研究论文

先天性肛门直肠畸形大鼠后肠发育中Fibronectin与 Laminin β1的表达及意义

吴芳^{1,2} 谷成超² 毕杨² 郭振华¹ 王佚^{1*} (¹重庆医科大学附属儿童医院胃肠新生儿外科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆),儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,重庆 400014; ²儿科学重庆市重点实验室,重庆市干细胞治疗工程技术研究中心,重庆 400014)

摘要 该文采用全反式维甲酸(ATRA)构建SD大鼠肛门直肠畸形模型(n=32),探究FN1(fibronectin 1)与LAMB1(laminin β1)在大鼠胚胎后肠发育过程的表达及意义。对照组与模型组均于E11.5~E16.5、E18.5、E20.5剖宫取胎,记录胎鼠身长、体质量、尾长、大体形态。qRT-PCR、Western blot、免疫组织化学检测FN1与LAMB1 mRNA及蛋白在对照组及模型组胚胎后肠发育中的表达。对照组生长发育指标在各个时间点均优于模型组,差异具有统计学意义(P<0.05)。FN1与LAMB1在胚胎后肠发育中呈连续动态表达。对照组中,qRT-PCR、Western blot、免疫组织化学结果显示二者表达高峰为E15.5,主要均匀分布于泄殖腔上皮黏膜层和基底膜。在模型组中,二者mRNA和蛋白表达水平在E11.5~E16.5均显著上调,表达高峰较对照组滞后出现在E16.5,差异具有统计学意义(P<0.05),免疫组织化学结果提示,二者在泄殖腔中呈现出高表达和分布不均匀的改变。与对照组相比,ATRA诱导的肛门直肠畸形模型组胚胎生长发育滞后,后肠发育中FN1与LAMB1表达上调且峰值延迟,可能与先天性肛门直肠畸形发生有关。

关键词 肛门直肠畸形; fibronectin; laminin β1; 胚胎发育

Expression and Significance of Fibronectin and Laminin β1 During the Developmental Hindgut in Rats with Anorectal Malformations

WU Fang^{1,2}, GU Chengchao², BI Yang², GUO Zhenhua¹, WANG Yi^{1*}

(¹Department of Neonatal Gastrointestinal Surgery, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders (Chongqing),

China International Science and Technology Cooperation base of Child development and Critical Disorders,

Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

²Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Chongqing 400014, China)

Abstract The aim of this paper is to investigate the expression and significance of FN1 (fibronectin 1) and LAMB1 (laminin β 1) in the development of hindgut in embryos with anorectal malformations (*n*=32), which

收稿日期: 2019-08-09 接受日期: 2019-11-06

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2018jcyjAX0230)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 023-63633113, E-mail: wy757311@hotmail.com

Received: August 9, 2019 Accepted: November 6, 2019

This work was supported by Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.cstc2018jcyjAX0230)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-23-63633113, E-mail: wy757311@hotmail.com

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5148

induced by ATRA (all-trans retinoic acid). Embryos were collected at E11.5-E16.5, E18.5, and E20.5 in control group and model group, with the length, weight, tail length, and gross morphology of the fetuses recorded. qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of FN1 and LAMB1 in the hindgut development of control group and model group. In control group, the data of length, weight, tail length were superior to the model group at each developmental time point, and the differences were statistically significant (P<0.05). FN1 and LAMB1 expressed continuously during the hindgut development with regular changing in both group. In control group, the results of qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry showed that the expression levels of the two genes reached the peak at E15.5 and most of the two proteins homogeneously distributed in the epithelial mucosa and basement membrane of the cloaca. In model group, the expression levels of both genes were significantly up-regulated in E11.5-E16.5, and the peaks appeared at E16.5 compared with control group, the differences were statistically significant (P<0.05). Immunohistochemistry results showed that both expressed highly with uneven distribution in the cloaca. Compared with control group, the embryo development of model group which induced by ATRA was delayed, and the expression of *FN1* and *LAMB1* were up-regulated with the peaks delayed during the hindgut development, which might be related to the form of anorectal malformations.

Keywords anorectal malformations; fibronectin 1; laminin β 1; embryo development

先天性肛门直肠畸形(anorectal malformations, ARMs)是小儿最常见的消化道畸形,在活产婴儿中 的发生率为(2~5)/10 000。ARMs病理类型复杂,包 含了从简单的的肛门狭窄到复杂的泄殖腔畸形等一 系列先天发育异常,伴或不伴其他并发畸形,被认为 是遗传因素和环境因素共同作用的结果。随着对胚 胎学、解剖学和生理学的认识,能够利用手术对现 有缺陷进行初步纠正,但该类疾病只有在出生后才 能确诊,至今其胚胎发生机制不清,且约有1/3的患 儿术后出现粪污、大便失禁等并发症,严重影响生 活质量^[1]。

ARMs是涉及多基因变化的累积效应,目前 国内外报道提示其发生可能与Shh、Fgf10、Hox、 Wnt5a等基因相关,它们共同调控着泄殖腔发育过程 中信号转导、细胞生理过程、发育分化等程序性生 物事件^[2-4]。FN1(fibronectin 1)与LAMB1(laminin β1) 二者作为细胞外基质(extracellular matrix, EMC)的 主要糖蛋白组分,在胚胎发育过程中维持细胞外微 环境稳定,既起着结构支持的作用,同时又调节细胞 的黏附迁移、增殖凋亡以及分化,但在后肠发育中 的表达及作用尚未明确^[5-7]。本研究拟通过检测FN1 及LAMB1在对照组和ATRA诱导的肛门直肠畸形 模型组后肠发育过程中的表达情况,为探究二者在 ARMs发生中的机制奠定了实验基础。

材料与方法 1.1 实验动物及试剂

8~10周SD雌鼠64只,体质量为(220~250)g购自 重庆医科大学实验动物中心。主要试剂:全反式维 甲酸(ATRA)购自Sigma公司;RNA提取试剂盒购自 北京百泰克生物技术有限公司;逆转录试剂盒购自 赛默飞世尔科技有限公司;引物合成购自华大基因; 抗β-actin、FN1、LAMB1抗体购自美国Bimake公司; 组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 构建ARMs动物模型 健康成熟己孕SD大 鼠在孕期10天(E10.5)行ATRA(all-trans retinoic acid, 120 mg/kg)灌胃处理,构建ARMs模型组大鼠共32只^[8]。 正常组32只孕鼠在E10.5予以等量玉米油灌胃。分别 于E11.5~E16.5、E18.5、E20.5每个发育时间点取正常 组和模型组各4只孕鼠CO₂麻醉处理后剖宫取胎,采集 胎鼠大体图片,并记录身长、体质量、尾长。部分胎 鼠于4%多聚甲醛中固定。部分胎鼠取其直肠(E16.5、 E18.5、E20.5)或骶尾部组织(E11.5~E15.5)于-80 °C 保存用于后续组织蛋白及mRNA提取。本研究已通 过重庆医科大学动物伦理审查委员会批准。

 qRT-PCR检测FN1、LAMB1在后肠发育中mRNA 表达 将所收集组织行匀浆处理,提取总RNA,紫 外分光光度计检测RNA浓度及纯度,符合要求后按 逆转录试剂盒说明逆转录合成cDNA后稀释5倍保 存于-20°C待用。采用Primer Premier 5.0设计引物。 *FN1*: F5'-AGA CCC TAC TGT GGA CC-3', R5'-TCT GTG CTA CTG CCT TC-3'; *LAMB1*: F5'-CCA TCA TTG GGT CAG GAG-3', R5'-GAG GCA CAG CCA TCA CAT-3'; *GAPDH*: F5'-TGG ATG GTC CCT CTG GAA-3', 5'-GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'。反应 条件: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 56°C 30 s, 共39个循环。 利用44Ct法行相对定量计算目的基因表达量。

1.2.3 Western blot检测FN1、LAMB1在后肠发育中 蛋白表达 按蛋白提取试剂盒说明进行所收集组 织蛋白提取, BCA定量后变性备用。采用8%分离 胶电泳,每孔蛋白样品总量40 μg,电泳后采用湿转 法转移蛋白至PVDF、封闭后一抗FN1(1:1 000)、 LAMB1(1:1 000)、β-actin(1:2 000)于4°C过夜孵育。 洗膜后,根据一抗来源选择相应的二抗(1:2 000)室 温孵育1 h,洗膜后使用ECL显影。采用ImageJ软件 进行灰度值分析,目的蛋白与内参蛋白的比值表示 蛋白的相对表达量。

E12.5

1.2.4 HE及免疫组织化学染色 4%多聚甲醛固定后的胎鼠经脱水、石蜡包埋后行矢状位连续切片,切片厚度为4μm。常规HE染色并于显微镜下确定肛门直肠畸形存在后,取E14.5~E16.5天切片,采用北京中杉金桥生物技术有限公司PV-9000两步法行FN1、LAMB1组织化学染色,结果采用定性判断,镜下观察可见免疫染色阳性的区域呈棕黄色或黄褐色。 1.2.5 统计学处理 应用SPSS 24.0软件行统计学分析,计量资料以平均值±标准差(x±s)表示,组间比较采用独立样本t检验。*P<0.05表示差异具有显著性意义,**P<0.01表示差异具有极显著性意义。

2 结果

正常对照组共取得胎鼠378只,无畸形发生;模型 组胎鼠361只,肛门直肠畸形发生率99.4%(359/361)。

2.1 胎鼠大体形态及生长发育指标

相对于正常对照组胎鼠,模型组胎鼠各发育时间点骶尾部均发育异常,表现为无尾或短尾, E16.5和E20.5体表未见肛门开口(图1)。身长、体质量、尾长在各发育时间点模型组均滞后于对照

E20.5



E16.5

A、C、E: 对照组; B、D、F: 模型组。箭头所示处为肛门开口。
 A,C,E: control group; B,D,F: model group. The anus opening is indicated by the arrow.
 图1 对照组与模型组胎鼠大体图

Fig.1 General view of embryos of control group and model group



*P < 0.05, **P < 0.01 compared with control group.

图2 胎鼠生长指标比较 Fig.2 Comparison of embryos growth index



图3 FN1及LAMB1 mRNA在对照组和模型组后肠发育中表达情况 Fig.3 mRNAs expression of FN1 and LAMB1 during hindgut development in control group and model group

组,在E16.5后差异更为显著,差异具有统计学意义 (P<0.05)(图2)。

2.2 qRT-PCR结果

两组中各个发育时间点均能检测到FN1、LAMB1 在尾肠中的表达。正常对照组中两个基因的表达随 时间逐渐升高,E15.5为二者的表达高峰,后逐渐下降。 模型组中E16.5为表达峰值,FN1在各个时间点的表达 水平均高于相应正常对照组,差异具有统计学意义 (P<0.01);LAMB1在E11.5~E16.5、E18.5表达水平显著 高于对照组(P<0.01),E20.5下降至正常水平(图3)。

2.3 Western blot结果

正常对照组中FN1、LAMB1蛋白呈持续动态 表达,均在E15.5达到峰值后逐渐下降。同对照组相 比,模型组中二者蛋白表达量明显上调,差异具有统 计学意义(P<0.01)。模型组中FN1与LAMB1表达峰 值均延迟出现在E16.5, FN1每个时间点表达量都显 著高于对照组,LAMB1在E16.5达到峰值后骤然下降,E20.5时回降至正常水平(图4)。

2.4 HE及免疫组织化学染色结果

HE染色结果显示,对照组胎鼠E16.5直肠与外 界相通,形成肛门开口。而模型组胎鼠直肠未与外 界相通,形成盲端或者开口于尿道形成直肠尿道瘘 (图5)。取肛门直肠发育关键时间点E14.5~E16.5胎 鼠切片行免疫组织化学染色。结果显示,对照组 E14.5时,FN1较均匀分布于泄殖腔黏膜上皮层细胞 外基质,LAMB1主要分布于基底膜;E15.5阳性表达 进一步增加,到E16.5阳性表达减弱,主要分布于直 肠黏膜层。模型组E14.5时,FN1与LAMB1分布出 现不均衡,主要聚集在泄殖腔中尿直肠隔(urorectal septum, USR)下方上皮层;E15.5天未见正常肛膜形 成,表现为一盲端(或瘘管),E16.5呈强阳性表达,分 布于直肠黏膜层及瘘管上皮(图5)。



图4 FN1和LAMB1蛋白在对照组和模型组后肠发育中的表达情况 Fig.4 Expressions of FN1 and LAMB1 during hindgut development in control group and model group

3 讨论

ARMs是儿童最常见的消化道畸形,但至今其胚胎期发生发展机制尚未完全阐明。近年来研究认为,泄殖腔结构发育异常是ARMs发生的形态学基础。泄殖腔作为胚胎后肠发育中的一暂时性结构,动物实验表明,尿直肠隔未能在特定时间内下降与泄殖腔膜融合将泄殖腔分割为泌尿生殖窦及直肠,则导致ARMs的出现^[9]。而尿直肠隔的程序性下降涉及到多基因调控,同时伴随着细胞黏附、迁移、增殖、凋亡、分化等生物学行为的发生,在此过程中若这些生物学事件时空规律性被打破,则泄殖腔构型发生异常,从而引发 ARMs^[10]。

Laminins是由α、β和γ三链组成的大异三聚体 多结构域蛋白家族,目前发现至少有16种不同的同 工异构体,多存在于基底膜,主要由上皮细胞及内皮 细胞产生,其中β1链参与至少6种亚型的构成,在结 直肠广泛分布^[7]。FN1是双链结构的大分子糖蛋白, 主要由中胚层来源细胞产生^[6]。二者作为重要的细 胞外基质组分,广泛存在于各种动植物的细胞表面、 细胞外液、结缔组织以及多数基底膜中。其生物学 功能除了介导细胞与基质的黏附^[11],同时与相应细 胞表面受体相互作用,激活下游信号通路,调控细胞 黏附和迁移、胚胎发育、肿瘤浸润、血管生成、组 织分化和伤口愈合等^[5,12-14]。国内外研究表明,FN1 及LAMB1在胚胎发育过程中,呈现动态的时空特异 性表达,调节着细胞增殖、凋亡、分化等生物学行 为的平衡^[15],特异性*LAMA5*基因敲除的小鼠其子代 在胚胎早期流产,并伴多种发育畸形^[7]。同时在一 些疾病过程中观察到,FN1及LAMB1的表达上调能 够减少细胞的凋亡率^[16-17],在后肠发育过程中,肛门 与外界相通依赖于特定时间肛门开口周围的细胞凋 亡,凋亡不足可致肛膜无法破裂形成ARMs^[18]。

本研究通过qRT-PCR和Western blot检测发现, 在后肠发育过程中, FN1与LAMB1表达具有时空的 特定性。正常对照组中,在泄殖腔发育早期,二者 表现出较为稳定的表达水平,在E13.5开始逐渐增 高,E15.5天达到顶峰,之后其表达开始下降至早期 水平。而在模型组中,FN1与LAMB1表达水平在各 个时间点均明显增高,表达水平峰值时间也较对照 组滞后,出现在肛门与外界相通的E16.5。通过免疫 组化结果发现,在对照组中,早期FN1与LAMB1主 要较均匀分布在泄殖腔上皮层及基底膜,肛门与外



A: 胎鼠HE染色; B: FN1免疫组化染色; C: LAMB1免疫组化染色。图中缩写字母R: 直肠; USR: 尿直肠隔; A: 肛门; F: 瘘管; U: 尿道。 A: fetal mouse HE staining; B: FN1 immunohistochemical staining; C: LAMB1 immunohistochemical staining. R: rectum; USR: urorectal septum; A: anus; F: fistula; U: urethra.

图5 胎鼠HE染色及FN1和LAMB1蛋白在对照组和模型组胎鼠泄殖腔的定位及表达情况 Fig.5 HE staining of embryos and the localization and expression of FN1 and LAMB1 in cloaca in control group and model group

界相通后主要表达在直肠黏膜层;而同时期的模型 组,二者在尿直肠隔末端上皮大量堆积,且在泄殖腔 其余部位的上皮或基膜表达阳性强度也明显增加, 提示FN1与LAMB1在泄殖腔发育过程中可能起到 不可或缺的作用。E14.5~E16.5是大鼠胚胎肛门发 育的关键时期,在此期间FN1与LAMB1在泄殖腔上 皮的异常增高堆积,不仅影响了泄殖腔细胞的增殖、 凋亡规律,使其不能在特定时间内发生相应的构型 变化,同时也可能提前促进泄殖腔上皮层细胞分化 成熟, 致尿直肠隔下降停滞, 不能顺利下降与泄殖腔 膜腹侧融合,从而阻碍直肠末端与外界相通,产生 ARMs。据报道, ATRA能够通过其受体与EMC蛋白 的启动子相互作用,调节参与EMC蛋白合成和降解 细胞因子的表达如转化生长因子- β 1(transforming g rowth factor-β1, TGF-β1), 或者修饰调节其他转录因 子等途径来下调EMC蛋白的表达[19-21]。同样地,大 量研究已经明确ATRA诱导的ARMs模型后肠维甲 酸受体α(RARα)表达较对照组缺乏^[22-23]。也进一步 说明了FN1与LAMB1在后肠中的异常增高干扰了 泄殖腔的程序性发育,可能与ATRA诱导的ARMs发 生相关。

综上,本研究发现,FNI与LAMBI在ARTA诱导的 ARMs模型胚胎的后肠发生过程中异常高表达且表达 峰值滞后,可能与ARMs的发生相关,这为后肠的发育 及ARMs的病因研究提供重要线索。在后续研究中, 我们拟检测二者在其他诱导ARMs模型中的表达情 况,进一步探究二者在肛门直肠发育中的作用。

参考文献 (References)

- GANGOPADHYAY A N, PANDEY V. Anorectal malformations
 J. J Indian Assoc Pediatr Surg, 2015, 20(1): 10-5.
- [2] MANDHAN P, QUAN Q B, BEASLEY S, et al. Sonic hedgehog, BMP4, and Hox genes in the development of anorectal malformations in ethylenethiourea-exposed fetal rats [J]. J Pediatr Surg, 2006, 41(12): 2041-5.
- [3] KRUGER V, KHOSHVAGHTI M, REUTTER H, et al. Investigation of FGF10 as a candidate gene in patients with anorectal malformations and exstrophy of the cloaca [J]. Pediatr Surg Int, 2008, 24(8): 893-7.
- [4] NAKATA M, TAKADA Y, HISHIKI T, et al. Induction of Wnt5aexpressing mesenchymal cells adjacent to the cloacal plate is an essential process for its proximodistal elongation and subsequent anorectal development [J]. Pediatric Res, 2009, 66(2): 149-54.
- [5] VEGA M E, SCHWARZBAUER J E. Collaboration of fibronectin matrix with other extracellular signals in morphogenesis and differentiation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2016, 42: 1-6.
- [6] PANKOV R, YAMADA K M. Fibronectin at a glance [J]. J Cell

Sci, 2002, 115(Pt 20): 3861-3.

- [7] MINER J H, YURCHENCO P D. Laminin functions in tissue morphogenesis [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 255-84.
- [8] 郭俊斌, 王练英, 张志波, 等. 维甲酸诱导大鼠产生肛门直肠畸形及其伴发畸形[J]. 中国优生与遗传杂志(GUO J B, WANG L Y, ZHANG Z B, et al. Anorectal malformation and accompanied malformations in rat fetuses induced by retinoic acid [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity), 2005, 13(1): 93-5.
- [9] GUPTA A, BISCHOFF A, PENA A, et al. The great divide: septation and malformation of the cloaca, and its implications for surgeons [J]. Pediatr Surg Int, 2014, 30(11): 1089-95.
- [10] GUPTA A, BISCHOFF A. Pathology of cloaca anomalies with case correlation [J]. Semin Pediatr Surg, 2016, 25(2): 66-70.
- [11] KALOGLU C, ONARLIOGLU B. Extracellular matrix remodelling in rat endometrium during early pregnancy: the role of fibronectin and laminin [J]. Tissue Cell, 2010, 42(5): 301-6.
- [12] DIGIACOMO G, TUSA I, BACCI M, et al. Fibronectin induces macrophage migration through a SFK-FAK/CSF-1R pathway [J]. Cell Adh Migr, 2017, 11(4): 327-37.
- [13] AMINI S, NIKRAVESH M R, JALALI M, et al. Effect of chronic sodium nitrite administration on the expression of fibronectin in interstitial tissue of mice testis An immunohistochemical study [J]. Biomedical Research, 2018, 29(1): 91-5.
- [14] DIAZ DE LA LOZA M C, DIAZ-TORRES A, ZURITA F, et al. Laminin levels regulate tissue migration and anterior-posterior polarity during egg morphogenesis in *Drosophila* [J]. Cell Rep, 2017, 20(1): 211-23.
- [15] LIN C, WERNER R, MA L, et al. Requirement for basement membrane laminin alpha5 during urethral and external genital development [J]. Mech Dev, 2016: S0925477316300405.
- [16] HU D, ANSARI D, ZHOU Q, et al. Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. World J Surg Oncol, 2019, 17(1): 29.
- [17] SCHWARZBAUER J E, DESIMONE D W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and *in vivo* functions [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(7). pii: a005041.
- [18] 张涛,张胜逆,李靖华,等.人类后肠及肛门直肠胚胎发育中 凋亡及细胞增殖的时空分布研究[J].河北医药(ZHANG T, ZHANG S R, LI J H, et al. Temporal and spatial distribution of apoptosis and cell proliferation in human hindgut and anorectal embryo development. Hebei Medicine), 2014, 36(23): 3541-4.
- [19] LIU X, LU L, TAO B B, et al. All-trans retinoic acid inhibits the increases in fibronectin and PAI-1 induced by TGF-beta1 and Ang II in rat mesangial cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(9): 1035-41.
- [20] BARBER T, ESTEBAN-PRETEL G, MARIN M P, et al. Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix [J]. Nutrients, 2014, 6(11): 4984-5017.
- [21] MCCARROLL J A, PHILLIPS P A, SANTUCCI N, et al. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis [J]. Gut, 2006, 55(1): 79-89.
- [22] BITOH Y, SHIMOTAKE T, KUBOTA Y, et al. Impaired distribution of retinoic acid receptors in the hindgut-tailgut region of murine embryos with anorectal malformations [J]. J Pediatr Surg, 2001, 36(2): 377-80.
- [23] LEE L M, LEUNG C Y, TANG W W, et al. A paradoxical teratogenic mechanism for retinoic acid [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(34): 13668-73.