

## • 基础研究 •

# 肥厚性幽门狭窄大鼠幽门中神经生长因子及其受体 TrkA、p75NTR 的表达

厦门大学附属福州第二医院检验科 (福州 350013) 陈 珊 陈文旭 徐 迪<sup>1</sup> 李立帜<sup>1</sup>

**【摘 要】 目的** 研究肥厚性幽门狭窄大鼠幽门中神经生长因子 (NGF) 及神经营养因子酪氨酸激酶受体 A (TrkA)、p75 神经营养因子受体 (p75NTR) 表达情况, 探讨 NGF 及其受体 TrkA 与 p75NTR 在先天性肥厚性幽门狭窄起病中的作用。**方法** 将受孕后的 SD 大鼠随机分为模型组与对照组, 模型组经尾静脉注射给予 N-硝基-L-左旋精氨酸甲酯 (L-NAME) 20 mg/(kg·d), 对照组经尾静脉注射给予同等剂量的生理盐水。新生鼠于出生后第 1、7、14 天与第 21 天分别称重, 生后第 2 天麻醉处死, 留取幽门组织。HE 染色后显微镜下测量幽门肌层厚度。实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测幽门组织中的 NGF 及其受体 TrkA 与 p75NTR 的 mRNA 表达水平。Western blot 检测幽门组织中的 NGF 及其受体 TrkA 与 p75NTR 的蛋白质表达水平。**结果** 与对照组新生鼠比较, 模型组新生鼠体质量增长明显缓慢, 体质量较低。模型组幽门肌明显肥厚。模型组新生鼠 NGF 的 mRNA 及蛋白表达显著减少; 模型组新生鼠 TrkA 与 p75NTR 的 mRNA 及蛋白表达显著减低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 幽门组织中 TrkA 与 p75NTR 降低及 NGF 的表达减少可能与先天性肥厚性幽门狭窄的发病有关。

**【关键词】** 先天性肥厚性幽门狭窄; 神经生长因子; TrkA; p75NTR

**【中图分类号】** R573 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)04-0134-03

**Expression of nerve growth factor and its receptors TrkA and p75NTR in mice with hypertrophic pyloric stricture** CHEN Shan, CHEN Wenxu, XU Di, LI Lizhi. Department of Clinical Laboratory, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350013, China

**【Abstract】 Objective** To study the expression of nerve growth factor (NGF), neurotrophic factor tyrosine kinase receptor A (TrkA) and p75 neurotrophic factor receptor (p75NTR) in the pylorus of mice with hypertrophic pyloric stenosis, and to explore the role of NGF and its receptors TrkA and p75NTR in the onset of congenital hypertrophic portal stenosis. **Methods** Pregnant SD mice were randomly divided into model group and control group. The model group was given 20 mg/(kg·d) of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) by tail vein injection, while the control group was given the same dose of normal saline through tail vein. The newborn mice were weighed on the 1st, 7th, 14th and 21st day after birth. The mice were killed on the 2nd day after birth. The thickness of pylorus muscle layer was measured under microscope after staining. Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of NGF, TrkA and p75NTR in pyloric tissue. Western blot was used to detect the protein expression of NGF, TrkA and p75NTR. **Results** Compared with the control group, the body weight of the model group was significantly slower than that of the control group. In the model group, the pyloric muscle was obviously hypertrophic. The expression of NGF mRNA and protein was significantly decreased in the model group, and the mRNA and protein expression of TrkA and p75NTR in the model group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The decrease of TrkA, p75NTR and NGF expression in pyloric tissue may be related to the pathogenesis of CHPS.

**【Key words】** congenital hypertrophic pyloric stenosis; nerve growth factor; TrkA; p75NTR

先天性肥厚性幽门狭窄 (congenital hypertrophic pyloric stenosis, CHPS) 是新生儿幽门环肌增生, 引起幽门管狭窄的一种上消化道梗阻疾病。CHPS 的发病机制复杂, 至今未明确。近期研究显示, 神经生长因子 (NGF) 受体参与到

CHPS 发病过程, 免疫组化研究证实在肥厚的幽门部肠神经系统支配异常<sup>[1]</sup>。但有关 CHPS 发病过程中 NGF 及其受体的变化有待进一步探索。本研究旨在探讨 NGF 在 CHPS 大鼠幽门肌及黏膜中的表达, 以及 NGF 相关受体的变化。

1 福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院小儿外科

## 1 材料与方法

### 1.1 材料:

1.1.1 实验动物: 成年 SPF 级 SD 大鼠 6 只, 其中雄鼠 2 只, 体质量约 250 g, 80~90 日龄; 雌鼠 2 只, 体质量 350~400 g, 90~110 日龄, 清洁级, 购自上海医学实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SYXK (沪) 2017-0003, 质量合格证号 0000419。动物使用协议已由审查委员会批准, 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准<sup>[1]</sup>。

1.1.2 主要试剂及耗材: N-硝基-L-精氨酸酯 (N-nitro-L-arginine methylester hydrochloride, L-NAME), 无 RNase 水购自北京奥森生物公司, 逆转录试剂盒等购自美国 Sigma 公司。

1.2 分组与动物模型建立: 野生型大鼠按雌: 雄比例 2: 1 合笼繁殖。所有母鼠保持饲养环境及饲料相同, 规律清晨取母鼠阴道涂片<sup>[1]</sup>, 妊娠第 1 天自镜检确认发现精子计算。一半数量的受孕母鼠随机分入模型组。按参考文献 [2] 的方法建立 CHPS 模型。相同数量的剩余受孕母鼠分入对照组。模型组接受尾静脉注射 L-NAME 处理, 注射时间从妊娠第 2 天开始, 剂量 20 mg/(kg·d)。对照组尾静脉注射给予等量生理盐水, 乳鼠出生 21 d 结束尾静脉给药。乳鼠生后母乳喂养, 新生鼠生后第 1、7、14、21 天按饲养笼位称重。两组母鼠孕期无显著差异, 均在 22~24 d, 对照组共生产乳鼠 9 只, 模型组共生产乳鼠 7 只。全部乳鼠均正常存活至出生后第 21 d, 乳鼠发育正常, 四肢完整, 营养良好。

1.3 取材及标本制作: 在新生鼠出生后第 21 天取材, 切除两份幽门组织, 立即取出其中一份经 10% 中性甲醛溶液处理固定, 另一份置于 -80℃ 环境长期保存, 固定, 染色后显微镜观察 HE 组织, 并测量幽门肌层厚度。

1.4 qRT-PCR 法检测 NGF 及其受体 TrkA、p75NTR 的 mRNA 表达: 所有实验乳鼠的幽门组织样本通过新鲜血液 RNA 快速提取试剂盒 (QIAGEN) 提取总 RNA<sup>[2]</sup>。根据 NGF 及其受体 TrkA、p75NTR 基因序列设计用于 RT-PCR 的引物。使用仪器配套分析软件 V2.02 进行分析以 U6-RNA 序列作为内参照<sup>[3]</sup>, 结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  来表示。

1.5 Western blot 法检测 NGF 及其受体 TrkA、p75NTR 蛋白表达: 采用蛋白质免疫印迹法进行检测。同一样本中蛋白与内参 GAPDH 蛋白条带的灰度值之比采用 Quantity one 软件分析。

1.6 统计学分析: 数据处理使用 SPSS 21.0 软件完成。计量资料使用平均数±标准差来表示, 组间差异比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组体质量增长情况: 与对照组乳鼠体质量增幅比较, 模型组乳鼠体质量增幅明显减小, 体质量较低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 两组乳鼠不同时间的体质量比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
对照组	9	6.11±0.35	12.02±2.34	25.03±6.34	33.9±4.13
模型组	7	5.39±0.49	9.12±0.69	16.37±1.04	23.9±3.29
<i>P</i> 值		0.003 2	0.000 1	0.000 2	0.004 5

2.2 模型组幽门肌增厚: 与对照组新生鼠幽门肌厚度 [(0.29±0.09) mm] 相比, 模型组新生鼠幽门肌 [(0.51±0.11) mm] 增厚。HE 染色显示, 模型组增厚组织主要以环形肌为主, 两组幽门肌厚度差异有统计学意义 ( $P = 0.003$ )。

2.3 模型组 NGF 及其受体 mRNA 水平异常: qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 模型组乳鼠的 NGF mRNA 减少, 而 TrkA 与 p75NTR 的 mRNA 降低, 见表 2。

表 2 两组 NGF、TrkA 与 p75NTR 的 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	NGF	TrkA	p75NTR
对照组	9	1.00±0.15	1.00±0.09	1.01±0.14
模型组	7	0.54±0.10	0.45±0.05	0.56±0.08
<i>P</i> 值		0.001 2	0.001 5	0.002 6

2.4 模型组 NGF 及其受体蛋白水平异常: Western blot 结果显示, 与对照组相比, 模型组乳鼠的 NGFmRNA 表达减少, 而 TrkA 与 p75NTR 的蛋白表达降低, 见表 3。

表 3 两组 NGF、TrkA 与 p75NTR 的蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	NGF	TrkA	p75NTR
对照组	9	1.02±0.09	1.12±0.09	1.01±0.11
模型组	7	0.58±0.13	0.32±0.03	0.09±0.04
<i>P</i> 值		0.002 3	0.003 5	0.002 6

## 3 讨论

CHPS 是一种先天性的胃肠道疾病, 具体发生机制并不完全清楚, 神经信号的传递异常是 CHPS

的疾病特征之一<sup>[4]</sup>。

本研究模型组雌鼠自孕期第 2 天给予尾静脉注射 NOS 抑制剂 L-NAME, 直至新生鼠出生后第 21 天。本研究关注了 NGF 下游的两个受体——TrkA 与 p75NTR, 并发现两者表达在 CHPS 幽门组织中显著下降, 提示存在一种可致幽门部肠神经系统发育异常的致病机制, NGF 及其受体下调可能起到关键作用。需要注意的是, 幽门肌细胞的来源并不完全清楚<sup>[5]</sup>, 可能主要来源于间充质细胞, 其与肌细胞交叉分布, 发挥过程中受到多种因素的影响。离体研究也发现, 肌间神经节细胞能够调节促进细胞轴突生长, 神经控制异常会导致肌肉无法松弛, 再通过过多的生长因子, 导致肌细胞增殖、肥大。其与 CHPS 的因果关系也不明确。有研究认为婴儿使用红霉素、妊娠期间母亲使用红霉素都可能增加 CHPS 发生风险, 但缺乏足够的循证证据。最后, CHPS 有明显的家族遗传倾向, 越来越多的证据显示, 遗传基因多态性可能与 CHPS 发病有关, 且不仅仅存在一个致病基因<sup>[6]</sup>, 这些基因是否参与 NGF 及其受体表达调节有待商榷。

本研究显示, CHPS 幽门组织的 NGF 及其受体表达异常, TrkA 与 p75NTR 的降低及 NGF 表达减少, 这种改变可能与 CHPS 的发病有关。关于 CHPS 发生机制主要为幽门肌改变、卡哈尔间质细胞发育异常、染色体及基因异常等<sup>[7]</sup>。常见的病理表现为幽门环形肌增生肥厚, 可合并多种畸形, 提示 CHPS 可能是一种多因性病变, 如其他畸形病因存在共性, 也存在特异性。幽门肌中多种生长因子及其受体表达明显增加, 肌肉中的神经末梢、肽能神经纤维等显著减少。神经胶质细胞有神经营养因

子作用, 而 NGF 及其受体在消化道的生理及病理过程中起到促进作用。无法发挥作用从而导致相关肌肉中的神经系统、肽能神经纤维发育不良, 平滑肌细胞增殖增生, 最终导致 CHPS 发生。

本研究为动物实验, 样本量有限, 影响一些评价指标, 将来拟扩大样本再进一步分析; 后续计划开展 CHPS 患儿的病理、分子生物学研究, 以进一步分析 NGF 与 CHPS 的关系。

综上所述, NGF 与 CHPS 具有因果关系, 而二者的结合点是 CHPS 引发的 NGF 受体表达降低, 具体表现为 TrkA 与 p75NTR 的表达降低, 这为深化 CHPS 机制研究提供了实验证据。

#### 参考文献

- [1] 蔡本龙, 张又祥. 先天性肥厚性幽门狭窄手术方式研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2016, 43 (3): 201-203.
- [2] 李万福, 马柱, 李朝旺, 等. 腹腔镜幽门环肌切开术与开腹手术治疗先天性肥厚性幽门狭窄有效性和安全性 Meta 分析 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28 (18): 1433-1436.
- [3] 曲颜, 刘远梅. 胶质细胞源性神经营养因子在肠神经系统中的作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29 (5): 384-386.
- [4] 高颜, 王春晖, 林燕, 等. 红霉素对胃食管反流幼兔模型胃肠道动力作用的影响 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31 (07): 491-495.
- [5] Gezer H Ö, Oguzkurt P, Temiz A, et al. Hypertrophic pyloric stenosis in twins; genetic or environmental factors [J]. Clin Genet, 2015, 87 (4): 388-391.
- [6] Boybeyi O, Soyer T, Atasoy P, et al. Investigation of the effects of chrm Horm ones Oil the pyloric muscle in newborn rats [J]. J Pediatr Surg, 2015, 50 (3): 408-412.
- [7] 魏颖, 张又祥, 张榕培, 等. 肝细胞生长因子在先天性肥厚性幽门狭窄大鼠幽门中的表达 [J]. 广东医学, 2015, 36 (12): 1855-1858.

#### • 基础研究 •

## 肿瘤相关成纤维细胞经 FGF19/FGFR4 信号轴调控结肠癌细胞生长的实验研究

福建医科大学省立临床学院 福建省立金山医院普外科 (福州 350007) 杨国华 郑圣斌 林彩锋 黄若磊

**【摘要】目的** 探讨肿瘤相关成纤维细胞 (CAF) 通过 FGFR4/FGF19 信号轴调控结肠癌生长可能机制。**方法** 将研究对象分为 3 组, 分别是细胞组、细胞+NF 组、细胞+CAF 组。绘制各组癌细胞生长曲线, 采用 ELISA 法检测细胞外 FGF19 因子浓度变化。**结果** 癌细胞与 CAF 共培养后, 癌细胞生长率明显提高, 与其他组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 细胞外 FGF19 因子浓度明显提高, 与其他组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** CAF 通过促进结肠癌细胞分泌 FGF19 因子, 促进癌细胞分裂生长。