

先天性巨结肠患儿平面细胞极性通路核心基因的突变筛查

苏琳¹ 姜茜² 蔚开慧³ 李 颀⁴ 张 震⁴ 肖 萍⁵ 姜 宏¹

摘要 目的 探讨平面细胞极性(PCP)信号通路核心基因突变在人类先天性巨结肠(HSCR)疾病发生中的作用。方法 收集83例HSCR患儿外周血,提取基因组DNA,对PCP通路的核心基因(*CELSR3*、*FZD3*、*VANG1*、*VANG2*、*PRICKLE1*、*PRICKLE2*、*DVL1*、*DVL2*)进行目标区域捕获及二代测序,针对检出的可疑致病性突变进行PCR扩增及Sanger测序验证,通过GeneTool软件及生物信息学网站进行数据分析。结果 83例患儿中,9例患儿存在PCP通路核心基因突变,阳性率为10.8%,突变的核心基因分别为:*CELSR3*基因 c.7724A>G(H2575R)、c.6613G>A(A2205T)、c.1961C>T(T654M)、c.2230G>A(V744M)和 c.8615C>G(A2872G);*PRICKLE1*基因 c.113C>T(P38L)和 c.797C>T(T266I);*DVL2*基因 c.319C>T(R107W)和 c.1276G>T(V426L)。数据分析提示上述突变为有害突变。结论 PCP通路核心基因突变导致的编码蛋白功能异常可能参与了HSCR疾病的发生。

关键词 先天性巨结肠;平面细胞极性通路;基因突变;*CELSR3*

中图分类号 R 394.1; R 715.2; R 715.5; R 714.7; R 714.55
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1534-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.031

先天性巨结肠(Hirschsprung disease, HSCR)是一种多基因、多因素参与的神经嵴细胞源性疾病^[1],属于典型的肠神经系统(enteric nervous system, ENS)先天发育异常性疾病,是导致功能性肠梗

阻最常见的小儿消化道畸形。其发病率存在种族差异,欧洲人群约为15/100 000,亚洲人群最高,我国属于高发病率国家^[2]。目前研究^[3-4]显示并确定的14个基因的累积突变仅能解释不足20%患者的发病原因,提示其他致病基因或危险因子可能参与了HSCR的发病。PCP通路在进化上非常保守,从果蝇到哺乳动物都包括一组共同的核心基因,在脊椎动物中主要包括*Fzd3*(*Frizzled 3*)、*Celsr3*(*fmi*)、*Vangl*、*Dvl*和*Prickle*等。其在原肠胚形成、轴突导向以及树突形成等过程中均发挥重要作用^[5]。有文献^[6]报道,*Celsr3*和*Fzd3*基因中任何一个缺失均可导致ENS轴突导向紊乱和胃肠道蠕动异常,症状与人类HSCR高度相似。但目前尚无直接证据证明PCP通路核心基因异常与人类HSCR的发生具有相关性。该研究旨在探讨HSCR患者PCP通路核心基因的突变频率、类型以及相应临床表型,为进一步阐明PCP信号通路在人类ENS发育及HSCR发病中的作用,并提供相应证据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2013年4月~2015年5月在北京首都儿科研究所附属儿童医院普通外科诊治的83例HSCR患儿作为研究对象,其中男51例,女32例;年龄10 d~10.8岁(1.17 ± 1.77)岁,除1例有HSCR家族史外,其余均为散发病例,其中全结肠型HSCR 32例,长段型HSCR 19例,短段型HSCR 32例。

1.2 方法

1.2.1 PCP通路核心基因捕获及二代测序 利用目标区域捕获、测序法对8个PCP通路核心基因(*CELSR3*、*FZD3*、*VANG1*、*VANG2*、*PRICKLE1*、*PRICKLE2*、*DVL1*和*DVL2*)的外显子及外显子-内含子交接区进行检测。

1.2.2 DNA提取及全基因组文库制备 应用德国Qiagen公司试剂盒(the QIAamp DNA Blood Midi Kit)提取患儿静脉血基因组DNA,随机打断(Bi-orupter),纯化长度150~250 bp之间的片段,T4 DNA Polymerase、T4 phosphorylated polynucleotide ki-

2016-05-30 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81300266);北京市自然科学基金面上项目(编号:7142029);北京市优秀人才培养个人项目(编号:2013D003034000007);北京市科技新星(编号:Z151100000315091)

作者单位:¹安徽医科大学解放军临床学院生殖中心,合肥 230031

²首都儿科研究所遗传研究室、儿童发育营养组北京市重点实验室,北京 100020

³广西医科大学基础医学院病理生理学教研室,南宁 530021

首都儿科研究所附属儿童医院⁴ 新生儿外科、⁵ 病理科,北京 100020

作者简介:苏琳,女,硕士研究生;

姜宏,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:jiangh105@sina.com

nase 和 *Eseheriehia coli* DNA 聚合酶 Klenow 片段对纯化后的 DNA 片段进行末端修复,按照美国 Illumina 公司二代测序仪的操作说明在片段两端加上 A 碱基及接头(adaptor) 磁珠纯化。

1.2.3 杂交 对纯化后的模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物与自主设计的特异性探针(GenCap Custom Enrichment Kit ,北京迈基诺基因科技有限责任公司) 杂交 22 h ,目标片段因与特异性探针结合而被捕获,洗脱未杂交的片段,保留在探针上的目标片段再进行次行捕获 PCR 以显著增加目标片段的数量。

1.2.4 生物信息学分析 本实验中使用的芯片捕获区包含 8 个 PCP 通路相关基因的外显子及其侧翼序列 100 bp。Illumina Pipeline(version 1.8.2) 获取高通量测序原始数据,去除低质量的数据后利用 BWA(Burrows wheeler aligner) 将“干净的”读序与人类基因组参考序列比对(UCSC ,hg19) ,再分别通过 SOAPsnp 和 GATK 软件收集 SNP 和 InDel。本实验中样品基因的平均测序深度约为 $266.8 \times$,捕获区覆盖度达 95% 以上。参考 dbSNP 数据库、Hapmap、千人基因组数据库及 ESP(NHLBI Exome Sequencing Project) 正常对照人群数据库,找出致病性点突变,将频率小于 0.05 的变异视为可疑。

1.2.5 PCP 通路核心基因罕见突变的验证 应用在线 PRIMER 3 软件对序列比对发现的突变位点逐一设计引物(表 1)。PCR 扩增,反应体系(50 μ l) 为: 10 ng/ μ l DNA 模板 15 μ l、20 μ mol/L 上、下游引

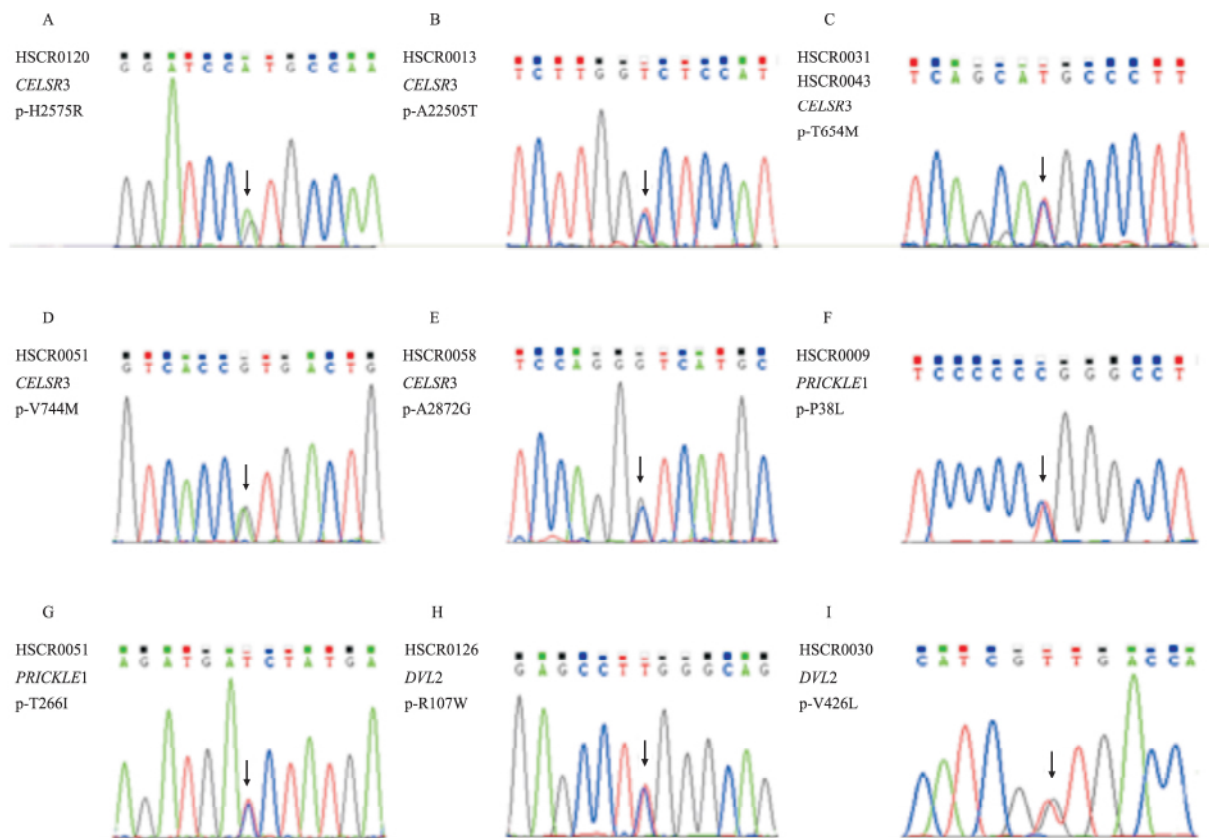
物各 2 μ l、10 $\times$ PCR buffer 5 μ l、2.5 mmol/L dNT-Pmix 5 μ l、Takara Taq 酶 0.5 μ l、去离子水 20.5 μ l。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min ,35 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s ,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s ,68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s) ,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。PCR 扩增产物纯化,双向测序(北京诺赛基因组研究中心有限公司) 突变位点分析。

2 结果

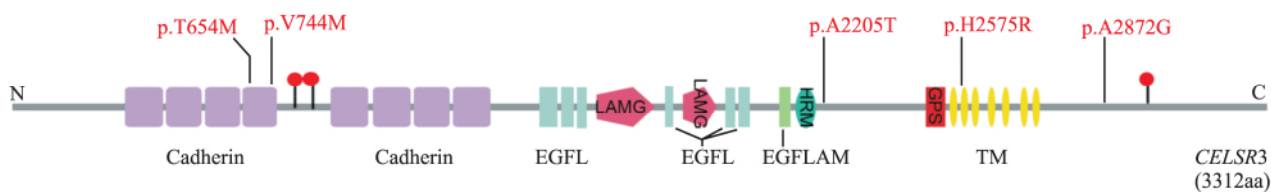
2.1 PCP 通路核心基因突变分析 83 例 HSCR 患儿中 9 个患儿中共检出 3 个基因的 9 个错义突变,全部为杂合突变(图 1),阳性率为 10.8%。6 例患儿发现 *CELSR3* 基因 5 个错义突变位点,分别为: c. 7724A > (H2575R) 、c. 6613G > A (A2205T) 、c. 1961C > T (T654M) 、c. 2230G > A (V744M) 、c. 8615C > G(A2872G) ,其中 2 例患儿(HSCR0031 和 HSCR0048) 同时出现 c. 1961C > T(T654M) 错义突变,且突变位点位于 *CELSR3* 基因编码蛋白的一个 Cadherin 功能域(图 2) ,其临床类型分别为长段型和全结肠型巨结肠(巨结肠合并胆总管囊肿) ,病情均较严重。2 例患儿 *PRICKLE1* 基因出现 c. 113C > T(P38L) 和 c. 797C > T(T266I) 2 个错义突变,另 2 例患儿 *DVL2* 基因出现 c. 319C > T(R107W) 和 c. 1276G > T(V426L) 2 个错义突变。9 例患儿中 1 例(HSCR0051) PCP 通路两个核心基因 *CELSR3* 和 *PRICKLE1* 同时发生错义突变,突变位点分别为 c. 2230G > A(V744M) 和 c. 797C > T(T266I) ,其携带

表 1 PCP 通路核心基因罕见突变位点验证引物信息

基因名称	错义突变位点	氨基酸变化	引物序列(5'-3')	PCR 产物长度(bp)
<i>CELSR3</i>	c. 7724A > G	His2575Arg	F: CCCATCAACCATCCCTGTCT R: CCTGATTGTGGGTCTGTGA	234
	c. 6613G > A	Ala2205Thr	F: TAAGGGACCACAGAGCAACC R: ACCTCATTGAAGTGGGCATC	250
	c. 1961C > T	Thr654Met	F: CTTTCGAGGCAGAGAGAGACT R: ATTCTCCCCATGGTCTGCAT	223
	c. 2230G > A	Val744Met	F: GTGTGGCACCTGATACTCCT R: CCACAGCTGCATCCTCATTC	240
	c. 8615C > G	Ala2872Gly	F: GCACTCAAAGACACTCCAGC R: CCCAACTCCACCAGCATCT	198
<i>PRICKLE1</i>	c. 113C > T	Pro38Leu	F: GGAGCCCAAGATGAGCAAAC R: AGGACTGAGGAGGGTGGTAT	240
	c. 797C > T	Thr266Ile	F: AGGCACACTCACAATACAGA R: ACTGGGCACAAGAAAAGCAG	246
<i>DVL2</i>	c. 319C > T	Arg107Trp	F: ACTTACTGCCACCTGTCACA R: CCTCCCCTGCAGTCAAGAAT	245
	c. 1276G > T	Val426Leu	F: CTGTTACCCGTTGTCTCCT R: CATTCTGGCTTTGTCTCACC	172

图1 *CELSR3*、*PRICKLE1*、*DVL2* 的 9 个错义突变位点 Sanger 测序验证

A: HSCR0120 患者 *CELSR3* 基因错义突变位点: c. 7724A > G (H2575R); B: HSCR0013 患者 *CELSR3* 基因错义突变位点: c. 6613G > A (A2205T); C: HSCR0031 和 HSCR0048 患者 *CELSR3* 基因错义突变位点: c. 1961C > T (T654M); D: HSCR0051 患者 *CELSR3* 基因错义突变位点: c. 2230G > A (V744M); E: HSCR0058 患者 *CELSR3* 基因错义突变位点: c. 8615C > G (A2872G); F: HSCR0009 患者 *PRICKLE1* 基因错义突变位点: c. 113C > T (P38L); G: HSCR0051 患者 *PRICKLE1* 基因错义突变位点: c. 797C > T (T266I); H: HSCR0126 患者 *DVL2* 基因错义突变位点: c. 319C > T (R107W); I: HSCR0030 患者 *DVL2* 基因错义突变位点: c. 1276G > T (V426L)

图2 *CELSR3* 基因编码蛋白模式图及本研究发现的 5 个错义突变位置

的 c. 2230G > A (V744M) 突变位点也位于 *CELSR3* 基因编码蛋白的 Cadherin 功能域,该患儿临床分类为长段型巨结肠,病情严重。Sanger 测序法的验证结果与 2 代测序完全吻合。全部错义突变位点的信息见表 2。

2.2 PCP 通路核心基因突变患儿的临床表型
PCP 通路核心基因突变共累及 9 例患儿,男 7 例,女 2 例,男性明显多于女性(3.5 : 1),与 HSCR 发生的性别比接近。患儿临床分型分别为短段型 4 例,长

段型 3 例,全结肠 2 例,长段型和全结肠型患儿的就诊年龄早于短段型。见表 3。

3 讨论

HSCR 是一种多基因、多因素参与的复杂性疾病,可散发,也可呈家族性遗传。目前已经鉴定的 14 个疾病易感基因主要来自 ENS 发育中起主要作用的 3 个信号通路 (RET、EDNRB 和 SEMA3C/D)^[2],以及可调控、影响这些基因表达的转录因子

表2 HSCR 患者 PCP 通路核心基因错义突变位点信息

基因名称及 外显子位置	染色体 位置(hg19)	突变位点		氨基酸 改变	保守性		生物信息学预测			变异等位基因频率(%)		
		dbSNP 号	碱基改变		分析 GERP	SIFT	Poly Phen_2	Mutation Taster	ESP	ExAc (East Asian)	Inhouse	
<i>CELSR3</i> E24	chr3: 48682949	rs375670832	c. 7724A > G	His2575Arg	5. 25	0. 22(Tolerated)	1 (Probably _ damaging)	1 (Disease _ cau- sing)	0. 000 154	0. 000 117	-	
<i>CELSR3</i> E18	chr3: 48686316	-	c. 6613G > A	Ala2205Thr	5. 34	0. 01(Damaging)	0. 994 (Proba- bly _damaging)	1 (Disease _ cau- sing)	-	0. 000 116	-	
<i>CELSR3</i> E1	chr3: 48698107	rs140688880	c. 1961C > T	Thr654Met	5. 57	0(Damaging)	1 (Probably _ damaging)	1 (Disease _ cau- sing)	0. 000 384	0. 005 567	0. 001 332	
<i>CELSR3</i> E1	chr3: 48697838	rs184868266	c. 2230G > A	Val744Met	4. 76	0. 04(Damaging)	0. 997 (Proba- bly _damaging)	0. 998 (Disease _ causing)	-	0. 002 429	0. 001 997	
<i>CELSR3</i> E31	chr3: 48679841	-	c. 8615C > G	Ala2872Gly	3. 91	0. 53(Tolerated)	0. 606 (Proba- bly _damaging)	0. 645 (Disease _ causing)	-	-	-	
<i>PRICKLE1</i> Exon2	chr12: 42866206	rs145493619	c. 113C > T	Pro38Leu	5. 27	0. 01(damaging)	1 (Probably _ damaging)	1 (Disease _ cau- sing)	-	0. 004 869	-	
<i>PRICKLE1</i> Exon7	chr12: 42859039	-	c. 797C > T	Thr266Ile	5. 12	0. 03(damaging)	0. 422 (Be- nign)	1 (Disease _ cau- sing)	-	-	-	
<i>DVL2</i> Exon3	chr17: 7133695	-	c. 319C > T	Arg107Trp	5. 38	0. 03(damaging)	0. 999 (Proba- bly _damaging)	0. 845 (Disease _ causing)	-	0. 000 462	-	
<i>DVL2</i> Exon12	chr17: 7130810	-	c. 1276G > T	Val426Leu	4. 76	0. 01(damaging)	0. 887 (Proba- bly _damaging)	1 (Disease _ cau- sing)	-	0. 000 231	-	

表中的变异等位基因频率的数据分别来自 ESP、ExAc 和北京迈基诺基因科技有限责任公司自建数据库等 3 个正常对照人群数据库的数据

表3 PCP 通路基因罕见突变累及患者的临床信息

患者编号	突变基因/位点	年龄	性别	临床分型
HSCR0120	<i>CELSR3</i> / c. 7724A > G	3 个月	女	短段型
HSCR0013	<i>CELSR3</i> / c. 6613G > A	5. 1 岁	男	短段型
HSCR0031	<i>CELSR3</i> / c. 1961C > T	1. 5 岁	男	长段型
HSCR0048	<i>CELSR3</i> / c. 1961C > T	8 个月	男	全结肠型
HSCR0051	<i>CELSR3</i> / c. 2230G > A	11 个月	男	长段型
HSCR0058	<i>CELSR3</i> / c. 8615C > G	4. 1 岁	男	短段型
HSCR0009	<i>PRICKLE1</i> / c. 113C > T	1. 5 岁	女	短段型
HSCR0051	<i>PRICKLE1</i> / c. 797C > T	11 个月	男	长段型
HSCR0126	<i>DVL2</i> / c. 319C > T	4 个月	男	全结肠型
HSCR0030	<i>DVL2</i> / c. 1276G > T	1. 8 岁	男	全结肠型

编码基因和其他几个在神经系统发育中已明确具有重要作用的基因。目前该病研究主要集中在与信号通路相关的肠神经嵴细胞发育以及肠道微环境等方面,关注神经网络形成、神经突起导向等方面的研究尚少。研究^[7]表明 PCP 信号通路在中枢神经系统和外周神经系统的发育过程中如神经元迁移、轴突导向和树突形成等方面均起着不可或缺的作用。*Celexr3* 和 *Fzd3* 基因敲除小鼠研究^[6]也已证实 PCP 通路参与了小鼠肠神经系统的形成,推测 PCP 通路核心基因的功能异常可能与人类 HSCR 的易感性增高有关。本研究采用二代测序方法对 83 例患儿的 PCP 通路核心基因进行筛查,在 9 个患儿中发现了 3 个基因的 9 个杂合错义突变,其中 6 例存在 *CELSR3* 基因的有害突变,2 例存在 *PRICKLE1* 基因的有害突变,2 例存在 *DVL2* 的有害突变,1 例患儿

同时存在 *CELSR3* 基因和 *PRICKLE1* 基因的 2 个突变。全部 9 个错义突变累及的位点都具有高度保守性,平均 GERP 分值达到 5.04 (最低 3.91,最高 5.57),且在正常人群数据库中均未出现或者出现频率极低。

CELSR3 基因编码蛋白是长度超过 3 000 个氨基酸的非典型钙黏蛋白,其胞外域极大,其中 8 个 N 末端重复钙黏结构域 (Cadherin) 在细胞迁移中起重要作用^[8]。神经嵴细胞是肠神经嵴细胞的祖细胞,其迁移障碍可导致其下游发生一系列变化,而 *CELSR3* 基因 N 端钙黏结构域可激活 PCP 通路并导致细胞极性变化,一旦发生错义突变可影响其蛋白功能,进而干扰其调控神经嵴细胞迁移功能^[9]。*CELSR3*^{-/-} 小鼠模型研究^[6]证实,突变小鼠病变段结肠呈现神经元迁移、轴突导向异常等多种障碍,其肠道运动功能的改变、排便障碍都和人类 HSCR 患者的临床表现高度相似。本研究 *CELSR3* 基因 5 个突变位点中有 2 个位于 N 末端重复钙黏结构域内, HSCR0031 和 HSCR0048 患儿均存在编码区 1961 位“C”、“T”碱基互换,导致其编码的氨基酸由苏氨酸变成蛋氨酸,患儿表现为长段型巨结肠; HSCR0051 患儿编码区 2230 位“G”、“T”碱基互换,导致其编码的氨基酸由缬氨酸变成蛋氨酸 (图 2),患儿表现为全结肠型巨结肠,3 例患儿病情均较严重。

作为 PCP 通路的核心基因, *PRICKLE1* 基因编

码的蛋白由 831 个氨基酸构成,主要参与神经突的生长和神经元的迁移^[10]。HSCR0009 患儿编码区 113 位“C”、“T”碱基互换,导致其编码的氨基酸由脯氨酸变成亮氨酸,HSCR0051 患儿编码区 797 位“C”、“T”碱基互换,导致其编码的氨基酸由苏氨酸变成异亮氨酸。*DVL2* 同样是 PCP 通路的核心基因,编码蛋白由 736 个氨基酸构成,HSCR0126 患儿编码区 319 位“C”、“T”碱基互换,导致其编码的氨基酸由精氨酸变成色氨酸;HSCR0030 患儿编码区 1276 位“G”、“T”碱基互换,导致其编码的氨基酸由缬氨酸变成亮氨酸。由于 PCP 通路的核心基因间相互紧密关联,任何一个基因的缺失或者功能受损都将影响其它核心蛋白的功能^[7],因此 *PRICKLE1* 和 *DVL2* 基因的错义突变可能会干扰 PCP 通路在 ENS 发育中的正常作用,参与 HSCR 的发生。

综上所述,本研究通过对 83 例 HSCR 患儿 PCP 通路核心基因突变筛查,在 9 例患儿中检出 3 个核心基因的 9 个杂合突变位点,其编码蛋白的受累氨基酸均高度保守且在正常人群中发生率极低,提示 PCP 通路核心基因编码蛋白的功能异常可能是 HSCR 发病的原因之一,或可显著增加其发病的易感性。鉴于本研究的病例样本数有限,尚不能得出确切结论,有待于进一步增加样本量,并从蛋白表达、信号转导功能等多方面进行深入研究,以揭示人类 ENS 发育和 HSCR 发生的确切机制。

参考文献

[1] Heanue T A, Pachnis V. Enteric nervous system development and

Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(6): 466–79.

- [2] Jiang Q, Arnold S, Heanue T, et al. Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with ret are critical to Hirschsprung disease liability [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 96(4): 581–96.
- [3] Kapoor A, Jiang Q, Chatterjee S, et al. Population variation in total genetic risk of Hirschsprung disease from common RET, SEMA3 and NRG1 susceptibility polymorphisms [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(10): 2997–3003.
- [4] Eichler E E, Flint J, Gibson G, et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(6): 446–50.
- [5] Tissir F, Goffinet A M. Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(8): 525–35.
- [6] Sasselli V, Boesmans W, Vanden Berghe P, et al. Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(4): 1763–72.
- [7] Goodrich L V. The plane facts of PCP in the CNS [J]. *Neuron*, 2008, 60(1): 9–16.
- [8] 曲宜波, 周立兵. 非典型钙粘蛋白 *Celsr1-3* 在神经系统发育和 PCP 中的功能 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2012, 33(4): 344–50.
- [9] Obermayr F, Hotta R, Enomoto H, et al. Development and developmental disorders of the enteric nervous system [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(1): 43–57.
- [10] Yang T, Bassuk A G, Stricker S, et al. Prickle1 is necessary for the caudal migration of murine facial [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(3): 549–61.

Mutation screening of the core genes in planar cell polarity pathway in patients with Hirschsprung disease

Su Lin¹, Jiang Qian², Yu Kaihui³, et al

(¹Reproductive Medicine Center, The Clinical College of PLA Affiliated Anhui

Medical University, Hefei 230031; ²Dept of Medical Genetics, Beijing Municipal Key Laboratory of Child Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020; ³Dept of Pathophysiology, School of Preclinical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

Abstract Objective To investigate the effect of core genes mutation in planar cell polarity (PCP) pathway on the pathogenesis of Hirschsprung disease (HSCR). **Methods** 83 Chinese children with HSCR were recruited in this study after obtaining informed consents, and genomic DNA of all subjects was extracted from peripheral blood. The suspected mutations of 8 core genes (*CELSR3*, *FZD3*, *VANGL1*, *VANGL2*, *PRICKLE1*, *PRICKLE2*, *DVL1*, *DVL2*) in PCP pathway were verified by Sanger sequencing after the next generation sequencing. The raw data were analyzed with the molecular biological websites and the GeneTool software. **Results** Heterozygous missense mutations were

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:49 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.032.html>

TPO、CD56 和 GPC-3 表达在甲状腺乳头状癌中的诊断价值

席民^{1,2}, 胡向阳^{1,3}, 郑丽⁴, 汪巧^{1,3}

摘要 目的 探讨甲状腺过氧化物酶(TPO)、神经细胞黏附分子(CD56)与磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC-3)蛋白表达在甲状腺乳头状癌中的诊断价值。方法 采用免疫组织化学 Envision 两步法检测 80 例甲状腺乳头状癌和 77 例甲状腺良性病变中 TPO、CD56 和 GPC-3 蛋白的表达。结果 80 例甲状腺乳头状癌中的 TPO、CD56 和 GPC-3 的阳性表达率分别为 11.2%、8.8%、88.8%, 77 例甲状腺良性病变中的阳性表达率分别为 88.3%、93.5%、2.6%, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。三项标记物中,以 CD56 诊断灵敏度最高,达 93.5%;以 GPC-3 诊断特异度最高,达 97.4%。甲状腺乳头状癌中 TPO、CD56 和 GPC-3 蛋白的表达与患者性别、年龄、肿瘤直径、淋巴结转移等临床病理参数间均无相关性。结论 TPO、CD56 和 GPC-3 在甲状腺乳头状癌与甲状腺良性病变的鉴别诊断中均有重要价值,联合检测尤其是联合灵敏度最高的 CD56 及特异度最高的 GPC-3,更能提高甲状腺乳头状癌诊断的准确性。

关键词 甲状腺乳头状癌; TPO; CD56; GPC-3

中图分类号 R 736.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)10-1539-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.032

甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺恶性肿瘤中最常见的类型,其病理诊

断主要依据乳头状结构、砂砾体、毛玻璃样核、核沟、核内包涵体等典型特征。然而,一些甲状腺良性病变亦可伴有乳头状增生或毛玻璃样核;一些非经典型 PTC 也可无典型核特征,从而给 HE 染色下区分 PTC 与某些甲状腺良性病变带来困难,故寻找能够帮助鉴别诊断的分子标志物显得十分必要。该研究采用免疫组织化学法检测甲状腺过氧化物酶(thy-ropoxidase, TPO)、神经细胞黏附分子(CD56)与磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(glypican 3, GPC-3)在 PTC 与甲状腺良性病变中的表达状况,探讨其对二者鉴别诊断的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选取安徽医科大学第一附属医院 2013 年~2015 年期间的 PTC 标本 80 例,男 16 例,女 64 例;年龄 16~83 岁,中位年龄 50 岁。伴有淋巴结转移者 24 例,不伴有淋巴结转移者 56 例。另收集同期手术切除的甲状腺良性病变 77 例(结节性甲状腺肿 35 例、甲状腺腺瘤 21 例、桥本氏甲状腺炎 11 例),男 14 例,女 63 例;年龄 22~76 岁,中位年龄 49 岁。

1.1.2 主要抗体与试剂 TPO、CD56、GPC-3 单克隆抗体(均为即用型、鼠抗人抗体)、二抗及 DAB 显色液等均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 方法 所有手术切除标本经组织处理,石蜡包埋后切片,切片厚度约 4 μm 。采用 Envision 免疫组化两步法检测 TPO、CD56、GPC-3 抗体在 PTC 和甲状腺良性病变中的表达状况。选用已知阳性切片作为阳性对照, PBS 代替一抗做阴性对照。

2016-05-19 接收

基金项目: 国家临床重点专科建设项目经费资助(编号: 3101005004021)

作者单位: ¹安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

²滁州城市职业学院病理教研室,滁州 233100

³安徽医科大学第一附属医院病理科,合肥 230022

⁴合肥市第二人民医院病理科,合肥 230011

作者简介: 席民,男,硕士研究生;

胡向阳,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yf-hxy2013@163.com

identified in 9 subjects with a detection rate of 10.8% (9/83). They were: *CELSR3* gene c. 7724A > G (H2575R), c. 6613G > A (A2205T), c. 1961C > T (T654M), c. 2230G > A (V744M) and c. 8615C > G (A2872G); *PRICKLE1* gene c. 113C > T (P38L) and c. 797C > T (T266I); *DVL2* gene c. 319C > T (R107W) and c. 1276G > T (V426L), and all of them had not been reported before. Bioinformatic analysis demonstrated that all these mutations were deleterious and might be the risk factors for pathogenesis. **Conclusion** Abnormal function of PCP core genes may be possible risk factor for the pathogenesis of HSCR.

Key words Hirschsprung disease; planar cell polarity; gene mutation; *CELSR3*