

# AQP1 在先天性巨结肠肠壁的表达及其意义



甘 亮<sup>1</sup> 杨文萍<sup>2</sup> 张守华<sup>1</sup> 徐红艳<sup>2</sup> 曾 华<sup>2</sup> 陶俊峰<sup>1</sup> 陈 快<sup>1</sup>  
黄金狮<sup>1</sup> 陶 强<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 本研究应用免疫组织化学染色方法,观察先天性巨结肠症(Hirschsprung's disease, HD)患儿有神经节细胞肠段、无神经节细胞肠段及非 HD 小儿肠壁(对照组)中水通道蛋白-1(AQP1)的表达结果,探讨 AQP-1 在先天性巨结肠症的表达意义及其在 HD 发病机理中可能起到的作用。**方法** 收集江西省儿童医院小儿外科 2009—2014 年经手术切除的 HD 肠组织标本 65 例,包括扩张段与痉挛段;将 21 例年龄与之相仿的非 HD 患儿的手术切除结肠标本作为对照组。分别对 HD 痉挛段、扩张段、对照组肠壁组织切片进行 HE 染色和 AQP1、组织蛋白酶 D 和 S100 的免疫组织化学染色,通过计算机成像系统照相存盘,分别判定 AQP1 在各组肠组织黏膜下、肌间神经丛中阳性细胞染色面积的百分比,所得数据用 SPSS 19.0 统计软件包进行处理分析。**结果** ①对照组、HD 的扩张段经 HE 和组织蛋白酶 D 和 S100 免疫组化染色,均证实神经节细胞存在;痉挛段未见神经节细胞(图 1,2);②对照组、HD 痉挛段、扩张段肠组织中见 AQP1 表达于所有血管内皮细胞;③在正常结肠、HD 扩张段肠组织黏膜下丛、肌间神经丛中,神经节细胞和雪旺细胞均可见 AQP1 呈阳性表达,HD 痉挛段相应部位 AQP1 表达大多呈阴性(90.2%),仅少量呈弱阳性表达;④半定量分析:AQP1 在神经丛中阳性染色评分,HD 痉挛段评分低于 HD 扩张段评分,二者间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** AQP1 在 HD 痉挛段和正常结肠、HD 扩张段肠壁神经丛的表达有显著差异,我们推测在肠道神经系统发育过程中,AQP1 对神经节细胞迁移具有一定的调控作用,在 HD 的发病机理中扮演了一定角色并可能成为一种新的诊断 HD 的神经标志物。

**【关键词】** Hirschsprung 病;水通道蛋白质 1;免疫组织化学

**The expression and its significance of AQP-1 in the intestinal wall of Hirschsprung's disease.** GAN Liang<sup>1</sup>, YANG Wen-ping<sup>2</sup>, ZHANG Shou-hua<sup>1</sup>, et al. Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006, China, Department of pediatric surgery. Corresponding author: Tao Qiang, E-mail: taoqiang\_2008@126.com

**【Abstract】 Objective** To explain the possible pathogenesis of ENS defection in HD, we now reveal the abnormal expression of a water channel protein, which named Aquaporin-1 (AQP-1), in intestinal wall of Hirschsprung's disease and the potential role AQP-1 played in the development of HD. **Methods** Specimens were collected from resected colon in both aganglionic bowel segments and ganglionic segments of 65 HD patients. The Colon in the control group colon was resected from 21 age-matched patients without HD. All specimens underwent haematoxylin and eosin (HE) staining, followed by immunostaining for AQP-1, Cathepsin D and S-100. Positively stained area density was evaluated at 400 magnification, calculating the sum of the areas which occupied on the basis of the positively stained area in plexuses. **Results** ①The ganglionic cells were detected in the dilated Segments of HD and tissue of control group, which is failed in narrow segments by HE, also in immunohistochemical staining of Cathepsin-D and S-100; ②AQP-1 was strongly positive in Endothelial cells both within the aganglionic and ganglionic gut and control group. ③In the ganglionic cells and Schwann Cells of the dilated segments, AQP-1 was positive both in the Auerbach plexuses and Meissner plexuses but negative in most of (about 90.2%) the narrow group. ④Semi-quantitative analysis showed that the positive staining area

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.02.006

基金项目:江西省卫生计生委基金资助项目(项目号:20141124)

作者单位:江西省儿童医院新生儿外科,(江西省南昌市,330006),1,新生儿外科;2,病理科,通讯作者:陶强, E-mail: taoqiang\_2008@126.com

percentage of AQP-1 has significant differences between the narrow segments and the dilated segments of HD ( $P < 0.001$ ). **Conclusions** AQP-1 immunohistochemical staining was strongly positive in ganglionic cells both in the dilated segments group and the normal colon but mostly negative in the narrow segments group. We presumably that AQP-1 may play a important role in the intestinal nerve cells migration to induce the development of HD thus AQP-1 can be useful as one of the neuronal markers for the diagnosis of HD.

**【Key words】** Hirschsprung Disease; Aquaporin 1; Immunohistochemistry

先天性巨结肠症(Hirschsprung's disease, HD)是小儿常见疾病,存活婴儿中发病率约为 1/5 000,居先天性消化道畸形第二位。应用 HE 和组织蛋白酶 D 和 S100 免疫组化染色发现,HD 主要病理改变是远端的狭窄肠管内肌间神经丛(Auerbach 丛)和粘膜下神经丛(Meissner 丛)内神经节细胞缺如,神经纤维增粗<sup>[1]</sup>。近年来我院新生儿外科逐步实行快速康复外科技术,对 1—4 月 HD 患儿住院期间的康复起到一定的积极作用<sup>[2]</sup>。但是,HD 病患术后远期的肠道功能恢复,包括自主排便恢复、生存生活质量及社会活动等预后指标,与术前病理病变类型之间并没有必然联系。HD 的发病机制尚不十分清楚,一般认为是胚胎发育过程中肠神经嵴细胞迁移障碍或迁移后不能正常生长分化所致。而细胞的生长和转移与其微环境相关,为了满足细胞增殖和侵袭的需要,其成分合成需要较正常细胞更多水份的参与。水通道蛋白家族是近年来发现对水有特异性通透的小分子跨膜蛋白家族,它所介导水的快速的跨膜转运,是水进出细胞的主要途径。本研究应用免疫组织化学方法观察水通道蛋白(aquaporin-1, AQP-1)在 HD 肠壁的表达情况,根据结果分别对其进行定性分析。目的在于了解 HD 的病理生理改变,探讨 HD 发病机制。

## 材料与方法

### 一、临床资料

病例组标本来自江西省儿童医院 2009 年 1 月至 2014 年 3 月手术并经病理检查证实的 65 例 HD 患儿肠组织,按照巨结肠痉挛段(无神经节细胞段)、扩张段(有神经节细胞段)分类。住院时年龄 10 d~12 岁(平均 13.1 个月)。男 41 例,女 24 例。所有病例均为散发性,其中 8 例伴先天性心脏病,3 例伴腹股沟斜疝,近系亲属无 HD 患儿。对照组选取年龄相似的肠套叠肠坏死、肛门外伤结肠造瘘患儿,共 21 例,将手术切除的结肠标本作为对照组,患儿均不合并 HD,家族中也没有患 HD 的病例。

### 二、方法

1. 主要试剂:兔抗人 AQP-1 一抗,组织蛋白酶 D 和 S100 均购自武汉博士德生物工程有限公司;二步法免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

2. 方法:分别对收集的 HD 痉挛段、扩张段、对照组肠壁组织切片进行常规 HE 染色、AQP-1、组织蛋白酶 D 和 S100 免疫组化染色。

3. 结果判定:光镜下发现棕黄色沉淀物为阳性反应,其密度及部位即为抗原的多少与分布,选择肌间神经丛,分别记录 4 种神经标志物在肠道表达的部位、分布和特点,采用半定量方法记录不同组的各种标志物在细胞体的表达强度,3 分为表达明显,2 分为表达,1 分表达微弱,0 分为不表达。成像系统摄取图像,存盘,判定 AQP-1 在对照组、HD 扩张段与痉挛段神经丛中评分。

### 三、统计学方法

全部病理切片均随机取肠壁黏膜下和肌间中 5 个高倍视野,由有经验的病理医师进行阳性染色结果鉴定,计算机图像分析软件分别计算 5 个视野中的神经丛中棕黄色染色面积所占百分率以及评分,再取平均数。所有数据均用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各指标在 HD 扩张段、痉挛段、对照组肠壁组织免疫组化染色阳性评分采用方差分析,应用 SPSS 19.0 统计软件分析。

## 结果

### 一、HE 染色结果

正常对照组肠壁和 HD 的扩张段均可见典型的成熟神经节细胞并易于辨认;HD 痉挛段未见神经节细胞。

### 二、免疫组化染色结果

1. 正常对照组肠壁和 HD 的扩张段经组织蛋白酶 D 和 S100 均证实神经节细胞存在;痉挛段未见神经节细胞。

2. HD 痉挛段、扩张段、对照组肠组织中所有血管内皮细胞均表达 AQP1(图 1,图 2)。

3. 在正常结肠及 HD 扩张段肠组织黏膜下、肌间神经丛中,神经节细胞和雪旺细胞 AQP1 呈阳性表达(图 3,图 4)。

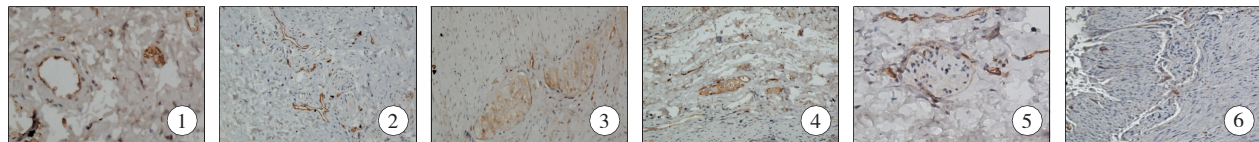


图 1 正常结肠管壁血管内皮细胞 AQP1 阳性表达( $\times 400$ ); 图 2 HD 痉挛段肠管壁血管内皮细胞 AQP1 阳性表达( $\times 200$ ); 图 3 正常结肠管壁肌间丛 AQP1 阳性表达( $\times 400$ ); 图 4 HD 扩张段肠管壁黏膜下丛 AQP1 阳性表达( $\times 200$ ); 图 5 HD 痉挛段肠管壁黏膜下丛 AQP1 阳性表达( $\times 400$ ); 图 6 HD 痉挛段肠管壁肌间丛 AQP1 阳性表达( $\times 200$ )

**Fig. 1** Normal colon of control group: AQP-1 is positive in *vascular endothelial cells* ( $\times 400$  magnification); **Fig. 2** Narrow segment of HD group: AQP-1 is positive in *vascular endothelial cells* ( $\times 200$  magnification); **Fig. 3** Normal colon of control group: AQP-1 is positive in *Auerbach plexus* ( $\times 400$  magnification); **Fig. 4** Dilated segment of HD group: AQP-1 is positive in *Meissner plexus* ( $\times 200$  magnification); **Fig. 5** Narrow segment of HD group: AQP-1 is positive in *Meissner plexus* ( $\times 400$  magnification); **Fig. 6** Narrow segment of HD group: AQP-1 is positive in *Auerbach plexus* ( $\times 200$  magnification)

5. 选取免疫组化染色后有效图像分析标本各 12 例, AQP1 在三组肠组织神经丛中的综合评分显示: 狭窄段组 ( $224.78 \pm 23.24$ ), 扩张段组 ( $239.49 \pm 18.72$ ), 对照组 ( $293.49 \pm 24.62$ ),  $F$  值:  $F = 31.36$ . AQP1 在正常以及 HD 扩张段结肠肠组织神经丛明显高于 HD 痉挛段肠组织 ( $P < 0.01$ )。

## 讨论

先天性肠无神经节细胞症 (aganglionosis) 是临床表现以便秘为主, 病变肠管神经节细胞缺如的一种消化道发育畸形, 又称先天性巨结肠 (congenital megacolon; HD hirschsprung's disease); 其发病率约  $1/2\ 000 \sim 5\ 000$ , 男女比例约  $4:1$ , 约 30% 合并染色体异常; 无神经节细胞症肠壁肌间神经丛中神经节细胞缺如, 是由于胚胎期 6~12 周时, 外胚层神经嵴细胞迁移发育过程停顿所致<sup>[1]</sup>. 1967 年日本 OKA-MOTO 与 UEDA 实验证明, 神经嵴的神经母细胞从头端到尾端的方向, 移行到消化道壁内, 从而形成肌间神经丛和黏膜下神经丛; 整个移行过程停顿越早, 无神经节细胞段越长, 因此, 探索肠道神经节细胞迁移停顿的时间节点和影响因素至关重要。

雪旺细胞属于外周胶质细胞的一种, 在神经系统中, 胶质细胞扮演许多不同的角色。有些细胞的主要功能是替神经元提供物理性支持, 有些则为神经元提供养分及氧气, 并维持周围液体环境恒定。亦有胶质细胞可形成髓鞘以维持绝缘的效果、或是摧毁病原体, 并移除死亡的神经元。除此之外, 胶质在神经发育上也扮演了重要角色, 可于发育早期引导神经元的迁移, 并分泌可影响轴突及树突生长的

4. HD 痉挛段肠组织黏膜下、肌间神经丛中 AQP1 大多表达阴性 (90.2%), 仅少量呈弱阳性表达 (9.8%) (图 5, 图 6)。

分子, 并在突触可塑性和突触发生 (synaptogenesis) 的过程中扮演关键的角色。另外一个显著作用, 就是控制减少细胞体积, 允许细胞从胞质中移除过多的水分, 试图维持水平衡, 这些显著的水分外排, 就是通过特殊的水通道进行的, 叫做 AQP<sub>s</sub><sup>[3]</sup>。

目前, 在中枢神经系统多见 AQP<sub>s</sub> 的报道, 但在周围神经系统的报道少见, 周围神经系统中的 AQP<sub>s</sub> 种类目前尚有争论<sup>[4]</sup>. Masato Nagahama 在小鼠回肠的 ENS 中, 发现了 AQP1 免疫阳性 (AQP1-IR) 表达在一些特殊的神经细胞亚型中; 这些 AQP1-IR 神经元同时表达神经元性特异标记物 HuC/D, 大部分 AQP1-IR 神经元表达在肌间丛 (Myenteric 丛), 但很少发现于黏膜下丛 (Submucosal 丛)<sup>[5]</sup>. Gao 等进一步在食管中做了 AQP1 的检测, 发现在胶质细胞中表达, 且在胰腺神经丛和食管黏膜下及肌间神经丛中均呈强阳性表达, 而在神经元细胞内则为阴性表达<sup>[6]</sup>。

临床实践中, 用于 HD 的诊断和鉴别诊断的常用免疫组化标记包括 S-100、组织蛋白酶 D 等, 这些标记物定位准确, 特异性强, 特别是在术中快速冰冻免疫组化法在先天性巨结肠术中诊断及鉴别诊断有重要的应用价值<sup>[7,8]</sup>. 鉴于 AQP-1 在神经系统的表达情况, 我们以 HD 病人的病变肠管做病理研究, 结果发现了类似现象, 在正常结肠肠管壁、HD 的扩张段肠管肌间丛中的神经节细胞以及雪旺细胞可见 AQP1 强阳性表达, 黏膜下丛染色相对较浅; 在狭窄段肠管肌间及黏膜下神经丛均未见雪旺细胞 AQP1 阳性表达, 提示 AQP1 在 HD 肠道神经系统的表达具有差异性, 特别是在雪旺细胞中, 这点和 HD 病变本身的神经节细胞缺如分布情况相吻合, 由此我们

猜测: AQP1 的特定部位表达缺失,是否通过影响雪旺细胞,改变维持神经节细胞发育、迁移的微环境,从而假设 AQP1 的差异表达与 HD 肠管的神经元迁移停顿之间具有某种联系。

AQP1 与细胞转移的现象最初是在小鼠移植黑色素瘤试验中被证实的。在中枢神经系统, AQP1 与恶性胶质瘤的形成及血管再生、代谢都有密切的联系<sup>[4,9,10]</sup>。但是 AQP 是如何促进细胞迁移的分子机制尚不明确,2008 年 Papadopoulos 等提出了两种理论,一是 AQPs 通过促进边缘细胞的细胞膜前段突出形成而促使细胞迁移<sup>[4,11]</sup>;细胞迁移中 AQP1 促进水分通过细胞膜内流,伴随着肌动蛋白的聚合和离子内流,细胞质浓度增加,形成静水压力的变化从而导致细胞膜扩张。在这些迁移细胞的前段,可见 AQP1 极性表达现象, AQP1 介导水分的特异性快速进出,静水压力局部增加,为肌动蛋白的重新聚合提供空间,促进了迁移细胞的前段突出形成和固定。AQP1 在内皮细胞膜上极性表达是细胞迁移的重要机制<sup>[12]</sup>。如果没有 AQPs 发生细胞前段突出形成,迁移的过程将很缓慢,因为大多数细胞膜脂质双层结构对水是中等通透的<sup>[13,14]</sup>。第二种理论,细胞的迁移通过快速改变细胞形状以及体积来实现, AQPs 通过调控细胞体积的变化来影响细胞迁移,不需要依赖肌动蛋白<sup>[11]</sup>。理论上水分子进出细胞前后边缘的比例不同,足以产生驱动细胞朝着低渗透压移动的力量,不需要借助肌动蛋白<sup>[13,15]</sup>。

这些研究结果提示, AQP 依赖的胶质细胞转移是一种普遍现象, AQP1 在迁移细胞膜前缘呈极性表达,和细胞迁移的突出形密切相关<sup>[13,16]</sup>。在 ENS 的发育过程中,肠神经元前体细胞到达肠管后再分化为肠神经元有一个时间差,无论时间的多短,都能够为嵴源性前体细胞提供与肠道微环境相互作用的机会,而 AQPs 可能会通过引导胶质细胞的增值迁移来调节局部内环境稳态,为肠道局部神经元前体细胞的生长提供合适的环境,引导神经元前体细胞的迁移、生长和成熟,从而为解释 HD 患者神经元迁移停顿提供一条新的思路。但是, AQP-1 在 ENS 中的促进神经元前体细胞迁移的上下游效应通路,以及与其他影响肠神经元生长迁移的细胞因子之间的相互作用,尚需进一步的研究证据支持。

## 参 考 文 献

1 施诚仁,小儿外科学[M].第4版,北京:人民卫生出版

- 社,2009(8):312.
- 2 陶俊峰,黄金狮,陶强.快速康复外科技术在1~4月龄婴儿巨结肠根治术中的应用[J].临床小儿外科杂志,2014,13(6):484-487.
- 3 Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, et al. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein[J]. Science, 1992(256):385-387.
- 4 Albertini Roberta1, Bianchi Rossella. Aquaporins and Glia [J]. Current Neuropharmacology, 2010(8):84-91.
- 5 Masato Nagahamaa, Ning Ma, Reiji Semba. Satoru Naruse. Aquaporin1 immunoreactive enteric neurons in the rat ileum [J]. Neuroscience Letters, 2006, (395):206-210.
- 6 Hongwen Gao. Localization of Aquaporin-1 Water Channel in Glial Cells of the Human Peripheral Nervous System [J]. GLIA, 2006, (53):783-787.
- 7 徐红艳,曾松涛,黄金狮.术中快速冰冻免疫组化在先天性巨结肠诊断中的应用价值[J].中华小儿外科杂志, 2012,33(4):312-313.
- 8 牛丽文,林智峰,陶强.先天性小肠闭锁肠壁肌层病变和肌动蛋白表达的临床研究[J].临床小儿外科杂志, 2006, 5(1):31-36.
- 9 Oshio K, Binder DK, Liang Y, et al. Expression of the aquaporin-1 water channel in human glial tumors [J]. Neurosurgery, 2005, (56):375-381.
- 10 Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, et al. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours [J]. Br. J. Cancer, 2002, (87):621-623.
- 11 Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism [J]. Int. Rev. Psychiatry, 2005(17):485-495.
- 12 Samira Saadoun, Marios C. Papadopoulos. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption [J]. NATURE, 2005, (434):786-792.
- 13 Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration [J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2008(456):693-700.
- 14 Charras GT, Yarrow JC, Horton MA, et al. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells [J]. Nature, 2005, (435):365-369.
- 15 Jaeger M, Carin M, Medale M, et al. The osmotic migration of cells in a solute gradient [J]. Biophys J, 1999, (77):1257-1267.
- 16 Barber MA, Welch HC. PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration [J]. Bull Cancer, 2006, (93):E44-E52.