

水通道蛋白3、8、9在结肠大部切除大鼠剩余结肠黏膜中的表达

张国平, 袁维堂

张国平, 袁维堂, 郑州大学第一附属医院肛肠外科 河南省郑州市 450052

张国平, 主要从事结肠肿瘤的研究.

河南省杰出青年基金资助项目, No. 084100510017

作者贡献分布: 此课题在袁维堂的指导下由张国平设计; 动物的饲养、结肠大部切除大鼠模型的制作及手术后的管理、术后大鼠粪便含水量测定及PCR等由袁维堂全程指导, 并协助张国平完成关键环节; 实验数据的整理分析由张国平完成; 本论文写作由张国平完成; 袁维堂负责审核.

通讯作者: 袁维堂, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市二七区建设东路1号, 郑州大学第一附属医院肛肠外科.

ywt555@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-06-05 修回日期: 2013-07-11

接受日期: 2013-07-18 在线出版日期: 2013-08-18

Expression of AQP3, 8 and 9 in the residual colonic mucosa of rats with extensive colon resection

Guo-Ping Zhang, Wei-Tang Yuan

Guo-Ping Zhang, Wei-Tang Yuan, Department of Colorectal Surgery of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Outstanding Youth Foundation of Henan Province, No. 084100510017

Correspondence to: Wei-Tang Yuan, Professor, Chief Physician, Department of Colorectal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Erqi District, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. ywt555@yahoo.com.cn

Received: 2013-06-05 Revised: 2013-07-11

Accepted: 2013-07-18 Published online: 2013-08-18

Abstract

AIM: To examine the expression of Aquaporins (AQPs) 3, 8 and 9 in the residual colonic mucosa of rats with extensive colon resection.

METHODS: Thirty-two healthy adult SD rats were randomly and equally divided into either a control group or an experimental group. Under general anesthesia, resection of about two-thirds of the colon was performed 5.0 cm from the ileocecal junction, followed by an end-to-end anastomosis with a single-layer 6/0 polypropylene suture. The animals were allowed to eat 24 h

after the surgery, and the water content of feces was determined. Rats of the experimental group were killed on days 14 and 28 after surgery, and those of the control group were killed on day 28 to take colonic mucosal samples. RT-PCR was used to determine the expression of AQPs 3, 8 and 9.

RESULTS: After surgery, the water content of feces increased. The relative expression levels of AQPs 3, 8 and 9 were significantly lower in the control group (day 28) than in the experimental group (days 14 and 28) (AQP3: 0.352, 0.425 vs 0.614, both $P < 0.01$; AQP8: 0.425, 0.518 vs 0.733, both $P < 0.01$; AQP9: 0.422, 0.516 vs 0.632, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: After extensive colon resection, expression of AQPs 3, 8 and 9 in the remaining colon increases, which may accelerate the absorption of water and increase the moisture of feces.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Extensive colon resection; Aquaporin; Colonic mucosa; Rats

Zhang GP, Yuan WT. Expression of AQPs 3, 8 and 9 in the residual colonic mucosa of rats with extensive colon resection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(23): 2315-2319 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2315.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i23.2315>

摘要

目的: 探索大鼠结肠部分切除术后, 水通道蛋白(aquaporin, AQP)3、8、9在剩余结肠黏膜中的表达变化.

方法: 健康成年SD大鼠32只, 随机分为对照组、实验组, 各16只; 对照组为假手术组; 实验组全麻下距回盲部5.0 cm处切除约2/3结肠, 6/0无创缝线间断单层端端吻合肠管, 术后禁食、水24 h, 然后正常喂养; 检测粪便含水量情况; 实验组术后14和28 d随机处死各6只,

■背景资料

近年结直肠肿瘤发病率逐年上升, 涉及结肠切除的患者较多, 术后腹泻是常见的并发症, 患者痛苦不堪. 水通道蛋白(aquaporin, AQP)作为结肠内转运水分的重要跨膜蛋白, 在水分的主动转运中作用巨大. 结肠缩短, 载体蛋白的数量下降, 与结肠水代谢能力降低关系密切, 国内外有关AQP在消化系统的研究较多, 但有关结肠切除术后, 剩余结肠内AQP的表达与粪便含水量情况, 报道较少.

■同行评议者

刘颖斌, 主任医师, 上海交通大学医学院附属新华医院

■研究前沿

AQP在人体不同组织的定位及表达,一直是国内外研究的热点。本文通过大鼠结肠大部切除模型,试图研究AQP3、8、9在术前及术后不同时段表达与粪便含水量的关系,以期从分子生物学角度寻找术后腹泻的可能原因。若能人为干预术后AQP3、8、9的表达,进一步研究粪便的含水量情况,可能更加具有临床研究价值。

提取结肠黏膜,冻存待检;对照组假手术后28 d全部处死,提取结肠黏膜,冻存待检;按RT-PCR方法检测结肠黏膜AQP3、8、9 mRNA的表达情况。

结果: (1)实验组大鼠术后粪便含水量增加; (2)对照组、实验组术后第14天和术后第28天目的基因条带与内参条带灰度值之比平均值分别为: AQP3为0.352、0.425、0.614($P<0.01$); AQP8为0.425、0.518、0.733($P<0.01$); AQP9为0.422、0.516、0.632($P<0.01$)。

结论: (1)结肠大部切除术后粪便含水量增加,术后时间延长,粪便含水量开始减少; (2)剩余结肠AQP3、8、9表达量增加,在一定程度上加速了结肠对水分的吸收。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 结肠大部切除; 水通道蛋白; 结肠黏膜; 大鼠

核心提示: 建立大鼠结肠大部切除模型,对照组与术后不同时段组比较,发现术后粪便含水量增加,术后时间延长,粪便含水量开始减少,水通道蛋白(aquaporin)3、8、9表达量增加可能加速了结肠水分的代谢。

张国平, 袁维堂. 水通道蛋白3、8、9在结肠大部切除大鼠剩余结肠黏膜中的表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(23): 2315-2319
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2315.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i23.2315>

0 引言

水通道蛋白(Aquaporin, AQP)又名水孔蛋白,是一种位于细胞膜上的蛋白质,在细胞膜上组成孔道,可控制水在细胞的进出。自1988年Agre等发现了这种特殊的蛋白质后,人们通过免疫组织化学、RT-PCR等研究发现在哺乳动物中有13种AQP亚型(AQP0-AQP12)^[1,2]。国内外文献报道AQP3、8、9等存在结肠^[3-6],与结肠水分吸收和分泌有密切关系。因结肠病变切除结肠后腹泻的发生率达5%-30%^[7],患者需要经历一段艰难的代偿期^[8],在此期间AQPs表达发生了如何变化,其表达变化是否与代偿有关,目前罕有文献报道。

1 材料和方法

1.1 材料 健康12周龄Sprague-Dawley(SD)大鼠32只,体质量250-300 g,雌雄各半,由郑州大学动物中心提供,实验动物合格证编号: SCXK(豫)

2010-0002,大鼠随机分为对照组和实验组,各16只;3组大鼠性别、年龄及体质量的差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性(表1);全部大鼠均单笼饲养。盐酸氯胺酮注射液,为本次实验的麻醉剂,由陕西正康医药化工有限公司提供;RNA提取液TRIzol(美国Invitrogen公司)提供;Thermo RT Kit cDNA、2×Taq PCR MasterMix试剂盒(北京TianGen公司);Marker、50×TAB电泳液(中国Solarbio公司);SD大鼠AQP3、8、9及 β -actin的基因序列由NCBI中的Genbank获得,由华大基因研究中心设计完成,并通过NCBI BLAST核对其特异性(如表2所示);其他的相关材料由当地购买。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立: (1)两组大鼠术前禁食24 h,不禁水;对照组腹腔注射氯胺酮全麻,开腹后不切除肠管,常规关腹,禁食水24 h后,自由进食; (2)氯胺酮按10 mg/kg剂量,对实验组大鼠行腹腔注射全麻;麻醉完成后,将其固定在恒温手术台上,给予气管插管和股动脉插管,以保证大鼠呼吸通畅和监测动脉血压;术区备皮消毒,取正中切口,先找到大鼠结肠,距回盲部5.0 cm处切除约2/3结肠,用6/0无创缝线间断单层端端吻合肠管,缝合结肠系膜,用普通丝线逐层关腹,关腹前腹腔内注射青霉素钠20万单位,术毕将大鼠放入代谢笼; (3)实验组大鼠术后24 h,自由进食水^[9],大鼠结肠大部切除模型建立; (4)实验组术后死于吻合口漏4只,其余在结肠切除术后的第14天和28天随机处死各6只,提取结肠黏膜冻存;对照组假手术后第28天全部处死,提取结肠黏膜冻存。

1.2.2 RNA的提取及RT-PCR: (1)大鼠禁食不禁水24 h,氯胺酮腹腔注射麻醉,由腹正中切1:3入腹,截取结肠黏膜,置入液氮中冻存;按照TRIzol提取RNA试剂盒说明提取组织中的总RNA,用普通凝胶电泳成像系统检测其完整性;按照cDNA试剂盒的说明对其反转录;按照PCR扩增试剂盒的要求,对目的DNA扩增; (2)PCR扩增反应:取以上逆转录产物1 μ L,依次加入Forward Primer 1 μ L(10 mmol/L)、Reverse Primer 1 μ L(10 μ mol/L),2×Master Mix 12.5 μ L,ddH₂O补至总体积为25 μ L;扩增条件:94 $^{\circ}$ C,3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;TM(AQP3:56 $^{\circ}$ C;AQP8:55 $^{\circ}$ C;AQP9:58 $^{\circ}$ C; β -actin:61 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 1 min,一个循环,共35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸5 min;4 $^{\circ}$ C保存。置于1.5%琼脂糖凝胶中电泳36 min,条带在凝胶成像

■相关报道

国内外有关“慢传输型便秘”患者结肠内AQP的变化情况,观察到了AQP3表达量的下调,以减少对水分的主动转运;还有关于通过HgCl₂和CuSO₄抑制大鼠结肠AQP3的表达,从而导致了大鼠持续的腹泻,也证明了AQP在结肠水分主动转运中的重要作用。

表 1 对照组及实验组大鼠性别、年龄及体质量统计学比较 (mean ± SD)

分组	性别		周龄(wk)	体质量(g)
	♀	♂		
对照组	8	8	12	252.68 ± 7.07
实验组	8	8	12	251.44 ± 4.47
统计量	$\chi^2 = 0.00$		$t = 0.00$	$t = 0.568$
P值	>0.05		>0.05	>0.05

表 2 目的基因及内参引物核苷酸序列

基因	上游引物	下游引物	扩增长度(bp)
AQP3	TCTCGGGCTAAAAACGCTCC	GAGCTACGCCCTCTTATGC	455
AQP8	TGGCATGTCTGGTATGAGC	TTCTCATTGACGGCACCCAT	422
AQP9	TCACCTCCAGAGATCCGTGT	ACTCCATCCTTCCAAAGGCG	421
β -actin	TCAGGTCATCACTATCGGCAAT	AAAGAAAGGGTGTAACGCA	332

AQP: 水通道蛋白.

表 3 对照组与实验组结肠黏膜AQP3、8、9灰度值比平均值 (mean ± SD)

分组	n	AQP3	AQP8	AQP9
对照组	16	0.352 ± 0.232	0.425 ± 0.102	0.422 ± 0.099
术后14 d组	6	0.425 ± 0.071	0.518 ± 0.100	0.516 ± 0.112
术后28 d组	6	0.614 ± 0.066	0.733 ± 0.035	0.632 ± 0.114
统计量				
F值		3868.0	372.0	658.1
t1		-22.48	-17.28	-16.35
t2		-78.42	-25.24	-36.78
P值		<0.01	<0.01	<0.01

AQP: 水通道蛋白.

系统上扫描; 观察扩增后的条带是否符合目的条带; 利用软件对电泳条带进行灰度值的测定, 目的条带与对应的内参 β -actin条带的灰度比值作为统计数据; (3)粪便含水量测定: 收集对照组每一只大鼠的1粒粪便; 术后14 d组和术后28 d组收集处死前48 h的粪便, 方法同对照组; 称量粪便湿重量, 干质量(湿便65 °C恒温, 干燥12 h), 最后计算粪便的含水量, 行统计学处理.

统计学处理 采用SPSS17.0软件进行统计学分析, 对大鼠的性别、年龄、体质量, 行 χ^2 检验和t检验; 实验数据正态性检验服从正态分布, 行单因素方差分析(one-way ANOVA), 若有显著性差异, 则用LSD进行组间比较.

2 结果

2.1 电泳成像 对照组(N)、术后14 d组(2W)、术后28 d组(4W), 其AQP3、8、9凝胶电泳成像系统上扫描结果, 如图1.

2.2 实验组与对照组结肠黏膜AQP3、8、9 mRNA比较 实验组较对照组结肠黏膜AQP3、8、9 mRNA表达量增加, 目的基因条带与内参条带灰度值之比均值也相应增大; 术后14 d组、对照组比较, 差异有显著统计学意义(t_1); 术后28 d组、对照组比较, 差异有显著统计学意义(t_2), 如表3.

2.3 粪便含水量比较 对照组即假手术组粪便含水量均值高于术后14 d组和术后28 d组, 术后14

■创新盘点

国外有文献报道大鼠行小肠大部切除术后, 观察到AQP在短期内表达量增加, 同时粪便变稀, 3-6 mo后, AQP表达量进一步增加, 粪便由稀变稠. 本文对大鼠结肠大部切除, 观察到剩余结肠AQP表达量增加, 在一定程度上加速了脱水粪便的形成.

■应用要点

大鼠结肠大部切除模型, 模拟了临床上结肠部分切除患者的术后情况, 探索了术后腹泻发生的可能原因, 若能从分子生物学水平调节结肠黏膜AQP的表达, 人为调节结肠水代谢的功能, 缩短结肠切除术后痛苦的代偿时间, 从而大大提高患者术后生活质量.

■名词解释

AQP: 又名水孔蛋白, 是一种位于细胞膜上的蛋白质, 在细胞膜上组成孔道, 可控制水在细胞的进出。作为水通道蛋白家族的一种, 广泛存在于原核和真核生物细胞膜, 能高效、选择性的转运水分。

表 4 对照组与术后14天组、术后28天组1粒粪便含水量平均值比较 (mean \pm SD)

分组	n	粪便湿质量(mg)	粪便干质量(mg)	粪便含水量(%)
对照组	12	59.5 \pm 40.1	32.8 \pm 25.9	47.2 \pm 6.4 ^a
术后14天组	10	263.1 \pm 30.4	85.3 \pm 25.1	68.4 \pm 4.7 ^c
术后28天组	10	281.2 \pm 38.4	93.4 \pm 20.3	63.7 \pm 5.2 ^e

^a $P < 0.05$ vs 术后14天组; ^c $P < 0.05$ vs 术后28天组; ^e $P < 0.05$ vs 术后14天组。

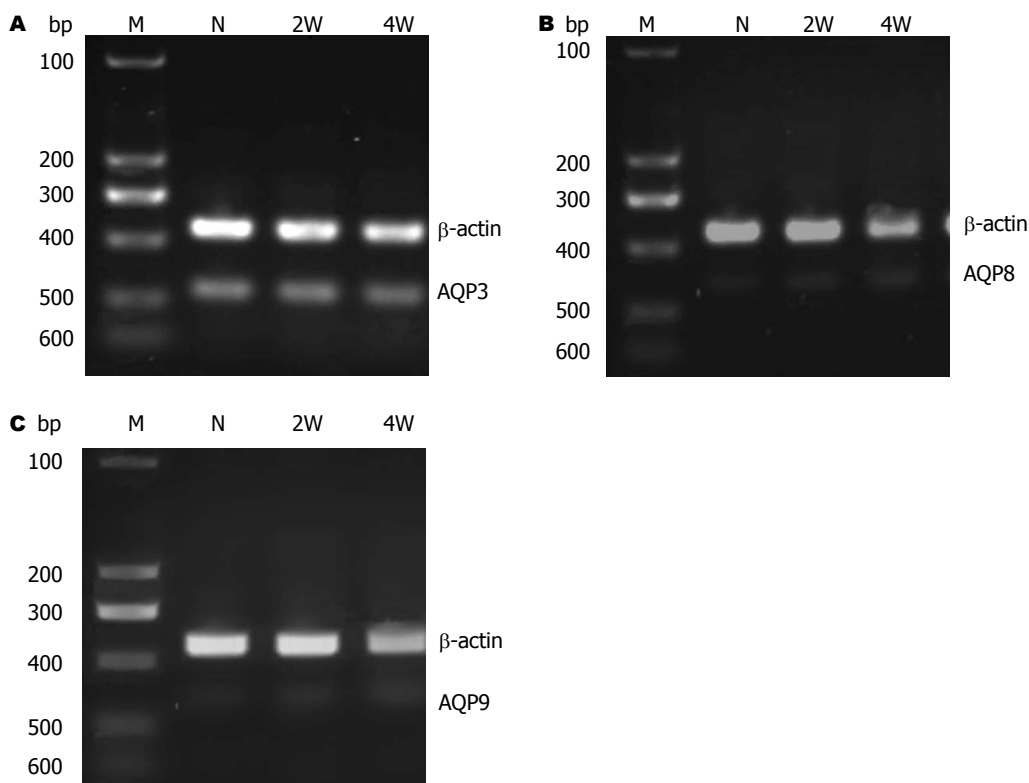


图 1 对照组、术后14天组和术后28天组AQP3、8、9凝胶电泳成像图. A: AQP3; B: AQP8; C: AQP9; M: marker; N: 对照组; 2W: 术后14 d组; 4W: 术后28 d组; β -actin: 内参蛋白; AQP: 水通道蛋白。

d组粪便含水量均值高于术后28 d组; 对照组、术后14 d组比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$), 对照组、术后28 d组比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$), 术后28 d组、术后14 d组比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$, 表4)。

3 讨论

健康成年人, 每天进入胃肠道的液体达9 L左右, 约有7 L的液体在小肠被吸收, 结肠每天逆浓度梯度吸收大约1.5-2.0 L的水, 仅有100 mL左右的水分经由粪便丢失, 因此结肠在脱水粪便形成中的作用不容忽视, 然而结肠黏膜的电阻明显高于小肠^[10], 在这种条件下结肠对水分的吸收更需要借助于载体系统才能得以实现, 而AQPs又是结肠内水代谢重要的载体蛋白, 国内外研究

已经证实: AQP3、AQP8、AQP9表达于结肠黏膜的上皮细胞, 而且其表达强度与吸收转运的活跃程度有一定关系^[4,11,12]。

临床上结直肠癌患者因手术切除了部分结肠, 术后排便频次和质量有所改变, 腹泻较为常见。结肠黏膜的丧失, 导致AQP总量下降无法满足正常的水代谢需要, 可能是术后腹泻发生的原因之一。Ikarashi等^[13]通过HgCl₂和CuSO₄抑制大鼠结肠AQP3的表达, 从而导致了大鼠持续的腹泻, 排便质量下降, 证明了AQP在结肠水代谢中的重要作用。Tsujikama等^[14]切除了大鼠80%的小肠后, 术后第1天就观察到AQP3在结肠的表达量增加, 术后第7天, AQP8在结肠的表达量也增加; 小肠大部切除后, 粪便变稀, 3-6 mo后, 由稀变稠, 同时也观察到结肠AQP的表达量相

应增加, 认为AQP在结肠表达量代偿性的增加, 增加了结肠跨膜转运水分的载体蛋白数量, 水代谢能力代偿性增强, 从而加速了脱水粪便的形成, 这同样也证明了AQP在正常粪便形成中的重要作用. 本实验中切除了大鼠约2/3的结肠, 正常进食后, 粪便含水量增加, 术后第14天, 检测结果显示大鼠结肠黏膜中AQP3、8、9的表达量增加, 第28天表达量明显增加, 但随着术后时间的延长, 粪便含水量开始减少, 与上述学者实验结果一致, 更进一步说明了AQP的表达量在增加, 在一定程度上加速了结肠水分的吸收.

临床上多种疾病特别是结肠肿瘤患者需行结肠部分切除术, 术后患者排便频次增加, 腹泻的发生率较高^[15]. 若能从分子生物学水平调节结肠黏膜AQPs的表达和功能, 则可人为调节结肠吸收和分泌水分的功能, 从而缩短结肠切除术后痛苦的代偿时间, 这将是我們今后的研究方向.

4 参考文献

- Nielsen CH. Major intrinsic proteins in biomimetic membranes. *Adv Exp Med Biol* 2010; 679: 127-142 [PMID: 20666229 DOI: 10.1007/978-1-4419-6315-4_10]
- Johansson B, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE. Intermediate filament proteins in adult human arteries. *Anat Rec* 1997; 247: 439-448 [PMID: 9096782 DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199704)247:4<439::AID-ARI>3.0.CO;2-M]
- Li A, Lu D, Zhang Y, Li J, Fang Y, Li F, Sun J. Critical role of aquaporin-3 in epidermal growth factor-induced migration of colorectal carcinoma cells and its clinical significance. *Oncol Rep* 2013; 29: 535-540 [PMID: 23165320 DOI: 10.3892/or.2012.2144]
- Ikarashi N, Ushiki T, Mochizuki T, Toda T, Kudo T, Baba K, Ishii M, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K. Effects of magnesium sulphate administration on aquaporin 3 in rat gastrointestinal tract. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 238-242 [PMID: 21415534 DOI: 10.1248/bpb.34.238]
- Liu J, Tian DA, Wang JP, Zhang SZ, Feng J, Zhao ZZ, Hao YX, Liu P. Expression of aquaporin 8 and its relationship with melanosis coli. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 3061-3065 [PMID: 22040556]
- Yuan WT, Yang HF, Zhang ZY, Liu JB. [Expression and significance of aquaporin 3 and aquaporin 9 in colonic mucosa of patients with functional constipation]. *Zhonghua Weichang Waikie Zazhi* 2008; 11: 57-60 [PMID: 18197497]
- He D, Wang HY, Feng JY, Zhang MM, Zhou Y, Wu XT. Use of pro-/synbiotics as prophylaxis in patients undergoing colorectal resection for cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012 Nov 19. [Epub ahead of print] [PMID: 23182673 DOI: 10.1016/j.clinre.2012.10.007]
- Theodoropoulos GE, Papanikolaou IG, Karantanos T, Zografos G. Post-colectomy assessment of gastrointestinal function: a prospective study on colorectal cancer patients. *Tech Coloproctol* 2013 Apr 19. [Epub ahead of print] [PMID: 23605189 DOI: 10.1007/s10151-013-1008-9]
- Karatepe O, Kurtulus I, Yalcin O, Battal M, Kamali G, Aydin T. Adrenomedulline improves ischemic left colonic anastomotic healing in an experimental rodent model. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66: 1805-1810 [PMID: 22012055 DOI: 10.1590/S1807-59322011001000021]
- Laforenza U. Water channel proteins in the gastrointestinal tract. *Mol Aspects Med* 2012; 33: 642-650 [PMID: 22465691 DOI: 10.1016/j.mam.2012.03.001]
- Yamamoto T, Kuramoto H, Kadowaki M. Down-regulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy. *Life Sci* 2007; 81: 115-120 [PMID: 17574630 DOI: 10.1016/j.lfs.2007.04.036]
- Okada S, Misaka T, Matsumoto I, Watanabe H, Abe K. Aquaporin-9 is expressed in a mucus-secreting goblet cell subset in the small intestine. *FEBS Lett* 2003; 540: 157-162 [PMID: 12681500 DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00256-4]
- Ikarashi N, Kon R, Iizasa T, Suzuki N, Hiruma R, Suenaga K, Toda T, Ishii M, Hoshino M, Ochiai W, Sugiyama K. Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea. *Biol Pharm Bull* 2012; 35: 957-962 [PMID: 22687538 DOI: 10.1248/bpb.35.957]
- Tsujikawa T, Itoh A, Fukunaga T, Satoh J, Yasuoka T, Fujiyama Y. Alteration of aquaporin mRNA expression after small bowel resection in the rat residual ileum and colon. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 803-808 [PMID: 12795752 DOI: 10.1046/j.1440-1746.2003.03033.x]
- Manceau G, d'Annunzio E, Karoui M, Breton S, Rousseau G, Blanchet AS, Vaillant JC, Hannoun L. Elective subtotal colectomy with ileosigmoid anastomosis for colon cancer preserves bowel function and quality of life. *Colorectal Dis* 2013 Apr 9. [Epub ahead of print] [PMID: 23570604 DOI: 10.1111/codi.12237]

同行评价

本文研究方法科学, 结论可信, 有一定学术价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

