

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.003

• 基础研究 •

水通道蛋白1及其mRNA在胸膜恶性肿瘤进展中的作用

张靖轩¹, 张伟², 周华荣³, 谢慧文², 董洪珍², 肖曼²**Effect of Aquaporin 1 and Its mRNA in Mice with Malignant Pleural Tumor**ZHANG Jingxuan¹, ZHANG Wei², ZHOU Huarong³, XIE Huiwen², DONG Hongzhen², XIAO Man²

1. Department of Critical Care Medicine, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510000, China; 2. Department of Respiration, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine; 3. Department of Emergency, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University



Abstract: Objective To reveal the change of aquaporin 1(AQP1) in malignant pleural tumor and their relationship. **Methods** Establish animal model of C57BL/6J mice with malignant pleural tumor, the tumor group was divided into three groups (T6, T8, T10). Based on the sixth, eighth, tenth day of injection, these mice were sacrificed and record the volume of the malignant pleural effusion, and determine the express of AQP1 and its mRNA in partial pleura using immunohistochemistry and Real-time PCR. **Results** 21 mice in MPE team appeared malignant pleural effusion in the right pleural cavity, MPE amount, level of VEGF and AQP1 of the 3 groups was gradually increased. There was positive correlation between the level of AQP1 and VEGF in T6, T8, T10 group and the amount of MPE. **Conclusion** AQP1 participates in the formation of malignant pleural tumor, its level and the amount of pleural fluid are positive correlation. Inhibiting the activation of AQP1 may be new ways to treat the malignant pleural tumor.

Key words: Pleural tumor; Malignant; Aquaporin-1 (AQP1)

摘要: 目的 探讨胸膜恶性肿瘤的进展对水通道蛋白1 (aquaporin-1, AQP1) 及其mRNA的影响。**方法** 通过胸膜腔注射法建立胸膜恶性肿瘤的动物模型, 按肿瘤种植时间分组 (T6, T8, T10), 记录各组胸水量, 采用免疫组织化学法、Real-Time PCR的方法测定AQP1及AQP1-mRNA水平。**结果** 肿瘤小鼠胸水量随时间而增长; 壁层胸膜AQP1及其mRNA水平随肿瘤进展而增高, 且与胸水量呈正相关。**结论** 在胸膜恶性肿瘤的进展中, 胸膜壁层AQP1及其mRNA水平升高, 胸水量与AQP1、AQP1-mRNA水平呈正相关, 进而提示AQP1参与了胸膜恶性肿瘤的构建和进展。

关键词: 胸膜肿瘤; 恶性; 水通道蛋白1

中图分类号: R734.3 **文献标识码:** A

0 引言

关于恶性胸膜肿瘤导致胸水的原因, 常认为与肿瘤组织的水液通透性增加有关, 具体机制尚未完全明了。水通道蛋白是一组与水通透性有关的细胞膜转运蛋白, 水通道蛋白1 (aquaporin-1, AQP1) 是参与肺部水液转运功能蛋白中最为重要的一种, 广泛表达于肺泡Ⅱ型上皮细胞、支气管黏膜下腺及气管腔上皮细胞顶膜面^[1-2]。它在肺

部的多项生理功能中起着重要的作用, 与肿瘤的发生、发展有密切的关系^[3-4], 在肺癌组织内, AQP1的表达明显增强, 应用AQP1抑制剂可以抑制肺癌的侵袭和转移^[5-6]。一些学者发现, 水通道蛋白参与了肿瘤组织的构建^[3], 水通道蛋白可以促进肿瘤的增殖^[7-8]。而检测某种水通道蛋白的水平可以协助鉴别或诊断一些肿瘤性的疾病^[4]。已有研究发现, AQP1与肺癌细胞对组织的侵袭有关^[9], 同时, 它与肺腺癌和肺部间皮瘤的发生也有一定关系^[10], 一些研究发现: 水通道蛋白与非小细胞肺癌关系密切^[10-13], 此外, 它还参与了肺部肿瘤细胞的迁移, 对周围组织造成了影响^[14], 肺腺癌的发生、发展也与水通道蛋白的关系极为密切。因此, 水通道蛋白与呼吸系统肿瘤有着密切的关

收稿日期: 2013-01-30; 修回日期: 2013-04-17

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(S2012010010563)

作者单位: 1. 510000 广州, 广州市第一人民医院中心ICU; 2. 广州中医药大学第一附属医院呼吸内科; 3. 中山大学孙逸仙纪念医院南区急诊科

作者简介: 张靖轩(1977-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事呼吸及危重症学、肿瘤学方面的研究

系。然而,关于AQP1与胸膜肿瘤关系的研究却鲜见报道。为揭示在胸膜恶性肿瘤的进展中AQP1的作用及两者间的关系,我们进行了这一研究,希望能为胸膜恶性肿瘤的治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 动物分组

采用C57BL/6J品系小鼠,由广州医学院动物实验中心提供,鼠龄6~8周,体重约25 g,雌雄不限。分三组(T6, T8, T10),每组7只,各组设立正常对照,分别于注射肿瘤细胞6、8、10天后处死小鼠,肿瘤细胞来源于广州市第一人民医院中心实验室。

1.2 胸膜恶性肿瘤模型的制备

培养Lewi's肺癌细胞,之后加入PBS配制细胞悬液(浓度调至 $1 \times 10^6/\text{ml}$),乙醚麻醉小鼠后仰卧位固定,消毒后,采用1 ml注射器和5号针头,吸取细胞悬液0.05 ml,于小鼠右侧腋前线剑突水平进针,针头斜向上与胸壁约成 30° 角,有落空感后停针注射。对照组小鼠在右侧胸腔接受注入等量的0.9%氯化钠溶液。

1.3 实验器材

低温离心机,核酸-微量蛋白测定仪,电泳仪,ABI 7500全自动荧光定量PCR仪,A高通量DNA合成仪,彩色病理图像免疫组织化学测量系统,CO₂培养箱,胎牛血清,DMEM培养液粉剂,DAB试剂盒(DAKO公司),兔抗鼠AQP1多克隆抗体(Santa Cruz公司),辣根过氧化物酶标记的抗兔Envision多聚物(Santa cruz公司)。

1.4 标本采集

取胸水:过量麻醉处死小鼠,仰卧位固定好,沿胸骨中线小心剪开胸壁,避免破坏膈肌,暴露胸膜腔,记录肿瘤生长情况及胸水性状,以1 ml注射器收集胸腔内液体并记量。取胸膜组织:剪下小鼠胸壁,固定于板上,以手术尖刀小心切割壁层胸膜,分别放于 -80°C 冰箱及多聚甲醛液体中保存。

1.5 标本检测

1.5.1 免疫组织化学法测壁层胸膜AQP1水平 胸膜标本经固定、脱水、透明、浸蜡后,进行包埋、切片,脱蜡至水。经水浴、TBS洗、抗原修后,顺序加入一抗、二抗,经DAB显色、苏木精染色后,用二甲苯透明、风干。用中性树胶封片保存。胸膜上皮细胞内的AQP1阳性显色后,呈现为亮棕色,颜色深浅与其水平呈正相关,以PBS

代替一抗作为阴性对照,之后采用HPISA210000彩色病理图像免疫组织化学测量系统进行图像分析,测量AQP1表达的平均灰度值。

1.5.2 实时荧光定量PCR法测定壁层胸膜AQP1-mRNA 在EP管中加入Trizol酶1 ml,加50~100 mg胸膜组织,将组织彻底匀浆溶解,经水浴、氯仿混匀、冷冻离心后,取液相,加0.5 ml异丙醇,混匀后静置10 min,冷冻离心后弃上清液,加乙醇混匀后 4°C 离心,弃上清液,干燥后加DEPC水浴。取RNA样品,用紫外分光光度计分别于A260、A280处比色,求A260/A280比值。 $\text{RNA浓度} = \text{A260值} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 250$ 。采用Invitrogen反转录试剂盒,以Oligo(dT)18为引物,按照试剂盒要求进行反转录,之后保存于 -20°C 备用。根据NCBI Genebank中的小鼠AQP1基因序列进行引物设计,采用Primer express 2.0软件,设计序列如下:

M-AQP1 (92 bp)

Forward Primer: 5'-CTA CAC TGG CTG CGG TAT CAA C-3'

Reverse Primer: 5'-GCC CCA CCC AGA AAA TCC-3'

内参序列: M-GAPDH (73 bp)

Forward Primer: 5'-CGT GTT CCT ACC CCC AAT GT-3'

Reverse Primer: 5'-TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT TCT-3'

委托达安基因公司合成引物,实时荧光定量PCR反应体系在ABI 3900 Real-time PCR仪上进行,PCR扩增共40循环,在每个循环的第二个步骤收集荧光信号,采用比较 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法。结果按拷贝数分析,用B表示,即 $B = \text{拷贝数}/\mu\text{l cDNA}$ 。考虑到各个样本总RNA浓度的差异,最终计算结果按下列公式换算: $A = B(\text{目的基因})/B(\text{内参基因})$,A值是统计时最终需要的数值。

1.6 统计学方法

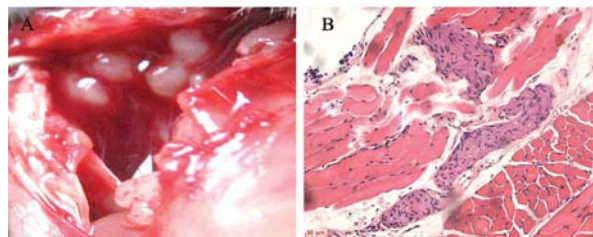
全部数据采用SPSS11.0医用统计软件进行分析,计量资料用均数±标准差表示,组间比较采用t检验(student's t-test)。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠情况

各对照组小鼠无死亡,解剖胸腔发现内壁光滑,未发现胸腔积液;胸膜恶性肿瘤组21只鼠无死亡,均可见血性胸腔积液,位于右侧胸膜腔,其中17只可见白色肿瘤结节,见图1A。壁层胸膜

石蜡切片的HE染色可见肿瘤细胞侵袭壁层胸膜，癌细胞排列紧密，间质结缔组织少，新生毛细血管丰富，见图1B。解剖胸腔可见右侧胸膜腔存在血性胸腔积液，随着肿瘤在胸膜腔内种植时间的延长，胸水量从6天时的(0.37±0.03) ml增加到10天时的(0.66±0.06) ml (P=0.04)，见表1。



A:the Lewi's lung cancer cells suspension(1×10⁶/L) was injected into C57BL/6J mice's right pleural cavity for 8 days, bloody pleural fluid was observed and there was round white visible tumor growth on partial pleura; B: We could observe the growth and infiltration of tumor cell in partial pleura(HE staining 20×10)

图1 Lewi's lung cancer cell (LLC) 注入C57BL/6J小鼠胸膜腔后8天肉眼观 (A) 及镜下组织学形态 (B)

Figure1 Histological changes of pleural cavity by naked eyes(A) and of partial pleural under microscope(B) after LLC cell was injected for 8 days

表1 各组小鼠的胸水量(̄±s)

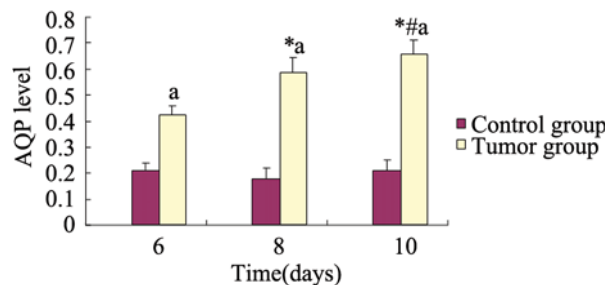
Time(days)	Control group		Tumor group	
	n	Pleural effusion(ml)	n	Pleural effusion(ml)
6	7	0	7	0.37±0.03
8	7	0	7	0.51±0.02
10	7	0	7	0.66±0.06

2.2 壁层胸膜AQP1水平

AQP1表达于胸膜壁层间皮细胞，经免疫组织化学染色并测定平均灰度值，胸膜恶性肿瘤组小鼠壁层胸膜AQP1表达较对照组明显增强，见图2。对照组小鼠的AQP1平均灰度在6、8、10天分别为(0.20±0.03)、(0.17±0.04)、(0.20±0.04)，组间差异无统计学意义(P>0.08)。胸膜恶性肿瘤组小鼠AQP1平均灰度在6、8、10天分别为(0.42±0.03)、(0.58±0.05)、(0.65±0.05)，各组差异有统计学意义(P=0.03)。胸膜恶性肿瘤组小鼠AQP1水平较相应天数的对照组小鼠高，差别有统计学意义(P<0.02)，见图2、3。

2.3 壁层胸膜AQP1-mRNA表达

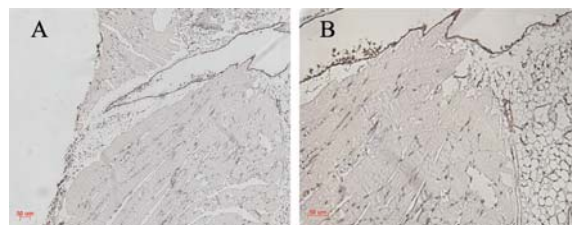
AQP1基因与管家基因的PCR标准曲线斜率接近，经检验其相关系数r=0.970，两种基因扩增效率一致。对照组小鼠AQP1-mRNA的相对值在6、8、10天分别为(1.05±0.12)、(1.19



*,compared with T6 group(the Tumor group which was injected LLC cells for 6 days), P<0.05; #:,compared with T8 group(the Tumor group which was injected LLC cells for 8 days),P<0.001;a:compared with control group,P<0.01

图2 壁层胸膜水通道蛋白1的表达

Figure2 The level of AQP1 of partial plural

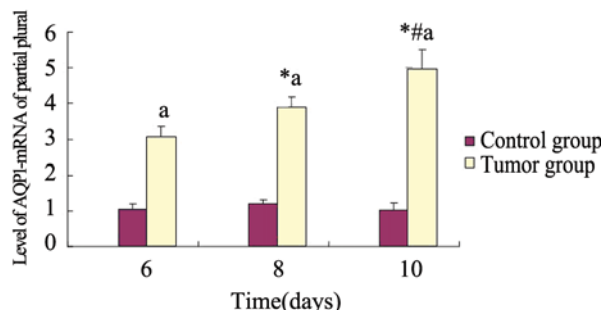


A:control group; B:T10 group

图3 壁层胸膜的免疫组织化学染色结果(×40)

Figure3 Immunohistochemistry staining of partial pleura (×40)

±0.12)、(1.02±0.18)，组间差异无统计学意义(P=0.06)。胸膜恶性肿瘤组小鼠AQP1-mRNA的相对值在6、8、10天分别为3.04±0.27、3.87±0.28、4.95±0.54，各组差异有统计学意义(P=0.01)。胸膜恶性肿瘤组小鼠AQP1-mRNA的相对值较相应天数的对照组小鼠高，差别有统计学意义(P=0.04)，见图4。



*:P<0.05, vs. T6 group; #:P<0.001, vs. T8 group; a:P<0.01, vs. control group

图4 壁层胸膜AQP1-mRNA表达

Figure4 The level of AQP1-mRNA of partial plural

2.4 恶性胸水量与AQP1的相关性研究

经直线相关分析，T6、T8、T10组胸水量与AQP1的表达存在正相关关系(r=0.97, r=0.92, r=0.98)，与AQP1mRNA的表达也存在正相关关系(r=0.93, r=0.96, r=0.94)。

3 讨论

呼吸系统恶性肿瘤在临床上极为常见,随着我国人口老龄化加剧、生活环境的污染,以及吸烟人口的增加,呼吸系统肿瘤的发病率急剧增多,发病率上升极快。然而,在呼吸系统肿瘤中,胸膜恶性肿瘤相对少见,但其发展迅速,出现恶性胸腔积液较早,常常造成严重的呼吸困难和循环障碍,危及生命。因而,积极研究其发生机制是进一步治疗胸膜恶性肿瘤的前提和基础。然而,由于胸膜恶性肿瘤的病因、发病机制及病理变化十分复杂,有多种因素的参与,相关研究相对较少,尤其是关于发生机制这一方面。

AQP1是第一个被发现的水通道蛋白,广泛分布于肺部,在其水液转运中起着极其重要的作用,它与肿瘤的发生有一定的关系。众所周知,在肿瘤的发生发展过程中,癌细胞增殖、分裂的速度较正常组织细胞大大加快。同时,为了满足肿瘤侵袭转移的需要,癌细胞某些酶的活性和表达也发生了改变,进而使细胞蛋白质、核酸的合成加强,而所有这些生命活动都离不开水的微环境和参与。因而,癌细胞比正常细胞更需要水分子的快速跨膜转运。这是水通道蛋白参与胸膜恶性肿瘤构建的理论基础。

一些学者已在此方面进行了一定的研究,并有所发现。在乳腺癌和恶性胶质瘤中,水通道蛋白1的表达都发生了改变,据此,有人设想可将其用于肿瘤的协助诊断^[4]。水通道蛋白1参与了肺癌的进展和侵袭,促进了肿瘤的增殖^[7-8,14],而运用AQP的抑制剂则可以部分抑制肺癌的侵袭和转移。水通道蛋白在肿瘤中的作用,已越来越受到大家的关注。然而,关于胸膜恶性肿瘤与水通道蛋白关系的研究,却未见报道。

鉴于临床胸膜恶性肿瘤患者标本收集难度较大,时间较长,我们先进行了动物研究,建立了胸膜恶性肿瘤的动物模型,在不同时间点检测壁层胸膜AQP1在蛋白和mRNA水平的表达,发现随着胸膜恶性肿瘤的进展,肿瘤小鼠的恶性胸腔积液量增加,同时,壁层胸膜AQP1及其mRNA的表达明显增加,胸水量与AQP1水平亦呈正相关关系。根据实验结果,我们认为AQP1参与了胸膜恶

性肿瘤的进展。这与既往的研究结果并不矛盾,并从分子生物学层面,部分揭示了胸膜恶性肿瘤发生、发展的机制,希望能为进一步研究、治疗胸膜恶性肿瘤提供一定的帮助。同时也提示我们:在临床对胸膜恶性肿瘤的治疗中,发掘相应的AQP1阻断剂、抑制剂来影响其生物学效应,有可能是治疗胸膜恶性肿瘤的一个新途径。

参考文献:

- [1] Dender BM,Smith BL,Kuhajda FP,*et al.* Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules[J]. *J Biol Chem*,1988,263(30):15634-42.
- [2] Agre P,Sasaki S,Chrispeels MJ. Aquaporins: a family of water channel proteins[J].*Am J Physiol*,1993,265(3):455-61.
- [3] Endo M, Jain RK, Witmer B, *et al.* Water channel expression and distribution in mammary carcinomas and glioblastomas[J]. *Microvasc Res*,1999,58(2) :89-98.
- [4] Verkman AS. Physiological importance of aquaporin water channels[J]. *Ann Med*,2002,34(3): 192-200.
- [5] Xiang Y, Ma B, Li T, *et al.* Acetazolamide suppresses tumor metastasis and related protein expression in mice bearing Lewis lung carcinoma[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(8):745-51.
- [6] Ma B, Xiang Y Li T, *et al.* Inhibitory effect of topiramate on Lewis lung carcinoma metastatic and its relation with AQP1 water channel[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(1):54-60.
- [7] Saadoun S, Papadopoulos MS, Davies DC, *et al.* Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours[J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(6) :621-3.
- [8] Saadoun S, Papadopoulos MS, Davies DC, *et al.* Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002, 72(2) :262-5.
- [9] Xie Y, Wen X, Jiang Z, *et al.* Aquaporin 1 and aquaporin 4 are involved in invasion of lung cancer cells[J]. *Clin Lab*, 2012, 58(1-2):75-80.
- [10] López-Campos JL, Sánchez Silva R, Gómez Izquierdo L, *et al.* Overexpression of Aquaporin-1 in lung adenocarcinomas and pleural mesotheliomas[J].*Histol Histopathol*,2011,26(4):451-9.
- [11] Li BL, Jin L, Zhong K, *et al.* Correlation of aquaporin 3 expression with the clinicopathologic characteristics of non-small cell lung cancer[J].*Zhongguo Fei Ai Za Zhi*,2012,15(7):404-8.[李白翎, 金磊, 钟铿, 等. 水通道蛋白3在非小细胞肺癌中的表达及与临床病理相关性的研究[J].*中国肺癌杂志*,2012,15(7):404-8.]
- [12] Warth A, Muley T, Meister M, *et al.* Loss of aquaporin-4 expression and putative function in non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*,2011,11:161.
- [13] Jarius S, Warth A, Wandinger KP, *et al.* Antibodies to aquaporin-4 in non-small cell lung cancer: a study on 50 patients [J].*Neurol Sci*, 2010,31(6):871-2.
- [14] Machida Y, Ueda Y, Shimasaki M, *et al.* Relationship of aquaporin 1, 3, and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth, and metastasis potential[J].*Hum Pathol*, 2011,42(5):669-78.

[编辑校对: 刘红武]