



[DOI] 10.3969/j.issn.1005-6483.2020.01.016

http://www.lcwzz.com/CN/10.3969/j.issn.1005-6483.2020.01.016

Journal of Clinical Surgery, 2020, 28(1):54-57

· 论著 ·

水通道蛋白 4 在乳腺癌细胞侵袭转移中的作用

李英彬 孙圣荣

[摘要] **目的** 探讨水通道蛋白 4(AQP4)在乳腺癌发展中的作用机制。**方法** 选用高表达 AQP4 的 T47D 及 MCF-7 细胞系,通过 50siRNA 干扰技术下调乳腺癌细胞 T47D 和 MCF-7 细胞系中 AQP4 的表达水平,检测下调的 AQP4 对乳腺癌细胞侵袭及转移的影响。**结果** 下调的 AQP4 能够显著的抑制乳腺癌细胞的侵袭及转移。**结论** AQP4 表达水平与乳腺癌病情发展有相关性,可以进一步开发成为新的靶点。

[关键词] 水通道蛋白 4; 小干扰 RNA; 侵袭; 转移

Effect of aquaporin AQP4 in invasion and metastasis of breast cancer cells Li Yingbin, SUN Shengrong. (Department of Breast Surgery, Inner Mongolia people's Hospital, Hohhot 010017, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of aquaporin 4(AQP4) in the development of breast cancer. **Methods** The expression of aquaporin 4 in the T47D and MCF-7 cell lines of breast cancer cells was downregulated by siRNA interference, and the effect of this down regulation on the invasion and metastasis of breast cancer cells was detected. **Results** Decreased expression of AQP4 inhibits invasion and metastasis of breast cancer cells. **Conclusion** The expression level of AQP4 is correlated with the development of breast cancer, and it can further develop into a new target.

[Key words] aquaporin 4; small interferes RNA; invasion; metastasis

乳腺癌(BC)是女性最常见的恶性肿瘤^[1],其发生机制不明。水通道蛋白(aquaporin, AQP)家族是一种疏水性跨膜蛋白,大小为 26~34 kDa,广泛地存在于包括哺乳动物在内的多种生物中^[2]。目前,在哺乳动物中已经发现至少 13 种 AQP 亚型^[3]。Aquaporin 4(AQP4)是 AQP 家族的一员,在维持水和离子平衡中起关键作用。有研究发现,AQP4 在肿瘤的发生发展中起着重要作用^[4]。敲除 AQP4 能抑制成年小鼠脑室下区神经干细胞的增殖,迁移和神经分化^[5]。Shi 等^[6]筛选在乳腺癌组织中的 AQP 的表达谱时发现,AQP4 在肿瘤组织中的表达水平显著高于正常组织,这说明它在乳腺癌发生发展中可能起一定的作用。本研究拟研究 AQP4 的表达水平及其在乳腺癌发生发展中的作用。

对象与方法

一、材料

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, T47D, MCF-7 和 ER-ZR-70 均购买于中国科学院细胞生物学研究所(上海)。

二、方法

1. 小干扰 RNA(siRNA)处理:T47D 和 MCF-7 细胞瞬时转染,将 siRNA 和 Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)分别与 Opti-MEM 无血清培养基混合,再将二者混合后处理肿瘤细胞,6 小时后更换为正常培养基。

2. RNA 的分离和实时 PCR 鉴定:总 RNA 使用 RNeasy 试剂盒进行提取。使用 PrimeScript RT-PCR 试剂盒对 1 μg 的总 RNA 进行反转录(Takara Bio, Tepeco, Japan),通过 PCR 检测 AQP4mRNA 的表达(引物:5'-GCTCAATAGCTTTAGCAATTG-3',吉凯基因公司合成,上海)。

3. 蛋白免疫印迹:细胞样品使用 1 × RIPA 细胞裂

基金项目:内蒙古自治区人民医院院内基金资助项目(92016032)

作者单位:010017 呼和浩特,内蒙古自治区人民医院乳腺外科(李英彬);武汉大学人民医院乳腺外科(孙圣荣)

解液进行蛋白裂解,超声波破碎,离心得上清,100℃煮样 10 分钟,SDS-PAGE 胶分离蛋白,特异性抗体孵育(抗-AQP4:SantaCruzBiotechnology sc-20812, SantaCruz, CA, 1:1000;抗-β-actin:SantaCruzBiotechnology sc1616, SantaCruz, CA, 1:1000)。实验结果使用 Odyssey® Imager 软件(LI-COR, Lincoln, NE, USA)对条带的荧光强度进行分析,以 β-actin 条带的相对荧光强度值作为实验数据分析对照。

4. 划痕试验:人乳腺癌细胞在含有 1% 胎牛血清的培养基中饥饿处理 24 小时,之后使用标准的 200 μl 无菌枪头对细胞爬片进行划线。细胞划痕的愈合情况由光镜下检测到的细胞生长迁移距离来进行评估。

5. 肿瘤细胞侵袭实验:肿瘤细胞侵袭实验根据细胞穿透 Transwell 小室(Costar, Cambridge, MA, USA)基质胶的程度来进行评估。在光镜下计数预先设立的 5 个区域内穿过基质胶的肿瘤细胞的数目。

三、统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。定量分析细胞愈合率,细胞愈合比率 = (0 时划痕面积值 - 24 小时该处划痕面积值) / 0 时划痕面积值 × 100%。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

1. AQP4 在人乳腺癌细胞系中表达特性:首先通过 Western Blot 试验验证 AQP4 在人乳腺癌细胞系中的表达,以 β-actin 作为对照(图 1)。

AQP4 在 T47D 和 MCF-7 细胞系中的表达高于 MDA-MB-231 和 ER-ZR-70。因此,我们选择 T47D 和 MCF-7 细胞系做进一步研究。利用 siRNA 技术沉默 T47D 和 MCF-7 细胞中 AQP4 mRNA 的表达,通过 RT-PCR 分析和免疫印迹分析检测 AQP4 的表达(图 2)。以无序的核苷酸序列同样转染入细胞株内作为(siCtrl)阴性对照,AQP4mRNA 相对表达量,siAQP4/MCF-7

组和 siAQP4/T47D 组均比对照 siCtrl 组低 ($P < 0.01$)。以 β-actin 蛋白为内参,AQP4 蛋白的表达水平,siAQP4/MCF-7 组和 siAQP4/T47D 组均比空白对照 siCtrl 组低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明经过 siRNA 沉默后,AQP4 mRNA 和蛋白表达均明显减少。

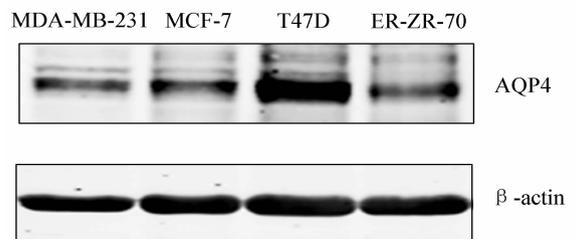


图 1 Western Blot 检测不同乳腺癌细胞系中 AQP4 的表达情况

2. 沉默 AQP4 显著降低乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力:AQP4 敲除的乳腺癌细胞系中,划痕愈合所需的时间明显比相应的对照组更长。敲除 AQP4 显著降低了乳腺癌细胞的迁移能力(图 3)。迁移结果在 0 小时 siAQP4/T47D 及 siAQP4/MCF-7 组与 siCtrl 组无明显差异,24 小时内 siCtrl 组组内对比细胞愈合率明显上升,说明细胞迁移距离增加,24 小时内 siAQP4/T47D 及 siAQP4/MCF-7 组组内对比细胞愈合率上升相对缓慢。但同时时间点实验组与对照组细胞愈合率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),siAQP4 组划痕愈合能力明显受到抑制,表现为划痕愈合面积缩小,划痕愈合面积内细胞迁移数量明显下降(图 3)。细胞愈合率 siAQP4/T47D 组和 siAQP4/MCF-7 组低于 siCtrl 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),表明经转染后沉默 AQP4 的 T47D 和 MCF-7 细胞的迁移能力下降。

将 siAQP4 T47D、siAQP4MCF-7 组细胞及未处理细胞和对照组(siCtrl)细胞分别接种于 Matrigel 胶铺就的 Transwell 小室中,48 小时后固定染色。

侵袭实验显示 siAQP4 细胞和 siCtrl 细胞在侵袭能力上有明显差异 ($P < 0.05$) (图 4)。细胞定量分析表明 siCtrl 组穿过的细胞数目较 siAQP/T47D 组高 2.3

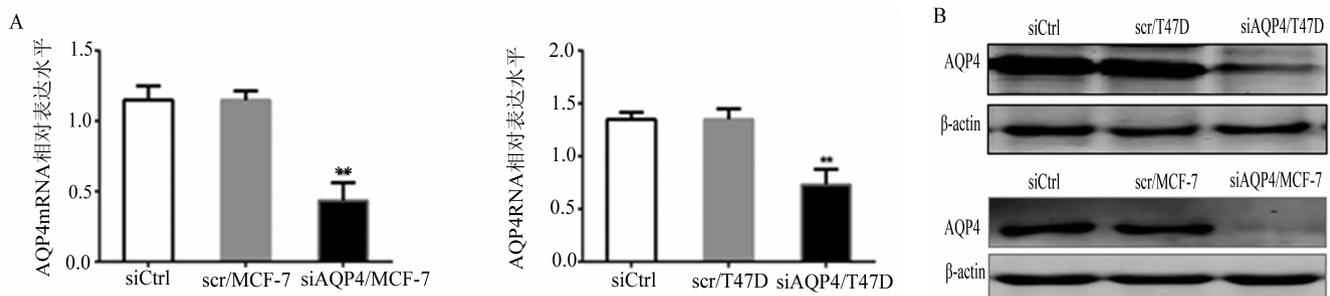


图 2 siRNA 序列转染后乳腺癌细胞系 AQP4mRNA 水平和蛋白表达量

倍 ($P < 0.05$), 较 siAQP/MCF 细胞高 2.0 倍 ($P < 0.05$)。结果表明 siAQP4 组乳腺癌细胞的侵袭能力明

显降低, 说明 AQP4 蛋白对乳腺癌细胞的侵袭能力有重要作用。

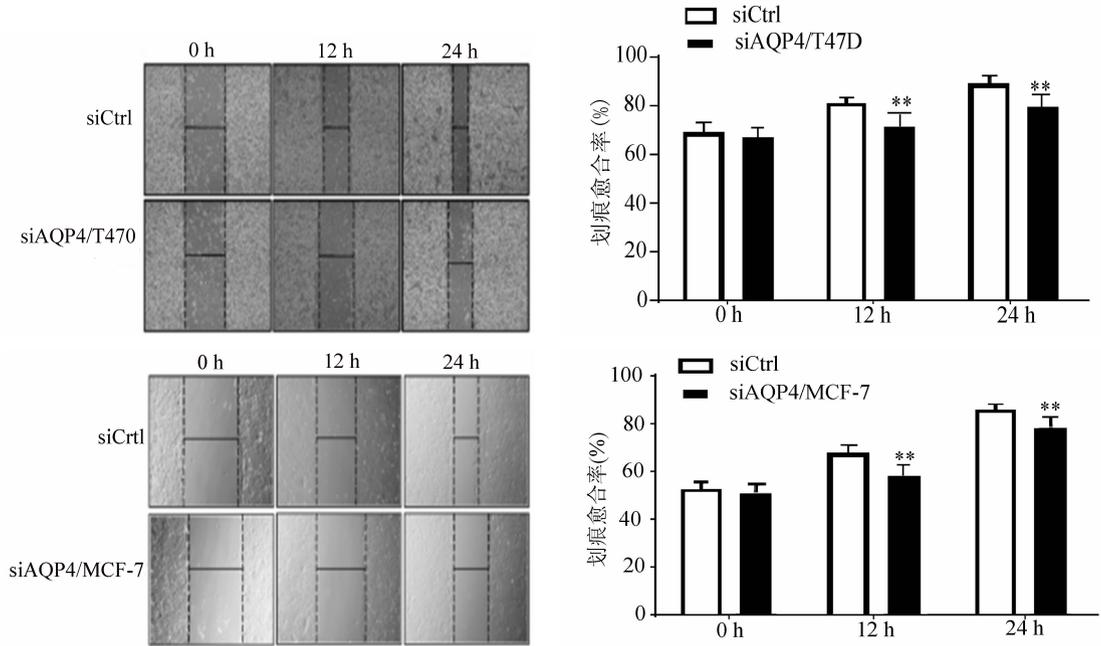


图 3 不同时间间隔划痕愈合率比较

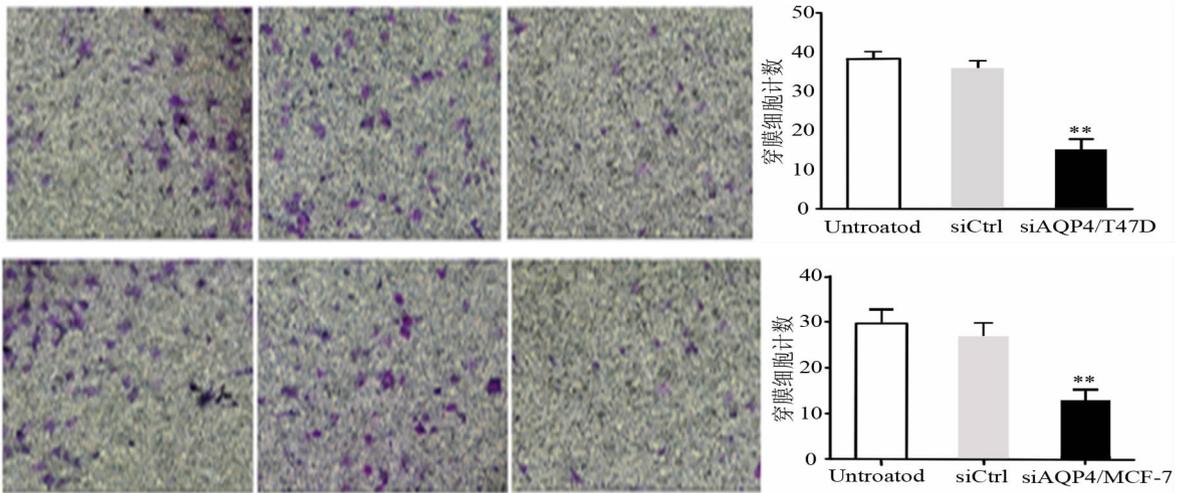


图 4 Transwell 小室实验

讨 论

迁移是细胞基本特性,这一过程出现在损伤后组织修复、炎症反应、新生血管形成和肿瘤扩散等生理和病理过程中^[7]。细胞迁移能力降低通常会导致侵袭能力的下降^[8]。根据对培养中迁移细胞的观察,将细胞迁移分为四个过程:极化、突起、牵拉和收缩^[9]。其中,质膜突起由肌动蛋白重组构成伪足结构为细胞迁移提供基础,水在细胞内外的流动为细胞迁移提供动力^[10]。有研究显示,AQP 作为一种肌动蛋白,其聚合/

解聚引起跨膜离子流结果导致靠近前缘处的迁移细胞的细胞质出现渗透压的快速变化,促进渗透水流穿过质膜渗入细胞突起,导致细胞的运动^[11]。在水通道的调节中,磷酸化是一个很重要的过程,从机制上来看,AQP4 含有 PKA 和 PKC 磷酸化的同源序列,这些水通道受磷酸化作用直接调节,并认为磷酸化与 AQP 的运输、门控以及重新分布有关,可见磷酸化直接影响其功能^[12]。

肿瘤侵袭和转移是在多基因协同作用下,癌细胞通过与宿主细胞以及细胞外基质等多因素之间相互作

用及信号整合的结果。在侵袭转移过程中肿瘤细胞的黏附、分泌蛋白酶、运动三种行为互相协调,在不同的时间和空间进行着精细的调控^[13]。在肿瘤的转移扩散中,癌细胞与癌细胞黏附和分离起着决定的作用。有研究发现,癌细胞在原发灶脱落、侵入转移位点并增殖的一系列过程中所涉及的细胞-细胞、细胞-基质间的相互作用由特异性黏附分子介导的^[14]。

乳腺癌细胞的迁移和侵袭可能与 AQP 磷酸化介导的细胞运动有关,在此基础上肿瘤细胞间黏附力的降低可能促进这一过程。这种生物学行为信号传导的研究是一个广泛而复杂的过程。有研究显示,替莫唑胺通过下调 AQP4 的表达以及激活 MAPK 信号通路,进而降低胶质瘤细胞的迁移及转移能力^[15]。胡慧等^[16]研究 STAT3 通路通过介导 MMP-2 和 MMP-9 的表达抑制乳腺癌的侵袭和转移。AQP 在乳腺癌中作用通路研究较少,测试何种机制介导 AQP 在这些过程中的作用也是本实验未来研究重点。完整的通路研究有利于开发 AQP4 成为乳腺癌治疗的新靶点。

参考文献

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA, 2014, 64 (1): 9-29.
 [2] Papadopoulos MC, Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1848 (10): 2576-2583.
 [3] AS Verkman, Mariko Hara-Chikuma, Marios C, et al. Aquaporins—new players in cancer biology [J]. J Mol Med (Berl), 2008, 86 (5): 523-529.

[4] Ribatti D, Ranieri G, Annese T, et al. Aquaporins in cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840 (5): 1550-1553.
 [5] Verkman AS, Tradtrantip L, Smith AJ, et al. Aquaporin Water Channels and Hydrocephalus [J]. Pediatr Neurosurg, 2017, 52 (6): 409-416.
 [6] Shi Z, Zhang T, Luo L, et al. Aquaporins in human breast cancer: identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer [J]. J Surg Oncol, 2012, 106 (3): 267-272.
 [7] Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration [J]. Pflugers Arch, 2008, 456 (4): 693-700.
 [8] Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, et al. In vitro cell migration and invasion assays [J]. J Vis Exp, 2014, 752 (1): 10-24.
 [9] 史永华. 水通道蛋白对子宫颈癌细胞系的迁移及局部浸润潜能的影响研究 [D]. 新疆医科大学, 2012.
 [10] NicoBeatrice, Ribatti Domenico. Role of aquaporins in cell migration and edema formation in human brain tumors [J]. Exp Cell Res, 2011, 317 (17): 2391-2396.
 [11] Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. Aquaporins: important but elusive drug targets [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2014, 13 (4): 259-277.
 [12] 王萍, 张荣明. 调节性 T 细胞在胃癌中的表达及其与水通道蛋白 4 的关系研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2016, 50 (1): 18-21.
 [13] Rycaj Kiera, Li HW, Zhou JJ, et al. Cellular determinants and micro-environmental regulation of prostate cancer metastasis [J]. Semin Cancer Biol, 2017, 44: 83-97.
 [14] 张穆, 刘君. E-cadherin、 α -catenin 与肿瘤研究进展 [J]. 泰山医学院学报, 2018, 39 (10): 1195-1198.
 [15] 陈玉琴. 替莫唑胺通过上调 p38 MAPK 信号通路调控 AQP4 表达影响胶质瘤细胞生物学行为 2. U251 细胞 MCT1、4 在氧糖剥夺后的表达变化及其机制研究 [D]. 重庆医科大学, 2017.
 [16] 胡慧, 韦伟, 易辛, 等. 信号传导与转录激活因子 3 在乳腺癌中的表达及其与人基质金属蛋白酶 2、9 的关系研究 [J]. 临床外科杂志, 2016, 25 (7): 516-519.

(收稿日期: 2018-04-13)

(本文编辑: 杨泽平)



[DOI] 10.3969/j.issn.1005-6483.2020.01.017

http://www.lcwjzz.com/CN/10.3969/j.issn.1005-6483.2020.01.017

Journal of Clinical Surgery, 2020, 28 (1): 57-58

• 短篇报道 •

经食管超声引导下心脏异物取出术一例

轩继中 程兆云 葛振伟 孙俊杰 孟树萍 赵亮 林鹏辉 王莹

[关键词] 心脏异物; 食管; 超声引导

病人, 男, 74 岁。因心脏穿透性损伤 1 周, 呼吸衰竭 2 天入院。入院 1 周

前因胸闷不适行彩超等检查提示心包及胸腔积液, 局麻下经左锁骨中线第 5 肋间行心包穿刺引流术, 穿刺过程中出现心脏穿透性损伤, 随即置入 6F J 形导管 (管径 2 mm) 1 根, 以封闭心脏破口, 并于剑突下左肋缘处再次行心包穿刺引流, 置入 3F 单腔管 1 根, 可见血性心包积液引出, 急查胸部 CT 提示 6F J 形导

管由心尖进入左心室, 弯曲尖端达主动脉瓣上方。观察剑突下心包引流管无持续血性心包积液引出, 超声监测未见心包积液增多, 遂保守治疗。2 天前因肺部感染出现呼吸衰竭, 行气管插管接呼吸机辅助呼吸。慢性再生障碍性贫血病史 10 余年; 7 年前因右肺腺癌行右肺上叶切除术。无吸烟史, 无冠心病、瓣膜病

基金项目: 河南省医学科技攻关计划资助项目 (201601011)

作者单位: 451464 郑州, 阜外华中心血管病医院心脏外科 (轩继中、程兆云、葛振伟、孙俊杰), 监护室 (孟树萍), 麻醉科 (赵亮), 手术室 (林鹏辉), 超声科 (王莹)