

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.02.001

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191101.1323.011.html>(2019-11-04)

AQP3 在人不同病理级别星形细胞瘤组织中的表达变化研究^{*}

盛华均,刘 茜,王依滢,许士叶,徐 进,邱国平,孙善全,朱淑娟[△]
(重庆医科大学人体解剖教研室 400016)

[摘要] **目的** 探讨水通道蛋白 3(AQP3)的表达变化与人不同病理级别星形细胞瘤的关系。**方法** 收集人各个级别星形细胞瘤标本 50 例,取肿瘤周围相对正常脑组织作为对照组,采用石蜡切片免疫组织化学、Western blot 及反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)等技术观察 AQP3 及其 mRNA 的表达变化。**结果** 50 例标本中Ⅰ级 5 例,Ⅱ级 11 例,Ⅲ级 20 例,Ⅳ级 14 例,免疫组织化学显示 AQP3 主要分布在星形细胞瘤组织细胞内,呈不均匀分布;Western blot 和 RT-PCR 结果显示在对照组及各肿瘤组织中均可观察到 AQP3 及其 mRNA 特定的免疫阳性反应产物,且高级别肿瘤组织显示灰度比低级别和对照组明显增强。免疫组织化学半定量分析与 Western blot、RT-PCR 结果一致显示,与对照组比较,高级别星形细胞瘤组织 AQP3 及其 mRNA 表达上调($P<0.05$),而低级别星形细胞瘤组织中无明显变化($P>0.05$)。**结论** AQP3 及其 mRNA 仅在人高级别星形细胞瘤组织中表达增强,AQP3 的表达变化与人星形细胞瘤的恶性程度有关。

[关键词] 水通道蛋白 3;病理级别;星形细胞瘤

[中图分类号] R739.41

[文章编号] 1671-8348(2020)02-0173-05

[文献标识码] A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the expression changes of AQP3 in different pathologic grade of human astrocytic tumors^{*}

SHENG Huajun,LIU Qian,WANG Yiyong,XU Shiye,XU Jin, QIU Guoping,
SUN Shanquan,ZHU Shujuan[△]

(Department of Human Anatomy,Chongqing Medical University,Chongqing 400016,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the expression of aquaporin3 (AQP3) and human astrocytoma of different pathological grades. **Methods** Fifty astrocytoma samples of different pathological grades were obtained,relative normal brain tissue around the tumor was selected as the control group. Expression variation of AQP3 protein and mRNA was observed by paraffin section immunohistochemistry,Western blot and RT-PCR. **Results** Five cases were diagnosed as grade Ⅰ,11 cases as grade Ⅱ,20 cases as grade Ⅲ and 14 cases as grade Ⅳ,AQP3 mainly distributed in astrocytoma cells by immunohistochemistry technique,showing uneven distribution. Western blot and RT-PCR results showed that specific immunoreactive products of AQP3 and its mRNA could be seen in the control group and all tumor tissues,and the gray scale of high-grade tissues was significantly higher than that of low-grade tissues and the control groups. The semi-quantitative analysis results of immunohistochemistry and that of Western blot and RT-PCR showed that compared with the control group,the expression of AQP3 and mRNA in high-grade tissue was up-regulated ($P<0.05$),while there was no significant change in low-grade tissue ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of AQP3 and mRNA was enhanced only in human high-grade tissues,and the expression of AQP3 was related to the malignant degree of human astrocytoma.

[Key words] aquaporin 3;pathologic grade;astrocytoma

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81502161);重庆市科技委员会项目(cstc2016jcyjA0229,cstc2017jcyjAX0414);重庆市教育委员会项目(KJ1600213)。 作者简介:盛华均(1964—),副教授,硕士,主要从事神经生物及中医药研究。 [△] 通信作者,E-mail:shujuanzhu@cqmu.edu.cn。

星形细胞瘤是神经系统的常见肿瘤,发病机制目前仍不清楚。研究表明,细胞容积变化在肿瘤的形成和发展过程中具有重要作用。水通道蛋白(aquaporin, AQP)作为跨细胞转运水分子的主要蛋白,可高效、有选择性地转运细胞内外的水分子,维持内环境的水液平衡,在细胞体积变化过程中举足轻重^[1]。目前,大量研究集中在对 AQP1 和 AQP4 在星型胶质瘤增殖过程中的作用机制,而 AQP3 与胶质瘤的关系少有报道。因此,本研究拟探讨 AQP3 的表达与人星形细胞瘤病理级别的相关性,分析 AQP3 在星形细胞瘤细胞增殖过程中的可能机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源

所有星形细胞瘤标本均取自重庆医科大学附属第一医院神经外科和第三军医大学附属大坪医院神经外科星形细胞瘤的患者,共计 50 例,按照世界卫生组织(WHO)对星形细胞瘤诊断的分级标准进行诊断,按照病理级别进行分组,分为 I、II、III、IV 级,其中低级别为 I~II 级,高级别为 III~IV 级,取肿瘤周围正常脑组织作为对照组。标本自术中取出后分别用于病理检查和后备实验,实验标本部分置于液氮中迅速冷冻后于-80℃冰箱保存。所有患者术前均未接受免疫治疗、放疗和化疗。本研究经患者知情同意和伦理委员会审核批准。

1.1.2 主要试剂及仪器

兔抗人 AQP3 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒、相应二抗试剂盒均购自中杉金桥公司; β -actin 购自武汉博士德公司;Western blot 一抗稀释液及其一抗封闭液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物科技有限公司;AQP3 引物购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学

将各组脑组织按以下顺序常规梯度脱水:50%乙醇(90 min)、70%乙醇(90 min)、85%乙醇(90 min)、95%乙醇(90 min)、100%乙醇(60 min)、100%乙醇(60 min),然后进行 1/2 乙醇+1/2 二甲苯、二甲苯、二甲苯透明,再进行二甲苯、石蜡渗透,最后将组织放入盛有石蜡的模具中进行石蜡包埋,连续切片,厚度为 5 μ m。漂片、贴附于涂有氨基酸的载玻片上,编号后 60℃烤箱 5 h。之后将石蜡切片放置在 60℃烤箱 120 min,按以下顺序:二甲苯(20 min)、二甲苯(20 min)、无水乙醇(5 min/2 次)、95%乙醇(5 min/2 次)、90%乙醇(5 min)、80%乙醇(5 min)常规脱蜡和

水化。苏木素-伊红(HE)染色进行诊断和分级,然后选片做常规 SABC 法免疫组织化学实验:经磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,每次 5 min,抗原修复后用蒸馏水和 PBS 分别洗 1 次,每次 5 min,3%过氧化氢(H_2O_2)室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加 AQP3 一抗孵育液(浓度为 1:500)4℃过夜, PBS 洗后滴加相应二抗(浓度为 1:2 000), PBS 洗后 DAB 显色并镜下控制显色程度,苏木素复染核后,常规脱水透明和封片,显微镜观察照相。免疫组织化学结果采用北航生物医学图像分析系统(CM-2000B)进行图像分析。

1.2.2 Western blot

用 Western blot 和 IP 细胞裂解液(碧云天生物有限技术公司)提取对照组和各级胶质瘤组织样品总蛋白:将组织匀浆后 4℃于 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液测蛋白浓度后,分装-80℃保存。每次上样量为 40 μ g,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳:先按比例制作分离胶,再按比例制作浓缩胶;将分离胶缓缓注入两层玻板之间,再在液面加一层水,静置 30 min 后将水吸掉,小心灌入浓缩胶,插入梳子静置 60 min。装入电泳槽后,拔掉梳子上样,选择恒压电转,电泳分离蛋白后湿转方式切胶转膜,5%封闭液室温封闭 2 h,分别加入含 AQP3(1:800)和 β -actin(1:4 000)一抗的孵育液,4℃过夜, PBST 洗膜后,滴加二抗(1:4 000)孵育液,室温孵育 2 h, PBST 洗膜后 DAB 试剂盒显色。用 Quantity one 软件转换后测定灰度值。将 AQP3 与 β -actin 灰度值的比值作为观察指标,进行统计学分析。

1.2.3 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

取各组脑组织 100 mg,按 Trizol 提取程序说明书操作提取组织总 RNA:将组织放入 EP 管内,将其剪碎,加入氯仿后室温 3 min,12 000 r/min 4℃离心 15 min,吸上清液并将其移入新的 EP 管加等体积异丙醇,离心后管底微量沉淀即是 RNA,弃上清液后加 75%乙醇震荡,7 500 r/min 4℃离心 10 min,弃上清液将沉淀溶于 DEPC 水,测吸光度(A)值,其 260 nm 与 280 nm 处 A 值比值(A_{260}/A_{280})在 1.65~1.75,再按 AMV 反转录试剂盒操作说明进行反转录后 4℃保存。扩增引物, AQP3 上游引物:5'-GTC ACT CTG GGC ATC CTC AT-3',下游引物:5'-GCC CAA AAA CTA TTC CAG CA-3',扩增片段长 166 bp; β -actin 上游引物:5'-CTG CCG CAT CCT CTT CCT C-3',下游引物:5'-CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT-3',扩增片段长 398 bp。扩增条件:94℃,15 s;55℃,15 s;72℃,20 s;共 35 个循环。2%琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像仪观察并照相,用 Band-scan5.0 软件测定条带灰度值,将 AQP3 mRNA 与 β -actin mRNA 灰度值的比值作为观察指标,做统计学分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病理诊断结果

50 例病理标本中,I 级 5 例,II 级 11 例,III 级 20 例,IV 级 14 例,典型病理切片见图 1。

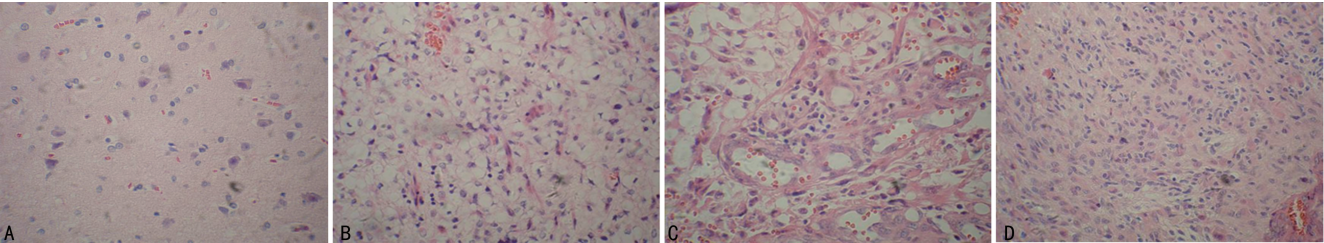
2.2 AQP3 的免疫组织化学结果

对照组中 AQP3 主要表达在神经元和星形细胞瘤细胞内,各级星形细胞瘤组织中 AQP3 主要表达在星形细胞瘤细胞内,呈不均匀分布。图像分析结果显示,低级别星形细胞瘤组织与对照组比较,AQP3 的表达无明显变化($P>0.05$),而在高级别星形细胞瘤

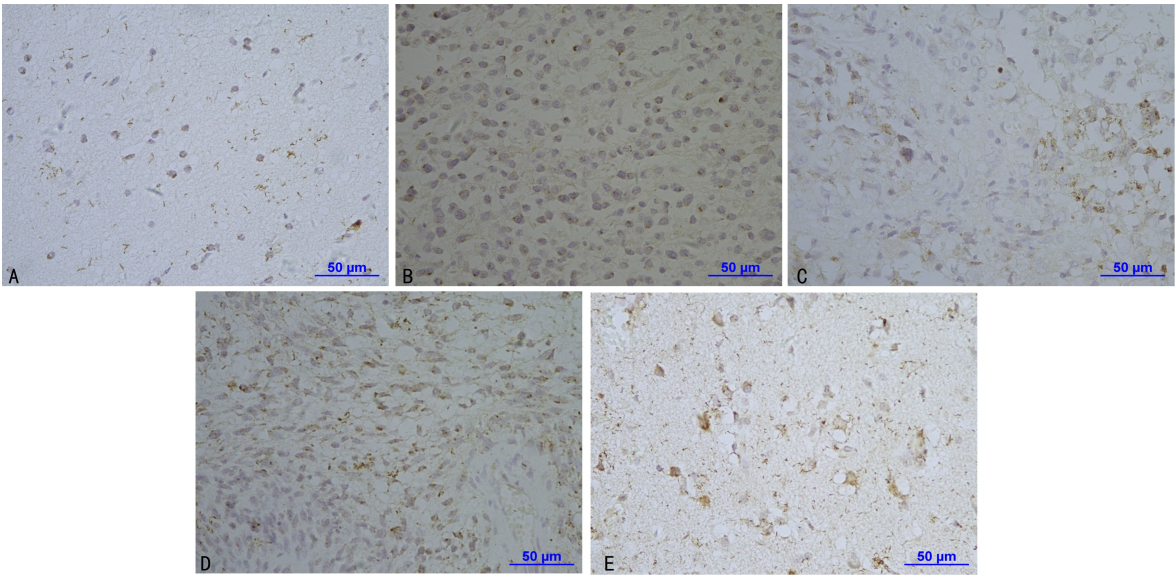
组织中,AQP3 的表达明显增强,在星形细胞瘤 IV 级组织中表达更加强烈($P<0.05$);AQP3 的表达在低级别肿瘤组织间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2、表 1。

2.3 AQP3 及其 mRNA 的水平变化

Western blot 及 RT-PCR 结果显示,在对照组及各级星形细胞瘤组织中均可看到 AQP3 及其 mRNA 特定的免疫阳性反应产物。条带分析结果显示,随星形细胞瘤病理级别的升高,AQP3 及其 mRNA 在低级别星形细胞瘤组织表达无明显变化,和对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而在高级别星形细胞瘤组织中表达增强,在星形细胞瘤 IV 级组织中表达最为强烈,和对照组及低级别星形细胞瘤组织比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与免疫组织化学结果一致,见表 1,图 3、4。



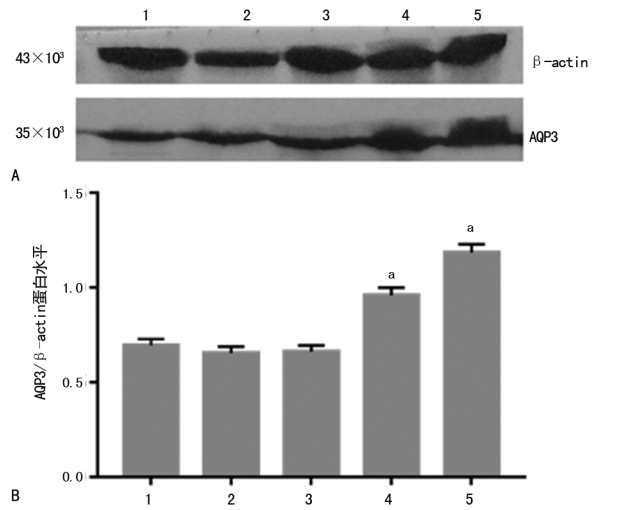
A:星形细胞瘤 I 级;B:星形细胞瘤 II 级;C:星形细胞瘤 III 级;D:星形细胞瘤 IV 级。
图 1 胶质瘤病理切片(HE 染色,×200)



A:星形细胞瘤 I 级;B:星形细胞瘤 II 级;C:星形细胞瘤 III 级;D:星形细胞瘤 IV 级;E:对照组。
图 2 AQP3 分布情况(免疫组织化学染色,×400)

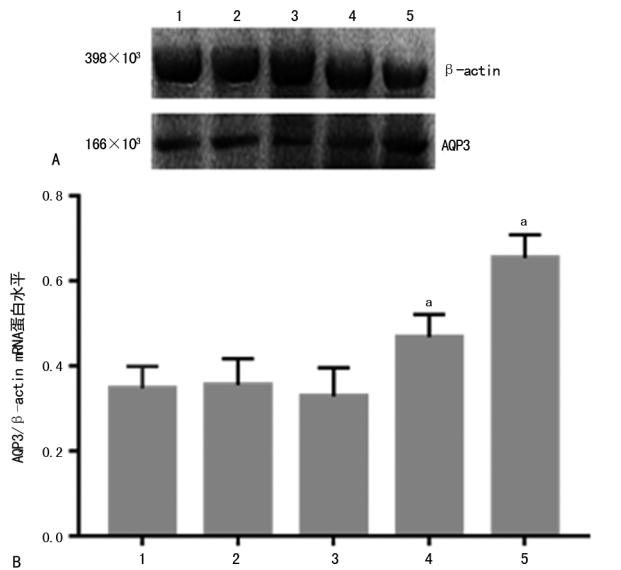
项目	对照组	星形细胞瘤 I 级	星形细胞瘤 II 级	星形细胞瘤 III 级	星形细胞瘤 IV 级
IA 值	0.608±0.076	0.616±0.071	0.609±0.058	0.796±0.079 ^a	0.887±0.082 ^a
AQP3/β-actin 蛋白灰度值	0.695±0.034	0.655±0.034	0.663±0.032	0.958±0.042 ^a	1.185±0.043 ^a
AQP3/β-actin mRNA 灰度值	0.347±0.052	0.355±0.062	0.329±0.067	0.468±0.053 ^a	0.654±0.054 ^a

^a: $P<0.05$,与对照组比较。



A: Western blot 蛋白条带;B:各组 AQP3/与 β -actin 蛋白灰度值的比较柱形图;1:对照组;2:星形细胞瘤 I 级;3:星形细胞瘤 II 级;4:星形细胞瘤 III 级;5:星形细胞瘤 IV 级;^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 3 星形细胞瘤组织中 AQP3 的表达



A:mRNA 条带;B:各组 AQP3/ β -actin mRNA 灰度值的比较柱形图;1:对照组;2:星形细胞瘤 I 级;3:星形细胞瘤 II 级;4:星形细胞瘤 III 级;5:星形细胞瘤 IV 级;^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 4 星形细胞瘤组织中 AQP3 mRNA 的表达

3 讨 论

在哺乳动物中,AQPs(AQP0~12)作为跨膜水道蛋白家族可以分为 3 类:(1)水孔蛋白类,包括 AQP 0~2、AQP4~5、AQP6 和 AQP8;(2)水甘油通道类,包括 AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10^[2];(3)超基因通道类,包括 AQP11~12,主要在细胞内膜系统中表达,并参与一些消化酶的共同分泌^[3-4]。其中,分布在脑组织的有 AQP1、3~5、8 和 9。

本课题组之前收集不同病理级别的星形细胞瘤标本,结果显示星形细胞瘤中 AQP1、AQP4 的表达均与其病理级别呈正相关,且 AQP1 主要分布在细胞膜

上,AQP4 在细胞质内,可能与其内化有关;AQP5、AQP8~9 的表达也与星形细胞瘤生长有关^[5-7],而 AQP3 与星形细胞瘤级别的关系研究目前较少有报道。先前研究报道,AQP3 广泛分布在表皮角蛋白细胞、脂肪及其他上皮组织,如呼吸道黏膜细胞^[8]和人的消化管壁等^[9]。其蛋白基因表达异常后,将引起如皮肤干燥、抵抗皮肤癌发生、细胞增殖受损和脂肪代谢改变等一系列现象^[10]。

文献报道 AQP3 可能在皮肤癌的发生、发展中起到决定性的作用^[11]。SHEN 等^[12]研究发现 AQP3 在人胃癌细胞中高表达。HUANG 等^[13]发现在胃癌细胞的增殖和迁移过程中,人体表皮细胞生长因子(hEGF)诱导的 AQP3 表达以时间和剂量依赖性的方式对此起增强作用,并通过 siRNA 抑制 hEGF 诱导的 AQP3 表达而最终抑制细胞迁移和增殖,提示 AQP3 能够促使胃癌细胞增殖和迁移。此外,U0126 作为分裂原活化蛋白激酶(MEK)/胞外信号调节激酶(ERK)抑制剂,能够抑制 hEGF 诱导的 AQP3 的表达和细胞的增殖与迁移。研究发现,AQP3 在小细胞肺癌、多形性肺癌及转移性结肠癌中无表达,但在肺腺癌所有亚型中均有表达,且 AQP3 的表达和肿瘤的分化及腺癌的临床阶段相关,AQP3 能够调节脊索细胞分化过程中渗透压的变化^[8,14],提示 AQP3 的异常表达和细胞种类有关,能发挥转运功能。袁芳等^[15]报道 AQP3 通过介导 H₂O₂ 跨膜转运可能激发细胞内依赖第二信使 H₂O₂ 的下游信号蛋白激酶 B(AKT),促使宫颈癌 HeLa 细胞发生增殖、迁移。在对 AQP3 敲除的小鼠表皮细胞的生化研究中显示,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路(特别是 P38 激酶)损伤,三磷酸腺苷(ATP)减少,甘油代谢和生物合成障碍^[16]。由此可见,AQP3 在机体细胞的表达是有定位的,其促使甘油转运在细胞增殖过程中亦不可忽视,对 AQP3 表达的细胞进行渗透压和甘油代谢的研究亦十分必要。

本研究结果显示,AQP3 的免疫染色结果呈现细胞内斑点状,分析认为 AQP3 可能位于某种亚细胞结构上,其定位和功能值得进一步研究。Western blot 和 RT-PCR 分析结果发现 AQP3 蛋白及其 mRNA 仅在星形细胞瘤 IV 级组织中表达增强,成为过表达 AQPs 亚型之一,提示 AQP3 也参与了星形细胞瘤的增殖和生长过程,它可能和其他几个 AQPs 协同发挥水或甘油转运功能,以满足星形细胞瘤因快速增长和代谢旺盛之需。这与先前研究结果共同显示,AQPs 部分家族成员在不同病理级别星形细胞瘤组织中表达变化具有差异性,但在高级别星形细胞瘤中均有较强的表达^[5-6,17]。AQPs 部分家族成员的这种高表达可能与协同促使星形细胞瘤细胞的生长、增殖和迁移及肿瘤血管生成等有关。目前,一些研究者发现,汤剂或单味中药可以影响 AQPs 中某些成员的表

达^[18-20]。中药作为我国宝贵的医药资源,可尝试将其应用到抑制肿瘤细胞增殖中来,通过影响细胞的容积变化调节其生长状况,给肿瘤治疗提供新思路。

参考文献

- [1] IKARASHI N,KON R,SUGIYAMA K. Aquaporins in the colon as a new therapeutic target in diarrhea and constipation[J]. *Int J Mol Sci*, 2016,17(7):E1172.
- [2] VERKMAN A S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins [J]. *J Cell Sci*, 2005,118:3225-3232.
- [3] ZHU C,CHEN Z,JIANG Z. Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines[J]. *Int J Mol Sci*, 2016,17(9):E1399.
- [4] SACHDEVA R,SINGH B. Insights into structural mechanisms of gating induced regulation of aquaporins[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2014, 114(2):69-79.
- [5] 朱淑娟,孙善全,汪克建,等. 水通道蛋白 4 和内向整流性钾通道 4.1 在星形细胞瘤组织中的共定位及表达差异[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 38(9):974-978.
- [6] 朱淑娟,孙善全,许士叶,等. 水通道蛋白 4 和 8 在人不同病理级别星形细胞瘤组织中的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2012,28(5):796-801.
- [7] TAN G,SUN S Q,YUAN D L. Expression of the water channel protein aquaporin-9 in human astrocytic tumours: correlation with pathological grade[J]. *J Int Med Res*, 2008,36(4):777-782.
- [8] LIU Y L,MATSUZAKI T,NAKAZAWA T,et al. Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues [J]. *Hum Pathol*, 2007,38(1):171-178.
- [9] ITOH A,TSUJIKAWA T,YASUOKA T,et al. Natriuretic peptides up-regulate aquaporin 3 in a human colonic epithelial cell line[J]. *Int J Mol Med*, 2004,14(4):621-626.
- [10] VERKMAN A S. Knock-out models reveal new

aquaporin functions[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009,190:359-381.

- [11] HARA-CHIKUMA M,VERKMAN A S. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption [J]. *Mol Cell Biol*, 2008,28(1):326-332.
- [12] SHEN L,ZHU Z,HUANG Y,et al. Expression profile of multiple aquaporins in human gastric carcinoma and its clinical significance[J]. *Biomed Pharmacother*, 2010,64(5):313-318.
- [13] HUANG Y,ZHU Z,SUN M,et al. Critical role of aquaporin-3 in the human epidermal growth factor-induced migration and proliferation in the human gastric adenocarcinoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010,9(12):1000-1007.
- [14] PALACIO-MANCHENO P E,EVASHWICK-ROGLER T W,LAUDIER D M,et al. Hyperosmolarity induces notochordal cell differentiation with aquaporin3 upregulation and reduced N-cadherin expression[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(2):788-798.
- [15] 袁芳,史永华. 水通道蛋白 3 介导过氧化氢转运对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、迁移的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2019,29(11):19-24.
- [16] VERKMAN A S. Aquaporins at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2011,124(13):2107-2112.
- [17] 朱淑娟,孙善全,张兴业,等. 水通道蛋白 1、5 在星形细胞瘤中的表达变化[J]. *解剖学杂志*, 2012,35(3):277-281.
- [18] 谢坚,汤洋,罗丽琳,等. 人参皂苷 Rg3 对大鼠直肠息肉水通道蛋白 3、4 表达的影响及机制研究[J]. *中药材*, 2019,42(5):1164-1168.
- [19] 刘丹,秦源,谢志敏,等. 益气养阴祛瘀方含药血清对干燥综合征人颌下腺细胞 AQP5 和 M3R 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019,39(3):330-334.
- [20] 段思明,张兴芳,张一听,等. 泽泻汤加味方对高脂血症大鼠胃黏膜 AQP3 蛋白表达的影响[J]. *河北中医药学报*, 2018,33(1):1-4.