

## 水通道蛋白 4 对结肠癌细胞迁移能力的影响

桂治府, 邓龙颖, 王建平, 沈历宗\*, 吴文溪

(南京医科大学第一附属医院普通外科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**探讨水通道蛋白 4(aquaporin-4, AQP4)对人结肠腺癌细胞增殖、迁移的影响。**方法:**以血管内皮生长因子(VEGF)与 AQP4-siRNA 分别上调或下调人结肠癌细胞株 LoVo 细胞 AQP4 表达, Western blot 检测 AQP4 表达变化;以细胞划痕试验及 CCK-8 增殖试验分别检测细胞迁移及增殖能力。**结果:**VEGF 可上调 LoVo 细胞中 AQP4 的表达, 且呈浓度和时间依赖性;VEGF 促进 LoVo 细胞迁移。AQP4-siRNA 干扰下调 AQP4 后细胞迁移能力明显下降;与 VEGF 处理组比较, AQP4-siRNA 与 VEGF 联合处理后 LoVo 细胞迁移能力下降。单独应用 VEGF 或 AQP4-siRNA 对细胞增殖能力无明显影响。**结论:**AQP4 对人结肠腺癌细胞迁移能力具有促进作用, 提示 AQP4 可能是结肠癌浸润、转移的重要因素之一。

**[关键词]** 结肠癌; 水通道蛋白 4; 血管内皮生长因子; 细胞迁移

**[中图分类号]** R735.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)03-315-05

## The role of aquaporin-4 on cell migration of human colon cancer cell

GUI Zhi-fu, DENG Long-ying, WANG Jian-ping, SHEN Li-zong\*, WU Wen-xi

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of aquaporin-4 (AQP4) on migration and proliferation of human colon cancer cell. **Methods:** AQP4 expression was determined by Western blot after vascular endothelial growth factor (VEGF) or AQP4-siRNA treatment in human colon cancer cell line LoVo, and the cell migration and proliferation were tested by cell scratch assay and CCK-8 proliferation assay. **Results:** VEGF up-regulated AQP4 expression of LoVo cell in a time- or concentration-dependent manner, and increased cell migration. When AQP4 was knocked down by AQP4-siRNA, cell migration decreased significantly. Compared with the VEGF-treated cell, the migration of combined AQP4-siRNA and VEGF treated cell decreased. AQP4-siRNA or VEGF had no significant effect on cell proliferation. **Conclusion:** AQP4 may promote the migration of human colon cancer cell. This provide evidence for a novel role of AQP4 in tumor growth and spread of human colon cancer.

**[Key words]** colon cancer; aquaporin 4; vascular endothelial growth factor; cell migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 315-319]

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是一组分子量约 30 000(单体)的疏水性膜转运蛋白,属于主要固有蛋白(major intrinsic protein)家族,由 Agre<sup>[1]</sup>于 1988 年首次发现,目前已经克隆的哺乳动物水通道家族有 13 个成员(AQP0~AQP12)。AQPs 在细胞膜上以四聚体形式构成选择性水通道,介导渗透压依赖性跨膜水转运。近来研究显示 AQPs 与人类肿瘤发生、发展密切相关<sup>[2-3]</sup>。Auguste 等<sup>[4]</sup>及 Ding 等<sup>[5]</sup>报告敲除星形胶质细胞的 AQP4 后,细胞迁移能力明

显下降。张文生<sup>[6]</sup>及本课题组前期研究<sup>[7]</sup>提示水通道蛋白 4(aquaporin-4, AQP4)在人结肠癌细胞系及结肠癌组织中有表达,但其对结肠癌生物学行为的作用尚不清楚。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在结肠癌组织表达水平与结肠癌分期密切相关,可能参与肿瘤的侵袭转移过程<sup>[8]</sup>。Rite 等<sup>[9]</sup>报告大鼠颅内注射 VEGF 可上调颅内血管周围及胶质界膜 AQP4 表达,且 AQP4 在胶质瘤旁水肿组织的表达与肿瘤分期及 VEGF 的表达正相关<sup>[10]</sup>。VEGF 与 AQP4 在结肠癌中均有表达,但 VEGF 在结肠癌中对 AQP4 表达的影响及 AQP4 对结肠癌细胞增殖、迁移能力的作用尚不清

**[基金项目]** 江苏省“六大人才高峰”第七批高层次人才项目(2010-WS-068);江苏省卫生厅重点项目(H201004)

\*通讯作者, E-mail: shenzl@163.com

楚。本研究通过体外实验,探讨 AQP4 对结肠腺癌细胞株 LoVo 细胞增殖、迁移能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人结肠腺癌细胞株 LoVo 细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所,人血管内皮生长因子(VEGF165)与兔抗人 AQP4 多克隆抗体分别购自美国 Pepro Tech 公司与美国 Santa Cruz 公司。AQP4-siRNA (干扰位点分别为 111、447、795、819)及阴性参照由上海吉玛公司合成,Lipofectamine™ 2000 购于美国 Invitrogen 公司,Cell Counting Kit-8 (CCK-8)增殖试剂盒购于美国 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及 VEGF 处理

LoVo 细胞在含 10%胎牛血清、青霉素和链霉素各 100 ng/ml 的 RPMI-1640 培养液中,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%饱和湿度的培养箱中常规培养。取对数生长期的细胞,以 5 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔培养板,以不同浓度 VEGF 处理不同时间后检测细胞 AQP4 表达及增殖、迁移能力变化。

#### 1.2.2 RNA 干扰试验

LoVo 细胞在不含抗生素的 RPMI-1640 培养基中培养 4 d,于转染前 1 d 以 5 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔培养板中,次日细胞融合度达到 70%~80%。以 Lipofectamine™ 2000 10 μl/孔、siRNA 寡聚物 (20 μmol/L)10 μl/孔分别混匀于不含血清的 240 μl RPMI-1640 培养基,室温孵育 5 min 后,二者轻轻混匀,再室温孵育 20 min,将混合物加入包含细胞和培养基的板孔中,前后摇动培养板混匀。转染 4~6 h 改换无抗生素培养基,48 h 后检测 AQP4 表达,并取同批次处理细胞用于迁移与增殖试验。

#### 1.2.3 Western blot

各处理组细胞用生理盐水清洗后刮下,裂解液冰上裂解 30 min,4℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清。BCA 法检测蛋白浓度,各组取等量总蛋白与 5 × SDS 上样缓冲液混匀,100℃煮 5 min。用 12.5%的 PAGE 凝胶电泳分离蛋白,半干法转于 NC 膜。5%脱脂奶粉封闭 2 h,孵育一抗(AQP4 1:500,Tubulin 1:1 000)4℃摇床过夜。1×TBST 洗膜,室温摇床孵育二抗(AQP4 二抗 1:500,Tubulin 二抗 1:1 000)2 h,洗膜后 ECL 显影,胶片曝光。胶片扫描后图像条带用 Image J 5.0 软件进行灰度、面积定量,并以 Tubulin 作为内参,半定量 AQP4 蛋白表达水平。

#### 1.2.4 细胞迁移能力检测——划痕试验

将各实验组细胞血清饥饿预处理后以 5 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔培养板,细胞生长达 80%融合后,用移液管尖端在每孔相同位置对细胞作线性划痕。PBS 洗去漂浮细胞,换用 0.2%的低血清培养液。在 40 倍倒置相差显微镜下摄片,沿划痕边缘等距离间隔作 5 个标记作为数据测定点,记录初始时及细胞培养 24 h 后两侧细胞间的距离,测量后取平均值。

#### 1.2.5 细胞增殖能力检测

采用 CCK-8 试剂盒,96 孔板每孔加入 100 μl 约 2 000 个细胞,每组设立 6 个平行样本,细胞贴壁后根据实验需要予以药物处理 48 h。每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,并设立只加了相应细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液但未加入细胞的孔作为空白对照。细胞培养箱孵育 1.5 h 后用酶标仪检测各孔在 450 nm 波长的吸光度。

### 1.3 统计学方法

所有结果至少重复 3 次,数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )表示,运用 SPSS18.0 软件对实验数据进行单因素方差分析,组间比较用 *q* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VEGF 对 LoVo 细胞 AQP4 表达及迁移、增殖能力的影响

LoVo 用不同浓度 VEGF(1、2、5、10 ng/ml)进行处理,培养 48 h 后以 Western blot 检测 AQP4 表达,结果显示各浓度组 AQP4 表达量分别为对照组的 1.6、1.9、2.1、2.2 倍(图 1A)。以 10 ng/ml VEGF 处理 LoVo 细胞 12、24、36、48 h,各处理组 AQP4 表达量分别为对照组的 1.2、1.3、1.4、1.9 倍(图 1B)。提示 VEGF 可上调 LoVo 细胞 AQP4 表达,且呈浓度与时间依赖性。

以 10 ng/ml VEGF 处理细胞 48 h 后行划痕试验,划痕 24 h 后平均迁移剩余距离仅为对照组的 47.8%,提示 VEGF 诱导增强 LoVo 细胞迁移能力(图 2A、2B)。CCK-8 细胞增殖试验显示 VEGF 对 LoVo 细胞增殖能力无明显影响(图 2C)。

### 2.2 沉默 AQP4 表达对 LoVo 细胞迁移和增殖的影响

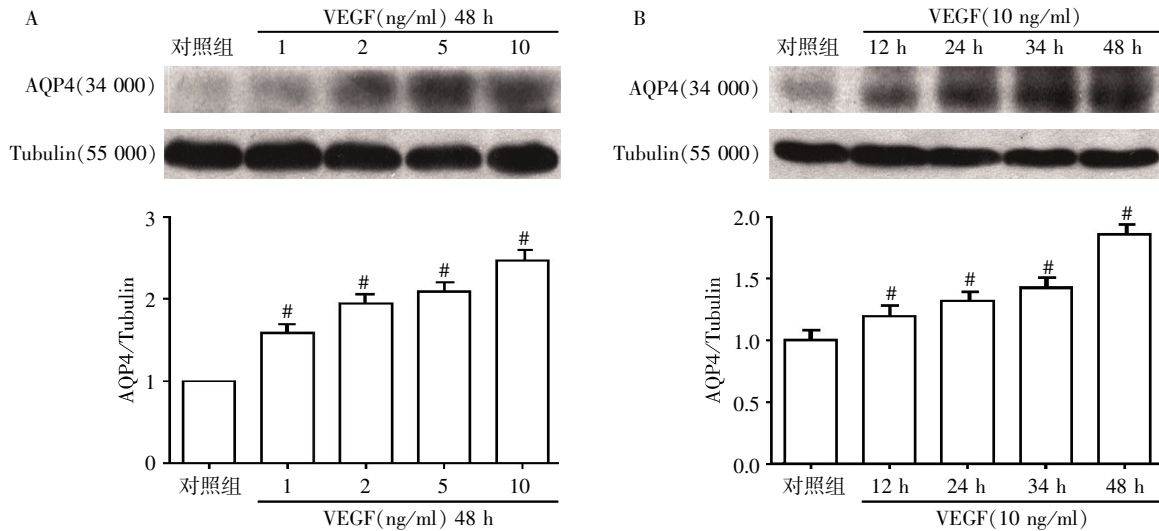
筛选获得最佳干扰位点 819 的 AQP4-siRNA,将其转染 LoVo 细胞后,相对于对照组,细胞 AQP4 的表达被抑制 50%(图 3)。划痕试验显示该 AQP4-siRNA 处理组细胞迁移剩余平均距离为对照组的 139%(图 2A、2B),提示 AQP4-siRNA 可使细胞迁移

能力显著下降。CCK-8 增殖试验显示 AQP4-siRNA 对 LoVo 细胞增殖能力无明显影响(图 2C)。

### 2.3 AQP4-siRNA 与 VEGF 联合处理对 LoVo 细胞迁移能力的影响

为明确 AQP4 在 VEGF 促进 LoVo 细胞迁移中的作用,将 AQP4-siRNA 与 VEGF 联合处理 LoVo 细胞,即在 AQP4-siRNA 干扰后,予以 VEGF(10 ng/ml)

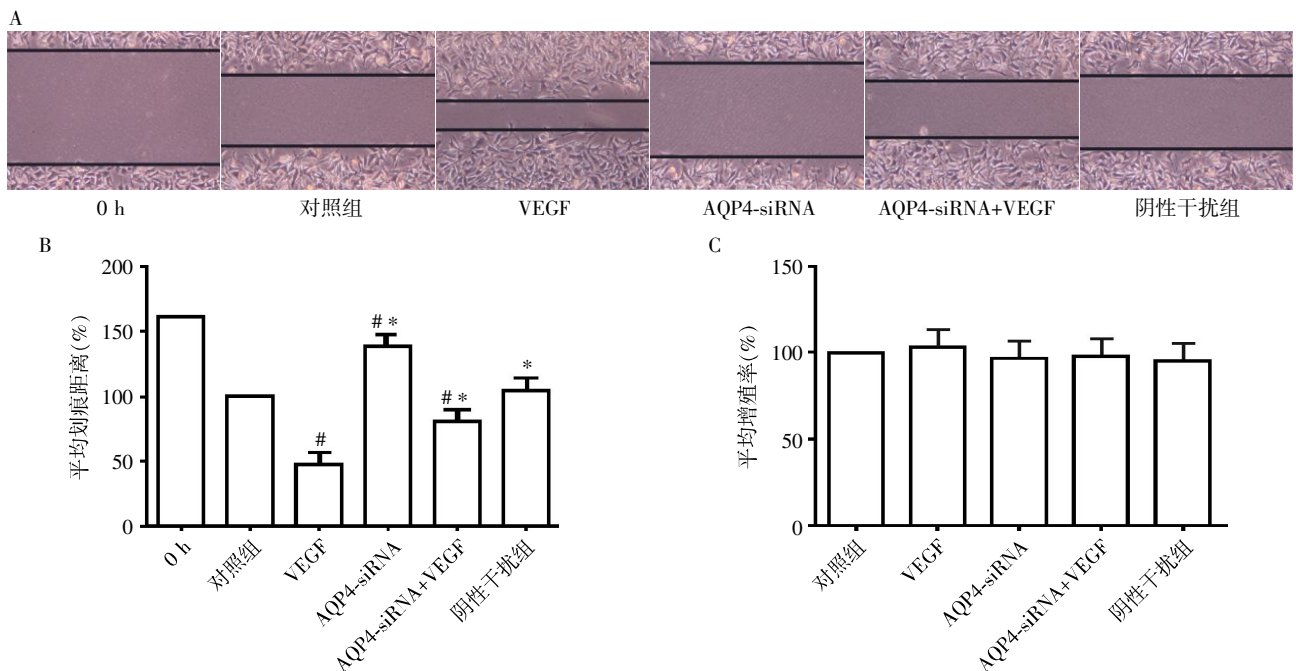
处理 48 h,比较联合处理对细胞迁移和增殖能力的影响。结果显示联合处理组细胞划痕 24 h 后平均迁移剩余距离为 VEGF 处理组的 168%,提示 VEGF 的促迁移作用受到明显抑制(图 2A、2B)。AQP4-siRNA 和 VEGF 联合处理对 LoVo 细胞增殖能力无明显影响(图 2C)。该结果同时也表明 VEGF 促进细胞迁移的机制可能与其上调 AQP4 表达有关。



A: 以 1、2、5、10 ng/ml VEGF 处理 LoVo 细胞 48 h, Western blot 检测 AQP4 表达; B: 以 10 ng/ml VEGF 处理细胞 12、24、36、48 h 后 Western blot 检测 AQP4 表达。与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 1 VEGF 对 LoVo 细胞 AQP4 表达的影响

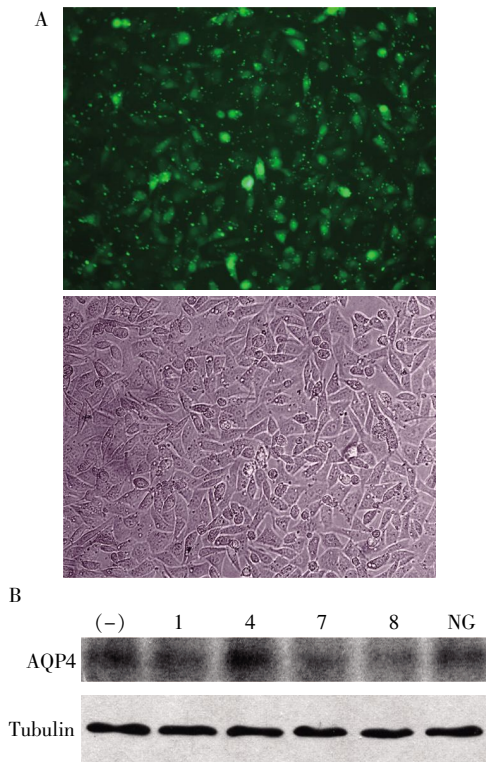
Figure 1 The effect of VEGF on AQP4 expression in LoVo cells



A、B: 划痕试验检测细胞迁移能力的变化,比较各组划痕 24 h 后迁移的平均剩余距离; C: CCK-8 试剂检测细胞增殖能力变化。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 VEGF 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 2 AQP4 及 VEGF 对 LoVo 细胞迁移、增殖能力的影响

Figure 2 The effects of AQP4 and VEGF on LoVo cell migration and proliferation



A: 荧光素标记的 AQP4-siRNA 转染的 LoVo 细胞; B: Western blot 检测 AQP4 表达; (-): 未处理组; NG: siRNA 阴性参照; 1: 111 干扰点; 4: 447 干扰点; 7: 795 干扰点; 8: 819 干扰点。

图 3 AQP4-siRNA 最佳干扰位点的选取

Figure 3 Screening of most efficient interfering site of AQP4-siRNA

### 3 讨论

AQPs 分为两类,一类为经典的水通道蛋白,只能转运水;另一类为水-甘油通道蛋白(aquaglyceroporin),不仅能转运水,对甘油、尿素等小分子物质也具通透性<sup>[11]</sup>。研究显示 AQPs 参与肿瘤细胞的增殖与迁移,提示 AQPs 在肿瘤生长、浸润和转移等过程中可能具有重要作用<sup>[12-13]</sup>。我们曾报告 AQP3、AQP5 在胃癌中高表达,并与肿瘤分化程度、淋巴结转移及脉管浸润等显著相关,且 AQP3 可促进胃癌细胞增殖、迁移<sup>[14-15]</sup>。结直肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。本课题组前期研究显示 AQP4 在结肠癌组织中表达增加,且与肿瘤病理分级、淋巴结转移相关,但其机制尚不明确<sup>[7]</sup>。本研究在体外证实 AQP4 可显著促进结肠癌细胞迁移,但对细胞增殖无影响。AQP4 何以促进细胞迁移? Verkman 等<sup>[4]</sup>认为,AQP4 属于经典水通道蛋白类,AQP4 介导的快速跨膜水转运促进细胞渗透压及形态变化,迁移阶段细胞前端板状伪足的水转运增加,同时伴随肌动蛋白聚合与解聚加快,使细胞更易变形和伸展运

动,以促进其迁移;在胶质瘤细胞中,AQP4 也可影响细胞间紧密蛋白和基质金属蛋白酶表达,从而改变细胞迁移能力<sup>[5]</sup>。结肠癌中存在 AQP4 的过表达,并且与肿瘤的病理分期、淋巴结转移密切相关<sup>[7]</sup>,因此推测 AQP4 可以促进结肠腺癌细胞株 LoVo 的迁移。本研究结果显示,AQP4 对结肠癌细胞增殖能力无影响,推测与 AQP4 不能转运甘油有关。我们前期研究显示 AQP3 作为一种水-甘油通道蛋白,不仅能促进胃癌细胞迁移,亦能促进肠癌细胞增殖,而 AQP3 介导的甘油转运对细胞增殖是必须的<sup>[15]</sup>。

本研究还显示 VEGF 可以上调结肠细胞中 AQP4 表达,并呈现浓度与时间依赖性。Rite 等<sup>[9]</sup>亦报告大鼠颅内注射 VEGF 可上调颅内血管周围及胶质界膜 AQP4 表达。VEGF 上调 AQP4 表达的机制尚不清楚。有文献显示 VEGF 可激活 p38MAPK 信号通路进而增强脐血管内皮细胞迁移运动<sup>[16]</sup>,而 p38MAPK 信号通路与 AQP4 调节相关<sup>[17-18]</sup>。因此,我们推测在肿瘤生长过程中,细胞低氧刺激的存在诱导产生缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )及 VEGF,激活 p38MAPK 通路继而上调 AQP4 表达。在体外细胞研究中亦证实,低氧可引起细胞 AQP4 表达上调<sup>[18]</sup>,这亦可解释在结肠癌中同时存在 VEGF 与 AQP4 的高表达现象。

结肠癌中 VEGF 及其受体呈现高表达,并与结肠癌分期、淋巴结及远处转移相关<sup>[8]</sup>。VEGF 影响肿瘤的转移与预后,不仅与其促进肿瘤血管生成相关,还与 VEGF 对肿瘤细胞迁移能力影响有关。在体外实验中,以大蒜素干扰 LoVo 细胞 VEGF 的表达,可降低肿瘤细胞迁移能力<sup>[19]</sup>。本研究结果提示,VEGF 可能通过上调结肠癌细胞 AQP4 的表达,增强肿瘤细胞的迁移能力,进而可能影响结肠癌转移及预后,因此,AQP4 或可成为结肠癌治疗的新靶点。

#### [参考文献]

- [1] Agre P. The aquaporin water channels[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(1): 5-13
- [2] Nico B, Ribatti D. Aquaporins in tumor growth and angiogenesis[J]. Cancer Lett, 2010, 294(20): 135-138
- [3] 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): 669-678
- [4] Auguste KI, Jin S, Verkman AS, et al. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury [J]. FASEB J, 2007, 21(1): 108-116

- [5] Ding T, Ma Y, Li M, et al. Role of aquaporin-4 in the regulation of migration and invasion of human glioma cells [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(6):1521-1531
- [6] 张文生, 李峰, 鲍军强, 等. 大黄蒽醌衍生物对大鼠结肠及 LoVo 细胞水通道蛋白 4 表达的调节效应 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(9):818-823
- [7] 唐会峰, 张玉华, 徐皓, 等. 水通道蛋白 4 在大肠癌组织中的表达 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2007, 27(11):1236-1239
- [8] Wu Y, Jin M, Xu H, et al. Clinicopathologic significance of HIF-1 $\alpha$ , CXCR4, and VEGF expression in colon cancer [J]. *Clin Dev Immunol*, 2010, [Epub ahead of print]
- [9] Rite I, Machado A, Cano J, et al. Intracerebral VEGF injection highly upregulates AQP4 mRNA and protein in the perivascular space and glia limitans externa [J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(4-5):897-903
- [10] Mou K, Chen M, Mao Q, et al. AQP-4 in peritumoral edematous tissue is correlated with the degree of glioma and with expression of VEGF and HIF-alpha [J]. *J Neurooncol*, 2010, 100(3):375-383
- [11] Magni F, Sarto C, Ticozzi D, et al. Proteomic knowledge of human aquaporins [J]. *Proteomics*, 2006, 6(20):5637-5649
- [12] Hu J, Verkman AS. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels [J]. *Faseb J*, 2006, 20(11):1892-1894
- [13] Hara-Chikuma M, Verkman AS. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(6):326-332
- [14] 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
- [15] 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
- [16] Kobayashi M, Nishita M, Mishima T, et al. MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration [J]. *EMBO J*, 2006, 25(4):713-726
- [17] Pan CF, Zhu SM, Zheng YY. Ammonia induces upregulation of aquaporin4 in neocortical astrocytes of rats through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(14):1888-1892
- [18] Qi LL, Fang SH, Shi WZ, et al. CysLT2 receptor-mediated AQP4 up-regulation is involved in ischemic-like injury through activation of ERK and p38 MAPK in rat astrocytes [J]. *Life Sci*, 2011, 88(1-2):50-56
- [19] 高勇, 刘扬清, 曹维克, 等. 大蒜素抗人结肠癌 LoVo 细胞侵袭转移作用及其机制 [J]. *中华医学杂志*, 2009, 89(20):1382-1386

[收稿日期] 2011-11-25

欢迎投稿 欢迎订阅