

胃癌中水通道蛋白 3 的表达与淋巴结转移的关系

徐 勇,张文杰,杨 力,徐泽宽*,徐 皓*

(南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨水通道蛋白 3 (AQP3) 在胃腺癌不同分期中的差异表达与淋巴结转移的关系。方法:采用定量 PCR、Western blot 法对 80 例不同分期的胃腺癌组织及作为对照的癌旁非肿瘤组织中 AQP3 mRNA 和蛋白的表达分别进行检测,并与各临床病理分期中淋巴结转移情况进行分析。结果:AQP3 在胃腺癌不同分期中的差异表达影响胃癌的淋巴结转移,有淋巴结转移的 T1、T2、T3、T4 期(UICC,2010)肿瘤组织中 AQP3 的表达明显高于无淋巴结转移者。结论:胃腺癌肿瘤组织中高表达的 AQP3 可能对患者淋巴结转移的发生有促进作用,因此 AQP3 有望成为预测胃腺癌转移和评估预后的重要指标,并可能是胃癌治疗靶点之一。

[关键词] 水通道蛋白 3; 胃腺癌; 淋巴结转移

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-454-04

Expression of aquaporin-3 in gastric adenocarcinoma and the relationship with lymph node metastasis

XU Yong,ZHANG Wen-jie,YANG Li,XU Ze-kuan*,XU Hao*

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

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression difference of aquaporin-3 (AQP3) in each stage of gastric adenocarcinoma (GAC),and the relationship with lymph node metastasis. **Methods:**Collecting 80 cases of gastric adenocarcinoma tissue and corresponding nontumor tissue,the AQP3 expression of mRNA and protein in each sample were detected by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot. Then,the relationship between AQP3 expression and clinicopathologic characteristics of the patients was analyzed. **Results:**The different expressions of AQP3 in each stage of GAC (T1,T2,T3,T4), according to UICC(2010),had effects on lymph node metastasis;The expression of AQP3 in tumor tissue with lymph node metastasis was higher than that without lymph node metastasis. **Conclusion:**The overexpression of AQP3 in GAC might stimulate the occurrence of lymph node metastasis. The overexpression of AQP3 can be taken as a biomarker of GAC prognosis and metastasis. AQP3 might be a therapy target of gastric adenocarcinoma.

[Key words] aquaporin-3(AQP3);gastric adenocarcinoma(GAC);lymph node metastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 454-457]

水通道蛋白(aquaporins,AQPs)由 Agre 于 1988 年在红细胞膜上发现,并于 1991 年完成了对其 cDNA 的克隆,命名为 aquaporin-1^[1];迄今为止,共发现 13 种 AQP 亚型(AQP0~AQP12)^[2-3]。AQPs 在细胞膜上以四聚体形式构成选择性水通道,介导水渗透压依赖性跨膜转运,不仅在液体转运及腺体分泌方

面起重要作用,而且参与机体的其他过程。以往的研究表明,肿瘤组织 AQPs 的表达与非肿瘤组织间存在差异^[4];AQPs 可能在肿瘤发生、肿瘤血管生成与细胞迁移^[5]、肿瘤细胞调亡^[6]等方面起重要作用。淋巴结转移是胃癌的主要转移途径,进展期胃癌的淋巴结转移率高达 70%左右,早期胃癌也可有淋巴结转移^[7];胃癌的手术疗效与有无淋巴结转移关系密切,而预后则与淋巴结转移的程度相关^[8];因此,了解胃癌淋巴结转移的影响因素及机制具有重要意义。本研究采用 RT-PCR、Western blot 法对 80 例不同分期的胃腺癌组织中 AQP3 mRNA 和蛋白的表达进行检

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30901421);江苏省卫生厅开放课题(XK03200903)

*通讯作者,E-mail:xuzekuan@njmu.edu.cn;brightmoon_1@sina.com

测,并与各临床病理分期中淋巴结转移情况进行对照分析,探讨AQP3的差异表达与淋巴结转移间的关系,为胃癌的治疗和预后评估提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2009年10月~2010年10月南京医科大学第一附属医院手术切除胃腺癌标本80例,术前均未行放化疗、免疫治疗;其中男53例,平均年龄63岁;女37例,平均年龄64岁;于手术切除的胃组织中留取肿瘤样本,同时在距肿瘤远端5 cm处切取非肿瘤样本。每块样本分为2份,一份在组织离体后立即(10 min内)冻存于液氮中,用于RNA分析,另一份存于-70℃冰箱,用于蛋白提取;切取肿瘤组织时注意避开坏死区域;所有病例经病理学证实为胃腺癌。所有样本均在患者签署知情同意后收集。

TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国);RNA逆转录试剂盒(Promega公司,美国);半定量及定量PCR试剂盒(Fermentas公司,立陶宛;TaKaRa公司,日本);兔抗人AQP3多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国);RIPA蛋白裂解液、PVDF膜等(南京迈迪特生物化学有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 AQP3引物合成和组织总RNA抽提

在PubMed基因库中检索到AQP3与 β -actin的mRNA全基因序列,用Primer5.0软件设计引物,由上海Invitrogen生物技术有限公司合成。引物序列为:正义链(5'-TCAATGGCTTCTTTGACCACTTCA-3'),反义链(5'-CTTCACATGGGCCAGCTTCA-CATT-3'),产物长度389 bp。按TRIzol试剂操作说明提取组织总RNA,变性电泳观察18S、28S条带,确认总RNA抽提成功;紫外分光光度计(Bio-Rad SmartSpec Plus Spectrophotometer)测定总RNA浓度及纯度,RNA纯度范围 $[D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})]$:1.8~2.0。

1.2.2 cDNA的合成

应用RT试剂盒逆转录合成cDNA,反应体系总体积20 μ l,在7.75 μ l不含核酸酶的水中分别加入MgCl₂ (25 mmol/L)4 μ l、10 \times 缓冲液2 μ l、dNTPs(各10 mmol/L)2 μ l、oligo(dT)15引物(500 μ g/ml)1 μ l、RNase抑制剂(40 U/ μ l)0.5 μ l、AMV逆转录酶(22 U/ μ l)0.75 μ l、RNA 1 μ g(2 μ l),使用(Bio-Rad C1000 Thermal Cycler)PCR仪:70℃变性10 min、42℃水浴90 min,95℃5 min灭活逆转录酶,cDNA

产物稀释4倍后存于-20℃备用。

1.2.3 半定量及定量PCR

半定量PCR反应体系总体积为25 μ l,分别加入cDNA 1 μ l、10 \times PCR缓冲液2.5 μ l、dNTPs(各2.5 mmol/L)2 μ l、MgCl₂ (25 mmol/L)3 μ l、rTaqDNA聚合酶(5 U/ μ l)0.125 μ l、上游引物(10 μ mol/L)1 μ l、下游引物(10 μ mol/L)1 μ l、双蒸水16 μ l,使用(Bio-Rad C1000 Thermal Cycler)PCR仪:95℃预变性,终末延伸72℃10 min,共36个循环。AQP3的PCR扩增反应条件:95℃30 s,56℃30 s,72℃2 min; β -actin的PCR扩增反应条件:95℃30 s,57℃30 s,72℃1 min。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶内电泳15 min后,于Hish Performance Ultraviolet Transilluminator(UVP)凝胶成像系统扫描、观察;切胶回收PCR扩增产物进行基因测序(Invitrogen公司,上海)以确认扩增产物的正确性。实时定量PCR按照TaKaRa试剂盒说明书于96孔板中在Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System上进行,反应的温度条件同半定量PCR,以 β -actin作为内参。实验结果所得Ct值(threshold value)转换成 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 后用于统计学分析。

1.2.4 Western blot

取适当大小组织,在液氮中充分研磨后溶解于RIPA蛋白裂解液中,充分震荡混匀后冰浴30 min,10 000 r/min 4℃离心5~10 min后收集上清液(用Bio-Rad protein assay检测蛋白浓度),按4:1的比例于上清液中加入5 \times SDS-PAGE上样缓冲液后置100℃沸水中煮5~10 min以使蛋白变性,产物用15% SDS-PAGE凝胶电泳分离后转移至PVDF膜(250 mA 120 min),5%脱脂奶粉常温封闭120 min后4℃一抗孵育过夜(稀释浓度:AQP3抗体1:500, β -actin抗体1:2 000);然后洗去一抗,常温孵育于对应的二抗(稀释浓度为1:2 000)中120 min,洗去二抗后按照ECL操作手册显影。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;实验数据输入SPSS13.0软件,对实验数据用t检验、Mann-Whitney U检验、Spearman等级相关分析等统计学方法进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

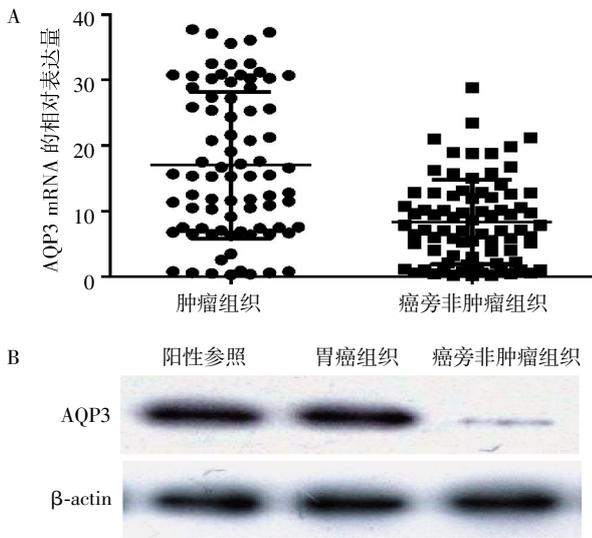
2.1 胃癌组织中AQP3的表达明显高于癌旁非肿瘤组织

80对胃癌及癌旁非肿瘤组织中,有67例胃癌组织AQP3 mRNA的表达高于对应的癌旁非肿瘤组织;

仅 13 例胃癌组织中 AQP3 mRNA 的表达低于对应的癌旁非肿瘤组织或表达无明显差异(图 1A, $n = 80$, $P < 0.05$);PCR 结果经 Western blot 证实(图 1B)。

2.2 胃癌不同分期与淋巴结转移有关,T 分期越高淋巴结转移数则越多

分析胃癌的淋巴结转移与分期的关系,非参数检验(Mann-Whitney U 检验)结果显示,T 分期越高,淋巴结转移数则越多(表 1, $n = 80$, $P < 0.05$);Spearman 等级相关分析示, $r_s = 0.48$, $P < 0.01$ (表 1, $n = 80$)。



A:定量 PCR 显示,肿瘤组织中 AQP3 的 mRNA 表达明显高于癌旁非肿瘤组织($n = 80$, $P < 0.05$); B:Western blot 证实了 PCR 的结果(图示为其中 1 对)。

图 1 胃癌组织及癌旁非肿瘤组织中 AQP3 mRNA 及蛋白的表达

Figure 1 The AQP3 expression of mRNA and protein in gastric adeno carcinoma tissue and corresponding nontumor tissue

表 1 胃癌不同分期淋巴结转移情况

Table 1 The lymph node metastasis in each stage of GAC

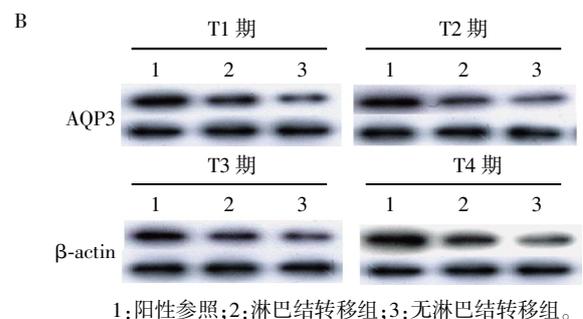
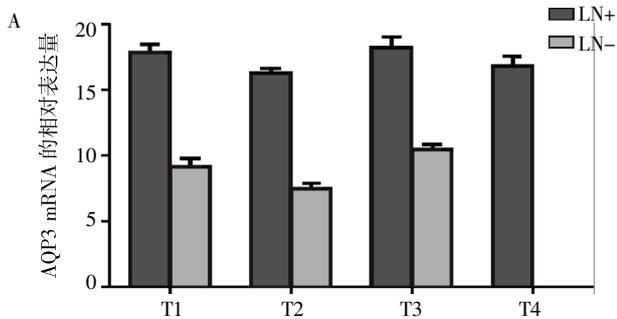
分期	<i>n</i>	有淋巴结转移	无淋巴结转移
T1	13	4	9
T2	15	9	6
T3	29	23	6
T4	23	23	0
合计	80	59	21

2.3 同一 T 分期中,淋巴结转移情况随 AQP3 不同表达而呈差异

分析 AQP3 与淋巴结转移之间的关系, t 检验结果显示:癌肿处于同一浸润深度时 AQP3 mRNA 的不同表达影响淋巴结转移,有淋巴结转移的 T1、T2、T3、T4 期癌组织中 AQP3 mRNA 的表达明显高于无淋巴结转移者(图 2A, $n = 80$, $P < 0.05$)。而癌肿处于不同浸润深度时,组织中 AQP3 mRNA 的表达并无明显差异(即 AQP3 在 T1、T2、T3、T4 期之间表达无差异)。另外,胃癌组织中 AQP3 mRNA 的表达与患者的性别、年龄、癌肿的大小、位置无关。PCR 结果经 Western blot 证实(图 2B)。

3 讨论

胃癌病死率高,预后差;据美国国家癌症研究署统计,胃癌位列全世界肿瘤发病率的第 4 位,占所有肿瘤的 8.6%,每年死于胃癌患者占所有肿瘤死亡的 10.4%,位列全世界肿瘤死亡原因的第 2 位^[9]。而中国据 169 871 例肿瘤统计分析,胃癌列我国肿瘤发病率的第 3 位^[10];探讨胃癌的发病原因及机制具有重要意义。以往的研究表明,上调 AQP 在肿瘤



A:定量 PCR 显示,同一 T 分期时 AQP3 mRNA 的不同表达影响淋巴结转移,即有淋巴结转移的各 T1、T2、T3、T4 期癌组织中 AQP3 mRNA 的表达明显高于无淋巴结转移者($P < 0.05$);B: Western blot 证实了 PCR 的结果(图示为各取其中 1 对)。

图 2 胃癌组织中 AQP3 的表达与淋巴结转移的关系

Figure 2 The relationship between the AQP3 expression in GAC and the lymph node metastasis

细胞中的表达后,细胞的迁移能力(体外)和局部侵袭能力(体内)增强^[11];提示 AQP 可能在恶性肿瘤的生长、转移中起重要作用^[12]。本研究采用 RT-PCR、Western blot 两种方法对 80 例不同分期的胃腺癌组织中 AQP3 mRNA 和蛋白的表达进行检测,并与各临床病理分期中淋巴结转移情况进行分析;结果显示,胃癌肿瘤组织中 AQP3 的表达明显高于癌旁非肿瘤组织,提示组织中 AQP3 的异常高表达可能是胃癌发生的促进因素之一。AQP3 在相同浸润深度的肿瘤组织中的差异表达与淋巴结转移存在关联,有淋巴结转移的 T1、T2、T3、T4 期肿瘤组织中 AQP3 的表达明显高于无淋巴结转移者,提示胃癌组织中高表达的 AQP3 可能促进胃腺癌患者淋巴结转移的发生。恶性肿瘤的淋巴结转移是进展期行为,而胃癌即使是早期(T1 期)也可以出现淋巴结转移^[7];胃癌的手术疗效与有无淋巴结转移关系密切,而预后则与淋巴结转移的程度相关^[8];因此 AQP3 的差异表达有望成为预测胃癌淋巴结转移、评估病情、判断手术疗效及预后的重要指标,并可能是胃癌治疗靶点之一。胃癌的淋巴结转移与分期有关,分期越高则转移的可能性越大;本研究通过分层分析,发现癌组织中 AQP3 的表达与胃转移相关,进一步可推测胃癌分期,结果更可信。

Huang 等^[13]用表皮生长因子(EGF)使胃癌细胞株 AGS、SGC7901 中 AQP3 表达上调,可使 AGS、SGC7901 细胞增殖(MTT 法)、迁移能力(划痕试验)明显增强;再运用 RNA 干扰技术使 AGS、SGC7901 细胞中 AQP3 的表达下调,结果显示 AQP3 下调后,AGS、SGC7901 细胞增殖、迁移能力均明显下降;初步证实 AQP3 高表达对胃癌细胞增殖、迁移能力具有调节作用,本文推断这可能是 AQP3 促进胃癌淋巴结转移的机制之一。

Shen 等^[14]的研究揭示,除 AQP3、AQP1、AQP4、AQP5 及 AQP11 也在胃腺癌组织中有表达,与 AQP3 相似,AQP5 在癌组织的表达明显高于癌旁非肿瘤组织;AQP4 则相反,与相应非肿瘤组织相比,癌组织中的表达极低;而 AQP1 和 AQP11 在两处的表达无明显差异。提示,水通道蛋白的其他亚型可能参与胃癌的发生发展。

总之,本研究初步揭示了胃腺癌组织 AQP3 的高表达可能促进胃癌淋巴结转移,而 AQP3 促进胃癌淋巴结转移的深入机制及其与胃癌其他方面的关系、AQPs 的其他亚型与胃癌的关系尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Preston GM,Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons;member of an ancient channel family[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991,88(24):11110-11114
- [2] Mobasher A,Wray S,Marples D. Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays [J]. J Mol Histol,2005,36(1-2):1-14
- [3] Morishita Y,Sakube Y,Sasaki S,et al. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases;aquaporin superfamily (superaquaporins):expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms[J]. J Pharmacol Sci,2004,96(3):276-279
- [4] Hoque MO,Soria JC,Woo J,et al. Aquaporin 1 is overexpressed in lung cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth [J]. Am J Pathol,2006,168(4):1345-1353
- [5] Saadoun S,Papadopoulos MC,Davies DC,et al. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours[J]. Br J Cancer,2002,87(6):621-623
- [6] Jablonski EM,Mattocks MA,Sokolov E,et al. Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2007,250(1):36-46
- [7] 吴在德,吴肇汉. 外科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:437-442
- [8] 吴孟超,吴在德. 黄家驷外科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:1440-1467
- [9] Parkin DM,Bray F,Ferlay J,et al. Global cancer statistics,2002[J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108
- [10] He J,Gu D,Wu X,et al. Major causes of death among men and women in China [J]. N Engl J Med,2005,353(11):1124-1134
- [11] Verkman AS,Hara-Chikuma M,Papadopoulos MC. Aquaporins--new players in cancer biology [J]. J Mol Med, 2008,86(5):523-529
- [12] Verkman AS. More than just water channels:unexpected cellular roles of aquaporins [J]. J Cell Sci,2005,118(Pt 15):3225-3232
- [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] 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

[收稿日期]2011-10-29