

· 基础研究 ·

水通道蛋白3参与缺氧介导的结直肠癌化疗耐药的机制研究

周阳春*, 章 静, 朱 峰

南京医科大学附属逸夫医院普外科, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探讨水通道蛋白3(aquaporin 3, AQP3)在缺氧介导结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)化疗耐药中的作用及意义。方法:通过实时荧光定量PCR和Western blot实验检测缺氧条件下结直肠癌HCT116、HT29细胞中AQP3表达的变化;通过CCK-8实验检测在氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)作用下,缺氧对HCT116细胞化疗敏感性的影响;通过CCK-8和平板克隆形成实验检测AQP3对缺氧条件下HCT116细胞化疗敏感性的影响。结果:在缺氧条件下,HCT116、HT29细胞中AQP3 mRNA以及蛋白表达水平均显著上调;抑制缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α)表达,缺氧条件下HCT116细胞中AQP3 mRNA、蛋白表达水平均未显著增加。在缺氧条件下,HCT116细胞对5-Fu的化疗敏感性低于常氧条件;抑制AQP3表达,HCT116细胞对5-Fu化疗敏感性增加。平板克隆形成实验也证明了抑制AQP3表达可增加HCT116细胞在缺氧条件下的化疗敏感性。结论:在缺氧条件下,HIF-1 α 上调AQP3表达,继而导致结直肠癌细胞对5-Fu耐药。

[关键词] 结直肠癌;水通道蛋白3;缺氧诱导因子-1 α ;化疗耐药

[中图分类号] R753.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)03-344-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20210306

Mechanism of AQP3 in the chemoresistance of colorectal carcinoma mediated by hypoxic condition

ZHOU Yangchun*, ZHANG Jing, ZHU Feng

General Surgery, Sir Run Run Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the role of aquaporin 3 (AQP3) in the chemoresistance of colorectal carcinoma mediated by hypoxia. **Methods:** Real-time quantitative PCR and Western blot were performed to detect the expression of AQP3 under hypoxic condition in colorectal carcinoma HCT116 cells and HT29 cells. CCK-8 was used to detect the influence of hypoxia on the sensitivity of HCT116 cells to 5-fluorouracil (5-Fu) under hypoxic condition. CCK-8 and colony formation assay were also used to detect the effect of AQP3 on the sensitivity of HCT116 cells to 5-Fu under hypoxic condition. **Results:** Under hypoxic condition, the expression levels of AQP3 mRNA and protein were significantly up-regulated in both HCT116 and HT29 cells. After hypoxia inducible factor (HIF-1 α) was inhibited, and the expression levels of AQP3 mRNA and protein in HCT116 cells under hypoxic condition were not significantly increased. Under hypoxic condition, the sensitivity of HCT116 cells to 5-Fu was lower than that in normal oxygen condition, which was reversed by inhibiting AQP3. Colony formation assay also demonstrated that the effect of 5-Fu on the proliferation ability of HCT116 cells was smaller under hypoxic condition, which was reversed by inhibiting AQP3. **Conclusion:** Under hypoxic condition, colorectal carcinoma up-regulated AQP3 expression by HIF-1 α , which lead to 5-Fu chemoresistance.

[Key words] colorectal carcinoma; aquaporin 3; hypoxia inducing factor-1 α ; chemoresistance

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(03):344-348]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金一般项目 (NMUB2018313)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhouyang.chun@163.com

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是我国最常见恶性肿瘤之一,且发病率逐年上升,居全部肿瘤第3位,死亡率列第4位,严重威胁我国人民生命健康^[1]。目前CRC治疗方法主要包括根治性手术治

疗、化学药物治疗以及分子靶向治疗等^[2],而肿瘤细胞对化疗不敏感常导致CRC治疗失败,严重影响患者预后^[3]。因此,深入研究CRC化疗耐药机制,降低CRC对化疗药物的耐药性,对提高CRC患者的预后具有十分重要的意义。

缺氧是实体肿瘤微环境的主要特征,且是肿瘤预后的独立危险因素^[4]。缺氧可导致肿瘤细胞生物学行为变化,诸如细胞存活、代谢重组、血管生成、基因组稳定性的改变^[5-7]。越来越多的研究发现缺氧参与肿瘤化疗耐药的产生,然而其机制仍不清楚^[8-10]。

水通道蛋白3(aquaporin 3, AQP3)是水通道蛋白家族成员之一,具有介导渗透压依赖性跨生物膜水转运的作用,对H₂O₂、甘油等小分子物质亦具有通透性^[11-13]。诸多研究发现AQP3参与肿瘤化疗耐药^[14-16]。文献研究证实CRC组织AQP3表达显著上调,且促进CRC细胞增殖、迁移^[17],但AQP3是否参与CRC化疗耐药尚不清楚。Hoogewijs等^[18]发现缺氧可上调纤维肉瘤L929细胞AQP3表达;然而缺氧是否可以上调CRC中AQP3表达尚不清楚。我们前期研究发现缺氧可上调HCT116和HT29细胞中AQP3表达,因此推测缺氧可能通过AQP3介导CRC化疗耐药。

1 材料和方法

1.1 材料

人CRC细胞系HCT116、HT29细胞(中国科学院上海细胞库);5-Fu(Sigma公司,德国);转染试剂Lipofectamine2000、TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国);RNA逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本);HIF-1 α -siRNA、AQP3-siRNA(上海吉凯基因);AQP3抗体(Santa Cruz公司,美国);HIF-1 α 抗体、GAPDH抗体(CST公司,美国);BCA试剂盒、抗兔或抗鼠二抗、细胞活性CCK-8检测试剂盒(杭州碧云天公司)。RPMI1640培养基、Opti-MEM培养基(Life Technologies公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HCT116、HT29细胞加入RPMI1640培养基+10%胎牛血清,加入100 U/mL的青霉素和100 mg/L的链霉素,于37℃、5% CO₂恒温孵箱中常规培养。缺氧条件下细胞培养是将细胞置于密封缺氧箱内(含有1% O₂)。

1.2.2 RNA干扰实验

取对数生长2 \times 10⁵个细胞接种于6孔板,加入

2 mL无抗生素的培养基,混匀,置于37℃、5% CO₂培养箱培养,1 d后进行干扰实验。20 μ mol/L siRNA 10 μ L加至250 μ L不含血清的Opti-MEM培养基,轻轻混匀,室温孵育5 min。5 μ L的Lipofectamine 2000加至250 μ L不含血清的Opti-MEM培养基,轻轻混匀,室温孵育5 min。再将两种悬液轻轻混合,室温孵育20 min。将上述混合液加入到1.5 mL无抗生素培养基中,培养细胞24 h后,弃去上层液体,更换新鲜培养基,继续培养48~96 h。

1.2.3 实时荧光定量PCR实验

采用TRIzol试剂提取细胞RNA,利用RNA逆转录试剂盒逆转成cDNA,实时荧光定量PCR检测AQP3 mRNA表达水平变化。相关引物序列:AQP3上游引物5'-CCGTGACCTTTGCCATGTG-3',下游引物5'-CGAAGTGCCAGATTGCATCATAA-3';HIF-1 α 上游引物5'-TAGCCGAGGAAGAACTATGAAC-3',下游引物5'-CTGAGGTTGGTTACTGTTGGTA-3';GAPDH上游引物5'-CGCTGAGTA CGTCGTG-GAGTC-3',下游引物5'-GCTGATGATCTTGAGGCT-GTTGTC-3'。每组实验重复3遍。PCR扩增条件:95℃ 30 s预变性,95℃ 6 s,60℃ 30 s,40个循环。在AB17300系统中检测目的基因和相应内参的Ct值,每组实验重复3遍。

1.2.4 Western blot实验

BCA法测定细胞裂解物的蛋白含量,取等量蛋白质用SDS-PAGE法分离,并转移至PVDF膜上,加单克隆抗体于4℃下过夜孵育,TBST洗去一抗,加二抗于室温孵育2 h,TBST洗去二抗,洗涤后以ECL试剂盒显示免疫印迹条带,以GAPDH作为内参。

1.2.5 细胞活力实验

CCK-8检测细胞活力。96孔板每孔加入1 \times 10⁴个细胞,37℃温箱培养,24 h后加入0、20、40、60、80、100 μ g/mL 5-Fu作用24 h,每组均设置3个平行样。每孔加入10 μ L CCK-8试剂,在细胞培养箱中继续孵育2 h,再用酶标仪检测,检测波长450 nm。

1.2.6 平板克隆形成实验

平板克隆形成实验评价细胞集落形成能力,将1 000个细胞种植于6孔板中,培养14 d后,用甲醛固定结晶紫染色后计数进行评价。

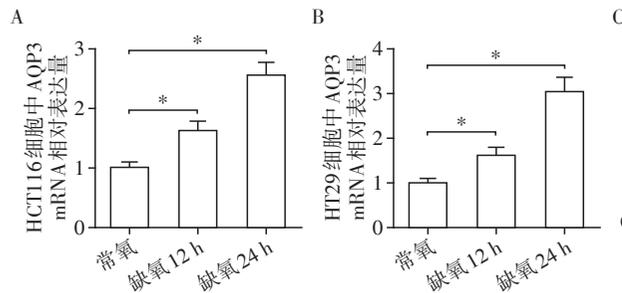
1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件处理分析实验数据。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组独立数据采用t检验分析组间差异;多组数据(同一研究对象在不同时间点的测量数据)采用重复测量方差分析总

体差异, LSD-*t*法进行组间两两比较; 多组数据(同一研究对象在不同因素处理的测量数据)采用单因素方差分析总体差异, LSD-*t*法进行组间两两比较; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧条件下结直肠癌细胞 AQP3 表达上调 为研究缺氧条件下 AQP3 在 CRC 细胞中表达的



变化, 将 HCT116、HT29 细胞分别放置于缺氧环境中 (1% O₂), 结果提示 AQP3 mRNA 表达水平增加 (图 1A、B, $P < 0.05$), AQP3 蛋白表达水平亦显著增加 (图 1C、D)。因此, 缺氧条件下, CRC 细胞通过转录水平上调 AQP3 mRNA 表达, 继而导致 AQP3 蛋白表达水平增加。

2.2 缺氧通过 HIF-1 α 上调结直肠癌细胞 AQP3 表达 HIF-1 α 是介导细胞对缺氧反应的重要转录调

A、B: 通过 RT-qPCR 验证在缺氧条件下, HCT116 细胞(A)和 HT29(B)中 AQP3 mRNA 表达水平上调; C、D: 通过 Western blot 验证在缺氧条件下, HCT116 细胞(C)和 HT29(D)中 AQP3 蛋白表达水平上调, $P < 0.05 (n=3)$ 。

图 1 缺氧条件下结直肠癌细胞 AQP3 表达上调

Figure 1 AQP3 expression in colorectal carcinoma cells was significantly up-regulated under hypoxic condition

节因子。HCT116 细胞在缺氧 12 h、24 h 后, HIF1 α 蛋白表达水平显著上调(图 2A)。采用 siRNA 抑制 HIF-1 α 表达后, 再将 HCT116 细胞置于缺氧条件下, AQP3 mRNA、蛋白表达水平均未显著增加(图 2B、C, $P < 0.05$)。因此, 缺氧通过 HIF-1 α 上调 CRC 细胞 AQP3 mRNA 的表达, 继而导致 AQP3 蛋白表达水平增加。

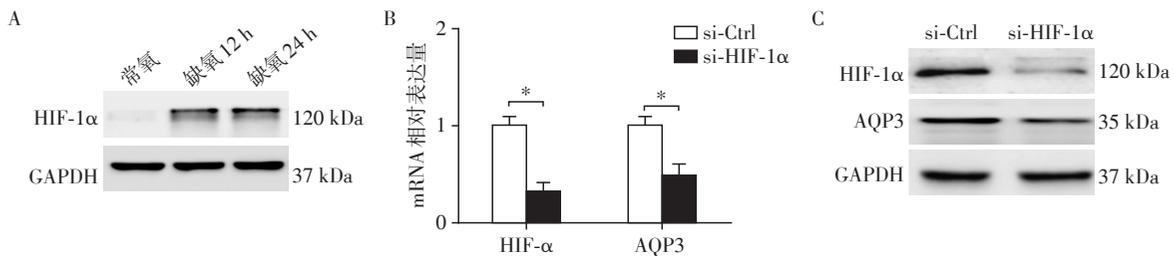
2.3 缺氧条件下抑制 AQP3 表达增加了结直肠癌细胞对 5-Fu 的化疗敏感性

CCK-8 实验发现, HCT116 细胞在 5-Fu 作用下, 缺氧条件下的细胞活力高于常氧条件(图 3A, $P < 0.05$), 提示缺氧导致 CRC 细胞对 5-Fu 的化疗敏感

性下降。然而, AQP3 在缺氧介导 CRC 细胞化疗耐药中的作用尚不清楚。本研究采用 siRNA 技术抑制 AQP3 表达, 继而发现在缺氧条件下, HCT116 细胞对 5-Fu 化疗敏感性增加(图 3B, $P < 0.05$)。平板克隆形成实验进一步证实了缺氧可导致结直肠癌细胞对 5-Fu 化疗敏感性的降低, 抑制 AQP3 表达可逆转此效应(图 3C、D, $P < 0.05$)。因此, 本研究认为 AQP3 参与缺氧介导的 CRC 化疗耐药。

3 讨论

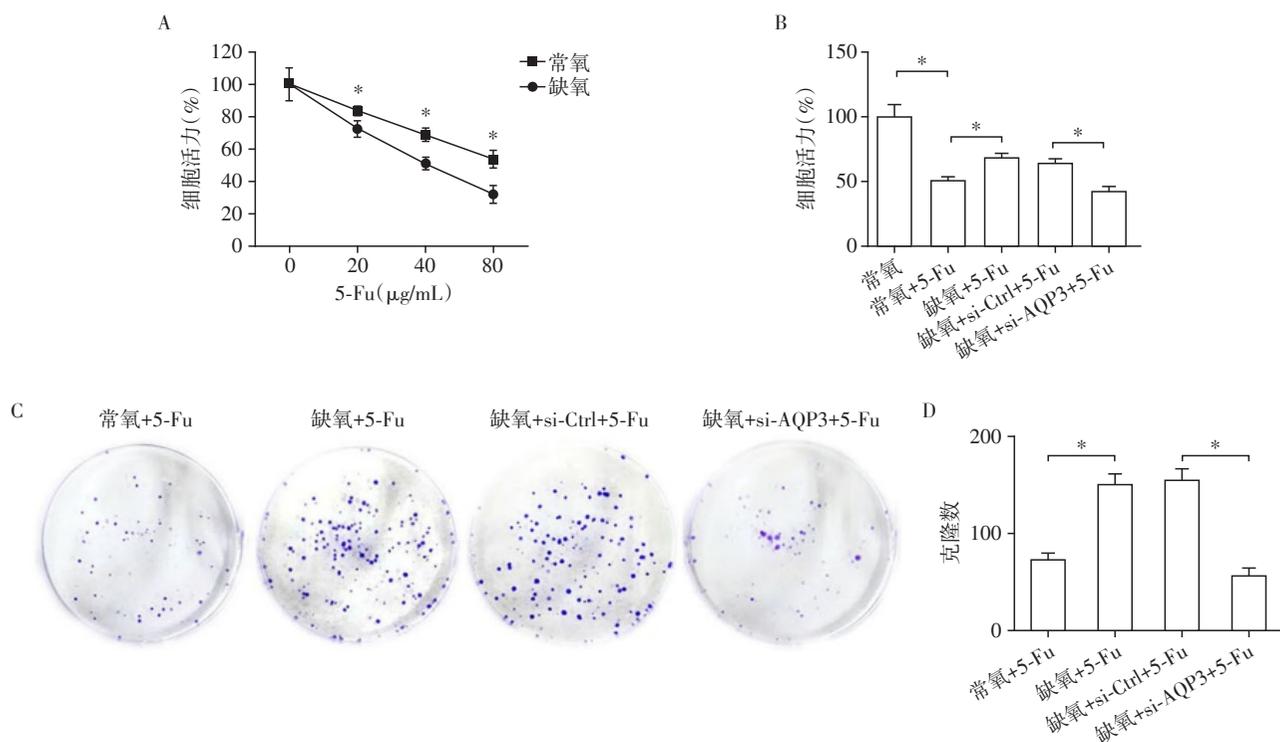
缺氧是实体肿瘤微环境的主要特征, 且参与肿瘤细胞生物学行为变化以及肿瘤化疗耐药的



A: Western blot 验证缺氧条件下 HCT116 细胞中 HIF-1 α 蛋白表达水平上调; B: 通过 RT-qPCR 验证在缺氧条件下, 抑制 HCT116 细胞中 HIF-1 α 表达, HIF-1 α 和 AQP3 mRNA 表达水平下调; C: Western blot 验证在缺氧条件下, 抑制 HCT116 细胞中 HIF-1 α 表达, HIF-1 α 和 AQP3 蛋白表达水平下调。两组比较, $P < 0.05 (n=3)$ 。

图 2 缺氧通过 HIF-1 α 上调结直肠癌细胞中 AQP3 表达

Figure 2 Hypoxia upregulated AQP3 expression by HIF-1 α in colorectal carcinoma cells



A: CCK-8 验证缺氧条件下 HCT116 细胞对 5-Fu 化疗敏感性低于常氧环境; B: CCK-8 验证缺氧环境下, 抑制 AQP3 表达增加了 HCT116 细胞对 5-Fu 的化疗敏感性; C: 平板克隆形成实验验证缺氧条件下, 抑制 AQP3 表达细胞克隆形成减少, 增加了 HCT116 细胞对 5-Fu 的化疗敏感性; D: 各组细胞克隆形成数的定量分析。两组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 缺氧条件下抑制 AQP3 表达增加了结直肠癌细胞对 5-Fu 的化疗敏感性

Figure 3 The sensitivity of colorectal carcinoma cells to 5-Fu was enhanced by inhibiting AQP3 expression under hypoxic condition

产生^[5-6,8]。HIF-1 α 是介导细胞对缺氧反应的重要转录调节因子,研究发现CRC中HIF-1 α 高表达,且与肿瘤分化程度、临床病理分期以及淋巴结转移有关^[19]。HIF-1 α 参与多种肿瘤相关基因的转录调控。主要包括:①血管新生相关基因:血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等;②糖代谢相关基因:糖酵解酶II等;③侵袭、转移相关基因:趋化因子受体4等;④凋亡相关基因:p53等;⑤细胞增殖与分化相关基因:胰岛素样生长因子2、转化生长因子、成纤维生长因子等^[20-21]。

AQP3是水通道蛋白家族成员之一,主要介导水、甘油、H₂O₂等小分子的跨膜转运^[22]。越来越多的研究发现AQP3参与肿瘤的发生与进展,促进肿瘤增殖、侵袭转移,参与肿瘤化疗耐药^[23-24]。这些研究表明AQP3可能在肝癌、乳腺癌的致癌机制及发展中发挥着重要作用。研究也发现CRC组织中AQP3表达显著上调,且促进CRC细胞增殖、迁移^[17],但在CRC化疗耐药中的作用尚不清楚。

Hoogewijs等^[18]发现缺氧可上调纤维肉瘤L929细胞AQP3表达;然而缺氧是否可以上调CRC的

AQP3表达尚不清楚。本研究发现缺氧促进CRC细胞株HCT116、HT29细胞中AQP3 mRNA、蛋白表达上调,抑制HIF-1 α 表达后AQP3表达明显下调,提示缺氧通过HIF-1 α 调控AQP3表达。HIF-1 α 是细胞内重要的转录调控因子,研究提示AQP3启动子区域存在HIF-1 α 反应元件(HIF-1 response element, HRE)^[18],然而CRC细胞AQP3启动子区域是否存在HRE,需要进一步研究。同时,缺氧可导致肿瘤细胞产生应激反应,继而导致细胞内H₂O₂积聚,而AQP3可转运H₂O₂,因此缺氧可能导致肿瘤细胞AQP3表达上调,继而加剧肿瘤细胞处于缺氧环境。

诸多研究表明缺氧可降低实体肿瘤化疗的敏感性,继而导致肿瘤细胞化疗耐药。然而AQP3是否参与缺氧介导的CRC细胞化疗耐药尚不清楚。本研究进一步证实缺氧降低CRC细胞对氟尿嘧啶的化疗敏感性,通过siRNA技术下调HCT116细胞中AQP3表达后,缺氧导致的化疗耐药得以逆转。因此,以上研究表明AQP3参与缺氧介导CRC化疗耐药,有利于进一步深入了解CRC化疗耐药的机制以及AQP3介导肿瘤化疗耐药的机制。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132
- [2] AJANI J A, D'AMICO T A, ALMHANNA K, et al. Gastric cancer, version 3.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl ComprCanc Netw*, 2016, 14(10): 1286-1312
- [3] LORD A C, GRAHAM M C, D'SOUZA N, et al. The significance of tumour deposits in rectal cancer after neoadjuvant therapy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Cancer*, 2019, 122: 1-8
- [4] SEMENZA G L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology[J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9(1): 47-71
- [5] 吴 飏, 刘东方, 张 纯, 等. 缺氧微环境中胰腺星状细胞通过CCL7/CCR5轴促进胰腺癌侵袭[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(5): 521-525, 543
- [6] MUZ B, DE LA PUENTE P, AZAB F, et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy[J]. *Hypoxia(Auckl)*, 2015, 3: 83-92
- [7] LEE G Y, CHUN Y S, SHIN H W, et al. Potential role of the N-MYC downstream-regulated gene family in reprogramming cancer metabolism under hypoxia[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 57442-57451
- [8] BARAN N, KONOPLEVA M. Molecular pathways: hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(10): 2382-2390
- [9] ROSCIGNO G, PUOTI I, GIORDANO I, et al. MiR-24 induces chemotherapy resistance and hypoxic advantage in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19507-19521
- [10] DANZA K, SILVESTRIS N, SIMONE G, et al. Role of miR-27a, miR-181a and miR-20b in gastric cancer hypoxia-induced chemoresistance [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(4): 400-406
- [11] HARA-CHIKUMA M, WATANABE S, SATOOKA H. Involvement of aquaporin-3 in epidermal growth factor receptor signaling via hydrogen peroxide transport in cancer cells [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2016, 471(4): 603-609
- [12] HARA-CHIKUMA M, SATOOKA H, WATANABE S, et al. Aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide transport is required for NF- κ B signalling in keratinocytes and development of psoriasis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 7454
- [13] THIAGARAJAH J R, CHANG J, GOETTEL J A, et al. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide-dependent responses to environmental stress in colonic epithelia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(3): 568-573
- [14] DONG X, WANG Y, ZHOU Y, et al. Aquaporin 3 facilitates chemoresistance in gastric cancer cells to cisplatin via autophagy [J]. *Cell Death Discov*, 2016, 2(1): 16087
- [15] GAO L, GAO Y, LI X, et al. Aquaporins mediate the chemoresistance of human melanoma cells to arsenite [J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(1): 81-87
- [16] TRIGUEROS-MOTOS L, PÉREZ-TORRAS S, CASADO F J, et al. Aquaporin 3(AQP3) participates in the cytotoxic response to nucleoside-derived drugs [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 434
- [17] LI A, LU D, ZHANG Y, et al. Critical role of aquaporin-3 in epidermal growth factor-induced migration of colorectal carcinoma cells and its clinical significance [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(2): 535-540
- [18] HOOGEWIJS D, VOGLER M, ZWENGER E, et al. Oxygen-dependent regulation of aquaporin-3 expression [J]. *Hypoxia(Auckl)*, 2016, 4: 91-97
- [19] 孙艳丽, 陈 飞, 陈 武. 缺氧诱导因子-1 α 及Foxp3在结直肠癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(5): 770-773
- [20] WEI T T, LIN Y T, TANG S P, et al. Metabolic targeting of HIF-1 α potentiates the therapeutic efficacy of oxaliplatin in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39(2): 414-427
- [21] LIN M C, LIN J J, HSU C L, et al. GATA3 interacts with and stabilizes HIF-1 α to enhance cancer cell invasiveness [J]. *Oncogene*, 2017, 36(30): 4380
- [22] AGRER. The aquaporin water channels [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3(1): 5-13
- [23] CHEN G, SHI Y, LIU M, et al. circHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP3 expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 175
- [24] SATOOKA H, HARA-CHIKUMA M. Aquaporin-3 controls breast cancer cell migration by regulating hydrogen peroxide transport and its downstream cell signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(7): 1206-1218

[收稿日期] 2020-04-02