

Expression of AQP1 in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line with Different Metastatic Capacities

Yunying Qin, Ningbin Luo, Peng Wang, Yinan Ji*

Guangxi Medical University Affiliated Cancer Hospital, Nanning Guangxi
Email: jnn716@163.com

Received: Nov. 25th, 2018; accepted: Dec. 10th, 2018; published: Dec. 17th, 2018

Abstract

Objective: To study the expression levels of AQP1 in human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines with different metastatic capacities. **Methods:** AQP1 expression was detected using RT-PCR and Western blot in human NPC cell lines CNE-1, CNE-2 and 5-8F. Differences of AQP1 levels among 3 kinds of cell lines were then analyzed. **Results:** AQP1 expression could be detected in CNE-1, CNE-2 and 5-8F cell lines. The AQP1 levels in 3 cell lines were different ($P < 0.05$), and the expression of AQP1 was increased with the degree of metastatic capacities in human NPC cell lines. **Conclusions:** The AQP1 expression is possibly associated with the metastatic potential of NPC cells.

Keywords

Nasopharyngeal Carcinoma, Cell Line, AQP1, Reverse Transcription PCR, Western Blot

AQP1在不同转移潜能的人鼻咽癌细胞株中的表达

覃云英, 罗宁斌, 王 鹏, 姬逸男*

广西医科大学附属肿瘤医院, 广西 南宁
Email: jnn716@163.com

收稿日期: 2018年11月25日; 录用日期: 2018年12月10日; 发布日期: 2018年12月17日

*通讯作者。

摘要

目的: 探讨AQP1在不同转移潜能人鼻咽癌细胞中表达的差异。**方法:** 利用RT-PCR及Western blot两种方法, 检测CNE1、CNE2、5-8F三种不同转移潜能的人鼻咽癌细胞株中AQP1的表达情况, 并分析AQP1表达与细胞转移潜能的关系。**结果:** 在CNE1、CNE2及5-8F细胞株中均可检测到AQP1的表达。在三种不同转移潜能细胞株中, AQP1的表达量水平有统计学差异($P < 0.05$)。而且, AQP1的表达水平随着细胞株转移潜能的增高而增加。**结论:** AQP1的表达水平可能与人鼻咽癌细胞的转移潜能密切相关。

关键词

鼻咽癌, 细胞株, AQP1, RT-PCR, Western Blot

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

鼻咽癌最常见于中国南方, 其中, 广西发病率位居全国第二。由于鼻咽癌位置的隐蔽性和临床症状的多样性, 大多数患者就诊时已属中晚期。经过合理的放射治疗和规范的综合治疗后, 远处转移是鼻咽癌治疗失败的主要原因之一[1]。因此对鼻咽癌转移机制的研究非常重要, 它是进一步降低鼻咽癌转移率、提高患者生存质量的关键步骤。

水通道蛋白 1 (Aquaporin 1, AQP1)是水通道蛋白家族的一员, 近年来研究发现它与肿瘤的浸润转移有重要联系[2] [3] [4]。为明确 AQP1 在鼻咽癌转移中的作用, 本研究通过 RT-PCR 法在 RNA 水平和 Western blot 法在蛋白水平检测 AQP1 在 3 种不同转移潜能人鼻咽癌细胞株 CNE-1 (中度转移性)、CNE-2 (高转移性)、5-8F (极高转移性) mRNA 表达及蛋白表达的差异, 分析 AQP1 表达与人鼻咽癌细胞转移潜能的相关性, 为进一步研究 AQP1 与鼻咽癌浸润转移实验提供理论基础, 争取在明确鼻咽癌转移机制上提供分子生物学基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

3 株不同转移潜能的人鼻咽癌细胞株(CNE1、CNE2、5-8F)中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心和武汉普诺赛生命科技有限公司, 培养条件为含 10%小牛血清及青、链霉素的 RPMI1640 培养基 (BioInd 公司), 5% CO₂ 孵箱 37°C 孵育。

2.2. 实验方法

2.2.1. RT-PCR 检测鼻咽癌细胞中 AQP1 mRNA 表达水平

AQP1 mRNA 引物: 上游引物 5'-CAGCCCAAGGACAGTTCAGAG-3', 下游引物 5'-CCATCATGGCTAAGTGCACAG-3', 扩增片段长度为 119 bp。内对照 β -actin 引物: 上游引物 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3', 下游引物 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGGA-3', 扩增片段长度为 185 bp。对数期细胞, 按照 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA, 每份细胞总 RNA 经逆转录成 cDNA

模板链后,取 2 μL cDNA 模板配置 25 μL PCR 反应体系,震荡混匀后短暂离心,置于 PCR 扩增仪中扩增。用微量移液器将 sybr green 荧光染料 1 μL 、扩增后 DNA 样品 5 μL 和 DNAMaker 5 μL 混匀后再缓慢加到电泳槽内,接通电源,当样品各条带已跑到预期位置,切断电源。紫外照相并进行分析扫描。AQP1 mRNA 表达的相对值为各目的基因与 β -actin 产物条带的灰度值比值。

2.2.2. Western Blot 法检测 3 种细胞株中 AQP1 蛋白表达

取对数期细胞,裂解离心得到总蛋白,采用 bradford 比色法测定蛋白含量。SDS PAGE 电泳分离 40 μL 样本,利用电转印法使蛋白转移至 PvDF 膜上,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜后加入一抗孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育(37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h), 孵育结束后 TBST 再次洗涤 3 次,最后曝光显影。AQP1 蛋白相对表达量为各目的蛋白光密度值与相应内参 β -actin 光密度值的比值。

1.3 统计学方法采用 SPSS 20.0 软件进行分析,应用单因素方差分析和 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 不同人鼻咽癌细胞株中 AQP1 mRNA 的表达水平

RT-PCR 结果显示 AQP1 mRNA 在 CNE1、CNE2、5-8F 三种不同转移潜能鼻咽癌细胞株中的相对表达量有统计学差异($P < 0.05$)。两两比较结果显示, CNE-2、5-8F 两组表达水平差异虽无统计学意义($P = 0.125$), 但均高于 CNE-1 (P 均 < 0.05) (见表 1)。

Table 1. Expression of AQP1 mRNA in 3 nasopharyngeal carcinomacell lines

表 1. 三种鼻咽癌细胞株中 AQP1 mRNA 的表达

细胞株	AQP1 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)	F	P
CNE-1	0.29 \pm 0.05		
CNE-2	0.57 \pm 0.04	101.96	<0.001
5-8F	0.65 \pm 0.06		

3.2. 不同人鼻咽癌细胞株中 AQP1 蛋白的表达水平

Western blot 结果显示在 CNE-1、CNE-2 及 5-8F 细胞株中均可检测到 AQP1 蛋白的表达(见图 1)。方

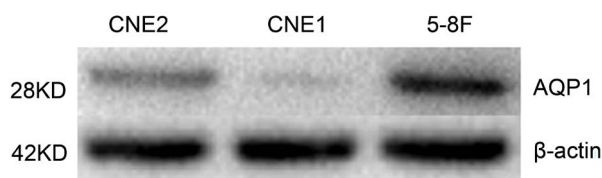


Figure 1. Expression of AQP1 protein in CNE2, CNE1 and 5-8F cell lines detecting by Western blot
图 1. Western blot 检测鼻咽癌细胞株 CNE2、CNE1、5-8F 细胞中 AQP1 的表达

Table 2. Expression of AQP1 protein in 3 nasopharyngeal carcinomacell lines

表 2. 三种鼻咽癌细胞株中 AQP1 的表达

细胞株	AQP1 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)	F	P
CNE-1	0.32 \pm 0.02		
CNE-2	0.58 \pm 0.03	41.24	<0.001
5-8F	0.65 \pm 0.04		

差分析和两两比较结果显示,三种细胞株 AQP1 蛋白表达均有统计学差异(P 均 < 0.05),其中 5-8F 最高,其次为 CNE-2, CNE-1 表达最低见(表 2)。

4. 讨论

本研究中,我们发现 AQP1 在不同转移潜能鼻咽癌细胞株中的表达有差异,高转移性的鼻咽癌细胞株 CNE2、5-8F 的 AQP1 表达高于相对低转移性的细胞株 CNE-1,其中 5-8F 表达最高,CNE-2 次之,提示 AQP1 与鼻咽癌的转移有密切的关系。

水通道蛋白广泛存在于原核和真核生物细胞膜,能高效、选择性的转运水分子,对调节动、植物的水代谢起着重要作用[5]。AQP1 是最早发现的水通道蛋白,其基因定位于人染色体 7p15 → p14 [6],质膜中以四聚体形式存在,在 4 个单体的中心部分含有独立的孔道,孔道中有 1 个带正电的区域会排斥带正电的离子,避免水合质子的通过。AQP1 是一种高效运输水的通道,其介导的水被动跨膜转运,在维持细胞内环境的稳定平衡中起着特殊作用。近年来发现,AQP1 在肿瘤的转移过程中主要发挥以下两点作用:1) 促进肿瘤血管生成。恶性肿瘤内 AQP1 表达水平和微血管密度呈正相关[7],敲除 AQP1 基因的小鼠成瘤能力大大降低,肿瘤细胞生长显著减缓,血管生成减少[8]。2) 促进肿瘤细胞迁移。AQP1 可以通过促进边缘细胞膜突起物的更新来加速细胞迁移,提示由 AQP1 介导的跨膜水转运可能在肿瘤细胞迁移过程中发挥了重要的作用,即促进细胞形状改变和帮助细胞向前推进[9]。

目前,AQP1 在鼻咽癌侵袭转移的研究较少。李琦研究结果发现鼻咽肿瘤组织中 AQP1 表达强于非肿瘤组织,且发生转移的肿瘤组织中表达进一步升高[10];AQP1 在鼻咽癌中通过 VEGF 参与血管生成,从而促进肿瘤生长和转移[11]。本研究在鼻咽癌细胞水平指出,AQP1 在不同侵袭潜能鼻咽癌细胞株中的表达有差异,也进一步证实了 AQP1 与鼻咽癌转移的相关性。

5. 结论

综上所述,AQP1 上调表达可能促进鼻咽癌的浸润转移,有望成为评估鼻咽癌患者预后的指标,并指导临床治疗方案的选择。抑制 AQP1 表达,能否逆转鼻咽癌细胞侵袭性,降低鼻咽癌转移率,值得进一步研究。

基金项目

广西高校中青年教师基础能力提升项目(2017KY0129)。

参考文献

- [1] 何妨,罗伟,张群,等.单纯调强放射治疗或结合化疗对局部区域晚期鼻咽癌的疗效观察[J].中华医学杂志,2013,93(29):2292-2295.
- [2] 牛文斌,罗振国,程亮,等.AQP1 基因沉默对前列腺癌 PC-3 细胞的影响[J].黑龙江医药科学,2015,38(4):141-143.
- [3] 马笮,李春明.水通道蛋白 AQP1 和 AQP5 在腮腺黏液表皮样癌中表达的研究[J].现代肿瘤医学,2014,22(12):2836-2839.
- [4] 雷阳,李跃文.AQP1、HBx 蛋白在乙肝相关性肝癌组织中的表达及其意义[J].实验与检验医学,2018,36(5):685-688.
- [5] Verkman, A.S., Hara-Chikuma, M. and Papadopoulos, M.C. (2008) Aquaporins: New Players in Cancer Biology. *Journal of Molecular Medicine*, **86**, 523-529. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0303-9>
- [6] Deen, P.M., Weghuis, D.O., van Kessel, A.G., et al. (1994) The Human Gene for Water Channel Aquaporin 1 (AQP1) Is Localized on Chromosome 7p15-->p14. *Cytogenetic and Genome Research*, **65**, 243-246. <https://doi.org/10.1159/000133639>

-
- [7] Deb, P., Pal, S., Dutta, V., *et al.* (2012) Correlation of Expression Pattern of Aquaporin-1 in Primary Central Nervous System Tumors with Tumor Type, Grade, Proliferation, Microvessel Density, Contrast-Enhancement and Perilesional Edema. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **8**, 571-577. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.106542>
- [8] Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Hara-Chikuma, M., *et al.* (2005) Impairment of Angiogenesis and Cell Migration by Targeted Aquaporin-1 Gene Disruption. *Nature*, **434**, 786-792. <https://doi.org/10.1038/nature03460>
- [9] 张斌, 马勇杰, 谷峰. 肿瘤浸润转移与水通道蛋白 1 的关系研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(12): 2764-2765.
- [10] 李琦, 张宝. 水通道蛋白 1 在鼻咽癌组织中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(9): 1028-1030.
- [11] 李琦, 张威, 张宝. 鼻咽癌中水通道蛋白 1 表达与血管生成能力的相关性研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 24(24): 1115-1118.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org