

·论著·

# 水通道蛋白1与非小细胞肺癌的相关性研究

马亚文<sup>1</sup>, Bingling Xu<sup>2</sup>, 刘丽华<sup>1</sup>

(1.广西医科大学第一附属医院呼吸内科, 广西 南宁 530021;

2. Royal Brompton Hospital, England London SW3 6LY)

**摘要:**目的 探讨水通道蛋白-1(AQP1)在体外对非小细胞肺癌细胞的影响及AQP1在非小细胞肺癌胸膜组织中的表达情况,分析其潜在应用价值。方法 收集广西医科大学第一附属医院2020年5月-2021年10月内科胸腔镜下组织标本60例,其中非小细胞肺癌胸膜组织标本40例,良性胸腔胸膜组织标本20例进行石蜡包埋切片,采用免疫组化S-P法测定AQP1的表达;通过转染慢病毒及筛选,获得过表达AQP1的稳定株,利用细胞增殖实验检测转染过表达AQP1慢病毒对A549细胞增殖能力的影响,通过流式细胞仪检测抑制AQP1对A549细胞凋亡能力的影响。结果 免疫组化显示,AQP1在非小细胞肺癌胸膜组织中呈高表达,高于良性胸膜组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ );细胞增殖实验和凋亡实验显示,与正常细胞相比过表达AQP1可以增强A549细胞的增殖能力,抑制AQP1的表达则促进了A549细胞早期和晚期的凋亡率。结论 AQP1在非小细胞肺癌患者胸膜组织中高表达且AQP1可能通过抑制凋亡而促进肺癌细胞增殖。

**关键词:**水通道蛋白1;非小细胞肺癌;胸膜组织

中图分类号:R563

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.06.018

文章编号:1006-1959(2022)06-0073-04

## Study on the Correlation Between AQP1 and Non-small Cell Lung Cancer

MA Ya-wen<sup>1</sup>, Bingling Xu<sup>2</sup>, LIU Li-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, Guangxi, China;

2. Royal Brompton Hospital, London SW3 6LY, England)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of Aquaporin1 on non-small cell lung cancer cells in vitro and the expression of AQP1 in pleural tissues of non-small cell lung cancer, and to analyze its potential clinical application value. **Methods** A total of 60 cases of thoracoscopic tissue specimens were collected from the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University from May 2020 to October 2021, including 40 cases of non-small cell lung cancer pleural tissue specimens and 20 cases of benign pleural tissue specimens. Paraffin-embedded sections were used to detect the expression of AQP1 by immunohistochemical S-P method. The stable AQP1 overexpression strain was obtained by transfecting lentivirus and screening. The effect of AQP1 overexpression lentivirus on the proliferation of A549 cells was detected by cell proliferation assay. The effect of AQP1 inhibition on the apoptosis of A549 cells was detected by flow cytometry. **Results** Immunohistochemistry showed that AQP1 was highly expressed in pleural tissue of non-small cell lung cancer, which was higher than that in benign pleural tissue ( $P<0.05$ ). Cell proliferation assay and apoptosis assay showed that overexpression of AQP1 could enhance the proliferation of A549 cells compared with normal cells. Inhibition of AQP1 expression promoted the early and late apoptosis of A549 cells. **Conclusion** AQP1 is highly expressed in pleural tissue of patients with non-small cell lung cancer and AQP1 may promote the proliferation of lung cancer cells by inhibiting apoptosis.

**Key words:** Aquaporin 1; Non-small cell lung cancer; Pleural tissue

肺癌(lung cancer)是最常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率和高死亡率,是全球死亡率最高的癌症之一,肺癌的5年生存率仅为19%<sup>[1]</sup>。手术、放疗、化疗和靶向治疗是目前非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的主要治疗方式,然而晚期NSCLC的生存率仍较低,患者中位生存期仅为10~12个月<sup>[2,3]</sup>。肺癌细胞对化疗药物显著的耐药性是晚期癌症进展的主要原因,目前急需探索新的治疗方案,提高肺癌患者的生存期。AQP1是存在于细胞膜上的水通道蛋白(aquaporins, AQP)家族中成员,主要促进水的跨细胞转运,并在细胞生命活动和细胞凋亡中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。研究发现<sup>[5-8]</sup>,AQP1在乳腺

癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌等都过度表达,并且已被证明是结肠癌患者预后较差的标志物,但其在肺癌中的作用尚未完全明确。基于此,本研究旨在探讨AQP1在NSCLC患者胸膜中的表达情况及对非小细胞肺癌A549细胞凋亡、增殖功能的影响,以期NSCLC的治疗提供新的策略。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集广西医科大学第一附属医院2020年5月-2021年10月60例内科胸腔镜下手术患者的胸膜组织进行石蜡包埋切片,其中非小细胞肺癌胸膜组织标本40例,良性胸腔胸膜组织标本20例,患者年龄19~80岁。纳入标准:患者临床资料完整。排除标准:合并严重心脑血管肝肾功能疾病者。

**1.2 主要试剂及仪器** A549细胞及专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司CM-0016)、AQP1慢病毒及阴性对照病毒(上海吉凯基因公司)、CCK-8试剂盒(meilunbio, 大连美仑生物公司)、AQP1抗体(美国Thermo Fisher Scientific公司, MA5-25401)、

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:8176100076)

作者简介:马亚文(1994.4-),女,安徽阜南人,硕士研究生,主要从事Aquaporin介导恶性胸腔积液胸膜肿瘤淋巴管生成的分子机制的研究

通讯作者:刘丽华(1978.7-),女,广西桂林人,博士,教授,硕士生导师,主要从事胸膜疾病、呼吸系统恶性肿瘤的研究

AQP1 抑制剂 Bacopaside II (上海 MCE 公司, HY-N6016)、胰蛋白酶消化液(0.25%)不含 EDTA(索莱宝科技公司)、凋亡试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)、多功能酶标仪(美国雷杜 Rayto RT-6100)、流式细胞仪(中国达科为生物公司)、DAB 显色试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司, G1211)。

**1.3 免疫组化实验** 采用 S-P 法对患者标本 AQP1 表达情况进行测定, 用 4% 的甲醛将收集的标本进行固定, 石蜡包埋后进行连续切片, 并放入恒温烤箱烤片, 采用常规的操作对切片进行脱蜡水化后, 用 PBS 溶液清洗, 并用 pH6.0 的柠檬酸钠盐缓冲液对抗原进行高压修复。然后将以下试剂依次进行滴加, 具体操作如下: 内源性过氧化物酶溶液、封闭用非免疫动物血清、一抗孵育过夜、二抗孵育 20 min、辣根酶标记链霉卵白工作液孵育 10 min、滴加 DAB 显色试剂(新鲜配置)显色 2 min、并在显微镜下进行染色观察、自来水冲洗、苏木素进行复染、1%盐酸酒精分化 2 s、自来水冲洗、脱水和透明处理、中性树胶封片。

**1.4 培养细胞及病毒转染** 将培养的 A549 细胞分别转染 AQP1(NM\_198098)慢病毒和阴性对照病毒, 转染成功后, 分别用含有嘌呤霉素的培养基进行筛选稳定株, 荧光显微镜下观察表达效果。

**1.5 细胞增殖实验** 将对照组(正常细胞)、转染过表达 AQP1 及阴性对照病毒的稳定株进行培养, 待汇合度达 80% 时, 胰酶消化后利用完全培养基重悬细胞, 进行细胞计数, 取相同数量的细胞接种到 96 孔板中, 每孔加 100  $\mu$ l 细胞悬液, 各设置 3 个重复孔, 37  $^{\circ}$ C 培养箱内培养 24 h, 吸弃原培养基, 加入 100  $\mu$ l 含有 10% CCK-8 增强型溶液的培养基, 培养箱内培养 0.5 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

**1.6 细胞凋亡流式细胞术检测** 收集对照组和抑制剂组(加入 AQP1 抑制剂 Bacopaside II)的细胞, 用 0.25% EDTA-Free 溶液消化细胞, 并收集至 1.5 ml 离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液, 保留少量液体覆盖细胞沉淀。用预冷磷酸盐缓冲液

(PBS)洗 2 次, 加入 Annexin V-AF488 染料 2.5  $\mu$ l, 避光染色 15 min, 加入 400  $\mu$ l Bindingbuffer, 混匀后置于流式细胞仪中检测细胞凋亡情况。

**1.7 结果判定** AQP1 阳性结果判断: AQP1 蛋白在肿瘤组织中主要表达在细胞膜及细胞胞浆中。根据阳性细胞密度和着色深度进行评分, 结果判断标准: ①根据阳性细胞密度评定: 无阳性细胞数计为 0 分, 阳性细胞所占比例  $\leq 10\%$  为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分,  $\geq 76\%$  为 4 分; ②根据染色程度进行评分: 强棕褐色评为 3 分, 棕黄色评为 2 分, 淡黄色评为 1 分, 无色评为 0 分; 两项评分的乘积  $< 1$  分为阴性,  $\geq 1$  分为阳性表达,  $< 4$  分为蛋白低表达,  $\geq 4$  分为蛋白高表达。

**1.8 统计学分析** 统计分析及作图软件均使用 GraphPad Prism 8.0.1 进行, 计量资料采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用方差分析(one-way ANOVA); 计数资料采用 [ $n(\%)$ ] 表示, 采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验;  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

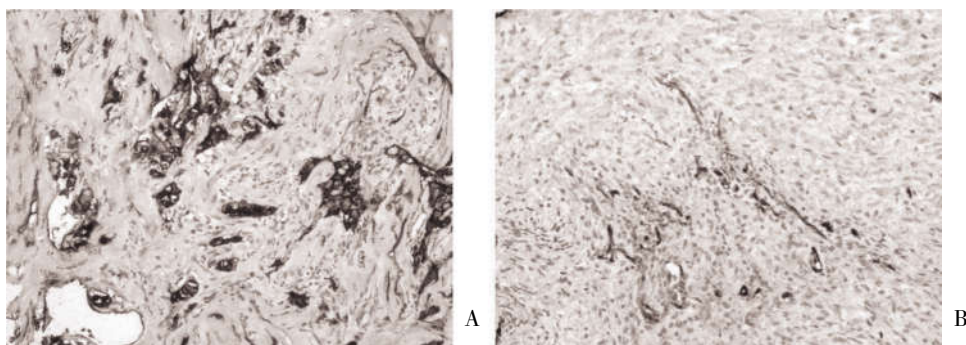
## 2 结果

**2.1 AQP1 在胸膜组织的表达比较** 免疫组化分析显示, 良性胸膜组织标本中 AQP1 表达较少, 非小细胞肺癌胸膜组织标本中 AQP1 表达呈强阳性, 见图 1。且在非小细胞肺癌胸膜组中 AQP1 阳性率为 80%, 良性胸膜组织中 AQP1 阳性率为 25%。

**2.2 获得病毒表达稳定株** 通过含有嘌呤霉素的培养基筛选, 可获得稳定转染株, 荧光显微镜下能检测到绿色荧光, 见图 2。

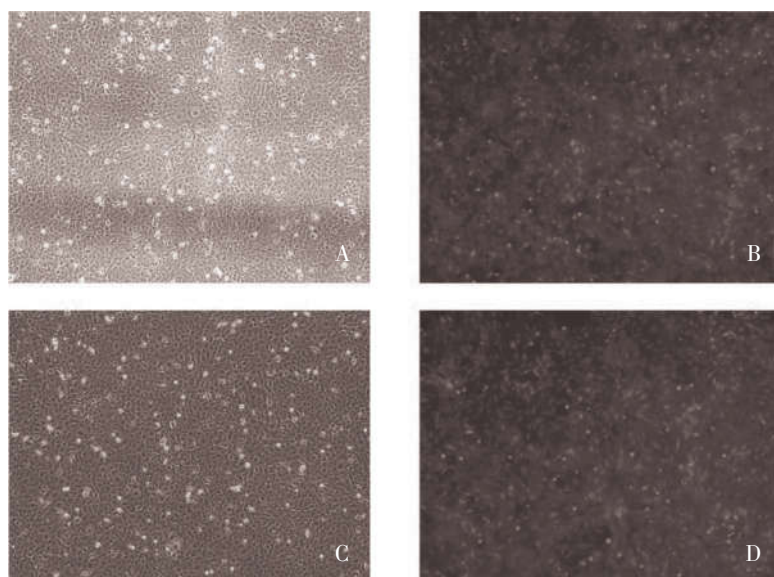
**2.3 过表达 AQP1 促进 A549 细胞增殖** 相同的培养条件下过表达 AQP1, 结果可见过表达 AQP1 能够促进 A549 增殖, 见图 3。

**2.4 抑制 AQP1 表达促进 A549 细胞凋亡** 与对照组相比, 抑制剂组在抑制 AQP1 表达后促进了 A549 细胞早期和晚期的凋亡, 对照组和抑制剂组早期凋亡率分别为 0.96%、1.76%, 晚期凋亡率分别为 0.41%、0.52%, 见图 4。



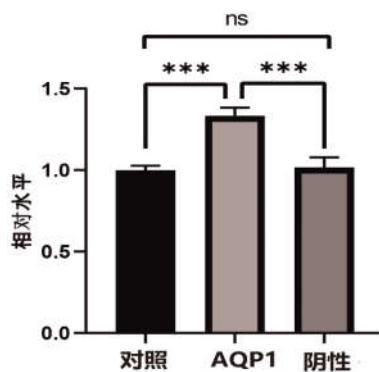
注: A: 非小细胞肺癌胸膜组织; B: 良性胸膜组织

图 1 AQP1 在良、恶性胸膜组织中的表达(SP×200)



注:A:AQP1 转染后,白光照片;B:AQP1 转染后,荧光照片;C:阴性对照病毒转染后,白光照片;D:阴性对照病毒转染后,荧光照片

图 2 AQP1 和阴性对照病毒的白光和荧光图( $\times 100$ )



注:\*\*\*:  $P < 0.05$ ; ns:  $P > 0.05$

图 3 AQP1 对 A549 细胞增殖的作用

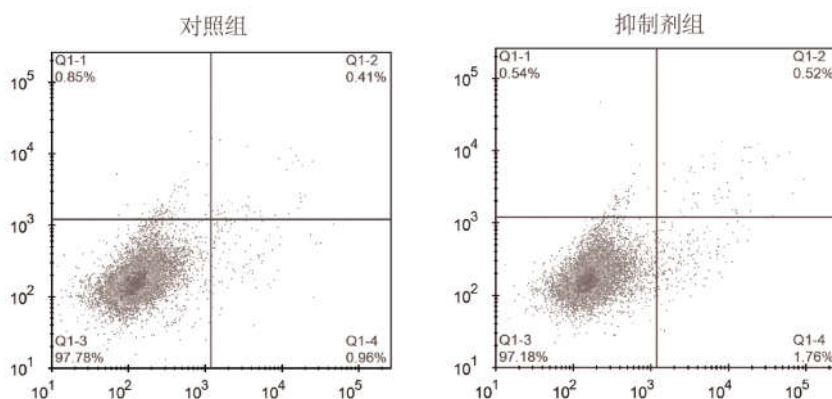


图 4 AQP1 抑制剂对 A549 细胞凋亡的影响

### 3 讨论

肺癌是癌症死亡的首要原因,NSCLC 约占肺癌总发病率的 85%,其发病原因与吸烟、环境污染、呼吸道疾病等密切相关<sup>[9,10]</sup>。NSCLC 发病较为隐匿,患者确诊时大多已处于中晚期状态,只能通过化疗、放疗等方式延缓其生存期,其预后较差且病死率较高<sup>[11]</sup>。因此,探索 NSCLC 的进展机制对改善肺癌患

者的预后有重要作用。

AQPS 广泛存在于人体组织中,是水快速跨膜转运的重要物质基础,在细胞新陈代谢、增殖和各种器官生理功能中发挥重要作用<sup>[7,12]</sup>。AQP1 是存在于细胞膜上水通道蛋白家族中的一员,主要促进水的跨细胞转运,广泛分布于内皮、上皮和特殊细胞中,如红细胞、骨骼肌细胞等,参与多种病理和生理过

程<sup>[13,14]</sup>。AQP1已在多种肿瘤中被证实可通过促进肿瘤细胞的侵袭、迁移、血管生成在肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[15-17]</sup>。另外,AQP1对肿瘤患者的预后具有一定影响,如研究发现AQP1与胰腺导管癌的不良预后相关,在动物研究实验中敲低AQP1可以抑制骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和肿瘤的发生发展<sup>[18,19]</sup>。已有研究发现<sup>[4,20]</sup>,AQP1是肺腺癌独立的预后标志,并可能通过细胞间充质转化作用增加肿瘤细胞的侵袭性。

本研究结果显示,过表达AQP1可以增强A549细胞的增殖能力,抑制AQP1的表达则促进了A549细胞早期和晚期的凋亡,且与良性胸膜组织相比,NSCLC患者胸膜组织中AQP1呈高表达。据此,推测在NSCLC中AQP1可能通过抑制细胞的凋亡从而促进了癌细胞的增殖能力。因此,AQP1可作为癌症治疗的一个新靶点,可通过降低其在癌细胞中的表达水平来干预肿瘤的进展。此外,已有研究表明AQP1参与肿瘤转移过程<sup>[21]</sup>。而本研究收集的NSCLC组织标本均已发生胸膜转移,因此猜测AQP1可能与NSCLC的胸膜转移有密切关系,但AQP1与胸膜转移的具体机制尚未完全阐明,未来还需要进一步研究。

综上所述,非小细胞肺癌患者的胸膜组织中AQP1表达水平高于良性胸膜组织,且在外源性AQP1刺激作用下能够促进A549细胞增殖,抑制AQP1的表达可促进A549细胞的凋亡。但AQP1通过调节细胞增殖和凋亡影响NSCLC进展的具体信号通路及分子机制仍不清楚,其中,促进细胞凋亡可能是抑制癌细胞增殖的关键。

#### 参考文献:

- [1]Siegel RL,Miller KD,Jemal A.Cancer statistics,2020 [J].CA Cancer J Clin,2020,70(1):7-30.
- [2]Wei X,Dong J.Aquaporin 1 promotes the proliferation and migration of lung cancer cell in vitro [J].Oncology Reports,2015,34(3):1440-1448.
- [3]Pennell NA,Arcila ME,Gandara DR,et al.Biomarker Testing for Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices [J].Am Soc Clin Oncol Educ Book,2019(39):531-542.
- [4]Yun S,Sun PL,Jin Y,et al.Aquaporin 1 Is an Independent Marker of Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma [J].J Pathol Transl Med,2016,50(4):251-257.
- [5]Kong B,Zhao S,Kang X,et al.MicroRNA-133a-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer by targeting AQP1 [J].Oncology Letters,2021,22(3):1-10.
- [6]Palethorpe HM,Tomita Y,Smith E,et al.The Aquaporin 1 Inhibitor Bacopaside II Reduces Endothelial Cell Migration and Tubulogenesis and Induces Apoptosis [J].International Journal of Molecular Sciences,2018,19(3):653.
- [7]Wang Z,Wang Y,He Y,et al.Aquaporin-1 facilitates proliferation and invasion of gastric cancer cells via GRB7-mediated ERK and Ras activation [J].Animal Cells and Systems,2020,24(5):253-259.
- [8]Wei M,Yu H,Cai C,et al.MiR-3194-3p Inhibits Breast Cancer Progression by Targeting Aquaporin 1 [J].Frontiers in Oncology,2020(10):1513.
- [9]张羿,朱正秋,薛静.外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值预测晚期非小细胞肺癌免疫治疗疗效的价值 [J].现代肿瘤医学,2022,30(1):54-57.
- [10]韩忠诚,王凤霞,马丽丽,等.miR-409-3p 调控靶基因 Beclin-1 抑制小细胞肺癌细胞的自噬进而抑制其生长和转移 [J].现代肿瘤医学,2022,30(4):570-575.
- [11]Li S,Zhou K,Wang M,et al.Degree of pulmonary fissure completeness can predict postoperative cardiopulmonary complications and length of hospital stay in patients undergoing video-assisted thoracoscopic lobectomy for early-stage lung Cancer [J].Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery,2018,26(1):25-33.
- [12]Huo Z,Lomora M,Kym U,et al.AQP1 Is Up-Regulated by Hypoxia and Leads to Increased Cell Water Permeability, Motility, and Migration in Neuroblastoma [J].Frontiers in cell and Developmental Biology,2021(9):224.
- [13]Yoshida T,Hojo S,Sekine S,et al.Expression of aquaporin-1 is a poor prognostic factor for stage II and III colon cancer [J].Molecular and Clinical Oncology,2013,1(6):953-958.
- [14]Abdelrahman AE,Ibrahim DA,El-Azony A,et al.ERCC1, PARP-1, and AQP1 as predictive biomarkers in colon cancer patients receiving adjuvant chemotherapy [J].Cancer Biomarkers,2020,27(2):251-264.
- [15]Tomita Y,Dorward H,Yool AJ,et al.Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression [J].International Journal of Molecular Sciences,2017,18(2):299.
- [16]Zhang Y,Qu H.Expression and clinical significance of aquaporin-1, vascular endothelial growth factor and microvessel density in gastric cancer [J].Medicine,2020,99(36):e21883.
- [17]Traberg-Nyborg L,Login FH,Edamana S,et al.Aquaporin-1 in breast cancer [J].APMIS,2022,130(1):3-10.
- [18]Zou W,Yang Z,Li D,et al.AQP1 and AQP3 Expression are Associated With Severe Symptoms and Poor-prognosis of the Pancreatic Ductal Adenocarcinoma [J].Appl Immunohistochem Mol Morphol,2019,27(1):40-47.
- [19]Wu Z,Li S,Liu J,et al.RNAi-mediated silencing of AQP1 expression inhibited the proliferation, invasion and tumorigenesis of osteosarcoma cells [J].Cancer Biology & Therapy,2015,16(9):1332-1340.
- [20]Bellezza G,Vannucci J,Bianconi F,et al.Prognostic implication of aquaporin 1 overexpression in resected lung adenocarcinoma [J].Interact Cardiovasc Thorac Surg,2017,25(6):856-861.
- [21]Simone L,Gargano CD,Pisani F,et al.Aquaporin-1 inhibition reduces metastatic formation in a mouse model of melanoma [J].J Cell Mol Med,2018,22(2):904-912.

收稿日期:2022-01-04;修回日期:2022-01-17

编辑/成森