

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.007

AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 在人膀胱尿路上皮癌组织中的表达及其意义王文光¹, 范兆阳¹, 景光远¹, 王玉杰¹, 阿不都·许库尔²

(新疆医科大学 1. 第一附属医院泌尿外科; 2. 基础医学院组胚教研室, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】目的: 观察水通道蛋白 1 (Aquaporin 1, AQP₁)、水通道蛋白 2 (Aquaporin 2, AQP₂)、水通道蛋白 3 (Aquaporin 3, AQP₃) 在膀胱尿路上皮癌组织及正常膀胱组织中的表达与分布, 探讨其意义。方法: 取膀胱尿路上皮癌组织 25 例及正常膀胱组织 25 例, 应用免疫组织化学方法检测 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 在膀胱尿路上皮癌和正常膀胱组织中的表达及分布。结果: AQP₁ 散在表达于正常膀胱组织中微血管和小动脉的内皮细胞的细胞膜及细胞质, 在膀胱尿路上皮癌组织中 AQP₁ 大量表达于肿瘤的血管内皮细胞的细胞膜及细胞质; 膀胱尿路上皮癌中 AQP₁ 表达水平较正常膀胱组织明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AQP₂ 主要表达于膀胱尿路上皮癌组织及正常膀胱组织的细胞间质中, 两者表达强度基本相同, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AQP₃ 主要表达在膀胱尿路上皮癌组织及正常膀胱组织的黏膜上皮细胞的胞质及胞膜, 在癌组织中的表达强度明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: AQP₁、AQP₃ 在膀胱尿路上皮癌组织中表达明显增高。提示 AQP₁、AQP₃ 可能与膀胱尿路上皮癌的发生和发展密切相关, 其机制需要进一步深入研究。

【关键词】水通道蛋白₁₋₃; 膀胱尿路上皮癌; 血管内皮细胞

【中国图书分类法分类号】R737.14

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-04-16

Expressions and significances of AQP₁, AQP₂ and AQP₃ in human bladder urothelial carcinoma tissueWANG Wenguang¹, FAN Zhaoyang¹, JING Guangyuan¹, WANG Yujie¹, Abdu Xukuer²

(1. Department of Urology, the First Affiliated Hospital; 2. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University)

【Abstract】Objective: To detect the expressions, distribution and the significances of aquaporin 1 (AQP₁), aquaporin 2 (AQP₂) and aquaporin 3 (AQP₃) in normal bladder tissues and bladder tumor tissues. **Methods:** The expression and distribution of AQP₁, AQP₂ and AQP₃ were detected by S-P immunohistochemistry in 25 cases of bladder tumor tissues and normal bladder tissues of 25 cases. **Results:** The AQP₁ was sporadically expressed in the vascular endothelial cells of normal bladder tissues. The majority expression of AQP₁ could be detected in the vascular endothelial cells of tumor cells. The expression of AQP₁ was remarkably higher in tumor tissues than in normal bladder tissues. Sporadic expression of AQP₂ could be detected in intercellular substance in both bladder tumor tissues and normal bladder tissues. The expression of AQP₂ in both tumor tissues and normal bladder tissues had no significant difference. the expression of AQP₃ was found mainly in the cellular membrane and periplasm of the mucous membrane in both bladder tumor tissues and normal bladder tissues. The expression of AQP₃ was significantly higher in tumor tissues than in normal bladder tissues. **Conclusion:** The expression of AQP₁ and AQP₃ were higher in bladder tumor tissues than those in normal bladder tissues. It suggested that AQP₁ and AQP₃ might related with the formation and development of bladder tumor. But the mechanism need to be further studied.

【Key words】Aquaporin₁₋₃; bladder urothelial cancer; vascular endothelial cells

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 绝大多

数来源于上皮组织, 其中 90% 以上为移行上皮肿瘤。由于其较高的发病率和死亡率, 膀胱癌已成为危害人群健康的主要疾病之一。1988 年, Agre 等^[1]在分离纯化红细胞膜上的 Rh 多肽时发现水通道蛋白。到目前为止, 经分子克隆发现在哺乳动物体内,

作者介绍: 王文光 (1981-), 男, 主治医师, 硕士,

研究方向: 泌尿系肿瘤。

通信作者: 王玉杰, 男, 主任医师, Email: wangyj-mr@vip.sina.com。

基金项目: 新疆医科大学第一附属医院青年资助项目 (编号: 2009QN12)。

水通道蛋白 (Aquaporin) 家族已有 13 名成员 (AQP₀ ~ AQP₁₂)^[2]。近年研究表明, AQP_s 与肿瘤生长、转移有关^[3]。已有学者对 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 在小鼠膀胱组织中分布情况进行研究, 取得一定进展^[4]。本文应用免疫组织化学技术检测 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 在膀胱尿路上皮癌组织和正常膀胱组织中的表达及分布, 探讨它们在膀胱尿路上皮癌生长、转移中可能的作用机制和意义。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱癌组: 收集本院泌尿外科 2006 年 11 月至 2009 年 12 月行全膀胱切除术组织标本 25 例, 其中男性 16 例, 女性 9 例, 平均年龄 (58.52 ± 5.72) 岁, 有汉族 10 例, 维吾尔族 10 例, 哈萨克族 4 例, 蒙古族 1 例。所有患者术前未行放化疗, 术后病理诊断均为尿路上皮癌, 病理分期均为 T₂ 以上。对照组: 前列腺增生患者行前列腺汽化电切时取其正常膀胱组织 25 例, 平均年龄 (66.40 ± 4.93) 岁, 有汉族 12 例, 维吾尔族 9 例, 哈萨克族 2 例, 蒙古族 1 例, 回族 1 例。标本切除后立即放入液氮中冷冻保存, 随后移至 -80 ℃ 低温冰箱保存备用。

1.2 方法

免疫组化染色: 标本以 4% 多聚甲醛、5%、10%、20% 蔗糖溶液依次固定。OTC 胶包埋, 在液氮中冷冻, 5 μm 连续切片。3% 过氧化氢孵育 15 min 消除内源性过氧化物酶活性, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer, PBS) 清洗, 枸橼酸盐缓冲液 92 ℃ ~ 98 ℃ 微波热修复 15 min, 冷却 30 min, 滴加非免疫山羊血清, 室温孵育 20 min, 倾去血清, 滴加 1:500 的兔抗 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 多克隆抗体 (购自 Santa Cruz 生物

技术公司), 4 ℃ 过夜, 经 0.1 mol/L PBS 冲洗后, 滴加 1:250 的二抗行免疫组化染色, 3,3'-二氨基联苯胺显色, Mayer 苏木素复染, 封片。以胞膜或胞质有棕黄色染色者为阳性细胞。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。所有切片在光学显微镜下观察, 取染色良好 (阳性细胞染色清晰, 背景染色很低) 的组织切片进行照相, 并在低倍镜下找到阳性细胞较为密集的区域, 测量 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 阳性产物面积及阳性产物强度灰度值。然后将上述数值依据 Fromowitz 阳性细胞半定量分级法, 以胞浆内出现棕黄色颗粒视为阳性细胞, 取表达最强的部位, 按着色强度计分, 无着色者为 0 分; 浅黄色、略高于背景者为 1 分; 棕黄色、明显高于背景者为 2 分; 强染、着棕褐色者为 3 分。同时按阳性细胞数面积计分: ≤5% 为 0 分; 6%~25% 为 1 分; 26%~50% 为 2 分; 51%~75% 为 3 分; >75% 为 4 分。2 项相加后的和为阳性细胞表达量; 0~1 分为阴性; 其他为阳性, 取其平均值 ($\bar{x} \pm s$) 作为阳性细胞表达量。

该实验中在方法学上综合了以往文献报道的多个实验技巧, 使得实验顺利进展。在标本的获得上, 尽可能减少常温下的暴露时间, 采用离体后立即放入液氮中保存, 随后移至 -80℃ 冰箱保存, 保持了抗原的稳定性, 若能使用新鲜标本则效果更佳; 通过预实验发现采用冰冻切片对 AQP_s 的表达更有优势, 表达阳性率更高, 因此采用了冰冻切片而非文献报道较多的石蜡切片; 采用蔗糖梯度固定及非免疫山羊血清孵育标本, 而非普通的 PBS 溶液, 使得抗原抗体更易于结合。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析, 应用 *t* 检验及 χ^2 检验对两样本均衡性检验, 检测结果用两样本均数之间的比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 病例组与对照组均衡性检验结果
Tab.1 Balance test results between case group and conctrl group

分组	<i>n</i>	年龄	性别		民族				
			男	女	汉族	维吾尔族	哈萨克族	蒙古族	回族
病例组	25	58.52 ± 5.72	16	9	10	10	4	1	0
对照组	25	66.40 ± 4.93	25	0	12	9	2	1	1
$t\chi^2$ 值		-5.214	10.974				1.901		
<i>P</i> 值		<0.001	0.001				0.754		

表 2 膀胱尿路上皮癌组与对照组 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 阳性表达量 ($n=25, \bar{x} \pm s$)
Tab.2 AQP₁, AQP₂ 和 AQP₃ positive expression in bladder carcinoma tissue and normal bladder tissues ($n=25, \bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	AQP ₁	AQP ₂	AQP ₃
病例组	25 *	4.680 0 ± 1.600 0	3.360 0 ± 0.994 9	4.240 0 ± 1.331 7
对照组	25	2.680 0 ± 1.180 4	2.920 0 ± 0.862 2	2.840 0 ± 1.312 7
<i>F</i> 值		10.127	0.260	5.679
<i>P</i> 值		0.003	0.612	0.021

注: *, 25 例中有男性 16 例, 女性 9 例。2 组资料之间在性别问题上存在不均衡性, 将病例组中的女性完全去除, 再次进行分析发现结果相同, 提示性别在此不影响所检测得到蛋白质的表达, 因此, 虽然本实验的标本存在性别的不均衡性, 但不影响实验的结果

2 结果

对患者的一般资料进行了比较,结果见表 1,将 AQP_s 阳性表达于正常膀胱组织者作为阳性对照,PBS 代替一抗者作为阴性对照,细胞质或细胞膜可见黄色或棕黄色颗粒者为阳性细胞。所有切片染色背景清晰,阴性对照不着色,对两组资料的蛋白表达进行检测,结果见表 2。两组资料之间在性别及年龄问题上存在不平衡性,因此将两组资料做分析比较,再将病例组中的女性完全去除后,再次进行分析发现结果相同,提示性别在此不影响所检测到的蛋白质的表达;对年龄对所检测蛋白的表达进行协方差分析,显示年龄也不影响其表达。因此,本实验标本的一般资料虽然存在不平衡性,但不影响实验的结果。AQP₁ 阳性反应呈棕黄色,主要表达于正常膀胱黏膜微血管和小动脉的内皮细胞及肿瘤组织的微血管内皮细胞的细胞膜及细胞质中(图 1)。对照组:AQP₁ 主要表达在正常膀胱黏膜微血管和小动脉的内皮细胞的胞膜和胞质,其阳性表达量为(2.680 0 ± 1.180 4);膀胱癌组:AQP₁ 主要表达于肿瘤组织微血管内皮细胞的细胞膜及胞质,其阳性表达量为(4.680 0 ± 1.600 0)。AQP₁ 在膀胱癌组织中表达量及强度明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。AQP₂ 阳性反应呈棕黄色,主要存在正常膀胱组织及膀胱癌组织的细胞间质中(图 2),2 组的表达强度基本相同,差异无统计学意义($P > 0.05$)。AQP₃ 阳性反应呈棕黄色,主要表达于膀胱黏膜上皮细胞及肿瘤上皮细胞的胞膜及胞质(图 3)。对照组:AQP₃ 主要表达在正常膀胱黏膜上皮细胞的胞膜和胞质,其阳性表达量为(2.840 0 ± 1.312 7)。膀胱癌组:AQP₃ 主要定位于膀胱尿路上皮癌组织癌细胞的胞膜和胞质,其阳性表达量为(4.240 0 ± 1.331 7)。AQP₃ 在膀胱癌组织中表达量较正常膀胱组织明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

AQP₁ 在正常膀胱黏膜组织(A)及膀胱尿路上皮癌组织(B)中的表达(10 × 20 倍),在膀胱癌组织中的表达较正常膀胱组织中的表达明显增强增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

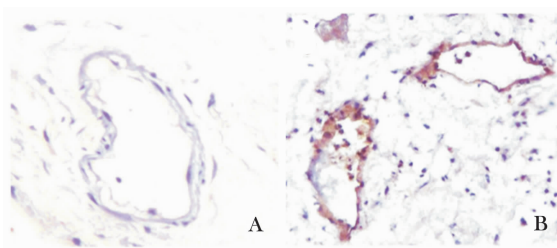


图 1 AQP₁ 表达结果

Fig. 1 AQP₁ expression results

AQP₂ 在正常膀胱黏膜组织(A)及膀胱尿路上皮癌组织(B)中的表达(10 × 20 倍),在膀胱癌组织中的表达较正常膀胱组织中的表达强度基本相同,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

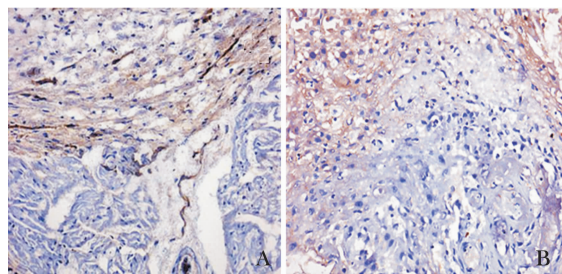


图 2 AQP₂ 表达结果

Fig. 2 AQP₂ expression results

AQP₃ 在正常膀胱黏膜组织(A)及膀胱尿路上皮癌组织(B)中的表达(10 × 20 倍),在膀胱癌组织中的表达较正常膀胱组织中的表达明显增强增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

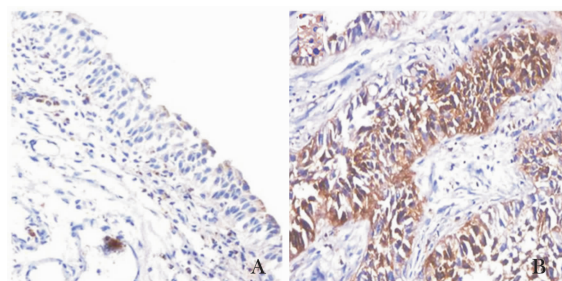


图 3 AQP₃ 表达结果

Fig. 3 AQP₃ expression results

3 讨论

多年来对肿瘤的研究表明,恶性肿瘤最基本的生物学特征是癌组织的无限增殖和肿瘤细胞的分化异常。AQP 可能通过多种途径参与肿瘤的发生和转移过程,在癌组织的增殖与分化过程中发挥重要作用。

近年研究证实^[6,7],AQP₁ 表达不足的动物实验模型,肿瘤血管生成发生障碍,肿瘤生长明显受到抑制甚至停滞。另有研究表明^[8~10]运用 AQP₁ 抑制剂可通过抑制组织内 AQP₁ 蛋白的表达,抑制肿瘤的转移,进一步证明 AQP₁ 参与肿瘤血管生成并影响肿瘤生长及转移。目前有大量的研究表明在多种肿瘤细胞及微血管内皮细胞中都有 AQP₁ 的高表达,且其表达量与肿瘤恶性程度呈正相关^[11]。

AQP₃ 为水-甘油通道,广泛的分布于哺乳动物的表皮上皮细胞的基底膜,在肾脏集合管上皮及膀胱上皮均有表达,对上皮肿瘤的表达有促进作用,有助于上皮肿瘤的生长。最近研究显示^[12],AQP₃ 敲除后的小鼠,通过抑制肿瘤细胞产生脂类及 ATP 从

而降低上皮肿瘤的发生率。近年研究表明^[13], AQP₃ 可促进的细胞迁移对不同的细胞类型具有普遍性, 这说明肿瘤细胞中表达的 AQP₃ 可能增加了肿瘤局部的侵袭性, 同时也增强了肿瘤细胞穿过微血管上皮细胞屏障进行转移的能力。故抑制 AQP₃ 的表达, 有可能抑制肿瘤细胞的生长增殖, 控制肿瘤的转移, 改善预后。

该实验结果提示, AQP₁ 主要表达于人膀胱尿路上皮癌组织的微血管内皮细胞, 较正常膀胱组织的表达量及强度增高, 可能与肿瘤组织具有浸润及转移能力, 需要较多的微血管来提供肿瘤细胞的快速增生所需的营养, 来满足肿瘤细胞的高代谢有关。AQP₂ 主要存在膀胱尿路上皮癌组织及正常膀胱组织的细胞间质中, 差异无统计学意义, 具体意义暂不明确。AQP₃ 表达于膀胱尿路上皮癌及正常膀胱组织黏膜上皮细胞的胞质及胞膜, 在肿瘤组织中表达较强, 与 AQP₃ 有促进细胞迁移的作用, 而增加肿瘤局部的侵袭性有关。以上结果表明, AQP₁、AQP₃ 表达量增高可能与膀胱尿路上皮癌的发生发展有一定的关系。为 AQP₁、AQP₂、AQP₃ 在人膀胱癌组织中的定位提供了一定依据, 为后续研究 AQP_s 的功能奠定一定的基础。目前尚未见到人膀胱癌组织与 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 研究的相关性报道, 本研究可能为今后研究 AQP₁、AQP₂ 和 AQP₃ 在膀胱癌诊断及治疗起到一定的推动作用。

虽然本实验组中的膀胱癌患者及正常对照组在年龄和性别组成上有一定的差异性, 但经过分析比较, 年龄和性别均不影响水通道蛋白的表达。在我们所处的多民族聚集地, 存在民族的差异, 但由于搜集的标本量不够多, 并不能详细去证实民族差异是否为影响蛋白表达的因素, 需要进一步大足量的标本来证实, 为进一步去研究各民族之间的差异性, 为了解民族之间的内在差异提供依据。

下一步通过用特异性的 AQP₁ 及 AQP₃ 基因基因敲除小鼠, 在其体内建立膀胱肿瘤模型, 在完全可控的情况下进一步研究 AQP₁ 及 AQP₃ 在膀胱癌的发生发展过程中的作用。由于膀胱肿瘤有较高的复发率, 是防治膀胱癌复发是提高膀胱癌治疗水平的关键, 我们进一步预通过检测膀胱尿路上皮癌复发前后 AQP₁ 及 AQP₃ 的表达, 检测其表达量与复发时

间之间的相关性, 探讨其在膀胱癌复发中的作用, 为研究预防肿瘤复发提供线索依据。在膀胱尿路上皮癌研究中, 对 AQP₁ 及 AQP₃ 的功能作用进行研究, 可能为膀胱肿瘤的发病机制、基因诊断及基因治疗提供新的途径。

参 考 文 献

- [1] Denker B M, Smith B L, Kubejda F P, et al. Identification purification, and partial characterization of anovel Mr 28000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules[J]. Biol Chem, 1988, 263(30): 15634-15642.
- [2] Wang F, Feng X C, Li Y M, et al. Aquaporins as potential drug targets[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(4): 395-401.
- [3] Verkman A S, Mariko, Hara-Chikuma, et al. Aquaporins—new players in cancer biology[J]. Mol Med, 2008, 86(5): 523-529.
- [4] Stephen G, Williams P. Molecular pathways in bladder cancer[J]. UrolRes, 2004, 32(6): 373-385.
- [5] Sadoun S, Papadopoulos M C, Hara Chikuma M, et al. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin1 gene disruption[J]. Nature, 2005, 434(7034): 786-792.
- [6] Yang J H, Shi Y F, Cheng Q, et al. Expression and localization of aquaporin 5 in the epithelial ovarian tumor. Gynecol Oncol, 2006, 100(2): 294-299.
- [7] 冯学超, 高洪文, 何成彦, 等. 水通道 AQP₁ 敲除小鼠肿瘤血管生成障碍及肿瘤生长减缓[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(4): 310-313.
- [8] Feng X C, Gao H W, He C Y, et al. Defective tumor angiogenesis and retarded tumor growth in Aquaporin-1 knockout mice[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2005, 32(4): 310-313.
- [9] Xiang Y, Ma B, Li T, et al. Acetazolamide inhibits aquaporin-1 protein expression and angiogenesis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(6): 812-816.
- [10] Xiang Y, Ma B, Li T, et al. Acetazolamide suppresses tumor metastasis and related protein expression in mice bearing Lewis lung carcinoma[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(8): 745-751.
- [11] Ma B, Xiang Y, Li T, et al. Inhibitory effect of topiramate on Lewis lung carcinoma metastasis and its relation with AQP₁ water channel[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(1): 54-60.
- [12] Moon C, Sofia J C, Jang S J, et al. Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis[J]. Oncogene, 2003, 22(43): 6699-6703.
- [13] Hara-Chikuma M, Verkman A S. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(1): 326-332.
- [14] Papadopoulos M C, Saadoun S, Verkman A S. Aquaporins and cell migration[J]. Pflugers Arch, 2008, 456(4): 693-700.

(责任编辑:唐秋姗)