



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.011
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3954.shtml

· 基础研究 ·

水通道蛋白9对肝癌细胞迁移能力的影响

郑玉杰, 苗雄鹰

(中南大学湘雅二医院肝胆外科, 湖南长沙410011)

摘要

目的: 通过油酸诱导肝癌 HepG2 细胞水通道蛋白9 (AQP9) 的表达观察后者对 HepG2 细胞株迁移能力的影响。

方法: HepG2 细胞经不同处理后 (0、250、500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸处理或 AgNO_3 +500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸处理), 用 Western blot 法检测 AQP9 蛋白的表达, 细胞划痕实验检测细胞迁移能力。

结果: 经油酸处理后, HepG2 细胞 AQP9 蛋白表达增加, 细胞迁移能力增强, 且呈浓度依赖性 (均 $P<0.05$), 油酸的上述作用被预先给予水通道蛋白抑制剂 AgNO_3 所取消。

结论: 肝癌 HepG2 细胞的迁移能力与其 AQP9 表达有关, AQP9 表达越高细胞的侵袭力越强。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(7):921-925]

关键词

癌, 肝细胞; 水通道蛋白质9; 细胞运动
中图分类号: R735.7

Effect of aquaporin-9 expression on migratory ability of liver cancer cells

ZHENG Yujie, MIAO Xiongying

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Corresponding author: MIAO Xiongying, Email: zyj441@163.com

ABSTRACT

Objective: To observe the influence of aquaporin 9 (AQP9) on migratory ability in liver cancer HepG2 cells through induction of its expression by oleic acid.

Methods: In HepG2 cells following different treatment (treatment of 0, 250, and 500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid, or treatment of AgNO_3 +500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid), the AQP9 protein expression was determined by Western blot analysis and cellular migratory ability was measured by scratch assay, respectively.

Results: After oleic acid treatment, the AQP9 protein expression was significantly up-regulated in HepG2 cells, and their migratory ability was significantly increased, which all presented a concentration-dependent manner (all $P<0.05$), while, these effects of oleic acid were abolished by pretreatment of the aquaporin inhibitor AgNO_3 .

Conclusion: The migratory ability of liver cancer HepG2 cells is associated with the AQP9 expression, which is the higher the AQP9 expression, the stronger the migratory ability of the HepG2 cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(7):921-925]

KEYWORDS

Carcinoma, Hepatocellular; Aquaporin 9; Cell Movement

CLC number: R735.7

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (10JJ3055)。

收稿日期: 2014-04-11; 修订日期: 2014-06-11。

作者简介: 郑玉杰, 中南大学湘雅二医院硕士研究生, 主要从事肝胆外科基础与临床方面的研究。

通信作者: 苗雄鹰, Email: zyj441@163.com

水通道蛋白9 (AQP9) 在肝脏中表达丰富, 主要分布在面向门静脉的肝窦状隙质膜上, 除了转运水以外还可以跨膜转运甘油、尿素、 CO_2 、氨、嘌呤、嘧啶等物质^[1], 正因为其对水、甘油等物质的通透性从而参与了许多肝脏的生理及病理过程。研究^[2]显示油酸可以通过磷脂酰肌醇-3激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和 p38 丝裂原活化蛋白激酶途径调节水通道蛋白9 的表达, 且低剂量油酸对肝癌细胞无伤害^[3]。目前发现硝酸银 (AgNO_3) 是水通道蛋白强有力的抑制剂^[4]。研究^[5-6]表明在肝癌组织中 AQP9 的表达低于正常组织及癌旁组织, 且与肿瘤的分化程度有关。同属水通道蛋白家族的水通道蛋白3 等可以促进肿瘤的迁移^[7], 故笔者推测 AQP9 同样可能与肝癌细胞的迁移有关。本研究探讨肝癌细胞中 AQP9 的表达受油酸调节及其对肝癌细胞迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 人肝癌细胞的培养

人肝癌细胞株 HepG2 (购自中国科学院上海细胞库), 细胞用含 10% 已经灭活的胎牛血清 (购自 Hyclone) 的 DMEM 培养基 (购自 Hyclone) 做培养基 (添加青霉素至最终浓度 100 U/mL 和链霉素最终浓度为 100 U/mL) 于 37 °C, 5% CO_2 条件下培养。

1.2 HepG2 肝癌细胞的处理及分组

将 HepG2 肝癌细胞接种于 6 孔板并分为 4 组。前 3 组以 Dae-Ho Lee 等的方法按 3 个浓度梯度添加油酸溶液 (0、250、500 $\mu\text{mol/L}$), 油酸 (购自 Sigma 公司) 与 BSA (牛血清白蛋白, 购自 Roche 公司) 以 3:1 的摩尔比混合^[3]。第 4 组参考 Vázquez-Meza 等^[8]的方法, 先加入 AgNO_3 (3×10^{-5} mol/L) 在 37 °C, 5% CO_2 条件下培养 30 min 预处理后, 再加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸溶液。所有细胞在 37 °C, 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h, 培养后的细胞样品提取蛋白质后用 Western blot 检测 AQP9 表达程度, 用划痕实验检测细胞迁移能力。

1.3 提取细胞总蛋白

不同处理组 HepG2 肝癌细胞经培养后, 吸净培养液, 用预冷的 PBS (磷酸盐缓冲液) 洗细胞 2 次, 裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂。吸净

PBS, 加入 200 μL RIPA (裂解液), 用细胞刮刀刮取贴壁细胞, 将细胞及裂解液转移至预冷的微量离心管中, 4 °C 摇动 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清转移至新预冷的微量离心管中并置于冰上, 即为总蛋白溶解液。BCA (二辛可宁酸) 法测定总蛋白浓度, -70 °C 保存。

1.4 Western blot 蛋白质印迹实验方法

按 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 凝胶制备试剂盒说明书配置 15% 的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶; 取测完蛋白浓度的总蛋白的细胞裂解液样品, 加入上样缓冲液后 100 °C 变性 5 min, 将样品加入 SDS-PAGE 凝胶上样孔, 80 V 电压跑胶, 待溴酚蓝进入分离胶后将电压调为 120 V; 结束电泳, 按照滤纸-凝胶-硝酸纤维素膜-滤纸的顺序装好转膜装置, 调整电泳条件为恒流 20 mA/板, 约 2 h, 转移条件为恒压 300 V, 约 2 h; 封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBST 洗涤缓冲液) 室温轻摇封闭 3 h; 用封闭液按 1:500 稀释一抗, 将膜和稀释后的抗体封闭在封口膜中, 4 °C 过夜; 用封闭液按 1:3 000 稀释二抗, 37 °C 摇动 1 h, TBST 漂洗 3 遍; 将化学发光底物涂在膜上显色, 压片、曝光、显影、定影。获得目标条带经光密度扫描仪扫描, 应用 Gel-ProAnalyzer 4.0 软件测定光密度值, 并与 β -actin 光密度进行校正, 取平均光密度比值进行统计学处理。

1.5 体外细胞迁移实验 (划痕)

6 孔板预涂聚赖氨酸 (30 $\mu\text{g/mL}$), 并用 BSA 封闭。用 marker 笔在 6 孔板背后, 每隔 0.5~1 cm 均匀划横线, 横穿过孔, 每孔 5 条。在孔中加入约 5×10^5 个细胞, 培养至 90% 融合, 无血清饥饿过夜。用 200 μL 移液头尖端轻轻划过细胞培养板, 造成宽度为 300~500 μm 的无细胞划痕区, 枪头进行细胞划痕后 PBS 清洗 3 次, 再加入含有系列浓度油酸的无血清培养基, 培养 24 h, 分别于 0 和 24 h 经显微镜下观察、照相测量伤口宽度。细胞迁移比率 = (实验组划痕距离 / 无药物组)。

1.6 统计学处理

用 SPSS 统计软件进行数据统计分析, 各指标以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据间的比较采用单因素方差分析, 单因素方差分析若具有统计学差异则再进行 LSD-*t* 检验, 两两比较各组间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 油酸上调 HepG2 细胞 AQP9 蛋白的表达

Western blot 结果显示,肝癌 HepG2 细胞中 AQP9 表达的强度随着油酸浓度的增加,AgNO₃ 预处理能明显抑制 AQP9 的表达(图 1A); Western blot 结果显示, AQP9 的相对表达量在 0、250、

500 油酸组与 AgNO₃+500 μmol/L 油酸组分别为 0.679 ± 0.033、0.804 ± 0.026、1.124 ± 0.015、0.670 ± 0.025, 各组间差异有统计学意义 (F=207.189, P<0.001)。AgNO₃+500 μmol/L 油酸组 AQP9 表达量与对照组 (0 μmol/L 油酸组) 比较差异无统计学意义 (P=0.667) (图 1B)。

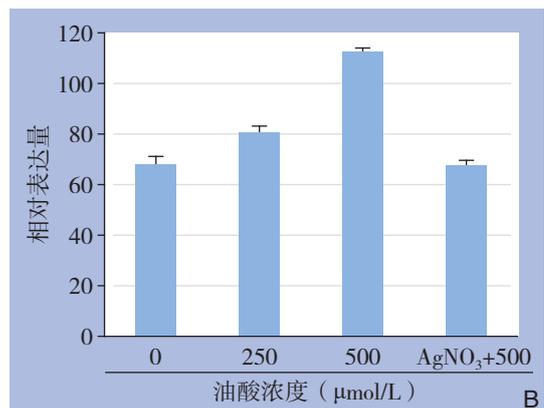
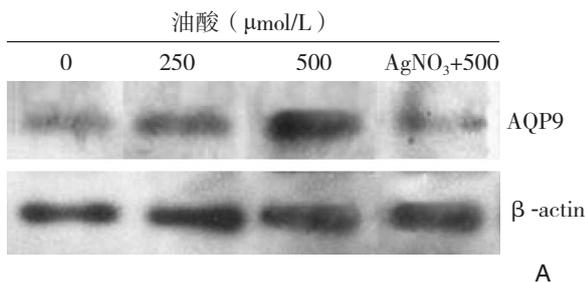


图 1 Western blot 检测 AQP9 蛋白表达
Figure 1 Western blot analysis for AQP9 protein expression

A: 各组蛋白条带; B: 各组 AQP9 相对表达量
A: Protein bands of each group; B: AQP9 relative level of each group

2.2 AQP9 表达上调对 HepG2 细胞迁移能力的影响

划痕结果显示,肝癌 HepG2 细胞的迁移能力随着油酸浓度的增加而增强,0、250、500 μmol/L 油酸组与 AgNO₃+500 μmol/L 油酸组的迁移比率

分别为 1 ± 0.026、0.813 ± 0.044、0.533 ± 0.079、1.008 ± 0.028, 组间差异有统计学意义 (F=123.182, P<0.001), 应用 AgNO₃ 抑制了 AQP9 后, HepG2 肝癌细胞株的迁移能力与对照组 (0 μmol/L 油酸组) 比较, 差异无统计学意义 (P=0.793) (图 2)。

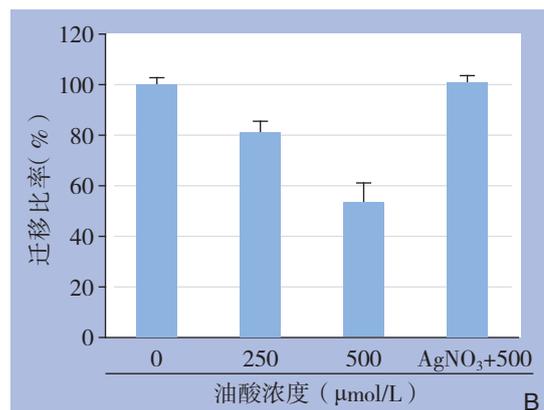
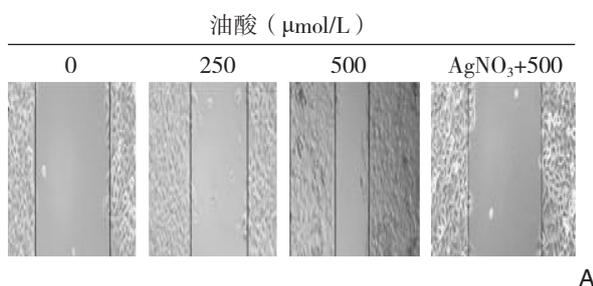


图 2 细胞迁移能力检测
Figure 2 Cell migration ability measurement

A: 各组细胞划痕的结果 (×100); B: 各组细胞迁移比率的比较
A: Results of the scratch test in each group (×100); B: Comparison of the cell migration rate among groups

3 讨论

肝细胞癌是世界上最常见且恶性程度最高的肿瘤之一。病毒性肝炎是肝癌的重要病因^[9]。肝癌

具有高度侵袭性、转移较早、复发率较高、预后较差等的临床特征, 肿瘤的侵袭和转移是影响肝癌患者生存期的重要因素而转移是其病死率高的主要原因。然而, 关于肝癌侵袭转移的具体机制还不清楚

楚,研究肝癌转移的机制对探索有效的肝癌治疗方法意义重大^[10]。

AQP9 是一种在肝脏细胞膜上表达丰富的跨膜水通道蛋白,主要参与水、甘油、尿素等多种物质的跨膜转运,既往的研究主要是 AQP9 与肝脏糖脂代谢^[11]、胆汁分泌^[12]、肝细胞细胞凋亡^[13]、肝硬化^[14]、非酒精性脂肪肝^[15]等肝脏生理、病理过程的关系。近年来,水通道蛋白在肿瘤细胞的表达及其与肿瘤的关系的研究逐渐成为肿瘤研究的热点,有研究^[16-17]显示 AQP9 与脑肿瘤和卵巢恶性肿瘤的形成有关。AQP9 在肝癌组织低表达的原因可能是 AQP9 的低表达增强了肝癌细胞对凋亡的抵抗力^[18],而肝癌转移灶中 AQP9 的表达以及肝癌细胞转移过程中 AQP9 的表达是否增高还需进一步研究。

目前关于肝癌迁移的相关研究较多,主要研究对象为信号通路途径中的某些重要因子,如 Notch 信号通路可以通过调控 COX-2/Snail/E-cadherin 通路来参与肝癌细胞的迁移过程^[19]。然而追踪国内外文献,未见 AQP9 对肝癌细胞迁移能力的相关研究。

本研究探索了 AQP9 在肝癌细胞迁移中的作用。通过 Western blot 检测出在不同浓度油酸作用下 HepG2 肝癌细胞株 AQP9 的表达强度,结果显示油酸可以上调 AQP9 的表达,呈浓度依赖性。而当 AQP9 表达强度增强后,划痕实验结果显示 HepG2 肝癌细胞的迁移能力也随之增强。本实验中应用了 AQP9 抑制剂 AgNO₃ 预处理后,结果显示油酸上调 AQP9 表达及对 HepG2 肝癌细胞迁移能力增强的作用消失,这进一步证明了 AQP9 的表达可以增强 HepG2 肝癌细胞的迁移能力。

由于 AQP9 影响肝癌细胞的迁移能力,迁移是肿瘤转移的关键环节,说明 AQP9 可能是参与肝癌转移的一个重要分子。而且与其它影响肝癌迁移的因素不同,它不仅影响肝癌的迁移而且还参与了与物质转运有关的肝癌的众多代谢过程,同时 AQP9 作为一种蛋白产物,可能是众多影响肝癌细胞迁移信号通路因素的最终效应分子,直接影响肝癌细胞的迁移。故以 AQP9 为治疗靶点,将可能更有效的抑制肝癌细胞的迁移。AQP9 促进肝癌细胞迁移能力的机制尚不明确。可能是 AQP9 促进水分子快速的跨膜流动,使得细胞膜内外的渗透压能够迅速的改变,这种渗透压的快速变化是细胞板状伪足形成的动力,可以促进细胞变形迁移^[20]。

本实验通过对 HepG2 肝癌细胞株的研究证实,AQP9 的表达受到油酸调节,且呈浓度依赖性;

AQP9 的表达提高了 HepG2 肝癌细胞的迁移能力。这为肝癌的治疗提供新的研究方向。

参考文献

- [1] Carbrey JM, Gorelick-Feldman DA, Kozono D, et al. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(5):2945-2950.
- [2] 顾陆响,邱烈旺,陈小凤,等. 油酸通过磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和 p38 丝裂原活化蛋白激酶途径调节水通道蛋白 3 和 9 的表达[J]. *中华肝病杂志*, 2013, 21(10):753-758.
- [3] Lee DH, Park DB, Lee YK, et al. The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats[J]. *Metabolism*, 2005, 54(10):1282-1289.
- [4] Niemietz CM, Tyerman SD. New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin[J]. *FEBS Letters*, 2002, 531(3):443-447.
- [5] 冉吕,梅浙川. 水通道蛋白 9 在人肝癌组织与癌旁正常肝组织中的表达差异[D]. 重庆:重庆医科大学,2013:1-38.
- [6] 曹学峰,苗雄鹰. 水通道蛋白 9 在人肝癌组织中的表达及意义[D]. 长沙:中南大学,2010:1-33.
- [7] 李昂,方育,李嘉,等. 表皮生长因子调节水通道蛋白 3 表达对结肠癌细胞迁移能力的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(8):1557-1560.
- [8] Vázquez-Meza H, de Piña MZ, Pardo JP, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs activate NADPH oxidase in adipocytes and raise the H2O2 pool to prevent cAMP-stimulated protein kinase a activation and inhibit lipolysis[J]. *BMC Biochem*, 2013, 14:13. doi: 10.1186/1471-2091-14-13.
- [9] Gao J, Xie L, Yang WS, et al. Risk factors of hepatocellular carcinoma--current status and perspectives[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(3):743-752.
- [10] Wong CC, Wong CM, Tung EK, et al. Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5):1583-1594.
- [11] Calamita G, Gena P, Ferri D, et al. Biophysical assessment of aquaporin-9 as principal facilitative pathway in mouse liver import of glucogenetic glycerol[J]. *Biol Cell*, 2012, 104(6):342-351.
- [12] Calamita G, Ferri D, Gena P, et al. Altered expression and distribution of aquaporin-9 in the liver of rat with obstructive extrahepatic cholestasis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(4):G682-690.
- [13] Jablonski EM, Webb AN, McConnell NA, et al. Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(4):C975-C985.

[14] Lakner AM, Walling TL, McKillop IH, et al. Altered aquaporin expression and role in apoptosis during hepatic stellate cell activation[J]. *Liver Int*, 2010, 31(1):42-51.

[15] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights[J]. *Science*, 2011, 332(6073):1519-1523.

[16] Warth A, Mittelbronn M, Hülpert P, et al. Expression of the water channel protein aquaporin-9 in malignant brain tumors[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007, 15(2):193-198.

[17] Yang JH, Yan CX, Chen XJ, et al. Expression of aquaglyceroporins in epithelial ovarian tumours and their clinical significance[J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(3):702-711.

[18] 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.

[19] 周亮, 窦科峰. Notch 信号通路参与肝癌细胞侵袭迁移的机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013:1-97.

[20] Loitto VM, Huang C, Sigal YJ, et al. Filopodia are induced by aquaporin-9 expression[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(7):1295-1306.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 郑玉杰, 苗雄鹰. 水通道蛋白 9 对肝癌细胞迁移能力的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(7):921-925. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.011

Cite this article as: ZHENG YJ, MIAO XY. Effect of aquaporin-9 expression on migratory ability of liver cancer cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(7):921-925. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.011

本刊常用词汇英文缩写表

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	心电图	ECG
Toll 样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心脏监护病房	CCU
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素 II	AngII
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC 法	血管内皮生长因子	VEGF
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC 法	血红蛋白	Hb
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	肌酐	Scr
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP 法	绿色荧光蛋白	GFP	血尿素氮	BUN
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血小板	PLT
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血压	BP
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血氧饱和度	SO ₂
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素 / 脂多糖	LPS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒	HBV
二甲基亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	原位末端标记法	TUNEL
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
环氧合酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	重症监护病房	ICU
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK 细胞
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL
计算机 X 线断层照相技术	CT	纤连蛋白	FN		