

Aquaporin 1 Promotes the Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cell *in Vitro*

Yunying Qin, Ningbin Luo*

Guangxi Medical University Affiliated Cancer Hospital, Nanning Guangxi
Email: *flying047@163.com

Received: Apr. 5th, 2020; accepted: Apr. 22nd, 2020; published: Apr. 29th, 2020

Abstract

Objective: To investigate the effects of AQP1 on nasopharyngeal carcinoma cell migration and invasion. **Methods:** Nasopharyngeal carcinoma cell 5-8F was transfected with short hairpin RNA (shRNA) targeting AQP1. And then, Western blot was used to detect the AQP1 protein expression, and Transwell assay was used to detect cell migration and invasion. **Results:** The expression of AQP1 was effectively downregulated in nasopharyngeal carcinoma cell by shRNA targeting AQP1. Knockdown of AQP1 inhibited nasopharyngeal carcinoma cell migration and invasion *in vitro* ($P < 0.01$). **Conclusion:** Aquaporin 1 can promote the migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma cell. Thus, AQP1 may serve as a potential therapeutic target for the treatment of TNBC.

Keywords

Aquaporin 1, Nasopharyngeal Carcinoma, Migration, Invasion

AQP1促进鼻咽癌细胞的迁移和侵袭

覃云英, 罗宁斌*

广西医科大学附属肿瘤医院, 广西 南宁
Email: *flying047@163.com

收稿日期: 2020年4月5日; 录用日期: 2020年4月22日; 发布日期: 2020年4月29日

摘要

目的: 探讨水通道蛋白1 (AQP1)对人鼻咽癌细胞迁移及侵袭能力的影响。**方法:** 采用shRNA转染人鼻咽*通讯作者。

癌细胞5-8F后,用Western blot检测AQP1蛋白的表达量,Transwell实验检测细胞的迁移及侵袭能力。结果:shRNA质粒转染细胞能显著降低人鼻咽癌细胞5-8F中AQP1的蛋白表达水平($P < 0.05$)。Transwell实验发现抑制AQP1的表达可降低鼻咽癌细胞的迁移侵袭能力($P < 0.05$)。结论:AQP1可促进鼻咽癌细胞的迁移和侵袭,可成为鼻咽癌治疗后潜在靶点。

关键词

水通道蛋白1, 鼻咽癌, 迁移, 侵袭

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

鼻咽癌在中国南方发病率较高,特别是在广西,其鼻咽癌的发病率及死亡率明显高于其他地区[1]。鼻咽癌经过规范的治疗后,多数患者可以得到临床缓解,但远处转移常常是鼻咽癌治疗失败的主要原因[2]。因此,进一步明确肿瘤转移相关因子并加以干预,是提高鼻咽癌患者生存率的关键环节。

我们前期研究发现水通道蛋白1(AQP1)在高转移潜能鼻咽癌细胞株中的表达高于低转移潜能的细胞株,提示AQP1的表达水平可能与人鼻咽癌细胞的转移潜能密切相关[3]。为了进一步明确AQP1在鼻咽癌浸润转移中的作用,本研究拟通过慢病毒干扰载体特异性沉默高AQP1表达的鼻咽癌细胞5-8F的AQP1基因,检测AQP1干扰后癌细胞迁移、侵袭能力变化的情况。

2. 材料与方法

2.1. 材料

鼻咽癌细胞株5-8F购自中国科学院上海细胞库。RPMI1640培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自BI公司。双抗(链霉素、青霉素)购自上海翊圣生物科技公司。Lipofectamine™2000及Trizol均购自Invitrogen公司。鼠抗人AQP1单克隆抗体购自Santa Cruz公司,鼠/兔通用二抗检测试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。兔抗人 β -actin抗体购自Abcam公司。

2.2. 鼻咽癌细胞培养及shRNA质粒转染

鼻咽癌细胞培养于含小牛血清(10%)的RPMI 1640培养基中,并在其内加入青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μ g/mL)。细胞在于温育箱(37°C、5% CO₂)中培养,当细胞处于对数生长期时,可用于实验。质粒转染步骤按照Invitrogen公司Lipofectamine™2000试剂的使用说明书施行。将转染了靶向AQP1的shRNA(AQP1-shRNA)的5-8F细胞作为AQP1干扰组,而未转染的5-8F细胞设置为空白对照组。AQP1-shRNA参考李卓等[4]报道构建,核心序列为:CCATTATGCTGGTGTATGT。

2.3. Western Blot 法分析鼻咽癌细胞转染前后AQP1蛋白表达的差异

将处于对数生长期的5-8F细胞裂解离心(1000 rpm 5分钟)后,得到对照组及AQP1干扰组细胞的总蛋白,并对两组细胞的蛋白含量进行测定(bradford比色法)。两组细胞的蛋白通过SDS PAGE电泳法各自分离出40 μ L样本,并将蛋白样本转移至PvDF膜上(电转印法)。将蛋白封闭后置于4°C冰箱并过夜,再

加入一抗孵育 2 小时, 然后用 TBST 洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育(37°C, 1 h), 孵育结束后 TBST 再次洗涤 3 次, 最后曝光显影。将两组 AQP1 蛋白光密度值比上相应内参 β -actin 光密度值, 得到各组细胞的 AQP1 蛋白相对表达量。

2.4. Transwell 实验分析鼻咽癌细胞转染前后垂直迁移及侵袭能力的差异

迁移实验:

将空白对照组与 AQP1 干扰组的鼻咽癌细胞 5-8F 消化, 制成细胞悬液。将 200 μ L 细胞悬液(内含 1×10^5 细胞)加入上室, 下室加入 1640 培养基(含 10% FBS)共 750 μ L, 空白对照组与 AQP1 干扰组均设 3 个复孔, 置于温育箱中培养, 培养环境设定为 37°C、5% CO_2 。细胞培养 48 h 后取出小室, 将上室的培养基用吸管吸取去除, 再用棉签将上室细胞轻轻拭去, 后用 4% 多聚甲醛固定 15 分钟, 再用结晶紫染色 10 分钟, 最后 PBS 洗涤 3 次, 于 100 倍倒置显微镜下随机选取 5 个视野进行拍照计数。

侵袭实验:

将 50 mg/L 的 Matrigel 预先用无血清的 1640 培养基以 1:4 比例稀释后, 包被 Transwell 小室的底部膜, 置于 4°C 温度下风干, 水化基底膜。其余步骤同迁移实验。

2.5. 统计学分析

图片数据的采集及处理用 Graphpad + Prism 5 和 Image J 软件进行。应用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学检验, 组间比较用两样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。柱形图用 Excel 软件描绘, 误差线为各个复孔的标准偏差 SD。3 次以上独立重复实验。

3. 结果

3.1. 鼻咽癌细胞 AQP1-shRNA 干扰后 AQP1 蛋白表达水平的变化

Western blot 分析显示, 与未进行 AQP1-shRNA 干扰的对照组细胞对比, 干扰组鼻咽癌 5-8F 细胞的 AQP1 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$), 见图 1。

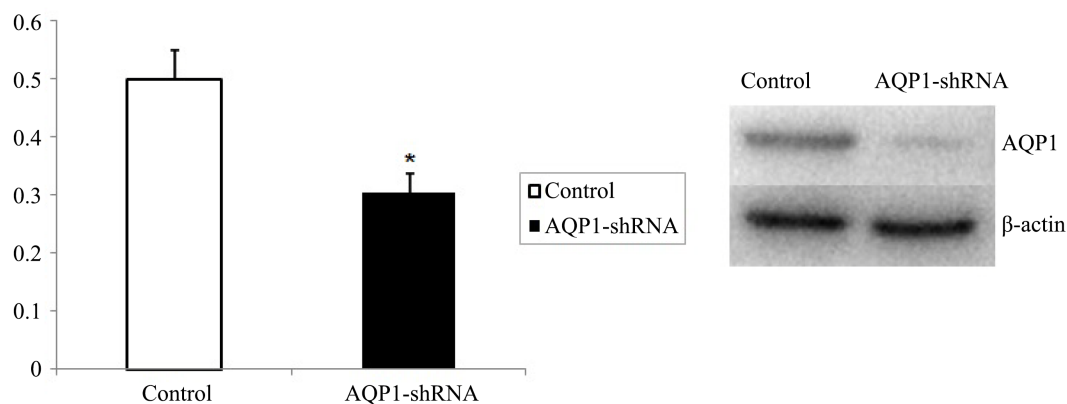


Figure 1. AQP1 expression in nasopharyngeal carcinoma cell is inhibited by sh-AQP1 (* $P < 0.05$)

图 1. 鼻咽癌细胞经 sh-AQP1 干扰后 AQP1 表达下降(* $P < 0.05$)

3.2. 鼻咽癌细胞 AQP1-shRNA 干扰后迁移能力的变化

Transwell 迁移实验显示, 鼻咽癌细胞 5-8F 经 AQP1-shRNA 干扰后(干扰组), 其细胞迁移个数明显低于空白对照组($P < 0.05$), 见图 2。

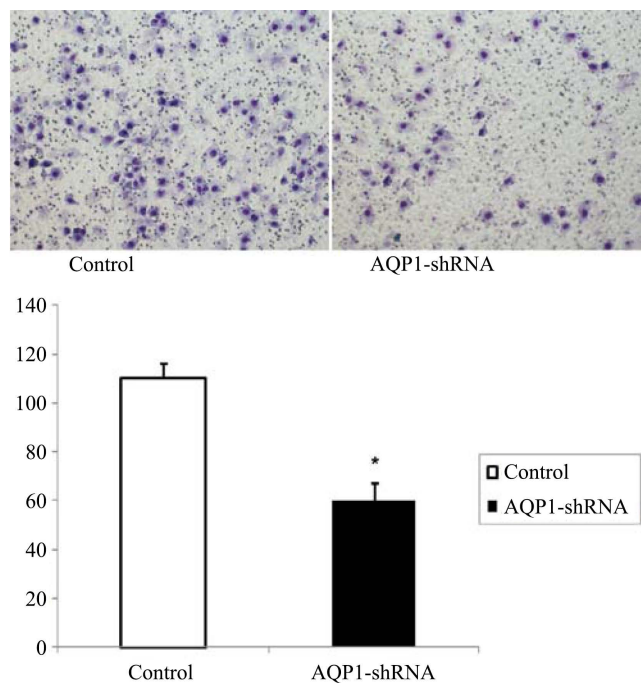


Figure 2. Downregulation of AQP1 inhibits cell migration in nasopharyngeal carcinoma cells
图 2. 下调 AQP1 表达抑制鼻咽癌细胞迁移能力($\times 100$). * $P < 0.05$

3.3. 鼻咽癌细胞 AQP1-shRNA 干扰后迁移能力的变化干扰 AQP1 对鼻咽癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验显示, 鼻咽癌细胞 5-8F 经 AQP1-shRNA 干扰后(干扰组), 其细胞侵袭个数明显低于空白对照组($P < 0.05$), 见图 3。

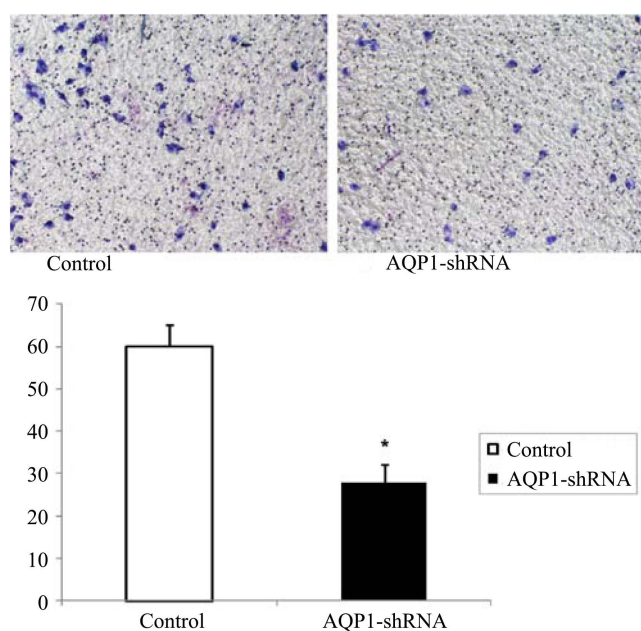


Figure 3. Downregulation of AQP1 inhibits cell invasion in nasopharyngeal carcinoma cells
图 3. 下调 AQP1 表达抑制鼻咽癌细胞侵袭能力($\times 100$). * $P < 0.05$

4. 讨论

AQP1 是介导组织内水的被动跨膜转运的重要工具, 对维持细胞内环境的稳定平衡具有重要作用。除了维持人体的正常生命活动外, AQP1 与恶性肿瘤的生长及转移可能也有着密切的联系。研究发现恶性肿瘤(如乳腺癌、宫颈癌、肺癌、结肠癌等[5] [6] [7] [8])中 AQP1 的表达水平高于正常组织或其他良性病变。在鼻咽癌的研究中也发现了类似的结果[9], 而且 AQP1 与肿瘤血管生成存在相关性, 提示其可以通过倡导肿瘤血管生成促进鼻咽癌的生长和转移[9]。

转移是恶性肿瘤的一个重要特征, 也是恶性肿瘤患者死亡的主要原因。转移的建立是一个多步骤的过程[10] [11], 其中肿瘤细胞的迁移侵袭能力是影响肿瘤转移的重要影响因素。下调肿瘤细胞 AQP1 的表达, 可以显著减少肿瘤细胞迁移的能力, 从而降低其转移的风险[12] [13]。本研究利用 AQP1 干扰慢病毒载体转染高 AQP1 表达鼻咽癌细胞株 5-8F, 使细胞株的 AQP1 表达降低, 结果发现细胞株的迁移侵袭能力也随之降低, 提示 AQP1 是促进鼻咽癌细胞迁移的重要影响因素。研究表明 AQP1 促进肿瘤细胞迁移的能力, 是驱动依赖 AQP1 的水分子渗透到细胞突起中, 为迁移的肿瘤细胞前缘为肌动蛋白聚合创造更多空间[14] [15] [16]。

5. 结论

综上所述, 本研究结果提示 AQP1 除了通过影响组织血管生成促进鼻咽癌转移外, 还可以直接影响鼻咽癌细胞本身的迁移侵袭能力。下调鼻咽癌的 AQP1 可以降低其转移风险, AQP1 可能成为鼻咽癌治疗的潜在靶点。

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] 曹骥, 李秋林, 容敏华, 葛莲英, 余家华. 2015 年广西肿瘤登记地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国癌症防治杂志, 2019, 11(1): 43-51.
- [2] 中国抗癌协会鼻咽癌专业委员会, 陈晓钟, 李金高, 等. 转移性鼻咽癌治疗专家共识[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(1): 23-28.
- [3] 覃云英, 罗宁斌, 王鹏, 等. AQP1 在不同转移潜能的人鼻咽癌细胞株中的表达[J]. 临床医学进展, 2018, 8(10): 948-952.
- [4] 李卓, 康炜, 辛娜, 等. AQP1-shRN A 表达质粒载体的构建与筛选[J]. 重庆医学, 2015(30): 4183-4186.
- [5] 张珺, 于世英, 殷铁军. AQP1、HPA 和 VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达和临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(18): 2750-2753+2756.
- [6] 张斌, 刘芳芳, 马勇杰, 等. 水通道蛋白 1 在乳腺癌细胞质中的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2013, 35(12): 904-909.
- [7] Kang, B.W., Kim, J.G., Lee, S.J., et al. (2015) Expression of Aquaporin-1, Aquaporin-3, and Aquaporin-5 Correlates with Nodal Metastasis in Colon Cancer. *Oncology*, **88**, 369-376. <https://doi.org/10.1159/000369073>
- [8] Chetry, M., Li, S., Liu, H., et al. (2018) Prognostic Values of Aquaporins mRNA Expression in Human Ovarian Cancer. *Bioscience Reports*, **38**. <https://doi.org/10.1042/BSR20180108>
- [9] 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.
- [10] Steeg, P.S. (2006) Tumor Metastasis: Mechanistic Insights and Clinical Challenges. *Nature Medicine*, **12**, 895-904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>
- [11] Nguyen, D.X., Bos, P.D. and Massagué, J. (2009) Metastasis: From Dissemination to Organ-Specific Colonization. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 274-284. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>

-
- [12] Wei, X. and Dong, J. (2015) Aquaporin 1 Promotes the Proliferation and Migration of Lung Cancer Cell *in Vitro*. *Oncology Reports*, **34**, 1440-1448. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4107>
- [13] Wang, Y., Fan, Y., Zheng, C., *et al.* (2017) Knockdown of AQP1 Inhibits Growth and Invasion of Human Ovarian Cancer Cells. *Molecular Medicine Reports*, **16**, 5499-5504. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7282>
- [14] Verkman, A.S. (2002) Aquaporin Water Channels and Endothelial Cell Function. *Journal of Anatomy*, **200**, 617-627. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00058.x>
- [15] 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>
- [16] Verkman, A.S. (2009) Knock-out Models Reveal New Aquaporin Functions. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **190**, 359-381. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_18