

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.009

沉默 AQP-5 对人结肠癌 HT-29 细胞的增殖、凋亡及其化疗敏感性的影响

石晓明, 吴胜春, 杨永宾, 唐雷, 吕柏楠(河北省人民医院 普外二科, 河北 石家庄 050051)

[摘要] **目的:**探讨小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 沉默水通道蛋白-5 (aquaporin-5, AQP-5) 的表达对人结肠癌 HT-29 细胞增殖、凋亡及化疗药敏感性的影响。**方法:**以合成的 AQP-5-siRNA 序列转染 HT-29 细胞, 采用 Western blotting 检测 AQP-5-siRNA 的转染效率, 磺酰罗丹明 (sulphorhodamine B, SRB) 染色法检测各组细胞的增殖抑制率, 流式细胞术检测 HT-29 细胞的凋亡。分光光度法检测 HT-29 细胞 caspase-3 活性, real-time PCR 和 Western blotting 检测 AQP-5-siRNA 转染后 HT-29 细胞中 PCNA 和 P53 在 mRNA 和蛋白水平的表达。选用 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 和顺铂 (cisplatin, DDP) 刺激 AQP-5-siRNA 转染细胞, SRB 染色法检测细胞的增殖抑制率, 以金正均法计算两药联合作用的 Q 值。**结果:**与 NC-HT-29 细胞相比, AQP-5-siRNA-HT-29 细胞中 AQP-5 蛋白的表达显著下降 ($P < 0.05$)。SRB 检测显示, AQP-5-siRNA-HT-29 细胞的增殖抑制率显著增加 [9.23 ± 0.51] % vs 0, $P < 0.05$]。流式细胞术检测显示, AQP-5-siRNA-HT-29 细胞的凋亡率显著升高 [10.81 ± 1.32] % vs [0.99 ± 0.18] %, $P < 0.05$]; caspase-3 活性显著升高 [0.19 ± 0.03] vs [0.09 ± 0.01] %, $P < 0.05$]。Real-time PCR 和 Western blotting 结果显示, AQP-5-siRNA-HT-29 细胞中 PCNA mRNA 和蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$), 同时, P53 mRNA 和蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$)。AQP-5-siRNA + 5-FU 组细胞的增殖抑制率显著高于 AQP-5-siRNA 组和 5-FU 组 [44.93 ± 2.28] % vs [9.11 ± 0.32] %、 25.68 ± 1.71] %, 均 $P < 0.05$], AQP-5-siRNA + DDP 组细胞的增殖抑制率显著高于 AQP-5-siRNA 组和 DDP 组 [39.01 ± 1.76] % vs [9.11 ± 0.32] %、 18.47 ± 1.25] %, $P < 0.05$], 而且, AQP-5-siRNA 与 5-FU 或 DDP 联用的 Q 值分别为 1.38 和 1.51, 均表现为协同作用。**结论:**AQP-5-siRNA 能抑制 HT-29 细胞增殖、促进其凋亡、并提高 HT-29 细胞对 5-FU 和 DDP 的化疗敏感性。

[关键词] 水通道蛋白 5; 结肠肿瘤; RNA 干扰; 化疗敏感性; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R735.4; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)03-0306-06

Silencing AQP-5 on proliferation, apoptosis and chemosensitivity of human colon cancer HT-29 cells

Shi Xiaoming, Wu Shengchun, Yang Yongbin, Tang Lei, Lü Bonan (Second Department of General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of siRNA (small interference RNA, siRNA) silencing aquaporin-5 (AQP-5) expression on the proliferation, apoptosis, and chemosensitivity of human colon cancer HT-29 cells. **Methods:** A synthetic AQP-5-siRNA sequence was transfected into HT-29 cells, and the inhibition efficiency was detected by Western blotting. Sulphorhodamine B (SRB) assay were used to detect the cell proliferation inhibition rate. Cell apoptosis of HT-29 cells were detected by flow cytometry (FCM). The activity of caspase-3 in HT-29 cells was measured by spectrophotometry. The mRNA and protein levels of PCNA and P53 in HT-29 cells after AQP-5-siRNA transfection were determined by real-time PCR and Western blotting. 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin (DDP) were selected to treat the AQP-5-siRNA-HT-29 cells, and SRB assay was used to detect the cell proliferation inhibition rate. The "Q" Method of Jin Zhenjun was used to evaluate the interaction of the two drugs. **Results:** SRB assay showed that compared with NC-HT-29 cells, AQP-5 expression was significantly decreased in AQP-5-siRNA-HT-29 cells ($P < 0.05$). Compared with NC-HT-29 cells, the proliferation inhibition rate was increased significantly in AQP-5-siRNA-HT-29 cells [9.23 ± 0.51] % vs 0, $P < 0.05$). Flow cytometry analysis showed that compared with NC-HT-29 cells, the cell apoptosis rate increased dramatically in AQP-5-siRNA-HT-29 cells [10.81 ± 1.32] % vs [0.99 ± 0.18] %, $P < 0.05$). The activities

[作者简介] 石晓明 (1969 -), 男, 河北省青龙县人, 副主任医师, 主要从事结肠癌分子生物治疗方面的研究。E-mail: shixm99@163.com

[通信作者] 吕柏楠 (Lü Bonan, corresponding author), E-mail: shixiaoming1999@126.com

of caspase-3 were also increased in AQP-5-siRNA-HT-29 cells compared with NC-HT-29 cells ($[0.19 \pm 0.03]$ vs $[0.09 \pm 0.01]$, $P < 0.05$). Real-time PCR and Western blotting results indicated that compared with NC-HT-29 cells, the mRNA and protein levels of PCNA were decreased ($P < 0.05$), simultaneously, the mRNA and protein levels of P53 were increased ($P < 0.05$) in AQP-5-siRNA-HT-29 cells. Compared with AQP-5-siRNA-HT-29 cells or 5-FU-HT-29 cells, the proliferation inhibition rate was increased remarkably in AQP-5-siRNA + 5-FU-HT-29 cells ($[44.93 \pm 2.28]\%$ vs $[9.11 \pm 0.32]\%$, $[25.68 \pm 1.71]\%$, $P < 0.05$), respectively. Compared with AQP-5-siRNA-HT-29 cells or DDP-HT-29 cells, the proliferation inhibition rate was increased remarkably in AQP-5-siRNA + DDP-HT-29 cells ($[39.01 \pm 1.76]\%$ vs $[9.11 \pm 0.32]\%$, $[18.47 \pm 1.25]\%$, $P < 0.05$), respectively. Moreover, the synergistic effects were showed between AQP-5-siRNA and 5-FU or DDP with Q value of 1.38 and 1.51, respectively. **Conclusion:** AQP-5-siRNA can inhibit the proliferation, promote the apoptosis of HT-29 cells, and increase the chemosensitivity of HT-29 cells to 5-FU and DDP.

[**Key words**] aquaporin 5; colonic neoplasm; RNA interference; chemosensitivity; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 306-311]

结肠癌是常见的消化道肿瘤,在世界范围内发病率均呈逐年上升的趋势,尤其在经济发达国家及地区发病率更高。在我国,结肠癌的发病率和病死率也呈逐年上升的趋势^[1-2]。目前,结肠癌的治疗仍以手术为主、化疗为辅进行综合治疗,但易复发和易转移是导致结肠癌治疗失败的主要原因。化疗药物的作用受到多种因素的影响,其中肿瘤对化疗药物的不敏感性可直接导致化疗的失败。因而如何提高肿瘤对化疗药物的敏感性已成为肿瘤研究的热点^[3-5]。水通道蛋白(aquaporin, AQP)家族成员与许多肿瘤密切相关^[6-8],可能成为肿瘤治疗新的分子靶点。因此本研究采用人结肠癌 HT-29 细胞作为研究对象,应用特异性小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)沉默人结肠癌 HT-29 细胞中 AQP-5 基因的表达,探讨 AQP-5 对结肠癌细胞增殖、凋亡及化疗药敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

DMEM/F12 培养液、胰蛋白酶购自 Gibco 公司,荧光定量 RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司,磺酰罗丹明(sulphorhodamine B, SRB)购自美国 Sigma 公司, FAS Calibur 流式细胞仪购自 BD 公司, ABI 7500 PCR 仪购自美国 ABI 公司。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)购自天津人民制药厂,批号为 0204242,顺铂(cisplatin, DDP)购自山东齐鲁制药厂生产,批号为 000602900。Caspase-3 分光光度法检测试剂盒购自南京凯基公司, AQP-5、PCNA、P53 及 GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 HT-29 细胞的培养

人结肠中分化腺癌细胞 HT-29 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞用含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM/F12 培养基培养,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中孵育。用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)溶液消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 AQP-5-siRNA 转染人结肠癌 HT-29 细胞

参考文献[9]设计合成 AQP-5-siRNA 序列。AQP-5-siRNA1 正义序列: 5'-AAAACCTCTGCGAACACGGCCCCTGTCTC-3'; 反义序列: 5'-AAGGCCGTGTTCCGACAGATTCCTGTCTC-3'。AQP-5-siRNA2 正义序列: 5'-AAGAGCAGCCAGTGAAGTAGACCTGTCTC-3'; 反义序列: 5'-AATCTACTTCACTGGCTGCTCCCTGTCTC-3'。阴性对照序列(NC-siRNA)序列为: 5'-GGUCUCACUCCCCAUAGAGTT-3'。转染前 24 h 于 6 孔板中接种 HT-29 细胞,调整细胞密度至 4×10^5 个/ml。转染前用无血清无抗生素的 DMEM/F12 清洗细胞,经脂质体介导法,按照试剂说明书用无血清无抗生素的 DMEM/F12 培养基稀释 AQP-5-siRNA 混合物或对照 NC-siRNA 和转染试剂 LipofectamineTM 2000,两种稀释液混合形成复合物后,将其转染 HT-29 细胞。实验分组为:正常培养的 HT-29 细胞对照组(Ctrl-HT-29 组)、转染 NC-siRNA 的 HT-29 细胞(NC-HT-29 组)和转染 AQP-5-siRNA 的 HT-29 细胞(AQP-5-siRNA-HT-29 组)。

1.4 SRB 染色法检测细胞对药物的敏感性

取生长良好的培养细胞,实验分为 6 组: Ctrl-HT-29、AQP-5-siRNA-HT-29、5-FU-HT-29 (5-FU: 15 $\mu\text{g/ml}$)、AQP-5-siRNA + 5-FU-HT-29、DDP-HT-29 (DDP: 2 $\mu\text{g/ml}$)、AQP-5-siRNA + DDP-HT-29。细胞

于培养结束后加入预冷的三氯醋酸(trichloroacetic acid, TCA) 体积分数为 50%) 50 μl /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 1 h, 弃去固定液, 用超纯水清洗培养孔 5 遍, 干燥后每孔加入 SRB 液 100 μl , 室温避光染色 10 min。弃去 SRB 液, 用 1% 醋酸洗去未与蛋白结合的 SRB 液, 自然干燥, 用 150 μl 10 mmol/L 非缓冲三羟甲基氨基甲烷(Tris) 碱液(pH 10.5) 溶解与蛋白结合的 SRB, 酶标仪于波长 545 nm 处测定各孔光密度(D) 值, 计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值}) / \text{对照组 } D \text{ 值} \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测 AQP-5-siRNA 转染后 HT-29 细胞的凋亡率

细胞用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA) 溶液消化, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 $\times g$ 离心收集细胞, 沉淀中加入预冷的 70% 乙醇 1 ml, 轻轻吹打, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 $\times g$ 离心 10 min, 去上清, PBS 清洗 2 次, 加入 1 ml PI 染液将细胞重悬, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min 后, 流式细胞仪检测 HT-29 细胞凋亡率。以上实验重复 3 次。

1.6 Caspase-3 试剂盒检测 AQP-5-siRNA 转染后 HT-29 细胞中 caspase-3 的活性

收集细胞, PBS 清洗 2 次, 按照 caspase-3 试剂盒说明书的要求, 检测细胞内 caspase-3 活性。用 50 μl 预冷的裂解液悬浮细胞, 冰浴裂解 20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 500 $\times g$ 离心 10 min, 转移上清至新管中, 并测定蛋白浓度。各组均取 100 μg 上清并用裂解液补充至总体积为 50 μl , 每组加入 50 μl 的反应缓冲液和 5 μl 相应的底物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h。酶标仪于 405 nm 处测定各孔光密度(D) 值, 检测 caspase-3 的活性变化(酶活性单位: U/ μg)。

1.7 Real-time PCR 检测 AQP-5-siRNA 转染后 HT-29 细胞中 PCNA mRNA 及 P53 mRNA 的表达

收集细胞, 按照 TRIzol 试剂产品说明书要求, 采用一步法提取 RNA。测定 RNA 纯度和浓度, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性后, 各组取 1 μg RNA, 进行反转录及 real-time PCR 反应。建立 20 μl PCR 反应体系: 1 μl 反转录产物作为模板、10 μl 2 \times Ultra SYBR 混合液、1 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物、8 μl 去离子水。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 进行 40 个循环。以 GAPDH 为内参照基因, 得到目的基因表达的相对定量值。PCNA 上游引物: 5'-GTG-GAGAACTTGAAATGGAAC-3', 下游引物 5'-TT-GAAGAGAGTGGAGTGGCT-3'; P53 上游引物: 5'-TTTGAGCTGCGTGTTCGTG-3', 下游引物: 5'-CCCTTCTTGCGGAGATTC-3'; GAPDH 上游引物:

5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', 下游引物 5'-GC TTCACCACCTTCTTGATGTC-3'。

1.8 Western blotting 检测 PCNA 及 P53 蛋白的表达

收集细胞, 用预冷 PBS 洗涤 3 次, 于细胞裂解液中重悬细胞, 冰上裂解间断涡旋 30 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上清, 进行蛋白定量。各组取等量的细胞总蛋白依次经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、电转移至 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉室温封闭后, 加稀释后的一抗 PCNA(1: 500)、P53(1: 400)、GAPDH(1: 500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 于室温摇床振荡漂洗 3 次后加入相应二抗, 室温孵育 2 h, 化学发光法进行显色, 用凝胶图像分析软件分析灰度值。以目的蛋白条带与 GAPDH 条带灰度值比值表示各目的蛋白表达水平。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 软件, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA 分析) 及 Dunnett 检验。采用金正均 Q 值法^[10]判断 AQP-5-siRNA 转染和化疗药物的协同作用, 其中 Q = 实际联合药效 R'(A + B) / 理论联合药效 R(A + B); R(A + B) = RA + RB - RA \times RB, RA、RB 为单独用药药效。Q < 0.85 表示两药合用具有拮抗作用, 0.85 < Q < 1.15 表示两药合用具有相加作用, Q \geq 1.15 表示两药合用具有协同作用。

2 结果

2.1 AQP-5-siRNA 转染抑制 HT-29 细胞中 AQP-5 蛋白的表达

Western blotting 结果(图 1) 显示, 与 NC-HT-29 细胞相比, AQP-5-siRNA-HT-29 细胞中 AQP-5 的表达明显下降[(0.14 \pm 0.02) vs (1.01 \pm 0.16), $P < 0.05$], NC-HT-29 细胞与 Ctrl-HT-29 细胞相比, AQP-5 的表达差异没有统计学意义($P > 0.05$)。结果提示, AQP-5-siRNA 能高效抑制 HT-29 细胞中 AQP-5 的表达。

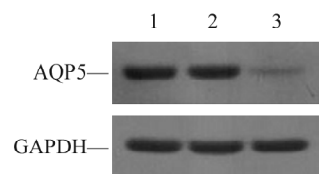


图 1 AQP-5-siRNA 转染抑制 HT-29 细胞中 AQP-5 蛋白的表达

Fig. 1 AQP-5-siRNA transfection inhibited expression of AQP-5 protein in HT-29 cells

1: Ctrl-HT-29; 2: NC-HT-29; 3: AQP-5-siRNA-HT-29

2.2 AQP-5-siRNA 转染对 HT-29 细胞增殖、凋亡及 caspase-3 活性的影响

SRB 检测结果(表 1)显示,与 NC-HT-29 细胞相比,AQP-5-siRNA-HT-29 细胞的增殖抑制率显著增加[$(9.23 \pm 0.51)\%$ vs 0 , $P < 0.05$],提示抑制 AQP-5 的表达可抑制 HT-29 细胞增殖。而 NC-HT-29 细胞与 Ctrl-HT-29 细胞相比,细胞增殖抑制率无明显差异。流式细胞术检测结果显示,AQP-5-

siRNA-HT-29 细胞的凋亡率显著增加[$(10.81 \pm 1.32)\%$ vs $(0.99 \pm 0.18)\%$, $P < 0.05$]。分光光度法检测细胞 caspase-3 活性,结果(表 1)显示,与 NC-HT-29 细胞相比,AQP-5-siRNA-HT-29 细胞 caspase-3 活性显著升高[$(0.19 \pm 0.03)\%$ vs $(0.09 \pm 0.01)\%$, $P < 0.05$],NC-HT-29 细胞与 Ctrl-HT-29 细胞相比,caspase-3 活性的差异则无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 AQP-5-siRNA-HT-29 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率及 caspase-3 活性增高($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab.1 Inhibition rate of proliferation, apoptotic rate, and caspase-3 activity increased in AQP-5-siRNA-HT-29 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Inhibition rate of proliferation(%)	Apoptotic rate(%)	Caspase-3 activity (U/ μ g)
Ctrl-HT-29	0	1.22 ± 0.17	0.09 ± 0.01
NC-HT-29	0	0.99 ± 0.18	0.09 ± 0.01
AQP-5-siRNA-HT-29	$9.23 \pm 0.51^*$	$10.81 \pm 1.32^*$	$0.19 \pm 0.03^*$

* $P < 0.05$ vs NC-HT-29 group

2.3 AQP-5-siRNA 转染对 PCNA、P53 在 mRNA 和蛋白水平表达的影响

Real-time PCR 和 Western blotting 结果(图 2、3)显示,与 NC-HT-29 细胞相比,AQP-5-siRNA-HT-29 细胞中 PCNA mRNA 和蛋白表达水平明显下降,分别为[(0.39 ± 0.13) vs (1.21 ± 0.15) , $P < 0.05$]和[(0.51 ± 0.08) vs (0.98 ± 0.16) , $P < 0.05$],P53 mRNA 和蛋白表达水平明显上升,分别为[(2.78 ± 0.46) vs (1.22 ± 0.18) , $P < 0.05$]和[(1.24 ± 0.20) vs (0.67 ± 0.11) , $P < 0.05$]。NC-HT-29 细胞与 Ctrl-HT-29 细胞相比,PCNA、P53 在 mRNA 和蛋白水平的表达差异则均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 AQP-5-siRNA 转染对 HT-29 细胞化疗药物敏感性的影响

SRB 检测结果(表 2)显示,5-FU 或 DDP 单独处理组 HT-29 细胞较对照组细胞增殖抑制率显著增加($P < 0.05$),AQP-5-siRNA + 5-FU 处理后,HT-29 细胞的增殖抑制率较 AQP-5-siRNA 组或 5-FU 单独处理组更为明显[$(44.93 \pm 2.28)\%$ vs $(9.11 \pm 0.32)\%$ 、 $(25.68 \pm 1.71)\%$;均 $P < 0.05$];AQP-5-siRNA + DDP 组对 HT-29 细胞的增殖抑制率较 AQP-5-siRNA 组或 DDP 单独处理组也更为明显[$(39.01 \pm 1.76)\%$ vs $(9.11 \pm 0.32)\%$ 、 $(18.47 \pm$

$1.25)\%$;均 $P < 0.05$],AQP-5-siRNA + 5-FU、AQP-5-siRNA + DDP 的 Q 值分别为 1.38 和 1.51,均表现为协同作用。结果提示,AQP-5-siRNA 转染可增强 HT-29 细胞对化疗药物的敏感性。

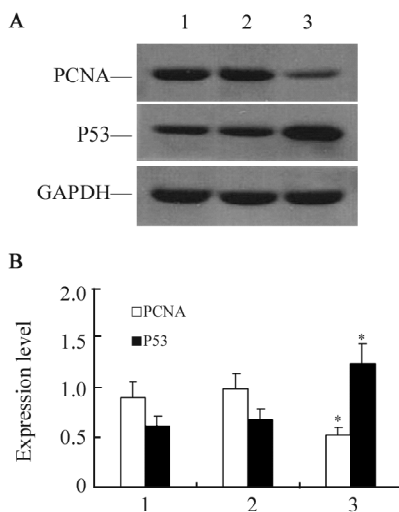


图 2 AQP-5-siRNA 转染对 HT-29 细胞 PCNA 和 P53 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of AQP-5-siRNA transfection on expressions of PCNA and P53 protein in HT-29 cells

1: Ctrl-HT-29; 2: NC-HT-29; 3: AQP-5-siRNA-HT-29

* $P < 0.05$ vs NC-HT-29 group

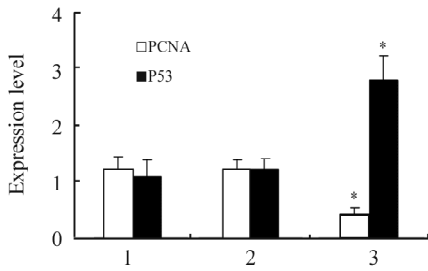


图3 AQP-5-siRNA 转染对 HT-29 细胞 PCNA 和 P53 mRNA 表达的影响

Fig.3 Effect of AQP-5-siRNA transfection on expression levels of PCNA and P53 mRNA in HT-29 cells

1: Ctrl-HT-29; 2: NC-HT-29; 3: AQP-5-siRNA-HT-29
* $P < 0.05$ vs NC-HT-29 group

表2 AQP-5-siRNA 转染增强 5-FU 和 DDP 对 HT-29 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab.2 AQP-5-siRNA transfection enhanced the inhibitory effects of 5-FU and DDP on proliferation of HT-29 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Proliferation inhibitory rate (%)	Q-value
Ctrl-HT-29	0	
AQP-5-siRNA	9.11 ± 0.32	
5-FU	25.68 ± 1.71	
AQP-5-siRNA + 5-FU	44.93 ± 2.28 **	1.38
DDP	18.47 ± 1.25	
AQP-5-siRNA + DDP	39.01 ± 1.76 **	1.51

** $P < 0.01$ vs AQP-5-siRNA, 5-FU or DDP group

3 讨论

结肠癌是人类常见的消化道恶性肿瘤,化疗为其主要治疗手段之一。然而,肿瘤细胞的耐药性往往导致化疗失败。因而,如何提高化疗敏感性,对提高结肠癌防治意义重大。AQP 是一类相对分子质量约为 30 000、调节水进出细胞的膜转运蛋白,属于主要固有蛋白(major intrinsic protein, MIP)家族^[11]。AQP 参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等病理过程^[12-13]。研究^[14-15]显示,AQP 与人类许多肿瘤关系密切。AQP-5 是近年发现的与结肠癌发生发展相关的蛋白。有研究^[16-17]发现,AQP-5 在结肠癌组织中高表达,且与肿瘤分化、浸润、淋巴结转移及 TNM 分期相关,在人结肠癌的发生、发展及转移的过程中可

能起重要作用,但有关 AQP 与化疗敏感性的研究报道很少。因此,本研究采用 RNA 干扰技术封闭内源性 AQP-5 的表达,观察其对细胞增殖、凋亡以及对化疗药物敏感性的影响。

本研究发现,结肠癌 HT-29 细胞中 AQP-5 表达较高,经 AQP-5-siRNA 转染后表达明显减弱,其下降幅度可达 90%。进一步 SRB 检测发现,转染了 AQP-5-siRNA 的 HT-29 细胞增殖抑制率显著增加,说明抑制 AQP-5 的表达可抑制 HT-29 细胞增殖。

细胞增殖核抗原 PCNA 和“分子警察”P53 在肿瘤的发生发展中具有相当重要的作用,两者都是肿瘤研究的热点靶基因^[18-20]。进一步研究显示,AQP-5-siRNA 转染后 HT-29 细胞中 PCNA 表达下降、周期抑制蛋白 P53 的表达明显上升。流式细胞术检测细胞凋亡的结果显示,转染了 AQP-5-siRNA 的 HT-29 细胞凋亡率显著增加,转染了 AQP-5-siRNA 的 HT-29 细胞 caspase-3 活性也显著升高,此结果提示抑制 AQP-5 的表达可促进 HT-29 细胞凋亡。

为了解抑制 AQP-5 的表达对化疗敏感性的影响,本研究检测了 AQP-5-siRNA 转染前后结肠癌细胞 HT-29 对结肠癌一线化疗药物 DDP、5-FU 的敏感性变化。DDP 是目前肿瘤化疗的主要药物,对多种肿瘤有较好疗效;5-FU 也是结肠癌化疗的一线药物,目前随着各种增效剂的使用其疗效已有明显提高^[21]。本研究结果表明,AQP-5-siRNA 联合 5-FU、AQP-5-siRNA 联合 DDP 处理 HT-29 细胞较化疗药物单独处理细胞,其细胞的增殖抑制率均显著增加。提示抑制 AQP-5 表达可提高结肠癌细胞对化疗药物的敏感性。

综上所述,抑制内源性 AQP-5 表达可以抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡,还可以提高 HT-29 细胞对 5-FU 和 DPP 的敏感性。今后将对 AQP-5 抑制肿瘤细胞生长的机制进行更为深入地探讨,为 AQP-5 成为结肠癌治疗的靶点提供实验依据。

[参考文献]

[1] Center MM, Jemal A, Smith RA, et al. Worldwide variations in colorectal cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(6): 366-378.
 [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
 [3] Weekes J, Lam AK, Sebesan S, et al. Irinotecan therapy and molecular targets in colorectal cancer: A systemic review [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(29): 3597-3602.
 [4] Wang L, Li PF, Geng M, et al. Correlation between chemosensitivity to anticancer drugs and telomerase reverse transcriptase

- mRNA expression in gastric cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8 (1): 33-37.
- [5] Shao CJ, Wu MW, Chen FR, et al. Histone deacetylase inhibitor, 2-propylpentanoic acid, increases the chemosensitivity and radiosensitivity of human glioma cell lines *in vitro* [J]. *Chin Med J*, 2012, 125(24): 4338-4343.
- [6] Frede J, Fraser SP, Oskay-Özcelik G, et al. Ovarian cancer: Ion channel and aquaporin expression as novel targets of clinical potential [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(10): 2331-2344.
- [7] Wang D, Owler BK. Expression of AQP1 and AQP4 in paediatric brain tumours [J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(1): 122-127.
- [8] Jung HJ, Park JY, Jeon HS, et al. Aquaporin-5: A marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28492-e28500.
- [9] Woo J, Lee J, Chae YK, et al. Overexpression of AQP5, a putative oncogene, promotes cell growth and transformation [J]. *Cancer Lett*, 2008, 264(1): 54-62.
- [10] 金正均. 合并用药中的相加 [J]. *中国药理学报*, 1980, 1 (2): 70-76.
- [11] Maqni F, Sarto C, Ticozzi D, et al. Proteomic knowledge of humanaquaporins [J]. *Proteomics*, 2006, 6(20): 5637-5649.
- [12] Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: Molecular mechanisms for human diseases [J]. *FEBS Lett*, 2003, 555(1): 72-78.
- [13] Verkman AS. More than just water channels: Unexpected cellular roles of aquaporins [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(15): 3225-3232.
- [14] Hwang I, Jung SI, Hwang EC, et al. Expression and localization of aquaporins in benign prostate hyperplasia and prostate cancer [J]. *Chonnam Med J*, 2012, 48(3): 174-178.
- [15] Ishimoto S, Wada K, Usami Y, et al. Differential expression of aquaporin 5 and aquaporin 3 in squamous cell carcinoma and adenoid cystic carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 67-75.
- [16] 张洪志, 周士福, 康厚纯, 等. 水通道蛋白 5 在人大肠癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *苏州大学学报: 医学版*, 2009, 29(5): 945-947.
- [17] 肖广发, 汤恢焕, 李宜雄. AQP-1 和 AQP-5 在结直肠癌中的表达及其临床意义 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(2): 186-187.
- [18] Fong MY, Farghaly H, Kakar SS, et al. Tumorigenic potential of pituitary tumor transforming gene (PTTG) *in vivo* investigated using a transgenic mouse model, and effects of cross breeding with p53 (+/-) transgenic mice [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 532-545.
- [19] Yoshida M, Katsuda S, Maekawa A. Involvements of estrogen receptor, proliferating cell nuclear antigen and p53 in endometrial adenocarcinoma development in donryu rats [J]. *J Toxicol Pathol*, 2012, 25(4): 241-247.
- [20] Spina A, Sorvillo L, Di Maiolo F, et al. Inorganic phosphate enhances sensitivity of human osteosarcoma U2OS cells to doxorubicin via a p53-dependent pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228 (1): 198-206.
- [21] Waterston AM, Cassidy J. Adjuvant treatment strategies for early colon cancer [J]. *Drugs*, 2005, 65(14): 1935-1947.
- [收稿日期] 2013-02-28 [修回日期] 2013-05-03
[本文编辑] 周玲琳

· 科技动态 ·

Trex1 通过调控溶酶体诱导干扰素非依赖性抗病毒基因的活化

病毒感染机体后,病毒核酸作为主要的病原体相关分子模式,可被 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)以及相关的 DNA sensor、RNA sensor 识别,通过下游接头分子 TANK 结合激酶 1(TANK-binding kinase 1, TBK1)及干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)促进 I 型干扰素的产生。I 型干扰素结合干扰素受体,通过 *JAK/STAT* 通路,诱导干扰素刺激基因(interferon-stimulated gene, ISG)活化,从而发挥抗病毒作用。但是 ISG 也可通过干扰素非依赖途径被直接活化,例如 MAVS 通过干扰素非依赖途径直接活化 ISG,发挥短暂、快速抗病毒作用,而对于通过胞质 DNA 诱导的干扰素非依赖 ISG 的活化,目前还没有相关报道。

Trex1 是一种定位于胞浆的核酸外切酶,可以对胞浆中的双链 DNA 进行剪切。Trex1 对机体自身 DNA 进行剪切,可以避免自身免疫性疾病的发生。如在 Aicardi-Goutières 综合征(Aicardi-Goutières syndrome, AGS)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)中均发现 Trex1 的功能异常或突变;Trex1 对病毒来源 DNA 进行剪切则可抑制机体对病毒的免疫反应,在人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的免疫逃逸中发挥重要作用。

论文作者阐述了在 Trex1 缺失的细胞中,一方面,溶酶体活性相关转录因子(transcription factor EB, TFEB)的负向调控因子 mTORC1 活性减弱,解除了其对 TFEB 胞浆定位的限制,使 TFEB 定位于细胞核,从而促进基因转录,增加溶酶体的生物学活性;另一方面,Trex1 通过未知的 DNA sensor 识别胞浆中的病毒 DNA,进而通过下游接头分子 STING,活化激酶 TBK1、IRF3 和 IRF7,直接转录活化 ISG,从而抵抗多种 RNA 病毒的感染,发挥抗病毒功能。

该研究将溶酶体生物学活性和胞质病毒 DNA 诱导的干扰素非依赖性 ISG 活化联系起来,并且在临床病例 AGS 患者中发现了 Trex1 失活突变株,为今后的临床治疗提供了新的方向和理论依据。

[李霞 摘译, 张迁 审阅. Hasan M, Koch J, Rakheja D, et al. *Nat Immunol*, 2012, 14(1): 61-71.]