

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.21.005

文章编号: 1005-8982(2019)21-0029-04

水通道蛋白1和肿瘤坏死因子受体相关蛋白1 在人脑胶质瘤中的表达及相关性*

卢家潮, 寿记新, 王冰冰, 高海东

(郑州大学第五附属医院 神经外科, 河南 郑州 450052)

摘要: **目的** 研究水通道蛋白1(AQP1)和肿瘤坏死因子受体相关蛋白1(TRAP1)在脑胶质瘤中的表达及其之间的相关性。**方法** 选取66例人脑胶质瘤和15例正常脑组织标本,经Western blotting及逆转录聚合酶反应(RT-PCR)对其AQP1、TRAP1 mRNA及蛋白表达进行检测分析。**结果** ①在人脑胶质瘤中AQP1、TRAP1 mRNA及蛋白表达水平较对照组上调($P < 0.05$);②在高级别胶质瘤(Ⅲ、Ⅳ级)中AQP1、TRAP1 mRNA及蛋白表达与低级别胶质瘤(Ⅰ、Ⅱ级)比较,前者表达水平上调($P < 0.05$);③AQP1、TRAP1 mRNA及蛋白在脑胶质瘤的表达无相关性($r_s = 0.074$ 和 0.058 , $P = 0.065$ 和 0.080)。**结论** AQP1和TRAP1表达与脑胶质瘤的肿瘤分期有关,恶性程度越高其表达量也越高,但两者与脑胶质瘤的病理进展无协同性。

关键词: 神经胶质瘤;水通道蛋白1;肿瘤坏死因子受体相关蛋白1

中图分类号: R739.41

文献标识码: A

Expression and correlation of AQP1 and TRAP1 in human glioma*

Jia-chao Lu, Ji-xin Shou, Bing-bing Wang, Hai-dong Gao

(Neurosurgery, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation and expression of aquaporin 1 (AQP1) and tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in human gliomas. **Methods** The expression of AQP1 and TRAP1 mRNA and protein were detected by Western blotting and reverse transcription-polymerase reaction (RT-PCR) in 66 human glioma specimens and 15 normal brain specimens. **Results** ① Compared with the control group, the mRNA and protein expression of AQP1 and TRAP1 in human gliomas were increased ($P < 0.05$); ② Compared with low-grade glioma (Grade II), the expression of mRNA and protein of AQP1 and TRAP1 in high-grade gliomas (III-IV) increased ($P < 0.05$); ③ There was no correlation between the expression of mRNA or protein of AQP1 and TRAP1 in glioma tissues ($r = 0.074$ and 0.058 , $P = 0.065$ and 0.080). **Conclusions** The expression of mRNA and protein of AQP1 and TRAP1 are closely related to the pathological grade of glioma. Higher the degree of malignancy is, more significant the mRNA and protein are; the expressions of AQP1 and TRAP1 have no correlation with the pathological development of glioma.

Keywords: glioma; aquaporin 1; TNF receptor-associated protein 1

脑胶质瘤又称胶质细胞瘤或神经胶质瘤,其发病率在中枢神经系统肿瘤中居首位,且其恶性程度也高

于其他颅内肿瘤,治疗时间长、过程非常复杂、预后差,对人类生命健康造成巨大危害^[1]。水通道蛋白1

收稿日期: 2019-05-22

* 基金项目: 河南省科技厅项目 (No: 102300410065)

[通信作者] 寿记新, E-mail: zdwfy9666@163.com

(Aquaporin-1, AQP1) 作为一种镶嵌在细胞膜又极其保守的蛋白, 具有自身的跨膜转运功能, 转运分子大小为 28 kD, 基因定位于人染色体 7p14^[2]。AQP1 主要定位于中枢神经系统脑室脉络丛上皮细胞, 发挥维持水通道及离子通道 (c-GMP) 平衡的双重效应, 与脑脊液生成、分泌有关^[3]。研究表明^[4-5], AQP1 在间变性星形胶质细胞瘤和肿瘤供血血管内皮细胞表达上调, AQP1 mRNA 及蛋白表达随肿瘤恶性程度增加而升高。肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1) 也称 HSP75, 是线粒体热休克蛋白 90 (HSP90) 的主要成员。稳定的 TRAP1 蛋白由 645 个氨基酸脱水缩合而成, 并且拥有 1 个三磷酸腺苷匹配区域, 在该区域三磷酸腺苷以独特的构象与 γ 磷酸基团进行匹配, 从而发挥作用^[6]。在胶质瘤, 线粒体作为肿瘤细胞的能量代谢中心, TRAP1 的高表达能改变线粒体的某些融合/分裂相关蛋白的表达, 使肿瘤细胞处于高能量代谢状态^[7-8]。国外学者研究分析发现 TRAP1 的表达与肿瘤直径的大小、恶性程度的高低及有无转移等密切相关, 即肿瘤直径越大、恶性程度越高伴随远处转移者 TRAP1 处于高表达状态, 同时发现 TRAP1 过度表达增加神经胶质瘤患者死亡风险^[9]。但 AQP1 与 TRAP1 在脑胶质瘤的表达水平及其相关性的研究, 目前鲜有报道, 本文旨在研究两者在脑胶质瘤中的表达及其相关性, 为实验及临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2014 年 3 月—2017 年 12 月在郑州大学第五附属医院神经外科病区的住院患者 66 例, 根据术前患者临床表现及影像学资料, 术后病理切片确诊为脑胶质瘤。全部标本均为第 1 次手术切除, 且术前从未进行过任何放化疗及免疫疗法等治疗。其中, 男性 38 例, 女性 28 例; 年龄 21 ~ 65 岁, 平均 53.7 岁; 根据《WHO 中枢神经系统肿瘤组织学分类》(2007), 将 66 例患者分为低级别组 (I、II 级) (A 组) 35 例和高级别组 (III、IV 级) (B 组) 31 例。另采集同期 15 例行第三脑室底造瘘术及大脑内减压术患者的正常脑组织作为对照组。所有获取的标本在实验前由家属签署知情同意书并得到本院医学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

AQP1、TRAP1 抗人单克隆抗体均购自上海优宁维生物科技股份有限公司, SP 试剂盒、DAB 显色剂

均购自上海哈灵生物科技有限公司, 总 RNA 提取试剂购自上海富衡生物科技有限公司。RNA 纯度经微量紫外分光光度计检测, A260/A280 在 1.6 ~ 1.8 之间, 满足实验要求。AQP1、TRAP1、 β -actin 基因引物序列由 Primer Premier 6.0 软件设计, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物序列: AQP1 正向 5'-CGGATCCATGGCCAGCGAGTTCAAGAAG-3', 反向 5'-GCTCTAGATTTGGGCTTCATCTCCACCCTG-3'; TRAP1 正向 5'-TTAGTAACATATGGCGCGGAGCTGCCG-3', 反向 5'-TTCCTCGAGTTAGTGTCGCTCCAGGCCTT-3'; β -actin 正向 5'-CGAGCTGGACATCCGCAAAT-3', 反向 5'-GTGGCAGGTGGACAGCGAGC-3。

1.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 AQP-1 与 TRAP1 mRNA 的表达

cDNA 4 μ l, dNTP Mixture (2 mmol/L) 20 μ l, 引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ l, 10 \times Taq Buffer 5 μ l, Taq 酶 1.5 μ l, dH₂O 30.5 μ l, 总容量 65 μ l。AQP1: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 92 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 57.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 共 35 个循环, 70 $^{\circ}$ C 最后延伸 14 min。TRAP1 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 56.8 $^{\circ}$ C 退火 33 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 12 min。将 RT-PCR 反应产物与 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 电压稳定在 85 V 电泳约 52 min, 接着对电泳结果进行拍照保存, 再经美国 Eagle EYE II 型凝胶图像软件处理系统, 用 (目的基因的吸光度值) / (β -actin 吸光度值) 代表目的基因的相对表达含量。

1.4 Western blotting 检测 AQP-1 与 TRAP1 蛋白的表达

提取少量组织标本尽量碾碎后放进预冷的含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液, 按每孔约 80 μ l 加入 6 孔板, 放置冰上 50 min 后吸取裂解液, 温度 4 $^{\circ}$ C 下将裂解液以 14 000 r/min 离心 35 min 后取上清液, BCA 蛋白检测方法进行蛋白定量。AQP1、TRAP1 分别于 10% 及 7% SDS-PAGE 分离, 采用半干法转至 PVDF, 常温下用 8% 的脱脂牛奶隔离 1 h, 分别加入一抗: 小鼠抗人 AQP1、TRAP1 抗体 (Abcam 公司), 工作浓度均为 1 : 1 000。二抗: HRP 结合的抗小鼠 IgG 抗体 (Zymed Laboratories Inc, 美国), 工作浓度 1 : 2 000。ECL 化学发光转至 X 射线胶片。采用美国 Eagle EYE II 型凝胶图像软件处理系统测定目标蛋白和标准对照的吸光度, 并以 (目标蛋白吸光度值) / (标准对照吸光度值) 作为目标蛋白半定量相对值。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, 相关性采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 AQP1 mRNA 及蛋白的表达情况

3 组 AQP1 mRNA 及蛋白表达的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, A 组、B 组 AQP1 mRNA 和蛋白表达较对照组上调 ($P < 0.05$), B 组 AQP1 mRNA 和蛋白表达较 A 组上调 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1、2。

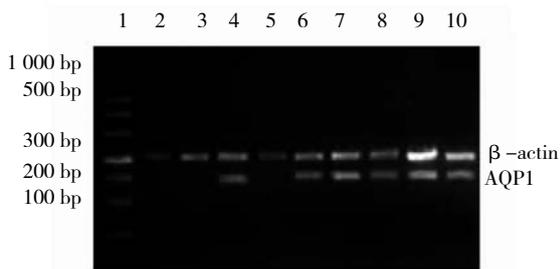
2.2 3 组 TRAP1 mRNA 及蛋白的表达情况

3 组 TRAP1 mRNA 及蛋白表达的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较,

表 1 各组 AQP1 mRNA 及蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AQP1 mRNA	AQP1 蛋白
对照组	15	0.336 ± 0.016	0.221 ± 0.011
A 组	35	0.456 ± 0.019 ^①	0.460 ± 0.022 ^①
B 组	31	0.783 ± 0.021 ^{①②}	0.799 ± 0.020 ^{①②}
<i>F</i> 值		11.356	10.298
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 A 组比较, $P < 0.05$ 。



1: Marker; 2 ~ 5: 低级别组 (A 组); 6 ~ 9: 高级别组 (B 组); 10: 对照组。

图 1 AQP1 mRNA 表达



图 2 AQP1 蛋白表达

A 组、B 组 TRAP1 mRNA 和蛋白表达较对照组上调 ($P < 0.05$), B 组 TRAP1 mRNA 和蛋白表达较 A 组上调 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 3、4。

2.3 AQP1 与 TRAP1 表达的相关性

随着 AQP1 mRNA 及蛋白表达的增多, TRAP1 表达也有逐渐增多的倾向, Spearman 相关分析显示 AQP1 mRNA 及蛋白表达和 TRAP1 mRNA 及蛋白表达无相关性 ($r_s = 0.074$ 和 0.058 , $P = 0.065$ 和 0.080)。

表 2 3 组 TRAP1 mRNA 及蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TRAP1 mRNA	TRAP1 蛋白
对照组	15	0.175 ± 0.021	0.204 ± 0.049
A 组	35	0.464 ± 0.039 ^①	0.457 ± 0.023 ^①
B 组	31	0.839 ± 0.029 ^{①②}	0.770 ± 0.035 ^{①②}
<i>F</i> 值		7.255	7.707
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 A 组比较, $P < 0.05$ 。



1: Marker; 2 ~ 5: 低级别组 (A 组); 6 ~ 9: 高级别组 (B 组); 10: 对照组。

图 3 TRAP1 mRNA 表达

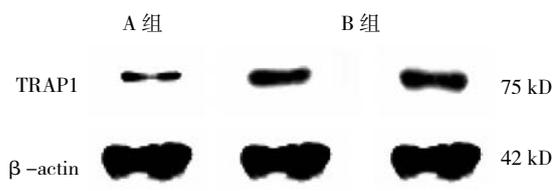


图 4 TRAP1 蛋白表达

3 讨论

目前, 在中枢神经系统原发性脑胶质瘤之所以难根治, 根本原因是该类肿瘤拥有非常丰富的血供及具有高度侵袭的特性^[10], 在中枢神经系统, AQP1 mRNA 及蛋白表达主要在侧脑室及第四脑室脉络组织上, 已有学者研究证实, AQP1 mRNA 及蛋白表达与 Na⁺-K⁺-ATP 酶定位一致, 集中在于朝向脑脊液的顶质膜的

微绒毛的表面,据推测,这可能与脑脊液生成和分泌有关,并参与水和离子平衡调节^[11],本研究发现,AQP1在原发胶质瘤(低度恶性与高度恶性)中普遍表达,而恶性程度不同的胶质瘤 AQP1 表达的特点不同,肿瘤内部 AQP1 的表达高于瘤周组织或者正常组织,说明 AQP1 的表达与原发胶质瘤的肿瘤特性有关,这与 EL HINDY 等^[12]在 AQP1 与人类星形细胞瘤血管生成的相关性标本中观察到的结果类似。而 AQP1 在胶质瘤新生血管中的普遍表达则提示 AQP1 的作用可能与胶质瘤的异常增殖和侵袭性生长有内在联系。有文章报道^[13],TRAP1 在细胞运动调控中具有双重作用,在抑制 TRAP1 活性而激活细胞运动,即有大量的能量来源时可能会降低细胞的最大迁移潜能,靶向 TRAP1 治疗可以选择性地增强抗转移治疗的疗效。WU 等^[14]通过实验证实,胶质母细胞瘤组织 TRAP1 表达水平高于正常脑组织,使用药物干扰 TRAP1 转录与翻译过程,可诱导细胞核分裂期(G₂/M 期)阻滞,导致 PKB 磷酸化活性降低,诱导有丝分裂失败,降低肿瘤细胞增殖和迁移。本实验结果显示,A、B 组较对照组 AQP1、TRAP1 mRNA 及蛋白表达强度上调,说明 AQP1、TRAP1 与胶质瘤的发生与病理等均有密切关系;且 AQP1 与 TRAP1 的 mRNA 和蛋白表达强度与胶质瘤的肿瘤分期具有一致性,即随着肿瘤病理级别增加,AQP1、TRAP1 表达强度依次增强。但经 Spearman 相关分析后显示 AQP1 mRNA 及蛋白表达与 TRAP1 mRNA 及蛋白表达无相关性。

综上所述,AQP1、TRAP1 与人脑胶质瘤发病和进展关系密切,而两者对胶质瘤的病理进展无协同作用。虽然该研究为深入研究胶质瘤的分子发病机制积累一定的实验基础,但要更深层次地认识胶质瘤仍需大样本对比分析。

参 考 文 献:

- [1] 赵建辉,胡世颖,李兵,等.胶质瘤临床诊疗研究进展[J].中华神经外科疾病研究杂志,2017,16(4): 374-377.
- [2] 何佳,李文良,谷峰,等.水通道蛋白 1 与胶质瘤的最新研究进展[J].中国肿瘤临床,2014,41(5): 341-344.
- [3] GUAN Y, CHEN J, ZHAN Y, et al. Effects of dexamethasone on C6 cell proliferation, migration and invasion through the upregulation of AQP1[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7595-7602.
- [4] NOEL S, FALLIER-BECKER P, MACK A F, et al. Water channels aquaporin 4 and -1 expression in subependymoma depends on the localization of the tumors[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131367.
- [5] YANG W Y, TAN Z F, DONG D W, et al. Association of aquaporin-1 with tumor migration, invasion and vasculogenic mimicry in glioblastoma multiforme[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3206-3211.
- [6] 沈培亮,刘兆国,孙丽华,等.肿瘤治疗新靶点 TRAP1 研究进展[J].中国药理学通报,2016,32(4): 459-463.
- [7] CHAE Y C, CAINO M C, LISANTI S, et al. Control of tumor bioenergetics and survival stress signaling by mitochondrial HSP90s[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(3): 331-344.
- [8] 袁萌,等. TRAP1 与恶性肿瘤的关系及研究进展[J].实用肿瘤学杂志,2017,31(4): 371-375.
- [9] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, LIAO P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(5): v1-v88.
- [10] 高海东,寿记新,付旭东,等. ICAM-1、MMP-2 在人脑胶质瘤的表达及相关性研究[J].中华神经医学杂志,2015,14(7): 674-677.
- [11] 李香营,韩向君,鲁宏,等. AQP1 调节机制及其表达在胶质瘤浸润中作用的研究进展[J].国际医学放射学杂志,2010,33(2): 144-147.
- [12] EL HINDY N, BANKFALVI A, HERRING A, et al. Correlation of aquaporin-1 water channel protein expression with tumor angiogenesis in human astrocytoma[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(2): 609-613.
- [13] AGLIARULO I, MATASSA D S, AMOROSO M R, et al. TRAP1 controls cell migration of cancer cells in metabolic stress conditions: correlations with AKT/p70S6K pathways[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(10 Pt A): 2570-2579.
- [14] WU J, LIU Y, CHO K, et al. Downregulation of TRAP1 sensitizes glioblastoma cells to temozolomide chemotherapy through regulating metabolic reprogramming[J]. *Neuroreport*, 2016, 27(3): 136-144.

(王荣兵 编辑)