基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0512-03

AQP8 在正常人绒毛滋养层细胞与绒癌 JAR 细胞株中的表达

王 莉,张建华,张 华,王思义
(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 AQP8 在正常人绒毛滋养细胞和绒癌 JAR 细胞株中的表达差异,及其表达改变与绒癌发生的关系。方法:正常人绒毛滋养细胞(正常组)的原代培养、纯化及鉴定;人绒癌 JAR 细胞株(绒癌组)的培养。以免疫组织化学法、免疫荧光激光共聚焦和 RT-PCR 技术检测 AQP8 蛋白和 AQP8 mRNA 在正常人绒毛滋养细胞和绒癌 JAR 细胞株细胞膜上的表达。结果:(1)应用免疫组化方法,在正常组中,仅能从显微镜中肉眼看到 AQP8 的极低表达,摄影效果不佳,而在绒癌组中 AQP8 的阳性细胞率为 93.27% ± 14.45%,远高于正常组。(2)应用免疫荧光染色后行激光共聚焦成像技术发现,在相同的条件及激发强度下,可见 AQP8 在绒癌组呈绿色阳性表达,而在正常组中未见绿光,但当加强激发强度后,仍可探及 AQP8 在正常组的表达。(3)应用 RT-PCR 技术,在正常组与绒癌组中,均检测到 AQP8 mRNA 的表达。绒癌组 AQP8 的 OD 值(0.98 ± 0.35)明显高于正常组 AQP8 的 OD 值(0.32 ± 0.04)($P<0.05$)。结论:AQP8 表达异常上调,滋养细胞内、外水、电解质平衡将被破坏,可能是导致绒癌发生的原因之一。

【关键词】AQP8;正常人绒毛滋养细胞;绒癌
【中国图书分类法分类号】R711.74 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-18

Expression of AQP8 in cultured normal humantrophocyte and JAR cell line

WANG Li, et al
(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the different expression of AQP8 in cultured normal human trophocyte and JAR cell line, and the relationship between the changed expression of the channel protein and nosogenesis of chorionic carcinoma. *Methods*: The human cultured normal trophocyte was primarily cultured, purified and identified. JAR cell line was cultured. The expression of AQP8 was detected in cultured normal human trophocyte and JAR cell line by immunohistochemistry immunofluorescence confocal laser and RT-PCR. *Results*: (1)In the control group, the limitied expression of AQP8 was observed in cultured normal human trophocyte and JAR cell line, but in the exprimental group, the rate of positive cell of AQP8 in JAR cell line were 93.27% ± 14.45%, much higher than that in the control group. (2)By immunofluorescence staining confocal laser imaging, it was revealed that, in the same condition and excitation intensity, AQP8 in the JAR choriocarcinoma cell lines showed positive expression of the green, while in normal trophoblast cells, no green light, but when the excitation intensity was strengthened, it may still explore AQP8 in normal human villous trophoblast cell expression. (3)The expression of AQP8mRNA was detected in both cultured normal human trophocyte and JAR cell line. The OD value (0.98 ± 0.35) of AQP8 in the experimental group was significantly higher than that (0.32 ± 0.04) in the control group. *Conclusion*: Abnormal overexpression of AQP8 will destroy the external water and electrolyte balance of trophoblast cells, which might be one of the reasons for the occurrence of choriocarcinoma.

【Key words】AQP8; Normal humantrophocyte; Choriocarcinoma

良性滋养细胞的恶性转化是一个多步骤的复杂过程。正常妊娠时,滋养细胞的增殖、侵袭能力对妊娠的维持起着关键作用,但其侵袭过程受到严格时序调控,一旦该调控发生紊乱导致异常范围的侵袭,即"过度侵袭",即可能导致潜在恶性变化或恶性病变的发生。绒癌是一种源于胎盘绒毛滋养细胞的高度恶性肿瘤,与妊娠有关,多发生于年轻育龄妇女。绒癌滋养细胞仍保持着其先祖细胞—妊娠滋养细胞侵蚀组织、血管的特性,因此绒癌易在病程早期发生血行播散,如不及时诊断及治疗常可导致患者死亡。迄今为止,有关绒癌的发生原因尚不十分清楚。

AQP8 作为一种多功能嵌膜蛋白,对维持细胞内外离子平衡和最适 pH 内环境起重要作用。而细胞内 pH 值与细胞

作者介绍:王 莉(1982-),女,硕士,
研究方向:围产医学。
通信作者:张 华,女,副教授,E-mail: h2844@sohu.com。
基金项目:重庆市自然科学基金(编号:2004-5480)。

生物学行为(如细胞的新陈代谢、凋亡、恶变)密切相关[1]。目前有研究发现[2,3]AQP8 在人早孕绒毛滋养细胞膜上有表达。那么是否由于滋养细胞上这种膜蛋白的表达改变造成水及电解质转运异常,最终导致绒癌的发生呢?本文通过对 AQP8 在人正常绒毛细胞和绒癌 JAR 细胞株中的表达进行对比研究,探讨这种通道蛋白的表达改变与绒癌发生的关系。

1 材料与方法

1.1 标本与试剂

1.1.1 标本的收集 收集正常意外妊娠(6~8 周)行人工流产术终止妊娠者的绒毛组织,所有患者年龄 20~35 岁,无阴道炎等妇科炎症,术前未用药物治疗。另于中国科学院上海细胞所细胞库购得人绒癌 JAR 细胞株。

1.1.2 试剂 DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品; 胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)为杭州四季青公司产品;胰蛋白酶为 GIBCO 公司产品;*DNase* Ⅰ为华美生物工程有限公司产品;Percoll 细胞分离液为 Pharmacia 公司产品;小鼠抗人细胞角蛋白(CK7)和波形蛋白(V9)单克隆抗体工作液、免疫组织化学染色超敏试剂盒均为北京中杉生物试剂公司产品;激光共聚焦成像系统为 ZEISS LSM 510 META。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

1.2.1.1 正常人绒毛滋养细胞的原代培养及纯化 在无菌条件下取人正常早孕绒毛,剪碎并尽可能去除肉眼可见的小血管及纤维连接成分。以 0.25%胰蛋白酶液及 20 U/ml *DNase* Ⅰ于 37 ℃恒温摇床内消化 5 min, 消化产物经 100 目不锈钢筛网过滤后,滤液加入预先加有 0.5 ml 小牛血清的 5 ml 离心管内,1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清,DMEM 培养液重悬沉淀,未消化组织重复消化 2 次,收集 3 次细胞悬液,稀释至 1×10^8 个 /ml。取收集的细胞悬液 2 ml 缓慢加于 35%~45%浓度梯度的 Percoll 分离液上层,以 2 500 r/min 离心 20 min,用吸管小心吸取云雾状的中层置于 50 ml 离心管内,DMEM 稀释 4 倍,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,以含 200 ml/L 胎牛血清、100 U/ml 庆大霉素及 25 *mmol/L* HEPES 的高糖型 DMEM 培养液重悬沉淀, 将细胞悬液浓度调整至 $(5\sim6)\times10^5$ 个 /ml,置于培养瓶内,在 37 ℃的 5%CO_2 培育箱内培养 1 h 后,将附壁未牢绒毛膜滋养层细胞换瓶继续培养, 弃去仍附壁的间质细胞。当原代培养的细胞长满瓶壁的 90%左右时可进行传代。于倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况。原代培养的正常人绒毛滋养细胞作为正常组。

1.2.1.2 人绒癌 JAR 细胞株的培养 人绒癌 JAR 细胞株作为绒癌组(购自中国科学院上海细胞库),培养方法见 ATCC 细胞库。

1.2.2 应用免疫组化的方法鉴定[4]原代培养的正常人绒毛膜滋养细胞 取对数生长期的正常人绒毛滋养细胞,消化制成单细胞悬液,接种于预先放置有盖玻片的 24 孔板中,待细胞接近长成单层后, 取出盖玻片,4%多聚甲醛固定 30 min,备用。磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered-saline)洗 5 min,3 次,空气干燥 5 min;3%过氧化氢去离子水孵 20 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性;PBS 洗 5 min,3 次;正常羊血清封闭液 37℃封闭 30 min,滤纸吸去;分别滴加 PBS 稀释(1:50)的角蛋白和波形蛋白一抗,4 ℃过夜;PBS 洗 5 min,3 次;生物素标记的兔抗山羊 IgG 二抗工作液(北京中杉金桥公司)37℃孵育 30 min;辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉卵白素工作液 37℃孵育 20 min;PBS 洗 5 min,3 次;二氨基联苯胺(DAB)显色,镜下观察,5 min 终止显色。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并照相。所有切片由第三者进行编号,由实验者及另外两名经过专业训练的技术人员来观察计数,以避免评分者的主观影响,随机选择 5~10 个高倍视野,记数 1 000 个滋养细胞中的阳性细胞,取其平均数作为阳性细胞表达率。

1.2.3 应用免疫组化的方法检测 AQP8 蛋白在正常组与绒癌组中的定位表达 一抗为山羊抗人 AQP8 多克隆抗体(Santa cruz 公司),其余方法同上。

1.2.4 应用免疫荧光激光共聚焦技术检测 AQP8 在正常组与绒癌组中的表达 取对数生长细胞, 消化制成单细胞悬液,接种于预先放置有盖玻片的 24 孔板中;待细胞接近长成单层后,取出盖玻片,PBS 漂洗 5 min,3 次;4%多聚甲醛 4℃固定 30 min,PBS 漂洗 5 min,3 次; 加入牛封闭血清,37℃孵育 1 h;甩去血清,加入 AQP8 蛋白一抗,湿盒内 4℃孵育 18 h, PBS 漂洗 5 min,3 次; 加入荧光二抗,37℃孵育 1 h,PBS 漂洗 5 min,3 次(避光操作);加入 10 mg/ml DAPI,室温孵育 3 min,PBS 漂洗 5 min,3 次(避光操作);荧光显微镜下观察细胞出现绿色荧光后,立即送至激光共聚焦成像。

1.2.5 应用 RT-PCR 技术检测 AQP8 *mRNA* 在正常组与绒癌组中的表达 自行设计 AQP8 引物:

AQP8:5'-TTCATTGGAGATGGGAAGACC-3',

3'-TTGAGAAGCAAGGAAGTGGC-5',439 bp;

β-action(内参):5'-ATCGTGATGGACTCCGGTGAC-3'

3'-GCTGATCCACATCTGCTGGGA-5',624 bp

引物均由上海生物工程公司合成。当生长于 DMEM 中的人正常绒毛滋养细胞和人绒癌 JAR 细胞株细胞长至汇合度为 70%~80%时, 使用上海华舜生物技术有限公司的细胞总 RNA 抽提试剂盒(W6701)抽提总 RNA,操作按照说明书进行。分别取 1 μl 正常组与绒癌组的总 RNA 进行 RT-PCR(购自 Takara)。AQP8 的 PCR 反应条件为反应体系 50 μl,94℃预变性 3 min 1 个循环;再 94 ℃变性 35 s,57℃退火 40 s,72℃延伸 45 s,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 6 min。反应产物保温于 4℃, 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳 (1 μl/20 ml Goldview 染色,100 V,30 min),紫外观测仪下检查有无特异条带并摄影。电泳结果以 Quantity One(美国 Bio-rad 公司)图象分析系统进行电泳条带光密度分析,计算正常组和绒癌组的产物与 β-actin 内参产物光密度积分的比例,作为正常组与绒癌组中 AQP8 mRNA 的表达水平。

1.3 统计学分析

全部数据资料均以($\bar{x}\pm s$)的形式表示。两组间均数比较采用 t 检验,以 SPSS 11.5 统计软件进行分析,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 正常人绒毛滋养细胞的培养及鉴定

正常人绒毛滋养细胞通过免疫组化 DAB 显色，显示大多数贴壁生长的细胞角蛋白阳性，波形蛋白阴性，角蛋白染色阳性为细胞浆呈清晰棕褐色颗粒（图 1）。阳性细胞数达 90%以上，符合纯度要求，可用于后续实验。

2.2 应用免疫组化，AQP8 蛋白在正常组和绒癌组中的表达

在正常组中，原代培养的正常人绒毛滋养细胞上 AQP8 的表达极低，只能在显微镜中用肉眼看到，以致摄影效果不佳；而在绒癌组中，绒癌 JAR 细胞膜上 AQP8 表达呈强阳性，其阳性细胞率为 93.27%±14.45%，远高于正常组（图 2）。

2.3 应用免疫荧光激光共聚焦技术，AQP8 在正常组与绒癌组中的表达

在相同的条件及激发强度下，可见 AQP8 在绒癌组中呈绿色阳性表达（图 3），其阳性细胞率为 95.17%±12.55%，而在正常组中未见绿光表达（图 4），但当加强激发强度后，可探及 AQP8 在正常组中的表达（图 5）。

2.4 应用 RT-PCR 技术，AQP8 mRNA 在正常组与绒癌组中的表达

在正常组与绒癌组中，均检测到 AQP8 mRNA 的表达。绒癌组 AQP8 的 OD 值为（0.98±0.35）；正常组 AQP8 的 OD 值为（0.32±0.04）。绒癌组 AQP8 的 OD 值明显高于正常组（$P<0.05$）。（图 6）

3 讨 论

正常妊娠时，滋养细胞仅侵及到子宫底蜕膜的致密层，而当高度增生、排列紊乱的恶性滋养细胞广泛侵入子宫肌层和破坏血管时，则形成绒癌[5]。绒癌由合体滋养细胞包绕在细胞滋养细胞周围形成细胞巢，直接浸于母体血液中，与母体进行物质交换，其侵蚀性及破坏性均远比正常滋养细胞强[6]。绒癌的形态学、生长代谢特征及其发病规律提示，绒癌恶性滋养细胞具有强大的维持水、电解质代谢，以满足自身过度增殖及异常迁移的能力；其滋养细胞水、电解质代谢异常可能是其异常增殖和迁移，并最终发展为绒癌的重要原因。

细胞的增殖、迁移与细胞内外水电解质平衡有关。研究显示[7-10]，正常情况下，细胞肿胀（Swelling）可促进细胞增殖，而细胞皱缩（Shrinkage）则抑制其增殖；在细胞体积增大的众多因素中，细胞含水量的增加是其主要因素。AQPs 作为近年来新分离出的一种专一性运输水的通道蛋白，广泛分布于机体组织细胞中，尤其与液体分泌和吸收有关的上皮细胞和内皮细胞含量颇丰，参与水的分泌、吸收及细胞内外水的平衡。

当水分子于细胞膜内外快速转运的同时，与之关联的其他离子转运体必将同时进行频繁的细胞内外离子交换。研究显示[2,3]，在人和羊胎盘滋养细胞膜上均有 AQP8 的表达。其对维持细胞内外离子平衡和最适 pH 内环境有重要的作用，而细胞内 pH 值又与细胞生物学行为（如细胞的新陈代谢、凋亡、恶变）密切相关[1]。

且有研究发现，水分子的转运增加，可延迟肿瘤细胞凋亡，在水分子的快速转运过程中，肿瘤细胞可获得增殖所必需的生长因子及大量营养物质[11]。研究显示[12]，在卵巢颗粒细胞中由于水通道蛋白的大量表达，细胞免于皱缩，降低了组织细胞的凋亡指数，使细胞处于抗凋亡状态。并且，水通道蛋白在肿瘤组织中的表达上调成为清除肿瘤及瘤周组织多余细胞间液的主要通道。

本研究应用免疫组化方法发现，AQP8 在原代培养的正常人绒毛滋养层细胞中的表达极低，仅能用肉眼分辨，摄影效果不佳，为弥补该实验缺陷，我们加以激光共聚焦成像。将



图 1 正常人绒毛滋养细胞角蛋白呈阳性(400×)

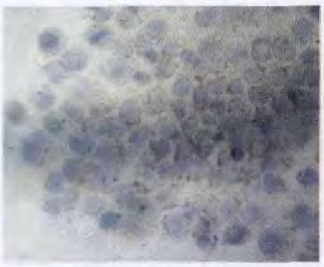


图 2 人绒癌 JAR 细胞膜上 AQP8 表达呈强阳性(400×)



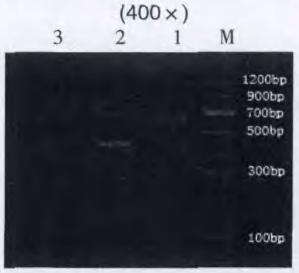
图 3 JAR 细胞 AQP8 激光共聚焦成像(400×)



图 4 滋养细胞 AQP8 激光共聚焦成像(400×)



图 5 增强照射后滋养细胞 AQP8 激光共聚焦成像(400×)



M. DNA marker；1. 内参 β-actin mRNA 的扩增产物；2. 绒癌组中 AQP8mRNA 的扩增产物；3. 正常组中 AQP8mRNA 的扩增产物；

图 6 AQP8mRNA 在正常组和绒癌组中的表达

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0515-04

HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 在喉癌组织中的表达及意义

吕彩凤,江黎珠,陈鸿雁
(重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus,HPV)16/18E(HPV16/18E6),周期素 D1(CyclinD1)、端粒酶逆转录酶(Human telomerase transcriptase,hTERT)在喉癌组织中的表达水平,探讨 HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 与喉癌的关系。方法:收集手术标本的石蜡切片 42 例,用免疫组织化学法检测喉癌组织中 HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 的表达情况。结果:(1)在喉癌组织中,HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 阳性表达率分别为 42.9%(18/42)、50.0%(21/42)、83.3%(35/42),明显高于对照组。(2)在喉癌组织中,HPV16/18E6 和 cyclinD1 阳性表达率随 T 分期的增加及淋巴结转移而升高。hTERT 阳性表达率随 T 分期增加而升高,而与淋巴结转移无关。三者都与年龄及性别无关。(3)HPV16/18E 与 cyclinD1,HPV16/18E 与 hTERT 两者相互间都呈正相关。结论:(1)HPV16/18E6、cyclinD1、hTERT 的高表达可能与喉癌的发生及发展相关。(2)喉癌中 HPV16/18E6 与 cyclinD1,HPV16/18E6 与 hTERT 之间可能存在相互作用,这种相互作用可能导致喉癌的发生,这可能为 HPV16/18 与喉癌发生之间的关系研究提供重要信息。

【关键词】喉癌;HPV16/18E6;CyclinD1;hTERT;免疫组织化学
【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-30

作者介绍:吕彩凤(1979-),女,硕士,
研究方向:头颈部肿瘤。
通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。

AQP8 免疫荧光染色后行激光共聚焦成像发现,AQP8 在绒癌 JAR 细胞株中呈绿色阳性表达,同时以相同的条件及强度激发正常滋养细胞未见绿光,但当加强激发强度时,仍可探及 AQP8 在正常滋养细胞上的表达。该补充实验明确地说明我们免疫组化实验结果的正确性,证明了 AQP8 在正常组及绒癌组的差异表达。应用 RT-PCR 技术,在正常组与绒癌组中均检测到 AQP8 mRNA 的表达,且绒癌组 AQP8 的 OD 值明显高于正常组,与免疫组化、免疫荧光激光共聚焦的实验结果相符。故推测,在正常情况下,少量的 AQP8 能维持滋养细胞内外水分子的交换。而当受到某些刺激后,AQP8 表达异常上调,滋养细胞内、外水、电解质平衡将被破坏,导致细胞内外渗透压及酸碱度的变化,细胞生长行为将随之发生改变,滋养细胞将过度增殖,处于抗凋亡状态,最终导致绒癌发生。但上述推测还需进一步实验证实。

参 考 文 献

[1] Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(24): 11110-11114.

[2] Wang S, Kallichanda N, Song W, et al. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 185(5): 1226-1231.

[3] Liu H, Koukoulas I, Ross MC, et al. Quantitative comparison of placental expression of three aquaporin genes[J]. Placenta, 2004, 25(6): 475-478.

[4] Lee KR, Drury, Vitarbo E, et al. Seizures induced by intracerebral injection of thrombin: a model of intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1997, 87(1): 73.

[5] 丰有吉,沈 铿,主编. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.346-351.

[6] 岳天孚,顾美皎,范郎娣. 滋养细胞疾病病理特征[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 18(8): 452-454.

[7] Lang F, Busch GL, Ritter M, et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms[J]. Physiol Rev, 1998, 78(1): 247-306.

[8] Okada Y, Maeno E, Shimizu T, et al. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) [J]. J Physiol, 2001, 532(Pt 1): 3-16.

[9] Anbari K, Schultz RM. Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rats of protein synthesis in preimplantation mouse embryos in vitro[J]. Mol Reprod Dev, 1993, 35(1): 24-28.

[10] Burg MB. Response of renal inner medullary epithelial cells to osmotic stress[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002, 133(3): 661-666.

[11] 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): C975-985.

[12] Pappas CA, Ullrich N, Sontheimer H. Reduction of glial proliferation by K^+ channel blockers is mediated by changes in PHi [J]. Neuroreport, 1994, 6(1): 193-196.

(责任编辑:关蕴良)