

研究快报

水通道 AQP1 敲除小鼠肿瘤血管生成障碍
及肿瘤生长减缓*

冯学超 高洪文 何成彦 麻彤辉**

(东北师范大学膜通道实验室, 长春 130024)

摘要 血管生成是肿瘤生长、浸润和转移的必要步骤. 肿瘤血管生成涉及瘤旁组织血管内皮细胞增殖、向肿瘤细胞团内迁移以及管腔形成, 目前机理尚不完全清楚. 水通道 AQP1 在多种肿瘤血管内皮高表达, 提示其可能参与肿瘤血管的生成过程. 应用 AQP1 敲除小鼠荷瘤实验证实了 AQP1 在黑色素瘤生长和血管新生中的作用. 结果表明, 皮下接种的黑色素瘤在 AQP1 敲除小鼠的生长较之在野生型小鼠延迟近 30% ($P < 0.01$). 免疫组化与肿瘤病理形态学分析显示, AQP1 在野生型小鼠黑色素瘤血管内皮细胞上高表达, 而在 AQP1 敲除小鼠黑色素瘤血管内皮细胞呈阴性表达. 在病理结构上, 黑色素瘤细胞围绕血管分支呈岛状分布. 野生型小鼠黑色素瘤内血管管腔较细小, 而 AQP1(-/-)小鼠黑色素瘤内血管床显著膨大. AQP1(-/-)小鼠肿瘤内平均微血管密度($47/\text{mm}^2$) 较之 AQP1(+/+)肿瘤 ($142/\text{mm}^2$) 减少 67% ($P < 0.01$). 围绕 AQP1(-/-)肿瘤血管的肿瘤细胞岛周边坏死区域明显大于 AQP1(+/+)肿瘤. 上述结果提出确切证据表明, AQP1 缺失使肿瘤血管生成发生障碍, 从而影响了肿瘤血液供应和肿瘤生长. AQP1 参与肿瘤血管生成的机理值得深入研究.

关键词 水通道 AQP1, 基因敲除, 血管生成, 肿瘤生长

学科分类号 R73

肿瘤血管生成 (angiogenesis) 为肿瘤提供充分的营养供应, 是原发肿瘤进一步生长和浸润的必要条件, 同时也是肿瘤细胞向远处组织转移的必要途径^[1,2]. 肿瘤血管生成是一个复杂的过程, 涉及瘤旁组织血管内皮细胞在肿瘤细胞分泌的各种生长因子刺激下发生增殖、向肿瘤细胞团内迁移以及管腔形成, 目前机理尚不完全清楚.

水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 是一族广泛表达于上皮和内皮细胞膜上、选择性高效转运水分子的特异孔道, 目前在哺乳类已发现至少 12 个成员^[3]. 小鼠基因敲除与人类基因突变研究表明, AQP 家族在多种组织的液体转运生理和病理中发挥重要作用^[3,4]. 水通道 AQP1 在肺毛细血管、肾脏直小血管、以及腹膜毛细血管等内皮细胞高表达并在渗透压驱动的跨内皮水转运中发挥重要作用^[5]. 新近的一些研究表明, AQP1 在多种肿瘤血管内皮高表达, 提示其可能参与肿瘤血管的生成过程并有可能影响肿瘤生长^[6-10]. 本文应用 AQP1 敲除小鼠荷瘤实验研究了水通道 AQP1 在黑色素瘤血管生成和肿瘤生长中的作用.

1 材料与方法

1.1 材料

AQP1 敲除小鼠由作者在美国加州大学旧金山分校 (UCSF) 制作, 详见参考文献[11]. AQP1 敲除突变经 7 次回交已转入 C57BL6/J 纯系小鼠. 黑色素瘤细胞系 B16F10 (来源于 C57BL6 小鼠) 由 UCSF 医学院 Alan Verkman 教授惠赠. 亲和纯化的兔抗大鼠 AQP1 抗体和小鼠 CD31 单克隆抗体购于美国 Chemicon 公司. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 二抗购于美国 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 黑色素瘤细胞的培养与小鼠皮下接种. 黑色素瘤细胞系 B16F10 的培养应用含 10% 胎牛血清的 MEM Eagles 培养基, 补充 2 mmol/L 谷氨酰胺和

*国家杰出青年科学基金项目 (30325011), 吉林省杰出青年科学基金项目 (20030112) 和教育部青年骨干教师资助计划项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0431-5099170, E-mail: math108@nenu.edu.cn

收稿日期: 2005-01-25, 接受日期: 2005-03-15

2 g/L 葡萄糖. B16F10 细胞呈贴壁生长, 增殖迅速. 接种时, 将胰酶消化后的单细胞悬液按每只小鼠 20×10^4 个细胞 (体积 0.1 ml) 用胰岛素注射器注入小鼠背部皮下.

1.2.2 肿瘤标本处理与免疫组化. 皮下接种 12 天后, 用苯巴比妥将野生型和 AQP1 敲除荷瘤小鼠麻醉, 仔细剥离整个肿瘤. 照相、称重后放入含 10% 福尔马林的磷酸缓冲溶液中固定. 经 30% 蔗糖溶液脱水后进行石蜡包埋. 按常规方法制备 $3 \mu\text{m}$ 切片, 脱蜡后进行免疫染色. 免疫过氧化物酶染色基本按文献[12]方法进行.

1.2.3 肿瘤组织微血管密度 (MVD) 测定. 用小鼠 CD31 单克隆抗体对 AQP1(+/+) 和 AQP1(-/-) 小鼠的肿瘤切片进行免疫过氧化物酶染色. 利用计算机图像处理系统 (Image-Pro plus 4.5, 美国 Media Cybernetics 公司) 进行肿瘤组织切片中 CD31 染色

微血管计数和 MVD 值测定. 显微镜系统为 Olympus AX 70. 每一肿瘤切片划 6 个区, 选各区中央镜下视野, 计算肿瘤的 MVD 值 (数据分布范围、平均值及标准差).

2 结 果

2.1 AQP1 敲除小鼠肿瘤生长显著延迟

为避免抗肿瘤免疫反应带来的影响, 原在 CD1 远系繁殖小鼠中的 AQP1 敲除突变经 7 次回交转入 C57BL/6/J 纯系小鼠. 给小鼠皮下接种 12 天后手术切除的黑色素瘤瘤体见图 1a. 可见 AQP1 敲除小鼠皮下生长的瘤体普遍小于野生型小鼠皮下生长的瘤体. 平均肿瘤重量 (图 1b) 以及经体重标准化的肿瘤重量 (图 1c) 均显示, 肿瘤在 AQP1 敲除小鼠的生长较之在野生型小鼠延迟将近 30%, 统计学差异显著 ($P < 0.01$).

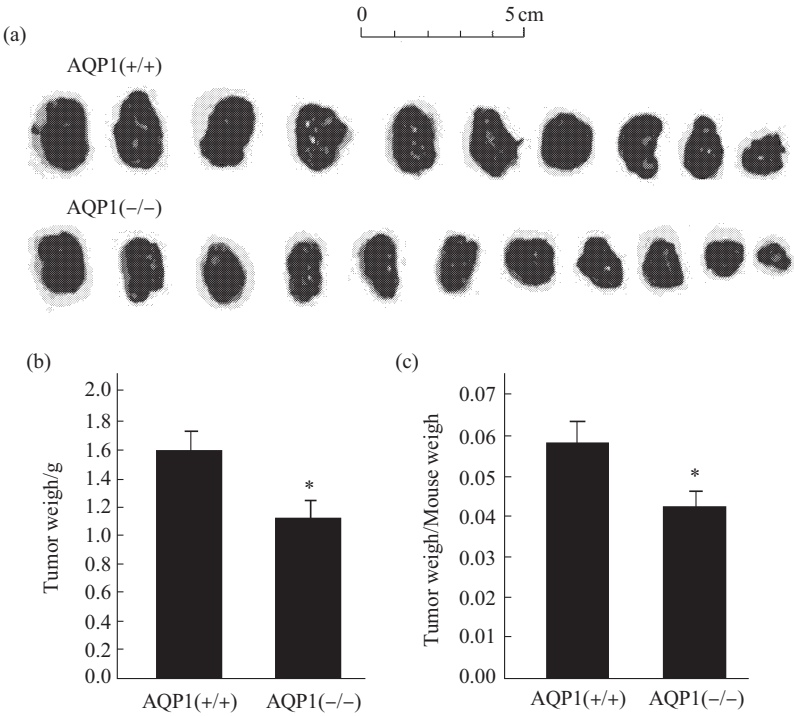


Fig.1 Tumor growth in AQP1 knockout vs wildtype mice
(a) representative melanomas removed from AQP1 -/- and +/+ mice showing generally smaller tumor size in knockout mice. (b) mass of tumors from AQP1 -/- and +/+ mice. $\bar{x} \pm s$, $n = 11$, $P < 0.01$. (c) tumor mass in (b) normalized by mouse body weight. $\bar{x} \pm s$, $P < 0.01$.

2.2 AQP1 敲除小鼠肿瘤血管生成障碍

肿瘤组织 AQP1 免疫过氧化物酶染色与肿瘤病理结构特点见图 2. AQP1 在野生型小鼠黑色素瘤血管内皮细胞上高表达, 而在 AQP1 敲除小鼠肿瘤血管内皮细胞呈阴性表达. 在病理结构上, 黑色素瘤

细胞围绕血管分支呈岛状分布. 野生型小鼠黑色素瘤内血管管腔较细小, 而 AQP1(-/-) 小鼠黑色素瘤内血管管腔膨大. 围绕 AQP1(-/-) 肿瘤血管的肿瘤细胞岛周边坏死区域明显大于 AQP1(+/-) 肿瘤. 肿瘤血管密度测定结果见表 1, AQP1(-/-) 小鼠肿瘤

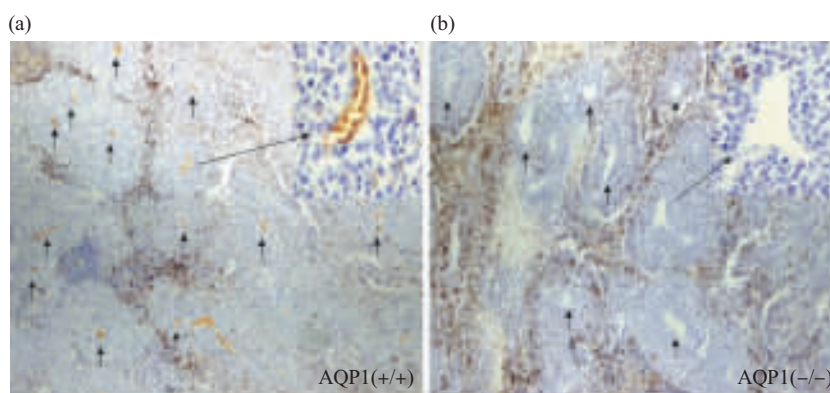


Fig.2 Immunohistochemistry and morphology of melanomas grown in AQP1 (+/+) and (-/-) mice
(a) AQP1(+/+); (b) AQP1(-/-). Representative sections among 10 AQP1(+/-) tumors and 11 AQP1(-/-) tumors are shown. Immunoperoxidase was performed using rabbit antihuman AQP1 antibody at 1:1000 dilution. The sections were counterstained by hematoxylin after immunostaining procedure. Both sections were stained with AQP1 antibody. Arrows indicate tumor blood vessels. Inset in AQP1 (+/+) tumor showing a selected blood vessel positively stained with AQP1 antibody. Inset in AQP1(-/-) tumor showing a enlarged blood vessel negatively stained with AQP1 antibody.

内平均微血管密度 ($47/\text{mm}^2$) 较之 AQP1(+/-)肿瘤内平均微血管密度 ($142/\text{mm}^2$) 减少 67%，差异高度显著。

Table 1 Microvessel density (MVD) of tumor tissues from AQP1 (+/+) and AQP1 (-/-) mice

Tumor	n	Field measured	MVD/ mm^{-2}		
			Range	$\bar{x}$	s
AQP1(+/-)	10	60	82~194	142	22.6
AQP1(-/-)	11	60	22~76	47*	7.2

* $P < 0.01$ compared to the MVD of AQP1(+/-) tumor.

3 讨 论

本文提供确切证据表明，AQP1 缺失使肿瘤血管生成发生障碍，从而影响了肿瘤血液供应和肿瘤生长。根据以往报道，AQP1 在乳腺癌、神经母细胞瘤、肺癌以及骨髓瘤等肿瘤血管内皮的表达是一普遍现象^[6-11]，似乎与肿瘤类型和肿瘤周围组织血管是否表达 AQP1 无关，强烈提示 AQP1 可能在肿瘤血管生成中发挥重要作用。李学军等^[13,14]应用小鼠 Lewis 肺癌模型研究了乙酰唑胺和 topiramate 对小鼠肺和肿瘤血管内皮 AQP1 表达的调节作用以及对肿瘤转移的影响。发现 AQP1 表达的下调与原位肿瘤的抑制及转移癌灶的减少相一致，进一步支持 AQP1 参与肿瘤血管生成并影响肿瘤生长。

本文结果显示 AQP1 敲除小鼠黑色素瘤内血管

与野生鼠肿瘤相比密度显著降低，管腔膨大，表明其肿瘤血管生成发生障碍。在 AQP1 敲除小鼠肿瘤组织中，围绕血管的肿瘤细胞岛周边坏死明显，提示血管壁结构异常可能造成营养物质和氧向深层肿瘤组织输送不足和 / 或代谢废物排除障碍。此外，AQP1 敲除可能造成肿瘤血管内皮两侧液体转运失衡，引起肿瘤组织间液压力和组分发生变化，间接影响肿瘤细胞生长。

AQP1 参与肿瘤血管生成的机理尚不清楚。血管内皮细胞的增殖和迁移是肿瘤血管生成的关键。与细胞膜水和离子转运相关的内皮细胞体积调控，可能在肿瘤血管生成过程中参与内皮细胞的增殖与迁移行为。AQP1 缺失究竟影响了内皮细胞的增殖抑或迁移及其细胞和分子水平上的机理值得深入研究。

参 考 文 献

- Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis M I. The vascular network of tumours — what is it not for?. *J Pathol*, 2003, **201** (2): 173~180
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis M I. Tumour angiogenesis: vascular growth and survival. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2004, **112** (7~8): 431~440
- Agre P, King L S, Yasui M, *et al.* Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 2002, **542** (Pt 1): 3~16
- Verkman A S. Physiological importance of aquaporin water channels. *Ann Med*, 2002, **34** (3): 192~200

- 5 Verkman A S. Aquaporin water channels and endothelial cell function. *J Anat*, 2002, **200** (6) : 617~627
- 6 Endo M, Jain R K, Witwer B, *et al.* Water channel (aquaporin 1) expression and distribution in mammary carcinomas and glioblastomas. *Microvasc Res*, 1999, **58** (2): 89~98
- 7 Yuan F, Salehi H A, Boucher Y, *et al.* Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res*, 1994, **54** (17): 4564~4568
- 8 Oshio K, Binder D K, Bollen A, *et al.* Aquaporin-1 expression in human glial tumors suggests a potential novel therapeutic target for tumor-associated edema. *Acta Neurochir Suppl*, 2003, **86**: 499~502
- 9 Saadoun S, Papadopoulos M C, Davies D C, *et al.* Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *J Cancer*, 2002, **87** (6) : 621~623
- 10 Vacca A, Frigeri A, Ribatti D, *et al.* Microvessel overexpression of aquaporin 1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2001, **113** (2): 415~421
- 11 Ma T, Yang B, Gillespie A, *et al.* Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem*, 1998, **273** (8): 4296~4299
- 12 Burghardt B, Elkaer M L, Kwon T H, *et al.* Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut*, 2003, **52** (7): 1008~1016
- 13 Xiang Y, Ma B, Li T, *et al.* Acetazolamide suppresses tumor metastasis and related protein expression in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23** (8) : 745~751
- 14 Ma B, Xiang Y, Li T, *et al.* Inhibitory effect of topiramate on Lewis lung carcinoma metastasis and its relation with AQP1 water channel. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, **25** (1): 54~60

Defective Tumor Angiogenesis and Retarded Tumor Growth in Aquaporin-1 Knockout Mice*

FENG Xue-Chao, Gao Hong-Wen, HE Cheng-Yan, MA Tong-Hui**

(Membrane Channel Research Laboratory, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract Tumor angiogenesis is a mandatory step of tumor growth, invasion, and metastasis involving endothelial cell proliferation and migration from blood vessels in peritumoral tissues and formation of tubules. Water channel aquaporin-1 (AQP1) has been reported to express in microvessels of many different type of tumors, indicating the possible involvement of AQP1 in tumor angiogenesis. A melanoma-bearing model in AQP1-knockout mice was used to evaluate the role of AQP1 in tumor angiogenesis. The results demonstrated nearly 30% retarded growth of subcutaneously inoculated melanoma in AQP1 knockout mice compared to tumors in wildtype mice. Immunohistochemistry of melanoma sections revealed strong AQP1 protein labeling in endothelium of tumor blood vessels in wildtype mice and negative labeling of AQP1 in the counterpart structures in AQP1-knockout mice. On the same tumor sections stained by hematoxylin, melanoma cells form islands with microvessels in the center. It is easily seen that high-density and thin microvessels (142/mm²) locate in the center of tumor islands in wildtype mice, whereas sparse and enlarged vessels (47/mm²) are evident in tumor islands in AQP1 knockout mice coincident with larger necrotic area in outer layer of the islands. These results provide definitive evidence that lacking of water channel AQP1 results in defective tumor angiogenesis and retarded tumor growth that may be involved in insufficient blood supply and/or abnormal transendothelial fluid transport. The underlying molecular and cellular mechanisms are worth further investigation.

Key words water channel aquaporin-1, gene knockout, angiogenesis, tumor

*This work was supported by grants from The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30325011), Distinguished Young Scholars Fund of Jilin Province (20030112) and Excellent Young Teachers Program of MOE, P.R.C..

**Corresponding author . Tel: 86-431-5099170, E-mail: math108@nenu.edu.cn

Received: January 25, 2005 Accepted: March 15, 2005