

猪苓介导 AQP1 和 AQP3 在治疗膀胱癌中作用*

张晓雷¹, 张国伟^{2△}

(1. 上海绿谷制药有限公司, 上海 201203; 2. 河北大学中医学院, 河北保定 071002)

摘要: **目的** 观察利水渗湿中药猪苓对膀胱癌大鼠膀胱组织中 AQP1 和 AQP3 表达的调节作用。**方法** 以猪苓干预 BBN 联合糖精诱导 Fisher-344 大鼠膀胱癌模型, 使用免疫组化和 RT-PCR 技术测定膀胱癌组织中 AQP1、AQP3 的表达。**结果** 与模型组比较, 猪苓 250mg/kg 和 500mg/kg 剂量对大鼠膀胱癌模型膀胱组织 AQP1、AQP3 mRNA 相对表达含量显著下调。**结论** 猪苓利水渗湿功效可能通过调节膀胱癌组织 AQP1 和 AQP3 产生抗膀胱癌作用。

关键词: 猪苓; 膀胱癌; 水通道蛋白 1; 水通道蛋白 3

中图分类号: R285.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)03-0001-03

AQP1 与 AQP3 与癌症的发生关系密切, 在膀胱癌组织中, AQP1 和 AQP3 都较正常膀胱组织表达偏低^[1]。另有研究者证明, AQP3 的缺失在浅表性膀胱癌的进展中扮演关键角色^[2]。

中医药在防治肿瘤方面, 有其自身的特色。泌尿系统常用中药猪苓性甘、淡、平, 归肾、膀胱经, 功效为利水渗湿。前期研究证实猪苓可有效干预膀胱癌^[3], 本文研究猪苓利水渗湿功效对大鼠模型膀胱组织中 AQP1、AQP3 表达的调节探讨其抑制膀胱癌药效作用。

1 材料

1.1 药物与试剂

猪苓颗粒, 江阴天江药业有限公司, 每克相当于 10g 生药, 用前按剂量溶于生理盐水; BBN, 日本 TCI 株式会社; Trizol, Invitrogen, Carlsbad, CA; PrimescriptTM RT reagent, SYBP Premix Ex TaqTM, TAKARA; 氯仿、异丙醇、无水乙醇均为新开瓶分析纯。

1.2 仪器

PCR 仪, ABI 7500 Real Time PCR System; UV-4 000 紫外可见分光光度计, Pharmacia Biotech 公司; 电泳仪, BIO-RAD; BIO-RAD Gel Doc XR 凝胶成像系统。

1.3 动物

清洁级雌性 Fisher344 大鼠 50 只, 7 周龄, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 合格证号: SCXK(京)2006-0009。实验开始前实验动物先于实验环境中适应 3d。动物饲养环境: 温度为 23±2℃, 湿度为 55%±5%, 12h/12h 昼夜交替, 自由饮水, 标准饲养饲料。

2 方法与内容

2.1 分组与给药

将大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 即生理盐水组、模型组、猪苓 50mg/kg 组、猪苓 250mg/kg 组、猪苓 500mg/kg 组, 实验动物给予含 0.05%BBN 饮用水 8 周, 第 9 周开始实验大鼠给予含 5%糖精的饮用水, 至第 20 周截止, 同时第 9 周开始给供试药物, 至第 20 周试验结束止, 给药剂量 1mL/100g。实验结束后, 大鼠行 10%水合氯醛 0.3mL/100g 肌肉注射, 麻醉后固定于大鼠固定器上, 分离膀胱组织。

2.2 大鼠膀胱组织 AQP1、AQP3 mRNA 相对表达含量测定

取大鼠膀胱组织约 50mg, TRIZOL 提取总 RNA, 根据所测定 RNA 浓度使用 TIANGEN 公司 TIANScript cDNA Synthesis Kit 依据使用说明反转

* 基金项目: 河北省自然科学基金(NO:H2013201222); 河北省卫生厅科研基金项目(NO:20110514); 河北省中管局科研项目(NO:2011106); 河北大学科研基金资助项目(NO:2010Q46); 河北大学医学学科建设资助项目(NO:2012A2001)

收稿日期: 2013-05-27 修回日期: 2013-06-06

作者简介: 张晓雷(1980~), 男, 河南叶县人, 工程师, 主要从事药物筛选与新药开发。

△通信作者: 张国伟, E-mail: xxzgw@126.com

录得到 cDNA,加入总 RNA 量为 3 μ g,反应体系为 20 μ L,并使用 TIANGEN 公司 RealMasterMix,SYBR Green I 进行荧光定量 PCR 实验。

扩增引物如下:

AQP1 sense,ATTGCAGCGTCATGTCTGAG;anti-sense,GAAGTAGGGGCATCCAAAC;

AQP3 sense,ACTCCAGTGTGGAGGTGGAC;antisense,GCCCCTAGTTGAGGATCACA;

引物设计由 GeneBank 得到序列后设计,AQP1- NM_012778.1,AQP3- NM_031703.1;产物扩增长度如下:AQP1-100bp,AQP3-147bp, β -actin-150bp。引物由 Invitrogen 公司合成。

RT-PCR 使用 ABI 7500 Real Time PCR System 进行,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,and 68 $^{\circ}$ C 33 s,35 个循环。

3 统计方法

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,以 Dunnett's t test 方法评价数据统计性差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4 结果

大鼠膀胱癌肿瘤诱导成功,猪苓对膀胱癌有治疗作用 [图 1];与模型组比较,猪苓 250mg/kg 和 500mg/kg 组实验大鼠 AQP1、AQP3 相对表达含量均

表 1 膀胱癌大鼠膀胱组织 AQP1、AQP3 mRNA

相对表达含量

治疗组	剂量 (mg/kg BW)	相对表达含量	
		AQP1	AQP3
Control	(n=9)	1(0.7-1.4)	1(0.5-1.9)
BBN	(n=9)	1.3(0.8-1.9)	2.0(0.9-4.4)
	50(n=10)	0.8(0.5-1.4)	2.4(1.2-4.7)*
BBN+Zhuling	250(n=9)	0.5(0.3-1.0)** $\Delta\Delta$	0.6(0.2-1.7) Δ
	500(n=10)	0.6(0.4-1.0) Δ	0.9(0.4-2.0) Δ

注:实验鼠膀胱 AQP1、AQP3 相对表达含量 RT-PCR 数据显著性统计分析采用 ΔC_t 法;与正常组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$,与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; $\Delta\Delta P < 0.01$;AQP1、AQP3 相对表达含量数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

显著下调[$P < 0.05$,表 1]。

5 讨论

在膀胱组织中,AQP1 主要定位于人膀胱黏膜下微血管和小动脉的内皮细胞,AQP2 和 AQP3 位于人膀胱黏膜上皮细胞的细胞膜及胞质中^[4]。

BBN 是第一个被明确认定的膀胱癌诱导剂^[5],在 BBN 诱导大鼠模型中,膀胱肿瘤发展从膀胱增生到浸润性膀胱癌都与人类极为类似^[6],同时,糖精作为化学诱导剂,也具有膀胱癌的诱导性^[7]。实验中,

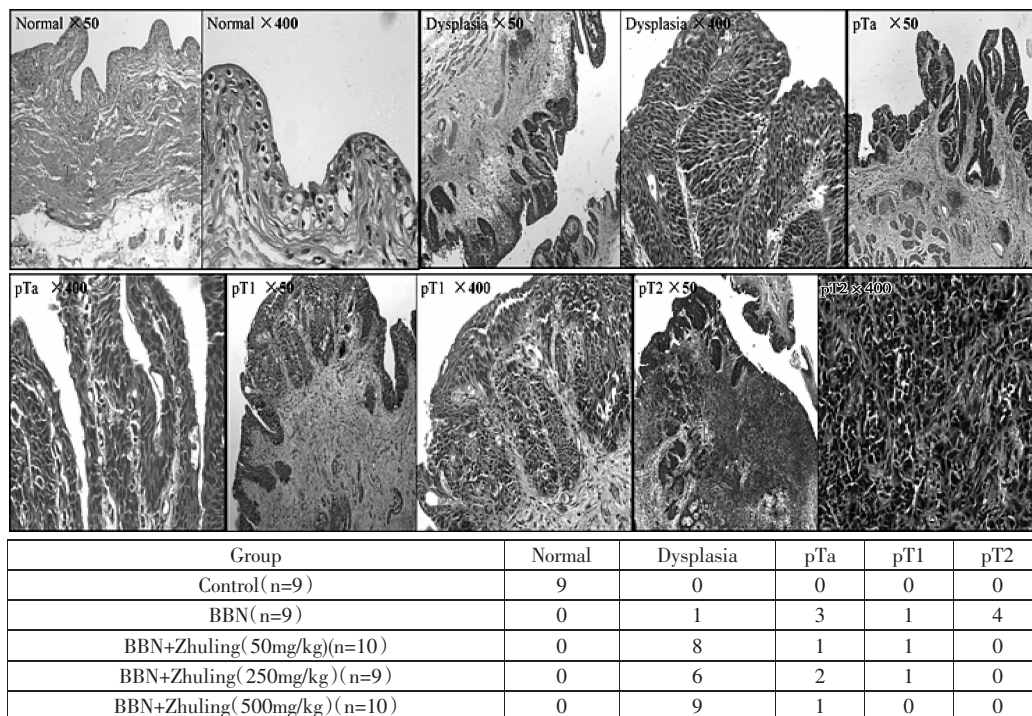


图 1 实验大鼠膀胱组织肿瘤生成示意图

给予实验大鼠含 0.05%BBN 饮用水 8 周,第 9 周开始实验大鼠给予含 5%糖精的饮用水,至第 20 周截止,膀胱癌诱导成功。

在实验大鼠膀胱组织中,膀胱癌大鼠膀胱组织 AQP1 和 AQP3 mRNA 明显上调,猪苓给药后,对膀胱癌有明显治疗作用,各剂量组膀胱组织 AQP1 mRNA 均出现下调现象,与模型组实验大鼠比较,更为明显;对膀胱组织 AQP3 mRNA 均出现下调现象,也与此现象基本一致。膀胱癌发生与 AQP1 与 AQP3 的表达上调有关,猪苓下调膀胱癌组织 AQP1 和 AQP3 mRNA 的上调现象,提示猪苓利尿渗湿功效可能通过调节膀胱组织 AQP1 和 AQP3 产生抗膀胱癌作用。

参考文献

- [1] 魏巍,张刚,谷欣权,等. AQP1、AQP2 及 AQP3 在人腺性膀胱炎组织中的表达 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2007,33(2):318-320.
- [2] Otto W, Rubenwolf PC, Burger M, et al. Loss of aquaporin 3 protein expression constitutes an independent prognostic factor for progression-free survival: an immunohistochemical

study on stage pT1 urothelial bladder cancer[J]. BMC Cancer. 2012 Oct 8;12(1):459.

- [3] Zhang G, Zeng X, Li C, et al. Inhibition of Urinary Bladder Carcinogenesis by Aqueous Extract of Sclerotia of Polyporus umbellatus Fries and Polyporus Polysaccharide [J]. Am J Chin Med. 2011,39(1):135-44.
- [4] Moon C, Soria JC, Jang SJ, et al. Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis [J]. Oncogene, 2003,22(43): 6699-6703.
- [5] Nakanowatari J, Fukushima S, Imaida K, et al. Strain differences in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine bladder carcinogenesis in rats [J]. Jpn J Cancer Res, 1988,79(4): 453-9.
- [6] Ohtani M, Kakizoe T, Sato S, et al. Strain differences in mice with invasive bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1986,112:107-10.
- [7] Kakizoe T, Komatsu H, Nijima T, et al. Maintenance by saccharin of membrane alterations of rat bladder cells induced by subcarcinogenic treatment with bladder carcinogens[J]. Cancer Res, 1981,41(11 Pt 1):4702-5.

(编辑:迟越)

The Regulation of Sclerotia of *P. Umbellate* Aqueous Extract with Bladder AQP1, AQP3 in Urinary Bladder Cancer

ZHANG Xiao-lei¹, ZHANG Guo-wei²

(1. Shanghai Green Valley Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201203;

2. College of Chinese Medicine of Hebei University, Baoding Hebei 071002)

ABSTRACT: **Objective** To evaluate regulation of the AQP1, AQP3 in bladder post oral administration of a diuresis-removing dampness chinese medicine, sclerotia of *P. umbellate* aqueous extract in urinary bladder cancer rats. **Methods** The sclerotia of *P. umbellate* aqueous extract given Fisher-344 rats induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) combined saccharin, then the regulation of AQP1, AQP3 measured with immunohistochemical and RT-PCR. **Results** The AQP1 and AQP3 mRNA relative expressions in bladder carcinogenesis rat bladder post 250mg/kg, 500mg/kg sclerotia of *P. umbellate* aqueous extract doses treatment were down-regulated compared to BBN group. **Conclusion** Inhibition of bladder carcinogenesis by sclerotia of *P. umbellate* aqueous extract associated with regulation of AQP1 and AQP3 in bladder.

KEY WORDS: sclerotia of polyporus umbellatus; bladder carcinogenesis; aquaporin-1; aquaporin-3.