

一种肿瘤标志物 AQUAPORIN 2 蛋白及其应用

技术领域

本发明属于肿瘤检测和分子靶向治疗领域，更具体地说，涉及一种跨膜蛋白 AQUAPORIN 2（文中简称为 AQP2）及其应用。

背景技术

肿瘤是目前危害人类健康最严重的一类疾病。研究发现肿瘤的产生是一个由基因突变逐渐积累的复杂过程，现代医学技术和分子生物学的发展，使得肿瘤治疗进入个体化时代，大大增加肿瘤治疗的缓解率。因此找到特异性的靶点对于肿瘤早期诊断、治疗及预后是目前制约肿瘤临床疗效的关键瓶颈。

头颈癌包括颈部肿瘤(甲状腺肿瘤等)、耳鼻喉科肿瘤(喉癌、鼻咽癌、副鼻窦癌等)以及口腔颌面部肿瘤(舌癌、牙龈癌、颊癌等)，其中超过 90%的头颈部肿瘤为鳞状细胞癌。头颈鳞癌为全球第六大常见癌症，全球每年新发病例超过 50 万例，且 5 年生存率不超过 40%。目前治疗手段仍集中在放疗、化疗、手术三种，临床预后不佳。因此深入研究头颈鳞癌的发病机制、发现新型的生物标志物对于头颈鳞癌的靶向治疗和患者预后具有重要意义。

肾癌又称肾细胞癌，起源于肾小管上皮细胞，是最常见的肾脏实质恶性肿瘤。全球每年约有 208,500 的新增病例，在我国发病率约 4.5/10 万，目前对肾癌的病因了解并不清楚，且临床治疗发现肾癌患者多数对放化疗均不敏感，多依赖于手术切除。因此提高早期诊断的准确性，有助于肾癌患者进行及时治疗。

前列腺癌是指发生在前列腺的上皮性恶性肿瘤，主要包括腺癌（腺泡腺癌）、导管腺癌、尿路上皮癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌等。发病率随着年龄的增长而增长，高峰年龄是 70~80 岁。前列腺癌发病有明显的地区和种族差异，据统计中国人最低，欧洲人最高。近年来随着生活条件的改善，人群寿命的延长，我国前列腺癌的发病率也逐年增加。

肿瘤转移侵袭是恶性肿瘤的重要特征，也是引起大多数肿瘤复发的元凶。研究发现肿瘤转移侵袭是一个连续的、由多基因参与的动态过程，其中原癌基因与抑癌基因发挥同等重要的作用。大量原癌基因如 PTEN、MYC、RAS、PIK3CA、AKT1 在包括头颈鳞癌在内的恶性肿瘤中的作用被深入揭示，而抑癌基因除 TP53 以外的研究鲜有报道。借助高通量筛选及大数据分析等生物信息学手段，发现具有重要功能的抑癌基因对揭示肿瘤的发病机制、提出更全面的诊疗方案十分重要。

水通道蛋白-2 (AQP2)作为水通道蛋白家族成员之一，主要分布在集合管主细胞管腔膜及细胞内囊泡中，是一种抗利尿激素敏感性水通道蛋白。目前研究发现 AQP2 主要表达在肾脏组织，参与包括神经性尿崩症、多囊肾等疾病的病理过程。但 AQP2 在肿瘤中的表达和功能还未有文献资料报道，本研究首次发现 AQP2 在不同种类的肿瘤中表达水平和潜在的生物学功能，对 AQP2 在肿瘤检测和治疗中应用价值的开发具有重要意义。

发明内容

针对现有的头颈鳞癌等恶性肿瘤缺乏关系密切的生物标志物的问题，本发明提供一种肿瘤标志物 AQP2 蛋白，并成功将其应用在肿瘤检测和治疗中，通过结合生物信息学手段、临床肿瘤样本以及生物功能实验，发现与头颈鳞癌、肾癌和前列腺癌的发生发展、转移有密切关系的新型生物标志物。

本发明所采用的技术方案如下：

一种跨膜蛋白在制备肿瘤治疗药物或作为肿瘤标志物中的应用，所述的标志物为跨膜蛋白 AQP2，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

优选地，该肿瘤标志物用于检测的肿瘤包括头颈鳞癌、肾癌和前列腺癌。

一种检测上述标志物表达的试剂盒，所述的检测试剂盒包括针对编码 AQP2 的核苷酸序列(为 SEQ ID NO. 1 所示)设计的特异性引物对。

优选地，检测生物标志物表达的试剂可以应用于对肿瘤对象进行预后的工具中。本文中所述的预后的方法包括：从肿瘤中获得测试样品；确定所述测试样品中生物标志物的表达水平；和分析所述表达水平以产生风险评分，其中该风险评分可用于提供对象的预后。需要说明的是，预后中用到的测试样品是新鲜的、冷冻的或石蜡固定包埋的组织。

优选地，上述的检测试剂，为含有抗 AQP2 蛋白抗体的试剂，也可以是含有抗 AQP2 蛋白抗体的组合物检测试剂。

上述生物标志物的检测方法，其特征在于：设计特异性引物利用 PCR 方法检测组织细胞中跨膜蛋白 AQP2 的表达量，所述的引物序列为 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所示。

一种实现跨膜蛋白 AQP2 过表达的重组载体，所述的重组载体可以在制备用于治疗肿瘤的药物中应用。

优选地，所述的重组载体为含有 SEQ ID NO. 1 所示核苷酸序列的过表达质粒、慢病毒或细胞株，其具有如下 (a1) - (a3) 功能：

(a1) 为抑制肿瘤生长；

(a2) 为抑制肿瘤细胞增殖;

(a3) 为抑制肿瘤细胞迁移。

相比于现有技术, 本发明的有益效果为:

(1) 首次发现跨膜蛋白 AQP2 在肿瘤诊断、预后和治疗方面具有重要作用, 可以作为包括头颈鳞癌、肾癌和前列腺癌的肿瘤标志物。

(2) 本发明发现跨膜蛋白 AQP2 在头颈鳞癌细胞、肾癌细胞和前列腺癌细胞中的表达水平显著低于正常上皮细胞, AQP2 过表达能显著抑制头颈鳞癌细胞、肾癌细胞和前列腺癌细胞的增殖、迁移和体内肿瘤生长, 这证明 AQP2 对肿瘤生长和转移的重要性, 说明 AQP2 具有作为靶标进行药物设计的潜能, 例如, 以 AQP2 为靶点的抗肿瘤物质 (含有其编码核苷酸的过表达质粒载体、慢病毒或转基因细胞系等) 可用于制备抗头颈鳞癌、肾癌和前列腺癌的药物。

(3) 本发明以 GAPDH 为内参基因, 对 AQP2 表达水平进行了检测, 发现 AQP2 蛋白在头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 中的表达量显著降低, 证明 AQP2 可作为一个新的生物标志物来诊断包括头颈鳞癌、肾癌和前列腺癌在内的恶性肿瘤。

附图说明

附图 1 为 AQP2 基因在人头颈鳞癌组织和癌旁组织中的表达量比较, 数据来自 TCGA 数据库;

附图 2 为 AQP2 基因在人肾乳头状细胞癌组织和癌旁组织中的表达量比较, 数据来自 TCGA 数据库;

附图 3 为 AQP2 基因在人肾透明细胞癌组织和癌旁组织中的表达量比较, 数据来自 TCGA 数据库;

附图 4 为 AQP2 基因在人肾嫌色细胞癌组织和癌旁组织中的表达量比较, 数据来自 TCGA 数据库;

附图 5 为 AQP2 基因在人前列腺癌组织和癌旁组织中的表达量比较, 数据来自 TCGA 数据库;

附图 6 为 AQP2 基因在三种肿瘤细胞和正常细胞中的 AQP2 基因表达量比较;

附图 7 为 AQP2 基因在三种肿瘤细胞和正常细胞中的 AQP2 蛋白表达量比较;

附图 8 为 AQP2 的慢病毒过表达载体图谱;

附图 9 为过表达 AQP2 对头颈鳞癌细胞中 AQP2 基因和蛋白表达量的影响;

附图 10 为过表达 AQP2 对肾癌细胞中 AQP2 基因和蛋白表达量的影响;

附图 11 为过表达 AQP2 对前列腺癌细胞中 AQP2 基因和蛋白表达量的影响;

附图 12 为过表达 AQP2 对头颈鳞癌细胞 SCC4 增殖能力的影响结果图；

附图 13 为过表达 AQP2 对肾癌细胞 786-O 增殖能力的影响结果图；

附图 14 为过表达 AQP2 对前列腺癌细胞 DU145 增殖能力的影响结果图。

附图 15 为过表达 AQP2 对头颈鳞癌细胞 SCC4 体内肿瘤生长的影响结果图；

附图 16 为过表达 AQP2 对肾癌细胞 786-O 体内肿瘤生长的影响结果图；

附图 17 为过表达 AQP2 对前列腺癌细胞 DU145 体内肿瘤生长的影响结果图。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进一步进行描述。

实施例 1

AQP2 在人不同肿瘤组织与癌旁组织的表达谱芯片分析

肿瘤基因组图谱（TCGA）计划由美国 National Cancer Institute（NCI）和 National Human Genome Research Institute（NHGRI）于 2006 年联合启动的项目，利用大规模测序为主的基因组分析技术，针对 36 种癌症进行大规模实验，TCGA 基因组分析中心（GCC）比对肿瘤和正常组织，寻找与各癌症或者亚型相关的基因突变、扩增或者缺失。为理解癌症的分子机制，提高人们对癌症发病分子基础的科学认识提供帮助。

利用 TCGA 标准方法下载 36 种肿瘤和其癌旁组织的全基因表达谱数据及临床信息，采用 R 语言（3.1.1 版本）软件过滤掉不含 AQP2 表达信息的肿瘤类型，发现共在 20 种肿瘤中检测到 AQP2 表达。

表 1. TCGA 数据库中 AQP2 在不同肿瘤中的表达水平分析

肿瘤类型	样本数量	P 值
膀胱癌	肿瘤 (408)	0.0689
	正常 (19)	
乳腺癌	肿瘤(1090)	0.1059
	正常(113)	
宫颈鳞状细胞癌	肿瘤(304)	0.1502
	正常(3)	
胆癌	肿瘤(36)	0.0594
	正常(9)	
结肠癌	肿瘤(454)	0.0721
	正常(41)	
食管癌	肿瘤(161)	0.0831

	正常(11)	
头颈部鳞癌	肿瘤(500)	0.0255
	正常(44)	
嫌色细胞癌	肿瘤(65)	<0.0001
	正常(24)	
肾透明细胞癌	肿瘤(530)	<0.0001
	正常(72)	
乳头状肾细胞癌	肿瘤(288)	<0.0001
	正常(32)	
肝癌	肿瘤(371)	0.0825
	正常(50)	
肺腺癌	肿瘤(513)	0.0613
	正常(59)	
肺鳞状细胞癌	肿瘤(501)	0.126
	正常(49)	
胰腺癌	肿瘤(177)	0.198
	正常(4)	
肾上腺癌	肿瘤(178)	0.465
	正常(3)	
前列腺癌	肿瘤(495)	<0.0001
	正常(52)	
直肠癌	肿瘤(165)	0.134
	正常(10)	
胃癌	肿瘤(375)	0.251
	正常(32)	
甲状腺癌	肿瘤(502)	0.0624
	正常(58)	
子宫内膜癌	肿瘤(543)	0.0582
	正常(23)	

利用 graphpad Prism 7 对 20 种肿瘤组织和对应癌旁组织中 AQP2 的表达水平进行统计学分析, 所有数据进行统计 t 检验, $*P<0.05$ 为显著性差异, $**P<0.01$ 为极显著性差异。具体分析结果见表 1, 与对应的癌旁组织相比, AQP2 在头颈鳞癌 (图 1)、三种肾癌亚型 (肾乳头状细胞癌、肾透明细胞癌、肾嫌色细胞癌, 图 2-4) 和前列腺癌(图 5)中显著低表达。

实施例 2

本实施例中利用荧光定量 PCR 方法检测肿瘤细胞和正常上皮细胞中 AQP2 的表达量。

1. 材料

头颈鳞癌细胞 SCC4 和人正常口腔上皮细胞 HIOEC, 肾癌细胞 786-O 和人肾上皮细胞 HEK293T, 前列腺癌细胞 DU145 和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1; 上述细胞均购自美国 ATCC 细胞库。

2. 方法

2.1 肿瘤细胞和正常上皮细胞中总 RNA 的提取

上述六种细胞分别在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 培养至密度为 90% 时用胰蛋白酶消化收集, 用培养液重悬细胞并在显微镜下计数, 将细胞浓度调整为 5×10^5 个/mL, 然后将浓度调整好的细胞悬液接种到 6 孔板中, 每孔 2 mL, 并继续于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

按 life 公司的 Trizol 说明书分别提取头颈鳞癌细胞 SCC4 和人正常口腔上皮细胞 HIOEC, 肾癌细胞 786-O 和人肾上皮细胞 HEK293T, 前列腺癌细胞 DU145 和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 的总 RNA, 再用 NanoDrop ND-1000 核酸定量仪定量所提取的 RNA 的纯度和浓度, 琼脂糖质检确保提取 RNA 的完整性。

2.2 RNA 反转录合成第一链 cDNA

采用 TaKaRa 试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 对提取的总 RNA 反转录合成 cDNA。该试剂盒含 gDNA Eraser DNase, 可有效去除混杂的基因组 DNA。

2.3 实时定量 PCR

根据 AQP2 和 GAPDH 的核酸序列设计特异性引物, 采用 TaKaRa 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus) 进行 PCR 反应, AQP2 的上游引物和下游引物分别为 SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4, GAPDH 的上游引物和下游引物分别为 SEQ ID NO.5 和 SEQ ID NO.6。反应体系如下表:

表 2. PCR 反应体系

试剂	使用量 (μL)
SYBR Premix Ex Taq II (TliRNaseH Plus) (2×)	12.5
PCR Forward Primer (10 μM)	1
PCR Reverse Primer (10 μM)	1
DNA 模板 (<100 ng)	2

灭菌水	8.5
Total	25

将上述组份混合均匀后按以下程序进行实时定量 PCR: 95 °C 30 s 预变性, 40 个循环; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s。

根据熔解曲线判断反应的特异性, 由公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 AQP2 的 mRNA 表达量。结果见图 6, 与人正常上皮细胞相比, AQP2 在头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 中的表达量显著降低, 与临床样本的分析结果一致。

实施例 3

本实施例中, 采用免疫印迹方法检测肿瘤细胞和正常上皮细胞中 AQP2 蛋白的表达量。

将实例 2 中的六种细胞在生长密度达到 90% 时用胰蛋白酶消化收集, 用培养液重悬细胞进行扩增培养, 然后收集 80% 汇合度时细胞, 离心后弃上清, PBS 润洗两次, 弃上清。加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 20 min。12000 g 离心 10 min 收集上清。加入 1XSDS 上样缓冲液, 吹打混匀后煮沸变性 5 min。10% SDS-PAGE 凝胶分离总蛋白, 然后转移到 PVDF 膜。5% BSA 室温封闭 2 h, 与 AQP2 抗体 (abcam) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次。二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次。ECL 超敏化学发光液显影, 经 Tannon 成像系统成像, 以 GAPDH 作为内参比较不同细胞中 AQP2 蛋白的表达水平。

结果见图 7, 与 AQP2 mRNA 表达差异一致, AQP2 蛋白在头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 中的表达量显著降低。

实施例 4

本实施例中进行过表达 AQP2 载体的制备和病毒转染效率检测。

同时合成针对 AQP2 的全长 cDNA (具体序列见 SEQ ID NO.1), 导入 plvx-CMV-ZsGreen1 质粒 (图谱见图 8) 中。将上述质粒同包装质粒 psPAX2 和包膜质粒 pMD2.G 共转入 293T 细胞中以产生病毒, 转染 48 h 后, 收集细胞的病毒上清, 分别感染 SCC4 头颈鳞癌细胞、786-O 肾癌细胞、DU145 前列腺癌细胞。感染 48 h 后, 加入嘌呤霉素筛选两周后, 获得稳定促进 AQP2 基因表达的细胞株。收集三种细胞空白载体和过表达载体的总 RNA 和总蛋白, 通过 qPCR (具体方法同实施例 2) 和免疫印迹方法 (具体方法同实施例 3), 比较 AQP2 基因和蛋白的表达量变化。

结果见图 9-11, 过表达 AQP2 使头颈鳞癌细胞 SCC4 (图 9)、肾癌细胞 786-O (图 10)、前列腺癌细胞 DU145 (图 11) 中的 AQP2 基因和蛋白的表达量显著升高。

实施例 5

本实施例为过表达 AQP2 对人肿瘤细胞增殖能力的影响。

将头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 稳定转染空载体和 AQP2 过表达的细胞在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养至密度 90% 时用胰蛋白酶消化收集，用培养液重悬细胞并在显微镜下计数，将细胞浓度调整为 3.0×10^4 个/mL，将细胞悬液接种到 96 孔板中，每孔 100 μ L，并于 37 °C，5% CO₂ 培养箱中分别培养 24 h，48 h，72 h。向 96 孔板中每孔加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT，继续培养 4 h。吸去培养基，每孔加入 100 μ L DMSO 溶解。用酶标仪在检测波长为 570 nm，参比波长为 630 nm 处测定吸光值，并计算生长抑制率 (proliferation inhibition, PI)，公式为：

$$PI(\%) = 1 - \text{给药组} / \text{阴性组}$$

试验独立重复 3 次，试验得到的结果以 mean $\pm$ SD 表示，并进行统计 t 检验，两组以上数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，利用 *P* 值表示统计学意义，其中 *P* < 0.05 为显著性差异，*P* < 0.01 为极显著性差异。

结果见图 12-14，与空载体细胞 (plvx-ctrl) 相比，具有 AQP2 过表达量的细胞 (plvx-AQP2) 头颈鳞癌细胞 SCC4 (图 12)、肾癌细胞 786-O (图 14)、前列腺癌细胞 DU145 (图 15) 的增殖速度明显减弱。表明 AQP2 过表达能显著抑制头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 细胞的增殖，进一步证实 AQP2 作为抑癌基因的重要性。

实施例 6

本实施例为过表达 AQP2 对人肿瘤细胞迁移能力的影响。

将头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 稳定转染空载体和 AQP2 过表达的细胞接种到 transwell 小室中，每孔 100 μ L，在 transwell 下室加入 0.6 mL 含 10% FBS 的完全培养基刺激细胞迁移，于 5% CO₂，37 °C 培养 24 h。弃去孔中培液，用 90% 酒精常温固定 30 min，0.1% 结晶紫常温染色 10 min，清水漂净，用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞，显微镜下观察并选择四个视野拍照计数。按照公式计算迁移抑制率 (migration inhibition rate, MIR)：

$$MIR(\%) = 1 - \frac{N_{test}}{N_{control}} \times 100\%$$

其中 *N*_{test} 为测试组 (plvx-AQP2) 的细胞迁移数，*N*_{control} 为空白对照组 (plvx-ctrl) 的细胞迁移数。试验独立重复 3 次，试验得到的结果计算 mean $\pm$ SD，并进行统计 t 检验，两组以上数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，利用 *P* 值表示统计学意义，*P* < 0.05 为显著性差异，*P* < 0.01 为极显著性差异。

表 3 过表达 AQP2 对人肿瘤细胞迁移能力的抑制作用

细胞类型	组别	细胞迁移数 (Mean ± SD)	细胞迁移抑制率(%)
SCC4	plvx-ctrl	661±48	0.00
	plvx-AQP2	263±37	77.00%**
786-O	plvx-ctrl	727±41	0.00
	plvx-AQP2	251±50	70.98%**
DU145	plvx-ctrl	707±39	0.00
	plvx-AQP2	304±28	68.32%**

表中：*表示 P 值 < 0.05 ，**表示 P 值 < 0.01 。

结果如表 3 所示，发现上调 AQP2 表达后，头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 细胞的迁移能力明显减弱。

实施例 7

本实施例为过表达 AQP2 对人肿瘤细胞体内生长的影响。

(1) 大量培养头颈鳞癌细胞 SCC4、肾癌细胞 786-O、前列腺癌细胞 DU145 稳定转染空载体和 AQP2 过表达的细胞，采用 0.25%胰酶溶液消化，终止消化后细胞悬液 1000 rpm 离心 5 min，用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞后计数，调整细胞浓度至 5×10^7 个/ml；

(2) 每只裸鼠(订购 4-6 周龄、体重在 14 - 16 g 的雌性，在 SPF 级动物饲养室适应性饲养 1 周)左侧腋下接种 100 μ l 对应组别的细胞悬液，注射细胞量为 5×10^6 个；

(3) 接种后密切观察裸鼠接种部位的肿瘤生长情况，每隔两日测量并记录移植瘤体积，肿瘤体积 (Tumor volume, TV) 计算公式如下：

$$\text{肿瘤体积} = 0.5 \times a \times b^2$$

其中，a 为移植瘤长度(mm)，b 为移植瘤宽度(mm)。

与空载体对照组(plvx-ctrl)相比，AQP2 过表达量的细胞(plvx-AQP2)(头颈鳞癌细胞 SCC4 (图 15)、肾癌细胞 786-O (图 16)、前列腺癌细胞 DU145 (图 17) 的裸鼠内肿瘤生长速度更慢，体内成瘤能力明显降低，说明过表达 AQP2 可以抑制恶性肿瘤细胞的体内生长能力。