

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.005

人水甘油通道蛋白 9 重组质粒的构建及表达

王 川, 谭 翠, 姜 政, 王丕龙

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建人水甘油通道蛋白 9(aquaglyceroporin9, AQP9)重组质粒,并检测其融合蛋白在真核细胞 COS-7 中的表达,为阐明 AQP9 在非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)中的作用奠定基础。**方法:**通过 RT-PCR 方法从人肝脏组织中获得 AQP9 基因,插入 pEGFP-N1 质粒,构建重组质粒 pEGFP-N1-AQP9,转染 COS-7 细胞,通过荧光显微镜检测其转染情况,RT-PCR 和 Western blot 检测 AQP9 在真核细胞中的表达。**结果:**PCR 及酶切鉴定显示插入人 AQP9 大小正确。测序鉴定显示,1 个碱基发生突变,45 位:A→G,为无义突变。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测到 AQP9 表达,说明 AQP9 基因在 COS-7 细胞中表达并与绿色荧光蛋白融合,且具有免疫原性。**结论:**成功构建了 pEGFP-N1-AQP9 重组质粒,并在 COS-7 细胞中表达,为进一步研究 AQP9 在 NAFLD 发生发展中的作用奠定基础。

【关键词】水甘油通道蛋白 9;非酒精性脂肪肝病;重组质粒

【中国图书分类法分类号】R575.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-10

Construction and expressions of recombinant plasmid encoding human aquaglyceroporin 9

WANG Chuan, TAN Cui, JIANG Zheng, WANG Pilog

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct human aquaglyceroporin 9 (AQP9) recombinant plasmid and to detect its expressions in COS-7 cells in order to elucidate the role of AQP9 in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** AQP9 gene was obtained by RT-PCR from human hepatic tissue and was cloned into pEGFP-N1 plasmid. pEGFP-N1-AQP9 recombinant plasmid was constructed, identified and transfected into COS-7 cells. Transfection was detected by fluorescence microscopy; expressions of AQP9 were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** PCR and enzyme digestion analysis showed that AQP9 size was right. Sequencing analysis found a nonsense mutation, 45 th: A→G. RT-PCR and Western blot demonstrated that AQP9 was expressed in COS-7 cells, suggesting that pEGFP-N1-AQP9 was expressed in COS-7 cells and had immunogenicity. **Conclusions:** pEGFP-N1-AQP9 recombinant plasmid is constructed and expressed successfully in COS-7 cells, which would lay a foundation for further study of AQP9 in the pathogenesis of NAFLD.

【Key words】 aquaglyceroporin 9; nonalcoholic fatty liver disease; recombinant plasmid

随着我国人民生活水平提高和西方化的饮食方式,非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患病率迅速增加,已经成为主要消化系统疾病之一^[1-2]。NAFLD 与脂肪重新分布有关,而水甘油通道蛋白 9(aquaglyceroporin9, AQP9)正是参与脂肪动员运输和肝脏摄取的重要膜蛋白^[3-4]。AQP9 主要表达于肝细胞膜门静脉面,能摄取血液中的甘油,大量甘油进入肝细胞将引起脂肪合成及

储存增加,从而导致脂肪肝的形成。本研究通过 RT-PCR 从人肝脏组织获取 AQP9 基因,插入 pEGFP-N1 质粒,构建重组质粒 pEGFP-N1-AQP9,并将其转染到真核表达细胞 COS-7 中,通过 RT-PCR、Western blot 以及绿色荧光检测其表达,为进一步研究 AQP9 在 NAFLD 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织和载体 液氮冻存肝脏组织取自本院肝胆外科手术患者(经患者同意);大肠杆菌菌株 DH5α 及真核表达质粒 pEGFP-N1 由重庆医科大学附属第一医院向廷秀博士惠

作者介绍:王 川, Email: 45496092@qq.com,

研究方向:非酒精性脂肪肝病。

通信作者:姜 政, Email: jiangz1753@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81070318);重庆市卫生局科研资助项目(编号:渝卫科教 2010-2-100)。

赠;细胞株 COS-7 购自中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂及工具酶 RNAiso Plus, RT-PCR 试剂盒, 限制性内切酶和 T4 DNA Ligase 购自大连 TaKaRa 公司, 凝胶回收试剂盒, 质粒小量提取试剂盒, 无内毒素质粒小量提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司, Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, RPMI1640 培养基购自美国 HyClone 公司, 胰蛋白酶和酵母提取物购自英国 Oxoid 公司, 兔抗人 AQP9 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 根据 NCBI 中 GenBank 的人 AQP9 的基因序列 (AB008775), 采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 设计 AQP9 巢式 PCR 引物, 外侧上游引物 P1: 5'-GATTCGCGTCTCTAAGTCGC-3', 外侧下游引物 P2: 5'-GAGAATCCCAACTGACTGC-3', 内侧上游引物 P3: 5'-GGAAGATCTGATGCAGCCTGAGGGAG-3', 内侧下游引物 P4: 5'-CGGGGTACCTGAGTTCATATTTCTCTGG-3', 内侧上游引物加入 *Bgl* II 酶切位点及其保护性碱基 GGA, 内侧下游引物加入 *Kpn* I 酶切位点及其保护性碱基 CGG, 目的基因扩增长度为 888 bp。同样方法设计内参 β -actin 引物, 上游引物 P5: 5'-ACTGTGCCCATCTACGAGG-3', 下游引物 P6: 5'-GAAAGGGTGTAAACGCAACTA-3', 扩增长度为 678 bp, 引物由 TaKaRa 公司合成。

1.2.2 肝脏组织总 RNA 的提取 按 RNAiso Plus 说明书操作提取人肝脏组织总 RNA, 而后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并检测总 RNA 纯度和浓度。

1.2.3 RT-PCR 扩增 AQP9 基因 反转录合成成人肝脏组织 cDNA, 然后采用巢式 PCR 方法扩增 AQP9 基因, 先使用外侧引物进行扩增, 以其产物为模板再进行内侧引物扩增, 所获 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 并进行凝胶回收纯化。

1.2.4 重组质粒的构建 分别将 AQP9 基因和 pEGFP-N1 质粒进行 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切反应, 产物用凝胶回收试剂盒进行纯化。将酶切纯化的人 AQP9 和 pEGFP-N1 按 5:1 的摩尔比例, 用 T4 DNA Ligase 连接过夜, 将上述连接产物 10 μ l 转化感受态细菌 DH5 α , 涂布于含 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 同时以空质粒及 ddH₂O 作为对照, 培养 16~18 h, 挑取单克隆阳性菌落摇菌扩增并提取重组质粒, 重组质粒命名为 pEGFP-N1-AQP9。

1.2.5 重组质粒 PCR 鉴定 取 1 μ l 重组质粒菌液为模板, 加入 AQP9 内侧引物进行 PCR 反应, 以空质粒菌液、DH5 α 菌液及 ddH₂O 为对照, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测能否扩增出 AQP9 基因。

1.2.6 重组质粒酶切鉴定 将提取的重组质粒与空质粒分别进行单酶切 (*Bgl* II) 及双酶切 (*Bgl* II 和 *Kpn* I) 鉴定, 而后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测重组质粒经过双酶切能否切出 AQP9 条带。

1.2.7 重组质粒测序鉴定 重组质粒送至上海生工测序, 测序结果与 GenBank 中人 AQP9 mRNA 序列进行比对。

1.2.8 COS-7 细胞的培养 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 COS-7 细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中, 传

至第 3 代, 用于转染。

1.2.9 检测绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达 转染前 1 d, 将 COS-7 细胞接种 6 孔板上, 每孔约 6×10^5 个细胞, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中培养, 待细胞融合度达 80%~90% 时, 将无内毒素的 pEGFP-N1-AQP9 通过脂质体 Lipofectamine2000 介导转染 COS-7 细胞, 质粒与脂质体比例为 1:2.5, 并以 pEGFP-N1, ddH₂O 及未处理 COS-7 细胞为对照, 每组转染 2 孔。48 h 后在倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达。

1.2.10 RT-PCR 检测 AQP9 表达 将上述 4 组细胞培养 48 h 后分别提取总 RNA, 各取 1 μ g RNA 进行 RT-PCR, 同时以 β -actin 作为内参, PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.11 Western blot 检测 AQP9 表达 将上述 4 组细胞培养 48 h 后分别提取总蛋白, 各取 50 μ g 蛋白上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 兔抗人 AQP9 抗体及兔抗 β -actin 抗体为一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日以 HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗室温孵育 1 h, 化学发光试剂 BeyoECL Plus 显色, 暗盒压片, 显影定影后 X 光片凝胶成像仪拍照分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 AQP9 基因

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 在 888 bp 位置可见 AQP9 条带 (图 1A)。

2.2 pEGFP-N1-AQP9 的鉴定

2.2.1 PCR 鉴定 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 重组质粒菌液在 888 bp 位置可见 AQP9 条带, 而对照组未见条带 (图 1B)。

2.2.2 酶切鉴定 酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 重组质粒经双酶切可见位于 888 bp 的 AQP9 条带, 而空质粒未见 AQP9 条带 (图 1C)。

2.2.3 测序鉴定 分析测序结果发现插入的 AQP9 基因第 45 位碱基发生突变: A $\rightarrow$ G, 为无义突变, 测序峰图见图 1D。

2.3 pEGFP-N1-AQP9 在 COS-7 细胞中的表达

2.3.1 检测 GFP 的表达 倒置荧光显微镜下观察, pEGFP-N1-AQP9 组和 pEGFP-N1 组可见绿色荧光 (图 2), 而 ddH₂O 组及未处理 COS-7 细胞组未见绿色荧光。

2.3.2 RT-PCR 检测 AQP9 表达 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 只有 pEGFP-N1-AQP9 组能够扩增出位于 888 bp 的 AQP9 条带, 而 pEGFP-N1 组、ddH₂O 组及未处理 COS-7 细胞组均没有 AQP9 条带扩增出来 (图 3A)。

2.3.3 Western blot 检测 AQP9 表达 增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 相对分子量约为 27 kD, AQP9 蛋白约为 29 kD, AQP9/EGFP 融合蛋白约为 56 kD。pEGFP-N1-AQP9 组在 56 kD 可见 AQP9/EGFP 融合蛋白条带, pEGFP-N1 组、ddH₂O 组及未处理 COS-7 细胞组在 56 kD 位置未见条带, 各组在 42 kD 位置均可见 β -actin 条带 (图 3B)。

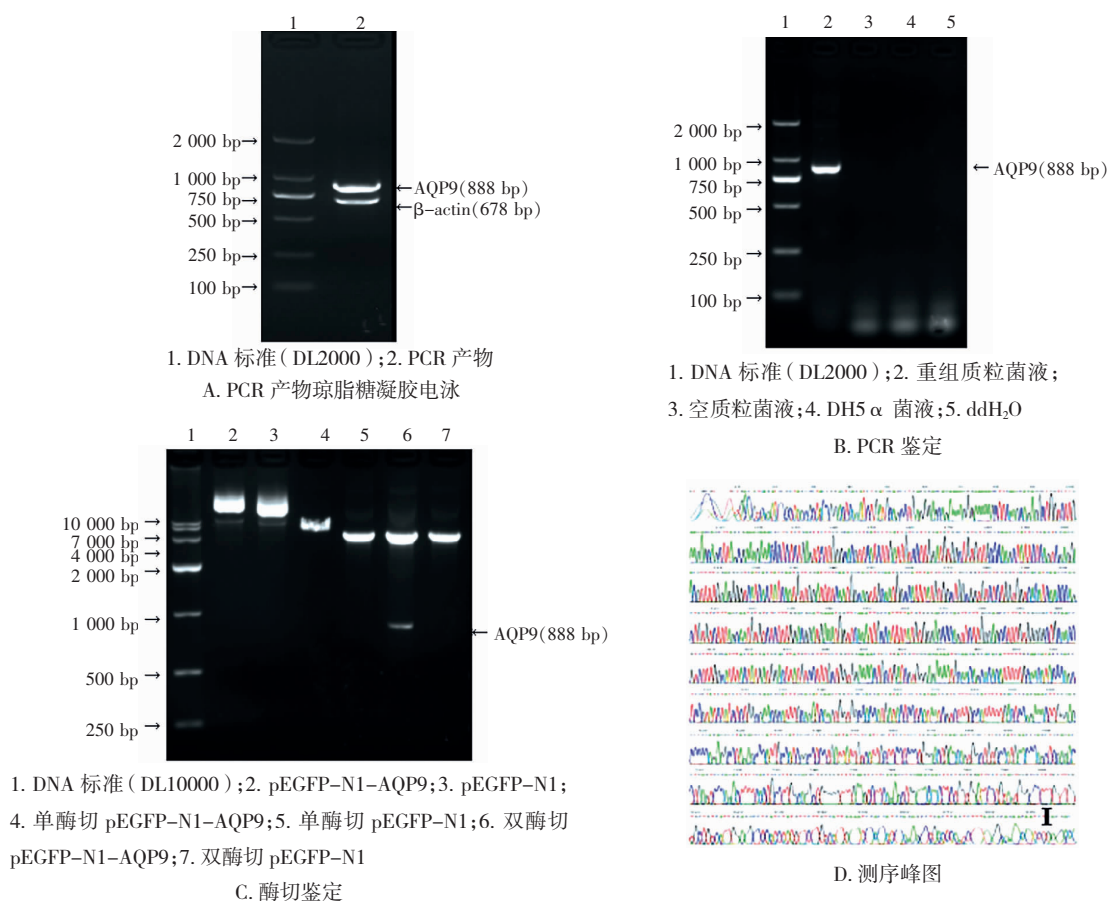
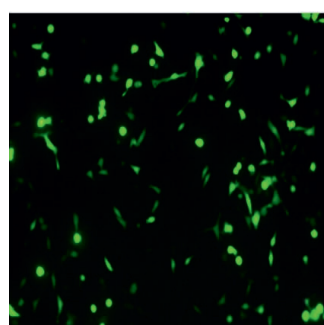
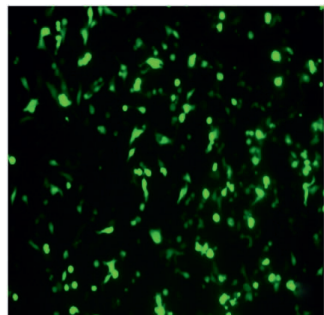


图 1 重组质粒的构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of recombinant plasmid



A. pEGFP-N1-AQP9 组



B. pEGFP-N1 组

图 2 荧光显微镜观察 COS-7 细胞中 GFP 表达 (200 ×)

Fig.2 Expressions of GFP in COS-7 cell detected by fluorescence microscopy (200 ×)

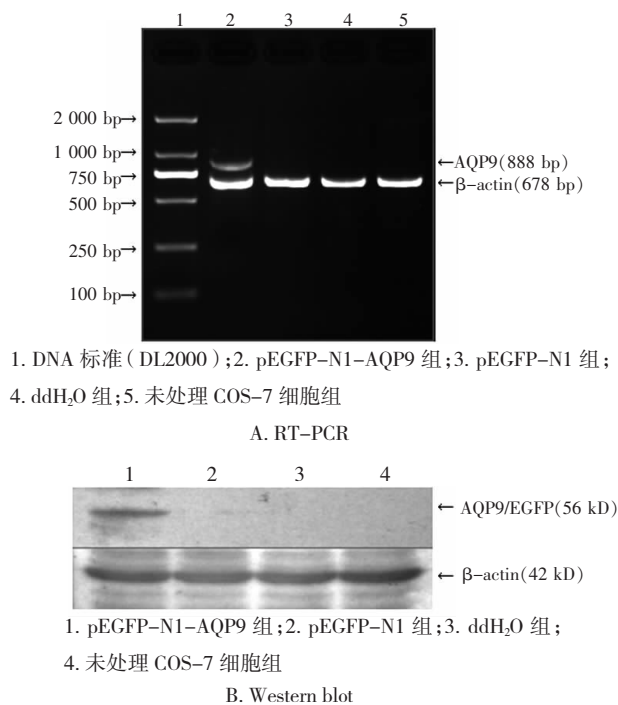


图 3 RT-PCR 及 Western blot 检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

Fig.3 Expressions of recombinant plasmid in COS-7 cell detected by RT-PCR and Western blot

3 讨论

随着 NAFLD 病情发展,主要表现为单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝纤维化和肝硬化,甚至原发性肝癌。脂肪异常分布引起的肝细胞脂肪变性是整个 NAFLD 的起始因素^[5-6],及早发现和治疗肝脏脂肪变性已成为全人类的共同心愿。目前针对 NAFLD 尚没有理想药物,迫切需要一种有效预防和治疗的方法。

水甘油通道蛋白属于主要内源性蛋白家族成员。它们分为两大类,一类为水通道蛋白,只允许水分子通过,而另一类为水甘油通道蛋白,除允许水分子通过外,还允许甘油、尿素甚至某些无机离子通过^[7],AQP9 属于后一类。肝脏通过 AQP9 将血液中的甘油转运至肝细胞内,在肝脏内以甘油和游离脂肪酸为原料合成甘油三酯,维持正常的血脂水平及脂质代谢,在调节机体的甘油运输和脂质代谢方面具有重要的意义。当 AQP9 数量及功能异常升高时,大量甘油进入肝细胞,必将造成肝细胞内脂肪蓄积和肝脏脂肪变性^[8-10]。AQP9 还在肿瘤的治疗方面具有良好的前景,AQP9 对砷离子具有通透性,增加肿瘤细胞膜上 AQP9 表达量可有效提高化疗药物三氧化二砷的疗效并减少用药剂量^[11-14],为提高化疗药物的疗效及依从性提供了一个新的方法。

本研究选用真核表达质粒 pEGFP-N1 以 EGFP 为报告基因,可以清楚的显示质粒的转染情况,且具有不影响目的蛋白的活性,对宿主细胞无毒性等优点。pEGFP-N1 多克隆位点位于 CMV 启动子与 EGFP 之间,转染进入细胞后可以生成目的蛋白/EGFP 融合蛋白,兼具有目的蛋白及 EGFP 的生物活性。

本研究构建重组质粒 pEGFP-N1-AQP9,测序分析发现插入的 AQP9 基因片段有 1 个碱基发生突变,45 位:A→G,为无义突变。将其转染 COS-7 细胞后,倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光,RT-PCR 及 Western blot 可检测到 AQP9 mRNA 及蛋白的表达,说明 pEGFP-N1-AQP9 可转染进入真核细胞并表达。下一步计划将该重组质粒应用于 NAFLD 体外及体内模型中,检测 AQP9 能否引起或加重肝脏

脂肪变性的程度,为进一步研究 AQP9 在 NAFLD 发生发展中的作用奠定基础。

参考文献

- [1] Polyzos S A, Kountouras J, Zavos C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2012, 46(4): 272-284.
- [2] Kim H K, Park J Y, Lee K U, et al. Effect of body weight and lifestyle changes on long-term course of nonalcoholic fatty liver disease in Koreans[J]. *Am J Med Sci*, 2009, 337(2): 98-102.
- [3] Rojek A M, Skowronski M T, Fuchtbauer E M, et al. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3609-3614.
- [4] Higashida T, Peng C, Li J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to brain edema after stroke by regulating aquaporins and glycerol distribution in brain[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2011, 8(1): 44-51.
- [5] Yilmaz Y. NAFLD in the absence of metabolic syndrome: different epidemiology, pathogenetic mechanisms, risk factors for disease progression?[J]. *Semin Liver Dis*, 2012, 32(1): 14-21.
- [6] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1): 1-26.
- [7] Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, et al. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(6): 1213-1228.
- [8] Liu H, Mei Z C, Xiao X. Effects of insulin and LY294002 inhibitors of PI3K on the regulations and expression of aquaporin 9 in normal liver cells[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2010, 18(6): 455-458.
- [9] Miranda M, Ceperuelo-Mallafre V, Lecube A, et al. Gene expression of paired abdominal adipose AQP7 and liver AQP9 in patients with morbid obesity: relationship with glucose abnormalities[J]. *Metabolism*, 2009, 58(12): 1762-1768.
- [10] Maeda N, Hibuse T, Funahashi T. Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190): 233-249.
- [11] Leung J, Pang A, Yuen W H, et al. Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells[J]. *Blood*, 2007, 109(2): 740-746.
- [12] Drobná Z, Walton F S, Paul D S, et al. Metabolism of arsenic in human liver; the role of membrane transporters[J]. *Arch Toxicol*, 2010, 84(1): 3-16.
- [13] Gao L, Gao Y, Li X, et al. Aquaporins mediate the chemoresistance of human melanoma cells to arsenite[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(1): 81-87.
- [14] Hamdi M, Sanchez M A, Beene L C, et al. Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins[J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10: 104.

(责任编辑:冉明会)