

· 论 著 ·

SL7207/pEGFP-N1-AQP9 及 SL7207/pshRNA-AQP9 重组沙门菌的构建及表达^{*}

王 川, 亢渝俊, 姜 政[△], 王丕龙

(重庆医科大学附属第一医院消化内科 400016)

摘 要:目的 将人水甘油通道蛋白 9(AQP9)真核表达质粒 pEGFP-N1-AQP9 及干扰质粒 pshRNA-AQP9 通过电穿孔转化减毒沙门菌株 SL7207,并验证其表达情况,为阐明 AQP9 在非酒精性脂肪肝病(NAFLD)中的作用奠定基础。**方法** 从人肝脏组织中通过 RT-PCR 获得 AQP9 基因,克隆到载体 pEGFP-N1 上,构建真核表达质粒 pEGFP-N1-AQP9,设计合成针对人 AQP9 的 siRNA,退火形成双链 shRNA,并插入 pGenesil-1 质粒中,构建干扰质粒 pshRNA-AQP9,电穿孔转化减毒沙门菌株 SL7207,通过 PCR、Western blot 验证其表达情况,并检测其稳定性。**结果** 成功构建 pEGFP-N1-AQP9 及 pshRNA-AQP9 重组质粒,将其转化 SL7207 后,能在重组沙门菌中表达。**结论** 成功构建 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 及 SL7207/pshRNA-AQP9 重组沙门菌,为进一步研究 AQP9 对 NAFLD 的基因治疗奠定基础。

关键词:水甘油通道蛋白质类;非酒精性脂肪肝病;重组质粒;基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3465-03

Construction and expression of recombinant Salmonella SL7207/pEGFP-N1-AQP9 and SL7207/pshRNA-AQP9^{*}

Wang Chuan, Kang Yujun, Jiang Zheng[△], Wang Pilong

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To transform human aquaglyceroporin 9(AQP9) recombinant eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-AQP9 and interference plasmid pshRNA-AQP9 into attenuated Salmonella strain SL7207 by electroporation and detect their expression, in order to lay the foundation for elucidating the human AQP9 in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** AQP9 gene was obtained by RT-PCR from human hepatic tissue and cloned into pEGFP-N1 vector, recombinant eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-AQP9 was constructed, designed and synthesized human AQP9 SiRNA, annealed to double-stranded ShRNA, inserted to pGenesil-1 plasmid, interference plasmid pshRNA-AQP9 was constructed, and then transformed into attenuated Salmonella strain SL7207 by electroporation, the expression were detected by PCR and Western Blot, and we detected their stability. **Results** Recombinant plasmid pEGFP-N1-AQP9 and pshRNA-AQP9 were constructed, transformed into attenuated Salmonella strain SL7207, after transformed into SL7207, could express in recombinant Salmonella. **Conclusion** Recombinant Salmonella SL7207/pEGFP-N1-AQP9 and SL7207/pshRNA-AQP9 are successfully constructed, lay the foundation for further study on the gene therapy of NAFLD with AQP9.

Key words: aquaglyceroporins; nonalcoholic fatty liver disease; recombinant vector; gene therapy

非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)已经成为世界性的公共卫生难题^[1-2]。NAFLD与脂肪代谢异常密切相关,而水甘油通道蛋白(aquaglyceroporin, AQP)正是参与甘油转运的重要膜蛋白^[3]。人AQP9位于肝细胞膜门静脉面,其主要功能是摄取甘油,肝细胞内过量脂肪蓄积将导致NAFLD的形成^[4]。本研究将真核表达质粒pEGFP-N1-AQP9及干扰质粒pshRNA-AQP9电穿孔转化减毒沙门菌株SL7207,通过PCR、Western blot验证其表达情况,并检测其稳定性,构建了SL7207/pEGFP-N1-AQP9及SL7207/pshRNA-AQP9重组沙门菌,为进一步研究AQP9对NAFLD的基因治疗奠定基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织和细胞 人肝脏组织取自本院肝胆外科手术患者(经患者同意);减毒沙门菌株SL7207由重庆医科大学附属第

一医院向廷秀博士惠赠。

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;凝胶回收纯化试剂盒,质粒少量提取试剂盒购自美国OMEGA公司;兔抗人AQP9抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒pEGFP-N1-AQP9的构建 根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)中人AQP9基因序列设计AQP9巢式PCR引物,外侧上游引物:5'-GAT TTC GGG TTC TAA GTC GC-3',外侧下游引物:5'-GAG AAT CCC AAA CTG ACT GC-3';内侧上游引物:5'-GGA AGA TCT GAT GCA GCC TGA GGG AG-3';内侧下游引物:5'-CGG GGT ACC CTG AGT TCA TAT TTC TCT GG-3',内侧上下游引物分别加入BglⅡ及KpnⅠ酶切位点,产物长度为888 bp。提取人肝脏组织的总RNA,反转录合成cDNA,巢式PCR方法扩增

^{*} 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81070318);重庆市卫生局医学科研资助项目(渝卫科教2010-2-100)。 [△] 通讯作者, Tel: 13500328655; Email: jiangz1753@163.com。

AQP9 基因, 所获 PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 进行凝胶回收纯化。分别将 AQP9 基因和 pEGFP-N1 质粒进行 BglⅡ 和 KpnⅠ 双酶切, 并凝胶回收纯化。将 AQP9 和 pEGFP-N1 用 T4 DNA Ligase 连接过夜, 产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑取经卡那霉素筛选的单克隆阳性菌落, 摇菌扩增并提取重组质粒, 命名为 pEGFP-N1-AQP9。

1.2.2 干扰质粒 pshRNA-AQP9 的构建 根据 NCBI 中人 AQP9 基因序列, 在 256 位选择 1 条 21 bp 的 siRNA 靶序列, 并设计 21 bp 的无关序列为阴性对照, TTCG 茎环序列形成发夹, 其后为 siRNA 靶序列的反向重复序列, 尾端加入 6 个 T 作为转录终止信号, 5' 端及 3' 端分别加入 BamHⅠ 及 HindⅢ 酶切位点。靶核苷酸序列上游引物: 5'-GAT CCG CTG TGT CTT TAG CAA TGT GTT TCG ACA CAT TGC TAA AGA CAC AGC TTT TTT A-3', 下游引物: 5'-AGC TTA AAA AAG CTG TGT CTT TAG CAA TGT GTC GAA ACA CAT TGC TAA AGA CAC AGC G-3'; 阴性对照序列上游引物: 5'-GAT CCG AAT CCG CAC TAC TCC TTA CAT TCG TGT AAG GAG TAG TGC GGA TTC TTT TTT A-3', 下游引物: 5'-AGC TTA AAA AAG AAT CCG CAC TAC TCC TTA CAC GAA TGT AAG GAG TAG TGC GGA TTC G-3'。经 BLAST 检索确定为特异性序列。将 2 对寡核苷酸链分别溶解在退火缓冲液中, 置 95 ℃ 水浴箱 5 min, 冷却至室温退火形成双链。BamHⅠ 和 HindⅢ 双酶切 pGenesil-1 质粒, 凝胶回收纯化, 将 shRNA 和 pGenesil-1 用 T4 DNA Ligase 连接过夜, 产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑取经卡那霉素筛选的单克隆阳性菌落, 摇菌扩增并提取重组质粒, 分别命名为 pshRNA-AQP9 及 pshRNA-阴性对照。

1.2.3 重组质粒的鉴定

1.2.3.1 酶切鉴定 将 pEGFP-N1-AQP9 与 pEGFP-N1 分别进行单酶切(BglⅡ)及双酶切(BglⅡ和 KpnⅠ), 将 pshRNA-AQP9、pshRNA-阴性对照与 pGenesil-1 进行双酶切(EcoRⅠ和 HindⅢ), 酶切产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3.2 测序鉴定 将酶切鉴定正确的重组质粒送至上海生工及重庆医科大学感染病重点实验室测序。

1.2.4 感受态 SL7207 的制备 挑取经 LB 平板培养的单克隆 SL7207 菌落接种于 LB 液体培养基中摇菌扩增, 待细菌至对数生长期(OD₆₀₀ 为 0.4~0.6)时停止培养, 冰浴 30 min, 4 ℃ 4 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 等体积灭菌 10% 甘油重悬细菌, 重复离心重悬 3 次, -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.5 重组质粒电穿孔转化 SL7207 将 pEGFP-N1-AQP9、pEGFP-N1、pshRNA-AQP9、pshRNA-阴性对照及 pGenesil-1 分别与感受态 SL7207 混匀, 转入电穿孔杯中冰浴 10 min, 使用 BIO-RAD 电穿孔系统进行电转化, 参数设置为电压 2.5 kV, 电流 25 mA, 电阻 200 Ω , 时间 4.5~5.0 ms。放电完毕后加入 LB 液体培养基中振荡 1 h, 涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上培养, 挑选单克隆阳性菌落摇菌扩增, 分别命名为 SL7207/pEGFP-N1-AQP9、SL7207/pEGFP-N1、SL7207/pshRNA-AQP9、SL7207/pshRNA-阴性对照及 SL7207/pGenesil-1。

1.2.6 重组沙门菌的鉴定

1.2.6.1 绿色荧光蛋白检测重组质粒表达 将重组沙门菌及 SL7207 接种于含卡那霉素的 LB 平板培养 18 h, 倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况。

1.2.6.2 PCR 检测 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 中 AQP9 基因的表达 以 SL7207/pEGFP-N1-AQP9、SL7207/pEGFP-N1 及 SL7207 菌液为模板, 用 AQP9 内侧引物进行 PCR 反应, 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

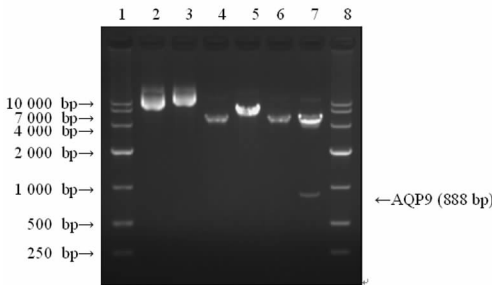
1.2.6.3 Western blot 检测 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 中 AQP9 蛋白的表达 将 SL7207/pEGFP-N1-AQP9、SL7207/pEGFP-N1 及 SL7207 菌液室温 10 000 r/min 离心, 弃上清液, 在沉淀中加入 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 进行 Western blot 检测 AQP9 蛋白的表达。

1.2.7 检测重组沙门菌的稳定性 将重组沙门菌分别在含和不含卡那霉素的 LB 液体培养基摇菌扩增 30 代, 每 10 代提取 1 次质粒, 进行双酶切反应, 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

2 结 果

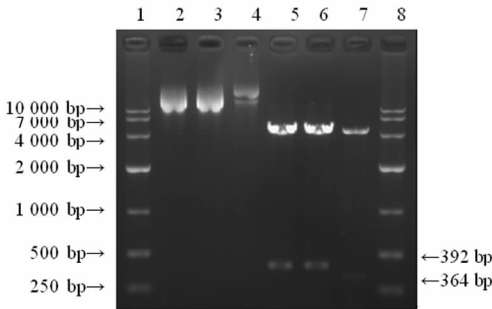
2.1 重组质粒的鉴定

2.1.1 酶切鉴定 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果显示: pEGFP-N1-AQP9 单酶切片段高于 pEGFP-N1 单酶切片段, pEGFP-N1-AQP9 经双酶切可切出 AQP9 目的条带(图 1)。pshRNA-AQP9 及 pshRNA-阴性对照经双酶切产生的小片段高于 pGenesil-1 的小片段(图 2), 初步说明重组质粒构建成功。



1、8: DNA Marker (DL 10 000); 2: pEGFP-N1; 3: pEGFP-N1-AQP9; 4: 单酶切 pEGFP-N1; 5: 单酶切 pEGFP-N1-AQP9; 6: 双酶切 pEGFP-N1; 7: 双酶切 pEGFP-N1-AQP9。

图 1 pEGFP-N1-AQP9 酶切鉴定



1、8: DNA Marker (DL 10 000); 2: pshRNA-AQP9; 3: pshRNA-阴性对照; 4: pGenesil-1; 5: 双酶切 pshRNA-AQP9; 6: 双酶切 pshRNA-阴性对照; 7: 双酶切 pGenesil-1。

图 2 pshRNA-AQP9 酶切鉴定

2.1.2 测序鉴定 测序结果经分析, pEGFP-N1-AQP9 发现 1 个碱基突变, 45 位: A $\rightarrow$ G, 为无义突变, pshRNA-AQP9 未发生突变, 且插入位置正确, 说明重组质粒构建成功。

2.2 重组沙门菌的鉴定

2.2.1 绿色荧光蛋白检测重组质粒表达 倒置荧光显微镜下观察, 重组沙门菌均可见绿色荧光(封 2 图 3), 而 SL7207 未见

绿色荧光,说明重组质粒已成功转化进入 SL7207 并表达。

2.2.2 PCR 检测 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 中 AQP9 基因的表达 产物经琼脂糖凝胶电泳,结果显示:SL7207/pEGFP-N1-AQP9 位于 888 bp 有 AQP9 目的条带,而 SL7207/pEGFP-N1 及 SL7207 未见条带(图 4)。证明 pEGFP-N1-AQP9 已成功转化进入 SL7207。

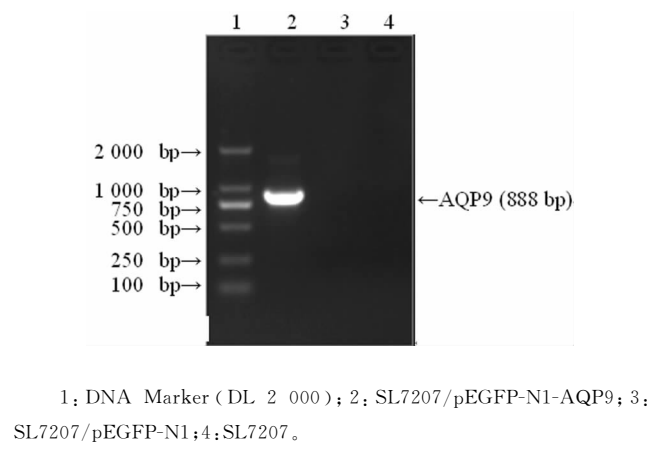


图 4 PCR 检测 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 中 AQP9 基因的表达

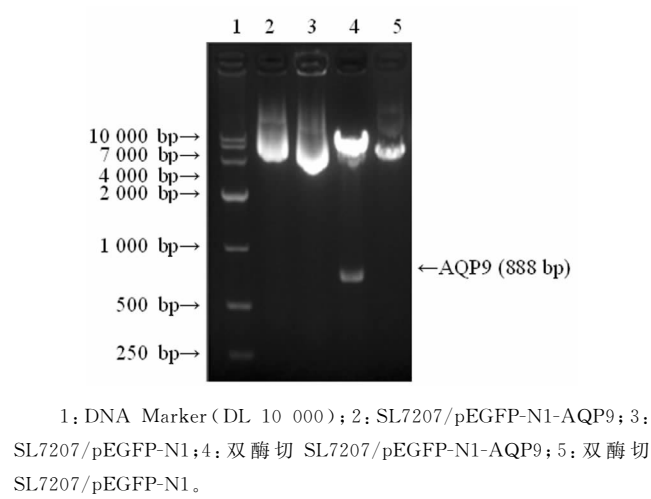


图 5 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 酶切鉴定

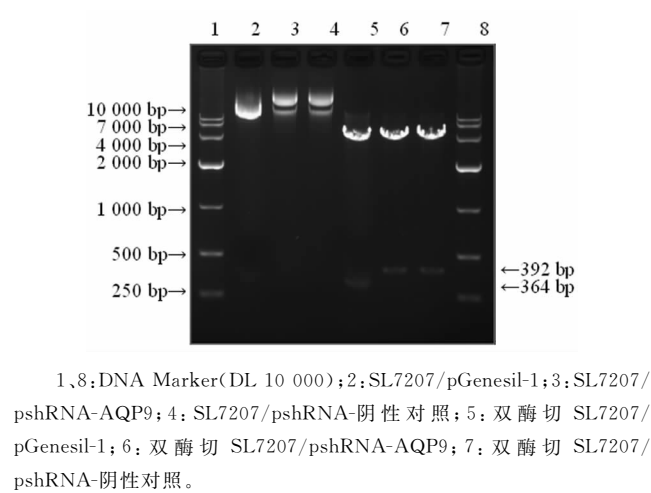


图 6 SL7207/pshRNA-AQP9 酶切鉴定

2.2.3 Western blot 检测 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 中 AQP9 蛋白的表达 AQP9 蛋白相对分子质量约为 29×10^3 ,软件预

测绿色荧光蛋白(GFP)相对分子质量约为 27×10^3 ,融合蛋白 GFP/AQP9 相对分子质量约为 56×10^3 ,经 Western blot 检测,SL7207/pEGFP-N1-AQP9 可见 GFP/AQP9 条带,SL7207/pEGFP-N1 及 SL7207 未见条带,再次证明 pEGFP-N1-AQP9 已成功转化进入 SL7207。

2.3 检测重组沙门菌的稳定性 琼脂糖凝胶电泳结果显示:重组沙门菌扩增 30 代能够提出重组质粒,且经双酶切能切出目的条带(图 5、6)。说明重组沙门菌在无卡那霉素选择压力下未丢失质粒,具有稳定性。

3 讨论

关于 NAFLD 的发病机制,目前主要倾向于“二次打击学说”,脂质代谢异常作为第一次打击将导致单纯性非酒精性脂肪肝,并引起肝脏对第二次打击的敏感性增加,而炎症因子作为第二次打击将引起肝细胞炎症及坏死,最终导致肝纤维化及肝硬化。由此可见,脂质代谢异常引起的肝细胞脂肪蓄积是整个 NAFLD 的起始因素^[5],尽早减轻肝细胞脂肪蓄积能够有效治疗 NAFLD,并阻止肝脏病变向纤维化进展。

肝脏脂肪蓄积与血脂异常密切相关,常见于肥胖、胰岛素抵抗、2 型糖尿病及代谢综合征患者,与肥胖关系最为密切^[6-7]。在生理状态下,肝细胞通过 AQP9 将血浆中的甘油摄取至细胞内,维持正常的血脂水平及脂质代谢,而在高脂血症及 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]。通过生物工程技术阻断人肝脏细胞 AQP9 的表达,可以有效减轻脂肪在肝脏的过多蓄积,为 NAFLD 的治疗与预防提供了一条崭新的途径^[11-12]。

减毒沙门菌作为 DNA 疫苗载体,保持了其侵袭能力,携带的外源性 DNA 能够在肝、脾、淋巴结等单核-巨噬细胞系统高效地表达。减毒沙门菌作为疫苗具有价格便宜、方法简单、接种方便、不良反应小和免疫原性强等优点,特别是它能引起较强的黏膜免疫反应。减毒沙门菌作为外源基因的良好载体在免疫功能紊乱及肿瘤防治等的基因治疗方面取得了广泛的应用和大量的研究成果^[13]。

本研究将 pEGFP-N1-AQP9 及 pshRNA-AQP9 电穿孔转化减毒沙门菌株 SL7207,通过 PCR、Western blot 验证其能在重组沙门菌中表达,并具有稳定性,成功构建了 SL7207/pEGFP-N1-AQP9 及 SL7207/pshRNA-AQP9 重组沙门菌,为进一步研究 AQP9 对 NAFLD 的基因治疗奠定基础。

参考文献:

[1] Kim HK, Park JY, Lee KU, 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.

[2] Polyzos SA, 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.

[3] Rojek AM, Skowronski MT, Füchtbauer EM, et al. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9(AQP9) knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(9): 3609-3614.

(下转第 3470 页)

于冷冻切片与石蜡切片标本,且不需要分析大量组织切片,可用于术前直肠黏膜活检及术后病理检查,是一种较准确的诊断 HD 的方法,有望成为新生儿 HD 诊断的一种新的实用性、准确性均较高的方法。但免疫组织化学法检测 CR 从技术角度上时间需要 2~3 d,不能用于术中快速诊断,需与其他方法联合应用以提高 HD 术中快速诊断率。

参考文献:

[1] Lwashita T, Kruger GM, Pardal R, et al. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function[J]. Science, 2003, 301(5635): 972-976.

[2] Montedonico S, Cáceres P, Muñoz N, et al. Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years experience with more than 1 500 biopsies[J]. Pediatr Surg Int, 2011, 27(5): 479-486.

[3] 杨小进, 林传友, 胡道松, 等. 外周蛋白和组织蛋白酶 D 在先天性巨结肠症中的表达[J]. 中华小儿外科杂志, 2004, 25(3): 261-263.

[4] Pacheco MC, Bove KE. Variability of acetylcholinesterase hyperinnervation patterns in distal rectal suction biopsy specimens in Hirschsprung disease [J]. Pediatr Dev Pathol, 2008, 11(4): 274-282.

[5] Nakao M, Suita S, Taguchi T, et al. Fourteen-year experience of acetylcholinesterase staining for rectal mucosal biopsy in neonatal Hirschsprung's disease [J]. J Pediatr Surg, 2001, 36(9): 1357-1363.

[6] Chentanez V, Chittmittrapap S, Cheepsoonthorn P, et al.

New classification of histochemical staining patterns of acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy in Hirschsprung's disease [J]. Med Assoc Thai, 2000, 83(10): 1196-1201.

[7] Kapur RP, Reed RC, Finn LS, et al. Calretinin immunohistochemistry versus acetylcholinesterase histochemistry in the evaluation of suction rectal biopsies for Hirschsprung disease[J]. Pediatr Dev Pathol, 2009, 12(1): 6-15.

[8] 刘虎, 徐兵. 新生儿巨结肠诊断的现状与进展[J]. 医学综述, 2010, 16(16): 2433-2435.

[9] Holland SK, Hessler RB, Reid-Nicholson MD, et al. Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease[J]. Modern Pathology, 2010, 23(9): 1173-1179.

[10] Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease[J]. Mod Pathol, 2009, 22(10): 1379-1384.

[11] 朱进, 金先庆. BCL-2、钙视网膜蛋白在发育异常肠壁神经节细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 60-62.

[12] Khan AR, Vuianic GM, Huddart S. The constipated child; how likely is Hirsehsprung s disease[J]. Pediatr Surg Int, 2003, 19(6): 439-442.

(收稿日期: 2012-02-13 修回日期: 2012-07-27)

(上接第 3467 页)

[4] Jelen S, Wacker S, Aponte-Santamaria C, et al. Aquaporin-9 protein is the primary route of hepatocyte glycerol uptake for glycerol gluconeogenesis in mice [J]. J Biol Chem, 2011, 286(52): 44319-44325.

[5] 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.

[6] Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis [J]. Diabetes Metab, 2008, 34(6): 643-648.

[7] Gupta R, Bhangoo A, Matthews NA, et al. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in obese children [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2011, 24(11/12): 907-911.

[8] 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.

[9] Liu H, Mei ZC, Xiao X. Effects of insulin and LY294002

inhibitors of PI3K on the regulations and expression of aquaporin 9 in normal liver cells [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2010, 18(6): 455-458.

[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] Guo XQ. Advances in reserch on aquaglyceroporin and glycerol transport [J]. Bull Acad Mil Med Sci, 2007, 31(5): 487-489.

[12] Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, et al. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control [J]. Cell Cycle, 2011, 10(10): 1548-1556.

[13] Zhang H, Wen K, Shen J, et al. Characterization of immune responses following intranasal immunization with the Mycobacterium bovis CFP-10 protein expressed by attenuated Salmonella typhimurium [J]. Scand J Immunol, 2010, 72(4): 277-283.

(收稿日期: 2012-02-03 修回日期: 2012-07-01)