

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.30.003

## 人 AQP1-shRNA 表达质粒载体的构建与筛选\*

李卓,康炜<sup>△</sup>,辛娜,田宇,李建华  
(西安医学院第一附属医院检验科 710077)

**[摘要]** **目的** 构建针对人水通道蛋白 1(AQP1)基因的 shRNA 表达质粒载体,并验证其干扰效果,为进一步探讨 AQP1 基因对人乳腺癌细胞的作用及机制奠定基础。**方法** 设计合成 4 对针对人 AQP1 基因不同位点的 shRNA 片段,通过 DNA 重组技术将其插入载体 GV115 中,构建 AQP1-shRNA 重组质粒,转染人乳腺癌 MCF-7 细胞,并通过实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和 Western blot 法检测干扰效率。**结果** RT-PCR 证实 AQP1 在乳腺癌 MCF-7 细胞中有表达。测序验证表明 4 对靶向 AQP1-shRNA 表达载体均构建成功。4 组干扰载体能够从基因和蛋白表达水平不同程度抑制 AQP1 表达,其中以 AQP1-shRNA 4 对 AQP1 的干扰效率最强。**结论** 成功地构建了针对人 AQP1 基因的 shRNA 重组质粒,能够有效抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 中 AQP1 的表达。

**[关键词]** 乳腺癌;人水通道蛋白 1;shRNA**[中图分类号]** R73-36+2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)30-4183-04

## Construction and screening of human AQP1 shRNA expression vectors\*

Li Zhuo, Kang Wei<sup>△</sup>, Xin Na, Tian Yu, Li Jianhua

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710077, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct and screen effective shRNA expression vectors targeting human AQP1 gene, and evaluate the interference efficiency of the AQP1 shRNA recombinant plasmids, thus provide basis for further exploration on the effect and mechanism of AQP1 gene on human breast cancer cells. **Methods** Four pairs of shRNA sequences targeting human AQP1 gene were designed and synthesized, and then inserted into the GV115 vector. AQP1 shRNA and control shRNA plasmids were transfected into human breast cancer MCF-7 cells. The expression of AQP1 mRNA and protein were detected by real time PCR(RT-PCR) and Western blot to evaluate the interfering efficiency. **Results** RT-PCR demonstrated that AQP1 was expressed in human breast cancer MCF-7 cells. Sequencing showed that the shRNA vectors targeting AQP1 were successfully constructed. 48 h after the AQP1 shRNA transfection, AQP1 mRNA and protein expression levels in MCF-7 cells were reduced to a significant degree, and the AQP1 shRNA 4 plasmid vector could inhibit the AQP1 most efficiently. **Conclusion** The AQP1 shRNA recombinant plasmids vectors were successfully constructed and can significantly inhibit the expression of AQP1 in MCF-7 human breast cancer cells.

**[Key words]** breast neoplasms; aquaporin 1; shRNA

RNA 干扰技术可以使目的基因表达受抑,现已广泛应用于肿瘤的分子治疗研究<sup>[1]</sup>。水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一族广泛存在于生物细胞膜上的能高效特异转运水的膜通道蛋白,在其众多成员中目前对水通道蛋白 1(aquaporin1, AQP1)的研究最为深入<sup>[2]</sup>。前期研究中笔者已证实乳腺癌组织中广泛表达 AQP1 蛋白,且发现其表达水平与肿瘤淋巴结转移及微血管生成关系密切,提示 AQP1 可能参与了乳腺癌的发生、发展<sup>[3]</sup>。本研究采用 RNA 干扰特异性沉默乳腺癌 MCF-7 细胞 AQP1 基因的表达,通过检测 AQP1 mRNA 和蛋白的表达情况评价其抑制作用,探讨 RNA 干扰 AQP1 在乳腺癌基因治疗中的可行性,以期对乳腺癌的治疗提供新的依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 人乳腺癌 MCF-7 细胞株由本院中心实验室提供。Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 及 Trizol 均购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 Age I、EcoR I, T4 DNA 连接酶, Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent Kit 及 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂均购自 TAKARA 公司。GV115 vector 为上海吉凯公司产品。兔抗人 AQP1 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,兔抗人  $\beta$ -actin 抗体购自 Ab-

cam 公司。DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 乳腺癌 MCF-7 细胞,采用含 10% 小牛血清、100  $\mu$ /mL 青/链霉素的 RPMI 1640 培养基,37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规传代培养。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 MCF-7 细胞中 AQP1 基因的表达**

**1.2.2.1 细胞总 RNA 提取** 对数生长期的细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,采用 Trizol 试剂提取总 RNA,用紫外分光光度计进行 RNA 定量,并采用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 提取质量。

**1.2.2.2 RT-PCR** RT-PCR 扩增按照 TaKaRa RNA PCR Kit 说明书进行,将总 RNA 逆转录合成 cDNA,再以其为模板,采用 AQP1 基因特异性引物进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系 25  $\mu$ L,反应条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,58  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶图像分析仪观察结果。AQP1 基因引物序列为:上游,5'-GAT CAC ACA CAA CTT CAG CAA CCA-

3';下游,5'-TTC ACG CGG TCT GTG AGG TC-3',扩增产物 126 bp,由 TAKARA 公司合成。

### 1.2.3 构建 AQP1-shRNA 重组质粒载体

**1.2.3.1 shRNA 的设计** 根据 GeneBank 中人 AQP1 基因的已知序列,选择其基因编码区的 4 个 19nt 的寡核苷酸序列作为靶点(表 1),设计并合成与之对应的 cDNA 模板序列,分别命名为 AQP1-1, AQP1-2, AQP1-3, AQP1-4(表 2),由上海吉凯公司合成,同时以一条无意序列作为阴性对照。

**1.2.3.2 shRNA 表达载体的构建和鉴定** 将合成的目的基因片段稀释成 100  $\mu\text{mol/L}$ ,各取 5  $\mu\text{L}$  配成混合液于 PCR 仪中 95  $^{\circ}\text{C}$ ,5 min,室温静置 20 min,形成双链 DNA 片段。同时,使用 Age I 和 EcoR I 对 GV115 载体于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,4 h 进行酶切。将干扰片段分别与线性化的 GV115 质粒表达载体进行连接,16  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜。取连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,于含氨苄霉素抗性的 LB 培养板上过夜培养,挑取阳性菌落,扩增提取质粒,行测序鉴定。分别命名为 AQP1-shRNA1、AQP1-shRNA2、AQP1-shRNA3 和 AQP1-shRNA4,阴性对照命名为 Con-shRNA。

**1.2.4 重组质粒转染人乳腺癌 MCF-7 细胞** 收集对数生长期细胞,调整浓度为  $1 \times 10^5$  个/孔,按每孔 2 mL 加入 6 孔板中,待细胞对数生长期时进行转染。实验分 6 组,分别为空白对照组、对照 shRNA 组和转染组(4 个 AQP1-shRNA 组),每组设 3 复孔。具体操作按照 Invitrogen 公司 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂说明书进行。每孔加入 4  $\mu\text{g}$  质粒,将其与脂质体按比例组成的复合物逐滴加入 6 孔板中,轻轻晃动使其分布均匀。正常对照组每孔加入等体积的 RPMI 1640 培养基(不含血清和抗生素)。37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 h,之后更换含有血清的新鲜培养基,置 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养。

### 1.2.5 shRNA 对 MCF-7 细胞 AQP1 表达抑制率的检测

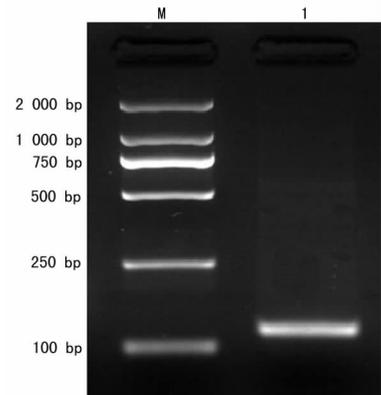
**1.2.5.1 RT-PCR 法检测 AQP1 mRNA 的表达** 转染 48 h 后,提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,以其为模板,采用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂进行 RT-PCR,20  $\mu\text{L}$  反应体系,包括 10  $\mu\text{L}$  2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>,正、反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ ,ROX Reference Dye II 0.4  $\mu\text{L}$ ,cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ ,双蒸水 6.8  $\mu\text{L}$ 。各设 3 个平行复孔,使用 ABI 7500 快速 RT-PCR 仪,反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s 预变性,95  $^{\circ}\text{C}$  3 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环。反应结束后确认扩增曲线和溶解曲线。AQP1 基因所采用的 PCR 反应引物与 1.2.2.2 RT-PCR 引物序列相同。此外,同时引入  $\beta$ -actin 基因作为内参,引物序列为:上游,5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3';下游,5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGG A-3',由 TAKARA 公司合成。AQP1 的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行计算,并用 GraphPad Prism 5 软件进行分析和绘图。

**1.2.5.2 Western blot 法检测 AQP1 蛋白的表达** 细胞转染 48 h 后,提取细胞总蛋白,采用 BCA 法定量。配制 12% 的凝胶进行 SDS-PAGE 电泳,电转膜,封闭,洗膜后分布加入一抗(兔抗人 AQP1 抗体 1 : 1 000 稀释,兔抗人  $\beta$ -actin 抗体 1 : 2 000 稀释),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1 : 5 000 稀释),采用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统进行结果扫描。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较数据采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 AQP1 在乳腺癌 MCF-7 细胞中有表达** 采用 RT-PCR 法,所得产物经过琼脂糖凝胶电泳,可以看到 126 bp 处有明显条带,证实 AQP1 在乳腺癌细胞 MCF-7 中有表达,见图 1。



M:DL2000 DNA Marker;1:MCF-7 细胞。

图 1 RT-PCR 检测人乳腺癌 MCF-7 细胞中的 AQP1 mRNA

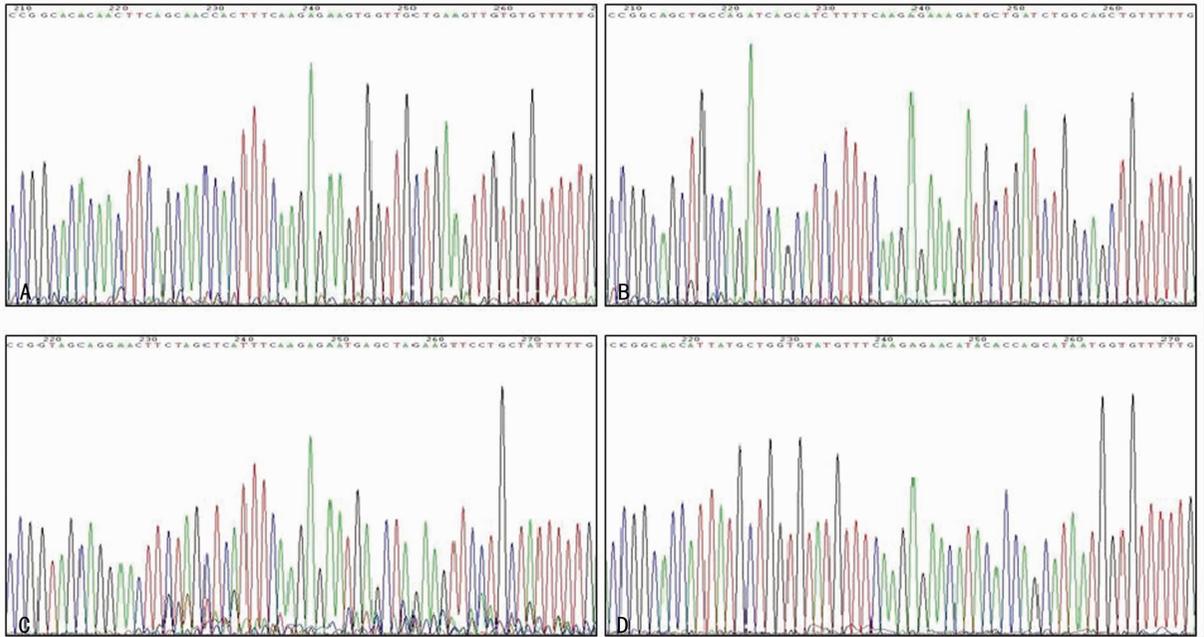
**2.2 重组质粒鉴定及转染率检测** 构建的重组质粒载体 AQP1-shRNA 经 DNA 测序比对,证实插入序列与所设计的 DNA 序列完全一致,无突变碱基,表明靶向 AQP1 基因的 shRNA 质粒表达载体构建成功,见图 2。重组质粒在脂质体介导下转染人乳腺癌 MCF-7 细胞,转染 6 h 后,倒置相差荧光显微镜下即可观察到 MCF-7 细胞内逐渐出现绿色荧光,48 h 时荧光强度最强,根据转染细胞的荧光判断其转染效率约为 50%,见图 3。

表 1 AQP1 靶序列信息

AQP1-shRNA 组	Target 序列信息	起始位置 信息	GC 含量 (%)
1	CAC AAC TTC AGC AAC CAC T	666	47.37
2	GCT GCC AGA TCA GCA TCT T	313	52.63
3	GCA GGA ACT TCT AGC TCA T	2 409	47.37
4	CCA TTA TGC TGG TGT ATG T	1 863	42.11

表 2 AQP1-shRNA 序列信息

AQP1-shRNA 组	5'	stem	loop	stem	3'
1	F Ccgg	caCACAACTTCAGCAACCACT	TTCAAGAGA	AGTGGTTGCTGAAGTTGTGtg	TTTTTg
	R aattcaaaaa	caCACAACTTCAGCAACCACT	TTCAAGAGA	AGTGGTTGCTGAAGTTGTGtg	
2	F Ccgg	caGCTGCCAGATCAGCATCTT	TTCAAGAGA	AAGATGCTGATCTGGCAGCtg	TTTTTg
	R aattcaaaaa	caGCTGCCAGATCAGCATCTT	TTCAAGAGA	AAGATGCTGATCTGGCAGCtg	
3	F Ccgg	taGCAGGAACTTCTAGCTCAT	TTCAAGAGA	ATGAGCTAGAAGTTCTGCTa	TTTTTg
	R aattcaaaaa	taGCAGGAACTTCTAGCTCAT	TTCAAGAGA	ATGAGCTAGAAGTTCTGCTa	
4	F Ccgg	caCCATTATGCTGGTGTATGT	TTCAAGAGA	ACATACACCAGCATAAATGGtg	TTTTTg
	R aattcaaaaa	caCCATTATGCTGGTGTATGT	TTCAAGAGA	ACATACACCAGCATAAATGGtg	



A: AQP1-shRNA1 组; B: AQP1-shRNA2 组; C: AQP1-shRNA3 组; D: AQP1-shRNA4 组。

图 2 AQP1-shRNA 重组质粒测序峰图

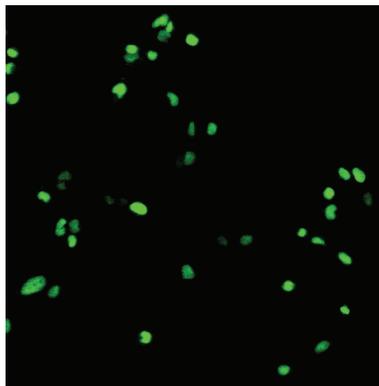
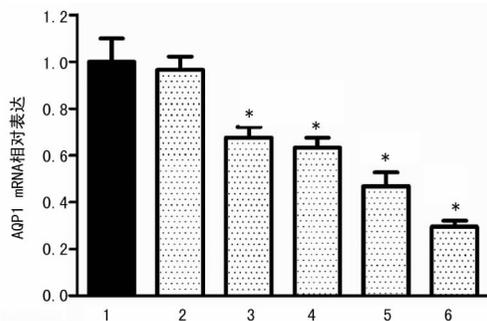


图 3 荧光显微镜观察 AQP1-shRNA 重组质粒转染 48 h 后的 MCF-7 细胞 (×200)



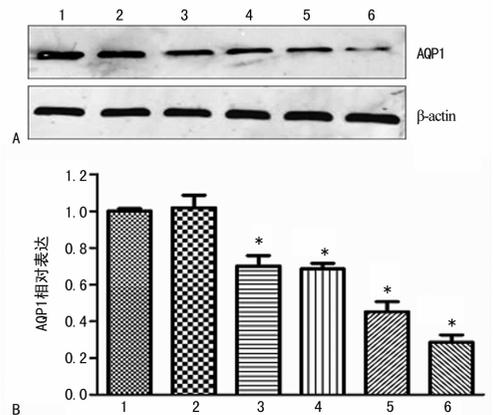
1: 空白对照组; 2: 对照 shRNA 组; 3: AQP1-shRNA1 组; 4: AQP1-shRNA2 组; 5: AQP1-shRNA3 组; 6: AQP1-shRNA4 组; \*:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较。

图 4 AQP1-shRNA 转染 MCF-7 细胞后 AQP1 mRNA 的表达量

**2.3 AQP1-shRNA 对 MCF-7 细胞中 AQP1 mRNA 水平的抑制作用** RT-PCR 检测结果表明, 各转染组和对照组均有 AQP1 和内参  $\beta$ -actin 的特异性扩增, 扩增曲线平滑, 溶解曲线

特异。经  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析, 转染组细胞的 AQP1 mRNA 表达水平呈不同程度降低, 抑制率分别为 32.37%、36.63%、53.20% 和 70.54%, 见图 4。

**2.4 AQP1-shRNA 对 MCF-7 细胞中的 AQP1 蛋白表达的抑制作用** Western blot 法检测结果显示, 与空白对照组比较, 4 组 AQP1-shRNA 转染后 MCF-7 细胞中的 AQP1 蛋白表达量均不同程度减低, 分别为  $0.70 \pm 0.06$ 、 $0.68 \pm 0.03$ 、 $0.45 \pm 0.06$  和  $0.29 \pm 0.04$ , 其中以 AQP1-shRNA4 的表达量最低, 见图 5。



A: Western blot; B: 蛋白表达量。1: 空白对照组; 2: 对照 shRNA 组; 3: AQP1-shRNA1 组; 4: AQP1-shRNA2 组; 5: AQP1-shRNA3 组; 6: AQP1-shRNA4 组; \*:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较。

图 5 AQP1-shRNA 转染 MCF-7 细胞后 AQP1 蛋白表达量

### 3 讨论

近年来大量研究证实, 机体广泛存在着特异性水通道蛋白家族 (aquaporins, AQP<sub>s</sub>)<sup>[4-5]</sup>, 目前已从动物组织中鉴定出 13 种水通道蛋白亚型 (AQP<sub>0</sub>~12), 其中对 AQP1 的研究最为

深入<sup>[2,6]</sup>。AQP1 分布广泛,具有特异转运水的功能。研究发现,AQP1 可表达于多种肿瘤组织中,它可能与肿瘤细胞的起源、生长及转移等密切相关<sup>[7-9]</sup>。AQP1 最早发现与多发性骨髓瘤微血管形成有关<sup>[10]</sup>,Saadoun 等<sup>[11]</sup>在微血管内皮细胞中也发现 AQP1 的高度表达,推测 AQP1 也可能与肿瘤的血管新生、发展有关。有研究显示,AQP1 还参与细胞周期的调控,在细胞无限复制过程中发挥着一定作用。正因为 AQP1 与多种疾病的发生、发展密切相关,目前已成为众多学者研究的热点。但有关 AQP1 在乳腺癌发生、转移过程中的作用及对乳腺癌细胞生长的影响目前国内外尚少有报道。前期研究中,笔者采用免疫组织化学法,对 106 例乳腺癌组织及作为对照的 20 例癌旁正常组织中 AQP1 表达情况进行了检测,结果表明,乳腺癌组织中广泛表达 AQP1 蛋白,且发现其表达水平与肿瘤淋巴结转移及微血管生成关系密切,提示 AQP1 可能参与了乳腺癌的发生、发展<sup>[3]</sup>。

RNA 干扰技术,是通过双链 RNA 分子介导的序列特异性转录后使相关基因表达减少或不表达的过程,能够使目的基因稳定沉默且对其他正常基因的表达不造成影响,该技术现已被广泛应用于肿瘤基因治疗的研究领域<sup>[1,12-13]</sup>。采用 RNAi 技术沉默靶基因,探讨其在肿瘤细胞中的表达情况及其对肿瘤细胞生物学特性的影响,并观察其抗肿瘤作用,对研究肿瘤的基因治疗具有重要意义。

本研究采用 RT-PCR 法证实 AQP1 mRNA 在人乳腺癌 MCF-7 细胞中有表达,再次印证了前期临床组织学实验的结果<sup>[3]</sup>。在此基础上,笔者针对 AQP1 mRNA 的不同靶点设计并合成了 4 个 shRNA,构建了靶向 AQP1 的 shRNA 重组质粒,经测序分析证实载体构建成功。将 4 个 shRNA 重组质粒分别转染人乳腺癌 MCF-7 细胞后,通过检测 AQP1 mRNA 和蛋白表达水平评价该载体对 AQP1 表达的抑制作用。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,4 个 AQP1-shRNA 转染后均可不同程度降低 AQP1 mRNA 和蛋白表达水平,其中以 AQP1-shRNA4 的沉默效应最为显著。据此,结合前期回顾性临床研究结果,笔者推测抑制 AQP1 基因的表达有可能会抑制肿瘤的血管新生及其通透性,并抑制肿瘤的侵袭和转移能力,这为乳腺癌的基因治疗开辟了新的思路。

然而,本研究的局限性是,关于 AQP1 蛋白表达量降低对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为的影响,及其在肿瘤发生、发展及转移等生物学特性变化方面的影响,还有待进一步验证。

## 参考文献

[1] Gaynor JW, Campbell BJ, Cosstick R. RNA interference: a chemist's perspective[J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(11): 4169-4184.

- [2] El Hindy N, Bankfalvi A, Herring A, et al. Correlation of aquaporin-1 water channel protein expression with tumor angiogenesis in human astrocytoma[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(2): 609-613.
- [3] 李卓, 康炜, 刘凯歌, 等. 水通道蛋白 1 与乳腺癌组织微血管生成的关系[J]. *山西医科大学学报*, 2011, 42(9): 732-734.
- [4] Hu J, Verkman AS. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels[J]. *FASEB J*, 2006(20): 1892-1894.
- [5] Jeyaseelan K, Sepramaniam S, Armugam A, et al. Aquaporins: a promising target for drug development[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006(10): 889-909.
- [6] Itoh T, Rai T, Kuwahara M, et al. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(3): 832-838.
- [7] Mobasher A, Airley R, Hewitt SM, et al. Heterogeneous expression of the aquaporin 1 (AQP1) water channel in tumors of the prostate, breast, ovary, colon and lung: a study using high density multiple human tumor tissue microarrays[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(5): 1149-1158.
- [8] Yang JH, Shi YF, Cheng Q, et al. Expression and localization of aquaporin-5 in the epithelial ovarian tumors[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(2): 294-299.
- [9] 王晨宇, 刘连新, 姜洪池. 肿瘤与水通道蛋白关系的研究进展[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(7): 891-892.
- [10] Endo M, Jain RK, Witwer B, et al. Water channel (aquaporin 1) expression and distribution in mammary carcinomas and glioblastomas[J]. *Microvasc Res*, 1999, 58(2): 89-98.
- [11] Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, et al. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours[J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(6): 621-623.
- [12] Matheis F, Besch R. Bifunctional siRNAs for Tumor Therapy[J]. *Methods Mol Biol*, 2014(1169): 181-192.
- [13] Stigliano C, Aryal S, de Tullio MD, et al. siRNA-chitosan complexes in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for the silencing of aquaporin-1 in cancer cells[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(8): 3186-3194.

(收稿日期: 2015-03-01 修回日期: 2015-05-23)