

· 基础研究 ·

## 人 AQP5 真核表达质粒的构建及其在胃癌细胞中的表达

黄永红<sup>1,2</sup>, 徐方云<sup>2</sup>, 吕农华<sup>1△</sup>

(1. 南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006;

2. 南昌大学基础医学院病理生理教研室, 南昌 330006)

**摘要:**目的 构建人 pcDNA3.1-AQP5/myc-His 真核表达质粒, 观察水通道蛋白 5(AQP5) 基因在胃癌 AGS 细胞中的稳定表达。方法 采用基因重组技术将人 AQP5 cDNA 插入真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His, 构建人 pcDNA3.1-AQP5/myc-His 真核表达质粒。脂质体介导空载体 pcDNA3.1/myc-His 和表达质粒 pcDNA3.1-AQP5/myc-His 分别转染入胃癌 AGS 细胞株, G418 筛选, 挑取阳性克隆, 扩大培养, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹法(Western Blot)分别检测 AQP5 mRNA 和蛋白表达。结果 双酶切和基因测序结果均证实人 pcDNA3.1-AQP5/myc-His 真核表达质粒构建成功。AQP5 转染组与空白对照组、空载体组比较, AQP5 mRNA 表达显著增加( $P < 0.05$ ), AQP5 蛋白表达显著上调( $P < 0.05$ )。结论 成功构建人 AQP5 真核表达质粒并获得稳定表达 AQP5 基因的胃癌 AGS 细胞系, 为进一步研究 AQP5 蛋白对胃癌恶性表型的影响奠定实验基础。

**关键词:** 胃肿瘤; 水通道蛋白 5; 转染

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)04-0407-03

## Construction of eukaryotic expression plasmid for human AQP5 and its expression in gastric cell line AGS

Huang Yonghong<sup>1,2</sup>, Xu Fangyun<sup>2</sup>, Lv Nonghua<sup>1△</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University,

Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Pathophysiology, the Basic Medical College of

Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract: Objective** To construct and identify human pcDNA3.1-AQP5/myc-His eukaryotic expression plasmid and to observe the expression of AQP5 in gastric cancer cell line AGS. **Methods** Human AQP5 cDNA was cloned into eukaryotic expression vector of pcDNA3.1/myc-His to construct pcDNA3.1-AQP5/myc-His plasmid. The recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-AQP5/myc-His and empty vector plasmid pcDNA3.1/myc-His were transfected into gastric cancer cell line AGS by Lipofectamine 2000, respectively. The positive colonies were selected by G418. The mRNA and protein expression of AQP5 were assessed by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-AQP5/myc-His was successfully constructed and confirmed by restriction endonuclease digestion and sequencing. And AQP5 mRNA and protein expression were significantly higher in AQP5 transfected group than those of either control or empty vector groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Gastric cancer cell line AGS with stable expression of AQP5 is established, and it can be used for further study on the effects of AQP5 protein on gastric malignant phenotypic.

**Key words:** stomach neoplasms; aquaporin 5; gastric cancer; transfection

水通道蛋白 5(aquaporin 5, AQP5) 是跨膜水通道蛋白家族的重要成员之一, 广泛分布于分泌性腺体上皮组织和细胞, 在体内平衡和腺体分泌等方面起着重要作用<sup>[1]</sup>。新近研究表明, AQP5 在多种肿瘤组织细胞中呈异常表达, 可能通过调节肿瘤细胞的增殖与转化<sup>[2]</sup>、影响肿瘤细胞的侵袭与迁移等参与肿瘤的发生与发展<sup>[3]</sup>。因此, AQP5 正成为肿瘤研究的新领域。本研究运用分子生物学方法, 构建人 AQP5 重组质粒并将其导入人胃癌细胞株 AGS 细胞中, 从而获得稳定表达 AQP5 基因的 AGS 细胞系, 为进一步研究 AQP5 基因对胃癌恶性表型的影响奠定实验基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人胃癌细胞株 AGS 为本研究所保种; pcDNA3.1/myc-His 质粒为本院科研中心罗时文教授馈赠; 总 RNA 提取液(Trizol)、逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒为北京 TransGen 公司产品; 脂质体 Lipofectmine2000 试剂为美国 Invitrogen 公司产品; 限制性核酸内切酶 EcoR I、BamH I、T4 DNA 连接酶为日本 TaKaRa 公司产品; 质粒小提试剂盒及

胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; 兔抗人 AQP5 抗体为 Abcam 公司产品; 鼠抗人  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体为 Santa Cruze 公司产品; 遗传霉素(G418)为 Merck 公司产品; 美国 Invitrogen 公司完成引物合成; 北京诺赛基因公司完成基因测序。

## 1.2 方法

**1.2.1 人 AQP5 真核表达质粒的构建** 根据序列数据库 GenBank 中人 AQP5 的 mRNA 序列设计特异性引物。引物序列: 上游 5'-GCG CGG ATC CAT GAA GAA GGA GGT GTG CTC CGT-3'(BamH I); 下游 5'-CCG GAA TTC TCA GCG GGT GGT CAG CTC C-3'(EcoR I), 下划线示酶切位点(BamHI, EcoRI)。用 PCR 法扩增获得 AQP5 目的片段, 产物长度为 810 bp。对扩增的 AQP5 基因片段和载体 pcDNA3.1/myc-His 分别用 EcoRI 和 BamHI 进行双酶切。酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳(110 V, 35 min), 电泳片段用凝胶回收试剂盒回收。AQP5 目的片段与线性载体分别按摩尔比 3:1, 6:1 和 9:1 用 T4 DNA 连接酶进行连接, 4℃ 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞后, 接种于含氨苄西林 100  $\mu$ g/mL 的 Lu-

ria-Bertani(LB)固体培养基平板,37℃筛选过夜。挑取阳性克隆摇菌提取质粒,质粒用 BamHI 和 EcoRI 酶切鉴定。将酶切鉴定正确的阳性质粒送北京诺赛基因公司进行测序鉴定。

**1.2.2 细胞培养及质粒转染** 转染前 24 h 取对数生长期 AGS 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  /mL,接种于 12 孔培养板,次日进行转染。随机分为对照组、空载体组和 AQP5 转染组。转染前弃含血清双抗培养基,磷酸缓冲盐溶液(PBS)漂洗 2 遍后,每孔加无血清无双抗 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)1 mL,将质粒( $\mu\text{g}$ )和 Lipofectmine 2 000( $\mu\text{L}$ )按 1:3 的比例分别用 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基稀释,各自轻轻混匀静置 5 min 后,再混合两者静置 20 min,将混合液均匀加至相应的细胞中,于 37℃ CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 5 h 后更换 10% 胎牛血清含青链双抗的 DMEM 培养基继续培养。

**1.2.3 G418 筛选浓度的确定及 AGS 细胞阳性克隆的筛选** 将 AGS 细胞以  $5 \times 10^4$  /mL 密度接种于 12 孔培养板中,24 h 后,将 G418 与含血清的 DMEM 培养基混合,配成浓度分别为 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900 和 1 000 mg/L 的液体,每隔 3 d 换液一次,培养 10 d,以 10 d 90% 细胞致死量为最佳筛选浓度,因此确定 400 mg/L 为最佳筛选浓度。转染 24 h 后按 1:10 传代于 24 孔板,细胞贴壁后加入含 400 mg/L G418 的完全培养基培养 14 d 至筛选出阳性克隆;挑取阳性克隆继续扩大培养,筛选出的稳定细胞株分别命名为 AGS/AQP5 细胞(转染 AQP5 的细胞)和 AGS/EV 细胞(转染空载体的细胞),用 200 mg/L G418 维持培养。

**1.2.4 RT-PCR 检测细胞 AQP5 mRNA 表达** TRIzol 法抽提 AGS(对照组)、AGS/AQP5(AQP5 组)和 AGS/EV(空载体组)细胞总 RNA,按逆转录试剂盒说明进行逆转录获取 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。AQP5 引物序列:上游 5'-CTT CCT CAA GGC CGT GTT C-3';下游 5'-CTC CTC CCA GTC CTC GTC A-3';内参  $\beta$ -actin 引物序列:上游 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3';下游 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3'。反应条件 94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,72℃ 继续延伸 7 min。取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析进行分析,以目的条带 AQP5 与  $\beta$ -actin 灰度值的比值反映 AQP5 mRNA 相对表达水平。实验重复至少 3 次。

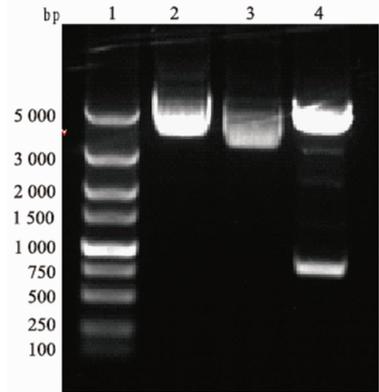
**1.2.5 蛋白质印迹法(Western Blot)检测细胞 AQP5 蛋白表达** 收集对照组、AQP5 组和空载体组细胞,细胞裂解液提取总蛋白。BCA 法进行蛋白含量测定。取总蛋白 50  $\mu\text{g}$ /孔在 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)40 V,30 min 后改电压为 80 V,120 min 后至溴酚蓝跑至胶最下方取胶,将分离的蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,25 V 90 min 进行转膜。转膜后 5% 脱脂奶粉含 0.1% 吐温 20 Tris 缓冲溶液(TBST)4℃ 封闭 60 min;加入一抗孵育(AQP5 1:500, $\beta$ -actin 1:500)4℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1:5 000)孵育,4℃ 5 h,洗膜,曝光、显影、定影。Gel-pro 凝胶成像分析软件分析 AQP5 蛋白和  $\beta$ -actin 蛋白的灰度值,并计算其比值反映 AQP5 蛋白相对表达水平。实验重复至少 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

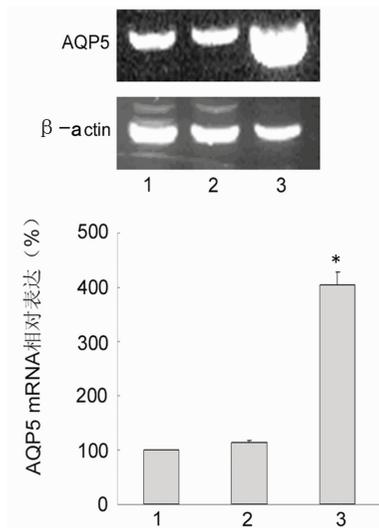
**2.1 克隆的双酶切及序列测定** 重组质粒双酶切后琼脂糖电

泳约在 810 bp 和 5 480 bp 附近分别见一明显条带,与目的片段大小相符,见图 1,北京诺赛基因公司测序结果与 GenBank 中人 AQP5(NM\_001651.2)的核苷酸序列完全一致。



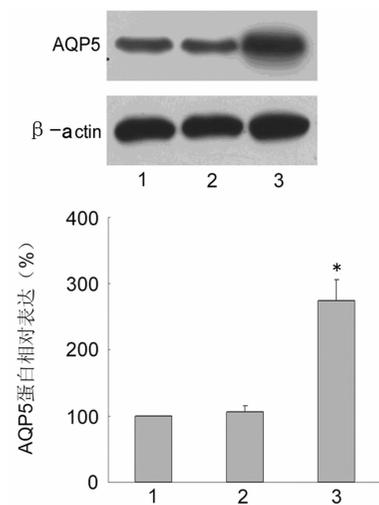
1:DNA marker(DL5000);2:BamH I 和 EcoR I 双酶切质粒 pcDNA3.1/myc-His;3:未酶切质粒 pcDNA3.1/myc-His;4:BamH I 和 EcoR I 双酶切质粒 pcDNA3.1-AQP5/myc-His。

图 1 酶切鉴定电泳图



1:对照组;2:空载体组;3:AQP5 组;\*: $P < 0.05$ ,与对照组比较。

图 2 RT-PCR 检测各组 AGS 细胞 AQP5 mRNA 的表达



1:对照组;2:空载体组;3:AQP5 组;\*: $P < 0.05$ ,与对照组比较。

图 3 Western Blot 检测各组 AGS 细胞 AQP5 蛋白的表达

**2.2 AQP5 mRNA 的表达** 外源 AQP5 转染 AGS 细胞后, AQP5 mRNA 表达水平显著上调, AQP5 组与对照组、空载组比较, AQP5 mRNA 水平显著上调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而对照组与空载组比较 mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P = 0.355$ ), 见图 2。

**2.3 AQP5 蛋白的表达** 外源 AQP5 转染 AGS 细胞后, AQP5 蛋白表达水平显著上调, AQP5 组与对照组、空载组比较, AQP5 蛋白水平显著上调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而对照组与空载组比较蛋白表达差异无统计学意义 ( $P = 0.181$ ), 见图 3。

### 3 讨论

水的微环境是细胞内外一切生命活动进行的场所, 肿瘤的发生、发展也离不开水的微环境。而且, 肿瘤细胞为了满足快速增殖、分裂及向周围基质侵袭和转移的需要, 一系列酶的活性和表达发生改变, 细胞基本结构成分合成明显加强; 同时癌细胞向周围基质侵袭和进出血管/淋巴管时需要体积和外形发生相应改变<sup>[4]</sup>。因此, 肿瘤细胞比正常细胞更需要水分子的快速跨膜转运。

近年文献报道 AQP5 蛋白过度表达于多种肿瘤组织中<sup>[5-8]</sup>, 并与某些肿瘤的进展、化疗药物的耐受及患者的预后相关。体外实验表明, AQP5 参与肿瘤生物学行为的形成。Chae 等<sup>[9]</sup>发现过表达 AQP5 的 K562 细胞和 LAMA84 细胞增殖能力增强。Chen 等<sup>[10]</sup>采用 RNA 干扰 (RNAi) 技术沉默 AQP5 基因表达可明显减少人肺癌细胞株 SPC-A1 细胞的迁移和侵袭能力, 且认为其迁移和侵袭能力下降与沉默 AQP5 基因, 降低细胞水的通透性, 调节细胞大小和形态有关。Jung 等<sup>[11]</sup>在乳腺癌研究中亦发现乳腺癌细胞 MCF7 AQP5 表达与肿瘤细胞的增殖和转移能力相关。Chae 等<sup>[7]</sup>的研究表明, 外源性表达 AQP5 的正常肺上皮细胞株 BEAS-2B 可发生上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT), 细胞呈成纤维样改变, 失去细胞-细胞间连接和细胞极性, 而且细胞上皮标志蛋白表达下调、间质标志蛋白表达则上调, 提示 AQP5 可通过 EMT 促进肿瘤细胞的侵袭和转移。此外, 动物实验表明 AQP5 过表达可诱导荷瘤动物肿瘤发生转移<sup>[12]</sup>。目前病理组织学研究发现<sup>[13-14]</sup>, 正常胃黏膜组织中 AQP5 呈低表达, 而胃癌组织中 AQP5 呈高表达, 提示 AQP5 可能参与胃癌的发生与发展。但是, AQP5 基因在胃癌发生发展中究竟发挥何种作用, 有待深入研究。

总之, 本研究通过 Western Blot 和 RT-PCR 实验证实已成功筛选出稳定表达外源性人 AQP5 基因的 AGS 胃癌细胞株, 这为进一步研究 AQP5 基因在胃癌发生发展中可能扮演的角色奠定实验基础。

### 参考文献:

[1] 张景熙, 李强, 刘忠令. AQP5 的结构功能及其调节[J]. 国

外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2003, 23(6): 599-601.

- [2] Woo J, Lee J, Chae YK, et al. Overexpression of AQP5, a putative oncogene, promotes cell growth and transformation[J]. *Cancer Letters*, 2008, 264(1): 54-62.
- [3] Chen ZH, Wang XD, Bai CX, et al. Regulation of MUC5AC mucin secretion by depletion of AQP5 in SPC-A1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(3): 775-781.
- [4] Verkman AS, Hara-Chikuma M, Papadopoulos MC. Aquaporins-new players in cancer biology[J]. *J Mol Med*, 2008, 86(5): 523-529.
- [5] Burghardt B, Elkjaer ML, Kwon TH, et al. Distribution of aquaporin water channels AQP1[J]. *Gut*, 2003, 52(7): 1008-1016.
- [6] Kang SK, Chae YK, Woo J, et al. Role of human aquaporin 5 in colorectal carcinogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(2): 518-525.
- [7] Chae YK, Kang SK, Kim MS, et al. Expression of aquaporin 5 (AQP5) promotes tumor invasion in human non small cell lung cancer[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(5): e2162.
- [8] Zhang Z, Chen Z, Song Y, et al. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer[J]. *J Pathol*, 2010, 221(2): 210-220.
- [9] Chae YK, Kang SK, Kim MS, et al. Human AQP5 plays a role in the progression of chronic myelogenous leukemia (CML)[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(7): e2594.
- [10] Chen Z, Zhang Z, Gu Y, et al. Impaired migration and cell volume regulation in aquaporin 5-deficient SPC-A1 cells[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011, 176(3): 110-117.
- [11] Jung HJ, Park JY, Jeon HS, et al. Aquaporin-5: a marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28492.
- [12] Zhang ZQ, Zhu ZX, Bai CX. Lung fluorescence imaging to evaluate tumor metastasis induced by AQP5 expression in murine model[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1): 205-211.
- [13] Watanabe T, Fujii T, Oya T, et al. Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer cells[J]. *J Physiol Sci*, 2009, 59(2): 113-122.
- [14] Shen L, Zhu Z, Huang Y, et al. Expression profile of multiple aquaporins in human gastric carcinoma and its clinical significance[J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(5): 313-318.

(收稿日期: 2012-09-14 修回日期: 2012-10-16)

(上接第 406 页)

Abdominal approach to chronic diaphragmatic hernias. Is it safe[J]. *Am Surg*, 2004, 70(6): 897-900.

[15] 吴孟超, 吴在德. 黄家驹外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 211.

[16] 王建柏, 高劲谋, 胡平. 穿透性膈肌破裂 36 例诊治[J]. 重

庆医学, 2008, 37(19): 2201-2202.

[17] 谢文义, 李向东, 黄越海, 等. 创伤性膈肌破裂 23 例诊治体会[J]. *创伤外科杂志*, 2005, 7(1): 5-6.

(收稿日期: 2012-09-14 修回日期: 2012-10-23)