

# RNAi 抑制水通道蛋白 5 表达及其对 细胞株黏蛋白合成及分泌的影响

陈智鸿 高磊 祝蓉 白莉 白春学<sup>Δ</sup>

(复旦大学附属中山医院肺科 上海 200032)

**【摘要】** 目的 观察瞬时及稳定转染的 RNA 干扰法对水通道蛋白 5(AQP5)的抑制效果,并观察 AQP5 抑制后细胞株黏蛋白合成、分泌的变化。方法 用化学合成 siRNA 和质粒介导的 shRNA 分别转染 SPC-A1 细胞,并在转染后 7 d 内的不同时间收集细胞,检测 AQP5 mRNA 和蛋白的变化。用 G418 筛选稳定转染细胞株,用 Western blot 法检测稳转株 AQP5 蛋白的抑制情况。用 ELISA 法检测 AQP5 抑制后各时点及稳定转染细胞株 MUC5AC 表达量的变化。结果 siAQP5 及 shAQP5 转染 24 h 对 AQP5 mRNA 的抑制率分别为 65%、79%。对蛋白的抑制在转染后第 7 d 最明显,分别为 93%、98%。稳转株(5 株)对 AQP5 蛋白的抑制率为 45%~64%。ELISA 显示瞬转第 5 d, MUC5AC 的合成和分泌分别增加 57.9%、85.3%。在 5 株稳定转染细胞中(shAQP5-G1, G2, G3, A1, A5) MUC5AC 的合成和分泌分别增加 59%~156%及 33%~166%。结论 化学合成及质粒介导的 RNA 干扰法均能有效抑制 SPC-A1 细胞 AQP5 的表达,后者较前者更经济,抑制效应更优。与瞬时转染比较,稳定转染可长时间抑制特定基因的表达。AQP5 抑制后,细胞株黏蛋白的合成、分泌增高。

**【关键词】** RNAi; siRNA; shRNA; AQP5; 黏蛋白; 稳定转染

**【中图分类号】** Q 74 **【文献标识码】** A

## Inhibition of AQP5 expression by RNAi and its effect on mucin synthesis and secretion

CHEN Zhi-hong, GAO Lei, ZHU Rong, BAI Li, BAI Chun-xue<sup>Δ</sup>

(Pulmonary Department, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】 Objective** In this experiment, we attempted to investigate whether the expression of AQP5 could be inhibited by RNAi transiently and stably, and to compare effects among the 3 methods, and the effect of AQP5 gene silencing on mucin synthesis and secretion. **Methods** SPC-A1 cells were firstly transfected with synthetic siRNA or vector driven hairpin RNA. Then, cells were collected at different times within 7 days, and mRNA and protein level of AQP5 were detected using quantitative real-time PCR and Western blot. Stably transfected cell lines were selected by G418, and AQP5 protein was detected by Western blot. MUC5AC was measured by ELISA. **Results** AQP5 mRNA were suppressed by 65% and 79% using siAQP5 and shAQP5 respectively, and AQP5 protein were decreased 93%, 98% on day 7 after transfection. The inhibitory rate for stable transfection cell lines was 45% to 64%. In transiently transfected cells, the results of ELISA showed that MUC5AC synthesis and secretion were increased by 57.9% and 85.3% respectively on day 5 after transfection. In 5 stable transfection clones, the elevated levels of MUC5AC synthesis and secretion varied from 59% to 156% and 33% to 166% respectively. **Conclusions** The results indicated that both chemically synthesized siRNA and vector-based hairpin RNA could dramatically inhibit targeting gene AQP5, and

the later is a more efficient and economical strategy than the former one. Stable transfection could inhibit gene expression longer than the transient one. After AQP5 silencing, mucin synthesis and secretion increased.

**【Key words】** RNAi; siRNA; shRNA; AQP5; mucin; stable transfection

水通道蛋白 5(aquaporin5, AQP5)是 AQPs 家族中的一个亚型,它除了分布在肺泡 I 型上皮细胞,还广泛分布于外分泌腺腺泡细胞膜上如泪腺、腮腺、汗腺、唾液腺和呼吸道黏膜下腺。

研究 AQPs 的生理功能通常采用 Knock-out 小鼠<sup>[1]</sup>,基因敲除虽是研究基因功能的理想模型,但所需技术含量高、价格昂贵限制了对 AQPs 的广泛研究。RNA 干扰是近年来兴起的新技术,它通过双链小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)或短发夹 RNA(small hairpin RNA, shRNA)与体内靶 mRNA 结合,从而产生序列特异性基因沉默(knock down),该法已日益成为研究基因功能及筛选分子靶向药物的良好工具<sup>[2]</sup>。

我们用化学合成的 siRNA 和质粒载体介导的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)转染人呼吸道黏膜下腺细胞(SPC-A1),并筛选出稳定转染的细胞株,观察其对水通道蛋白 5(aquaporin 5, AQP5)表达的抑制效应,并研究 AQP5 抑制后对细胞黏蛋白合成、分泌的影响。

## 材料和方法

**siAQP5 和 shAQP5 的制备** 将 Genbank 中 AQP5 序列号 NM\_001651 输入 Dharmacon 公司的在线设计工具-siRNA design center,搜索到针对 AQP5 的靶序列(nt879~897)。由 Dharmacon 公司合成 3'末端带 UU 的双链 siRNA,并命名为 siAQP5,同时合成一个无关的 siRNA,命名为 siMock。

shRNA 按照限制性内切酶、正义链、loop、反义链、RNA 多聚酶终止信号、限制性内切酶顺序设计寡核苷酸序列(shAQP5), sense: 5' GATCCCGCGCTC-AACAACAACACAATTCAAGAGATTGTGTTGTTGTTGAGCGCTTTTTTCCAAA3'; antisense: 5' AGC-TTTTTGGAAAAAAGCGCTCAACAACAACAACAACTCTGAATTGTGTTGTTGTTGAGCGCGG3'; 阴性序列(shNeg): sense: 5' GATCCCACTACCGTTGT-TATAGGTGTTCAAGAGACACCTATAACAACGG -TAGTTTTTTTTCCAAA3'; antisense: 5' AGCTTTTGGAAAAAACTACCGTTGTTATAGGTGTTCTCT-TGAACACCTATAACAACGGTAGTGG 3'由上海生

工生物工程技术服务公司合成。

空载体 pRNA-U6.1/Neo(Genscript Corp.)用 BamHI 和 HindIII 双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳,回收线性载体。采用 T4 连接酶,把合成的寡核苷酸序列(shAQP5, shNeg)连接到线性载体中。连接产物转化 DH5 $\alpha$  大肠埃希菌,在含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养基上涂板,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取 5 个细菌克隆抽质粒,由上海博雅生物公司测序鉴定,测序结果与设计相符合。

**细胞培养及转染** SPC-A1 细胞株由中国科学院上海细胞生物研究所提供,以含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 为培养基。细胞进行常规培养和传代。

转染前 1 d 将细胞接种于 6 孔培养板,接种密度为  $1 \times 10^6$ /孔,使得次日转染时细胞融合达 80%~90%。实验分为对照组,Mock 组和 siAQP5 组,其中 siAQP5 终浓度为 100 nmol/L,并传代培养 7 d,收集 1,3,5,7 d 的细胞。shAQP5 组分为对照组,即仅加无血清 RPMI-1640 稀释的 Lipofectamine 2000;shNeg 组,加入 4  $\mu$ g shNeg 与 10  $\mu$ L Lipofectamine 2000 的混合液,shAQP5 组,加入 4  $\mu$ g shAQP5 与 10  $\mu$ L Lipofectamine 2000 的混合液。其中 shAQP5 组细胞常规传代培养 7 d。

**稳定转染细胞株的筛选** 转染了 pShAQP5 及 pShNeg 的 SPC-A1 细胞在含 400  $\mu$ g/mL G418 的 DMEM 中培养 7~9 d,未转染重组质粒的细胞因不具有新霉素抗性而大批死亡,其余细胞转移到 10 cm 平板中继续培养,细胞密度为 100/平板,新霉素筛选压力为 200  $\mu$ g/mL,继续培养 3 周,当肉眼可见耐新霉素细胞克隆形成后,挑单克隆并转移到 96 孔板,继而 12 孔板继续扩大培养,期间新霉素仍维持 200  $\mu$ g/mL。

**稳定转染细胞株的鉴定** 选稳定转染的细胞 5 株(G1, G2, G3, A1, A5)及未转染的 Con 组细胞抽提细胞基因组 DNA。用 PCR 法进行片段大小鉴定,引物序列为:利用质粒载体的正向及反向测序引物。正向测序引物: TACGATACAAGGCTG-TTAGAGAG;反向测序引物: TAGAAGGCACAGTCGAGG。PCR 循环参数为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,59  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s 共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物凝胶电泳, BIO-RAD 成像系统(Gel Doc 2000 Gel Document-

ation System)分析结果。同时将抽提的 DNA 液送上海生工生物技术公司测序鉴定。

**Real-time PCR** 收集各组细胞,其中 siAQP5、shAQP5 处理组收集不同时间点的细胞,按照总 RNA 抽提试剂盒(上海生工)说明抽提各组总 RNA,OD260/280 均在 1.7~1.9。然后用 MMLV 逆转录试剂盒(上海生工)合成 cDNA。25  $\mu$ L PCR 反应体系包括 1  $\mu$ L 模板 cDNA、1 mmol/L 正向和反向引物及 0.25  $\times$  sybr Green 等,用 Rotor-Gene RG-3000 仪进行实时定量 PCR,以  $\beta$ -actin 为内参照。引物序列如下: $\beta$ -actin: sense: 5' CCTGTA-CGCCAACACAGTGC3', antisense: 5' ATACTCC-TGCTTGCTGATCC3' AQP5: sense: 5' CTGTC-CATTGGCCTGTCTGTC3', antisense: 5' GGC-TCATACGTGCCTTTGATG3'。

**Western blot** 用 RIPA 试剂盒提取细胞总蛋白。蛋白定量采用 Bradford 法。各组样本分别取总蛋白 80  $\mu$ g,经 7.5% SDS-PAGE 电泳后转膜。与特异性一抗(AQP5:兔抗鼠单抗,购自美国 Calbiochem 公司)37  $^{\circ}$ C 温育 1.5 h,与二抗(碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG,上海基因公司提供)室温孵育 1 h 后,加入 ECL,暗室曝光,X 光片通过图像分析系统半定量。

**ELISA 法** 瞬时转染细胞分 5 组,Con 组;shNeg 组(转染后 3~7 d 的细胞);shAQP5(转染后 3~7 d 的细胞);EGF 处理组(0.625~10 ng/mL);地塞米松处理组(Dex)(0.1~1  $\mu$ mol/L)。稳定转染细胞分 7 组:对照组(Con),shAQP5 稳定转染细胞株(G1,G2,G3,A1,A5),shNeg 稳定转染细胞株(N8)。分别收集上清液及细胞裂解液。用 BCA 法测定每孔细胞的总蛋白量。

孔板上清或细胞裂解液,及标准黏蛋白液(浓度分别为:1 000,500,250,125,62.5,31.25,15.63 ng/mL)过夜包被。PBST 洗涤后用 1% BSA 封闭。加入 1:200 稀释的兔抗人 MUC5AC 抗体,37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。加入生物素标记抗兔二抗,37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 洗涤后加入 HRP-streptavidin,37  $^{\circ}$ C,孵育 1 h。加入 OPD 显色液,用 bio-tek ELx 800 酶标仪定量。

**统计学分析** 用 SPSS 10.0 统计软件包,多样本采用方差分析,组间比较采用 Student-Newman-Keuls 法,两组之间的比较采用成组  $t$  检验, $P < 0.05$  为组间有统计学差异。

## 结 果

### siAQP5 及 shAQP5 对 SPC-A1 细胞 AQP5

**mRNA 抑制情况的比较** siAQP5 组分 3 组(Con, Mock, siAQP5),shAQP5 组也分 3 组(Con, Neg, shAQP5)。其中,siAQP5/shAQP5 的细胞常规传代培养 7 d,分别取 1,3,5,7 d 细胞进行分析。结果显示两组 1~7 d AQP5 的 mRNA 与对照比较均有明显抑制,其中 siAQP5 对 SPC-A1 细胞 AQP5 mRNA 的抑制率为 46%~65% ( $P < 0.05$ ),最高抑制出现在转染后 24 h。shAQP5 对 SPC-A1 细胞 AQP5 mRNA 的抑制率为 40%~79% ( $P < 0.05$ ),最高抑制也出现在转染后 24 h,但回升较快。两组间在转染 24 h 和 48 h 对 mRNA 的抑制率的差异有统计学意义( $P < 0.01$ )(图 1)。

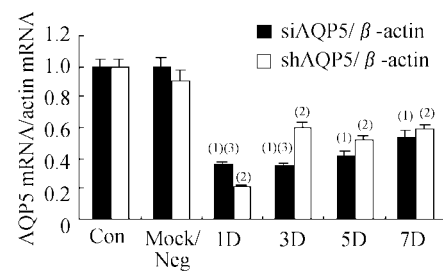


图 1 siAQP5 及 shAQP5 对 SPC-A1 细胞 AQP5 mRNA 表达的抑制

Fig 1 Inhibitory effect of siAQP5 and shAQP5 on AQP5 mRNA in SPC-A1 cells

Con: Non-transfected group; Mock/Neg: Non-specific transfected group; 1D - 7D: 1 day, 3 days, 5 days, 7 days after siAQP5 and shAQP5 transfection. <sup>(1)</sup>  $P < 0.05$  compared with con group; <sup>(2)</sup>  $P < 0.05$  compared with con group; <sup>(3)</sup>  $P < 0.01$  pair-comparison between siAQP5 group and shAQP5 group. Data were shown as  $x \pm s$ ,  $n = 3$ .

**siAQP5 及 shAQP5 对 SPC-A1 细胞 AQP5 蛋白表达抑制的比较** siAQP5 及 shAQP5 的分组及时点取样情况如上。对 SPC-A1 AQP5 蛋白的抑制直到转染后第 5 d 才出现明显效应,siAQP5 组的抑制率在 5,7 d 分别为 64% 和 93% ( $P < 0.05$ );shAQP5 组的抑制率在 5,7 d 分别为 78% 和 98% ( $P < 0.05$ )。两组间在第 5 d 的抑制率以 shAQP5 组稍好( $P < 0.01$ )(图 2)。

**稳定转染 shAQP5 的细胞株的筛选和鉴定** SPC-A1 细胞转染 pShAQP5 及 pShNeg 后,即给予一定筛选浓度的 G418(400  $\mu$ g/mL),挑单克隆后,细胞仍在含一定抗生素压力的环境中培养(G418: 200  $\mu$ g/mL),经 1 月筛选获得的单克隆细胞基本为稳定转染的细胞株,为进一步验证能在体内表达短发夹 RNA 的序列是否重组到细胞的基因组中,我们选取了几个单克隆细胞株抽提 DNA,用 Genscript 公司提供的测序引物进行 PCR,若为阳

性克隆则 PCR 产物大小约为 315 bp,若为阴性克隆则不应该有扩增片段。同时我们还进行了空载体和重组载体的 PCR,结果表明空载体的 PCR 产物为 251 bp,即不含外源性插入序列,而重组载体的 PCR 产物大小则与阳性克隆一致,为 315 bp,说明含有外源性插入片段(图 3)。

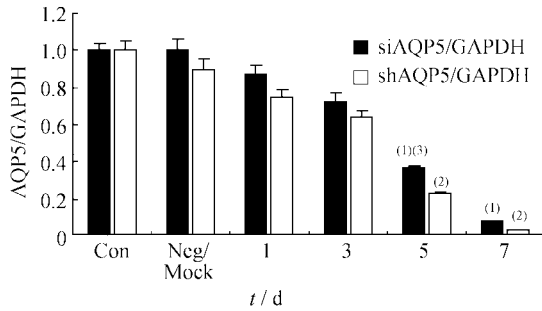


图 2 siAQP5 及 shAQP5 抑制 SPC-A1 细胞 AQP5 蛋白的表达

Fig 2 Downregulation of AQP5 protein induced by siAQP5 and shAQP5 in SPC-A1 cells

Con: Non-transfected group; Mock/Neg: Non-specific transfected group; 1D - 7D: 1 day, 3 days, 5 days, 7 days after siAQP5 and shAQP5 transfection. <sup>(1)</sup>  $P < 0.05$  compared with con group; <sup>(2)</sup>  $P < 0.05$  compared with con group; <sup>(3)</sup>  $P < 0.01$  pair-comparison between siAQP5 group and shAQP5 group. Data were shown as  $x \pm s, n = 3$ .

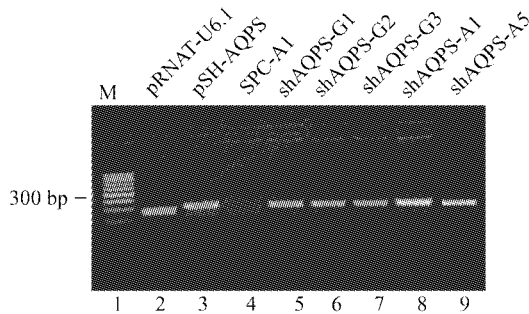


图 3 稳定转染细胞株的 PCR 快速鉴定

Fig 3 Identification of stable transfection cell lines by PCR

M: Molecular marker; 2, 3 line: Empty vector and reconstruction vector; 4 line: Gene of SPC-A1 cell without transfection; 5~9 line: Stable transfection cell lines selected by G418.

将初步鉴定为稳定转染细胞株的 DNA 样本送上海生工生物技术公司测序,PCR 引物为 Genscript 公司提供的测序引物,结果表明我们设计的寡核苷酸序列已重组到细胞的基因组中(测序图略)。

稳定转染 shAQP5 的细胞株的 RNAi 效应验证

用 Western blot 对各单克隆细胞株 AQP5 的表达进行半定量分析,我们选用了 Con 组,shNeg 组的稳转细胞株-N8,及 shAQP5 组的稳转细胞株

G1,G2,G3,A1,A5 进行研究,结果表明 shNeg-N8 的 AQP5 表达与 Con 组相似,但 shAQP5 组各稳转株的 AQP5 的表达均有不同程度的降低,抑制率为 45%~64%,且与 Con 比较有统计学差异(图 4)。

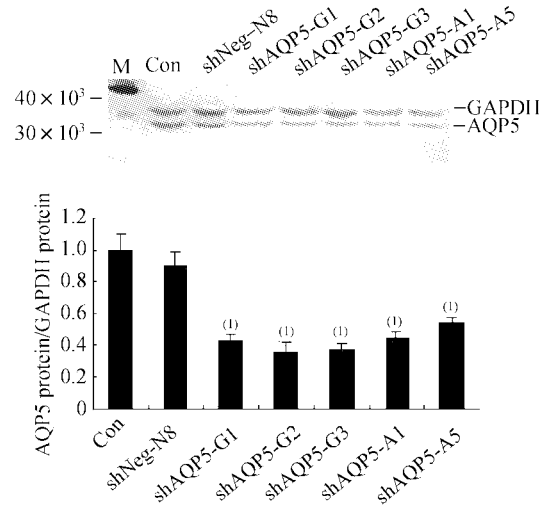


图 4 Western blot 法检测稳定转染细胞株 AQP5 表达

Fig 4 Inhibition of AQP5 in stable transfected cell lines by Western blot

Con: Control group without transfection; shNeg-N8: Stably cell line transfected with negative sequence; shAQP5-G1, G2, G3, A1, A5: Stably cell lines transfected with pshAQP5. Data were shown as  $x \pm s, n = 3$ . <sup>(1)</sup>  $P < 0.01$  compared with control group.

SPC-A1 细胞 AQP5 表达抑制后对黏蛋白合成及分泌的影响

瞬时转染 shAQP5 对细胞株 MUC5AC 合成及分泌的影响 实验分 5 组:Con 组;shNeg 组(转染后 3~7 d 的细胞);shAQP5(转染后 3~7 d 的细胞);EGF 处理组(0.625~10 ng/mL);地塞米松处理组(Dex)(0.1~1  $\mu\text{mol/L}$ )。在细胞裂解液(代表 MUC5AC 的合成)的检测中,shNeg 组和 shAQP5 组细胞合成的 MUC5AC 在第 5~7 天均有升高,但后者升高更明显。用 shAQP5 组的检测值减去 shNeg 组的检测值(即剔除空质粒载体对黏液合成的影响),其差值再与 Con 组比较,仍明显增高,其中第 5 天达到高峰,MUC5AC 合成增加 57.9%(与 Control 组比较, $P < 0.01$ )。EGF 处理可刺激细胞 MUC5AC 的合成,在一定的浓度范围内呈现剂量效应关系,5 ng/mL 时使 MUC5AC 的合成增加 78.5%,而 10 ng/mL 时仅增加 72.3%(与 Control 组比较, $P < 0.01$ )。Dex 处理可呈现剂量依赖型地抑制细胞 MUC5AC 的合成,最大抑制出现在 0.8  $\mu\text{mol/L}$ ,MUC5AC 的合成降低 36.9%(与 Control 组比较, $P < 0.05$ )(图 5)。

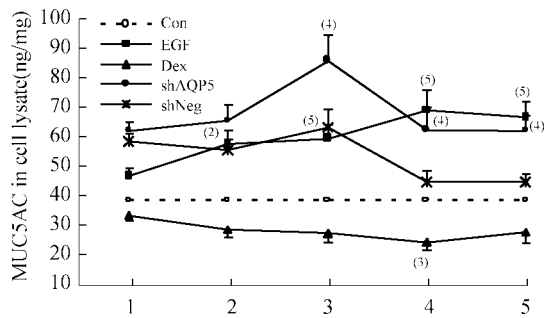


图5 瞬时转染对 SPC-A1 细胞株 MUC5AC 合成的影响

Fig 5 Variation of MUC5AC synthesis in SPC-A1 cells after inhibiting AQP5 transiently

Amount of MUC5AC in cells treated with *p*ShAQP5 (solid circle) or *p*ShNeg (star) on day 3~7 after transfection. Solid square, triangle and dash were represented EGF, dexamethasone and control group respectively. Data are shown as  $x \pm s (n=3)$ . <sup>(1)(2)(3)</sup>  $P < 0.05$ , compared with control group; <sup>(4)(5)(6)</sup>  $P < 0.01$ , compared with control group.

MUC5AC 的分泌主要靠检测上清中 MUC5AC 的含量,实验分组与上同,结果显示第 5~7 d sh.Neg 组和 shAQP5 组的 MUC5AC 的分泌均有升高,但后者升高更明显,用 shAQP5 组的检测值减去 shNeg 组的检测值,差值再与 Con 组比较,仍明显增高,其中第 5 d MUC5AC 分泌增加 85.3%,为达峰值。第 6~7 d 较对照组仍有所增高,增加率分别为 60.2%,41.8%(与 Control 组比较,  $P < 0.01$ )。EGF 处理可刺激细胞 MUC5AC 的分泌,在 2.5~10 ng/mL 浓度范围内使 MUC5AC 的分泌增加 25.8%~29.7%(与 Control 组比较,  $P < 0.01$ )。而 Dex 处理可抑制细胞 MUC5AC 的分泌,最大抑制率为 43%(与 Control 组比较,  $P <$

0.01)(图 6)。

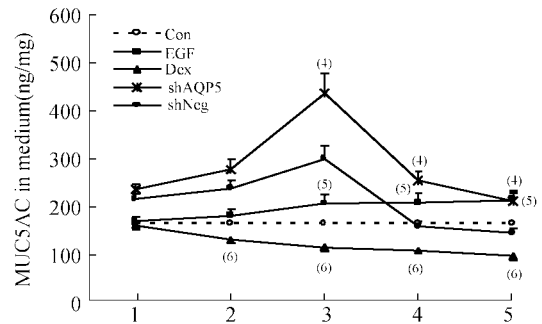


图6 瞬时转染对 SPC-A1 细胞株 MUC5AC 分泌的影响

Fig 6 Variation of MUC5AC secretion in SPC-A1 cells after inhibiting AQP5 transiently

Amount of MUC5AC in culture medium were measured by ELISA. Amount of MUC5AC in cells treated with *p*ShAQP5 (star) or *p*ShNeg (solid circle) on day 3 to 7 after transfection. Solid square, triangle and dash were represented EGF, dexamethasone and control group respectively. Data are shown as  $x \pm s (n=3)$ . <sup>(1)(2)(3)</sup>  $P < 0.05$ , compared with control group; <sup>(4)(5)(6)</sup>  $P < 0.01$ , compared with control group.

稳定转染 shAQP5 对细胞株 MUC5AC 合成及分泌的影响 细胞分 7 组:Con 组,shNeg 组的稳转细胞株-N8,及 shAQP5 组的稳转细胞株 G1,G2,G3,A1,A5,收集各组细胞的上清和细胞裂解液,用 ELISA 法检测 MUC5AC 的合成及分泌量。可见 sh.Neg-N8 克隆与 Con 比较对 MUC5AC 的合成和分泌无明显影响,而 shAQP5 组各单克隆细胞株使 MUC5AC 的合成增加 59%~156%(与 Control 组比较,  $P < 0.01$ ),使其分泌增加 33%~166%(与 Control 组比较,  $P < 0.01$ ;与 Control 组比较,  $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 shAQP5 稳定转染对 MUC5AC 合成和分泌的影响

Tab 1 Elevated synthesis and secretion of MUC5AC in 5 stably transfected clones

Groups	Cell lysate		Supernate	
	MUC5AC(ng/mg)	Increase(%)	MUC5AC(ng/mg)	Increase(%)
Con	43.0 ± 2.2	—	173.8 ± 17.4	—
shNeg-N8	48.0 ± 3.2	—	187.8 ± 20.4	—
shAQP5-G1	73.1 ± 5.1	70 <sup>(3)</sup>	309.4 ± 34.0	78 <sup>(4)</sup>
shAQP5-G2	110.2 ± 11.1	156 <sup>(3)</sup>	462.3 ± 69.3	166 <sup>(4)</sup>
shAQP5-G3	68.4 ± 4.5	59 <sup>(3)</sup>	262.4 ± 31.5	50 <sup>(4)</sup>
shAQP5-A1	95.5 ± 7.6	122 <sup>(3)</sup>	358.0 ± 30.4	106 <sup>(4)</sup>
shAQP5-A5	78.3 ± 5.5	82 <sup>(3)</sup>	231.2 ± 20.8	33 <sup>(2)</sup>

Data are shown as  $x \pm s (n=3)$ . <sup>(1)(2)</sup>  $P < 0.05$ , compared with control group; <sup>(3)(4)</sup>  $P < 0.01$ , compared with control group.

## 讨 论

本研究采用了化学合成小干扰 RNA,质粒介导的发夹状小 RNA 技术并筛选了稳定转染的细胞

株,实验结果显示了对 AQP5 的表达均有特异性抑制效应,但也各有其优劣。

从瞬时转染的 RNA 干扰效应看出,mRNA 水平的抑制通常出现在 24~48 h,可持续 3~5 d。转染后 24 h,siAQP5 对 AQP5 mRNA 的抑制率为

64%, 而 shAQP5 的抑制效率更强为 79%。文献报道蛋白的抑制效应通常在 48~72 h 出现<sup>[4]</sup>, 但我们的研究表明 AQP5 蛋白表达的明显抑制要到转染后 120 h 才出现。RNA 干扰对已合成的蛋白没有降解作用, 因此我们推测 RNA 干扰的起始效应与所干扰的蛋白的半衰期有关, 说明 AQP5 的半衰期可能较长。siAQP5 对 AQP5 蛋白的抑制率为 64%~93%, 而 shAQP5 为 78%~98%, 后者较前者稍好。Wu 等<sup>[5]</sup> 采用 siRNA、shRNA、sense-RNA、antisense-RNA 来抑制萤火虫荧光素基因的表达, 证明 siRNA、shRNA 均有明显的基因表达抑制, 但后者效果稍好。我们的实验结果与其相似。

瞬时转染的 RNAi 效应不能持久, 因为无论是体外导入的 siRNA, 还是质粒介导体内表达的 shRNA 在经历了 4~8 个倍增周期后, 会逐渐被稀释或丢失, 从而失去对靶基因的抑制效应。理论上, 只有当含 shRNA 的质粒整合到细胞基因组上, 并把这群细胞筛选出来, 才有可能实现持久的基因表达抑制。长久、稳定的基因抑制将更有利于研究基因功能, 甚至可用于胚胎干细胞, 从而在整体动物水平研究基因缺失的表型。我们选用了含新霉素抗性标记的真核细胞表达载体, 用 G418 进行筛选, 因为外源基因整合到宿主基因组的概率非常低, 通常为 1:1 000~1:10 000, 因此必须挑选单克隆后扩大培养, 一月后我们共筛选了 12 株单克隆细胞(数据未完全显示), 并一直维持 200  $\mu$ M G418 的抗性压力, 通过 PCR 和测序进一步验证了外源基因已整合到细胞的基因组上。

外源基因整合时通常为整段基因的整合, 可以为单拷贝整合, 也可为串连多拷贝整合<sup>[6]</sup>, 我们选用的质粒带 GFP 报告基因, 理论上所有稳定转染的细胞都该带绿荧光标记, 但实验表明仅 1/3(4/12 株) 细胞有 GFP 表达, 转入基因表达沉默可能与局部 DNA 甲基化或受邻近宿主染色体的结构影响有关。在长久抑制基因表达方面, Western blot 半定量研究各克隆基因表达水平, shAQP5-G1, G2, G3, A1, A5 克隆 AQP5 的表达抑制率波动为 45%~64%, 抑制水平的差异可能与各株细胞插入片段的拷贝数不同及随机插入的部位有关, 与瞬时转染比较, 稳定转染的优势在于可长时间抑制某特定基因的表达, 细胞株可冻存, 利于供系列实验研究使用, 但其抑制效率不如瞬时转染, 说明外源基因一旦整合到细胞的基因组上, 其表达会受到更多因素的影响。

气道黏液高分泌一直是呼吸生理研究的重点, 已知多种炎性介质如 IL-4、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、EGF、PGF2 $\alpha$ 、LT 及神经递质如乙酰胆碱等均可上

调黏蛋白基因(MUC5AC)的表达<sup>[7]</sup>, 上皮通道蛋白与黏液生成的关系也有报道, 刺激 ATP 敏感性 K<sup>+</sup> 通道可抑制固有的和乙酰胆碱激发后的黏液聚集。选择性 Cl<sup>-</sup> 及 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 离子通道阻断剂可增加乙酰胆碱激发下呼吸道黏膜下腺黏液的分泌。Ca<sup>2+</sup> 活化的 Cl<sup>-</sup> 通道(CaCC, Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> channel) 在哮喘气道高分泌患者中表达增高<sup>[8]</sup>。

水通道与黏液分泌的关系报道较少。若用霍乱毒素肠道给药, 可见大鼠小肠 AQP8 的表达降低, 同时伴 MUC2, MUC3 基因表达增强<sup>[9]</sup>。CFTR(cAMP 敏感性 Cl<sup>-</sup> 通道) 缺陷导致气道黏液分泌增高、稠厚且不易排出, 研究发现 CFTR 也是 AQP3 的调节剂, 可上调 AQP3 在气道上皮细胞的表达。呼吸道黏液分泌相关的水通道蛋白为 AQP5, 该型水通道蛋白在呼吸道黏膜下腺表达。尽管 Song 等的研究表明 AQP5 缺失小鼠在呼吸道黏液分泌降低的同时伴蛋白浓度的明显升高<sup>[10]</sup>, 但未进一步阐述何种蛋白成分升高。我们的研究提示, 扣除质粒本身对结果的影响, 瞬转 5~7 d 时, MUC5AC 的合成和分泌逐步增加, 呈时间依赖性变化, 且对分泌的影响更强于合成, 该作用时间点也与 RNAi 起效时间点吻合。通过对稳定转染细胞株(2~3 月) 检测发现 MUC5AC 的合成和分泌分别增高 59%~156%, 33%~166%。推测 AQP 功能缺失可能导致气道表面液体的厚度, 成分及渗透压的改变。而环境改变可能使细胞黏蛋白合成、分泌增强, 从而使上皮获得一层保护性黏液。

我们通过本研究对比了化学合成, 质粒介导及稳定转染的 RNA 干扰法。质粒介导的 shRNA 较之 siRNA 抑制效果更佳, 也更经济, 稳定转染细胞克隆可实现对 AQP5 表达长久、稳定的抑制。初步研究结果发现 AQP5 抑制后细胞株黏蛋白的合成、分泌增加, 那么水通道蛋白是通过何种机制影响黏蛋白的表达, 在整体动物水平是否能复制在细胞水平观察到的结果, 其他亚型的水通道蛋白是否也影响气道黏蛋白的分泌等均有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Borok Z, Verkman AS. Lung edema clearance: 20 years of progress invited review; Role of aquaporin water channels[J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93: 2 199-2 206.
- [2] Lung RKM, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics[J]. *Pharmacol & Ther*, 2005, 107: 222-239.
- [3] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering

- RNAs[J]. *Methods*, 2002, 26: 199 - 213.
- [4] Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, *et al.* Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication[J]. *FEBS Letters*, 2003, 543: 51 - 54.
- [5] Wu MT, Wu RH, Hung CF, *et al.* Simple and efficient DNA vector-based RNAi systems in mammalian cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330: 53 - 59.
- [6] Celius T, Garberg P, Lundgren B. Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 365 - 371.
- [7] 毛翎, 白春学, 张敏, 等. 表皮生长因子受体和黏蛋白在慢性阻塞性疾病气道中的表达及意义[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2004; 27: 585 - 588.
- [8] Wang K, Wen FQ, Feng YL, *et al.* Increased expression of human calcium-activated chloride channel 1 gene is correlated with mucus overproduction in Chinese asthmatic airway[J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31: 1 388 - 1 395.
- [9] Flach CT, Lange S, Jennische E, *et al.* Cholera toxin induces expression of ion channels and carriers in rat small intestinal mucosa[J]. *FEBS Letters*, 2004, 561: 122 - 126.
- [10] Song YL, Verkman AS. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 41 288 - 41 292.

(收稿日期: 2008 - 02 - 21; 编辑: 沈玲)

(上接第 563 页)

- [3] Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems[J]. *J Mol Endocrinol*, 2002, 29(1): 23 - 39.
- [4] Clark BD, Bedrosian I, Schindler R, *et al.* Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays[J]. *J Appl Physiol*, 1991, 71: 2 412 - 8.
- [5] de Perrot M, Fischer S, Liu M, *et al.* Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro-to anti-inflammatory cytokines [J]. *Transplantation*, 2001, 72(9): 1 505 - 1 512.
- [6] Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SM, *et al.* Patterns of injury and roles of neutrophils in lung ischemia reperfusion injury of rat lung[J]. *J Surg Res*, 1995, 58: 713 - 718.
- [7] Obermaier R, Benz S, Von Dobschuetz E, *et al.* Characterization of microcirculatory disturbance in a novel model of pancreatic ischemia-reperfusion using intravital fluorescence-microscopy[J]. *Pancreas*, 2002, 25: 142 - 148.
- [8] Kaneda H, Waddell TK, de Perrot M, *et al.* Pre-implantation multiple cytokine mRNA expression analysis of donor lung grafts predicts survival after lung transplantation in humans [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(3): 544 - 551.
- [9] Filip RR, Bart MV, Wim A. Wuyts, *et al.* IL-1 in Bronchial Lavage Fluid is a Non-Invasive Marker That Predicts the Viability of the Pulmonary Graft From the Non-Heart-Beating Donor[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2005, 24(1): 20 - 28.
- [10] Yamane M, Liu M, Kaneda H, *et al.* Reperfusion-Induced Gene Expression Profiles in Rat Lung Transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2005, 5: 2 160 - 2 169.

(收稿日期: 2007 - 11 - 23; 编辑: 沈玲)