

论著

文章编号:1000-5404(2012)17-1722-05

重组 AQP9 对 L-02 细胞脂质沉积的影响

王川,袁媛,姜政,王丕龙 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院消化内科)

[摘要] **目的** 构建人水甘油通道蛋白9(aquaglyceroporin9, AQP9)重组质粒,验证其在 L-02 肝细胞中的表达,并检测其对非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)细胞模型的作用。**方法** 从人肝脏组织中提取总 RNA, RT-PCR 获得 AQP9 基因,克隆到载体 pEGFP-N1 上,构建重组质粒 pEGFP-N1-AQP9。将其转染 L-02 细胞,通过荧光显微镜观察其转染情况,RT-PCR 和 Western blot 检测 AQP9 基因在细胞中的表达。通过油红 O 染色,测定甘油三酯、游离脂肪酸及甘油含量,检测其对 L-02 细胞脂肪变性模型的作用。**结果** 成功构建 pEGFP-N1-AQP9 重组质粒,并能在 L-02 细胞中表达,将其转染 L-02 细胞脂肪变性模型后,油红 O 染色可见油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组较油酸组细胞内脂质含量明显升高,油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组细胞内甘油三酯、游离脂肪酸及甘油含量分别为(5.435 ± 0.337)、(2.016 ± 0.144)、(1.485 ± 0.113) mmol/L,而油酸组分别为(3.218 ± 0.220)、(1.538 ± 0.193)、(1.024 ± 0.148) mmol/L,两者之间差异有统计学意义($P < 0.01$),说明上调 AQP9 表达量可使其脂肪变性程度加重。**结论** AQP9 异常升高能够引起或加重非酒精性脂肪肝病。

[关键词] 水甘油通道蛋白9;非酒精性脂肪肝病;重组质粒;基因治疗

[中图分类号] R394.33; R392.4; R575.5 **[文献标志码]** A

Effect of recombinant AQP9 on lipid deposition in L-02 cells

Wang Chuan, Yuan Yuan, Jiang Zheng, Wang Pilong (Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To construct a recombinant plasmid of human aquaglyceroporin 9 (AQP9), to examine its expression in liver cell L-02 and to detect its effect on cellular models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Total mRNA was extracted from human hepatic tissues, and human AQP9 gene was amplified by RT-PCR. AQP9 gene was then inserted into pEGFP-N1 to construct recombinant plasmid pEGFP-N1-AQP9, which was transfected into L-02 cells. The transfection was detected by fluorescent microscopy, and the expression of AQP9 gene was detected by RT-PCR and Western blotting. The effect of AQP9 on NAFLD cellular models was examined by oil red O staining and the determination of triglycerides (TG), free fatty acids (FFAs) and glycerol contents. **Results** Recombinant plasmid pEGFP-N1-AQP9 was successfully constructed, and AQP9 expression could be detected after L-02 cells were transfected with pEGFP-N1-AQP9. The oil red O staining showed that the intracellular lipid contents were significantly higher in the oleic acid/pEGFP-N1-AQP9 group than in the oleic acid group ($P < 0.01$). The intracellular TG, FFAs and glycerol contents in the oleic acid/pEGFP-N1-AQP9 group were 5.435 ± 0.337, 2.016 ± 0.144 and 1.485 ± 0.113 mmol/L, respectively, while those in the oleic acid group were 3.218 ± 0.220, 1.538 ± 0.193 and 1.024 ± 0.148 mmol/L, respectively. It indicated that the upregulation of AQP9 could aggravate the degree of steatosis. **Conclusion** AQP9 abnormal upregulation can lead to or aggravate NAFLD.

[Key words] aquaglyceroporin 9; nonalcoholic fatty liver disease; recombinant vector; gene therapy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81070318) and Project of the Medical Science and Technology Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-100). Corresponding author: Jiang Zheng, Tel: 86-23-89013098, E-mail: jiangz1753@163.com

[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学技术研究项目(渝卫科教2010-2-100)

[通信作者] 姜政,电话:(023)89013098, E-mail: jiangz1753@163.com

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种无过量饮酒史, 以肝实质细胞脂肪变性和脂肪蓄积为特征的临床病理综合征。目前针对 NAFLD 还没有特效药物, 随着西方化的饮食方式及生活水平的提高, 其发病率迅速增加, 已经成为危害人类健康的主要消化系统疾病之一^[1-2], 对其治疗和预防迫在眉睫。NAFLD 与脂肪重新分布有关, 而脂肪的动员运输和肝脏的摄取又与水通道蛋白 (aquaglyceroporin9, AQP9) 相关^[3-4]。AQP9 主要表达于肝细胞窦状隙膜上, 能将血液中甘油转运入肝细胞, 大量甘油进入肝细胞将引起脂肪合成及蓄积增加, 从而导致脂肪肝的形成。本研究通过 RT-PCR 从人肝脏组织中获得 AQP9 基因, 构建重组质粒 pEGFP-N1-AQP9, 验证其在 L-02 细胞中的表达, 通过油红 O 染色, 测定细胞内脂质含量, 检测其对 L-02 细胞脂肪变性模型的作用, 为进一步研究 AQP9 在非酒精性脂肪肝病发生、发展中的作用奠定基础。

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), 人正常肝细胞株 L-02 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、限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司, 凝胶回收纯化试剂盒、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, 油酸购自美国 Sigma 公司, Lipofectamine 2000、Opti-MEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司, 兔抗人 AQP9 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 甘油三酯检测试剂盒购自北京北化康泰临床试剂有限公司, 游离脂肪酸检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 甘油含量 GPO-POD 酶法测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 根据 NCBI 中人 AQP9 的基因序列 (AB008775), 设计 AQP9 巢式 PCR 外侧上游引物: 5'-GATTTCCGGTCTAAGTCGC-3', 外侧下游引物: 5'-GAGAATCCAAACTGACTGC-3', 内侧上游引物: 5'-GGAAGATCTGATGCAGCTGAGGGAG-3', 内侧下游引物: 5'-CGGGTACCCTGAGTTCATATTTCTCTGG-3', 内侧上下游引物分别加入 *Bgl* II 及 *Kpn* I 酶切位点及其保护碱基, 产物长度为 888 bp。同样方法设计 AQP9 短片段 PCR 引物, 上游引物: 5'-CTTTGGACG-GATGAAATGTT-3', 下游引物: 5'-GAGTCAGGCTCTGGATG-GTG-3', 产物长度为 546 bp。提取人肝脏组织总 RNA, 反转录合成 cDNA, 采用巢式 PCR 扩增 AQP9 基因, 所获 PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并进行凝胶回收纯化。分别将 AQP9 基因和 pEGFP-N1 质粒进行 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切, 而后

凝胶回收纯化。将 AQP9 和 pEGFP-N1 用 *T*₄ DNA Ligase 连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 同时以空质粒及 ddH₂O 为对照, 挑取经卡那霉素筛选的阳性克隆摇菌扩增并提取重组质粒, 命名为 pEGFP-N1-AQP9。

1.2.2 重组质粒的鉴定

1.2.2.1 PCR 鉴定 取重组质粒菌液 1 μ l 煮沸, 同时以空质粒菌液、DH5 α 菌液及 ddH₂O 为对照, 分别加入 AQP9 内侧引物进行 PCR 反应, 所获产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2.2 酶切鉴定 将 pEGFP-N1-AQP9 与 pEGFP-N1 分别进行单酶切 (*Bgl* II) 及双酶切 (*Bgl* II 和 *Kpn* I), 酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2.3 测序鉴定 将 PCR 及酶切鉴定正确的重组质粒送至上海生工测序, 使用 *T*₇ 通用引物, 将测序结果与 GenBank 中人 AQP9 mRNA 序列进行比对。

1.2.3 重组质粒在 L-02 细胞中的表达

1.2.3.1 重组质粒转染 L-02 细胞 用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养 L-02 细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养, 传至第 3 代用于转染。转染前 1 d, 将 L-02 细胞接种 6 孔板上, 每孔接种约 7×10^5 个, 待细胞达 80% ~ 90% 融合度时, 将无内毒素的 pEGFP-N1-AQP9 以脂质体 Lipofectamine 2000 介导的方法转染 L-02 细胞, 并以 pEGFP-N1、ddH₂O、未处理 L-02 细胞为对照, 每组转染 2 孔, 48 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.3.2 RT-PCR 检测 AQP9 基因的表达 48 h 后分别提取各组细胞总 RNA, 进行 RT-PCR 反应, 以 β -actin 作为内参, 所获 PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3.3 Western blot 检测 AQP9 蛋白的表达 48 h 后分别提取各组细胞总蛋白, 取 50 μ g 蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转膜到 PVDF 膜上, 封闭 2 h 后, 以免抗人 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, 显影定影后凝胶成像仪拍照分析。

1.2.4 MTT 法确定油酸诱导 L-02 细胞脂肪变性最适作用浓度 将 L-02 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 贴壁后加入含不同油酸浓度 (0、10、20、30、40、50 μ g/ml) 的 10% 胎牛血清 1640 培养基, 每组设置 8 个复孔。继续培养 72 h 后, 吸弃孔内的培养基, 每孔加入 20 μ l MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 每孔加入 150 μ l DMSO, 室温振荡 10 min, 酶标仪上选择 490 nm 波长, 测定各孔的吸光度值 [$D(490)$]。

1.2.5 检测 L-02 细胞脂肪变性模型中 AQP9 的表达

1.2.5.1 L-02 细胞脂肪变性模型的建立及重组质粒的转染

将传至第 3 代的 L-02 细胞按 3×10^5 /孔接种于 6 孔板, 贴壁后加入含油酸的 10% 胎牛血清 1640 培养基, 培养 72 h 诱导 L-02 细胞脂肪变性。将 pEGFP-N1-AQP9 转染脂肪变性的 L-02 细胞, 并以 pEGFP-N1、ddH₂O 及未处理 L-02 细胞为对照, 每组转染 2 孔, 继续培养 72 h。

1.2.5.2 绿色荧光蛋白检测转染情况 72 h 后倒置荧光显微镜观察各组 L-02 细胞绿色荧光蛋白表达情况。

1.2.5.3 半定量 PCR 检测各组 AQP9 mRNA 表达 72 h 后分别提取各组细胞的总 RNA,加入 AQP9 短片段引物进行 RT-PCR 反应,PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5.4 Western blot 检测各组 AQP9 蛋白表达 72 h 后分别提取各组细胞的总蛋白,Western blot 检测 AQP9 及 β -actin 蛋白的表达。

1.2.6 油红 O 染色检测 L-02 细胞中脂质含量 泡酸消毒盖玻片置于 24 孔板中,接种约 6×10^4 /孔 L-02 细胞,贴壁后加入含油酸的 10% 胎牛血清 1640 培养基。72 h 后将 pEGFP-N1-AQP9 转染脂肪变性的 L-02 细胞,以 pEGFP-N1、ddH₂O 及未处理 L-02 细胞为对照,继续培养 72 h。吸弃孔内的培养基,PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,油红 O 溶液染色 30 min,60% 异丙醇洗涤 30 s,ddH₂O 洗涤 30 s,苏木精复染 3 min,ddH₂O 冲洗 5 min,中性树胶封片,正置显微镜拍照保存。

1.2.7 L-02 细胞中甘油三酯、游离脂肪酸及甘油含量测定

将传至第 3 代的 L-02 细胞以含油酸的 10% 胎牛血清 1640 培养基培养 72 h,将 pEGFP-N1-AQP9 转染脂肪变性的 L-02 细胞,并以 pEGFP-N1、ddH₂O 及未处理 L-02 细胞为对照,每组包含 5 瓶细胞,继续培养 72 h。PBS 洗涤细胞 3 次,反复冻融裂解细胞,使用甘油三酯检测试剂盒,游离脂肪酸检测试剂盒,甘油含量 GPO-POD 酶法测定试剂盒测定 L-02 细胞中脂质含量。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 总 RNA 提取及 RT-PCR 扩增目的基因

肝脏总 RNA 行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见 28 S、18 S 和 5 S 3 个条带,分光光度计结果: $D(260)/D(280)$ 为 1.95, $D(260)/D(230)$ 为 1.31,符合实验需求。PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在 888 bp 附近有特异性条带,提示扩增产物为人 AQP9 片段。

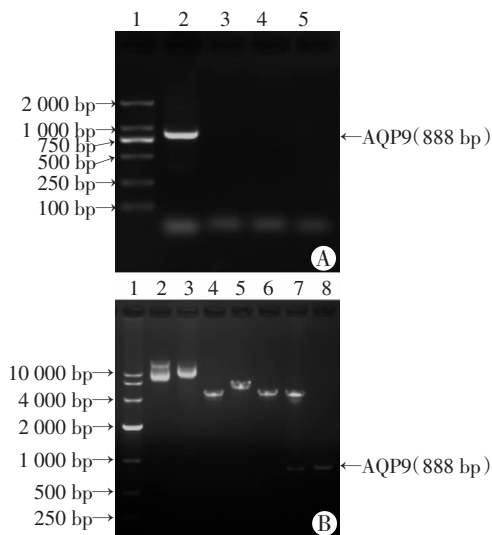
2.2 重组质粒 pEGFP-N1-AQP9 的鉴定

2.2.1 PCR 及酶切鉴定 PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。结果显示,重组质粒菌液在 888 bp 处有一特异性 AQP9 条带,而对照组未见条带(图 1A),初步说明重组质粒构建成功。酶切产物行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。结果显示,重组质粒经双酶切可切出 AQP9 目的条带(888 bp),而空质粒未切出目的条带(图 1B),再次证明重组质粒构建成功。

2.2.2 测序鉴定 测序结果经分析,发现 1 个碱基发生突变,45 位:A→G,为无义突变。充分证明 AQP9 已正确插入 pEGFP-N1 载体,pEGFP-N1-AQP9 重组质粒构建成功。

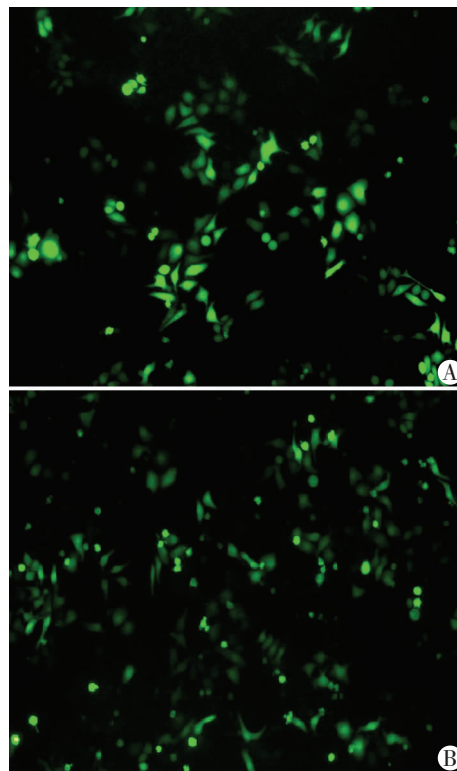
2.3 重组质粒在 L-02 细胞中的表达

2.3.1 绿色荧光检测重组质粒的表达 荧光显微镜下观察,pEGFP-N1-AQP9 转染组和 pEGFP-N1 转染组均可见到绿色荧光(图 2),ddH₂O 转染组、未处理 L-02 细胞组未见到绿色荧光。说明重组质粒已经转染进入 L-02 细胞并表达融合蛋白。



A:PCR 鉴定 1:DNA 标准(DL 2000),2:重组质粒菌液,3:空质粒菌液,4:DH5 α 菌液,5:ddH₂O;B:酶切鉴定 1:DNA 标准(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-AQP9,8:AQP9 PCR 产物

图 1 重组质粒 PCR 及酶切鉴定结果

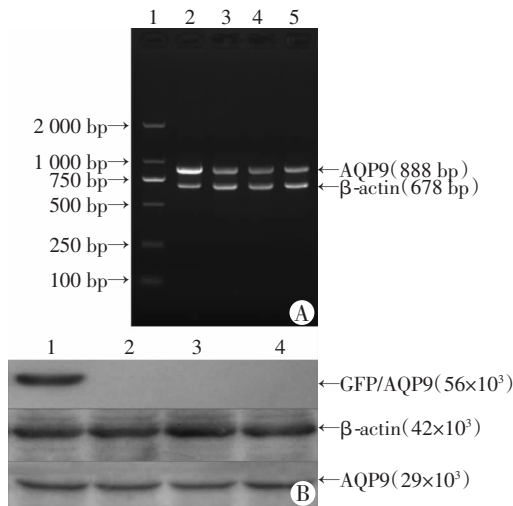


A:pEGFP-N1-AQP9 转染组;B:pEGFP-N1 转染组

图 2 荧光显微镜观察重组质粒在 L-02 细胞中的表达 ($\times 200$)

2.3.2 RT-PCR 及 Western blot 检测 AQP9 的表达 PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳。结果显示,pEGFP-N1-AQP9 转染组、pEGFP-N1 转染组、ddH₂O 转染组及未处理 L-02 细胞组都能够扩增出 AQP9 条带(888 bp),其中 pEGFP-N1-AQP9 转染

组 AQP9 条带最亮(图 3A),说明 pEGFP-N1-AQP9 转染成功,并能在 L-02 细胞中表达。经 Western blot 检测,各组细胞在 42×10^3 位置的 β -actin 条带均清晰,pEGFP-N1-AQP9 转染组、pEGFP-N1 转染组、ddH₂O 转染组及未处理 L-02 细胞组均在 29×10^3 可见 AQP9 条带,pEGFP-N1-AQP9 转染组在 56×10^3 可见 GFP/AQP9 融合蛋白条带(图 3B),说明重组质粒在 L-02 细胞中表达 AQP9 蛋白并与绿色荧光蛋白融合。



A: RT-PCR 检测 1: DNA 标准(DL 2000), 2: pEGFP-N1-AQP9 转染组, 3: pEGFP-N1 转染组, 4: ddH₂O 转染组, 5: 未处理 L-02 细胞组;
B: Western blot 检测 1: pEGFP-N1-AQP9 转染组, 2: pEGFP-N1 转染组, 3: ddH₂O 转染组, 4: 未处理 L-02 细胞组

图 3 RT-PCR 及 Western blot 检测重组质粒在 L-02 细胞中的表达

2.4 MTT 法确定油酸最适浓度

当油酸浓度大于 20 $\mu\text{g/ml}$,吸光度值明显下降,细胞活性显著降低(表 1),因此确定 20 $\mu\text{g/ml}$ 的油酸浓度作为诱导 L-02 细胞脂肪变性的最适浓度。

表 1 不同浓度油酸对 L-02 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

油酸	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
吸光度值	0.43 \pm 0.04	0.48 \pm 0.04	0.47 \pm 0.05	0.44 \pm 0.03	0.40 \pm 0.05	0.35 \pm 0.05 ^a

a: $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{g/ml}$ 比较

2.5 L-02 细胞脂肪变性模型中 AQP9 的表达

2.5.1 绿色荧光蛋白检测转染情况 倒置荧光显微镜观察,油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组、油酸/pEGFP-N1 转染组均可见绿色荧光。油酸/ddH₂O 转染组、油酸组、未处理 L-02 细胞组未见绿色荧光。说明重组质粒转染进入 L-02 细胞并表达。

2.5.2 半定量 PCR 及 Western blot 检测各组 AQP9 表达情况

PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果显示,油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组 AQP9 条带最亮,油酸/pEGFP-N1 转染组、油酸/ddH₂O 转染组及油酸组 AQP9 条带较亮,未处理 L-02 细胞组 AQP9 条带最淡。经 Western blot 检测,油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组可见 GFP/AQP9 融合蛋白条带,油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组、油酸/pEGFP-N1 转染组、油酸/ddH₂O 转染组及油酸组可见较亮 AQP9 蛋白条带,而未处理 L-02 细胞组 AQP9 蛋白条带最淡。说明油酸诱导 L-02 细胞脂肪变性能增加其 AQP9 表达,而转染重组质粒 pEGFP-N1-AQP9 后,可使其 AQP9 表达量进一步升高。

2.6 油红 O 染色

正置显微镜下观察:油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组 L-02 细胞内可见大量橘红色脂滴,伴较多脂滴融合现象,脂肪变性程度较重;油酸/pEGFP-N1 转染组、油酸/ddH₂O 转染组及油酸组可见中等量橘红色脂滴,伴少许脂滴融合,脂肪变性程度较轻;未处理 L-02 细胞组未见橘红色脂滴(图 4)。表明增加 L-02 细胞的 AQP9 表达量能使其脂肪变性程度加重。

2.7 甘油三酯、游离脂肪酸及甘油含量测定

油酸可诱导 L-02 细胞脂肪变性,使其 TG、FFA 及甘油含量增加,未处理 L-02 细胞组与其他组比较,有显著的差异($P < 0.01$)。油酸/pEGFP-N1 转染组、油酸/ddH₂O 转染组与油酸组之间比较,差异没有统计学意义($P > 0.05$)。油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组与油酸组比较,有显著的差异($P < 0.01$,表 2)。说明增加 AQP9 表达量能使 L-02 细胞中 TG、FFA 及甘油含量增加,表明 AQP9 在肝细胞脂肪变性中起着重要的作用。

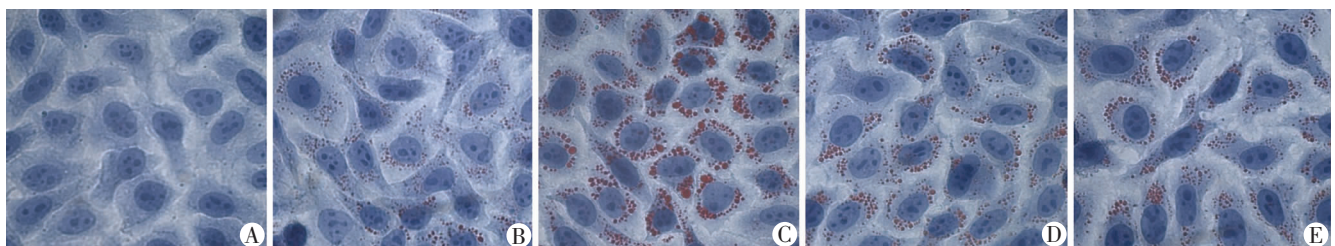
表 2 各组甘油三酯、游离脂肪酸、甘油含量的测定($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	n	甘油三酯	游离脂肪酸	甘油
未处理 L-02 细胞组	5	1.366 \pm 0.239 ^a	0.493 \pm 0.124 ^a	0.379 \pm 0.092 ^a
油酸组	5	3.218 \pm 0.220	1.538 \pm 0.193	1.024 \pm 0.148
油酸/pEGFP-N1-AQP9 转染组	5	5.435 \pm 0.337 ^a	2.016 \pm 0.144 ^a	1.485 \pm 0.113 ^a
油酸/pEGFP-N1 转染组	5	3.505 \pm 0.304	1.634 \pm 0.224	0.973 \pm 0.163
油酸/ddH ₂ O 转染组	5	3.259 \pm 0.253	1.517 \pm 0.157	1.113 \pm 0.252

a: $P < 0.01$, 与油酸组比较

3 讨论

临床上 NAFLD 已成为常见的肝病之一,随着病情的进展,将形成非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝纤维化,甚至原发性肝癌,同时也将引起脂质代谢紊



A: 未处理 L-02 细胞组; B: 油酸组; C: 油酸组/pEGFP-N1-AQP9 转染组; D: 油酸/pEGFP-N1 转染组; E: 油酸/ddH₂O 转染组

图 4 油红 O 染色观察各组 L-02 细胞中脂质含量的变化

乱,导致心脑血管疾病^[5]。据流行病学调查,不同种族、不同年龄人群均可发生 NAFLD,高发于 40 ~ 49 岁,在不同国家和地区患病率为 10% ~ 24%,其中肥胖人群患病率更高,为普通人群的 4.6 倍,可达 57.4% ~ 74.0%^[6]。重度肥胖患者肝脏活检结果发现,脂肪肝占 86% ~ 93%,脂肪性肝炎占 24% ~ 26%,肝硬化占 2% ~ 17%,表明 NAFLD 的患病率与肥胖呈正相关,减轻肥胖的程度可以显著降低 NAFLD 的危险性。肝细胞脂肪变性和脂肪蓄积是整个 NAFLD 的始作俑者,尽早发现和治理肝脏脂肪变性已成为全人类的共同心愿。

AQP 属于主要内源性蛋白(major intrinsic protein, MIP)家族,可分为两大类:一类为水通道蛋白,占其中的大多数,仅对水分子有通透性,另一类为水甘油通道蛋白,包含 AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10,它们不仅对水分子有通透性,还对尿素、甘油甚至某些无机离子有通透性^[7],它们在调节的机体的甘油运输和脂质代谢方面具有重要的意义,与 NAFLD、肥胖、代谢综合征及胰岛素抵抗关系密切。

肝细胞膜上存在 3 种水甘油蛋白通道:AQP3、AQP7 及 AQP9,其中 AQP9 表达量最高。肝细胞膜上的 AQP9 能将血液中甘油转运进入肝细胞,在肝细胞内以甘油和游离脂肪酸为原料合成甘油三酯,参与了甘油从脂肪细胞到肝细胞的转移,实现了脂肪的重新分布^[8]。如果 AQP9 异常升高,大量甘油进入肝细胞将引起脂肪合成和蓄积增加,从而导致脂肪肝的形成^[9]。AQP9 功能异常也将阻碍糖异生过程而导致低血糖,同时也与胰岛素及代谢综合征抵抗密切相关^[10-12]。降低肝细胞 AQP9 的表达可有效阻断甘油进入肝细胞,从而治疗和预防 NAFLD 的发生、发展。同时 AQP9 也作为一些药物吸收的通道,如化疗药物三氧化二砷^[13-14],诱导肿瘤细胞膜上 AQP9 表达量增加可有效提高化疗药物的疗效,并减少用药剂量,从而降低药物的毒副作用,为肿瘤的治疗提供了一个新的思路^[15]。

本课题成功构建了重组质粒 pEGFP-N1-AQP9。经测序分析,有 1 个碱基发生突变,45 位:A→G,为无义突变。重组质粒 pEGFP-N1-AQP9 能在 L-02 肝细胞中表达并且能够被兔抗人 AQP9 抗体识别。通过油酸诱导建立 L-02 脂肪变性细胞模型,将重组质粒转染细胞模型后,发现增加 L-02 细胞的 AQP9 表达量能使其脂肪变性程度加重,细胞内脂质含量增加,甘油三酯、游离脂肪酸及甘油含量升高。证明 AQP9 异常升高能够引起或加重 NAFLD,提示以 AQP9 为靶点预防和治

疗 NAFLD 具有良好的应用前景,为进一步研究 AQP9 对 NAFLD 的基因治疗奠定基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Hjelkrem M C, Torres D M, Harrison S A. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Minerva Med*, 2008, 99(6): 583 - 593.
- [3] 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.
- [4] 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 U S A*, 2007, 104(9): 3609 - 3614.
- [5] 王万东,陈东风. 非酒精性脂肪变性肝细胞模型中 ATF4 基因的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(14): 1487 - 1490.
- [6] Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis[J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34(6 Pt 2): 634 - 637.
- [7] 邱烈旺,顾陆均,吕琳,等. 水甘油通道蛋白在非酒精性脂肪变性肝细胞模型中的表达和意义[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(7): 622 - 626.
- [8] Hara-Chikuma M, Verkman A S. Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(12): 1386 - 1392.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 刘卉,梅浙川,肖潇. 胰岛素对人肝细胞 L02 水通道蛋白 9 表达的影响及其调控通路[J]. 中华肝病杂志, 2010, 18(6): 455 - 458.
- [12] Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis[J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34(6 Pt 2): 643 - 648.
- [13] Lewen S, Zhou H, Hu H D, *et al.* A Legumain-based minigene vaccine targets the tumor stroma and suppresses breast cancer growth and angiogenesis[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(4): 507 - 515.
- [14] Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, *et al.* Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(31): 12879 - 12883.
- [15] 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.

(收稿:2012-02-06;修回:2012-04-03)

(编辑 王红)