

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00199

## 小鼠水通道蛋白1基因慢病毒载体构建及其在神经膜细胞中的表达

章杰<sup>1,2</sup>, 江华<sup>1\*</sup>, 汪汇<sup>1</sup>, 方帆<sup>1</sup>, 宋艳玲<sup>1</sup>, 芦立轩<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003

2. 南昌大学第一附属医院整形美容科, 南昌 330006

**[摘要]** **目的** 构建表达小鼠水通道蛋白1(AQP1)基因的慢病毒载体, 体外感染原代培养的 C57BL/6 小鼠神经膜细胞, 观察是否提高 AQP1 的表达, 为进一步研究 AQP1 与周围神经系统损伤后水肿的关系奠定基础。 **方法** 将小鼠 AQP1 基因克隆到慢病毒 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 载体, 通过 PCR 和测序鉴定获得连接正确的克隆。将鉴定后的重组表达质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1 与包装质粒 psPAX2、pMD 共转染 293T 细胞, 制备携带 AQP1 基因的慢病毒 lentivirus-AQP1。体外培养 C57BL/6 小鼠的神经膜细胞, 将 lentivirus-AQP1 感染神经膜细胞, RT-PCR 和蛋白质印迹法检测感染后神经膜细胞 AQP1 mRNA 和蛋白的表达情况。 **结果** 构建的慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1 经 PCR 鉴定和测序正确。慢病毒 lentivirus-AQP1 感染神经膜细胞后 AQP1 表达增加 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 成功构建了小鼠 AQP1 基因的慢病毒表达载体, 该载体能有效感染神经膜细胞, 使 AQP1 mRNA 和蛋白表达水平增高。

**[关键词]** 水通道蛋白1; 过表达; 慢病毒; 神经膜细胞

**[中图分类号]** R 349.83

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0199-06

### Construction of lentiviral vector containing mouse aquaporin-1 gene and its expression in Schwann cells

ZHANG Jie<sup>1,2</sup>, JIANG Hua<sup>1\*</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, FANG Fan<sup>1</sup>, SONG Yan-ling<sup>1</sup>, LU Li-xuan<sup>1</sup>

1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

**[Abstract]** **Objective** To construct a lentiviral vector carrying mouse aquaporin-1 (AQP1) gene and use it for infecting Schwann cells of C57BL/6 mouse, so as to provide AQP1 + Schwann cells for further studying the relationship of AQP1 with peripheral nerve system injury edema. **Methods** Mouse AQP1 gene was inserted into lentiviral vector pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP, and the products were confirmed by PCR and sequencing analysis. pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1 and the virus packaging plasmids psPAX2 and pMD were cotransduced into 293T cells to prepare lentivirus-AQP1, and the latter was used to infect C57BL/6 mouse Schwann cells *in vitro*. The expression of AQP1 mRNA and protein was detected by quantitative real-time PCR and Western blotting analysis in infected mouse Schwann cells. **Results** PCR and sequencing revealed that the pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1 plasmids were successfully constructed. The expression of AQP1 mRNA and protein in Schwann cells was significantly increased than that in cells infected with control lentiviruses ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** We have successfully constructed a recombinant lentivirus carrying AQP1 gene, which can be used to infect mouse Schwann cells, leading to increase of AQP1 mRNA and protein expression.

**[Key words]** aquaporin 1; over-expression; lentivirus; Schwann cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):199-204]

水通道蛋白1(aquaporin-1, AQP1)存在于多种组织细胞中, 参与水的排出、吸收及细胞内外水平衡的维持, 与组织器官水肿的形成和消除密切相关, 对

胶质细胞的作用发挥有重要影响, 是一种高效介导跨膜水转运的膜蛋白<sup>[1]</sup>。已有研究发现, AQP1 是周围神经系统表达最多的 AQP, 并且定位在神经膜

**[收稿日期]** 2012-09-06

**[接受日期]** 2012-10-11

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31271264), 上海市科委基础研究重点课题(08JC1407100). Supported by National Natural Science Foundation of China (31271264) and Key Basic Research Program of Shanghai Science and Technology Commission (08JC1407100).

**[作者简介]** 章杰, 博士生, 主治医师. E-mail: zhjprs@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886777, E-mail: dosjh@126.com

细胞内<sup>[2]</sup>,对周围神经系统损伤后水肿起重要作用,但 AQP1 在周围神经系统中的具体功能及其作用机制还不清楚。本研究通过构建携带 AQP1 基因的重组慢病毒,并使其感染神经膜细胞,以提高 AQP1 mRNA 和蛋白表达,为探讨 AQP1 在周围神经系统损伤后水肿中的功能及机制,确定 AQP1 与周围神经损伤后水肿的因果关系及寻求基因治疗奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 慢病毒载体系统购自 SBI 公司,该病毒包装系统由 SBI 公司提供;原代小鼠神经膜细胞由第二军医大学神经生物研究所分离鉴定,293T 细胞由第二军医大学神经生物研究所保存。限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 以及 T4 连接酶购自 New England 公司;小鼠 AQP1 cDNA 购自北京傲锐东源生物科技有限公司;C57BL/6 新生鼠(3 日龄)购自第二军医大学实验动物中心;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生物科技有限公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自 TRANS-gene 公司;SYBR Master Mixture 试剂盒购自 TaKaRa 公司;In-Fusion 试剂盒购自 BD 公司;TRIzol 试剂盒、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;小鼠抗 AQP1 单克隆抗体、山羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司;蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司;ECL-Plus 试剂盒购自 Amersham 公司;PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司;细胞培养液 DMEM-F12 购自 HyClone 公司;ABI PRISM 9700 PCR 扩增仪,ABI 7900 HT 定量 PCR 仪;胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;荧光倒置显微镜(CKX41-F32FL)购自日本奥林巴斯;蛋白质印迹法的电泳以及转膜采用 Bio-Rad 仪器。引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,基因测序均由上海联合基因科技有限公司完成。

1.2 PCR 法获取目的基因片段 使用小鼠 AQP1 cDNA 作为模板,PCR 上游引物为 5'-AAA GGA TCC ATG GCC AGC GAG TTC AAG A-3',下游引物为 5'-AAA GAA TTC CTA TTT GGG CTT CAT CTC CAC-3'。PCR 反应体系: Buffer (10 $\times$ ) 5  $\mu$ L, Primer mixture 2  $\mu$ L, 模板(100 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, dNTP mix(各 2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, *Pfu* Ultra II 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 38  $\mu$ L, 共 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 52 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s,

共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增结果,用 DNA 标志物判断扩增片段大小,紫外灯下观察大小为 800 bp 的 AQP1 并切胶回收。

1.3 慢病毒表达载体和 AQP1 基因扩增产物的酶切和纯化 取慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 5  $\mu$ g 以及纯化的 PCR 产物 30  $\mu$ L, 使用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 将其切成带黏性末端的线性载体,总体积 40  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。酶切载体产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收。PCR 产物经过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶酶切后使用异丙醇沉淀, ddH<sub>2</sub>O 溶解。

1.4 制备重组 AQP1 过表达慢病毒克隆 AQP1 片段及 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 质量比约为 5:1(AQP1 产物片段大致 250 ng, 酶切载体约为 50 ng), 2  $\mu$ L 的 T4 连接酶缓冲液(NEB), 1  $\mu$ L 的 T4 连接酶, 室温 2 h, 并设立对照组(不加入 AQP1 的产物片段)。连接产物分别全部转化 100  $\mu$ L 的 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 冰上 30 min, 热激 1 min, 然后置于冰上 2 min, 加入 700  $\mu$ L 预冷的无氨苄青霉素抗性的无菌 LB 培养液, 6.3 $\times$ g, 37 $^{\circ}$ C 摇菌 1 h。离心转化的感受态细胞, 去上清, 吹匀感受态细胞, 均匀涂在含有氨苄青霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 琼脂平板上, 待其吸收后, 倒置平皿, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。

1.5 PCR 扩增法鉴定重组克隆 待克隆长到直径约 0.5 mm 时, 用高压灭菌的牙签随机挑选 6 个克隆到 3 mL 有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)抗性的 LB 中, 水平摇床 37 $^{\circ}$ C、6.3 $\times$ g 过夜。标记好每个克隆, 然后用高压灭菌的枪头吸 200  $\mu$ L 的菌液到 EP 管中, 沸水煮 5 min, 4 $^{\circ}$ C、22 500 $\times$ g 离心 10 min。反应体系: 取上述细菌裂解液上清 1  $\mu$ L 作为模板, 去离子水 18.5  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP mix 2  $\mu$ L, 前、后引物各 0.5  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 扩增 25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取扩增产物各 10  $\mu$ L, 用琼脂糖凝胶电泳分析电泳结果, 用 DNA 标志物来判断扩增片段的大小。取 2 个以上阳性克隆送测序。

1.6 重组慢病毒包装及滴度测定 293T 细胞培养于 DMEM 高糖培养液(含胎牛血清 10%), 在体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度及 37 $^{\circ}$ C 下进行培养。当细胞融合度达 60%~70%时转染;取 2 个无菌 1.5 mL

EP管,各加入500  $\mu\text{L}$  Opti-MEM培养液,将慢病毒包装系统中3种质粒混合物与克隆的慢病毒载体加入其中一个EP管中,混合均匀。另外一个EP管中加入60  $\mu\text{L}$ 的Lipofectamine 2000进行混合,静置5 min。然后将质粒混合物缓慢加入含有脂质体的EP管中,形成DNA与转染试剂的转染复合物。将转染复合物转移至换为无血清培养液的293T细胞中,混合,培养6 h后弃上清,加入含10%胎牛血清的培养液继续培养。当细胞培养液变黄时,收集转染的293T细胞上清液,重复收集2次,于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下4 000 $\times g$ 离心10 min,收集上清液,使用贝克曼高速离心机97 800 $\times g$ 离心2 h,弃上清,使用无菌的PBS溶解,将上述溶解液以0.45  $\mu\text{m}$ 滤器过滤,分装于1.5 mL的EP管,冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。慢病毒感染293T细胞以确定病毒的滴度,使用梯度稀释法将病毒稀释成不同浓度的病毒液。将293T细胞均匀铺于6孔板中,分别加入1、5、10、20、40、100  $\mu\text{L}$ 病毒液。72 h后观察细胞的荧光效率。

**1.7 神经膜细胞的培养及感染** 原代培养新生C57BL/6小鼠(3日龄)面神经神经膜细胞,在解剖显微镜下于小鼠耳前与眼连线之间,用显微镊剥离皮肤及皮下组织显露面神经,可见面神经主干及其分支,取出面神经放入解剖液内(以无机盐和葡萄糖配成的PBS),仔细剥除神经外膜,显微剪反复剪碎组织块,0.25%胰蛋白酶37 $^{\circ}\text{C}$ 消化1 h,含10%胎牛血清的DMEM-F12培养液终止消化,157 $\times g$ 离心5 min后用培养液重悬,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 孵箱内培养,以获得神经膜细胞;接种目的细胞于6 cm培养皿中,当细胞融合度达到30%~45%时,加入500  $\mu\text{L}$ 的浓缩病毒上清,同时加入10 mL含10%胎牛血清的细胞培养液,加入polybrene(Sigma)至终浓度4~8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,24 h后更换为普通培养液。72 h荧光显微镜下观察细胞感染效率。

**1.8 RT-PCR和蛋白质印迹法检测AQP1 mRNA和蛋白表达** (1)用TRIzol法提取未感染和慢病毒感染神经膜细胞的总RNA,经反转录试剂盒合成cDNA;AQP1 RT-PCR检测前引物为5'-GCT CAC CCG CAA CTT CTC-3',后引物为5'-GGG CTT CAT CTC CAC CCT-3',内参( $\beta$ -actin)检测前引物为5'-CAC TGT GCC CAT CTA CGA-3',后引物为5'-CAG GAT TCC ATA CCC AAG-3'。使用TaKaRa公司的PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit进行实时荧光定量PCR,按照TaKaRa实时荧光定量PCR

说明书,加入引物等,置于7900HT荧光定量PCR仪上进行扩增。数据使用SDS 2.1软件分析,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算基因相对表达。(2)用PBS洗涤受感染和未感染的神经膜细胞,收集并用裂解液裂解,用细胞刮刮下裂解产物,30 700 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min,去除细胞碎片。使用蛋白定量试剂盒测定裂解产物的蛋白浓度为2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。用10%琼脂糖凝胶电泳分离等量的蛋白质,然后电转移至PVDF膜。将膜浸入TBST 5%脱脂奶粉中室温放置1 h,与1:100稀释的小鼠抗AQP1抗体和1:2 500稀释的抗 $\beta$ -actin抗体共孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。与1:5 000稀释的羊抗鼠IgG在室温下孵育1 h。经过多次清洗,用ECL-Plus试剂盒观察蛋白条带。实验至少重复3次。

**1.9 统计学处理** 采用SPSS 15统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

**2.1 目的基因AQP1 PCR扩增产物电泳结果** 以小鼠AQP1 cDNA为模板进行PCR,取PCR产物10  $\mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳,显示在810 bp处有扩增条带,片段大小与预期值一致,表明目的基因克隆成功(图1)。

**2.2 慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1构建鉴定及测序** 使用BamH I和EcoR I限制性内切酶双酶切后的质粒载体与PCR产物连接后,挑选5个克隆进行菌液PCR。如图2所示,1、2、4泳道为阳性克隆,表明连接成功,PCR产物电泳结果显示均表达与扩增条带大小一致的DNA片段。对质粒载体送测序,测序结果表明:表达克隆中插入目的基因的片段序列与美国国家生物技术信息中心的NM\_007472.1序列一致,大小为810 bp(小鼠AQP1基因),表明慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1构建成功。

**2.3 双酶切鉴定结果** 对PCR鉴定初步筛选为阳性重组子pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1进行双酶切鉴定,由于目的基因AQP1两端在扩增引物上加入了BamH I和Hind III酶切位点,使用BamH I和Hind III限制性内切酶酶切重组质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1,可以得到2个片段,即约7 500 bp的慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP片段与810 bp的目的基因片段,

见图3。经酶切鉴定再次证实获得的重组子 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1 构建成功。

度梯度分别加入不同量的病毒,加入 ploybrene 使细胞内终浓度达到 8 μg/mL。24 h 后换成新鲜的含 10%胎牛血清的培养液。72 h 观察细胞的荧光效率以此判断病毒的滴度。病毒经浓缩后其滴度为 2 × 10<sup>8</sup>PFU/mL。

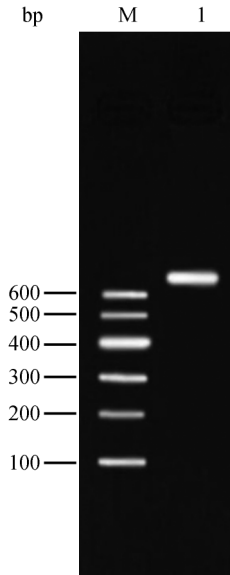


图 1 目的基因 AQP1 的 PCR 扩增产物凝胶电泳分析

Fig 1 Agarose gel electrophoresis results of PCR products of AQP1

AQP1: Aquaporin-1; M: DNA marker; 1: PCR amplification products of AQP1 (810 bp)

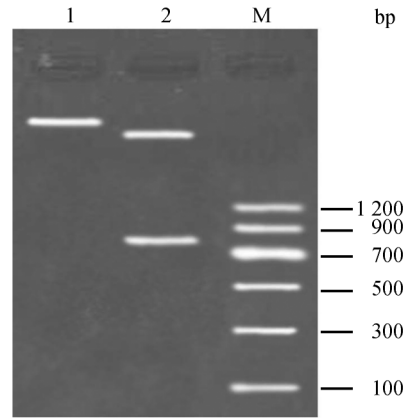


图 3 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1 双酶切鉴定结果

Fig 3 Double digestion identification results of pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1

M: DNA marker; 1: pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1; 2: Double digestion (*Bam*HI and *Hind*III) for recombinant of pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1

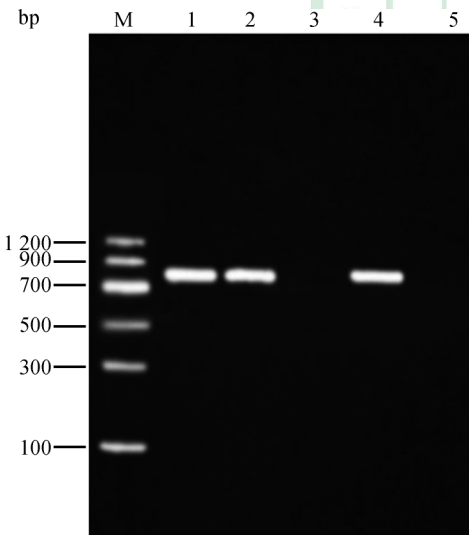


图 2 目的基因 AQP1 重组克隆 PCR 鉴定结果

Fig 2 PCR identification results of recombinant lentivirus-AQP1

AQP1: Aquaporin-1; M: DNA marker; 1-5: Recombinant lentivirus-AQP1 digested by *Bam*H I and *Eco*R I (AQP1 PCR amplification products being 810 bp)

2.4 慢病毒滴度测定 对数生长期的 293T 细胞于病毒感染前 1 d 使用胰酶消化细胞并计数细胞密度,按照 1 : 4 的细胞密度接种到 6 孔板中。按病毒滴

2.5 慢病毒感染神经膜细胞后荧光表达 经过病毒滴度的测定,以合适的病毒量(约 5 × 10<sup>6</sup> PFU 空载体慢病毒或 AQP1 过表达慢病毒)分别感染原代分离的小鼠神经膜细胞,细胞感染后 72 h,如图 4 所示,在倒置荧光显微镜下均可观察到绿色荧光,感染效率都在 90% 以上。

2.6 RT-PCR 检测慢病毒感染神经膜细胞后 AQP1 mRNA 表达 细胞感染后 96 h 收取 RNA,经反转录成 cDNA 后,RT-PCR 检测 AQP1 mRNA 表达。如图 5 所示,相对于未感染组和空载体感染组,AQP1 过表达慢病毒组的 AQP1 mRNA 表达水平上升( $P < 0.05$ ),表明 AQP1 过表达成功。

2.7 蛋白质印迹法检测慢病毒感染神经膜细胞后 AQP1 蛋白表达 感染后 96 h 收取蛋白,蛋白定量后检测 AQP1 的蛋白表达情况。如图 6 所示,空白对照组和空载体对照组在相对分子质量为 28 000 处均有较弱的印迹条带,而 AQP1 过表达慢病毒组的印迹条带最明显,强于空白对照组和空载体对照组,说明构建的表达 AQP1 基因的慢病毒载体可高效表达 AQP1 蛋白。

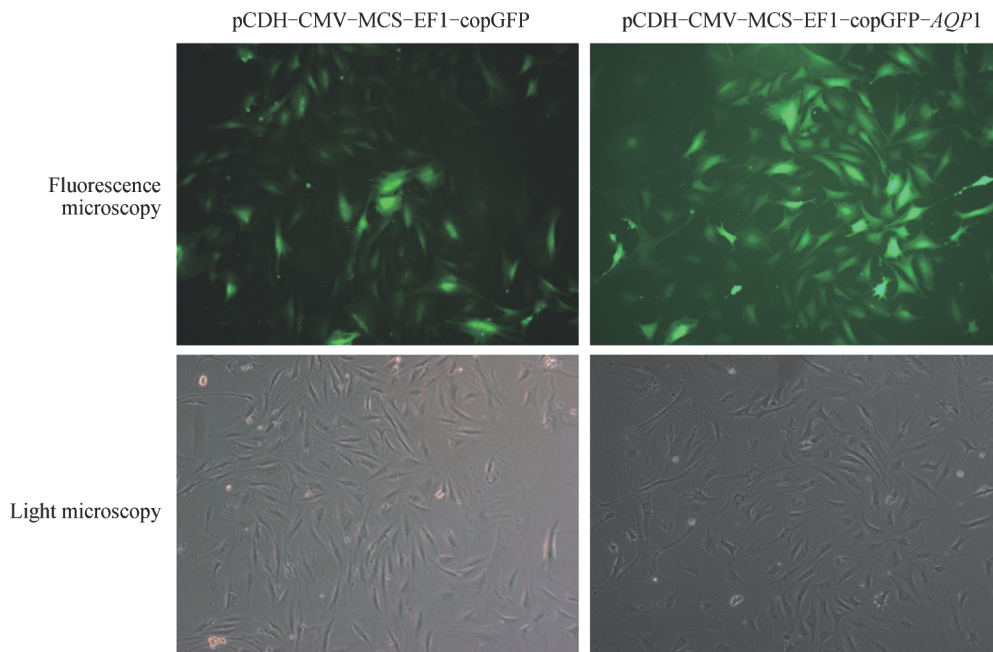


图 4 利用绿色荧光观察慢病毒对神经膜细胞的感染效率

Fig 4 GFP expression in lentivirus infected Schwann cells

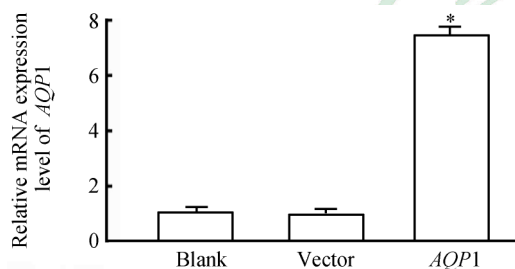


图 5 RT-PCR 检测过表达

AQP1 基因后神经膜细胞 AQP1 mRNA 结果

Fig 5 Overexpression of AQP1 mRNA in Schwann cells detected with real time-PCR

Blank: Negative control; Vector: Empty vector group (pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP); AQP1: pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1 group. \*  $P < 0.05$  vs the other 2 groups.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

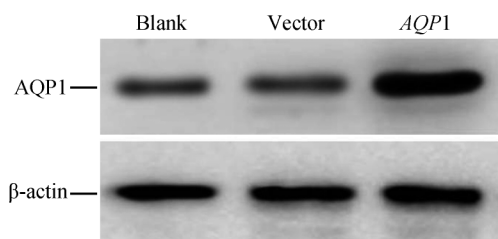


图 6 过表达 AQP1 基因的慢病毒载体感染神经膜细胞后的蛋白质印迹分析结果

Fig 6 Overexpression of AQP1 protein in

Schwann cells detected by Western blotting analysis

Blank: Negative control; Vector: Empty vector (pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP); AQP1: pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-AQP1

### 3 讨论

目前已知周围神经的各种损伤,包括牵拉伤、离断伤、压迫伤、感染等,均会造成周围神经的水肿,但导致周围神经水肿的分子机制还不清楚。而面神经作为周围神经的一种,因解剖特殊,损伤后受面神经管压迫,常形成水肿-缺血-水肿的恶性循环,进一步加重面神经的损伤。因此,如何预防或减轻面神经的水肿在面瘫临床治疗中显得尤为重要。AQPs 是一组对水有高度选择性的细胞膜转运蛋白,也是跨膜水转运的重要通道,广泛分布于机体的多种组织细胞中,在组织器官水肿形成和消除以及水液代谢的调节中起重要作用,并对胶质细胞的作用发挥有重要影响<sup>[3]</sup>。AQP1 则是周围神经系统表达最多的 AQP,其在周围神经系统的定位也一直受到关注。Gao 等<sup>[2]</sup>报道,使用免疫组化、RT-PCR 和免疫印迹的方法,发现 AQP1 定位在周围神经系统的胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)表达阳性的神经膜细胞内,近来也有研究发现 AQP1 在肠道神经系统的神经组织内表达阳性<sup>[4]</sup>,而且 AQP1 也在周围神经系统的背根神经节、三叉神经节、结节性神经节的神经膜细胞和卫星细胞内表达<sup>[5]</sup>,明确了 AQP1 在周围神经系统的定位。本研究前期通过细胞免疫组化双标法确定来自面神经体外培养的 S-100 表达阳性的原代神经膜细胞表达 AQP1,与文献相符<sup>[2,4-5]</sup>;而且还发现

面神经损伤后 AQP1 表达增高,并与面神经损伤后水肿时相性变化高度一致,提示 AQP1 与面神经损伤后继发性水肿密切相关,但是 AQP1 表达增高与面神经水肿的因果关系还未确定,AQP1 在神经膜细胞内如何发挥生理和病理作用也不清楚。因此本研究构建 AQP1 过表达病毒载体感染体外培养的神经营养细胞,为后期观察神经膜细胞表型及功能变化,进而确定 AQP1 与周围神经水肿关系及研究 AQP1 基因功能奠定实验基础。

细胞基因转染有多种载体可供选择,如质粒、脂质体、反转录病毒、腺病毒等。然而,这些载体与慢病毒相比具有许多缺点,如质粒和脂质体转染效率低、细胞毒性强<sup>[6]</sup>;反转录病毒只能在可分裂细胞中整合外源基因;腺病毒只能瞬时表达外源基因,感染效率较低且需较高的病毒量<sup>[7]</sup>。而慢病毒载体能将目的基因或 RNAi 高效导入动物或人的原代细胞或细胞系,具有毒力低、感染效率高、容纳外源性基因片段大等特点,并能将目的基因整合到宿主细胞染色体中,可长期稳定表达外源基因,还可为活体动物模型实验提供高质量的包含目的基因的病毒液,产生转基因动物,是目前理想的基因治疗载体系统<sup>[8-9]</sup>。

本研究经 PCR 筛选阳性克隆及测序鉴定结果表明:成功构建了含有小鼠 AQP1 基因的慢病毒载体。慢病毒包装质粒包装病毒 lentivirus-AQP1 能有效提高神经膜细胞 AQP1 表达,并且随细胞传代,将 AQP1 基因稳定地遗传给下一代,为研究受 AQP1 基因感染的神经膜细胞表型及功能改变奠定了基础。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Hachez C, Chaumont F. Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 679: 1-17.
- [2] Gao H, He C, Fang X, Hou X, Feng X, Yang H, et al. Localization of aquaporin-1 water channel in glial cells of the human peripheral nervous system[J]. *Glia*, 2006, 53: 783-787.
- [3] Verkman A S. Physiological importance of aquaporin water channels[J]. *Ann Med*, 2002, 34: 192-200.
- [4] Nagahama M, Ma N, Semba R, Naruse S. Aquaporin 1 immunoreactive enteric neurons in the rat ileum[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 395: 206-210.
- [5] Nandasena B G, Suzuki A, Aita M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Maeda T. Immunolocalization of aquaporin-1 in the mechanoreceptive Ruffini endings in the periodontal ligament[J]. *Brain Res*, 2007, 1157: 32-40.
- [6] Kusumawati A, Combes T, Liautard J P, Widada J S. Transfection of myelomonocytic cell lines: cellular response to a lipid-based reagent and electroporation[J]. *Anal Biochem*, 1999, 1: 219-221.
- [7] Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, Curiel D T. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles [J]. *Stem Cells*, 2003, 21: 389-404.
- [8] Sakuma T, Barry M A, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational[J]. *Biochem J*, 2012, 443: 603-618.
- [9] Dreyer J L. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions[J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 47: 169-187.

[本文编辑] 尹 茶