论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1698-05

rAQP4-M1 真核表达载体的构建及在 CHO 细胞中的表达

冉建华[1,2],唐 玲[3],汪克建[1,2],李小松[1,2],孙善全[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院解剖学教研室[1],神经科学研究中心[2];402161 重庆,重庆医科大学附属永川医院神经内科[3])

【摘要】 目的 构建 rAQP4-M1 基因真核表达载体,建立稳定转染 AQP4-M1 的 CHO 细胞系。**方法** 应用 RT-PCR 从大鼠脑组织中扩增 rAQP4-M1,并将 PCR 产物双酶切后插入到 pcDNA3.1(+)真核表达载体中,经过菌落 PCR、双酶切及测序验证的 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 质粒通过脂质体转染 CHO 细胞。G418 筛选建立稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞系。采用细胞免疫荧光和免疫印迹技术检测 rAQP4-M1 在该细胞系中的表达。**结果** 成功构建了 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 表达质粒,建立了稳定转染的 CHO 细胞系。免疫荧光检测结果显示,rAQP4-M1 在 CHO 细胞膜上稳定表达;免疫印迹检测可见 34×10^3 处的阳性条带,表明 rAQP4-M1 在该细胞系中成功表达。蓝绿温和胶电泳技术证实了 rAQP4-M23 而不是 rAQP4-M1 参与了正交排列颗粒(orthogonal arrays of particles,OAPs)的形成。**结论** rAQP4-M1 在 CHO 细胞系中稳定表达成功,rAQP4-M1 未参与 OAPs 的形成。

【关键词】 rAQP4-M1;稳定转染;真核表达载体

【中图法分类号】 R322.81;R329;R394-33 **【文献标志码】** A

Construction of eukaryotic expression vector of rat AQP4-M1 and its expression in CHO cells

Ran Jianhua[1,2], Tang Ling[3], Wang Kejian[1,2], Li Xiaosong[1,2], Sun Shanquan[1,2] ([1]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, [2]Neuroscience Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Neurology, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402161, China)

【Abstract】 **Objective** To construct an eukaryotic expression vector of rat aquaporins (AQP4)-M1 and to establish its stable transfectants in CHO cells. **Methods** The fragment of rAQP4-M1 was amplified from rat brain by RT-PCR, and then the PCR products were cloned into pcDNA3.1(+) after *Nde* Ⅰ and *Xho* Ⅰ digestion. The eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 was sequenced and transfected into CHO cells by Lipofectamine 2000. After screening by G418, stably transfected CHO cell line was established. The expression of rAQP4-M1 was identified by immunocytochemistry and immunoblotting. Blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) was used to detect the formation of orthogonal arrays of particles (OAPs). **Results** The eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 was successfully constructed and its stable transfectants in CHO cells was established. Immunofluorescence image revealed that rAQP4-M1 was expressed successfully on the membrane of CHO cells. Immunoblotting results following SDS-PAGE indicated the positive band was at 34×10^3, which manifesting that rAQP4-M1 was successfully and stab1y expressed in CHO cells. Results of BN-PAGE indicated that it was rAQP4-M23 not rAQP4-M1 that played a role in the formation of OAPs. **Conclusion** The recombinant eukaryotic expression vector of pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 is constructed successfully and stab1y expressed in CHO cells, which provides a foundation for further studies on the function of AQP4 isoforms of M1 and M23.

【Key words】 rAQP4-M1; stable transfection; eukaryotic expression vector

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470608, 30500171) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5098).
Corresponding author: Sun Shanquan, Tel: 86-23-68485763, E-mail: sunsq2151@sohu.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30470608,30500171);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5098)
【通信作者】 孙善全,电话:(023)68485763,E-mail:sunsq2151@sohu.com

水通道蛋白(aquaporins,AQPs)是一组广泛分布于哺乳动物、植物和微生物,介导水乳酸、尿素等小分子溶质跨细胞膜快速转运的细胞膜蛋白。目前已在哺乳动物体内分离鉴定出 13 种水通道蛋白,即 AQP0 ~ AQP12,其中在脑组织中分布最广泛的是 AQP4[1,2]。AQP4 可能在维持脑组织内环境稳定、胶质细胞迁移和神经信号转导等过程中发挥重要作用,而多种中枢神经系统疾病(如脑水肿、恶性胶质瘤、癫痫等)的病理过程也与 AQP4 的表达和分布异常密切相关[3-6],但目前对其具体的分子机制认识仍不十分清楚。AQP4 单体具有 M1 和 M23 2 种亚型[7],由这 2 种单体构成的异源四聚体是 AQP4 内源性四聚体的常见形式。目前国内外对 M1 和 M23 单体的功能研究均不充分,其中多数研究仅以 M23 为对象,而对 M1 的认识却相对不足,严重制约了对 AQP4 生理功能及其病理作用的认识。本实验将大鼠脑组织 rAQP4-M1 基因的全长 cDNA 克隆到 pcDNA3.1(+)真核表达载体中,建立能在真核细胞中组成性表达大鼠 rAQP4-M1 蛋白的真核表达载体并转染 CHO 细胞,经筛选得到组成性高表达大鼠 rAQP4-M1 蛋白的细胞系,有助于对 AQP4 分子结构、生理功能及其病理作用进行深入研究,并为其治疗提供重要的理论学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

感受态细菌 JM109 为本实验室留存,CHO 细胞由 Alan S. Verkman(California University San Francisco, UCSF)馈赠,稳定表达 rAQP4-M23 的 CHO 细胞系由北京大学医学部药理学系膜通道实验室杨宝学教授馈赠。RNA 抽提试剂购自美国 Omega 公司,cDNA 第 1 链合成试剂盒、高保真 PCR 扩增酶、限制性内切酶 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ、质粒抽提试剂盒、胶回收及 PCR 纯化试剂盒、DNA 连接试剂盒均购自上海宝生物工程公司,PCR 扩增引物由上海宝生物工程公司合成,真核细胞表达载体 pcDNA 3.1(+)、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,G418 购自 Sigma 公司,F12 培养基为 Gibco 公司产品,兔抗大鼠 rAQP4 抗体购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 的 rAQP4-M1 序列,用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计。上游引物 5′-TATCATATGAGTGACGGAGCTGCAGCGAG-3′(划线处为 *Nde* Ⅰ的酶切位点);下游引物 5′-CCGCCTCGAGTCATACAGAAGATAATACCTCT-3′(划线处为 *Xho* Ⅰ的酶切位点)。其中,分别在上游和下游引物的 5′端加上了 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点及保护性碱基。

1.2.2 RT-PCR 扩增 按照 Omega 公司 RNA 抽提试剂盒说明书提供的方法抽提大鼠脑组织总 RNA,参照上海宝生物工程公司 cDNA 第 1 链合成试剂盒说明书进行 cDNA 合成。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,20 μl 反应总体积中加入下列物质:DEPC 处理水 12.1 μl,PCR 高保真酶反应缓冲液 2 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.6 μl,10 mmol/L dNTP 混合物 1.5 μl,10 pmol/μl 的上下游引物各 0.8 μl,高保真酶 0.2 μl,cDNA 模板 1.0 μl。在 9700 型 PCR 扩增仪(GeneAmp PCR System 9700,美国应用生物系统公司)上完成 PCR 扩增。扩增条件如下:先 95 ℃预变性 3 min 后,94 ℃变性 40 s,57 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 50 s,完成 35 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min,置 4 ℃保温。取 2 μl PCR 扩增产物,1% 琼脂糖凝胶电泳,以鉴定 PCR 扩增结果。

1.2.3 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 重组质粒的构建与鉴定

将 rAQP4-M1 扩增的 PCR 产物在 37 ℃用 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切 4 h,50 μl 双酶切反应体系:rAQP4-M1 PCR 扩增产物 30 μl、反应缓冲液 5 μl、*Nde* Ⅰ 2 μl、*Xho* Ⅰ 2 μl 及灭菌蒸馏水 11 μl。rAQP4-M1 酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化后,连接到已用 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切好的 pcDNA3.1(+)载体上,在连接酶的作用下 16 ℃连接过夜,然后转化大肠杆菌感受态细胞 JM109。培养过夜后挑取克隆,在含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中增菌,取适量菌液煮沸后离心以上清液为模板,按照 1.2.2 PCR 扩增条件对所挑选克隆进行菌落 PCR 鉴定,其中设置的阴性对照模板为去离子水,阳性对照模板为 rAQP4-M23 cDNA。对菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆提取质粒做双酶切鉴定,然后送检进行 DNA 测序。

1.2.4 建立稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞系 CHO 细胞在含 10% 小牛血清的 F12 培养基中于 37 ℃、50 ml/L CO_2 培养箱中培养,待细胞融合至 80% ~90% 时,按照 Lipofectamine 2000 操作说明书将 pcDNA3.1(+)和重组表达载体 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 转染 CHO 细胞,在 37 ℃,5% 的 CO_2 中保温 6 h 后,更换为新鲜 F12 培养基培养 48 h,随后用胰蛋白酶消化细胞,采用有限稀释法将细胞种入 96 孔板中,每孔加入含有 G418(800 mg/L)的选择性培养基 200 μl 继续培养。持续筛选 3 周后,获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆,扩增培养即得到稳定表达 rAQP4-M1 的 CHO 细胞系。

1.2.5 免疫印迹检测转染后 CHO 细胞系中 rAQP4-M1 的表达

将以上各组培养细胞弃培养基,用 PBS 漂洗细胞 3 次后,加入 1×SDS 样品缓冲液(6 孔板为 100 μl),刮落细胞,转移到 EP 管(冰上操作);超声 10 ~15 s 剪切 DNA 减低样品粘性,煮沸样品 5 min 后离心 12 000 × *g*,10 min,取上清并测定蛋白浓度。将备好的样品按 60 μg/道上样于 10% SDS-PAGE gels (Invitrogen),加入电泳缓冲液,120 mV,2.5 h;按常规电转移步骤将蛋白转至 PVDF 膜;经 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h 后,用 5% BSA/TBST 缓冲液稀释的兔抗 rAQP4 多克隆抗体(稀释度为 1∶1 000)和 β-actin 抗体(稀释度为 1∶1 000)孵育 2 h;TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,用 5% 的脱脂牛奶/TBST 缓冲液稀释的二抗(浓度为 1∶10 000)孵育 1 h;TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,ECL 避光孵育 15 min 后,用保鲜膜完全包裹免疫印迹膜,去除皱褶。用胶带将免疫印迹膜固定在暗盒内,蛋白带面向上,暗房内压 X 线片,曝光、显影、冲洗。

1.2.6 细胞免疫荧光鉴定稳定转染后 CHO 细胞系中 rAQP4-M1 的定位 分别将 rAQP4-M1-CHO 细胞系、转染空载体组的 CHO 细胞系(作为阴性对照)和稳定表达 rAQP4-M23 的 CHO 细胞系(作为阳性对照)接种于直径 12 mm 的盖玻片上。待细胞融合至 80% ~90%,将细胞爬片按以下程序检测:PBS

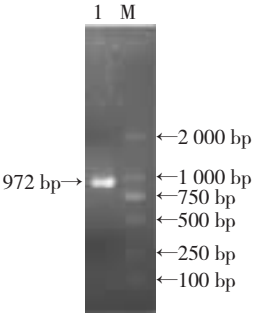
漂洗 5 min,4% 多聚甲醛固定15 min;PBS 漂洗后用 0.5% Triton 穿孔 15 min;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;1% BSA 封闭 30 min 后加入 1% BSA 稀释的 rAQP4 抗体(浓度为 1∶500),于 4 ℃过夜;次日将细胞爬片 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入 1% BSA 稀释的 PE-标记的羊抗兔荧光二抗(浓度为 1∶200)孵育 1 h;PBS 漂洗 3 次后,用 DAPI 对细胞核进行复染,PBS 漂洗 3 次后用 50% 甘油封片,激光共聚焦荧光显微镜下观察照相。

1.2.7　蓝绿温和胶电泳技术(blue-native polyacrylamide gel electrophoresis, BN-PAGE)检测 CHO 细胞系中正交排列颗粒(orthogonal arrays of particles, OAPs)的形成　参照 Crane 等[8]方法将以上各组培养细胞弃培养基,用 PBS 漂洗细胞 3 次后,加入含有 0.5% dodecyl-D-maltoside (EMD chemicals, Gibbstown, NJ)的 NativePAGE 样品缓冲液(Invitrogen)冰上裂解细胞 10 min,裂解液 4 ℃离心 20 000 × *g*, 30 min,取上清并测定蛋白浓度。将备好的样品按 20 μg/道以及 Native 分子量 Marker(Invitrogen)上样于 NativePAGE 3% ~ 12% Bis-Tris gel (Invitrogen),加入含有考马斯亮蓝 G250 的电泳缓冲液 120 mV,2.5 h;按操作手册电转移步骤将蛋白转至 PVDF 膜(Invitrogen)后,其余步骤参见免疫印迹。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增 rAQP4-M1

RT-PCR 扩增 rAQP4-M1 产物经琼脂糖凝胶电泳分析,基因片段的大小为 972 bp,与预期的片段一致(图 1)。



1:rAQP4-M1 mRNA;M:DNA 标准

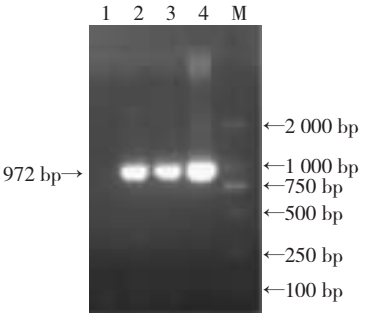
图 1　rAQP4-M1 基因 RT-PCR 扩增结果

2.2　重组质粒阳性菌落 PCR、pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 的双酶切鉴定及测序

随机挑选菌落进行 PCR(图 2),选择 PCR 检测阳性的克隆抽提质粒 DNA,用限制性内切酶 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切鉴定,结果 rAQP4-M1 成功构建到 pcDNA3.1(+)表达载体中(图 3)。以 pcDNA3.1(+)质粒载体多克隆位点上的通用引物进行双向测序鉴定,结果 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 重组质粒插入片段的序列与 GenBank 登录的序列一致,表明 rAQP4-M1 的真核表达载体构建成功。

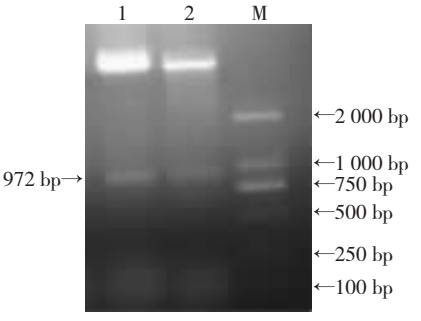
2.3　稳定转染后 CHO 细胞系的免疫印迹鉴定

在稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞中可检测到相对分子质量为 34×10^3 的条带,而稳定转染 rAQP4-M23 的 CHO 细胞中检测到相对分子质量为 32×10^3 的条带(阳性对照),且空载体转染的 CHO 细胞以 rAQP4 孵育后未见相应条带。说明稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞系构建成功(图 4)。



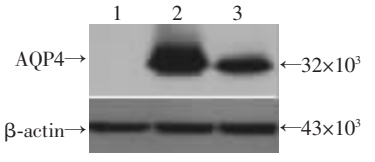
1:阴性对照;2、3:重组质粒 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 阳性菌落;4:阳性对照;M:DNA 标准

图 2　重组质粒 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 菌落 PCR 电泳结果



1、2:*Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1;M:DNA 标准

图 3　pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 双酶切鉴定电泳结果



1:转染 pcDNA3.1(+)的 CHO 细胞(阴性对照);2:转染 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 的 CHO 细胞;3:转染 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M23 的 CHO 细胞(阳性对照)

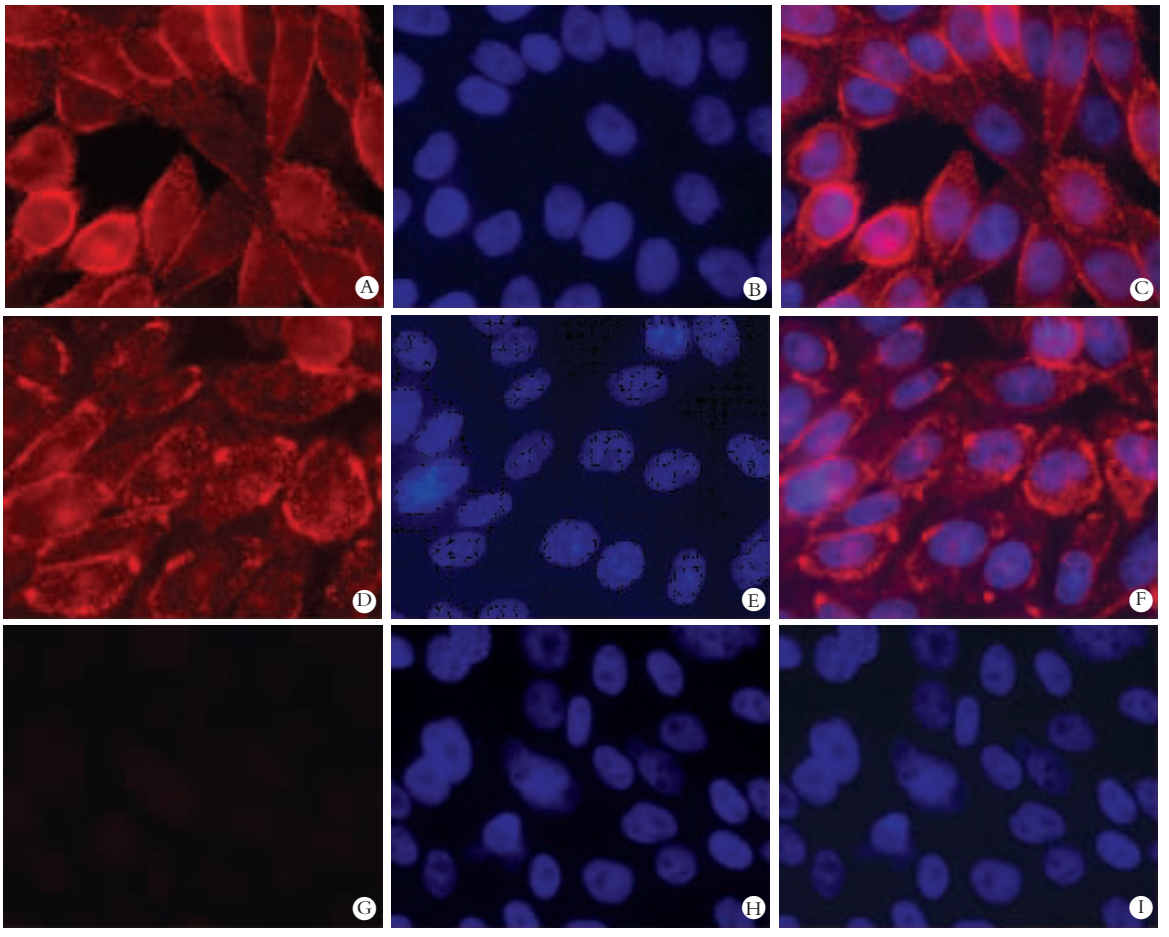
图 4　AQP4 蛋白免疫印迹鉴定结果

2.4　稳定转染后 CHO 细胞系的细胞免疫荧光鉴定

采用倒置荧光显微镜,观察红色荧光在不同转染组别细胞中的表达情况,同时 DAPI 为紫外光(UV)激发,发射蓝光染细胞核。稳定转染 rAQP4-M1 和 rAQP4-M23 细胞均在细胞膜上出现红色荧光,而以空载体转染的 CHO 细胞未见红色荧光分布,表明稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞系构建成功。同时,可观察到 rAQP4-M1 和 rAQP4-M23 在 CHO 细胞膜上的表达模式亦存在一定差异,rAQP4-M1 在 CHO 细胞膜上的颗粒结构很小且分布均匀,沿细胞膜边界流畅呈线形;而 rAQP4-M23 在 CHO 细胞膜上的表达较分散,呈现出较大的颗粒状分布特征(图 5)。

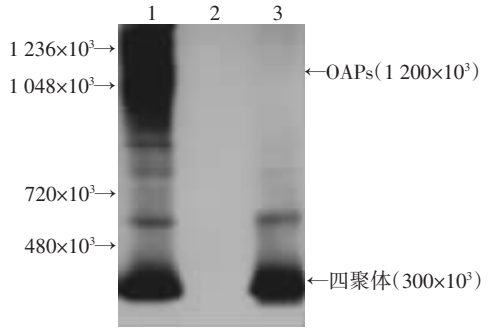
2.5　蓝绿温和胶电泳技术检测 CHO 细胞系中 OAPs 的形成

在稳定转染 rAQP4-M1 和 rAQP4-M23 的 CHO 细胞中均可检测到相对分子质量约为 300×10^3 的条带,除此之外,稳定转染 rAQP4-M23 的 CHO 细胞中还可检测到相对分子质量大于 $1\,200 \times 10^3$ 的较宽并且弥散的条带,而空载体转染的 CHO 细胞以 rAQP4 孵育后未见任何条带。rAQP4-M23 参与了 OAPs 的形成,而 rAQP4-M1 未参与 OAPs 的形成(图 6)。



A～C:稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞;D～F:稳定转染 rAQP4-M23 的 CHO 细胞;G～I:转染 pcDNA3.1(+)的 CHO 细胞;A、D、G:AQP4 抗体染色;B、E、H:DAPI 复染细胞核;C、F、I:AQP4 抗体染色与 DAPI 复染细胞核叠加

图 5 转染不同载体的 CHO 细胞 AQP4 蛋白的免疫荧光鉴定结果 (×400)



1:转染 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M23 的 CHO 细胞;2:转染 pcDNA3.1(+)的 CHO 细胞;3:转染 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 的 CHO 细胞

图 6 蓝绿温和胶电泳技术检测 CHO 细胞系中 OAPs 的形成

3 讨论

AQP4 全长氨基酸序列包含 2 个不同的转录起始位点,即从第 1 和第 23 位甲硫氨酸开始转录形成的所谓"长"的 M1 和"短"的 M23 亚型,其相对分子质量分别为 34×10^3 和 32×10^3。2 种亚型均可以通过形成稳定的四聚体发挥水分子通道的功能[8]。中枢神经系统中 M1 和 M23 形成异源四聚体的含量之比约为 1∶4;而中枢神经以外的组织(包括肾、胃等)则以 M23 亚型为主。然而,有关 M1 和 M23 组织分布差别对其功能的影响以及与疾病发生、发展的关系尚不明确[9]。

Neuhaus 等[10]发现膜内蛋白以紧密排列的方阵形式存在,称之为正交排列颗粒(OAPs)。AQP4 在胶质细胞终足膜上呈极性分布,并在一些具有 OAPs 结构的特殊类型细胞上表达[11];稳定转染 AQP4-M23 的 CHO 细胞膜上有颗粒状的 OAPs 聚集[11],而 AQP4 基因敲除小鼠组织中却未见 OAPs 形成[12]。以上研究证实了 AQP4 与 OAPs 的形成相关,但形成过程及 OAPs 的生物作用目前尚不清楚。目前认为 OAPs 可能具有促进 AQP4 对水的通透[13],维持 AQP4 在胶质细胞终足膜上极性分布[14],以及提高胶质细胞间黏附的作用[15],OAPs 的分布异常与神经性和神经肌肉性疾病相关[16]。最近有学者提出 OAPs 是视神经脊髓炎患者血清中特异性抗体 NMO-IgG 作用的靶点[17]。因此,研究 AQP4 与 OAPs 结构形成之间的相互关系,以及在病理因素作用下二者的动态变化,是揭示这些

疾病病理生理机制的重要研究方向。

本研究应用 RT-PCR 从大鼠脑组织中扩增 rAQP4-M1，并将 PCR 产物双酶切后插入到 pcDNA3.1(+)真核表达载体中，从而成功构建了一个组成性表达 rAQP4-M1 蛋白的表达载体 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1。将该载体转染到 CHO 细胞，通过 G418 筛选建立了一个在基因组 DNA 中稳定整合有 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 的 CHO 细胞克隆。倒置荧光显微镜观察发现，稳定转染 rAQP4-M1 和 rAQP4-M23 细胞均在细胞膜上出现红色荧光，而以空载体转染的 CHO 细胞却未见红色荧光分布。免疫印迹结果显示，在稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞中可检测到相对分子质量 34×10^3 的条带；以稳定转染 rAQP4-M23 的 CHO 细胞相对分子质量为 32×10^3 的阳性带作为对照，则进一步证实了稳定转染 rAQP4-M1 的 CHO 细胞系构建成功。但稳定转染细胞系所产生的 rAQP4-M1 是否具有快速转运水分子的功能还需要采用停流试验(stopped-flow)进行验证。值得注意的是，rAQP4-M1 和 rAQP4-M23 在 CHO 细胞膜上的表达模式存在一定差异，rAQP4-M1 在 CHO 细胞膜上的颗粒结构很小且分布均匀，细胞膜边界流畅呈线形；而 rAQP4-M23 在 CHO 细胞膜上的表达较分散，呈现出较大的颗粒状分布特征，这些差异可能与 OAPs 的形成相关。蓝绿温和胶电泳技术是一种采用特殊的细胞裂解液以保持细胞内大分子复合物如 OAPs 等保持天然完整状态的方法，本研究发现，以 rAQP4 孵育后空载体转染的 CHO 细胞未见任何条带；在稳定转染 rAQP4-M1 和 rAQP4-M23 的 CHO 细胞中均可检测到相对分子质量约为 300×10^3 的条带，提示二者均可形成四聚体；除此之外，稳定转染 rAQP4-M23 的 CHO 细胞中还检测到相对分子质量大于 $1\ 200\times10^3$ 的较宽并且弥散的条带，此条带提示 OAPs 的形成。由此可见，rAQP4-M23 而不是 rAQP4-M1 参与了 OAPs 的形成，这一结果与免疫荧光的检测结果一致。如果要从形态学角度确定 AQP4-M1 不参与大的 OAPs 形成故在胞膜上分布均匀呈流线型表达，而阳性对照的 AQP4-M23 胞膜上颗粒状物质是否就是 OAPs，还可利用冰冻蚀刻电子显微镜技术加以证实。

综上所述，本研究成功构建了 pcDNA3.1(+)/rAQP4-M1 表达质粒，建立了稳定转染的 CHO 细胞系。免疫荧光和免疫印迹检测结果表明 rAQP4-M1 在该细胞系中成功表达，蓝绿温和胶电泳技术证实了 rAQP4-M23 而不是 rAQP4-M1 参与了 OAPs 的形成。本研究结果可为各种病理因素作用下 rAQP4-M1 和 rAQP4-M23 的表达模式、功能变化及其信号调节途径等研究奠定基础。

参考文献：

[1] Denker B M, Smith B L, Kuhajda F P, *et al*. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules[J]. J Biol Chem, 1988, 263(30): 15634-15642.

[2] Lu M, Lee M D, Smith B L, *et al*. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(20): 10908-10912.

[3] Verkman A S. Aquaporins: translating bench research to human disease[J]. J Exp Biol, 2009, 212(Pt 11): 1707-1715.

[4] Lu D C, Zhang H, Zador Z, *et al*. Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels [J]. FASEB J, 2008, 22(9): 3216-3123.

[5] Saadoun S, Papadopoulos M C, Watanabe H, *et al*. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation [J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 24): 5691-5698.

[6] 楚燕飞，李兵仓，陈菁，等. 水通道蛋白4 RNA干扰对爆炸伤后脑水肿的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(8)：709-713.

[7] Neely J D, Christensen B M, Nielsen S, *et al*. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels [J]. Biochemistry, 1999, 38(34): 11156-11163.

[8] Crane J M, Van-Hoek A N, Skach W R, *et al*. Aquaporin-4 dynamics in orthogonal arrays in live cells visualized by quantum dot single particle tracking [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(8): 3369-3378.

[9] Frigeri A, Gropper M A, Umenishi F, *et al*. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues[J]. J Cell Sci, 1995, 108(Pt 9): 2993-3002.

[10] Neuhaus J. Orthogonal arrays of particles in astroglial cells: quantitative analysis of their density, size, and correlation with intramembranous particles[J]. Glia, 1990, 3(4): 241-251.

[11] Yang B, Brown D, Verkman A S. The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells [J]. J Biol Chem, 1996, 271(9): 4577-4580.

[12] Verbavatz J M, Ma T, Gobin R, *et al*. Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4[J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt 22): 2855-2860.

[13] Yang B, van-Hoek A N, Verkman A S. Very high single channel water permeability of aquaporin-4 in baculovirus-infected insect cells and liposomes reconstituted with purified aquaporin-4[J]. Biochemistry, 1997, 36(24): 7625-7632.

[14] Amiry-Moghaddam M, Frydenlund D S, Ottersen O P. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport [J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 999-1010.

[15] Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, *et al*. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion[J]. J Mol Biol, 2006, 355(4): 628-639.

[16] Hatton J D, Ellisman M H. Orthogonal arrays are redistributed in the membranes of astroglia from alumina-induced epileptic foci[J]. Epilepsia, 1984, 25(2): 145-151.

[17] Nicchia G P, Mastrototaro M, Rossi A, *et al*. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies [J]. Glia, 2009, 57(13): 1363-1373.

(收稿：2010-01-26 修回：2010-05-11)

(编辑 龙 亮)