维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0565-03

水通道蛋白 8 在人羊膜上皮细胞 WISH 株的表达和定位

李 莉[1], 漆洪波[2]

(1.重庆市妇幼保健院,重庆 400013;2.重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究水通道蛋白 8(AQP8)在人羊膜上皮细胞 WISH 株的表达和定位,羊水膜内吸收的分子机制。方法:培养人羊膜上皮细胞 WISH 株,采用 Western blot 技术检测 WISH 细胞 AQP8 蛋白表达,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 WISH 细胞 AQP8 mRNA 的表达,免疫荧光组织化学方法检测 WISH 细胞上 AQP8 的分布。结果:WISH 细胞能表达较低水平的 AQP-8 mRNA,WISH 细胞 AQP8 蛋白在 34ku 处有一明显的糖基化条带。在细胞内微粒体膜和细胞膜上均检测到标记 AQP8 的荧光。结论:人羊膜上皮细胞 WISH 有 AQP8 的蛋白和 mRNA 表达,AQP8 可能介导了羊水膜内吸收。

【关键词】水通道蛋白 8;WISH 细胞;羊水调控

【中国图书分类法分类号】R714 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-28

Expression and localization of aquaporin 8 in human WISH cells

LI Li, et al

(*Chongqing Health Center for Women and Children*)

【Abstract】*Objective*: To determine the expression of aquaporin 8 and its localization in human WISH cells and to explore the molecular and cellular mechanisms for water absorption across the amniotic membranes. *Methods*: Human amnion-derive WISH cells were cultured. Western analysis was used to quantify AQP8 expression level. Reverse transcripton-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to quantify AQP8 mRNA expression levels. Immunofluorescence was used to determine localization of AQP8 in WISH cells. *Results*: AQP8 mRNA protein was found in human WISH cells. By western-blot, the AQP8 proteim was detected at 34ku in human WISH cells. AQP8 labeling was observed in intracellular vesicular structures throughout the cytosol and plasma membrane. *Conclusion*: The study demonstrates the expression of aquaporin 8 in human WISH cells. These results suggest that aquaporin 8 may be a channel that mediates amniotic fluid resorption by way of intramembranous pathway.

【Key words】Aquaporin 8; WISH cells; Amniotic fluid volume regulation

正常的羊水量对维持胎儿的生长和发育有重要作用。羊水过多或羊水过少是常见的妊娠并发症,其围产儿病率和死亡率显著升高[1]。羊水膜内转运吸收是维持羊水稳态平衡的重要方式,但其分子机制尚不清楚。水通道蛋白(AQP)介导大量水分子顺渗透压梯度跨细胞膜转运,促进细胞膜水通透性增加[2]。人羊膜上皮细胞 WISH 株来源于正常足月妊娠的人羊膜上皮细胞[3],为研究水通道蛋白在羊水膜内转运中的作用及其调控提供了重要的实验模型。本研究检测 WISH 细胞 AQP8 表达水平以及在细胞上的定位,以探讨羊水膜内吸收的分子和细胞机制。

作者介绍:李 莉(1976-),女,住院医师,硕士,主要研究方向:围产医学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400616)。

1 资料与方法

1.1 人羊膜上皮细胞 WISH 株的培养

人羊膜上皮细胞 WISH 株,从中国科学院上海细胞生物学研究所购得。在含 15%小牛血清的 1640 培养液中,37℃、5%CO_2 孵箱,常规培养。WISH 细胞爬满 100ml 培养瓶时取样。

1.2 Western blot 技术检测 WISH 细胞 AQP8 蛋白的表达。

取生长在 100ml 培养瓶的 WISH 细胞,用预冷的 PBS 漂洗 1 次,加入 200μl 的上样缓冲液裂解细胞,用细胞刮刮下细胞,并用 22 号针头吹打,断裂 DNA,4000g 4℃离心 10min,取上清液,煮沸 20min,4℃16000g 离心 30min,取上清液备用。用 Bradford 法测定蛋白浓度并调整为 1μg/μl,用 12%的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳(20μg/道),转移至 PVDF 膜上。用含 5%脱脂奶粉的 0.02mol/L 的 PBST 封闭 4℃过夜。洗膜后按 1:500 滴加山羊抗人亲和纯化的 AQP8 抗

维普资讯 http://www.cqvip.com

体(Santa Cruze 公司产品)。β-actin(肌动蛋白)一抗(北京三杉公司产品)1:400 作为内参照。4℃孵育过夜,0.02mol/L 的 PBST 洗膜 10min 3 次。加入辣根过氧化酶(HRP)标记的二抗(兔抗山羊),37℃孵育 60min。洗膜 10min 3 次,用 ECL 曝光。结果以 Quantity One 图象分析系统(美国 Bio-Rad 公司产品)进行条带光密度分析,计算 AQP8 产物与 β-actin 产物的光密度积分的比例,作为 AQP8 蛋白的表达水平。大鼠肝脏组织表达 AQP8 蛋白[4],设为阳性对照,大鼠肺不表达 AQP8 蛋白[4],作为阴性对照。

1.3 RT-PCR 技术检测 WISH 细胞 AQP8mRNA 的表达

按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA,采用 MMLV 逆转录试剂盒操作说明逆转录为 cDNA,转录产物再进行 PCR。AQP8 引物序列:上游引物 5'TGCCACGCTGGGGAATATC3',下游引物 5'TCGTCAGATGATCTGCC3',扩增产物片段长度为 326bp;β-actin 引物序列:上游引物 5'ATCGTGATGGACTC-CGGTGACT3',下游引物 5'GCTGATCCACATCTGCTGGGGA 3',扩增产物片段长度为 698bp。反应体系 50μl,退火温度 58℃,反应 30 个循环。PCR 产物以 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察并照相。电泳结果以 Quantity One(美国 Bio-Rad 公司)图象分析系统进行电泳条带光密度分析,计算 AQP8 产物与 β-肌动蛋白产物的光密度积分的比例,作为 AQP8mRNA 的表达水平(试剂和引物合成均为上海生工产品)。脾不表达 AQP8 的 mRNA[5],作为阴性对照。

1.4 免疫荧光组织化学法检测 AQP8 在 WISH 细胞的定位

将 WISH 细胞接种在放有盖玻片的 24 孔板中,制成细胞爬片备用。用 0.01mol/L 的 PBS 振洗 5min,取出吹干,按 1:1000 滴加山羊抗人亲和纯化的 AQP8 抗体(Santa Cruze 公司产品),置湿盒内,37℃孵育 60min,用含 0.2%Triton-100 的 PBS 振洗 5min,吹干,按 1:200 滴加荧光素标记的兔抗山羊二抗(北京中山公司提供),置湿盒内,37℃孵育 60min,含 0.2%Triton-100 的 PBS 振洗 5min,吹干,用 50%的甘油封片,荧光显微镜观察。

2 结 果

2.1 人羊膜上皮细胞 WISH 株 AQP8 蛋白的表达

如图 1 所示,WISH 细胞 Western-blot 在 34ku 处检测到一明显条带。肝脏组织检测到一条相同位置的条带(阳性对照)。肺组织没有检测到条带(阴性对照),见图 2。AQP8 蛋白的表达水平约为 0.027(AQP8 表达水平=AQP8/β-actin),见图 3。

2.2 人羊膜上皮细胞 WISH 株 AQP8mRNA 的表达

RT-PCR 检测到 AQP8mRNA 在 WISH 细胞有低水平的表达,AQP8mRNA 的表达水平约为 0.028(AQP8 表达水平=AQP8/β-actin)。见图 4。

2.3 AQP8 蛋白在 WISH 细胞中的定位

在细胞膜和细胞内微粒体膜上均检测到标记 AQP8 的黄绿色荧光。荧光大多分布在细胞内微粒体膜,细胞膜上的荧光相对较少。见图 5。



图 1 WB 检测 WISH 细胞 AQP8 蛋白的表达



图 2 阳性对照和阴性对照

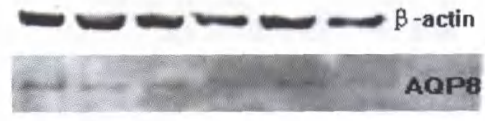


图 3 WISH 细胞 AQP8 蛋白表达水平

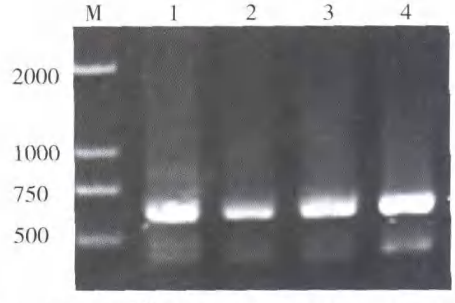


图 4 RT-PCR 检测 WISH 细胞 AQP8 mRNA 的表达

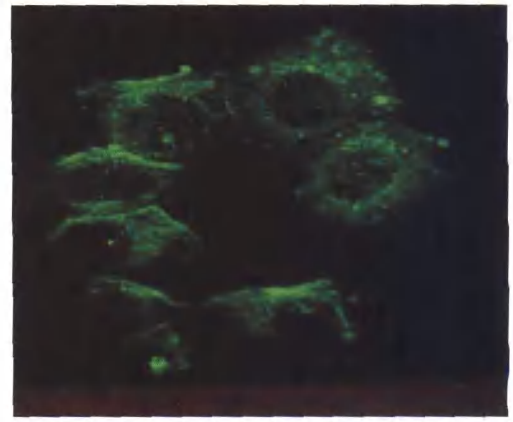


图 5 免疫荧光显示正常 WISH 细胞 AQP8 的分布(400×)

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

生理情况下，水分子跨膜转运有两种方式：一是弥散通过细胞膜磷脂双分子层的简单扩散；二是通过跨膜转运蛋白的快速转运。简单扩散不能解释渗透作用所驱使的大量水转运。长期以来，人们一直设想细胞膜上存在水通道。直到 20 世纪 90 年代，Agre 和 Preston 首次从红细胞膜分离出 28ku 形成通道的整合膜蛋白(CHIP28)，并完成了其 cDNA 的分子克隆，当时并不知道该蛋白的功能。在进行功能鉴定时，将体外转录合成的 CHIP28cDNA 注入非洲爪蟾蜍的卵母细胞(Xenopus oocytes)内，发现在低渗溶液中，卵母细胞迅速膨胀，并于 5min 内破裂。为进一步确定其功能，又将其构建于合成的脂质体内，脂质体对水表现出极高的通透性，证实为 aquaporin(水通道蛋白，AQP)，这是水通道研究史的重要里程碑，1997 年经人类基因组委员会命名为 AQP1[2]。AQP 的发现证实了水转运的另外一种重要方式即通道蛋白介导的水转运。

AQPs 广泛分布于机体组织细胞中，尤其是与液体分泌和吸收有关的上皮细胞和内皮细胞内。大多数 AQP 对水的通透性具有高度选择性，水分子可以通过 AQP 向高渗方向转运，对于维持细胞内外的水平衡具有重要作用。其中新近发现的 AQP8 主要存在于肾近曲小管上皮细胞、睾丸曲细精管上皮细胞、胆管上皮细胞、胰腺腺泡细胞、肝细胞、空肠上皮细胞、结肠上皮细胞、唾液腺细胞和胎膜内等，参与液体分泌和水的吸收[2]。

随着研究的深入，近年连续发现了其他水通道蛋白，形成水通道蛋白家族(AQPs)。迄今为止，已确定了至少 11 种水通道蛋白，AQP0~AQP10[2]。

已知绒毛膜板（覆盖胎盘胎儿面的绒毛膜羊膜)是羊水膜内吸收的主要部位，羊水跨胎盘胎儿面的羊膜绒毛膜经胎盘内血管进入胎儿血循环。体外研究证实羊膜是一种对水具有很高通透性的膜，很早以前人们就认识到要保持羊水的稳态平衡，羊膜对羊水的正常吸收是非常重要的[1]。尽管如此，羊水膜内转运吸收与平衡的调节因素和机制尚不清楚。以前认为羊水跨膜转运是通过膜上的小孔通道进行，AQPs 的发现，因而推测羊膜内羊水吸收是否通过羊膜 AQPs 介导完成？

近年的研究表明 AQP8 在人胎膜上有表达[6]，提示 AQP8 可能介导了羊水跨膜转运。本研究试图通过研究 AQP8 在人羊膜上皮细胞 WISH 株上的表达水平和定位，为研究 AQP8 介导羊水跨膜转运机制及探讨调控 AQP8 的可能性提供理论依据和建立实验模型。

本研究证实 WISH 细胞有 AQP8 蛋白表达。AQP8 在细胞外的 C 环天冬酰胺 141 处有一典型的 N 端糖基化位点，其蛋白多以糖基化形式存在。本研究检测到 WISH 细胞的 AQP8 蛋白条带在 34ku 处，就是其糖基化蛋白，这与大鼠肝脏和睾丸相似[4,5]。在正常条件下，WISH 细胞表达的 AQP8 蛋白量相对较少。

本研究证实 WISH 细胞有 AQP8mRNA 的表达，与 Wang 等的研究相吻合[6]，其表达水平与人羊膜上皮细胞相似。表明 WISH 细胞可以作为研究羊膜 AQP8 水转运及调控机制的细胞模型，为研究调控 AQP8 表达，改变细胞膜通透性从而调节羊水量提供了重要的实验模型。

本研究免疫荧光显示正常情况下 WISH 细胞 AQP8 主要定位在细胞内，推测可能是细胞内的囊状结构（微粒体膜），而在细胞膜的表达却相对较少。提示基础条件下 AQP8 在整个细胞膜对水的通透性所起的作用不大。这与大鼠肝细胞 AQP8 相似[4]。我们推测可能 AQP8 在细胞内微粒体膜和细胞膜之间循环。在适当刺激下(如酸碱度的改变、渗透压的改变、激素 LH、FSH、胰高血糖素，cAMP 等)重新分布，从而达到 WISH 细胞对水平衡调节的目的。若在以后的实验中得到证实，AQP8 在羊膜上皮细胞膜和细胞内的循环和重新分布是羊水膜内吸收的重要机制。这一机制类似于囊泡转运水的机制。囊泡转运是通过膜的内陷和重新分布，而 AQP8 是通过蛋白的重新分布，从而调节膜的通透性达到转运水的目的，且比囊泡转运更快速更节能。

在正常情况下，羊水和血液之间的渗透压梯度是 20 Osm/kg 时，非简单扩散的机制超过 65%[1]。现有资料表明胎膜中不存在淋巴管，以前认为最可能的胎膜转运的基础生理机制是羊水通过囊泡转运[7]。本研究结果提示 AQP8 可能通过蛋白的重新分布介导了羊水膜内转运，在羊水平衡调控中起了重要作用，可能对母-胎之间快速的液体交换亦有推动作用。总之 AQP8 有助于维持羊水量的稳态平衡并针对 AQP8 进行靶向调控。因此，对 AQP8 在 WISH 细胞的生理功能、信号传导及调控机制还有待作更

(下转第 574 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

都无明显的影响。在经过镍离子亲和层析，透析除咪唑后，得到了纯度达到 90%的重组蛋白。从一级结构的序列分析、融合蛋白的分子量以及其带有的 6 个组氨酸接头等几方面，证实了该表达蛋白为 PspA。PspA 的成功表达为研制其单克隆抗体、动物免疫奠定了物质基础。

PspA 缺陷菌株在小鼠体内毒力明显下降，作为肺炎链球菌重要的毒力因子，其主要作用是与乳铁蛋白结合使其丧失功能并抑制补体活化，降低 C_{3b} 在肺炎链球菌表面的沉淀从而干扰补体介导的吞噬调理作用，而吞噬调理作用被认为是宿主清除肺炎链球菌最主要的途径[8,9]，但 PspA 在肺炎链球菌致病中所起的作用还没有完全阐明。目前还没有任何有关 PspA 结构生物学方面的报道，我们期待在实现其高效可溶性表达的基础上，能够研究其结构生物学，进一步阐明其功能。

（通讯作者：尹一兵，电话 023-68485658，E-mail:yibingyin@21cn.com。）

参 考 文 献

[1] Balakrishnan I,Crook P,Morris R,et al. Early predictors of mortality in *pneumococcal* bacteraemia[J].J Infect,2000;40(3):256-261.

[2] Veenhoven R,Le Thomas I,Uiterwaal C,et al. The vaccine impact surveillance network-invasive *pneumococcal* study group.Are current recommendations for *pneumococcal* vaccination appropriate for Western Australia[J].Med J Aust,2000;2(173):S36-40.

[3] Zhang JR,Mostov KE,Lamm ME,et al.The polymeric immunoglobin receptor translocates *pneumococci* across human nasopharyngeal epithelial cells[J].Cell,2000;102(6):827-837.

[4] Gor DO,Ding X,Briles DE,et al.Relationship between surface accessibility for PpmA, PspA,and PsaA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *streptococcus pneumoniae*[J].Infect Immun,2005;73(3):1304-1312.

[5] Garcia-Suarez Mdel M,Cima-Cabal MD,Florez N,et al. Protection against *pneumococcal pneumoniae* in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin[J].Infect Immun,2004;72(8):4534-4540.

[6] Rosenow C,Ryan P,Weiser JN,et al.Contribution of novel choline-binding proteins to adherence,colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*[J].Mol Microbiol,1997;25(5):819-829.

[7] Roche H,Hakansson A,Hollingshead SK,et al.Regions of PspA/EF3296 best able to protect against *streptococcus pneumoniae* in murine infection model[J].Infect Immun,2003;71(3):1033-1041.

[8] Bogaert D,De Groot R,Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonization:the key to pneumoncoccal disease[J].Lancet Infect Dis,2004;4(3):144-154.

[9] Briles DE,Hollingshead SK,Nabors GS,et al.The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *streptococcus pneumoniae*[J].Vaccine,2001;19(S11):S87-95.

（上接第 567 页）

深入的研究，以阐明羊水膜内转运和平衡调控的分子机制，有望为羊水量异常的治疗提供新的策略。

参 考 文 献

[1] Daneshmand SS,Cheung CY,Brace RA. Regulation of amniotic fluid volume by intramembranous absorption in sheep:Role of passive permeability and vascular endothelial growth factor[J].Am J Obstet Gynecol,2003;188(3):786-793.

[2] Matsuzaki T,Tajika Y,Tserentsoodol N,et al.Aquaporins:a water channel fanmily[J].Anat Sci Int,2002;77(2):85-93.

[3] Hayflick L.The establishment of a line (WISH)of human amnion cells in cintimuous cultivation[J].Exp Cell Res,1961;23:14-20.

[4] Gradilone SA,Garcis F,Huebert RC,et al.Glucagon induces the plasma membrane insertion of functional aquaporin-8 water channels in isolated rathepatocytes[J].Hepatoloty,2003;37(6):1435-1441.

[5] Calamita G,Mazzone A,Cho YS,et al.Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis[J].Biology of reproduction,2001;64:1660-1666.

[6] Wang S,Chen J,Katherine T,et al.Expression of aquaporin-8 and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in human WISH cells[J]. Am J Obstet Gynecol,2003;18:997-1001.

[7] Wang S,Kallichanda N,Song W,et al. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes:evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption[J]. Am J Obstet Gynecol,2001;185:1226-1231.