

· 基础研究 ·

人醛糖还原酶基因在酿酒酵母中的诱导表达及活性分析

翟冰¹, 叶玲^{2*}, 刘静², 刘建伟²

(解放军总医院:¹老年血液科,²老年医学研究所, 北京 100853)

【摘要】 目的 建立人醛糖还原酶(AR)及其与绿色荧光蛋白(GFP)融合表达的酿酒酵母细胞表达株,检测细胞中目的基因的表达及蛋白活性。方法 将含目的基因AR及融合基因AR::GFP的重组质粒pYEX-BX转化酵母细胞INVSc1,得到宿主菌株XAR、XAG及对照菌株YEX。观察酵母细胞生长曲线及GFP荧光信号;Northern blot检测细胞中AR mRNA转录;Western blot检测AR蛋白表达;荧光法测定AR活性。结果 三菌株生长速率无明显差异;XAG菌株相对荧光强度与生长时间成线性关系;XAR、XAG菌株分别有持续、稳定的目的基因mRNA转录及目的蛋白表达,并具有AR活性。结论 成功构建了AR基因的酵母表达株,为进一步将此细胞株应用于研究AR的致病机制及AR抑制剂的初步筛选打下基础。

【关键词】 醛糖还原酶;酵母;绿色荧光蛋白质;基因表达

【中图分类号】 Q789

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00014

Induced expression and activity analysis of human aldose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*

ZHAI Bing¹, YE Ling^{2*}, LIU Jing², LIU Jianwei²

(¹Department of Geriatric Hematology, ²Institute of Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To construct the *Saccharomyces cerevisiae* cell strains expressing aldose reductase(AR) and AR-green fluorescent protein(AR-GFP) fusion protein, and to detect the target gene expression and the AR enzyme activity. **Methods** The yeast expression plasmids pYEX-BX inserted with AR and AR::GFP fusion gene were transformed into the yeast strain INVSc1, which were named as XAR and XAG strains respectively. The blank pYEX-BX strain was used as the normal control. The growth curves and the fluorescence were determined in all strains. Northern blot, Western blot and the fluorescent method were used to detect the AR mRNA transcription, AR protein expression, and the AR activity respectively. **Results** There was no significant difference in the growth rates among three strains. There was a linear relationship between relative fluorescence of the XAG and the growth time. The mRNA transcription and protein expression of AR and AR::GFP were sustainable and stable in XAR and XAG strains. The AR activities in the two strains were both proved by the fluorescent method. **Conclusion** The yeast expression strain of AR was constructed successfully, which lays basis for its application in the researches on pathogenic mechanism of AR and preliminary screening of new AR inhibitors.

【Key words】 aldose reductase; yeast; green fluorescent protein; gene expression

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (30472172)

醛糖还原酶(aldose reductase, AR)是糖尿病慢性并发症发病机制有关的多元醇通路中的限速酶。糖尿病时细胞内高葡萄糖导致AR被激活,山梨醇大量产生,引起细胞渗透性水肿^[1];此外作为AR辅酶的NADPH和山梨醇脱氢酶辅酶的NAD⁺相应减少,引起机体抗氧化能力降低,自由基清除减少等^[2],共同参与了糖尿病慢性并发症的发生。最近的研究发现,AR在许多炎症相关细胞因子诱导的疾病中发挥了关键作用,如动脉粥样硬化、败血症、哮喘;还发现AR在许多肿瘤中高表达,如肝癌、直肠癌、乳腺癌、宫

颈癌及卵巢癌^[3,4]。目前已研发成功的AR抑制剂如Sorbini, Fidaresta, Epalrestat, Zopolrestat等,都曾进入期临床试验,除Epalrestat仅在日本上市外,其他药物均因为疗效不充分或副作用太大而无法上市。若AR抑制剂能够得到广泛应用,可通过下调炎症相关细胞因子的表达,应用于上述疾病的治疗。

酵母是一种单细胞低等真核生物,其细胞表达的外源蛋白质具有一定程度上的折叠加工和糖基化修饰,适合于有功能的真核生物蛋白表达和制备。酵母细胞与人的AR基因具有高度同源性,葡萄糖在

酵母细胞中的代谢与在动物细胞中的代谢相似^[5]。我们利用基因工程的方法,将载有 AR 基因的质粒转入酵母表达宿主,建立 AR 的酵母细胞表达株,在酵母细胞模型中观察外界诱导因素与 AR 基因表达之间的内在联系,也为转染动物细胞,建立糖尿病及其并发症动物模型,并有针对性地选择 AR 抑制剂,奠定理论依据和技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株和载体:含有人 AR cDNA 基因的质粒 pBluescript KS-hAR 为香港大学分子生物学研究所 Sookja K. Chung 教授馈赠。质粒 pGFP 为本实验室保存。质粒 pYEX-BX 为荷兰阿姆斯特丹大学 Kruckeberg 博士赠送。酵母宿主菌 INVSc1 (*MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*), 购自 Invitrogen 公司。本实验室前期工作^[6]已将目的基因 AR、融合基因 AR::GFP 插入质粒 pYEX-BX, 与空载体一起分别转化酿酒酵母细胞 INVSc1, 得到菌株 XAR、XAG 及对照菌株 YEX。

1.2 酵母细胞的诱导、生长及 GFP 荧光信号分析

分别复苏 YEX, XAR, XAG 三菌株,于 SC-UD 选择性培养基中进行培养,挑取单克隆菌落至 SC-UD 液体培养基,培养至细胞密度 (A_{600}) 为 0.5,加入 $CuSO_4$ (终浓度为 $150 \mu mol/L$), 记为 0 h; 细胞继续培养约 8 h, 取不同时间点在荧光显微镜下观察 XAG 荧光的表达,并测定 A_{600} 及 XAG 荧光强度。相对荧光强度 (RF) 为荧光强度与 A_{600} 的比值。

1.3 Northern blot 检测细胞目的基因的转录

在上述时间点,保留三菌株细胞样本,参照 Schmitt 等^[7]的方法提取酵母细胞总 RNA。取 $10 \mu g$ 总 RNA, 甲醛变性电泳, Vacu Gene XL 转膜仪 (Pharmacia 公司) 真空转膜。用 $\gamma\text{-}^{32}P\text{-ATP}$ 标记的寡核苷酸探针 Y-AR, Y-GFP 和 Y-GAPDH 进行杂交, 探针序列见表 1。常规洗膜、放射自显影及探针的洗脱参照《分子克隆实验指南》^[8]。洗脱探针后的膜可用于再杂交。

表 1 探针序列

定位	序列
AR	5'-GAAGTTGGAGATGCCAATAG-3'
GFP	5'-CGTATGTTGCATCACCTTCC-3'
GAPDH	5'-GAGACAATTGGATACCAGCG-3'

1.4 Western blot 检测蛋白表达

在同样的时间观察点保留细胞,使用玻璃珠研磨法^[9]提取酵母细胞蛋白,Bradford 法^[10]测定蛋白

浓度,调节各泳道总蛋白上样量均为 $15 \mu g$, SDS-PAGE 变性电泳、湿式电转膜法将蛋白转印至 PVDF 膜上。封闭后分别加入 1:500 羊源 AR IgG 抗体 (一抗, Santa Cruz 公司) 及 1:500 兔抗羊 IgG 抗体 (二抗, 鼎国生物公司) 进行孵育,化学发光法暗室操作曝光 X 线底片。同法应用 1:2000 鼠源 GFP 抗体 (华大公司) 检测 AR-GFP 融合蛋白的表达。

1.5 荧光法测定 AR 活性^[11]

利用 NADP 在强碱的作用下产生荧光, 荧光强度与其浓度成正比的原理, 在荧光分光光度计下记录生成的 NADP 荧光强度来表示 AR 活性。以每分钟产生 $1 \mu mol$ NADP 为一个酶活性单位 (U), AR 比活性 = 酶活性单位 (U) / 蛋白量 (g)。反应体系总体积为 $200 \mu l$, 包括: $0.54 mol/L$ 钠-钾缓冲液, $2 mol/L (NH_4)_2SO_4$, $0.2 mmol/L$ NADPH, DL-甘油醛及适量蛋白。反应后加强碱激发 NADP 荧光。室温下平行测定 3 次, 取均值。

1.6 统计学处理

使用 Stata 7.0 软件进行统计学分析。计量资料使用双侧 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 酵母细胞生长曲线及 XAG 荧光表达

图 1 可见在观察时间段内三菌株生长情况大致相同。图 2 为 XAG 的荧光表达照片, 可见随着 $CuSO_4$ 诱导时间的延长, GFP 表达水平不断提高, 荧光逐渐变强, 在观察时间段内与培养时间成线性关系 (图 3)。

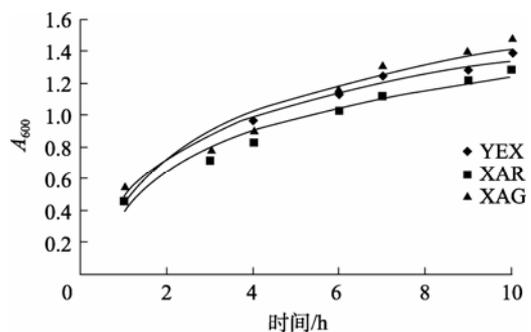


图 1 三菌株生长曲线

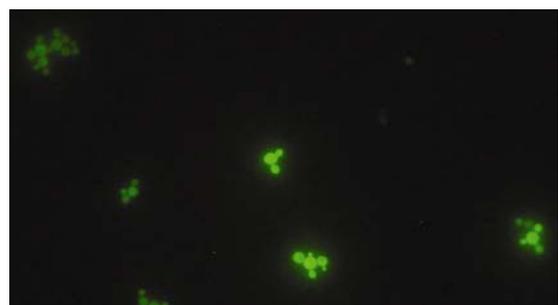


图 2 XAG 中 GFP 表达 (9 h, $\times 40$)

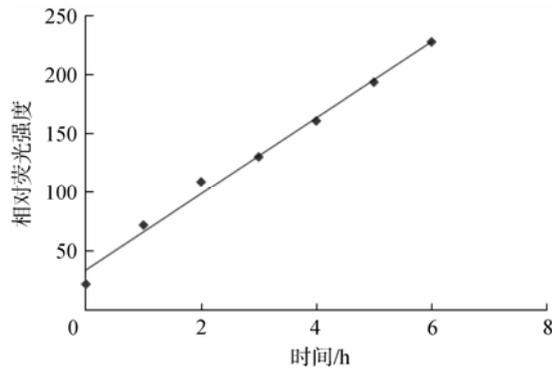


图3 XAG 相对荧光强度随时间变化的趋势

2.2 Northern blot 检测细胞中目的基因的转录

所提取各样本 RNA 的 $A_{260/280}$ 均在 1.8~2.0 之间, 浓度 0.7~1.5 g/L, 1% 甲醛变性胶电泳, 可见 mRNA 无降解 (图 4)。AR 探针标记结果可见 XAR, XAG 均有恒定的 AR mRNA 转录 (图 5)。XAG 菌株 AR, GFP, GAPDH 探针标记结果可见三者转录均比较恒定, 但 AR, GFP mRNA 在诱导前无条带, GAPDH mRNA 在酵母细胞诱导生长 19 h 时几乎不再转录。作为对照同时将诱导 6 h 的 YEX 菌株的 RNA 样本上样, 可见 YEX 无 AR, GFP mRNA 转录, 而 GAPDH mRNA 的转录同 XAG (图 6)。



图4 部分酵母样本总 RNA 甲醛变性胶电泳

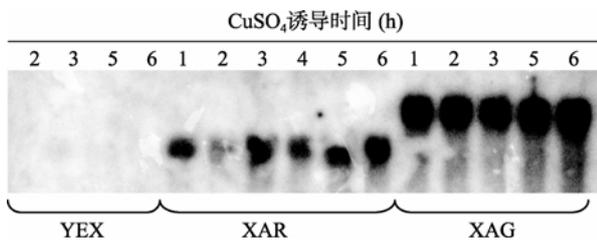


图5 Northern blot 检测 AR mRNA 的转录

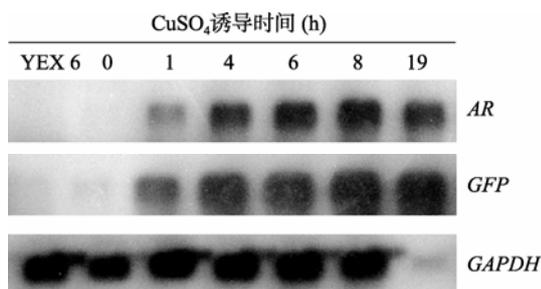


图6 Northern blot 检测 XAG 菌株 mRNA 的转录

2.3 Western blot 检测蛋白表达水平

AR 蛋白杂交结果可见 XAR, XAG 经诱导后均有 AR 表达, AR 大小为 30 ku, 而 AR::GFP 融合蛋白大小约 57 ku (图 7)。GFP 杂交结果可见, XAG 菌株经诱导后有 GFP 表达, 位置与 AR::GFP 融合蛋白一致 (图 8)。

2.4 AR 活性测定

如图 9 所示, 诱导后 3 h, 6 h XAR, XAG 菌株的 AR 比活性均高于 YEX ($P < 0.05$), 但 YEX 菌株的测得的比活性值较高, 各时间点之间及两菌株比较未发现规律性差异 (图 9)。

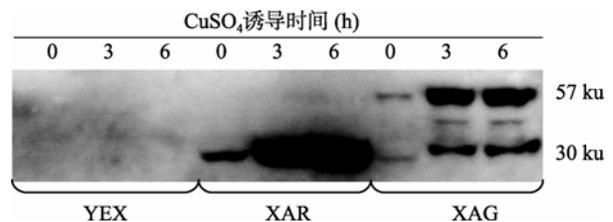


图7 Western blot 检测 AR 表达

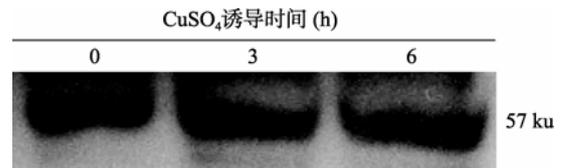


图8 Western blot 检测 GFP 表达

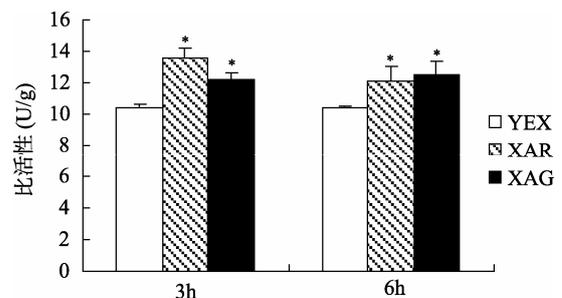


图9 三菌株 AR 活性比较与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

建立致病基因的细胞模型是常用的研究方法, 虽然构建、评价过程较为复杂, 但可将致病基因列为独立因素来研究, 具有简便、快捷、靶点明确等优点, 可以方便地控制影响因素, 更直接地观测基因与发病之间的关系, 且重复性好、费用经济。酵母细胞作为一种真核细胞模型, 具有生长速度快、繁殖周期短、培养成本低、易于进行分子生物学和细胞生物学操作等优点, 并且外源蛋白表达水平高, 具有翻译后修饰功能, 表达的外源蛋白与天然蛋白

性质相似。但酵母细胞仍为低等真核细胞,与哺乳动物细胞内信号转导、转录调节的复杂性、蛋白质分子修饰加工等过程相比有较大差异。

pYEX-BX 为非整合型载体,将其转入酵母细胞后虽并不与宿主染色体整合,但本研究所得菌株传至 2~3 代后,目的基因仍有较稳定的表达。将空载体和带有目的基因 *AR* 和重组基因 *AR::GFP* 的载体分别转入酵母细胞后,在其对数生长期开始时加入 CuSO_4 诱导,启动目的基因转录,观察三菌株的生长情况,发现其生长曲线基本无差异,可见外源 *AR* 基因的表达对酵母细胞的生长并无显著影响。*GFP* 基因与 *AR* 基因共同使用一个启动子转录,融合表达,通过观察荧光,即直观监测了 *AR* 的表达,结果显示其表达是稳定的。

我们进一步在 RNA 和蛋白两个水平研究模型中目的基因的表达情况。Northern blot 结果证实在 XAR 和 XAG 两模型中,目的基因的转录是恒定的。在 XAG 菌株中,*AR* 与 *GFP* mRNA 共同转录,但不影响各自的翻译。与持续高转录的 *AR* 基因相比,作为管家基因的 *GAPDH* 在培养过夜后转录量甚微,考虑为目的基因 *AR* 和 *AR::GFP* 在 XAR, XAG 菌株中高表达,引起细胞内氧化还原状态的改变,使得 *GAPDH* 的 mRNA 降解^[12]。该结果与临床上多元醇代谢通路中 *AR* 基因过度表达,导致一系列生化生理改变,诱发糖尿病并发症的现象是一致的,即 *AR* 基因过度表达对细胞代谢的影响是导致糖尿病并发症发生发展的一个重要机理。

在 Western blot 中我们检测到了 *AR* 及 *AR::GFP* 融合蛋白的表达,得到约 30 ku 的 *AR* 蛋白和约 57 ku 的 *AR::GFP* 融合蛋白。同时也发现,在相同总蛋白量的情况下,XAG 表达目的蛋白的量比 XAR 菌株略少,可能是因为蛋白分子量较大之故。在 XAG 菌株 30ku 处,即与 XAR 菌株表达的 *AR* 蛋白同一位置处,也有少量的 *AR* 蛋白表达,Northern blot 结果也出现同样情况,考虑为 mRNA 剪切所致。

酶活性测定方法是间接通过 NADPH/NADP 的变化来检测的。NADPH/NADP 是广泛参与氧化还原反应的辅酶,酵母细胞内存在内源性依赖 NADPH 的醛类还原酶家族^[13],我们使用粗提的酵母总蛋白检测活性,其中的某些蛋白参与了 NADPH 的氧化,导致对照菌株 YEX 出现较高 *AR* 比活性值。而在过去许多研究中测定 *AR* 活性时,主要使用提纯的 *AR* 蛋白。下一步我们将改进工作或寻求更适合本模型 *AR* 蛋白活性测定的方法。

我们构建了 GFP 标记的 *AR* 基因的酵母细胞表达株,检测到宿主菌中 *AR* mRNA 的转录及蛋白的表达,测定了酶活性,并期望将此细胞模型用于 *AR* 抑制剂的初步筛选,开发高效低毒的药物应用于临床;另外,还可将此细胞模型作为机理模型,研究 *AR* 在其他疾病发生中的地位和作用。

【参考文献】

- [1] Varma SD, Mizuno A, Kinoshita JH. Diabetic cataracts and flavonoids[J]. Science, 1977, 195(4274):205-206.
- [2] Bhatnagar A, Srivastava SK. Aldose reductase: congenial and injurious profile of an enigmatic enzyme[J]. Biochem Med Metab Biol, 1992, 48(2): 91-121.
- [3] Alexiou P, Pegklidou K, Chatzopoulou M, et al. Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st Century[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(6): 734-752.
- [4] Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(1): 17-20.
- [5] 陈思妘, 萧熙佩. 酵母生物化学[M]. 山东科学技术出版社, 1990: 106-260.
- [6] 刘静, 叶玲, 刘建伟. 糖尿病并发症相关基因醛糖还原酶酵母细胞模型的建立[J]. 中国老年学杂志, 2005, 11(25): 1367-1369.
- [7] Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (10): 3091-3092.
- [8] Sambrook J, David W. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第3版. 科学出版社, 2002: 76-78.
- [9] Burke D, Dawson D, Stearns T. Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory course manual (2000 Edition) [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002: 115-116.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [11] Lowry OH, Robert NR, Kappahn JI. The flurometric measurement of pyridine nucleotides[J]. J Biol Chem, 1957, 224(2): 1047-1064.
- [12] Trueblood N, Ramasamy R. Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts[J]. Am J Physiol, 1998, 275 (1): H75-83.
- [13] Mervi HT, Laura S, Laura R, et al. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6): 3681-3686.

(编辑: 王雪萍)