

醛糖还原酶 cDNA 的克隆和表达

项军强, 蒋红亮, 张 虹, 丁 明, 赵辅昆

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘 要: 醛糖还原酶能促使葡萄糖转化成山梨醇,是多元醇代谢通路的限速酶,与糖尿病并发症的发生和发展有密切关系。用 RT-PCR 扩增醛糖还原酶基因,将扩增产物克隆到大肠杆菌表达载体 pET22b(+),构建重组表达载体 pET22b(+)-AR。经 PCR、双酶切和序列测定鉴定后,转化 *E. coli* BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 和 Western blotting 对重组蛋白进行分析和鉴定后,利用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析纯化获得重组蛋白 AR-(His)₆。紫外分光光度法对 AR-(His)₆ 进行酶活检测,其比活力为 0.45 U/mg,为下一步筛选具有抑制醛糖还原酶活性的化合物及开发有临床应用价值的醛糖还原酶抑制剂提供参考。

关键词: 糖尿病并发症; 醛糖还原酶; 表达纯化

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A

0 引 言

糖尿病及糖尿病并发症(diabetic complications, DCC)的治疗一直是医学研究的热点和难点。随着糖尿病患者病程的发展,约 73.2% 的糖尿病患者伴有一种或多种糖尿病并发症,且晚期糖尿病并发症病人生存率非常低^[1-3]。研究发现,在高血糖条件下多元醇代谢通路(polyol pathway, PP)的激活是糖尿病慢性并发症的发生与发展的重要原因之一^[4-7],该通路的限速酶是醛糖还原酶(aldose reductase, AR, EC1. 1. 1. 21),它属于还原性辅酶Ⅱ(NADPH)依赖型醛-酮还原酶家族,将葡萄糖转化为不易透过细胞膜的山梨醇,引起细胞的渗透性损伤^[8-9]。醛糖还原酶抑制剂(aldose reductase inhibitor, ARI)可以有效地改善糖尿病患者聚醇代谢异常,目前临床上醛糖还原酶抑制剂仍是预防、延缓和治疗糖尿病并发症的首选药物之一^[10],但由于此类药物副作用大而限制了其临床使用^[11],迫切需要开发新的更安全有效的醛糖还原酶抑制剂。同时由于醛糖还原酶价格昂贵,极大地限制了高通量醛糖还原酶抑制剂的筛选。本文构建了人醛糖还原酶的表达载体 pET22b(+)-AR 并在 *E. coli* BL21(DE3)中表达了醛糖还原酶,为体外筛选新的醛糖还原酶抑制剂打下基础。

1 实验材料与方法

1.1 材料和试剂

肝癌细胞株 SMMC-7721,质粒 pET22b(+),大肠杆菌(*E. coli*) TG1, BL21(DE3),为本实验室保存; PrimerSTAR DNA polymerase, T₄ DNA ligase, *Xho* I 和 *Eco*R I 购自 Takara 公司; Trizol 试剂和反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司; Mouse His-Tag antibody 购自 Abcam 公司; Human aldose reductase antibody 购自 Santa cruz 公司; IPTG, PMSF, DL-甘油醛和还原型 NADPH 购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SMMC-7721 细胞培养

肝癌细胞 SMMC-7721 培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉

素),培养条件为 37℃、5% CO₂,取生长状态良好的对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 RT-PCR

用葡萄糖终浓度为 50 mM 培养肝癌细胞 SMMC-7721,培养 96 h 后收集细胞,提取总 RNA,RT-PCR 获得醛糖还原酶 cDNA(按 Invitrogen 公司反转录试剂盒说明书进行操作)。

1.2.3 pET22b(+)-AR 质粒构建

根据醛糖还原酶基因表达序列设计 PCR 引物,在引物两端分别加 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点和 3 个保护性碱基,引物序列如下:5'-GTAGAATTTCATGGCAAGCCGTCTCTCTGC-3';5'-GTAGAGCTCAAACCTCTTCATGGAAGGGGTAATCC-3'(斜体下划线表示限制性酶切位点)。PCR 产物纯化后和 pET22b(+)载体分别进行限制性内切酶 *Xho* I、*EcoR* I 双酶切处理。回收目的片段和线性化载体,经 T₄DNA 连接酶 16℃ 连接 16 h 后,转化感受态大肠杆菌(*E. coli*) TG1。经 PCR、双酶切和序列测定鉴定后,阳性重组质粒命名为 pET22b(+)-AR,转化 *E. coli* BL21(DE3)宿主菌。

1.2.4 重组 AR 的表达和纯化

将重组质粒 pET22b(+)-AR 转化 *E. coli* BL21(DE3)后,经 1 mmol/L IPTG 30℃ 诱导培养 6 h 后,离心收集菌体,经溶菌酶裂解后,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,分别收集离心的上清和沉淀。将沉淀经包涵体溶解缓冲液 I (8 mol/L 尿素,50 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,0.1 mmol/L PMSF,pH8.0)溶解,25℃、100 r/min 摇床变性 2 h,最大程度溶解包涵体中的目标蛋白。然后将溶液加入到 9 倍体积的包涵体溶解缓冲液 II 中(50 mmol/L KH₂PO₄,1 mmol/L EDTA,50 mmol/L NaCl,pH10.7),室温放置 30 min,维持 pH10.7。在缓冲液透析,逐渐去除变性剂,之后用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析柱进行分离纯化。

1.2.5 免疫印记(Western blotting)

每孔 15 μg 蛋白经 12%SDS-PAGE 分离,通过电转移至 PVDF 膜后,放入装有 5%封闭液的专用盒中,并做标记,室温摇动 1 h。然后用 TBST 溶液洗涤膜去除多余的封闭液,加入 5 mL TBST 溶液稀释后的一抗,4℃,摇动孵育过夜。用 TBST 溶液洗涤膜,5 min×3 次。加入 5 mL TBST 稀释后的二抗,室温摇动孵育 1 h。再用 TBST 溶液洗涤膜,5 min×3 次。将膜平放到保鲜膜上,将混合好的 ECL 底物滴加到膜表面,均匀覆盖,室温反应 1 min 后,倒去液体,盖好保鲜膜放入压片夹中。暗室内压片 1~2 min,依次显影和定影。Western blotting 验证重组蛋白能与 His-Tag antibody 或 Human aldose reductase antibody 产生免疫印迹反应后,命名为 AR-(His)₆。

1.2.6 AR 酶活性测定

1.2.6.1 NADPH 标准曲线的测定

新鲜配制 NADPH,使其终浓度分别为 12.5、25、50、75、100、125、250、300 μM;用 Beckman DU800 检测 340 nm 下的光吸收值,以 A₃₄₀ 值为横坐标,相应 NADPH 浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.6.2 测定 AR 酶活性

融合蛋白 AR-(His)₆ 经 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析纯化后,按 Srivastava 法进行酶活性测定。在 25℃,1 min 内使 1 μmol NADPH 被氧化的酶量定义为 1 个活力单位(U)。

反应体系总体积为 800 μL,其中含有 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.2),400 mmol/L 硫酸锂,5 mmol/L β-巯基乙醇,0.24 mmol/L NADPH,2 mmol/L DL-甘油醛。在反应体系中加入 24 μg 的 AR-(His)₆,记录反应时间,计算 340 nm 光吸收的降低值,平行测定 3 次,取均值,然后计算 AR-(His)₆ 的比活力。

2 结果

2.1 RT-PCR 获得醛糖还原酶基因

以 50 mmol/L 的葡萄糖处理两代的 SMMC7721 细胞的总 RNA 为模板,用 Invitrogen 公司的反转录试剂盒 RT-PCR 获得醛糖还原酶基因。图 1 为 RT-PCR 扩增醛糖还原酶基因的琼脂糖凝胶电泳图,第 1 个泳道有一条明显条带,其分子量与醛糖还原酶 cDNA 大小相符。

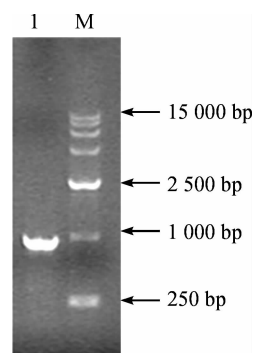
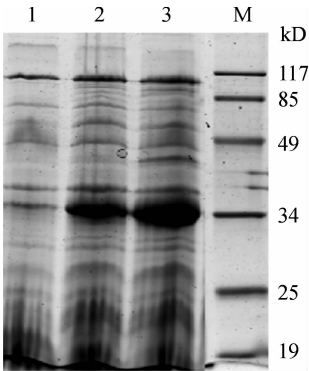


图 1 RT-PCR 扩增醛糖还原酶基因的琼脂糖凝胶电泳图

2.2 醛糖还原酶的表达和纯化

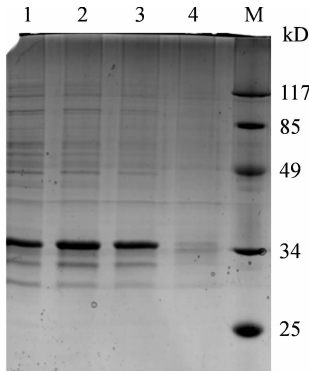
重组表达载体 pET22b(+)-AR 转化 *E. coli* BL21(DE3)后,用 1 mmol/L IPTG 30℃ 诱导表达重组蛋白,经 SDS-PAGE,结果如图 2 所示。其中,1 号泳道为未加 IPTG 诱导的空白对照,2 号泳道为 30℃ 诱导 4 h,3 号泳道为 30℃ 诱导 6 h,M 号泳道为蛋白质分子量 Maker。结果显示 2 和 3 号泳道在 34 kD 大小附近的蛋白表达量均有明显的提高,与预期的重组蛋白的分子量一致。

经 SDS-PAGE 分析重组蛋白以包涵体形式存在沉淀中,将沉淀经包涵体溶解缓冲液 I、II 溶解后,在缓冲液透析,逐渐去除变性剂,使溶解的重组蛋白发生复性。之后用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析柱进行分离纯化,用 6 个柱体积的结合缓冲液(pH7.8)洗柱,用 4 个柱体积的洗涤缓冲液(pH6.0)洗柱,直至流过液 A₂₈₀ <0.01 后,用 6 个柱体积的 10 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱结合蛋白,再 4 个柱体积的 150 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱结合蛋白,结果如图 3 所示:1~4 泳道为 150 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱电泳图,M 泳道为蛋白质分子量 Maker,1~3 泳道有明显接近均一的蛋白电泳条带,4 泳道基本上看不到蛋白电泳条带,说明 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析柱上结合的蛋白基本上被全部洗脱下来。



注:1 号泳道空白对照,2 号泳道为 IPTG 诱导 4 h,
3 号泳道为 IPTG 诱导 6 h,泳道 M 为蛋白质分子量 Maker。

图 2 IPTG 诱导表达重组蛋白的 SDS-PAGE 图

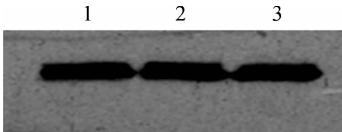


注:1~4 泳道为亲和洗脱先后次序,
泳道 M 为蛋白质分子量 Maker。

图 3 变性复性后镍柱亲和和纯化 SDS-PAGE 图

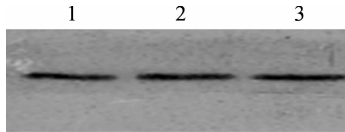
2.3 Western blotting

重组蛋白沉淀经变性复性用 Ni-NTA 琼脂糖亲和纯化后,分别用 6×His-Tag 的单克隆抗体(图 4)和醛糖还原酶单克隆抗体(图 5)对纯化的 AR-(His)₆ 进行 Western-blotting 验证,结果显示 AR-(His)₆ 融合蛋白可以与 6×His-Tag 的单克隆抗体、醛糖还原酶单克隆抗体发生免疫印迹反应,且条带单一。Western-blotting 结果表明,成功诱导表达的融合蛋白为 AR-(His)₆。



注:1~3 泳道为 AR-(His)₆ 纯化产物。一抗为 His-Tag 单克隆抗体,
其稀释浓度为 1 : 2 000

图 4 His-Tag 的单克隆抗体与重组蛋白的 Western-blotting 图



注:1~3 泳道为 AR-(His)₆ 纯化产物。一抗为 AR 单克隆抗体,
其稀释浓度为 1 : 300

图 5 AR 单克隆抗体与重组蛋白的 Western-blotting 图

2.4 AR 酶活性测定

融合蛋白 AR-(His)₆ 经 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析纯化后,Western-blotting 验证 AR-(His)₆ 与 6×His-Tag 的单克隆抗体、醛糖还原酶单克隆抗体有免疫学活性,然后进行 AR-(His)₆ 酶活性测定。经紫外分光光度法对 AR-(His)₆ 的酶活检测,3 次测量其比活力的平均值为 0.45 U/mg。

3 讨 论

醛糖还原酶(aldose reductase,AR,EC1. 1. 1. 21)存在于人体神经、红细胞、晶状体、视网膜等部位中,在正常生理水平时,它对葡萄糖的亲合力较低,但高血糖状况下,醛糖还原酶激活且表达量上升,促使体内的葡

葡萄糖转化为山梨醇^[12-13]。本实验发现 SMMC7721 肝癌细胞经高浓度葡萄糖处理后醛糖还原酶 mRNA 的量会有所提高。其原因可能是:肿瘤细胞生长迅速,代谢过程中会产生有害的羰基化合物,醛糖还原酶对这些有毒物质有解毒作用^[14-16],解除细胞脂代谢过程中产生的有毒羰基化合物^[17]。而且在高浓度的葡萄糖的刺激下,产生大量的山梨醇,引起细胞的渗透压变化,激活渗透调控转录因子 NFAT5/TonEBP/OREB^[18-21],又反馈调节了醛糖还原酶的 mRNA 的转录。

醛糖还原酶抑制剂(aldose reductase inhibitor,ARI)目前仍是临床上治疗糖尿病并发症的首选药物之一,ARI 主要是利用与 AR 活性部位之间的极性与非极性作用来寻找与酶的最佳结合位点^[22]。ARI 与 AR 的结合部位(抑制位点)不同于葡萄糖或 NADPH 与 AR 的结合部位,ARI 作用机理主要是对 AR 产生非竞争性抑制或反竞争性抑制^[23]。我国有着得天独厚的中草药资源,利用 AR 为靶点,可能从中筛选出新一代的醛糖还原酶抑制剂,然而因醛糖还原酶价格昂贵,不利于筛选获得天然化合物 ARIs 的临床用药,为得到足够量的醛糖还原酶,本文克隆并表达了人醛糖还原酶,用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析纯化了 AR-(His)₆,为筛选 ARIs 提供了基础。

参考文献:

- [1] Stein P D, Goldman J, Matta F, et al. Diabetes mellitus and risk of venous thromboembolism[J]. *Am J Med Sci*, 2009, 337(4): 259-264.
- [2] Yang J, Li S, Zheng Y. Predictors of depression in Chinese community-dwelling people with type 2 diabetes[J]. *J Clin Nurs*, 2009, 18(9): 1295-1304.
- [3] Dunlop M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 77: 3-12.
- [4] Drel V R, Pacher P, Ali T K, et al. Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract formation, retinal oxidative-nitrosative stress, glial activation, and apoptosis[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(6): 667-676.
- [5] Ohmura C, Watada H, Azuma K, et al. Aldose reductase inhibitor, epalrestat, reduces lipid hydroperoxides in type 2 diabetes[J]. *Endocr J*, 2009, 56(1): 149-156.
- [6] Doggrell S A. Metformin & lifestyle intervention prevent type 2 diabetes; lifestyle intervention has the greater effect[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2002, 3(7): 1011-1013.
- [7] Kamijo M, Yagihashi S. Polyol pathway and diabetic neuropathy: selective preventive effects of an aldose reductase inhibitor in experimental diabetic neuropathy[J]. *Jpn J Med*, 1991, 30(6): 629-630.
- [8] Ino-Ue M, Zhang L, Naka H, et al. Polyol metabolism of retrograde axonal transport in diabetic rat large optic nerve fiber[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(13): 4055-4058.
- [9] Steuber H, Zentgraf M, Podjarny A, et al. High-resolution crystal structure of aldose reductase complexed with the novel sulfonyl-pyridazinone inhibitor exhibiting an alternative active site anchoring group[J]. *J Mol Biol*, 2006, 356(1): 45-56.
- [10] Li Y, Huang T H, Yamahara J. Salacia root, a unique Ayurvedic medicine, meets multiple targets in diabetes and obesity[J]. *Life Sci*, 2008, 82(21-22): 1045-1049.
- [11] Okayama N, Omi H, Okouchi M, et al. Mechanisms of inhibitory activity of the aldose reductase inhibitor, epalrestat, on high glucose-mediated endothelial injury: neutrophil-endothelial cell adhesion and surface expression of endothelial adhesion molecules[J]. *J Diabetes Complications*, 2002, 16(5): 321-326.
- [12] Zeindl-Eberhart E, Haraida S, Liebmam S, et al. Detection and identification of tumor-associated protein variants in human hepatocellular carcinomas[J]. *Hepatology*, 2004, 39(2): 540-549.
- [13] Lee K W, Ko B C, Jiang Z, et al. Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance[J]. *Anticancer Drugs*, 2001, 12(2): 129-132.
- [14] Saraswat M, Mrudula T, Kumar P U, et al. Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues[J]. *Med Sci Monit*, 2006, 12(12): 525-529.
- [15] Tammali R, Ramana K V, Srivastava S K. Aldose reductase regulates TNF-alpha-induced PGE2 production in human colon cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(2): 299-306.
- [16] Lefrancois-Martinez A M, Bertherat J, Val P, et al. Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase(AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors[J]. *J Clin Endocrinol*

Metab, 2004, 89(6): 3010-3019.

- [17] Rittner H L, Hafner V, Klimiuk P A, et al. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis[J]. J Clin Invest, 1999, 103(7): 1007-1013.
- [18] Lopez-Rodriguez C, Antos C L, Shelton J M, et al. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8): 2392-2397.
- [19] Zhao H, Tian W, Cohen D M. Rottlerin inhibits tonicity-dependent expression and action of TonEBP in a PKCdelta-independent fashion[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(4): 710-717.
- [20] Kuper C, Steinert D, Fraek M L, et al. EGF receptor signaling is involved in expression of osmoprotective TonEBP target gene aldose reductase under hypertonic conditions[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(5): 1100-1108.
- [21] Irarrazabal C E, Williams C K, Ely M A, et al. Activator protein-1 contributes to high NaCl-induced increase in tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein transactivating activity[J]. J Biol Chem, 2008, 283(5): 2554-2563.
- [22] Wilson D K, Tarle I, Petrash J M, et al. Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(21): 9847-9851.
- [23] Balendiran G K, Rajkumar B. Fibrates inhibit aldose reductase activity in the forward and reverse reactions[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(11): 1653-1663.

Cloning and Expression cDNA of Aldose Reductase

XING Jun-qiang, JIANG Hong-liang, ZHANG Hong, DING Ming, ZHAO Fu-kun

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Aldose reductase(AR), the rate-limiting enzyme of the polyol pathway of sugar metabolism, has been implicated in the pathogenesis of diabetic complications, in particular D-glucose reduction to sorbitol. Aldose reductase cDNA is amplified by reverse transcription-PCR (RT-PCR) from the isolated SMMC7721 total RNA. The PCR product is cloned and inserted into *E. coli* expression vector pET22b(+) to create a recombinant plasmid with 6×His Tag, which is named pET22b(+)-AR. The AR-(His)₆ fusion protein is expressed in *E. coli* BL21(DE3) by IPTG. And AR-(His)₆ is purified by Ni-NTA affinity chromatography. Finally the purified AR-(His)₆ activity enzyme is measured by AR assay with ultraviolet spectrophotometry. The results of this study may represent a basis for development of potential drug in preventing diabetic complications.

Key words: diabetic complications; aldose reductase; expression and purification

(责任编辑: 许惠儿)