文章编号:1000-5404(2007)20-1925-04

论著

赖氨酸 490 突变对 OATP-C 分子底物转运能力的影响

杨 聪[1],陈文生[1],邓国宏[2],汪荣泉[1],肖天利[1] (第三军医大学西南医院:[1] 全军消化病研究所,[2] 全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 研究人肝脏特异的有机阴离子转运蛋白基因 OATP-C 蛋白分子膜外区保守的 490 位阳离子赖氨酸对其有机阴离子底物摄取能力的影响。**方法** 从人肝脏 mRNA 中克隆 OATP-C 野生型基因全长 cDNA 序列,通过定点突变将高度保守的第 490 位赖氨酸残基突变为中性氨基酸-苏氨酸,构建其 C 端的 GFP 融合蛋白的真核表达载体,转染 HEK293 细胞,观察突变体的细胞膜定位能力和底物摄取功能的变化。**结果** OATP-C 野生型及突变体均能定位表达于 HEK293 细胞质膜;[^{3}H]硫酸盐雌酮底物摄取实验显示,突变体 5 min 底物摄取量较野生型下降了 38.66%,浓度依赖的[^{3}H]硫酸盐雌酮底物摄取动力学分析表证明,突变体 Km 和 Vmax 分别明显增高和降低。**结论** OATP-C 蛋白膜外区第 490 位赖氨酸是关键的功能氨基酸,是其重要的结构功能单位。

关键词: OATP-C;定点突变;底物摄取;HEK293 细胞

中图法分类号: R322.47;R394-33;R394.2 **文献标识码**: A

Effect of its Lysine-490 mutation on uptake function of organic anion transporting polypeptide C

YANG Cong[1], CHEN Wen-sheng[1], DENG Guo-hong[2], WANG Rong-quan[1], XIAO Tian-li[1] ([1]Gastroenterology Research Center, [2]Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the alterations in uptake function of liver specific transporter OATP-C (organic anion transporting polypeptide C) by mutating positive charge consensus lysine K490T (Lys to Thr) localized on this polypeptide extracellular loop. **Methods** Wild type OATP-C full length cDNA was amplified from human liver mRNA by RT-PCR. Mutation of positive charge to neutral amino acid K490T (Lys to Thr) was made by site-direct mutagenesis technique. The recombinant constructs of wild type and mutated OATP-C cDNA with GFP fusion gene at its C-terminal were generated by subcloning and transfected into HEK293 cells, then cell plasma membrane targeting expression and substrate uptake function were observed. **Results** Both the wild type and mutated OATP-C proteins were highly expressed on HEK293 cell plasma membrane. The uptake of [^{3}H] estrone sulfat substrates of mutated OATP-C markedly reduced in 5 min by 38.66% as compared with wild type. Analysis of concentration-dependent uptake kinetics demonstrated that the mutants possessed a significantly higher Km value and lower Vmax value than those of wild type. **Conclusion** The conserved positive charge Lys-490 on extracellular loop of OATP-C may be a determinant amino acid in the uptake of organic anion substrates.

Key words: OATP-C; site-direct mutagenesis; substrate uptake; HEK293 cell

基金项目:国家自然科学基金(30440015);重庆市自然科学基金(CSTC-2005BB5043);第三军医大学回国人员启动基金(XG200552);西南医院归国人员启动基金(2005) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30440015), the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5043), the Initial Funds of Third Military Medical University for Personnel Returning from Overseas (2005) (XG200552) and the Initial Funds of Southwest Hospital for Personnel Returning from Overseas (2005)

作者简介:杨 聪(1974 -),男,四川省雅安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝脏膜转运蛋白结构与功能方面研究。电话:(023)68765183, E-mail: ycong11@163.com

通讯作者:陈文生,电话:(023) 68765183, E-mail:wenshengchen@hotmail.com

收稿日期:2007-01-12;**修回日期**:2007-05-18

OATP-C(SLC21A6)是人肝脏中特异性表达的有机阴离子转运多肽,是 OATPs (organic anion transporting polypeptides)家族的重要成员,它分布在窦状间隙肝细胞基底侧膜,参与肝脏摄取多种内源性和外源性有机溶质(如胆红素、外源性有机毒素等)。我们从比较生物进化学的角度,发现起源于2亿年前的一种古老的海洋鱼类低等脊椎动物-多髦毛小"鳐"(Raja erinacea, or Skate)的肝脏中存在与高等哺乳动物鼠和人等相似的有机阴离子转运系统,并克隆得到了一个在其肝脏组织中特异性高表达的、原始的 sOatp 基因[1]。进一步比对"鳐"肝脏特异的 sOatp 和人肝特异性的 OATP-C 分子的高同源性区域,结合其有机阴离子底物转运特性,发现 OATP-C 分子膜外区第490位赖氨酸是高度保守的阳离子氨基酸。推测其与 OATP-C 分子有机阴离子底物摄取功能密切相关,可能是关键的氨基酸基团。因此,我们从人肝脏 mRNA 中克隆 OATP-C 全长 cDNA 序列,通过定点突变将第490位赖氨酸(阳离子氨基酸)突变为中性氨基酸苏氨酸,构建其 C 端的 GFP 融合蛋白的真核表达载体,实验观察野生型和突变体的细胞膜定位及底物摄取功能变化,以揭示 OATP-C 转运多肽对有机阴离子底物的选择性转运的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

反转录试剂盒(Reverse Transcription Kit),定点突变试剂盒(Site-directed mutagenesis kit)购于 Stratagene(La jolla, CA);pcDNA3.1, lipofectamine2000, mRNA 抽提试剂盒 Trizol, Topo cloning 试剂盒购于 Invitrogen (Carlsbad, CA);放射性底物[^{3}H] Estrone sulfate ammonium salt (2120GBq/mmol)购于 PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA);所有抗体(anti-OATP-C, anti-Calnexin)均购自 Santa Cruz。

1.2 方法

1.2.1 OATP-C 基因克隆,其野生型及 C 端 GFP 野生融合型基因真核表达载体的构建 用 Trizol(Invitrogen)从新鲜人肝组织中抽提分离得到完整的 mRNA,反转录为 cDNA(Stratagene, Reverse Transcription Kit),设计其特异的 Oligo 引物,正义链:5′-ATCTATATTTCAATCATGGACCAAAATC-3′,反义链:5′-GACAATGTGTTTCACTATCTGCCCC-3′以及终止密码突变引物:TTGGAAACACAGAAGCAGAAGTGGC,经 PCR 扩增出 OATP-C 全长 cDNA(野生型和终止密码突变体),通过 Topo cloning 技术自动连接装载入 pCR2.1 和 pcDNA-GFP 载体,得到 pCR2.1-OATP-C 野生型质粒和 pcDNA-OATP-C 野生融合型基因真核表达质粒。经 DNA 序列测定鉴定整个基因序列的正确性后,将 OATP-C 野生型基因从 pCR2.1-OATP-C 野生型质粒中酶切后,转装到 pcDNA3.1 真核表达质粒中,得到不含 GFP 融合蛋白的 pcDNA3.1-OATP-C 野生型真核表达质粒。

1.2.2 对 pcDNA3.1-OATP-C 野生融合型基因膜外保守区第490位赖氨酸进行定点突变 用定点突变试剂盒将 pcDNA3.1-OATP-C-GFP(Wild type, Wt)融合基因定点突变,得到突变体(Mutation, Mut):490 Lys(K) →Thr(T)(AAA→ACA)突变正向引物:5′-CACCCTGTCTAGCAGGTTGCACATCTTCAAGTGGCAATAAAAAGC-3′。突变后经测序证实成功突变为苏氨酸。

1.2.3 野生型融合蛋白(Wt)及突变体(Mut)在 HEK293 细胞中表达后的细胞定位能力检测 将经过多聚赖氨酸(Poly-D-lysine, sigma)处理的 2 cm×2 cm 盖玻片放入6孔细胞培养板(corning)中,按 3.0×10^6/孔种植 HEK293 细胞,用含10%胎牛血清(PAA)的高糖 DMEM(Hyclone)培养,细胞生长铺底约60%时行转染,将 pcDNA-OATP-C-GFP(Wt)及其突变体质粒(Mut)用脂质体法转染 HEK293 细胞,转染24 h后经4%多聚甲醛固定,以野生融合型蛋白 Wt(GFP 荧光)为阳性对照,在共聚焦显微镜下观察 OATP-C-GFP 突变体(Mut)(GFP 荧光)在 HEK293 细胞的定位情况。

1.2.4 Western blot 检测细胞总蛋白和膜蛋白中 OATP-C 和 Calnexin 蛋白的表达 分别取细胞总蛋白 20 mg 或膜蛋白 100 μg 与等体积上样缓冲液混匀,直接上样,蛋白使用7.5% SDS-PAGE 电泳胶进行电泳分离,然后电转移至硝酸纤维素膜,丽春红染色确定上样的均一性和电转移效率,含1%脱脂奶粉的 PBST 室温封闭2 h,加一抗(1∶100)室温孵育过夜,用 PBST 洗去一抗后加入相应二抗(1∶2 000),室温孵育2 h。OATP-C 蛋白免疫印迹所用的同一硝酸纤维素膜上免疫复合物经洗脱(Stripped)以后,与另一胞浆蛋白 Calnexin 抗体孵育后,Western blot 检测 OATP-C 和内参照 Calnexin 蛋白表达量。

1.2.5 Wt 和 Mut 融合蛋白在 HEK293 细胞对底物[^{3}H]硫酸盐雌酮摄取功能实验 HEK293 细胞按 2.0×10^6/孔种植于经多聚赖氨酸铺底处理的12孔细胞培养板中,用含10%胎牛血清(PAA)的高糖 DMEM(Hyclone)培养细胞,待细胞生长铺底约80% ~90%时进行脂质体法瞬时转染细胞,在转染24 h后,每孔细胞用 DMEM(Hepes, 25 mmol/L)1.0 ml 漂洗1次,然后每孔加入含1.0 μl[^{3}H]硫酸盐雌酮(Estrone sulfate, ES)的 DMEM(Hepes, 25 mmol/L)200 μl,在0、5 min 后0 ℃(冰上)用 DMEM (5% BSA, sigma)400 μl 漂洗1次,再用 DMEM(Hyclone)400 μl 漂洗3次;每孔加入1% SDS 100 μl 裂解细胞,取部分细胞裂解液做液闪测定^{3}H 放射量,余下的细胞裂解液离心取上清测定蛋白浓度。另外,以不同浓度的[^{3}H]硫酸盐雌酮作为底物,每孔加入200 μl 不同浓度的[^{3}H]硫酸盐雌酮溶液进行摄取实验,在5 min 后0 ℃(冰上)DMEM (5% BSA, sigma)400 μl 漂洗1次,再用 DMEM(Hyclone)400 μl 漂洗3次;每孔加入1% SDS 100 μl 裂解细胞,取部分细胞裂解液做液闪

测定^{3}H 放射量，余下的细胞裂解液离心取上清测定蛋白浓度。计算 Wt、Mut 两种融合蛋白对不同浓度[^{3}H]硫酸盐雌酮的摄取量，米式方程作出摄取动力参数图，分别计算出 Km 值、Vmax 值。

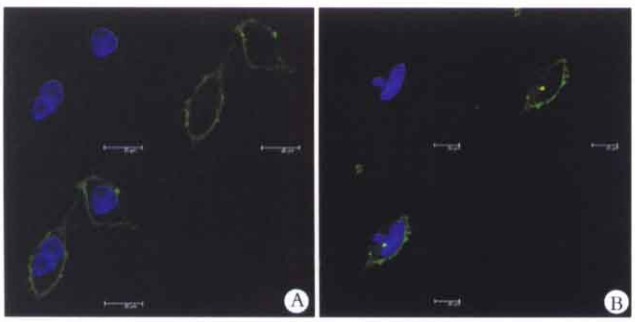
1.3　统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计学软件行 t 检验。

2　结果

2.1　野生融合型(Wt)和突变体(Mut)的亚细胞定位

应用激光共聚焦显微镜在 HEK293 细胞爬片，Wt 和 Mut 质粒转染 24 h 后观察细胞，细胞核经 4′,6－二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色为蓝色(图 1)。



A：野生型；B：突变型

图 1　HEK293 细胞的绿色荧光蛋白表达　(激光共聚焦显微镜，标尺：20 μm)

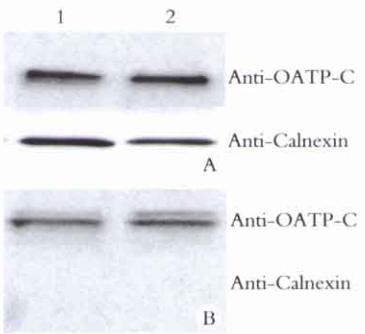
从图 1 可以看出：野生融合型 pcDNA -OATP-C-GFP(Wt)的绿色荧光主要定位在 HEK293 细胞膜上，在细胞质和细胞核中的绿色荧光很少，说明了野生型具有良好的细胞膜定位能力，能够充分定位细胞膜上，这也是发挥 OATP-C 蛋白质摄取功能的基础；从图 2 可以看出：突变融合型(Mut)的绿色荧光也能够定位在 HEK293 细胞的细胞膜上，但在其细胞质中也可见较多的绿色荧光，说明了突变体蛋白在 HEK293 细胞的细胞膜上定位能力与野生融合型相比较可能有减弱。

2.2　OATP-C-GFP Wt 和 Mut 蛋白在 HEK293 细胞膜的表达

分离转染 OATP-C-GFP 融合蛋白基因(Wt 和 Mut)的 HEK293 细胞总蛋白和膜蛋白，以 Western blot 检测 OATP-C 和内参照胞浆蛋白 Calnexin 表达量(图 2)，结果显示 Wt 和 Mut 的 OATP-C 蛋白在 HEK293 细胞膜的表达量无明显差异。

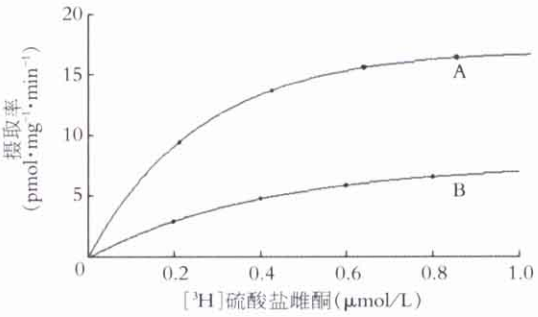
2.3　野生融合型(Wt)和突变融合型(Mut)的 5 min 底物摄取量及动力学参数 Km 和 Vmax 值

采用 3 个同样的对照孔进行实验，分别测定每一孔的放射量和蛋白浓度，经过换算来得到其摄取量，对[^{3}H]硫酸盐雌酮 5 min 摄取量 Wt 为$(6095.83 \pm 254.17) \times 10^{-3}$ pmol/mg，Mut 为$(3739.32 \pm 147.45) \times 10^{-3}$ pmol/mg。与 Wt 相比较，Mut 5 min 底物摄取量较野生型下降了 38.66%，说明 Mut 对[^{3}H]硫酸盐雌酮的摄取能力是减弱的。进一步我们用不同浓度的[^{3}H]硫酸盐雌酮进行 5 min 摄取实验，得出各自的摄取动力曲线：Wt 的 Km = (0.26 ± 0.03) μmol/L，Vmax = (111.80 ± 2.10) pmol · mg^{-1} · (5 min)$^{-1}$；Mut 的 Km = (1.20 ± 0.06) μmol/L，Vmax = (88.70 ± 5.90) pmol · mg^{-1} · (5 min)$^{-1}$，结果见图 3。可以看出，与 Wt 相比较，Mut 的 Km 明显升高，说明其对硫酸盐雌酮的亲和力明显降低；同时其 Vmax 也是降低的。对二者的 Km 和 Vmax 分别进行 t 检验，P 值均小于 0.01(n = 3)，有显著性差异。结果进一步说明了 Mut 对[^{3}H]硫酸盐雌酮的摄取能力是降低的。因此，我们认为 OATP-C 膜外区的第 490 位保守阳离子氨基酸赖氨酸是 OATP-C 分子重要的功能结构单位，对维持其有机阴离子物质的转运功能具有十分重要的意义。



A：细胞总蛋白；B：细胞膜蛋白；1：野生型；2：突变体

图 2　转染 Wt 和 Mut 的 HEK293 细胞总蛋白、膜蛋白 OATP-C 蛋白表达量的表达　(以胞浆蛋白 Calnexin 为内参照)



A：野生型；B：突变体

图 3　野生型和突变体对[^{3}H]硫酸盐雌酮的摄取动力曲线

3　讨论

肝脏是维持人体正常机能的重要器官，肝脏的主要功能之一是从门静脉血液中摄取一些毒性的有机化合物，在肝细胞中加工、转化、代谢，再分泌到胆汁中排出体外，发挥其解毒作用。而肝脏摄取有机化合物溶质的功能在很大程度上主要由肝细胞膜上一组结构和功能相似的转运蛋白质介导，即有机阴离子转运多肽(OATPs)[2]。OATP-C 是仅在人肝脏组织中特异性表

达的有机阴离子转运蛋白，参与肝脏从血液中摄取、清除多种内源性和外源性有机溶质的重要的膜蛋白[3,4]。已有的研究表明 OATP-C 对在肝脏转化灭活药物的代谢特别重要，如新型他汀类降血脂药物普伐他汀[5,6]的代谢主要经肝细胞转运摄取、排泄清除，OATP-C 是其在肝细胞内摄入代谢的主要载体。抗结核药物 Rifamycin SV 和 Rifampicin 诱导患者出现高胆红素血症以及溴磺酞 BSP(bromosulfophthalein)清除率降低等肝功能损害的副作用，与这类药物抑制 OATP-C 的活性可能是其重要机制之一[7]。OATP-C 还参与非结合型胆红素的转运，其活性的减低可能与遗传性家族性非结合胆红素血症 Gilbert 综合征有关[8]。因此研究其转运分子机制对于阐明家族性黄疸的发病机制、药物和毒素在肝脏的摄取转运过程具有重要的临床意义。

本研究中，我们从比较生物进化学角度发现 OATP-C 分子第 490 位氨基酸(赖氨酸)是高度保守的阳离子氨基酸。在对美国非洲裔和欧洲裔人群调查的研究中已表明，OATP-C 基因的单个碱基突变、尤其是发生于保守区的突变可以直接严重减弱它的摄取功能，另有少数突变是通过影响其在细胞内表达后的细胞膜定位而间接削弱其功能，而同源性较低的区域的突变对其功能影响很小或甚至没有影响[9]。OATP-C 分子第 490 位氨基酸(赖氨酸)为高度保守的阳离子氨基酸，我们推测可能与其有机阴离子底物摄取功能密切相关。HEK293 细胞是来源于人胚胎肾皮质的细胞系，有生长速度快，倍增时间短，生物学性质稳定和易于转染基因的特性，并且其无内源性的 OATP-C 表达，因而选为实验转染细胞；结果表明，第 490 位阳离子氨基酸赖氨酸突变为中性氨基酸苏氨酸后，从激光共聚焦图片可以看出在细胞膜的定位能力上野生型和突变体都能够在 HEK293 细胞膜上正确定位，但突变体除了在细胞膜上有表达外，在细胞质中也有较多的表达，说明突变体的细胞膜定位能力与野生型相比可能是减弱的。尽管 Western blot 检测结果显示 Wt 和 Mut 的 OATP-C-GFP 蛋白的表达量无明显差异，但从对底物的摄取能力来看，OATP-C 野生型对[^{3}H]硫酸盐雌酮的摄取能力很高，而突变体对硫酸盐雌酮的摄取能力比较低，野生型的 Km = (0.26 ± 0.03) μmol/L，Vmax = (111.80 ± 2.10) pmol · mg^{-1} · 5 min^{-1}；突变体的 Km = (1.20 ± 0.06) μmol/L，Vmax = (88.70 ± 5.90) pmol · mg^{-1} · 5 min^{-1}，说明野生型比突变体对硫酸盐雌酮具有更高的亲和力和更大的最大摄取速度。对二者的 Km、Vmax 分别进行 t 检验，P 值均小于 0.01，有显著性差异，有明显的统计学意义，说明与野生型相比，突变体功能是明显减弱的。因此我们认为第 490 位阳离子氨基酸赖氨酸突变为中性氨基酸苏氨酸后的 OATP-C 的底物摄取能力显著降低，可能与突变后的 OATP-C 在细胞膜上的定位能力下降有关，但更有可能是由于阳离子氨基酸突变为中性氨基酸后，降低或者部分失去了对有机阴离子底物硫酸盐雌酮的结合、转运能力。因此，我们认为 OATP-C 分子的第 490 位阳离子氨基酸赖氨酸是 OATP-C 分子重要的功能结构单位，对维持 OATP-C 分子转运功能非常重要。

参考文献：

[1] Cai S Y, Wang W, Soroka C J, *et al*. An evolutionarily ancient Oatp: insights into conserved functional domains of these proteins[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(4): G702 - G710.

[2] Meier P J, Stieger B. Bile salt transporters[J]. Annu Rev Physiol, 2002, 64: 635 - 661.

[3] Kullak-Ublick G A, Stieger B, Meier P J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 322 - 342.

[4] 陈毅飞，陶国才，崔 剑，等. 大鼠无肝状态肾脏罗库溴铵相关转运蛋白 OATP-3 及其基因的表达变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(10)：1040 - 1042.

[5] Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, *et al*. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1)[J]. Pharmacogenetis, 2004, 14(7): 429 - 440.

[6] Mwinyi J, Johne A, Bauer S, *et al*. Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics[J]. Clin Pharmacol Ther, 2004, 75(5): 415 - 421.

[7] Vavricka S R, Van-Montfoort J, Ha H R, *et al*. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver [J]. Hepatology, 2002, 36(1): 164 - 172.

[8] Cui Y, Konig J, Leier I, *et al*. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6[J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 9626 - 9630.

[9] Tirona R G, Leake B F, Merino G, *et al*. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans[J]. J Biol Chem, 2001, 276(38): 35669 - 35675.

(编辑 栾 嘉)