论著

文章编号:1000-5404(2014)10-1002-06

Radixin 定点突变过表达对 HepG2 细胞膜转运蛋白 Bsep 的影响

封欣婵,柴 进,程 英,陈文生 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 构建 pcDNA3.1-RDX 定点突变真核过表达质粒,研究其在胆汁淤积时对 HepG2 细胞膜转运蛋白胆盐输出泵(bile salt export pump, Bsep)定位表达的影响。**方法** 从含有 RDX 野生型质粒中,利用 PCR 方法钓取 RDX 野生型基因片段并以野生型为基础进行定点突变,PCR 扩增后转入 pcDNA3.1 载体,其产物转化 DH-5α 感受态细胞。对长出的单克隆进行菌落 PCR 鉴定,再对 PCR 鉴定阳性的克隆进行测序和比对分析,比对正确即为构建成功的目的质粒。将目的质粒转染 HepG2 细胞,经 G418 筛选构建稳转细胞株。提取各株细胞的总蛋白,检测磷酸化 RDX 是否影响 HepG2 细胞膜上转运蛋白 Bsep 的表达。**结果** PCR 和测序结果均证实 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 过表达载体构建成功。蛋白免疫印迹表明,与转染 pcDNA-3.1-RDX-WT 的 HepG2 相比,转染 pcDNA-3.1-T564D 的 HepG2 的 Bsep 膜蛋白表达量显著增加($P<0.05$),而转染 pcDNA-3.1-T564A 的 HepG2 的 Bsep 膜蛋白表达量有所下降($P>0.05$)。**结论** 成功构建了 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 过表达载体,并证实 RDX 的磷酸化能增强 HepG2 细胞膜上 Bsep 的表达。

[关键词] RDX 定点突变;载体构建;pcDNA3.1 载体;胆盐输出泵

[中图法分类号] R322.47;R394.3;R657.430.2 [文献标志码] A

Effect of radixin phosphorylation on bile salt export pump expression on HepG2 cell membrane

Feng Xinchan, Chai Jin, Cheng Ying, Chen Wensheng (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct radixin (RDX) wild type and mutant over-expression vectors, pcDNA3.1-RDX WT, pcDNA3.1-RDX T564D, and pcDNA3.1-RDX T564A, and to study the effects of RDX phosphorylation on bile salt export pump (Bsep) expression of HepG2 cell membrane. **Methods** RDX wild type gene was used as template to carry out point mutation, T564D and T564A. All target DNAs were transferred to pcDNA3.1 to construct 3 over-expression vectors, pcDNA3.1-RDX WT, pcDNA3.1-RDX T564D, and pcDNA3.1-RDX T564A. DH-5α competent cells were transformed with the recombinant plasmids for positive clone identification. Then target clones were used to transfect HepG2 cells and stable cell lines were established. Western blotting was used to confirm the expression of RDX, p-Thr564-RDX and Bsep. **Results** All the recombinant plasmids were correctly constructed. Western blot results demonstrated that the cell membrane Bsep expression was slightly higher in HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-RDX WT than in the cells transfected with pcDNA-3.1-RDX T564A ($P>0.05$) and significantly lower than in the cells transfected with pcDNA3.1-RDX T564D ($P<0.05$). **Conclusion** RDX wild type and mutant over-expression vectors are successfully constructed. RDX phosphorylation improves Bsep expression on HepG2 cell membrane.

[**Key words**] radixin; phosphorylation; mutant; vector construction; pcDNA3.1; bile salt export pump

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81370560,81170430) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81100280). Corresponding author: Chen Wensheng, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370560,81170430);国家自然科学基金青年科学基金(81100280)

[通信作者] 陈文生,E-mail: wenshengchen@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140115.1518.013.html(2014-01-15)

胆汁淤积是由多种原因引起的肝细胞和/或毛细胆管结构与功能的异常,导致胆汁的生成和/或胆汁内溶质的排出障碍。各种病因所致的胆汁淤积都会引起肝细胞及胆管细胞膜上负责胆汁生成和排出的一系列膜转运蛋白的表达和功能的改变,这些膜转运蛋白主要有:位于肝细胞胆管面的胆盐输出泵(bile salt export pump,Bsep)、多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2,MRP2)、多药耐药蛋白3(multidrug-resistance protein 3,MDR3)等;位于肝细胞窦面的多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1,MRP1)、多药耐药相关蛋白3(multidrug resistance-associated protein 3,MRP3)、有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptides,OATPs)等。近年来的研究表明,肝细胞和胆小管细胞膜上的胆盐输出泵在调控胆汁的分泌和排出的过程中发挥着重要作用[1]。Bsep属于ABC蛋白家族(ATP-binding cassette family),主要位于肝细胞胆管膜面,是胆盐分泌的主要承担者,能将牛磺胆酸、胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、熊去氧胆酸等各种胆盐转运到胆管中,是影响胆汁流形成的最重要、最关键的因素,表现为当Bsep表达下降或功能缺失时肝内胆汁淤积加重,胆汁中胆酸含量减少,引起进行性家族遗传性肝内胆汁淤积Ⅱ型(progressive familial intrahepatic cholestasis,PFIC2)、妊娠性胆汁淤积等[2-3]。目前,Bsep的表达调控机制仍不清楚。研究报道,其表达主要受FXR的转录调节,FXR被胆汁酸激活后与RXRα或RARα结合形成异二聚体,之后此异二聚体诱导Bsep的激活。此外,转录因子Nrf2能够刺激Bsep启动子的活动,从而促使Bsep表达上调。另外,Bsep还存在转录后调节,其受多种因素的影响,包括糖基化、磷酸化、泛素化等[2,4-5]。

Radixin(RDX)为细胞膜-细胞骨架连接蛋白(membrane cytoskeleton cross linker protein),是连接细胞膜和细胞骨架之间的ERM(ezrin/radixin/moesin)家族成员之一,表达于肝细胞、肾脏细胞等,参与细胞形态调节、信号转导、细胞运动等多种生命活动[6-7]。Radixin主要由3个结构域构成:与细胞膜连接的高度保守的球状氨基末端,即FERM区;中间区域为α螺旋区;带正电荷的羧基末端,即C-ERMAD区,该区域含有苏氨酸残基(Thr564),能够被磷酸化和去磷酸,是RDX的主要调控位点[8-11]。骨架蛋白RDX在肝细胞主要表达于胆管膜面。近期研究表明,RDX基因敲除的小鼠在出生后8周会出现轻度肝损伤和高胆红素血症[8],而在内毒素所致胆汁淤积动物模型,肝细胞小管膜面Bsep的减少与RDX磷酸化密切相关[9]。但是,骨架蛋白RDX与肝细胞小管膜面Bsep定位表达的关系尚不清楚[9-11]。文献[12-13]报道RDX主要功能氨基酸Thr564的磷酸化和去磷酸化,能够调节B淋巴细胞CD44的膜定位表达,并且在维持肝细胞的极性方面发挥着重要的作用[14]。因此,我们构建了携带绿色荧光基团GFP的RDX野生型(pcDNA 3.1-RDX WT)、RDX磷酸化激活型(pcDNA 3.1-RDX T564D)和RDX磷酸化失活型(pcDNA3.1-RDX T564A)的过表达载体,同时研究其RDX磷酸化状态对肝细胞小管膜面Bsep的影响,旨在为临床治疗胆汁淤积提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2细胞购自中科院上海细胞研究所;DMEM培养基、胎牛血清、Opti-MEM I Reduced Serum Medium购自GIBCO公司;DH5α感受态细胞购自北京天根生物有限公司;pcDNA3.1载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司;限制性内切酶*Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ购自NEB公司;*Taq* polymerase购自SinoBio公司;In-Fusion™ PCR Cloning Kit购自Clontech公司;dNTP购自TaKaRa公司;胶回收试剂盒、Plasmid抽提试剂盒购自Promrga公司;定点突变试剂盒购自赛百盛公司;X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagen、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自Roche公司;RIPA Buffer购自Sigma公司;Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit购自Thermo Scientific公司;BCA蛋白定量试剂盒、Supersingnal West Femto maximum sensitivity substrate Kit购自Pierce Biotechnology公司;Phospho-Threonine购自Cell signal公司;RDX、GAPDH购自Epitomics公司;Bsep购自Santa Cruz公司;羊抗兔、兔抗山羊二抗购自Pierce Biotechnology公司。引物设计、合成及测序由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增RDX野生型基因片段 RDX野生型PCR引物序列:5′端引物:TCCGCTCGAGATGCCGAAACCAATCAACG;3′端引物:ATGGGGTACCGTCATTGCTTCAAACTCATCGATACGCTGCTTTGTATTGCCTTGTCG。5′端引物和3′端引物含交换配对碱基、酶切位点及含目的基因5′端部分序列。PCR反应体系:20 μL体系中5′端和3′端引物各0.4 μL(10 μmol/L)、dNTPs 1.6 μL(2.5 mmol/L)、Template 1 μL(10 ng/μL)、*Taq* polymerase 0.2 μL、5×*Taq* Buffer 4 μL、ddH_2O 12.4 μL。反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min 30个循环,72 ℃ 10 min。反应后1%琼脂糖凝胶电泳观察结果,切胶回收目的DNA片段。

1.2.2 pcDNA3.1-RDX WT Thr564位点定点突变 以pcDNA3.1-RDX WT为模板,利用定点突变试剂盒,使RDX Thr564突变为Asp564和Ala564,即:564位点A的缺失突变及564位点T突变为D。PCR反应扩增目的片段后,1%琼脂糖凝胶电泳观察结果,且胶回收目的片段。

1.2.3 重组质粒的构建

1.2.3.1 PCR产物交换入线性化表达载体 用*Xho*Ⅰ/*Kpn*Ⅰ双

酶切 pcDNA3.1 载体使其线性化,将 RDX WT、RDX T564D、RDX T564A 的 PCR 产物分别与 pcDNA3.1 连接,构建新的质粒。连接体系设阳性对照(GAPDH,含有交换臂)、自连接对照、实验组 1(RDX WT)、实验组 2(RDX T564D)、实验组 3(RDX T564A)。反应时间:25 ℃ 30 min→ 45 ℃ 15 min,反应体系见表 1。

表 1 质粒构建连接体系(μL)

反应体系	ddH_2O	10×In-Fusion 交换酶缓冲液	In-Fusion 交换酶	pcDNA3.1 载体 DNA	纯化的 PCR 产物	总体积
阳性对照	12.5	2	0.5	1	4	20
自连接对照	16.5	2	0.5	1	0	20
实验组 1	12.5	2	0.5	1	4	20
实验组 2	12.5	2	0.5	1	4	20
实验组 3	12.5	2	0.5	1	4	20

1.2.3.2 转化 转化所用感受态细胞为 DH5α。3 支 100 μL 的感受态细胞(-80 ℃保存)在冰上融化,将新构建好的 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 各 10 μL 分别加入其中,轻轻旋转 EP 管以混匀。冰上静置 30 min。42 ℃热击 90 s,迅速冰浴 2 min。每管加入 900 μL 不含抗生素的 LB 培养基,37 ℃ 150 r/min 摇床温育 45 min 使菌体复苏。将 200 μL 以转化的菌液转移至含卡那霉素抗性的 LB 琼脂糖培养基上,涂布均匀,37 ℃培养 16 h。

1.2.4 阳性克隆的 PCR 鉴定及测序 挑取单克隆菌落 8 个,分别装入含有 5 mL LB 培养基的锥形瓶中,摇床 37 ℃ 240 r/min 培养 16 h。取 1 mL 菌液装入灭菌的 EP 管中,10 000 r/min,离心 1 min,收集菌体。加入 200 μL ddH_2O 充分涡旋,悬浮菌体。沸水煮沸 15 min,直至出现白色絮状沉淀。离心后取上清,上清即为待测样品。经 PCR 鉴定后,将转化成功的阳性克隆送吉凯基因进行测序。PCR 反应体系:20 μL 体系中 5′端和 3′端引物各 0.4 μL(10 μmol/L)、dNTPs 1.6 μL(2.5 mmol/L)、Template 1 μL(10 ng/μL)、*Taq* polymerase 0.2 μL、5×*Taq* Buffer 4 μL、ddH_2O 12.4 μL 反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min 30 个循环,72 ℃ 10 min。鉴定引物。

表 2 阳性克隆 PCR 鉴定引物序列

质粒	引物序列(5′→3′)
pcDNA3.1-RDX WT	上游:KI4414-P3 TCTGCCATAGCAAAACAAGC
	下游:EGFP-N-R CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG
pcDNA3.1-RDX T564D	上游:KI4378-2-P4 TCTGCCATAGCAAAACAAGC
	下游:EGFP-N-R CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG
pcDNA3.1-RDX T564A	上游:KI4371-P4 TCTGCCATAGCAAAACAAGC
	下游:EGFP-N-R CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG

1.2.5 稳转细胞系的建立 常规培养细胞至对数培养期,将 HepG2 细胞接种至 6 孔板中,24 h 后代细胞融合度达 90% 左右,分别转染 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 及 pcDNA3.1-CTR(pcDNA3.1 空白质粒)。操作过程根据 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagen 说明书完成。X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagen:DNA 复合物 = 4∶1。常规培养细胞 24 h,更换新鲜的 10% FBS-DMEM 培养基并用 800 μg/mL G418 进行阳性筛选并以正常的 HepG2 细胞做阴性对照。培养 8 d 后,挑选单克隆稳定转染细胞株,继续用 500 μg/mL G418 维持筛选 3 周,获得稳定转染细胞株,传代扩大培养。

1.2.6 蛋白免疫印迹 按照文献[15]方法提取各稳转细胞株总蛋白及膜蛋白,BCA 法进行蛋白定量,在 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳,每孔上样量为 20 μg 总蛋白。浓缩胶 60 V 电泳 1 h,分离胶 100 V 电泳 2 h,常规湿法转膜 80 min,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,加一抗(Phospho-Threonine 1∶1 000,RDX 1∶20 000,Bsep 1∶1 000,GAPDH 1∶50 000)4 ℃孵育过夜,用 TBST 吸取一抗后加入相应的二抗(1∶50 000),室温孵育 1 h。ECL 化学发光,凝胶成像系统显影。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

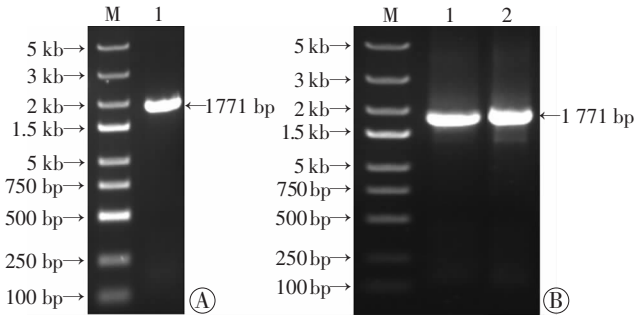
2.1 成功构建并筛选出 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 过表达载体

将 RDX 野生型(RDX WT)基因片段进行 PCR 扩增,扩增后取 5 μL 产物,加 1 μL 6×上样缓冲液混匀上样,电泳,得到 1 771 bp 的条带(图 1A),成功扩增了 RDX WT 基因片段。胶回收,回收后利用定点突变试剂盒进行突变,使 564 位点 T 突变为 A(RDX 磷酸化,RDX T564A),及 564 位点 T 突变为 D(RDX 去磷酸化,RDX T564D),PCR 扩增后再次电泳,得到 1 771 bp 大小的条带(图 1B),表明成功突变并扩增了 RDX T564A、RDX T564D 基因片段。将 RDX WT、RDX T564A、RDX T564D 基因片段的 PCR 产物与 pcDNA3.1 载体连接后转入 DH-5α 感受态细胞,在含卡那霉素抗性的琼脂糖平板上培养 16 h。随机挑选 8 个菌落,以 pcDNA3.1 自连接为阴性对照,GAPDH 为阳性对照进行 PCR 扩增筛选鉴定,结果表明:阴性对照未扩增,阳性对照得到大小为 1 kb 的条带,pcDNA3.1-RDX WT 重组子 3、5、6 号得到大小为 650 bp 的条带(图 2A),pcDNA3.1-RDX T564D 重组子 1、3、7、8 号得到大小为 650 bp 的条带(图 2B),pcDNA3.1-RDX T564A 重组子 1、2、5、7 号重组子得到大小为 650 bp 的条带(图 2C),证明 RDX WT、RDX T564A、RDX T564D 基因片段已插入载体,重组子构建成功。PCR 初筛鉴定后,将其分子量大小符合的阳性克隆进行 DNA 序列测定,所得序列经 DNAMAN 软件对比,证实插入序列与目的基因标准序列完全一致(图 3),表明 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 过表达载体构建成功。

2.2 磷酸化 RDX 能增强肝细胞膜上 Bsep 的表达

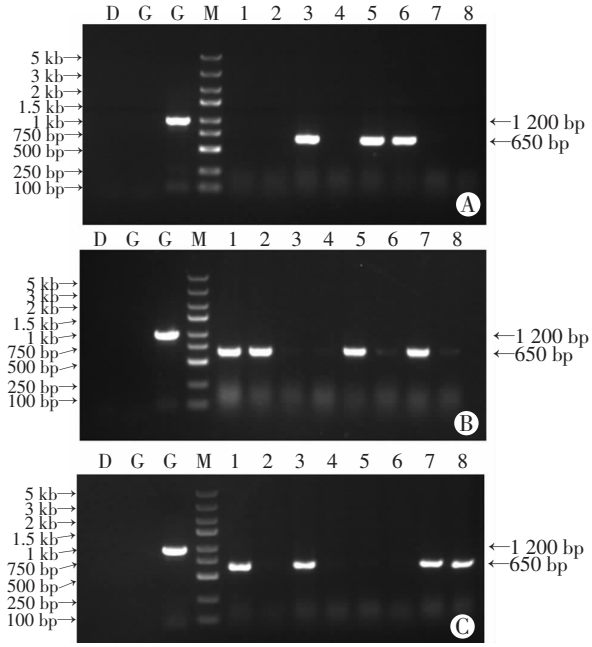
将 pcDNA-3.1-CTR、pcDNA-3.1-RDX-WT、pcDNA-3.1-T564D 和 pcDNA-3.1-T564A 过表达质粒分别转染 HepG2 细胞,24 h 后荧光倒置显微镜下观察细胞转染后的荧光效果(图 4),然后用 800 μg/mL G418 进行抗性筛选,4 周后获得过表达稳定转染细胞株。然后用 RIPA buffer 提取总蛋白。蛋白免疫印迹结果表明,与转染 pcDNA-3.1-RDX-WT 的 HepG2 细胞相比,转染磷酸化激活型过表达质粒 pcDNA-3.1-T564D 的 HepG2 细胞磷酸化 RDX 显著增高。反之,转染 pcDNA-3.1-T564A 的 HepG2 细胞 RDX 磷酸化水平有所下降。转染

pcDNA-3.1-CTR 的 HepG2 细胞 RDX 磷酸化水平与转染 pcDNA-3.1-RDX-WT 的 HepG2 细胞无显著差别。然后,各组间总 RDX 均无明显变化(图 5A)。为了研究磷酸化 RDX 是否影响 HepG2 细胞膜上转运蛋白 Bsep 的表达。我们用 Mem-PER 膜蛋白提取试剂盒提取上述过表达的 4 种细胞株总膜蛋白。蛋白免疫印迹表明,与转染 pcDNA-3.1-RDX-WT 的 HepG2 相比,转染 pcDNA-3.1-T564D 的 HepG2 的 Bsep 膜蛋白表达量显著增加,而转染 pcDNA-3.1-T564A 的 HepG2 的 Bsep 膜蛋白表达量有所下降。而转染 pcDNA-3.1-CTR 的 HepG2 的 Bsep 膜蛋白无明显变化(图 5B)。以上结果充分说明,RDX 的磷酸化能增强 HepG2 细胞膜上 Bsep 的表达。



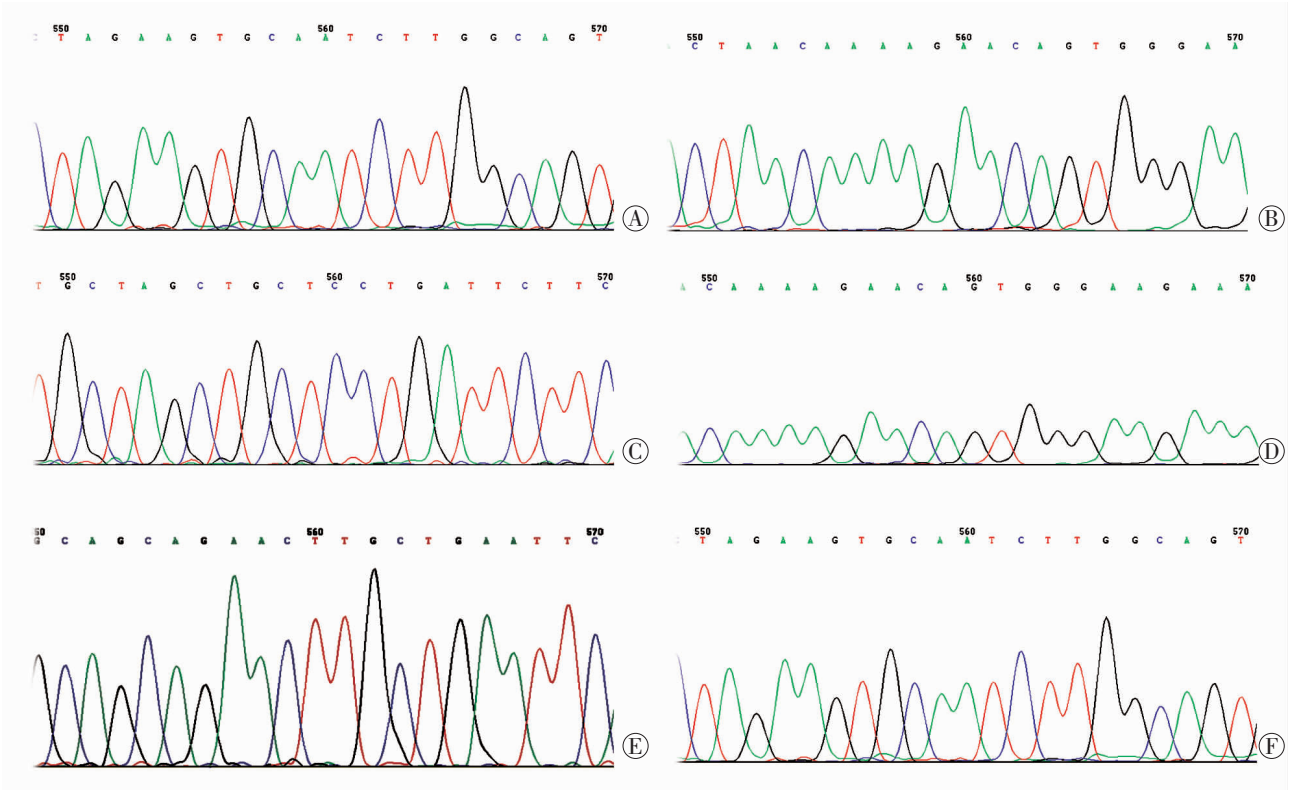
A: RDX WT 经 PCR 扩增后片段　1:RDX WT,M:标准;B: RDX T564D、RDX T564A 经 PCR 扩增后片段　1:RDX T564D, 2:RDX T564A,M:标准

图 1　RDX WT、RDX T564D、RDX T564A 经 PCR 扩增后凝胶电泳结果



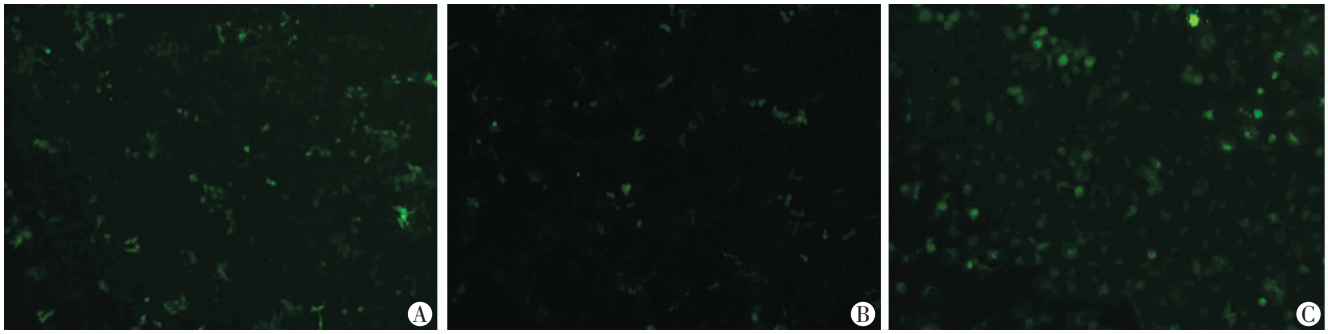
D:pcDNA3.1 自连接;G:GAPDH;M:标准;1~8:随机挑选的重组子
A: pcDNA3.1-RDX WT;B: pcDNA3.1-RDX T564D; C:pcDNA3.1-RDX T564A;

图 2　pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 重组子 PCR 鉴定结果



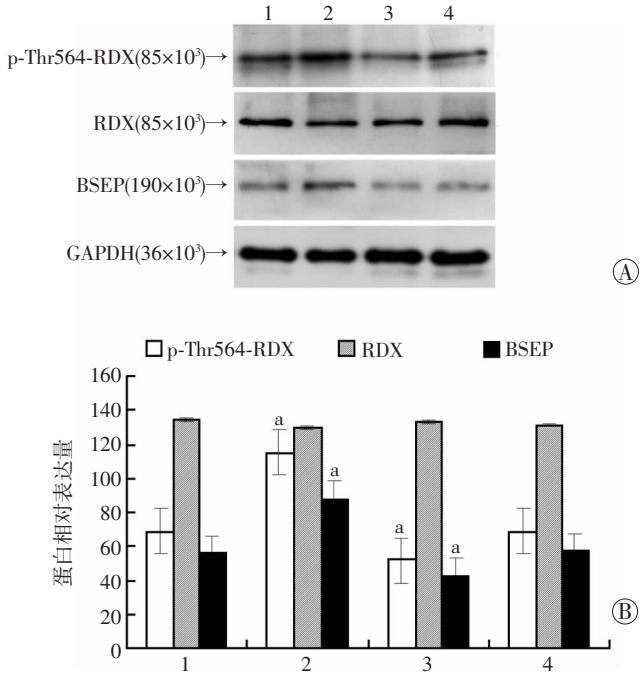
A、B:pcDNA3.1-RDX WT 真核表达测序结果　A:KL4414-2. KL4371-W1F;B:KL4414-2. PEGFP-N-3;C、D:pcDNA3.1-RDX T564D 真核表达测序结果　C:KL4371-1. KL4371-W1F;D:KL4371-1. PEGFP-N-3;E、F:pcDNA3.1-RDX T564A 真核表达测序结果　E:KL4378-2. KL4371-W1F;F:KL4378-2. PEGFP-N-3

图 3　pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 真核表达测序结果



A：pcDNA3.1-RDX WT 转染 HepG2 细胞；B：pcDNA3.1-RDX T564D 转染 HepG2 细胞；C：pcDNA3.1-RDX T564D 转染 HepG2 细胞

图4 重组质粒转染 HepG2 细胞 24 h 后绿色荧光蛋白的表达 （荧光显微镜 ×400）



1：RDX WT；2：RDX T564D；3：RDX T564A；4：CTR A：蛋白免疫印迹结果；B：统计分析结果（$n=3$，$\bar{x}\pm s$） a：$P<0.05$，与 RDX WT 组比较

图5 各组质粒转染 HepG2 细胞后 p-Thr564-RDX、RDX 与 Bsep 的蛋白表达情况

3 讨论

Bsep 为一种 ATP 依赖的胆酸转运蛋白，分布于肝细胞胆管膜面，主要以牛磺胆酸、胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、熊去氧胆酸等各种胆盐以及环孢霉素、利福平、格列本脲、普伐他汀等药物为底物，是影响胆汁流形成的最重要、最关键的因素[1-3]。人体胆汁淤积肝组织样品和胆汁淤积动物模型表明，肝细胞 Bsep 表达下降或功能缺失，可导致胆汁淤积，促进肝损伤的进一步加重，最终导致肝功能衰竭[15]。因此，Bsep 在胆汁淤积性疾病中对保护肝细胞起到极其重要的作用，其作用机制可能与 Bsep 能够将淤积于肝细胞内的胆汁酸转运入胆管系统有关。但是在胆汁淤积情况下，肝细胞 Bsep 表达 mRNA 水平无明显变化，而肝细胞小管面膜表达则明显下降。这可能提示胆汁淤积下肝细胞小管面膜 Bsep 的表达下降主要是转录后调控。但是目前该调控机制尚不清楚。

ERM 家族蛋白作为细胞骨架相关蛋白，主要包括 RDX、EZR 和 MSN，是将细胞表面蛋白与细胞内部其他分子之间连接起来的桥梁。相对于 EZR 和 MSN，我们对 RDX 的在肝细胞的功能知之甚少。RDX 蛋白，又称根蛋白，基因定位于第 11 号染色体，它的许多重要生理功能（如 T、B 淋巴细胞上标志蛋白的定位）均离不开其 Thr564 位点的磷酸化与去磷酸化[16-17]。研究表明，在胆道梗阻、药物性肝损、原发性硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎等原因引起的胆汁淤积中，均发现 RDX 蛋白表达下降或分布异常[8-9,11]。大鼠模型中，RDX 表达的下调会使胆小管膜结构发生明显改变，导致 Mrp2、Bsep、Mdr1 等蛋白分解[18-21]。而这些蛋白与胆汁酸的转运密切相关。

最近研究表明，ERM 家族具有调节肝细胞转运蛋白的功能。在体外培养的大鼠肝细胞的研究发现，利用 siRNA 技术下调 RDX 的表达扰乱了胆管结构的正常生成并使 Mrp2、Bsep 从胆管面的顶端面解离[17]。而在 RDX 缺失的大鼠模型中，Mrp2、Bsep、Mdr1 将从细胞膜进入细胞质中[11]。因此，我们有理由相信：RDX 蛋白在胆汁淤积时对肝细胞膜上的蛋白分布起到了关键的调节作用。有文献报道，ERM 家族蛋白保守位点的苏氨酸残基磷酸化（ezrin T567，radixin T564，moesin T558）能够调节 T、B 淋巴细胞 CD144 等膜蛋白的定位及功能[22]。而在包括乳腺癌细胞、肺癌细胞、骨肉瘤细胞等肿瘤细胞及血管内皮细胞中，ERM 磷酸化与蛋白激酶 C 及蛋白激酶 A 密切相关[23-26]。所以，胆汁淤积情况下 RDX 的磷酸化是否

与蛋白激酶家族有关,其调控 Bsep 表达的分子机制成为我们研究的重点。为此,本研究利用 RDX 野生型基因,经点突变构建了 RDX 磷酸化与去磷酸化的质粒,成功构建了 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 的真核表达载体并将其分别转染 HepG2 细胞,建立了 pcDNA3.1-RDX WT、pcDNA3.1-RDX T564D、pcDNA3.1-RDX T564A 稳转细胞株,通过蛋白免疫印迹对 p-Thr564-RDX 及 RDX 进行鉴定并研究了其与 Bsep 的关系,初步确定了 RDX 的磷酸化能增强 HepG2 细胞膜上 Bsep 的表达,为后续实验研究 RDX 在胆汁淤积时的作用和功能奠定了基础。

参考文献:

[1] Stieger B, Meier Y, Meier P J. The bile salt export pump[J]. Pflugers Arch, 2007, 453(5): 611 - 620.

[2] Soroka C J, Boyer J L. Biosythesis and trafficking of the bile salt export pump, Bsep: Therapeutic implications of Bsep mutations [J]. Mol Aspects Med, 2013, pii: S0098-2997(13)00034-4. [Epub ahead of print].

[3] Adada M, Canals D, Hannun Y A, *et al*. Sphingolipid regulation of ezrin, radixin, and moesin proteins family: Implications for cell dynamics[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(5): 727 - 737.

[4] Kubitz R, Droge C, Stindt J, et at. The bile salt export pump (Bsep) in health and disease[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012, 36(6): 536 - 553.

[5] 白阳, 冯义朝. Bsep 的调控及其突变与胆汁淤积性肝病的关系[J]. 医学信息,2013, 26(3): 326 - 327.

[6] Neisch A L, Fehon R G. Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling [J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(4): 377 - 382.

[7] Niggli V, Rossy J. Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(3): 344 - 349.

[8] Maniti O, Carvalho K, Picart C. Model membranes to shed light on the biochemical and physical properties of ezrin/radixin/moesin[J]. Biochimie, 2013, 95(1): 3 - 11.

[9] Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, *et al*. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes [J]. Nat Genet, 2002, 31(3): 320 - 325.

[10] Fukumoto K, Kikuchi S, Itoh N, *et al*. Effects of genetic backgrounds on hyperbilirubinemia in radixin-deficient mice due to different expression levels of Mrp3 [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1172(3): 298 - 306.

[11] Wang W, Soroka C J, Mennone A, *et al*. Radixin is required to maintain apical canalicular membrane structure and function in rat hepatocytes [J]. Gastroenterology, 2006, 131(3): 878 - 884.

[12] Kojima H, Nies A T, Konig J, *et al*. Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis [J]. J Hepatol, 2003, 39(5): 693 - 702.

[13] Song W, Liu C, Upadhyaya A. The pivotal position of the actin cytoskeleton in the initiation and regulation of B cell receptor activation [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838(2): 569 - 578.

[14] Parameswaran N, Gupta N. Re-defining ERM function in lymphocyte activation and migration [J]. Immunol Rev, 2013, 256(1): 63 - 79.

[15] 何孝崇, 柴进, 何宇, 等. 阻塞性肝胆汁淤积下转录因子 NR5A2 和 SP1、胆酸转运蛋白 MRP3 与肝脏损伤的相关性[J]. 第三军医大学学报, 2012, 33(24): 2474 - 2478.

[16] Muller N, Fischer H J, Tischner D, *et al*. Glucocorticoids induce effector T cell depolarization *via* ERM proteins, thereby impeding migration and APC conjugation [J]. J Immunol, 2013, 190(8): 4360 - 4370.

[17] Parameswaran N, Matsui K, Gupta N. Conformational switching in ezrin regulates morphological and cytoskeletal changes required for B cell chemotaxis[J]. J Immunol, 2011, 186(7): 4088 - 4097.

[18] Wang R, Liu L, Sheps J A, *et al*. Defective canalicular transport and toxicity of dietary ursodeoxycholic acid in the abcb11-/- mouse: transport and gene expression studies[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 305(4): G286 - G294.

[19] Suda J, Zhu L, Karvar S. Phosphorylation of radixin regulates cell polarity and Mrp-2 distribution in hepatocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 300(3): C416 - C424.

[20] Saeki J, Sekine S, Horie T. LPS-induced dissociation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and radixin is associated with Mrp2 selective internalization in rats[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(1): 178 - 184.

[21] Kojima H, Sakurai S, Yoshiji H, *et al*. The role of radixin in altered localization of canalicular conjugate export pump Mrp2 in cholestatic rat liver[J]. Hepatol Res, 2008, 38(2): 202 - 210.

[22] Rost D, Kloeters-Plachky P, Stiehl A. Retrieval of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 is associated with a rearrangement of actin filaments and radixin in bile salt-induced cholestasis[J]. Eur J Med Res, 2008, 13(7): 314 - 318.

[23] Fievet B, Louvard D, Arpin M. ERM proteins in epithelial cell organization and functions[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(5): 653 - 660.

[24] Koss M, Pfeiffer G R 2nd, Wang Y, *et al*. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. J Immunol, 2006 , 176(2): 1218 - 1227.

[25] Ren L, Hong S H, Cassavaugh J, *et al*. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC[J]. Oncogene, 2009, 28(6): 792 - 802.

[26] Lahoz A, Hall A. A tumor suppressor role for srGAP3 in mammary epithelial cells[J]. Oncogene, 2013, 32(40): 4854 - 4860.

(**收稿**:2013-11-06;**修回**:2013-12-23)

(编辑 王 红)