DOI:10.16016/j.1000-5404.201501154

论著

Ezrin上调HepG2细胞膜转运蛋白MRP2的表达

柴 进,封欣婵,张樑君,程 英,陈兰芳,胡 珍,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** 建立Ezrin基因表达缺失的HepG2细胞株,并研究其在胆汁淤积时对HepG2细胞胆汁酸转运蛋白多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2,MRP2)的影响。**方法** 不同位点干扰的Ezrin-shRNA质粒转染HepG2细胞,筛选Ezrin基因表达缺失的HepG2细胞。分别提取细胞总蛋白和膜蛋白,检测Ezrin基因表达缺失是否影响HepG2细胞胆汁酸转运蛋白MRP2的表达。**结果** RT-qPCR结果证实,Ezrin-shRNA#3质粒转染HepG2细胞后成功抑制了Ezrin基因表达,抑制率为70%。蛋白免疫印迹表明,Ezrin基因表达缺失后,HepG2细胞胆汁酸转运蛋白MRP2表达增高,但与对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。蛋白免疫共沉淀检测生物素化MRP2膜蛋白表明,Ezrin基因表达缺失后,无论是胞浆中还是细胞膜上,MRP2膜蛋白均表达增高($P<0.05$)。**结论** Ezrin基因表达缺失后能够上调HepG2细胞中MRP2膜蛋白,使其表达增高。

[关键词] Ezrin基因缺失;胆汁淤积;多药耐药相关蛋白2
[中图法分类号] R322.47;R394.2;R575.602 [文献标志码] A

Ezrin knockdown up-regulates MRP2 protein membrane expression in HepG2 cells

Chai Jin, Feng Xinchan, Zhang Liangjun, Cheng Ying, Chen Lanfang, Hu Zhen, Chen Wensheng (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of ezrin in the regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) by constructing ezrin knockdown HepG2 cell lines through stably transfected with Ezrin-shRNA plasmids. **Methods** Ezrin-shRNA plasmids targeting to silence the gene at different sites were used to transfect HepG2 cells. Then HepG2 cell lines stably transfected by Ezrin-shRNA plasmids were obtained by G418 selection. The knockdown efficiency was measured by real-time qPCR and Western blotting. The expression of membrane transport protein MRP2 was detected in both total membrane extraction and biotinylated cell surface proteins to explore the effect of ezrin knockdown. **Results** Real-time qPCR results revealed that the transfection of Ezrin-shRNA#3 plasmid reduced the ezrin expression, with an inhibitory rate of about 30% of control cells ($P<0.05$). Western blotting indicated that ezrin knockdown resulted in the increased expression of MRP2, but no such increase was seen in the control cell though without significant difference ($P>0.05$). Immunoprecipitation assay showed ezrin knockdown induced the expression of MRP2 protein increased in both total membrane extraction and biotinylated cell surface proteins ($P<0.05$). **Conclusion** Ezrin knockdown induces MRP2 protein membrane expression by post-translational regulation in HepG2 cells.

[**Key words**] ezrin; cholestasis; multidrug resistance-associated protein 2

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81370560, 81170430) and the National 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项目(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.20150703.1449.013.html(2015-07-03)

胆汁淤积是常见的临床综合征,其发病率和诊断率越来越高。多项研究表明,胆汁淤积的发生与肝细胞表面胆汁酸转运蛋白的异常表达密切相关[1-2]。这些转运蛋白包括:钠依赖牛磺胆酸共转运体(Na^+/taurocholate cotransporting polypeptide,NTCP)、阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptide,OATP)、胆盐输出泵(bile salt export pump,BSEP)、多药耐药蛋白2(multidrug resistance-2,MDR2)、多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2,MRP2)等。近年研究表明:MRP2在调控胆汁酸排泌方面发挥着重要的作用[3-4]。人类原发性胆小管硬化性胆汁淤积症、Dubin-Johnson综合征等疾病与其减少密切相关。动物实验发现,肝细胞胆管膜面的Mrp2表达降低可导致胆汁淤积[5]。目前,MRP2的表达调控机制并不清楚。已有研究表明,RXRα与法尼酸受体FXR、CAR和孕烷受体PXR形成异二聚体参与MRP2基因转录的调控[6-7]。

Ezrin(EZR)为细胞膜-细胞骨架连接蛋白,主要表达于上皮细胞,尤其在小肠、胃、肺、胰腺、肾脏、肝脏中高表达[8]。Ezrin主要由3个结构域组成:①氨基端高度保守的球形结构,即FERM区;②α螺旋区;③伸向胞浆的羧基端,其中有一个可与F-action相连接的高度保守的氨基酸序列,而Ezrin的磷酸化位点也位于此区,参与Ezrin蛋白的活化[9]。骨架蛋白EZR主要在肝细胞胆管膜面表达,其异常表达或分布异常将导致细胞正常生理功能的异常。近年研究表明,EZR即能参与细胞的生长和信号转导,有可接受胞外信号,使细胞骨架重排[10]。因此,我们建立了EZR表达缺失的HepG2细胞,并研究其表达缺失对肝细胞胆管膜面的胆汁酸转运蛋白MRP2的影响,旨在为临床治疗胆汁淤积提供新的线索。

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;X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagen、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自Roche公司;Streptavidin Agarose Resins、EZ-Link Sulfo-NSS-SS-Biotin购自Pierce Biotechnology公司;EZR、MRP2购自Epitomics公司;羊抗兔二抗购自Pierce Biotechnology公司;Ezrin-shRNA质粒由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 Ezrin-shRNA-HepG2稳转细胞株的建立 参考文献[11]的方法,转染Ezrin-shRNA#1、Ezrin-shRNA#2、Ezrin-shRNA#3及Control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=3:1。常规培养细胞24 h,更换新鲜的10% FBS-DMEM培养基并用1 000 μg/mL G418进行阳性筛选7 d后,挑选单克隆稳定转染细胞株,继续用500 μg/mL G418持续筛选3周,获得稳定转染细胞株,扩大培养。提取细胞RNA,筛选出能够有效抑制EZR基因表达的细胞株。

1.2.2 RT-qPCR 按TRIzol说明书提取细胞RNA。逆转录为cDNA后进行RT-qPCR扩增。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 μmol/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。引物序列见表1。

表1 PCR引物序列大小及长度

基因	引物序列(5′→3′)	长度(bp)
MRP2	上游:CTCACTTCAGCGAGACCCG 下游:CCAGCCAGTTCAGGGGTTT	191
EZR	上游:TTGTGGCTTGCTCTGTGCT 下游:AACACCGAACGACACACGA	261
GAPDH	上游:CCACGAAACTACCTTCAACTCC 下游:CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC	252

1.2.3 生物素化反应并提取蛋白 按EZ-Link Sulfo-NSS-SS-Biotin说明书进行操作。冰冷的PBS液清洗细胞后,6孔板每孔加入1 mL Biotin Solution,4 ℃反应1 h,使膜蛋白充分Biotin化,加入2.5 mL/孔的冰冷反应终止液洗涤2次。按照文献[11]的方法提取总膜蛋白,进行蛋白免疫印迹实验。

1.2.4 蛋白免疫印迹 按照文献[11]的方法提取细胞总蛋白,并进行SDS-PAGE电泳,上样量为20 μg/孔。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,一抗(EZR 1:20 000,Na^+-K^+-ATPase 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统计软件行 t 检验。

2 结果

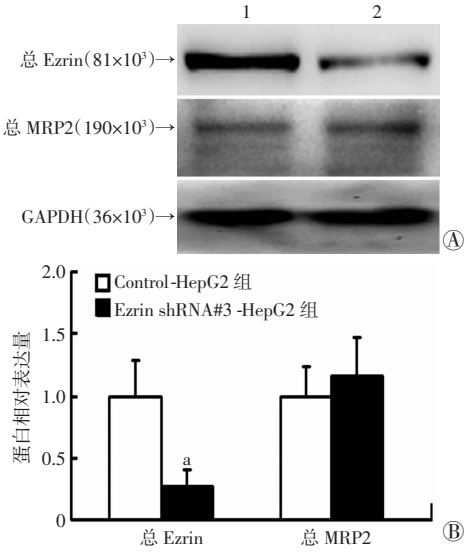
2.1 成功建立并筛选了EZR表达缺失的HepG2细胞稳转细胞株

将Ezrin-shRNA#1、Ezrin-shRNA#2、Ezrin-shRNA#

3、Ezrin-shRNA#4 及 control 质粒转染 HepG2 细胞后，筛选稳转细胞。提取各株细胞的 RNA，RT-qPCR 检测 EZR 基因的表达情况，结果表明 Ezrin-shRNA#3、Ezrin-shRNA#4 质粒能够有效抑制 HepG2 细胞 EZR 基因的表达（$P<0.01$），其中 Ezrin-shRNA#3 效果最优，抑制率达 70%，在后续实验中选择使用 Ezrin shRNA#3-HepG2。

2.2 EZR 表达缺失对 HepG2 细胞 MRP2 总蛋白的表达无明显影响

Ezrin shRNA#3-HepG2 的 EZR mRNA 表达缺失最显著，因此，选择提取 Ezrin shRNA#3-HepG2 细胞总蛋白，检测 EZR 表达缺失对 HepG2 细胞 MRP2 总蛋白的表达影响。蛋白免疫印迹检测结果显示，与对照组相比，Ezrin shRNA#3-HepG2 组细胞 MRP2 表达增高，但差异无统计学意义（图 1）。这提示 EZR 表达缺失对 HepG2 细胞 MRP2 总蛋白的表达无明显影响。

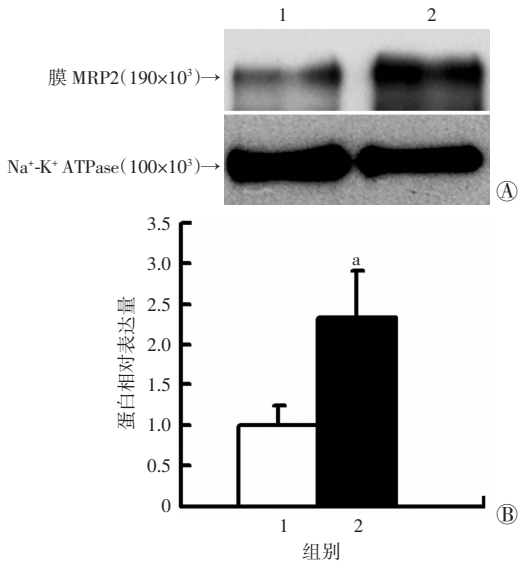


A：蛋白免疫印迹检测结果　1：Control-HepG2 组；2：Ezrin shRNA#3-HepG2 组；B：半定量分析结果　a：$P<0.01$，与 Contorl-HepG2 组比较

图 1　蛋白免疫印迹检测 MRP2 总蛋白在 Ezrin shRNA#3-HepG2 中的表达

2.3 EZR 表达缺失上调 HepG2 细胞 MRP2 总膜蛋白的表达

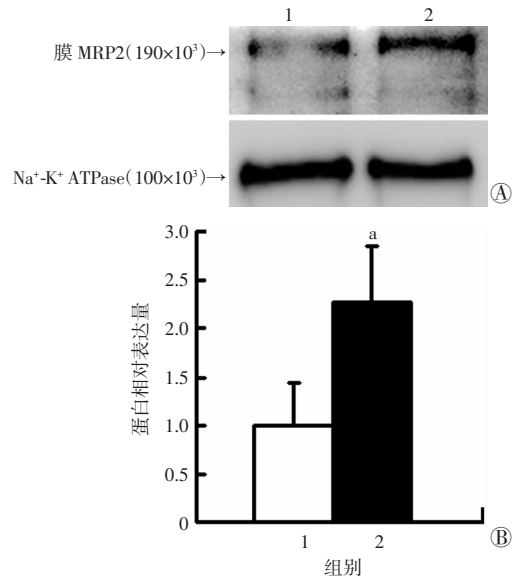
为进一步明确胆汁淤积时 EZR 蛋白与 MRP2 蛋白的关系，我们提取生物素化的 Ezrin-shRNA#3-HepG2 和 Control-HepG2 细胞的总膜蛋白，检测 EZR 表达缺失与 MRP2 膜蛋白的关系。结果表明：与 Control-HepG2 细胞相比，Ezrin-shRNA#3-HepG2 细胞膜表面的 MRP2 表达量明显增高（$P<0.01$，图 2），而胞浆中的 MRP2 膜蛋白的表达量也明显增高（$P<0.01$，图 3）。表明 EZR 表达缺失能够明显上调 HepG2 细胞 MRP2 总膜蛋白的表达。



1：Control-HepG2 组；2：Ezrin shRNA#3-HepG2 组

A：蛋白免疫印迹检测结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.01$，与 Contorl-HepG2 组比较

图 2　蛋白免疫印迹检测 MRP2 膜蛋白在 Ezrin shRNA#3-HepG2 细胞胞膜上的表达



1：control-HepG2 组；2：Ezrin shRNA#3-HepG2 组

A：蛋白免疫印迹检测结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.01$，与 Contorl-HepG2 组比较

图 3　蛋白免疫印迹检测 MRP2 膜蛋白在 Ezrin shRNA#3-HepG2 细胞胞浆中的表达

3　讨论

MRP2 为一种 ATP 依赖的胆酸转运蛋白，分布于肝细胞胆管膜面，主要以各种胆盐以及利福平、普伐他汀等药物为底物，是维持肝脏正常生理功能的重要蛋白[12]。胆汁淤积时，MRP2 表达降低后，机体能够相

应地作出适应性反应以代偿 MRP2 的功能,但是这种代偿功能并不能完全取代 MRP2 的作用保护肝脏处于正常状态。因此,胆酸转运蛋白 MRP2 在维持正常的肝细胞功能方面发挥着极其重要的作用。动物模型表明,Mrp2 在胆汁淤积发生时其肝脏 mRNA、总蛋白水平并未发生明显变化,而肝细胞胆管膜面 Mrp2 的定位表达却显著减少[13]。这可能提示胆汁淤积下肝细胞胆管面膜 MRP2 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 EZR、RDX 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。EZR 又称艾兹蛋白,主要分布在极性化细胞的表面,参与细胞形态维持、运动、黏附、信号传递和生存等多种功能。最近的研究表明,ERM 家族具有调节肝细胞表面胆汁酸转运蛋白的作用[14]。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 EZR 蛋白表达下降或分布异常。在肠上皮 Caco-2 细胞中,骨架蛋白 Ezrin 还可与 Mrp2、F-action 相互作用[15]。我们的前期研究表明[11],该家族的另一成员 RDX 影响胆酸转运蛋白 BSEP 在 HepG2 细胞的定位表达。MRP2 属于功能性蛋白,本身不具备运动转移功能。而文献[11]与本研究结果均表明:胆汁淤积时,MRP2 在肝细胞胆管膜面的定位表达减少。我们前期关于 RDX 的研究中并未发现其与 MRP2 的定位表达具有相关性。因此,我们猜测 ERM 家族另一锚定蛋白 EZR 可能与 MRP2 的定位表达有关。

为了验证该假设,本研究构建了 Ezrin 表达缺失的 HepG2 稳转细胞,对 MRP2 总蛋白进行检测,明确了 Ezrin 表达缺失对 MRP2 总蛋白无影响,从而进一步验证了我们关于 MRP2 转录后调控的推测。而通过生物素化反应检测 MRP2 膜蛋白的表达变化,则初步确认了在 HepG2 细胞中,Ezrin 表达缺失后,MRP2 膜蛋白表达增高。Ezrin 为锚定蛋白,主要是通过与其他蛋白形成复合物,促进蛋白在细胞的定位表达,我们怀疑 Ezrin 表达缺失后,原定位于细胞膜的 MRP2 蛋白从胞膜解离进入胞浆,从而导致胞浆中 MRP2 膜蛋白表达增高。因此,该研究为后续研究胆汁淤积时 MRP2 的转录后调控机制提供了可能的方向。

参考文献:

[1] Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperubinemia[J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42(4): 561-565.

[2] Gossard A A, Talwalkar J A. Cholestatic liver disease[J]. Med Clin North Am, 2014, 98(1): 73-85.

[3] Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisma of cholestasis[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 565-580.

[4] Sekine S, Yano K, Saeki J, *et al*. Oxidative stress is a triggering factor for LPS-induced Mrp2 internalization in the cryopreserved rat and human liver slices[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 399(2): 279-285.

[5] Anakk S, Watanabe M, Ochsner S A, *et al*. Combined deletion of Fxr and Shp in mice induces Cyp17a1 and results in juvenile onset cholestasis[J]. J Clin Invest, 2011, 121(1): 86-95.

[6] 吴晓平, 张保新, 张晓娟, 等. 多耐药相关蛋白 MRP2 与核受体 RXRα、RARα 在人阻塞性胆汁淤积肝组织中的表达变化[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(8): 769-770.

[7] Chen W, Cai S Y, Xu S, *et al*. Nuclear receptor RXRalpha: RARalpha are repressors for human MRP3 expression[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(5): G1221-G1227.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 封欣婵, 柴进, 程英, 等. Radixin 定点突变过表达对 HepG2 细胞膜转运蛋白 Bsep 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(10): 1002-1007.

[12] 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.

[13] Rost D, Kloeters-Plachky P, Stichl 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.

[14] Nakano T, Sekine S, Ito K, *et al*. Correlation between apical localization of Abcc2/Mrp2 and phosphorylation status of ezrin in rat intestine[J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(7): 1521-1527.

[15] Yang Q, Onuki R, Nakai C, *et al*. Ezrin and radixin both regulate the apical membrane localization of ABCC2 (MRP2) in human intestinal epithelial Caco-2 cells[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(16): 3517-3525.

(**收稿**:2015-01-20;**修回**:2015-03-13)

(编辑 王 红)