

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.17.002

硒结合蛋白 2 的表达及与 FKBP38 蛋白的相互作用*

唐敏怡¹ 莫广财¹ 区家铭¹ 王 帅¹ 吴晓丽¹ 赵子建² 李芳红^{1Δ}

(1 广东工业大学生物医药学院 广东 广州 510006; 2 南方医科大学顺德医院 广东 佛山 528300)

摘要 目的: 构建重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒并探讨 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白的相互作用。**方法:** 首先以小鼠肝脏总 RNA 为模板, 根据小鼠 SELENBP2 基因 CDS 序列设计的引物通过 RT-PCR 扩增 SELENBP2 蛋白编码序列, 通过基因工程技术进行限制性核酸内切酶酶切、与 pcDNA3.1-6×HIS 载体连接并转化入 JM108 感受态大肠杆菌扩增, 挑选阳性单克隆大肠杆菌并提取质粒后得到重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒。重组质粒经测序分析鉴定后, 使用 Lipofectamine 3000 转染试剂转染至小鼠肝细胞 AML12 细胞中培养 30 h, 采用 Western blot 法检测蛋白表达情况。使用 AlphaFold-Multimer 预测 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白相互作用的可能性及可能相互作用的结构域。最后, 将重组质粒转染入过表达 FKBP38 蛋白的 AML12 细胞中, 培养 30 h 后收集细胞蛋白样品, 进行免疫共沉淀实验。**结果:** 重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒测序结果显示插入的 SELENBP2 蛋白编码序列与 GenBank 中 SELENBP2 基因 CDS 序列相同, 且转染重组质粒后, AML12 细胞能有效表达 SELENBP2-HIS 融合蛋白。AlphaFold-Multimer 结果显示 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白相互作用的可能性较高, 且作用于 FKBP38 蛋白的 TPR 结构域。免疫沉淀实验结果显示, 在 AML12 细胞中, SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白存在相互作用。**结论:** 重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒构建成功并能在 AML12 细胞中正确表达, 为进一步研究 SELENBP2 蛋白的功能奠定了基础。SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白相互作用, 为 SELENBP2 蛋白的研究进一步拓宽了思路, 为深入研究 SELENBP2 蛋白在肝脏中的生物学功能提供了新方向。

关键词: SELENBP2 蛋白; 重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒; FKBP38 蛋白; 免疫共沉淀; 肝脏

中图分类号: R-33; Q789; Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2024)17-3205-06

Expression of Selenium Binding Protein 2 and Their Interaction with FKBP38 Protein*

TANG Min-yi¹, MO Guang-cai¹, OU Jia-ming¹, WANG Shuai¹, WU Xiao-li¹, ZHAO Zi-jian², LI Fang-hong^{1Δ}

(1 The School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong, 510006, China; 2 Shunde Hospital of Southern Medical University, Southern Medical University, Foshan, Guangdong, 528300, China)

ABSTRACT Objective: This study aims to construct pcDNA3.1-6 × HIS-mSELENBP2 recombinant plasmid and explore the interaction between SELENBP2 and FKBP38 proteins. **Methods:** Firstly, total RNA from mouse liver tissue was isolated as a template and designed the primers according to the CDS sequence of the mouse SELENBP2 gene to synthesize the SELENBP2 protein coding sequence through RT-PCR. The SELENBP2 gene sequence was recycled by restriction endonuclease and connected by ligase with pcDNA3.1-6 × HIS plasmid vector, and then transformed into a JM108 competent Escherichia coli for amplification. After selecting positive monoclonal E. coli and extracting plasmids, the pcDNA3.1-6 × HIS-mSELENBP2 recombinant plasmid was obtained using genetic engineering technology. Then, after sequencing analysis and identification, the recombinant plasmid was transfected into AML12 cells using Lipofectamine 3000 transfection reagent and cultured for 30 h to detect protein expression using Western blot analysis. Using AlphaFold Multimer to predict the possibility of interaction between SELENBP2 and FKBP38 proteins, as well as the possible domains of interaction. Finally, the recombinant plasmid was transferred into AML12 cells which over expressed FKBP38 protein and after 30 h of cultivation, cell protein samples were collected for immunoprecipitation test. **Results:** The sequence analysis results of pcDNA3.1-6 × HIS-mSELENBP2 recombinant plasmid showed that the inserted SELENBP2 protein coding sequence was in accordance with the expected sequence as the CDS sequence of the mouse SELENBP2 gene in GenBank report. After transfection of pcDNA3.1-6 × HIS-mSELENBP2 recombinant plasmid into AML12 cells, the SELENBP2 HIS fusion protein can be effectively expressed. The results of AlphaFold Multimer showed that the possibility of interaction between SELENBP2 and FKBP38 proteins is high, and it acted on the TPR domain of FKBP38 protein. There is an interaction between the SELENBP2 protein and the FKBP38 protein in AML12 cells

* 基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2019B020201015)

作者简介: 唐敏怡(1997-), 女, 博士研究生, 研究方向: 非酒精性脂肪肝病, E-mail: minyit@outlook.com

Δ 通讯作者: 李芳红(1966-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤分子病理和个性化病理诊断以及代谢相关妇科疾病研究,

E-mail: fli@gdut.edu.cn

(收稿日期: 2024-03-17 接受日期: 2024-04-23)

according to the co-immunoprecipitation experiment. **Conclusions:** The pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 recombinant plasmid has been successfully constructed and can be correctly expressed in AML12 cells, laying the foundation for further research on the function of the SELENBP2 protein. The interaction between SELENBP2 and FKBP38 proteins further broadens the thinking of the study of SELENBP2 protein and provides a new direction for the further studying of the biological function of SELENBP2 protein in the liver.

Key words: SELENBP2 protein; Recombinant pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 plasmid; FKBP38 protein; Co-immunoprecipitation; Liver

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q789; Q503 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)17-3205-06

前言

硒结合蛋白 2 (Selenium binding protein 2, SELENBP2) 定位在小鼠 3 号染色体上, 分子量为 56 kDa, 在肝脏及肾脏中高表达, 且 SELENBP2 蛋白的表达丰度在雄性中高于雌性^[1-3]。乙酰氨基酚代谢物具有肝毒性, SELENBP2 是首个发现能与对乙酰氨基酚代谢物共价结合的特异性蛋白质, 但具体机制尚不明确^[4,5]。此外, 在健康小鼠肝脏与纤维化小鼠肝脏蛋白组学分析中发现, SELENBP2 蛋白的表达水平在纤维化小鼠肝脏显著下调, 表明 SELENBP2 蛋白可能与肝纤维化有关^[6]。FK506 结合蛋白 8 (FK506 binding protein 8, FKBP38) 是在多种真核生物中发现的高度保守的蛋白质。FKBP38 蛋白具有许多生理功能, 包括调节蛋白质的稳定性、调节线粒体功能和调控细胞凋亡等功能, 能有效抑制肝细胞脂质积累, 在细胞生长过程中起着重要的调控作用^[7-10]。

本文将利用基因工程技术构建重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒并将其转染到 AML12 细胞中, 从基因水平调控肝细胞中 SELENBP2 的表达, 验证肝细胞中的蛋白表达情况, 随后从 SELENBP2 蛋白和 FKBP38 蛋白相互作用的角度进行研究, 进一步为探讨 SELENBP2 蛋白在肝脏中的生物学功能研究提供有力的工具及新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞株 C57BL/6J 小鼠在广东药科大学 SPF 级实验动物中心饲养, 实验动物饲养设施合格证号为 SYXK(粤)2017-0125。本实验所用动物保护指南是由广东药科大学动物护理委员会所制定 (实验动物伦理号为 gdpulacspf 2017010)。AML12 小鼠正常肝细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 pcDNA3.1(-)-6×HIS-C 空载质粒购自丰晖生物 (BR743); Trizol (T9424)、PVDF 膜 (ISEQ00010) 和 ECL 发光液 (WBKLS0100) 购自美国 Sigma 公司; 质粒提取试剂盒 (K210007)、Lipofectamine 3000 转染试剂 (L3000015)、rabbit anti-FKBP38 抗体 (PA5-96573) 和交联磁珠式免疫沉淀试剂盒 (88805) 购自 Thermo 公司; RNA 逆转录试剂 (R223-01)、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (P505) 和 5 min Universal Ligation Mix (C311-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶 *Nhe* I (SE0974) 和 *Not* I (SE0594S) 购自 Sibenzyme 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (D2500) 购自 Omega 公司; JM108 感受态大肠杆菌 (DL1022) 购自上海维地生物技

术有限公司; rabbit anti-HIS 抗体 (12698)、anti-HIS-HRP 抗体 (12688) 和 Normal Rabbit IgG 抗体 (2729) 购自 CST 公司; goat anti-FKBP38 抗体 (AF3580) 购自 RD 公司。

1.1.3 仪器 Cyclor PCR 仪 (美国 Bio-Rad); 低温离心机 (美国 Thermo); Chemi Doc + XRS 化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad); -20 °C 冰箱 (中国美菱); qTOWER3G analytic (德国 Jena)。

1.2 方法

1.2.1 提取小鼠 SELENBP2 目的片段 使用 Trizol 法提取小鼠肝脏组织总 RNA^[11], 按照 RNA 逆转录试剂将 RNA 逆转录为 cDNA, 根据 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书对 SELENBP2 蛋白编码序列进行扩增实验。引物由作者在 GenBank 数据库中设计并由上海生工生物有限公司合成。使用以下引物对小鼠肝脏 SELENBP2 基因型扩增。上游引物: 5'-CTAGCTAGCGCCACCATGGCTACAAAATGCACAAAG-3', 下游引物: 5'-AAATATGCGCCGCTTGATCCAGATATCAGAACTGCAG-3'。

1.2.2 构建 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 真核表达质粒 用 *Nhe* I 和 *Not* I 在 37 °C 孵育 15 min 对 pcDNA3.1-6×HIS-C 质粒及纯化后的 mSELENBP2 目的片段进行 37 °C 酶切 1 h, 分别用 1% 和 2% 琼脂糖凝胶进行分离后使用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化。根据 5 min Universal Ligation Mix 说明书将酶切后的 pcDNA3.1-6×HIS 产物与 mSELENBP2 蛋白编码序列产物在 25 °C 孵育 5 min 进行连接。最后将连接产物直接转化至 JM108 感受态大肠杆菌中, 在不含氨苄青霉素的 LB 培养基中扩增后涂布于含氨苄青霉素的 TB 固体培养基平板中, 并置于 37 °C 培养箱中培养。随后挑取多个单克隆菌落在含氨苄青霉素的 LB 培养基中少量培养, 对菌液进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳, 观察片段大小以确定目的基因是否正确。上游引物: 5'-ATGGCTACAAAATGCACAAAG-3', 下游引物: 5'-TTGATCCAGATATCAGAACTGCAG-3'。

1.2.3 重组表达质粒的鉴定及提取 根据菌液 PCR 鉴定结果选择相应菌液, 委托上海生工生物有限公司使用 pcDNA3.1 通用引物对菌液中的质粒进行测序, 比对 NCBI 数据库中 mSELENBP2 蛋白编码序列观察重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒序列是否正确。随后, 将菌液置于含氨苄青霉素的 LB 培养基中大量扩增, 按照质粒提取试剂盒说明书提取菌液中的质粒, 溶于无菌 PBS 中, 检测浓度后于 -20 °C 保存。

1.2.4 质粒转染 将 AML12 细胞接种于 10 cm 培养皿中, 待细胞密度为 70 % 时, 根据 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书加入 20 μg 重组质粒进行瞬时转染, 在 37 °C、5 % CO₂ 的培养

箱中培养 30 h 后提取细胞中的蛋白质进行后续实验。

1.2.5 AlphaFold-Multimer 预测蛋白相互作用 在 uniprot 蛋白数据库中下载 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白的蛋白序列,使用 AlphaFold-Multimer 预测蛋白结构,并根据两个蛋白的结构利用同源蛋白质的信息和多序列比对其进行预测其相互作用的可能性,随后生成预测的复合物建模分数(Predicted template modeling, pTM)及预测的复合物界面分数(Interface pTM score, ipTM),并得到预测局部距离差异测试分数(Predicted local distance difference test, pLDDT)来评估蛋白相互作用的可能性^[2]。选出 ipTM+pTM 及 pLDDT 评分较高的预测相互作用结构,导入 pymol 中查看,分析相互作用区域,并得到相互作用结构图。

1.2.6 蛋白免疫共沉淀检测 根据交联磁珠式免疫沉淀试剂盒说明书提取转染质粒后 AML12 细胞中的蛋白质,并分别使用 HIS 兔抗抗体及 FKBP38 兔抗抗体对蛋白质进行免疫沉淀,收集沉淀下来的蛋白质。随后分别使用 FKBP38 羊抗抗体及 anti-HIS-HRP 抗体进行蛋白质免疫印迹检测。

2 结果

2.1 扩增和鉴定 SELENBP2 基因

提取 C57BL6/J 小鼠肝脏总 RNA 为模板,通过逆转录聚合酶链式反应扩增小鼠 SELENBP2 的 CDS 基因序列,预测产物为 1447 bp 的片段,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测发现所得条带与预测条带大小相符(图 1)。将 RT-PCR 产物进行测序鉴定,测序比对结果证明序列正确。提取凝胶中的基因序列,用于后续实验。

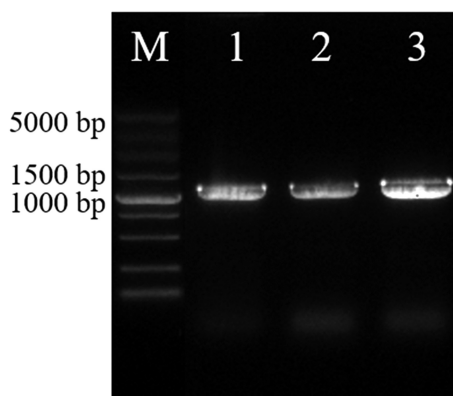


图 1 SELENBP2 的 RT-PCR 扩增结果;M:Marker (DL5000);1-3: SELENBP2

Fig. 1 The RT-PCR amplification products of SENERBP2: M: Marker (DL5000); 1-3: SELENBP2

2.2 构建重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒

pcDNA3.1-6xHIS 空质粒和 SELENBP2 蛋白编码序列经 *Nhe* I 和 *Not* I 酶切后,通过琼脂糖凝胶电泳分离所需的片段(图 2),并采用琼脂糖凝胶回收获取暴露粘性末端的质粒及目的片段后,经过连接、转化,通过氨苄青霉素抗性基因筛选多个单克隆菌落,提取单克隆菌大肠杆菌中的质粒即为重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒。

2.3 鉴定重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒

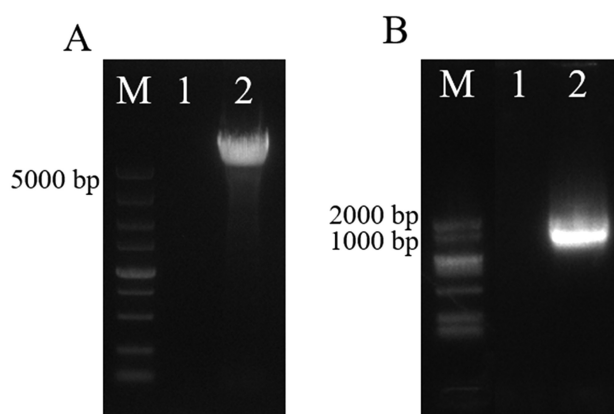


图 2 pcDNA3.1-6xHIS 载体质粒与 SELENBP2 蛋白编码序列酶切结果:A:M:Marker (DL5000);1:灭菌双蒸水对照;2:pcDNA3.1-6xHIS 载体质粒为模板;B:M:Marker (DL2000);1:灭菌双蒸水对照;2:SELENBP2 蛋白编码序列为模板

Fig. 2 Enzyme digestion diagram of pcDNA3.1-6xHIS plasmid vector and SELENBP2 protein coding sequence: A: M: Marker (DL5000); 1: Steam sterilization water control; 2: pcDNA3.1-6xHIS plasmid vector as a template; B: M: Marker (DL2000); 1: Steam sterilization water control; 2: SELENBP2 protein coding sequence as a template

将上述提取的多个质粒使用上述自行设计的 SELENBP2 引物进行聚合酶链式反应,琼脂糖凝胶结果显示重组质粒中含有与具有 SELENBP2 蛋白编码序列大小相符的产物,提示所提取的重组质粒已连接 SELENBP2 蛋白编码序列(图 3)。随后将重组质粒委托上海生工生物有限公司使用 pcDNA3.1 通用引物进行测序,将测序结果与目的重组质粒进行比对显示序列无误,证明重组质粒构建成功。

2.4 检测 SELENBP2 蛋白的表达

将重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒通过脂质转染试剂转染至 AML12 细胞 30 h,使细胞表达 SELENBP2-HIS 融合蛋白,提取细胞中的蛋白质,检测 HIS 标签蛋白的表达以验

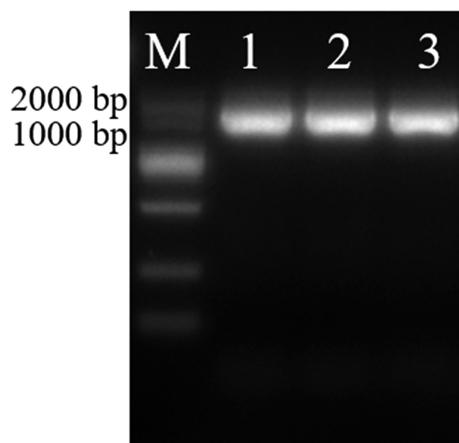


图 3 重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒中 SELENBP2 基因的 PCR 扩增结果;M:Marker (DL2000); 1-3:pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 为模板

Fig. 3 The PCR amplification products of SENERBP2 in pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 recombinant plasmid: M: Marker (DL2000); 1-3: pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 as a template

证 SELENBP2 蛋白的表达情况。如图 4 所示, 转染重组质粒后, 在 55 kDa 左右可见一条特异性条带, 而未转染重组质粒的细胞在该位置无 HIS 标签蛋白的表达, 证明重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒能在 AML12 细胞过表达 SELENBP2 蛋白。

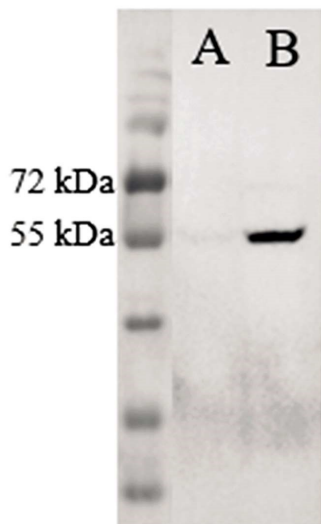


图 4 AML12 细胞中 HIS 蛋白表达水平: A: 未转染质粒的 AML12 细胞; B: 转染重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒的 AML12 细胞
Fig. 4 The expression of HIS protein in AML12 cells: A: AML12 cells with no transfecting plasmid; B: AML12 cells with pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 recombinant plasmid

2.5 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白相互作用

为了探讨 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白是否存在相互作用, 我们使用 AlphaFold-Multimer 评估 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白相互作用的可能性, 发现预测 SELENBP2-FKBP38 的最佳 ipTM+pTM 评分为 0.80, 在相互作用界面也具有较高的 pIDDT 评分为 81.6, 说明 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白相互作用的可能性极大, 且如图 5 A 所示, 预测的结合区域在 FKBP38 蛋白的 TPR 序列结构域。大量研究表明 TPR 结构域可与其他蛋白质形成多聚体复合物, 如已被

证明与分子伴侣 Hsp90、抗凋亡蛋白 Bcl-2 等相互作用^[13]。随后利用前期构建的 LV-mFKBP38 转染 AML12 细胞, 利用嘌呤霉素筛选能过表达 FKBP38 蛋白的 AML12 细胞, 待其稳定生长后瞬时转染重组 pcDNA3.1-6×HIS-mSELENBP2 质粒 30 h, 使细胞同时过表达 FKBP38 蛋白及 SELENBP2 蛋白。收取细胞中的蛋白, 分为 3 份, 分别使用 Rabbit IgG 抗体、HIS 抗体、FKBP38 抗体进行免疫沉淀实验。如图 5 B 所示, 蛋白免疫沉淀结果发现, 在 HIS 蛋白的免疫沉淀产物中能检测到 FKBP38 蛋白的表达, 而蛋白大小与 FKBP38 蛋白大小一致, 在 FKBP38 蛋白的免疫沉淀产物中能检测到 SELENBP2-HIS 蛋白的表达, 而蛋白大小与 SELENBP2-HIS 蛋白大小一致, 且 Rabbit IgG 蛋白的免疫沉淀产物中没有 HIS 蛋白与 FKBP38 蛋白的表达(可排除抗体对免疫沉淀产物的影响), 说明在 AML12 细胞中, SELENBP2 蛋白能与 FKBP38 蛋白相互作用。

3 讨论

SELENBP2 是首个发现能与对乙酰氨基酚活性代谢物结合的蛋白质^[4,14]。对乙酰氨基酚是一种应用广泛的镇痛解热药, 对乙酰氨基酚会被细胞色素 P450 代谢为一种与蛋白质共价结合的活性代谢物, 过量服用这种药物会导致严重的肝脏和肾脏损伤, 甚至死亡^[15,16]。研究表明, 硒是一种必需的微量元素, 对体内的正常生长和发育起着至关重要的作用, 主要发挥调控细胞氧化还原稳态、调控信号级联调控反应及抗癌等作用, 而硒则以硒半胱氨酸的形式在硒结合蛋白中介导其功能^[17]。Jerry Lanfear 等人发现, SELENBP2 的 mRNA 水平在肝细胞系中趋于下调, 但在体内二乙基亚硝胺诱导的肝肿瘤中保持高水平, 猜测 SELENBP2 这种蛋白质在介导硒的抗癌作用和解毒机制方面起重要作用, 然而, 机制尚未明确^[18]。SELENBP2 蛋白可能通过氧化还原调节硒的状态影响对乙酰氨基酚诱导的肝毒性和脂质过氧化作用^[19]。许多哺乳动物对对乙酰氨基酚产生肝毒性的易感性存在性别差异, 雄性通常比雌性更容易产生对乙酰氨基酚肝毒性^[20]。Jens Mattow 等人采用双向凝胶电泳和基质辅助激光解吸质谱相结合的方法对家鼠和小家鼠两个亚种雌雄小鼠的肝脏样本进行了研究, 发现作为小鼠肝细胞质中乙酰氨基酚活性代谢物的主要结合蛋白, SELENBP2 蛋白在雄性小鼠

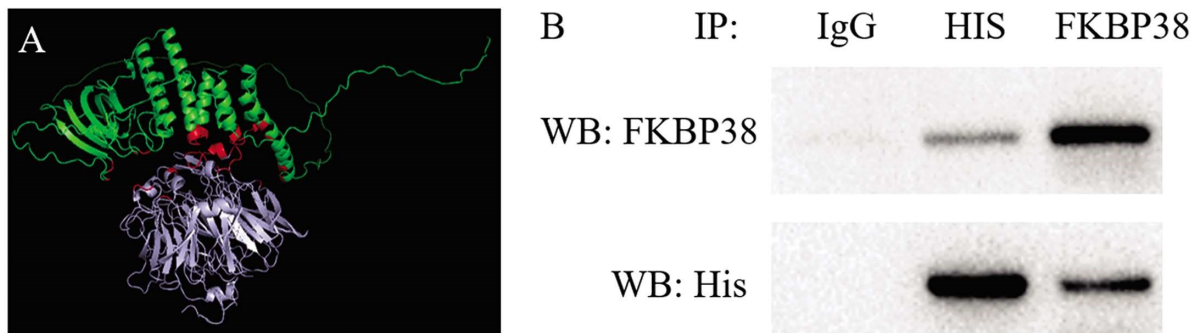


图 5 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白相互作用: A: SELENBP2-FKBP38 复合物的 AlphaFold-Multimer 预测结构: 绿色区域为 FKBP38 蛋白、紫色区域为 SELENBP2 蛋白、红色区域为预测结合区域; B: Western blot 法检测 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白的内源性相互作用
Fig. 5 Interaction between SELENBP2 and FKBP38 proteins: A: Best structures predicted by AlphaFold-Multimer for SELENBP2 - FKBP38 complexes: the green area represents the FKBP38 protein, the purple area represents the SELENBP2 protein, and the red area represents the predicted binding site; B: Endogenous interaction of SELENBP2 protein with FKBP38 protein using Western blot

中的表达量明显高于雌性小鼠,并且这种差异反映也在 mRNA 水平上,提示 SELENBP2 蛋白表达水平的差异可能在对乙酰氨基酚产生肝毒性的性别差异易感性中发挥了作用^[9]。对喂养正常饮食或高脂肪富集的动脉粥样硬化饮食 8 周后动脉粥样硬化易感性品系 C57BL/6J 小鼠和动脉粥样硬化抗性品系 C3H/HeJ 小鼠的肝脏蛋白质组学进行分析,发现 SELENBP2 蛋白在 C57BL/6J 小鼠喂养高脂肪富集的动脉粥样硬化饮食后表达下降,而在 C3H/HeJ 小鼠中无变化,说明肝脏 SELENBP2 蛋白的功能在动脉粥样硬化发展过程中发挥着重要作用^[21]。此外,使用蛋白质组学方法分析用 Wy-14,643 处理和酰基辅酶 A 氧化酶基因敲除小鼠(均能激活过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)的肝脏蛋白,评估 PPAR α 激活后肝脏中基因表达模式的改变,发现在 PPAR α 激活后的小鼠肝脏中,SELENBP2 蛋白的表达水平较 PPAR α 激活前显著降低,而 PPAR α 在诱导细胞特异性多效性反应中很重要,包括调节肝脏脂肪酸代谢及肝肿瘤的发生等过程^[22]。尽管在这些蛋白质组学研究提示我们 SELENBP2 蛋白的表达水平在调节肝脏脂肪酸代谢及肝肿瘤的发生等过程中发挥着重要作用,但其确切生物学功能尚不清楚。我们利用基因工程技术构建重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒,使其在 AML12 细胞中表达,有助于进一步探讨 SELENBP2 蛋白在肝细胞中的生物学功能。

FKBP38 蛋白是一种参与免疫调节、蛋白折叠和转运功能的免疫亲和蛋白,可定位在线粒体膜上,促进 Bcl-2 和 Bcl-XL 等抗凋亡蛋白转移至线粒体,调控细胞凋亡^[23,24]。FKBP38 蛋白还能调控线粒体自噬,在维持线粒体功能和限制过量破坏性活性氧的产生方面起着重要的调控作用^[25,26]。此外,FKBP38 蛋白具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性,在内质膜细胞质侧的膜蛋白生物生成中起重要作用,而调节肽基脯氨酰顺反异构酶活性被认为是蛋白质折叠的限速步骤,能调节底物蛋白的活性^[7]。FKBP38 与内质网新生质膜离子通道相关,抑制细胞中 FKBP38 蛋白的表达增加了蛋白质合成,但抑制了囊性纤维化跨膜传导调节因子的翻译后折叠,导致内质膜中囊性纤维化跨膜传导调节因子的蛋白表达水平降低,而激活 FKBP38 的肽基脯氨酰顺反异构酶活性能促进囊性纤维化跨膜电导调节器蛋白翻译后折叠,对蛋白质的稳定性起着重要的调节作用^[27]。前期研究结果发现,FKBP38 蛋白能够通过调控肝脏脂肪酸氧化影响脂质积累,从而影响非酒精性脂肪肝病的发生和发展^[28]。非酒精性脂肪肝病是一种由肝脏异位脂肪过度堆积引起的慢性肝损伤和炎症状态,并伴有坏死性炎症反应甚至纤维化的疾病,最常见的慢性肝病之一^[29,30]。根据最近的一项荟萃分析,在 1990 年至 2019 年间,全球非酒精性脂肪肝病的患病率估计超过 30%^[31]。非酒精性脂肪肝的主要发病机制是由于新脂肪生成的增加及脂肪酸氧化的减少导致肝脏异位脂肪的过度积累,从而导致肝细胞应激、肝细胞凋亡和巨噬细胞浸润并进一步加剧脂质积累^[32,33]。由于其复杂的发病机理,导致目前没有被中国或者美国批准用于治疗非酒精性脂肪肝病的特效药物^[34,35]。有趣的是,在探讨肝细胞特异性缺失 FKBP38 蛋白加剧小鼠非酒精性脂肪肝病发生及发展的过程中,我们发现,FKBP38 蛋白

可能与 SELENBP2 蛋白发生相互作用,从而调控肝细胞脂质代谢。根据目前对 SELENBP2 蛋白的研究,我们猜测 SELENBP2 蛋白可能通过调节肝细胞氧化还原稳态及肝脏脂肪酸代谢从而调控非酒精性脂肪肝病的发生与发展。

本文选用能够在哺乳动物细胞内高水平瞬时表达多种外源基因蛋白的 pcDNA3.1-6xHIS 质粒为载体,通过基因工程技术,提取小鼠 SELENBP2 蛋白编码序列,成功构建了重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒,并使其在小鼠来源的肝细胞 AML12 细胞中成功过表达 SELENBP2-HIS 融合蛋白,为进一步探讨 SELENBP2 蛋白在肝细胞中的生物学功能提供一个有效的工具,为进一步研究 SELENBP2 蛋白的功能奠定了基础。另外,本文研究证明在 AML12 细胞中,FKBP38 蛋白与 SELENBP2 蛋白存在相互作用,这为进一步研究 SELENBP2 蛋白在肝细胞中的作用机制提供了新方向。后期将使用重组 pcDNA3.1-6xHIS-mSELENBP2 质粒进一步探讨 SELENBP2 在肝细胞脂质代谢中的生物学功能,及 SELENBP2 蛋白与 FKBP38 蛋白结合后对肝细胞脂质代谢的影响,以期为非酒精性脂肪肝病的治疗提供新的分子靶点。

参考文献(References)

- [1] NAVARRO C L, COHEN S D, KHAIRALLAH E A. Genes encoding the acetaminophen and selenium binding proteins map to mouse chromosome 3[J]. *Mamm Genome*, 1996, 7(12): 919-20.
- [2] KARIM S A, JOHNSON K J, GRIFFITHS I R, et al. A physical map of the genomic region on mouse chromosome 3 containing the hindshaker (hsh) mutation[J]. *Genomics*, 2004, 83(2): 225-30.
- [3] SONG Y, KUROSE A, LI R, et al. Ablation of Selenbp1 Alters Lipid Metabolism via the Ppar α Pathway in Mouse Kidney[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5334.
- [4] PUMFORD N R, MARTIN B M, HINSON J A. A metabolite of acetaminophen covalently binds to the 56 kDa selenium binding protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 182(3): 1348-55.
- [5] MATTOW J, DEMUTH I, HAESSELBARTH G, et al. Selenium binding protein 2, the major hepatic target for acetaminophen, shows sex differences in protein abundance[J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(8): 1683-91.
- [6] HENKEL C, RODERFELD M, WEISKIRCHEN R, et al. Identification of fibrosis-relevant proteins using DIGE (difference in gel electrophoresis) in different models of hepatic fibrosis [J]. *Z Gastroenterol*, 2005, 43(01): 23-9.
- [7] SIEKIERKA J J, HUNG S H, POE M, et al. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin [J]. *Nature*, 1989, 341(6244): 755-7.
- [8] SHIRANE M, NAKAYAMA K I. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(1): 28-37.
- [9] ZHANG J, YIN Y, WANG J, et al. Prohibitin regulates mTOR pathway via interaction with FKBP8[J]. *Front Med*, 2021, 15(3): 448-59.
- [10] CHOI M S, MIN S H, JUNG H, et al. The essential role of FKBP38 in regulating phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) protein stability[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(2): 305-9.

- [11] RIO D C, ARES M, JR., HANNON G J, et al. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent)[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2010, 2010 (6): pdb.prot5439.
- [12] HOMMA F, HUANG J, VAN DER HOORN R A L. AlphaFold-Multimer predicts cross-kingdom interactions at the plant-pathogen interface[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6040.
- [13] CHOI B H, YOON H S. FKBP38-Bcl-2 interaction: a novel link to chemoresistance[J]. Curr Opin Pharmacol, 2011, 11(4): 354-9.
- [14] CHO S, YANG X, WON K J, et al. Phenylpropionic acid produced by gut microbiota alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2231590.
- [15] WATSON W A, LITOVITZ T L, KLEIN-SCHWARTZ W, et al. 2003 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System[J]. Am J Emerg Med, 2004, 22(5): 335-404.
- [16] ZENG Y, WU R, WANG F, et al. Liberation of daidzein by gut microbial β -galactosidase suppresses acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice[J]. Cell Host Microbe, 2023, 31(5): 766-80.e7.
- [17] KRYUKOV G V, CASTELLANO S, NOVOSELOV S V, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes [J]. Science, 2003, 300(5624): 1439-43.
- [18] LANFEAR J, FLEMING J, WALKER M, et al. Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 1993, 14(3): 335-40.
- [19] SCHNELL R C, PARK K S, DAVIES M H, et al. Protective effects of selenium on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1988, 95(1): 1-11.
- [20] TARLOFF J B, KHAIRALLAH E A, COHEN S D, et al. Sex- and age-dependent acetaminophen hepato- and nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats: role of tissue accumulation, nonprotein sulfhydryl depletion, and covalent binding[J]. Fundam Appl Toxicol, 1996, 30(1): 13-22.
- [21] PARK J Y, SEONG J K, PAIK Y K. Proteomic analysis of diet induced hypercholesterolemic mice[J]. Proteomics, 2004, 4(2): 514-23.
- [22] CHU R, LIM H, BRUMFIELD L, et al. Protein Profiling of Mouse Livers with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Activation [J]. Mol Cell Biol, 2023, 24(14): 6288-97.
- [23] EDLICH F, ERDMANN F, JARCZOWSKI F, et al. The Bcl-2 regulator FKBP38-calmodulin- Ca^{2+} is inhibited by Hsp90 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(21): 15341-8.
- [24] MISAKA T, MURAKAWA T, NISHIDA K, et al. FKBP8 protects the heart from hemodynamic stress by preventing the accumulation of misfolded proteins and endoplasmic reticulum-associated apoptosis in mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 114: 93-104.
- [25] SEUNG-MIN YOO, SHUN-ICHI YAMASHITA, HYUNJOO KIM, et al. FKBP8 LIRL-dependent mitochondrial fragmentation facilitates mitophagy under stress conditions [J]. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2020, 34: 2944--57.
- [26] BHUJABAL Z, BIRGISDOTTIR A B, SJOTTEM E, et al. FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy [J]. EMBO Rep, 2017, 18(6): 947-61.
- [27] BANASAVADI-SIDDEGOWDA Y K, MAI J, FAN Y, et al. FKBP38 peptidylprolyl isomerase promotes the folding of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2011, 286(50): 43071-80.
- [28] 唐敏怡, 王帅, 邢朝凤, 等. FKBP38 基因的表达对小鼠非酒精性脂肪肝发生和发展的影响[J]. 中国药理学报, 2022, 38(04): 518-24.
- [29] POWELL E E, WONG V W-S, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. The Lancet, 2021, 397(10290): 2212-24.
- [30] NASSIR F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers [J]. Biomolecules, 2022, 12(6).
- [31] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, PAIK J M, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review [J]. Hepatology, 2023, 77: 1335-47.
- [32] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908-22.
- [33] CHEN S, LU Z, JIA H, et al. Hepatocyte-specific Mas activation enhances lipophagy and fatty acid oxidation to protect against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice[J]. J Hepatol, 2023, 78 (3): 543-57.
- [34] HARVEY B E. NASH: regulatory considerations for clinical drug development and U.S. FDA approval [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(5): 1210-4.
- [35] TRAUNER M, FUCHS C D. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease[J]. Gut, 2022, 71(1): 194-209.