

CCC2 基因缺陷型酵母对中国人 Wilson 病 突变热点致病性的研究

丰岩清, 李洵桦, 国宁, 梁秀龄, 黄帆, 王莹, 陈曦

(中山大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】应用 CCC2 基因缺陷型酵母研究中国人 Wilson 病 (Wilson disease, WD) 突变热点 Arg778Leu 的致病性, 在蛋白水平上探讨中国人 Wilson 病的发病机制。【方法】应用 RT-PCR 和 TOPO TA 克隆技术分段克隆 ATP7B 的全长 cDNA, USE 定点诱变技术制备突变体, 应用酵母功能互补分析的方法研究 Arg778Leu 的致病性。【结果】本研究应用 USE 定点诱变技术成功制备了 ATP7B 的 Arg778Leu 突变体, 在 CCC2 缺陷型酵母内表达人的野生型 ATP7B 可以弥补酵母内 CCC2 蛋白的运铜功能, 使 CCC2 缺陷型酵母在铜、铁及亮氨酸缺陷型培养基上生长良好; 对突变体的研究表明 Arg778Leu 只能部分代偿 CCC2 蛋白的运铜功能。【结论】本试验证明 CCC2 基因缺陷型酵母是研究人 ATP7B 的一种良好的细胞模型, 证明了中国人 WD 的常见突变 Arg778Leu 是一种致病性的突变。

关键词: Wilson 病; 定点诱变; CCC2 缺陷型酵母

中图分类号: R742.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0541-04

Study on Pathogenesis of Chinese Hot-Spot Mutation in Wilson Disease with CCC2 Gene Destructed Yeast Cells

FENG Yan-qing, LI Xun-hua, GUO Ning, LIANG Xiu-ling, HUANG Fan, WANG Ying, CHEN Xi
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To study the pathogenesis of Chinese WD hot-spot mutation-Arg778Leu, and to explore the molecular mechanism of Wilson disease at protein level.【Methods】To clone the full length of WD cDNA with RT-PCR and TOPO-TA clone techniques, using this as a template we prepared the Arg778Leu with USE site-directed mutagenesis technique. We used the functional complementation assay, expressed the normal and mutated ATP7B in CCC2 yeasts and studied the function of Arg778Leu.【Results】We successfully cloned the full-length WD cDNA, and constructed ATP7B mutants-Arg778Leu which was the hot-spot mutations of ATP7B in Chinese patients. CCC2 destructed yeast grew well in the SD medium lacking copper, iron and leucine under the condition that normal ATP7B was expressed in the yeasts, but grew slowly in the same medium with Arg778Leu mutant protein expression.【Conclusion】Our experiment confirms that CCC2 yeast is a quite good model to analyze the function of ATP7B, normal ATP7B can completely complement the function of Ccc2p to deliver copper. The complementation assay shows Arg778Leu can only partly complement the function of Ccc2 protein, demonstrating the mutation is disease-causing.

Key words: Wilson disease; site-directed mutation; CCC2 destructed yeast

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(5):541- 544.578]

Wilson病(Wilson disease, WD)是一种常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病, 临床特点是好发于青少年、肝硬化、基底节变性、角膜 K-F 环、肾功能损害等^[1]。自 1993 年 WD 基因得到克隆以来, 世界许多国家都对 WD 病人外显子突变进行了研究,

目前国际上已报道了 200 余种突变类型。已经证明 His1069Gln 突变为欧洲患者的高频突变点; 而 Arg778Leu 是亚洲人的突变热点, 在我国 Arg778Leu 突变占患者总数的 28.8%^[2]。因此对 Arg778Leu 进行致病机制和致病性方面的研究具

收稿日期: 2004-12-09

基金项目: 广东省自然科学基金(31694 和 21894)

作者简介: 丰岩清(1970-), 男, 山东聊城人, 博士, 讲师; 梁秀龄, 通信作者, E-mail:fyqgz@126.com

有重要的意义。本研究的重点在于应用基因缺陷型酵母建立一种对 Wilson 病基因突变能够进行功能分析的系统,以期对所发现的众多的突变进行功能分析,鉴别是正常的多态还是引起疾病的突变;并对 Arg778Leu 的致病性进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验菌株和质粒

酵母菌株 YPH252(MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-1, his3-200, leu2-1) 以及该菌 CCC2 基因遭到破坏的突变株均由美国 Daniel 教授提供,酵母表达质粒 pMA91 由中山大学生命科学院罗进贤教授馈赠。

1.2 全长 ATP7B cDNA 的合成

将新鲜的肝脏组织切成米粒大小,按 Trizol 的说明提取总 RNA。RT-PCR 采用两步法进行,以 Oligo dT 为引物合成第一链。根据全长 ATP7B 的限制酶切图谱,WD 正常 cDNA 在 2153 位含有单一的 Stu 酶切位点,因此可以将 ATP7B 分为 2 段合成。以第一链为模板,应用 IVITROGEN 公司的 Plantum Tag High Fidelity 进行 PCR 扩增,反应产物切胶回收、纯化,扩增的两个片段分别命名为 WD1 和 WD2。然后进行克隆片段的 TOPO TA 克隆,形成 pCR2.1-WD1 和 pCR2.1-WD2,酶切鉴定。将 WD 基因 2 个片段进行酶切、连接,克隆到 PUC19 上形成 PUC19-ATP7B,全长测序鉴定。

1.3 ATP7B 突变体的制备

采用 CLONTECH 的 USE 技术进行 778 位点的定点诱变^[3],诱变以 pUC19-ATP7B 为模板进行,我们设计的选择引物是突变掉 PUC19 质粒所固有的 Nde 酶切位点。778 位诱变引物的设计:5'-GCCCTGGGCCTGTGGCTG-3';选择引物:5'-GAGTGCACCATG GCGGTGTGAAAT-3'。应用 T4 polynucleotide kinase 将诱变引物的 5' 进行磷酸化,制备 BMH71-18 感受态细胞,然后进行定点诱变,测序鉴定。

1.4 pMA91-ATP7B 重组质粒的构建

pMA91 酵母表达质粒只有单克隆酶切位点,无法进行定向克隆,因此 ATP7B 的两侧需加入 Bgl 酶切位点。引物的设计加入 Bgl :上游,5'-TATCAGATCTATGCTGAGCAGGAGAGA-3' 和下游,5'-ACTTAGATCTCTTGTGGTGAGT GGAGG-3'。以 PUC19-ATP7B 的重组质粒为模板扩增全长的 ATP7B cDNA,扩增产物纯化后用 CIAP 对 Bgl 酶切后的 pMA91 和 PCR 产物进行处理,以增加重

组质粒形成和筛选的效率。然后进行 pMA91 与 ATP7B 的连接,因 ATP7B 可按两个方向插入质粒中去,故需要选择方向正确的克隆,以保证阅读框架的正确。我们在鉴定该质粒的方向时采用双酶切片断分析法。利用 WD cDNA 阅读框架内第 1619 位的 XhoI 和酵母表达质粒上克隆位点后端的 Sal 两个酶切位点的存在,用两种酶进行酶切,根据酶切片断的大小来鉴定阅读框架的正确性。用 XhoI 和 Sal 双酶切质粒,两个片段相距近者则属于我们所需要的质粒(即大片段小,小片段大)。

1.5 pMA91 和 ATP7B 克隆方向的鉴定和 pMA91 表达质粒的改建

pMA91 是酵母高效多拷贝表达质粒^[4],为了在量上控制 pMA91 的表达,我们对其进行了改建。酵母质粒 2 μ 起始区的存在使其拷贝数在细胞中可以达到 20~50,并使其在有丝分裂中保持高度的分离忠实性。我们参考国外文献^[5],对 2 μ 起始区内的 2 个 EcoRI 的酶切位点的序列切除,并把其它两个片段进行连接。将野生型和突变型的 ATP7B 克隆到 pMA92 上,并进行方向鉴定。制备酵母感受态细胞,将不同的重组质粒分别转化到 CCC2 酵母中。

1.6 Western blot 检测

在缺乏亮氨酸、铜和铁的 SD 减培养基中加入 MES 缓冲液至终浓度为 50 mmol/L;转化的酵母接种于以上培养基中,30 震荡培养至对数中期。各取 25 mL 放入 50 mL 的离心管中,10 000 \times g 离心 5 min;把菌液倒掉,用 milli-Q 水冲洗两次,然后再用 800 μ L 混匀缓冲液冲洗 1 次。再在 200 μ L 的混匀缓冲液中重悬。转入 1.5 mL 的离心管中。每管加入玻璃微珠 100 μ g,剧烈震荡裂解细胞 5 min,10 000 \times g 离心 30 s 去除未破碎的细胞和细胞器。用 Bradford 方法对蛋白的含量进行检测,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后进行电转,将蛋白转移到 PVDF 膜上。分别加入一抗^[6]和二抗^[7]孵育、曝光、观察 X 线片上有无特异性条带。

1.8 酵母生长曲线的观察

将野生酵母和 3 种转化不同质粒的 CCC2 酵母(分别含有 pMA91-ATP7B, pMA92-ATP7B, pMA92-wd778) 分别接种于 5 mL 缺乏亮氨酸、铜和铁的 SD 减培养基(加入 MES 缓冲液至终浓度为 50 mmol/L),培养至 A₆₀₀ 为 0.1。然后每个样本准备 5 个 50 mL 无菌培养瓶,将 10 mL 同样培养基加入 50 mL 培养瓶中,每个样本培养 5 瓶,每个培

养瓶加入 100 μ L A_{600} 为 0.1 的母液, 进行加入含 10 mL 同样培养基的 50 mL 培养瓶中, 30 230 r/min 震荡培养, 分别于 3、6、12、18、24 h 分别检测其 A_{600} 的值。绘制生长曲线。

1.9 Fet3p 氧化酶分析

氧化酶的分析方法使用 1995 年 Yuan^[7] 等所采用的方法, 并稍做改进。在缺乏亮氨酸、铜和铁的 SD 减培养基中加入 MES 缓冲液至终浓度为 50 mmol/L 中, 30 震荡培养转化的酵母至对数中期, 玻璃微珠剧烈震荡 5 min 破裂细胞, 离心沉淀细胞膜, 将沉淀溶于细胞膜溶解缓冲液中, 17 800 \times g 离心 30 min 初去沉淀。取 30 μ g 的膜蛋白加入 SDS 氧化酶上样缓冲液, 凝胶电泳, 将分离胶在 50 mL 的氧化酶缓冲液中平衡 1 h 时, 然后取 10 mL 同样的缓冲液加入 5 mg 的 -邻苯二胺, 将分离胶放入其中, 避光平衡 1 h。将胶夹在两层玻

璃纸之间, 放入湿盒中, 显色 24 h。

2 结 果

2.1 全长 WD cDNA 克隆

由 RT-PCR 的结果可以看到在 WD1 和 WD2 在 2.15 kb 的 Marker 附近条带清晰。因为我们的全长 cDNA 为 4.3 kb, Stu 位点位于 cDNA 的 2153 位, 因此两个片段长度基本相等。由于 Stu 在 BamH 和 Sal 的酶切 buffer 中效率均只有 50%, 因此可以看到未切开的重组质粒。WD1、WD2 和 PUC19 酶切后进行连接后, WD cDNA 的全长测序和 GenBank 比较未发现突变存在。

2.2 Arg778Leu 突变体的制备

经过 2 次酶切、转化后, 再经过测序筛选, 成功制备了 Arg778Leu 突变体(图 1)。

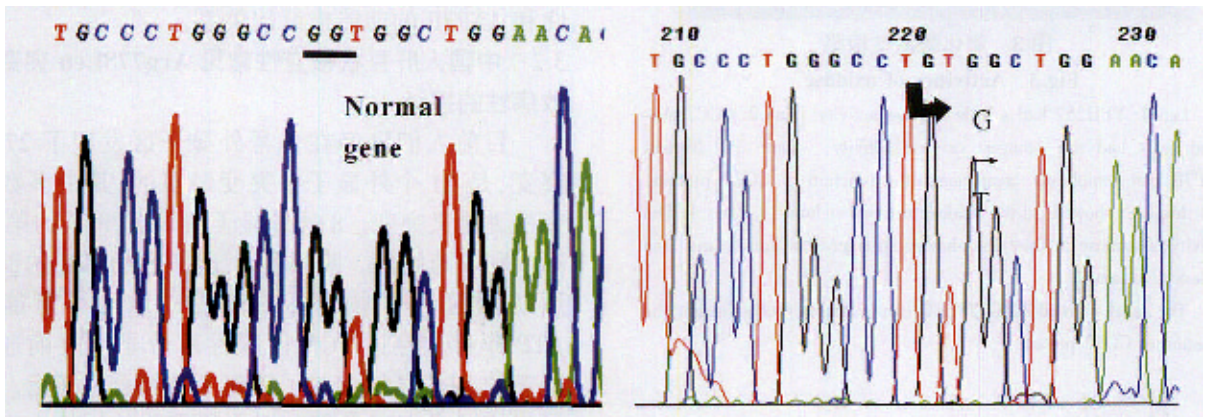


图 1 Arg778Leu 突变体测序
Fig.1 Sequence analysis of Arg778Leu mutant

2.3 Western blot 检测 ATP7B 在细胞内的拷贝

所构建的 pMA92-ATP7B 其 ATP7B 在 CCC2 酵母所形成的条带较 pMA91-ATP7B 所形成的条带明显弱, 表明应用所构建的单拷贝酵母表达载体, ATP7B 在 CCC2 酵母内表达明显减少(图 2)。

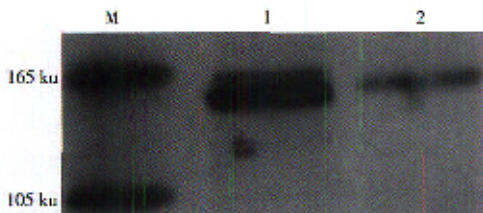


图 2 Western-blot 检测 ATP7B 在 CCC2 酵母内的表达
Fig.2 Expression of ATP7B in CCC2 yeast tested by Western blot analysis

Lane 1: high-level expression in CCC2 yeast cells with pMA91-ATP7B; Lane 2: low-level expression in CCC2 yeast cells with reconstructed pMA92-ATP7B; M: marker

2.4 酵母的生长情况

基因缺陷性 CCC2 酵母很难在缺乏铜铁的培养基上生长, 生长速率最低; 但在细胞内表达正常的 ATP7B 后, 即使在单拷贝的情况下, CCC2 酵母的生长都能转为正常; 在细胞内表达 Arg778Leu 突变型的 ATP7B 后, 酵母的生长速度介于前两者之间, 说明只起到部分 ATP7B 的作用。各组 CCC2 酵母的生长情况和生长速率的比较见表 1。

2.5 氧化酶分析

野生型酵母 YPH252 在 SC-Fe,Cu 培养基培养之后的细胞膜氧化酶条带很弱; CCC2 缺陷性酵母在转入空质粒 pMA92 后氧化酶的条带的氧化酶活性最高, 显示的条带最为清楚, 说明其空质粒不能代偿 CCC2 蛋白的功能; CCC2 酵母内转入 pMA92-ATP7B 后氧化酶活性明显降低, 说明野生型 ATP7B 能够代偿 CCC2 蛋白的运铜功能; 778

表 1 CCC2 酵母在转化不同的质粒后其不同的时间点的 A_{600} 值及生长速率
Table 1 A_{600} and growth rates of CCC2 yeast at 5 time points when transformed with different plasmids (n=5)

Yeast	$A_{600}/10^{-3}$					Growth rate(%)
	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h	
1.CCC2+pMA92	1.2 ±0.2	1.3 ±0.2	1.9 ±0.3	2.3 ±0.5	3.3 ±0.1	2.1 ±0.1
2.CCC2+pMA91+ATP7B	2.4 ±0.4	5.8 ±0.5	3.20 ±1.4	176.3 ±4.6	987.9 ±10.9	12.5 ±1.8
3.CCC2+pMA92+ATP7B	2.3 ±0.2	5.7 ±0.8	28.3 ±3.3	151.3 ±5.7	758.8 ±7.6	12.0 ±2.1
4.CCC2+pMA92+778M	1.5 ±0.2	2.2 ±0.3	4.8 ±1.1	10.6 ±2.8	23.3 ±3.0	5.7 ±0.1

Pair-wise comparison of growth rate, group 2,3 were greater than group 4, and group 4 was greater than group 1, $P < 0.05$

突变体的氧化酶条带仍然较为清晰, 但明显不如空质粒组, 显示 Arg778Leu 只能部分代偿 CCC2 蛋白的功能(图 3)。

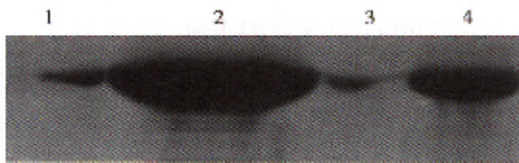


图 3 氧化酶活性检测

Fig.3 Activities of oxidase

Lane1: YPH252 had a little oxidase activity; Lane 2: CCC2 mutated yeast had the strongest oxidase activity; Lane 3: Normal ATP7B can completely complement the function of CCC2 protein, and this lane showed a little oxidase activity as lane 1; Lane 4: The activity of oxidase in this lane showed stronger than lane 1 and lane 3, less than lane 2

The assay showed ARG778LEU can only partly complement the function of CCC2 protein

3 讨论

3.1 酵母是研究人肝细胞铜代谢的一种良好细胞模型

酵母是研究真核细胞基本功能的一种良好细胞模型, 在人和酵母之间铜的代谢具有高度的保守性^[8,9]。酵母功能分析系统的应用, 为我们分析 ATP7B 基因突变对功能的影响提供了一个敏感而又易于操作的方法, 这种分析模式可以进行详细的功能分析而又避免了应用放射性铜来追踪铜的转导途径带来的弊端。在此模型中 ATP7B 可以完全替代 CCC2 蛋白的功能, 即使是在单拷贝的情况下。这为功能分析提供了很大的方便。

通过对酵母生长速度的观察以及对 fet3p 氧化酶活性的检测就可以了解突变型 ATP7B 对 CCC2 酵母功能代偿的程度, 进而分析基因突变对 ATP7B 功能影响是一种精确可行的分析方法^[7]。该方法使用过程中, 我们对酵母表达质粒的改建, 消除了细胞内表达大量异常蛋白所致的“数量”对功能的代偿影响, 从而对突变的功能分析能更为精

确。我们的研究发现 fet3p 的氧化酶活性和酵母的生长速率有着明显的对应关系, apo-fet3p 的含量越多, 其形成 holo-fet3p 含量越少, fet3p 就越不能得到铜离子, 细胞膜氧化酶的活性越高, 酵母生长速度也就越慢^[7]。而正常细胞 YPH252, 因为 apo-fet3p 很快得到铜离子形成 holo-fet3p, 因此其氧化酶活性很低, 细胞生长速度很快。fet3p 的氧化酶活性和 ATP7B 的功能成反比关系。

3.2 中国人肝豆状核变性常见 Arg778Leu 突变的致病性的探讨

目前人们已经在 8 号外显子区发现了 27 种突变, 是 21 个外显子中突变最多的, 其中多数的突变为错义突变。8 号外显子编码 ATP7B 的第 2、第 3 和第 4 跨膜区。跨膜区对于维持 ATP7B 的铜转运功能起着非常重要的作用, 该区域可能在 ATP7B 移位穿过 TGN 区膜性双分子层之前通过保守的 CPC 区域参与了铜离子的结合和转运。除了提供适合于正常蛋白折叠所需要的拓扑空间骨架, P 型 ATP 酶的跨膜区可能在离子转运过程中起着改变空间构向的作用。该区域的基因突变常常影响 ATP7B 酶的一些潜在的功能, 而这种功能对于 ATP7B 功能的发挥可能是非常重要的。对 WD 基因 8 号外显子第 778 位密码子的突变研究, 共发现了 4 种错义突变类型, 即 R778Q、Arg778Leu、R778G 和 R778W, 其中最常见的是 Arg778Leu。第 778 位密码子编码的精氨酸残基 (Arg) 位于第 4 跨膜区, Arg778Leu 是中国人肝豆状核变性最常见的基因突变。梁秀龄等在 39 个家系 45 例 WD 患者中, 发现具有 Arg778Leu 纯合子突变患者 2 例, 复合杂合突变 11 例, 总共发现有 Arg778Leu 突变的患者 13 例, 占患者总数的 28.8%, 可见该突变是一种致病性的突变。本研究也证实 Arg778Leu 突变型 ATP7B 在 CCC2 酵母中只能部分补偿 CCC2 蛋白的功能, 和正常 ATP7B 所代偿的功能相比有显著性差异。对于该型突变

(下转第 577 页 to page 577)

- [4] White LB, Kelk A, Hahn SJ, et al. Pregnancy outcome from an In Vitro Fertilization-Embryo transfer (IVF-ET) cycle is not a predictor for frozen embryo transfer success[J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(9) suppl 3: S246.
- [5] 于红玲, 张慧琴, 邓晓惠, 等. 冷冻复苏胚胎自然周期与激素替代周期移植妊娠率的比较 [J]. *山东医药*, 2003, 43(32): 16- 7.
- [6] 陈士岭, 孔令红, 黄敏珍. 冷融胚胎移植的临床应用 (附 36 例分析) [J]. *第一军医大学学报*, 2000, 20(1): 74- 6.
- [7] American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1993 results generated from the American Society for reproductive medicine/society for Assisted Reproductive Technology Registry [J]. *Fertil Steril*, 1995, 64(1): 13- 21.
- [8] Khalifa E, Brzyski RG, Oehninger S, et al. Sonographic appearance of the endometrium: the predictive value for the outcome of in-vitro fertilization in stimulated cycles [J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(5), 677 - 80.
- [9] 钟依平, 周灿权, 庄广伦, 等. 黄体生成素在控制性超排卵中的应用 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2003, 24(3): 164- 7.
- [10] Hazlett W, Karande V, Vietzke M. How many frozen embryos should be transferred: Is 3 better than 2? [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(3) suppl 1: S126- 7.
- [11] Check JH, Nowroozi K, Choe JK, et al. Influence of endometrial thickness and echo patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril*, 1991, 56(6): 1173- 5.
- [12] 苗本郁, 周灿权, 庄广伦. 体外受精与胚胎移植治疗周期中子宫内膜厚度和回声类型与妊娠结局的关系 [J]. *新医学*, 2000, 31(增刊): 74- 75.
- [13] Check JH, Dietterich C, Nazari A, et al. Non-homogeneous hyperechogenic pattern three days after frozen embryo transfer is associated with low pregnancy rates [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(3) suppl 1: S128.
- [14] Dietterich C, Wang W, Shucoski K, et al. The relationship of endometrial thickness and pregnancy in infertile women treated without in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(3) suppl 3: S29.

(编辑 张恩健)

(上接第 544 页 from page 544)

的致病原因推测可能是编码的精氨酸残基 (Arg) 突变为亮氨酸残基 (Leu) 后, 导致 ATP7B 第 4 跨膜区蛋白折叠发生错误, 影响了整个蛋白在细胞内的定位, 进而影响了蛋白的铜转运功能^[9]。

Arg778Leu 突变和临床表型的关系分析目前仍然存在一些争议, 但多数人认为该型突变病人发病较早, 以肝型为主。如 Nanji^[9] 等对 28 例 WD 患者和同胞进行 WD 所有外显子测序, 发现 3 例有 Arg778Leu 的 WD 患者, 这些患者均有明显的肝脏损害且起病年龄较早 (4 到 16 岁)。国内刘晓青等^[10] 报道了 15 例纯合的 Arg778Leu 突变的 WD 患者的临床表型都以肝脏损害为主。

参考文献:

- [1] 梁秀龄. 肝豆状核变性的分子生物学研究 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2):86- 9.
- [2] 徐评议, 梁秀龄, 马少春. 肝豆状核变性基因突变分析 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(2): 97- 9.
- [3] 丰岩清, 国宁, 王莹, 等. 应用 USE 定点诱变技术制备 Wilson 病突变体 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2003, 24(6):585- 8.
- [4] Chino MS, Lennard MS, Tucker GT, et al. The expression of human cytochrome P450IA1 in the yeast *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1991,

42(3):753- 8.

- [5] Forbes JR, Cox DW. Functional characterization of missense mutation in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? [J]. *Am J Hum Genet*. 1998, 63(6): 1663- 74.
- [6] 丰岩清, 王莹, 黄帆, 等. 肝豆状核变性基因表达蛋白的多克隆抗体制备和纯化 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2002, 28(4):241- 4.
- [7] Yuan DS, Stearman R, Dancis A, et al. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(7):2632- 6.
- [8] 侯国庆, 梁秀龄, 陈嵘, 等. Wilson 病基因产物在人肝细胞内存在和定位的研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2000, 26(4):202- 4.
- [9] Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(6): 1423- 9.
- [10] 刘晓青, 张建明, 顾学范, 等. Wilson 病 ATP7B 基因 Arg778Leu 突变与临床表型之相关性探讨 [J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(6):359- 61.

(编辑 刘清海)