DOI:10.16016/j.1000-5404.201502076

论著

P364L突变降低UGT1A1酶对非结合胆红素的催化活性

唐 怡,邓国宏,李露锋,郭 艳,吴全新,毛 青 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所,感染病研究重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 研究尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A1的P364L突变型(c.1091 C>T)对催化非结合胆红素葡糖醛酸化的影响。**方法** 构建含有*UGT1A1*编码序列的野生型和P364L突变型质粒,转染HEK293细胞,表达野生型与突变型蛋白;Western blot验证野生型和P364L突变型蛋白表达情况;超声裂解细胞提取表达蛋白;设计两组反应,野生型为对照组,P364L突变型为实验组,分别催化非结合胆红素反应,HPLC定量检测两组中非结合胆红素浓度变化情况。**结果** 对照组中非结合胆红素的浓度随着时间的延长呈逐渐下降的趋势,而结合胆红素的浓度随时间延长逐渐升高;实验组中非结合胆红素浓度下降程度远小于对照组,未见明显的结合胆红素峰值;反应30 min时计算酶的活性P364L突变型为野生型的14.2%。**结论** 突变酶UGT1A1-P364L催化非结合胆红素能力较野生型明显降低。

[关键词] 尿苷二磷酸葡糖醛酸基转移酶1A1;胆红素;葡糖醛酸化;突变体
[中图法分类号] R322.48;R345;R394.3 [文献标志码] A

Mutant P364L reduces catalytic activity of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 on unconjugated bilirubin *in vitro*

Tang Yi, Deng Guohong, Li Lufeng, Guo Yan, Wu Quanxin, Mao Qing (Institute of Infection Diseases, Chongqing Key Laboratory for Infectious Diseases Research, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) genetic mutant P364L (c.1091 C>T) on the glucuronidation of unconjugated bilirubin. **Methods** The *UGT1A1* wild-type and mutant P364L gene sequences were inserted into plasmid pEZ-M03 respectively, and then transfected into HEK293 cells. Western blotting was applied to test the expression of wild-type and mutant P364L-UGT1A1 proteins. Ultrasound was used to extract the intra-cellular compounds. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the level of unconjugated bilirubin in both wild-type and mutant P364L catalytic reaction. **Results** The concentration of unconjugated bilirubin was significantly decreased while the peak concentration of conjugated bilirubin was increased over time in wild-type UGT1A1 catalytic reaction. However, the concentration of unconjugated bilirubin was slightly decreased over time and the peak concentration of conjugated bilirubin was not obviously detected in P364L-UGT1A1 catalytic reaction. The mutant P364L-UGT1A1 contained only 14.2% of wild-type enzyme activity. **Conclusion** Mutant P364L-UGT1A1 (1091C>T) has significantly lower enzyme activity to catalyze unconjugated bilirubin than wild-type UGT1A1.

[**Key words**] UDP-glucuronosyltransferase1 A1; bilirubin; glucuronidation; mutation

Corresponding author: Mao Qing, Tel: 86-23-68754141, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

[通信作者] 毛 青,电话:(023)68754141, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150410.1512.019.html(2015-04-10)

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A家族(UDP-glucuronosyltransferase 1 family As,UGT1As)为体内催化底物葡糖醛酸化的一类Ⅱ相代谢酶,编码基因位于人类常染色体2q37上,包含2~5个共用外显子和13个独立外显子,外显子1~13分别与共用外显子2~5组成*UGT1A1*、*UGT1A2*等13个独立编码基因[1],翻译合成8种UGT1As蛋白酶。前期我们对本院门诊以血清非结合胆红素升高为主要表现的患者进行*UGT1A1*基因筛查。发现1例CN-Ⅱ综合征患者仅携带c.1091C>T纯合突变,突变点位于*UGT1A1*基因外显子4上,导致UGT1A1酶的第364位的脯氨酸被亮氨酸(P364L)替代。由于该突变点位于共用外显子4上,除UGT1A1酶外对其他UGT1As酶家族均有影响,体内外许多物质经UGT1As酶代谢,P364L突变对物质代谢影响广泛。UGT1A1酶是目前为止发现的人体内唯一能催化非结合胆红素代谢的酶,因此P364L突变对UGT1A1催化非结合胆红素影响尤其明显。故本实验构建UGT1A1-P364L突变酶,研究其对非结合胆红素代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器

超声破碎仪(Misonix Sonicators Q700)、高效液相色谱仪(LC-2010AHT)、高速冷冻离心机(Legend Micro 21R)、纯净水净化系统(Milli-Q3)、全波长酶标仪(Multiskan Spectrun)、精密电子天平(BSA224S-CW)、核酸浓度测定仪(Nanodrop 2000 Spectrophotometer)、恒温振荡器(THZ-C-1)、凝胶成像仪(ChemiDoc XRS)。

1.2 材料

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(uridine diphosphateglucuronic acid, UDPGA)、非结合胆红素、胆红素HPLC标准品、氯化镁(源叶生物);抗坏血酸、pH 7.4的100 mol/L的Tris-HCl缓冲液(Solarbio);丙甲菌素、二甲基亚砜、甲醇(Sigma);高糖细胞培养基、胰酶(HyClone);胎牛血清(四季青);Lipofectamine 2000(Invitrogen);OPTI-MEM(Gibco);人UGT1A1抗体(Ab170858,Abcam);GAPDH抗体(碧云天);蛋白酶抑制剂混合物、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(康为世纪);HEK293细胞(百恩维生物);小量质粒抽提试剂盒(Plasmid Mini Kit Ⅰ,Omega)。

1.3 方法

1.3.1 构建含有目的基因的表达质粒 野生型和突变型质粒均购自GeneCopoeia公司(产品ID S0207)。选用哺乳动物质粒pEZ-M03作为载体,于质粒开放阅读框中插入人类*UGT1A1*表达序列(NM_000463.2),总长1 602 bp。野生型质粒与突变型质粒的区别在于外显子4上第1 091个碱基由C突变为T。

1.3.2 质粒转化感受态细胞提取质粒测序 50 μg质粒加入100 μL感受态细胞中,置于冰上30 min,42 ℃水浴热激90 s,冰上冷却2 min后加入42 ℃预热的LB 900 μL,于37 ℃摇床150 r/min培养1 h。感受态细胞均匀涂抹到含氨苄西林的LB平板上,37 ℃培养。挑取菌落用LB培养基培养,Plasmid Mini Kit Ⅰ提取质粒。送华大基因公司测序。

1.3.3 质粒转染HEK293细胞提取蛋白 HEK293细胞接种于6孔板上,当细胞融合度达80%时,换用OPTI-MEM无血清培养基,将质粒与Lipofectamine 2000按4 μg∶6 μL的比例加入培养基中,5 h后换为无双抗的含10%胎牛血清高糖培养基。继续培养48 h后,刮取细胞。超声仪破碎细胞,12 000×*g*离心5 min,留取上清。

1.3.4 蛋白质免疫印迹 表达有野生型与突变型蛋白的细胞均浆分别取30 μg,加入SDS-PAGE胶中,电泳分离,转膜后按UGT1A1抗体(Ab170858,abcam)1∶1 000稀释后孵育,以山羊抗兔辣根过氧化物酶IgG(1∶500)作为二抗孵育。Western Bright ECL(Advansta)显色,凝胶成像仪观察结果。

1.3.5 非结合胆红素葡糖醛酸化的催化条件 缓冲液pH 7.4的100 mmol/L Tris-HCl,总反应体系200 μL,包括HEK293细胞均浆100 μg,$MgCl_2$ 4 mmol/L,UDPGA 5 mmol/L,丙甲菌素50 μg/mg蛋白,二甲基亚砜(DMSO)溶解的非结合胆红素(DMSO占总体积的1%),37 ℃反应。最后加入200 μL含2%(质量体积比)抗坏血酸的冰甲醇终止反应。18 000×*g*离心后将上清注入高效液相色谱仪分析。

1.3.6 高效液相色谱条件 流动相由pH 4.85的0.1 mol/L的醋酸铵和27.5%乙腈组成,两者比例72.5∶27.5(体积比),流速:1.0 mL/min,17 min后将乙腈比例增加到43.3%,2 min后再次增加到79%,将此比例保持7 min后降到初始比例。检测波长为453 nm。

1.4 统计学分析

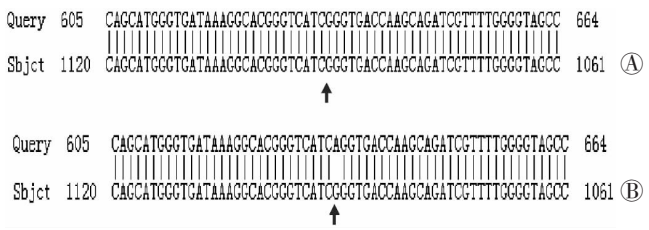
采用Stata软件进行Chow检验,比较野生型与突变型两组非结合胆红素浓度随时间变化的差异。

2 结果

2.1 质粒测序结果

测序由华大基因公司进行,使用pEZ-M03质粒测

序通用引物(正向引物 5′-GCGGTAGGCGTGTACGGT-3′,反向引物 5′-CCGGACACGCTGAACTTGT-3′)测序。对比野生型质粒和突变型质粒测序结果,所测野生型质粒序列段的第 634 位碱基为鸟嘌呤(G),而突变质粒为腺嘌呤(A),其余碱基完全一致。正反向拼接质粒测序结果,在 NCBI 网站上与人类 *UGT1A1* 基因比对(NM_000463.2),发现在野生型质粒中插入的长 1 062 bp 的开放阅读框与人类 *UGT1A1* 基因外显子序列完全一致。人类 *UGT1A1* 序列的第 1 091 个外显子位置对应质粒正向测序结果的第 634 个碱基位置,在此位置人类 *UGT1A1* 序列反义链的第 1 091 为 G,而突变型的第 634 个碱基为 A,对应突变质粒及 *UGT1A1* 的正义链即为突变型外显子 4 上第 1 091 个碱基由 C 突变为 T(图 1)。

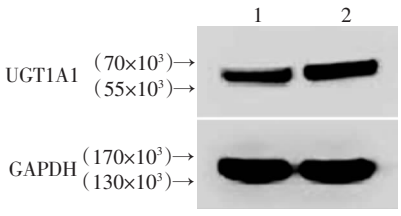


A:野生型质粒插入碱基与人类 *UGT1A1* 基因(NM_000463.2)对比结果; B:突变型质粒插入碱基与人类 *UGT1A1* 基因(NM_000463.2)对比结果　Query:质粒测序结果;Sbjct:人类 *UGT1A1* 基因序列;箭头示定点突变位点

图 1　插入人类 *UGT1A1* 基因开放阅读框的野生型质粒以及突变型质粒测序结果

2.2　HEK293 细胞表达野生型与突变型 UGT1A1 蛋白结果

Western blot 检测发现 UGT1A1 野生型和 P364L 突变型质粒转染的 HEK293 细胞中均有 UGT1A1 酶的表达,表达的蛋白相对分子质量在 55×10^3 左右(图 2)。



1:UGT1A1 野生型;2:P364L

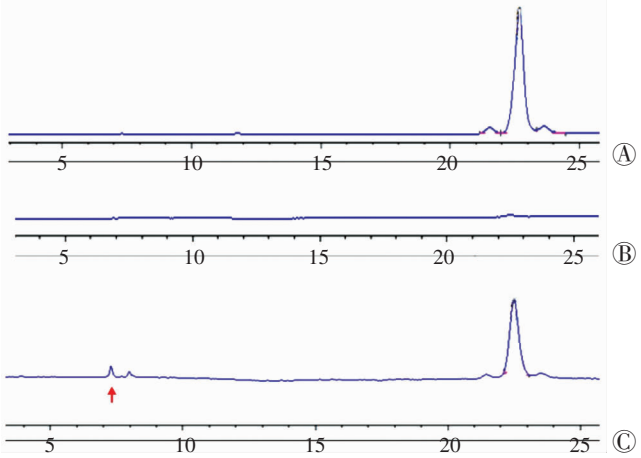
图 2　Western blot 检测野生型和突变型质粒转染 HEK293 细胞 48 h 后蛋白的表达

2.3　非结合胆红素标准曲线

配制非结合胆红素浓度 0.312 55、0.625 5、1.255、2.55、5 μg/mL,分别取 30 μL 加入色谱仪,按色谱条件进行分析。以非结合胆红素峰面积(X)作为横轴,非结合胆红素浓度(Y,μg/mL)作为纵轴,进行线性回归分析,非结合胆红素在 0.312 5 ~ 5 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。回归方程为:$y = 0.057\ 1x + 0.101\ 1$,$r^2 = 0.994\ 6$。

2.4　非结合胆红素催化反应结果

设计 2 个对照组:一组为反应体系中含非结合胆红素而无 UDPGA 的对照,HPLC 分析结果仅可见非结合胆红素洗脱峰(图 3A);另一组为有 UDPGA 而无非结合胆红素的对照,HPLC 分析结果无任何洗脱峰(图 3B)。图 3C 为在酶的催化下非结合胆红素与 UDPGA 反应后的色谱图,如箭头示在 7 ~ 8 min 时观察到结合胆红素洗脱峰。



A:含非结合胆红素无 UDPGA 对照;B:有 UDPGA 无非结合胆红素对照; C:酶催化下非结合胆红素与 UDPGA 反应后结果

图 3　HPLC 色谱分析非结合胆红素催化反应变化

100 μg 含 UGT1A1 野生型、突变型蛋白的 HEK293 细胞匀浆分别催化非结合胆红素反应,野生型与突变型反应体系中非结合胆红素的浓度均随时间增加而呈下降趋势,但野生型催化体系中非结合胆红素浓度较突变型体系下降明显(表 1)。Chow 检验比较野生型与突变型两组非结合胆红素浓度随时间变化的差异,似然比 LR = 36.05,两组线性回归模型具有显著差异($P < 0.05$),说明突变酶 UGT1A1-P364L 催化非结合胆红素能力较野生型明显降低。计算单位时间内在单位酶量催化下被转化的非结合胆红素的量,即酶活性。取反应 30 min 时非结合胆红素浓度计算,野生型为 271.03 pmol/(min · mg),P364L 突变型为 38.42 pmol/(min · mg),因此反应 30 min 时 P364L 突变酶活性仅

为野生型的14.2%。

表1 催化反应体系中非结合胆红素浓度随时间变化情况

时间(min)	野生型浓度(μg/mL)	突变型浓度(μg/mL)
0	5.847	2.000
10	5.092	1.986
30	3.470	1.663

3 讨论

UGT1As 基因存在普遍的多态性,大量研究证实一些多态性与疾病的发生、药物代谢的异常相关,甚至会增加患癌的风险[1]。*UGT1A1* 作为 *UGT1As* 中的一员,同样具有基因多态性,这种多态性形成了先天性高胆红素血症如 Gilbert 综合征、CN-Ⅰ综合征和 CN-Ⅱ综合征的发病机制。2004 年 Takeuchi[2] 对遗传性高胆红素血症的患者进行 *UGT1A1* 基因筛查,首次发现了 P364L 突变,该患者表现为 Gilbert 综合征,为杂合突变。Mimura 等[3] 研究了日本人中 P364L 的等位基因频率为0.0053,而本课题组在前期研究发现其等位基因频率为0.033[4],可见 P364L 突变在人群中并不罕见,且 P364L 突变位于 UGT1As 的共用外显子4上,不仅影响 UGT1A1 酶催化的非结合胆红素、雌二醇的代谢,也影响到由 UGT1As 酶家族催化的其他物质,尤其是临床一些常用药物的代谢如丙咪嗪、速尿、瑞替加滨、拉莫三嗪等[5-7],因此进行 P364L 突变酶的功能研究具有重要的临床意义。

本研究前期临床筛查发现1例携带 P364L 纯合突变患者,临床表型为 CN-Ⅱ综合征,是目前为止发现的首例因 P364L 突变致 CN-Ⅱ综合征的病例,理论上讲 CN-Ⅱ综合征患者体内酶活性应在野生型的30%以下[8]。本研究发现 P364L 突变酶催化胆红素的活性仅为野生型的14.2%,低于 Takeuchi[2] 的研究结果(P364L 催化非结合胆红素活性较野生型下降35.6%),本研究结果更符合 CN-Ⅱ综合征患者中 UGT1A1 酶活性的下降特点,也与患者的临床表型相适应。Takeuchi 等[2] 的研究中选择非人源性的 COS7 细胞作为转染细胞,而本研究中选择人源性的 HEK293 细胞,这种转染细胞的选择差异可能导致酶活性的检测结果不同,但本研究选择的 HEK293 细胞更为合理,更接近体内 UGT1A1 蛋白的表达。

在研究方法上,本实验较以往酶活性的研究不同。由于非结合胆红素与结合胆红素化学性质均不稳定,结合胆红素见光更易分解,整个实验过程需在避光的条件下进行。这种不稳定性使市面上无可售的结合胆红素标准品,实验不能直接对生成的结合胆红素进行定量,催化非结合胆红素生成结合胆红素的实验存在一定难度,国内尚无人研究 UGT1A1 及其变异体对非结合胆红素的催化作用。非结合胆红素与结合胆红素在同一波长453 nm处有相同的消光系数[9],比较本实验的无 UDPGA 对照组和实验组可确定在453 nm波长处7~8 min时实验组观察到的新出现的洗脱峰为结合胆红素。本实验中我们用非结合胆红素的减少量来计算反应速度,虽与常用的产物增加计算方法不同,但在一个反应中底物的消耗与产物的增加呈正相关,故这种方法仍具有可行性。不足之处在于测量底物消耗不如测量产物增加灵敏,因为产物在整个反应中为新生物质,生成量的变化更容易被观察到,而底物在整个环境中大量存在,若减少量较小时不容易被观察到。故为进一步提高实验的准确性,需克服结合胆红素不稳定的困难,尽量合成稳定的结合胆红素标准品或找到代替物。

既往研究发现 P364L 突变酶对雌二醇、对乙酰氨基酚的催化活性下降[3],而本研究也发现 P364L 突变酶对非结合胆红素的催化活性明显下降。推测 UGT1A1 的第364个氨基酸脯氨酸在构成蛋白空间结构及功能发挥上起着重要作用。Xing 等[10] 对 UGT1A6 空间结构研究发现羧基端的 P363L(相当于 UGT1A1 的 P364L)突变,破坏了 Miley 等[11] 推测的葡萄糖醛酸基转移酶共有的重要的配体结合区域的空间构象,削弱 UGT1A6 的尿苷二碱酸葡萄糖醛酸基结合位点对底物的亲和力。*UGT1A1* 基因的2~5个外显子为 UGT1As 家族共用,即 UGT1A1 蛋白的第289~533个氨基酸为 UGT1As 酶家族共有,UGT1As 酶羧基端在空间构象上相似,因此理论上讲 UGT1A6-P363L 与 UGT1A1-P364L 突变酶催化活性的下降有着相似的机制。酶 K_m 值是反应酶对底物亲和力的直接指标,为进一步证明 P364L 突变对 UGT1A1 酶在蛋白空间结构及催化功能上的重要性,下一步还应继续研究 UGT1A1-P364L 突变酶与野生型 UGT1A1 酶的 K_m 值差异。

总的来说,P364L 是 UGT1A1 酶上的重要突变点,携带 P364L 突变的患者 UGT1A1 酶的催化活性降低,导致一些内源性和外源性有毒物质在体内蓄积,加大了药物的副作用和人体的患癌几率。P364L 突变对人体健康危害较大,既往对于 P364L 的研究较少,故除

研究突变酶UGT1A1-P364L催化非结合胆红素的活性外,对其他重要底物的葡糖醛酸化的影响具有进一步研究的价值。

参考文献:

[1] Tukey R H, Strassburg C P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000, 40: 581-616.

[2] Takeuchi K, Kobayashi Y, Tamaki S, *et al*. Genetic polymorphisms of bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene in Japanese patients with Crigler-Najjar syndrome or Gilbert's syndrome as well as in healthy Japanese subjects [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(9): 1023-1028.

[3] Mimura Y, Maruo Y, Ohta Y, *et al*. Effect of common exon variant (p. P364L) on drug glucuronidation by the human UDP-glucuronosyltransferase 1 family[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 109(6): 486-493.

[4] 李露锋, 邓国宏, 谭文婷, 等. 8个Gilbert综合征家系UGT1A1变异谱调查及分析[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(23): 2408-2412.

[5] Lee S J, Park J B, Kim D, *et al*. *In vitro* selective inhibition of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 by finasteride, and prediction of *in vivo* drug drug interactions[J]. Toxicol Lett, 2015, 232(2): 458-465.

[6] Korprasertthaworn P, Rowland A, Lewis B C, *et al*. Effects of amino acid substitutions at positions 33 and 37 on UDP-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) activity and substrate selectivity[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(11): 1511-1521.

[7] Reimers A, Sjursen W, Helde G, *et al*. Frequencies of UGT1A4*2 (P24T) and *3 (L48V) and their effects on serum concentrations of lamotrigine[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2014, [Epub ahead of print].

[8] Bosma P J, Goldhoorn B, Oude-Elferink R P, *et al*. A mutation in bilirubin uridine 5′-diphosphate-glucuronosyltransferase isoform 1 causing Crigler-Najjar syndrome type II[J]. Gastroenterology, 1993, 105(1): 216-220.

[9] Bhutani V K, Gourley G R, Adler S, *et al*. Noninvasive measurement of total serum bilirubin in a multiracial predischarge newborn population to assess the risk of severe hyperbilirubinemia[J]. Pediatrics, 2000, 106(2): E17.

[10] Xing Y, Yang L, Wang L, *et al*. Systematic screening for polymorphisms within the UGT1A6 gene in three Chinese populations and function prediction through structural modeling[J]. Pharmacogenomics, 2009, 10(5): 741-752.

[11] Miley M J, Zielinska A K, Keenan J E, *et al*. Crystal structure of the cofactor-binding domain of the human phase II drug-metabolism enzyme UDP-glucuronosyltransferase 2B7 [J]. J Mol Biol, 2007, 369(2): 498-511.

(**收稿**:2015-02-11;**修回**:2015-03-19)

(编辑 王 红)