

SED-T-PA 致病基因 WISP3 突变体的构建及在 COS-7 细胞中的表达定位

王敏 周后德 彭依群 翟木绪 何玉玲 谢辉 隋国良 罗湘杭

郭丽娟 黄佼 杨敏 崔蓉蓉 廖二元

摘要：目的 通过构建晚发型脊柱骨骺发育不良伴进行性骨关节炎病(SEDT-PA)致病型(1000 T-C ,840 delT)Wnt 诱导分泌蛋白 α WISP 3)与绿色荧光蛋白融合表达的真核表达载体 ,观察其在 COS-7 细胞中的表达和亚细胞定位 ,为研究 WISP 3 突变致 SEDT-PA 的机理奠定基础。方法 从正常人软骨细胞获得野生型 WISP 3 基因的全长 cDNA(WT-WISP 3) ,定点突变方法构建携带 WISP 3 基因致病型的重组真核表达质粒 MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 和 MUT^{840 delT}/pEGFP-C 2 ;以空白载体 pEGFP-C 2 为对照 ,脂质体转染法将重组质粒瞬时转染 COS-7 细胞 ,48 h 后用荧光显微镜检测绿色荧光蛋白表达 ;半定量 RT-PCR 法检测 WISP 3 基因的表达。结果 测序和酶切鉴定证实插入片段大小和序列的正确 ;突变体在 COS-7 细胞中均高效表达 ,荧光显微镜观察发现 ,转染野生型 WISP 3 基因的 COS-7 细胞中绿色荧光均匀分布在细胞浆和细胞膜 ,转染突变体的 COS-7 细胞中荧光呈斑点状染色和聚集现象。结论 成功构建了 SEDT-PA 致病基因 WISP 3 突变体 ,且发现野生型 WISP 3 蛋白定位于细胞浆和细胞膜 ,而突变型的 WISP 3 蛋白在细胞浆内异常聚集 ,为进一步探讨 SEDT-PA 的发病机制创造条件。

关键词：SEDT-PA ; WISP 3 ; 突变体 ; 定点突变 ; 亚细胞定位

Construction and expression of the mutants of SEDT-PA's pathogenic gene WISP3 in COS-7 WANG Min , ZHOU Houde , PENG Yiqun , et al. Institute of Metabolism and Endocrinology , the Second Xiangya Hospital , Central South University , Changsha 410011 , China

Abstract : Objective To construct two types of WISP3 gene's mutants(1000T-C ,840delT) found in SEDT-PA patients and green fluorescence protein fusion gene , and to observe their expression and subcellular localization in COS-7 cells. **Methods** Full-length cDNAs of wild type WISP3 gene(WT-WISP3) was amplified from human chondrocytes by RT-PCR , and site-directed mutagenesis was used to obtain full-length cDNAs of the mutated WISP3 genes(MUT^{1000T/C} and MUT^{840delT}). The recombined plasmids WT-WISP3/pEGFP-C2 , MUT^{1000T/C}/pEGFP-C2 and MUT^{840delT}/pEGFP-C2 were transfected transiently into COS-7 cells through liposome-mediated method , and pEGFP-C2 vector was used as control. The green fluorescence protein expression and localization of plasmids were observed using fluorescence microscope after 48 hours of transfection. **Results** By restriction endonuclease analysis and sequencing , the sequences of MUT^{1000T/C} and MUT^{840delT} were consistent with that mutated in SEDT-PA , and the open reading frames were matched with the vector sequence. The recombined plasmids were highly expressed in COS-7 cells. Green fluorescence signal was distributed uniformly in cytoplasm and cell membrane transfected with WT-WISP3/pEGFP-C2 , however , the fluorescence signal aggregated to speckles or agglomerates in cytoplasm transfected with mutants. **Conclusions** WISP3 gene's mutants of SEDT-PA are successfully constructed using genetic recombination , and Wild type WISP3 protein is localized in cytoplasm and cell membrane , and the mutated WISP3 protein aggregated abnormally in cytoplasm , which provide a basis for future studies on its molecular functions in SEDT-PA.

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30400218)

作者单位：410011 长沙 中南大学湘雅医院内分泌科

通信作者：廖二元 , Email : eyliao2003@21cn.com

Key words: Spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy (SEDT-PA); Wnt-inducible secreted protein 3 (WISP3); Mutant ; Site-directed mutagenesis ; Subcellular localization

由 Wynne-Davies 等^[1]首先报道(1982 年)的晚发型脊柱骨骺发育不良伴进行性骨关节病(SEDT-PA),属于骨-软骨发育不良症中的一种,多在 3~8 岁时首次出现症状,典型的临床特点为关节肿胀、运动受限、关节挛缩和持续性关节软骨退化、丢失和骨破坏^[2-5]。1999 年, Hurvitz 等^[6]首次应用定位克隆方法确定 WISP 3 基因为 SEDT-PA 的致病基因。近来检测一个 SEDT-PA 家系的基因突变检测表明^[7,8],两例患者 WISP 3 基因第 8 外显子出现一种新的混合杂合性突变(1000 T→C 和 840 delT)。目前, WISP 3 基因突变导致 SEDT-PA 发病的具体机制不明。本研究运用基因重组技术构建了之前报道的 SEDT-PA 患者 WISP 3 基因突变类型的真核表达载体,并观察其在 COS-7 细胞中的表达和定位。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

pcDNA 3.1(+) 载体、pEGFP-C 2 载体和 JM 109 菌株由本室保存。pGEM-T easy 载体、各种限制性内切酶、DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、Pfu 酶和逆转录试剂盒购自 Promega 公司; QIAprep Spin Miniprep Kit、Qiafilter plasmid midi kit 和 DNA 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司; DMEM 培养基、胎牛血清、Trizol 试剂、脂质体 (LipofectAMINE 2000TM) 购自 Gibco 公司; 引物合成及 DNA 测序由大连宝生物工程有限公司完成; COS-7 细胞株购自中科院上海细胞所细胞库。

1.2 软骨细胞分离培养及鉴定

经患者同意及中南大学医学伦理学委员会批准取髌关节置换术切取的外伤致股骨颈骨折患者的股骨头进行软骨细胞分离培养。将所取的股骨头,剔除筋膜, PBS 冲洗去除血液。将表面软骨剪成 0.1~1.0 mm³ 碎片,用 II 型胶原酶连续消化 3 次,每次 30 min,软骨细胞用 DMEM 培养(含 10% FBS, 100 U/ml 青霉素和 50 U/ml 链霉素)。用甲苯胺蓝染色行软骨细胞鉴定。

1.3 野生型 WISP 3 基因的全长 cDNA(WT-WISP 3) 的扩增和 T-A 克隆

取上述培养液培养的原代软骨细胞提取总 RNA。总 RNA 的提取采用 Gibco 公司的 Trizol 试剂,按说明书操作方法进行,经琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 无降解,紫外分光光度计定量后用于反转录。

利用 Promega 公司逆转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA 第一链。根据 Genbank 基因序列(WT-WISP 3 accession number NM_003880)设计扩增野生型 WISP 3 基因全长 cDNA 的引物(WT-WISP 3 for pEGFP-C 2, 1065 bp)。在上游引物加上 Hind III 酶切位点,不包含起始密码子,利用载体上的起始密码子;在下游引物加上 BamH I 酶切位点,含有终止密码子 TAA。上游引物 5'-TCAAGCTTCGACGTACAGGGGCTCCTCTT-3', 下游引物 5'-GCCGATCCTTACAGAATCTTGAGCTCAG-3'。取上述逆转录反应合成的 cDNA,用 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应条件是模板 94℃ 变性 5 min 后进行循环,变性 94℃, 1 min,退火 63℃, 40 s,延伸 72℃, 2 min 30 s,共 32 循环,最后于 72℃ 延伸 10 min,1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。将上述 PCR 扩增后的产物纯化回收后加上 poly A 尾,参照 T-A cloning 试剂盒操作手册将其与 pGEM-T easy 连接转化已制备好的感受态 JM 109 细菌,蓝/白斑菌落筛选,挑取单个白色菌落,双酶切及测序鉴定插入片段的正确性。

1.4 WISP 3 基因致病型(1000 T-C, 840 delT)与绿色荧光蛋白融合表达载体的构建

根据 WISP 3 基因突变类型(1000 T-C, 840 delT)设计定点突变的引物, MUT^{1000 T/C} 的上游引物是 5'-CCTTGTGTGTGTCTCAGAGAAA-3', 下游引物是 5'-CCTTCTACGACACCTAATGT-3'; MUT^{840 delT} 上游引物是 5'-AATTGTCTTTTC TGGATGCTCA-3', 下游引物是 5'-AAGGTTGAGAGGTTTCGACTTT-3'。以上述 T-A 克隆产物为模板,用 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。反应条件为:模板 94℃ 变性 5 min 后进行循环,变性 94℃, 30 s,退火(MUT^{1000 T/C} 为 54℃, 40 s; MUT^{840 delT} 为 51℃, 40 s),延伸 72℃, 6 min,共 30 循环,最后于 72℃ 延伸 10 min。将上述 PCR 产物纯化回收,进行末端磷酸化,经酚/氯仿抽提后用 T 4 连接酶将线性 DNA 进行自身连接。自连的环状质粒转化已制备好的感受态 JM 109 细菌,以氨卡青霉素筛选白色克隆进行质粒扩增、提取和酶切测序鉴定。用 Hind III 和 BamH I 双酶切 T-A 克隆、定点突变 PCR 产物和质粒载体 pEGFP-C 2,纯化后将目的片段定向克隆到 pEGFP-C 2 载体中,连接产物转化感受态 JM 109 细菌,以卡那霉素筛选白色克隆进行质粒扩增、提取和酶切测序鉴定。

1.5 COS-7 细胞培养及突变体的转染

空载体质粒 pEGFP-C 2、携带野生型 WISP 3 基因的重组质粒 WT-WISP 3/pEGFP-C 2, 突变体 MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 和 MUT^{840 delT}/pEGFP-C 2 经大量制备并纯化。将生长状态良好的 COS-7 细胞按 1×10^5 cells/孔的密度转移到放玻片的六孔板中, 在 37℃、5% CO₂ 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养 24 h, 转染当天细胞的汇合率约 80%。取 4 μg 质粒 DNA 和 8 μL LipofectAMINE 2000™, 各加入于 100 μL 无血清 DMEM 中, 使脂质体与 DMEM 在室温孵育 5 min。混合含 DNA 和脂质体的培养液, 使其充分混匀, 于室温孵育 20 min。用无血清 DMEM 洗细胞 2 次, 加 800 μL 无血清 DMEM, 逐滴加入转染液, 于 37℃、50 mL/L CO₂ 培养 8 h。弃转染液, 换含 10% 胎牛血清的 DMEM 继续培养。同时设转染空载体 pEGFP-C 2 为对照组。

1.6 细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测 mRNA 的表达

转染后 48 h 提取细胞总 RNA。总 RNA 和逆转录方法见 1.3。随后以 β-actin 作为内参照进行 WISP 3 的 PCR 扩增。β-actin 的上游引物是 5'-TCCTGTGCATCCACGAAACT-3', 下游引物是 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3', 大小为 310 bp。PCR 扩增条件为 95℃预变性 5 min, 94℃变性 45 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 28 个循环, 最后 72℃ 10 min, 然后行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.7 荧光显微镜观察

转染 48 h 后, 弃去培养基, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次。0.25% Triton 100 37℃去膜 20 min, PBS 洗涤 3 次。加含联胺基苯吡啶酸盐 (DAPI) (1:500 稀释) 的 PBS 标记细胞核, 3~8 min, PBS 洗涤 10 min × 3 次。用荧光显微镜观察野生型和突变 WISP 3 蛋白表达及 DAPI 核定位 (所有的操作均在避光条件下进行)。

2 结果

2.1 野生型 WISP 3 基因的全长 cDNA (WT-WISP 3) 的扩增

用 RT-PCR 的方法从正常人软骨细胞扩增野生型 WISP 3 基因的全长 cDNA (WT-WISP 3), 所扩增的 PCR 产物约为 1.1 kb, 与预计大小相同 (图 1)。

2.2 WT-WISP 3 的 T-A 克隆

T-A 克隆将 WT-WISP 3 连接到 pGEM-T easy 载体上 (4.1 kb, 图 2), 经 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定,

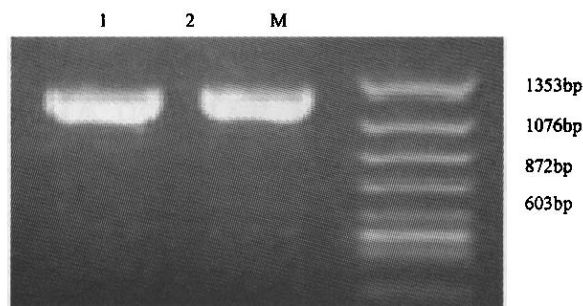


图 1 野生型 WISP 3 基因的全长 cDNA PCR 扩增产物电泳图
1, 2: WT-WISP 3; M: Φx174-Hae III digest DNA Market

酶切后得到大小约为 3.0 kb 和 1.1 kb 的片段 (图 2) 测序后与 Genbank (WISP 3 accession number NM_003880) 基因序列比较证实, 两者序列一致无突变 (图 10.1, 图 10.3)。

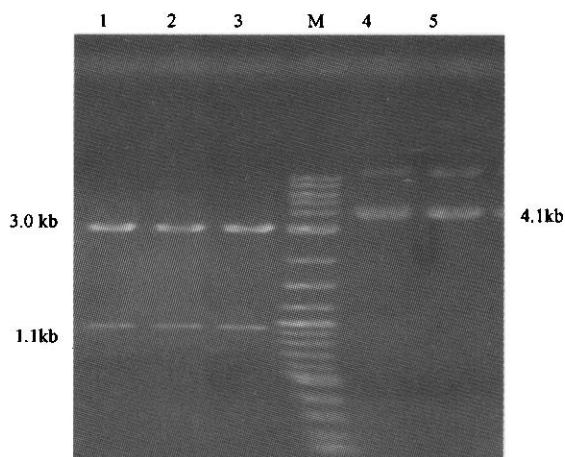


图 2 T-A 克隆和定点突变获得的重组质粒酶切产物电泳图

1: WT-WISP 3/pGEM-T easy; 2: MUT^{1000 T/C}/pGEM-T easy; 3: MUT^{840 delT}/pGEM-T easy; 4, 5: T-A 克隆的重组质粒未酶切电泳图; M 2-Log DNA Ladder

2.3 突变 WISP 3 基因全长 cDNA 的克隆

定点突变的方法获得突变 WISP 3 基因全长 cDNA 与 pGEM-T easy 载体相连的重组质粒 (MUT^{1000 T/C}/pGEM-T easy 和 MUT^{840 delT}/pGEM-T easy, 4.1 kb, 图 3), 经 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定, 酶切后为大小约为 3.0 kb 和 1.1 kb 的片段 (图 2), 测序后与我们报道的 SEDT-PA 患者 WISP 3 基因序列比较证实, 上述产物与之一致无突变 (图 10.2 和图 10.4)。

2.4 绿色荧光蛋白融合表达 WISP 3 基因的真核表达载体的构建和鉴定

各重组质粒 WT-WISP 3/pEGFP-C 2, MUT^{1000 T/C}/

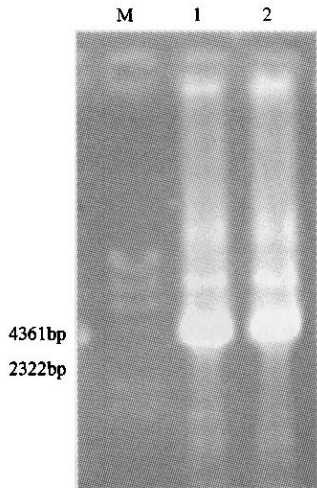


图 3 定点突变 PCR 扩增产物电泳图

1 :MUT^{1000 T/C}/pGEM-T easy ;2 :MUT^{840 delT}/pGEM-T easy ;M :λ-Hind III digest DNA Ladder

pEGFP-C 2 和 MUT^{840 delT}/pEGFP-C 2 经 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定 ,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析所得酶切片段为为 4.7 kb 和 1.1 kb ,与理论预计相符 (图 4) ,对突变体中插入片段进行测序分析 ,DNA 序列及读码框架完全正确。

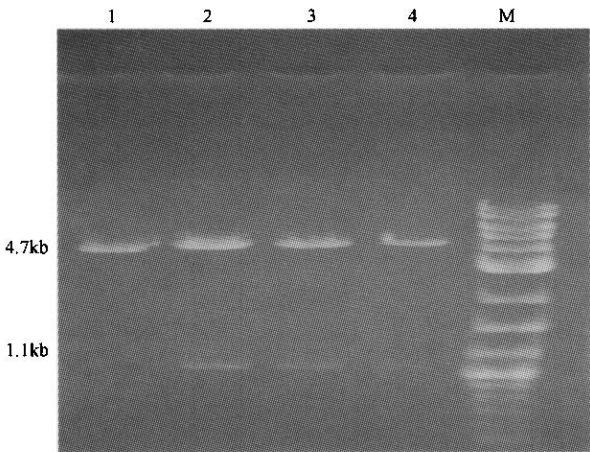


图 4 重组真核表达质粒经双酶切产物电泳图

1:pEGFP-C 2 载体;2:WT-WISP 3/pEGFP-C 2;3:MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2;4:MUT^{840 delT}/pEGFP-C 2;M:2-Log DNA Ladder

2.5 RT-PCR 结果

重组质粒 WT-WISP 3/pEGFP-C 2、MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 和 MUT^{840 delT}/pEGFP-C 2 转染组中 WISP 3 mRNA 的表达量明显高于空载体 pEGFP-C 2 组(图 5)。

2.6 荧光显微镜观察结果

采用荧光显微镜观察绿色荧光在 COS-7 细胞中的分布 ,以确定 WISP 3-GFP 融合蛋白在细胞中的分

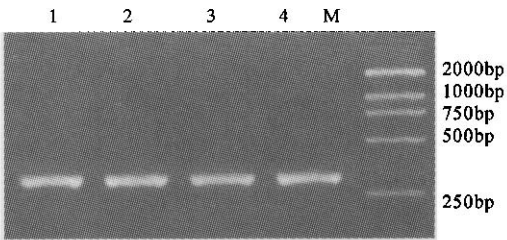


图 5. 1:β-actin 基因 mRNA 在 COS-7 细胞中的表达

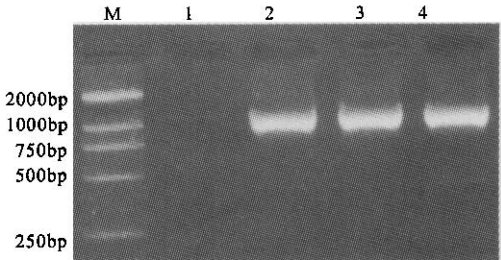


图 5. 2:β-WISP3 基因 mRNA 在 COS-7 细胞中的表达

图 5 瞬时转染各重组质粒的 COS-7 细胞

WISP 3 基因 mRNA 的表达

1 转染空白载体 pEGFP-C 2 2 转染重组质粒 WT-WISP 3/pEGFP-C 2 3 转染突变体质粒 MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 4 :转染突变体质粒 MUT^{840 delT}/pEGFP-C 2 (X) ;M :DL2000 DNA Mark

布和定位。瞬时转染 48 h 后 ,转染空白载体 pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中荧光分布于整个细胞(图 6) ;转染携带野生型 WISP 3 基因 WT-WISP 3/pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中绿色荧光均匀分布在细胞浆和细胞膜(图 7) ,转染突变体 MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 和 MUT^{840 delT}/pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中荧光呈斑点状染色和聚集现象(图 8、9)。

3 讨论

SEDT-PA 属于常染色体单基因隐性遗传性疾病^[9,10] ,由 WISP 3 基因突变引起 ,主要累及关节软骨 ,其病理特征为进行性关节僵硬和关节间隙变窄 ,关节软骨退行性变并随年龄增长加重。1998 年 Pennica 等^[11]首先克隆了 WISP 3 基因 ,并将其定位于 6 q 22~6 q 23。WISP 3 基因编码含 354 个氨基酸相对分子量约 40 kb 的分泌性蛋白^[12] ,由信号肽和 4 个富含半胱氨酸残基的结构域构成^[13,14]。作者曾报道的两例 SEDT-PA 患者的 WISP 3 基因出现复合杂合性基因突变(1000 T→C ,840 delT) ,且蛋白质三维结构预测分析发现^[15] :MUT^{1000 T→C} 导致其编码的丝氨酸被脯氨酸替代(Ser 334 Pro ,错义突变) ,Ser

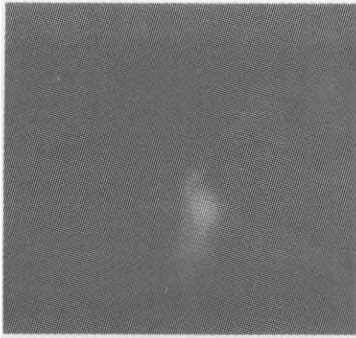


图 6.1 转染空白载体 pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中荧光均匀分布于整个细胞, × 200

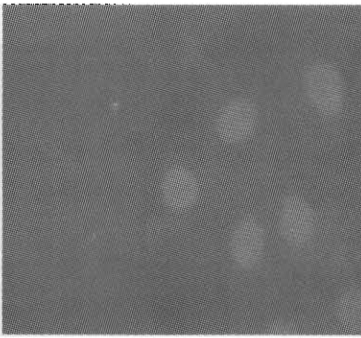


图 6.2 转染空白载体 pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中细胞核 DAPI 染色(与图 1.1 同一视野), × 200

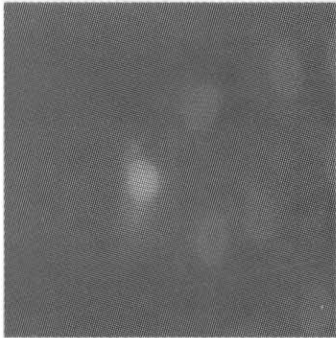


图 6.3 为图 6.1 和图 6.2 的叠加图片,提示 EGFP 蛋白荧光分布于整个细胞, × 200

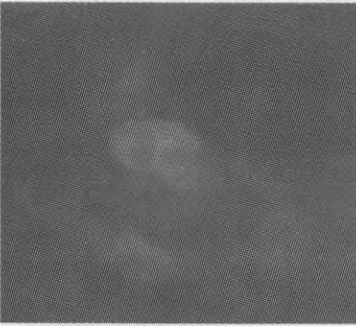


图 7.1 转染重组质粒 WT-WISP 3/ pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中荧光均匀分布于细胞浆和细胞膜, × 200

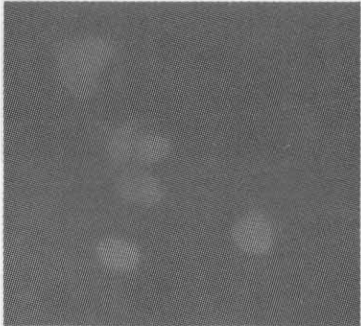


图 7.2 转染重组质粒 WT-WISP 3/ pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中细胞核 DAPI 染色(与图 7.1 同一视野), × 200

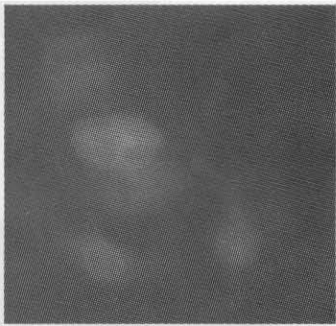


图 7.3 为图 7.1 和图 7.2 的叠加图片,提示野生型 WISP 3 蛋白定位于细胞浆和细胞膜, × 200

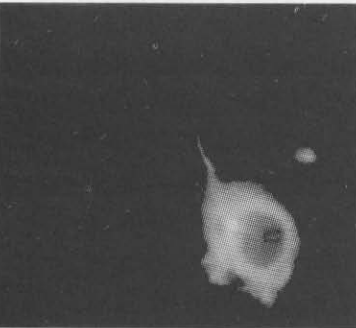


图 8.1 转染携带突变 WISP 3 基因质粒 MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中荧光在细胞浆中呈斑点状染色和聚集现象, × 200

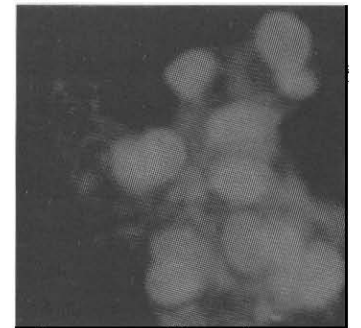


图 8.2 转染携带突变 WISP 3 基因质粒 MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中细胞核 DAPI 染色(与图 8.1 同一视野), × 200

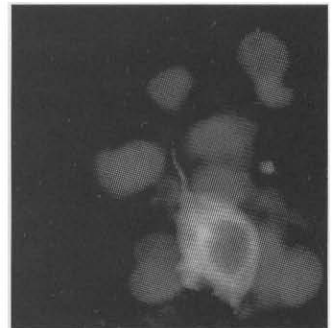


图 8.3 为图 8.1 和图 8.2 的叠加图片,提示 MUT^{1000 T/C}/pEGFP-C 2 蛋白在细胞浆内异常分布, × 200

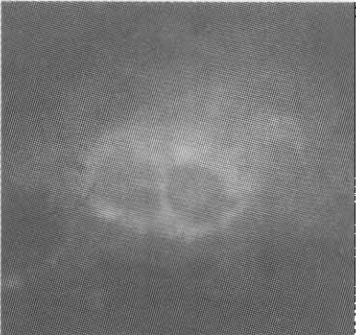


图 9.1 转染携带突变 WISP 3 基因质粒 MUT^{640 delT}/pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中荧光在细胞浆中呈斑点状染色和聚集现象, × 200

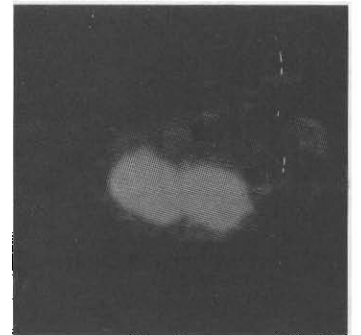


图 9.2 转染携带突变 WISP 3 基因质粒 MUT^{640 delT}/pEGFP-C 2 的 COS-7 细胞中细胞核 DAPI 染色(与图 9.1 同一视野), × 200



图 9.3 为图 9.1 和图 9.2 的叠加图片,提示 MUT^{640 delT}/pEGFP 的蛋白在细胞浆内异常分布, × 200

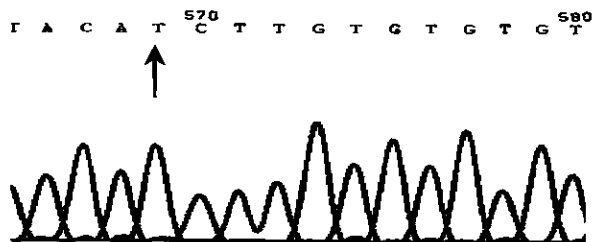


图 10.1 野生型 WISP 3 基因的全长 cDNA 测序图(部分)。与 Genbank (WISP 3 accession number NM_003880) 基因序列比较证实两者序列一致无突变

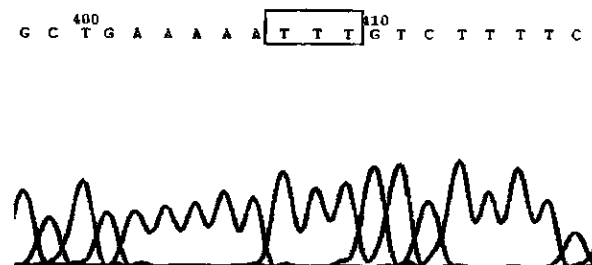


图 10.3 野生型 WISP 3 基因的全长 cDNA 测序图(部分)。与 Genbank (WISP 3 accession number NM_003880) 基因序列比较证实两者序列一致无突变

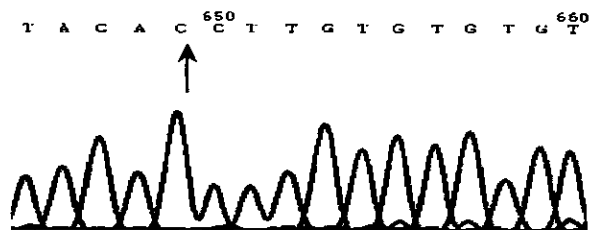


图 10.2 重组质粒 MUT^{1000 T/C} for pEGFP-C 2/pGEM-T easy 测序图(部分)。与 WT-WISP 3 for pEGFP-C 2/pGEM-T easy 比较证实成功引入 T-C 的错义突变(箭头所指), 与我们报道的 SEDT-PA 患者 WISP 3 基因序列(1000 T→C)比较证实, 两者序列一致无突变

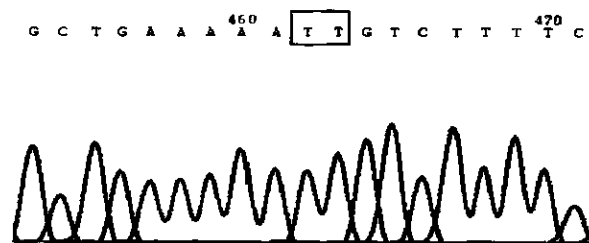


图 10.4 重组质粒 MUT^{840 delT} for pEGFP-C 2/pGEM-T easy 测序图(部分)。与 WT-WISP 3 for pEGFP-C 2/pGEM-T easy 比较证实成功引入 delT 缺失突变(见方框标注), 与我们报道的 SEDT-PA 患者 WISP 3 基因序列(840 delT)比较证实, 两者序列一致无突变

334 Pro WISP 3 蛋白质仅有 C 末端方向与野生型蛋白质相反, 而 MUT^{840 delT} 导致其编码的氨基酸残基序列出现移码突变, 在下游 31 个氨基酸残基后提前出现终止密码子, 所编码的蛋白质在 C 末端被截短 43 个氨基酸残基, 且这种突变蛋白质三维结构与野生型蛋白质相比, 从信号肽至第一个结构域 (IGFBP) 起始的 24 个氨基酸残基区域由一个单一环变成两个小的交叉环, 而且伴 C 末端明显缩短。但是目前 WISP 3 基因突变导致 SEDT-PA 发病的具体作用机制尚未阐明, 由于 WISP 3 含有信号肽, 可能是一种分泌性蛋白, 而分泌性蛋白必须通过细胞浆内一系列细胞器的处理才能分泌到细胞外发挥功能, 基因突变能否引起 WISP 3 细胞外分泌障碍呢? 本研究首先研究了 WISP 3 基因突变后细胞内亚定位的变化。

本实验构建了绿色荧光蛋白融合表达突变 WISP 3 基因的真核表达载体, 并转染真核细胞 COS-7。我们选用的是 pEGFP-C 2 载体, 其携带绿色荧光蛋白 EGFP 的是 GFP 的突变体, 是将 GFP 发光结构中 Ser 65 用 Thr 替代, Phe 64 用 Leu 替代使 GFP 的荧光强度提高了 35 倍, 而且激发后 16~24 h 仍可稳定地测定荧光, 并用人蛋白中编码的密码子代替相应的 wtGFP 中密码子而提高了 GFP 在哺乳动物细胞

中的表达率, 这些改变大大增加了 GFP 作为报告分子的检测灵敏度。

采用一步反向 PCR 致点突变的方法^[16]构建绿色荧光蛋白融合表达的 WISP 3 基因突变体。首先将野生型 WISP 3 基因克隆到环状质粒 pGEM-T Easy 上, 利用一对含突变的引物扩增整个环状质粒, 从而得到含突变的线性 DNA, 随后将线性 DNA 环化便得到完整的含突变的质粒。酶切鉴定和测序的结果提示, 插入载体 WISP 3 全长片段的 DNA 序列、大小、插入方向及读码框架完全正确, 成功构建了 WISP 3 基因与绿色荧光蛋白融合表达的真核表达载体。转染后的 RT-PCR 结果显示与空载体转染组相比, 转染各重组质粒的 COS-7 细胞中的 WISP 3 基因过量表达, 证明转染是成功的。在高效表达 WISP 3-GFP 融合蛋白后, 采用荧光显微镜观察绿色荧光在 COS-7 细胞中的分布, 结果表明野生型的 WISP 3-GFP 融合蛋白主要分布在细胞浆和细胞膜, 提示 WISP 3 蛋白定位在细胞浆和细胞膜。而突变的 WISP 3 蛋白在细胞浆中呈斑点状染色和聚集现象。

综上所述, WISP 3 蛋白是一种分泌蛋白质, 内质网是它合成的主要场所, 且其合成、转运、修饰和分泌等过程主要在细胞浆内完成, 最后通过胞吐作用被分泌到细胞外。突变 WISP 3 蛋白在细胞内的

定位变化,极有可能影响蛋白的细胞外分泌,从而影响 WISP 3 蛋白正常功能的行使,最终导致 SEDT-PA 的发生,其具体的作用机制有待于进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Wynne-Davies R , Hall C , Ansell BM. Spodyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy1 A “ new ” disorder of autosomal recessive inheritance1 .J Bone Joint Surg Br ,1982 ,64 :442-445.
- [2] Byrne PA , Rajan KT. Spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy mimicking juvenile chronic arthritis. Br J Rheumatol , 1998 ,37 :233-234.
- [3] Kocyigit H , Arkun R , Ozkinay F , et al. Spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy. Clin Rheumatol , 2000 , 19 :238-241.
- [4] Van Buggenhout G , de Smet L , Maroteaux P , et al. Progressive pseudorheumatoid dysplasia : report of a patient with symptoms present at birth. Genet Couns , 1998 , 9 :277-281.
- [5] Balci S , Aypar E , Kasapcopur O , et al. An eleven-year-old female Turkish patient with progressive pseudorheumatoid dysplasia mimicking juvenile idiopathic arthritis. Clin Exp Rheumatol , 2001 , 19 :759.
- [6] Hurvitz JR , Suwairi WM , Van Hul W , et al. Mutations in the CCN gene family member WISP 3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia. Nature Genet , 1999 , 23 :94-98.
- [7] Liao EY , Peng YQ , Zhou HD , et al. Gene symbol : WISP 3. Disease : spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy. Hum Genet , 2004 , 115 :169.
- [8] Liao EY , Peng YQ , Zhou HD , et al. Gene symbol :WISP 3. Disease :

spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy. Hum Genet , 2004 , 115 :174.

- [9] Spranger J , Albert C , Schilling F , et al. Progressive pseudorheumatoid arthritis of childhood (PPAC). A hereditary disorder simulating rheumatoid arthritis. Eur J Pediatr , 1983 , 14 :34-40.
- [10] Rezai-Delui H , Mamoori G , Sadri-Mahvelati E , et al. Progressive pseudorheumatoid chondrodysplasia : a report of nine cases in three families. Skeletal Radiol , 1994 , 23 :411-419.
- [11] Pennica D , Swanson TA , Welsh JW , et al. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in Wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumor. Proc Nat Acad Sci , 1998 , 95 :14717-14722.
- [12] Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and CCN family of genes : structural and functional issues. Mol Pathol , 2001 , 54 :57-79.
- [13] Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/ nephroblastoma overexpressed (CCN) family. Endocrine Reviews , 1999 , 20 :189-206.
- [14] Lau LF & Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators : the integrin connection. Experimental Cell Research , 1999 , 248 :44-57.
- [15] 彭依群 , 廖二元 , 顾慧敏 , 等. 复合杂合性 CCN6 基因突变致晚发型脊柱骨骺发育不良伴进行性骨关节炎病的关节软骨病理和分子病因研究. 中华医学杂志 , 2004 , 84 :1796-1803.
- [16] Chen K , Arnold FH. Turning the activity of an enzyme for unusual environments : sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. Proc Natl Acad Sci , 1993 , 90 :5618-5622.

(收稿日期 :2006-04-07)