

PKHD1基因的分子特征和生物功能研究进展*

付玉龙 吴冠青**

(中国医学科学院肿瘤医院, 北京 100021)

摘要 *PKHD1* (polycystic kidney and hepatic disease 1) 基因定位于人染色体 6p12.2. 该基因在基因组内约占 500 kb, 其中大约含 86 个外显子. 目前所知, 其最长 ORF 至少由 67 个外显子组成, 编码一个由 4 074 个氨基酸组成的单次跨膜受体样蛋白, 被称为纤囊素(fibrocytin/polycystin, FPC). *PKHD1* 是人类常染色体隐性遗传多囊肾病(autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD)的致病基因. 在小鼠中, FPC 于胚胎期 9.5 天可在发育中的神经管、气管、原肠管等含管道的器官中被检测到. 在人类, FPC 在胎肾即开始表达于输尿管芽, 并持续表达于输尿管芽分支演变为集合管的整个过程. 在成体肾, FPC 也主要表达于肾内集合管上皮细胞, 其亚细胞定位于上皮细胞的管腔面的顶端, 主要分布在细胞纤毛和基体附近. FPC 的主要生物功能目前仍未完全明了, 新近的研究表明, FPC 可能作为一个膜受体样蛋白, 将细胞外的信号通过结合与调节 TRPP2 (PKD2) 钙离子介导的通道传递到细胞内, 调控体内各管道上皮细胞分化、增殖、极化和移行, 从而促成各种生理管道的形成.

关键词 *PKHD1*, 纤囊素, 人类遗传性隐性多囊肾疾病, 结直肠癌

学科分类号 Q75

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00657

PKHD1 (polycystic kidney and hepatic disease 1) 是目前所知人类常染色体隐性遗传多囊肾病 (ARPKD, MIM 263200) 的唯一致病基因. ARPKD 是一种多发于儿童、以多囊肾 (polycystic kidney disease, PKD) 为表型的单基因遗传病. 其主要临床表现以双肾形成多个进行性增大囊肿, 并伴有明显的肝囊肿和硬化. 该病主要的并发症包括高血压 (60%~100%)、由肝硬化所致的门脉高血压 (30%~75%) 和慢性肺脏疾病 (11%). 此外, 生长迟缓、颅内动脉瘤及肾上腺皮质功能不全等也有报道. ARPKD 的发病率约为 1/20 000, 而其突变携带者 (杂合子) 约为 1/70. *PKHD1* 基因近几年才被克隆, 其产物纤囊素 (FPC) 的具体功能目前还不十分清楚. 已有的研究表明, 纤囊素参与了调控体内各管道上皮细胞的分化、增殖、极化和移行, 进而调节各种生理管道的形成. 据新近报道该基因的突变还可能与结直肠癌的发生有一定的相关. 这可能是因为该基因的突变使结直肠管道上皮细胞的分化和增殖失调所致. 本综述以本课题组的研究成果为主线, 总结了近年来关于 *PKHD1* 基因及其基因产物的研究成果, 以探索和揭示该基因产物生物功能的

研究现状和未来方向.

1 *PKHD1* 及其表达产物纤囊素 (fibrocystin/polycystin, FPC)

早在 1994 年 Zerres 等通过在 16 个 ARPKD 家系内的连锁分析, 首先将 *PKHD1* 基因定位于人染色体 6p21-cen 之间. 1995 年 Guay-Woodford 等利用一组临床表型较明显的 ARPKD 家系进行连锁分析, 将该基因的定位缩小至该染色体 3.8 cM 范围内的 6p21.1-p12 区. 随后的研究表明, 无论该疾病的表现度如何, 都是由同一个基因突变引起的, 并将该基因定位于 D6S1714 和 D6S1024 之间的 1 cM 范围内. 2002 年 3 个不同的研究组采用定位克隆的方法几乎同时克隆了该致病基因^[1~3]. *PKHD1* 基因在基因组内约占 500 kb, 其中大约含 86 个外

* 长江学者特聘教授计划和国家自然科学基金 (30572205, 30672483) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-87788689, E-mail: drguanqing@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-09-22, 接受日期: 2008-11-27

显子. 其最长的 ORF 由 67 个外显子构成一个长约 16 kb 的转录本, 并编码一个由 4 074 个氨基酸组成的单次跨膜蛋白, 被称为纤囊素 (fibrocystin/polycystin, FPC) [1~3].

人组织的 RNA 印迹表明, 在肾组织能检测到强烈但很弥散的带, 在肝脏也能检测到弥散但较肾组织微弱的带 [1~3], 加之该基因在基因组中覆盖范围很大, 含外显子较多, 所以推测 *PKHD1* 有可能由多种剪接方式从而构成多种不同的异构体. 本研究所克隆的 *PKHD1* 较另外两个课题组克隆的 *PKHD1* 在羧基端有明显不同, 从而进一步证实了该基因具有多种转录本 [4].

据预测显示, 纤囊素是一个受体样的单次跨膜蛋白, 羧基端位于胞内, 由 192 个氨基酸组成, 并含有 3 个潜在的酪氨酸激酶磷酸化位点, 从而提示该蛋白质可能介导细胞内外信号的传递. 由约 3 900 个氨基酸组成的胞外区从氨基端顺序排列着信号肽、7~8 个串联的 IPT/TIG (Ig-like, plexins transcription factors) 结构域以及由 9~10 个 PbH1 (parallel β -helix repeats) 重复序列组成的 TEME 同源结构 [4]. IPT/TIG 结构域和 PbH1 重复序列的具体功能还未知, 前者在免疫球蛋白样蛋白质家族中常见, 作为细胞外受体参与蛋白质间的相互作用, 后者在含有平行 β -螺旋重复结构的蛋白质家族中常见, 存在于细胞表面催化多糖形成 [5]. 在结构上 FPC 属于一个新的蛋白质家族, 最近发现了该蛋白质家族的另一个成员 fibrocystin-L (FPC-L), 基因名为 PKHDL1, 其与 FPC 一致性和相似性分别达 25% 和 41.5% [4].

小鼠的同源基因 *Pkhd1* 也已被克隆 [5]. 原位杂交结果表明 *Pkhd1* 定位于小鼠 1 号染色体 A 带, 并在小鼠基因组中占据约 550 kb 的范围 [5, 6]. 该基因至少含有 67 个非重叠的外显子, 最长的 ORF 编码由 4 060 个氨基酸组成的蛋白质. 人和小鼠的 FPC 在结构和序列上都非常保守, 蛋白质序列整体一致性和相似性分别达 72% 和 82%, 而胞内区不是很保守, 一致性为 55% [5]. 在其他一些哺乳动物如恒河猴、大鼠等都存在其同源基因, 但在鱼类和其他进化上更早的物种中并没有发现其同源基因.

2 纤囊素在亚细胞中的分布

确定蛋白质的组织表达及亚细胞定位对揭示其功能十分重要. 对于 FPC 的亚细胞分布, 用不同的抗体所得的结论略有不同. FPC 氨基端单克隆抗

体 hAR-Nm3G12 位于 MDCK 和 IMCD3 细胞的基体内, 在纤毛轴丝、微绒毛和质膜上也有表达 [9]. 运用 FPC 蛋白羧基端的一株单抗 (FB5) 进行免疫荧光检测表明, FPC 定位于 MDCK 细胞的纤毛轴丝内, 另一株羧基端的单抗 (803) 免疫荧光检测表明, FPC 仅位于 MDCK 细胞的基体内, 而 FPC 蛋白氨基端的一株单抗 (804) 免疫荧光检测表明, FPC 在基体和轴丝内都有分布. 由于 *PKHD1* 的 RNA 有多种剪接形式, 从而有可能产生多种异构体. 不同的异构体也可能有不同的定位并行使不同的功能, 因而各种抗体可能显示不同的亚细胞定位. 值得一提的是, 我们发现 ARPKD 致病基因 *PKHD1* 的产物 FPC 与常染色体显性遗传多囊肾 (ADPKD) 致病基因 PKD2 的产物 Polycystin-2 (PC2) 共定位于纤毛和基体内, 这一结果提示这两种致病基因产物有可能相互关联 [9].

3 纤囊素在组织器官生长发育中的表达

在没有制备 FPC 的特异性抗体之前, 多个研究组运用 RNA 印迹或原位杂交的方法检测了其 mRNA 的分布情况. 不同实验室采用的 RNA 印迹探针不同, 但得出的结论大同小异. *PKHD1* 高表达于人胎肾和成年肾, 在肝和胰腺也有适度表达, 在心脏、脑、肺、胎盘和肌肉等组织都没有检测到其表达. 用小鼠组织 RNA 杂交也得到相同的结论 [1~3]. 用小鼠 *Pkhd1* 的 5 号外显子为探针原位杂交研究 *Pkhd1* 在小鼠发育过程中的表达情况, 结果表明, *Pkhd1* 在鼠胚 E12.5 时即开始高表达于正在分支输尿管芽, 并持续至形成集合管, 在生后肾原基、逗号小体、S 小体和肾小球未见表达. 在肾外组织中, *Pkhd1* 还高表达于肝内外胆管和一些大型血管的管壁, 另外, 在用 41 号外显子探针还能在发育中的胰腺管、气管、支气管和骨骼肌中检测到微弱表达.

最近, 多个研究组分别制备了能识别 FPC 不同位点的单抗或多抗, 并以这些抗体通过免疫组化、免疫荧光或 Western blot 研究了 FPC 的表达. 本课题组制备了能分别识别 FPC 三个不同位点的单抗和多抗, 利用这些抗体免疫组化表明, 在小鼠的发育过程中, E9.5 时 FPC 即开始表达于神经管上皮细胞, E10.5 出现于支气管和原肠腔, E11.5 时 FPC 表达于中肾导管和正在发育的输尿管芽, 随着后肾的发育, FPC 特异表达于正在分支的输尿管芽和正在形成的集合管, 而在逗号小体、S 小体

和肾小球内未见表达^[5]。可见在胎肾发育过程中免疫组化和原位杂交得出的结论是一致的。在成熟小鼠肾内, FPC 也主要表达于集合管上皮细胞, 在近曲小管、亨利祥升支的上皮细胞顶端和基底膜端也有微弱表达, 在成人肾和大鼠肾组织也得到相似的表达模式。除肾脏外在胆管、胰腺管内也有表达, 在其他一些管状结构如腮腺管、乳腺管和肠腔上皮细胞并未见到 FPC 的表达。

本课题组新近建立了一个小鼠 *Pkhd1* 基因敲除小鼠模型, 该模型小鼠 *Pkhd1* 基因的 15 号外显子内融合了绿色荧光蛋白(GFP)序列, 同时删除 16 号外显子, 达到破坏 *Pkhd1* 读码框的目的。利用该打靶策略, *Pkhd1* 将编码一个融合 GFP 标签、大小约为 130 ku 的蛋白 FPCΔ-GFP。利用 GFP 抗体可探知由小鼠 *Pkhd1* 自身启动子表达的 FPCΔ-GFP 融合蛋白在小鼠组织器官中的分布。GFP 抗体免疫组化或免疫荧光显示, FPC 分布于肾集合管、胃肠道、气管/支气管等管道结构的上皮细胞, 在脑室的室管膜细胞也能检测其表达^[6]。这为 FPC 的组织与器官的分布提供了最直接的证据。

4 ARPKD 患者中 *PKHD1* 的突变

多囊肾病(ARPKD)的临床表征在家族内外都有较大差异。约 50% 患者在胎儿期已经发病, 约 30% 出生时伴随呼吸和肾功能障碍而死亡。有人认为 *PKHD1* 突变的多样性可能是 ARPKD 临床表征多样性的原因。目前已经报道了至少 300 种 *PKHD1* 突变 (<http://www.humgen.rwth-aachen.de>)。其中包括 184 个错义突变, 37 个无义突变, 62 个插入或缺失(移码)突变以及 21 个经典剪接位点突变。这些突变几乎分布于整个 *PKHD1* 基因, 没有明显的突变热点或成簇分布现象, 仅有一个多发位点(T36M)在多个群体中发现。由于该基因本身较大, 并且其 RNA 有多种剪接方式, 外加突变的多样性, 所以研究者们还难以明确阐明突变与疾病表型之间的关系。*PKHD1* 突变位点与临床症状之间的初步分析表明, 编码截短的突变具有比错义突变患儿表现出更为严重的临床表型, 双 *PKHD1* 等位均含有截短突变的患儿大多在围产期和新生儿期即死亡, 而度过新生儿期能存活下来的患儿多携带有至少一个错义的突变^[7]。

5 纤囊素的功能

由于 *PKHD1* 突变后导致 ARPKD, 因而该基

因产物 FPC 的功能研究受到多个课题组的重视, 并从分子、细胞和动物等多层面对其进行了研究。本课题组利用 RNA 干涉的方法下调 *Pkhd1* 在 IMCD3 细胞内的表达后发现, IMCD3 细胞在三维培养条件下不能形成管状结构, 细胞间及细胞与胞外基质间黏附异常, 细胞骨架紊乱, 细胞增殖和凋亡异常, 细胞的原发纤毛变短及减少^[8]。另外, 在 HEK-293T 细胞内抑制 *PKHD1* 的表达后发现, 胞内钙离子浓度降低, 并导致 EGF 诱导的 ERK1/2 的活化从而引起细胞异常增殖。

最近, 本课题组通过免疫共沉淀发现, FPC 的羧基端与 PC2 的氨基端存在相互作用, 证实了 FPC 和 PC2 可能共存于同一个蛋白质复合体中^[9]。FPC 通过胞内羧基端与 PC2 的胞内氨基端相互作用调控 PC2 的表达, PC2 是一个钙通道调节蛋白, FPC 可能通过调控 PC2 的活性调节胞内的钙稳态, 进而调节细胞的分化、增殖和凋亡等。因而 ARPKD 和 ADPKD 这两种病理形态不同的疾病其发病机制可能经由相同或至少部分相同的信号通路。最近我们发现, FPC 的胞内羧基端和 PC2 的胞内氨基端直接相互作用, 从而提供了这两种疾病蛋白质相互作用的分子基础^[9]。

最新研究表明 FPC 还可能与平面细胞极化(planar cell polarity, PCP)的形成有关。在肾脏发育过程中纤毛-基体-中心体复合物通过各种信号通路调控其管道沿其轴向延伸而不是径向扩增。FPC 作为纤毛-基体-中心体复合物的组成型蛋白, 可能直接参与了这一信号通路。在正常的肾集合管上皮细胞有丝分裂过程中, 细胞纺锤体的方向与集合管的轴向是平行的, 95% 的细胞纺锤体与集合管轴之间的夹角小于 34°, 平均角度为 11°, 而在 *Pkhd1* 突变的大鼠模型 Pck 的集合管内, 细胞纺锤体不再具有其特定的方向, 23% 的细胞纺锤体与集合管轴夹角在 30°和 90°之间。

动物模型的研究可以深入了解 *PKHD1* 基因产物在生长发育中的功能。目前已有 7 种 ARPKD 啮齿类动物模型的报道(表 1)。除了 Pck 大鼠为自发突变产生的大鼠模型外, 其他都是通过基因打靶产生的小鼠动物模型。尽管这些动物模型都具有 *Pkhd1* 基因的突变, 但它们的表型并不完全一致(表 1)。这一结果似与 ARPKD 患者的临床表征多样性相一致。

Table 1 *Pkhd1* gene mutant rodent models
表 1 已报道的 *Pkhd1*基因突变动物模型

突变位置	表型	参考文献
缺失 exon2	肝肾胰腺异常, 胆管进行性扩张, 肝囊化和纤维化; 在较老的雌性小鼠近端小管扩张, 但在雄性并不受影响. 胆管内纤毛变短, 并出现分支.	[10]
Exon1-3 被 LacZ 取代	肝肾囊化, 肝门周纤维化, 胆管扩张, 胰腺外分泌管扩张.	[11]
缺失 exon40	胆管异常, 未见肾结构异常.	[12]
缺失 Exon4	FPC 表达下调 30%, 肝内胆管扩张, 肝进行性囊化, 肝门周纤维化, 胰腺囊化, 脾肿胀, 肾的结构和功能未受影响.	[13]
缺失 Exon3-4	肾囊化, 随着年龄的增加严重, 胆管扩张, 胰腺囊化.	[14]
Exon15 插入 GFP, exon16 缺失	肝肾囊化, 胰腺囊化, 胆管扩张, 纤毛数量减少并变短.	[6]
PCK 大鼠, 至少 exon36 缺失	肝肾囊肿, 胰腺正常, 胆管扩张, 轻度肝门纤维化,	[15]

6 纤囊素与癌症

最近, Sjöblom 等^[15]通过大规模的癌细胞基因组测序和严格的统计方法, 系统地研究了基因突变与乳腺癌和结直肠癌的关系. 该研究组分析了 13 000 个编码蛋白在乳腺癌和结直肠癌(各 11 例)中的突变情况, 发现每个肿瘤个体约累积 90 个突变, 但只有一部分突变与肿瘤的发生相关. 通过严格的排查共得到了 189 个 CaMP 值(cancer mutation prevalence score)大于 1.0 的基因, 即被认为是肿瘤相关基因. 这些基因功能涉及细胞黏附、信号转导和转录调控等. 其中 *PKHD1* 在结直肠癌的细胞黏附和运动这一类基因中以 3.5 的最高值位居第一. 这项研究结果提示 *PKHD1* 基因与结直肠癌有可能高度相关. *PKHD1* 在结直肠癌的发生发展过程中发挥何种重要作用有待于进一步的研究.

7 展 望

目前的研究表明, 纤囊素(FPC)是一个与上皮细胞的纤毛 / 基体相关的蛋白质. 该蛋白质与一个钙通道调节蛋白 PC2(TRPP2)相结合, 通过调控 PC2 的活性调节胞内的钙稳态, 进而由钙信号通路调控细胞的分化、极性、增殖和凋亡等. 纤囊素可能表达多种异构体, 这些异构体的定位及其功能有可能也不同. 未来的研究将着重于: a. 这些异构体的定位及其功能; b. FPC 各功能结构域的作用; c. FPC 与 *Pkd1* 基因产物 PC1 的关系; d. FPC 的配基以及其在器官组织中管道形成中的作用. 多囊肾疾病是一种常见的以成人和婴幼儿为主要发病人群的遗传性疾病, 由于目前还没有有效的治疗方法, 一旦发病往往给家庭带来极大的经济和心理负担. 深入研究疾病致病基因的功能将有助于寻找新的有效的治疗药物和途径.

参 考 文 献

- 1 Xiong H, Chen Y, Yi Y, *et al.* A novel gene encoding a TIG multiple domain protein is a positional candidate for autosomal recessive polycystic kidney disease. *Genomics*, 2002, **80**(1): 96~104
- 2 Christopher J W, Marie C H, Sandro R, *et al.* The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet*, 2002, **30**(3): 259~269
- 3 Onuchic L F, Furu L, Nagasawa Y, *et al.* PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet*, 2002, **70**(5): 1305~1317
- 4 Hogan M C, Griffin M D, Rossetti S, *et al.* PKHD1, a homolog of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene, encodes a receptor with inducible T lymphocyte expression. *Hum Mol Genet*, 2003, **12**(6): 685~698
- 5 Zhang M Z, Mai W, Li C, *et al.* PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(8): 2311~2316
- 6 Kim I, Fu Y, Hui K, *et al.* Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol*, 2008, **19**(3): 455~468
- 7 Sharp A M, Messiaen L M, Page G, *et al.* Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts. *J Med Genet*, 2005, **42**(4): 336~349
- 8 Mai W, Chen D, Ding T, *et al.* Inhibition of *Pkhd1* impairs tubulomorphogenesis of cultured IMCD cells. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**(9): 4398~4409
- 9 Kim I, Li C, Liang D, *et al.* Polycystin-2 expression is regulated by a PC2-binding domain of intracellular portion of fibrocystin. *J Biol Chem*, 2008, **283**(46): 31559~31566
- 10 Woollard J R, Punyashtiti R, Richardson S, *et al.* A mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease with biliary duct and proximal tubule dilatation. *Kidney Int*, 2007, **72**(3):328~336
- 11 Williams S S, Cobo-Stark P, James L R, *et al.* Kidney cysts, pancreatic cysts, and biliary disease in a mouse model of autosomal

- recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 2008, **23**(5): 733~741
- 12 Moser M, Matthiesen S, Kirfel J, *et al.* A mouse model for cystic biliary dysgenesis in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hepatology*, 2005, **41**(5): 1113~1121
- 13 Gallagher A R, Esquivel E L, Briere T S, *et al.* Biliary and pancreatic dysgenesis in mice harboring a mutation in *Pkhd1*. *Am J Pathol*, 2008, **172**(2): 417~429
- 14 Lager D, Qian Q, Bengal R, *et al.* The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int*, 2001, **59**: 126~136
- 15 Sjöblom T, Jones S, Wood L D, *et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 2006, **314**(5797): 268~274

Molecular Characteristics and Functions of *PKHD1**

FU Yu-Long, WU Guan-Qing**

(Cancer Institute(Hospital), Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100021, China)

Abstract *PKHD1* (polycystic kidney and hepatic disease 1), the causal gene of human autosomal recessive polycystic kidney disease(ARPKD), is located on chromosome 6p12.2 and covers a genomic region of ~500 kb. *PKHD1* is among the largest human genes, with a minimum of 86 exons from which multiple transcripts may be generated by alternative splicing. The longest continuous open reading frame consists of 12 222 bp, encoding a 4 074 amino acid protein, designated as fibrocystin/polyductin(FPC). FPC is predicted to be a receptor like protein, with single transmembrane domain and a short cytoplasmic tail. The expression of mouse FPC can be detected in various duct-containing organs. In mouse embryogenesis, FPC appears in developing neural tube, bronchi, and the primordial gut as early as the day of E9.5. In fetal human kidneys, high level of FPC expression is present in ureteric bud and its expression continues throughout the process of renal tubuobranching. In adult human kidneys, FPC mainly expresses in the epithelia of renal collecting ducts. FPC is subcellularly localized to the primary cilia and concentrated on the basal bodies in renal epithelial cells. The detail function of FPC is still unrevealed, most recent studies demonstrate that FPC, as a receptor, may transduce cell signal by interacting with a *trp* superfamily TRPP2 (PKD2), which is a causal gene for ADPKD, and mediate intracellular calcium homeostasis to regulate differentiation, proliferation, migration and polarity of various duct/tubular epithelia, in turn, to modulate the formation of all physiologic ducts, tubules and tracts.

Key words *PKHD1*, FPC, ARPKD, colorectal cancer

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00657

*This work was supported by grants from Yangzi Professor Grant and The National Natural Science Foundation of China(30572205, 30672483).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-87788689, E-mail: drguanqing@yahoo.com.cn

Received: September 22, 2008 Accepted: November 27, 2008