

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.001

破骨细胞钠氢转运蛋白集中于线粒体中表达

黄晓斌, 仲蕾蕾

(重庆大学农学及生命科学研究院, 重庆 400045)

【摘要】目的:把 RAW264.7 和人外周血 CD14⁺ 诱导成破骨样细胞,检测破骨细胞在成熟过程中钠氢转运蛋白 2(Na⁺-H⁺ Antiporter 2, NHA2)的转录表达情况,并定位其表达位置。方法:细胞因子 RANKL、M-CSF 在体外诱导 RAW264.7 和人外周血 CD14⁺细胞发育成破骨样细胞;RT-PCR 检测 NHA2 在诱导过程中转录水平上所发生的变化;Western blot 检测诱导前后此蛋白表达情况;细胞原位荧光染色对其表达进行细胞精确定位。结果:RAW264.7 和人外周血 CD14⁺ 细胞被 RANKL、M-CSF 诱导成破骨样细胞;RT-PCR 结果显示 NHA2 随着破骨细胞的分化成熟转录水平不断加强;Western blot 结果显示此蛋白只表达于成熟的破骨细胞中;细胞原位荧光染色结果显示这个蛋白主要表达于成熟破骨细胞的线粒体中。结论:NHA2 作为盐离子载体主要表达于成熟破骨细胞的线粒体中,通过控制线粒体盐离子的代谢平衡来影响破骨细胞的发育分化。

【关键词】破骨细胞;钠氢转运蛋白 2;线粒体;细胞原位荧光染色

【中国图书分类法分类号】R393

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-14

Na⁺-H⁺ antiporter mainly expressed in the mitochondria of mammalian osteoclast

HUANG Xiaobin, ZHONG Leilei

(The Institute of Agriculture and Life Science, Chongqing University)

【Abstract】Objective: To induce the RAW264.7 and human blood CD14⁺ cells to differentiate into osteoclasts, to detect the transcription and expression of the osteoclast during its differentiation and maturation, and define the expressing position of Na⁺-H⁺ antiporter 2. **Methods:** The RAW264.7 and human blood CD14⁺ cells were induced to differentiate into osteoclasts by RANKL and M-CSF in vitro; the transcription of NHA2 was detected by RT-PCR during induction; the antiporter expression was tested by Western blot before and after induction, and the exact position of its expression was defined by immunocytochemistry. **Results:** The RAW264.7 and human blood CD14⁺ cells were differentiated into osteoclasts by RANKL and M-CSF; the RT-PCR result indicated the transcription level was increased during osteoclast differentiation and maturation; the Western blot test revealed the antiporter was only expressed in the matured osteoclast; and the immunocytochemistry experiment told us that the antiporter was mainly expressed in the mitochondria of osteoclast. **Conclusion:** Na⁺-H⁺ Antiporter 2 was mainly expressed in the mitochondria of matured osteoclast as a salt antiporter, which will affect the development and differentiation of osteoclast through controlling the metabolized balance of mitochondria.

【Key words】osteoclast; Na⁺-H⁺ Antiporter 2; mitochondria; immunocytochemistry

哺乳动物细胞中都有一套离子载体系统,根据细胞内外的离子浓度、pH 值和细胞自身发育的需要,不断调节着各种离子代谢平衡。其中一个 pH 依赖的阳离子/质子载体(Cation proton antiporter, CPA)系统主要调节着细胞内外的单价阳离子浓度和 pH 值,这些阳离子包括:Na⁺、H⁺、K⁺、NH₄⁺等,这对细胞的正常发育过程是非常重要的。CPA 家族成员含 333~900 个氨基酸左右,都有 10~14 段跨膜片段,可分为 CPA1 和 CPA2 亚家族^[1-3]。

作者介绍:黄晓斌(1980-),男,讲师,博士,

研究方向:分子生物学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31100029);重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2011BB1097)。

近几年来,对 CPA1 家族的 Na⁺-H⁺交换泵(Na⁺-H⁺ exchanger, NHE)研究比较多,所有 NHE 亚型 N 端都比较保守,由 10~12 个跨膜的 α 螺旋组成,在离子交换中发挥作用,C 端通过跨膜域调节其转运活性。NHE 家族不同亚型之间也有着差异,这主要是由于从跨膜段到胞质部分碱基序列的不同引起的^[4-5]。NHE 家族成员与多种疾病有关,参与肿瘤细胞内 pH 值的调节,激发肿瘤细胞的生长与增殖,促进其恶性转化及转移。但目前,对 CPA2 家族还知之不多。

钠氢转运蛋白 2(Na⁺-H⁺ Antiporter 2, NHA2)是 HsNHA2 在小鼠中的同源类似物,在所有多细胞生物研究中都有发现,属于 CPA2 家族^[6-8]。整个 NHA2 cDNA 开放阅读框长 1 641 bp,编码的蛋白由 547 个氨基酸组成,小鼠中 NHA2 位于其 3

号染色体,q3G 区域,有 13 个外显子,大约 55 kD。体内外实验均已证明 NHA2 显著地表达于破骨细胞中^[9],但对其在细胞内的具体定位还不清楚。本实验欲在哺乳动物细胞中对 NHA2 基因表达进行定位研究,将有助于更好地理解各种盐离子在骨的生长发育中的平衡机制,进一步为骨形态建成方面提供分子机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 RAW264.7(TIB-71,ATCC);人外周血单核细胞。

1.1.2 主要细胞培养用品 细胞培养基:a-MEM (GIBCO),DMEM(JRH Biosciences,Lenexa,KS);胎牛血清(FBS):(Bio Whitaker);RANKL(PeproTech);HuRANKL(PeproTech Inc.);M-CSF(PeproTech Inc.);Hu M-CSF(PeproTech Inc.)。

1.1.3 主要生化试剂 RNA 酶(Invitrogen);苯甲基磺酰氟 PMSF(Sigma);Taq DNA 聚合酶(Invitrogen);AMV 逆转录酶(Invitrogen);1 kb DNA Marker(Invitrogen);100 bp DNA Ladder(Invitrogen);预染 protein Marker(Invitrogen);普通 PCR 试剂盒(Invitrogen);Trizol RNA 提取试剂(Invitrogen);线粒体分离试剂盒(Sigma);MitoTracher 线粒体染色试剂盒(Invitrogen);兔源抗线粒体抗体(Invitrogen);兔 Anti-NHA2 多克隆抗体(Abcam);鼠抗兔 IgG HRP 抗体(Invitrogen);鼠抗兔 IgG-FITC 抗体(Invitrogen);BCA 蛋白检测试剂盒(PIERCE);TRAP 染色试剂盒(Sigma);Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat anti mouse IgG(H+L)(Invitrogen);Poly-L-lysine solution(1)(Sigma);Prolong Gold antifade reagent(Invitrogen);DAPI(Sigma);Rabbit Anti-mouse IgG HRP(Invitrogen)。

1.1.4 NHA2 引物 上游 5'-GAA CTA CGG GAA GAG A-GA GTC AT-3';下游 5'-GGG ATA TTC CTC AAG AGA AAC C-3'。

1.2 方法

1.2.1 诱导 RAW264.7 成破骨样细胞 选用 DMEM 作为 RAW264.7 细胞培养基(10%FBS),接种细胞;待其生长良好后,用细胞刮刮下细胞并计数;向 12 孔细胞培养板中每孔加入 1 ml DMEM/FBS 培养基,每孔种约 25 000 个细胞;加细胞因子 RANKL 到每孔,使终浓度为 50 ng/ml;诱导的第 3 天换培养基并加新鲜 RANKL;第 5 天停止。

1.2.2 提取 RNA 分批收集好 RANKL 诱导不同阶段 RAW264.7 细胞及未经 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞,加入 400 μ l TRIAZOL;室温放置 10 min;加入 80 μ l chloroform(终浓度 20%);充分混合 15 s;4℃,14 000 r/min 离心 10 min;小心吸取上层约 200 μ l 放于 1 根新管;加入 120 μ l 异丙醇(终浓度 60%);充分混合后,14 000 r/min 离心 15 min;倒掉液体,可看见管底白色 RNA 小团块;加入 100 μ l 70%酒精洗涤;14 000 r/min 离心 5 min;空气中干燥 3 min;加入 40 μ l DEPC 水溶解 RNA;测量 OD₂₆₀nm/OD₂₈₀nm。

1.2.3 反转录 PCR(RT-PCR) 首先将 RAW264.7 不同诱导阶段细胞提取的 RNA 按照 SuperScript II Reverse Transcrip-

tase 试剂盒操作说明逆转录出 cDNA,然后取 1/25 cDNA 作为 PCR 模板,用 Platinum PCR Supermix 试剂盒,beta-actin、Cathepsin K、NHA2 引物(400 bp)按操作步骤做 PCR。

1.2.4 线粒体蛋白及核蛋白提取 从培养皿上用细胞刮刮下经过 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞,600 $\times$ g 离心 5 min;去掉上清液,重新悬浮细胞于冰 PBS 中,600 $\times$ g 离心 5 min,用线粒体分离试剂盒按如下步骤提取出线粒体:去掉上清液,加入 2 ml 1 $\times$ Extraction Buffer(1 ml 5 $\times$ Extraction Buffer,4 ml 超净水,50 μ l 蛋白酶抑制剂 cocktail);在冰上放置 10~15 min;用磨棒来回碾压 30 次,600 $\times$ g 离心 10 min(这时最下面应该没有被碾碎的细胞);把上清液转移到 1 个新塑料管,然后在 11 000 $\times$ g 离心 10 min(这时上清是细胞核及碎片,下面是线粒体);重悬线粒体于 50 μ l PBS;加入 200 μ l 储存 Buffer,在冰上放 15 min;然后用 BCA 试剂盒测蛋白浓度。

1.2.5 蛋白免疫印迹分析(Western blot) 分别收集好 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨样细胞线粒体蛋白、核蛋白、总蛋白,预先用 BCA 试剂盒定量,取等量蛋白,加入上样缓冲液,100℃煮沸 5 min 变性,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。每孔上样 30 μ g 总蛋白。分别用 NHA2 兔多克隆抗体、beta-actin 兔抗作为第一抗体,鼠抗兔 IgG HRP(1:500)作为第二抗体。孵育、洗膜后,加入显影液,然后在 X-RAY 中曝光。

1.2.6 从人外周血中分离 CD14⁺细胞诱导成破骨样细胞 抽取 15 ml 健康人血液;根据试剂盒操作说明分离出 CD14⁺细胞。对细胞进行计数,加入 2 ml alpha-MEM;取出 1 个 12 孔板,向孔中放入圆形盖玻片;加入 500 μ l alpha-MEM 细胞液到培养孔中;加入 3.75 μ l 细胞因子 M-CSF 和 4.5 μ l Hu-RANKL,37℃培养;第 4 天和第 6 天换液 alpha-MEM/M-CSF/HuRANKL;第 7 天固定细胞,首先去掉培养基,让玻片自然干掉,加入 1 ml PFA 溶液,放置 10 min 后吸掉,加入适量 PBS 到玻片上,4℃保存。

1.2.7 对经过诱导的 CD14⁺细胞做免疫荧光染色(Immunocytochemistry) 从人外周血中分离到的 CD14⁺细胞经过 M-CSF 和 HuRANKL 诱导后,分化成破骨细胞,对破骨细胞用 MitoTracher(染线粒体)、NHA2 抗体、DAPI(染细胞核)做免疫细胞荧光染色,操作步骤如下:首先用 PBS 洗细胞 1 次;加入 200 nmol/L MitoTracker/PBS 到细胞中,37℃室温孵育 30 min;PBS 洗 1 次;加入 1 ml 4% PFM 室温固定 10 min;PBS 洗 1 次;用 PBS/2%BSA 在常温孵育 30 min;PBS 洗 1 次;加入适量兔源一抗 NHA2(稀释 200 倍于 PBS/2%BSA 中),室温孵育 1 h;PBS 洗 3 次;加入抗兔带有 FITC 荧光标记的二抗,室温孵育 1 h;PBS 洗 3 次;DAPI 染细胞核 5 min,PBS 洗 3 次;放在载玻片上封好;共聚焦显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 RANKL 可诱导 RAW264.7 细胞形成成熟破骨样细胞

破骨细胞的骨吸收与成骨细胞的骨形成之间的平衡是维持正常骨重建的基础。破骨细胞的活性改变是导致各种代谢性骨病的主要原因,通过 RANKL 诱导破骨前体细胞是获

得成熟破骨细胞的一种较好方法。本实验用 RANKL 诱导其形成成熟破骨细胞来研究 NHA2 的表达情况。结果证明, RANKL 可诱导 RAW264.7 细胞形成成熟破骨样细胞, 诱导 4 d 后, 可以看到 TRAP 阳性多核细胞。

2.2 NHA2 在成熟破骨细胞中表达

RAW264.7 细胞经 RANKL 诱导分化成破骨样细胞的过程中, 为确定 NHA2 转录及表达情况, 做 NHA2 逆转录 PCR。从 RANKL 开始诱导 RAW264.7 第 1 天起, 每天收集细胞提取 RNA, 然后用 β -actin、Cathepsin K、NHA2 做反转录 PCR。RT-PCR 结果表明, RAW264.7 细胞在细胞因子 RANKL 诱导前后均表达破骨细胞成熟标志基因 Cathepsin K。RAW264.7 细胞在细胞因子 RANKL 诱导后随着细胞不断分化为破骨细胞, NHA2 的表达也不断增加 (如图 1), 表明 NHA2 是表达于破骨细胞分化晚期。

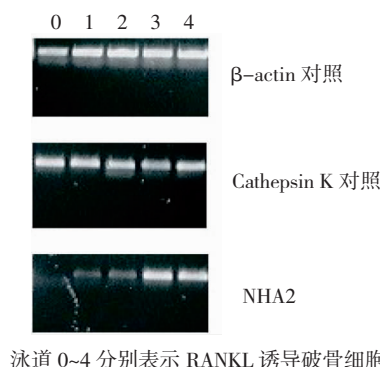


图 1 NHA2 在破骨细胞成熟过程中表达情况

Fig.1 Transcription of Na⁺-H⁺ Antiporter 2 during the differentiation of osteoclast

2.3 NHA2 在 RANKL 诱导 RAW264.7 后的破骨样细胞中的线粒体中表达

为了证明 NHA2 在破骨细胞的线粒体中表达, 分别从 RANKL 诱导的 RAW264.7 与未加以诱导的 RAW264.7 细胞中提取线粒体和细胞核中的蛋白及细胞总蛋白。定量后, 分别用 β -actin、线粒体、NHA2 抗体做 Western blot。从图 2 可以看出, NHA2 只表达于线粒体及总蛋白中。说明 NHA2 对破骨细胞的作用是通过调节线粒体离子平衡来影响破骨细胞。

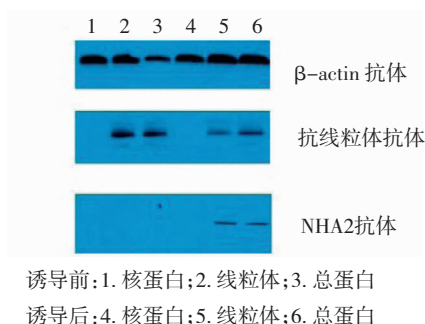
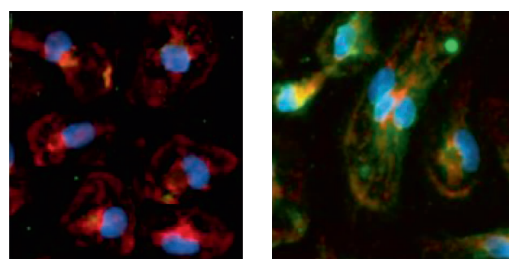


图 2 Raw264.7 诱导成破骨细胞后 NHA2 表达于线粒体

Fig.2 Na⁺-H⁺ Antiporter 2 expressed in the mitochondria of osteoclast induced by RAW264.7

2.4 人 CD14⁺ 细胞被诱导成破骨细胞后有 NHA2 表达

除了用 RAW264.7 细胞, 也用从人外周血 CD14⁺ 来诱导破骨样细胞。首先从人外周血中分离出 CD14⁺ 细胞, 然后用 M-CSF 与 HuRANKL 来诱导成破骨样细胞。把 CD14⁺ 细胞诱导成破骨细胞前后作为对照做细胞原位荧光免疫染色。选用 Invitrogen 公司 MitoTracker Mitochondrion-selective Probes 染色线粒体; FITC 标记的鼠源二抗作用于兔源 NHA2 一抗; DAPI 对细胞核进行染色。然后在共聚焦显微镜下观察照相。结果如图 3 显示, CD14⁺ 细胞诱导前无 NHA2 表达, 诱导成破骨细胞后, NHA2 围绕着线粒体分布表达。



红色: MitoTracker 染线粒体; 蓝色: DAPI 染细胞核; 绿色: FITC 标记二抗作用于 anti-NHA2

图 3 人 CD14⁺ 细胞被 M-CSF/HuRANKL 诱导成破骨细胞前后 NHA2 的表达情况

Fig.3 Expression of Na⁺-H⁺ Antiporter 2 in the human CD14⁺ cell induced by M-CSF/HuRANKL

3 讨论

随着哺乳动物 CPA1 基因家族各个成员 cDNA 的克隆成功, 对其分子、生理以及生化特征的了解越来越多。CPA1 家族的 NHE 在肿瘤发生、发展及转移过程中的作用引起众多研究者的重视。特别是在肿瘤的治疗中, 采用一些抑制剂直接或间接抑制 NHE-1 的表达, 都可能诱导肿瘤细胞死亡。而对同样是离子载体的 CPA2 家族的 NHA2 知之甚少, 因此有必要对 NHA2 进入深入的研究。

CPA2 家族中的 NHA2 高选择性地表达于破骨细胞, 在破骨细胞分化、成熟、凋亡、骨吸收等过程中发挥重要作用。用细胞因子 RANKL 来诱导 RAW264.7 细胞株分化成破骨样细胞; 用 RANKL 和 M-CSF 联合作用诱导人外周血 CD14⁺ 分化为成熟破骨细胞, 来分别检测分析在诱导的不同阶段, NHA2 的表达发生的变化, 从而说明 NHA2 在破骨细胞正常分化成熟中所起的作用。

本实验最终结果显示, RAW264.7 细胞在加入细胞因子 RANKL 后, 4~5 d 可被诱导分化成成熟的破骨样细胞; 血液 CD14⁺ 细胞在 M-CSF 与 HuRANKL 共同作用下, 7~8 d 后可分化为破骨细胞, 这为研究破骨细胞的生理病理提供了一个很好的模板。从本实验可能推断出: 随着破骨细胞的不断成熟, NHA2 表达水平不断增高, NHA2 是破骨细胞分化成熟所必须的。而且 NHA2 选择性地表达于破骨细胞中的线粒体中, 它可能也是通过影响线粒体内的离子代谢平衡系统来影

响整个破骨细胞的成熟分化。NHA2 的研究将为某些疾病的治疗探索新途径和提供新思路,其具有重要的理论意义和实践意义,这还有待于更深入地研究。

参 考 文 献

- [1] Brett C L, Donowitz M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288 (2): C223-C239.
- [2] Ritter M, Fuerst J, Woll E, et al. Na⁺/H⁺ exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell function[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2001, 11 (1): 1-18.
- [3] Slepko E R, Rainey J K, Sykes B D, et al. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger[J]. *Biochem J*, 2007, 401 (3): 623-633.
- [4] Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, et al. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation[J]. *J. Biol. Chem*, 2005, 280 (2): 1561-1572.
- [5] Orłowski J, Grinstein S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family[J]. *Pflügers Arch*, 2004, 447 (5): 549-565.
- [6] Battaglini R A, Pham L, Morse L R, et al. NHA2/NHA2: a mitochondrial cation-proton antiporter selectively expressed in osteoclasts[J]. *Bone*, 2008, 42 (1): 180-192.
- [7] Rheault M R, Okech B A, Keen S B, et al. Molecular cloning, phylogeny and localization of AgNHA1: the first Na⁺/H⁺ antiporter (NHA) from a metazoan, *Anopheles gambiae*[J]. *J. Exp. Biol*, 2007, 210 (21): 3848-3861.
- [8] Xiang M, Feng M, Muend S, et al. A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, 2007, 104 (47): 18677-18681.
- [9] Pham L, Purcell P, Morse L, et al. Expression analysis of NHA2/NHA2: a novel gene selectively expressed in osteoclasts[J]. *Gene Expr. Patterns*, 2007, 7 (8): 846-851.

(责任编辑: 冉明会)

个案与短篇

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.002

动脉支架植入术后精神异常 1 例报道

李 晓, 李光勤

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R749.1+3

【文献标志码】B

【收稿日期】2011-09-06

动脉支架植入术后常见并发症有穿刺点处出血、脏器或脏器出血、高灌注综合征、血管栓塞、支架内血栓形成、消化道出血等, 而出现精神异常者, 国内未见有报道, 国外报道亦仅是心脏支架术后。近来, 有 1 例颈动脉及肾动脉支架植入术后出现精神异常, 现报道如下。

1 临床资料

患者, 男, 78 岁, 因口齿不清、左下肢乏力 5 h 于 2011 年 5 月 27 日入院。入院前 5 h, 在家休息时突然出现口齿不清、流涎、左下肢乏力、行走不稳。门诊行头颅 CT 检查: 脑梗塞。既往有高血压病史 20 年, 最高血压 170/110 mmHg, 规律服用降压药物。5 年前曾因病态窦房结综合征行心脏起搏器置入术。无精神病史, 性格易怒。

入院查体: 体温 36.5℃, 心率 90 次/min, 呼吸 18 次/min, 血压 160/80 mmHg, 神志清晰, 左侧中枢性面瘫, 伸舌居中, 左侧肢体肌力 3 级, 余神经系统无阳性体征。

辅助检查: 三大常规、肝肾功、电解质、凝血象、血脂、血糖等常规生化检查未见明显异常; 血同型半胱氨酸: 15.0 μmol/L; 心电图: 一度房室传导阻滞, 完全性右束支传导阻

滞; 颈动脉彩超: 左侧颈动脉球部斑块形成; 经颅超声多普勒 (Transcranial doppler, TCD): 左侧大脑中动脉血流速度增快; CT 血管成像 (Computer tomography angiography, CTA): 右侧颈内动脉起始处管腔重度狭窄, 左侧大脑中动脉 M1 段、双侧大脑前动脉 A2 段及双侧大脑后动脉轻中度狭窄。

入院后予以阿司匹林 (300 mg/d) 抗血小板聚集、依达拉奉清除自由基、银杏达莫活血化瘀、奥拉西坦改善脑功能, 并辅以物理治疗、肢体功能训练等。患者左下肢肌力好转至 4 级。入院 16 d 后, 患者同意行支架植入术, 术中造影见右颈内动脉及右肾动脉起始处狭窄约 70%。在预先植入 Angioguard 保护伞下, 于右颈动脉狭窄处成功植入 7 mm × 30 mm Cordis 自膨式支架 1 个, 于右肾动脉狭窄处成功植入 6 mm × 15 mm Cordis 球扩式支架 1 个, 造影见支架位置满意, 残余狭窄率 < 30%, 远端血管显影好, 手术用时 110 min。

术后 4 h, 患者突然出现躁动、话多、要求穿拖鞋睡觉及下床走动, 不听医生解释, 测血压 101/61 mmHg, 神经系统体征无变化, 急查肝肾功、电解质、血常规、心肌酶谱、头颅 CT 等未见异常。予以安定 10 mg 肌注后症状无明显缓解, 予以肌注氟哌啶醇 5 mg + 东莨菪碱 0.15 mg 治疗后症状缓解。术后第 2 天, 患者未再出现烦躁、精神异常兴奋等表现, 但左侧肢体肌力下降至 3 级, 再次复查头颅 CT 未见出血及新发低密度影, 排除脑高灌注综合征可能。继续维持以上治疗, 4 d

作者介绍: 李 晓 (1987-), 男, 硕士,

研究方向: 脑血管病。

通信作者: 李光勤, 男, 教授, Email: Liguangqin@tom.com。

(下转第 109 页)