

· 论 著 ·

Rab29 对甲状旁腺激素受体胞内转运的调控作用研究*

徐 诚, 范 磊[#], 许 诺, 肖金淮, 袁同洲[△]

(南京医科大学第二附属医院骨科 210011)

摘要:目的 研究 Rab29 在细胞内的分布以及对甲状旁腺激素受体(PTHr)胞内转运的调控作用。方法 采用免疫荧光技术观察 Rab29 在细胞内的分布;细胞内分别转染野生型 Rab29 和 Rab29 两种突变型,免疫荧光技术观察 3 种 Rab29 在细胞内的分布;细胞内共转染 PTHr 和 Rab29,免疫荧光技术处理后,在电镜下观察 Rab29 调控 PTHr 的胞内分布;半衰期实验检测细胞 Rab29 基因敲减后 PTHr 的稳定性。结果 Rab29 定位于反式高尔基体,Rab29 突变型的细胞内定位均由野生型的核周聚集变为细胞内弥散状,Rab29 的缺陷导致了 PTHr 的逆膜转运受损和稳定性下降。结论 定位于反式高尔基体的 Rab29 是逆膜转运通路中不可或缺的一部分,对 PTHr 的胞内转运起着重要的调控作用。

关键词:Rab29; 甲状旁腺激素受体; 胞内转运; 调控

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.014 **文章编号:**1672-9455(2017)09-1241-03

Research of regulation of Rab29 gene on the intracellular trafficking of parathyroid hormone receptor*

XU Cheng, FAN Lei[#], XU Nuo, XIAO Jinhuai, YUAN Tongzhou[△]

(Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210011, China)

Abstract:Objective To explore the intracellular distribution of the Rab29 as well as the regulation of the Rab29 in the intracellular trafficking of parathyroid hormone receptor (PTHr). **Methods** By immunofluorescence technique, the intracellular distribution of the Rab29 was observed. Wild type Rab29 and two mutant-types of Rab29 were transfected respectively and the intracellular distributions of the three types of Rab29 were observed using immunofluorescence technique. Co-transfection of PTHr and Rab29 was constructed in cells, and then the intracellular distribution of the PTHr which was regulated by Rab29 with the help of electron microscope after immunofluorescence treatment had been observed. Using half-life experiment, the stability of the PTHr was tested after Rab29 was knocked-down. **Results** Rab29 located in trans-Golgi apparatus, and the wild-type Rab29 exhibited perinuclear pattern while the mutant-types were dispersed in cells, the defection of Rab29 led to the damage of PTHr's retrograde trafficking as well as its stability. **Conclusion** Rab29 which locates in trans-Golgi is indispensable to retrograde trafficking, and it plays a vital role in PTHr's intracellular trafficking.

Key words:Rab29; parathyroid hormone receptor; intracellular trafficking; regulation

甲状旁腺激素受体(PTHr)参与机体骨与钙代谢,在骨质疏松的发生发展中起着重要的作用^[1-3]。PTHr 的胞内转运机制是目前研究的热点^[4]。Rab29 是一种小 G 蛋白酶,是 70 多个 Rab 蛋白家族的一员,已经被证实在囊泡出芽、融合以及保持包膜细胞器的完整性中发挥重要作用^[5-7]。本研究通过观察 Rab29 在细胞内的定位,细胞转入 Rab29 突变型观察 PTHr 在细胞内的分布以及基因敲除 Rab29 观察 PTHr 的稳定性,从而探讨 Rab29 对甲状旁腺激素受体胞内转运的调控作用。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 人 Rab29、PTHr cDNA 序列由 Open Biosystems (GE Dharmacon, 美国)公司提供;Myc-6 磷酸甘露糖受体(MPR)的质粒由 Nebraska 大学的 Richard G. MacDonald 教授赠与;pcDNA3.1-3Flag 和 pcDNA3.1-3HA 空载体由本实验室提供;10%胎牛血清由 Hyclone(美国)公司提供;Hek293 和 HeLa 细胞由中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供;脂质体 Lipofectamine2000 由 Invitrogen(美国)提供;电化学发光(ECL)试剂由 Sigma(美国)提供。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养与转染 用 10%胎牛血清完全培养基,在 37℃,5%CO₂ 的培养箱中培养 Hek293 和 HeLa 细胞。常规 PCR 突变技术获得 Rab29-T21N 和 Rab29-Q67L 突变,将 Rab29 的编码区插入 pcDNA3.1-3Flag 和 pcDNA3.1-3HA 空载体中的 Kpn I/XbaI 区,以获得 3xFlag/3xHA-Rab29,将 PTHr 的编码区插入 pcDNA3.1-3Flag 和 pcDNA3.1-3HA 空载体中的 HindIII/XbaI 区以获得 3xFlag/3xHA-PTHr。转染依照转染试剂说明书将受体质粒与 Lipofectamine2000 (Invitrogen, 美国)混合,在细胞融合度达到 70%~80% 时进行。

1.2.2 免疫荧光染色成像技术检测 Rab29 在细胞内的定位 将 HEK293 细胞事先种于铺好 L-多聚赖氨酸和基质胶的盖玻片上,分别用 Golgin97 抗体识别高尔基体,EEA1 抗体识别内体,Flag 抗体识别 3Flag-Rab29,在 LSM 510 共聚焦显微镜(Zeiss, 德国)下进行免疫荧光测定。用蛋白转运抑制剂(Brefeldin A)处理转染过 3Flag-Rab29 的 HeLa 细胞 5 min,在高尔基体完全碎裂后,使用免疫荧光技术,用 Flag 抗体识别 3Flag-Rab29, TGN46 抗体识别反式高尔基体,GM130 抗体识别顺式高尔基体。

1.2.3 免疫荧光染色成像技术检测 Rab29 调控逆膜转运通

* 基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(14KJB320008)。

作者简介:徐诚,男,硕士研究生,主要从事骨质疏松方面的研究。 # 共同第一作者:范磊,男,副主任医师,主要从事骨肿瘤、骨质疏松方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: ytz2047@sina.com。

路 研究已经证实 MPR 是最为经典也是最早发现的逆膜转运中的货物^[8]。MPR 位于高尔基体,负责识别并转运新生成的溶解酶至溶酶体,完成转运后,MPR 再经由逆膜转运通路回到高尔基体进行下一轮识别转运^[9]。在表达 Myc-MPR 的 Hela 细胞内分别转染野生型 3Flag-Rab29 和 Rab29 的 2 种突变 3Flag-Rab29 T21N、3Flag-Rab29 Q67L。用免疫荧光技术标记 MPR 与 3 种 Rab29,在 LSM 510 共聚焦显微镜下进行免疫荧光测定,观察 MPR 的细胞内定位。

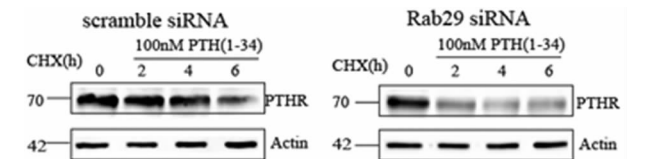
1.2.4 半衰期测定检测 Rab29 在 PTHR 胞内转运的作用 设计蛋白质半衰期试验,在 Hek293 细胞内转入 3HA-PTHrP、Rab29 siRNA 或者 3HA-PTHrP、scramble Rab29 siRNA。Rab29 siRNA 用于敲除 Rab29,scramble Rab29 siRNA 作为阴性对照。在细胞培养基内孵育放线菌酮(CHX)和 100 nM PTH(1-34),分别在 0、2、4、6 h 时收集细胞裂解液,之后采用 Western blot 技术检测每个时间点的 PTHR 蛋白水平。

2 结 果

2.1 Rab29 定位于反式高尔基体 共聚焦显微镜下观察 3Flag-Rab29 在 Hela 细胞内成核周聚集分布,并且与高尔基体的标志 Golgin97 有大量共定位,而与内体的标志 EEA1 共定位较少,这表明 Rab29 定位于高尔基体。用 Flag 抗体识别 3Flag-Rab29,TGN46 抗体识别反式高尔基体,GM130 抗体识别顺式高尔基体。3Flag-Rab29 与反式高尔基体开始共同位于细胞核周,并且有大量共定位,随着高尔基体的整体碎裂,3Flag-Rab29 仍然与散在细胞质中的反式高尔基体有大量共定位;反之,3Flag-Rab29 与顺式高尔基体开始共同位于细胞核周,并且有大量共定位,随着高尔基体的整体碎裂,3Flag-Rab29 几乎不与顺式高尔基体共定位。

2.2 Rab29 调控逆膜转运通路 野生型的 3Flag-Rab29 与 MPR 有着相似的细胞内分布,均是核周聚集状,并且有着大量的共定位。不论 3Flag-Rab29 T21N 还是 3Flag-Rab29 Q67L 的细胞内定位均由野生型的核周聚集变为细胞内弥散状。这两种 Rab29 的突变也导致了 MPR 的细胞内定位发生了改变,即由核周变为弥散,表明 Rab29 参与调控逆膜转运通路。

2.3 Rab29 调控 PTHR 的胞内分布 PTH(1-34)刺激后的 PTHR 内吞至细胞内呈现出核周聚集的分布,并且与野生型 Rab29 大量共定位,由于 Rab29 定位于反式高尔基体,可以将 Rab29 看成高尔基体的标志物,所以这表明了内吞进细胞内的 PTHR 回到了高尔基体。对照组中 PTHR 的降解速率较缓慢,在 6 h 处,仍有大于 60% 的 PTHR 未被降解。当 Rab29 被敲除掉之后,PTHrP 的降解速率显著加快,在 6 h 处,PTHrP 只剩不到 40% 未被降解。蛋白免疫印迹(Western blot)的灰度分析强有力地证明了 Rab29 的缺陷导致了 PTHR 的稳定性下降,降解加速。见图 1。



注:在 Hek293 细胞中分别共转 3Flag-PTHrP 和 scramble siRNA、Rab29 siRNA,24 h 后,以 PTH(1-34)和放线菌酮共同孵育细胞,并在 0、2、4、6 h 时间点提取细胞样品,Western blot 检测 PTHR(70 条带)蛋白水平,以 actin(42 条带)为参照。

图 1 Rab29 调控 PTHR 胞内转运

3 讨 论

为确定 Rab29 在细胞内的定位,本研究首先探究了 Rab29 在细胞器上的分布情况。研究证明 Rab 家族的蛋白参与了囊

泡出芽和融合这些膜转运过程^[7,10],因此本研究首先将视野放到 Rab29 与高尔基体,内体这 2 个经典膜转运细胞器的关联上。本研究证实了 Rab29 定位于高尔基体。由于高尔基体由顺式高尔基体(cis-Golgi)和反式高尔基体(trans-Golgi)组成,这两部分在蛋白质的修饰和转运中有这不同的作用。同时,本研究同样使用免疫荧光技术证实了 Rab29 定位于反式高尔基体。

本研究中使用免疫荧光技术标记 MPR 与 3 种 Rab29。野生型的 3Flag-Rab29 与 MPR 有着相似的细胞内分布,均是核周聚集状,并且有着大量的共定位。不论 3Flag-Rab29 T21N 还是 3Flag-Rab29 Q67L 的细胞内定位均由野生型的核周聚集变为细胞内弥散状。本研究 Rab29 的突变也导致了 MPR 的细胞内定位发生了改变,即由核周变为弥散。推测这种改变的原因是 Rab29 的突变导致了逆膜转运通路受损,MPR 不能经由逆膜转运通路从溶酶体回到高尔基体,从而弥散在了细胞内。持续激活型的 Rab29 Q67L 表现出了与无功能型 Rab29 T21N 对 MPR 相似的影响。其原因可能是 Rab29 Q67L 虽然持续结合 ATP,成为激活形式,但是 Rab29 Q67 结合 ATP 后又迅速将 ATP 水解掉,所以也表现为无功能型突变形式。

本研究证实了定位于反式高尔基体的 Rab29 是逆膜转运通路中不可或缺的一部分,并且 Rab29 调控了 PTHR 的胞内转运。这于先前的关于逆膜转运体 retromer 终结 PTHR 的 cAMP 的实验相符合,只有当逆膜转运体 retromer 将 PTHR 转运至高尔基体时,信号转导才被终止^[7,11]。Rab29 调控 PTHR 的意义不仅在于保证 PTHR 顺利到达高尔基体重新回到细胞膜表面,还在于 Rab29 增加了 PTHR 在细胞内的稳定性,阻止了 PTHR 被溶酶体迅速降解^[12]。

综上所述,定位于反式高尔基体的 Rab29 是逆膜转运通路中不可或缺的一部分,对 PTHR 的胞内转运起着重要的调控作用。继续探究逆膜转运以及 PTHR 的转运机制,可以丰富对于受体转运的了解,为转运机制缺陷而导致的受体调控骨代谢障碍的疾病找到新的治疗靶点具有重要的临床和科研价值。

参考文献

- [1] Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function[J]. Bone, 2013, 54(2):250-257.
- [2] Kang DS, Tian X, Benovic JL. Arrestins and G Protein-Coupled Receptor Trafficking[J]. Handb Exp Pharmacol, 2014, 512(219):173-186.
- [3] Vilardaga JP, Romero G, Friedman PA, et al. Molecular basis of parathyroid hormone receptor signaling and trafficking: a family B GPCR paradigm[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(1):1-13.
- [4] Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, et al. Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors[J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(5):278-284.
- [5] Mitra S, Cheng KW, Mills GB. Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders[J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(1):57-68.
- [6] Wang S, Ma Z, Xu X, et al. A role of Rab29 in the integrity of the trans-Golgi network and retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptor[J]. PLoS One, 2014, 9(5):e96242.
- [7] Pfeffer SR. Rab GTPase regulation of membrane identity[J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25(4):414-419.
- [8] Arighi CN, Hartnell LM, Aguilar RC, (下转第 1245 页)

者 DVT 风险水平成倍增长,提示 Wells 评估表更适合临床医生诊断与鉴别诊断 DVT,而非预防性筛查工具。同时,研究表明 Wells 对 DVT 精确诊断,需结合 D-二聚体、纤维蛋白原降解产物等实验室检查指标,这使得该评估表在骨科大手术患者中的应用受到一定限制^[11-12]。

Autar 和 Caprini 的 AUC 均低于 Wells,且两评估表之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。临床应用中发现,Autar 和 Caprini 评估表的评估指标中涉及 DVT 危险因素更全面,使医护人员更容易发现高危因素,有利于及时采取预防措施。从评估表的设计背景和发展来看,Autar 本身是基于骨科患者设计的,更多体现骨科疾病的特点,但 Autar 血栓风险评估表敏感度高达 88.0%,特异度却低至 49.0%,说明该评估工具本身可能存在过高地评估患者 DVT 风险的问题,这与 Pannucci 等^[13]的研究论点一致。因此,对于骨科大手术高危人群,选择 Autar 作为预测 DVT 评估工具时应该重新界定临界值(cut-off 值),如此才能对骨科患者进行有效分层,减少不必要的干预,降低医疗成本。Caprini 是由外科医生基于住院患者制定,实验室检查 Leiden 阳性、血清同型半胱氨酸升高、凝血酶原 20210A 阳性、痕胶抗凝物阳性、抗心磷脂抗体升高都是 DVT 形成的重要危险因素,如医院未常规开展这些检查, Caprini 评估分值将降低,会导致评估工具低估患者 DVT 风险,不能识别“真正患者”,降低评估工具本身准确性。本研究 Caprini 评估表 AUC 为 0.68,灵敏度为 63.0%,特异度为 70.0%,研究结果低于国内外其他相关研究^[14],可能与所调查医院对骨科大手术患者未常规进行上述实验项目检查有一定关系。

综上所述,Wells、Autar 和 Caprini 3 种血栓风险评估表对骨科大手术后 DVT 发生均有一定的预测价值,Wells 评估表更适合临床医生对 DVT 诊断和鉴别诊断,Autar 和 Caprini 评估表有助于识别 DVT 高危因素,以便及早采取相应预防措施,降低骨科大手术后患者 DVT 发生率,更适宜临床护理人员应用和推广。因本研究采用的是回顾性资料分析,存在不能识别患者所有危险因素的可能,会低估患者的风险水平,有待今后采用多中心大样本研究来减少试验倚倚。

参考文献

[1] 尹知训,余楠生,卢伟杰,等.初始全髋关节置换术后静脉血栓栓塞症预防的临床研究[J].中国骨与关节外科,2013,6(s1):57-60.
 [2] 彭慧明,翁习生,翟吉良,等.初次全膝关节成形术后常规抗凝患者症状性静脉血栓症发生率的调查研究[J].中国骨与关节外科,2014,7(2):101-104.
 [3] Michael K,David A,Sherry M,et al. Prevention of VTE

in nonorthopedic surgical patients Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis,9th ed American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines[J].CHEST,2012,141(2):e227S-e277S.
 [4] Buyukyilmaz F,Sendir M,Autar R,et al. Risk level analysis for deep vein thrombosis (DVT): A study of Turkish patients undergoing major orthopedic surgery[J]. J Vasc Nurs,2015,33(3):100-105.
 [5] 刘晓涵,卢根娣.国外静脉血栓栓塞症风险评估工具的研究进展[J].护理学杂志,2014,29(12):94-96.
 [6] Jacobs JJ,Mont MA,Bozic KJ,et al. American Academy of Orthopaedic Surgeons clinical practice guideline on: preventing venous thromboembolic disease in patients undergoing elective hip and knee arthroplasty[J]. J Bone Joint Surg Am,2012,94(8):746-747.
 [7] 中华医学会骨科学分会.中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南[J].中华骨科杂志,2009,29(6):602-604.
 [8] Manoucheri R,Fallahi MJ. Adherence to Venous Thromboprophylaxis Guidelines for Medical and Surgical Inpatients of Teaching Hospitals, Shiraz-Iran[J]. Tanaffos, 2015,14(1):17-26.
 [9] 方曙馨,刘梅,许勤,等.骨创伤患者下肢深静脉血栓的预防管理[J].护理学杂志,2013,28(16):28-29.
 [10] Choi M,Hector M. Management of venous thromboembolism for older adults in long-term care facilities[J]. J Am Acad Nurse Pract,2012,24(6):335-344.
 [11] Geersing GJ,Zuithoff NPA,Kearon C,et al. Exclusion of deep vein thrombosis using the Wells rule in clinically important subgroups individual patient data meta-analysis [J]. BMJ,2014,348:g1340.
 [12] 沈明荃.预测评分系统结合 D-dimer 及 FDP 预测诊断创伤后下肢深静脉血栓形成的研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2015.
 [13] Pannucci CJ,Barta RJ,Portschy PR,et al. Assessment of postoperative venous thromboembolism risk in plastic surgery patients using the 2005 and 2010 Caprini Risk score[J]. Plast Reconstr Surg,2012,130(2):343-353.
 [14] Lobastov KV,Barinov VE,Schastlivtsev IV,et al. Caprini score as individual risk assessment model of postoperative venous thromboembolism in patients with high surgical risk[J]. Khirurgiia Mosk,2014 (12):16-23.

(收稿日期:2016-12-16 修回日期:2017-02-09)

(上接第 1242 页)

et al. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor[J]. J Cell Biol,2004,165(1):123-133.
 [9] Seaman MN. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer[J]. J Cell Biol, 2004,165(1):111-122.
 [10] Onnis A,Finetti F,Patrussi L,et al. The small GTPase Rab29 is a common regulator of immune synapse assembly and ciliogenesis[J]. Cell Death Differ,2015,22(10):

1687-1699.
 [11] Attar N,Cullen PJ. The retromer complex[J]. Adv Enzyme Regul,2010,50(1):216-236.
 [12] Shenoy SK,Barak LS,Xiao K,et al. Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation[J]. J Biol Chem,2007,282(40): 29549-29562.

(收稿日期:2016-12-21 修回日期:2017-01-19)