

伴肌动蛋白相关锚定蛋白(N-RAP)在 颈椎后纵韧带骨化中的表达及意义

张 竞¹, 张 颖², 王良哲³, 孙其志², 袁 文²

(1 上海交通大学医学院附属新华医院骨科 200092; 2 第二军医大学附属长征医院骨科医院 200003;

3 第二军医大学附属长征医院病理科 200003)

【摘要】目的:从蛋白质及核酸水平研究伴肌动蛋白相关锚定蛋白(N-RAP)在颈椎后纵韧带骨化中的表达,探讨其存在的临床意义。**方法:**选择 2006~2010 年间行手术治疗的 20 例颈椎后纵韧带骨化症患者(OPLL 组)及 10 例因外伤行颈椎手术患者(对照组)的颈椎后纵韧带标本。所有标本福尔马林固定、石蜡包埋,以 N-RAP 兔抗人多克隆抗体作为 I 抗免疫组化 SP 法制片, DAB 显色。选择染色满意的标本切片,观察表达 N-RAP 的细胞(棕黄染色)在两组样本中的数量及分布特点。5 例骨化样本及 5 例对照样本冰浴匀浆、提取总 RNA,行实时定量 PCR 检测。观测后纵韧带骨化症患者及对照病例后纵韧带组织中 N-RAP mRNA 的表达情况。**结果:**20 例骨化韧带标本中,16 例染色满意;10 例对照组后纵韧带标本中,6 例染色满意。免疫组化结果显示 N-RAP 表达于韧带组织中细胞的胞浆中,呈棕黄色染色。在 OPLL 组的后纵韧带组织中,可见多个黄染细胞及少量蓝色无 N-RAP 表达的细胞。而在对照组后纵韧带中,仅可见蓝色无 N-RAP 表达的细胞。实时定量 PCR 检测发现 N-RAP 在对照组标本中平均表达量为 14.29 ± 4.70 , 在 OPLL 组标本中为 161.29 ± 60.14 , 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**颈椎 OPLL 韧带组织中存在较高水平的 N-RAP,其可能参与了韧带骨化的发生、发展过程。

【关键词】后纵韧带骨化症;伴肌动蛋白相关锚定蛋白;实时定量 PCR

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.09.13

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-09-0833-04

Expression and significance of Nebulin related anchoring protein(N-RAP) in the ossified posterior longitudinal ligament/ZHANG Jing, ZHANG Ying, WANG Liangzhe, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(9): 833-836

【Abstract】Objectives: To investigate the expression of Nebulin related anchoring protein(N-RAP) in the ossified posterior longitudinal ligament, and to explore its clinical significance. **Methods:** Ligament samples were harvested from the patients undergoing anterior cervical surgeries. 20 were from patients with OPLL and 10 from patients suffering from trauma were served as control group. All samples were fixed with formalin and embedded with paraffin. N-RAP polyclonal rabbit anti-human antibody, immunohistochemical SP method tablets and DAB color were used for immunohistochemical detection. Slices with satisfying staining were submitted for observation of cells expressing N-RAP (Brown-yellow staining). Samples from 5 ossified ligaments and 5 normal controls were submitted for RT-PCR. Samples were homogenized on ice and total RNA was extracted. Real-time quantitative PCR was used to verify the mRNA expression of N-RAP in two groups. **Results:** 16 samples from ossified ligaments and 6 samples from normal controls got satisfying immunohistochemical staining. Immunohistochemistry showed that N-RAP expressed in cytoplasm in cellular components of ligament tissue. Cells expressing N-RAP were brown-yellow, while cells with no N-RAP were in blue. In ossified ligament from patients with OPLL, most cells were brown-yellow and a small amount of blue cells without expressing N-RAP were observed. While in control samples, only blue cells with no N-RAP expression could be seen. Under real-time quantitative PCR detection, the average expression level of N-RAP was 14.29 ± 4.70 in control groups, while 161.29 ± 60.14 in ossified ligaments, which showed significant difference

基金项目:本研究受 2010 年度“上海市卫生局科研课题”经费支持(基金编号:2010138)

第一作者简介:男(1978-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(021)25077977 E-mail:zjortho@163.com

between two groups ($P < 0.05$). **Conclusions:** There is a higher expression of N-RAP in ligament tissue from patients with OPLL, which indicates that N-RAP may be involved in the onset or development of OPLL.

【Key words】 Ossification of the posterior longitudinal ligament; Nebulin related anchoring protein; RT-PCR

【Author's address】 Department of orthopedics, Xinhua Hospital, Affiliated to Shanghai Jiaotong University, School of Medicine

伴肌动蛋白相关锚定蛋白 (Nebulin related anchoring protein, N-RAP) 是一种细胞骨架蛋白, 属于 LIM 蛋白家族, 能够结合肌动蛋白。该蛋白在小鼠、猪、人等多种生物的多种组织中都有表达, 而以心肌及骨骼肌表达量最高。N-RAP 在骨骼肌内出现于肌肉肌腱连接部位、在心肌表达于闰盘内。既往研究表明, N-RAP 具有在细胞和细胞外基质之间传导应力的作用, 在骨骼肌中参与肌纤维生成过程, 参与扩张性心肌病和小脑生理性老化的过程^[1]。我们在前期的研究中, 对后纵韧带骨化 (ossification of posterior longitudinal ligament, OPLL) 患者的韧带组织进行了蛋白质组学的研究, 发现后纵韧带骨化组织中, N-RAP 表达增加^[2]。在本研究中, 我们进一步对正常及骨化后纵韧带组织中 N-RAP 的表达进行免疫组化和 RT-PCR 检测, 探讨 N-RAP 在 OPLL 发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选自 2006 年 2 月~2010 年 8 月行手术治疗的 20 例颈椎后纵韧带骨化症患者及 10 例无 OPLL 者的颈椎后纵韧带标本。以 OPLL 患者后纵韧带标本为实验组, 无 OPLL 者后纵韧带标本为对照组。病变标本来自因 OPLL 行颈椎前路减压术患者, 术前均行颈椎 CT 检查确诊。对照组标本来自因外伤行颈椎前路减压植骨内固定术的患者。术中获标本后迅速剔除骨组织, -80°C 保存。

1.2 主要试剂及设备

N-RAP 兔抗人多克隆抗体 (ABCAM)、SP 免疫试剂盒、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司)。荧光定量 PCR 仪 (Rotor-Gene RG-3000 Real-Time Thermal Cycler, Corbett Research); RNA 抽提试剂 (Trizol, Invitrogen); RT 试剂 (RevertAid TM First strand cDNA Synthesis Kit, Fermentans); Realtime PCR 反应试剂 (SYBR Green Realtime PCR Master Mix,

TOYOBO); DNA-mark (DL2000, TakaRa)。

1.3 免疫组化

标本解冻后福尔马林固定, 常规石蜡包埋。沿蜡块长轴进行切片。采用免疫组化 SP 法, 并用 DAB 显色对实验组 (20 例) 及对照组 (10 例) 标本观察表达 N-RAP 蛋白的细胞数量、分布等情况。所有标本采用高温高压修复抗原, 并按照试剂说明书进行染色。用肝组织已知阳性切片作为阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照。染色满意的标本选择组织切面最大的 3~5 张切片进行观察。表达 N-RAP 的细胞为棕黄色染色, 不表达 N-RAP 的细胞呈蓝染。

1.4 实时定量 PCR

取 5 例实验组样本及 5 例对照组样本。每例样本取 0.1g, 冰浴匀浆后加入 200 μl 氯仿混匀, 离心后取上清。加入等体积异丙醇, 混匀后 -20°C 沉淀 1h。 4°C , 13000rpm, 离心 20min。弃上清。加入 500 μl 75% 乙醇, 洗涤沉淀。 4°C , 13000rpm, 离心 10min。弃上清。加入 10 μl DEPC-Water 至完全溶解。走 RNA 变性电泳观察 18s, 28s 条带, 分光光度计检测 260/280 吸光度比值, 计算 RNA 浓度。取总 RNA 2 μg 加入 Oligo dT 1 μl , 用 DEPC-water 补充体积至 12 μl 。混匀后 70°C 放置 5min, 立即冰浴。依次加入 5 $\times$ reaction buffer 4 μl 、RNA 酶抑制剂 1 μl 、10mM dNTP mix 2 μl , 混匀后 37°C 反应 5min。加入 RevertAid TM M-MulV Reverse Transcriptase 1 μl , 最终体积为 20 μl 。混匀后 42°C , 60min; 然后 70°C , 10 min。引物序列 (5' $\rightarrow$ 3') 如下: NRAP_S: GGGAGGAA-GAAAGCATCGGAA Tm62; NRAP_A: TTTTTCGT-CGGATGAACTCGG Tm63; NM_198060 214bp。将预试验的 PCR 产物以 10 倍浓度梯度进行稀释, 选择 1/10000、1/100000、1/1000000、1/10000000 浓度的稀释产物作为标准品模版, 进行荧光定量 PCR 反应并同时在荧光定量 PCR 仪中输入以上四个浓度梯度的浓度数值。通过这四个标准品生成的反应数据, 软件 Rotor-Gene 6.0 根据反应的

荧光实时监控数据和标准品的浓度关系,生成标准曲线。通过此标准曲线来计算在标准曲线所划定的 Ct 值。

1.5 统计方法

应用 SPSS 13.0 统计软件分析数据。连续型变量的组间差异采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

20 例骨化韧带标本中, 16 例染色满意, 无明显脱片、无背景染色; 10 例正常后纵韧带标本中, 6 例染色满意。免疫组化结果显示韧带组织以排列有序、不染色的胶原成分为主, 其间散在成纤维细胞。OPLL 患者韧带组织中, 可见大量散在的整体棕黄色染色细胞, 提示 N-RAP 表达于成纤维细胞胞浆中。在病变的后纵韧带组织中, 可见多个黄染细胞及少量蓝色无 N-RAP 表达的细胞 (图 1)。而在正常后纵韧带中, 仅可见蓝色无 N-RAP 表达的细胞 (图 2)。PCR 反应效率 (eff) 为 0.94, 反应效率满意, Ct 值可靠。N-RAP 在对照标本中平均表达量为 14.29 ± 4.70 , OPLL 组标本中平均表达量为 161.29 ± 60.14 , $P = 0.041$, 差异有统计学意义。说明 N-RAP 在 OPLL 患者后纵韧带组织中 mRNA 高于健康人。

3 讨论

3.1 N-RAP 蛋白的功能

N-RAP 于 1997 年首先在小鼠体内发现, 其 C 端为 Nebulin 相关重复序列, 可结合肌动蛋白 (actin) 和粘着斑蛋白 (vina-lin), N 端为 LIM 结构域, 可结合踝蛋白 (talin), 中间序列为 N-RAP 所特有, 可结合肌肉 LIM 蛋白 (muscle LIM protein, MLP) 和肌动蛋白, 但与肌动蛋白的结合能力比 C 端低 10 倍。N-RAP 含 1175 个氨基酸, 分子质量为 185kDa, 在骨骼肌和心肌组织含量高。在 MLP 敲除和 tropomodulin 转基因小鼠模型中的表达都上调, 提示有可能作为扩张性心肌病 (dilated cardiomyolmthy, DCM) 的早期标志^[3]。N-RAP 被认为在肌纤维生成过程中起作用, 是肌纤维组装的引发中心。对鼠小脑的蛋白质组研究提示 N-RAP 可能参与生理性老化过程^[1]。

人 N-RAP 的研究表明, 人 N-RAP 基因定位于 10q25~q26, 编码区由 41 个外显子组成, 可翻译为含 1695 个氨基酸的蛋白质, 等电点 pI 为 9.7, 无疏水区, 为可溶性蛋白。其基因与小鼠同源, 推测也具有类似的功能^[4]。不同之处在于, 人 N-RAP 蛋白在肝脏、脑、脊髓和前列腺中均有表达, 而小鼠仅表达于骨骼肌和心肌组织中^[5]。亚细胞定位证实人 N-RAP 表达于细胞浆。人 N-RAP 具有两个异构体, isoform C 开放读码框长约 5,

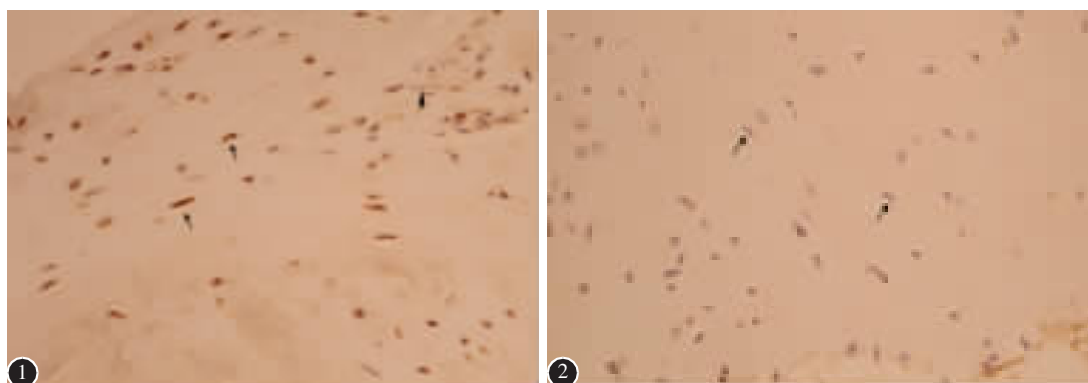


图 1 OPLL 组颈椎后纵韧带中 N-RAP 的表达, 黑色箭头示表达 N-RAP 的细胞成棕黄色染色, 三角示无染色细胞, 提示无 N-RAP 表达 (免疫组化 SP 法、DAB 显色, $\times 400$) 图 2 对照组颈椎后纵韧带中 N-RAP 的表达, 仅可见蓝色染色细胞 (蓝色, 黑色箭头示) (免疫组化 SP 法、DAB 显色, $\times 400$)

Figure 1 N-RAP protein expression in the posterior longitudinal ligament of OPLL patients. The black arrow represents the staining positive cells (brown and yellow). The black triangle represents the staining negative cells (blue). (Using immunohistochemical SP method, and DAB staining, $\times 400$) **Figure 2** N-RAP protein expression in the normal posterior longitudinal ligament. Only staining negative cells could be observed (Blue ones). (Using immunohistochemical SP method, and DAB staining, $\times 400$)

085 bp; isoform S 长约 5190bp, 其产物分子量为 193~197kDa, isoform S 在心肌中无表达^[6]。RNA 干扰法敲除 N-RAP 基因后, 发现 N-RAP 通过某种转录后干扰的方式, 控制两种不同形态的肌球蛋白保持平衡, 提示 N-RAP 有干扰基因翻译或参与蛋白修饰的功能^[3]。N-RAP 可在很低的含量下重复催化肌原纤维的组装过程^[7]。

3.2 N-RAP 在 OPLL 发生发展中的意义

既往研究^[8]表明, OPLL 具有一定的遗传背景; VI 型胶原编码基因是已知的 OPLL 发病相关基因。OPLL 患者韧带成纤维细胞与正常韧带成纤维细胞相比, 分泌、增殖活跃, 更易诱导成骨, 因而又被称为 OPLL 细胞^[9]。应力是 OPLL 发生、发展的重要因素^[9,10]。应力刺激可诱导 OPLL 细胞转化成为成骨细胞, 同时表达多种成骨因子如骨桥蛋白、骨形态发生蛋白(BMP)、转化生长因子 β (TGF- β)等, 其受体的 RNA 转录也增强, 进而出现细胞分化、基质钙沉积, 而普通细胞对应力刺激没有这样的反应^[10,11]。这些现象说明 OPLL 细胞对应力信号敏感, 而造成 OPLL 细胞的应力高敏现象的机制尚不明确。

在前期研究中, 我们采用蛋白质组学手段对 OPLL 患者的颈椎后纵韧带标本和对照组颈椎后纵韧带标本进行了分析, 筛选出 6 个差异蛋白^[2]。在这个 6 个蛋白中, N-RAP 表达增高, 且由于其具有应力传导功能^[1], 与既往研究中后纵韧带细胞应力高敏感特性可能存在联系, 因而我们选择了 N-RAP 蛋白进行进一步深入研究。但由于蛋白质组学本身高敏感性、低特异性的特点^[12], 其筛选蛋白是否确实存在差异尚需进一步验证。因而在本研究中, 我们以颈椎后纵韧带组织为研究对象, 采用免疫组化和 PCR 技术, 对 N-RAP 在 OPLL 患者和对照组中的表达情况进行了比较。结果表明, N-RAP 的 mRNA 转录水平在 OPLL 患者组织中高于正常韧带组织, N-RAP 蛋白仅在 OPLL 患者韧带组织中表达。结合我们发现 N-RAP 在 OPLL 病灶中表达增高的现象, 及 N-RAP 的应力传导作用, 我们推测 N-RAP 可能与应力诱导韧带骨化过程中有重要作用。这一推测尚需进一步研究证实。

4 参考文献

1. Gokulrangan G, Zaidi A, Michaelis ML, et al. Proteomic analysis of protein nitration in rat cerebellum: effect of biological aging [J]. J Neurochem, 2007, 100(6): 1494-1504.
2. 张颖, 李阳, 王新伟, 等. 后纵韧带骨化症患者后纵韧带组织的蛋白质组学[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(11): 1264-1267.
3. Dhume A, Lu S, Horowitz R. Targeted disruption of N-RAP gene function by RNA interference: a role for N-RAP in myofibril organization[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2006, 63(8): 493-511.
4. 袁红丰, 王冬梅, 李海民, 等. 人伴肌动蛋白相关锚定蛋白基因 cDNA 的克隆与功能分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(2): 257-261.
5. Luo G, Zhang JQ, Nguyen TP, et al. Complete cDNA sequence and tissue localization of N-RAP, a novel nebulin-related protein of striated muscle[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 1997, 38(1): 75-90.
6. Mohiddin SA, Lu S, Cardoso JP, et al. Genomic organization, alternative splicing, and expression of human and mouse N-RAP, a nebulin-related LIM protein of striated muscle [J]. Cell Motil Cytoskeleton. 2003, 55(3): 200-212.
7. Lu S, Borst DE, Horowitz R. N-RAP expression during mouse heart development [J]. Dev Dyn, 2005, 233(1): 201-212.
8. Kong Q, Ma X, Li F, et al. COL6A1 polymorphisms associated with ossification of the ligamentum flavum and ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. Spine, 2007, 32(25): 2834-2838.
9. Ishida Y, Kawai S. Characterization of cultured cells derived from ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. Bone, 1993, 14(2): 85-91.
10. Furukawa K. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: molecular basis of ectopic bone formation induced by mechanical stress[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 100(3): 201-204.
11. Iwasaki K, Furukawa KI, Tanno M, et al. Uni-axial cyclic stretch induces Cbfa1 expression in spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. Calcif Tissue Int, 2004, 74(5): 448-457.
12. Brewis IA, Brennan P. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2010, 80: 1-44.

(收稿日期: 2012-08-30 末次修回日期: 2013-07-17)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)