

葡萄糖转运子 9 和尿酸转运子 1 在软骨细胞中表达的体外试验

张冰清¹, 段梦园², 张保中³, 龙波⁴, 王冬梅⁵, 朱蕾², 曾学军⁶

1. 中国医学科学院北京协和医院内科, 北京 100730; 2. 中国医学科学院基础学院药理学系, 北京 100010;
3. 中国医学科学院北京协和医院骨科, 北京 100730; 4. 中国医学科学院北京协和医院中心实验室, 北京 100730;
5. 南方医科大学南方医院神经内科, 广东 广州 510000; 6. 中国医学科学院北京协和医院普通内科, 北京 100730

摘要: **目的** 观察在软骨细胞中葡萄糖转运子 (GLUT)9 和尿酸转运子 (URAT)1 的表达, 探讨软骨细胞中是否存在尿酸转运。**方法** 选择 2017 年 11 月至 2018 年 4 月 5 例外伤性股骨颈骨折患者 (排除痛风性关节炎和病理性骨折) 的软骨组织作为对象, 用 Western blot 和免疫组化法测定软骨组织中 GLUT9 和 URAT1 蛋白表达水平, 并以 II 型胶原蛋白作为阳性对照。**结果** Western blot 结果表明, 5 例标本 II 型胶原蛋白均为阳性, II 型胶原蛋白是软骨细胞的特征性蛋白, 其染色阳性证实取材标本中包含软骨细胞。5 例标本在 59 kDa 和 70 kDa 均有阳性条带, 分别对应兔抗人 GLUT9 和兔抗人 URAT1; 免疫组化结果表明, 软骨细胞样本中可见特征性的软骨窝结构; 软骨细胞经 II 型胶原蛋白抗体染色后细胞质均显现为褐色, URAT1 和 GLUT9 两种抗体染色下, 软骨细胞的细胞膜可见均一的褐色染色, 细胞质内亦有褐色染色分布。**结论** GLUT9 和 URAT1 在软骨组织中呈高表达, 可能存在尿酸转运过程, 其是否参与痛风性关节炎的发生、发展, 有待进一步研究。

关键词: 软骨细胞; 葡萄糖转运子 9; 尿酸转运子 1; 免疫印迹法; 免疫组织化学法; 尿酸转运; 痛风性关节炎
中图分类号: R 589.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)07-0870-04

Expression of glucose transporter 9 and urate transporter 1 in chondrocytes in vitro

ZHANG Bing-qing*, DUAN Meng-yuan, ZHANG Bao-zhong, LONG Bo, WANG Dong-mei, ZHU Lei, ZENG Xue-jun

* Department of Internal Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China

Corresponding author: ZENG Xue-jun, E-mail: zxpumch@126.com

Abstract: Objective To investigate the expressions of glucose transporter 9 (GLUT9) and urate transporter 1 (URAT1) in chondrocytes and to explore whether uric acid transport exists in chondrocyte. **Methods** The cartilage tissues from 5 patients with traumatic femoral neck fracture (excluding gouty arthritis and pathological fracture) collected from November 2017 to April 2018 were selected as subjects. The expression levels of GLUT9 and URAT1 in cartilage tissue were determined by Western blot and immunohistochemistry, and type II collagen was used as a positive control. **Results** Western blot results showed that type II collagen was positive in all 5 samples. Type II collagen was the characteristic protein of chondrocyte. Positive staining of type II collagen confirmed that chondrocyte was contained in the samples. Five specimens presented positive bands at 59 kDa and 70 kDa, corresponding to rabbit anti-human GLUT9 and rabbit anti-human URAT1. Immunohistochemistry results showed that characteristic cartilage fossa was visible in chondrocyte samples. The cytoplasm of the chondrocytes stained with type II collagen antibody showed brown color. By the staining of URAT1 and GLUT9 antibody, the cell membrane of chondrocytes appeared uniform brown staining, and brown staining distribution was also found in the cytoplasm of chondrocytes. **Conclusions** High expressions of GLUT9 and URAT1 in cartilage tissue may be involved in uric acid transport. Whether GLUT9 and URAT1 participate in the occurrence and development of gouty arthritis needs further study.

Key words: Chondrocytes; Gglucose transporter 9; Uric acid transporter 1; Western blot; Immunohistochemistry; Uric acid transport; Gouty arthritis

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2019.07.002

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2016-I2M-1-002); 中国医学科学院医学表现中心基金项目 (2017PT31035); 北京协和医院青年科学基金项目 (pumch-2016-2.13)

通讯作者: 曾学军, E-mail: zxpumch@126.com

Fund program: Medical and Health Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences (2016-I2M-1-002)

痛风性关节炎是由于尿酸盐沉积在关节囊、软骨、滑囊、骨质或其他部位引起的炎性反应,好发于 40 岁以上男性,第一跖趾关节,亦可发生在其他较大关节,临床多表现为关节红肿、压痛、皮温增高等,严重者可导致关节破坏^[1]。尿酸是嘌呤代谢的最终产物,而长时间嘌呤代谢障碍、血尿酸增高是引起痛风的重要原因^[2]。软骨细胞是骨代谢中相对重要的细胞,能合成多种胶原蛋白、糖蛋白。但是,痛风性关节炎可以引起关节炎与骨侵蚀,导致骨质丢失,软骨发生破坏、软骨细胞空泡变性^[3-4]。尿酸转运子 (URAT)1 属于有机阴离子家族一员,其分布不仅局限于肾脏,在其他组织中亦可表达,能介导尿酸、乳酸等实现离子的交换,能维持人类血尿酸水平稳定^[5-6];葡萄糖转运子 (GLUT)9 属于葡萄糖转运家族中的一员,除了转运葡萄糖外,还可以参与尿酸的转运^[5,7]。因此,本研究以 2017 年 11 月至 2018 年 4 月收集的软骨组织 5 例作为对象,探讨 GLUT9 和 URAT1 在软骨细胞中的表达,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 11 月至 2018 年 4 月收集的软骨组织 5 例作为对象,男 3 例,女 2 例;年龄 54 ~ 68 (60.8 ± 5.40) 岁。纳入标准:(1) 入组患者均为因外伤致股骨颈骨折,拟行全髋关节置换术者;(2) 符合手术治疗适应证,且围术期成功获得软骨组织;(3) 均能严格遵循医嘱完成检查、治疗。排除标准:(1) 合并痛风、骨关节炎、类风湿关节炎、病理性骨折、肿瘤、局部感染者;(2) 近期服用降尿酸药物或伴有自身免疫系统疾病者;(3) 合并精神异常或围术期伴有严重并发症终止手术者。本研究经过北京协和医院伦理委员会批准 (ZS-1445)。

1.2 仪器与设备 实验所需仪器与设备见表 1。

表 1 仪器与设备

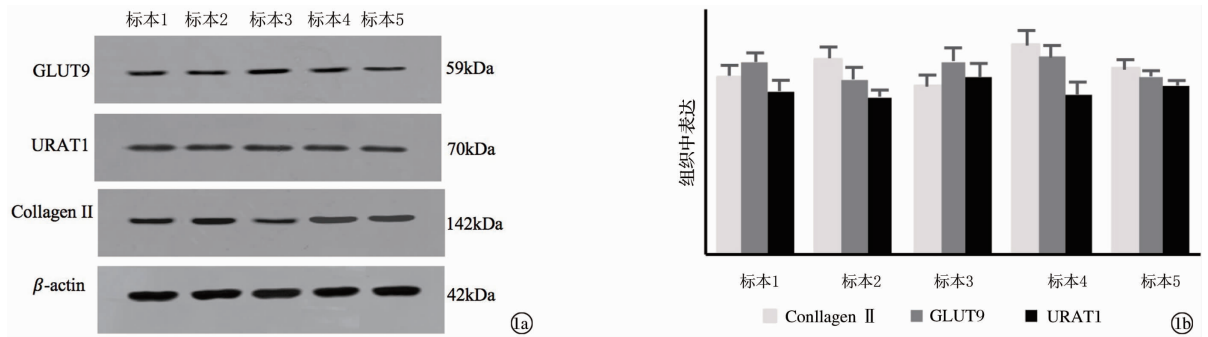
仪器与试剂	厂家
DAB 显色试剂盒	DA1010,北京索莱宝科技有限公司
苏木素	7104460,上海经科化学科技有限公司
RIPA 组织裂解液	89901, Thermo Scientific
高度冷冻离心机	美国 Eppendorf 公司
兔抗人 II 型胶原蛋白多克隆抗体	ab34712, Abcam, Cambridge, UK
兔抗人葡萄糖转运子 9	ab223470, Abcam
兔抗人尿酸转运子 1	14937-1-AP, Proteintech; Rosemont, IL, USA
鼠抗人 β -actin 多克隆抗体	TA-09, 中杉金桥
辣根酶标记山羊抗兔 IgG	ZB-2301, 中杉金桥
辣根酶标记山羊抗鼠 IgG	ZB-2305, 中杉金桥
蛋白质定量试剂盒	PI511, 北京普利莱基因技术有限公司

1.3 方法 (1) 标本采集:入组 5 例患者根据手术需要切除股骨头,切除完毕后立即放置在冰上,切取股骨头表面的关节软骨 2 份,1 份立即置入液氮中冻存;另一份浸泡在 10.0% 的福尔马林中,用于免疫组化检测。(2) 免疫印迹法 (Western blot):以 Western blot 法测定软骨组织中 GLUT9 和 URAT1 蛋白表达水平,并以 II 型胶原蛋白作为阳性对照。取液氮冻存的软骨组织,放入含有液氮的研磨器中进行研磨至粉末。向匀浆器中加入 RIPA 组织裂解液 500 μ l,待组织充分裂解后移到 EP 离心管 1.5 ml 中,10 min 离心,离心速度 12 000 rpm,离心完毕后留取上清,利用蛋白质定量试剂盒完成蛋白浓度测定并将其放置在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。精确称取待测样品 30 μ g,加入 5 \times loading buffer,煮沸 5 min 使得蛋白充分变性(检测 II 型胶原的样本不加热),取上清液,转移到 EP 管中,放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中,备用。对蛋白组织进行 SDS-PAGE 电泳、转膜后加入加入兔抗人 II 型胶原蛋白抗体 (1:1 000),兔抗人 GLUT9 抗体 (1:1 000),兔抗人 URAT1 抗体 (1:600) 和鼠抗人 β -actin 一抗 (1:1 000),4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜后进行 3 次 PBS 清洗,加入二抗,常温下孵育 45 min,清洗 3 次,每次 10 min,加入显色液,在 Tanon5200 化学发光成像系统中成像^[8-9]。使用 AlphaView 软件进行光密度分析^[10]。每个样品检测三次。(3) 免疫组化:取福尔马林固定的软骨组织,常规制作组织切片,组织切片进行常规脱蜡脱水后,使用 10 mM 枸橼酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0) 进行抗原修复。使用 3% 双氧水阻断内源性过氧化物酶,3% 牛血清 (北京索莱宝科技, A8010) 封闭非特异性抗原。切片加入兔抗人 II 型胶原蛋白抗体 (1:100),兔抗人 GLUT9 抗体 (1:100),兔抗人 URAT1 抗体 (1:100),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。孵育后的切片与二抗 (1:1 000) 在室温下孵育 50 min。随后滴加新鲜的 DAB 显色液 (DA1010),显微镜下控制显色时间,自来水冲洗切片终止显色。苏木素 (7104460, 上海经科化学科技) 复染细胞核。最后脱水至透明,中性树脂胶封片^[11]。以染色阳性细胞数计分值与染色强度计分值相加为评定结果。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 one-way ANOVA 和 Bonferroni 检验。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

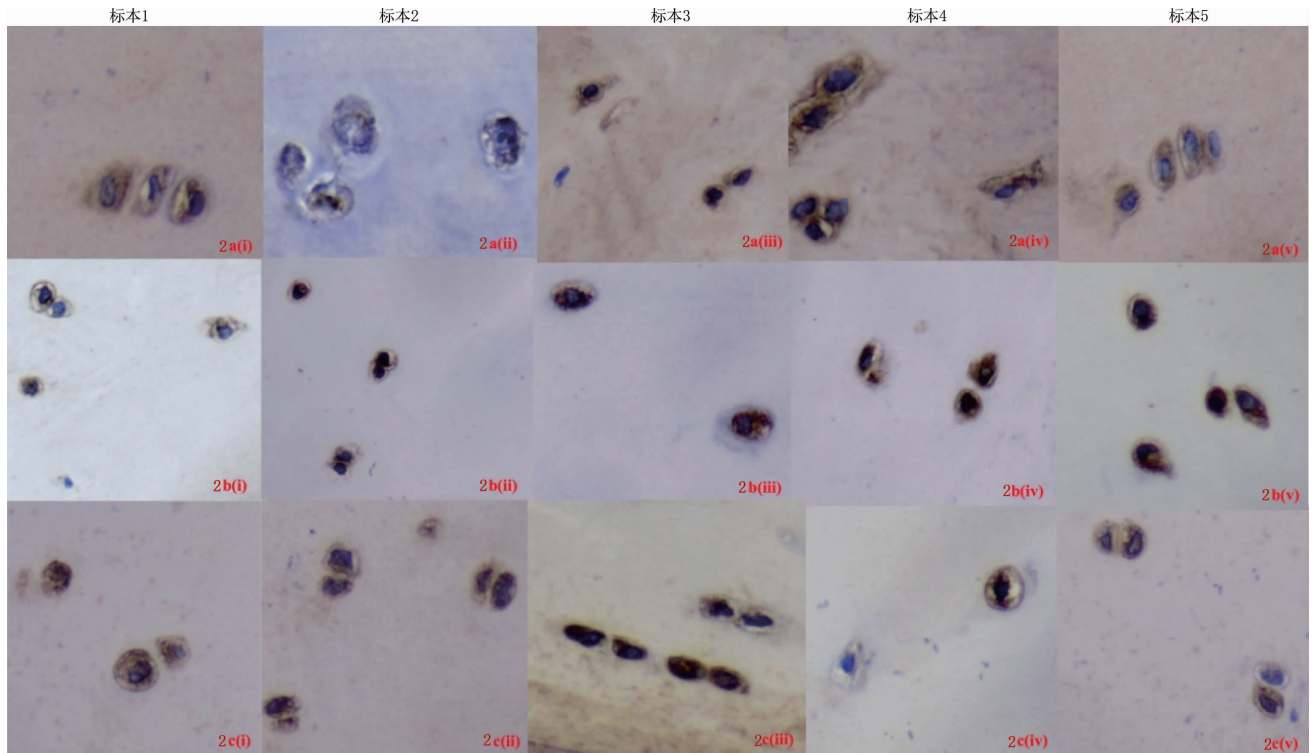
2 结果

2.1 GLUT9 和 URAT1 在软骨组织中 Western blot 结



注:1a: GLUT9 和 URAT1 蛋白表达 Western blot 电泳图;1b:GLUT9 和 URAT1 蛋白表达水平直方图。

图 1 Western blot 检测软骨组织中 GLUT9 和 URAT1 蛋白的表达



注:2a(首行): II 型胶原蛋白染色;2b(第二行):URAT1 染色;2c(第三行):GLUT9 染色;标本软骨细胞在三个抗体的染色下均呈阳性,其中 URAT1 和 GLUT9 均匀分布在细胞膜和细胞质内。

图 2 GLUT9 和 URAT1 在软骨组织中免疫组化结果($\times 200$)

果 结果表明,5 例标本 II 型胶原蛋白均为阳性,II 型胶原蛋白是软骨细胞的特征性蛋白,其染色阳性证实取材标本中包含软骨细胞。5 例标本在 59 kDa 和 70 kDa 均有阳性条带,分别对应兔抗人 GLUT9 和兔抗人 URAT1。光密度数据分析显示每个蛋白的 5 个标本间无统计学差异($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 GLUT9 和 URAT1 在软骨组织中免疫组化结果

结果表明,软骨细胞标本中可见特征性的软骨窝结构;软骨细胞经 II 型胶原蛋白抗体染色后细胞质均显现为褐色,特异性兔抗人 URAT1 和兔抗人 GLUT9 抗体染色下,软骨细胞的细胞膜可见均一的褐色染色,细胞质内亦有褐色染色分布。见图 2。

3 讨论

软骨细胞位于软骨组织表层,体积相对较小,多呈椭圆形,且越向深层软骨细胞体积越大并呈圆形。同时,软骨细胞埋藏在软骨间质中,具有合成和分泌基质与纤维的功能,是骨代谢的重要组成部分,能在生物酶的作用下合成多种胶原蛋白、糖蛋白^[12]。但临床研究显示,骨关节炎、类风湿关节炎患者的软骨细胞中糖蛋白合成率较低,能参与疾病的发生、发展^[12-13]。本研究主要观察 GLUT9 和 URAT1 在软骨组织中的表达,Western blot 结果表明,5 例标本 II 型胶原蛋白均为阳性,II 型胶原蛋白是软骨细胞的特征性蛋白,其染色阳性证实取材标本中包含软骨细胞。5 例标本在 59 kDa 和 70 kDa 均有阳性条带,分别对

应兔抗人 GLUT9 和兔抗人 URAT1, 提示软骨组织内表达 GLUT9 和 URAT1。从大的角度来说, URAT1 属于有机阴离子转运蛋白家族一员, 能表达于肾小管上皮细胞、脂肪细胞与血管平滑肌中^[5]。迄今为止尚未有软骨细胞表达 URAT1 的报道。有研究表明, URAT1 能介导尿酸、乳酸等有机阴离子、氯等无机阴离子交换, 将尿酸经肾小管的管腔重吸收入肾小管上皮细胞中, 能维持人体血尿酸水平的平衡^[14]。同时, URAT1 亦是促尿酸排泄药的作用靶点, 药物能与 hURAT1 结合抑制其蛋白活性, 能减少尿酸盐的重新吸收, 是近年来新型降尿酸药物研发的热门靶点^[15-16]。而 GLUT9 是一个高效的、电位依赖型的单转运蛋白, 属于是葡萄糖转运蛋白家族一员^[5]。在肾脏, GLUT9 可介导尿酸从肾小管上皮细胞重吸收至毛细血管网内, 完成肾小管的尿酸重吸收过程^[14]。同时 GLUT9 在肝脏和肠道均发挥着尿酸转运的功能^[17]。GLUT9 的失功能突变可导致低尿酸血症, 而其遗传多态性影响和激素水平等调节则可能上调或下调 GLUT9 的功能, 影响血尿酸水平^[18-19]。值得注意的是, Tu 等^[20]以中国男性痛风患者作为对象, 检测 GLUT9 的失义突变 rs3733591, 结果显示在痛风患者中该突变发生频率高于健康对照; 在合并痛风石患者中携带该位点的比例显著高于无痛风石的患者 [分别为 49% 和 32%, $OR = 2.05 (95\% CI 1.11 \sim 3.77, P = 0.0044)$], 提示 GLUT9 可能与痛风石形成和痛风相关骨侵蚀相关。本研究免疫组化结果表明, 软骨细胞标本中可见特征性的软骨窝结构; 软骨细胞经 II 型胶原蛋白抗体染色后细胞质均显现为褐色, 特异性兔抗人 URAT1 和兔抗人 GLUT9 抗体染色下, 软骨细胞的细胞膜可见均一的褐色染色, 细胞质内亦有褐色染色分布。但是, URAT1 和 GLUT9 在软骨细胞中的表达受到的影响因素较多, 且在软骨细胞中尿酸转运的具体机制尚不清楚, 均需要进一步探讨。

综上所述, GLUT9 和 URAT1 在软骨组织中呈高表达, 可能存在尿酸转运过程, 其是否参与痛风性关节炎的发生、发展, 有待进一步研究。

参考文献

[1] Neogi T. Gout[J]. Ann Intern Med, 2016, 165(1): ITC1 - ITC16.
 [2] Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout[J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2039 - 2052.
 [3] Chhana A, Callon KE, Pool B, et al. The effects of monosodium urate monohydrate crystals on chondrocyte viability and function: implications for development of cartilage damage in gout[J]. J Rheumatol, 2013, 40(12): 2067 - 2074.

[4] Zhu FF, Yin L, Ji LL, et al. Suppressive effect of Sanmiao formula on experimental gouty arthritis by inhibiting cartilage matrix degradation: an in vivo and in vitro study[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 30: 36 - 42.
 [5] 张冰清, 张响, 曾学军, 等. 尿酸转运蛋白是治疗高尿酸血症的新靶点[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(11): 1582 - 1585.
 [6] Tan PK, Farrar JE, Gaucher EA, et al. Coevolution of URAT1 and uricase during primate evolution: implications for serum urate homeostasis and gout[J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(9): 2193 - 2200.
 [7] Ebert K, Ludwig M, Geillinger KE, et al. Reassessment of GLUT7 and GLUT9 as putative fructose and glucose transporters[J]. J Membr Biol, 2017, 250(2): 171 - 182.
 [8] 赵金香, 胡章云, 李耀华, 等. 菊粉联合游泳训练对代谢综合征大鼠骨骼肌胰岛素受体底物 1 及葡萄糖转运子 4 表达的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(9): 831 - 835.
 [9] 何慧君, 欧阳翠雯. 葡萄糖转运蛋白 1 和己糖激酶-II 在乳腺癌组织中的表达及其评价患者预后的价值[J]. 中国临床研究, 2017, 30(6): 752 - 755.
 [10] Zhai KF, Duan H, Khan GJ, et al. Salicin from Alangium chinense Ameliorates Rheumatoid Arthritis by Modulating the Nrf2-HO-1-ROS Pathways[J]. J Agric Food Chem 2018, 66: 6073 - 6082.
 [11] Uemura N, Murakami R, Chiba Y, et al. Immunoreactivity of urate transporters, GLUT9 and URAT1, is located in epithelial cells of the choroid plexus of human brains[J]. Neurosci Lett, 2017, 659: 99 - 103.
 [12] 蒋总, 陈琳英, 卢向阳, 等. 骨关节炎软骨细胞的来源、分离及体外培养的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(9): 62 - 65.
 [13] 范凯健, 许颖, 王婷玉, 等. 软骨细胞在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(7): 848 - 851.
 [14] Nakanishi T, Ohya K, Shimada S, et al. Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate[J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28(3): 603 - 611.
 [15] 张冰清, 曾学军. 新型降尿酸药物的研究进展[J]. 中华内科杂志, 2016, 55(12): 969 - 972.
 [16] Wu T, Chen JS, Dong S, et al. Identification and characterization of a potent and selective inhibitor of human urate transporter 1[J]. Pharmacol Rep, 2017, 69(5): 1103 - 1112.
 [17] Xu XX, Li CH, Zhou P, et al. Uric acid transporters hiding in the intestine[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(12): 3151 - 3155.
 [18] Ruiz A, Gautschi I, Schild L, et al. Human mutations in SLC2A9 (glut9) affect transport capacity for urate[J]. Front Physiol, 2018, 9: 476.
 [19] Bu PL, Le Y, Zhang Y, et al. Hormonal and chemical regulation of the glut9 transporter in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017, 360(1): 206 - 214.
 [20] Tu HP, Chen CJ, Tovosia S, et al. Associations of a non-synonymous variant in SLC2A9 with gouty arthritis and uric acid levels in Han Chinese subjects and Solomon Islanders[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(5): 887 - 890.