

Muted 蛋白介导 CD63 在嗜铬细胞大致密核心颗粒的定位

郝振华, 李巍

首都医科大学附属北京儿童医院, 北京市儿科研究所医学遗传中心, 教育部儿科重大疾病研究重点实验室, 北京 100045

摘要: 大致密核心颗粒(Large dense-core vesicles, LDCVs)是一种溶酶体相关细胞器(Lysosome-related organelles, LROs), 在细胞受到刺激时快速释放其内含物, 从而调节机体生长发育、物质代谢和能量代谢等, 维持机体的稳态。Muted 蛋白是溶酶体相关细胞器生物发生复合体-1(Biogenesis of lysosomal organelles complex-1, BLOC-1)的一个亚基, 参与调控溶酶体和多种细胞特异性 LROs 的生物学发生。四联体跨膜蛋白 CD63 最初被定位在内体-溶酶体系统, 后来发现它也参与部分 LROs 膜的组成。CD63 是否存在于 LDCVs 尚不清楚, 其靶向运输过程是否依赖 Muted 蛋白也不明确。本研究以肾上腺嗜铬细胞为细胞模型, 采用荧光共定位、活细胞追踪和密度梯度离心等实验鉴定 CD63 蛋白为 LDCVs 的膜组分, 并探讨了其生物学功能。活细胞实验显示 CD63-YFP 特异性定位在 NPY-dsRed 标记的 LDCVs 上, 并动态参与 LDCVs 膜的组成; 密度梯度离心实验表明高密度区的 CD63 与 LDCVs 的标记蛋白 VMAT1 共同出峰; Muted 蛋白缺乏的小鼠(*Bloc1s5* 基因突变)是一种理想的 Hermansky-Pudlak 综合征(HPS)小鼠模型, 免疫印迹实验显示该突变体小鼠肾上腺组织中 CD63 蛋白含量明显减少, 暗示 Muted 蛋白可能参与 CD63 的分选。以上结果表明 CD63 是 LDCVs 的膜成分, CD63 在胞内的稳态水平依赖于 Muted 蛋白, 为 HPS 的病理发生机制提供一定的理论依据。

关键词: 大致密核心颗粒; CD63; Muted; 溶酶体相关细胞器; Hermansky-Pudlak 综合征

Muted protein is involved in the targeting of CD63 to large dense-core vesicles of chromaffin cells

Zhenhua Hao, Wei Li

Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education, Center for Medical Genetics, Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China

Abstract: Large dense-core vesicles (LDCVs) are characterized as a class of lysosome-related organelles (LROs), which undergo regulated release and play important roles in development, metabolism and homeostasis. The Muted protein is a subunit of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1), which functions in the biogenesis of lysosomes and LROs. CD63 is a membrane component of lysosomes and LROs. Whether and how CD63 is sorted into LDCVs

收稿日期: 2016-05-03; 修回日期: 2016-06-06

基金项目: 北京市自然科学基金项目(编号: 5164032)资助[Supported by Beijing Natural Science Foundation (No. 5164032)]

作者简介: 郝振华, 博士, 助理研究员, 研究方向: 医学遗传学与细胞生物学。E-mail: nanshayu@163.com

通讯作者: 李巍, 博士, 教授, 研究方向: 医学遗传学与细胞生物学。E-mail: liwei@bch.com.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-156

网络出版时间: 2016/6/30 10:40:50

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160630.1040.005.html>

is largely unknown. In this study, we aim to identify the localization of CD63 in chromaffin cells by colocalization, living cell imaging and cell fractionation. We found that a proportion of CD63-YFP colocalized with NPY-dsRed labeled LDCVs. By sucrose density gradient fractionation, a proportion of CD63 was found to be highly enriched in LDCVs fractions. The Muted mutant mouse is a model of Hermansky-Pudlak syndrome (HPS). We also found that the level of CD63 was significantly decreased in Muted-deficient adrenal glands, suggesting that the Muted protein is important for the steady-state level of CD63. Our results suggest that CD63 is a membrane component of LDCVs and the stability of CD63 is dependent on the Muted protein, which provides a clue to the pathogenesis of LRO defects in HPS.

Keywords: large dense-core vesicles; CD63; Muted; lysosome-related organelle; Hermansky-Pudlak syndrome

大致密核心颗粒(Large dense-core vesicles, LDCVs)是内分泌细胞所特有的标志性细胞器,分布于内分泌腺和其他器官的内分泌细胞中^[1]。LDCVs 内腔含有大量的粒蛋白(Granin)、神经肽(Neuropeptide)、酶和蛋白酶抑制剂,并贮存儿茶酚胺类神经递质、ATP、抗坏血酸(Ascorbic acid)和钙等^[2]。当细胞受到刺激时,LDCVs 进行调节型分泌,其贮存的物质以血液循环或局部扩散的方式调节其他器官的功能,对机体的发育、代谢以及行为等具有重要的调控作用^[3]。

LDCVs 膜蛋白是隔离细胞质和 LDCVs 内含物的有效屏障,而且在 LDCVs 形成、内含物的分选以及胞吐等过程中发挥至关重要的作用。近年来,LDCVs 膜蛋白的鉴定和功能解析日益受到科学家的关注。随着分子生物学及生物化学等技术手段的发展和运用,目前已鉴定出多个 LDCVs 膜蛋白,如 VMAT1^[4]、VMAT2^[4]、Synaptotagmin^[5]和 VAMP2^[6]等,但是大多数膜蛋白成分仍然未知。已知 CD63 是四联体跨膜蛋白家族的成员,在细胞膜表面、外泌体^[7]、多泡体(Multivesicular bodies, MVBs)和溶酶体^[8]上分布。越来越多的研究表明 CD63 也出现在组织特异性的溶酶体相关细胞器上,如血管内皮的 WPB 小体(Weibel-Palade bodies)^[9,10]、血小板的致密颗粒^[11]、树突状细胞的 MHCII(Major histocompatibility complex II)^[8,12]等。LDCVs 内部呈酸性,含有单层膜结构,具有储存和分泌功能,近年来有学者将其归为溶酶体相关细胞器家族的成员^[13]。CD63 是否参与 LDCVs 膜的组成及其分选机制目前还没有报道。

肾上腺髓质嗜铬细胞中含有大量形态典型的 LDCVs。本研究以嗜铬细胞 LDCVs 为研究模型,结合荧光共定位、活细胞追踪和密度梯度离心等多种

方法,发现 CD63 在 LDCVs 膜上也有分布。Muted 蛋白是溶酶体相关细胞器发生复合体-1(Biogenesis of lysosome-related organelles complexe-1, BLOC-1)的一个亚基,参与细胞内体-溶酶体系统货物的分选和运输^[13,14],并且介导溶酶体相关细胞器货物的运输及其生物学发生过程。本实验室前期的研究结果发现,Muted 缺乏影响 LDCVs 的形态结构、内含物的分选以及 LDCVs 的分泌功能^[15]。在前期实验的基础上,本研究以 Muted 缺乏的突变体小鼠——*mu* 小鼠(一种人 Hermansky-Pudlak 综合征小鼠模型^[16])为材料,进一步分析了 Muted 缺乏对 CD63 的影响,发现 *mu* 小鼠肾上腺嗜铬细胞中 CD63 的蛋白含量显著减少。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

CHMU/Le(野生型, +/+)和 *mu*(突变体, *mu/mu*)纯合小鼠由美国 Richard T. Swank 实验室馈赠,中国科学院遗传与发育生物学研究所动物中心 SPF (Specific pathogen free, SPF)屏障内饲养繁殖。

1.1.2 细胞系和质粒

CD63-YFP、Rab5-pEGFP、Rab7-pEGFP 和 LAMP1-mCherry 质粒为本实验室保存;NPY (Neuropeptide Y)-dsRed 和 NPY-pEGFP 为中国科学院生物物理研究所徐涛实验室惠赠;大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞系为中国科学院遗传与发育生物学研究所许执恒实验室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 PC12 细胞培养和细胞转染

PC12 细胞系培养在 37℃、含 5%CO₂ 的培养箱

中,培养基为含 10% 马血清(Gibco, USA)和 5% 胎牛血清的 DMEM(Gibco, USA),常规方法传代和冻存。将生长状态良好的 PC12 细胞接种到 P-D-L 包被的盖玻片,培养过夜后按 Lipofectamine™ 2000(Life Technologies, USA)试剂说明书转染,表达 24 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞,室温风干,90% 甘油封片,100 倍激光共聚焦显微镜(ECLIPSE Ti-C2, Nikon, Japan)观察并采集图片。

1.2.2 活细胞实验

PC12 细胞接种到 P-D-L 包被的玻璃底细胞培养皿,转染 24 h 后,放在 Nikon 活细胞小室中,去除培养基,换成台氏缓冲液(119 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂, 2 mmol/L MgCl₂, 30 mmol/L Glucose 和 25 mmol/L Hepes, pH 7.4),保持 37℃ 和 5% CO₂ 的培养条件,100×油镜(Nikon C1-si, Nikon, Japan)观察,拍摄采集。

1.2.3 Western blotting 实验

取 2~3 月龄成年同窝野生型和突变体雄鼠的双侧肾上腺组织,加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100 和蛋白酶抑制剂, pH 7.4),冰上匀浆裂解,BCA 法对蛋白定量,上样量为 50 μg。用 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜(Millipore, USA)。一抗分别按以下比例稀释:PC1(NOVUS, USA)为 1:2000, β-actin(Sigma-Aldrich, USA)为 1:10000, Muted(自制^[15])为 1:2000, LAMP1(Sigma-Aldrich, USA)为 1:5000, CD63(BD, USA)为 1:2000, Synaptotagmin (Assay Designs, USA)为 1:500, VMAT1(Santa Cruz, USA)为 1:500。

1.2.4 蔗糖密度梯度离心

用含 0.3 mol/L 蔗糖的缓冲液(5 mmol/L Na₂EDTA 和 20 mmol/L Hepes, pH 7.4)匀浆裂解肾上腺组织,铺于 0.6 mol/L 到 1.6 mol/L 蔗糖(Sigma-Aldrich, USA)密度梯度上。调节台式超速离心机(Beckman Coulter, USA)30 000 r/min, 4℃ 离心 12 h。离心结束后,从上到下等量吸取不同组分, TCA(三氯乙酸)-DOC(脱氧胆酸钠)-丙酮法沉淀蛋白,进行 Western blotting 实验。

1.2.5 统计学分析

CD63 的相对含量以均值±标准误(mean±SEM)表示,对两样本均数采用 Student's *t* 检验分析, *P*<0.05 为有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 CD63 在 LDCVs 上的定位

将 NPY-pEGFP 与 NPY-dsRed 共转染到 PC12 细胞中,两者在 PC12 细胞中呈点状分布,并很好的共定位(图 1A),可作为 LDCVs 的标记蛋白。将 NPY 与不同的细胞器标记共转染到 PC12 细胞中,共聚焦显微镜下观察,发现 NPY 与 CD63 有部分共定位(图 1A),而与早期内涵体标记物 Rab5、晚期内涵体标记物 Rab7 和溶酶体标记物 LAMP1 没有明显共定位(图 1A),提示 CD63 是 LDCVs 的膜组成成分。为进一步检测内源性 CD63 是否分布在 LDCVs 上,将小鼠肾上腺组织匀浆经蔗糖密度梯度离心后,从上到下等体积吸取不同组分,进行 Western blotting 实验。结果显示 CD63 在低密度区和高密度区出现两个峰,高密度区的 CD63 与 LDCVs 的标志性膜蛋白 VMAT1 共同出峰(图 1B),说明内源性 CD63 在密度较高的 LDCVs 区也有分布。

2.2 CD63 在 LDCVs 上的动态运输

为进一步明确 CD63 与 NPY 标记的 LDCVs 之间的关系,本研究利用活细胞追踪的方法检测 CD63 在 LDCVs 上的动态变化。在 PC12 细胞中共转染 CD63-YFP 和 NPY-dsRed,发现 CD63-YFP 呈点、环和管状分布(图 2A),绝大部分 CD63 与 NPY-dsRed 重叠,说明 CD63 参与了 LDCVs 膜的组成。NPY-dsRed 标记的 LDCVs 在细胞内比较稳定,而 CD63-YFP 相对活跃,不断与 NPY-dsRed 标记的 LDCVs 融合后离开(图 2B),或从 LDCVs 上以出芽方式从 LDCVs 脱离(图 2, C 和 D),提示 CD63 可能参与了 LDCVs 内含物的分选和运输,这与已知的 CD63 作为分选机器的角色也是一致的^[17~19]。

2.3 CD63 的稳定性依赖 Muted 蛋白

利用 Western blotting 检测野生型(+/+)和纯合子(mu/mu)小鼠肾上腺组织蛋白抽提物,发现 CD63 的

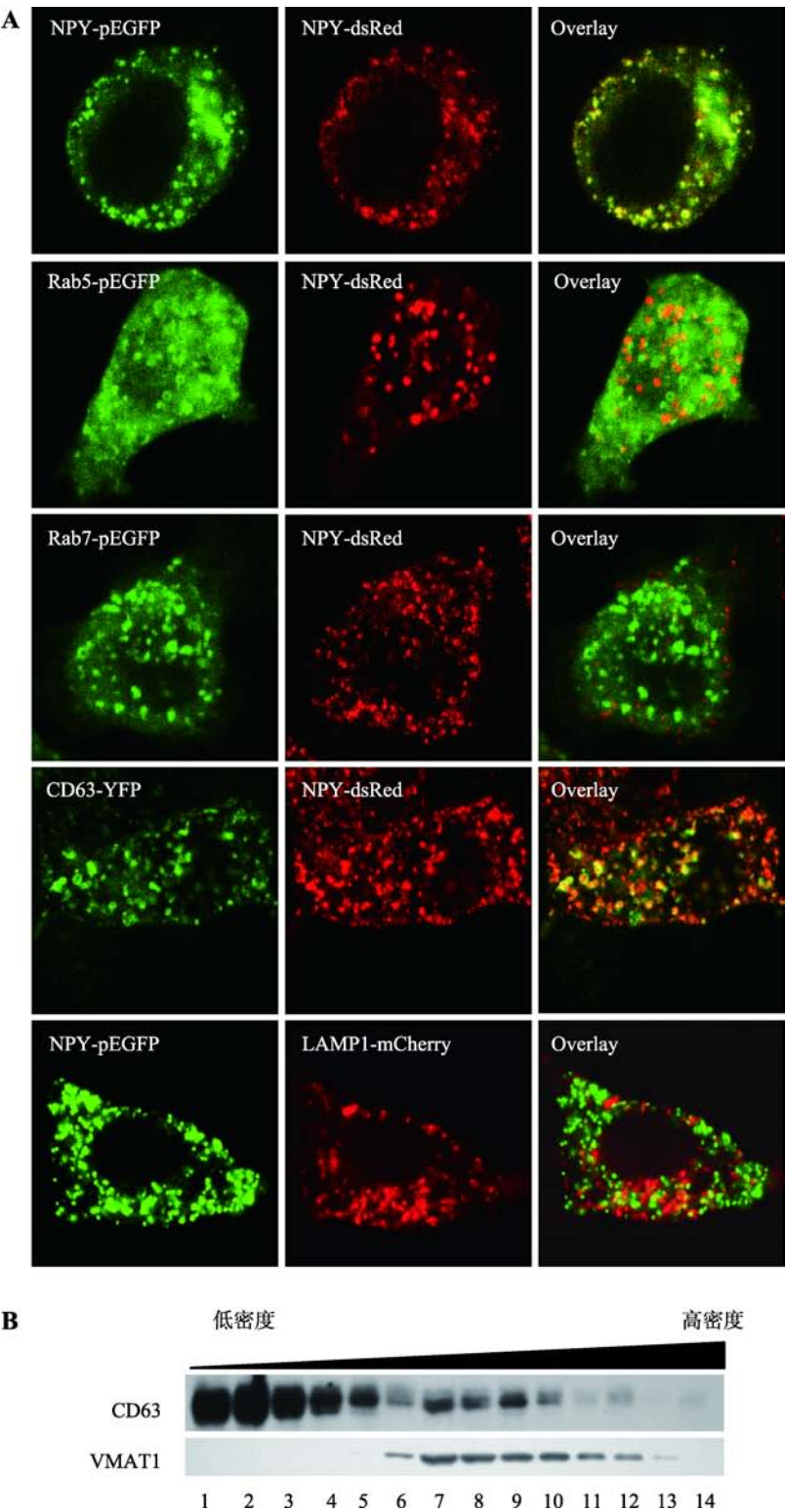


图 1 CD63 在 LDCVs 上的分布

Fig. 1 Localization of CD63 in LDCVs

A : 荧光共聚焦显微镜观察 CD63 的分布。图中标注的质粒共转染到 PC12 细胞, 24 h 后观察 CD63、Rab5、Rab7 以及 LAMP1 与 NPY 标记的 LDCVs 之间的空间分布关系。B : 内源性 CD63 在 LDCVs 上的分布。肾上腺组织匀浆经蔗糖密度梯度离心后进行 Western blotting 检测, 1~14 泳道表示蔗糖浓度由低到高。

蛋白水平依赖 Muted 蛋白的存在, *mu* 小鼠组织中几乎检测不到 CD63 蛋白的表达, 而溶酶体膜蛋白 LAMP1、LDCVs 膜蛋白 VMAT1 和 Synaptotagmin 1、LDCVs 内含蛋白 PC1 以及内参 β -actin 的蛋白水平均没有明显改变(图 3), 说明 Muted 蛋白的缺失特异性降低了 CD63 的稳态水平。

3 讨 论

CD63 是四联体跨膜蛋白(Tetraspanin)家族的成员, 广泛表达在内体-溶酶体系统和细胞膜表面。在组织特异性细胞中, CD63 在溶酶体相关细胞器上也有分布。CD63 与 LAMP1、LAMP2 和 LIMPII 结构相似, 都是溶酶体膜蛋白家族的成员。不同的是 CD63 属于四次跨膜超家族(TM4SF)膜蛋白, 能与脂质双分子层、整合素、膜受体、衔接蛋白复合体以及其他 TM4SF 分子直接或间接结合, 参与不同的生物学过程^[12]。CD63 通过介导货物(包括内腔可溶性蛋白、颗粒膜蛋白的可溶性内腔结构域及膜蛋白)的分选和靶向运输参与 LROs 的发生, 被认为是 LROs 发生的分选机器^[17-19]。

本文发现 CD63 定位在嗜铬细胞的 LDCVs 上, 密度梯度离心实验显示 CD63 在高密度区与 LDCVs 膜蛋白 VMAT1 共同出峰。这些结果表明 CD63 是 LDCVs 的膜组成成分。此外还有大量的 CD63 分布在 LDCVs 以外的低密度区域, 这部分可能是分布在多泡体、溶酶体以及质膜上的 CD63。

CD63 分选进入 LDCVs 的机制还不明确。Muted 蛋白是 BLOC-1 的一个亚基, 参与细胞内体-溶酶体系统货物的分选, 并且介导溶酶体相关细胞器货物的运输及其生物学发生过程^[14]。本文发现在 Muted 缺乏的突变体小鼠肾上腺中, CD63 稳态水平明显降低, 但 Muted 是胞质蛋白, 没有跨膜区域, 而 CD63 定位在 LDCVs 膜, 推测 Muted 可能直接或间接识别并结合 CD63, 介导 CD63 的分选和运输, 参与 CD63 在 LDCVs 的正常定位。缺乏 Muted 时, 其定位异常可能导致其错误运输到溶酶体降解, 这方面还有待于进一步实验证实。*mu* 突变小鼠表现出以多种 LRO 缺陷为特征的 Hermansky-Pudlak 综合征(HPS)的表型, HPS 是一种常染色体隐性遗传病, 患者表现为眼皮肤白化病、出血倾向等^[14]。Muted 影响 CD63

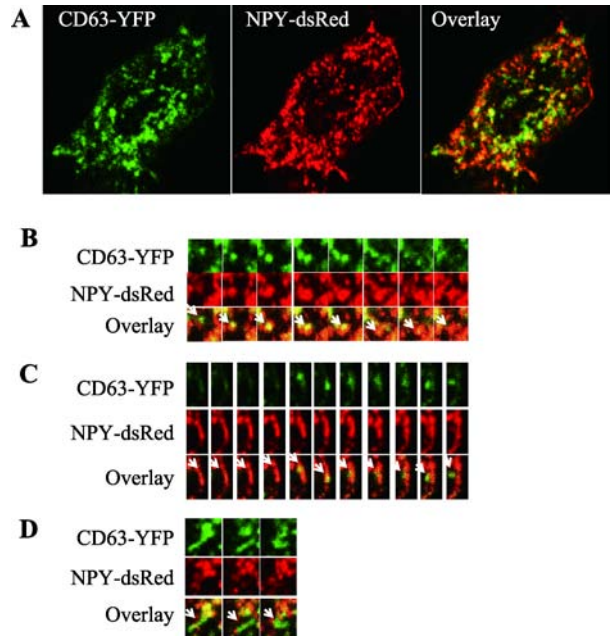


图 2 活细胞内 CD63 在 LDCVs 上的动态运输

Fig. 2 Living cell imaging shows dynamic interaction between CD63 and LDCVs

A: PC12 细胞中共转染 CD63-YFP 和 NPY-dsRed。B~D: CD63-YFP 和 NPY-dsRed 随时间序列的运动。白色箭头指向荧光标记颗粒, 从左到右显示颗粒随时间序列的位置变化。

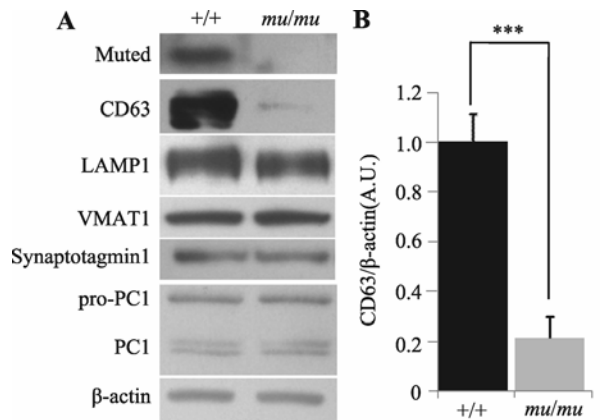


图 3 野生型和 *mu* 小鼠肾上腺组织中 CD63 蛋白的稳态水平

Fig. 3 Steady-state level of CD63 in wild-type and *mu* adrenal glands

A: Western blotting 检测野生型(+/+)和纯合突变体(mu/mu)小鼠肾上腺组织中 CD63、LAMP1、VMAT1、Synaptotagmin 1、PC1 前体(pro-PC1)和 PC1 的稳态水平。 β -actin 作为内参, *mu* 小鼠中检测不到 Muted 蛋白。B: CD63 相对平均含量的柱状统计图。测量 Western blotting 实验中 CD63 和 β -actin 条带的相对灰度值, 分别得到野生型(+/+, $n=8$)和纯合突变体(mu/mu, $n=8$)小鼠 CD63 与 β -actin 的相对比值, 共 3 次以上独立重复实验, *** $P<0.001$ 。

的稳态水平, 暗示其可能参与多种 LRO 的生物发生, 这为解释 HPS 患者的 LRO 的病理变化提供了一定依据。

参考文献(References):

- [1] Kim T, Gondré-Lewis MC, Arnautova I, Loh YP. Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21(2): 124–133. [DOI]
- [2] Crivellato E, Nico B, Ribatti D. The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008, 291(12): 1587–1602. [DOI]
- [3] Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J, Hwang SR. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48: 393–423. [DOI]
- [4] Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE. Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic*, 2008, 9(9): 1425–1436. [DOI]
- [5] Matsuoka H, Harada K, Nakamura J, Fukuda M, Inoue M. Differential distribution of synaptotagmin-1, -4, -7, and -9 in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Tissue Res*, 2011, 344(1): 41–50. [DOI]
- [6] Chang CW, Hui EF, Bai JH, Bruns D, Chapman ER, Jackson MB. A structural role for the synaptobrevin 2 transmembrane domain in dense-core vesicle fusion pores. *J Neurosci*, 2015, 35(14): 5772–5780. [DOI]
- [7] Li TM, Lan WJ, Huang C, Zhang C, Liu XM. Establishment and identification of the near-infrared fluorescence labeled exosomes in breast cancer cell lines. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(5): 427–435.
李泰明, 蓝文俊, 黄灿, 张春, 刘晓玫. 近红外荧光蛋白标记乳腺癌细胞外泌体的构建及鉴定. *遗传*, 2016, 38(5): 427–435. [DOI]
- [8] Mantegazza AR, Barrio MM, Moutel S, Bover L, Weck M, Brossart P, Teillaud JL, Mordoh J. CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. *Blood*, 2004, 104(4): 1183–1190. [DOI]
- [9] Zhang Z, Li W. Formation and function of Weibel-Palade bodies. *Hereditas (Beijing)*, 2009, 31(9): 882–888.
张喆, 李巍. Weibel-Palade 小体形成和功能研究进展. *遗传*, 2009, 31(9): 882–888. [DOI]
- [10] Vischer UM, Wagner DD. CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*, 1993, 82(4): 1184–1191. [DOI]
- [11] Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerard JM. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest*, 1993, 91(4): 1775–1782. [DOI]
- [12] Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*, 2009, 315(9): 1584–1592. [DOI]
- [13] Wei AH, Li W. Hermansky-Pudlak syndrome: pigmentary and non-pigmentary defects and their pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, 26(2): 176–192. [DOI]
- [14] Hao ZH, Li W. Cellular functions of the lysosomal transport. *Chin Bull Life Sci*, 2010, 22(11): 1138–1146.
郝振华, 李巍. 内体—溶酶体运输及其细胞功能. *生命科学*, 2010, 22(11): 1138–1146. [DOI]
- [15] Hao ZH, Wei LS, Feng YQ, Chen XW, Du W, Ma J, Zhou Z, Chen LY, Li W. Impaired maturation of large dense-core vesicles in muted-deficient adrenal chromaffin cells. *J Cell Sci*, 2015, 128(7): 1365–1374. [DOI]
- [16] Zhang Q, Li W, Novak EK, Karim A, Mishra VS, Kingsmore SF, Roe BA, Suzuki T, Swank RT. The gene for the muted (*mu*) mouse, a model for Hermansky-Pudlak syndrome, defines a novel protein which regulates vesicle trafficking. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(6): 697–706. [DOI]
- [17] Flannery AR, Czibener C, Andrews NW. Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca^{2+} sensor synaptotagmin VII to lysosomes. *J Cell Biol*, 2010, 191(3): 599–613. [DOI]
- [18] van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell*, 2011, 21(4): 708–721. [DOI]
- [19] Källquist L, Hansson M, Persson AM, Janssen H, Calafat J, Tapper H, Olsson I. The tetraspanin CD63 is involved in granule targeting of neutrophil elastase. *Blood*, 2008, 112(8): 3444–3454. [DOI]

(责任编辑: 史岸冰)