

和方法,提高我们对髋关节病变的认识及人工假体的设计水平,为髋关节外科学的发展提供有益的思路。

参考文献

- 1 Marshall AD, Mokris JG, Reitman RD, *et al.* Cementless titanium tapered - wedge femoral stem: 10 - to 15 - year follow - up[J]. J Arthroplasty, 2004, 19(5):546 - 552
- 2 Hallan G, Espehaug B, Furnes O, *et al.* Is there still a place for the cemented titanium femoral stem? [J]. Acta Orthop, 2012, 83(1):1 - 6
- 3 Wong AS, New AMR, Isaacs G, *et al.* Effect of bone material properties on the initial stability of a cementless hip stem: a finite element study[J]. Proc Inst Mech Eng, 2005, 219(4):265 - 275
- 4 Pancanti A, Bernakiewicz M, Viceconti M. The primary stability of a cementless stem varies between subjects as much as between activities [J]. J Biomech, 2003, 36(6):777 - 785
- 5 Viceconti M, Pancanti A, Varini E, *et al.* On the biomechanical stability of cementless straight conical hip stems[J]. Proc Inst Mech Eng, 2006, 220(3):473 - 480
- 6 Hsu JT, Chang CH, An KN, *et al.* Effects of screw eccentricity on the initial stability of the acetabular cup[J]. Int Orthop, 2007, 31(4):451 - 455
- 7 Mann KA, Miller MA, Costa PA, *et al.* Interface micromotion of un-

- cemented femoral components from postmortem retrieved total hip replacements[J]. J Arthroplasty, 2012, 27(2):238 - 245
- 8 Viceconti M, Pancanti A, Dotti M, *et al.* Effect of the initial implant fitting on the predicted secondary stability of a cementless stem[J]. Med Biol Eng Comput, 2004, 42(2):222 - 229
- 9 Spinarelli A, Patella V, Conserva V, *et al.* Hip painful prosthesis: surgical view[J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2011, 8(2):14 - 18
- 10 Engh CA, Oconnor D, Jasty M, *et al.* Quantification of implant micromotion, strain shielding, and bone - resorption with porous - coated anatomic medullary locking femoral prostheses[J]. Clin Orthop Relat Res, 1992, 285:13 - 29
- 11 Varini E, Cristofolini L, Traina F, *et al.* Can the rasp be used to predict intra - operatively the primary stability that can be achieved by press - fitting the stem in cementless hip arthroplasty[J]? Clin Biomech (Bristol, Avon), 2008, 23(4):408 - 414
- 12 Heller MO, Kassi JP, Perka C, *et al.* Cementless stem fixation and primary stability under physiological - like loads in vitro[J]. Biomed Tech (Berl), 2005, 50(12):394 - 399

(收稿日期:2012 - 05 - 09)

(修回日期:2012 - 09 - 12)

利用优化的显微技术观察和定位 Merm1/Wbscr22 在人肺癌细胞 NCI - H1299 中的表达

颜冬梅 郑晓亮 屠凌岚 高明 王孝举

摘要 **目的** 优化细胞免疫荧光染色技术结合激光扫描共聚焦显微镜技术的实验步骤,观察并定位 Merm1/Wbscr22 在人肺癌细胞 NCI - H1299 中的表达,以期对后续深入研究 Merm1/Wbscr22 的分子功能提供技术支持。**方法** 采用 Western blot 及细胞免疫荧光染色结合激光扫描共聚焦显微镜技术观察 Merm1/Wbscr22 在 NCI - H1299 细胞的表达与定位,改进并优化免疫荧光染色实验步骤。**结果** Merm1/Wbscr22 蛋白在 NCI - H1299 细胞内过量表达,并定位于细胞核内。细胞免疫染色步骤显著地影响 Texas Red - 鬼笔环肽的非特异性染色及 F - actin、Merm1/Wbscr22、细胞核 DNA 染色荧光的强度。**结论** 结合细胞免疫荧光染色技术与激光扫描共聚焦显微镜技术可以清楚地观察 Merm1/Wbscr22 在人肺癌细胞 NCI - H1299 的表达与定位,该技术的最优实验步骤是细胞固定、透膜、封闭、Texas Red - 鬼笔环肽标记 F - actin、一抗结合、二抗结合、DAPI 标记细胞核 DNA,最后共聚焦显微镜成像,这样既能减少 Texas Red - 鬼笔环肽的非特异性染色,各组分荧光强度又足够清晰利于观察。

关键词 免疫荧光染色 激光扫描共聚焦显微镜 Merm1/Wbscr22

Observation and Localization of Merm1/Wbscr22 Expression in NCI - H1299 Cells Using Optimized Microscope Technology. Yan Dongmei, Zheng Xiaoliang, Tu Linglan, Gao Ming, Wang Xiaojun. The Center for Molecular Medicine, Institute of Hygiene, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310013, China

Abstract Objective To optimize the experimental procedures to clearly observe and localize the expression of Merm1/Wbscr22 in

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(CF1214D);浙江省科技厅科技条件建设项目(2011F10015)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院分子医学中心(颜冬梅、郑晓亮、屠凌岚、王孝举),卫生学研究所(高明)

通讯作者:王孝举,电子信箱:wang. x. george@gmail.com

NCI - H1299 cells using immunofluorescence and confocal laser scanning microscope (CLSM), thus providing technical foundation for further study of the function of Merm1/Wbscr22 in the context of tumorigenesis. **Methods** The expression and localization of Merm1/Wbscr22 in NCI - H1299 cells were determined by Western Blot and immunofluorescence staining combined with CLSM. Different conditions were tested to enhance the fluorescent signals. **Results** In NCI - H1299 cells, Merm1/Wbscr22 proteins were overexpressed and localized in cell nuclei. The different staining steps could result in the non - specific staining of Texas Red - phalloidin, as well as the fluorescent intensity of F - actin, Merm1/Wbscr22 and DNA. **Conclusion** The optimal fluorescent staining steps are fixation, Triton X - 100 extraction, blocking, F - actin staining by Texas Red - phalloidin, primary antibody incubation, secondary antibody incubation, DNA staining by DAPI and photograph with CLSM. This procedure not only significantly decreases artificial staining caused by Texas Red - phalloidin, but also enhances the fluorescent intensity.

Key words Immunofluorescence; Confocal laser scanning microscope; Merm1/Wbscr22

Merm1/Wbscr22 基因是威廉综合征 (Williams - Beuren syndrome) 患者的一个缺失基因^[1]。Merm1/Wbscr22 mRNA 在人体组织中普遍存在,尤其在心肌和骨骼肌中表达最高,但其功能尚不清楚^[2-5]。对 Merm1/Wbscr22 的功能进行深入研究,首先需要明确其在机体组织细胞中的表达及分布。已有文献报道人 Merm1/Wbscr22 蛋白定位于人黑色素瘤细胞 A375M 的细胞核内,推测 NCI - H1299 细胞中 Merm1/Wbscr22 蛋白亦可能分布于细胞核^[4]。本实验拟采用细胞免疫荧光染色与激光扫描共聚焦显微镜技术相结合的方法观察 Merm1/Wbscr22 在人肺癌细胞株 NCI - H1299 的表达与定位,以期对后续深入研究其功能提供技术支持。

目前常规的免疫荧光染色方法包括利用荧光偶联鬼笔环肽标记细胞 F - actin, DAPI 标记细胞核 DNA,靶向特异性一抗与荧光二抗标记目标蛋白等,因此需要一定程度的透膜,在细胞膜上形成孔洞,以利于靶向特异性一抗与荧光标记二抗进入细胞内,与目的蛋白结合。而对于细胞核内靶向蛋白的染色定位,则需要更为严格的透膜处理,以便检测抗体进入细胞核内。一般的实验步骤为:细胞固定、透膜、封闭、一抗结合、二抗结合、荧光偶联鬼笔环肽标记 F - actin、DAPI 标记细胞核 DNA、激光扫描共聚焦显微镜观察成像。但如果细胞透膜后再进行荧光偶联鬼笔环肽标记 F - actin,因鬼笔环肽分子质量小,易大量进入细胞质、细胞核,从而导致非特异性染色^[6,7];若不进行透膜处理或透膜时间过短,一抗和(或)二抗可能不能进入或仅少量进入细胞核与目标蛋白结合,而导致假阴性或目的蛋白荧光强度太弱。多聚甲醛固定细胞时细胞膜产生的孔洞足以让鬼笔环肽进入细胞,因此是否可以优化实验步骤,既能使目的蛋白染色,又避免鬼笔环肽非特异性信号,笔者对此进行了探索^[7]。

材料与方法

1. 材料: Merm1/Wbscr22 特异性兔抗人多克隆一抗为美国 GeneTex 公司产品;HRP - 鼠抗兔二抗为美国 CST 公司产品;荧光标记二抗 Alexa Fluor 488 - 驴抗兔 IgG、Texas Red - 鬼笔环肽均为美国 Invitrogen 公司产品。Alexa Fluor 488 - 驴抗兔 IgG 用前离心,取上清用于实验。Texas Red - 鬼笔环肽配制成 200units/ml 甲醇储备液, - 20℃ 保存。BCA 法蛋白定量试剂盒、一抗稀释液、二抗稀释液、DAPI 染色液及抗荧光淬灭封片液购自碧云天生物科技有限公司;DMEM 培养基、胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品;胎牛血清为杭州四季青生物材料有限公司产品。

2. 细胞株:人肺癌细胞株 NCI - H1299 购自中国科学院上海细胞库。含有靶向人 Merm1/Wbscr22 的 shRNA 序列的质粒稳定转染 NCI - H1299 细胞,建立敲低 Merm1/Wbscr22 表达的 NCI - H1299/shRNA 细胞株。肿瘤细胞生长在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中传代培养,实验用细胞均处于对数生长期。

3. 仪器设备:激光扫描共聚焦显微镜为德国蔡司 710 型产品;超净台为苏州苏洁净化设备公司产品;二氧化碳细胞培养箱为日本 Sanyo 公司产品。

4. 方法:(1) Western blot 检测 Merm1/Wbscr22 蛋白在 NCI - H1299 及 NCI - H1299/shRNA 细胞中的表达:收集洗涤对数生长期 NCI - H1299 及 NCI - H1299/shRNA 细胞,于冰上细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量,取 15μg 总蛋白加入上样缓冲液煮沸后 12% SDS - PAGE 凝胶电泳,硝酸纤维素膜转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1h, Merm1/Wbscr22 特异性兔抗人多克隆一抗(1:300)、β - actin 兔抗人单克隆一抗(1:500)4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤, HRP - 鼠抗兔二抗(1:500)室温孵育 2h, TBST 洗涤, ECL 发光、显影成像。(2) NCI - H1299 及 NCI - H1299/shRNA 细胞免疫荧光染色:细胞培养于 glass - bottom 培养皿中,汇合程度达到 60% 时,吸尽培养液,预温 1 × PBS 洗涤 3 次,每次 5min;4% 多聚甲醛 1ml 室温固定 10min, 1 × PBS 洗涤 3 次,每次 5min(细胞固定);0.5% Triton X - 100 透膜 20min, 1 × PBS 洗涤 3 次,每次 5min(细胞透膜);5% BSA 室温封闭 60min(封闭);Merm1/Wbscr22 特异性一抗以 1:100 稀释于一抗稀释液,与细胞 4℃ 孵

育过夜,1×PBS 洗涤 3 次,每次 5min(一抗结合);荧光标记二抗 Alexa Fluor 488 - 驴抗兔 IgG 稀释于二抗稀释液,终浓度 10μg/ml,室温避光孵育 90min(二抗结合);加入 Texas Red - 鬼笔环肽(Texas Red - 鬼笔环肽标记 F - actin),终浓度 12U/ml,室温避光孵育 20min,1×PBS 洗涤;加入少量 DAPI 染色液(DAPI 标记细胞核 DNA),室温避光放置 3min,1×PBS 洗涤;滴加抗荧光淬灭封片液(封片)。(3)激光扫描共聚焦显微镜观察成像:DAPI 激发波长 340nm,发射波长 488nm;Texas Red 激发波长 591nm,发射波长 608nm;Alexa Fluor 488 激发波长 495nm,最大发射波长 519nm。根据图片观察 Merm1/Wbscr22 蛋白表达及定位。

5. 实验设计与分组:实验时 NCI - H1299 细胞分为 3 组,采用不同的实验步骤,细胞分组及具体操作步骤如表 1,同时以 NCI - H1299/shRNA 细胞作为阴性对照,用以检验一抗特异性。

表 1 NCI - H1299 细胞分组及具体操作步骤

组 1	组 2	组 3
细胞固定	细胞固定	细胞固定
Texas Red - 鬼笔环肽标记 F - actin	细胞透膜	细胞透膜
第 1 次共聚焦显微镜成像	Texas Red - 鬼笔环肽标记 F - actin	封闭
细胞透膜	第 1 次共聚焦显微镜成像	Texas Red - 鬼笔环肽标记 F - actin
封闭	封闭	第 1 次共聚焦显微镜成像
一抗结合	一抗结合	一抗结合
二抗结合	二抗结合	二抗结合
DAPI 标记细胞核 DNA	DAPI 标记细胞核 DNA	DAPI 标记细胞核 DNA
封片	封片	封片
第 2 次共聚焦显微镜成像	第 2 次共聚焦显微镜成像	第 2 次共聚焦显微镜成像

结 果

1. NCI - H1299 及 NCI - H1299/shRNA 细胞中 Merm1/Wbscr22 蛋白检测:Western blot 结果显示,Merm1/Wbscr22 蛋白在人肺癌细胞 NCI - H1299 中高度表达,利用 shRNA 敲低细胞中的 Merm1/Wbscr22 基因,其蛋白表达则显著减少(图 1)。

2. Merm1/Wbscr22 蛋白定位于 NCI - H1299 细胞核内:NCI - H1299 细胞 F - actin 呈现明亮的红色荧光。第 1 组 NCI - H1299 细胞 F - actin 红色荧光强度浅淡,但清晰勾勒出细胞轮廓,并且细胞内未显示红色荧光(图 2 中 1A);第 2 组 NCI - H1299 细胞 F - actin 红色荧光最明显,除了可见细胞 F - actin 呈

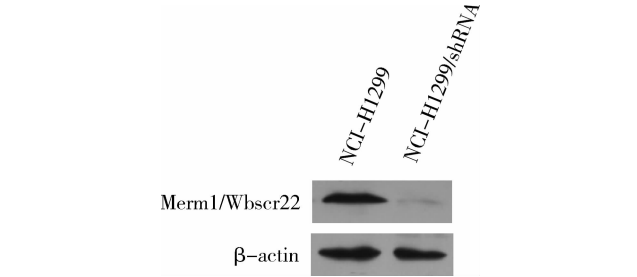


图 1 Merm1/Wbscr22 在 NCI - H1299 及 NCI - H1299/shRNA 细胞中的表达

现红色细丝状或条束状结构,细胞质和(或)细胞核部位亦可见呈团块状无明显结构的红色荧光(图 2 中 2A);而第 3 组 NCI - H1299 细胞 F - actin 荧光强度较第 2 组细胞略弱,细胞内团块状红色荧光较第 2 组明显减少减弱(图 2 中 3A)。NCI - H1299 细胞核呈现蓝紫色荧光,目的蛋白 Merm1/Wbscr22 于 NCI - H1299 细胞核部位呈现明亮的绿色荧光。第 1 组 NCI - H1299 细胞 Merm1/Wbscr22 及细胞核 DNA 荧光强度较第 2、3 组明显减弱(图 2 中 1B、1C、2B、2C、3B、3C)。与 NCI - H1299 细胞比较,NCI - H1299/shRNA 细胞的 F - actin、细胞核 DNA 也分别呈现明亮的红色及蓝紫色荧光,但 Merm1/Wbscr22 呈现的绿色荧光强度则显著减弱(图 2 中 4A、4B),与 Western blot 结果一致。

讨 论

结果表明 NCI - H1299 细胞只要经过细胞固定这一步骤,无论细胞是否经过透膜处理,Texas Red - 鬼笔环肽都可以对细胞 F - actin 进行荧光标记,这是因为鬼笔环肽虽不具有活细胞通透性,但因其相对分子质量小,4% 多聚甲醛固定后细胞膜上产生的孔洞足以让 Texas Red - 鬼笔环肽进入细胞,与 F - actin 特异性结合,进行荧光染色,这与文献报道一致^[6-9]。细胞透膜与否则不影响 Texas Red - 鬼笔环肽与 F - actin 结合,但会导致 F - actin 的荧光强度及细胞内非特异性染色的差异。细胞未透膜 F - actin 红色荧光强度比较弱,这可能是因为细胞固定后细胞膜产生的孔径小和(或)数量少,Texas Red - 鬼笔环肽进入细胞量少而导致。细胞透膜后再进行 F - actin 免疫荧光染色,则荧光强度明显增强,并且细胞内出现团块状无明显结构的红色荧光。这种细胞内团块状无明显结构的红色荧光实际上是鬼笔环肽引起的细胞内非特异性染色,表明细胞透膜后产生的孔径增大和(或)数量增加,Texas Red - 鬼笔环肽进入细胞的数

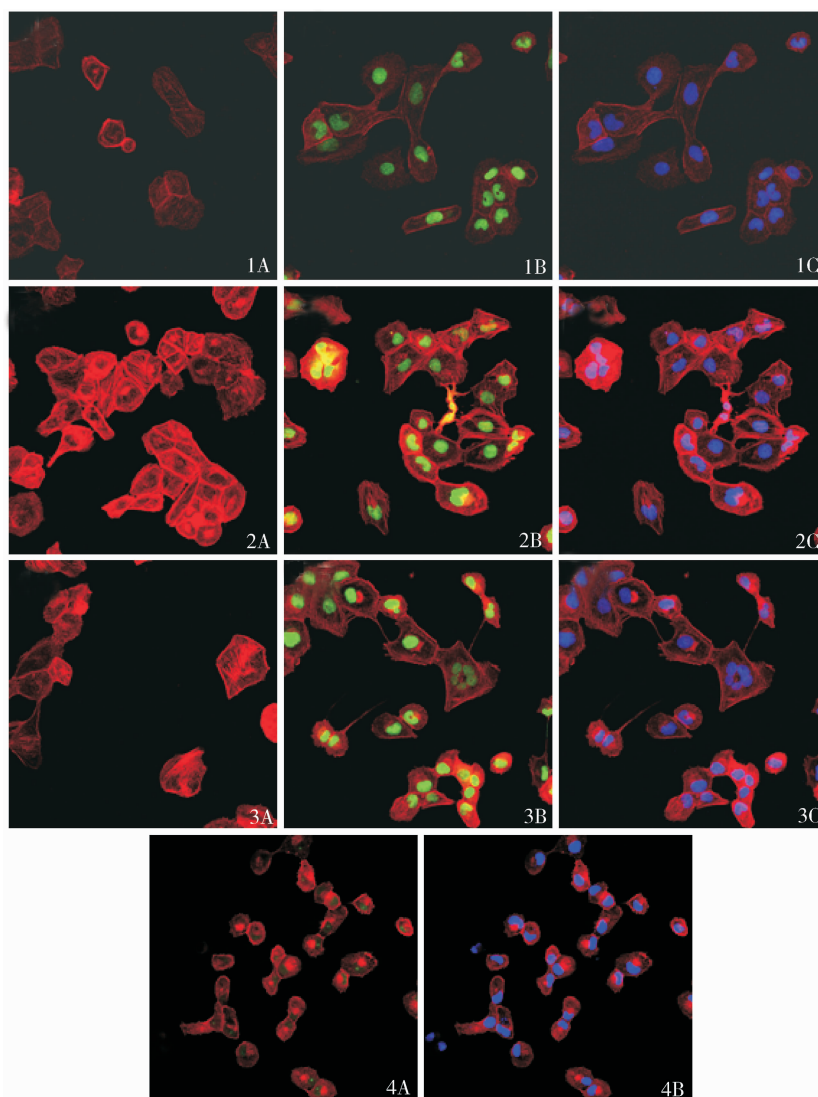


图2 Merm1/Wbser22 在 NCI-H1299 及 NCI-H1299/shRNA 细胞中的表达与定位

1A、2A、3A 分别为第 1、2、3 组 NCI-H1299 细胞第 1 次共聚焦显微镜成像图, F-actin 呈现红色荧光; 1B、1C、2B、2C、3B、3C 分别为第 1、2、3 组 NCI-H1299 细胞第 2 次共聚焦显微镜成像图, Merm1/Wbser22 蛋白呈现绿色荧光, 细胞核 DNA 呈现蓝紫色荧光; 4A、4B 为 NCI-H1299/shRNA 细胞, Merm1/Wbser22 蛋白呈现极微弱绿色荧光

量随之增加, 导致了 F-actin 荧光染色强度增加及非特异性染色出现, 类似现象亦有文献报道^[7,9]。细胞封闭这一步骤也会对 Texas Red-鬼笔环肽标记 F-actin 的荧光强度及非特异性染色有所影响。结果表明细胞封闭有助于减少 Texas Red-鬼笔环肽导致的细胞内非特异性染色, 这可能是因为封闭液中 BSA 预先结合了非特异性结合位点。

另外, 细胞透膜处理以及 F-actin 标记的顺序, 对后续的 Merm1/wbser22 及细胞核 DNA 荧光染色的强度也会产生影响。细胞透膜前与细胞透膜后进行 F-actin 荧光染色, 两者进行比较, 前者 Merm1/Wbser22 及细胞核 DNA 荧光强度较后者明显减弱, 可能

与 F-actin 在细胞内的功能有关。F-actin 是细胞骨架微丝的一种存在形式, 与细胞质膜上的蛋白质、脂质分子相互连接而成为细胞运动、细胞形态和跨膜信息传递的结构基础, 参与多种细胞生理功能过程, 如保持细胞的形状、运动, 细胞间黏附、细胞增殖^[10,11]。研究还证实, F-actin 聚合/解聚参与膜的重塑, 影响离子通道的敏感性从而影响细胞内外物资的运输^[12,13]。因此推测鬼笔环肽特异性地与细胞 F-actin 结合后抑制了 F-actin 解聚, 破坏了聚合/解聚的动态平衡, 从而稳定了 F-actin 结构, 引起细胞膜的状态发生改变, 即使 0.5% Triton X-100 透膜 10min 也不能破坏 F-actin 稳定性, 因此阻塞了某些

通道造成一抗和(或)二抗、DAPI 进入细胞核减少,从而导致 Merm1/Wbscr22 及细胞核 DNA 荧光染色强度减弱^[14,15]。

根据结果,笔者认为细胞免疫荧光染色结合激光扫描共聚焦显微镜技术观察 Merm1/Wbscr22 在人肺癌细胞 NCI-H1299 中表达与定位的最佳实验步骤是细胞固定、透膜、封闭、Texas Red-鬼笔环肽标记 F-actin、一抗结合、二抗结合、DAPI 标记细胞核 DNA、最后共聚焦显微镜成像,这样既能减少鬼笔环肽非特异性染色,Merm1/Wbscr22 蛋白及细胞核 DNA 荧光强度又足够清晰便于观察。

参考文献

- 1 Poher BR. Williams-Beuren syndrome[J]. N Engl J Med, 2010, 362(3): 239-352
- 2 Merla G, Ucla C, Guipponi M, *et al.* Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region[J]. Hum Genet, 2002, 110(5): 429-438
- 3 Doll A, Grzeschik KH. Characterization of two novel genes, WBSCR220 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome[J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 95(1-2): 20-27
- 4 Nakazawa Y, Arai H, Fujita N. The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zacl/p53-dependent apoptosis[J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 1146-1155
- 5 Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, *et al.* Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes[J]. Oncogene, 2008, 27(3): 378-386
- 6 Wieland T, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita

- mushrooms[J]. CRC Crit Rev Biochem, 1978, 5(3): 185-260
- 7 Wulf E, Deboben A, Bautz FA, *et al.* Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979, 76(9): 4498-4502
- 8 Wehland J, Osborn M, Weber K. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74(12): 5613-5617
- 9 Osborn M, Weber K. The detergent-resistant cytoskeleton of tissue culture cells includes the nucleus and the microfilament bundles[J]. Exp Cell Res, 1977, 106(2): 339-349
- 10 徐国恒. 细胞骨架-肌动蛋白纤维[J]. 生物学通报, 2005, 40(2): 43
- 11 Flavahan NA, Bailey SR, William A, *et al.* Imaging remodeling of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells after mechanosensitive arteriolar constriction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(2): 660-669
- 12 Nakamura TY, Iwam Y, Sampaoli M, *et al.* Stretch-activated cation channels in skeletal muscle myotubes from sarcoglycan deficient hamsters[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(2): C690-699
- 13 Zhang J, Ryder KD, Bethel JA, *et al.* PTH-induced actin depolymerization increases mechanosensitive channel activity to enhance mechanically stimulated Ca^{2+} signaling in osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(11): 1729-1737
- 14 Wieland T. Modification of actins by phallotoxins[J]. Naturwissenschaften, 1977, 64(6): 303-309
- 15 Faulstich H, Schiffer AJ, Weckauf M. The dissociation of the phalloidin-actin complex[J]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1977, 358(2): 181-184

(收稿日期:2012-09-11)

(修回日期:2012-09-27)

牡蛎壳粉/ α -半水硫酸钙复合人工骨修复兔股骨髁缺损的实验研究

寇冬权 林忠勤 王伟 程少文 陈庆玉 张伟 彭磊

摘要 目的 评价牡蛎壳粉/ α -半水硫酸钙复合人工骨材料填充兔股骨髁缺损的成骨能力及降解性。方法 用牡蛎壳粉及 α -半水硫酸钙按 1:3 比例混合,制备人工骨。采用新西兰大白兔制做股骨髁缺损的动物模型,将复合人工骨植于一侧股骨髁,另一侧为空白对照,分别于术后 4、8、12 周取材、脱钙、组织包埋、切片行 HE 染色,观察成骨及材料降解情况。结果 大体观察未见组织炎症反应,缺损区内填充的复合人工骨逐渐降解。4 周时实验组有少量新骨形成,对照组无明显成骨,到 8 周时实

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y405476)

作者单位:408000 重钢总医院康复科(寇冬权);325027 温州医学院附属第二医院(林忠勤、王伟、程少文、陈庆玉、张伟、彭磊);570100 海南医学院附属医院创伤中心(彭磊)

通讯作者:彭磊,教授,硕士生导师,电子信箱: penglei7511@yahoo.com.cn