

抗酒石酸性磷酸酶在骨组织不同细胞中的表达

张 菁, 苗登顺*

(南京医科大学骨与干细胞研究中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:明确抗酒石酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)活性和蛋白在骨组织不同细胞中的表达和定位。方法:取正常 6 周龄 C57BL/6J 小鼠的胫骨,制备石蜡切片,分别通过组织化学、免疫组织化学以及上述两者双重染色的方法检测 TRAP 活性和蛋白在骨组织不同细胞的表达和定位。结果:组织化学和免疫组织化学染色显示破骨细胞呈现 TRAP 强阳性反应,而且关节软骨细胞、生长板软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞也呈现 TRAP 阳性反应。双重染色结果可见大多数免疫组织化学 TRAP 阳性细胞显示组织化学阳性反应,但也有少数细胞只显示免疫组织化学阳性反应。结论:TRAP 活性和蛋白不仅在破骨细胞高表达,在软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞中也有表达。

[关键词] 抗酒石酸性磷酸酶;破骨细胞;软骨细胞;成骨细胞;骨外膜细胞

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-636-05

The expression of tartrate-resistant acid phosphatase in different cells of skeletal tissue

ZHANG Jing, MIAO Deng-shun*

(The Research Center of Bone and Stem Cells, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the expression and localization of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in different cells of skeletal tissue. **Methods:** The activity and protein localization of TRAP in different cells of skeletal tissue of tibiae from 6-week-old C57BL/6J mice were examined by histochemistry, immunohistochemistry or histochemical and immunohistochemical double staining. **Results:** Strong positive reaction for TRAP was detected in osteoclasts and positive reaction was also detected in chondrocytes from articular cartilage and growth plates, osteoblasts and periosteal cells by both histochemistry and immunohistochemistry. Histochemical and immunohistochemical double staining demonstrated that the most of TRAP immunopositive cells also showed histochemical positive reaction for TRAP, but some TRAP immunopositive cells were histochemical negative for TRAP. **Conclusion:** The TRAP not only highly express in osteoclasts, but also express chondrocytes of articular cartilage and growth plates, osteoblasts and periosteal cells.

[Key words] TRAP; osteoclasts; chondrocytes; osteoblasts; periosteum

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 636-640]

长期以来,抗酒石酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)被当作破骨细胞一个特异性标志物,而且到目前为止,通过 TRAP 组织化学染色鉴定破骨细胞仍然被众多研究者广泛使用。TRAP 组织化学染色是一个简便快捷的方法并应用于长骨中的破骨细胞^[1]、下颌骨中的破骨细胞^[2]以及在体外培养的破骨细胞的鉴定^[3]。然而,通过 TRAP 组织化学显示 TRAP 活性在骨骼组织不同细胞的表达受到固定和石蜡包埋温度等因素的影响而使检

测的 TRAP 阳性细胞不同。有研究发现 TRAP 不仅表达于破骨细胞,也表达于巨噬细胞^[4]、肥大软骨细胞等^[5]。因此,TRAP 阳性作为鉴定破骨细胞的特异性标记受到质疑。为了明确 TRAP 活性和蛋白是否特异性地表达和定位于破骨细胞,本研究选取 6 周龄小鼠的胫骨固定脱钙后制备石蜡切片,通过 TRAP 组织化学染色、免疫组织化学或组织化学染色和免疫组织化学双重染色的方法,检测 TRAP 活性和蛋白在骨骼组织不同细胞的表达和定位。

1 材料与方法

1.1 材料

[基金项目] 江苏省自然科学基金重点项目(BK2008440)

*通讯作者, E-mail: dsmliao@njmu.edu.cn

动物: C57BL/6J 野生型小鼠, 雄性, 南京医科大学 SPF 级实验动物中心饲养。

试剂: Naphthol AS-MX phosphate、Fast Garnet GBC、Fast Red、高碘酸钠、左旋赖氨酸和副醛均购于美国 Sigma 公司。牛血清白蛋白(BSA) 购于瑞士 Roche 公司。Tris-盐酸、乙二醇苯醚、醋酸钠、甲基绿以及酒石酸钠、乙二胺四乙酸、甘油、蔗糖、酒精、石蜡、二甲苯、水溶性封片胶、过氧化氢和正常羊血清等常规试剂均为国产试剂。

抗体: 单克隆小鼠抗 TRAP 抗体 (rabbit anti-mouse sCD40 ligand/TRAP) 购于加拿大 CEDAR-LANE Laboratories Limited 公司; 生物素结合的羊抗兔 IgG (全分子) 抗体购于美国 Sigma 公司; Vectastain ABC-AP kit 购于美国 Vector 公司。

仪器: 全自动脱水机 (TP1020 型)、包埋机 (EG1150H 型)、冷却机 (EG1150C 型)、切片机 (RM2235 型)、摊片机 (HI1210 型) 均为德国 Leica 公司产品。体视显微镜 (SZ2-ILST 型)、正置显微镜 (CX31 型)、图像采集系统 (DP70 型 CCD) 均为日本 Olympus 公司产品。其余如微波炉、电磁炉等均为国产仪器。

1.2 方法

1.2.1 标本固定、脱钙、石蜡包埋和切片

使用先前报道的方法行标本固定、脱钙、石蜡包埋和切片^[6]。取 6 周龄小鼠进行研究。动物乙醚麻醉, 颈椎脱臼处死, 解剖分离胫骨, 置于高碘酸盐-左旋赖氨酸-多聚甲醛 (PLP) 固定液^[7]中固定 24 h, 经甘油 EDTA 脱钙液脱钙 2 周, 系列酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 行冠状面切片, 片厚为 5 μm 。

1.2.2 TRAP 组织化学染色

使用先前报道的方法行 TRAP 组织化学染色。胫骨石蜡切片经脱蜡水化, 用酒石酸盐缓冲液孵育标本 20 min, 弃去酒石酸盐缓冲液, 用 TRAP 染色液孵育 15 min, 流水冲洗 3 min, 甲基绿复染 5 min, 流水冲洗 3 min, 水溶性封片剂封片。正置荧光显微镜下观察, 用 DP70 型 CCD 图像采集系统采集图像。

1.2.3 TRAP 免疫组织化学染色

石蜡切片经常规脱蜡水化以后, 使用先前报道的 ABC 法^[8]行 TRAP 免疫组织化学染色。5% 正常羊血清封闭 20 min 后, 加单克隆小鼠抗 TRAP 抗体室温孵育过夜; 加生物素标记羊抗兔 IgG 室温孵育 30 min, 之后加入 ABC-AP 室温孵育 30 min, 碱性磷酸酶 (ALP) 显色液^[9] (含萘酚、快红、Tris-盐酸, 现配现

用) 室温孵育 5~30 min (阳性产物显红色), 甲基绿复染 1 min, 水溶性胶封片, 光镜观察, 摄片。

1.2.4 组织化学和免疫组化双重染色

石蜡切片先行 TRAP 组织化学染色, 继而行 TRAP 免疫组织化学染色。TRAP 免疫组织化学染色的一抗和二抗与上述相同, 二抗孵育后加入 Elite-ABC 室温孵育 30 min, Vector-SG 显色液室温孵育 5~10 min (阳性产物显灰色)^[10], 甲基绿复染 1 min, 水溶性胶封片, 光镜观察, 摄片。

2 结果

2.1 小鼠骨骼组织不同细胞中的 TRAP 活性

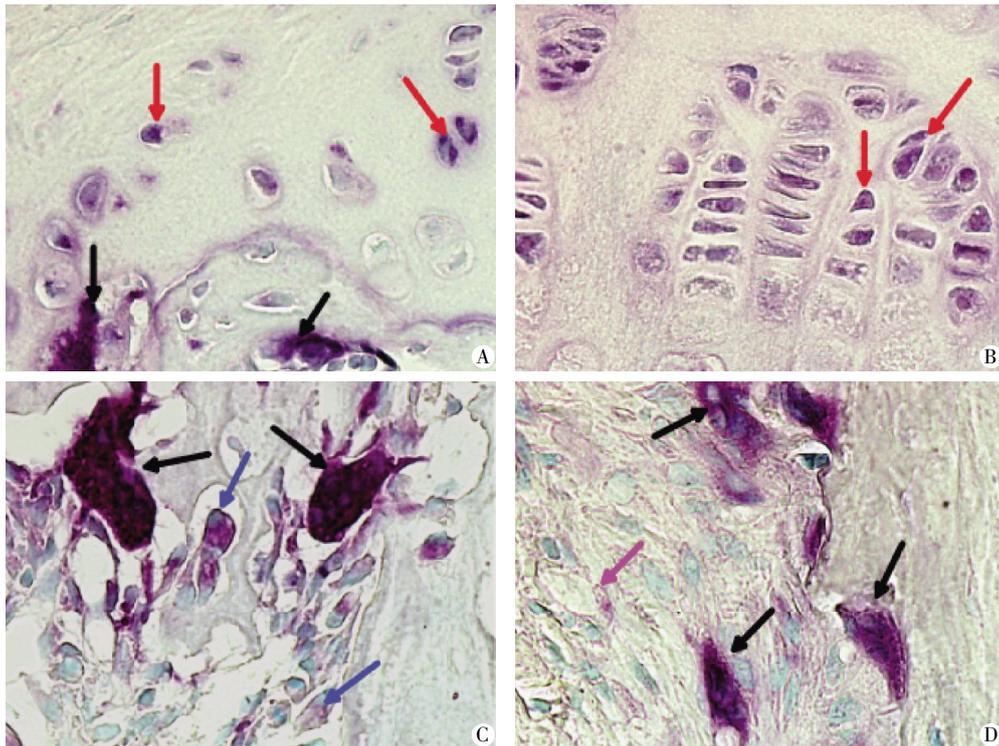
为了明确 TRAP 活性在小鼠骨骼组织不同细胞中的表达, 通过 TRAP 组织化学的方法检测了 TRAP 活性在 C57BL/6J 野生型小鼠胫骨不同细胞中的表达。结果发现, 无论在骺端骨组织 (图 1A)、干骺端骨组织 (图 1C), 还是骨外膜 (图 1D) 中的破骨细胞均呈现 TRAP 强阳性反应。在关节软骨中部分软骨细胞呈现 TRAP 阳性反应 (图 1A), 多数生长板软骨细胞也呈现 TRAP 阳性反应 (图 1B)。在干骺端小梁骨表面不仅存在 TRAP 强阳性反应的多核破骨细胞, 也存在一些 TRAP 阳性反应的成骨细胞 (图 1C)。在骨外膜中不仅存在 TRAP 强阳性反应的多核破骨细胞, 也发现一些 TRAP 弱阳性的骨外膜细胞 (图 1D)。这些结果提示 TRAP 活性不仅在破骨细胞中强表达, 也在软骨细胞和成骨细胞中表达。

2.2 TRAP 蛋白在小鼠骨骼组织不同细胞中的表达

为了明确 TRAP 组织化学反应的特异性, 本研究利用免疫组织化学的方法检测了 TRAP 蛋白的定位。结果发现, TRAP 蛋白的定位基本上与 TRAP 组织化学阳性反应部位相一致。TRAP 蛋白在软骨细胞 (图 2A、B)、破骨细胞 (图 2C、D)、成骨细胞 (图 2C) 和骨外膜细胞 (图 2D) 中都有表达。

2.3 双重染色检测小鼠胫骨中 TRAP 活性和 TRAP 蛋白的表达

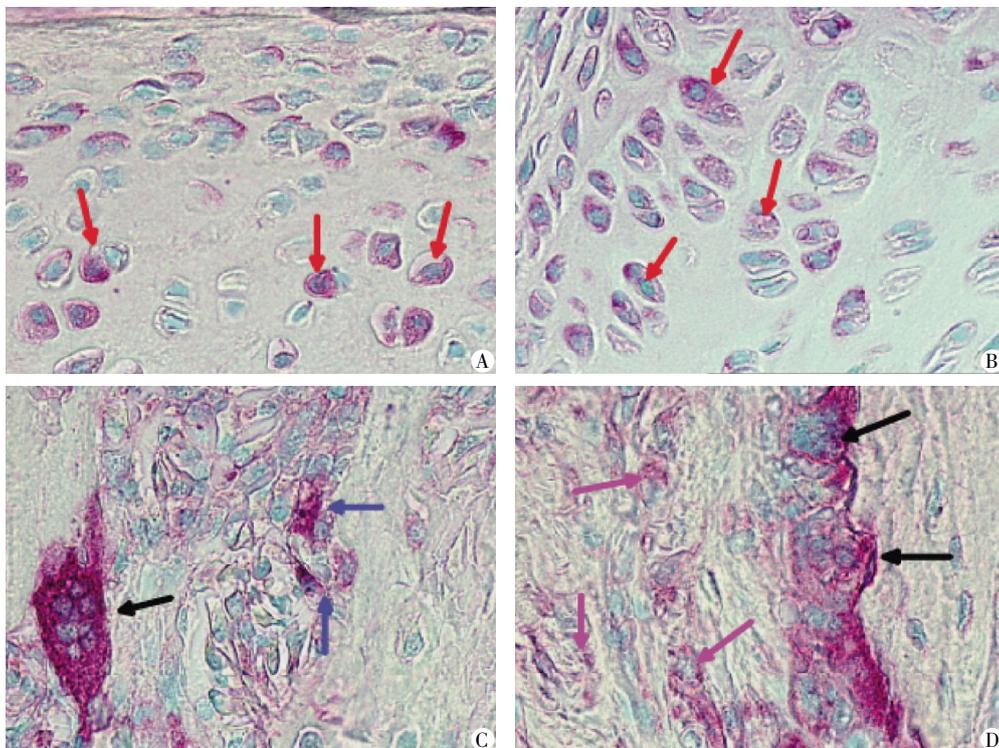
为了进一步明确 TRAP 酶活性的位置和蛋白表达的位置是否一致, 本研究通过 TRAP 组织化学和免疫组织化学双重染色观察了 TRAP 组织化学阳性细胞和 TRAP 免疫组织化学阳性细胞的共定位情况。实验结果显示, 所有的破骨细胞均显示 TRAP 组织化学和免疫组织化学双阳性反应 (图 3A、C、D)。在部分软骨细胞显示 TRAP 组织化学和免疫组织化学双阳性反应, 而在一些软骨细胞只显 TRAP 免疫组织化学阳性反应, 而缺乏 TRAP 组织化学阳性反



A: 胫骨上端关节软骨; B: 胫骨软骨生长板; C: 胫骨干骺端; D: 胫骨骨外膜。→示软骨细胞, →示成骨细胞, →示骨外膜细胞, →示破骨细胞, 提示 TRAP 活性在小鼠骨骼组织中的破骨细胞、软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞中均有表达。

图 1 组织化学染色法检测小鼠胫骨中不同细胞的 TRAP 活性(× 400)

Figure 1 The expression of TRAP activity in different cells from the tibia of mice by histochemistry staining(× 400)



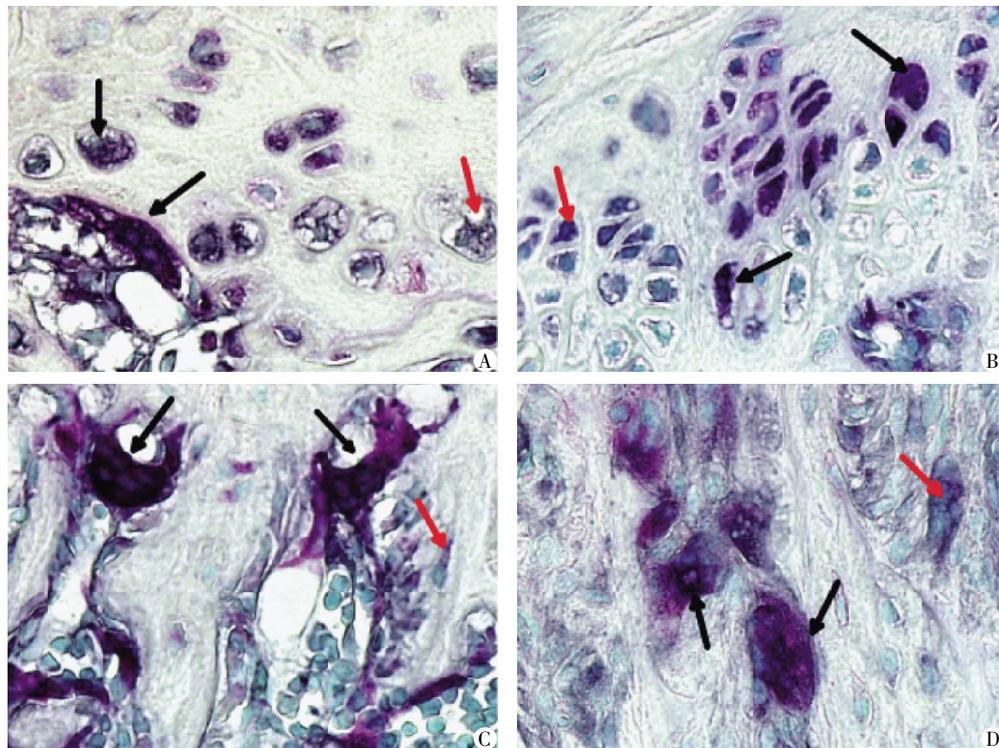
A: 胫骨上端关节软骨; B: 胫骨软骨生长板; C: 胫骨干骺端; D: 胫骨骨外膜。→示软骨细胞, →示成骨细胞, →示骨外膜细胞, →示破骨细胞, 提示 TRAP 蛋白不仅在破骨细胞中高表达, 在一些软骨细胞、成骨细胞及骨外膜细胞中也有表达。

图 2 TRAP 蛋白在小鼠骨骼组织不同细胞中的表达(× 400)

Figure 2 The localization of TRAP protein in different cells of the tibia of mice(× 400)

应(图 3A、B)。与软骨细胞类似,部分成骨细胞和骨外膜细胞显示 TRAP 组织化学和免疫组织化学双阳性反应,而在一些成骨细胞和骨外膜细胞只显 TRAP 免疫组织化学阳性反应,缺乏 TRAP 组织化

学阳性反应(图 3C、D)。这些结果说明 TRAP 蛋白不仅在破骨细胞高表达,而且也呈现高活性;TRAP 蛋白在软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞的表达不仅水平较低,而且部分蛋白缺乏活性。



A:胫骨上端关节软骨显微图像;B:胫骨软骨生长板显微图像;C:胫骨干骺端显微图像;D:胫骨骨外膜显微图。→示组织化学和免疫组织化学双染阳性细胞,→示免疫组织化学单阳性细胞,提示 TRAP 蛋白在破骨细胞高表达且高活性,在软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞中表达水平和活性均较低。

图 3 TRAP 组织化学(紫红色)和免疫组织化学(灰色)双重染色检测小鼠胫骨中 TRAP 活性和 TRAP 蛋白的表达($\times 400$)

Figure 3 The expression of TRAP in the tibia of mice by histochemical and immunohistochemical double staining($\times 400$)

3 讨论

很多年来 TRAP 都被认为是破骨细胞的特异性指标,而本研究实验结果证明不仅破骨细胞呈现 TRAP 强阳性反应,关节软骨细胞、生长板软骨细胞和成骨细胞也呈现 TRAP 阳性反应。组织化学和免疫组织化学双重染色结果显示大多数免疫组织化学 TRAP 阳性细胞显示组织化学阳性反应,但也有少数细胞只显示免疫组织化学阳性反应,而缺乏组织化学阳性反应。这些结果说明 TRAP 的确在破骨细胞呈现高表达和高活性,然而,TRAP 也在软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞中表达,并可呈现其酶的活性。

本实验结果与先前的报道有一致和不一致的地方,TRAP 在小鼠骨骼破骨细胞中呈现高活性与以前的研究是一致的^[11-14],而 TRAP 组织化学染色

结果显示除了破骨细胞外,关节软骨细胞、生长板软骨细胞和成骨细胞也呈现 TRAP 阳性反应,那为什么会呈现不一致的结果呢?这可能与本研究实验方法的改进有关,首先,我们使用的组织固定液是 PLP,该固定液能够很好地保存蛋白的抗原性和酶的活性^[15]。如果使用其他的固定液很可能会破坏蛋白的抗原性和酶的活性,造成 TRAP 阳性只能在其高表达的破骨细胞中呈现,而在其他弱表达的细胞则不能呈现。其次,本研究在组织包埋、切片烘烤的过程中,控制温度不超过 60℃,这样不会破坏酶的活性。本研究结果说明 TRAP 的抗原性和酶的活性在 PLP 固定液固定的石蜡切片能得到很好的保存。

本研究证实 TRAP 不仅在破骨细胞表达,而且也在软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞中有表达。在先前的研究中也支持这一结果,有研究者提出 TRAP 的表达虽然与破骨细胞的分化和酶的活性有

关,但是也与软骨细胞、巨噬细胞、Gaucher 细胞和树突细胞的分化有关^[16-18]。因此,在相关的研究中将 TRAP 作为鉴定破骨细胞及其前体细胞的特异性标志物应该谨慎。

本研究结果也显示 TRAP 蛋白的表达与酶的活性不一致的现象。这种现象一方面可能与 TRAP 酶的活性有关,即有蛋白的表达不一定呈现酶的活性;另一方面可能与实验过程中酶的活性受到实验因素的抑制有关,包括组织固定的时间、固定液的质量、石蜡包埋时的温度控制等。

本研究首次应用 TRAP 组织化学和免疫组织化学双重染色的方法,证明了 TRAP 活性和蛋白不仅在破骨细胞高表达,在软骨细胞和成骨细胞中也有表达。本研究结果扩大了 TRAP 组织化学和免疫组织化学染色方法在骨代谢研究中的应用范围,也为探讨 TRAP 在软骨细胞、成骨细胞和骨外膜细胞中的功能提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Miao D, Su H, He B, et al. Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(51): 20309-20314
- [2] Sun W, Liu J, Zhou X, et al. Alterations in phosphorus, calcium and PTHrP contribute to defects in dental and dental alveolar bone formation in calcium-sensing receptor-deficient mice[J]. Development, 2010, 137(6): 985-992
- [3] Kiuru M, Solomon J, Ghali B, et al. Transient overexpression of sonic hedgehog alters the architecture and mechanical properties of trabecular bone [J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(9): 1598-1607
- [4] Hayman AR, Bune AJ, Bradley JR, et al. Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization to dendritic cells and diverse murine tissues [J]. J Histochem Cytochem, 2000, 48(2): 219-228
- [5] Szuwart T, Kierdorf H, Kierdorf U, et al. Histochemical and ultrastructural studies of cartilage resorption and acid phosphatase activity during antler growth in fallow deer (*Dama dama*) [J]. Anat Rec, 2002, 268(1): 66-72
- [6] 刘洪, 苗登顺. 1- α 羟化酶基因敲除导致小鼠牙本质形成和前期牙本质矿化障碍 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2008, 28(8): 985-989
- [7] Miao D, He B, Lanske B, et al. Skeletal abnormalities in Pth-null mice are influenced by dietary calcium [J]. Endocrinology, 2004, 145(4): 2046-2053
- [8] Miao D, He B, Karaplis AC, et al. Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation [J]. J Clin Invest, 2002, 109(9): 1173-1182
- [9] Zhang ZL, Tong J, Lu RN, et al. Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration [J]. Bone Marrow Transplant, 2009, 43(1): 69-81
- [10] Miao D, Bai X, Panda D, et al. Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal pth expression and with altered bone matrix protein expression and deposition [J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 926-939
- [11] 谢春风, 苗登顺. 皮下移植羊膜间充质干细胞在正常小鼠体内的迁移及分化 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(5): 601-605
- [12] Hollberg K, Hulthenby K, Hayman A, et al. Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport [J]. Exp Cell Res, 2002, 279(2): 227-238
- [13] Nordahl J, Hollberg K, Mengarelli-Widholm S, et al. Morphological and functional features of clasts in low phosphate, vitamin D-deficiency rickets [J]. Calcif Tissue Int, 2000, 67(5): 400-407
- [14] Lindunger A, MacKay CA, Ek-Rylander B, et al. Histochemistry and biochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and tartrate-resistant acid adenosine triphosphatase (TrATPase) in bone, bone marrow and spleen; implications for osteoclast ontogeny [J]. Bone Miner, 1990, 10(2): 109-119
- [15] Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage [J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(3): 333-340
- [16] Nakayama T, Mizoguchi T, Uehara S, et al. Polarized osteoclasts put marks of tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices - a simple method for identifying polarized osteoclasts [J]. Bone, 2011, 49(6): 1331-1339
- [17] Hayman AR, Bune AJ, Cox TM. Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo [J]. J Anat, 2000, 196 (Pt 3): 433-441
- [18] Holmbeck K, Szabova L. Aspects of extracellular matrix remodeling in development and disease [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2006, 78(1): 11-23

[收稿日期] 2011-11-18