

# 在血清饥饿条件下 CHP2 调节 NHE1 活性 减少细胞死亡

李庆华 庞天翔\* 袁文肃 韩忠朝

(中国医学科学院、中国协和医科大学血液学研究所, 实验血液学国家重点实验室,  
协和干细胞基因工程有限公司, 天津 300020)

**摘要** 钠氢离子交换蛋白(NHE)是维持细胞内 pH 值等内环境稳定的重要蛋白; 钙调磷酸酶 B 同源蛋白(CHP)是 NHE 的一个活性调节亚单位。研究 CHP2 对 NHE1 的调节作用时发现, 在血清饥饿的条件下, PS120 细胞依赖于 CHP2 的表达来调节外源性 NHE1 的活性, 使细胞维持必要的钠氢交换生理活性和较高水平的细胞内 pH 值(pH<sub>i</sub> 7.4), 明显减少细胞因自身的胞浆酸化而死亡, 延长细胞存活时间(70% 以上的细胞存活时间超过 7 天)。实验结果提示, 通过研究减少 CHP2 表达或抑制其活性, 可望找到加速细胞死亡的新方法。

**关键词** 钙调磷酸酶 B 同源蛋白; 钠氢离子交换蛋白; 细胞内 pH 值; 细胞死亡

钠氢离子交换蛋白(Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE)分布于细胞膜, 是维持细胞内酸碱平衡的主要蛋白质。它的重要功能之一是调节细胞内 pH 值, 使之保持在生理范围之内。细胞内 pH 值的变化, 直接或间接的影响细胞生长、分裂、增殖、分化和细胞凋亡<sup>[1, 2]</sup>。NHE 的另一个重要功能是调节细胞内离子浓度和细胞容积, 参与钠盐吸收<sup>[1]</sup>。另外, NHE1 还与心肌细胞缺血再灌注损伤密切相关<sup>[1, 2]</sup>。世界各国已经对 NHE 的这些方面研究了近 20 年, 取得了很多成果, 并开发了一系列的抑制剂用于利尿、治疗高血压、预防和治疗冠心病<sup>[1, 2]</sup>。哺乳动物的 NHE 家族拥有 9 个亚型, 其中 NHE1~NHE5 定位于细胞膜表面, NHE6~NHE9 分布在细胞质内细胞器膜表面, 仅 NHE1 广泛表达于包括肿瘤在内的各种组织细胞, 它的活性还影响细胞移动和肿瘤细胞转移<sup>[1, 2]</sup>。NHE2~NHE5 的表达局限于少数组织, 很少在肿瘤组织中发现; NHE3 表达于肠道、肾脏和脑组织细胞, NHE5 表达于脑组织细胞<sup>[1, 2]</sup>。

钙调磷酸酶 B 同源蛋白(calcineurin B homologous protein, CHP)是 NHE 的结合蛋白及活性调节亚单位。CHP1<sup>[3-9]</sup>广泛表达于各种组织细胞中, 但在不同组织细胞中 CHP 各种亚型的表达水平存在着差异。CHP2 基因最早被称为 HCA520<sup>[10]</sup>, 因为部分肝癌病人体内存在其特异性的抗体, 所以它也被认为是肿瘤相关抗原<sup>[10]</sup>, 根据蛋白质的氨基酸同源

性、蛋白质结构和功能研究, 该蛋白质被重新命名为 CHP2<sup>[11]</sup>, 它表达于某些肿瘤细胞和细胞系以及胃肠组织中<sup>[10, 11]</sup>。CHP3<sup>[11]</sup>因为被证明与组织细胞分化有关, 曾经被称为 Tescalcin<sup>[12, 13]</sup>, 它表达于心、脑、肾等器官中。各种 CHP 亚型扮演着不同的角色, 各自影响 NHE 活性, 进而影响细胞内 pH 值, 加速肿瘤细胞生长和疾病进展。NHE1 的生理活性是依赖于 CHP1 或 CHP2 来调节的。本文我们重点研究血清饥饿条件下, CHP2 调节 NHE1 对细胞生长和死亡的影响。用依靠血清来调节 NHE1 活性的 CHP1 作为对照, 证明了血清饥饿时部分存活时间较长的细胞是通过非血清依赖的 CHP2 调节 NHE1 活性, 使胞内 pH 值维持在较高水平, 避免细胞因自身的胞浆酸化而死亡。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人体多种组织的 cDNA、真核细胞表达质粒 pEGFP-N1 均购自于 Clontech 公司, 细胞培养液 DMEM 购自于 Invitrogen 公司。NHE 表达缺失的 PS120 细胞系, 包括人 NHE1 野生型及其突变体

收稿日期: 2005-01-25 接受日期: 2005-05-20

天津市科委应用基础基金资助项目(No.05YFJMJC02100)

\* 通讯作者。Tel: 022-27307938-3112, Fax: 022-27306542,

E-mail: tianxiangpang@yahoo.com.cn

NHE1-4Q(NHE1 结合 CHP 区域的 4 个疏水性氨基酸被 4 个亲水性氨基酸置换而失去结合 CHP 能力<sup>[4]</sup>)的真核细胞表达质粒 pECE, 抗 NHE1 多克隆抗体、抗 CHP1 单克隆抗体和抗 CHP2 单克隆抗体均由日本国家循环系统疾病中心研究所赠送。NHE1 特异性抑制剂 Cariporide 由日本大阪新药特药研究室提供。细胞内阳离子测定系统由日本国家循环系统疾病中心研究所赠送。

## 1.2 方法

1.2.1 制备 CHP1、CHP2 cDNA 利用 RT-PCR 方法, 以人体多种组织的 cDNA 为模板, 合成 CHP1、CHP2 cDNA。将保留终止密码子的 CHP1、CHP2 cDNA 插入真核细胞表达质粒 pEGFP-N1。

1.2.2 细胞转染及其筛选 首先用钙磷沉降法, 将含野生型或突变型 NHE1 cDNA 的真核细胞表达质粒 pECE 转染到 PS120 细胞里, 用氢离子杀死法(H<sup>+</sup>-killing)筛选出表达 NHE1 的细胞, 之后, 用同样方法再将包含 CHP1、CHP2 cDNA 的真核细胞表达质粒 pEGFP-N1 转染到表达外源性 NHE1 的细胞中, 用 G418 筛选复合表达 NHE1/CHP1 或 NHE1/CHP2 的细胞<sup>[6,12]</sup>。

1.2.3 鉴定细胞 抗 NHE1 多克隆抗体的抗原决定簇是人 NHE1 细胞质区域氨基酸残基; 抗 CHP1 单克隆抗体的抗原决定簇是人 CHP1 的多肽<sup>96</sup>NEKS-KDVNGP<sup>105</sup>; 抗 CHP2 单克隆抗体的抗原决定簇是人 CHP2 的多肽<sup>96</sup>EDTETQDPK<sup>106</sup>。仓鼠 PS120 细胞所表达的 CHP1 和 CHP2, 存在着与人完全相同的抗原决定簇。

1.2.4 细胞培养 细胞培养在含有 7.5%~10% 胎牛血清、50 μg/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液中, 放置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中温育。

1.2.5 细胞内 pH 值测定 将细胞内装载 BCECF, 应用细胞内阳离子测定系统检测细胞内氢离子浓度, 以获得细胞内确切的 pH 值<sup>[11]</sup>。

1.2.6 细胞计数 应用显微镜计数正常或血清饥饿条件下生存和死亡的细胞数。

## 2 结果

### 2.1 PS120 细胞表达 NHE1、CHP1 和 CHP2

取 20 mg 细胞总蛋白, 用抗 NHE1 多克隆抗体检测 PS120 细胞所表达的外源性 NHE1(图 1A), 从图中可见成熟的 110 kDa NHE1(被糖基化、能够定位于细胞膜表面<sup>[2]</sup>)和未成熟的 85 kDa NHE1(仅定位于内质网和高尔基体<sup>[2]</sup>)的表达。从左至右依次为: 表达 NHE1 野生型、突变体 NHE1-4Q、复合表达 NHE1/CHP1、复合表达 NHE1/CHP2 的 4 组细胞, 这些细胞表达外源性 NHE1 的水平相同。

PS120 细胞表达内源性 CHP1 和 CHP2, 因为两个蛋白质的靶蛋白相同, 所以表达其中的一个能够抑制另一个蛋白质的表达(两者之间存在着竞争抑制); 其中 CHP2 的表达水平仅占两者总和的 20% 以下<sup>[11]</sup>。用特异性抗 CHP3 抗体探测未发现 PS120 细胞表达 CHP3(结果未发表)。取等量的细胞总蛋白, 用抗 CHP1 单克隆抗体检测 PS120 细胞内源性 CHP1 表达水平(图 1B), 可以看到表达在 20~25 kDa 之

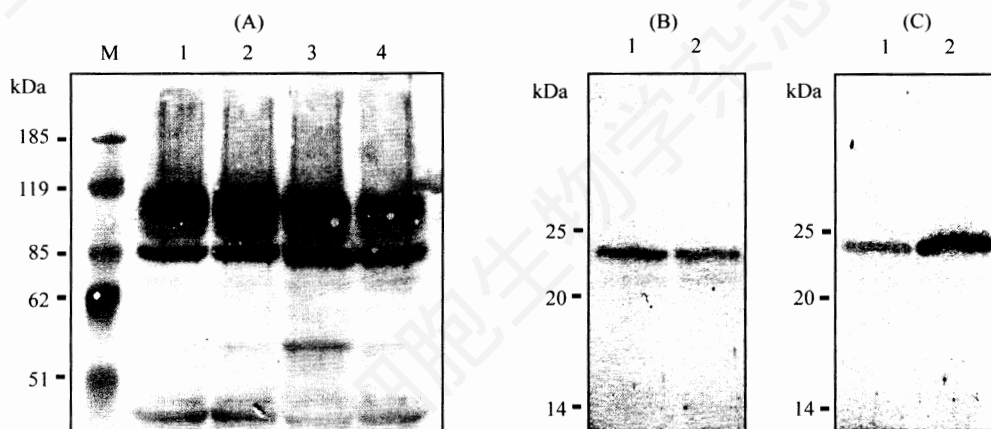


图 1 特异性抗体检测 PS120 细胞表达 NHE1、CHP1 和 CHP2

(A) PS120 细胞表达外源性 NHE1 水平。M: 蛋白质分子质量标准; 1: 表达野生型 NHE1 细胞; 2: 表达突变体 NHE1-4Q 细胞; 3: 复合表达 NHE1/CHP1 细胞; 4: 复合表达 NHE1/CHP2 细胞。(B) PS120 细胞表达内源性 CHP1 水平。1: 单独表达外源性 NHE1 细胞; 2: 复合表达外源性 NHE1/CHP2 细胞。(C) PS120 细胞表达 CHP2 水平。1: 未表达外源性 CHP2 细胞; 2: 表达外源性 CHP2 细胞。

间的 CHP1, 对比单独表达外源性 NHE1 细胞(图 1B 左侧)与复合表达外源性 NHE1/CHP2 细胞(图 1B 右侧), 后者的内源性 CHP1 表达水平降低。用抗 CHP2 单克隆抗体检测 PS120 细胞内源性和外源性 CHP2 总的表达水平(图 1C), 可以看到表达于 20~25 kDa 之间的 CHP2, 对比单独表达外源性 NHE1 细胞(图 1C 左侧)与复合表达外源性 NHE1/CHP2 细胞(图 1C 右侧)的 CHP2 表达水平, 可以看到表达外源性 CHP2 能够明显增加细胞内 CHP2 总水平(图 1C 右侧)。

## 2.2 CHP1 和 CHP2 是 NHE1 的生理活性亚单位

利用复合表达 NHE1/CHP1、NHE1/CHP2 的 PS120 细胞系, 进行 NHE 活性测定。应用“ $K^+$ /nigericin  $pH_i$  clamp”方法, 将细胞内 pH 值分别控制在 5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4, 分别检测培养于 7.5% 胎牛血清和血清饥饿 5 h 状态下的细胞对  $^{22}Na^+$  的摄取能力。发现是否存在血清, 直接影响 NHE1/CHP1 复合体摄取钠能力, 即存在血清的条件下 NHE1/CHP1 复合体有摄取钠的生理活性, 血清饥饿的条件下其丧失摄取钠能力(结果未显示)。与此相反, NHE1/CHP2 复合体的活性却不受血清的影响, 即血清饥饿对其摄取钠能力无明显影响(结果未显示)。

在血清饥饿 5 h 或血清存在条件下, 对多组表达外源性蛋白的细胞进行静息状态下细胞内 pH 值的测定, 得到了与 NHE1 摄取钠能力正相关的结果(图 2)。仅在血清存在条件下, 复合表达 NHE1/CHP1 的 PS120 细胞能够维持比较高的胞内 pH 值; 在血清饥饿条件下, 胞内 pH 值变得很低。与此相反, 复合表达 NHE1/CHP2 的细胞, 无论有无血清, 细胞都能够维持较高的胞内 pH 值。另外, PS120 细胞系、单独表达 CHP2 的 PS120 细胞系以及复合表达突变体 NHE1-4Q/CHP2 的 PS120 细胞系, 在血清饥饿的条件下, 胞内 pH 值都很低。

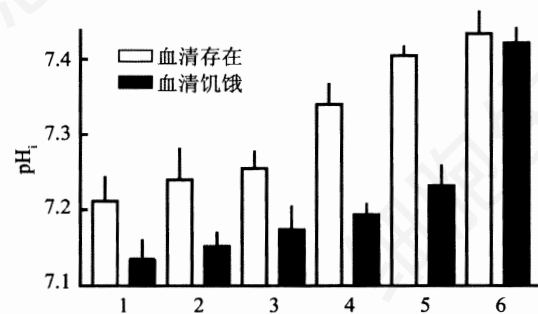


图 2 血清存在与血清饥饿 5 h 的细胞内 pH 值

1: PS120 细胞; 2: 单独表达 CHP2 细胞; 3: 复合表达突变体 NHE1-4Q/CHP2 细胞; 4: 单独表达 NHE1 细胞; 5: 复合表达 NHE1/CHP1 细胞; 6: 复合表达 NHE1/CHP2 细胞。

条件下, 胞内 pH 值都很低。

虽然血清饥饿 24 h、48 h 测定的细胞内 pH 值结果比较凌乱, 但是在各组细胞之中, 还是能够发现随着血清饥饿时间的延长细胞内 pH 值逐渐降低的趋势。因为血清饥饿超过 24 h 之后细胞黏附能力明显减弱, 致使检测细胞内 pH 值的难度变得很大, 所以本文只显示血清饥饿较短时间的检测结果。发现在各组细胞之中, 随着血清饥饿时间的推移复合表达 NHE1/CHP2 细胞的胞内 pH 值降低速度最慢(结果未显示)。

## 2.3 表达 NHE1 加快细胞生长速度, NHE1 抑制剂 Cariporide 减慢细胞生长速度

当存在血清时, 用野生型的 PS120 细胞作为对照, 观察到表达 NHE1/CHP1 复合体、NHE1/CHP2 复合体都能加快细胞生长速度, 其两者之间没有差异(图 3A)。对比加入 NHE1 特异性抑制剂 Cariporide 与否的条件下, 可以看到表达 NHE1/CHP2 复合体细胞的生长被抑制(图 3B); 表达 NHE1/CHP1 复合体的细胞生长也同样被抑制(结果未显示)。

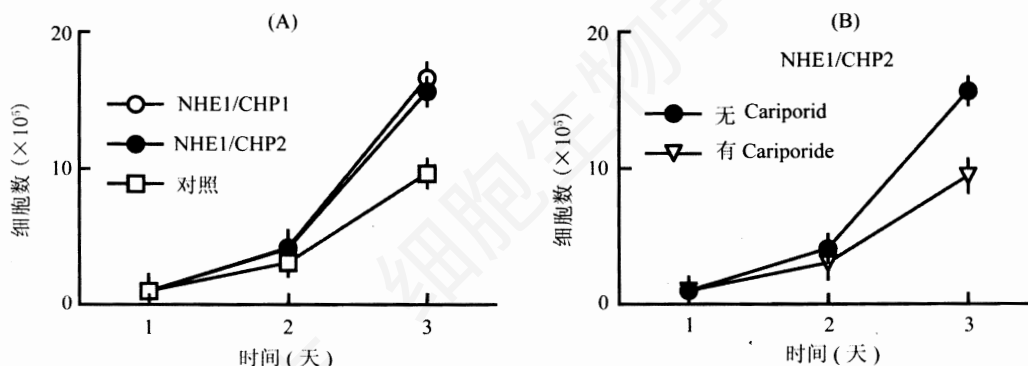


图 3 CHP 和 NHE1 对于细胞生长的影响

(A) 复合表达 NHE1/CHP1 或 NHE1/CHP2 能加快细胞生长速度。(B) Cariporide 抑制复合表达 NHE1/CHP2 细胞的生长。

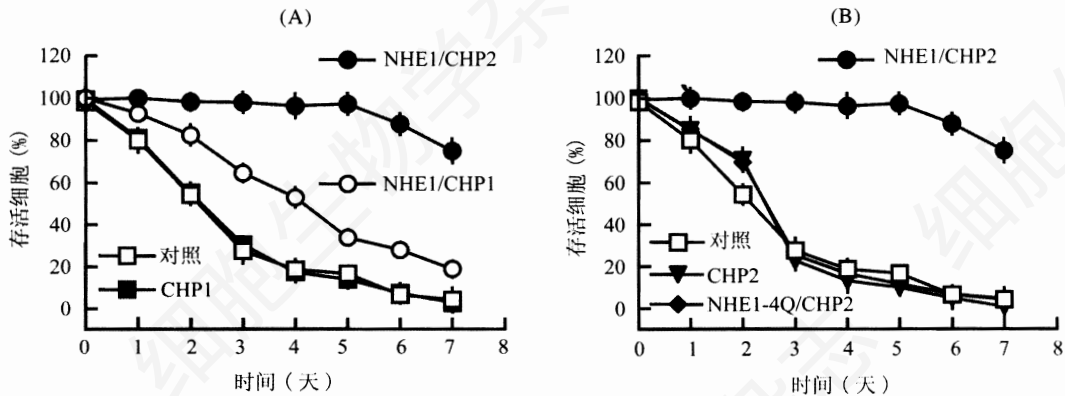


图4 血清饥饿时 CHP2 减少细胞死亡

(A) 复合表达 NHE1/CHP2 比 NHE1/CHP1 更能减少细胞死亡。(B) 复合表达缺失结合 CHP 能力的变异体 NHE1-4Q/CHP2 不能减少细胞死亡。

## 2.4 CHP2 的表达调节外源性 NHE1 活性, 减少血清饥饿状态下的细胞死亡

复合表达 NHE1/CHP2 的 PS120 细胞系, 在血清缺失的 DMEM 中培养 7 天, 仅有少数细胞死亡; 而作为对照的不表达外源性蛋白、单独表达 CHP1 以及复合表达 NHE1/CHP1 的 PS120 细胞系, 都有比较多的细胞死亡(图 4A)。另外, 不表达外源性蛋白、单独表达 CHP2 以及复合表达变异体 NHE1-4Q/CHP2 的 PS120 细胞系, 也都有比较多的细胞死亡(图 4B)。血清缺失时, 变异体 NHE1-4Q 和 CHP2 同时存在的细胞死亡并没有被减少, 而该变异体仅仅缺失结合 CHP 的能力<sup>[4]</sup>, 这里表明与之相关的生理活性需要通过两个蛋白相互结合才能完成。

## 2.5 NHE1 活性是减少血清饥饿状态下细胞死亡的重要因素

还用上述细胞系, 研究 NHE1 特异性抑制剂 Cariporide 对于血清饥饿状态下细胞死亡的影响。与对照组(未加入 Cariporide)相比, 当复合表达 NHE1/CHP2 的细胞被 Cariporide 抑制后 NHE1 活性降低, 致使细胞内 pH 值也随之降低, 细胞死亡明显增多(图 5)。这说明 NHE1 活性是减少血清饥饿状态下细胞死亡的决定因素, CHP2 的作用是通过调节 NHE1 活性而实现, 并非通过其他途径。

本研究证明, CHP 是 NHE1 的生理活性的调节亚单位, 是维持细胞内 pH 值不可缺少的辅助因子。特别应该指出的是: 在有血清条件下, CHP1 是 NHE1 生理活性的重要调节亚单位, 或者辅助因子<sup>[4]</sup>; 在血清饥饿条件下, CHP2 成为 NHE1 生理活性的重要调节亚单位, NHE1/CHP2 的复合体也能保持一定的钠氢离子交换活性、维持细胞内较高的 pH 值, 这些

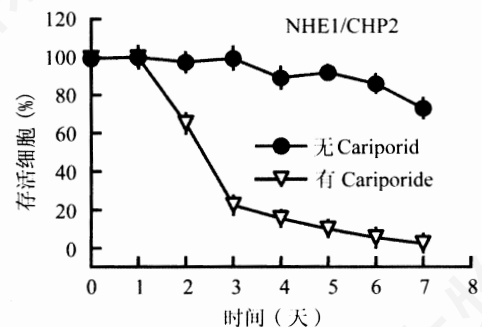


图5 NHE1 的抑制剂 Cariporide 增加细胞死亡

是保护细胞免于胞浆酸性化而死亡的重要因素。因此, 我们认为 CHP2 是抑制细胞死亡的“因子”之一。

## 3 讨论

氢离子杀死法筛选细胞是研究 NHE 的关键技术, 可以使研究者得到表达单一亚型 NHE 的细胞用于研究蛋白质活性。因为有了这项技术, NHE 的研究得以深入进行, 它是一种非常好的筛选细胞的方法。在 NHE 表达缺失的 PS120 细胞系中, 转染插入 NHE cDNA 的 pECE 真核细胞表达载体。细胞用 PBS 清洗 2 次, 换用含 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的液体温育 60 min, 再换用含 120 mmol/L NaCl 的液体温育 60 min。这项技术的原理是在细胞内外  $\text{NH}_4\text{Cl}$  达到平衡之后, 去除细胞外液的  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 使得细胞内的  $\text{NH}_3$  快速向细胞外移动, 细胞内遗留大量的氢离子, 如果这个细胞不能表达 NHE, 没有这个蛋白质快速排除氢离子, 集聚在细胞内的氢离子就能杀死细胞。间隔数日之后, 再次重复上述方法, 只是第二次所换液体包含 NaCl 的浓度降低。反复几次

之后, 后面的液体包含 NaCl 的浓度降至 2~3 mmol/L, 用筛选得到的细胞提取细胞蛋白、电泳、转膜、用特异性抗体检测和鉴别, 之后进行细胞功能测定。

CHP 是 NHE 的活性亚单位, 也被称为 NHE 辅助因子、NHE 活性因子。CHP2 与 CHP1 的核苷酸水平同源性很高, 氨基酸水平的同源性也很高(相同率 61%)。与 CHP1 比较, 在多种正常组织细胞中, CHP2 的表达水平很低; 但在某些肿瘤组织细胞和一部分肿瘤细胞系细胞中其表达水平却比较高<sup>[10,11]</sup>。

一些报道指出, 由于实体肿瘤内外部之间的血液分布不均匀, 造成实体肿瘤的内部 pH 值比正常组织低很多<sup>[4]</sup>。虽然实体肿瘤内部的细胞外环境 pH 值很低, 但是实体肿瘤内部的细胞内环境 pH 值却相对比较高, 致使这些肿瘤细胞能够较长时间的残存<sup>[4]</sup>; 尽管这些现象被证实了多年, 但是细胞内 pH 值的调节机制尚不清楚。因为多数正常组织细胞内由 CHP1 调节的 NHE1 活性是血清依赖性的, 所以在血清饥饿条件下 NHE1 活性就会被抑制, 如果正常组织处在与实体肿瘤内部同样的血液分布不均匀情况, 会造成细胞内外 pH 值同时降低, 进而出现正常组织细胞被胞浆酸化杀死的现象。我们的研究提示, 一部分细胞系和肿瘤细胞表达的 CHP2 能

够调节 NHE1 非血清依赖的活性, 减少因胞浆过度酸化所引起的细胞死亡, 这很可能是一些肿瘤细胞顽强残存的原因。我们认为, 可以根据上述机制进一步研究 CHP2 的特异性抑制剂, 应用生物工程手段降低肿瘤细胞中 CHP2 表达或抑制其活性, 使细胞在血清饥饿条件下死亡增加, 达到减缓部分实体肿瘤生长速度的目的, 这将成为治疗肿瘤的新方法和手段。

#### 参考文献 (References)

- [1] Orlowski J *et al.* *Pflugers Arch*, 2004, **447**: 549
- [2] Wakabayashi S *et al.* *Physiol Rev*, 1997, **77**: 51
- [3] Lin X *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**: 12631
- [4] Pang T *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 17367
- [5] Matsumoto M *et al.* *J Biochem (Tokyo)*, 2001, **130**: 217
- [6] Nakamura N *et al.* *J Biochem (Tokyo)*, 2002, **132**: 483
- [7] Kuwahara H *et al.* *J Biochem (Tokyo)*, 2003, **134**: 245
- [8] Nagita M *et al.* *J Biochem (Tokyo)*, 2003, **134**: 919
- [9] Pang T *et al.* *Biochemistry*, 2004, **43**: 3628
- [10] Wang Y *et al.* *J Immunol*, 2002, **169**: 1102
- [11] Pang T *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 43771
- [12] Mailander J *et al.* *FEBS Lett*, 2001, **507**: 331
- [13] Gutierrez-Ford C *et al.* *Biochemistry*, 2003, **42**: 14553
- [14] Kozin SV *et al.* *Cancer Res*, 2001, **61**: 4740

## CHP2 Regulates the Activity of NHE1 Reducing Cell Death upon to Serum Depletion

Qing-Hua Li, Tian-Xiang Pang\*, Wen-Su Yuan, Zhong-Chao Han

(Union Stem Cell & Gene Engineering Co., Ltd., State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

**Abstract** The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) is a main protein to maintain the intracellular pH (pH<sub>i</sub>). Calcineurin B homologous protein (CHP) is an essential regulation cofactor for NHE. Under the condition of serum depletion in PS120 cells, CHP2 can regulate the activity of NHE1, maintain the essential physiology activity of NHE1, promote the intracellular pH to a high level (pH<sub>i</sub> 7.4). CHP2 also can reduce the cell death caused by self-acidification of cytoplasm and prolong time of cell survival after long serum starvation (70% cells can survive more than 7 days). The results indicated that by means of reducing the expression of CHP2 or repressing its activity, we may get new methods to promote cell death.

**Key words** calcineurin B homologous protein (CHP); Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE); intracellular pH (pH<sub>i</sub>); cell death

Received: January 25, 2005 Accepted: May 20, 2005

This work was supported by the Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Tianjin City (No.05YFJMJC02100)

\*Corresponding author. Tel: 86-22-27307938-3112, Fax: 86-22-27306542, E-mail: tianxiangpang@yahoo.com.cn