

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.001

• 基础研究 •

二维回转培养对 MLO-Y4 骨样细胞 PKD2 表达定位
及胞内钙信号的影响 *关莹 续惠云[△] 瓮媛媛 商澎

(西北工业大学生命学院 特殊环境生物物理学研究所 空间生物实验模拟技术国防重点实验室 陕西 西安 710072)

摘要 目的:PKD2(polycystin2, 多囊肾病蛋白 2)能够在细胞膜上形成无选择性的阳离子通道,在肾上皮细胞中 PKD2 与初级纤毛共定位,通过改变胞内的钙信号过程参与细胞对力学刺激的响应。本实验通过二维回转培养来模拟失重效应,旨在探讨二维回转培养对 MLO-Y4 骨样细胞 PKD2 表达定位,及胞内钙信号的影响。初步了解 PKD2 在小鼠骨样细胞 MLO-Y4 响应力学刺激过程中起的作用。**方法:**采用二维回转培养骨样细胞 MLO-Y4,用 RT-PCR 和 western blotting 检测 PKD2 的表达,用荧光共聚焦显微镜检测细胞中 PKD2 与初级纤毛的定位及细胞内钙离子含量。**结果:**与对照组相比,在二维回转培养后,骨样细胞 MLO-Y4 的 PKD2 表达在 mRNA 和蛋白水平都有明显的下降,PKD2、PKD1(polycystin1, 多囊肾病蛋白 1)和乙酰化的 α -tubulin 共定位,同时二维回转培养降低了细胞内钙离子含量。**结论:**在二维回转培养下,PKD2 可能通过调节自身表达来改变细胞膜上 PKD 通道的数目和开放情况来影响细胞内钙离子含量,参与骨细胞对细胞外应力的感受过程,其详细机制还有待进一步实验研究。这将对探讨骨细胞响应力学刺激的具体机制提供重要的理论依据。

关键词: 二维回转培养;模拟失重; PKD2; MLO-Y4**中图分类号:** Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)14-2601-05The Effects of 2D-Clinorotation on Expression and Location of PKD2
Protein and the Intracellular Ca^{2+} Concentration of MLO-Y4*GUAN Ying, XU Hui-yun[△], WENG Yuan-yuan, SHANG Peng(Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences,
Northwestern Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi, 710072, China)

ABSTRACT Objective: PKD2 (polycystin2) could form nonspecific cation channel on the cytomembrane, which is responsible for Ca^{2+} penetration when kidney epithelial cell transforms mechanical stimulation into intracellular chemical information. In this study, 2D-clinorotation was used to simulate weightlessness condition. The aim of this study was to investigate the effects of 2D-clinorotation culture on expression and location of PKD2 protein and the intracellular Ca^{2+} concentration of mouse osteocyte-like MLO-Y4 cell. Also we want to understand the role of PKD2 in the process of MLO-Y4 responding to mechanical stimulation. **Methods:** Mouse osteocyte-like MLO-Y4 cell were cultured under the condition of 2D-Clinorotation. The expression and location of PKD2 was detected by RT-PCR, western-blotting and fluorescent staining, the intracellular Ca^{2+} concentration was detected by Ca^{2+} staining technique. **Results:** Under the condition of 2D-Clinorotation culture, the expression of PKD2 and the intracellular Ca^{2+} concentration were distinctly reduced. At the same time, we found that PKD2 co-localized with PKD1 (polycystin1) and the specific ciliary axoneme marker-acetylated α -tubulin. **Conclusion:** the results suggest under 2D-clinorotation culture, mouse osteocyte-like cell could respond to the mechanical stimulation by regulating the expression of PKD2 and the intracellular Ca^{2+} concentration. It is helpful to investigate the cellular mechanism of bone cells in responding to mechanical stimulation.

Key words: 2D-Clinorotation; Weightlessness; PKD2; MLO-Y4**Chinese Library Classification(CLC):** Q291 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)14-2601-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30700152;31170812),西北工业大学基础研究基金(NPU-FFR-JC201160)

作者简介:关莹,女,硕士研究生,主要从事模拟失重效应下的骨细胞响应机制研究,

E-mail: guanying@mail.nwpu.edu.cn

[△]通讯作者:续惠云,副教授,硕士生导师, E-mail: celldon@nwpu.edu.cn

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-11)

前言

骨细胞分散在整个矿化的骨基质中,占据骨组织细胞的90%-95%。由于其特殊的结构和分布,骨细胞成为骨组织中感受力学刺激的主要感受细胞和协调者^[1]。人们一直希望能在骨细胞上找到一些力学感受结构,从而进一步揭示其力学感受机制。有研究者在对肾细胞的研究中发现了初级纤毛对液体的响应,提出了初级纤毛可能是一种力学感受器^[2-5]。

作为纤毛-多囊蛋白复合物的组成蛋白之一^[6],PKD2 (polycystin2,多囊肾病蛋白2)是位于细胞膜上一个无选择性的阳离子通道蛋白。Nauli等的研究表明,PKD2和PKD1(polycystin1,多囊肾病蛋白1)定位在肾细胞的初级纤毛上,通过改变胞内的钙信号过程参与了肾细胞对外界流体变化的感受^[5-7]。那么,在骨组织细胞中,PKD蛋白和初级纤毛是否也有同样的里感受功能呢?2006年Xiao等第一次在小鼠成骨样细胞MC3T3-E1和小鼠骨样细胞MLO-Y4中检测到了PKD1、PKD2和纤毛蛋白Tg37和Kif3a的表达^[8],观察到了初级纤毛的存在^[9]。2010年,Ronald等发现初级纤毛参与了MLO-Y4细胞对液体的响应过程^[10]。目前,Xiao等已经构建了PKD1条件敲除的小鼠,发现小鼠的骨骼发育受到了明显的影响^[11]。但目前对PKD2在骨力学响应方面的研究还很少。

本实验使用二维回转条件培养骨样细胞MLO-Y4。二维回转培养是将细胞培养在特定的回转器中,通过回转器不断地变换方向,使细胞在矢量方向上所受到的力学刺激为零,来达到模拟失重的效应^[12]。本实验中检测了MLO-Y4细胞PKD2的表达定位,及细胞内钙离子含量的变化,旨在探讨二维回转条件对PKD2的影响及PKD2在骨细胞力学感受中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 总RNA抽提试剂Trizol、BSA、Pacific blue标记羊抗兔荧光二抗购自美国Invitrogen公司, MEM培养基、胎牛血清(FBS)、小牛血清(BCS)购自美国Hyclone公司, I型鼠尾胶原购自美国BD公司, Tap DNA聚合酶、dNTPs、Oligo(dT)引物、RT-PCR试剂盒购自日本Takara公司, PKD2蛋白抗体、PKD1蛋白抗体、乙酰化 α -tubulin抗体购自美国SANTA CRUZ公司, 罗丹明标记羊抗鼠荧光二抗购自美国TEMECULA公司, FITC标记兔抗羊荧光二抗购自美国ROCKLAND公司, Fluo-3-AM购自美国Sigma公司。

1.1.2 细胞系 小鼠骨样细胞系MLO-Y4由美国密苏里大学堪萨斯分校Bonewald教授惠赠。

1.1.3 主要仪器 双向多样本回转器(2D-RWVs)购自中国航天员科研训练中心, 蛋白电泳仪(PowerPac300)购自美国Bio-Rad公司, 双红外荧光成像系统(Odyssey)购自美国LI-COR公司, 激光扫描共聚焦显微镜(TCS SP5)购自德国莱卡公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠骨样细胞MLO-Y4, 使用含5%小牛血清和5%胎牛血清的MEM培养液进行细胞培养。培养瓶用I型鼠尾胶原包被, 置于37℃, 5% CO₂培养箱中。

1.2.2 二维回转培养 细胞以 2.0×10^5 / 片均匀地接种在血盖片

(26 mm×22 mm)上, 贴壁24 h后, 随机选取血盖片分为三组: 静止对照组(SC), 水平旋转组(RC)和二维回转实验组(E), 置于样本支架上, 放在专用的细胞培养瓶中, 置于37℃培养箱中培养12 h。SC组静止培养; RC组以30转/分进行水平旋转, 作为旋转对照组; E组以30转/分进行绕水平轴的旋转培养。

1.2.3 RT-PCR 使用Trizol提取总RNA, 用紫外分光光度计测定RNA的纯度和浓度。cDNA合成后用RT-PCR检测mRNA表达。

PCR引物为:

pkd2: 正向引物: 5'-CCGGGAGACTCTCTGAGATGG-3'

反向引物: 5'-GGGGCTGCTACAGTTTCTTG-3'

18S: 正向引物: 5'-AATCAGGGTTCGATTCCGGA-3'

反向引物: 5'-CCAAGATCCAACCTACGAGCT-3',

PCR反应产物进行琼脂糖电泳, 然后用凝胶成像系统扫描后软件Quantity One处理分析结果, 独立实验重复三次。

1.2.4 western-blotting 细胞裂解后收集总蛋白, SDS-PAGE凝胶的分离胶浓度10%, 浓缩胶浓度为5%, 蛋白分离后, 湿转法将胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用5%的脱脂奶粉封闭1.5 h, 一抗4℃静置过夜(PKD2抗体为1:200, GAPDH为1:6000), 二抗为IRDyeTM 800荧光试剂标记的抗体(1:4000), 室温孵育2 h, 用Odyssey红外成像仪对膜扫描, 计算机软件Quantity One处理分析结果, 独立实验重复三次。

1.2.5 共聚焦显微镜检测 PKD2、PKD1 在细胞内的表达和定位 5%的戊二醛室温固定细胞10 min, 0.1%硼氢化钠, 室温7 min进行淬灭, Abdil(TBS+0.1% TX100+2% BSA+0.1%叠氮钠)室温封闭30 min到1 h, 然后一抗4℃过夜, 浓度分别为: PKD1(1:100), PKD2(1:100), 乙酰化 α -tubulin(1:300)。加FITC标记的兔抗羊抗体(1:10)室温孵育1 h, 清洗后, 再加罗丹明标记的羊抗鼠抗体(1:10)和太平洋蓝标记的羊抗兔抗体(1:200)室温孵育1 h, 用抗荧光淬灭的甘油封片, 共聚焦显微镜进行检测。

1.2.6 共聚焦显微镜检测细胞内钙浓度 取出已处理的爬片细胞, 向细胞中加入5 μ M Fluo-3-AM, 37℃孵育30 min。室温放置15 min, 用loading buffer (PSS100 mL BSA3 g, pH 7.3), 生理盐缓冲液清洗两次, 在共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 pkd2 mRNA 的表达

对电泳条带做灰度定量, 用18S做内参, 对三次实验结果做统计学处理分析, 用pkd2灰度值/18S灰度值为纵坐标做柱状图。如图1所示, SC组是E组表达量的约3倍, RC组是E组表达量的约2倍。说明二维回转条件明显降低了pkd2 mRNA的表达。

2.2 western blotting 检测 PKD2 的表达

图2中50KD左右的未知条带可能是PKD2的剪切体。对western blotting结果图进行灰度定量, 对三次结果进行统计分析, 以PKD2灰度/GAPDH灰度为纵坐标, 得到柱状图, 可以看出二维回转培养明显降低了PKD2蛋白的表达。

2.3 荧光共聚焦显微镜检测 PKD2、PKD1 在细胞内的定位

采用荧光共聚焦显微镜检测了PKD2、PKD1和纤毛上特异表达的乙酰化 α -tubulin在骨样细胞中的定位情况。从图3

中可以看出,PKD2(绿色)、PKD1(蓝色)和乙酰化 α -tubulin(红色)表征的初级纤毛在细胞内共定位。

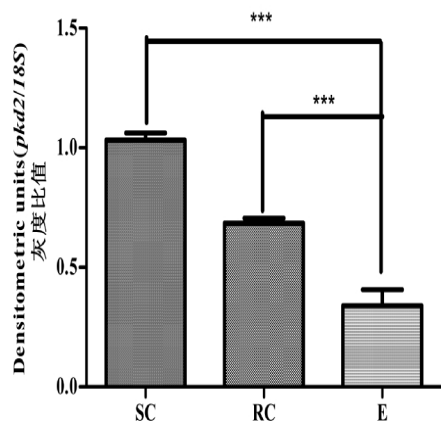
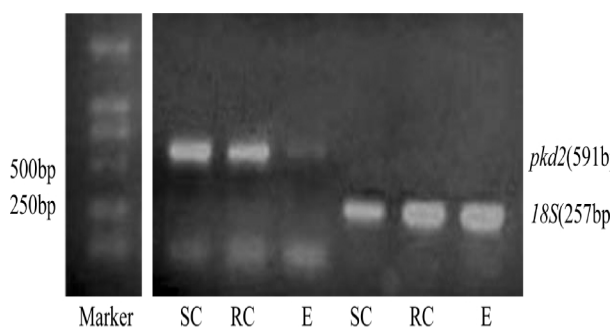


图1 二维回转培养降低了 PKD2 mRNA 的表达(***P<0.001)

Fig.1 Expression of PKD2 in mRNA level decreased under 2D-clinorotation culture(***P<0.001)

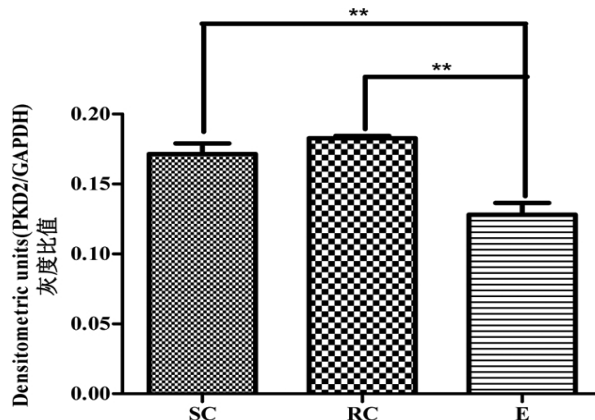
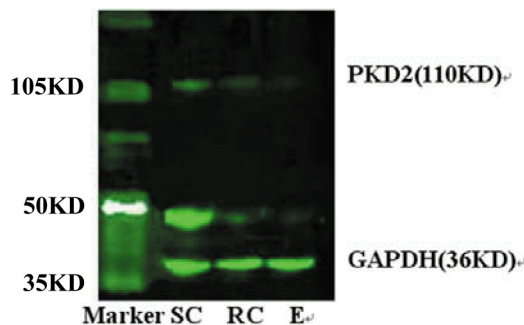


图2 二维回转培养降低了 PKD2 蛋白的表达(**P<0.01)

Fig.2 Expression of PKD2 in protein level decreased under 2D-clinorotation culture(**P<0.01)

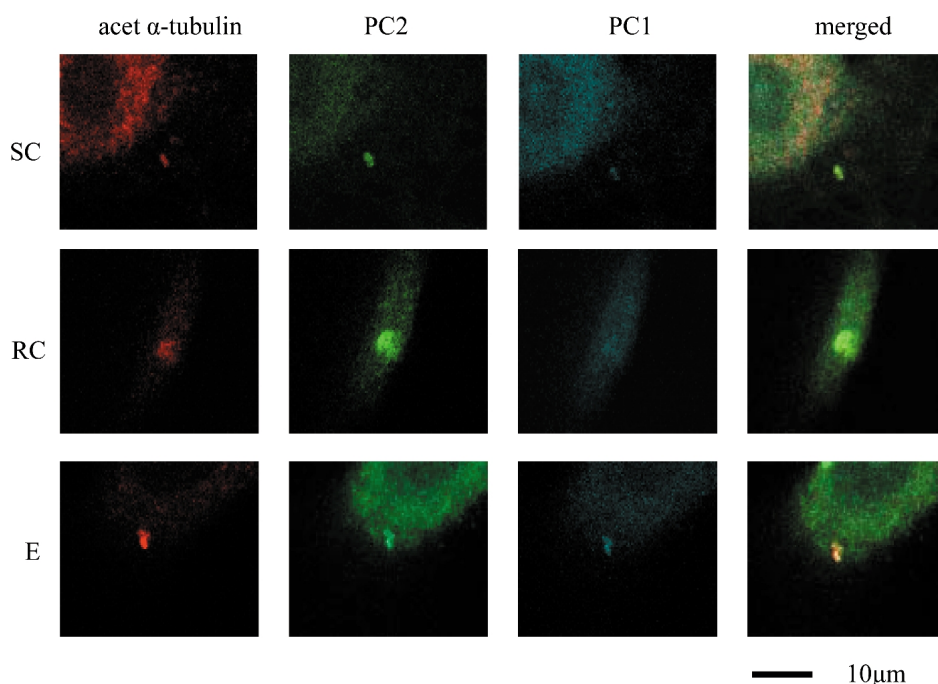


图3 共聚焦显微镜检测 PKD2、PKD1 和初级纤毛在细胞内共定位($\times 63$)

Fig.3 PKD2 co-localized with PKD1 and the primary cilium($\times 63$)

2.4 荧光共聚焦显微镜检测细胞内钙含量

用荧光共聚焦显微镜检测了实验组和对照组细胞内钙离子的含量(图4)。从图4中可以看出,二维回转培养降低了细胞内钙含量。

3 讨论

PKD 蛋白是纤毛-多囊蛋白复合物的组成蛋白,PKD1 和 PKD2 可以共定位在肾上皮细胞的初级纤毛上,共同参与细胞对流体剪切力的感知。同时,Nauli 等还发现,去除培养基中的 Ca^{2+} 或加入 PKD2 抗体可完全阻断流体剪切力引起的肾小管上皮细胞内 Ca^{2+} 变化,这表明经 PKD2 通道内流的 Ca^{2+} 携带着管腔内流体液压变化的信号^[9]。pkd2 基因突变可以导致肾

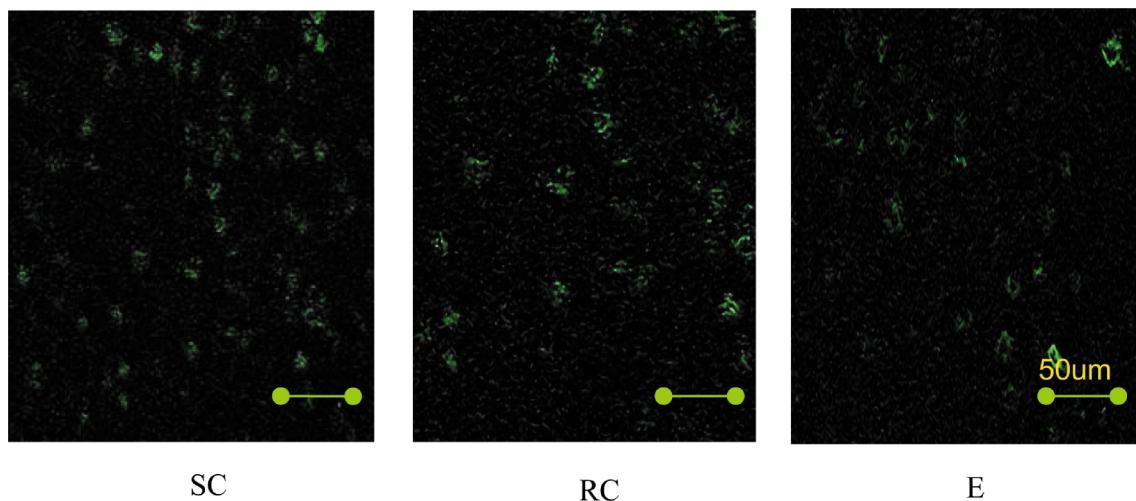


图4 二维回转培养降低了MLO-Y4细胞内钙离子含量($\times 20$)

Fig.4 Intracellular Ca^{2+} concentration reduced under 2D-clinorotation culture ($\times 20$)

上皮不能正确感应肾小管内液压的变化,最终引起多囊肾病的发生^[5]。Masyuk等证实胆管上皮细胞中也存在类似的流体感知机制^[13]。这提示了,力学信号通过经PKD2通道内流的 Ca^{2+} 转化为胞内 Ca^{2+} 水平变化,可能是细胞进化发育过程中形成的一种具有保守性的信号转导机制^[14]。

此外,初级纤毛已经被认为是骨组织中感受力学刺激的感受器之一^[15]。Qui等发现敲除初级纤毛重要组成蛋白Kif3a基因,能造成小鼠胫骨中骨钙素mRNA表达的下降,从胫骨中分离出成骨细胞进行体外培养,发现细胞质中钙离子水平下降,而且流体剪切力刺激的细胞间钙应答受到了阻断^[16]。因此,在骨组织细胞中,初级纤毛可能也有响应力学刺激,引起细胞内钙信号改变的功能。

在本实验中,我们采用二维回转培养MLO-Y4小鼠骨样细胞,二维回转器在不断的转动过程中,作用于细胞上的重力由于方向连续不断改变,所以产生的矢量和等于“零”,其结果就像没有受到重力的作用一样,产生出类似于空间失重环境下的现象^[12]。因此,回转器虽然不能提供真实的失重环境,但是可以模拟失重效应,在力学感知的研究中有重要作用。骨细胞可以通过改变自身结构和功能去适应力学环境的改变^[17]。我们的前期研究表明小鼠骨样细胞MLO-Y4在二维回转培养24 h后,细胞突触数目明显减少,在48 h后 α -Tubulin和F-actin的分布会改变,细胞骨架发生重排^[18]。在本次实验中,我们发现在小鼠骨样细胞MLO-Y4中,二维回转培养降低了PKD2的表达,PKD1、PKD2和初级纤毛共定位。同时,二维回转培养引起了细胞内钙离子水平的下降。因此,我们推测,在二维回转模拟失重条件下,细胞感受的力学刺激下降,PKD2表达降低来响应这一变化,从而可能引起了膜上的钙通道数目或通道开放程度的变化,进一步引起下游细胞内钙离子水平的降低,从而将外界力学信号的改变传递到细胞内部转化成生化信号,激活胞内多种信号通路,影响细胞内一系列的生化反应。也就是说,在骨细胞中可能存在与肾上皮细胞中类似的机制,PKD1/2和初级纤毛参与了细胞的力化学传导过程。

作为骨组织中最主要的力学感受细胞,骨细胞能够感受外界的力学刺激,并引起细胞内一系列的生化反应发生改变,调

节骨形成和骨吸收,维持骨组织平衡^[19-21]。我们的结果提示PKD1/2和初级纤毛可能是骨样细胞响应力学刺激的结构之一。接下来我们将采用RNAi沉默MLO-Y4细胞中PKD2的表达,研究PKD2对胞内钙离子水平的调节机制。同时进一步调查PKD1/2和初级纤毛在骨样细胞感受力学刺激过程中所起的作用。这将为探究骨细胞响应力学刺激的具体机制提供实验基础,同时也对研究力学刺激改变引起的一些骨骼疾病提供参考依据。

致谢:感谢美国密苏里大学堪萨斯分校Lynda Bonewald教授惠赠小鼠骨样细胞MLO-Y4。

参考文献(References)

- [1] Bonewald L F. Mechanosensation and transduction in osteocytes [J]. BoneKEy-Osteovision, 2006, 3(10):7-15
- [2] Singh R, Cawson R. Malignant myoepithelial carcinoma (myoepithelioma) arising in a pleomorphic adenoma of the parotid gland: an immunohistochemical study and review of the literature [J]. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1988, 66(1):65-70
- [3] Roth K, Rieder C, Bowser S. Flexible-substratum technique for viewing cells from the side: some in vivo properties of primary (9+0) cilia in cultured kidney epithelia [J]. Journal of cell science, 1988, 89(4): 457-466
- [4] Hierck B P, Van der Heiden K, Alkemade F E, et al. Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress [J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(3):725-735
- [5] Nauli S M, Alenghat F J, Luo Y, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells [J]. Nature genetics, 2003, 33(2):129-137
- [6] Nguyen A M, Jacobs C R. Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes [J]. Bone, 2013, 54(2):196-204
- [7] Praetorius H, Spring K R. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium [J]. The Journal of membrane biology, 2001, 184(1):71-79
- [8] Xiao Z, Quarles L. Role of the polycystin-primary cilia complex in bone development and mechanosensing [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1192(1):410-421
- [9] Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, et al. Cilia-like structures and polycystin-1

- in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(41):30884-30895
- [10] Kwon R Y, Temiyasathit S, Tummala P, et al. Primary cilium-dependent mechanosensing is mediated by adenylyl cyclase 6 and cyclic AMP in bone cells[J]. The FASEB journal, 2010, 24(8):2859-2868
- [11] Xiao Z, Dallas M, Qiu N, et al. Conditional deletion of Pkd1 in osteocytes disrupts skeletal mechanosensing in mice [J]. The FASEB journal, 2011, 25(7):2418-2432
- [12] 蒋远大, 李维宁, 王鲁峰, 等. 几种新型回转器 [J]. 航天医学与医学工程, 2008, 21(4): 368-371
Jiang Yuan-da, Li Wei-ning, Wang Lu-feng, et al. Several New Type of Clinostats[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2008,21(4): 368-372
- [13] Masyuk A I, Masyuk T V, Splinter P L, et al. Cholangiocyte Cilia Detect Changes in Luminal Fluid Flow and Transmit Them Into Intracellular Ca^{2+} and cAMP Signaling [J]. Gastroenterology, 2006, 131(3):911-920
- [15] Masyuk A I, Masyuk T V, LaRusso N F. Cholangiocyte primary cilia in liver health and disease [J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(8):2007-2012
- [16] Qiu N, Xiao Z, Cao L, et al. Disruption of Kif3a in osteoblasts results in defective bone formation and osteopenia[J]. Journal of cell science, 2012, 125(8):1945-1957
- [17] Kulkarni R N, Bakker A D, Everts V, et al. Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes: involvement of MEPE[J]. Calcified Tissue International, 2010, 87(5):461-468
- [18] Xu H, Wu J, Weng Y, et al. Two-dimensional clinorotation influences cellular morphology, cytoskeleton and secretion of MLO-Y4 osteocyte-like cells[J]. Biologia, 2012, 67(1):255-262
- [19] 孟芮, 王海芳, 续惠云, 等. 骨细胞功能研究进展[J]. 细胞生物学志, 2008, 30(2):161-165
Meng Rui, Wang Hai-fang, Xu Hui-yun, et al. Progress in Function of Osteocytes[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2008, 30(2):161-165
- [20] Bonewald L F. Osteocytes as dynamic multifunctional cells[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007, 1116(1):281-290
- [21] Klein-Nulend J, Bakker A D. Osteocytes: mechanosensors of bone and orchestrators of mechanical adaptation [J]. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism, 2007, 5(4):195-209

• 重要信息 •

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN:978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。