

强磁重力环境对人成骨细胞发动蛋白-2 表达和定位的影响

狄升蒙 蹇爱荣 田宗成 张 维 胡丽芳 尹大川 续惠云 瓮媛媛 商 澎*

(西北工业大学生命科学院, 西北工业大学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学科实验室, 西安 710072)

摘要 研究强磁重力环境对人成骨细胞 MG-63 中发动蛋白-2 表达和分布的影响。采用大梯度超导磁体模拟空间重力环境, 该超导磁体可以提供3种不同的强磁重力环境(high magnetic gravitational environment, HMGE), 即 0 g (12 T), 1 g (16 T) 和 2 g (12 T)。将 MG-63 细胞分别在 0 g (12 T)、1 g (16 T)、2 g (12 T) 及对照环境(1 g, 地磁)中培养 24 h 后, 采用 Real Time PCR、Western 印迹以及激光扫描共聚焦显微术等方法检测 HMGE 对发动蛋白-2 的表达及定位的影响。结果显示, 与对照组相比, 0 g (12 T)、1 g (16 T)、2 g (12 T) 环境处理组 MG-63 细胞中发动蛋白-2 在 mRNA 上的表达量分别上调 6.43、15.57、1.29 倍; 在蛋白质水平上, 0 g (12 T)、1 g (16 T) 环境处理组细胞发动蛋白-2 分别上调 89% 和 7%, 而 2 g (12 T) 环境处理组则下调 41%; 在对照组中发动蛋白-2 弥散分布于细胞质中, 而 0 g (12 T) 处理组发动蛋白-2 则有从细胞边缘向核周集中的趋势。上述结果说明强磁重力环境影响了发动蛋白-2 在 MG-63 细胞中的表达和定位。

关键词 强磁重力环境; 模拟失重; 成骨细胞; 发动蛋白-2

空间环境的特点是高真空、微重力、强辐射。40 多年的航天实践证明, 空间飞行可导致心血管功能障碍、骨质丢失、肌肉萎缩、免疫功能下降、内分泌功能紊乱、空间运动病等多种生理及病理变化^[1]。空间微重力是空间飞行中影响生物体结构和功能的主要因素之一。由于空间实验受到诸多限制, 地基模拟设备对了解空间飞行中发生的生理和病理变化是非常重要的。强磁重力是一种新型的地基模拟空间失重的环境^[2], 由 Valles 等^[3]率先利用这种技术在生命科学领域进行研究。在磁悬浮的环境中, 非洲爪蟾胚胎的有丝分裂器发生再定向, 卵裂面方向也发生变化^[4]。本课题组前期进行的研究表明, 强磁重力环境影响成骨细胞的形态, 也影响到增殖、黏附、周期、基因表达等生理过程^[5]。

发动蛋白-2 是一个 100 kDa 的微管结合 GTP 酶, 于 1994 年被首次鉴定^[6]。研究发现发动蛋白-2 与细胞骨架^[7]、凋亡的调节^[8,9]、信号转导^[10]、细胞内吞^[11]以及膜运输、肌动蛋白集合^[12]和中心体内聚等相关^[13], 其中, 最主要的功能是参与胞吞作用, 这种胞吞作用在抛物线飞行产生的微重力中得到加强^[14], 在离心力产生的超重环境中受到抑制^[15], 但是其分子机制尚不清楚。本实验拟将探讨强磁重力环境对发

动蛋白-2 表达和细胞中定位的影响, 以期验证强磁重力环境模拟空间重力条件的可行性, 同时实现对空间某些生理和病理变化的本质认识和有效对抗。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

TRIzol、DAPI、MEM 培养基及 CO₂ 非依赖型培养基(美国 Invitrogen 公司), DL2000 marker、RT-PCR Kit、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (中国大连 TaKaRa 公司), 胎牛血清(美国 HyClone 公司), PVDF 膜(美国 Millipore 公司), 发动蛋白-2 鼠单抗(美国 BD Biosciences Pharmingen 公司), 羊抗鼠 FITC-IgG (美国 KPL 公司), IRDye[™] 800 标记的羊抗鼠二抗(美国 Rockland 公司), BCA Protein Assay Reagent (美国 Pierce 公司), Odyssey 双红外成像系统(美国 LI-COR Biosciences 公司), Leica sp5 激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。

收稿日期: 2008-06-18 接受日期: 2008-08-13

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2008AA12A218)和国家自然科学基金(No.30670520)资助项目

* 通讯作者。Tel: 029-88460391, Fax: 029-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

1.2 强磁重力环境

本实验室引进了可产生大梯度强磁场的超导磁体(JMTA-16 T 50 MF), 该磁体可提供 0 g、1 g 和 2 g 等 3 种不同的重力水平, 对应的磁感应强度分别为 12 T、16 T 及 12 T, 是目前国内唯一具备模拟空间重力环境的超导磁体。在本研究中共设置了 4 个组, 即 0 g (12T)组, 1 g (16 T)组, 2 g (12 T)组以及对对照组 (1 g, 地磁场)。分别比较 0 g (12 T)组和 2 g (12 T)组、1 g (16 T)组与对照组之间的差异, 可以相对区分重力效应及磁场效应。本实验室针对该超导磁体, 已自主开发了适应于生物学研究的专用实验设备, 可实现在超导磁体室温腔内进行等效重力水平、温度、湿度、气氛、试样位置的检测^[16]。

1.3 细胞培养

人成骨细胞 MG-63 购自中国科学院上海细胞库。将对数生长期的细胞(5×10^5 个)接种到 35 mm 的培养皿或粘到培养皿底部的盖玻片上, MEM 培养基, 10% 的胎牛血清, 37 °C, 5% CO₂ 培养 18 h 后, 血清饥饿 24 h, 使细胞同步生长进入休止期, 弃上清液, 加入 CO₂ 非依赖型培养基, 分别放置到超导磁体腔室 3 个不同的强磁重力位置及正常条件下, 37 °C, 培养 24 h。

1.4 总 RNA 提取及反转录

使用 TRIzol 提取细胞总 RNA, 操作步骤参照试剂说明书进行。反转录体系为 20 μ l, 包括 1 μ g RNA, 4 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 2 μ l 10 \times 反转录缓冲液, 2 μ l 10 mmol/L dNTP 混合物, 0.5 μ l 40 U/ μ l 核酸酶抑制剂, 1 μ l 50 μ mol/L 随机引物, 0.2 μ l 5 U/ μ l AMV 反转录酶, 补加灭活核酸酶的去离子水到 20 μ l。反应程序如下: 30 °C, 10 min; 55 °C, 30 min; 99 °C, 5 min; 5 °C, 5 min。

1.5 Real Time PCR 方法检测发动蛋白-2 的表达

根据 NCBI 中发动蛋白-2 的 cDNA 全长(登录号: NM_001005360.1), 用 Primer premier 5.0 软件进行引物设计。内参则选取 18S rRNA 基因^[17]。引物序列如下: 发动蛋白-2: 正向 5'-AAGAGCCCTGCTGAAATGTG-3', 反向 5'-TGGCAAACCCGATGAAGT-3'; 18S rRNA: 正向 5'-AATCAGGGTTCGATTCCGGA-3', 反向 5'-CCAAGATCCAACACTACGAGCT-3'。

Real Time PCR 为 20 μ l 反应体系, 包括 10 μ l 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™], 正向及反向引物各 2.5 μ mol/L; 60 ng cDNA; 灭菌水补充到 20 μ l。反应条件如下: 95 °C, 30 s; 95 °C, 30 s, 55 °C, 20 s, 72 °C, 15 s, 共 45 个循环, 每次循环后于 80 °C 收集荧光信号。将 Real Time PCR 产物从 75 °C 缓慢而均匀地升温至 95 °C, 温度每升高 0.3 °C 读一次荧光值, 时间间隔为 1 s, 由

荧光定量 PCR 仪自动绘制融解曲线。以 18S rRNA 基因为内参对目的基因表达量进行归一化处理。反应完成后, 取 5 μ l 进行 1% 琼脂糖电泳, 拍照。实验重复 4 次, *t* 检验进行统计学分析。

1.6 Western 印迹方法检测发动蛋白-2 的表达

MG-63 细胞在强磁重力环境下处理 24 h 后, 离心收集细胞。PBS 清洗 1 次, 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.02% 叠氮钠, 0.1% SDS, 100 μ g/ml PMSF, 1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸和蛋白酶抑制剂)冰上裂解 10 min。16 000 g, 4 °C 离心 10 min, 收集上清液, BCA 法测定蛋白质浓度。取 100 μ g 总蛋白行 SDS-PAGE。转至 PVDF 膜, Odyssey 封闭液封闭, 加一抗(1:100) 4 °C 温育过夜。用含 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲液清洗 3 次, 加 IRDye[™] 800 标记的二抗(1:4 000)温育 1 h。内参为 GAPDH^[17]。将膜清洗后, 用 Odyssey 红外成像系统进行扫描。采用 ImageJ 软件扫描测定每个蛋白质条带的灰度值。

1.7 激光共聚焦显微术

细胞处理 24 h, 戊二醛室温下固定 15 min 后, TBS 冲洗 3 次。用抗体稀释液(2% 牛血清白蛋白, 0.1% Triton X-100 和 0.1% 叠氮钠)对细胞进行预封闭, 换以新鲜的封闭液, 加鼠发动蛋白-2 单抗(1:10), 4 °C 温育过夜。TBS 清洗 3 次, 用羊抗鼠 FITC-IgG (1:100)温育 1 h, DAPI 复染细胞核。TBS 清洗 3 次, 甘油封片, 然后用 Leica TCS SP5 激光扫描共聚焦显微镜进行扫描。FITC (绿色荧光)激发波长为 488 nm, DAPI 激发波长为 405 nm。

1.8 统计分析

数据以均数 \pm 标准差表示, 以 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。多个样本均数间的两两比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 质量检测

提取 RNA 后, 用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度, 结果表明所提取的 RNA 样品在 260 nm 与 280 nm 的吸光度比值均位于 1.7~2.0 之间。另取 3 μ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1。

2.2 发动蛋白-2 的表达差异

Real time PCR 电泳结果表明, 发动蛋白-2 和 18S rRNA 内参基因进行扩增后, 扩增片段大小达到预期, 而且特异性良好(图 2)。

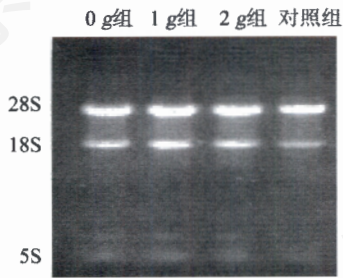


图1 强磁重力环境处理MG-63细胞后提取RNA的电泳结果

对发动蛋白-2基因表达相对定量分析结果表明, 相对于强磁0 g组, 强磁2 g组中发动蛋白-2的表达量下调(表1)。然而, 相对于对照组, 强磁1 g组中发动蛋白-2表达上调(表1), 两种表达差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

强磁重力环境处理24 h后, Western印迹分析结果显示: 强磁2 g组与0 g组相比发动蛋白-2的表达下降69%; 相对于对照组, 强磁1 g组中发动蛋白-2的表达增加7%, 强磁0 g组增加89%, 强磁2 g组下降41% (图3)。

2.4 MG-63细胞中发动蛋白-2的定位

表1 强磁重力环境对发动蛋白-2在mRNA水平表达的影响, 以18S rRNA为内参基因, 对目的基因拷贝数进行归一化处理($\bar{x} \pm s$)

基因	强磁0 g组	强磁1 g组	强磁2 g组	对照组
发动蛋白-2/ 18S rRNA	0.52±0.05	1.16±0.01	0.16±0.03	0.07±0.01

激光共聚焦显微术结果表明, 在强磁0 g组中, 发动蛋白-2在细胞边缘的分布明显减少, 而在细胞核周围明显集中(图4A); 强磁1 g组中发动蛋白-2弥散分布于细胞质中(图4B)。强磁2 g组及对照组中发动蛋白-2相似分布, 主要分布于细胞边缘、黏着斑及胞质中(图4C, 图4D)。

3 讨论

强磁重力环境是由大梯度强磁场产生的一种极端的人工物理环境。本实验选取了梯度磁场中0 g、1 g、2 g三种重力水平, 相对应的磁场强度分别为12 T、16 T和12 T。重力的效应可通过分析比较强磁0 g、12 T组与强磁2 g、12 T组而得到, 强磁

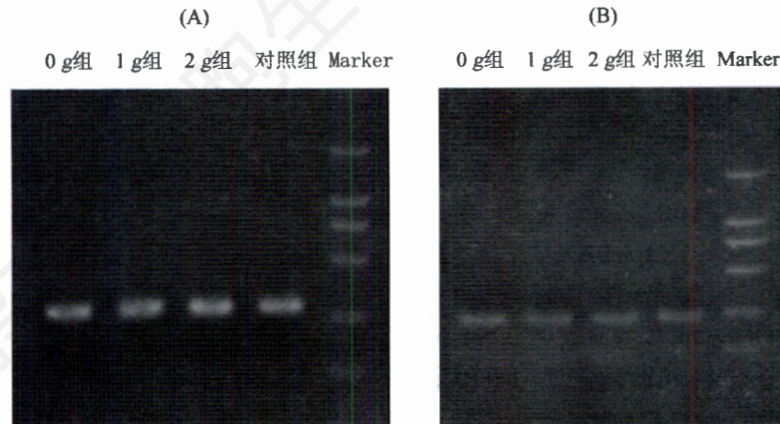


图2 强磁重力环境处理后, MG-63细胞中18s rRNA (A)和发动蛋白-2 (B)的Real Time PCR扩增片段电泳结果
18S rRNA的扩增片段长度为257 bp, 发动蛋白-2的扩增片段长度为231 bp, marker为DL2000。

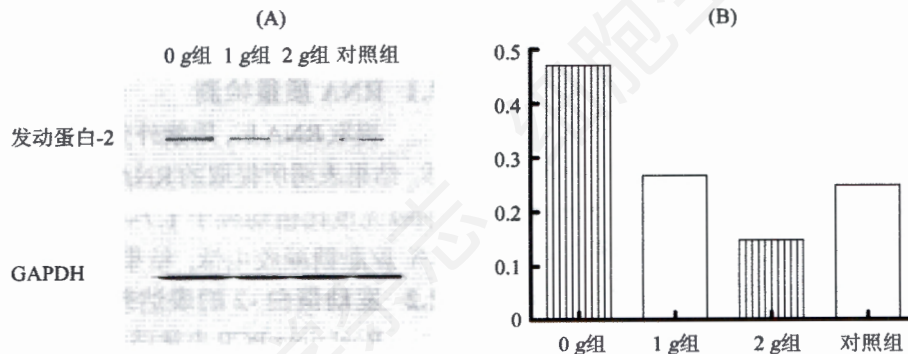


图3 Western印迹检测强磁重力环境对MG-63细胞中发动蛋白-2表达的影响

A: Western印迹结果; B: 发动蛋白-2相对于GAPDH的表达量。

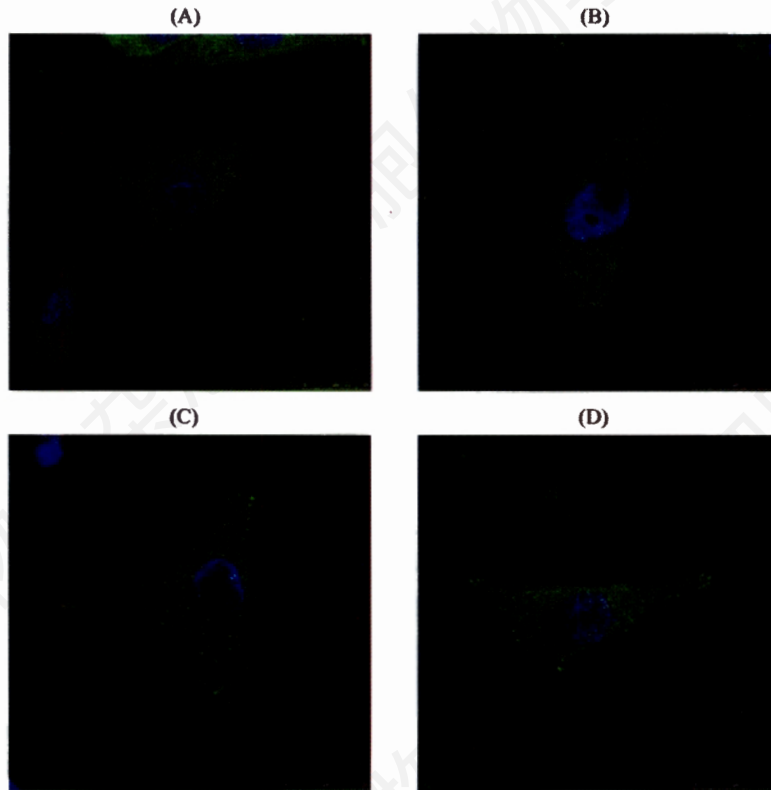


图4 强磁重力环境处理后,发动蛋白-2在MG-63细胞中的分布

A: 强磁0 g组; B: 强磁1 g组; C: 强磁2 g组; D: 对照组。

场的效应则可通过比较强磁1 g、16 T组与对照组(1 g, 地磁场)而得到。

强磁重力环境处理MG-63细胞24 h后,在mRNA水平上,发动蛋白-2的表达在对重力和强磁场都比较敏感。而在蛋白质水平上,发动蛋白-2的表达在失重条件下增加,在超重条件下下降,强磁场的影响不显著。由于发动蛋白-2在细胞中主要参与胞吞作用,因此,我们认为在失重条件下胞吞作用得到加强,而在超重条件下胞吞作用受到减弱。同时,我们发现,强磁重力环境对发动蛋白-2在mRNA和蛋白质水平上的影响变化趋势不一致,对于这种现象,我们尚无法对其具体的机制做出解释。我们猜测,在翻译及翻译后的过程中,某些起重要调控作用的蛋白质因子受重力或强磁场的影响,调控功能发生异常,导致发动蛋白-2基因与蛋白质的表达水平并不一致。

Malouvier等^[14]研究指出,抛物线飞行中产生的变化的重力场使得受体介导的胞吞作用得到加强。Lisboa等^[15]研究发现,烟草花粉管的胞吞作用在空间飞行产生的微重力条件下增加,而在离心力产生的超重条件下减弱。我们的实验结果与此相符,表明在不同的重力条件下,发动蛋白-2的表达水平发生变化,从而引起胞吞作用得到增加或减弱,导致营养物

质、抗原、生长因子、病原等进入真核细胞受到影响^[18]。

Yoo等^[19]报道,发动蛋白-2在细胞中主要分布于细胞质中,我们的实验结果与此相符。然而,经强磁重力环境处理后,我们发现强磁0 g组中发动蛋白-2在细胞边缘分布减少,向细胞核聚集的趋势比较显著。本研究结果提示,强磁0 g环境会加速胞吞作用的进行。在真核细胞中,细胞内货物的运送、分泌及胞吞囊泡的形成,都需要蛋白质来协助,而在细胞中负责此项工作的是发动蛋白^[20]。发动蛋白是一个帮助细胞形成小泡以及从细胞膜上脱离的主要蛋白质。因此,强磁0 g环境可能通过影响发动蛋白在细胞中的分布,从细胞边缘向核周转位,从而影响细胞内物质的运输。这个过程需要动态的、活性的肌动蛋白细胞骨架^[6]。发动蛋白-2也是微管马达蛋白之一,它与微管相互作用以帮助微管发挥功能。随着空间生命科学研究的不断深入,空间微重力诱导的细胞生物学效应已逐渐集中到细胞骨架系统^[1],因为细胞骨架是细胞内的重力感受系统^[21]。在空间飞行中,细胞骨架形态与结构发生明显的变化。包括:包括微丝和微管聚合发生改变,微丝、微管和中间纤维的形态学发生异常;微管发生合并、变短;微

管-细胞膜接触断开;核周的细胞角蛋白网络松弛;微管组织中心破坏;细胞分裂时中心体复合物异常^[22]。我们认为,细胞骨架对重力变化的反应影响到了发动蛋白-2的表达水平,从而导致其介导的胞吞作用发生异常。

本实验用强磁重力环境处理体外培养的MG-63细胞,分析了发动蛋白-2表达和定位的变化。一方面,验证了强磁重力环境模拟空间重力条件的可行性,另一方面,发动蛋白-2在强磁重力环境中表达和定位的变化,不但为解释胞吞作用在不同重力条件下的变化提供了分子机制,同时也为研究空间重力环境下的细胞骨架变化提供了新的基础和思路。但是,本实验是用大梯度强磁场来实现不同的重力环境,在重力变化的同时不可避免地带进了磁场的变化,虽然可以通过比较实验组与对照组间的差异来获得重力或磁场的单因素效应,但这样做不能排除两个因素同时变化时引起的生物学效应。我们将来会在均恒磁场中对磁场的生物学效应开展实验,以获得更加严谨的研

究结果。

参考文献(References)

- [1] 李莹辉. 航天医学与医学工程, 2003, 16 (增刊): 589
- [2] Valles JM Jr et al. *Biophys J*, 1997, 73: 1130
- [3] Valles JM Jr. *Biophys J*, 2002, 82: 1260
- [4] Denegre JM et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14729
- [5] Qian AR et al. *Acta Astronaut*, 2008, 63: 929
- [6] Cook TA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 644
- [7] Orth JD et al. *Cur Opin Cell Biol*, 2003, 15: 31
- [8] Fish KN et al. *J Cell Biol*, 2000, 150: 145
- [9] Kahsiwakura Y et al. *Circulation*, 2004, 110: 3329
- [10] Gorska MM, et al. *J Biol Chem*, 2006, 281: 14429
- [11] Jeong MJ et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 283: 136
- [12] Kabbani N et al. *Cell Signal*, 2004, 16: 497
- [13] Thompson HM et al. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 335
- [14] Malouvier A et al. *Physiologist*, 1993, 36: S160
- [15] Lisboa YS et al. *J Gravit Physiol*, 2002, 9: 3979
- [16] 商 澎等. 中国专利: CN101188069 (公开号)
- [17] Babbick M et al. *Adv Space Res*, 2007, 39: 1182
- [18] Takei K, et al. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 385
- [19] Yoo J et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328: 424
- [20] van der Blik AM. *Trends Cell Biol*, 1999, 9: 96
- [21] Hughes-Fulford M. *Adv Space Res*, 2003, 32: 1585
- [22] Lewis ML et al. *Gravit Space Biol Bull*, 2003, 17: 3

Effects of High Magnetic Gravitational Environment on Expression and Distribution of Dynamin-2 in MG-63

Sheng-Meng Di, Ai-Rong Qian, Zong-Cheng Tian, Wei Zhang, Li-Fang Hu, Da-Chuan Yin,
Hui-Yun Xu, Yuan-Yuan Weng, Peng Shang*

(Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences,
Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract The aim of the research is to investigate the effects of high magnetic gravitational environment (HMGE) produced by a superconducting magnet on gene expression and distribution of dynamin-2 in human osteosarcoma cell line MG-63 cells. A special designed large gradient superconducting magnet which can produce three HMGE, namely 0 g (12 T), 1 g (16 T) and 2 g (12 T). After the cells were cultured under 0 g (12 T), 1 g (16 T), 2 g (12 T) and control environments for 24 h, Real Time PCR, Western blot and laser scanning confocal microscopy (LSCM) were utilized to detect the expression and distribution of dynamin-2. And the results showed that, compared to control group, dynamin-2 expression at mRNA level in MG-63 cells exposed to 0 g (12 T), 1 g (16 T) and 2 g (12 T) conditions was increased by 6.43, 15.57 and 1.29 folds, respectively. However, at protein level, dynamin-2 expression in MG-63 cells exposed to 0 g (12 T) and 1 g (16 T) conditions was increased by 89% and 7% while that of 2 g (12 T) condition was decreased by 41% compared to control group. In addition, dynamin-2 was mainly diffused in the cytoplasm in MG-63 cells of control groups, so was that of 1 g and 2 g groups. But in 0 g group, the distribution of dynamin-2 exhibited trends towards accumulation in the perinuclear region. Taken together, the results suggest that HMGE influences expression and distribution of dynamin-2 in MG-63 cells.

Key words high magnetic gravitational environment; simulated weightlessness; osteoblast; dynamin-2

Received: June 18, 2008 Accepted: August 13, 2008

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2008AA12A218) and the National Natural Science Foundation of China (No.30670520)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88460391, Fax: 86-29-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn