

胸腺肽- β 4 在 小鼠胚胎成纤维细胞中的定位规律

张岩 李树峰 李 宁 杨彩荣 郑可佳 严云勤*

(东北农业大学动物细胞与发育生物学教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 胸腺肽- β 4 (thymosin- β 4, Tb4)是一种重要的 G-actin 活性遮蔽因子,其能够在细胞微丝活动中对 G-actin 的活性进行调节。虽然许多研究报道了 Tb4 具有广泛的生理功能与作用,但其在细胞中的定位规律迄今还没有达成共识。因此本研究选用小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)作为实验模型,以免疫荧光组织化学技术为主要实验方法,以激光共聚焦扫描显微镜为主要观测工具,研究了 Tb4 在 MEFs 中的定位规律。结果显示 Tb4 在 MEFs 贴壁、生长、增殖过程和特定细胞周期中有着显著的核、质定位变化规律,细胞形态变化和细胞所处周期两大因素能够决定 Tb4 在 MEFs 中的定位类型。

关键词 胸腺肽- β 4; 小鼠胚胎成纤维细胞; 微丝; 免疫荧光组织化学; 激光共聚焦扫描显微

胸腺肽最初是从动物胸腺组分中分离获得的一类生物活性物质,其在机体免疫和神经内分泌等方面有着重要的调节功能。1972年,Goldstein等^[1,2]从小牛胸腺组分 V 中分离提纯了一种分子量为 5 kDa、由 43 个氨基酸残基组成、亲水性较强的胸腺肽家族新成员——胸腺肽- β 4 (thymosin- β 4, Tb4)。Tb4 具有广泛的生物学功能,其与免疫调节^[3]、神经发育^[4]、伤口愈合^[5]、血管发生^[6]、细胞凋亡^[7]以及肿瘤发生与迁移^[8]等生理和病理活动均有关系。

Tb4 的主要生理功能是可以遮蔽单体肌动蛋白(G-actin)的 ATP 结合位点,并与 G-actin 以 1:1 的比例结合,从而抑制其聚合成微丝^[9]。细胞中接近一半的 G-actin 是通过结合各种遮蔽因子来实现其活性的抑制与后备分子的储备,而 Tb4 正是此类遮蔽功能最主要的执行者^[10]。此外,近年来的报道证实 Tb4 还具有配体功能,能够参与内分泌和细胞核内信号的转导过程^[11,12]。

迄今针对 Tb4 的研究已经取得了许多重大的突破,其多样性的生物学功能也被逐一揭示。但是在以往的报道中,在 Tb4 的细胞内定位问题上仍存在较大分歧,因此本实验以小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)为实验模型,探索 Tb4 在细胞内的定位规律。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

本实验使用的主要试剂:山羊抗胸腺肽- β 4 单克隆抗体及配套二抗(Santa Cruz)、罗丹明标记的鬼笔

环肽(rhodamine-phalloidin) (Cytoskeleton)、Hoechst33258 (Sigma)、胸腺嘧啶核苷(TdR, Sigma)、DMEM 细胞培养基(Gibco)。本实验使用的主要仪器:CO₂ 培养箱(Forma)、实体解剖镜与激光共聚焦显微镜(Leica)。

1.2 MEFs 的建立

实验动物为 8~10 周龄雌性和适龄雄性昆明小鼠,由东北农业大学组织胚胎研究室提供。通过注射孕马血清(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)进行同期发情和超排处理,后将妊娠 13.5 天的孕鼠脱臼处死,无菌取出子宫,获得胎鼠,去除胎鼠的头、尾、四肢和内脏后,将组织充分剪碎,用 0.25% 胰蛋白酶在室温反复消化,获得的细胞调整密度后进行原代培养。接种密度为 5×10^5 个/ml,使用添加 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。每 72 h 进行 1:3 比例传代,并经常观察细胞生长状况。第 5~8 代的细胞用于实验研究,并做好足量的冻存储备。

1.3 MEFs 的 S 期阻断处理

S 期的阻断采用 TdR 一次性阻断法,待细胞汇集率达到 70%~80% 时,更换细胞培养基,其中含有 2 mmol/L TdR,继续培养 12 h 后,大部分细胞能够被阻滞在前 S 期。

1.4 三通道免疫荧光组织化学技术流程

(1)正常或抑制培养的 MEFs 经胰蛋白酶消化后,

传代至事先放入盖玻片的 3.5 cm 细胞培养皿中培养; (2)待细胞培养达到本实验所规定的时间后及时取出,并用含 4% 多聚甲醛的 PBS 进行室温固定处理 30 min; (3)经含 0.1% Tween 20 的 PBS 简单清洗后,加入含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中作室温透膜处理 30 min; (4)移入含 10% 正常马血清的 PBS 中 37 °C 封闭非特异抗原位点 1 h; (5)封闭后的样本首先与含山羊抗 Tb4 抗体(1:100, V/V)的封闭液 4 °C 共同温育 10~12 h; (6)加入 FITC 标记抗山羊二抗(1:100, V/V)温育液室温下温育 1 h; (7)以上 3 次处理的间隔用含 0.1% Tween 20 的 PBS 清洗 3 次,每次 5 min; (8)样本与含罗丹明标记的鬼笔环肽(100 nmol/L)的 PBS 室温下共同温育 30 min; (9)使用 PBS 清洗 2 次,每次 5 min, 钠钾生理盐水清洗一次, 5 min; (10)与含 Hoechst33258 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的钠钾生理盐水溶液室温下共同温育 15 min; (11)钠钾生理盐水清洗一次, 5 min, PBS 清洗 2 次,每次 5 min; (12)使用抗荧光淬灭剂对样本进行封片,激光共聚焦扫描显微镜下观察,照相记录图像数据。

1.5 统计方法

本实验各有效处理重复 3 次,且各重复来源于不同批次培养的细胞。在共聚焦观察过程中,每张制片依照 Z 字型顺序随机选取 10 个以上的位点进行观察记录。然后使用 Image-pro-plus 5.0 软件对图像进行荧光密度扫描,获得细胞核、质中荧光表达量的平均积分光密度值(AIOD)。根据细胞核、质中 AIOD 比值差异,将细胞划分为 Tb4 在细胞核中高表达类型($\text{AIOD}_N/\text{AIOD}_P > 0.5$)和细胞核中弱表达类型($\text{AIOD}_N/\text{AIOD}_P < 0.5$),分别简记为 NH 和 NL 定位型细胞。计算各处理中 NL 定位型细胞所占比值,使用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析,获得统计结论,差异显著标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 Tb4 在 MEFs 游离期和贴壁期的定位特点

经过胰蛋白酶消化传代的 MEFs 具有很强的贴壁能力,传代 30 min 后细胞的汇集率即可达到 20% 左右,细胞多呈扁圆盘状, NL 定位型细胞占总细胞数量的 80% 左右(图 1A)。随后,直到完成贴壁过程大约经过 4 h, NL 型细胞所占的比例逐渐下降(图 1B~图 1D)。体外培养 6~8 h 的 MEFs 中, Tb4 的定位表达重新发生变化,在细胞核中的表达量逐渐降低, NL 型细胞的比例再度增加, 8 h 左右达到峰值(图 1F)。

而后经过增殖,细胞数量不断增加,从传代后 12~48 h, Tb4 的表达逐渐趋向于核、质均一化, NL 型细胞的比例逐渐降低(图 1G~图 1I)。

2.2 Tb4 在 MEFs 增殖期和 S 期阻断后的定位特点

依据前期实验获得的结果, 4 h 之前对应 MEFs 的贴壁期,这一阶段, NL 定位型细胞比例逐渐降至较低水平。本实验观察到该细胞系培养至 8 h 时, NL 型细胞比例又恢复到较高水平。我们推测此现象出现在 S 期细胞当中,因此进行了 MEFs 的细胞周期阻断实验。具体方法为,将正常培养 6 h 左右的细胞更换含有 2 mmol/L TdR 的培养液继续培养 12 h,以达到阻断细胞于 S 期的目的。在细胞 S 期阻断后, MEFs 极高比例地呈现 NL 型表达(图 1J)。

经过统计分析, NL 型细胞所占比例伴随 MEFs 贴壁、生长、增殖过程和 S 期细胞周期阻断的变化趋势图参见图 2。

2.3 Tb4 定位类型与 MEFs 生长密度的关系

在同一体系下培养的 MEFs 能够出现不同密度的生长集落。Tb4 在不同密度集落中的主要定位类型有所差异,高密度区域细胞多呈现 NH 型表达,而低密度区域以 NL 定位型细胞为主(图 1K)。

3 讨论

Tb4 是一种重要的 G-actin 活性遮蔽因子,能够在细胞微丝活动中对 G-actin 的活性进行调节。细胞微环境中非遮蔽状态 G-actin 的浓度水平能够直接影响微丝活动效果,使之倾向于聚合或是解聚。当遮蔽因子与 G-actin 结合后,使后者失去了重新聚合成微丝的能力,从而提高了原有微丝的解聚效率;反之去除遮蔽因子后则有利于胞质微丝的聚合。

Bednarek 等^[12]研究表明 Tb4 分子具有广泛的定位特征,将 Tb4 酶解后, C 端片段只能定位于细胞质,中段能够与 G-actin 结合,而 N 端片段能够定位于细胞核当中,因此该分子具有在核、质中定位的结构条件。Yu 等^[13]证实 Tb4 在巨噬细胞当中主要集中分布于胞质中央,但并非定位于细胞核内。McCormack 等^[14]发现在 IEC-6 细胞系中, Tb4 只分布于细胞质当中,当对细胞核膜进行通透处理之后,核中才出现该分子的分布。而 Watts 等^[15]揭示该分子在非洲爪蟾卵母细胞的核、质中均有分布,且表达量较为均一。Huff 等^[16]证实了在 MCF-7、Vero、HeLa 等细胞系中, Tb4 均有核、质双重定位表达的特征。上

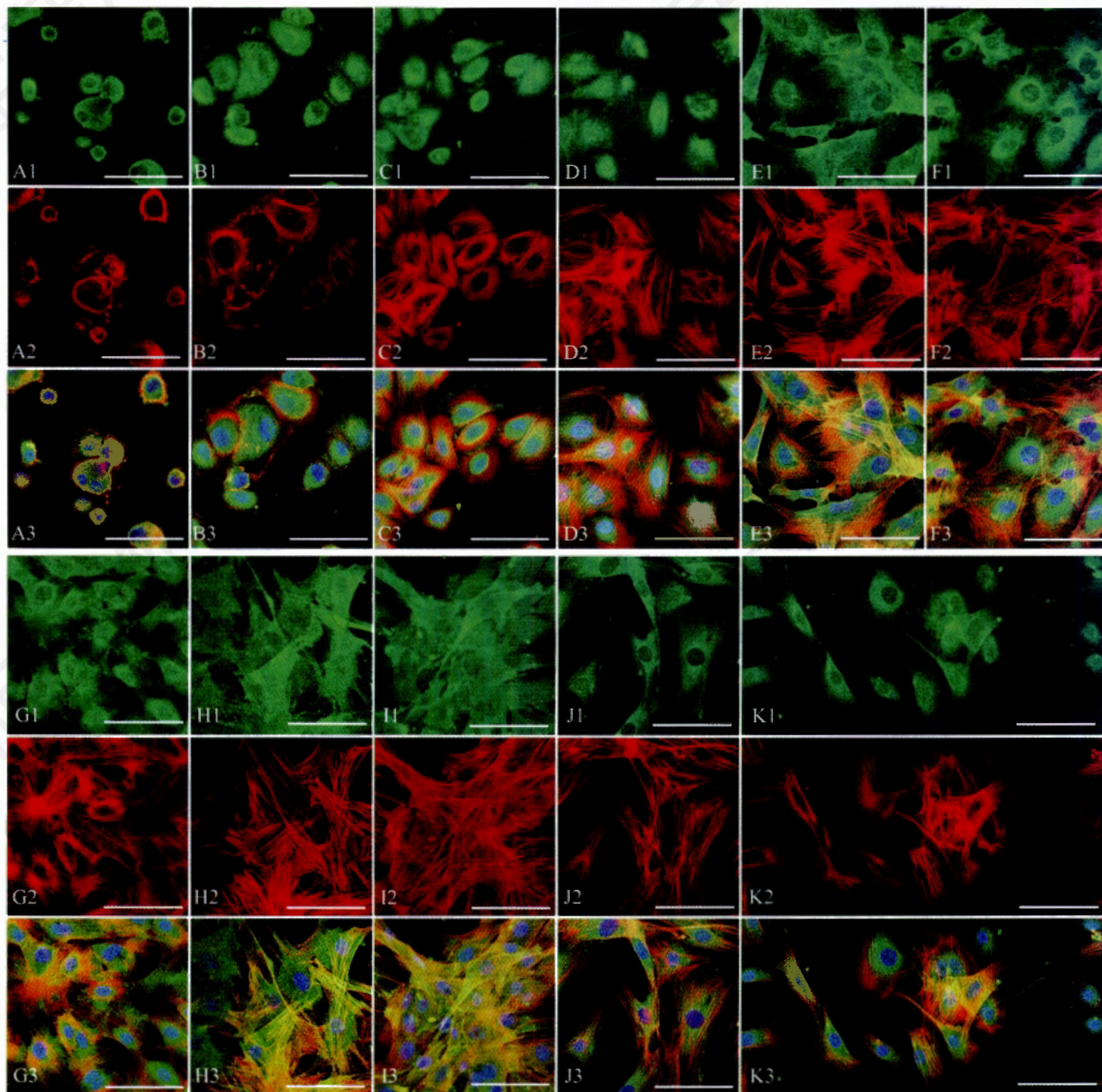


Fig.1 Immunofluorescence confocal results of thymosin- β 4 peptide expression in different IVC stages, TdR treated and different MEFs growth density test groups (scale bar: 50 μ m)

Numbers note different fluorescence channel. 1: expression of Tb4, with FITC-antibody tagged; 2: expression of microfilaments, with rhodamine-phalloidin tagged; 3: merged figure, with DNA stained by hoechst33258. Letters note the results in different IVC stages, TdR treated and different MEFs cell density test groups. A: IVC 30 min; B: IVC 1 h; C: IVC 2 h; D: IVC 4 h; E: IVC 6 h; F: IVC 8 h; G: IVC 12 h; H: IVC 24 h; I: IVC 48 h; J: TdR treated group; K: Tb4 expression in different cell density by IVC 4 h.

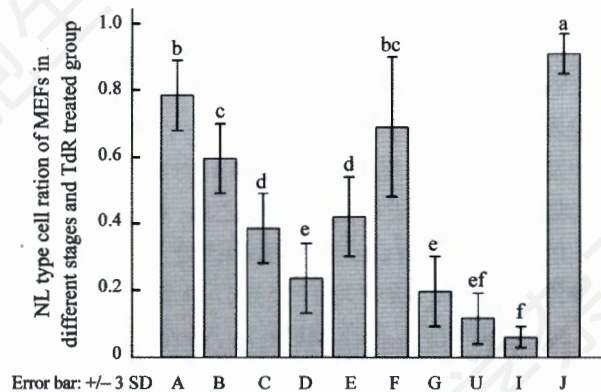


Fig.2 Ration of Tb4 expression as NL type during different IVC stages and TdR treated groups

A: IVC 30 min; B: IVC 1 h; C: IVC 2 h; D: IVC 4 h; E: IVC 6 h; F: IVC 8 h; G: IVC 12 h; H: IVC 24 h; I: IVC 48 h; J: TdR treated group.

述差异性的定位结果可能是由不同实验材料自身特性所决定的。

本实验以增殖周期较短的 MEFs 作为实验模型, 发现 Tb4 的定位行为完全符合作为 G-actin 遮蔽因子的要求。在 MEFs 消化离壁前, 参与细胞形态维持、贴壁和细胞间黏附的微丝处于相对稳定的动态平衡状态, 此时胞质对遮蔽因子需求量较低, 细胞多表现为 NH 定位类型。MEFs 经消化离壁后, 胞质中原有的微丝急剧解聚。期间有大量 Tb4 分子参与遮蔽 G-actin 的活性, 使活性状态的 G-actin 浓度降低, 以促进微丝的解聚。细胞核中原有的 Tb4 分子向胞质方向转运, 因而绝大部分细胞呈现出 NL 定位类型。伴随 MEFs 贴壁过程的进行, 细胞中 G-actin 逐渐聚合成微丝。高浓度的非遮蔽 G-actin 能够促进微丝的聚合, 因此胞质对遮蔽因子的需求量降低, Tb4 重新向核内转运, 随之 NH 定位类型细胞比例不断增加。所以在 MEFs 中伴随胞质中微丝的聚合, Tb4 趋向于核内转运; 伴随胞质中微丝的解聚, Tb4 趋向于胞质方向转运; 而在微丝活动稳定后, Tb4 在细胞核、质中也呈现稳定的分布。

Tb4 的核内转运现象不仅仅具有调节胞质中遮蔽因子浓度和核内储备的作用。据文献报道, 肌动蛋白在核内是以非常规的聚合形式存在的, 其与细胞核结构的构成以及核功能的执行密切相关^[17,18], 再者 Tb4 可与其它因子共同作用于 DNA 的转录和复制过程^[19,20]。因此众多细胞核相关活动均需要 Tb4 的参与, 而 Tb4 在细胞核、质间的双向转运过程正是调节细胞核结构、形态和相关功能执行的重要途径。

在 MEFs 贴壁完成到进入 S 期的过程中, Tb4 重新向胞质转运。Tb4 可能在这一期间逐渐完成了对细胞核结构和功能的调整, 低水平的遮蔽因子往往意味着细胞核内的肌动蛋白处于聚合状态。在前 S 期, MEFs 中 NL 型细胞比例达到最高水平, 这一现象揭示 Tb4 对 DNA 复制起始后的过程是非必需的。MEFs 在 S 期后表现为 NH 定位型比例逐渐升高, 而当细胞增殖达到最大汇集率时, 由于受到接触抑制限制, 多数细胞均停留在 G₁ 期。此时细胞内微丝活动处于相对稳定的状态, Tb4 在细胞核、质中均有分布, 且表达量无显著差异。

本实验同时发现 Tb4 在不同密度集落中的定位类型存在差异。通过实验证实, 在 MEFs 增殖过程中, 细胞定位类型与细胞周期相关, 高密度区域细胞多数已完成分裂而停留在 G₁ 期, 而低密度区域细胞

还没有完成分裂, 多处于 S 期和 G₂ 期, 因而导致 Tb4 定位类型产生差异。2004 年, Huff 等^[16]首先在研究人乳腺癌 MCF-7 细胞系的实验中发现 Tb4 在同一细胞系中的定位类型具有可变性, 其中低密度生长细胞多呈 NH 型分布, 而高密度生长细胞多呈 NL 型分布。Huff 等的结论似乎与本实验相悖, 但通过分析发现, 其报导中定义的“低密度”细胞其实已经汇集完全, 呈单层生长状态; 而其定义的“高密度”细胞是发生重叠性生长的高度增殖细胞集落, 这与笔者实验中划分密度的标准不同。Huff 等认为细胞密度因素是产生定位类型差异现象的直接原因; 但笔者认为该差异实际上与细胞密度并无直接关系, 而仍与细胞增殖过程中所处的细胞周期相关。

本实验证实伴有高水平微丝聚合、解聚活动的细胞形态变化可以改变 MEFs 中 Tb4 的定位类型。而在 MEFs 增殖过程中, 细胞周期因素能够对 Tb4 定位类型产生显著影响, 具体为 G₁ 期细胞呈现高比例的 NH 定位类型, S 期为高比例的 NL 定位类型, 而在 S 期之后, NH 定位类型的比例又逐渐恢复到较高水平。综上所述, 伴有高水平微丝聚合、解聚活动的细胞形态变化过程和细胞所处周期两大因素能够决定 Tb4 在 MEFs 中的定位类型。

参考文献(References)

- [1] Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, *et al.* Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(7): 1800-1803
- [2] Low TL, Hu SK, Goldstein AL. Complete amino acid sequence of bovine thymosin $\beta 4$: A thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(2): 1162-1166
- [3] Gondo H, Kudo J, White JW, *et al.* Differential expression of the human thymosin-beta 4 gene in lymphocytes, macrophages, and granulocytes, *J Immunol*, 1987, 139(11): 3840-3848
- [4] Yang H, Cheng X, Yao Q, *et al.* The promotive effects of thymosin $\beta 4$ on neuronal survival and neurite outgrowth by upregulating L1 expression, *Neurochem Res*, 2008, 33(11): 2269-2280
- [5] Sosne G, Szliter EA, Barrett R, *et al.* Thymosin $\beta 4$ promotes corneal wound healing and decreases inflammation *in vivo* following alkali injury, *Exp Eye Res*, 2002, 74(2): 293-299
- [6] Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR. Thymosin $\beta 4$ and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential, *Angiogenesis*, 2007, 10(4): 229-241
- [7] Müller CS, Huff T, Hannappel E. Reduction of thymosin $\beta 4$ and actin in HL60 cells during apoptosis is preceded by a decrease in their mRNAs, *Mol Cell Biochem*, 2003, 250(1-2): 179-188
- [8] Otto AM, Müller CS, Huff T, *et al.* Chemotherapeutic drugs

- change actin skeleton organization and the expression of β -thymosins in human breast cancer cells, *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128(5): 247-256
- [9] Huff T, Müller CS, Otto AM, *et al.* β -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions, *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(3): 205-220
- [10] Safer D, Elzinga M, Nachmias VT. Thymosin β 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable, *J Biol Chem*, 1991, 266(7): 4029-4032
- [11] Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, *et al.* Thymosin β 4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection, *Circulation*, 2008, 117(17): 2232-2240
- [12] Bednarek R, Boncela J, Smolarczyk K, *et al.* Ku80 as a novel receptor for thymosin β 4 that mediates its intracellular activity different from G-actin sequestering, *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1534-1544
- [13] Yu FX, Lin SC, Morrison-Bogorad M, *et al.* Effects of thymosin β 4 and thymosin β 10 on actin structures in living cells, *Cell Motil Cytoskeleton*, 1994, 27(1): 13-25
- [14] McCormack SA, Ray RM, Blanner PM, *et al.* Polyamine depletion alters the relationship of F-actin, G-actin, and thymosin β 4 in migrating IEC-6 cells, *Am J Physiol*, 1999, 276 (2 Pt 1): C459-C468
- [15] Watts JD, Cary PD, Sautiere P, *et al.* Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins, *Eur J Biochem*, 1990, 192(3): 643-651
- [16] Huff T, Rosorius O, Otto AM, *et al.* Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin β 4, *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt22): 5333-5341
- [17] Krauss SW, Chen C, Penman S, *et al.* Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19): 10752-10757
- [18] Gonsior SM, Platz S, Buchmeier S, *et al.* Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody, *J Cell Sci*, 1999, 112 (Pt 6): 797-809
- [19] Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling, *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 755-781
- [20] Shumaker DK, Kuczmarski ER, Goldman RD. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions, *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(3): 358-366

The Distribution of Thymosin- β 4 in Mouse Embryonic Fibroblasts

Yan Zhang, Shu-Feng Li, Ning Li, Cai-Rong Yang, Ke-Jia Zheng, Yun-Qin Yan*

(Department of Animal Cell and Developmental Biology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract As an important G-actin sequestering factor, thymosin- β 4 (Tb4) regulates the G-actin activity during many cellular microfilaments events. Hitherto, serious of reports have confirmed that Tb4 has broad cellular and physiological functions, but the discipline of cellular location have never reached a consensus. Thus, we chose mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as experimental model, and utilized immuno-fluorescence-histochemistry technology as the chief method, while confocal laser scanning microscope as the main instrument. The results showed that the distributive type of Tb4 changed regularly in the processes of MEFs' adhesion, growth, proliferation and special cell cycle. In conclusion, the distributive type of Tb4 in MEFs is determined by the special cell cycle and the transformation of cellular morphology, which always accompanied with intensive microfilaments polymerization or depolymerization.

Key words thymosin- β 4; mouse embryonic fibroblasts; microfilaments; immuno-fluorescence-histochemistry; confocal laser scanning microscope

Received: January 14, 2009 Accepted: May 12, 2009

*Corresponding author. Tel: 86-451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com