

研究论文

模拟微重力诱导的细胞微丝变化影响 *COL1A1* 启动子活性

戴钟铨, 李莹辉*, 丁 柏, 杨 芬, 谭映军, 聂捷琳, 于建如

航天细胞分子生物学实验室, 航天医学工程研究所, 北京 100094

摘 要: 细胞骨架系统是细胞内的重力感受系统。已知微重力导致的细胞形态、功能、信号传导等多种变化均与细胞骨架系统变化有关, 但微重力对相关基因调控的影响知之甚少。本研究以构建的基因工程细胞株(EGFP-ROS)为对象, 以回转器模拟微重力效应, 利用增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)荧光半定量和细胞微丝荧光染色分析技术, 探讨回转模拟微重力条件下, 细胞微丝系统对 I 型胶原 $\alpha 1$ 链基因(collagen type I alpha chain 1 gene, *COL1A1*)启动子活性的影响。空间飞行和回转模拟微重力后, 细胞微丝解聚、张力纤维减少, 表明微重力可降低细胞微丝结构的有序性, 诱导细胞骨架重排。适合剂量的细胞松弛素 B 处理 EGFP-ROS 细胞诱导微丝骨架解聚, 同时导致 *COL1A1* 启动子活性增加, 细胞荧光强度增强, 并呈现剂量依赖性。因此, 一定程度的细胞微丝系统破坏将导致 *COL1A1* 启动子活性的增强, 证明细胞微丝骨架系统参与了微重力对 *COL1A1* 启动子活性调节, 且在微重力信号传导中起重要作用。

关键词: 微重力; 细胞骨架; 启动子; I 型胶原

中图分类号: R852.22

Disruption of microfilament cytoskeleton induced by simulated microgravity increases the activity of *COL1A1* promoter

DAI Zhong-Quan, LI Ying-Hui*, DING Bai, YANG Fen, TAN Ying-Jun, NIE Jie-Lin, YU Jian-Ru

Laboratory of Space Cellular and Molecular Biology, Institute of Space Medico-engineering, Beijing 100094, China

Abstract: It is well known that cytoskeleton system is the sensor of gravity in cells. Under microgravity condition, cytoskeleton is associated with the changes of cell shape, function, signaling and so on; but the relationship between cytoskeleton and gene expression is not fully understood. In present study, we discussed the effects of cell microfilament on the activity of collagen type I alpha 1 chain gene (*COL1A1*) promoter under microgravity simulated by clinostat and/or cytochalasin B as microfilament depolymerizer in the established EGFP-ROS cell line using the method of fluorescence semi-quantitative analysis and the fluorescent stain of microfilament. Compared with the normal control, the microfilament of ROS17/2.8 cell tended to disassemble, marginal distribution of fiber stress, and showed reducing stress fibers after spaceflight in Photon-M1 or clinorotation simulated microgravity, which suggested that microgravity destroyed the well-order cell cytoskeleton and induced a rearrangement. Treatment with suitable concentration of cytochalasin B in normal gravity induced disruption of microfilament, increased the activity of *COL1A1* promoter and resulted in a dose-dependent increase of EGFP fluorescence. Therefore, a certain extent disruption of the microfilament system was associated with increased activity of the *COL1A1* promoter. All above demonstrate that microfilament cytoskeleton system takes part in the regulation of *COL1A1* promoter activity and plays an important role in the signaling of microgravity.

Key words: microgravity; cytoskeleton; promoter; collagen type I

40多年的空间探索使人类对外层空间和生命现象有了更深刻、更本质的认识, 研究内容已从早期的空间环境对人体生理生化影响的现象观察, 效应

确定, 发展到对空间环境影响有机体的细胞、分子乃至基因变化的机理研究和本质认识。现有研究结果表明, 细胞骨架系统对微重力环境非常敏感^[1]; 可

Received 2005-07-18 Accepted 2005-10-12

This work was supported by National High Technology Research and Development Program of China (No. 863-2-210-3).

*Corresponding author. Tel: +86-10-66365755; Fax: +86-10-66365757; E-mail: yinghuidd@vip.sina.com

能参与微重力导致的细胞形态功能变化过程^[2]。细胞可通过细胞外基质以及细胞骨架系统, 协同化学信号传导通路将重力变化的刺激级联传递到细胞核, 激发相关基因表达变化, 进而影响细胞功能^[3,4]。前期研究表明, 回转模拟微重力能改变 I 型胶原 $\alpha 1$ 链基因(*COL1A1*)启动子活性^[5], 但其机制不清。我们认为细胞骨架系统可能参与微重力对 *COL1A1* 启动子活性的调控。本文在空间飞行和地面模拟微重力诱导细胞微丝骨架变化的基础上, 利用稳定转染 *COL1A1*-EGFP 基因的 ROS17/2.8 细胞株^[6], 研究了回转模拟微重力条件下细胞微丝系统对 *COL1A1* 启动子活性的影响, 以期为空间微重力作用下的细胞信号传导调控理论积累科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料仪器 大鼠骨肉瘤细胞系 ROS17/2.8, 由 Vico 教授[Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux (LBTO), Faculte de Medecine, St. Etienne, France]馈赠。稳定转染 *COL1A1*-EGFP 基因的 *COL1A1*-EGFP-ROS 细胞和稳定转染的 pEGFP-C1 (Clontech) 质粒的 CMV-EGFP-ROS 细胞由本室构建^[6]。Cytochalasin B 购自美国 Sigma 公司。Texas Red 标记的 phalloidin 购自美国 Molecular Probes。MG3 型细胞回转器由中科院生物物理所研制。IBIS 空间细胞培养实验装置由法国空间中心(CNES)研制。

1.2 空间飞行细胞样品的制备 ROS17/2.8 细胞以每片 1.0×10^5 个密度接种到 Thermanox (15 mm $\times$ 20 mm, Sigma), 培养基中含 25 mmol/L HEPES 和 4% 胎牛血清, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度饱和条件下预培养 24 h 后, 将 Thermanox 细胞片封装到含 2.5 ml 培养基的细胞培养袋中, 袋内含 2 个预装有 120 μ l 激活剂和多聚甲醛固定剂的胶囊。将细胞培养袋装入专用密闭细胞培养盒的专用空间细胞实验盒中, 置于 IBIS 中。IBIS 是由法国航天中心研制的空间细胞培养装置。该装置内有一离心机, 可以在空间实现模拟 1 g 重力环境, 即 inflight 1 g 对照。样品搭载于国际 Photon-M1 返回式卫星, 细胞在空间的激活、固定、转移、冷藏等步骤都是按预先设定的程序自动进行。卫星在进入轨道后, IBIS 细胞开始工作, 温度由 4 $^{\circ}$ C 升到 37 $^{\circ}$ C。入轨 4 h 后自动激活, 并分别于飞行 48 h、96 h 自动固定。固定的样品转移到 4 $^{\circ}$ C 冷藏箱内, 直到返回。卫星返回后对细胞样品进行细胞骨架分析。

1.3 细胞松弛素 B 对启动子活性的影响 将密度为 1.0×10^5 个/ml EGFP-ROS 细胞接种到贴有玻片的六孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、湿度饱和的培养箱中培养 24 h 后, 添加不同浓度细胞松弛素 B 的培养基(0.5、2、4 μ g/ml), 继续培养 24 h。用 4% 多聚甲醛固定细胞, 随后进行荧光强度分析。

1.4 回转模拟微重力条件下的细胞培养 将密度为 1.0×10^5 个/ml EGFP-ROS 细胞接种到放有玻片的六孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、湿度饱和的培养箱中培养 24 h 后, 将玻片装入细胞培养袋, 灌满培养液, 封口; 随机分为对照、回转模拟微重力、细胞松弛素 B 处理和细胞松弛素 B 与回转共处理等四组。两组回转细胞置于回转器, 以 30 r/min 的转速, 回转模拟微重力培养 24 h。对照和药物处理组细胞则置于同一培养箱中密闭静置培养。用 4% 多聚甲醛固定细胞, 随后进行荧光强度和细胞骨架分析。

1.5 荧光强度分析 利用荧光显微镜(Leica, Germany)观察细胞, 采集细胞荧光图像。对同一批次实验, 设定相同的 gamma 值、曝光时间、gain 值等采集图像参数, 图像分辨率为 1272 $\times$ 1017; 用 ImageJ 软件分析并进行半定量分析处理。

1.6 微丝荧光染色 多聚甲醛固定的细胞, 用 1% Triton 处理和 1% BSA 封闭 30 min 后, 加入 Texas Red 标记的 Phalloidin 孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次后用 Mowiol 封片。荧光显微镜下观察拍片。

1.7 数据统计分析 所有数据以 mean $\pm$ SD 表示, 同一时间的对照组与回转组采用配对样本 *t* 检验, *P* < 0.01 为有极显著差异。

2 结果

2.1 微重力对细胞微丝骨架的影响

采用微丝荧光标记技术同时检测了地面模拟微重力和空间真实微重力下细胞微丝骨架结构的变化, 结果(图 1)说明细胞骨架对微重力非常敏感。ROS17/2.8 细胞在经过回转模拟微重力培养后, 细胞微丝骨架出现局部解聚和张力纤维减少的趋势(图 1D); 而对照组细胞的微丝骨架排列有序、粗细均匀、走向清晰(图 1A)。空间飞行样品的细胞微丝骨架荧光染色结果发现, 真实微重力组的微丝明显解聚、骨架蛋白弥散分布、细胞骨架的网络结构消失、细胞核区不可分辨(图 1C), 而飞行 1 g 对照组(图 1B)和地面对照组(图 1A)的微丝骨架没有发生明

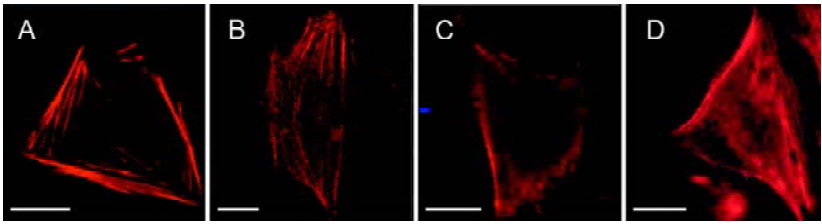


图 1. 微重力和回转对细胞骨架的影响(红色为微丝)

Fig.1. Cytoskeletal changes in ROS17/2.8 cells under different gravity conditions. A: Ground control. B: Insight 1 g group. C: Micro-gravity group. D: Simulated microgravity. Scale bar, 10 μm .

显变化。这与 Hughes-Fulford 等在 STS-56 上观察到的结果一致^[7]。由此看出, 在真实微重力和模拟微重力条件下, 细胞微丝骨架发生解聚, 张力纤维减少, 即破坏了细胞微丝骨架结构。

2.2 回转模拟失重对 COL1A1 活性的影响

采集的图像经 ImageJ 软件分析, 得到细胞内平均荧光强度值。图 2 是回转模拟微重力对 COL1A1 和 CMV 启动子活性的影响。回转后, COL1A1-

EGFP 细胞株的对照组和回转组荧光强度值分别为 47.6 ± 1.73 和 55.8 ± 1.34 。与对照相比, 其荧光强度显著增强。而 CMV-EGFP 细胞株的对照组和回转组荧光强度值分别为 47.3 ± 1.67 和 46.6 ± 0.68 , 两者荧光强度值没有显著差别。以上结果表明回转导致荧光强度值升高, EGFP 表达增强, 而且具有启动子特异性。

2.3 细胞松弛素 B 对 COL1A1 启动子活性的影响

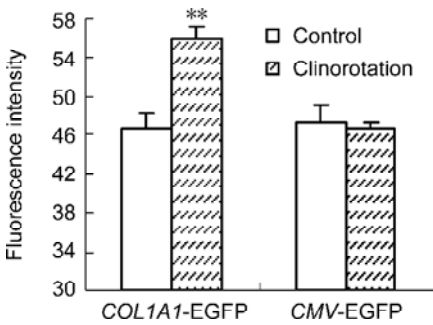


图 2. 回转对 COL1A1 启动子活性的影响

Fig.2. Effects of clinorotation on the activity of COL1A1 or CMV promoter. ** $P < 0.01$, $n = 4$.

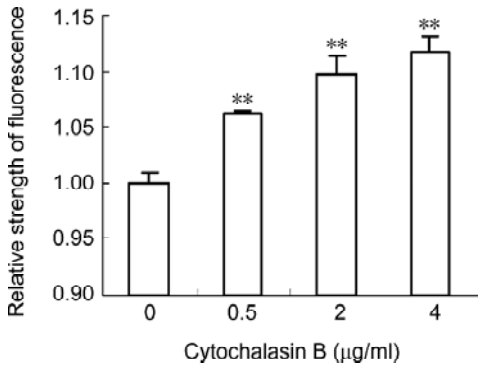


图 3. 细胞松弛素 B 对 COL1A1 启动子活性的影响

Fig 3. Effects of cytochalasin B treatment on COL1A1 promoter activity. ** $P < 0.01$ vs control, $n = 4$.

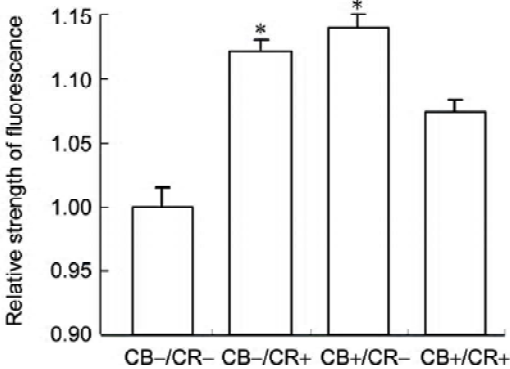
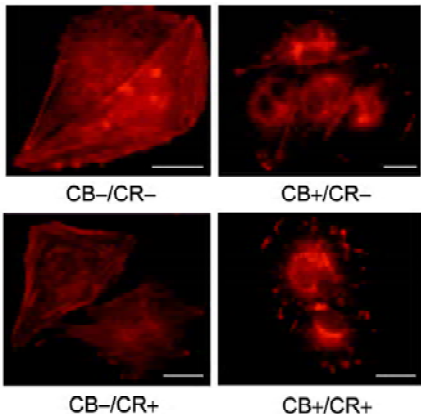


图 4. 细胞松弛素 B 和 / 或回转对细胞微丝骨架及 COL1A1 启动子的影响

Fig.4. Effects of cytochalasin B (CB) and/or clinorotation (CR) on the microfilament and the activity of COL1A1 promoter. + as treatment, - as control. * $P < 0.05$ vs control, $n = 4$. Scale bar, 5 μm .



细胞骨架是细胞的重要组成部分,在细胞功能、基因表达调节上具有重要作用。回转导致的细胞微丝骨架与基因启动子活性变化之间是否存在关联呢?为了检测微丝骨架对 *COL1A1* 启动子活性的影响,用不同浓度(0.5、2、4 $\mu\text{g/ml}$)的微丝骨架破坏剂细胞松弛素 B 处理 *COL1A1*-EGFP-ROS 细胞。荧光强度分析(图 3)显示伴随细胞松弛素 B 处理导致的微丝骨架解聚,细胞荧光强度增强,即 *COL1A1* 启动子活性升高;而且在一定的浓度范围内呈浓度依赖性。细胞松弛素 B 和回转同时处理(CB+/CR+),更严重地破坏了细胞微丝骨架,其荧光强度却比单独处理组低,但仍高于没有任何处理的细胞组(CB-/CR-)(图 4),但没有统计学意义。由此说明 *COL1A1* 启动子活性的升高与微丝解聚的程度相关;证明微丝骨架可以影响 *COL1A1* 启动子活性。以上实验数据表明细胞松弛素 B 处理、微重力以及回转模拟微重力诱发的 *COL1A1* 活性升高与微丝骨架的解聚密切相关。

3 讨论

本实验利用成骨肉瘤细胞株 EGFP-ROS 和已建立的荧光半定量分析方法^[5],以回转器模拟微重力效应和细胞松弛素 B 诱导的微丝解聚细胞模型,探讨了回转模拟微重力下,细胞微丝系统对 *COL1A1* 启动子活性的影响。其中 *COL1A1*-EGFP-ROS 和 CMV-EGFP-ROS 细胞株分别是稳定转染了由 *COL1A1* 启动子(3.6 kb)或 CMV 启动子驱动的 EGFP 基因的成骨肉瘤细胞系 ROS17/2.8^[6]。用该细胞株进行的回转对 *COL1A1* 启动子活性影响的研究表明,可用该细胞株的荧光强度变化来表现 EGFP 和 I 型胶原的表达变化,可利用该细胞株进行有关 I 型胶原表达调控和信号传导的研究^[5]。

微重力对细胞信号传导和基因表达的影响,尤其在基因表达影响方面,一直是空间细胞分子生物学的研究热点和难点^[8-11]。细胞是以整体来感受和响应重力变化的;也就是说力学信号传导存在物理传导和化学传导两个通路。这两个通路相互交叉,其交叉点就是细胞骨架。这里指的细胞骨架包括细胞外基质到核内 DNA 之间的物理连接网络结构,包括细胞外基质、细胞膜骨架、细胞质骨架、核基质及染色体 DNA 等。当细胞受到物理信号(力、光、热、电、磁等)刺激时,与细胞骨架相连的蛋白质发生构象的变化,从而产生机械信号,可以

形成机械波,沿着细胞骨架组份传播到达细胞核;也可以在特定的靶点处激发引起生物化学的级联信号传导过程^[12];从而引起基因表达变化。本实验结果为此理论提供实验依据。

我们前面报道了在模拟微重力条件下, *COL1A1*-EGFP-ROS 细胞的荧光强度增强,说明在模拟失重条件下 *COL1A1* 启动子活性升高;免疫分析也证实了在模拟微重力下 I 型胶原分泌是升高的;认为这是一种细胞代偿性反应,但其具体细胞机制不明确。众多研究表明,细胞骨架系统参与了微重力的胞内信号传导过程。Krebsbach 等^[13]研究表明当骨细胞的细胞形态、细胞之间及细胞基质间的相互作用方式改变时, *COL1A1* 启动子的调控方式也发生改变。可见 *COL1A1* 启动子的调控与细胞形态和细胞骨架密切相关。在本实验中我们观察到细胞骨架在微重力下产生了一系列的解聚和不规则排列现象,推测细胞微丝骨架参与了微重力对 *COL1A1* 启动子的活性调控。通过细胞松弛素实验证明一定程度上细胞微丝骨架的破坏导致 *COL1A1* 启动子活性升高。而过度地破坏细胞骨架(图 4 CB+/CR+)可能会影响到细胞生存能力,导致细胞凋亡或死亡等情况,也影响 *COL1A1* 启动子活性。微重力导致细胞微丝骨架解聚,提高了 *COL1A1* 启动子活性,说明细胞微丝骨架参与微重力对 *COL1A1* 启动子活性的调节,其详细机制还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Papaseit C, Pochon N, Tabony J. Microtubule self-organization is gravity-dependent. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97 (15): 8364-8368.
- 2 Ingber D. How cells (might) sense microgravity. FASEB J 1999; 13 Suppl: S3-S15.
- 3 Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. Science 1993; 260(5111): 1124-1127.
- 4 Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Pockwinse SH, McNeil S. Implications for interrelationships between nuclear architecture and control of gene expression under microgravity conditions. FASEB J 1999; 13 Suppl: S157-S166.
- 5 Dai ZQ, Li YH, Ding B, Liu PP, Liu WQ, Zhang YG. Effects of clinorotation on *COL1A1*-EGFP gene expression. Sci China C Life Sci 2004; 47(3): 203-210
- 6 Dai ZQ (戴钟铨), Li YH, Ding B, Liu PP, Zhang YG. Establishment of *COL1A1*-EGFP stably transfected ros17/2.8 cell lines. Space Med Med Eng (航天医学和医学工程) 2004; 17

- (2): 107-110 (Chinese, English abstract).
- 7 Hughes-Fulford M, Lewis ML. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp Cell Res* 1996; 224(1): 103-109.
- 8 Wan YM (万玉民), Ma YJ, Zhang XY, Zeng B, Wang HH, Li YH. Effects of rotation on osteonectin and osteopontin mRNA level of cultured osteoblasts in rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2005; 57(3): 384-388 (Chinese, English abstract).
- 9 Lewis ML. The cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. *Adv Space Biol Med* 2002; 8: 77-128.
- 10 Hughes-Fulford M. The role of signaling pathways in osteoblast gravity perception. *J Gravit Physiol* 2002; 9(1): P257-P260.
- 11 Lewis ML, Cubano LA, Zhao B, Dinh HK, Pabalan JG, Piepmeier EH, Bowman PD. cDNA microarray reveals altered cytoskeletal gene expression in space-flown leukemic T lymphocytes (Jurkat). *FASEB J* 2001; 15(10): 1783-1785.
- 12 Hughes-Fulford M. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv Space Res* 2003; 32(8): 1585-1593.
- 13 Krebsbach PH, Harrison JR, Lichtler AC, Woody CO, Rowe DW, Kream BE. Transgenic expression of *COL1A1*-chloramphenicol acetyltransferase fusion genes in bone: differential utilization of promoter elements *in vivo* and in cultured cells. *Mol Cell Biol* 1993; 13(9): 5168-5174