

多囊蛋白 2 对低频脉冲电磁场促进成骨细胞分化成熟的影响

何玥颖^{1,2}, 杨明俊¹, 陈卓², 魏朋², 秦昆², 谢高倩², 陈克明^{2,3}

1 兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

2 解放军联勤保障部队第 940 医院基础医学实验室, 甘肃 兰州 730050

3 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 甘肃 兰州 730050

何玥颖, 杨明俊, 陈卓, 魏朋, 秦昆, 谢高倩, 陈克明. 多囊蛋白 2 对低频脉冲电磁场促进成骨细胞分化成熟的影响. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1159-1172.

HE YY, YANG MJ, CHEN Z, WEI P, QIN K, XIE GQ, CHEN KM. Effect of polycystin2 on differentiation and maturation of osteoblasts promoted by low-frequency pulsed electromagnetic fields. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1159-1172.

摘要: 已知低频脉冲电磁场 (pulsed electromagnetic fields, PEMFs) 可以促进体外培养大鼠颅骨成骨细胞 (rat calvarial osteoblasts, ROB) 的分化成熟, 但 ROB 感知 PEMFs 物理信号并启动成骨性分化的机制至今不明。本研究探究了 0.6 mT 50 Hz PEMFs 促进 ROB 成骨性分化与位于 ROB 表面的初级纤毛上的多囊蛋白 2 (polycystin2, PC2) 的关系。首先用免疫荧光染色法研究了 PC2 是否位于 ROB 初级纤毛内, 然后通过 Western blotting 检测了经 PEMFs 处理不同时间后, ROB 内 PC2 蛋白表达的变化情况。接着用 PC2 阻断剂盐酸阿米洛利 (amiloride HCl, AMI) 预处理 ROB, 检测碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性和 PC2 蛋白表达受 PEMFs 处理的影响情况, 以及与骨形成相关的 Runx-2、Bmp-2、Col-1、Osx 的蛋白及基因表达的变化情况。再用 RNA 干扰法抑制 ROB 内 PC2 的表达后, 检测与骨形成相关基因表达情况。结果发现, PC2 被定位于 ROB 初级纤毛上, PEMFs 处理增加了 PC2 蛋白表达量。PC2 被 AMI 阻断后, PEMFs 不再能提高 PC2 蛋白表达水平及 ALP 活性, PEMFs 对成骨相关蛋白和基因表达的促进作用也被抵消。使用 RNA 干扰法抑制 PC2 的表达后, PEMFs 也不再能提高骨形成相关基因的表达。结果表明: 存在于成骨细胞初级纤毛表面的 PC2 在感知并传递 PEMFs 发出的物理信号中扮演着不可或缺的角色, PEMFs 促进 ROB 成骨性分化依赖于 PC2 的存在。本研究为阐明低频脉冲电磁场促进骨形成及治疗骨质

Received: May 13, 2021; Accepted: August 23, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81770879); Youth Science and Technology Fund Project of Gansu Province, China (20JR5RA589)

Corresponding author: CHEN Keming. Tel: +86-931-2994582; E-mail: chenkm@lut.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (81770879); 甘肃省青年科技基金计划项目 (20JR5RA589)

疏松的机制研究奠定了基础。

关键词：多囊蛋白 2；低频脉冲电磁场；成骨细胞；盐酸阿米洛利；RNA 干扰

Effect of polycystin2 on differentiation and maturation of osteoblasts promoted by low-frequency pulsed electromagnetic fields

HE Yueying^{1,2}, YANG Mingjun¹, CHEN Zhuo², WEI Peng², QIN Kun², XIE Gaoqian², CHEN Keming^{2,3}

1 College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, Gansu, China

2 Basic Medical Laboratory of the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, Gansu, China

3 Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drugs of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu, China

Abstract: It is known that low-frequency pulsed electromagnetic fields (PEMFs) can promote the differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts (ROBs) cultured *in vitro*. However, the mechanism that how ROBs perceive the physical signals of PEMFs and initiate osteogenic differentiation remains unknown. In this study, we investigated the relationship between the promotion of osteogenic differentiation of ROBs by 0.6 mT 50 Hz PEMFs and the presence of polycystin2 (PC2) located on the primary cilia on the surface of ROBs. First, immunofluorescence staining was used to study whether PC2 is located in the primary cilia of ROBs, and then the changes of PC2 protein expression in ROBs upon treatment with PEMFs for different time were detected by Western blotting. Subsequently, we detected the expression of PC2 protein by Western blotting and the effect of PEMFs on the activity of alkaline phosphatase (ALP), as well as the expression of Runx-2, Bmp-2, Col-1 and Osx proteins and genes related to bone formation after pretreating ROBs with amiloride HCl (AMI), a PC2 blocker. Moreover, we detected the expression of genes related to bone formation after inhibiting the expression of PC2 in ROBs using RNA interference. The results showed that PC2 was localized on the primary cilia of ROBs, and PEMFs treatment increased the expression of PC2 protein. When PC2 was blocked by AMI, PEMFs could no longer increase PC2 protein expression and ALP activity, and the promotion effect of PEMFs on osteogenic related protein and gene expression was also offset. After inhibiting the expression of PC2 using RNA interference, PEMFs can no longer increase the expression of genes related to bone formation. The results showed that PC2, located on the surface of primary cilia of osteoblasts, plays an indispensable role in perceiving and transmitting the physical signals from PEMFs, and the promotion of osteogenic differentiation of ROBs by PEMFs depends on the existence of PC2. This study may help to elucidate the mechanism underlying the promotion of bone formation and osteoporosis treatment in low-frequency PEMFs.

Keywords: polycystin2; low-frequency pulsed electromagnetic field; osteoblasts; amiloride hydrochloride; RNA interference

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量低、骨组织微细结构破坏导致骨脆性增加和骨折危险性增加为特征的一种系统性、全身性骨骼疾病^[1]。近年来,骨质疏松症的发病率迅速攀升,在中老年人中显得尤为突出。大量研究表明,脉冲电磁场在体外实验中可以促进成骨细胞的矿化成熟^[2],在增强成骨细胞的成骨活性的同时降低破骨细胞的骨吸收活性;在体内实验中可提高实验大鼠的骨密度及峰值骨量,同时减缓骨量丢失^[3]。目前电磁场治疗骨质疏松症已有一定的临床应用,但对其作用机制需要进一步深入研究,以便为推广脉冲电磁场治疗骨质疏松症提供实验依据。

多囊蛋白 (polycystin) 因常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 而被熟知^[4],在许多组织和细胞类型中广泛表达,包括骨中的成骨细胞谱系。作为存在于细胞表面的一种膜蛋白受体,多囊蛋白能接收并感知多种信号。目前被广泛研究的多囊蛋白主要是多囊蛋白 1 (polycystin1, PC1 或 TRPP1) 和多囊蛋白 2 (polycystin2, PC2 或 TRPP2), PC1 由 *PKD1* 基因编码, PC2 则由 *PKD2* 基因编码^[5]。PC2 作为一种 Ca^{2+} 通道,属于瞬时受体电位成员之一^[6],被认为是最合适的细胞传感器的候选者。已有相关研究证明, PC1 和 PC2 在成骨细胞中表达,共同定位于成骨细胞的初级纤毛上,相互作用形成复合物,起到“传感器”的作用^[7-8]。本课题组通过前期大量研究已经证明, PEMFs 可以激活 BMP-2/Smad、PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin、IGF-1R/NO 等信号途径而促进成骨细胞的矿化成熟^[9-11],且成骨细胞表面的初级纤毛具有接受 PEMFs 信号的能力^[12]。但是,触发这一系列信号级联反应的初始事件是什么, PEMFs 作为一种物理信号,初级纤毛是如何将其转化为细胞内的化学信号

的? 初级纤毛上是否存在着感受和传导 PEMFs 所发出的物理信号的特定结构或特殊蛋白受体? 位于 ROB 表面初级纤毛上的 PC2 是否具有上述功能? 这些问题得到证实,才能更进一步阐明 PEMFs 参与骨形成的作用机制。本研究将对这些问题进行逐一探讨。

1 材料与方法

1.1 实验装置

实验所用的低频脉冲电磁场处理仪是由本实验室与中国科学院近代物理研究所共同研究自制的 (专利号为 ZL 20112 0528654.3)。其包括 6 个部分: 程序控制计算机、数模转换器、功率放大器、螺线管、磁场传感器和温度传感器。该设备可以产生静磁场和连续或脉冲电磁场 (PEMFs), 其频率范围为 5–100 Hz, 磁感应强度范围为 0.0–5.0 mT, 实验前已经由中国科学院近代物理研究所进行了校准。螺线管是由 3 个串联线圈组成的, 以产生良好均匀的电磁场, 经灭菌后放于恒温 CO_2 培养箱中以放置成骨细胞。该线圈长 27 cm, 直径为 14 cm, 具有良好的均匀性, 其水平误差 < 0.10%, 垂直误差 < 0.05%, 确保所有细胞受到相同的电磁辐射。

本实验所用的 CO_2 恒温培养箱为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; 高速冷冻离心机为德国 Heraeus 公司产品; Epoch 酶标仪为美国 BioTek 公司产品; 电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品; ChemiDoc-It 凝胶成像系统为美国 UPV 公司产品; ViiA™ 7 Dx 实时荧光定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.2 试剂

本实验所用到的 α -MEM 培养基、Opti-MEM™ 减血清培养基、Trypsin-EDTA (0.25%) 均购于美国 Gibco 公司; 胎牛血清购于以色列 Biological Industries 公司; ALP 检测试

剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司； β -actin、Runx-2、Bmp-2、Col-1 蛋白一抗、辣根过氧化物酶标记的 IgG 及山羊抗兔 IgG (Alexa Fluor[®] 488) 和山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 594) 均购于美国 Abcam 公司；PC2、Acetyl- α -Tubulin 蛋白一抗购于美国 Santa Cruz 公司；Osx 蛋白一抗、ECL 超灵敏发光液购于美国 Affinity Biosciences 公司；PC2 的阻断剂盐酸阿米洛利购于美国 MCE 公司；II 型胶原酶、青链霉素混合液 (100 \times)、二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO)、高效 RIPA 裂解液 (组织/细胞)、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶制备试剂盒、4 \times 蛋白质上样缓冲液、焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水、抗荧光衰减封片剂、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (diamidine phenyl indoles, DAPI) 购于北京索莱宝科技有限公司；免疫染色封闭液购于上海碧云天生物技术有限公司；Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司；RNAiso plus 购于日本 TaKaRa 公司；Evo M-MLV 反转录试剂盒、SYBR[®] Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购于湖南艾科瑞生物工程有限公司。

1.3 大鼠颅骨成骨细胞的分离及培养

如文献[13]所述, 取出生 48 h 以内的 SPF 级 SD 大鼠乳鼠 (由中国农业科学院兰州兽医研究所提供, 符合中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院关于动物实验的伦理规定, 伦理委员会批准号为 2021KYLL185) 4 只, 处死后置于 75%酒精消毒 10–15 min; 取其颅骨, 剔除附着其上的结缔组织后用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 3 遍, 剪碎置于 25 mL 培养瓶中, 加入适量的 0.25%的

胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 水浴消化 15 min 后, 弃消化液, 此步骤重复 2 次; 然后加入适量的 0.1%的 II 型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 水浴消化 5 次, 每次 12 min, 弃第一次消化液, 收集后 4 次消化液于含有适量完全培养基 (α -MEM 培养基: 胎牛血清=9:1) 的 25 mL 培养瓶中, 200 目细胞筛过滤, 1 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 用事先配置好的完全培养基重悬细胞沉淀, 调整细胞密度至 1×10^4 个细胞/mL, 接种于 100 mm 培养皿中, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中培养; 每隔 3 d 更换一次完全培养基; 待细胞生长融合至 80%以上时, 传代用于后续实验。

1.4 碱性磷酸酶 (ALP) 的测定

将 ROB 接种于 35 mm 培养皿中, 随机分成 4 组, 分别为空白对照组、PEMFs 组、AMI 组和 AMI+PEMFs 组。待细胞生长融合至 60%–70% 时, 加入 PC2 阻断剂 AMI (AMI 用 DMSO 溶解, 终浓度为 10^{-6} mol/L^[14]), 对照组和 PEMFs 组加入等量的 DMSO, 待 12 h 后用 0.6 mT 50 Hz PEMFs 每天处理 90 min, 连续处理 3 d 和 5 d 后, 弃培养基, PBS 漂洗 3 遍, 按照试剂盒说明书使用 Epoch Biotek 全波长酶标仪测其 ALP 活性, 根据公式计算 ALP 活性值。

1.5 Western blotting 分析

将 ROB 接种于 60 mm 培养皿中, 随机分成 4 组, 分别为空白对照组、PEMFs 组、AMI 组和 AMI+PEMFs 组。PEMFs 组和 AMI+PEMFs 组置于 PEMFs 中, 90 min/d 连续处理 3 d 后即刻提取蛋白。弃培养基, PBS 漂洗 3 遍, 每皿加入含 1% PMSF (蛋白酶抑制剂) 的高效 RIPA 裂解液 200 μ L, 冰上裂解 15 min, 枪头研磨后收集细胞裂解液, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。取 20 μ L 用 BCA 法进行蛋白质浓度测定。剩余样品加入 1/3 体积的 4 \times 蛋白质上样缓冲液, 98 $^{\circ}$ C 变性 15 min, 待冷却后, 各

组取 20 μg 进行 SDS-PAGE, 然后电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日待钟摆摇床室温复温 1 h 后, TBST 清洗 5 遍, 每遍 8 min。然后二抗室温摇床孵育 2 h, TBST 清洗 5 遍, 每遍 8 min。加入 ECL 超灵敏发光液后使用 ChemiDoc-It 凝胶成像系统进行曝光。结果使用 ImageJ 软件进行量化分析。

1.6 实时荧光定量 PCR

将 P1 代 ROB 接种于 60 mm 培养皿中, 随机分成 4 组, 分别为空白对照组、PEMFs 组、AMI 组和 AMI+PEMFs 组。PEMFs 组和 AMI+PEMFs 组置于 PEMFs 中, 90 min/d, 处理 5 d 后即刻提取 RNA。提取方法如下: 弃培养基, PBS 清洗 3 遍, 吸干, 每皿加入 1 mL 的 RNAiso plus, 冰上裂解 10 min, 收集细胞裂解液于 1.5 mL 离心管中; 每管加入 400 μL 氯仿, 轻微上下颠倒混匀后静置 10–15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 此时溶液分为 3 层, 小心吸取最上层水相; 加入 200 μL 异丙醇, 轻微上下颠倒混匀后静置 20 min 沉淀 RNA, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min; 弃上清, 每管加入 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 水现配现用) 振荡, 悬浮沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 重复 2 次;

弃上清, 将离心管倒扣于滤纸上, 于超净工作台中风干; 取适量 DEPC 水溶解沉淀, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。根据 RNA 浓度使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒进行反转录反应合成 cDNA, 反应条件如下: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。反转录产物 cDNA 使用 SYBR[®] Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒在 ABI Biosystems 7300 上扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 31 s, 延伸, 40 个循环。引物序列如表 1 所示。实验结果使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.7 PC2 的 RNA 干扰

将靶向 *pkd2* 基因的 siRNA 寡核苷酸 (5'-TC AGGACCTGAGAGATGAAAT-3') 和相应的阴性对照 siRNA 克隆到 pLKO.1-Puro 表达载体中, 构建针对 *pkd2* 基因的 shRNA 质粒, shRNA 质粒委托南京晶百生物科技有限公司合成。将 ROB 接种于 60 mm 培养皿中, 随机分为空白对照组、PEMFs 组、siRNA 组、siRNA+PEMFs 组, 待 ROB 生长融合至 70% 时, 使用 Lipofectamine 2000 将重组质粒转染成骨细胞, 空白对照组和 PEMFs 转染阴性对照 siRNA, siRNA 组和 siRNA+PEMFs 组转染靶向 *pkd2* 基因的 siRNA, 转染 8 h 后更换完全培养基。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	GenBank accession No.	Primer sequences (5'→3')
gapdh	NM_017008.4	Forward: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG Reverse: ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
runx-2	NM_001278483.1	Forward: CATGGCCGGGAATGATGAG Reverse: TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
bmp-2	NM_017178.1	Forward: ACCGTGCTCAGCTTCCATCAC Reverse: TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
osx	NM_001037632.1	Forward: CATCCATGCAGGCATCTCA Reverse: CTGCCACCACTAACC
col-1	NM_053356	Forward: TTCCCGGTGAATTCGGTCTC Reverse: ACCTCGGATTCCAATAGGACCAG
pkd2	NM_001191934.1	Forward: GAGAATCCTGGGCTTAGTGCTGTC Reverse: AGCAGTTAGCTGGAGGTTTGTCTATG

1.8 免疫荧光染色

将 ROBs 接种于提前放置无菌盖玻片的 35 mm 培养皿中,待细胞生长融合至 70%–80% 后,弃培养基, PBS 清洗 3 遍;通用型组织固定液固定 10 min,弃固定液, PBS 清洗 3 遍; 0.1% Triton-100 透膜 3 min, PBS 清洗 3 遍;免疫封闭液封闭 15 min,在盖玻片上滴加 PC2 和 Acetyl- α -Tubulin 一抗 (一抗比例 1:800), 4 °C 孵育过夜。次日,弃一抗, PBS 摇床清洗一抗 3 次,每次 5 min;清洗完毕后加入荧光素标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠(二抗比例 1:1 000), 4 °C 孵育过夜。次日,弃二抗, PBS 摇床清洗二抗 3 次,每次 5 min;清洗完毕后加入 DAPI,细胞培养箱中避光孵育 15 min,弃 DAPI, PBS 摇床清洗 3 次,每次 5 min,脱水后使用中性树脂封片,封片时加入适量抗荧光衰减封片剂,晾干,荧光显微镜观察。

1.9 统计学分析

所有实验数据使用 SPSS 20.0 软件进行分析,实验结果以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间差异采用单因素方差分析法,各组间多重比较采用 LSD 法来判断是否有差异显著性,当 $P < 0.05$ 时被认为差异有统计学意义,当

$P < 0.01$ 时被认为差异有显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PC2 被定位于 ROBs 初级纤毛内

将初级纤毛与 PC2 进行共定位染色,结果发现 PC2 基本定位于整根初级纤毛上(图 1)。

2.2 PEMFs 处理不同时间后 ROBs 内 PC2 蛋白表达情况

用 0.6 mT 50 Hz PEMFs 分别处理 ROBs 0、5、15、30、60、90、120 min,连续处理 3 d,第 3 天处理完后即刻提取蛋白,Western blotting 检测 PC2 蛋白表达量。由图 2 可见,PEMFs 处理 5 min PC2 的表达即显著高于 0 min ($P < 0.01$),之后持续升高,至 30 min 达到峰值,60 min 后回落至与 0 min 相似水平,90 min 后又显著上升 ($P < 0.01$),120 min 后再次回落,但仍显著高于 0 min ($P < 0.01$)。这种经 PEMFs 处理后先升高后降低,之后再升高的波浪状变化与我们之前的报道相一致^[9,15]。

2.3 阻断 PC2 后 PEMFs 对 ALP 活性的影响

ALP 是成骨早期分化的重要指标,本课题组在先前的研究中已经发现 0.6 mT 50 Hz

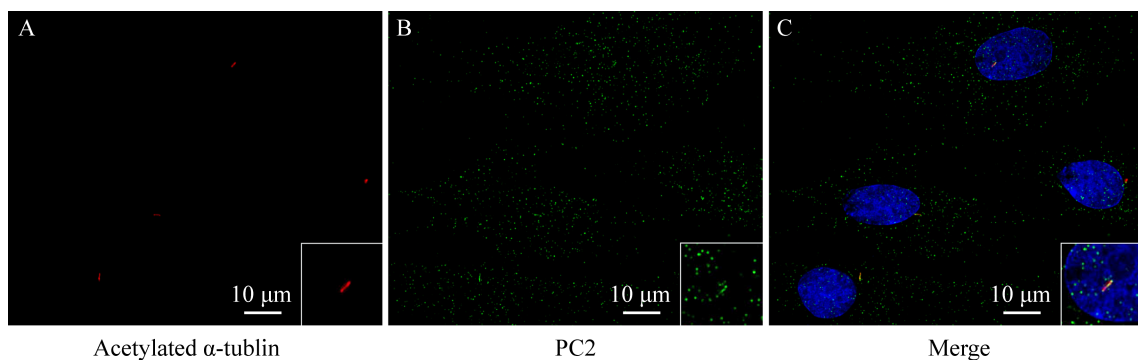


图 1 PC2 在大鼠颅骨成骨细胞初级纤毛中的免疫染色定位

Figure 1 Immunostaining localization of PC2 in primary cilia of rat calvarial osteoblasts (ROBs). PC2 (B), acetylated α -tubulin (A) and nuclei (C) are stained in green, red and blue (with DAPI), respectively.

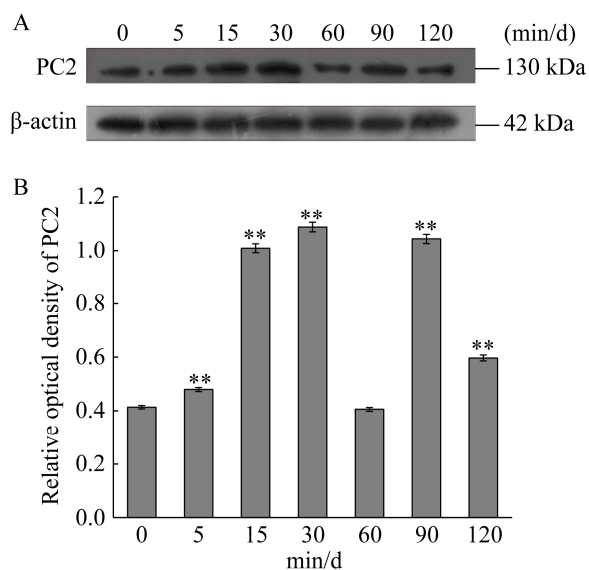


图 2 低频脉冲电磁场处理不同时间后对大鼠颅骨成骨细胞 PC2 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of PEMFs on the protein expression of PC2 in rat calvarial osteoblast cells after treatment for different time. (A) ROB cells were treated with PEMFs for 0, 5, 15, 30, 60, 90 and 120 minutes every day. After 3 days of treatment, PC2 levels were analyzed by Western blotting. (B) Band intensities were analyzed by densitometry scanning using Image J. The data represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). **: $P<0.01$ vs. the 0 minute control group.

PEMFs 能显著提高 ALP 活性及骨形成相关蛋白的表达量,且在 0.6 mT 50 Hz PEMFs 处理 90 min 后,骨形成相关因子蛋白和基因表达量升高最为显著。同时从图 2 中可以看出,0.6 mT 50 Hz PEMFs 处理 ROB 30 min 和 90 min 后,PC2 表达量均显著升高,结合本课题组前期实验结果^[16],我们选择 90 min 为后续实验 PEMFs 的处理时间。用 10^{-6} mol/mL 的 AMI (PC2 阻断剂) 预处理 ROB,12 h 后,用 0.6 mT 50 Hz PEMFs 处理 ROB,每天 90 min,连续 3 d 和 5 d 后检测 ALP 活性。如图 3 所示,PEMFs 显著提高了 ROB 的 ALP 活性,但用 AMI 预处理后,提高作用被抵消 (AMI+PEMFs)。

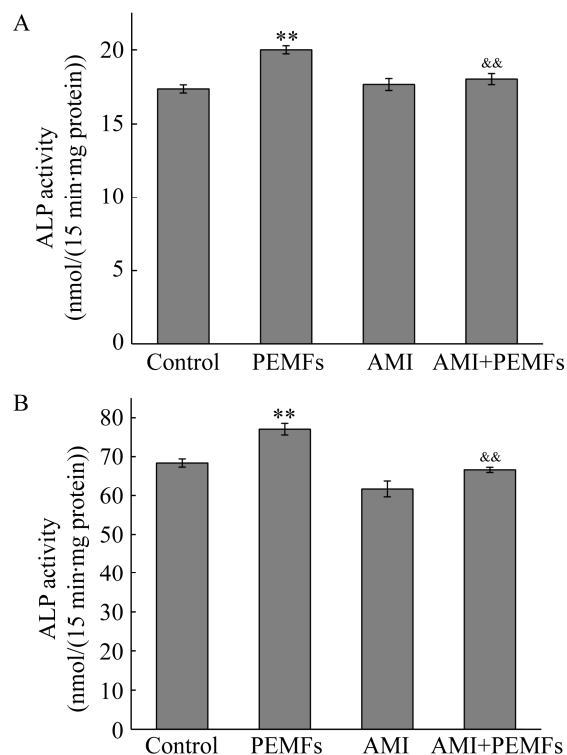


图 3 PC2 阻断剂对大鼠颅骨成骨细胞 ALP 活性的影响

Figure 3 Effect of PC2 inhibitor on ALP activity in rat calvarial osteoblast cells. The ALP activities of ROB cells in different groups were measured by an ALP assay kit after PEMFs treatment at 90 min/day after 3 days (A) and 5 days (B). They are randomly divided into four groups: control group, PEMFs group (treated with 50 Hz 0.6 mT PEMFs), AMI group (treated with AMI), and AMI+PEMFs group (treated with AMI and 50 Hz 0.6 mT PEMFs). The data represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). **: $P<0.01$ vs. the control group, &&: $P<0.01$ vs. the PEMFs group.

2.4 阻断 PC2 后 PEMFs 对 ROB 成骨相关蛋白的影响

既然 AMI 可以抵消 PEMFs 对 ALP 活性的提高作用,那么其是否也影响 PC2 及成骨性相关蛋白的表达呢?为此我们用 Western blotting 法检测了 AMI 预处理 ROB 后 PEMFs 对这些蛋白表达的影响。如图 4 所示,与 Control 组相比,PEMFs 组的 PC2、Runx-2、Bmp-2、Osx、

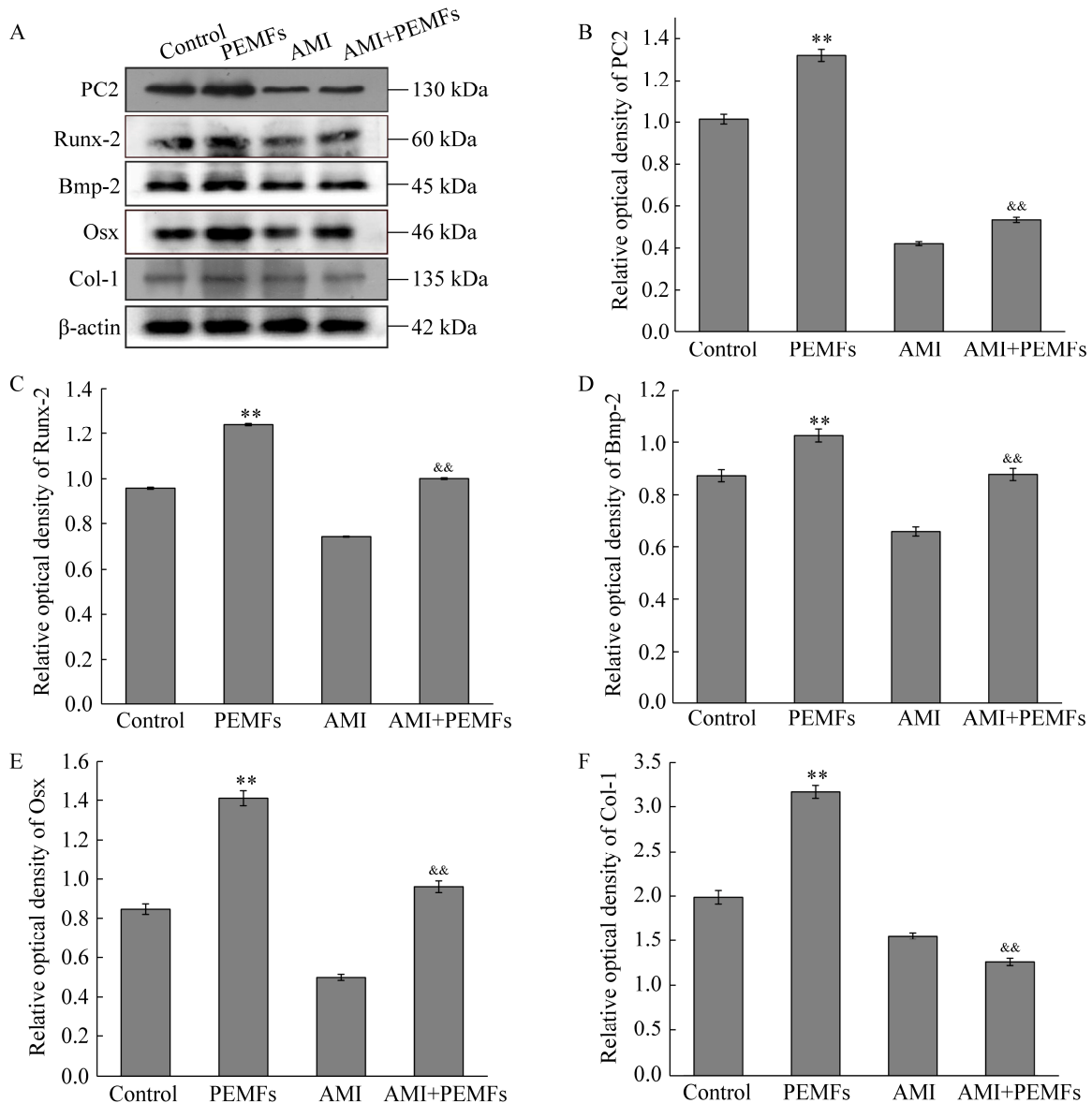


图 4 PC2 阻断剂对 PEMFs 处理后大鼠颅骨成骨细胞内 PC2 及成骨相关蛋白的影响

Figure 4 Effect of PC2 inhibitor on PC2 and osteogenic related proteins in rat calvarial osteoblast cells after PEMFs treatment. (A) Western blotting analysis of PC2, Runx-2, Bmp-2, Osx and Col-1 expression levels in four groups after PEMFs treatment 3 days (90 min/d). (B-F) Band intensities were analyzed by densitometry scanning using Image J. Data represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). **: $P<0.01$ vs. the control group, &&: $P<0.01$ vs. the PEMFs group.

Col-1 的表达量均显著升高 ($P<0.01$), 而在 AMI+PEMFs 组则都显著下降 ($P<0.01$), 表明 AMI 大大抑制了 PEMFs 所引起的 PC2 及成骨性蛋白表达的增强。

我们还用免疫荧光染色法观察了 AMI 预处

理 ROBs 后 PC2 蛋白的空间分布情况 (图 5)。可以看到, PEMFs 处理显著增加了胞浆内 PC2 的含量, 但经过 AMI 预处理后, PC2 表达量增加的现象消失, 这与 Western blotting 检测结果相一致。

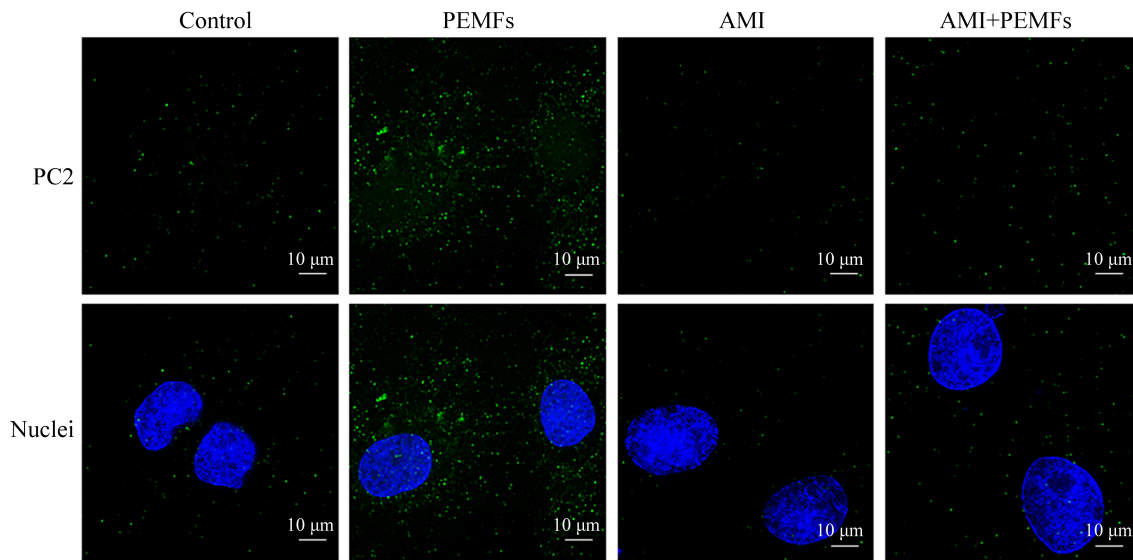


图 5 PC2 阻断剂对 PEMFs 处理后大鼠颅骨成骨细胞中 PC2 空间分布的影响

Figure 5 Effect of PC2 inhibitor on the spatial distribution of PC2 in rat calvarial osteoblast cells after PEMFs treatment PEMFs-induced increase in PC2 expression is inhibited by PC2 inhibitor after 90 min of PEMFs treatment. PC2 and nuclei are stained in green and blue (with DAPI), respectively.

2.5 阻断 PC2 后 PEMFs 对成骨性相关基因表达的影响

为检测 AMI 是否也影响了 ROBs 内成骨性相关基因的表达, 我们进而分析了 *runx-2*、*bmp-2*、*osx* 及 *col-1* mRNA 的表达情况。如图 6 所示, 与 Control 组相比, PEMFs 显著提高了成骨性基因 *runx-2*、*bmp-2*、*osx* 及 *col-1* 的表达 ($P<0.01$), 而 AMI+PEMFs 组中 *runx-2*、*bmp-2*、*osx* 及 *col-1* 的 mRNA 表达量都显著下降 ($P<0.01$), 以上结果表明 AMI 抵消了由 PEMFs 引起的成骨性基因转录增强的现象。

2.6 RNA 干扰 PC2 后 PEMFs 对成骨相关基因表达的影响

为了更进一步证实 PC2 在 PEMFs 促进成骨相关基因表达中的关键作用, 将经阴性对照 siRNA (PEMFs 组) 和靶向 *pkd2* 基因的 siRNA 转染的细胞 (siRNA+PEMFs) 用 PEMF 连续处理 5 d, 每天 90 min, 然后检测 *pkd2*、*runx-2*、*bmp-2*、*osx* 及 *col-1* 的 mRNA 表达情况。如图 7 所示,

与 Control 组相比, PEMFs 显著提高了 *pkd2* 及成骨性基因 *bmp-2*、*osx*、*col-1* ($P<0.01$)、*runx-2* ($P<0.05$) 的表达, siRNA 组中 *pkd2* 的 mRNA 表达量显著降低, 而 siRNA+PEMFs 组中 *pkd2*、*bmp-2*、*osx*、*col-1* ($P<0.01$)、*runx-2* ($P<0.05$) 的 mRNA 表达量都显著下降。以上结果表明, RNA 干扰 PC2 后, PEMFs 不再能提高骨形成相关基因的表达。

3 讨论

随着我国人口结构日趋老龄化, 骨质疏松症的发病率也日渐升高^[17]。治疗原发性骨质疏松症的根本方法在于抑制破骨细胞、激活成骨细胞和促进人体骨组织的新陈代谢。目前对于骨质疏松症最主要的治疗方法还是采用药物疗法, 如雌激素类、淫羊藿苷、仙灵骨葆胶囊等中药^[18-19]。但是临床用药仍存在价格昂贵且具有毒副作用及不良反应存在等局限。PEMFs 在临床上用于骨质疏松症已有近半个世纪的历史^[20],

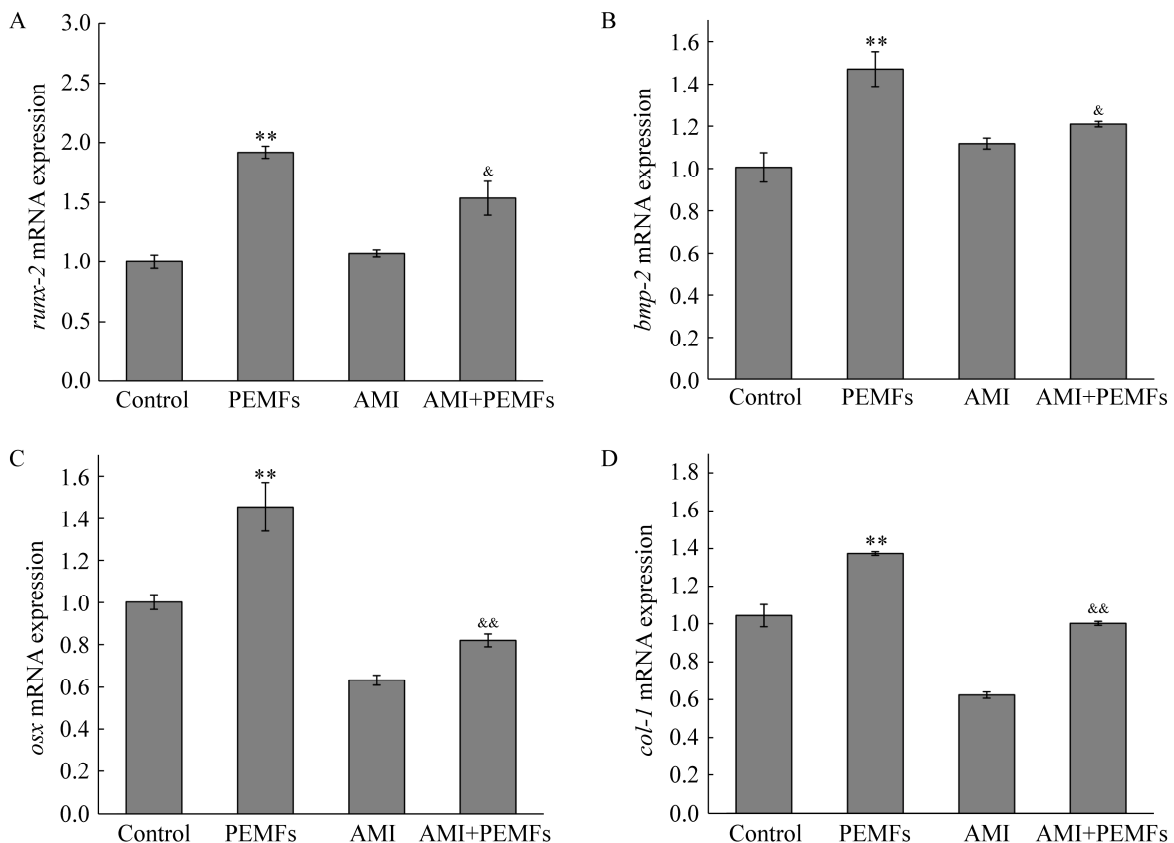


图6 PC2 阻断剂对 PEMFs 处理后大鼠颅骨成骨细胞内成骨相关基因的影响

Figure 6 Effect of PC2 inhibitor on osteogenic gene transcription in rat calvarial osteoblast cells after PEMFs treatment. (A–D) Real-time RT-PCR analysis of *runx-2*, *bmp-2*, *osx* and *col-1* mRNA expression levels in four groups after PEMFs treatment 5 days (90 min/d). The GAPDH was used as an internal control. Data were analyzed by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The data points represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). **: $P<0.01$ vs. the control group, &: $P<0.05$ or &&: $P<0.01$ vs. the PEMFs group.

具有价格低廉、使用方便、不良反应少等优势。同时本课题组通过体内外实验也都证明电磁场能够促进成骨细胞的分化及成熟^[21-22]。

然而，截至目前，PEMFs 促进成骨细胞的分化及成熟的具体机制尚未彻底阐明。本实验室通过基础研究已经证明，PEMFs 可通过 sAC/cAMP/PKA/CREB 信号途径促进成骨细胞的矿化及成熟^[23]，sAC 即溶性腺苷酸环化酶 (soluble adenylyl cyclase, sAC)，那么，又是什么激活 sAC 呢？于是我们提出猜想：最有可能激活 sAC 的毫无疑问就是 Ca^{2+} 。原因如下：第

一， Ca^{2+} 是 sAC 的激活剂之一^[24]；第二，已经有相关研究表明，电磁场处理可以引起包括成骨细胞在内的多种细胞的胞内 Ca^{2+} 浓度的显著升高^[25-26]；第三， Ca^{2+} 是一种普遍存在的第二信使，在多种细胞的生理生化过程中起着至关重要的作用^[27-28]。在肾上皮细胞中，PC1 通过其胞外域感知外界信息，例如液体流动导致纤毛弯曲，PC1 感知后发生构象改变，从而激活 PC2 通道， Ca^{2+} 得以进入胞内。因此，无论 PC1 或 PC2 发生突变，都会引起多囊肾病^[29-30]。PC2 作为瞬时受体电位之一的 Ca^{2+} 通道，与 PC1

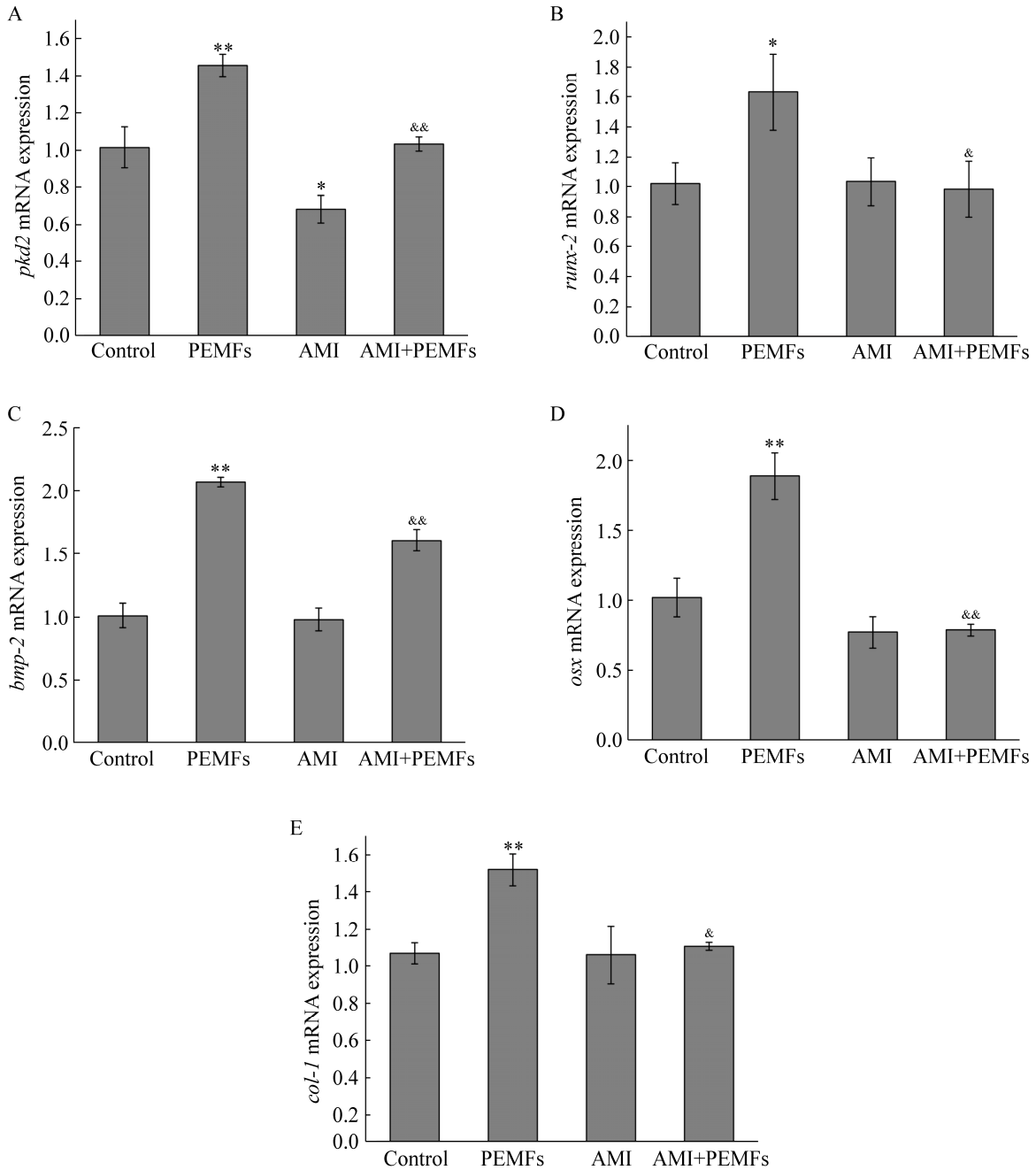


图 7 RNA 干扰 PC2 对 PEMFs 处理后大鼠颅骨成骨细胞内成骨相关基因的影响

Figure 7 Effect of RNA interference with PC2 on osteogenic gene in rat calvarial osteoblast after PEMFs treatment. The *pkd2* expression was inhibited by transfection of *pkd2* siRNA (siRNA), and scrambled control siRNA was used as the negative control (control). (A–E) Real-time RT-PCR analysis of *pkd2*, *runx-2*, *bmp-2*, *osx* and *col-1* mRNA expression levels in four groups after PEMFs treatment 5 days (90 min/d). The GAPDH was used as an internal control. Data were analyzed by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Data represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$ or **: $P<0.01$ vs. the control group, &: $P<0.05$ or &&: $P<0.01$ vs. the PEMFs group.

形成复合体存在于成骨细胞初级纤毛内。已有大量研究表明, PC1 与 PC2 在促进成骨细胞骨形成中起着至关重要的作用。Xiao 等证明 PC1 通过刺激成骨细胞特异性转录因子 RUNX-2 调节骨骼生成, Pkd1 的缺失会降低 RUNX-2 的表达; 除此之外, PC1 通过与转录共激活因子 TAZ 相互作用来调节成骨发生^[31-32]; Xiao 等还发现特异性敲除 *pkd2* 基因的小鼠表现出骨密度、骨小梁体积、皮质厚度、矿物附着率的降低, 成骨细胞特异性的 Pkd2 缺失会导致骨质减少^[33]; Mesner 等发现成骨细胞中 Pkd2 的敲低导致体外成骨细胞分化受损^[34]。由此可见, 多囊蛋白在成骨细胞的骨形成中起着至关重要的作用。

本研究发现, PEMFs 处理能显著提高成骨细胞内 PC2 蛋白的表达量。但使用 AMI 阻断 PC2 后, ROBs 内 PC2 蛋白的表达量显著降低; PEMFs 促进的 ALP 活性的增强被抵消; 由 PEMFs 所引起的成骨性相关蛋白表达量增强的现象消失, AMI 还抵消了由 PEMFs 引起的成骨性基因转录增强的现象。与此同时, 通过 RNA 干扰法特异性敲低 *pkd2* 基因的表达后, 由 PEMFs 引起的成骨性基因转录增强的现象也被抵消。由此可见, PEMFs 促进成骨细胞的分化成熟需要 PC2 的存在。

前期研究已证明 PC2 主要存在于 ROBs 初级纤毛中, 本研究发现经电磁场处理后其表达量显著升高, 同时一部分穿梭进入胞浆, 我们猜测 PC2 穿梭进入胞浆是为了执行某种生理功能, 这种穿梭活动很可能是 PC2 发挥其促进骨形成的一种机制。本课题组正在研究 RNA 干扰法敲低 PC2 的表达后对成骨细胞成熟及矿化的影响, 同时也在寻找 PC2 的特异性激动剂, 以检测在激活 PC2 前后 ROBs 内 Ca^{2+} 的变化情况, 从而进一步阐明 PC2 影响 PEMFs 促进

成骨细胞成骨性分化成熟的具体机制。我们也正在研究同样定位于初级纤毛上并被认为是潜在骨力学传感器的 PC1 与 PC2 的潜在关系, PC1 是否也在 PEMFs 促进 ROBs 的成熟及成骨性分化中起着关键的作用? 这些研究将为进一步阐明 PEMFs 预防和治疗骨质疏松的具体机制提供帮助, 从而为将来临床治疗骨质疏松症提供新思路。

REFERENCES

- [1] Melton LJ, Thamer M, Ray NF, et al. Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(1): 16-23.
- [2] Zhou J, Ming LG, Ge BF, et al. Effects of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts. *Bone*, 2011, 49(4): 753-761.
- [3] Jing D, Shen G, Huang J, et al. Circadian rhythm affects the preventive role of pulsed electromagnetic fields on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Bone*, 2010, 46(2): 487-495.
- [4] Nickel C, Benzing T, Sellin L, et al. The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J Clin Invest*, 2002, 109(4): 481-489.
- [5] Wilson PD. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med*, 2004, 350(2): 151-164.
- [6] Brill AL, Ehrlich BE. Polycystin 2: a calcium channel, channel partner, and regulator of calcium homeostasis in ADPKD. *Cell Signal*, 2020, 66: 109490.
- [7] Xiao ZS, Quarles LD. Role of the polycystin-primary cilia complex in bone development and mechanosensing. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192: 410-421.
- [8] Xiao Z, Dallas M, Qiu N, et al. Conditional deletion of *Pkd1* in osteocytes disrupts skeletal mechanosensing in mice. *Faseb J*, 2011, 25(7): 2418-2432.
- [9] Xie YF, Shi WG, Zhou J, et al. Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation and maturation of osteoblasts by upregulating the expression of BMPRII localized at the base of primary

- cilium. *Bone*, 2016, 93: 22-32.
- [10] 何文芳, 李雪雁, 任莉, 等. 低频脉冲电磁场通过 PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin 信号途径促进成骨细胞矿化成熟. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(12): 1464-1472.
- He WF, Li XY, Ren L, et al. Effect of low-frequency pulsed electromagnetic fields on osteoblastic differentiation through PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2020, 36(12): 1464-1472 (in Chinese).
- [11] 邵佳乐, 李志忠, 周建, 等. 低频脉冲电磁场通过 IGF-1R/NO 信号通路促进大鼠颅骨成骨细胞成熟及矿化. *浙江大学学报(医学版)*, 2019, 48(2): 158-164.
- Shao JL, Li ZZ, Zhou J, et al. Effect of low-frequency pulsed electromagnetic fields on activity of rat calvarial osteoblasts through IGF-1R/NO signaling pathway. *J Zhejiang Univ (Med Sci Ed)*, 2019, 48(2): 158-164 (in Chinese).
- [12] Yan JL, Zhou J, Ma HP, et al. Pulsed electromagnetic fields promote osteoblast mineralization and maturation needing the existence of primary cilia. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 404: 132-140.
- [13] 王媛媛, 蒗慧荣, 石文贵, 等. 低频脉冲电磁场对大鼠成骨细胞骨形成的影响及作用机制. *中国医学科学院学报*, 2019, 41(1): 21-27.
- Wang YY, Xi HR, Shi WG, et al. Effect of low-frequency pulsed electromagnetic fields on bone formation in rat osteoblasts and its mechanism. *Acta Acad Med Sin*, 2019, 41(1): 21-27 (in Chinese).
- [14] 王天宝. 盐酸阿米洛利对大鼠膀胱 ICCs 细胞内 Ca²⁺ 振荡的影响研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2014.
- Wang TB. Effects of amiloride hydrochloride on ICC cells of bladder Ca²⁺ fluctuations in research[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2014 (in Chinese).
- [15] Zhou J, Gao YH, Zhu BY, et al. Sinusoidal electromagnetic fields increase peak bone mass in rats by activating Wnt10b/ β -catenin in primary cilia of osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(7): 1336-1351.
- [16] Zhu BY, Yang ZD, Chen XR, et al. Exposure duration is a determinant of the effect of sinusoidal electromagnetic fields on peak bone mass of young rats. *Calcif Tissue Int*, 2018, 103(1): 95-106.
- [17] Chao EY, Inoue N, Koo TK, et al. Biomechanical considerations of fracture treatment and bone quality maintenance in elderly patients and patients with osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(425): 12-25.
- [18] Levin VA, Jiang X, Kagan R. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. *Osteoporos Int*, 2018, 29(5): 1049-1055.
- [19] 李建国, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 淫羊藿提取物淫羊藿苷在细胞水平防治骨质疏松症的研究概况. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(1): 132-135.
- Li JG, Xie XW, Li DP, et al. *Epimedium* extract *icariin* for the prevention and treatment of osteoporosis at the cellular level. *Chin J Osteoporos*, 2019, 25(1): 132-135 (in Chinese).
- [20] Heckman JD, Ingram AJ, Loyd RD, et al. Nonunion treatment with pulsed electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res*, 1981(161): 58-66.
- [21] 闫娟丽, 周建, 葛宝丰, 等. 脉冲电磁场对 MC3T3-E1 细胞增殖与分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(1): 39-43.
- Yan JL, Zhou J, Ge BF, et al. Effect of pulsed electromagnetic fields on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21(1): 39-43 (in Chinese).
- [22] Cheng G, Zhai Y, Chen K, et al. Sinusoidal electromagnetic field stimulates rat osteoblast differentiation and maturation via activation of NO-cGMP-PKG pathway. *Nitric Oxide*, 2011, 25(3): 316-325.
- [23] Wang YY, Pu XY, Shi WG, et al. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation by activating the sAC-cAMP-PKA-CREB signaling pathway. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2807-2821.
- [24] Willoughby D, Wachten S, Masada N, et al. Direct demonstration of discrete Ca²⁺ microdomains associated with different isoforms of adenylyl cyclase. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 1): 107-117.
- [25] 黄小军, 曲萍, 张勇, 等. 135Hz 极低频电磁场对 HepG-2 细胞内 Ca²⁺浓度的影响. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(4): 369-370, 373.
- Huang XJ, Qu P, Zhang Y, et al. Effect of 135 Hz extremely low frequency electromagnetic field on the intracellular Ca²⁺ concentration of HepG-2 cells. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2009, 25(4): 369-370, 373 (in Chinese).
- [26] 杨国华, 吴华, 赵东明, 等. Ca²⁺在电磁场刺激骨髓间充质干细胞增殖与分化过程中的内流变化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(51): 10109-10112.
- Yang GH, Wu H, Zhao DM, et al. Influx changes of

- calcium ion during the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by electromagnetic fields. *J Clin Rehabilitative Tissue Eng Res*, 2008, 12(51):10109-10112 (in Chinese).
- [27] Thurley K, Skupin A, Thul R, et al. Fundamental properties of Ca^{2+} signals. *Biochim et Biophys Acta BBA-Gen Subj*, 2012, 1820(8): 1185-1194.
- [28] Dalal PJ, Muller WA, Sullivan DP. Endothelial cell calcium signaling during barrier function and inflammation. *Am J Pathol*, 2020, 190(3): 535-542.
- [29] Douguet D, Patel A, Honoré E. Structure and function of polycystins: insights into polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(7): 412-422.
- [30] Singla V, Reiter JF. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science*, 2006, 313(5787): 629-633.
- [31] Xiao Z, Zhang S, Magenheimer BS, et al. Polycystin-1 regulates skeletogenesis through stimulation of the osteoblast-specific transcription factor RUNX2-II. *J Biol Chem*, 2008, 283(18): 12624-12634.
- [32] Xiao Z, Baudry J, Cao L, et al. Polycystin-1 interacts with TAZ to stimulate osteoblastogenesis and inhibit adipogenesis. *J Clin Invest*, 2018, 128(1): 157-174.
- [33] Xiao Z, Cao L, Liang Y, et al. Osteoblast-specific deletion of Pkd2 leads to low-turnover osteopenia and reduced bone marrow adiposity. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114198.
- [34] Mesner LD, Ray B, Hsu YH, et al. *Bicc1* is a genetic determinant of osteoblastogenesis and bone mineral density. *J Clin Invest*, 2014, 124(6): 2736-2749.

(本文责编 郝丽芳)