

EphB4/ephrinB2 逆向信号对 RAW264.7 破骨细胞分化中 PDZ 结构域蛋白表达变化的研究*

毛英杰¹⁾ 黄旭²⁾ 赵鹄¹⁾ 史月华³⁾ 谷志远^{1, 3)**}

(¹⁾ 浙江大学医学院附属口腔医院, 杭州 310006; (²⁾ 浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310000; (³⁾ 浙江中医药大学, 杭州 310006)

摘要 Eph 受体是酪氨酸蛋白激酶受体家族中最大的亚家族, ephrin(Eph 受体相互作用蛋白)是其配体, 它们是膜结合蛋白, 相互依赖进行信号转导. 内居蛋白(syntenin)与 Pick1 属于 PDZ 结构域(PSD-95/Dlg-/Zoo-1 domain)蛋白, 报道称能与 ephrinB 配体结合, 但是否受 Eph 受体调控尚未见报道. 以 RAW264.7 细胞株为研究对象, 通过蛋白质印迹及 / 或免疫荧光分析显示 RAW264.7 细胞经 RANKL 诱导的破骨细胞表达 ephrinB2、内居蛋白(syntenin)和 Pick1 三个蛋白质. 将提前成簇的可溶性 EphB4 蛋白加入培养液, 与 ephrinB2 配体结合, 用来研究 EphB4/ephrinB2 逆向信号对 syntenin 和 Pick1 表达水平变化的影响. 免疫印迹及 Real-time RT-PCR 分析结果显示, 在 EphB4-Fc 实验组中 Pick1 的蛋白质及 mRNA 水平都有明显增加, 然而在 EphB4-Fc 实验组与 Fc 对照组间 syntenin 的蛋白质及 mRNA 水平未见明显变化. 免疫共沉淀结果显示, syntenin 和 Pick1 不能与 ephrinB2 共沉淀. 以上结果初步探索了体外破骨细胞分化过程中, EphB4/ephrinB2 逆向信号对 PDZ 结构域蛋白(ephrinB2 配体潜在的下游信号分子)表达变化的调控.

关键词 EphB4, ephrinB2, 内居蛋白(syntenin), Pick1, RAW264.7 细胞株

学科分类号 R68, R780.2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00672

近十几年, 随着 Eph 受体基因的克隆成功^[1]及其 Ligands 配体的识别^[2-3], 有关这些分子在有机体生长发育及疾病变化中的重要作用得到了广泛的研究. Eph(erythropoietin-producing hepatocyte kinases)受体是酪氨酸蛋白激酶受体家族中最大的亚家族, ephrin(Eph 受体相互作用蛋白, Eph receptor interacting proteins)是其配体. 在人类基因组中, Eph 受体共有 14 个成员, 分为 2 个亚类 EphA (EphA1~EphA8)和 EphB(EphB1~EphB6). Ephrin 配体有 8 个成员, 也被分成 2 个亚类 ephrinA (ephrinA1~ephrinA5)和 ephrinB (ephrinB1~ephrinB3)^[4]. Eph 受体与 Ligands(配体)相互作用的一个重要特征是能进行双向信号转导^[5], ephrin 不仅作为 Eph 的配体, 它还具有受体样的功能, 即以 ephrin 为配体向 Eph 表达细胞胞内转导信号(正向信号)的同时, ephrin 亦反向在自身细胞胞内转导信号(逆向信号)^[6]. EphrinB 均有一个跨膜结构域和很短的胞内区, 胞内区域是高度保守的, 含有多

重酪氨酸, 特别是 33 C 端氨基酸, 而 C 端 YKV 基序含 PDZ(PSD-95/Dlg-/Zoo-1 domain, postsynaptic density protein, disks large, zona occludens)结构域蛋白的结合位点^[7].

Eph/ephrin 双向信号转导已被证实参与诸多生物学领域, 包括血管发生、骨骼发育、组织发育及轴突导向等^[8]. 然而, 直到 Zhao 等^[9]的研究对 Eph/ephrin 双向信号转导在骨重建中的作用进行详细报道. 骨重建过程是受破骨细胞的骨吸收活动与成骨细胞的骨形成活动相互作用的调节^[9]. 该相互作用调节机制发生异常, 会破坏骨重建和骨稳态, 引发骨硬化症、骨质疏松等骨量平衡失调所致的疾

* 国家自然科学基金(30700958)和浙江省自然科学基金(Y2100333)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 013588193844, E-mail: gzy@zju.edu.cn

收稿日期: 2011-02-10, 接受日期: 2011-03-09

病以及肿瘤、炎症等所致的骨质异常表现^[10-12]。Zhao 等^[7]的研究结果揭示 Eph/ephrin 双向信号转导对破骨细胞分化的反向抑制作用依赖于 ephrinB2 配体胞内区的 C 端 YKV 基序, 提示 PDZ 结构域蛋白参与到逆向信号下游转导。根据与该基序相互作用关系的不同, PDZ 结构域蛋白可划分为两类: 仅含有 PDZ 结构域的衔接蛋白, 比如 GRIP2 和内居蛋白(syntenin); 除了 PDZ 结构域, 同时含有其他功能结构域的衔接蛋白, 比如 Pick1(the protein kinase C-interacting protein)和 PTP-BL^[4]。其中 syntenin^[13]和 Pick1^[14]被报道能与 ephrinB 配体相互结合。然而, 当破骨细胞膜蛋白 ephrinB 配体被 EphB 受体激活后, syntenin 和 Pick1 等 PDZ 结构域蛋白是否受 Eph/ephrin 逆向信号转导调控尚未见相关报道。

本实验研究以 RAW264.7 细胞株为研究对象, 通过蛋白质印迹及 / 或免疫荧光染色分析证实 RAW264.7 细胞经 RANKL 诱导的破骨细胞表达 ephrinB2, syntenin 和 Pick1 三个蛋白质。提前成簇的可溶性 EphB4 蛋白加入培养液, 与 ephrinB2 配体结合, 用来研究 EphB4/ephrinB2 逆向信号对 syntenin 和 Pick1 表达水平变化的影响。初步探索了体外破骨细胞分化过程中, EphB4/ephrinB2 逆向信号对 PDZ 结构域蛋白(ephrinB2 配体潜在的下游信号分子)表达变化的调控。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用培养基均购自美国 GIBCO 公司; RNA 提取液 TRIZOL 购自美国 Invitrogen 生命技术公司; TRAP 染色试剂盒购自美国 Sigma 公司; 羊抗人 IgG-Fc γ 抗体与人 IgG-Fc 片段购自美国 Jackson 公司; 重组小鼠可溶性 RANKL 蛋白与重组小鼠

EphB4-Fc 蛋白购自美国 R&D 公司; 羊抗小鼠 ephrinB2(H-83)多克隆抗体与兔抗小鼠 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗小鼠 PICK1(ab3 420)多克隆抗体与兔抗小鼠 Syntenin (ab19 903)多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 罗丹明 TRITC 标记兔抗羊与羊抗兔二抗 IgG 购自英国 PeproTech 公司; Real-time RT-PCR 试剂盒购自中国 TaKaRa 生物公司; Protein A+G 琼脂糖购自中国碧云天生物公司。

1.2 细胞培养

小鼠的单核 / 巨噬细胞系 RAW264.7(ATCC 号: TIB-71)用含 10%FBS 的 DMEM 培养液于 37℃, 5%CO₂ 环境条件下培养, 其中含 2 mmol/L 的谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素。

1.3 TRAP 染色

RAW264.7 细胞分别以 0.5×10^4 、 1.0×10^4 、 1.5×10^4 及 2.0×10^4 孔接种到已提前放置无菌盖玻片的 24 孔板。用含 10% FBS 及 25 μ g/L RANKL 的无酚红 α -MEM 培养基培养, 隔天换液。培养 4 天后, TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)试剂盒对培养细胞染色, Olympus IX71 倒置显微镜 40 倍镜下观察计数。

1.4 Real-time RT-PCR 分析

RAW264.7 细胞以合适浓度接种到 6 孔板, 用含 2 mg/L EphB4-Fc(或 Fc)、10% FBS 及 25 μ g/L RANKL 的无酚红 α -MEM 培养基培养。加入培养基前, EphB4-Fc 或 Fc 片段用抗人 Fc 抗体以 1:10 摩尔比 4℃ 下成簇反应 1 h。隔天换液, 培养 4 天后用 TRIZOL 提取总 RNA, 溶于去 RNase 水, -80℃ 下保存备用。Real-time RT-PCR 试剂盒合成 cDNA 及定量 real-time RT-PCR 反应。Real-time RT-PCR 所用引物见表 1。

Table 1 Primer for real-time RT-PCR

Name	Sequence(5'~3')	Length of PCR products/bp
EphrinB2	Sense: 5' TCTGTGTGGAAGTACTGTTGGGGACTTT 3'	548
	Antisense: 5' TGTACCAGCTTCTAGCTCTGGACGTCCTT 3'	
Syntenin	Sense: 5' GTCTGTGCCTGCATCAGTCCTTAC 3'	119
	Antisense: 5' AACACAGGCTGGCCAAGAG 3'	
Pick1	Sense: 5' GCACACCGCAGCATTGAGA 3'	117
	Antisense: 5' AGGTACGTGTTTCAGGTCGTCAG 3'	
β -Actin	Sense: 5' AGGAGCAATGATCTTGATCTT 3'	115
	Antisense: 5' TGCCAACACAGTGCTGTCT 3'	

反应条件: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s 及 72℃ 延伸 1 min, 进行 40 个循环. Real-time RT-PCR 反应在 Bio-Rad CFX96 系统上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对数据进行统计学分析.

1.5 免疫荧光染色

RAW264.7 细胞培养条件同方法 1.3, 4 天后, 盖玻片上细胞用甲醇固定 30 min, PBS 清洗, 含 0.2% Triton X-100 的 PBS 液透化 5 min, PBS 清洗, 用含 5% BSA 的 PBS 液室温封闭 1~2 h, 一抗 1:50 浓度稀释, 4℃ 孵育过夜, PBS 清洗, 二抗 1:200 浓度稀释, 孵育 30 min, PBS 清洗, 封片, Nikon Eclipse 80i 荧光显微镜下观察.

1.6 Western blot 检测

细胞用冰预冷的裂解液(50 mmol/L Tris pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 1 mmol/L EDTA, 1% Na_3VO_4 , 0.5 mg/L 亮抑蛋白酶肽(leupeptin), 氟化钠, 1 mmol/L PMSF)裂解后, 4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min, 小心吸取上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量. 计算含 30 μg 蛋白质的溶液体积即为上样量, 8%~12% SDS-PAGE, 转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5~10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 4℃ 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次

5~10 min, 进行化学发光反应, 显影、定影后用图像分析软件 Bandscan software 分析.

1.7 免疫共沉淀

细胞收集裂解同 1.6, 离心后吸取的上清液用羊抗小鼠 ephrinB2 多克隆抗体 4℃ 孵育过夜, protein A+G 琼脂糖加入, 4℃ 旋转混匀 3 h, 4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min 沉淀, 去上清, 用裂解液清洗 5 次, 加电泳缓冲液重悬, Western blot 检测分析.

1.8 统计分析

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用方差分析法及 t 检验, $P < 0.05$ 认为有差异统计学意义.

2 结 果

2.1 接种密度对 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化的影响

为了能得到合适的接种细胞密度, RAW264.7 细胞以 0.5×10^4 、 1.0×10^4 、 1.5×10^4 及 2.0×10^4 孔接种到 24 孔板. 培养 4 周后, 用 TRAP 染色(图 1a). 含有 3 个或 3 个以上细胞核、染色呈深红色的细胞定义为 TRAP 阳性细胞, 即为分化的破骨细胞, 计数. 图 1b 显示 1.0×10^4 孔组 TRAP 阳性细胞数目明显多于其他各组.

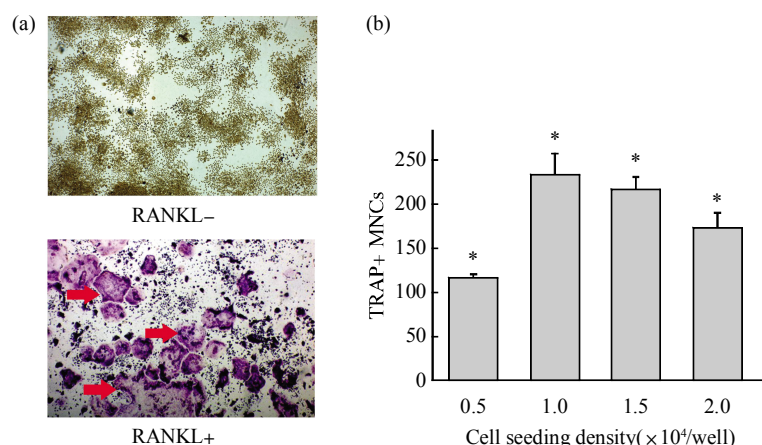


Fig. 1 The effect of the seeding cell density on the RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells

(a) TRAP staining of undifferentiated and differentiated osteoclasts derived from RANKL-stimulated RAW264.7 cells, magnified by $100\times$. (b) RAW264.7 cells were seeded at a concentration of 0.5×10^4 , 1.0×10^4 , 1.5×10^4 and 2.0×10^4 cells/well into 24-well culture plates. After four days of conditional culture, the number of TRAP-positive MNCs was significantly higher in the group of 1.0×10^4 cells/well than the other groups. Bars represent $\bar{x} \pm s$, $*P < 0.01$. All data are representative of three independent experiments.

2.2 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后 syntenin 的表达

用 Western blot 及免疫荧光染色检测 RANKL 诱

导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后 syntenin 是否有表达, 其中把含有或不含有 RANKL 诱导的细胞组分别定义为 RANKL+组或 RANKL-组. Western blot

检测及免疫荧光染色结果显示, 在 RANKL+组与 RANKL-组 syntenin 都有表达, 而组间无明显差异

(图 2a, b), 表明 syntenin 表达可能与 RANKL 诱导关系不大。

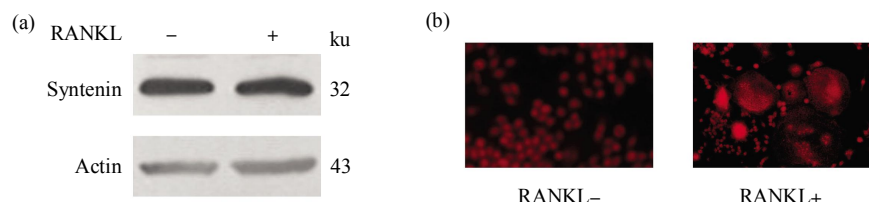


Fig. 2 The expression of syntenin during RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells

(a) Immunoblot analysis of syntenin protein after osteoclast differentiation of RAW264.7 cells in the presence or absence of RANKL for 4 days. Actin served as a loading control. (b) Immunofluorescence of syntenin in RAW264.7 cells in the presence or absence of RANKL for 4 days. 100 $\times$.

2.3 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后 Pick1 的表达

用 Western blot 及免疫荧光染色检测 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后 Pick1 是否有

表达, Western blot 检测结果显示, Pick1 蛋白表达在 RANKL+组中显影条带明显强于 RANKL-组 (图 3a), 跟免疫荧光染色结果一致 (图 3b), 表明在 RANKL 诱导后 Pick1 表达成上升趋势。

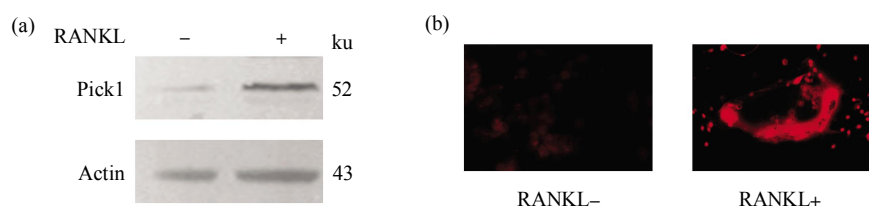


Fig. 3 The expression of Pick1 during RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells

(a) Analysis of Pick1 protein after osteoclast differentiation of RAW264.7 cells in the presence or absence of RANKL for 4 days. Actin served as a loading control. (b) Immunofluorescence of Pick1 in RAW264.7 cells in the presence or absence of RANKL for 4 days. 100 $\times$.

2.4 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后 ephrinB2 的表达

用 Western blot 及 real-time RT-PCR 检测 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后 ephrinB2 蛋白及基因是否有表达。Western blot 检测结果显示,

在 RANKL+组 ephrinB2 蛋白有明显表达, 而在 RANKL-组未见黑色条带 (图 4a)。Real-time RT-PCR 检测结果显示, 在 RANKL+组中 ephrinB2 mRNA 表达量明显高于 RANKL-组 (图 4b)。

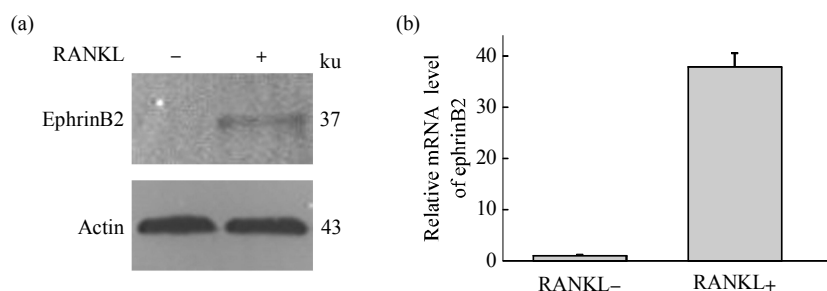


Fig. 4 The expression of ephrinB2 was prominently elevated after osteoclast differentiation of RAW264.7 cells

in the presence of RANKL for 4 days, compared with undifferentiated RAW264.7 cells cultured in the absence of RANKL

(a) Analysis of ephrinB2 protein. Actin served as a loading control. (b) Real-time RT-PCR analysis of ephrinB2 gene expression. β -Actin was used as an internal control to normalize the expression of the target genes. All data are representative of three different experiments ($\bar{x} \pm s$). RANKL+ group *vs* RANKL- group ($P < 0.01$).

2.5 EphB4/ephrinB2 逆向信号对 RAW264.7 破骨细胞分化后 Pick1 表达变化的影响

用 Western blot 及 real-time RT-PCR 检测分析 EphB4/ephrinB2 逆向信号对 RAW264.7 破骨细胞分化后 Pick1 表达变化的影响。有条件地培养 4 天

后, Western blot 检测结果显示在 EphB4-Fc 实验组中蛋白质条带明显强于 Fc 对照组, 与图像分析软件 Bandscan software 分析结果一致。Real-time RT-PCR 检测结果显示在 EphB4-Fc 实验组中 Pick1 mRNA 表达量明显高于 Fc 对照组(图 5a, b)。

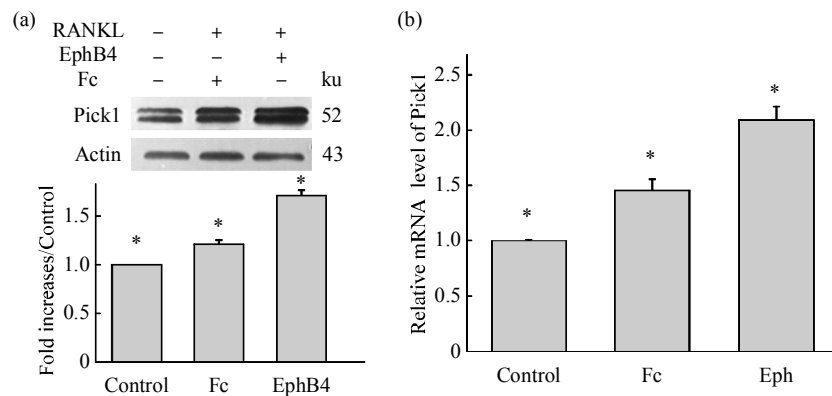


Fig. 5 The effect of EphB4/ephrinB2 reverse signaling on the expressions of Pick1 in RANKL-stimulated RAW264.7 cells

(a) Immunoblot analysis of Pick1 proteins in the EphB4-Fc treated group compared with the Fc treated group. Actin protein expression served as an internal control and was used to normalize the protein band intensity. The bar represents the relative Pick1 protein levels (percent of control group). EphB4 group *vs* Fc group or control group (* $P < 0.01$). (b) Real-time RT-PCR analysis of Pick1 mRNA expression (the EphB4-Fc treatment compared with the Fc treated group). β -Actin was used as an internal control to normalize the expression of target genes. All data are representative of three independent experiments ($\bar{x} \pm s$). EphB4 group *vs* Fc group or control group (* $P < 0.01$).

2.6 EphB4/ephrinB2 逆向信号对 RAW264.7 破骨细胞分化后 syntenin 表达变化的影响

用 Western blot 及 real-time RT-PCR 检测分析 EphB4/ephrinB2 逆向信号对 RAW264.7 破骨细胞分化后 syntenin 表达变化的影响。有条件地培养 4 天

后, Western blot 检测结果显示在 EphB4-Fc 实验组及 Fc 对照组间蛋白质条带无明显差异, 与图像分析软件 Bandscan software 分析结果一致。Real-time RT-PCR 检测结果显示在 EphB4-Fc 实验组及 Fc 对照组间 syntenin mRNA 表达量无明显差异(图 6a, b)。

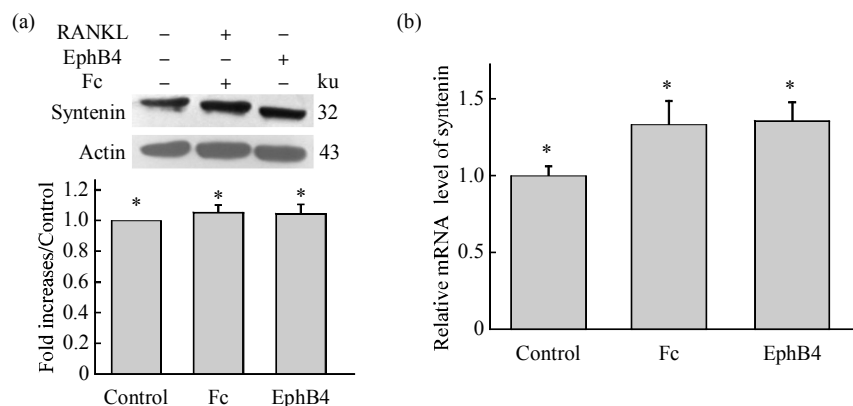


Fig. 6 The effect of EphB4/ephrinB2 reverse signaling on the expressions of syntenin in RANKL-stimulated RAW264.7 cells

(a) Immunoblot analysis of syntenin proteins in the EphB4-Fc treated group compared with the Fc treated group. Actin protein expression served as an internal control and was used to normalize the protein band intensity. The bar represents the relative syntenin protein levels (percent of control group). EphB4 group *vs* Fc group or control group (* $P > 0.05$). (b) Real-time RT-PCR analysis of syntenin mRNA expression (the EphB4-Fc treatment compared with the Fc treated group). β -Actin was used as an internal control to normalize the expression of target genes. All data are representative of three independent experiments ($\bar{x} \pm s$). EphB4 group *vs* Fc group (* $P > 0.05$).

2.7 Syntenin 与 Pick1 是否能与 ephrinB2 共沉淀

用免疫共沉淀检测 syntenin 与 Pick1 是否能与 ephrinB2 共沉淀, 初步探索其与 ephrinB2 PDZ 结合位点的相互作用关系. 显影结果显示, 尽管

37 ku 位置处可见蛋白质条带, 说明 ephrinB2 已沉淀, 而 Pick1(52 ku)与 syntenin(32 ku)对应处却未见明显条带, 说明 Pick1 与 syntenin 并未与 ephrinB2 发生共沉淀.

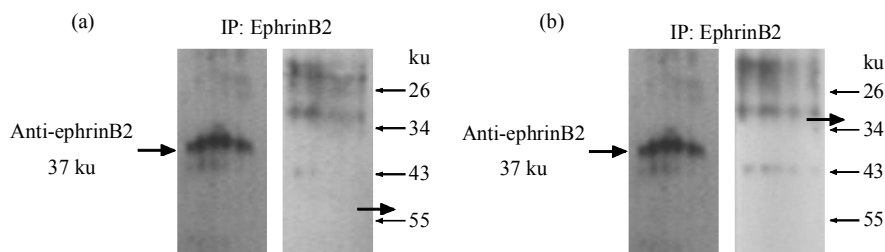


Fig. 7 Identification of potential PDZ-domain proteins as binding partners for the PDZ binding site of ephrinB2

We immunoprecipitated ephrinB2 protein from the cell lysis buffer with a goat polyclonal antibody against ephrinB2 (1 : 50) and assayed for coimmunoprecipitated PDZ-domain proteins by immunoblotting. (a) Pick1 (52 ku) did not show the expected size coprecipitated with ephrinB2. (b) Syntenin (32 ku) did not show the expected size coprecipitated with ephrinB2.

3 讨 论

EphB4/ephrinB2 双向信号转导能调节成骨细胞与破骨细胞之间的相互耦联机制^[7, 15-17], 其对破骨细胞分化的反向抑制作用依赖于 ephrinB2 配体胞内区 C 端 YKV 基序的参与, 是胞内逆向信号转导的关键, 也是 PDZ 结构域蛋白结合位点, 而 EphB4/ephrinB2 逆向信号转导对 PDZ 结构域蛋白表达变化调控的研究报道较少. 本实验研究证实 RAW264.7 细胞经 RANKL 诱导的破骨细胞表达 ephrinB2、syntenin 和 Pick1 三个蛋白质. Pick1 在分化的破骨细胞表达明显强于未分化的破骨前体细胞, 并受 EphB4/ephrinB2 胞内逆向信号转导调控. 相反, syntenin 的表达在破骨细胞分化前后未见明显变化, 亦不随 EphB4 受体刺激而变化, 说明 EphB4/ephrinB2 逆向信号转导不对其产生任何调控作用.

PDZ 结构域蛋白是指含有 PDZ 结构域单元, 能与胞内 C 端结合的一系列蛋白质^[18]. PDZ 结构域是蛋白质-蛋白质相互作用的主要单元^[19], 存在于从细菌到脊椎动物的多数有机体中^[20]. 它们通常是一种由 80 到 100 个氨基酸残基组成的保守序列, 能与其他 PDZ 结构域形成二聚物^[21]. PDZ 结构域的重要功能是调节亚细胞蛋白质的靶向作用, 特别是膜蛋白, 亦能作为蛋白质支架支持多亚基蛋白聚集^[22]. 本实验对 syntenin (仅含有 PDZ 结构域)与

Pick1 (含有 PDZ 结构域及其他结构域)进行研究分析. 为了取得重复且稳定的实验结果, 本实验把破骨前体细胞 RAW264.7 细胞株作为研究对象, 在 RANKL 及 / 或 M-CSF 的刺激诱导下 RAW264.7 细胞分化为成熟的破骨细胞, 具有同原代破骨细胞同样的生物学功能^[23]. 本实验证实 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化后有 syntenin 与 Pick1 表达. 在 RANKL+组与 RANKL-组别间 syntenin 表达并无明显差异, 表明 syntenin 表达可能与 RANKL 诱导关系不大. 然而, Western blot 及免疫荧光染色结果发现, 在 RANKL+组 Pick1 表达明显强于 RANKL-组, Pick1 表达在 RANKL 诱导后成上升趋势, 提示 Pick1 蛋白更有可能参与到 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化过程中.

本实验亦证实, RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化后明显有 ephrinB2 蛋白表达, 而 RAW264.7 未破骨分化前未见 ephrinB2 蛋白有表达, 进一步说明 RAW264.7 细胞研究模型适合本课题研究. Zhao 等提出破骨细胞内 EphB4/ephrinB2 逆向信号转导依赖于 PDZ 结构域蛋白与 ephrinB 配体胞内区 C 端 YKV 基序的相互作用, 而不是依赖于酪氨酸磷酸化作用^[7, 15]. 而且, 有报道 PDZ 结构域蛋白诸如 Syntenin^[13, 20, 24]与 Pick1^[14]能与 ephrinB 配体相互作用. Syntenin 是含有 2 个 PDZ 结构域的重要衔接蛋白分子, 最初被认为是 syndecan 结合蛋白, 其 2 个 PDZ 结构域不仅能形成自联作用,

还能结合于一系列诸如 neurexins 和 ephrinB 等跨膜蛋白分子^[20]。敲除 syntenin 的 1 个或 2 个 PDZ 结构域能阻断或明显减弱其与以上蛋白质的相互作用^[13]。Pick1 是一类外在膜蛋白, 含有 1 个 PDZ 结构域及 1 个 BAR 结构域^[22]。Pick1 的 PDZ 结构域亦能结合于大量膜蛋白, 特别是含有 C 端 I 型 PDZ 结合基序的蛋白质分子比如 ephrinB^[14]。综合以上实验结果与文献回顾, RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化过程中 syntenin 与 Pick1 具有与 ephrinB2 相互作用的观点具有一定的合理性。

因 EphB4 受体与 ephrinB2 配体之间相互作用的排外性^[25-26], 本实验选择可溶性 EphB4-Fc 刺激 ephrinB2, 来研究 EphB4/ephrinB2 逆向信号对胞内 PDZ 结构域蛋白表达变化的影响。Western blot 及 real-time RT-PCR 检测结果发现, 在 EphB4-Fc 实验组及 Fc 对照组间 syntenin 的蛋白及 mRNA 表达无明显差异, 而在 EphB4-Fc 实验组 Pick1 的蛋白及 mRNA 表达明显高于 Fc 对照组。综合考虑 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后 syntenin 蛋白表达亦未见明显变化, 说明 EphB4/ephrinB2 胞内逆向信号转导不对其产生调节作用, 但是不排除其与 ephrinB2 胞内区能相互结合的可能性。Pick1 蛋白在 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化后表达明显强于在未分化破骨前体细胞内, 并在 EphB4 的干预下 Pick1 的蛋白质及 mRNA 表达明显呈上升趋势, 提示 Pick1 受 EphB4/ephrinB2 胞内逆向信号转导调控, 可溶性 EphB4-Fc 结合于跨膜蛋白 ephrinB2 配体, 激活 ephrinB2 胞内 PDZ 结合位点, 募集 Pick1 蛋白至 C 端 YKV 基序端。Pick1 又能诱导 ephrinB2 配体及 Eph 受体成簇聚集^[27], 进一步加强逆向信号转导。为了进一步了解 Pick1 与 syntenin 同 ephrinB2 胞内是否具有直接结合关系, 本实验采用免疫共沉淀方法检测, 显影结果显示, ephrinB2 已沉淀, 但 Pick1 与 syntenin 并未与 ephrinB2 发生共沉淀。实验结果与文献报道有分歧, 可能与选择的研究对象细胞株或组织不同有关, 或者 Pick1 与 syntenin 跟 ephrinB2 胞内直接结合能力弱或间接结合的可能性, 这些都需要后续实验进一步补充完善。

综上所述, 本实验研究了 RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化前后是否表达 syntenin 和 Pick1, 结果证实 RAW264.7 细胞分化后的破骨细胞不仅表达 syntenin 和 Pick1, 同时表达 ephrinB2。

RANKL 诱导的 RAW264.7 破骨细胞分化过程中, EphB4/ephrinB2 逆向信号正向调控 Pick1 蛋白及 mRNA 表达, 但对 syntenin 不产生调控作用。初步探索了体外破骨细胞分化过程中, EphB4/ephrinB2 逆向信号对 PDZ 结构域蛋白(ephrinB2 配体潜在的下游信号分子)表达变化的调控。对于该信号机制的充分研究, 有助于开发针对骨吸收和骨形成耦联的特异靶点和药物, 预防及治疗相应致病机理的各种骨稳态失衡疾病。

致谢 感谢浙江加州国际纳米技术研究院的技术支持。

参 考 文 献

- [1] Bartley T D, Hunt R W, Welcher A A, *et al.* B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature*, 1994, **368** (6471): 558-560
- [2] Beckmann M P, Cerretti D P, Baum P, *et al.* Molecular characterization of a family of ligands for eph-related tyrosine kinase receptors. *EMBO J*, 1994, **13**(16): 3757-3762
- [3] Cheng H J, Flanagan J G. Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell*, 1994, **79**(1): 157-168
- [4] Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature Reviews*, 2002, **3**(7): 475-486
- [5] Pasquale E B. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews*, 2005, **6**(6): 462-475
- [6] Egea J, Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends in Cell Biology*, 2007, **17**(5): 230-238
- [7] Zhao C, Irie N, Takada Y, *et al.* Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metabolism*, 2006, **4**(2): 111-121
- [8] Palmer A, Klein R. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes & Development*, 2003, **17**(12): 1429-1450
- [9] Manolagas S C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 2000, **21**(2): 115-137
- [10] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, **423**(6937): 337-342
- [11] Karsenty G, Wagner E F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*, 2002, **2**(4): 389-406
- [12] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, *et al.* RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in Molecular Medicine*, 2006, **12**(1): 17-25
- [13] Grootjans J J, Reekmans G, Ceulemans H, *et al.* Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *J Biol Chem*, 2000, **275** (26): 19933-19941

- [14] Dev K K. PDZ domain protein-protein interactions: a case study with PICK1. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2007, **7**(1): 3–20
- [15] Mundy G R, Eleftheriou F. Boning up on ephrin signaling. *Cell*, 2006, **126**(3): 441–443
- [16] Pasquale E B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, 2008, **133**(1): 38–52
- [17] 赵 鹏, 毛英杰, 谷志远. 骨吸收与骨形成耦联中 Eph/ephrin 信号转导的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(9): 1101–1105
- Zhao J, Mao Y J, Gu Z Y. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(9): 1101–1105
- [18] Songyang Z, Fanning A S, Fu C, *et al.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, 1997, **275**(5296): 73–77
- [19] Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Review Neuroscience*, 2001, **24**: 1–29
- [20] Grembecka J, Cierpicki T, Devedjiev Y, *et al.* The binding of the PDZ tandem of syntenin to target proteins. *Biochemistry*, 2006, **45**(11): 3674–3683
- [21] Brenman J E, Chao D S, Gee S H, *et al.* Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, 1996, **84**(5): 757–767
- [22] Xu J, Xia J. Structure and function of PICK1. *Neuro-Signals*, 2006, **15**(4): 190–201
- [23] Sanchez-Fernandez M A, Gallois A, Riedl T, *et al.* Osteoclasts control osteoblast chemotaxis *via* PDGF-BB/PDGF receptor beta signaling. *PLoS One*, 2008, **3**(10): e3537
- [24] McClelland A C, Sheffler-Collins S I, Kayser M S, *et al.* Ephrin-B1 and ephrin-B2 mediate EphB-dependent presynaptic development *via* syntenin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(48): 20487–20492
- [25] Gale N W, Yancopoulos G D. Growth factors acting *via* endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & Development*, 1999, **13**(9): 1055–1066
- [26] Myshkin E, Wang B. Chemometrical classification of ephrin ligands and Eph kinases using GRID/CPCA approach. *J Chem Inform Comp Sci*, 2003, **43**(3): 1004–1010
- [27] Torres R, Firestein B L, Dong H, *et al.* PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron*, 1998, **21**(6): 1453–1463

EphB4/ephrinB2 Reverse Signaling Regulates Expression Levels of PDZ-domain Proteins During Osteoclast Differentiation of RAW264.7 Cells*

MAO Ying-Jie¹⁾, HUANG Xu²⁾, ZHAO Juan¹⁾, SHI Yue-Hua³⁾, GU Zhi-Yuan^{1, 3)*}

¹⁾ The Affiliated Hospital of Stomatology, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China;

²⁾ The First Affiliated Hospital of Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China;

³⁾ Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

Abstract Syntenin and Pick1 (PDZ-domain proteins) have been reported to bind to ephrinB ligands. However, there is no data related to whether ephrinB ligands, located on the membrane of osteoclasts, regulate expression levels of syntenin and Pick1, following activation by EphB receptors. RAW264.7 cell line was used as osteoclast precursors, which can differentiate into osteoclast induced by RANKL. Western blot analysis and/or immunofluorescence staining revealed that not only syntenin and Pick1, but also ephrinB2 were prominently expressed during RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells, thus furtherly illustrating that the model of RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells can be used for further investigation. In order to study the effects of reverse signaling on the expression levels of PDZ-domain proteins, soluble EphB4-Fc protein was used to stimulate ephrinB2 because EphB4 exclusively interacts with ephrinB2. In contrast to the similar expression level of syntenin between EphB4-Fc and Fc treated group, the protein and mRNA expression levels of Pick1 were obviously enhanced in EphB4-Fc treated group compared with Fc treated group. However, co-immunoprecipitation results showed that there were no direct interactions between ephrinB2 and endogenously

expressed syntenin and Pick1 in the RANKL-induced osteoclasts of RAW264.7 cells *in vitro*. In summary, it was demonstrated that both syntenin and Pick1 were expressed during RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells, and EphB4/ephrinB2 reverse signaling regulates the expression levels of Pick1, but not of syntenin. These data help to preliminarily explore the potential PDZ-domain proteins involved in the downstream of ephrinB2 during the osteoclast differentiation of RAW264.7 cells *in vitro*.

Key words EphB4, ephrinB2, syntenin, Pick1, RAW264.7 cells

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00672

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30700958) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Y2100333).

**Corresponding author.

Tel: 86-13588193844, E-mail: gzy@zju.edu.cn

Received: February 10, 2011 Accepted: March 9, 2011