

小GTP酶ARL13B在小胶质细胞有丝分裂期的时空动态分布

沈嘉浩¹ 陈嘉欣² 张荣² 华君瑞³ 何进鹏^{3*} 魏丽^{4*}

(¹苏州大学苏州医学院放射医学与防护学院, 苏州 215123; ²甘肃中医药大学公共卫生学院&基础医学院, 兰州 730000; ³中国科学院近代物理研究所生物医学中心, 兰州 730000; ⁴甘肃省人民医院检验科, 兰州 730000)

摘要 小GTP酶ARL13B在初级纤毛的发生和功能维持中发挥重要作用,但在其他细胞进程中的功能仍不十分清楚。该研究以小胶质细胞和胶质母细胞瘤细胞为模型,通过开展ARL13B和 γ -tubulin的免疫荧光染色分析,发现ARL13B不仅在初级纤毛上特异表达,而且自有丝分裂期中期开始在赤道板位置富集,随后依次在胞质分裂桥(cytokinetic bridge)中间区域形成环状和双棒状结构,最终随着有丝分裂的结束被分配至子代细胞中。通过对纺锤体微管和中间体(midbody)微管(α -tubulin)进行免疫荧光染色发现ARL13B自有丝分裂后期开始依次富集于分裂沟、收缩环、中间体中央的阀体(stem body)位置,表明其可能参与调控细胞的有丝分裂进程。此外,在小胶质细胞的有丝分裂期末期,环状或双棒状的ARL13B始终保持在中间体中央的阀体区域,其两侧与中间体微管末端相邻连接;而在胶质母细胞瘤细胞中,ARL13B除在阀体区域富集外,还与两侧的中间体微管存在大范围的共定位。进一步研究发现,利用siRNA抑制ARL13B的蛋白表达会显著降低有丝分裂期细胞中末期细胞的比例,并导致细胞的增殖速率下降。该研究揭示了ARL13B在小胶质细胞有丝分裂期的时空动态分布,初步证明了ARL13B参与调节细胞有丝分裂进程的新功能。

关键词 小胶质细胞; ARL13B; 有丝分裂; 中间体; 初级纤毛

The Spatiotemporal Dynamics of the Small GTPase ARL13B during Mitosis in Microglia

SHEN Jiahao¹, CHEN Jiixin², ZHANG Rong², HUA Junrui³, HE Jinpeng^{3*}, WEI Li^{4*}

(¹School of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou 215123, China; ²School of Public Health & School of Basic Medical Sciences, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

³Biomedical Research Center, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

⁴Department of Clinical Laboratory, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

Abstract The small GTPase ARL13B plays a crucial role in the formation and functional maintenance of primary cilia, yet its functions in other cellular processes remain poorly understood. In this study, immunofluorescence staining analyses of ARL13B and γ -tubulin are conducted in microglia and glioblastoma cells. It is found that ARL13B is not only specifically expressed on primary cilia but also begins to accumulate at the equatorial plate during metaphase of mitosis. Subsequently, it sequentially forms ring-like and double-rod structures in cytokinetic

收稿日期: 2026-02-10 接受日期: 2026-04-23

甘肃省科技计划(批准号: 25JRRA1204、24JRRA952、23JRRA533)、兰州市科技计划(批准号: 2023-4-60)和国家自然科学基金(批准号: 12375355)资助的课题

*通信作者。Tel: 0931-5196184, E-mail: hejp03@impcas.ac.cn; Tel: 0931-8281364; E-mail: peixiaoqiao@126.com

Received: February 10, 2026 Accepted: April 23, 2026

This work was supported by the Science and Technology Research Project of Gansu Province (Grant No.25JRRA1204, 24JRRA952, 23JRRA533), the Science and Technology Research Project of Lanzhou (Grant No.2023-4-60), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.12375355)

*Corresponding authors. Tel: +86-931-5196184, E-mail: hejp03@impcas.ac.cn; Tel: +86-931-8281364, E-mail: peixiaoqiao@126.com

bridge midzone, ultimately distributing into daughter cells. Immunofluorescence staining of spindle microtubules and midbody microtubules (α -tubulin) displays that ARL13B sequentially accumulates at the cleavage furrow, contractile ring, and the middle region of the midbody, termed the stem body, starting from the anaphase of mitosis, indicating the involvement of ARL13B in regulating the mitotic process. Furthermore, during the telophase of mitosis in microglia cells, the ring-like or double-rod ARL13B structures consistently stay in the stem body region, with their ends connected to the termini of midbody microtubules on both sides. However, in glioblastoma cells ARL13B not only accumulates in the stem body region but also exhibits extensive colocalization with the midbody microtubules on both sides. Further investigation demonstrates that inhibiting ARL13B protein expression by siRNA significantly reduces the proportion of cells in telophase during mitosis and leads to an obvious decline in cell proliferation. This study shows the spatiotemporal dynamics of ARL13B distribution during mitosis in microglia, and provides preliminary evidence for its novel function in regulating the mitotic process.

Keywords microglia; ARL13B; mitosis; midbody; primary cilia

ARL13B(ADP ribosylation factor-like protein 13B)是ADP核糖化因子家族和Ras超家族的一种小GTP酶,其N-端和C-端均包含结合鸟嘌呤核苷酸的结构域^[1],其在多个物种细胞的初级纤毛中高度聚集,是调控纤毛形成和维持纤毛功能的重要因子^[2-3]。*ARL13B*基因突变导致的初级纤毛结构和功能异常与多种神经系统疾病高度相关^[4]。此外,ARL13B还通过调控一系列纤毛信号通路介导多种中枢神经系统肿瘤的进展及治疗抵抗^[5-6],它可能是一个极具潜力的靶向治疗和联合治疗增效靶点。

在哺乳动物中枢神经系统中,初级纤毛是星形胶质细胞和神经元等重要的信号转导器,可调控脑发育过程及特定脑区的功能^[7-9]。ARL13B在星形胶质细胞的初级纤毛中高度富集,而在神经元初级纤毛中的表达丰度较低^[10-12]。小胶质细胞是一种中枢神经系统的常驻免疫细胞,表现出高度动态和迁移的特性,作为组织特异性的巨噬细胞,在维持中枢神经系统稳态和介导免疫反应中发挥关键作用^[13]。研究发现人和小鼠脑部小胶质细胞普遍不具有初级纤毛结构^[10-11,14]。但是,近期有研究以AC3(adenylyl cyclase 3)作为初级纤毛标志物,在6月龄小鼠大脑皮层及外侧隔核区的小胶质细胞中观察到了初级纤毛,而在同龄阿尔茨海默病模型小鼠脑部的相同区域内小胶质细胞的纤毛发生率和长度均显著下降^[15],提示初级纤毛可能在中枢神经系统疾病的免疫响应中发挥重要作用。然而,作为重要纤毛蛋白的ARL13B在小胶质细胞中的表达分布及功能仍不清楚。本研究以人小胶质细胞HMC3为模型,探究了ARL13B在HMC3细胞中的表达、定位以及其对细胞增殖的影

响,旨在为研究ARL13B在小胶质细胞中的功能提供新的视角。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人小胶质细胞HMC3购自中国科学院上海细胞库/干细胞库;人胶质母细胞瘤细胞M059K和M059J细胞购自美国模式培养物保藏中心ATCC,由中国科学院近代物理研究所生物辐射效应室保存。所有细胞均使用支原体检测试剂盒进行检测,结果显示为支原体阴性。

1.1.2 主要试剂 MEM(minimum essential medium,货号:11095080)、Opti-MEM(货号:11058021)、DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)/F-12(货号:11320033)液体培养基购自Gibco公司;胎牛血清FBS(fetal bovine serum,货号:FSD500)购自Ex-Cell公司;100 \times 青霉素和硫酸链霉素(货号:P7539)购自Sigma公司;小鼠抗人ARL13B单克隆抗体(货号:66739-1-Ig)、兔抗人ARL13B多克隆抗体(货号:17711-1-AP)、小鼠抗人 α -tubulin(α -tub)单克隆抗体(货号:66031-1-Ig)、小鼠抗人GAPDH单克隆抗体(货号:60004-1-Ig)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠IgG二抗(货号:SA00001-1)购自Proteintech公司;小鼠抗人 γ -tubulin(γ -tub)单克隆抗体(货号:T6557)、Alexa Fluor 594/488标记的山羊抗鼠IgG荧光二抗(货号:A-11005/A-11001)、Alexa Fluor 555/488标记的山羊抗兔IgG荧光二抗(货号:A32732/A32731)、HRP底物化学发光液(货号:WBKLS0100)购自Merck公司;细胞裂解液RIPA(radio immunoprecipitation as-

say, 货号: P0013C)购自上海碧云天生物技术有限公司; 特异靶向 ARL13B 的 siRNA (siARL13B-1# / 2#, 货号: siG000200894A-1-5 / stB0016505A-1-5)、阴性对照 siRNA (NC, 货号: siN0000001-1-5)、EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) 细胞增殖试剂盒 Cell-Light EdU Apollo488 *In Vitro* Kit (货号: C10310-3) 购自广州市锐博生物科技有限公司; 细胞转染试剂 Lipofectamine 2000 (货号: 11668019)、磷酸盐缓冲液 PBS (phosphate buffered saline, 货号: 10010023) 购自 ThermoFisher Scientific 公司; 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 货号: H-1200) 购自 Vector 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HMC3 细胞使用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 MEM 培养基, M059K 和 M059J 使用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F-12 培养基, 培养于 5% CO₂、37 °C 恒温细胞培养箱。

1.2.2 细胞转染及 RNA 干扰 将 HMC3 细胞 (2×10^5 个) 接种于 35 mm 培养皿培养 24 h, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂在 Opti-MEM 培养基中包裹 siARL13B 和 NC (终浓度为 50 nmol/L), 移除细胞培养皿中的培养基并加入含有 siARL13B 或 NC 的 Opti-MEM 培养基, 在培养箱中孵育 5 h 后更换新鲜培养基, 继续培养 48 h, 使用 RIPA 提取总蛋白, 并通过蛋白质免疫印迹法检测 siRNA 对 ARL13B 蛋白表达的抑制效率。siARL13B-1# / 2# 的序列分别为: siARL13B-1#, 5'-GTG TCA GAT AGA ACC ATG T-3'; siARL13B-2#, 5'-GAA CCA TGT TCA GCA ATC T-3'。

1.2.3 Western blot 检测 ARL13B 蛋白表达情况 HMC3 细胞转染 siRNA 后继续培养 48 h, 经 RIPA 裂解后 1 2000 r/min、4 °C 离心 15 min 收集总蛋白, 95 °C 加热变性 10 min, 取 20 μ g 总蛋白, 通过 10% 的 SDS-PAGE 凝胶以 120 V 电压进行电泳 1.5 h, 再以 200 mA 恒流湿转法 4 °C 转膜 2 h, 将凝胶上的蛋白条带转移至 0.22 μ m 的 PVDF 膜, 抗体封闭液室温封闭 2 h, ARL13B (1:1 000 稀释) 和 GAPDH (1:50 000 稀释) 一抗室温孵育 2 h, HRP 标记的二抗 (1:2 000 稀释) 室温孵育 1 h, 利用 HRP 底物化学发光液进行显影并使用 Alliance LD4 凝胶成像系统采集图像, 使用 ImageJ 软件对蛋白条带灰度值进行分析。

1.2.4 免疫荧光染色 细胞经预冷的冰甲醇在 -20 °C 固定 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 使用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 在室温下透膜 10 min, 使用免疫染色封闭液室温封闭 1 h 后一抗孵育 2 h, 以 ARL13B 抗体 (1:500 稀释) 对初级纤毛或 ARL13B 蛋白进行标记, 以 γ -tub 抗体 (1:500 稀释) 对纤毛基体和中心粒进行标记, 以 α -tub 抗体 (1:500 稀释) 对纺锤体微管和中间体微管进行标记, PBS 清洗 3 次后使用荧光二抗 (1:500 稀释) 室温孵育 1.5 h 进行荧光染色, PBS 清洗 3 次后使用 DAPI 对细胞核进行复染并封片。利用 ECHO RVL-100-G 荧光显微成像系统采集荧光图片, 通过 ImageJ 软件进行初级纤毛发生率统计、蛋白共定位量化分析, 随机选取 10 个以上视野 (细胞总数大于 500), 统计纤毛发生率。

1.2.5 细胞计数及拍照 将 HMC3 细胞 (1.5×10^5 个) 接种于 35 mm 培养皿 37 °C 培养 24 h 后, 利用 Lipofectamine 2000 转染 NC、siARL13B-1# / 2# (终浓度 50 nmol/L), 转染 5 h 后更换新鲜培养基作为起点, 以不进行任何处理的对照组 0 d 时细胞数量作为参照, 分别在转染 0、1、2、3 d 时采用胰酶消化收集细胞, 利用贝克曼库尔特 Z2 全自动细胞分析计数仪进行细胞数量统计, 并计算相对细胞数量和绘制细胞生长曲线。在转染后 3 d 利用徕卡 DMIL LED 倒置相差显微镜随机拍摄 10 个视野, 根据细胞形态统计有丝分裂期细胞数 (细胞数量大于 300) 和末期细胞数, 并计算末期细胞在有丝分裂期细胞中的比例, 实验进行 3 次独立重复。

1.2.6 EdU 细胞增殖检测 将 HMC3 细胞 (1.5×10^5 个) 接种于 35 mm 共聚焦小皿培养 24 h, 利用 Lipofectamine 2000 转染 NC、siARL13B-1# / 2# (终浓度 50 nmol/L) 5 h 后更换新鲜培养基终止转染, 转染后的细胞培养 46 h 后更换 EdU (50 μ mol/L) 培养基继续孵育 2 h, 经 PBS 清洗 2 次后使用 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min, 经 2 mg/mL 甘氨酸室温孵育 5 min 后用 PBS 清洗, 使用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 透膜 10 min, 加入 1 \times Apollo 染色反应液, 室温避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次后使用 DAPI 对细胞核进行复染并封片。利用 ECHO RVL-100-G 荧光显微成像系统随机采集 5~10 个视野 (细胞核总数大于 500) 的荧光图片, 通过 ImageJ 软件进行细胞数量和 EdU 阳性细胞数量统计, 并计算 EdU 阳性细胞率。实验进行 3 次独立重复。

1.2.7 统计学分析 所有实验进行 3 次以上独立重

复, 统计数据采用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间数据比较采用 Student's-*t* 检验。**P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

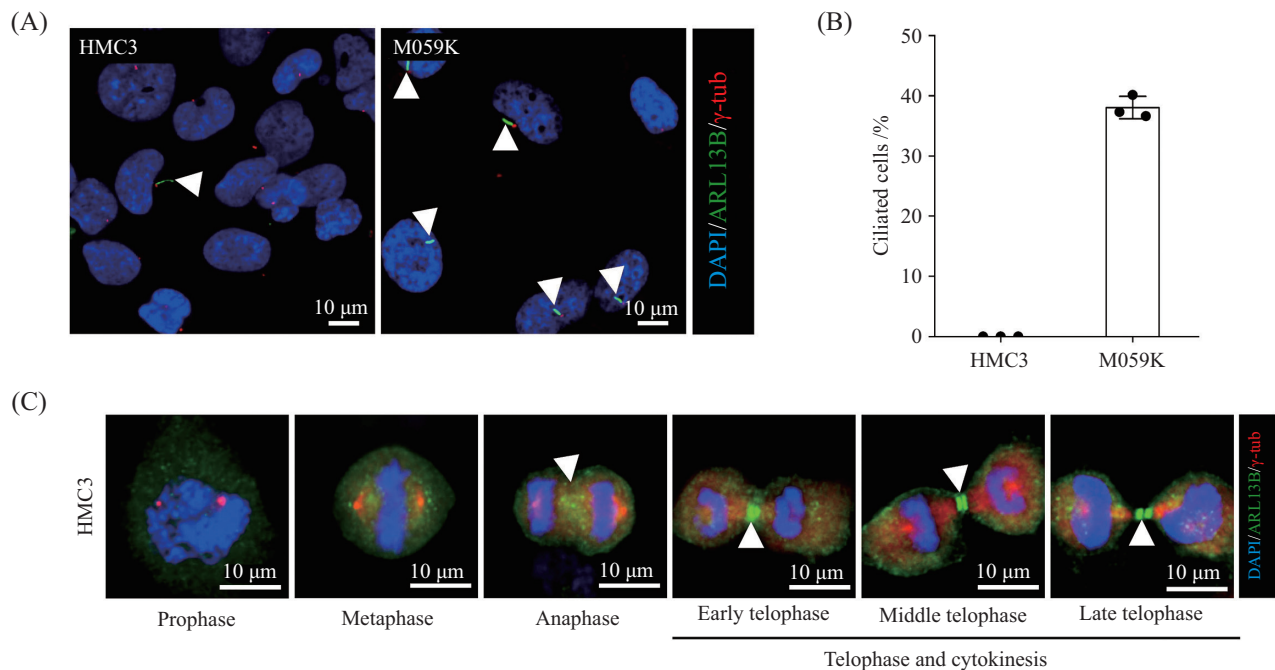
2.1 ARL13B在小胶质细胞中的表达与分布

在发育成熟的中枢神经系统中, 小胶质细胞往往不表达初级纤毛^[10-11,14]。通过ARL13B和中心粒标志因子 γ -tub的免疫荧光染色发现, ARL13B在胶质母细胞瘤M059K细胞的初级纤毛中特异聚集表达, 其纤毛发生率约为40%(图1A和图1B), 这与前期报道相一致^[16-19], 同时也证明所用抗体的特异性良好。为了探索ARL13B在小胶质细胞中的表达与分布, 在小胶质细胞HMC3中进行ARL13B免疫荧光染色, 发现HMC3细胞仅具有偶发的初级纤毛(图1A和图1B)。有趣的是, 免疫荧光染色结果还显示ARL13B在有丝分裂期的细胞中高度特异表达, 自有丝分裂中期开始在赤道板位置富集; 结合对 γ -tub的免疫荧

光染色结果显示, 在有丝分裂期末期ARL13B始终保持在连接两个子细胞的细长管状结构-胞质分裂桥的中间区域, 并随着胞质分裂的进行依次形成环状、双长棒状、双短棒状/点状形态(图1C), 提示ARL13B可能在小胶质细胞的有丝分裂进程中发挥作用。

2.2 ARL13B在HMC3细胞有丝分裂期的动态分布

为了更为准确地定位ARL13B在有丝分裂期细胞内的分布, 利用免疫荧光染色对ARL13B和纺锤体微管 α -tub进行共染色。结果如图2A所示, ARL13B在有丝分裂期早期均匀地分布在细胞膜表面, 并在中期富集于赤道板位置; 进入后期, ARL13B并没有随着染色体向纺锤体两极移动, 而是与纺锤体中央区微管发生部分共定位, 表明ARL13B可能并未与染色体发生直接的结合; 随后, ARL13B特异富集在分裂沟和收缩环位置, 提示其可能参与分裂沟和收缩环的形成。进入有丝分裂末期, 随着染色体进一步分离, 在胞质分裂桥中间的高度凝聚区域-



A, B: 免疫荧光染色检测HMC3和M059K细胞的初级纤毛(ARL13B, 绿色, 白色箭头所指)和基体/中心粒(γ -tub, 红色)(A), 并统计纤毛发生率(B), 细胞核经DAPI复染为蓝色。C: 免疫荧光染色检测ARL13B(绿色, 白色箭头所指)在HMC3细胞有丝分裂期的动态分布, 中心体和纺锤体中央区经 γ -tub免疫荧光染色为红色, 染色体经DAPI复染为蓝色。

A, B: immunofluorescence staining of primary cilia (ARL13B, green, indicated by white arrows) and basal bodies/centrioles (γ -tub, red) in HMC3 and M059K cells (A), and the proportions of ciliated cells were measured (B); the nuclei were counterstained in blue by DAPI. C: spatiotemporal localization of ARL13B (green, indicated by white arrows) in mitotic HMC3 cells, the centrosomes and spindle midzone were immunostained in red with γ -tub; the chromosomes were counterstained in blue by DAPI.

图1 ARL13B在HMC3及M059K细胞中的免疫荧光染色定位

Fig.1 Immunofluorescence staining localization of ARL13B in HMC3 and M059K cells

中间体的中央, ARL13B首先收缩为环状, 之后转变为相邻但不接触的两个长棒状结构, 并逐渐压缩为短棒状甚至点状(图2B)。由于中间体的中央位置为聚集了多种蛋白分子并发生膨大的阀体结构^[20-21], 以上结果提示 ARL13B可能参与中间体及阀体的形成和动态变化。在少部分细胞中, ARL13B在中间体阀体位置形成的环状结构会持续存在(图2B), 直至形成独立的子代细胞才消失。

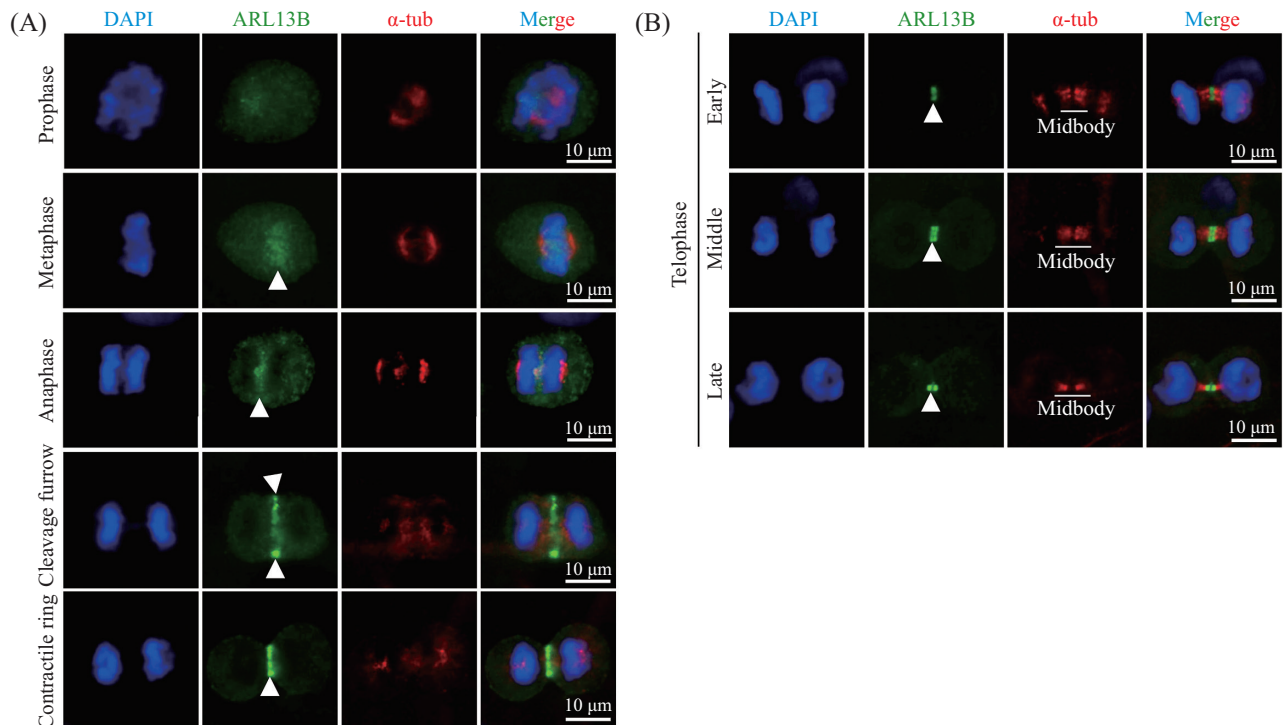
2.3 ARL13B在中间体上的定位

为了探究有丝分裂期 ARL13B的分布和定位是否具有普遍性, 进一步在胶质母细胞瘤细胞 M059K 和 M059J 中进行免疫荧光染色检测。结果(图3A)显示, 在 M059K 和 M059J 细胞中 ARL13B 同样会特异聚集于赤道板和分裂沟位置, 并在末期形成环状、长棒状和短棒状形态。此外, 这一现象还存在于其他多种类型肿瘤细胞, 如肺癌 A549 和宫颈癌 HeLa 细胞。在有丝分裂完成后, 部分子代细胞中仍存在

ARL13B形成的点状结构(图3B), 推测其可能定位于中间体残体。然而, 免疫荧光染色共定位结果还显示, 在有丝分裂期末期的 HMC3 和 M059K 细胞中 ARL13B 与中间体微管的作用方式存在明显差异: 在 HMC3 细胞中, ARL13B 与两侧中间体微管末端相邻连接, 但基本没有空间位置上的重叠(图3C和图3D); 在 M059K 细胞中, ARL13B 却与两侧中间体微管存在大范围的空间位置重叠(图3C和图3E), 提示不同细胞中 ARL13B 在参与中间体组成上具有一定差异性。以上结果表明, ARL13B 除了参与初级纤毛的形成外, 还可能参与细胞的有丝分裂进程, 并且这一功能广泛存在于多种类型细胞, 可能是其固有的生物学特性。

2.4 干扰 ARL13B 抑制 HMC3 细胞增殖

在明确了 ARL13B 在 HMC3 细胞有丝分裂期的时空动态分布后, 我们又继续探究了其是否参与调控细胞的有丝分裂进程。利用特异靶向 ARL13B

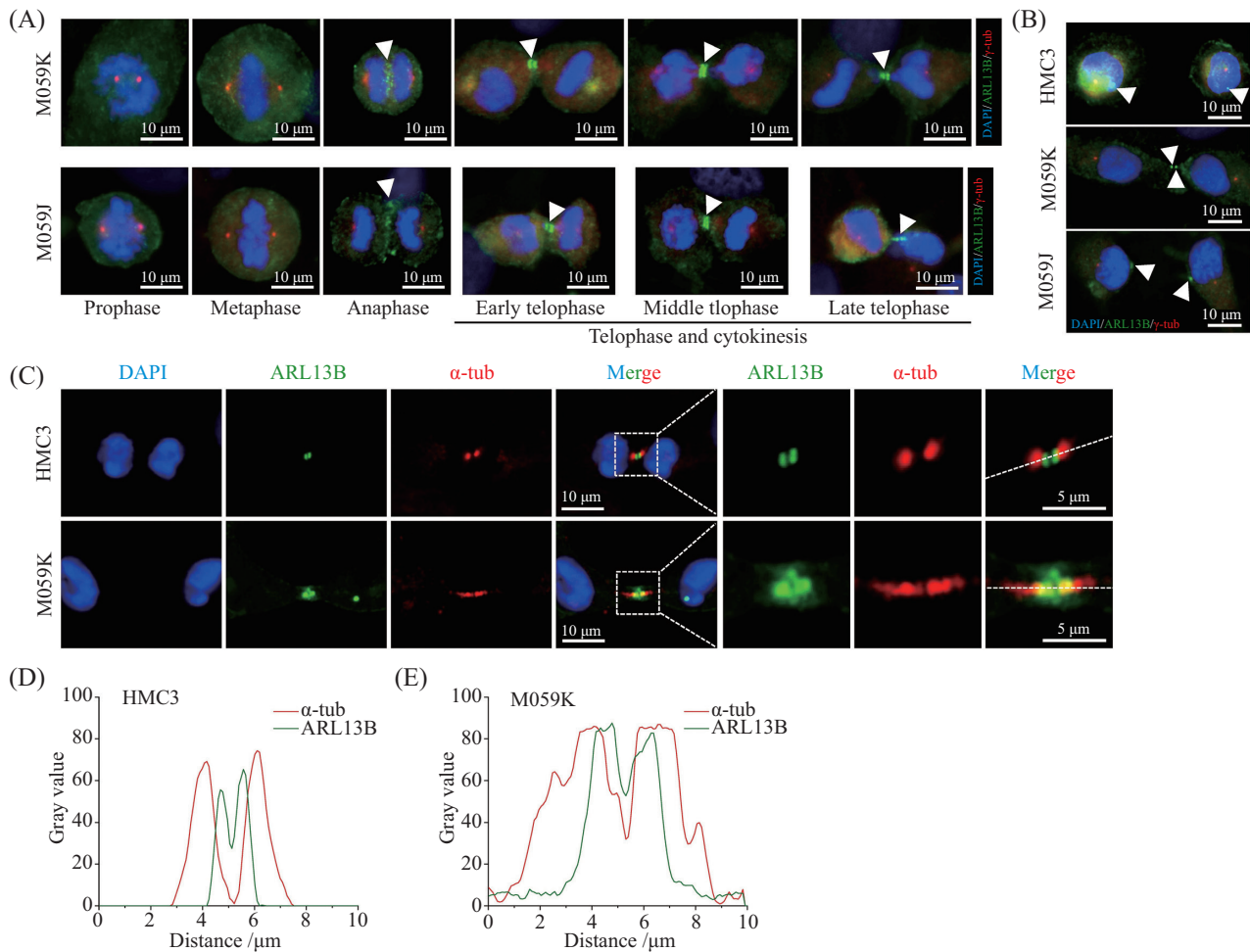


A: 免疫荧光染色检测 ARL13B(绿色, 白色箭头所指)在 HMC3 细胞有丝分裂期早期、中期、后期、分裂沟和收缩环形成期的表达和分布, 纺锤体微管和中央区经 α -tub 免疫荧光染色为红色, 染色体经 DAPI 复染为蓝色。B: 免疫荧光染色检测 ARL13B(绿色, 白色箭头所指)在 HMC3 细胞有丝分裂期末期胞质分离过程中的动态分布, 纺锤体微管和中间体微管经 α -tub 免疫荧光染为红色, 染色体经 DAPI 复染为蓝色。

A: immunofluorescence staining of ARL13B (green, indicated by white arrows) during prophase, metaphase, anaphase, and at cleavage furrow and contractile ring in mitotic HMC3 cells; the spindle microtubules and midzone were immunostained in red with α -tub; the chromosomes were counterstained in blue by DAPI. B: spatiotemporal localization of ARL13B (green, indicated by white arrows) during telophase of mitosis in HMC3 cells, the midbody microtubules were immunostained in red with α -tub; the chromosomes were counterstained in blue by DAPI.

图2 ARL13B在HMC3细胞有丝分裂期的动态分布

Fig.2 Spatiotemporal dynamics of ARL13B in mitotic HMC3 cells



A: 免疫荧光染色检测ARL13B(绿色, 白色箭头所指)在M059K和M059J细胞有丝分裂期的分布, 中心体和纺锤体中央区 γ -tub免疫荧光染色为红色, 染色体经DAPI复染为蓝色。B: 免疫荧光染色检测ARL13B(绿色, 白色箭头所指)在HMC3细胞子代细胞中分布, 中心粒经 γ -tub免疫荧光染色为红色, 细胞核经DAPI复染为蓝色。C~E: 免疫荧光染色检测HMC3和M059K细胞处于有丝分裂末期时ARL13B(绿色)的分布及其与中间体微管(α -tub, 红色)的共定位(C), 并利用ImageJ分别测量HMC3细胞(D)和M059K细胞(E)白色虚线径迹上两种蛋白的共定位水平。

A: spatiotemporal localization of ARL13B (green, indicated by white arrows) in mitotic M059K and M059J cells, the centrosomes and spindle midzone were immunostained in red with γ -tub, the chromosomes were counterstained in blue by DAPI. B: immunofluorescence staining of ARL13B (green, indicated by white arrows) in the daughter cells, the centrioles were immunostained in red with γ -tub, and the chromosomes were counterstained in blue by DAPI. C-E: localizations of ARL13B (green) and midbody microtubule (α -tub, red) in telophase HMC3 and M059K cells were presented by immunofluorescence staining (C), and the colocalization of ARL13B and γ -tub were measured along the white dot lines in HMC3 (D) and M059K (E) cells.

图3 ARL13B在HMC3和M059K细胞中间体上的定位存在差异

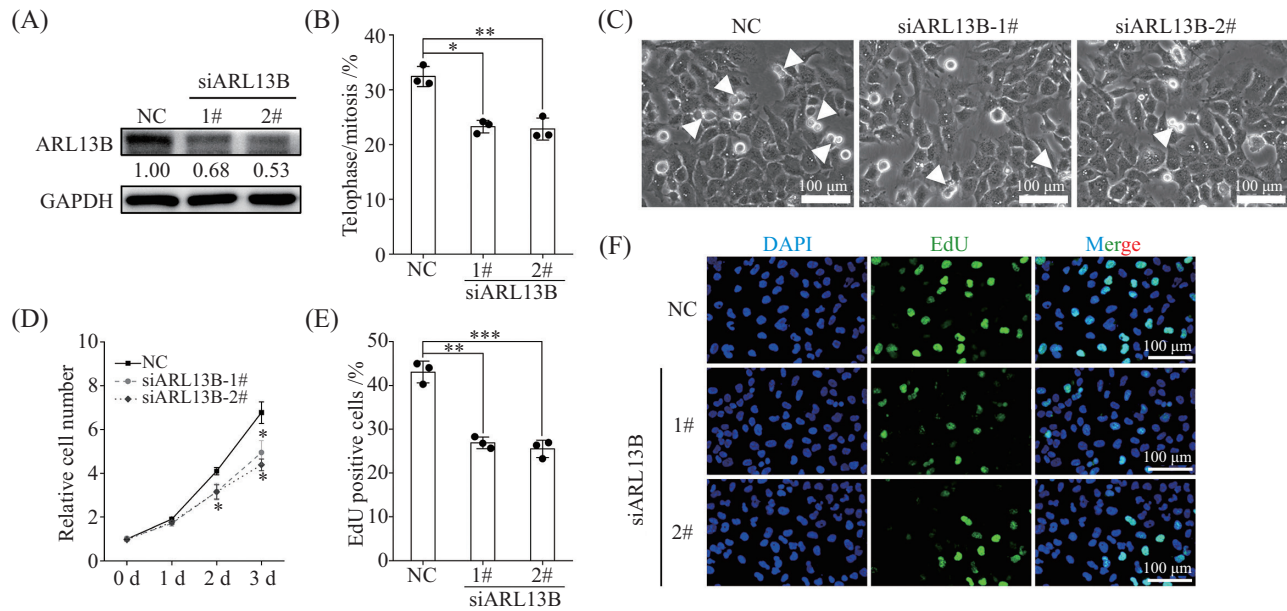
Fig.3 Localization of ARL13B at midbody is different between HMC3 and M059K cells

基因的 siRNA(siARL13B-1#/2#)抑制胞内 ARL13B 蛋白表达(图4A), 发现 ARL13B 表达受抑后不仅导致有丝分裂期细胞比例出现一定程度下降, 而且使末期细胞在有丝分裂期细胞中的占比由对照组的约 35% 下降至 siARL13B-1#/2# 组的约 22% ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$, 图 4B 和图 4C), 这证明 ARL13B 发挥着推动细胞有丝分裂进程的生物学功能。最终, 通过 siARL13B-1#/2# 抑制 ARL13B 的表达也显著降低了 HMC3 细胞的增殖速率 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.05$, 图 4D) 和增殖能力 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$, 图 4E 和 4F)。以上结果

提示, ARL13B 不仅是一种特异的纤毛蛋白, 在纤毛发生和功能维持中发挥重要作用, 而且还在推动有丝分裂进程中发挥重要作用, 其可能也是一种重要的有丝分裂调控因子。

3 讨论

ARL13B 作为小 GTP 酶 Ras 超家族的成员, 是一种在多物种中被广泛认可的初级纤毛标志蛋白分子^[2-3], 它在中枢神经系统多种类型细胞的初级纤毛中特异聚集, 通过响应胞外信号刺激并介导 Hedgehog、Wnt



A: HMC3细胞转染特异靶向 $ARL13B$ 基因的siRNA(siARL13B-1#/2#)或阴性对照siRNA(NC), 蛋白质免疫印迹法检测细胞内ARL13B蛋白的表达水平, 对条带进行灰度分析并计算相对表达量, GAPDH为上样内参。B、C: HMC3细胞转染siARL13B-1#/2#、NC后72 h, 显微镜拍照统计处于有丝分裂期和末期细胞数量, 计算末期细胞在有丝分裂期细胞的比例(B), 并拍照展示代表性细胞形态(C), 白色箭头指示处于有丝分裂末期细胞, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与NC组相比。D: HMC3细胞转染siARL13B-1#/2#、NC后0、1、2、3天分别统计细胞数量并计算相对生长速率, $*P<0.05$, 与相同时间点NC组相比。E、F: HMC3细胞转染siARL13B-1#/2#、NC后48 h, 开展EdU掺入实验检测细胞增殖情况, 荧光显微镜拍照统计EdU阳性(绿色)细胞比例(E)并展示代表性图片(F), 细胞核经DAPI染为蓝色; $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与NC组相比。

A: immunoblotting analysis of the expression of ARL13B in HMC3 cells transfected with siRNA targeting ARL13B (siARL13B-1#/2#) or negative control siRNA (NC), and GAPDH was used as a loading control. B,C: the number of cells in mitosis and telophase were captured by using microscope and the proportion of telophase cells in mitotic cell was calculated (B), representative images of cellular morphology (C), cells in telophase were indicated by white arrows, $*P<0.05$, $**P<0.01$ compared with NC group. D: relative cell number analysis of NC, siARL13B-1#, and siARL13B-2# groups for 0 to 3 days. $*P<0.05$ compared with NC group at the same time point. E,F: proportion of EdU positive cells (green) of HMC3 cells transfected with NC, siARL13B-1#, and siARL13B-2# at 48 h post-transfection (E), and the representative images were captured by fluorescence microscopy (F), the nuclei were counterstained in blue by DAPI, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with NC group.

图4 抑制ARL13B表达阻碍HMC3细胞有丝分裂进程

Fig.4 Inhibition of ARL13B blocks the mitotic process in HMC3 cells

等信号通路调控脑区发育、维持细胞正常功能^[7-9]。尽管大多数研究表明小胶质细胞不产生初级纤毛结构, 但本研究发现ARL13B在小胶质细胞的有丝分裂期会特异定位于中央纺锤体、分裂沟、收缩环、中间体中央区等区域和位置, 推动有丝分裂进程。尽管它发挥作用的具体机制仍不清楚, 但本研究揭示了ARL13B在初级纤毛之外的新定位和非纤毛依赖的新功能, 为其功能研究提供了新方向。

小GTP酶Ras超家族成员在细胞骨架动态调控、细胞有丝分裂及细胞周期进程中发挥重要的作用^[22]。其中, Rho家族蛋白在中央纺锤体MKLP1(mitotic kinesin-like protein 1)/MgcRacGAP复合物的驱动下在赤道板位置特异激活, 进而驱动肌动蛋白F-actin聚合和肌球蛋白Myosin-2激活, 最终确定分裂沟的起始位置、控制收缩环的形成及收缩

速度^[23-24]。本研究结果显示, ARL13B在小胶质细胞有丝分裂期的时空动态分布及形态(图2)与多种已知的胞质分裂和中间体组装调控因子如PRC1(protein regulator of cytokinesis 1)^[20-21]、MKLP1^[20-21]、MgcRacGAP^[20]、Aurora B^[20-21]、KIF4(kinesin family member 4)^[20]等高度相似。作为Ras超家族的同族成员, 我们推测ARL13B可能在细胞有丝分裂进程中发挥着与Rho相似甚至相同的功能。值得关注的是, ARL13B不仅在中间体阔体位置形成了与MKLP1/MgcRacGAP复合物相同的环状结构, 同时还在与阔体两侧中间体微管交接位置形成了与PRC1、KIF4、Aurora B相似的双棒状结构(图2), 提示ARL13B较Rho的互作蛋白数量可能更多, 而功能也可能更为广泛。

HMC3作为一种小胶质细胞功能研究的常用体外永生代细胞模型, 在保留原代小胶质细胞许多表型和

形态学特征的同时,也表现出较快的增殖速度^[25]。本研究显示,在HMC3中ARL13B与中间体微管相邻连接(图3C),并没有明显的位置重叠(图3D),而PRC1、PLK1(polo-like kinase 1)、KIF4等也是以相同的方式与中间体微管相互作用^[20],表明ARL13B在HMC3细胞有丝分裂末期晚期可能主要参与中间体微管的动态变化;而在M059K中,ARL13B与中间体微管具有大范围位置重叠(图3C和图3E),这与Aurora B和MKLP2在中间体微管上的位置更为相似^[20],表明ARL13B在M059K细胞有丝分裂末期晚期不仅调节中间体微管动态变化,还参与中间体微管的组装。这些结果提示,在不同细胞的有丝分裂进程中,ARL13B的相互作用蛋白应该存在一定的差异,这可能是导致其在中间体微管上定位有所不同的主要原因。由于中间体及中间体残体的组分、组装和解聚能够影响细胞的增殖速度^[26],ARL13B在有丝分裂末期集中定位于中间体微管并与PLK1等激酶的相互作用,可能是其促进HMC3细胞快速增殖的重要机制。

在具有初级纤毛的胶质瘤、胃癌、小细胞肺癌等肿瘤细胞中,ARL13B通过纤毛依赖的途径激活Hedgehog、VEGF等信号通路,促进细胞增殖和肿瘤发展^[27-30]。然而,尽管大部分实体瘤细胞的初级纤毛发生过程受阻,甚至完全不形成初级纤毛结构^[31],但在一些不具有初级纤毛的乳腺癌细胞和组织中ARL13B的表达同样明显上调,它通过与黏着斑上的整合素发生互作,促进细胞迁移和侵袭^[32]。此外,在自发癫痫小鼠脑皮质损伤模型研究中发现,癫痫发作会导致海马体齿状回区的星形胶质细胞初级纤毛中的ARL13B表达水平下降,乃至完全不表达,但在损伤区邻近区域内的星形胶质细胞中ARL13B表达水平发生显著上调,然而它并未富集于初级纤毛上,而是广泛分布于细胞质内,可能参与调控细胞分裂和损伤修复^[33]。这些研究提示,ARL13B还可能具有多种未被完全揭示的非纤毛依赖的生物学功能。本研究首次发现ARL13B在小胶质细胞的有丝分裂过程中聚集于胞质分裂桥中央区域(图1C),并随着染色体分离呈现出动态的形态变化(图2),并且这一现象普遍存在于多种类型细胞中(图3A)。此外,抑制ARL13B表达能够影响细胞的有丝分裂进程并导致细胞增殖速率下降(图4)。因此,本研究在小胶质细胞中揭示了一种ARL13B非纤毛依赖的、参与细胞分裂调控的新功能,但具体的分子机制仍有待深入研究。

尽管本研究初步揭示出小胶质细胞有丝分裂期ARL13B的动态分布,但同样存在着一定的局限性。首先,本研究开展了ARL13B与胞质分裂桥微管、纺锤体微管、中间体微管的免疫荧光共染,明确了其在有丝分裂期细胞内的时空动态分布,这与ARL13B在人视网膜色素上皮细胞hTERT-RPE1和小鼠胚胎成纤维细胞NIH 3T3有丝分裂期的胞质分裂桥上存在定位的最新研究结果相一致^[34],由于本研究缺少ARL13B与中间体、微管等标志蛋白的共定位染色,尤其是三维共定位分析,因而无法完全明确它的准确定位。其次,本研究缺乏ARL13B在活细胞中的实时动态分布数据,可以通过构建连接荧光蛋白标签的融合表达载体技术^[35],并结合活细胞实时动态成像及分析系统,进一步明确ARL13B在细胞有丝分裂期的分布、定位、形态,及其对细胞有丝分裂进程的影响。再次,尽管本研究初步明确了抑制ARL13B表达能够导致有丝分裂期细胞特别是末期细胞比例下降,但它参与调控有丝分裂进程的具体机制仍不清楚,而随着邻近标记技术的突破性发展,以ARL13B为靶标的多种捕捉工具在纤毛蛋白组动态特征研究中取得了一系列重要成果^[36-38];还有研究利用邻近标记技术以140种磷酸酶催化结构域为靶标在60种细胞模型中筛选互作蛋白,发现调控有丝分裂进程的磷酸酶PTPRH(protein tyrosine phosphatase receptor type H)和CTDSPL(carboxy-terminal domain small phosphatase like)与ARL13B有直接的相互作用^[39],提示ARL13B可能通过影响这两种磷酸酶活性调节有丝分裂期进程,且该效应在多种类型细胞中普遍存在。

最后,在本研究的免疫荧光实验中发现,细胞的固定方法对ARL13B的染色效果具有明显的影响,这与以往在初级纤毛免疫荧光染色研究中的报道是一致的^[40]。通过在本研究实验体系条件下的预实验比较,发现冰甲醇固定后染色效果最佳,其次为冰乙醇、多聚甲醛/冰甲醇联合,而单独使用多聚甲醛固定后染色效果不佳。此外,染色效果还可能受细胞类型、抗体特异性、透膜条件等因素的影响。因此,通过预实验筛选出最佳的固定方法是开展免疫荧光染色和共定位实验必不可少的步骤。

作者贡献

沈嘉浩、陈嘉欣、张荣、华君瑞负责实验开展、

数据采集和分析;沈嘉浩和陈嘉欣合作撰写论文初稿;何进鹏和魏丽提出研究思路,并对实验进行指导以及对论文初稿进行修改。

参考文献 (References)

- [1] DONALDON J G, JACKSON C L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(6): 362-75.
- [2] LI Y J, WEI Q, ZHANG Y X, et al. The small GTPases ARL-13 and ARL-3 coordinate intraflagellar transport and ciliogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(6): 1039-51.
- [3] LARKINS C E, AVILES G D, EAST M P, et al. Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins [J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(23): 4694-703.
- [4] CEVIK S, HORI Y, KAPLAN O I, et al. Joubert syndrome Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes protein transport in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Cell Biol*, 2010, 188(6): 953-69.
- [5] BAY S N, LONG A B, CASPARY T. Disruption of the ciliary GTPase Arl13b suppresses Sonic hedgehog overactivation and inhibits medulloblastoma formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(7): 1570-5.
- [6] SHIREMAN J M, ATASHI F, LEE G, et al. *De novo* purine biosynthesis is a major driver of chemoresistance in glioblastoma [J]. *Brain*, 2021, 144(4): 1230-46.
- [7] GUEMEZ-GAMBOA A, COUFAL N G, GLEESON J G. Primary cilia in the developing and mature brain [J]. *Neuron*, 2014, 82(3): 511-21.
- [8] WANG L, GUO Q, ACHARYA S, et al. Primary cilia signaling in astrocytes mediates development and regional-specific functional specification [J]. *Nat Neurosci*, 2024, 27(9): 1708-20.
- [9] BEAR R, SLOAN S A, CASPARY T. Primary cilia shape postnatal astrocyte development through Sonic Hedgehog signaling [J]. *J Cell Sci*, 2025, 138(20): jcs263965.
- [10] STERPKA A, CHEN X. Neuronal and astrocytic primary cilia in the mature brain [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 137: 114-21.
- [11] SIPOS É, KOMOLY S, ÁCS P. Quantitative comparison of primary cilia marker expression and length in the mouse brain [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(3): 397-409.
- [12] DUPUY V, PRIEUR M, PIZZOCCARO A, et al. Spatiotemporal dynamics of 5-HT6 receptor ciliary localization during mouse brain development [J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 176: 105949.
- [13] VOET S, PRINZ M, VAN LOO G. Microglia in central nervous system inflammation and multiple sclerosis pathology [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(2): 112-23.
- [14] WU J Y, CHO S J, DESCANT K, et al. Mapping of neuronal and glial primary cilia contactome and connectome in the human cerebral cortex [J]. *Neuron*, 2024, 112(1): 41-55.e3.
- [15] YEO S, JANG J, JUNG H J, et al. Primary cilia-mediated regulation of microglial secretion in Alzheimer's disease [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1250335.
- [16] 马伟, 马青龙, 魏丽, 等. 电离辐射促进神经胶质瘤细胞初级纤毛发生[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*(MA W, MA Q L, WEI L, et al. Ionizing radiation promotes primary ciliogenesis in glioblastoma cells [J]. *J Radiat Res Radiat Process*), 2021, 39(2): 27-34.
- [17] WEI L, MA W, CAI H, et al. Inhibition of ciliogenesis enhances the cellular sensitivity to temozolomide and ionizing radiation in human glioblastoma cells [J]. *Biomed Environ Sci*, 2022, 35(5): 419-36.
- [18] MA W, WEI L, JIN L L, et al. YAP/Aurora A-mediated ciliogenesis regulates ionizing radiation-induced senescence via Hedgehog pathway in tumor cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(4): 167062.
- [19] LIU X Z, WEI L, ZHANG R, et al. The DNA-PKcs-primary cilia axis maintains ionizing radiation-induced senescence in tumor cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2025, doi: 10.3724/abbs.2025168.
- [20] HU C K, COUGHLIN M, MITCHISON T J. Midbody assembly and its regulation during cytokinesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(6): 1024-34.
- [21] HALCROW E F J, MAZZA R, DIVERSI A, et al. Midbody proteins display distinct dynamics during cytokinesis [J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3337.
- [22] WENNERBERG K, ROSSMAN K L, DER C J. The Ras superfamily at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(5): 843-6.
- [23] BEMENT W M, GORYACHEV A B, MILLER A L, et al. Patterning of the cell cortex by Rho GTPases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(4): 290-308.
- [24] CARIM S C, KECHAD A, HICKSON G R X. Animal cell cytokinesis: the Rho-dependent actomyosin-annuloseptin contractile ring as a membrane microdomain gathering, compressing, and sorting machine [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 575226.
- [25] WOOLF Z, STEVENSON T J, LEE K, et al. *In vitro* models of microglia: a comparative study [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 15621.
- [26] FARMER T, PREKERIS R. New signaling kid on the block: the role of the postmitotic midbody in polarity, stemness, and proliferation [J]. *Mol Biol Cell*, 2022, 33(3): pe2.
- [27] CHEN L M, XIE X S, WANG T T, et al. ARL13B promotes angiogenesis and glioma growth by activating VEGFA-VEGFR2 signaling [J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25(5): 871-85.
- [28] SHI P, TIAN J, MALLINGER J C, et al. Increasing ciliary ARL13B expression drives active and inhibitor-resistant smoothened and GLI into glioma primary cilia [J]. *Cells*, 2023, 12(19): 2354.
- [29] SHAO J, XU L L, CHEN L M, et al. Arl13b promotes gastric tumorigenesis by regulating Smo trafficking and activation of the Hedgehog signaling pathway [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 4000-13.
- [30] SHINMURA K, KATO H, KAWASAKI H, et al. Primary cilia are frequently present in small cell lung carcinomas but not in non-small cell lung carcinomas or lung carcinoids [J]. *Lab Invest*, 2023, 103(2): 100007.
- [31] KISELEVA A A, NIKONOVA A S, GOLEMIS E A. Patterns of ciliation and ciliary signaling in cancer [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2023, 185: 87-105.
- [32] CASALOU C, FAUSTINO A, SILVA F, et al. Arl13b regulates breast cancer cell migration and invasion by controlling integrin-mediated signaling [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1461.
- [33] STERPKA A, YANG J, STROBEL M, et al. Diverged morphology changes of astrocytic and neuronal primary cilia under reactive insults [J]. *Mol Brain*, 2020, 13(1): 28.

- [34] HANSEN J N, SUN H, KAHNERT K, et al. Intrinsic heterogeneity of primary cilia revealed through spatial proteomics [J]. *Cell*, 2025, 188(24): 6804-24,e16.
- [35] CHO H, KEHRL J H. Localization of Gi alpha proteins in the centrosomes and at the midbody: implication for their role in cell division [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(2): 245-55.
- [36] LIU X, YAM P T, SCHLIENGER S, et al. Numb positively regulates Hedgehog signaling at the ciliary pocket [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3365.
- [37] WANG P, WU X N, XIAO L Q, et al. Proximity labeling proteomics with cilia-TurboID transgenic mice identified regulators of motile cilia function [J]. *J Genet Genomics*, 2025, 52(11): 1413-6.
- [38] SCHERMER B, ROEPMAN R, MICK D U. Advances in ciliary proteomics: towards cracking the hidden proteome code of cilia [J]. *J Cell Sci*, 2025, 138(20): jes264197.
- [39] ST-DENIS N, GUPTA G D, LIN Z Y, et al. Phenotypic and interaction profiling of the human phosphatases identifies diverse mitotic regulators [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(9): 2488-501.
- [40] HUA K, FERLAND R J. Fixation methods can differentially affect ciliary protein immunolabeling [J]. *Cilia*, 2017, 6: 5.