

· 基础研究 ·

不同固定方法对初级纤毛蛋白免疫荧光的影响

李田元,王悦,艾紫荷,刘晨,俞婷婷,程雁*,乐坤*

南京医科大学基础医学院医学遗传学系,江苏南京 211166

[摘要] 目的:比较不同固定方法对动物细胞初级纤毛组分免疫荧光染色的影响,探究初级纤毛免疫荧光成像的优化策略。方法:选择4%多聚甲醛(paraformaldehyde,PFA)、甲醇(MeOH)、10%三氯乙酸(trichloroacetic acid,TCA)固定细胞,后续使用相同的透化、封闭、抗体孵育条件,最后比较相同拍摄参数下初级纤毛的成像效果。结果:PFA固定法可使纤毛轴丝蛋白和部分纤毛膜蛋白有更好的染色效果,MeOH固定法可以更清晰地展现纤毛底部定位的蛋白。相比前两种方法,TCA固定的细胞虽然纤毛轴丝的染色效果很差,但适用于部分纤毛膜蛋白和轴丝结合蛋白。除荧光强弱不同外,使用不同方法固定后染色得到的蛋白定位也有微小差异。结论:3种固定方法在初级纤毛免疫荧光实验中各有优劣,需要综合考虑实验目的以及目标蛋白的特点进行选择。

[关键词] 初级纤毛;固定;细胞免疫荧光

[中图分类号] R329.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)03-343-07

doi:10.7655/NYDXBNS20230307

The comparison of different fixation methods on primary cilia immunofluorescence

LI Tianyuan, WANG Yue, AI Zihé, LIU Chen, YU Tingting, CHENG Yan*, YUE Shen*

Department of Medical Genetics, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of different fixation methods on primary cilia immunofluorescence in mammalian cells and to investigate the optimized strategy of primary cilia immunofluorescence imaging. **Methods:** Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), methanol (MeOH) or 10% trichloroacetic acid (TCA), followed by the same conditions of penetration, blocking and antibody incubation, and finally the primary cilia imaging results were compared under the same shooting parameters. **Results:** PFA fixation resulted in the better imaging of ciliary axoneme proteins and part of the ciliary membrane proteins, and MeOH fixation showed more clear imaging of the proteins localized at the bottom of cilia. Compared with other two methods, TCA fixation was suitable for some ciliary membrane proteins and axoneme binding proteins although the staining signal of ciliary axoneme was weak. In addition to the variations of fluorescence intensity, there were also minor differences in protein localization observed by staining after fixation using different methods. **Conclusion:** Each of the three fixation methods has their own advantages and limitations in immunofluorescent staining of primary cilia, and the appropriate fixation method needs to be selected with comprehensive consideration of the experimental purpose and the characteristics of target protein.

[Key words] primary cilia; fixation; cellular immunofluorescence

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(03): 343-348, 379]

初级纤毛是一种存在于大多数类型细胞表面的特化细胞器,有两个重要组成部分(基体和轴

丝)。基体是初级纤毛生长的基础结构,由G₀期细胞的中心粒组装而成,位于纤毛底部;而轴丝是由基体延伸出来的微管骨架,如天线一样突出细胞表面,外被细胞膜,其上分布着多种特异性定位的蛋白^[1]。初级纤毛突出细胞的部分与位于胞内的部分(即基体与轴丝)之间还存在一个被称为“过渡区”

[基金项目] 国家自然科学基金(82173291,82172629)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:yueshen@njmu.edu.cn;
sycheng@njmu.edu.cn

(transition zone, TZ)的门控结构,该结构不仅将初级纤毛的内部空间与胞质分隔,也将初级纤毛膜与胞膜分隔,在纤毛内形成“隔间”,使纤毛的蛋白组成和胞膜、胞质有所不同^[2]。初级纤毛内部不存在蛋白质翻译和合成系统,因此其各蛋白组分依赖纤毛内转运(intraflagellar transport, IFT)运输。IFT家族蛋白根据其生化性质及运输方向的不同主要分为两类:IFT-A和IFT-B,分别负责纤毛内物质的反向运输和正向运输^[3]。

目前已发现初级纤毛与多种信号转导通路有关,包括Hedgehog信号通路、G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)信号通路、Wnt信号通路、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 信号通路等^[1]。其中Hedgehog通路是一个公认的典型纤毛相关信号系统,通路内有多种蛋白定位并富集于初级纤毛,常在初级纤毛研究中作为观察纤毛功能是否正常的标志^[4]。初级纤毛在信号转导中发挥着重要作用,因此初级纤毛结构或功能缺陷会导致一系列纤毛相关的综合征,被统称为“纤毛病”。这些疾病往往累及多组织、多器官,常见症状如唇裂、多趾、多囊肾、心脏发育不全、小脑共济失调等^[5]。

在探究某种初级纤毛疾病可能的分子病因时,细胞免疫荧光是观察纤毛结构、蛋白定位、蛋白富集是否异常必不可少的实验手段。初级纤毛体积较小,哺乳动物初级纤毛长度为1~4 μm ^[6],直径约300 nm^[7-8],结构层次较多,因此不同蛋白的共免疫荧光显示难度较大。在初级纤毛的免疫荧光实验中,固定是对结构、组分保存最关键的一步,不合适的固定方法不仅容易破坏目的蛋白的纤毛定位,而且大大减弱荧光信号。基于以上考虑,本研究尝试了3种文献中最常见的固定方法对永生化小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)与人视网膜色素上皮细胞RPE1的初级纤毛进行固定,并比较不同定位的纤毛蛋白的染色效果。以组成纤毛轴丝的乙酰化 α -微管蛋白(acetylated α -Tubulin, AC α -Tubulin)作为纤毛标志物^[9],分别观察了定位于纤毛膜上的ADP核糖基化因子样蛋白13B(ADP ribosylation factor like GTPase 13B, ARL13B)^[10]、纤毛基底中心粒的 γ -微管蛋白(γ -Tubulin)、纤毛过渡区的MKS过渡区复合物亚基1(MKS transition zone complex subunit 1, MKS1)^[11]、沿轴丝分布的纤毛正向转运蛋白88(intraflagellar transport 88, IFT88)^[12]和纤毛逆向转运蛋白140(intraflagellar transport

140, IFT140)^[12],定位于纤毛轴丝附近并借助其转运的肌醇多聚磷酸5-磷酸酶(inositol polyphosphate-5-phosphatase E, INPP5E)^[13],以及Hedgehog信号通路膜受体SMO(smoothened,属于GPCR家族,Hedgehog信号通路的活化因子)和G蛋白偶联受体161(G protein-coupled receptor 161, GPR161, Hedgehog信号通路的抑制因子)^[4]。

3种固定试剂对应的温度、时间均为该试剂最适合的固定条件。本研究着重探究不同固定方法对各类初级纤毛蛋白免疫荧光染色效果的影响,对于同样可能影响荧光染色效果的透化条件、封闭条件以及抗体选择,采用前期实验中已成熟的方案,而不考虑这些条件可能造成的染色效果的差异。

1 材料和方法

1.1 材料

实验中使用的永生化MEF细胞、RPE1细胞为本实验室保存;LSM900激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss公司,德国);DMEM细胞培养基(Gibco公司,美国),DMEM/F12细胞培养基(南京凯基公司),胎牛血清(Gibco公司,美国),青霉素/链霉素(苏州新赛美公司);明胶(上海碧云天),4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)(北京Solarbio公司),甲醇(MeOH,南京化学试剂),三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)(上海麦克林试剂公司);AC α -Tubulin抗体(Sigma-Aldrich公司,美国), γ -Tubulin、SMO抗体(Santa Cruz公司,美国),ARL13B、IFT88、IFT140、MKS1、INPP5E、GPR161抗体(武汉三鹰公司);荧光二抗Goat anti-Mouse IgG2b偶联488、Goat anti-Mouse IgG2a偶联594、Goat anti-Mouse IgG1偶联647、Donkey anti-Rabbit IgG(H+L)偶联594(Invitrogen公司,美国);DAPI(Sigma-Aldrich公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

培养永生化MEF细胞使用DMEM培养基,添加10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素;培养RPE1细胞使用DMEM/F12培养基,添加10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素;两种细胞均在5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的细胞培养箱中进行培养。在准备免疫荧光实验样品时,将永生化MEF细胞和RPE1细胞接种在提前用0.1%明胶孵育过的细胞爬片上,待细胞长至汇合度90%时,将培养液更换为添加0.2%胎牛血清的DMEM或DMEM/F12培养基进行血清饥饿,持续24 h以诱导细胞长

出初级纤毛。在准备观察SMO的免疫荧光样品时,进行血清饥饿使用的培养基额外添加200 nmol/L的SMO激动剂(smoothened agonist, SAG),以诱导SMO在初级纤中富集。

1.2.2 固定方法

固定细胞前,吸干细胞培养液,用PBS缓冲液清洗细胞两遍。

PFA固定:4%PFA长期贮存于-20℃,使用时提前解冻,置于4℃保存。细胞浸没在4%PFA中,室温下固定30 min,之后用PBS清洗两次。

MeOH固定:在使用MeOH固定前需将试剂预冷至-20℃。将细胞浸没在预冷后的MeOH中,并立即将容器置于-20℃冰箱,固定10 min,如条件允许可将容器直接放置在冰箱制冷管道上以获得最好的降温效果,之后用PBS清洗两次。

TCA固定:TCA于4℃避光保存,10%TCA固定液在使用前现配制,取1/10体积TCA溶于PBS缓冲液中并置于4℃冰箱预冷。将细胞浸没在预冷的10%TCA中,4℃条件下固定20 min,之后用PBS清洗两次。

1.2.3 免疫荧光

不同固定方法固定细胞后,使用抗体稀释液(3% BSA、0.3% Triton X-100,溶于PBS)4℃下封闭并透化细胞1 h,之后4℃孵育一抗过夜。不同抗体使用的稀释比例:AC α -Tubulin 1:1 000、 γ -Tubulin 1:200、ARL13B 1:200、IFT88 1:200、IFT140 1:500、MKS1 1:100、INPP5E 1:100、GPR161 1:100、SMO 1:50。

孵育好一抗之后,使用0.2%TBST清洗细胞2次,每次3~5 min,之后室温条件下荧光二抗避光孵育1 h,不同荧光二抗使用的稀释比例均为1:200。孵育二抗后,0.2%TBST清洗细胞3次,每次3~5 min。最后使用封固剂(含DAPI)将细胞爬片固定在载玻片上。

图像拍摄使用LSM900激光共聚焦显微镜搭配63倍油镜,图像处理使用ZEN 3.0(blue edition)软件。

2 结果

2.1 常用纤毛标志物AC α -Tubulin的免疫荧光染色对比

AC α -Tubulin作为纤毛轴丝的重要结构组成之一,常被用作免疫荧光实验中的纤毛标志物。在使用4%PFA固定的MEF细胞和RPE1细胞中,染色AC α -Tubulin都可以观察到清晰明显的纤毛标记(图1、表1)。在使用MeOH固定的两种细胞中,染色AC α -Tubulin观察到的信号稍弱,且在RPE1细胞中除标记了纤毛轴丝之外还能观察到纤毛基底中心体的荧光(图1)。当使用10%TCA固定两种细胞时,染色AC α -Tubulin标记出的纤毛荧光信号很弱,且存在轻微的不连续,难以找到并观察(图1、表1)。

2.2 纤毛内多种不同定位蛋白的免疫荧光染色对比

ARL13B是一种小分子GTP酶,高度富集于纤毛膜^[10]。在采用不同固定方法的MEF细胞中,ARL13B都显示出了明显的纤毛定位,其中TCA固定的纤毛中ARL13B信号最强,而PFA与MeOH固定的纤毛中信号稍弱且互相之间没有明显差别(图2A、表1),在RPE1细胞中观察到了相同的结果(图2B、表1)。

在对纤毛基底中心体染色的实验中,可以观察到MeOH固定的MEF细胞有更好的 γ -Tubulin染色效果(图2A、表1),在RPE1细胞中使用MeOH和TCA固定都可以观察到高亮度的中心粒标记(图2B、表1),但PFA固定后 γ -tubulin染色信号不明显。与 γ -Tubulin的染色结果类似,MeOH固定细胞的纤毛过渡区蛋白MKS1的荧光信号最明显,而PFA和TCA固定细胞未见定位于过渡区的荧光信号(图2,表1)。

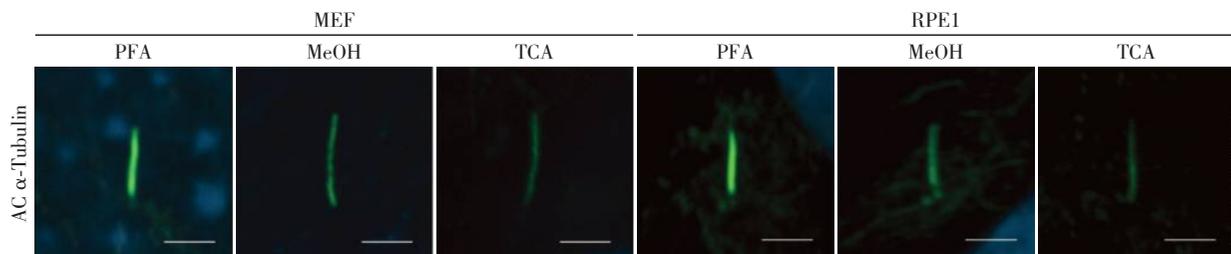


图1 不同固定方法对MEF和RPE1细胞纤毛AC α -Tubulin免疫荧光的影响($\times 630$)

Figure 1 Different fixation methods and their effects on AC α -Tubulin immunolabeling of cilia in MEF and RPE1 cells ($\times 630$)

表1 不同固定方法对MEF和RPE1细胞初级纤毛蛋白免疫荧光的影响

Table 1 Different fixation methods and their effects on various proteins immunolabeling of cilia in MEF and RPE1 cells

纤毛相关蛋白	固定方法		
	PFA	MeOH	TCA
MEF细胞			
AC α -Tubulin	+++	++	+
ARL13B	++	++	+++
γ -Tubulin	+	+++	+
MKS1	-	+	-
IFT88	++	+++	+
IFT140	+	+	+
INPP5E	-	-	-
SMO	+++	+	-
GPR161	-	+	-
RPE1细胞			
AC α -Tubulin	+++	++	+
ARL13B	++	++	+++
γ -Tubulin	+	+++	+++
MKS1	-	+	-
IFT88	+	+++	+
IFT140	++	++	+
INPP5E	+++	-	++
SMO	++	-	-
GPR161	+	++	-

-:未观察到纤毛染色;+:观察到纤毛染色但不明显;+:纤毛染色比较明显;+++;纤毛染色明亮清晰。

MEF细胞的IFT88免疫荧光实验发现,MeOH固定的纤毛有着更强的IFT88荧光信号,而且3种固定方法观察到的IFT88定位也有所不同。在PFA固定细胞中,IFT88信号主要定位于纤毛基底与顶端,但在MeOH固定细胞中,信号富集于纤毛基底部且沿纤毛轴丝较为均匀地分布,在TCA固定细胞中,信号则呈“珠串”状沿轴丝分布(图2A、表1)。在PFA或TCA固定后染色的RPE1细胞中均观察到IFT88只定位于纤毛基底部,而MeOH固定的细胞中IFT88信号定位于纤毛基底与顶端,且信号最强(图2B、表1)。3种固定方法对IFT140信号的定位影响不大,IFT140均定位于纤毛基底部,且信号强度没有明显差异,仅在TCA固定的MEF细胞中存在“珠串”状沿轴丝分布的荧光信号(图2,表1)。

INPP5E定位于纤毛轴丝附近并通过转运蛋白与纤毛轴丝间接结合,研究中常把INPP5E作为纤毛转运系统的“货物”进行观察^[13]。MEF细胞中,仅

PFA与TCA固定细胞可以观察到很弱的INPP5E沿轴丝分布的荧光信号(图2A、表1)。但在RPE1细胞中,PFA与TCA固定后可以观察到明显、清晰的INPP5E标记,其中PFA固定后的染色效果优于TCA(图2B、表1)。MeOH固定的两株细胞都无法观察到INPP5E的荧光信号(图2,表1)。

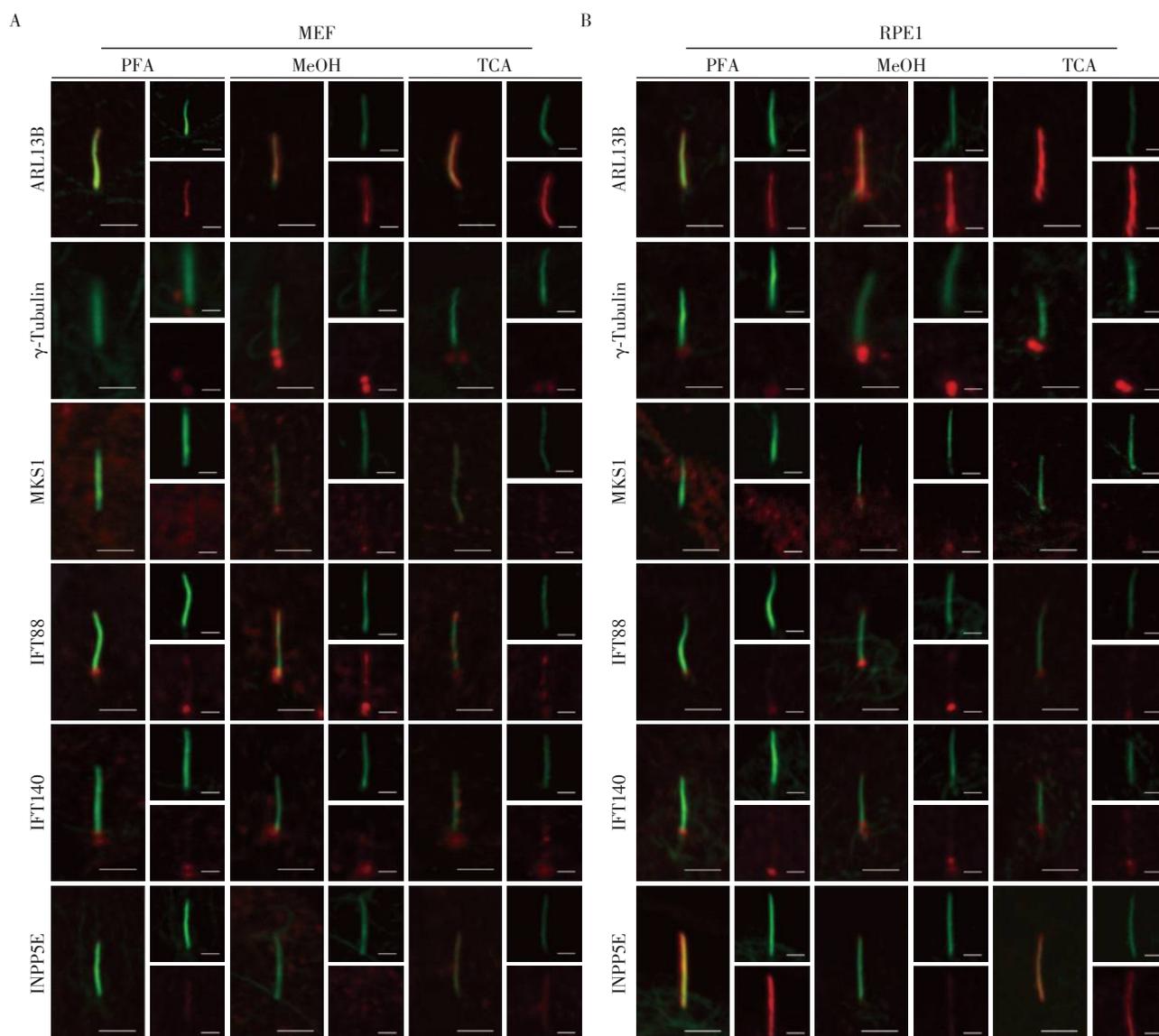
2.3 纤毛内Hedgehog信号通路相关蛋白的免疫荧光染色对比

Hedgehog信号通路是初级纤毛的经典信号通路,当Hedgehog信号被激活时,SMO蛋白富集到初级纤毛膜上^[14],伴随着GPR161蛋白移出纤毛^[15]。本研究检测了不同固定方法对上述两分子的纤毛内定位成像的影响。在MEF细胞中,PFA固定后染色的SMO免疫荧光信号最明显,MeOH固定后染色效果较弱,而TCA固定后的细胞几乎观察不到SMO定位在纤毛的荧光信号(图3A、表1),而GPR161的免疫荧光结果显示,只有使用MeOH固定后的细胞可以观察到GPR161在纤毛的定位(图3A、表1)。在RPE1细胞中,仅PFA固定适用于SMO纤毛内染色(图3B、表1)。MeOH固定更适用于GPR161纤毛染色,尽管PFA固定的细胞也有微弱的荧光信号(图3B、表1)。

3 讨论

近年来越来越多的研究聚焦于初级纤毛,许多以往未被关注的蛋白被证明具有重要的纤毛相关功能,阐明这些蛋白发挥功能的分子机制离不开对其纤毛定位的观察。为了应对研究初级纤毛时涉及多种蛋白的复杂情况,本研究试图归纳总结出固定方法与不同种类纤毛蛋白免疫荧光效果之间的规律,可以在需要共染两种甚至多种纤毛蛋白时提供参考。但是目前结果显示3种固定方法互有优劣,适合不同纤毛蛋白的固定条件差异较大,没有一种固定方法可使免疫荧光所染蛋白都达到最佳效果。如果进一步探究纤毛免疫荧光的优化策略,需要确定更具体的共染色的蛋白种类。

本研究结果显示,需使用4%PFA进行固定的免疫荧光实验中以AC α -Tubulin作为纤毛标志物是最佳选择,MeOH固定后的细胞中AC α -Tubulin的染色效果也可满足作为标志物的需求,而需要使用10%TCA固定的细胞,可以选择ARL13B作为纤毛标志物。AC α -Tubulin是初级纤毛最内部的骨架结构,本研究起初怀疑是PFA的固定效果比MeOH和TCA更为温和,能更好地保存脆弱的微管结构,从



每组3个图,左侧为共标记图像,右上为AC- α Tubulin标记染色,右下为相应的蛋白标记染色($\times 630$)。

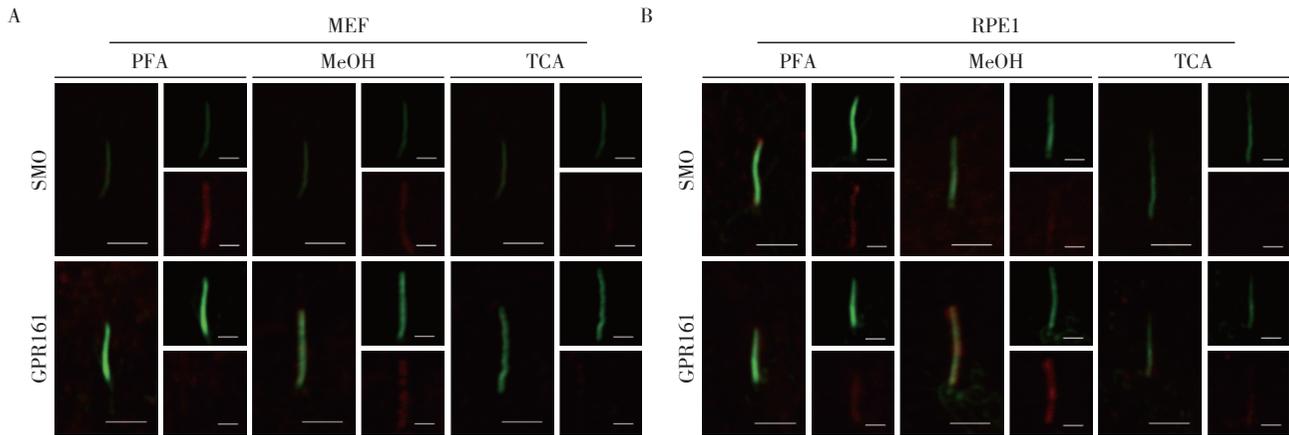
图2 不同固定方法对MEF细胞(A)和RPE1细胞(B)纤毛内蛋白免疫荧光的影响

Figure 2 Effects of different fixation methods on immunolabeling of ciliary proteins in MEF cells(A)and RPE1 cells(B)

而造成了免疫荧光染色的差异。后续3种固定方法在ARL13B免疫荧光染色中的表现却又说明使用TCA进行固定才是最温和的方式,因此意识到“温和”与否无法定性比较不同的固定方法,一种固定方法可能对不同定位的纤毛蛋白产生不同程度的破坏。出人意料的是,同样属于纤毛膜蛋白的SMO和GPR161的染色结果与ARL13B又截然不同,这可能是由于小分子GTP酶与GPCR、不同GPCR之间同样存在结构上的不同,使一种固定方法对不同种类膜蛋白的定位效果也不同。有文献使用TCA固定某些比较难以用免疫荧光进行检测的质膜蛋白,也侧面印证了上述猜测。本研究检测的3种纤毛膜蛋白ARL13B、SMO和GPR161,最适合的固定试剂分

别为TCA、PFA和MeOH,因此在初次免疫荧光染色1种纤毛膜蛋白时3种固定方法都应该尝试。

虽然有文献曾质疑MeOH用于纤毛蛋白固定的实验稳定性与可重复性^[16],但从本研究的结果来看,使用MeOH固定细胞在免疫荧光染色纤毛“根部”蛋白时有着明显优势。与纤毛“根部”结构蛋白不同的是,两种纤毛转运蛋白IFT88和IFT140所适合的固定方法较难判断。对MEF细胞的IFT88进行染色时,3种固定方法得到的结果出现了IFT88定位上的差异,MeOH固定的细胞中IFT88信号最强,但TCA固定的细胞中IFT88沿轴丝分布的形态最符合活细胞中IFT复合体的类似“train”的运动方式^[17]。此外,如果IFT140蛋白的染色效果以本研究观察到的



每组3个图,左侧为共标记图像,右上为AC- α Tubulin标记染色,右下为相应的蛋白标记染色($\times 630$)。

图3 不同固定方法对MEF细胞(A)和RPE1细胞(B)内SMO和GPR161的纤毛定位免疫荧光的影响

Figure 3 Effects of different fixation methods on immunofluorescence of SMO and GPR161 in proteins cilia of MEF (A) and RPE1 cells (B)

“分别聚集在TZ区两侧”的形态为准,MEF细胞和RPE1细胞的染色效果之间也出现了差异,在一种细胞中可以成功染色的固定方法在另一种细胞中反而表现不佳。这种现象可能源于两种细胞蛋白表达的差异,或是源于抗体与不同种属细胞蛋白结合效果的差异。类似的是,INPP5E在MEF细胞中荧光信号很差,而在RPE1细胞中非常清晰,但是两种细胞间不同固定方法的染色效果相似。作为间接与轴丝相结合的蛋白,INPP5E的免疫荧光染色效果基本没有关联,甚至在纤毛转运蛋白染色中表现出众的MeOH固定法会几乎完全破坏INPP5E在纤毛中的免疫荧光定位。

一些文献曾报道使用优化的固定方法,均是在这3种方法的基础上进行改良,精力所限本研究无法全部进行尝试。此外,不同实验室的实验效果也存在不同,例如有报道使用MeOH固定细胞后,免疫荧光染色显示IFT88聚集于纤毛两端,且在纤毛转运功能受损的细胞中,IFT88异常地聚集于纤毛底部^[18];而另一项研究使用PFA固定细胞后的染色结果显示IFT88沿整根纤毛分布^[19],前者如果使用PFA固定法可能观察不到如此明显的组间差异。另有报道在TZ蛋白MKS1的免疫荧光染色中特意使用TCA固定^[12],但染色效果不如其他研究使用的优化MeOH固定法^[11,20]。这些差异一定程度上可能源于各实验室固定时的操作不同或所用抗体不同。总的来说,当研究纤毛定位蛋白时,可能需要多次尝试,最终根据免疫荧光实验观察的重点来选择效果最好的固定方法。

[参考文献]

- [1] ANVARIAN Z, MYKYTYN K, MUKHOPADHYAY S, et al. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(4): 199-219
- [2] CHIH B, LIU P, CHINN Y, et al. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(1): 61-72
- [3] LECHTRECK K F. IFT - cargo interactions and protein transport in cilia [J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(12): 765-778
- [4] GOETZ S C, ANDERSON K V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(5): 331-344
- [5] REITER J F, LEROUX M R. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(9): 533-547
- [6] WANG W, JACK B M, WANG H H, et al. Intraflagellar transport proteins as regulators of primary cilia length [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 661350
- [7] MELEPPATTU S, ZHOU H X, DAI J, et al. Mechanism of IFT - a polymerization into trains for ciliary transport [J]. *Cell*, 2022, 185(26): 4986-4998
- [8] SUN S F, FISHER R L, BOWSER S S, et al. Three-dimensional architecture of epithelial primary cilia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(19): 9370-9379
- [9] WLOGA D, JOACHIMIAK E, LOUKA P, et al. Posttranslational modifications of tubulin and Cilia [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(6): 028159
- [10] EVE A. Arl13b regulates sonic hedgehog signaling from

(下转第379页)

- trend of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in rheumatoid arthritis: a general population - based study [J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2021, 60(1):188-195
- [19] HERBERT K E, SCOTT D L, PERRET T D. Nucleosides and bases in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 1988, 74(1):97-99
- [20] SOOAH K, JIWON H, JUNGYEON K, et al. Metabolic discrimination of synovial fluid between rheumatoid arthritis and osteoarthritis using gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. *Metabolomics*, 2022, 18(7):48
- [21] GUDBJÖRNSSON B, ZAK A, NIKLASSON F, et al. Hypoxanthine, xanthine, and urate in synovial fluid from patients with inflammatory arthritides [J]. *Ann Rheum Dis*, 1991, 50(10):669-672
- [22] DUARTE-DELGADO N P, CALA M P, BARRETO A, et al. Metabolites and metabolic pathways associated with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [J]. *J Transl Autoimmun*, 2022, 5:100150
- [收稿日期] 2022-08-16
(本文编辑:陈汐敏)

(上接第348页)

- outside primary cilia [J]. *Elife*, 2020, 9:50434
- [11] LUO M N, HE R D, LIN Z S, et al. Novel compound heterozygous variants in MKS1 leading to Joubert syndrome [J]. *Front Genet*, 2020, 11:576235
- [12] OKAZAKI M, KOBAYASHI T, CHIBA S H, et al. Formation of the B9 - domain protein complex MKS1 - B9D2 - B9D1 is essential as a diffusion barrier for ciliary membrane proteins [J]. *MBoC*, 2020, 31(20):2259-2268
- [13] DYSON J M, CONDUIT S E, FEENEY S J, et al. INPP5E regulates phosphoinositide - dependent cilia transition zone function [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(1):247-263
- [14] DORN K V, HUGHES C E, ROHATGI R. A smoothed-Evc2 complex transduces the hedgehog signal at primary cilia [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(4):823-835
- [15] MUKHOPADHYAY S, WEN X H, RATTI N, et al. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the sonic hedgehog pathway via cAMP signaling [J]. *Cell*, 2013, 152(1/2):210-223
- [16] HUA K, FERLAND R J. Fixation methods can differentially affect ciliary protein immunolabeling [J]. *Cilia*, 2017, 6(1):1-17
- [17] DUAN S C, LI H, ZHANG Y R, et al. Rab12 GTP hydrolysis licenses BBSome-mediated export to fine-tune ciliary signaling [J]. *EMBO J*, 2021, 40(2):e105499
- [18] FUNABASHI T, KATOH Y, OKAZAKI M, et al. Interaction of heterotrimeric kinesin- II with IFT-B-connecting tetramer is crucial for ciliogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(8):2867-2876
- [19] FUJII R, HASEGAWA S, MAEKAWA H, et al. Decreased IFT88 expression with primary cilia shortening causes mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced tubular injury [J]. *Am J Physiol Ren Physiol*, 2021, 321(3):F278-F292
- [20] LOKAJ M, KÖSLING S K, KOERNER C, et al. The interaction of CCDC104/BARTL1 with Arl3 and implications for ciliary function [J]. *Structure*, 2015, 23(11):2122-2132
- [收稿日期] 2022-11-15
(本文编辑:陈汐敏)