

炎症反应中选择素粘附分子与配体间相互作用的研究^{*}

叶志义^{1,2} 全学军¹

(1 重庆工学院 重庆 400050 2 重庆大学 重庆 400044)

摘要:在炎症反应中,白细胞在内皮细胞上滚动由选择素分子与其配体分子相互作用所导致,选择素分子有3种,P选择素分子(P-selectin)、E选择素分子(E-selectin)、L选择素分子(L-selectin),选择素分子与其对应的P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)的相互作用起着重要的作用。用等离子共振、流动腔、原子力显微镜等技术能定量分析选择素分子与其配体分子相互作用的动力学反应。

关键词:选择素;P-选择素糖蛋白配体-1;动力学

中图分类号:R331.1 **文献标识码:**A

The research on kinetics of interaction between selectin and ligand in inflammatory processes

YE Zhi-yi^{1,2}, QUAN Xue-jun¹

(1 Chongqing Institute of Technology, Chongqing, 400050;

2 Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT: Leukocytes roll along the endothelium of postcapillary venules in response to inflammatory and thrombotic processes. The selectin family of cell adhesion molecules, which mediate the rolling of leukocytes on blood vessel endothelium, are the P-selectin, E-selectin and L-selectin. It is very important for selectins to interact on their counterpart ligand—P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). Kinetics interactions between selectin and PSGL-1 was extensively studied by using the state-of-the-art techniques such as surface plasma resonance, flow chamber, atomic force microscope (AFM) and so on.

Key words: Selectin; PSGL-1; Kinetics

前言

粘附分子是一类介导细胞与细胞间或细胞与细胞外基质间相互作用的分子,大多为跨膜糖蛋白,含膜外区、跨膜区、胞浆区。粘附分子广泛分布于各类细胞,粘附分子以配体-受体结合的形式作用,参与细胞识别、信号转导以及细胞活化、增殖、分化与移动等,是免疫应答、炎症反应、肿瘤转移等一系列重要生理和病理过程的分子基础。粘附分子按其分子结构特点可分为5个家族,即整合素、选择素、粘蛋白样、免疫球蛋白超家族及钙粘蛋白五类。

在炎症反应和淋巴细胞归巢过程中,粘附分子的作用使白细胞在血管内皮上滚动、粘附从而启动一系列反应,最终使白细胞在炎症反应区域集中。白细胞粘附、穿越血管内皮细胞向炎症部位移行是炎症过程的重要特征,其分子基础是白细胞与血管内皮细胞表面粘附分子间的相互作用以及细胞因子对粘附分子表达的调节。白细胞粘附是一个多步骤的过程,参与的分子很多,分别在白细胞粘附的不同阶段起作用。许多研究表明,白细胞在内皮细胞上滚动由选择素分子与其配体分子相互作用所导致^[1,2]。

选择素是细胞粘附分子家族成员之一,选择素家族参与炎症发生、淋巴细胞归巢、凝血以及肿瘤转移等。选择素根据

表达可分为三类:P-选择素(P-selectin)表达于活化的血小板和血管内皮细胞表面;E-选择素(E-selectin)表达在活化血管内皮细胞表面;L-选择素(L-selectin)则表达在白细胞表面。

1 选择素家族的组成和基本结构

三种选择素皆为I型膜分子,其膜外区结构相似,由三个结构域构成:N端的C型凝集素结构域,表皮生长因子(EGF)样结构域、重复次数不同的补体调控蛋白结构域组成。其中,凝集素结构域是选择素分子结合糖脂分子上的糖配体的部位。

P-selectin 又称 CD62P 是一种分子质量约为 140 kD 的跨膜糖蛋白,通常储存于血小板的 α 颗粒、血管内皮细胞的 Weibel-Palade 小体中。P-selectin 由不同的结构域组成:凝集素样结构域(Lectin-like domain)、表皮生长因子样结构域(Epidermal Growth Factor, EGF)、九个补体调节蛋白样功能区重复序列(Consensus Repeat, CR)、跨膜功能区 and 胞质区^[3]。P-selectin 识别的配体包括 P 选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)、sialyl Lewis X(sLex)等糖基结构的糖蛋白、糖脂等,P-selectin 与其配体识别和作用为钙离子依赖性的^[4]。

选择素作为粘附和信号分子在白细胞介导的炎症免疫反

* 基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(8666)

作者简介:叶志义,(1965-),男,博士,副研究员,主要研究方向:分子动力学

通讯作者:叶志义, E-mail: yzybio@163.com 重庆大学生物工程学院(400044)

(收稿日期:2006-06-20 接受日期:2006-07-27)

应中起重要作用。研究发现,当血小板或内皮细胞受凝血酶、组胺、肿瘤坏死因子等刺激而活化后, α 颗粒和 Weibel-Palade 小体膜与胞膜迅速融合,可导致这些部位已储存的 P-selectin 在细胞表面快速表达,从而介导活化的内皮细胞和血小板与中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞及 T 淋巴细胞亚群相互作用^[5]。

P-selectin 与其配体结合,可调节白细胞在血管内皮上滚动,已证实缺乏 P-selectin、E-selectin 的小鼠受创伤或感染时,早期可出现白细胞滚动迟缓的现象,这进一步证明 P-selectin 是白细胞介导炎症反应的早期参与因素^[6]。近期还发现,选择素参与介导的白细胞浸润及炎症免疫反应,与介导细胞间粘附启动或参与了细胞内信号传导途径有关^[7]。

P-selectin 作为中性粒细胞和单核细胞受体,其介导细胞粘附的功能区域位于分子 N-末端的 lectin 区和 EGF 区,通过钙离子的参与来调节细胞粘附过程,并使中性粒细胞在内皮细胞表面向前滚动^[8]。

E-selectin 分子量为 115 kD 由 589 个氨基酸残基构成,E-选择素表达于活化的内皮细胞,主要介导中性粒细胞与内皮细胞的起始黏附作用,其配体是唾液酸化的 Lewis X 寡糖。内皮细胞受刺激后,E-选择素于 4h 表达达高峰,可维持 24h 然后从胞膜上脱落进入血液,成为可溶性 E-选择素。经研究证实,E-选择素有介导活化内皮细胞与中性粒细胞粘附作用。内皮细胞上 E-选择素可锚定白细胞,继而介导其活化,有助于白细胞稳定的粘附于内皮细胞,继而迁移至血管外组织。

L-selectin 分子量为 90 kD 由 324 个氨基酸残基组成,表达于白细胞。研究表明,L-选择素成簇存在于中性粒细胞微绒毛顶端。在细胞激活过程中,L-选择素迅速下调,这种下调既发生在转录水平,亦发生在翻译水平。这有利于其始粘附的白细胞与内皮细胞脱离,还可影响淋巴细胞向外周淋巴结的归巢^[9]。

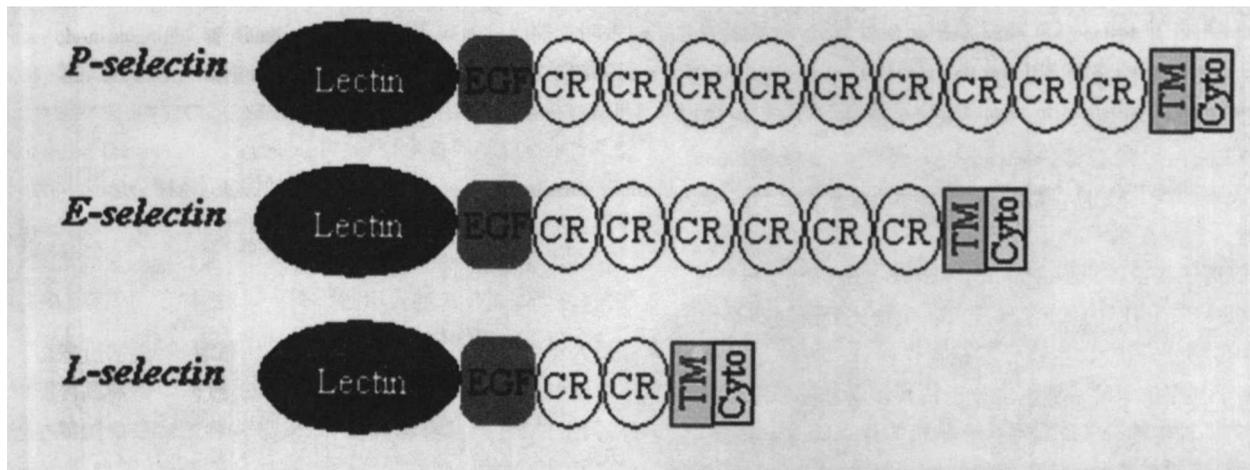


图 1 选择素的组成和基本结构

Fig 1 The structure of selectins

2 选择素分子的配体

选择素分子识别或结合的配体是一些寡糖基团,主要是唾液酸化的路易斯寡糖 (sialyl Lewis^x, sLex 或 CD15^a) 或类似结构的分子,此类配体主要分布于白细胞、血管内皮细胞及某些肿瘤细胞表面。

P-选择素糖蛋白配体-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand1, PSGL-1) 是选择素的主要糖蛋白配体,它与选择素相互作用,在介导炎症和损伤时白细胞的滚动过程中起重要作用,该配体由两个单体通过二硫键构成分子量为 240 KD 的同源二聚体,其主要表达在白细胞的微绒毛体上。PSGL-1 在细胞膜突起微绒毛上的定位对于白细胞在血管内皮细胞表面的滚动和黏附有重要意义^[10]。

1992 年 Moore 等首先用 Western 杂交方法在中性粒细胞和 HL-60 细胞上提出该膜糖蛋白。PSGL-1 表达于几乎所有类型的白细胞表面。可以与表达于血管内皮细胞表面的 P-selectin 和 E-selectin 及表达于白细胞表面的 L-selectin 相互作用,从而完成介导白细胞粘附的起始过程^[5,11]。

2.1 PSGL-1 的分子结构

PSGL-1 是一种跨膜的糖蛋白分子,由 412 个氨基酸组成。胞外部分有 318 个氨基酸,其中富含丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸,跨膜结构域有 24 个氨基酸,C-末端的胞浆尾部有 70 个氨基酸。位于 NH₂-末端的第 46、第 48 和第 51 位的 3 个酪氨酸易被硫酸化^[5,11]。胞外部分的第 320 位的半胱氨酸恰好位于膜外,对于 PSGL-1 分子的二聚体形成起关键作用^[12]。PSGL-1 分子上的一些氨基酸可以通过“O”连接或“N”连接与相应的寡糖基团结合,在蛋白质的骨架上形成很多糖链。糖链的组成和结构对于 PSGL-1 的功能是十分重要的。

2.2 PSGL-1 与选择素的相互作用

作为选择素的配体,PSGL-1 的功能是通过与选择素的相互作用实现的。PSGL-1 最初是作为 P-selectin 的配体被发现的,随后体内和体外实验都证明,PSGL-1 是惟一与 P-selectin 具有高度亲和性的配体,抗 PSGL-1 的单克隆抗体 (PL1) 可以完全阻断血流状态下白细胞在表达 P-selectin 细胞上的滚动和静止状态下白细胞与表达 P-selectin 细胞的粘附。P-selectin 主要表达于激活的血管内皮细胞和血小板的表面,PSGL-1 与 P-selectin 的相互作用主要介导白细胞与血管内皮细胞的起始粘附,即介导白细胞的滚动过程^[6]。PSGL-1 与 P-selectin 的识别和作用需要酪氨酸的硫酸化,而与 E-selectin

作用则不需要^[13]。图2.是 P-selectin 与 PSGL-1 相互作用示意图。

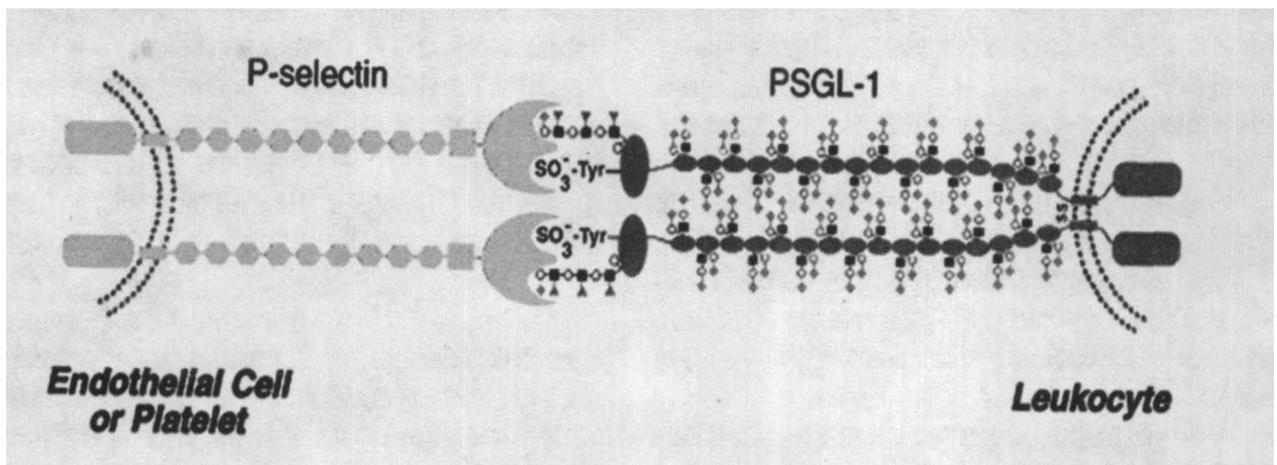


图2 P-selectin 与 PSGL-1 相互作用示意图

Fig 2 Diagram of interaction between P-selectin and PSGL-1

3 选择素分子与配体作用的研究

选择素及其配体相互作用可以用不同的实验手段来定量测量如:等离子共振(Surface Plasma Resonance, SPR)、流动腔(Flow Chamber)、微吸管(Micropipette)、原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM)、激光镊子(Laser Tweezers)等超灵敏力传感器。

3.1 等离子共振(Surface Plasma Resonance, SPR)

SPR 一种利用物理光学原理分析生物大分子间相互作用的生物传感分析技术,生物分子相互作用分析方法是基于表面等离子共振技术的一种生物分子相互作用分析方法。实验时,先将一种生物分子固定在生物传感芯片表面,将与之相互作用的分子溶于溶液或细胞提取液流过芯片表面,检测器能实时检测两者生物分子间的相互作用,并定量求出其相互作用强弱的结合常数和解离常数。

Nicholson 等用表面等离子共振(SPR)技术研究 L-selectin 与表达在高内皮静脉上的 glyCAM-1 分子的作用,游离态的单体 L-selectin 与固定在芯片上的 glyCAM-1 分子的解离常数(Kd)为 108 μ M, L-selectin 从 glyCAM-1 分子以较快的分离率分离 10s⁻¹,结合常数为 10⁵ M⁻¹ s⁻¹。^[14]

Mehta 等研究白细胞表面上的 PSGL-1 在 p-selectin 或在激活的内皮细胞上的滚动的作用,同样用表面等离子共振(SPR)技术测定游离态的单体 p-selectin 分子与固定在芯片上的 PSGL-1 的亲力和动力学常数,用含 lectin 和上皮样生长因子和 9 个 CR 与仅有 lectin 和上皮样生长因子与 PSGL-1 作用这两种分子与 PSGL-1 分子作用的动力学常数是一致的,其解离常数为 320 μ M,分离率(K_{off})是 1.4 s⁻¹结合率(K_{on})为 4.4 × 10⁶ M⁻¹ s⁻¹,得出 p-selectin 与 PSGL-1 有较高的结合率和分离率,这些性质对白细胞在血管内皮上的滚动是非常重要的^[15]。

E-selectin 表达在内皮细胞上,也是介导白细胞在血管内皮上滚动的重要粘附分子,E-selectin 不但能与 PSGL-1 分子作用,同时能与表达在骨髓细胞表面上的 ESL-1(E 选择素-1 糖蛋白)相互作用,Wild M K^[16]用表面等离子共振(SPR)技术

测定 E-selectin 与 ESL-1 相互作用的动力学和亲和力。结果表明有较快的分离率 4.6 s⁻¹和结合率为 7.4 × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹解离常数(Kd)为 62 μ M 与 L-selectin 与糖基化粘附分子作用相似。

3.2 平行流动腔技术(Flow Chamber)

Kaplanski,等第一次用平行流动腔技术研究分子间相互作用的动力学,研究了 E-selectin 与其配体的作用^[17],随后相继有 Puri, Lawrence 等学者用该方法研究了 L-selectin, p-selectin 等选择素与其配体的作用。^[18-20]

3.3 原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM)

随着 AFM 技术的迅速发展,在生命科学领域的应用日趋广泛,能以皮克牛顿(pN)的精确度直接测量生物分子间及分子内的作用力。

在分子水平对生物分子表面的各种相互作用进行测量,是原子力显微镜的一个十分重要的功能,这对于了解生物分子的结构和物理特性是很有用的。用 AFM 技术所研究的配体—受体反应的分子系统中, P-selectin 和 PSGL-1 相互作用力的研究以及键的寿命与作用力之间的关系,对 P-selectin/PSGL-1 相关作用的定量描述有重要意义。

Friet^[21]是最早用 AFM 系统对 P-selectin 和 PSGL-1 相互作用所形成的复合物断裂力进行研究。所采用分子系统中 P-selectin 是通过基因转染细胞表达获得的只有 6 个 CR 序列无跨膜的游离相分子, PSGL-1 也是通过转染而得到游离相分子。

与流动腔技术所测的系数比较,用 AFM 技术能够详尽分析单位时间力的关系和单分子间相互作用的随机性。在选择素与其配体动力学研究中,最早采用的是流动腔技术和微吸管技术且观察的对象是细胞之间作用,由于细胞表面的不规则和拓扑结构的复杂性,产生较多非特异性粘附现象,用 AFM 研究提纯蛋白分子的相互作用,能够减少非特异性,且较为方便和精确地测量分子间的相互作用力。但在分子提纯过程中分子的原始功能性可能有所影响。故 Hanley^[22]等用 AFM 技术探测 PSGL-1 和 P-selectin 的相互作用时,探针包被游离相的 P-selectin(souble P-selectin, sPs),而表达 PSGL-1 分子的单核粒细胞样本被固定在培养皿上,硅烷化的探针浸泡于抗

人 IgG/Fc 抗体,然后与带 IgG/Fc 片段的 P-selectin 结合,使 P-selectin 的 Lectin 区表达,以利于与白细胞上的 PSGL-1 相互作用。Marshall 等^[23]用 AFM 研究 P-selectin/PSGL-1 相互作用,发现了逆锁键的存在。

3.4 激光镊子(Laser Tweezers)

光具有动量,当一束汇聚的激光束照射在微粒上时,由于微粒对光的折射、反射和吸收将产生一个非常小的梯度力,这个梯度力将微粒束缚在激光焦点附近,起到了一个光学陷阱的作用。利用光镊技术可以实现对活细胞细胞器固定、悬浮和分选,对染色体的捕捉,对活的细胞内部的微粒进行精确的重新定位^[24]。

Rinko 用激光阱技术研究 P-Selectin 和 L-Selectin 与 PSGL-1 相互作用,PSGL-1 被化学耦联的方法包被在聚苯乙烯小球上,选择素包被在玻璃球上,PSGL-1 小球被光阱捕获并与玻璃小球接触使其上的分子相互作用形成键。移动小球施加一定的加载率直到键断裂。该实验发现断裂力随加载率增加而增大^[25]。

章燕等用激光阱技术研究了 P-选择素与 PSGL-1 相互作用的解离过程。通过研究力作用下 P-selectin/PSGL-1 键的解离,得到了在较低加载率($< 25\text{pNs}$)下键解离的断裂力分布,发现键的最可几断裂力随加载率而增加。^[26]

综上所述:用上述方法定量描述选择素分子与配体分子间相互作用,获得分子作用的动力学参数,使我们更深入地了解炎症反应中选择素粘附分子与配体间相互作用机理^[27]。

参考文献

- [1] Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins[J]. Cell, 1991,65:859-873
- [2] Kaplanski G, Farnier C, Tissot O, et al. Granulocyteendothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow[J]. Biophys. J., 1993,64:1922-33
- [3] McEver RP. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium[J]. Blood Cells, 1990,16:73-83
- [4] Ushiyama S, Laue TM, Moore KL, et al., Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin[J]. J. Biol. Chem, 1993,268:15229-37
- [5] McEver RP, Cummings R D. Cell adhesion in vascular biology: Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment[J]. J. Clin. Invest, 1997,100:485-492
- [6] Moore KL, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin[J]. J. Cell. Biol, 1995,128:661-71
- [7] Nicholson MW, Barclay AN, Singer MS. Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1[J]. J. Biol. Chem, 1998,273:763-70
- [8] Goda KT, Tanaka M, Monden M. Characterization of an apparently conserved epitope in E- and P-selectin identified by dual-specific monoclonal antibodies[J]. Eur. J. Immunol, 1999,29:1551-1560
- [9] 龚非力.医学免疫学[M].北京:科学出版社,2001:108-110
- [10] Yago T, Leppanen A, Qiu H, et al. Distinct molecular and cellular contributions to stabilizing selectin-mediated rolling under flow[J]. J. Cell Biol, 2002,158:787-799
- [11] Mehta P, Cummings RD, McEver RP. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1[J]. J. Biol. Chem, 1998,273:32506-13
- [12] Snapp KR, Craig R, Herron M. Dimerization of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) Required for Optimal recognition of P-Selectin[J]. J. Cell. Biol, 1998,142:263-270
- [13] Patel KD, Nollert MU, McEver R P. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils [J]. J. Cell. Biol, 1995,131:1893-902
- [14] Nicholson MW, Barclay AN, Singer MS, et al. Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent celladhesion molecule-1[J]. J. Biol. Chem., 1998,273:763-70
- [15] Mehta P, Cummings RD, McEver RP. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1[J]. J. Biol. Chem., 1998,273:32506-32513
- [16] Wild M K, Huang M C, Schulze-Horsel U, et al. Affinity, kinetics, and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1 [J]. J. Biol. Chem., 2001,276:31602-31612
- [17] Kaplanski G, Farnier CO, Tissot, et al. Granulocyteendothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow[J]. Biophys. J., 1993,64:1922-33
- [18] Puri KD, Springer TA. A Schiff base with Mildly Oxidized Carbohydrate Ligands Stabilizes L-selectin and not P-selectin or E-selectin Rolling Adhesions in Shear Flow [J]. J. Biol. Chem., March 8, 1996,271(10):5404-5413
- [19] Alon R, Chen S, Puri KD, et al. SpringerThe Kinetics of L-selectin Tethers and the Mechanics of Selectin-mediated Rolling[J]. J. Cell Biol., 1997,138:1169-1180
- [20] Lawrence MB, Kansas GS, KunkelEJ, et al. Threshold Levels of Fluid Shear Promote Leukocyte Adhesion through Selectins (CD62L, P, E) [J]. J. Cell Biol., 1997,136:717-727
- [21] Fritz JA, Katopodis G, Kolbinger F, et al. Force mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1998,95:12283-12288
- [22] Hanley W, Carty OM, Jadhav S. Single Molecule Characterization of P-selectin/Ligand Binding[J]. J. Biol. Chem., 2003,278:10556-10561
- [23] Marshall B, Long M, Piper JW, et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules[J]. Nature., 2003,423:190-193
- [24] 朱天津,冯秀舟,钱农.激光光镊对生物细胞操纵的研究[J].中国血液流变学杂志,2002,12(3):179-180
- [25] Linda J. Rinko, Michael B. Lawrence et al. The Molecular Mechanics of P- and L-Selectin Lectin Domains Binding to PSGL-1[J]. Biophys. J., 2004,86:544-554
- [26] 章燕,叶志义,霍波,等.应用光阱技术测量 P-selectin/PSGL-1 键解离的断裂力[J].生物医学工程学杂志 2005,22(5):961-965
- [27] 叶志义,全学军.用原子力显微镜研究炎症反应中粘附分子间相互作用[J].现代生物医学进展,2006,6(6):47-49