

多肽 LSARLAF 直接引发整合素活化及信号传导的研究 *

徐振陆 牛海霞 李 定 柴蔚然 张 琳 刘俊岭[△]

(上海交通大学医学院医学科学研究所生物化学与分子细胞生物学系 上海 200025)

摘要 目的 研究 LSA 引起信号传递以及 PLC 2 诱导的血小板聚集和分泌的作用。方法 通过酶联免疫吸附配体 - 受体结合及血小板聚集和分泌实验,研究 LSA 诱导血小板活化的作用及参与的信号分子。结果 LSA 引起了整合素 IIb 3 上 LIBS 表位表达明显增加,PLC 2 可能以一种酪氨酸活化依赖性的方式参与了这种信号传递。结论 LSA 引起的信号传递是由 $\beta 3$ 介导的,并且 LSA 可引起不依赖于聚集的活化剂的分泌,而这些活化剂能引发聚集依赖性 IIb 3 信号传递。

关键词 多肽 LSARLAF;整合素 IIb 3;信号传导

中图分类号 :Q75 ,Q78 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)06-1009-04

Peptide LSARLAF Directly Stimulate α IIb β 3 Activation and Outside-in Signaling*XU Zhen-lu, NIU Hai-xia, LI Ding, CHAI Wei-ran, ZHANG Lin, LIU Jun-ling[△]

(Department of Molecular Biology, College of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200025)

ABSTRACT Objective: To investigate the LSA-mediated signal transduction and to investigate PLC 2-induced platelet aggregation and secretion. **Methods:** LSA-induced platelet activation and signaling molecules involved were studied by enzyme-linked immunosorbent assay ligand - receptor binding and platelet aggregation and secretion experiments. **Results :** α IIb β 3 on the LIBS epitope expression increased significantly by LSA. PLC 2 tyrosine activation may be involved in this signaling. **Conclusion:** LSA-mediated signal transduction was mediated by the $\beta 3$. LSA could cause activator secretion which was not depend on the aggregation, and it could lead to aggregation activator-dependent α IIb β 3 signaling.

Key words: LSARLAF; Integrin α IIb β 3

Chinese Library Classification(CLC): Q75 ,Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)06-1009-04

前言

多肽激动剂 LSARLAF(LSA)在缺少从内向外信号传递信号的情况下可直接活化 IIb β 3^[1-4]。这一现象已经通过这种经固定化和液相纯化的受体复合体的实验得到证明^[2,3]。LSA 激活 α -IIb β 3 受体产生从外向内的信号传递,其中部分通过 IIb 介导参与颗粒释放,TxA2 和血小板聚集^[1-4]。LSA 刺激低表达 α IIb β 3 的血小板,其颗粒内容物无法释放出来,从而证明 LSA 引起释放的作用是 α IIb β 3 依赖性的^[1-4]。本实验研究发现在整合素 α IIb β 3 与纤维蛋白原的交联被阻断时,LSARAF 以一种 α IIb β 3 依赖的方式通过低水平的颗粒和血栓烷 A2 的释放启动信号传递,接着整合素 α IIb β 3 信号被继续传递并且放大,这种信号传递是依赖于释放活化剂引起的聚集。本研究通过研究 LSA 与整合素 α IIb β 3 信号传递的关系,以期探讨其机制做准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 ADP、三磷酸腺苷双磷酸酶购自 Sigma-Aldrich 公司,卵母细胞抗鼠 α IIb β 3 单克隆抗体 1B5 由 Bar-

ry S. Coller 博士惠赠。

1.1.2 实验动物 PLC 2 和 3 缺陷小鼠, FcR-chain-/- 小鼠和对照组小鼠购自 Taconic 公司。

1.1.3 主要仪器和设备 Eppendorf 5415R, 5804R 低温高速离心机(Germany), Beckman DU640 紫外分光光度计(Germany); 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); Thermo Multifuge 3SR+ 低温高速离心机(Germany), LAS-4000 化学发光成像分析系统(Japan) Tanon-Rad 电泳仪; 上海天能凝胶成像系统, Chrono-Log 血小板聚集仪(USA), 荧光分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 ATP 分泌的测量 ATP 分泌的测量是通过在生物发光聚集测定仪上用 CHRONO-LUME 试剂(Chrono-Log Corp., Havertown, PA)并按说明书操作来实现的。在血小板经 1200 rpm 搅动 4-6 分钟后,向每一支上机测试的玻璃管中加入 10 微升的荧光素酶 - 荧光素。测试荧光强度时的荧光设定为 $\times 0.001$ 。

1.2.2 LIBS 在纯化的 α IIb β 3 中的表达的测定 用竞争性 ELISA 测定 α IIb β 3 上的 LIBS 抗原表位,当给予 1 毫摩尔 / 升的多肽刺激时,若孔上经 EDTA 解离的 α IIb β 3 与 LIBS 抗体的

* 基金项目:国家自然科学基金(81030039 to J. L.), (81000204 to D. L.), 上海浦江计划(09PJ1406800 to J. L.)

作者简介:徐振陆(1984-),男,硕士研究生,主要研究方向:血栓止血信号通路

[△]通讯作者:刘俊岭,博士生导师, E-mail: jliujl@shsmu.edu.cn

(收稿日期:2011-10-05 接受日期:2011-10-28)

结合减少则显示在可溶性 α IIb β 3 上 LIBS 抗原表位的表达增加。每个得出的数值是四次测定的平均值加标准差,实验的结果以直方图的形式显示。

2 结果

2.1 α IIb β 3 上的 LIBS 抗原表位变化

通过用竞争性 ELISA 测定 α IIb β 3 上的 LIBS 抗原表位,发现 LSA 引起了整合素 α IIb β 3 上 LIBS 表位表达明显增加(表 1),从而证实 LSA 参与整合素 α IIb β 3 活化信号的放大。

2.2 不同浓度 LSA 刺激引发 PLC 的变化

LSA 和胶原引发的分泌依赖性聚集可能会使用相同的信号分子^[5,6],而 PLC 2 是胶原引发的 IIb 3 信号所必需的^[7,8],故本研究用 LSA 刺激 PLC 2^{-/-} 的血小板。无论给予任何剂量的 LSA 刺激,PLC 血小板同样没有 ATP 的分泌 x 的合成或聚集发生(图 1)。相似地,外源性 ADP 或纤维蛋白原也无法修复 PLC 血小板的聚集和 ATP 分泌,从而显示 PLC 不仅是颗粒的分泌所必需的,也是聚集和 ATP 分泌所必需的。这些数据证实 PLC 是由 LSA 引发的、IIb 3 介导的从外向内信号传递所必需的。

2.3 单克隆抗体 1B5 抑制了血小板聚集实验

表 1 LSA 引起纯化整合素 α IIb β 3 上的 LIBS 表位增加

Table 1 α IIb β 3 on the LIBS epitope expression was increased by LSA

添加物 a Additives a	D3 表位表达 b D3 epitope expression b (6)	LIBS-1 (5)	LIBS-6 (3)	PMI-1 (6)
No peptide	1.350±0.054	1.358±0.021	1.070±0.035	1.180±0.013
LSARLAF	0.721±0.047	0.602±0.062	0.481±0.039	0.599±0.044
FRALASL	1.402±0.050	1.247±0.023	1.024±0.071	1.140±0.026
RGDS	0.536±0.038	0.565±0.017	0.355±0.013	0.623±0.029
L10	0.839±0.032	0.720±0.021	0.589±0.018	0.733±0.036

注 a.添加的多肽的终浓度为 1 毫摩尔 / 升 b.用竞争性 ELISA 测定 α IIb β 3 上的 LIBS 抗原表位,当给予 1 毫摩尔 / 升的多肽刺激时,若孔上经 EDTA 解离的 α IIb β 3 与 LIBS 抗体的结合减少则显示在可溶性 α IIb β 3 上 LIBS 抗原表位的表达增加。每个得出的数值是四次测定的平均值加标准差

Note: aFinal peptide concentration was 1 mM. bThe competitive ELISA assay used for detection of expression of the LIBS epitopes on IIb 3 is based on a previously published technique (see LK Jennings et al Thromb Haemost 2000; 84:1095-102). In this assay decreased binding of the LIBS antibody to wells coated with EDTA-dissociated α IIb β 3 indicates increased expression of the LIBS epitope on the soluble IIb 3 receptor when treated with peptide. Each reported value is the mean of quadruplicate determinations + standard deviations of the data. The number of experiments is shown in parentheses

LSA 是否通过与 IIb 3 的配体交联启动经由 IIb 3 信号放大引起的一个自身催化性应答?本实验在给予经 1B5(仓鼠抗小鼠 IIb 3 单克隆抗体)预处理的小鼠血小板低水平的 LSA 刺激后,研究结果显示,这种单克隆抗体可以通过封闭纤维蛋白原与 IIb 3 的结合来阻止血小板聚集。和给予 IgG 预处理的对照组相比,1B5 可抑制由低浓度 LSA 引起的聚集同时也抑制了大部分的 ATP 分泌和 TxA2 合成。同时,用低水平的 LSA 刺激血小板,在无聚集发生时仍可引起大约两倍于静息态水平的 ATP 和 TxA2 释放($P<0.05$)(图 2)。EDTA 可以与 IIb 3 与配体结合时所需的二价阳离子相螯合,借此来抑制聚集的发生。在经 EDTA 处理后,LSA 活化的血小板分泌的麦帕克林是静息态血小板的 25%($P<0.01$),而其产生的 TxA2 是静息态血小板的 2.7 倍($P<0.05$)(图 2)。所以 LSA 在血小板没有发生聚集时仍可直接引起颗粒分泌和 TxA2 合成。释放的这些活化剂据推断可能启动了聚集信号,并且由其产生的 IIb 3 信号放大了一种自身催化的分泌 / 聚集反应。其原因也可能为 IIb 3 从外向内信号的传递所经由的信号通路总是相同的。

3 讨论

七个氨基酸 (Leu-Ser-Ala-Arg-Leu-Ala-Phe) 构成的短肽

LSARLAF(LSA)可以活化血小板整合素 IIb 3,且 LSA 的活化作用可在 ADP 和 TxA2 释放后被加强。LSA 以一种 IIb 3 依赖性的方式引起血小板聚集和聚集非依赖性阿尔法颗粒内容的释放,并且这种多肽在与 PGE1 共同作用时才引起释放。

由整合素 IIb 3 介导的从外向内信号的其中一个最早期事件是酪氨酸激酶 Syk 被 Src 家族激酶的磷酸化活化^[9,10]。由整合素 IIb 3 介导的信号传递同时伴随有整合素 3 亚单位和调节蛋白 SLP 的酪氨酸磷酸化^[11]。后者是与调节蛋白 ADAP(粘附和脱颗粒促进调节者蛋白)和 Gads(Shc 下游的 Grb2 相关性调节蛋白)组成性偶联的^[12-15]。这些调节蛋白作用的结果是 PI3K 和 PLC2 的活化和细胞骨架的重构^[11,16-18]。本研究通过竞争性 ELISA 法证实 LSA 引发的信号传递经 IIb 3 介导(表 1),并且 PLC 由 LSA 引发、IIb3 介导的从外向内信号传递所必需的(图 1)。然而这种信号的传递依赖于受体与纤维蛋白原的交联,也就是说,在没有受体和纤维蛋白原结合时,IIb 3 介导信号的传递与 LSA 引发的信号通路不同。因此,配体引起的受体成簇可能不是引发 IIb 3 信号所必需的。通过这种模型,LSA 与 IIb 3 结合激活了受体,并且活化的受体可能会发生寡聚化^[19,20]。活化的受体或寡聚化受体都可能引发信号的传递,并能被受体与纤

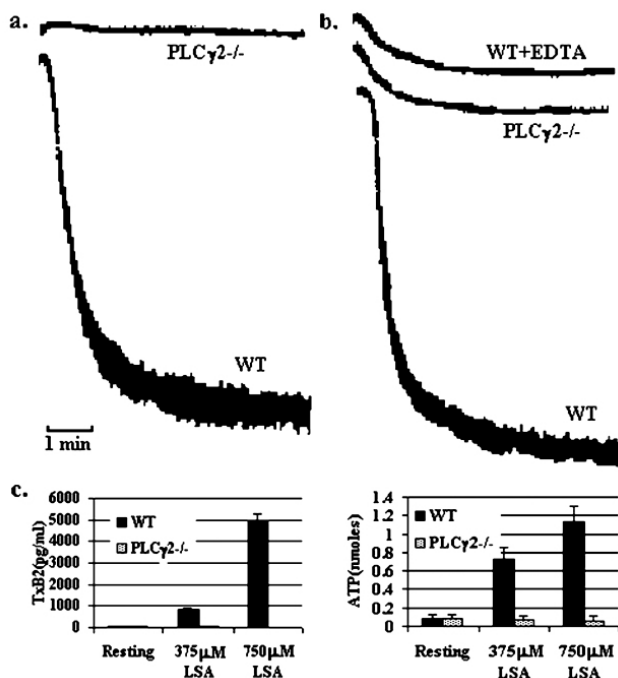


图1 PLC 2是 LSA 介导的血小板分泌和聚集所必需的。在低浓度(375 微摩尔 / 升)(a, c)和高浓度(750 微摩尔 / 升)(b, c) LSA 刺激下 PLC 2^{-/-} 血小板不发生聚集 ATP 分泌或 TxA₂ 合成。因为高浓度的 LSA 会引起低水平的凝集(血小板-血小板之间不依赖于纤维蛋白原的相互作用)所以高浓度 LSA 刺激的血小板同样给予 5 毫摩尔 / 升的 EDTA 做预处理。这个实验增进了血小板聚集而非凝集的认识。高浓度的 LSA 对 PLC 2^{-/-} 血小板产生的作用是凝集而不是聚集。外源性纤维蛋白原或 ADP 无法修复 ATP 释放和聚集, 以上数据来自三个实验。柱状图代表平均值± 均值标准误

Fig.1 PLC 2 function is required for LSA-induced secretion and platelet aggregation. PLC 2^{-/-} platelets did not aggregate, secrete ATP or produce TxA₂ to a low (375 M) (a, c) or high (750 μM) (b, c) level of LSA. Platelets stimulated with a high level of LSA were also stimulated in the presence of 5mM EDTA because a high level of LSA causes a low level of agglutination (platelet-platelet interaction that is not dependent on fibrinogen). This test facilitates recognition of a platelet response as aggregation rather than agglutination. The response of the PLC 2^{-/-} platelets to a high level of LSA was agglutination, not aggregation. Exogenous fibrinogen or ADP did not restore aggregation of ATP secretion (not shown). Data were obtained from three tests. Bars represent means ± S.E.M.

维蛋白原的交联放大(图 2)。因此这些机制可能共同参与启动和放大 IIb 3 介导的信号。

本实验结果为进一步研究整合素 IIb 3 胞内段特定氨基酸序列与血小板活化及信号转导之间的相互关系奠定了基础, 对于整合素 IIb 3 介导的双向信号转导链的组成及作用模式有待进一步的研究并加以完善。

参考文献 (References)

- [1] Musci MA, Hendricks TLR, Motto DG, et al. Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases [J]. J. Biol. Chem, 1997, 272: 11674-11677

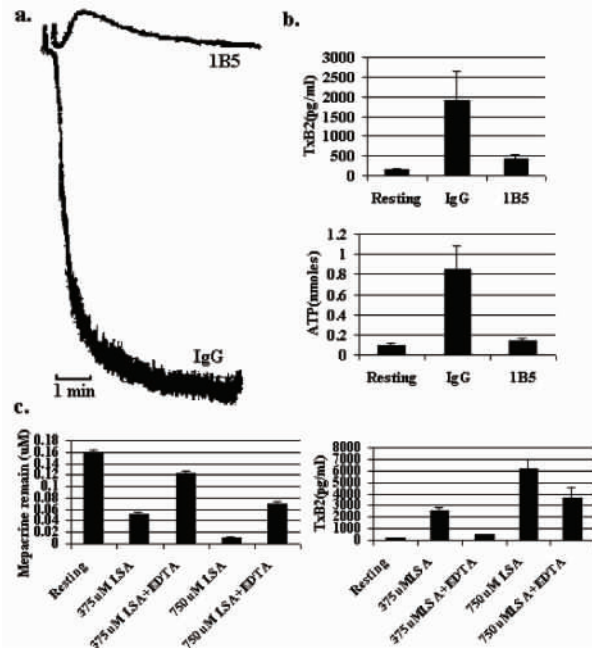


图2 LSA 刺激的血小板引起了 ATP 的分泌和 TxA₂ 合成, 而这并不依赖 IIb 3 与纤维蛋白原的交联。在低浓度(375 微摩尔 / 升) LSA 刺激前, 野生型血小板与单克隆抗体 1B5 (10 微克 / 毫升) 或对照的仓鼠 IgG (10 微克 / 毫升) 一起孵育 10 分钟。单克隆抗体 1B5 抑制了血小板聚集 (a) 和几乎所有的 ATP 分泌以及 TxA₂ 合成 (b)。血小板在不发生聚集的情况下发生了两倍于静息态水平的 ATP 分泌及 TxA₂ 合成, 因此证实了低浓度 LSA 在不发生聚集的情况下可以直接引起分泌 (P<0.05)。我们通过用 5 毫摩尔 / 升的 EDTA 而不是单克隆抗体 1B5 来阻止经麦帕克林处理的血小板的聚集来重复这个实验。在预先经 EDTA 作用后, 低浓度 LSA 刺激的血小板分泌了 25% 的致密颗粒内容物 - 这可以通过麦帕克林荧光的损失来反映出来 (P<0.01) (c)。这些血小板同样合成了约 2.7 倍于静息态水平的 TxA₂ (P<0.05)

Fig.2 LSA stimulation of platelets causes some ATP secretion and TxA₂ production that is not dependent on IIb 3 crosslinking by fibrinogen. Wild type platelets were incubated with the mAb 1B5 (10 μg/ml), a hamster monoclonal anti-mouse IIb 3 antibody, or control hamster IgG (10 μg/ml) for 10 minutes before stimulation with a low concentration (375 M) of LSA. The mAb 1B5 inhibited platelet aggregation (a) and most, but not all ATP secretion and TxA₂ production (b). The platelets secreted about twice the resting level of ATP and TxA₂ in the absence of aggregation (P<0.05) thereby demonstrating that a low level of LSA can directly cause secretion in the absence of aggregation. This experiment was repeated using mepacrine loaded platelets²⁷ treated with 5mM EDTA rather than mAb 1B5 to prevent aggregation. Platelets stimulated with a low level of LSA in the presence of EDTA secreted about 25% of their dense granule contents as reflected by the loss mepacrine fluorescence (P<0.01) (c). These platelets also produced about 2.7 folds more TxA₂ than the resting platelets (P<0.05)

- [2] Obergfell A, Judd BA, del Pozo MA, et al. The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin αIIbβ3 to the actin cytoskeleton [J]. J. Biol. Chem, 2001, 276: 5916-5923
- [3] Da Silva AJ, Li Z, de Vera, et al. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein

- 76 and modulates interleukin 2 production [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, 94: 7493-7498
- [4] Griffiths EK, Penninger JM. Communication between the TCR and integrins: role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap [J]. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, 14: 317-322
- [5] Oberfell A, Judd BA, del Pozo MA, et al. The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin α IIb β 3 to the actin cytoskeleton[J]. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 5916-5923
- [6] Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, et al. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain[J]. *FEBS Lett.*, 1997, 413: 255-259
- [7] Cho MJ, Liu J, Pestina TI, Steward SA, et al. The roles of IIb 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A2, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation[J]. *Blood*, 2003, 101: 2646-2651
- [8] Wang D, Feng J, Wen R, et al. Phospholipase C 2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors [J]. *Immunity*, 2000, 13: 25-35
- [9] Weiguo Z, Sommers CL, Burshtyn DN, et al. Essential role of LAT in T cell development[J]. *Immunity*, 1999, 10: 323-332
- [10] Wang D, Feng J, Wen R, et al. Phospholipase C 2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors [J]. *Immunity*, 2000, 13: 25-35
- [11] Pivniouk V, Tsitsikov E, Swinton P, et al. Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking adaptor protein SLP-76[J]. *Cell*, 1998, 94: 229-238
- [12] Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, et al. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103 (2): 229-238
- [13] Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, et al. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 1987, 69: 1712-1720
- [14] Takayama H, Nakamura T, Yanagi S, et al. Ionophore A23187-induced protein-tyrosine phosphorylation of human platelets: possible synergism between Ca^{2+} mobilization and protein kinase C activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1991, 174: 922-927
- [15] Ezumi Y, Kodama K, Uchiyama T, et al. Constitutive and functional association of the platelet collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor-chain complex with membrane rafts [J]. *Blood*, 2002, 99: 3250-3255
- [16] Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, et al. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents[J]. *Br J of Haemat*, 1995, 89: 380-385
- [17] Dorahy DJ, Berndt MC, Burns GF. Capture by chemical crosslinkers provides evidence that integrin α IIb β 3 forms a complex with protein tyrosine kinases in intact platelets [J]. *Biochem J*, 1995, 309: 481-449
- [18] Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, et al. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor chain complex on human platelets [J]. *J Exp Med*, 1998, 188: 267-276
- [19] Li R, Babu CR, Lear JD, et al. Oligomerization of the integrin IIb3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 12462-12467
- [20] Li R, Mitra N, Gratkowski H, et al. Activation of integrin IIb 3 by modulation of transmembrane helix associations [J]. *Science*, 2003, 300: 795-798