

用原子力显微镜研究炎症反应中粘附分子间相互作用^{*}

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,白细胞在血液流动动力和粘附分子的作用下在血管内皮上的滚动,是白细胞从流动的血液中浸润、迁移到炎症部位整个过程的第一步。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,其中P选择素分子(P-selectin)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。原子力显微镜技术能定量分析P-selectin/PSGL-1相互作用的动力学反应。

关键词:P选择素;P-选择素糖蛋白配体-1;原子力显微镜

中图分类号:Q-336 **文献标识码:**A

Measuring Molecule Adhesion Forces In Inflammatory Processes with Atomic Force Microscope (AFM)

YE Zhi-yi, QUAN Xue-jun

Chongqing institute of technology, Chongqing 400050, China Chongqing University, Chongqing 400044, China

ABSTRACT: Leukocytes roll along the endothelium of postcapillary venules in response to inflammatory and thrombotic processes, which is, under hydrodynamic shear forces, the first step in directing leukocytes out of the blood stream into sites of inflammation, and mainly resulted from the interaction between P-selectin on the endothelial cell membrane and P-selectin glycoprotein ligand-1(PSGL-1) on the leucocyte microvilli. Kinetics of P-selectin/PSGL-1 interaction was made a quantitative analysis by using atomic force microscope (AFM).

Key words: P-selectin; PSGL-1; Atomic force microscopy (AFM)

1 前言

在免疫反应中,白细胞与内皮细胞的粘附起着重要的作用。细胞粘附分子间相互作用可用反应动力学参数来描述,如反应速率、反应亲和性等。正是这些参数决定着受体-配体反应发生的可能性、快慢、以及键的强弱和寿命。表达在白细胞微绒毛上的PSGL-1与表达在内皮细胞膜上的P-selectin的相互作用,导致血液流动动力学作用下白细胞滚动,这正是白细胞从流动的血液中浸润、迁移到炎症部位整个过程的第一步。选择素与配体分子亲和性强且结合速率非常快,二者结合所形成的复合体能承受较高的拉力且能控制其结合而不至于使其自身的分子从细胞膜拔出,表明选择素及其配体耦合了力学和生化的特征;同时这对分子的生物化学性质以及相应结构和功能已描述的很清楚,是在分子水平上研究反应动力学及粘附力进行机制的一对典型分子系统^[1]。

那么如何定量地描述P-selectin和PSGL-1的相互作用?以及其相互作用后所形成键的强弱和键的寿命?

白细胞在激活的内皮细胞上滚动,可以认为是白细胞上PSGL-1与内皮细胞P-selectin相互作用的动力学过程,其核心是相互作用时键的形成和键的解离,而键的形成和解离与时间的关系就是反应动力学,表现为分子间结合时正反应率和零力时键解离时负反应率,以及键在外力作用下的负反应率。那么,要了解P-selectin和PSGL-1相互作用所形成键的

强弱,就得用力学的方法定量地测量键的断裂力,之所以可用力学方法来测量化学反应,是因为作为反应产物的分子键的功能,恰恰是为两个细胞提供物理连接,因此反应的结果便可从力学的角度来检测^[2]。细胞粘附可以用不同的实验手段来定量测量如:流动腔(Flow Chamber)^[3]、微吸管(Micropipette)^[4]、离心机(Centrifugation)^[5]、原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM)^[6-9]或激光镊子(Laser Tweezers)^[10]等超灵敏力传感器来测量。

2 原子力显微镜的工作原理及特点

AFM是在扫描隧道显微镜(Scanner tunnel microscope, STM)的基础上发展起来的。1982年,第一台STM问世。1986年由Binnig Quate和Gerber推出AFM^[11]。AFM是通过探针与被测样品之间的相互作用力(原子力)来获得物质表面形貌的信息。AFM工作原理是将探针装在一弹性微悬臂的一端,微悬臂的另一端固定,当探针在样品表面扫描时,探针与样品表面原子间的排斥力会使得微悬臂轻微变形,这样,微悬臂的变形就可以作为探针和样品间排斥力的直接量度。一束激光经微悬臂的背面反射到光电检测器,可以精确测量微悬臂的微小变形,这样就实现了通过检测样品与探针之间的原子排斥力来反映样品表面形貌。

随着AFM技术的迅速发展,在生命科学领域的应用日趋广泛,主要涉及以下几方面:一是能在液体等多种环境中得到

* 基金项目:重庆市科委自然科学基金资助(编号 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

(收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-04-15)

生物分子及细胞等样品的表面三维图像;二是能以皮克牛顿(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。生物分子间作用力的大小一直为人们所关注。原子力显微技术问世以来,许多研究者将其用于分子间的力学测定^[12-14]。

1994年 Moy 等人利用原子力显微技术的单分子力谱方法研究了生物素分子和亲和素分子间的特异性相互作用^[15]。他们在实验过程中,将一层生物素分子固定于氮化硅针尖上,亲和素分子通过特异性识别作用与生物素分子结合。用表面修饰有生物素分子的琼脂糖颗粒与结合了亲和素分子的针尖接触,当针尖进一步逼近琼脂糖颗粒时,亲和素分子的另两个结合位点与生物素分子发生配体-受体识别并特异性作用而结合;当针尖远离琼脂糖颗粒时,这种粘附力使悬臂发生偏转,随着悬臂弯曲度增大,针尖与颗粒间相互作用受到不断拉伸,直至这种作用断裂,由探针的偏曲程度及弹性系数可知作用力的大小。

基于 AFM 技术的单分子力谱方法对生物素分子和亲和素分子间的特异性相互作用力的研究成功,其它的一些生物分子系统也相继被研究,如抗原/抗体^[16-18]、受体/配体^[9,18,19]与蛋白之间的作用^[20]等。

3 AFM 技术对 P-selectin 和 PSGL-1 相互作用的研究

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以及将来在相关药物评价等方面有重要意义。

Fried^[9]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。

具体实验:硅烷化后的探针和玻片与亲和素浸泡,然后探针与生物素化的 PSGL-1 作用;玻片与生物素化的 P-selectin 作用,使 PSGL-1 和 P-selectin 分子分别包被到探针和玻片表面。AFM 实验时探针与样本接触的时间为 40ms,最大压力为 500 pN 。通过加 EDTA 络合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子从而阻断 P-selectin 与 PSGL-1 相互作用的实验,以及无功能化的 PSGL-1 包被的探针与 P-selectin 相互作用因缺少 Lex 而无粘附反应的空白对照实验等一系列特异性验证实验,说明用 AFM 能够测量 PSGL-1 和 P-selectin 的特异性反应。

将特异反应的粘附力做直方图,显示一峰值,用高斯方程拟合得最可几力,键的解离力的大小没有一固定值,但随回拉速度的增加而连续性的增加直到 165 pN 。实验中不同加载速度与对应的解离力用贝尔模型方程来分析,通过拟合可得零力条件下的解离率 $k_{r0} = 0.02 \text{ s}^{-1}$,贝尔常数 $a = 0.25 \text{ nm}$ 。作者用这些参数和回拉速度 2800 nm/s 作 Monte Carlo 模拟,模拟的断裂力的分布与实验结果一致。

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^[21]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 (soluble 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。

AFM 实验时探针回拉加载速度从 500 nm/s 到 30000 nm/s ,探针与样本接触时间为 0.001s,其目的是减少多个粘附事件的发生。实验结果中将粘附力统计做直方图(在给定的速度下)可得一个单独峰值的分布。作者由此认为这是由一个 P-selectin/PSGL-1 复合体解离所得,力单峰分布同时也表明实验中非特异反应没有显著的作用。该实验结果得出 P-selectin/PSGL-1 的解离力为 175 pN ,零力条件下解离速率为 0.20 s^{-1} ,同时作者用 Monte Carlo 模拟键解离,所得的力分布与实验一致。

Marshall 等^[22]用 AFM 研究 P-selectin/PSGL-1 相互作用,发现了逆锁键的存在,该文在 Nature 杂志上发表。具体方法是将探针浸泡在 PL2(PSGL-1 的捕获抗体)溶液里过夜,PL2 通过物理吸附于探针表面,然后捕获 PSGL-1 分子,因为 PL2 结合 PSGL-1 的重复序列,使其与 P-selectin 结合的位点表露。对应的 P-selectin 分子通过脂质体的制备和脂双层铺展,其跨膜的 P-selectin 锚定于脂双层上,使与 PSGL-1 结合位点的 Lectin 区向上展露。针尖与样本接触压力为 20 pN ,探针以 250 nm/s 的速度回拉并停留在一定位置,保持力的恒定直到键的断裂,这时所记录的键持续时间就是键的寿命。实验结果表明 P-selectin/PSGL-1 相互作用所成的键在外力作用下有逆锁键产生,即在一定力的范围如 10-20 pN 随着力的增加键的寿命增加而负反应率 k_r 减少,但当外力超过 20 pN 以后这一现象消失,即随着力的增加键寿命降低而负反应率 k_r 增加。

综上所述:用 AFM 方法定量描述 P-selectin 和 PSGL-1 分子间相互作用以及键的寿命与作用力之间的关系,使我们更深入地了解蛋白质分子相互作用的机理。并为将来在相关药物的设计、药效的评估、药物靶向性等方面提供重要的方法和有价值的数

参考文献

- [1] 龙勉. 选择子/配体相互作用的二维反应动力学[C]. 生物力学最新进展. 北京:高等教育出版社,2001:17-25
- [2] 朱承. 细胞粘附过程中的化学反应动力学与力学[C]. 生物力学最新进展. 北京:高等教育出版社,2001:31-46
- [3] Kaplanski, G., C. Famarier, O. Tissot, et al. Granulocyte endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow[J]. Biophys. J. 1993, 64: 1922-33
- [4] Chesla, S. E., P. Selvaraj, C. Zhu. Measuring two-dimensional re-

- ceptor- ligand binding kinetics by micropipette[J]. Biophys. J. 1998, 75: 1553- 72
- [5] Piper, J. W., R. A. Swerlick, C. Zhu. Detemining force dependence of two - dimensional receptor- ligand binding affinity by centrifugation [J]. Biophys. J. 1998, 74: 492- 513
- [6] Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, et al. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM [J]. Science. 1997b. 276: 1109- 1112
- [7] Rief, M., M. Gautel, A. Schenmel, et al. The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin III domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy[J]. Biophys. J. 1998a. 75: 3008 - 3014
- [8] Rief, M., F. Oesterhelt, B. Heymann, et al. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy [J]. Science. 1997a. 275: 1295- 1297
- [9] Fritz, J. A., G. Katopodis, F. Kolbinger, 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
- [10] Thoumine, O., P. Kocian, A. Kottelat. Short- tem binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis[J]. Eur. Biophys. J. 2000, 29: 398- 408
- [11] Binnig, G., C. F. Quate, C. Gerber. Atomic force microscope [J]. Phys. Rev. Lett. 1986, 56: 930- 933
- [12] Dammer, U., M. Hegner, D. Anselmetti. Specific antigen/ antibody interactions measured by force microscopy [J]. Biophys. J. 1996, 70: 2437- 2441
- [13] Allen, S., X. Chen, J. Davies, et al. Detection of antigen- antibody binding events with the atomic force microscope [J]. Biochemistry. 1997, 36: 7457- 7463
- [14] Hinterdorfer, P., H. J. Gruber, K. Schilcher, et al. Antibody - antigen unbinding forces measured by force microscopy using antibodies bound to AFM tips via a specially designed flexible crosslinker [J]. Biophys. J. 1995, 68: 139a. (Abstr.)
- [15] Moy, V. T., E - L. Florin, H. E. Gaub. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors [J]. Science. 1994a. 266: 257- 259
- [16] Hinterdorfer, P., W. Baumgartner, H. J. Gruber, et al. Detection and localization of individual antibody- antigen recognition events by atomic force microscopy [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93: 3477- 3481
- [17] Ros, R., F. Schwesinger, D. Anselmetti, et al. Antigen binding forces of individually addressed single- chain Fv antibody molecules [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998, 95: 7402- 7405
- [18] Willemsen, O. H., M. M. E. Snel, K. O. van der Werf, et al. Simultaneous height and adhesion imaging of antibody- antigen interactions by atomic force microscopy [J]. Biophys. J. 1998, 75: 2220- 2228
- [19] Dammer, U., O. Popescu, P. Wagner. Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy [J]. Science. 1995, 267: 1173- 1175
- [20] Boland, T., B. D. Ratner. Direct measurement of hydrogen bonding in DNA nucleotide bases by atomic force microscopy [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92: 5297- 5301
- [21] Hanley, W., O. M. Carty, S. Jadhav. Single Molecule Characterization of P- selectin/Ligand Binding [J]. J. Biol. Chem. 2003, 278: 10556- 10561
- [22] Marshall, B., M. Long, J. W. Piper, et al. Direct observation of catch bonds involving cell- adhesion molecules [J]. Nature. 2003, 423: 190- 193

(上接第 57 页)

4 小结

中医学中的脾与肾在生长发育与衰老、饮食物的消化吸收、血液生成以及水液代谢等诸多方面均有密切的联系,都涉及西医的多个系统和器官,尤其表现在神经、内分泌、免疫系统等方面。对于脾肾相关证型的实验研究目前大多集中于对脾肾阳虚证、脾肾阴虚证的探讨。通过综述,我们认为对脾肾相关证型的研究还可进一步完善提高。如在造模方法上应尽可能接近中医理论的病因,在观察指标的确定上应根据中医理论选择相关性、特异性强的指标。中医学中的脾与肾在生长发育、饮食物的消化吸收以及水液代谢等诸多方面均有密切的联系,故我们可以拓宽思路,从不同角度对脾、肾的关系加以研究。

参考文献

- [1] 白桦,刘晓力,宋雅芳,等.脾肾阳虚证红细胞免疫功能改变的初步探讨[J].中国中西医结合杂志,1996,(1):41
- [2] 童光东,袁静,刘惠玲,等.温补培元方对脾虚与脾肾阳虚模型细胞免疫功能的实验研究[J].中国中西医结合消化杂志,2001,(1):8-10
- [3] 黄春林,杨霓芝,刘旭生,等.加味阳和汤治疗实验性大鼠膜性肾

病脾肾阳虚型的实验研究[J].中国中医药信息杂志,2001,(8):33-34

- [4] 吴玲霓,雷妮妮,杨冬娣,等.肾虚、脾虚造动物免疫超微结构的比较研究[J].中医药研究,1999,(3):39-40
- [5] 高守泉,王勇庆,彭淑珍,等.脾肾相关型的实验研究[J].湖南中医药导报,1998,(12):26-28
- [6] 吕爱平,李德新,崔家鹏,等.脾肾相关的分子生物学基础——脾肾阳虚证模型大鼠自由基损伤的比较研究[J].辽宁中医杂志,2001,(3):189-190
- [7] 杜标炎.肾阳虚造模及补肾中药对大鼠免疫功能的影响[J].广州中医药大学学报,1996,(1):37-39
- [8] 李凤歧,武文斌.脾肾阳虚证与血清 VT3 浓度关系研究[J].天津中医学院学报,1991,(1):44-45
- [9] 陈德珍,魏睦新,顾迂春,等.脾肾阴虚证患者血清铜锌含量的变化[J].辽宁中医杂志,1999,(7):291
- [10] 陈德珍,魏睦新,顾迂春,等.脾肾阴虚证血清氧自由基损伤初探[J].华人消化杂志,1998,(8):660-661
- [11] 汪受传,王明明,姚惠陵.胎怯肾脾两虚证与内分泌激素关系的研究[J].辽宁中医杂志,1996,(3):100-101
- [12] 季凤清,王秀琴,史小林,等.实验性脾虚证大鼠肾上腺形态学有细胞化学研究[J].首都医科大学学报,1997,(1):25-27