# 利用显性负模型研究整合素β3胞浆段RGT序列对 信号转导的调控机制

陶岚岚 黄建松 吕媛靖 周玉兰 崔雄鹰 阮 铮 奚晓东\* (上海交通大学附属瑞金医院,上海血液学研究所、医学基因组国家重点实验室,上海 200025)

摘要 该研究探讨整合素β3胞浆段RGT序列在整合素信号转导中的作用。利用IL-2R胞外 段和跨膜段(Tac)与整合素β3胞浆段全长或截短序列构建Tac-β3嵌合体,即Tac-β3和Tac-β3Δ759,使 其分别在表达GPIbIX、整合素αIIbβ3的CHO细胞株(IbIX/IIbIIIa-CHO细胞株)中稳定表达(即IbIX/ IIbIIIa-CHO/Tac-β3、IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株(IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3、IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株)。利用竞争酶联免疫法对Tac-β3嵌合体 进行定量,观察IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株)。利用竞争酶联免疫法对Tac-β3嵌合体 进行定量,观察IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株)。利用竞争酶联免疫法对Tac-β3嵌合体 质上的伸展情况(代表外向内的信号转导); Co-IP研究Tac-β3嵌合体、β3与下游信号分子Src的结合 情况。结果发现:竞争酶联免疫法证实了两个细胞株的Tac-β3嵌合体表达都高于野生型β3,保证了 Tac-β3嵌合体对内源性β3在结合胞内分子中的显性负效应; IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株在固相 化纤维蛋白原上的黏附伸展能力受到抑制,而IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株在固相化纤维 蛋白原上的黏附伸展能力并未受到明显影响。Co-IP结果显示: Tac-β3能结合内源性Src,而胞浆段 RGT序列缺失的Tac-β3Δ759则不与内源性Src结合。选择性地破坏Tac-β3的Src结合能力即足以去 除其对外向内信号转导的显性负效应,从而表明:整合素β3尾端RGT序列与Src的相互作用在这一 信号转导通路中起决定性的作用。

关键词 显性负;整合素αIIbβ3;竞争酶联免疫测定;蛋白质相互作用;信号转导

血小板是血栓形成过程中的重要参与者, 而整 合素αIIbβ3作为血小板表面丰富的膜糖蛋白, 是不 同激动剂诱导血小板活化、聚集的最终共同通路。 整合素αIIbβ3是由αIIb和β3两种I型跨膜糖蛋白以非 共价键组成的异源二聚体, 其缺乏或功能不全可以 导致血小板止血功能受到不同程度的影响, 临床上 称为血小板无力症<sup>[1]</sup>。整合素αIIbβ3目前被认为是 抗血栓治疗的理想靶点, 因此, 对整合素αIIbβ3及其 相关分子机制的深入研究在血小板相关疾病的防治 等领域具有广泛的应用前景<sup>[2]</sup>。

突变分析是对整合素β3胞内段氨基酸序列在 信号传导中作用的主要研究方法。但由于血小板是 一种特殊的细胞碎片,没有细胞核,因而很难对其进 行基因操作。由此,选用一种细胞模型模拟血小板 以研究整合素β3的功能变得极其必要。在中国仓鼠 卵巢细胞(CHO)基础上建立的IbIX/IIbIIIa-CHO细胞 株,可经由GPIb/IX诱导整合素αIIbβ3活化,模拟完 整的双向信号转导;也可通过与固相化纤维蛋白原 的相互作用而传递外向内信号,为深入研究整合素 αIIbβ3活化过程中的信号转导的分子基础提供了有效的工具<sup>[3]</sup>。本研究在IbIX/IIbIIIa-CHO细胞株基础上,构建表达有IL-2R的胞外段和跨膜段(Tac)以及整合素β3胞浆段嵌合体的显性负细胞模型,观察整合素β3胞浆段及其与胞内分子的相互作用在整合素αIIbβ3介导的信号转导中的作用。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 载体和质粒 pCMV-IL2R、pCDM8-β3由 美国伊利诺大学医学院杜小平教授惠赠。

 1.1.2 细胞株 联合表达人类血小板GPIb/IX和 整合素αIIbβ3的CHO细胞株(IbIX/IIbIIIa-CHO)由美 国伊利诺大学医学院杜小平教授惠赠。

收稿日期: 2011-10-12 接受日期: 2011-12-09

国家高技术研究发展计划(863)(No.2006AA02A245)、国家自然科 学基金(No.81070414)和上海市科委国际合作项目(No.09410706800)资助 项目

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 021-64370045-610616, E-mail: xi\_xiaodong@shsmu.edu.cn

1.1.3 培养基 细胞培养基F12、胎牛血清(FBS) 购自Gibco公司。

1.1.4 主要试剂 Src单抗购自Cell Signaling公司,分泌抗IL-2R的单抗7G7B6的杂交瘤细胞株HB-8784购自ATCC公司,IL-2R的单抗(适用于Western blot)购自R&D公司,抗整合素β3的抗体SZ-21以及 抗整合素αIIb的抗体SZ-22由江苏省血液研究所阮 长耿教授惠赠,抗整合素β3胞浆段羧基末端抗体Ab 762和抗整合素β3 759位截短体抗体Ab 759为本实 验室,生产,异硫氰酸荧光素(FITC)或辣根过氧化物 酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG购自Biosource公司,蛋白 酶抑制剂Cocktail和PMSF购自Roche公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 Tac-β3嵌合体表达载体的构建 通过PCR技 术从pCDM8-β3质粒中扩增出β3胞内片段,并向编码 整合素β3胞浆段特定氨基酸的相应cDNA的不同位置 引入终止码及酶切位点(CMV-IL2R Tac-β3正向引物: 5'-GGA AGC TTC TCA TCA CCA TCC ACG ACC-3', 反向引物: 5'-GCC TCG AGT TAA GTG CCC CGG TAC GTG A-3'; CMV-IL2R Tac-β3Δ759正向引物: 5'-GGA AGC TTC TCA TCA CCA TCC ACG ACC-3',反向引 物: 5'-TAC TCG AGC TAG TAC GTG ATA TTG GTG A-3'), 构建至IL-2R表达载体pCMV-IL2R中, 即将编 码IL-2R的膜外段和跨膜段(Tac)的cDNA与编码整合 素β3胞浆段序列的cDNA连接,得到Tac-β3胞内全长 片段嵌合体(以下简称Tac-β3)和Tac-β3胞浆段759位截 短突变型嵌合体(以下简称Tac-β3Δ759)表达质粒,其 DNA序列经测序证实。

1.2.2 稳转细胞株的建立和鉴定 利用阳离子脂 质体转染法,将嵌合体表达质粒(Tac-β3、Tac-β3Δ759) 分别与带Hygromycin抗性基因的质粒(pcDNA3.1/ Hygro(+))共转染IbIX/IIbIIIa-CHO细胞。转染后48 h 加入筛选抗生素Hygromycin(400 µg/mL)继续培养 以建立稳转细胞株。收集IbIX/IIbIIIa-CHO、IbIX/ IIbIIIa-CHO/Tac-β3及IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759 细胞,加入抗β3抗体(SZ-21)及抗IL-2R抗体(7G7B6), 37 ℃孵育1 h,用PBS洗涤后加入FITC标记的抗鼠二 抗,于37 ℃避光孵育30 min。经PBS洗涤后在流式 细胞仪上检测细胞荧光强度。通过挑选表达阳性的 细胞并在体外长期培养最终获得稳定表达株。

1.2.3 免疫印迹法检测Tac-β3嵌合体的表达 裂解稳转细胞提取总蛋白,用固相化的抗Tac抗体 (7G7B6)或抗整合素β3抗体(SZ-21)沉淀细胞裂解 液,用抗整合素β3 C末端抗体(Ab 762)和抗整合素β3 759位截短体抗体(Ab 759)检测沉淀复合物中的Tacβ3嵌合体(Tac-β3和Tac-β3Δ759)。

消化、收集细胞(约10<sup>7</sup>细胞), 经PBS洗涤后用 200 µL预冷的RIPA裂解液(Sigma公司, 含1 mmol/L PMSF, 0.1% Protease Inhibitor Cocktail, 1 mmol/L EDTA)重悬细胞沉淀, 冰上静置30 min, 其间每10 min 轻轻振荡一次, 12 000 r/min, 4 ℃离心15 min, 收集 上清即细胞裂解液(细胞总蛋白)。蛋白定量后分装, -80 ℃保存。取含500 μg蛋白的细胞裂解液, 加入50 μL 预先经RIPA洗涤的Protein G琼脂糖珠子(sc-2002, Santa Cruz Biotechnology), 4 °C旋转孵育1 h后离心, 将蛋白上清转移到一个新的离心管中。将Tac抗体 7G7B6(10 µg)加入预处理过的细胞蛋白上清中,4℃ 旋转混匀孵育1h;再加入50 µL经RIPA洗涤过的 Protein G琼脂糖珠子,4°C旋转孵育过夜。隔日将混 悬液4 ℃、1 000×g离心5 min, 收集琼脂糖珠子--抗 原抗体复合物,经RIPA洗涤后溶解在SDS-PAGE样 品缓冲液中,100 ℃煮沸10 min,离心后取上清做免 疫印迹检测。

1.2.4 竞争性酶联免疫法<sup>[4]</sup>测定细胞膜蛋白抗原表 (1)鼠IgG的固相化:将经蛋白A亲和层析纯 位 化的正常小鼠IgG用0.1 mol/L、pH9.6的NaHCO3稀 释(终浓度为250 µL/L), 以200 µL/孔加入96孔板中, 4°C包被过夜。次日用PBS洗涤后以20 mg/mL的 BSA室温封闭2h; (2)酶联免疫反应: 将已用4%多 聚甲醛固定的细胞100 μL与单抗(7G7B6或SZ-21) 100 µL于室温孵育3 h, 用含0.05% Tween-20的PBS 洗涤3次,计数后调整浓度至2×10<sup>6</sup>/mL。将细胞以 100 μL/孔加入已包被有鼠 IgG的微孔中,同时每孔 加入酶联羊抗鼠IgG(1:10 000稀释) 100 μL, 置37 °C 孵育1h后,用含0.05% Tween-20的PBS洗涤6次。每 孔加入TMB显色液100 µL并以2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反 应, 在波长450 nm测定光吸收值; (3)标准曲线制作及 表位数计算: 倍比稀释的IgG纯品((16~8 000) ng/mL) 以100 µL/孔加入已包被有鼠IgG的微孔。酶联抗体 的加入、洗涤、显色、测定等均同前,并绘制标准 曲线。每个细胞的平均抗原表位数量按以下公式 计算:

每孔游离IgG量(g)×阿伏伽德罗常数(6.023×10<sup>23</sup>/mol)

1.2.5 细胞在固相化纤维蛋白原上的伸展、黏附试 验 将20 µg/mL的纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)以 50 μL/孔加入96孔板中,4℃包被过夜。经PBS洗涤 后用20 mg/mL的BSA室温封闭2 h。收集IbIX/IIbIIIa-CHO细胞、IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞及IbIX/ IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞,以PBS洗涤2遍,以8×10<sup>5</sup>/mL 的密度悬浮于1×Tyrode's缓冲液(137 mmol/L NaCl、 2 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mmol/L glucose, 5 mmol/L HEPES, 0.1% BSA, pH7.4)中,室温静置30 min。取细胞悬液,以100 μL/孔 加入纤维蛋白原包被的孔中, 置于37 ℃、5% CO₂细 胞培养箱中孵育1.5 h,镜下观察对照组IbIX/IIbIIIa-CHO细胞伸展良好时终止孵育, PBS洗涤3次, 以去 除未稳定黏附的细胞。在伸展试验中,用1%多聚甲 醛/PBS固定黏着在板上的细胞, 经PBS洗涤后在显微 镜下观察、拍照。在黏附试验中, PBS洗涤去除未黏 附的细胞后,其稳定黏附的细胞经过PNPP(3 mg/mL PNPP、1% Triton X-100、100 mmol/L NaAc, pH5.0) 底物比色法检测。在酶标仪405 nm波长读取D值, 以未经洗涤的细胞孔作为对照, 计算黏附细胞百分 比。

1.2.6 Co-IP和Western blot检测RGT序列与Src的相 互作用 用200 μL预冷的RIPA裂解液裂解细胞, 冰上静置30 min,每10 min轻轻振荡一次,12 000 r/min 4 ℃离心15 min后收集上清。取500 µg上清, 加入50 µL 预先经RIPA洗涤的Protein G琼脂糖珠子, 4°C旋转 孵育1h后离心,将蛋白上清转移到一个新的离心 管中。将Src抗体(4 μg, Cell Signaling公司)与50 μL Protein G琼脂糖珠子室温旋转孵育1h后,用500 µL 硼酸钠(0.2 mol/L, pH9.0)重悬, 加入交联剂DMP<sup>[5]</sup>至 终浓度为20 mmol/L。将上述混合液室温旋转孵育 30 min, 5 000 r/min离心5 min去上清, 加入0.2 mol/L乙 醇胺终止反应。在乙醇胺溶液中封闭2 h后,用RIPA 洗涤3次后, 重悬于50 µL RIPA中, 即完成了抗体的 固相化(抗体与Protein G珠为共价键偶联)。将预处 理的蛋白上清与固相化的Src抗体混合,4℃旋转孵 育2h, 收集琼脂糖珠子--抗原抗体复合物, 经预冷 的RIPA洗涤后溶解在SDS-PAGE样品缓冲液(不含 β-ME)中, 100 °C煮沸10 min, 离心后取上清做Western blot.

2 结果

#### 2.1 嵌合体表达载体的构建和测序

为了在CHO细胞中表达Tac-β3嵌合体,本实验 以IL-2R的胞外段和跨膜段的真核表达载体pCMV-IL2R为基础,在编码IL-2R胞外段和跨膜段氨基酸序 列所对应的DNA的3'端分别插入编码野生型和759 位截短突变型整合素β3胞浆段氨基酸序列的DNA, 组成了Tac-β3嵌合体的真核表达质粒,并测序鉴定 (图1)。结果表明,我们成功构建了:(1)编码IL-2R胞 外段和跨膜段氨基酸序列以及野生型整合素β3胞 浆段氨基酸序列的质粒,即Tac-β3表达载体;(2)编码 IL-2R亚基的胞外段和跨膜段氨基酸序列以及759位 截短突变型整合素β3胞浆段氨基酸序列的质粒,即 Tac-β3Δ759表达载体。

#### 2.2 稳转细胞株的建立

采用特异性识别整合素β3的单抗(SZ-21)和特 异性识别IL-2R(即Tac)的单抗(7G7B6)检测稳转细 胞株上整合素β3和Tac-β3的表达。流式细胞术检测 结果(图2)表明, IbIX/IIbIIIa-CHO细胞表达整合素β3 亚基但不表达Tac-β3嵌合体; IbIX/IIbIIIa-CHO/Tacβ3及IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞上除原有的 IbIX/IIbIIIa-CHO细胞上表达的整合素β3亚基外,还 能有效表达Tac-β3嵌合体。此外,流式细胞术检测 到图形呈基底较窄的高尖的细胞峰型,表明该细胞 株为蛋白表达均一的单克隆细胞株。

#### 2.3 免疫印迹法检测细胞膜蛋白的表达(定性)

用于免疫印迹检测的抗整合素β3羧基末端的 抗体(Ab 762)和抗整合素β3 759位截短体抗体(Ab 759)均为本实验室制备。为了证实抗体的有效性, 图3A显示了上述两种抗体识别原核表达的GST标记 的整合素β3胞浆蛋白(GST-β3Δ759、GST-β3)的免疫 印迹结果。结果表明, Ab 762可特异性识别整合素 β3胞浆段完整的GST-β3融合蛋白(即GST-β3),而不 能识别759位截短突变型的GST-β3融合蛋白(即GSTβ3Δ759); Ab 759可特异性识别759位截短突变型的 GST-β3融合蛋白(即GST-β3Δ759),而不能识别整合 素β3胞浆段完整的GST-β3融合蛋白(即GST-β3)。

为了在分子水平鉴定已获得的分别表达含完整 整合素β3胞浆段的Tac-β3和759位截短突变型的Tacβ3Δ759稳转细胞株,实验设计用抗IL-2R抗体(7G7B6) 分别从IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3和IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-



## 图1 Tac-β3和Tac-β3Δ759表达载体DNA测序图 (仅显示β3羧基末端)

Fig.1 DNA sequencing of recombinant constructs expressing Tac-β3 and Tac-β3Δ759(C-terminus of β3)

β3Δ759细胞裂解液中对Tac-β3嵌合体(Tac-β3或Tacβ3Δ759)进行免疫沉淀,并分别用特异性识别整合 素β3羧基末端抗体(Ab 762)和特异性识别整合素 β3 759位截短突变型的抗体(Ab 759)对免疫沉淀的 Tac-β3嵌合体进行鉴定。图3B的免疫印迹结果表明: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞株上仅表达Tac-β3,而 不表达Tac-β3Δ759; IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细 胞株上仅表达Tac-β3Δ759, 而不表达Tac-β3。

#### 2.4 竞争性酶联免疫法定量分析细胞膜蛋白

定量酶联免疫测定法为饱和竞争反应,抗原和 抗体的浓度对方法的准确度和灵敏度至关重要。因 此,本实验对酶联抗体浓度和鼠IgG包被浓度都进行 了检测和优化,最终采用1:10 000稀释度的酶标抗体



3. 7G7B6(antibody specific for Tac)

用特异性识别Tac的抗体(7G7B6)、特异性识别整合素β3亚基胞外段的抗体(SZ-21)经流式细胞术检测稳转细胞表面Tac-β3嵌合体和野生型β3的 表达。非特异性鼠IgG作为阴性对照。

Expression level of Tac- $\beta$ 3 chimeras and  $\beta$ 3 was examined by flow cytometry with an antibody specific for Tac (7G7B6), and an antibody specific for extracellular domain of  $\beta$ 3 subunit (SZ-21), respectively. Non-specific mouse IgG was used as negative control.

```
图2 流式细胞术检测Tac-β3嵌合体和野生型β3在稳转细胞株上的表达
Fig.2 Expression of Tac-β3 chimeras and β3 in stably transfected cells by FACS
```

(7076, Cell Signaling公司)和250 μL/L标准IgG(5415, Cell Signaling公司)的包被浓度。本研究中所有酶联免疫测 定均采用同一批号抗体及相应稀释度。图4的剂量反 应标准曲线显示了在250 μL/L的抗体包被浓度下,在 96孔板中加入倍比稀释的系列浓度(16~8 000 μg/L)的 游离抗体和1:10 000稀释度的酶标二抗后,吸光度 值随游离抗体数量增加的变化趋势。由于游离抗体 与包被抗体竞争结合酶标二抗,但只有与包被抗体 结合的酶标二抗经洗涤后仍留在96孔板中参与显色 反应,因此随着游离抗体的增加,吸光度值呈现下降

趋势。从图4剂量反应曲线可知:10个倍比稀释度 (16~8 000 µg/L)的游离标准鼠IgG可导致吸光度值 在0.10~1.75范围内变化,其中16~500 µL/L五个浓度 范围内吸光度值在线性良好。

为了比较稳转细胞株上β3和Tac-β3的表达数 量,本实验基于抗原和抗体是1:1比例结合的理论 基础,通过检测细胞表面饱和结合抗体(SZ-21或 7G7B6)的数量,估算细胞表面抗原表位(β3或IL-2R) 的数量。研究设计将一定数量的细胞和过量抗体 共同孵育,使细胞表面所有抗原表位均特异性结合



A:利用原核表达的GST标记的整合素β3胞浆蛋白鉴定抗整合素β3胞浆段第759位截短型的抗体(Ab 759)和抗整合素β3胞浆段羧基末端的抗体 (Ab 762)的有效性; B:利用免疫共沉淀和免疫印迹法分析稳转细胞株中Tac-β3或Tac-β3Δ759的表达。

A: identification of the cleavage site-specific antibody (Ab 759) and an antibody specific for the COOH terminus of  $\beta$ 3 (Ab 762) by using GST-tagged integrin  $\beta$ 3 cytoplamic tails; B: analysis of the expression of Tac- $\beta$ 3 or Tac- $\beta$ 3 $\Delta$ 759 in stably transfected CHO cell lines by immunoprecipitation and Western blot.

#### 图3 免疫印迹法鉴定稳转细胞株上Tac-β3或Tac-β3△759的表达 Fig.3 Identification of expression of Tac-β3 or Tac-β3△759 in stably transfected cells by Western blot





相应抗体,然后将抗原表位饱和结合抗体的细胞和 1:10 000稀释度的酶标抗体一同加入250 µL/L抗体 包被的反应杯中,进行吸光度检测。根据测得的吸 光度值和剂量反应标准曲线,计算反应杯中所有细 胞抗原表位结合的抗体的总浓度。再根据反应杯 中反应体积、IgG的标准分子量、阿伏伽德罗常数 和反应杯中加入的细胞数量,即可计算出每个细胞 上的抗原表位数。本测定体系已测定并优化出与 细胞孵育的单抗饱和浓度分别为SZ-21 50 μg/mL和 7G7B6 16.5 μg/mL。与不同单抗孵育后的细胞测得 吸光度值在线性范围内所需细胞浓度为2×10<sup>6</sup>/mL。 不同单抗(SZ-21和7G7B6)在稳转细胞株上的抗原表 位(β3、IL-2R)测定结果如表1所示。结果显示:在表 达Tac-β3嵌合体的稳转细胞(IbIX/IIbIIIa-CHO/Tacβ3Δ759及IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3)上, Tac-β3嵌合体 的表达量大于野生型整合素β3的表达量,这种量上 的表达优势为Tac-β3嵌合体与野生型β3竞争下游信 号分子提供了基础。

表1	稳转细胞株中不同抗体(SZ-21/7G7B6)的抗原表位定量分析( $n=3, \bar{x}\pm$ SD)
~~ 1	

Table 1 Quant	titative analysis on epitope amounts of	different antibodies (SZ-21/7G7B6) in th	e stably transfected cells( $n=3, \bar{x}\pm SD$ )
单抗	IbIX/IIbIIIa-CHO	IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3∆759	IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3
Antibody	IbIX/IIbIIIa-CHO	IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759	IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3
SZ-21	(4.548 2±2.098 8)×107	(5.579 4±2.376 4)×107	(6.395 8±2.936 9)×107
7G7B6	NA	(2.147 3±0.759 4)×10 <sup>8</sup>	$(1.701\ 2\pm 0.318\ 3) \times 10^8$
NIA 工社/公司			

NA: 无法检测。

NA: not available.

#### 2.5 细胞在固相化纤维蛋白原上的黏附、伸展试验

已知IbIX/IIbIIIa-CHO细胞表达人类血小板糖 蛋白Ib/IX复合物和整合素αIIbβ3,是整合素αIIbβ3 介导的信号转导的细胞模型。外向内信号转导一个 重要的功能是介导细胞在细胞外基质上的稳定黏附 和伸展。将IbIX/IIbIIIa-CHO、IbIX/IIbIIIa-CHO/Tacβ3Δ759及IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3消化收集,以相同 的细胞数量加入纤维蛋白原包被的孔中进行孵育。 孵育终止后PBS洗涤以去除未黏附的细胞,经多聚 甲醛固定后,光镜下观察细胞在固相化纤维蛋白原 上的黏附和伸展状况。如图5所示IbIX/IIbIIIa-CHO 在固相化纤维蛋白原上黏附的细胞数量适中,细胞 伸展良好,呈梭型或不规则形;IbIX/IIbIIIa-CHO/Tacβ3黏附细胞数量明显少于IbIX/IIbIIIa-CHO/Tacβ3Δ759在固相化纤维蛋白原上的黏附和伸展状况均与对照IbIX/IIbIIIa-CHO细胞相似,黏附细胞数量适中且伸展良好。结果表明:Tac-β3的表达使IbIX/IIbIIIa-CHO细胞在固相纤维蛋白原上的黏附和伸展受到抑制,而携带β3胞浆段截短型突变的Tac-β3Δ759嵌合体的表达并不影响该细胞株在固相纤维蛋白原上的黏附和伸展功能。

为了精确测量稳定黏附在固相纤维蛋白原上的细胞百分比,以未经PBS洗涤孔为对照,用PNPP 底物比色法检测PBS洗涤后残留在纤维蛋白原包被 孔中的碱性磷酸酶活性。研究结果表明:各细胞株 经PNPP比色法测得的D值和对照组D值的比值与 镜下观察结果一致,IbIX/IIbIIIa-CHO细胞与IbIX/ IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞的黏附量均远远高于 IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞(图6)。因此,与IbIX/



A: IbIX/IIbIIIa-CHO细胞株; B: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株; C: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞株。 A: IbIX/IIbIIIa-CHO; B: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759; C: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3.

图5 Tac-β3嵌合体的表达对细胞在固相化纤维蛋白原上的黏附和伸展的影响 Fig.5 Effects of Tac-chimeras on integrin-dependent cell adhesion and spreading on immobilized fibrinogen



A: IbIX/IIbIIIa-CHO细胞株; B: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞株; C: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞株。

A: IbIX/IIbIIIa-CHO; B: IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759; C: IbIX/ IIbIIIa-CHO/Tac-β3.

- 图6 定量检测Tac-β3嵌合体的表达对细胞在在固相化纤维 蛋白原上稳定黏附的影响(n=3, x̄±SD)
- Fig.6 Quantitative analysis of the effects of Tac-chimeras on stable cell adhesion on fibrinogen( $n=3, \bar{x}\pm SD$ )

IIbIIIa-CHO细胞相比,表达含完整整合素β3胞浆段的Tac-β3嵌合体的IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞在固相纤维蛋白原上的黏附、伸展功能明显受损;但表达缺失整合素β3胞浆段羧基端RGT序列的Tac-β3Δ759 嵌合体的IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞在固相纤维蛋白原上的黏附、伸展功能未受明显影响。

### **2.6 Co-IP和Western blot**检测RGT序列与下游信 号分子Src的相互作用

为研究RGT序列与下游信号分子Src相互作用 的分子机制,我们用Src抗体进行Co-IP,并用特异 性识别β3和Tac(即IL-2R)的单抗分别对细胞裂解液 和Co-IP得到的免疫复合物中的β3和Tac-β3嵌合体 进行免疫印迹检测,分析Src与β3或Tac-β3嵌合体的 相互作用。如图7A所示,IbIX/IIbIIIa-CHO、IbIX/



A:免疫印迹法检测各稳转细胞株上β3和Tac-β3的表达,Src和actin作为细胞裂解液的内参;B:免疫共沉淀和免疫印迹法分析整合素β3、Tac-β3 嵌合体与Src的相互作用。用Src单抗对各稳转细胞株的裂解液进行Co-IP制备免疫复合物,并分别用特异性识别β3胞外段的单抗(SZ-21)和特异 性识别Tac的单抗(即IL-2R单抗)对免疫复合物中的整合素β3和Tac-β3嵌合体进行检测。Src作为免疫复合物的内参。

A: detection of  $\beta$ 3 and Tac- $\beta$ 3 chimeras in the lysates of stably transfected cell lines by Western blot. Actin and Src were used as internal references of lysates; B: analysis of the interaction between integrin  $\beta$ 3 and Src as well as the interaction between Tac- $\beta$ 3 and Src by immunoprecipitation and Western blot. An antibody specific for the extracelluar domain of integrin  $\beta$ 3 (SZ-21) and an antibody specific for Tac (IL-2R) were used for the detection of integrin  $\beta$ 3 and Tac- $\beta$ 3 chimeras in the immune complex precipitated by anti-Src antibody. Src was used as internal reference of IP complex.

图7 免疫共沉淀和免疫印迹法分析分析整合素β3胞浆段RGT序列与Src的相互作用 Fig.7 Analysis of the interaction between the RGT sequence of integrin β3 and Src by immunoprecipitation and Western blot

IIbIIIa-CHO/Tac-β3△759 和 IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3 三株细胞的β3和Src的表达水平相同; IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759和IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3两株细胞的 Tac-B3嵌合体的表达水平也相同,而IbIX/IIbIIIa-CHO 细胞株没有表达Tac-β3嵌合体。Src抗体Co-IP得到 的免疫复合物的免疫印迹分析结果显示(图7B)IbIX/ IIbIIIa-CHO、IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3∆759两 株 细胞与Src结合的β3的量一致,并且都大于在IbIX/ IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞中与Src结合的β3的量; 在 IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞中未检测到与Src结 合的Tac-β3Δ759, 但在IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3细胞中 能检测到与Src结合的Tac-β3。IbIX/IIbIIIa-CHO/Tacβ3Δ759细胞株Src抗体Co-IP得到的免疫复合物中 仅能检测出β3, 而无法检测出Tac-β3Δ759, 提示Tacβ3Δ759缺失了C端RGT序列,失去了与Src相互作用 的能力。IbIX/IIbIIIa-CHO细胞株与Src抗体Co-IP得 到的免疫复合物中不仅能检测出β3,还同时检测出

Tac-β3, 提示含有C端RGT序列的Tac-β3可保留与Src 相互作用的能力。

#### 3 讨论

在正常生理状态下,血管壁受损后血小板在局 部可发生黏附和聚集,形成血小板血栓,即止血过 程。但在动脉血栓性疾病过程中,血小板聚集可形 成阻塞性血小板血栓,导致心肌梗死和中风。作为 血小板膜上的主要蛋白,整合素αIIbβ3是血小板聚 集过程的最终共同通路,目前被认为是抗血栓治疗 的理想靶点。整合素αIIbβ3受体抑制剂(如阿昔单抗、 埃替巴肽、替罗非班等)可阻断整合素αIIbβ3的胞外 受体功能区与配体的结合,进而抑制信号转导和血 小板聚集,但在一定条件下会因影响患者正常止血 过程导致出血危险增高<sup>[6]</sup>。若要避免此类不利因素, 选择性阻断信号转导通路而不是配体/受体结合应 该是合乎逻辑的考虑。因此,对血栓性疾病治疗靶 点的研究,逐渐由胞外段向胞内段转移,集中在整合 素αIIbβ3介导的信号转导及其分子基础上。

静息状态下,血小板膜上的整合素αIIbβ3呈弯曲结构,配体结合位点处于"隐蔽"状态,与配体的亲和力较低。当激动剂与相应受体结合后,细胞骨架蛋白talin的头部FERM结构域中的β3结合位点暴露,通过与β3亚基锚定在细胞膜上的N<sup>744</sup>PLY<sup>747</sup>结构域的结合,使维持整合素αIIbβ3稳定状态的D<sup>723</sup>-R<sup>995</sup>盐键断裂。整合素αIIbβ3的胞外结构从弯曲状态变为伸展状态,使其与配体的亲和力增高,主要表现在血小板的初期黏附和第一相聚集<sup>[16]</sup>,即发生内向外的信号转导。配体与整合素结合后,整合素αIIbβ3 发生集簇形成粘着斑(focal adhesion)<sup>[17]</sup>,随后通过磷酸化β3胞内段的Y<sup>747</sup>、Y<sup>759</sup>磷酸化,活化信号蛋白(如Src、FAK等),改变胞内钙离子浓度等,调控血小板的稳定黏附和伸展以及第二相的聚集、释放、血块回缩等,即外向内信号传导<sup>[18]</sup>。

目前,已确定整合素β3胞内不同区段参与,调 控了血小板活化的双向信号传导。经过大量突变分 析得知整合素β3的胞质尾区对整合素功能起到重要 影响,譬如,缺乏胞质尾区的整合素β3对配体的结 合力下降,导致下游信号传导分子的活性受损。仅 是发生在β3的752残基上单个S到P的突变就会引起 αIIbβ3双向信号传导受损<sup>[19]</sup>,最终导致血小板机能 不全。β3胞内段747和759位点酪氨酸残基的磷酸 化阻止了calpain对β3胞质尾区的切割,是血小板伸 展及血块回缩所必需的过程<sup>[20]</sup>。活化的血小板中, calpain可选择性地对β3胞浆段T<sup>741</sup>、T<sup>747</sup>、F<sup>754</sup>和Y<sup>759</sup> 位点进行切割。迄今, calpain对αIIbβ3的切割在血小 板生理中的作用尚未明确。

整合素β3双向信号传导的完成与其胞内蛋白的作用密切相关,现阶段已证实许多胞内蛋白可与整合素胞内段结合,其中某些蛋白可与大部分的整合素结合,例如talin、α-actinin、filamin、FAK等; 而另一些则特异地与整合素αIIbβ3相互作用,例如 CIB、Src、β3-endonexin。而在静息血小板中与整 合素β3亚基结构性结合的Src激酶在外向内信号传导过程中对血小板功能有重要的调节作用<sup>[21]</sup>。因而, 在整合素β亚基结合蛋白中Src受到特别的瞩目。近 来研究表明,非受体酪氨酸激酶Src通过其SH3区与 整合素β3羧基端最后三个氨基酸(<sup>760</sup>RGT<sup>762</sup>)相互作 用而发生组成性结合<sup>[9]</sup>。血小板在静息状态下, Src 及其调节激酶Csk与整合素αIIbβ3的β3亚基胞浆段 组成性结合,但整合素αIIbβ3活化后Csk与整合素 αIIbβ3分离,随后Src中Y<sup>529</sup>去磷酸化及Y<sup>418</sup>磷酸化, 此时Src发生活化,并招募酪氨酸激酶Syk,该招募的 过程主要是通过Src氨基末端的SH2区域和A区与β3 尾端最后28个氨基酸相互作用介导。Src和/或Syk的 磷酸化底物包括SLP-76、ADAP、c-Cbl(接合分子)、 Vav(一种Rac鸟苷三磷酸酶)及一些影响肌动蛋白重 新分布的蛋白分子<sup>[21]</sup>。Src已被证实参与血小板外 向内信号传导,因此深入了解calpain切割RGT序列 后的β3胞质尾区对此信号传导过程的影响十分重 要。

为进一步研究下游分子Src在整合素β3介导 的信号转导中所起的作用,我们试图引入突变蛋 白,观察其对细胞功能的影响。但血小板无核且寿 命短,导致通过转染突变体对其进行细胞功能的研 究无法实现。有文献表明,在CHO基础上建立的 IbIX/IIbIIIa-CHO细胞株中,经由GPIb/IX可诱导整 合素αIIbβ3活化及双向信号转导,为深入研究整合 素αIIbβ3活化过程中的信号转导提供有效的工具<sup>[3]</sup>。 而其与固相化纤维蛋白原的相互作用可激发外向内 信号转导。已有研究者对IbIX/IIbIIIa-CHO细胞中 表达的整合素β3进行各种截短型突变,通过观察表 达不同截短型突变的细胞功能改变情况,研究整合 素β3胞浆段各序列在信号转导中所起的作用[10]。但 这种截短型突变细胞株中所产生的细胞功能的改 变,无法排除是由于截短直接造成的整合素β3空间 构象的改变而引起的,即无法肯定功能改变完全是 由于整合素β3胞内段丧失了与其相互作用分子结合 的氨基酸位点所致。

为克服上述模型存在的不足,我们采用了以 CHO细胞为基础形成的另一种细胞模型,即显性 负细胞模型。这种方法是在IbIX/IIbIIIa-CHO细胞 基础上构建IL-2R胞浆段和跨膜段(Tac)及野生型 或突变型整合素β3胞浆段的嵌合体。Tac-β3嵌合 体借助IL-2R胞外段和跨膜段锚定在胞膜上,由于 缺少β3胞外段不能结合配体,因此本实验中建立的 Tac-β3嵌合体本身无信号转导功能。但Tac-β3嵌 合体中含有完整的或缺失了RGT序列的整合素β3 胞内段氨基酸序列,因而Tac-β3嵌合体的β3部分具 备与野生型β3胞浆段竞争全部或部分胞内蛋白的 能力。Calderwood等<sup>[11]</sup>曾利用显性负细胞株(IbIX/ IIbIIIa-CHO/Tac-β3W739A 和 IbIX/IIbIIIa-CHO/Tacβ3L746A细胞株),以研究W<sup>739</sup>和L<sup>746</sup>两位点在整合素 β3与talin结合中的作用。至于Tac-β3嵌合体是否能 与野生型β3竞争性结合胞内蛋白并抑制相应的信号 转导,取决于细胞膜上Tac-β3嵌合体与野生型β3表 达的数量关系。有研究表明, 当Tac-β3嵌合体表达 低于野生型β3时, Tac-β3嵌合体并不表现出显性负 作用,而是富集在粘着斑处。只有当Tac-β3嵌合体 表达量是野生型β3的1~10倍时,才能够有效地竞争 抑制野生型β3介导的细胞信号转导[12]。为了确定在 IbIX/IIbIIIa-CHO细胞株中稳转了Tac-β3嵌合体的细 胞株是显性负细胞株,我们利用竞争酶联免疫测定 对表达于细胞膜的Tac-β3嵌合体和野生型β3进行定 量分析。分析结果表明,在细胞膜上Tac-β3嵌合体 的表达比野生型β3的表达具有足够的数量优势,为 达到竞争抑制和显性负作用提供了基础。

在细胞功能实验中我们证实了IbIX/IIbIIIa-CHO/ Tac-β3细胞在代表外向内信号转导的固相化纤维蛋 白原上的稳定黏附和伸展功能受损较为严重,表明 过表达的Tac-β3可以达到竞争抑制和显性负作用。 而IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759细胞的固相化纤维 蛋白原上的黏附和伸展功能未受明显影响,提示过 表达的Tac-β3Δ759并不能抑制野生型β3介导的外向 内信号转导功能。有文献报道, Src与β3胞浆段组成 性地结合,并且Src在整合素αIIbβ3的外向内信号转 导中起关键的作用<sup>[9,13]</sup>。为了了解Tac-β3Δ759不能 抑制野生型β3的外向内信号转导功能的分子机制, 我们联合使用免疫共沉淀与免疫印记法, 检测Tacβ3 嵌合体(包括Tac-β3和Tac-β3Δ759)与Src的相互作用。结果显示, Tac-β3Δ759由于缺失了C末端RGT序 列,丧失了与Src作用的结合位点,保留了野生型整 合素β3介导的外向内信号转导和相应的细胞在固相 纤维蛋白原上的黏附伸展功能,提示仅取消对Src的 显性负作用即可影响整合素β3介导的细胞功能,这 也充分证明了Src/β3相互作用在外向内信号转导中 的中心作用。在上述显性负细胞模型中, Tac-β3可 与野生型β3竞争包括Src在内的诸多下游信号分子, 而缺失了RGT序列的Tac-β3Δ759失去了与Src的结 合位点,使野生型β3保留了与Src的结合。该模型不 存在截短体突变造成B3构象改变而影响信号转导的 可能性,在研究整合素β3胞浆段序列的信号转导上 具有独特的优越性。进一步分析带有整合素β3胞浆 段及其不同突变体的Tac-β3嵌合体与胞内信号分子 相互作用的整体情况,可对信号转导的分子机制作 出更为详尽的解释。

综上所述,我们对整合素β3羧基末端RGT氨基 酸序列与血小板活化和信号传递之间的相互关系和 分子机制已经有了一些了解。但还有很多问题亟待 解决,如在内向外的信号传递过程中,除talin之外, cGMP、PKG、Raf、MEK、ERK等也先后参与并 形成信号传递链<sup>[14-15]</sup>,但是,目前尚不清楚还有哪些 分子处于ERK至整合素αIIbβ3之间以构成这一完整 的信号传递链;并且这些蛋白质与整合素β3相互作 用的准确部位尚不清楚。因此对于整合素β3介导的 双向信号传导链的组成及作用模式的完整了解有待 于进一步的研究。

#### 参考文献 (References)

- Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. J Thromb Haemost 2003; 1(7): 1628-36.
- 2 Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. Nat Rev Drug Discov 2003; 2(1): 15-28.
- 3 Zaffran Y, Meyer SC, Negrescu E, Reddy KB, Fox JE. Signaling across the platelet adhesion receptor glycoprotein Ib-IX induces alpha IIbbeta 3 activation both in platelets and a transfected Chinese hamster ovary cell system. J Biol Chem 2000; 275(22): 16779-87.
- 4 奚晓东,赵益明,吴 强,蒋惠源,李佩霞,阮长耿.血小板膜蛋 白酶联免疫测定法的建立和应用.中华医学检验杂志 1996; 19:233-7.
- 5 Sisson TH, Castor CW. An improved method for immobilizing IgG antibodies on protein A-agarose. J Immunol Methods 1990; 127(2): 215-20.
- 6 Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: Dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. Blood 2004; 104(6): 1606-15.
- 7 Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. J Cell Sci 2000; 113(Pt20): 3563-71.
- 8 Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, *et al.* Talin binding to integrin beta tails: A final common step in integrin activation. Science 2003; 302(5642): 103-6.
- 9 Arias-Salgado EG, Lizano S, Sarkar S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(23): 13298-302.
- 10 Xi X, Bodnar RJ, Li Z, Lam SC, Du X. Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin beta3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling. J Cell Biol 2003; 162(2): 329-39.
- Calderwood DA, Tai V, Di Paolo G, de Camilli P, Ginsberg MH.
   Competition for talin results in trans-dominant inhibition of

integrin activation. J Biol Chem 2004; 279(28): 28889-95.

- 12 LaFlamme SE, Thomas LA, Yamada SS, Yamada KM. Single subunit chimeric integrins as mimics and inhibitors of endogenous integrin functions in receptor localization, cell spreading and migration, and matrix assembly. J Cell Biol 1994; 126(5): 1287-98.
- 13 Su X, Mi J, Yan J, Flevaris P, Lu Y, Liu H, *et al.* RGT, a synthetic peptide corresponding to the integrin beta 3 cytoplasmic C-terminal sequence, selectively inhibits outside-in signaling in human platelets by disrupting the interaction of integrin alpha IIb beta 3 with Src kinase. Blood 2008; 112(3): 592-602.
- 14 Li Z, Xi X, Du X. A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alpha IIbbeta3. J Biol Chem 2001; 276(45): 42226-32.
- 15 Li Z, Xi X, Gu M, Feil R, Ye RD, Eigenthaler M, *et al.* A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. Cell 2003; 112(1): 77-86.
- 16 Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. J Cell Biol 2002; 158(5): 833-9.

- 17 Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. Biochem Soc Trans 2004; 32(Pt3): 416-20.
- 18 Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIbbeta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. Thromb Haemost 2001; 86(1): 246-58.
- 19 Chen YP, O'Toole TE, Ylanne J, Rosa JP, Ginsberg MH. A point mutation in the integrin beta 3 cytoplasmic domain (S752-->P) impairs bidirectional signaling through alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa). Blood 1994; 84(6): 1857-65.
- 20 Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIbbeta3 signalling and platelet function. Nature 1999; 401(6755): 808-11.
- 21 Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, *et al.* Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. J Cell Biol 2002; 157(2): 265-75.

# Analysis of the Regulatory Mechanisms of the RGT Sequence of Integrin β3 Cytoplasmic Tail in Signal Transduction by Using a Dominant Negative Model

Tao Lanlan, Huang Jiansong, Lü Yuanjing, Zhou Yulan, Cui Xiongying, Ruan Zheng, Xi Xiaodong\* (State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract This study purposed to investigate the molecular mechanisms of the RGT sequence of integrin β3 cytoplasmic tail in signal transduction by using a dominant negative cell model. Constructs encoding a chimeric protein composed of the extracellular and transmembrane domains of interleukin-2 receptor (Tac) and the full length or RGT-truncated  $\beta$ 3 intracellular domain were expressed in CHO cells expressing GPIbIX and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (IbIX/ IIbIIIa-CHO cell line) to establish the stable IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac- $\beta$ 3 and IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac- $\beta$ 3 $\Delta$ 759 cell lines. Competitive ELISA was performed to quantify the expression level of Tac- $\beta$ 3 chimeras in the dominant negative cell lines. Spreading and stable adhesion of the IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3 and IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759 cells on immobilized fibrinogen (Fg) were examined to evaluate the transduction of outside-in signals. The interaction of Tac-B3 chimeras and endogenous B3 with Src kinase was simultaneously analyzed with Co-IP. Competitive ELISA showed that the expression level of Tac- $\beta$ 3 chimeras was substantially higher than that of endogenous  $\beta$ 3 in both IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac- $\beta$ 3 and IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac- $\beta$ 3 $\Delta$ 759 cell lines that ensures the dominant negative effect of the Tac- $\beta$ 3 chimeras over the endogenous wild type  $\beta$ 3 in binding intracellular molecules. In deed, the ability of IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3 cells in spreading and stable adhesion on immobilized Fg was effectively inhibited, while that of IbIX/IIbIIIa-CHO/Tac-β3Δ759 cells was not affected. Co-IP results demonstrate that the Tac-β3 chimeras competed with the endogenous integrin  $\beta$ 3 in binding Src, while Tac- $\beta$ 3 $\Delta$ 759 lacking the RGT sequence at the C terminal of β3 cytoplasmic tail lost this ability. Selective disruption of Src-binding capacity of Tac-β3 is sufficient to eliminate its dominant negative effect on outside-in signaling suggesting that the interaction of the RGT sequence at the integrin  $\beta$ 3 tail with Src kinase is crucial for this signaling pathway.

Key words dominant negative; integrin αΠbβ3; competitive ELISA; protein interaction; signal transduction

Received: October 12, 2011 Accepted: December 9, 2011

This work was supported by the National High Technology Research and Development (863) Program (No.2006AA02A245), National Natural Science Foundation of China (No.81070414) and the Grant from Shanghai Municipal Commission for Science and Technology (No.09410706800)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: 86-21-64370045-610616, E-mail: xi\_xiaodong@shsmu.edu.cn