

P-选择素糖蛋白配体1与白细胞的起始黏附

陈琳 巴雪青^{1*}

(长春市中心血站, 长春 130033; ¹ 东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024)

摘要 P-选择素糖蛋白配体1(P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1)是20世纪90年代初发现的一种具同源二聚体结构的跨膜糖蛋白, 表达于几乎所有白细胞表面, 是迄今为止阐述得最为详尽的选择素配体。PSGL-1是以P-选择素为亲和探针分离得到的, 与P-选择素有高度的亲和性。近年来, 越来越多的研究证明了PSGL-1同时也是L-选择素和E-选择素的生理配体。通过PSGL-1与选择素分子间的相互作用, 白细胞在血管内皮细胞上产生滚动(即起始黏附), 进而使白细胞逐步活化并稳定黏附于血管内皮。现从PSGL-1的结构、分布、表达调控、信号转导、生理病理角色、临床应用等方面进行综述。

关键词 黏附分子; P-选择素糖蛋白配体1; 选择素; 白细胞起始黏附

与其他的细胞黏附现象(尤其是胚胎发育过程中的细胞黏附现象)不同, 血流状态下的白细胞的募集是一个非常快速的过程, 需要特别的机制建立白细胞与内皮细胞间的联系, 选择素家族及其配体代表了一类适应这一特殊目的的黏附分子。起始黏附不仅引发了白细胞向炎症部位的募集, 淋巴细胞的归巢与再循环、造血祖细胞向骨髓中的归巢、血栓形成、动脉粥样硬化的形成、损伤修复等生理或病理过程也依赖于循环状态的白细胞在血管内皮细胞上起始黏附的这一附着过程^[1]。

选择素(selectin)是血管系统内表达的Ca²⁺依赖的动物凝集素, 包括P-选择素、E-选择素和L-选择素, L-选择素组成性表达于大多数类型的白细胞上; E-选择素由活化的内皮细胞转录合成; P-选择素存在于胞内的贮存颗粒中, 活化时外化表达于血小板和内皮细胞上。因为详实的证据证明了选择素在炎症等生理病理反应中至关重要的作用, 所以, 选择素糖连接配体性质的研究成为过去几年中人们密切关注的问题^[1]。

P-选择素糖蛋白配体1(P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1)是迄今为止阐述得最为详尽的一种选择素配体。许多体内数据证明了PSGL-1是3种选择素的生理配体, 通过介导白细胞在内皮细胞上的起始黏附引发各种生理病理过程。一般认为, PSGL-1通过与内皮细胞上的P-选择素的作用实现白细胞的一级募集, 通过与另外白细胞上的L-选择素的作用实现新流经的白细胞在已经黏附的白细胞上的二次募集^[2]。

1 PSGL-1的基本结构

纯化糖蛋白的生化分析显示PSGL-1是一个高度唾液酸化的黏蛋白, 具有同源二聚体结构, 每个单体的相对分子量为120 kDa左右, 其蛋白骨架上带有1~3个N-连聚糖和数目众多的唾液酸化的O-连聚糖^[2]。

HL-60的PSGL-1 cDNA显示它的多肽骨架是一个由402个氨基酸残基构成的I型跨膜蛋白, 包括308个氨基酸残基组成的富含丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸的胞外区, 24个氨基酸残基构成的疏水跨膜区和70个氨基酸残基构成的胞内区^[2](图1)(鼠的PSGL-1 cDNA编码一个由397个氨基酸残基构成的I型跨膜蛋白, 包括265个残基的胞外区, 24个残基的跨膜区和一个由67个残基构成的胞内区)。胞外区的前18个氨基酸残基为信号肽序列, 接下来的19~41氨基酸残基为前肽序列, 在嗜中性粒细胞、COS细胞及各种髓样和淋巴样细胞中, 这一前肽序列被切除, 但转染的CHO细胞、B细胞系Ramos和SB仍保留有这一段序列。因此成熟的白细胞PSGL-1肽链是从cDNA编码的第42个氨基酸残基开始的。118~267这一区段为10个氨基酸(A-T/M-E-A-Q-T-T-X-P/L-A/T)的15次重复(人嗜中性粒细胞、单核细胞及某些血细胞来源的细胞系的这一区段为

收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-06-15

国家自然科学基金(No.30370710, No.30570928)和国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(No.2002CB513000)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0431-5099317 Fax: 0431-5687517 E-mail: baxq755@nenu.edu.cn

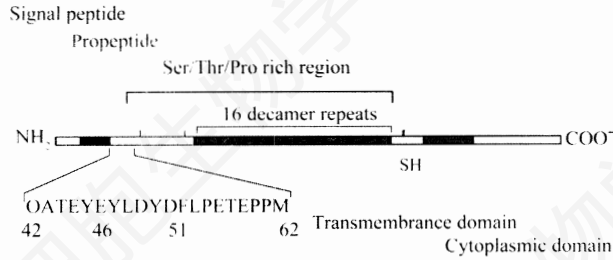


图1 PSGL-1分子的多肽结构^[3]

16次重复,因而这些细胞的PSGL-1多肽链为412个氨基酸残基,而鼠的这一区段则为10个氨基酸的10次重复)。65、111、292位是可能的N-连聚糖的结合位点。309位的半胱氨酸残基是PSGL-1二聚化的可能位点。成熟PSGL-1的前19个氨基酸残基对其功能来说是非常重要的,因为其间存在46、48、51位酪氨酸残基的硫酸化位点及抗体识别和选择素结合的表位。特异识别N末端这一区段的单克隆抗体mAb PL1可以阻断PSGL-1与纯化的P-选择素或完整白细胞的结合;而识别PSGL-1重复序列的mAb PL2却没有这种功能^[2,3]。

2 PSGL-1适应与P-选择素结合的翻译后修饰

2.1 PSGL-1的糖基化

多肽N-连糖基酶(peptide N-glycosidase F)的消化作用显示PSGL-1带有至多2~3个N-连聚糖,一般认为N-连聚糖不支持与选择素的结合^[2],但也有

研究认为N-连聚糖可能参与与选择素的结合^[4]。 $\alpha 2,3$ 键连的唾液酸和 $\alpha 1,3$ 键连的岩藻糖对于PSGL-1与P-选择素的识别是非常重要的,而且这种修饰必须发生在O-连聚糖上。当O-连唾液酸糖蛋白内切酶作用于完整的髓样细胞时(切除唾液酸化的O-连聚糖,但不影响细胞表面总体水平Sle^x的表达),与P-选择素结合的高亲和位点被清除,提示带有唾液酸化的O-连聚糖对PSGL-1的功能十分重要^[2,3]。内切糖基酶作用显示人中性粒细胞上存在唾液酸化和岩藻糖化的多聚乳糖胺[$\rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNac } \beta 1 \rightarrow]_n$,这种多聚乳糖胺的重复延伸只发生在具有两个糖链分支的O-连聚糖(core-2 O-glycans)的 $\beta 1,6$ 分支上。转基因的CHO细胞必须共转染core-2 $\beta 1,6$ 乙酰葡萄糖胺转移酶(core-2 $\beta 1,6$ N-acetylglucosaminyl transferase C2GnT)和 $\alpha 1,3$ 岩藻糖基转移酶的cDNA,才能表达功能性的PSGL-1分子^[2,3]。体内实验显示,C2GnT基因缺失小鼠P-选择素依赖的滚动受到严重影响^[5]。因此, $\alpha 2,3$ 唾液酸化和 $\alpha 1,3$ 岩藻糖基化的core-2 O-连聚糖结构是PSGL-1分子与P-选择素作用所需的翻译后修饰(图2)。成熟PSGL-1的N末端44、57位Thr是形成上述这种糖侧链的最可能位点,因为它们离簇集的3个Try最近。丙氨酸替代这两个残基或57位残基使重组PSGL-1与P-选择素的结合减弱^[2,3]。

2.2 PSGL-1的硫酸化

人的PSGL-1分子上存在硫酸化修饰,但与P-选择素结合所需的硫酸化位点全部位于酪氨酸残基

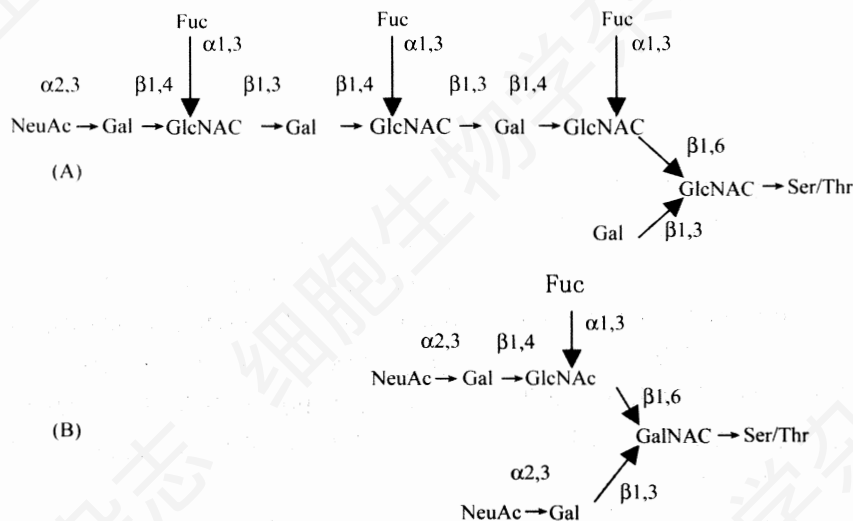


图2 PSGL-1上唾液酸化的O-连接聚糖^[2]

A: 连接3个岩藻糖和1个唾液酸的聚糖; B: 连接1个岩藻糖和2个唾液酸的聚糖。NeuAc: N-acetylneuraminic acid; Fuc: fucose; Gal: galactose; GalNAc: N-acetylgalactosamine; GlcNac: N-acetylglucosamine。

上,而不同于L-选择素对其归巢配体GlyCAM-1的修饰要求,硫酸化发生在core-2 O-连聚糖的 β 1,6分支上^[11]。酶反应去硫酸化、阻断硫酸化的合成、酶切除去含有3个酪氨酸的N末端片段、或用苯丙氨酸替代酪氨酸等实验显示PSGL-1与P-选择素的结合被清除^[2]。重组可溶性PSGL-1用芳基硫酸酯酶处理或用苯丙氨酸替代酪氨酸消除了其与皮肤相关化学因子CCL27(介导T淋巴细胞向皮肤归巢)的结合^[6]。

2.3 PSGL-1的二聚化

成熟的PSGL-1分子都是以二聚体形式存在的。有实验证明了二聚化的PSGL-1比单体PSGL-1更容易建立起较稳定的滚动黏附,而且这种黏附表现出更大的剪切力抗性和更小的滚动速度的波动^[7,8];PSGL-1的二聚化可以在层流条件下增加与P-选择素的黏附^[9]。

3 PSGL-1在组织中的分布及细胞膜上的定位

人的PSGL-1基因定位于染色体的12q24区域,包括两个外显子^[3]。利用PSGL-1抗体(PL1或PL2)的免疫组化实验对人的多种组织进行分析,结果显示PSGL-1的骨架蛋白主要表达于造血系统细胞,在骨髓中,除红细胞、巨核细胞、血小板外,髓样细胞在许多成熟阶段都表达PSGL-1,B细胞的表达量较低,而且T细胞中只有 γ/δ 亚类才与其他大部分白细胞一样具有结合P-选择素的能力,原因是没有被激活的淋巴细胞缺乏O-连接分支酶(C2GnT),并只有较低的 α 1,3岩藻糖基转移酶活性。非造血系统起源的实质性细胞中,表达PSGL-1抗原的细胞有输卵管内腔表皮细胞及病理性的前列腺肥大和肺纤维囊肿组织的细胞^[21]。

以鼠全长PSGL-1 cDNA为探针,检测鼠各种组织中PSGL-1的RNA,结果显示:除造血组织(如血液、骨髓、胸腺、脾)外,心、肾、肺、卵巢、胃、脑及脂肪等非造血组织的细胞中也检测到PSGL-1的转录,表明PSGL-1的组织分布在种间存在较明显差异^[2,3]。

PSGL-1组成性地表达于白细胞膜表面,同某些黏附分子(如L-选择素, $\alpha_4\beta_7$ 等)一样分布于静止白细胞的微绒毛上^[3]。PSGL-1是一种高度延展的分子,它在细胞膜突起微绒毛上的定位对于其起始白细胞的滚动黏附可能具有重要意义。白细胞在内皮细胞上的滚动是一个连续的、交替的吸附解离过

程,微绒毛突起作为一种弹性装置,可以延长吸附时间,稳定滚动速度,使白细胞与内皮细胞的结合更充分^[10],比较吸附PSGL-1的微球与白细胞的滚动,发现微绒毛延伸使PSGL-1与P-选择素的结合更稳定^[11]。

PSGL-1在白细胞表面微绒毛上的这种随机的、均匀的分布会因白细胞的激活而改变,活化后的白细胞PSGL-1重新分布到新形成的尾足上^[12,13]。内毒素可导致人嗜中性粒细胞和单核细胞上PSGL-1的下调^[14];另外,活化后的白细胞表现出PSGL-1的脱落^[15]。EDTA对PSGL-1表达的下调有抑制作用,提示PSGL-1的脱落可能是一个二价阳离子依赖的过程,而所有抑制L-选择素脱落的抑制剂都对PSGL-1的脱落没有影响,意味着PSGL-1的脱落与L-选择素依赖不同的金属蛋白酶或不同的脱落机制^[15]。

4 PSGL-1与选择素间的作用及其生理病理意义

目前,一系列的研究工作已经证明了PSGL-1是所有3种选择素的生理性配体^[16-18],但3种选择素与PSGL-1作用时对PSGL-1翻译后修饰的要求可能有所不同:一般认为PSGL-1与L-选择素的作用依赖于同P-选择素作用相似的分子机制^[2],Tyr的替代实验揭示,在介导与L-选择素的结合及白细胞的滚动过程中,PSGL-1的51位Tyr较48位Tyr起更重要的作用,而PSGL-1与P-选择素的结合48位Tyr起关键作用^[19];PSGL-1与E-选择素的结合表现为不需酪氨酸磷酸化^[2,3],而且糖基化作用依赖不同的core-2 O-连糖基转移酶^[20]等。

PSGL-1与选择素间的作用对于引发炎症的意义已有较多阐述^[1-3]。新近的一些研究发现,PSGL-1的表达是募集TH1细胞到炎症肠片层的主要因素^[21],在自反应性淋巴细胞向炎症脑微静脉募集过程中,PSGL-1和G蛋白偶联受体发挥了重要作用,提示PSGL-1在自身免疫性炎症中的病理角色^[22]。小鼠皮肤Arthus反应(一种过敏性炎症反应模型)中,PSGL-1作为P-选择素主要配体,E-选择素部分配体参与了中性粒细胞和巨噬细胞的募集,PSGL-1单克隆抗体的处理显著减轻了小鼠皮肤的水肿和出血,提示PSGL-1将是治疗人类免疫复合物介导疾病的靶点^[23]。除了在炎症过程中募集白细胞,PSGL-1与P-选择素间的作用也参与了血栓的形成^[24]。另外,在造血祖细胞向骨髓的归巢过程中,PSGL-1

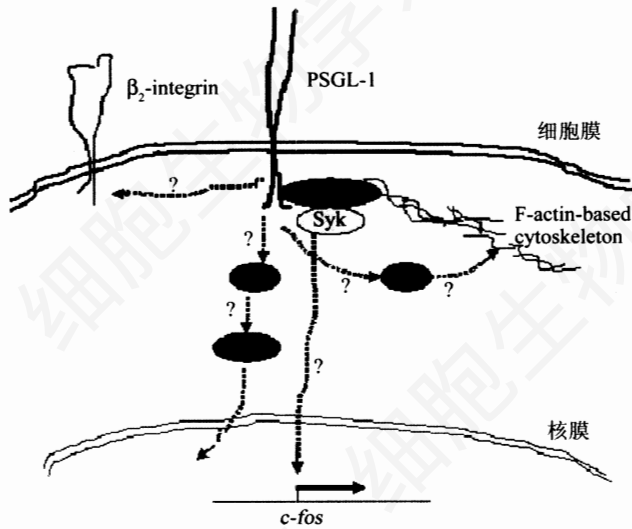


图3 PSGL-1介导的白细胞信号转导

分子与P-选择素作用的位点被单克隆抗体封闭后, 归巢细胞数下降35%^[25]。

5 PSGL-1与信号转导

在起始黏附过程中, PSGL-1不仅可通过与选择素间的作用建立白细胞与内皮细胞间联系, 同时也可作为信号受体向白细胞内传递信号引起白细胞的活化(图3)。

白细胞活化的一个重要环节就是整合素的活化, 白细胞通过活化的整合素与内皮细胞上表达的配体(如ICAM、VCAM等)的作用在血管壁上形成稳定黏附。Blanks等^[26]证明了鼠PSGL-1能够转导信号并导致 β_2 整合素的活化, 但他的实验结果认为人的中性粒细胞上PSGL-1的结合或交联是不足以活化 β_2 整合素的。可溶性P-选择素-IgG可引发 β_2 整合素依赖的染料木黄酮(genistein)敏感的同型多形核白细胞(PMN)的凝聚, 提示PSGL-1不仅是连接PMN细胞和表达P-选择素细胞的黏系分子, 也可触发PMN酪氨酸磷酸化依赖的信号, 并上调Mac-1的功能^[27]。P-选择素与PSGL-1结合诱导了 $\alpha_M\beta_2$ 的中间态活化并协同其它胞外刺激导致人中性粒细胞的活化^[28]。

白细胞活化的另一明显标志就是细胞骨架的动态改变, 因为细胞骨架的变化才导致细胞变形及伸出尾足, 从而使活化后的白细胞在血管内皮上铺展开来。中性粒细胞活化后的重新分布与其胞浆尾部与ERM(ezrin-radixin-moesin)相互作用有关^[13,29,30]。活化中性粒细胞的PSGL-1与膜突蛋白(moesin)存在

共定位^[13,30]; PSGL-1胞浆尾部缺失严重影响白细胞在P-选择素上的滚动^[29]。上述结果提示了活化白细胞与细胞骨架的结合, 而最近的一项研究直接探讨了通过PSGL-1的信号对F-肌动蛋白骨架动态变化的影响。人中性粒细胞的PSGL-1经抗体交联后引起了酪氨酸激酶c-Abl参与的F-肌动蛋白骨架的聚合及重新分布^[31]。

PSGL-1介导的白细胞内的信号事件是多种多样的, PSGL-1与mAbs或固定的P-选择素结合可引发人中性粒细胞中几种蛋白质的快速酪氨酸磷酸化(包括具有GTP酶活性的Ras及MAPK家族中Erk1/2的活化); PSGL-1与mAbs的结合足以激活人中性粒细胞分泌IL-8, 这种分泌被酪氨酸磷酸化抑制剂所阻断^[32]。淋巴细胞和U937细胞的PSGL-1可转导信号引发酪氨酸蛋白激酶Syk的磷酸化, 并诱导了血清效应元件(serum response element)依赖的c-fos转录活性^[30]。抗体交联PSGL-1诱导了活化T细胞非caspase依赖的凋亡, 这项研究证明了PSGL-1在T细胞凋亡及免疫调节中的作用^[33]。

6 依赖PSGL-1结构的应用研究

PSGL-1与选择素的相互作用在炎症发生等生理病理过程中的重要作用, 提示了PSGL-1的抗体、可溶性PSGL-1及其他结构类似物具有可观的抗炎药物开发前景。不同动物的各种组织器官的缺血再灌注模型及移植模型中, 重组可溶性PSGL-1都显示了较好的抑制损伤或抑制免疫排斥作用^[34,35]。另外, 重组可溶性PSGL-1还可通过抑制中性粒细胞与血小板的结合有效抑制冠状动脉的术后再狭窄^[36,37]。体内实验证明, 一些基于天然PSGL-1结构的小分子选择素抑制物glycosulfopeptides(GSPs)能够抑制P-选择素依赖的白细胞滚动, 清除实验证明了这类抑制物循环水平的快速降低和尿中的富集^[38], 预示了它们作为药物应用于临床的前景。

7 小结

综上所述, PSGL-1作为理想的选择素配体, 具有岩藻糖化、唾液酸化、硫酸化等适于与选择素结合的结构。在起始炎症等病理过程时, PSGL-1与选择素间的作用一方面将血流中的白细胞捕获到活化的内皮上, 另一方面也引发了白细胞内的信号传递。通过PSGL-1转导的信号与其他活化因子(如血小板活化因子、细胞因子等)的信号协同作用,

共同参与了起始黏附过程中白细胞的活化。

从发现 PSGL-1 分子到现在, 许多有关 PSGL-1 的研究工作越来越引起相关学者的关注。但目前仍有很多问题急待解决, 如 PSGL-1 与各种选择素间作用的更精确的结构细节、体外黏附模型的优化和参数设定、PSGL-1 介导的信号、基于 PSGL-1 结构的药物筛选和应用开发研究等。

参考文献 (References)

- [1] Vestweber D *et al. Physiol Rev*, 1999, **79**: 181
- [2] McEver RP *et al. J Clin Invest*, 1997, **100**: 485
- [3] Moore KL. *Leuk Lymphoma*, 1998, **29**: 1
- [4] Aeed PA *et al. Cell Res*, 2001, **11**: 28
- [5] Sperandio M *et al. Blood*, 2001, **97**: 3812
- [6] Hirata T *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 51775
- [7] Snapp KR *et al. J Cell Biol*, 1998, **142**: 263
- [8] Ramachandran V *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 10166
- [9] Smith MJ *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 21984
- [10] Yago T *et al. J Cell Biol*, 2002, **158**: 787
- [11] Park EY *et al. Biophys J*, 2002, **82**: 1835
- [12] Bruehl RE *et al. J Leukoc Biol*, 1997, **61**: 489
- [13] Alonso-Lebrero JL *et al. Blood*, 2000, **95**: 2413
- [14] Marsik C *et al. J Clin Immunol*, 2004, **24**: 62
- [15] Davenpeck KL *et al. J Immunol*, 2000, **165**: 2764
- [16] Norman KE *et al. Blood*, 2000, **96**: 3585
- [17] Hirata T *et al. J Immunol*, 2002, **169**: 4307
- [18] Sperandio M *et al. J Exp Med*, 2003, **197**: 1355
- [19] Bernimoulin MP *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 37
- [20] Snapp KR *et al. Blood*, 2001, **97**: 3806
- [21] Haddad W *et al. J Exp Med*, 2003, **198**: 369
- [22] Piccio L *et al. J Immunol*, 2002, **168**: 1940
- [23] Yanaba K *et al. J Leukoc Biol*, 2004, **76**: 374
- [24] Vandendries ER *et al. Thromb Haemost*, 2004, **92**: 459
- [25] Katayama Y *et al. Blood*, 2003, **102**: 2060
- [26] Blanks JE *et al. Eur J Immunol*, 1998, **28**: 433
- [27] Evangelista V *et al. Blood*, 1999, **93**: 876
- [28] Ma YQ *et al. Blood*, 2004, **104**: 2549
- [29] Snapp KR *et al. Blood*, 2002, **99**: 4494
- [30] Urzainqui A *et al. Immunity*, 2002, **17**: 401
- [31] Ba X *et al. J Cell Biochem*, 2005, **94**: 365
- [32] Hidari KI *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 28750
- [33] Chen SC *et al. Blood*, 2004, **104**: 3233
- [34] Fuller TF *et al. Transplantation*, 2001, **72**: 216
- [35] Opal SM *et al. Shock*, 2001, **15**: 285
- [36] Bienvu JG *et al. Circulation*, 2001, **103**: 1128
- [37] Tanguay JF *et al. Thromb Haemost*, 2004, **91**: 1186
- [38] Hicks AE *et al. FASEB J*, 2002, **16**: 1461

P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and the Initial Adhesion of Leukocyte

Lin Chen, Xue-Qing Ba^{1*}

(Central Blood Station of Changchun, Changchun 130033, China; ¹Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) was found at the beginning of 1990s'. It is a transmembrane glycoprotein with homodimeric structure and expresses on the surface of almost all leukocytes. PSGL-1 is the best-characterized selectin ligand to date. PSGL-1 was isolated through affinity chromatography by using P-selectin as a probe, and shows high affinity to P-selectin. The accumulating data further demonstrate that PSGL-1 also acts as the physiological ligand of L-selectin and E-selectin. The reaction of PSGL-1 with selectins initiates the rolling adhesion of leukocytes on the endothelium cells, which lead to the maximum activation and firm adhesion of leukocytes. The present review summarized the studies on PSGL-1's structure, localization, expressional regulation, signal transduction, physiological and pathological role and clinical therapeutics in the decade.

Key words adhesion molecule; P-selectin glycoprotein ligand 1; selectin; rolling adhesion of leukocytes

Received: April 4, 2005 Accepted: June 15, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370710, No.30570928) and the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2002CB513000)

*Corresponding author. Tel: 86-431-5099317, Fax: 86-431-5687517, E-mail: baxq755@nenu.edu.cn