

骨桥蛋白趋化和趋触作用对 FAK 和 ILK 磷酸化修饰的影响

李菁菁 温进坤* 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 为探讨可溶性(趋化作用)或锚定(趋触作用)形式的骨桥蛋白(OPN)与整合素相互作用对下游信号分子黏着斑激酶(FAK)和整合素偶联激酶(ILK)磷酸化修饰的影响, 分别用包被于培养瓶上锚定型或加在培养液中的可溶性 OPN 刺激血管平滑肌细胞(VSMC)后, 观察 FAK 和 ILK 的磷酸化及 FAK 与 ILK 相互作用的变化。结果显示, 包被于培养瓶上的 OPN 通过趋触作用促进 VSMC 黏附和伸展, 接种 45 min 时, 黏附细胞数达对照组的 2.4 倍($P < 0.05$); OPN 的趋触及趋化作用均可诱导 FAK 磷酸化、ILK 去磷酸化并抑制 FAK 与 ILK 结合; 转染可表达整合素 $\beta 3$ 亚单位胞内区的表达质粒 pEGFP-C3- $\beta 3$ CD 能阻断 OPN 与整合素相互作用所引发的 FAK 磷酸化及 ILK 去磷酸化。研究表明, OPN 的趋触和趋化作用对整合素下游信号分子 FAK 和 ILK 的影响是一致的, 且这些作用是由整合素 $\beta 3$ 亚单位胞内区所介导的。

关键词 骨桥蛋白; 趋化作用; 趋触作用; 黏着斑激酶; 整合素偶联激酶

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是存在于细胞外环境中的网络状结构, 它们将各种细胞连接在一起, 赋予各种组织、器官基本结构和形状。除此以外, ECM 还通过与其受体的相互作用直接或间接调节细胞的多种行为, 如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)与整合素 $\alpha v \beta 3$ 结合后可调节血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的黏附、迁移、增殖和分化过程^[1,2]。在研究 ECM 与细胞相互作用及其对细胞行为的影响时, 研究人员常采用将 ECM 包被于培养瓶上或加入培养液中两种方式。研究发现, ECM 的存在形式不同, 对细胞行为的影响也不相同, 溶于培养液中的 ECM 发挥趋化作用(chemotaxis), 而锚定在培养瓶上的 ECM 引起细胞趋触(haptotaxis)。许多实验结果表明, 在培养板上锚定的 OPN 通过与整合素 $\alpha v \beta 3$ 相互作用激活下游信号分子, 如诱导黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt)的磷酸化^[3], 而促进细胞的黏附和迁移^[4,5]; 同样, 存在于培养液中的可溶性 OPN 也参与细胞的迁移过程^[6]。为了明确两种不同存在形式的 OPN 在调节 VSMC 黏附和伸展方面的分子机制是否相同, 本文分别用包被于培养瓶上的或可溶性的 OPN 刺激 VSMC 趋触或趋化, 观察 FAK 和整合素偶联激酶(integrin-linked kinase, ILK)的磷酸化及 FAK 与 ILK 相互作用的变化。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 小鼠抗 FAK 单抗(sc-1688)、小鼠抗 ILK 单抗(sc-20019)、鼠抗酪氨酸磷酸化单抗(PY-99)、Protein A-agarose 和化学发光试剂盒均购自 Santa Cruz 公司; 鼠抗苏氨酸磷酸化单抗和 ESCORT™ IV 细胞转染试剂盒购自 Sigma 公司; 兔抗鼠 IgG 购自 Pierce 公司; 可表达整合素 $\beta 3$ 亚单位胞内区的真核表达载体 pEGFP-C3- $\beta 3$ CD 由本室构建与鉴定^[7]; OPN 由本室制备^[8], 取大鼠 VSMC 无血清培养基进行 DEAE-Cellulose 不连续层析分离, 在紫外分光光度计监测下收集蛋白质洗脱峰。将各峰洗脱液合并后经 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色进行鉴定。取分子量约为 66 kDa 的组分经盐酸水解后进行高压液相色谱分析, 证实氨基酸组成与标准鼠源 OPN 相一致。

1.2 细胞培养、分组及转染

取 5 周龄 SD 大鼠胸腹主动脉, 按贴块法分离培养 VSMC, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 3~5 代细胞

收稿日期: 2006-11-20 接受日期: 2007-03-27

国家自然科学基金(No.30570661)、国家科技部基础研究重大项目前期研究专项项目(No.2005CCA03100)、河北省自然科学基金(No.C200600084)和高等学校博士学科点专项科研基金(No.20040089018)资助

* 通讯作者。Tel: 0311-86265563, E-mail: wjk@hebm.edu.cn

进行实验。传代培养的 VSMC 生长到 80% 汇合时, 血清饥饿培养 24 h, 使细胞同步于 G₀ 期。之后, 向培养液中加入 20 μg/ml OPN, 继续培养 45 min 作为 OPN 趋化刺激组; 用 PBS(对照)、BSA(20 μg/ml)或 OPN(20 μg/ml)于 4 °C 处理 60 mm 培养瓶过夜, 50 °C 烤干, 使 OPN 包被于培养瓶上。将 VSMC 以 5 × 10⁶ 个/瓶的密度接种于培养瓶, 继续培养 45 min 作为 OPN 趋触刺激组; pEGFP-C3-β3CD 及对照质粒 pEGFP-C2 转染所用质粒浓度均为 2 μg/ml, 操作按 ESCORT™IV 细胞转染试剂盒说明进行, 转染 24 h 后加入 OPN 或接种于包被 OPN 的培养瓶中, 观察其趋化和趋触作用对 FAK 和 ILK 磷酸化及其相互作用的影响。

1.3 细胞黏附实验

将传代 VSMC 重悬于含 1% NCS 的培养基中, 调整细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/ml, 接种于用 PBS(对照)、BSA 或 OPN 包被的 60 mm 培养瓶, 5 ml/瓶, 37 °C 温育 0、20、45、90 和 180 min 后, 于高倍相差显微镜下任取 3 个视野计数贴壁细胞的数目, 并观察细胞伸展的程度。

1.4 免疫沉淀和 Western 印迹分析

用细胞裂解液(1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, pH 8.0, 0.2 mmol/L Na₃VO₄, 0.2 mmol/L PMSF, 0.5% NP-40)分别裂解 DMEM 悬浮培养组、OPN 趋化刺激组、OPN 趋触刺激组以及不同质粒转染组细胞, 离心收集上清液。各取 300 μg 蛋白质加入 NET- 明胶缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶)至总体积为 180 μl 后, 加入 20 μl Protein A-agarose 至总体积为 200 μl, 4 °C 摇动 1 h, 12 000 r/min 离心 20 s, 收集上清液(沉淀用于阴性对照), 加入小鼠抗 FAK 单抗或小鼠抗 ILK 单抗各 5 μl, 4 °C 摇动 2 h。随后, 加入 1 μl 1 μg/μl 兔抗小鼠 IgG, 4 °C 摇动 30 min, 加入 20 μl Protein A-agarose 至总体积为 200 μl, 4 °C 摇动过夜。4 °C, 12 000 r/min 离心 20 s, 收集 Protein A-agarose- 抗原-抗体三元复合物。依次用 0.5 ml NET- 洗涤缓冲液 I (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶), 缓冲液 II (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 0.25% 明胶), 缓冲液 III (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40)于 4 °C 条件下洗涤 20 min, 4 °C,

12 000 r/min 离心 20 s, 用 2 × SDS 上样缓冲液悬浮沉淀, 100 °C 加热 3 min, 12 000 r/min 离心 20 s, 取上清液进行 SDS-PAGE, 同时任取其中一组细胞的 100 μg 蛋白质作为阳性对照(Input), 转移至 PVDF 膜上, 分别用 PY-99 和抗苏氨酸磷酸化单抗检测 FAK 和 ILK 的磷酸化水平以及两者之间的相互作用。

1.5 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差表示, 采用 SPSS10.0 统计分析软件进行组间及组内方差分析。Excel 软件作图。

2 结果

2.1 包被于培养瓶上的 OPN 通过趋触作用促进 VSMC 黏附和伸展

图 1 显示, VSMC 接种于对照、包被 BSA 或 OPN 的培养瓶后, 细胞呈圆球形, 表面积较小, 并有折光现象。随着培养时间的延长, 接种于 OPN 上的细胞最先发生黏附并开始伸展, 其次为接种于 BSA 上的细胞, 最后开始黏附和伸展的是接种于对照瓶中的细胞。接种 45 min 后, 包被 OPN 培养瓶中的黏附细胞数明显高于其他两组, 黏附细胞数达对照组的 2.4 倍(P<0.05), 细胞呈现椭圆形, 失去折光性, 部分已经开始伸展, 表面积增大, 说明包被于培养瓶上的 OPN 可通过趋触作用促进 VSMC 的黏附和伸展。当接种时间达到 90 min 时, 这种差别明显减小, 180 min 时, 三组细胞的黏附细胞数与伸展状态不再存在差别, 因此本实验选取接种 45 min 的 VSMC 观察 FAK 和 ILK 磷酸化水平。

2.2 OPN 的趋触及趋化作用均可诱导 FAK 磷酸化、抑制 FAK 与 ILK 结合

可溶性 OPN 作用于 VSMC 45 min 后, FAK 的磷酸化被显著诱导, 其磷酸化水平达到对照组的 4.2 倍, 包被于培养瓶上的 OPN 对 FAK 的影响与可溶性 OPN 相类似。转染 pEGFP-C3-β3CD 使整合素 β3 胞内区在 VSMC 中强制性表达后, OPN 刺激对 FAK 磷酸化的诱导作用被抑制(图 2A), 提示整合素 β3 亚单位胞内区介导 OPN 与整合素相互作用所触发的信号转导过程。以抗 FAK 抗体对 VSMC 裂解液进行免疫沉淀后, 对沉淀物用 ILK 抗体进行 Western 印迹分析的结果表明, 可溶性及锚定形式的 OPN 都可使沉淀物中的 ILK 减少, ILK 水平分别降至对照细胞的 34.9% 和 33.7%(图 2C), 转染 pEGFP-C3-β3CD 后, FAK 与 ILK 之间的结合增加, 即免疫沉淀物中 ILK 明显增多(图

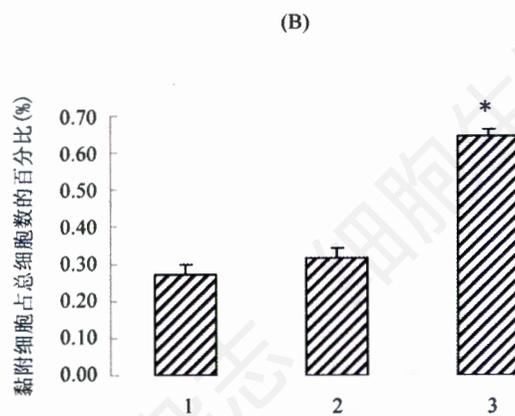
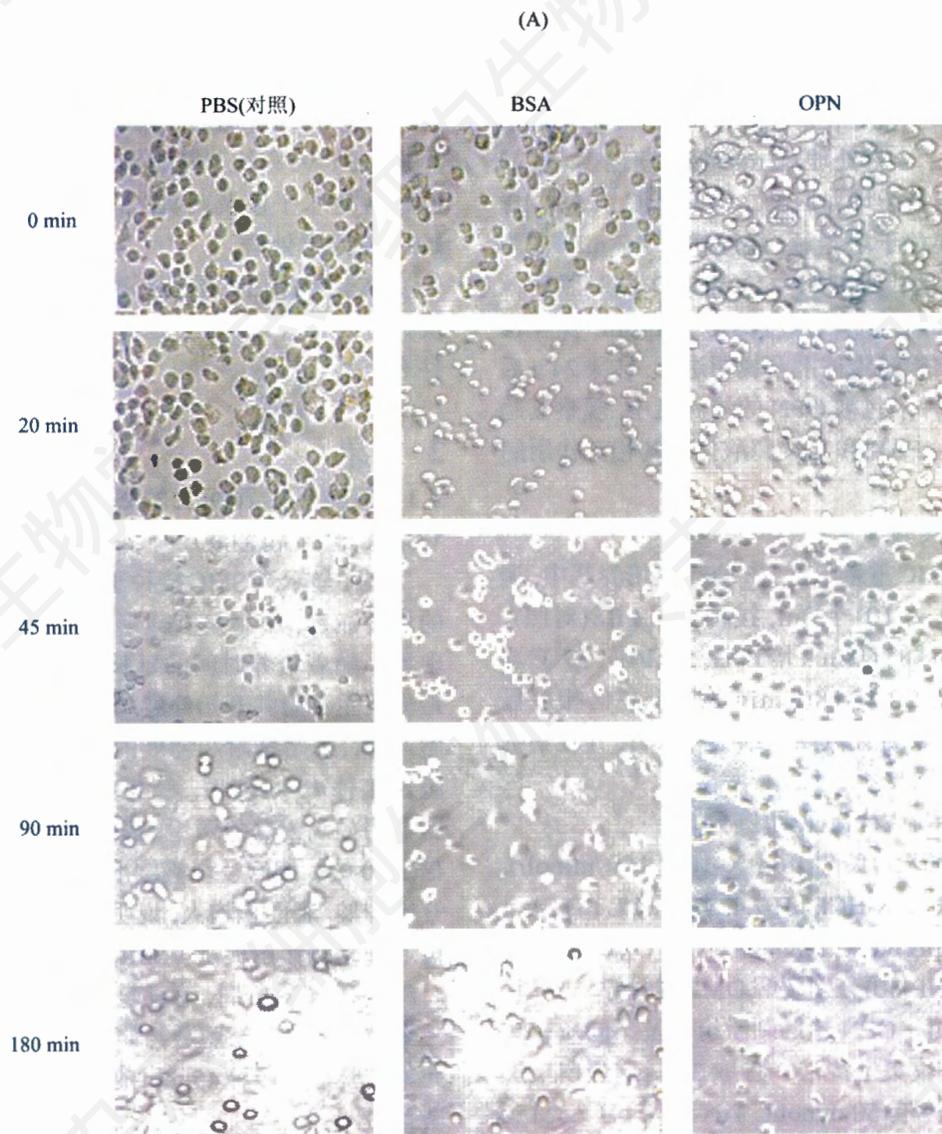


图1 OPN的趋触作用对VSMC黏附和伸展的影响 ($n=3$, 与对照相比, $*P<0.05$)

(A)接种不同时间后VSMC黏附和伸展的相差显微图像(100×);(B)接种45 min后黏附细胞占总细胞数的百分比。1: PBS(对照); 2: BSA; 3: OPN。

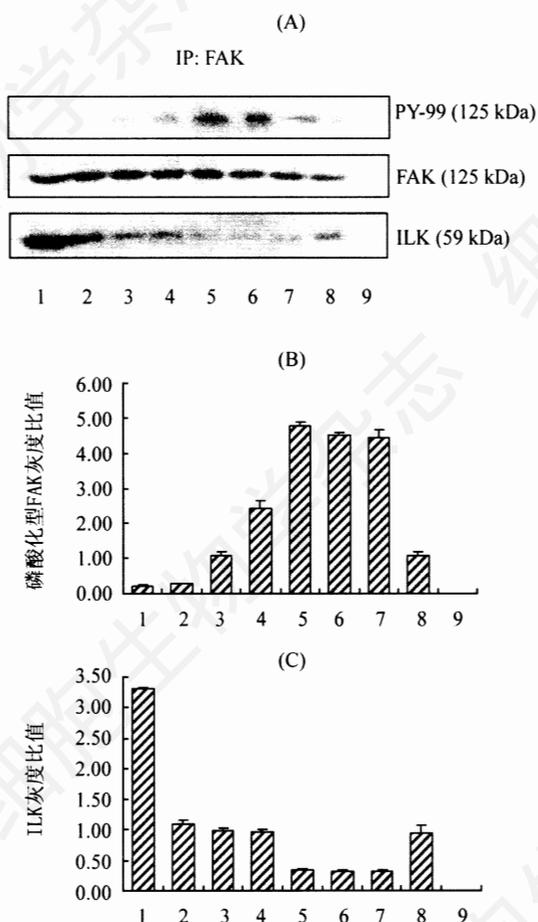


图2 可溶性或锚定 OPN 对 FAK 磷酸化及 FAK 与 ILK 结合的影响

(A)Western 印迹结果; (B)、(C)磷酸化型 FAK(PY-99)和 ILK 灰度扫描相对比值(实验重复 3 次)。1: Input; 2: DMEM 悬浮培养; 3: PBS 包被的培养瓶(对照); 4: BSA 包被的培养瓶; 5: OPN 包被的培养瓶; 6: 可溶性 OPN; 7: 转染 pEGFP-C2 后接种于 OPN 包被的培养瓶; 8: 转染 pEGFP-C3-β3CD 后接种于 OPN 包被的培养瓶; 9: 阴性对照。

2A)。这些结果表明, FAK 的磷酸化对其与 ILK 的结合产生抑制作用。

2.3 OPN 的趋触及趋化作用均可诱导 ILK 去磷酸化

图 3 结果显示, 可溶性及包被于培养瓶上的 OPN 均可诱导 ILK 去磷酸化, 在两种形式的 OPN 作用下, 磷酸化型 ILK 水平分别降至对照组的 35.0% 和 34.4%。转染 pEGFP-C3-β3CD 后, OPN 诱导的 ILK 去磷酸化作用受到抑制, 转染对照质粒无明显影响。以上结果表明, 在本实验条件下, OPN 的趋触和趋化作用对整合素下游信号分子 FAK 和 ILK 磷酸化修饰的影响是一致的, 且这种作用是由整合素 β3 亚单位胞内区所介导的。

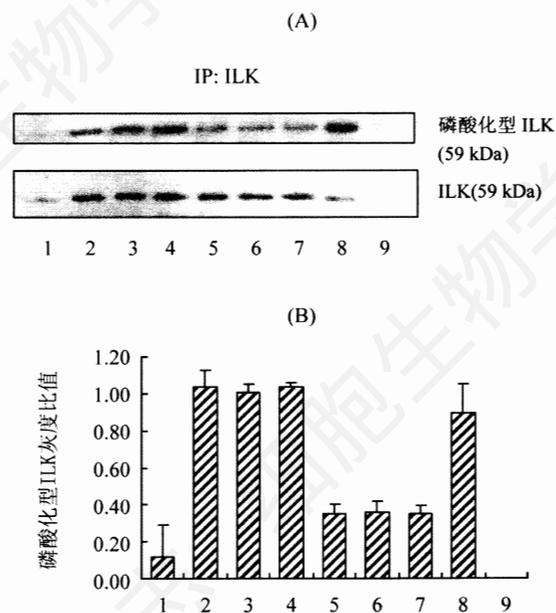


图3 可溶性或锚定 OPN 对 ILK 磷酸化的影响

(A)Western 印迹结果; (B)磷酸化型 ILK 灰度扫描相对比值(实验重复 3 次)。1: Input; 2: DMEM 悬浮培养; 3: PBS 包被的培养瓶(对照); 4: BSA 包被的培养瓶; 5: OPN 包被的培养瓶; 6: 可溶性 OPN; 7: 转染 pEGFP-C2 后接种于 OPN 包被的培养瓶; 8: 转染 pEGFP-C3-β3CD 后接种于 OPN 包被的培养瓶; 9: 阴性对照。

3 讨论

ECM是由细胞合成后分泌到细胞外的一类完整的蛋白质, 它们将各种细胞连接在一起, 是各型细胞的支架结构与附着位点, 因此它们通常都是以锚定形式来发挥作用的。在体外实验中, 不同研究人员采用不同形式的 ECM 来研究其与细胞的相互作用。例如, 在趋触实验中, 锚定 ECM 可促进细胞迁移^[9], 并活化下游信号分子^[10]; 在趋化实验中也得到相似的结果。Li 等^[11]曾发现, 成纤维细胞与包被 OPN 的作用要强于可溶性 OPN, 相同时间内发生迁移的细胞数要明显多于后者, 除此之外, 也有类似的报道^[12]。为了检验两者的作用机制有无差别, 本实验采取用 OPN 包被培养瓶或直接于培养基中加入可溶性 OPN 两种条件对 VSMC 给予刺激, 观察它们对整合素下游信号分子的影响。实验结果表明, 在我们的实验条件下, 两者都可以促进 FAK 的磷酸化、ILK 的去磷酸化并抑制 FAK 与 ILK 的结合, 其程度上没有明显差别。我们推测, 这可能是因为无论是可溶性的还是包被的 OPN 都可以与整合素相互结合, 一旦开始向下游转导信号, 其影响程度可能就不存在差异了。另外, 也可能与我们的实验条件有关。

整合素作为 ECM 的受体不仅介导细胞与 ECM

之间的相互作用,而且还具有双向信号转导功能。业已证明,整合素是由17种 α 和8种 β 亚单位组成的异源二聚体跨膜受体,它们可组合成24种不同的整合素^[13],VSMC主要表达整合素 $\alpha v\beta 3$ 。由于本身不具有激酶活性,整合素需要通过 β 亚单位的胞内区与下游接头蛋白相互作用,如踝蛋白(talin)^[14]、桩蛋白(paxillin)、FAK和ILK^[15]等,使其募集到胞膜内侧,共同形成黏着斑复合物,启动多条信号转导途径,从而影响细胞的生理和病理功能。本实验通过转染pEGFP-C3- $\beta 3$ CD,使整合素 $\beta 3$ 胞内区在VSMC中强制性表达后,抑制了OPN对下游信号的影响,这说明OPN-整合素 $\alpha v\beta 3$ 信号是通过 $\beta 3$ 亚单位胞内区向下游转导的,它位于FAK和ILK的上游。我们推测,过量表达的整合素 $\beta 3$ 胞内区多肽可以竞争性地与参与黏着斑形成的下游信号蛋白相结合,但因其没有胞外区而不能接受配体的信号刺激,从而干扰了整合素介导的信号传递过程。

总之,可溶性或锚定型OPN均可通过趋化或趋触作用调节VSMC的功能,它们对整合素下游信号分子FAK和ILK的影响是相似的,并且均需通过整合素 $\beta 3$ 亚单位胞内区向下游转导信号。

参考文献(References)

- [1] Nelson PR *et al. J Vasc Surg*, 1996, **24**: 25
- [2] 李菁菁等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, **22**: 9
- [3] Zheng DQ *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 24565
- [4] 刘智敏等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20**: 131
- [5] Sugatani T *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 5001
- [6] 刘智敏等. *中国病理生理杂志*, 2003, **19**: 163
- [7] 李菁菁等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, **22**: 477
- [8] 柴锡庆等. *中国老年学杂志*, 2004, **24**: 725
- [9] Hruska KA *et al. Endocrinology*, 1995, **136**: 2984
- [10] Chellaiah M *et al. J Cell Biol*, 2000, **148**: 665
- [11] Li G *et al. Circulation*, 2000, **101**: 2949
- [12] Itoh H *et al. J Vasc Surg*, 1997, **25**: 1061
- [13] 马进. *上海第二医科大学学报*, 2004, **24**: 11
- [14] Ulmer TS *et al. Biochemistry*, 2003, **42**: 8307
- [15] Yoganathan TN *et al. Biochem Pharmacol*, 2000, **60**: 1115

The Roles of Osteopontin in Chemotaxis and Haptotaxis Involve the Focal Adhesion Kinase and Integrin-linked Kinase

Jing-Jing Li, Jin-Kun Wen*, Mei Han

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To study the effect of the soluble or anchoring osteopontin (OPN) on focal adhesion kinase (FAK) and integrin-linked kinase (ILK) in vascular smooth muscle cells (VSMCs), VSMCs were treated with OPN coated on culture flasks or soluble OPN, then the level of FAK and ILK phosphorylation, as well as their interactions were detected. The results showed that OPN coated on culture flasks promoted VSMC adhesion and spreading through haptotaxis. After seeded for 45 min, the number of attached cells on OPN-coated flasks was increased by 1.4 folds compared with control. OPN added in culture media or coated on the culture flasks induced FAK phosphorylation and ILK dephosphorylation, and inhibited FAK interaction with ILK through chemotaxis or haptotaxis. Transfection of the eukaryotic expression vector, pEGFP-C3- $\beta 3$ CD, harboring the cytoplasmic domain of human integrin $\beta 3$ subunit cDNA inhibited these effects. These results suggest that both soluble and anchoring OPN regulate similarly the integrin downstream molecules FAK and ILK through the cytoplasmic domain of integrin $\beta 3$ subunit.

Key words osteopontin; chemotaxis; haptotaxis; focal adhesion kinase; integrin-linked kinase

Received: November 20, 2006 Accepted: March 27, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570661), the Special Found for Preliminary Research of Key Basic Research Project of Ministry of Science and Technology of China (No.2005CCA03100), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2006000814) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20040089018)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, E-mail: wjk@hebm.u.edu.cn