

整合素在细胞响应机械应力中的作用*

张惠静** 蔡绍哲 卢 晓

(重庆大学生物工程学院, 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要 机械应力在细胞生长、分化和基因表达等生理学过程和某些病理学过程中起了重要的作用。细胞粘附分子——整合素是机械信号转导中重要的跨膜分子。细胞通过整合素与胞外基质蛋白、细胞骨架蛋白以及聚焦粘附激酶等的反应, 将感应的力信号转化为化学信号, 从而调节细胞的生理机能, 其中整合素与胞外基质蛋白之间的动态和特异性反应在细胞的机械信号转导过程中起了功能性作用。

关键词 整合素, 机械应力, 胞外基质蛋白, 机械信号转导

学科分类号 Q274

生物体从器官、组织到细胞等各个层次上的生命运动均是在一定力学环境中进行的, 作为生命基本组成单元的细胞, 其生存的力学环境非常复杂, 整个系统是地心重力、气体和流体压力以及运动所产生的局部应力、细胞骨架结构引起的张力等相互作用的结果。越来越多的研究表明, 机械应力在细胞生长、分化、凋亡以及基因表达等生理学过程和某些病理学(如心肌肥大、动脉粥样硬化等疾病)过程中起了重要的作用, 这就提出一个问题: 机械应力是如何被细胞感受并传递至细胞内, 最终导致细胞发生一系列生物学效应的。尽管目前基于机械信号转导的机制有各种各样的说法, 但是, 大量的研究证明^[1-3]: 细胞表面存在对应力敏感的受体, 这些受体能将所感应的力信号通过细胞表面特殊的分子通道传递至胞内不同结构部件上, 实现力化学转化, 从而调节细胞的生理机能。这些受体主要有: 离子通道、细胞粘附分子——整合素、G 蛋白连接受体、促有丝分裂原激活受体等。本文在此仅就整合素在细胞响应机械应力中所起的作用作一综述。

1 整合素的生物学作用

整合素^[4,5]是一类重要的细胞表面受体, 其配体主要为细胞外基质(ECM)蛋白, 如胶原蛋白、纤粘连蛋白、层粘连蛋白等。整合素通过识别这些胞外基质蛋白, 介导细胞与细胞、细胞与 ECM 的粘附反应并接受传导级联信号, 在多种基本的病理生理过程中发挥重要作用。目前, 已发现的整合素有 20 多种, 均为异二聚体跨膜糖蛋白, 其 α 、 β 亚单位均具有一个大的胞外 N 端结构域, 通过其折

叠内旋的构型改变与特异的配体相结合; 其 β 亚单位的胞内区不仅能与肌动蛋白结合的蛋白质(如组蛋白 vinculin、裸蛋白 talin 等)反应, 而且还能与聚焦粘附激酶(FAK)的氨基端反应, FAK 又进一步与各种信号分子反应, 如 C-Src、Graf(与 FAK 有关的 GTP 酶调控因子)、PI-3 激酶等, 这些信号分子又进一步地激活各种下游蛋白的级联反应, 包括促有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)、PIP-5 激酶和蛋白激酶 C(PKC)等, 因此, 将机械信号转变为胞内第二信使信号的机械转导分子, 整合素是一个非常重要的分子。

2 整合素在细胞响应机械应力中的作用

2.1 整合素在心肌细胞响应机械应力中的作用

在心脏, 有多个整合素被表达并参与许多生物学活动。在体内, 整合素是早期心肌发育的重要调控因子, 为迁移分化的细胞提供方位信息, 同时也是心肌细胞形态的重要决定因素。心肌细胞具有感受机械拉伸并能将它转化为胞内生长信号的能力, 从而导致心肌肥大。在体外, 心肌细胞的机械拉伸可引起多个第二信使系统的激活, 该系统与生长因子诱导的细胞信号系统非常相似。心肌细胞的机械拉伸可激活即刻早期基因 C-fos、C-jun 和 C-myc 等, 引起一系列胞内信号分子的激活, 如磷脂酶、酪氨酸激酶、MAPK、PKC 等^[1,6]。目前, 针对机

* 国家自然科学基金资助项目(19732003)。

** 通讯联系人, 现所在单位: 第三军医大学医学检验系, 重庆 400038。

Tel: 023-68752597, E-mail: Zhanghj715@sina.com

收稿日期: 2001-10-12, 接受日期: 2001-12-03

械拉伸诱导的心肌肥大信号转导已做了大量的工作, 涉及到拉伸诱导的基因表达、胞内信号分子、离子通道、生长因子等, 但是有关整合素在其中所起的作用, 研究仍很少. 整合素 $\alpha_5\beta_1$ 亚单位能够识别 RGD 肽序列, 生长在可拉伸基底上的新生鼠心肌细胞用 RGD 肽处理后, 并不抑制 C-fos 基因对线性伸展的感应, 这表明对 RGD 肽敏感的整合素对拉伸诱导的 C-fos 基因表达并不是必需的, 因此, 在拉伸诱导的心肌肥大中, 对 RGD 肽不敏感的整合素的作用需要进一步研究. 然而, 心肌细胞发生低渗膨胀时, 用 RGD 肽预处理后, FAK 和骨架蛋白桩蛋白 (paxillin) 的酪氨酸磷酸化作用将明显减弱, 这表明对 RGD 肽敏感的整合素在膨胀诱导的酪氨酸激酶激活中起了重要作用. 因此, 在研究心肌肥大的致病机理中, 整合素在拉伸诱导的心肌肥大响应中, 所起的作用尚需进一步确定.

2.2 整合素在平滑肌细胞响应机械应力中的作用

位居血管壁中层的血管平滑肌细胞 (VSMC) 在体应力微环境中, 由压力所产生的周向环形牵张力对其影响尤为重要. 近年来, 大量的研究证明^[3,7,8]: 机械应力对 VSMC 的表型转变、增殖以及 ECM 的分泌和沉淀有密切关系, 可能直接参与了诸如高血压、动脉粥样硬化等血管病变过程. 目前, 对于 VSMC 感应机械应力的力信号转导研究, 已涉及到离子通道、整合素、各种酪氨酸激酶的激活 (如 C-Src、FAK、MAPK) 和生长因子, 其中整合素的作用, 主要集中于与 ECM 间的特异性反应及对 VSMC 感应机械应力的调控作用.

迄今为止, 在 VSMC 中已发现了大约 11 种不同类型的整合素表达, 研究表明^[9~11]: 周期性拉伸可诱导 VSMC 的有丝分裂, 激活其蛋白激酶 A (PKA) 和蛋白激酶 C (PKC) 通道, 但是分别抑制 PKA 和 PKC, 并不能阻止拉伸诱导的细胞排列和增殖. 对于培养在胶原、纤粘连蛋白和玻璃粘连蛋白上的 VSMC, 机械拉伸可诱导细胞增殖, 其 DNA 合成得以增加, 但对于培养在弹性蛋白和层粘连蛋白上的 VSMC 却无此现象, 这说明, 由拉伸诱导 VSMC 的有丝分裂响应取决于特异性的整合素——ECM 间的相互反应 (如 $\alpha_v\beta_3$ 与玻璃粘连蛋白的反应), 这种响应在应用抗 β_3 、抗 $\alpha_5\beta_1$ 抗体时即消失, 而抗 β_1 抗体却不行. 另一方面, 对于生长在层粘连蛋白上的 VSMC, 机械拉伸可增强其平滑肌肌球蛋白重链 SM-1 和 SM-2 的表达, 并且, 生长在层粘连蛋白上 VSMC 的 SM-1 表达比生

长在胶原和纤粘连蛋白上的更强. 因此, VSMC 的机械转导机制可能与整合素—配体间的相互反应特性有关, 细胞通过整合素的介导, 调控其对周围环境变化的响应, 从而得以控制自身内环境的稳定性.

2.3 整合素在内皮细胞响应机械应力中的作用

内皮细胞 (EC) 内衬于血管的内壁, 长期承受血液循环流动产生的剪切应力的作用, 由内皮细胞调控的与机械力学相关的问题, 在控制血管弹性, 调节血管形态结构和功能, 阐明动脉粥样硬化等心脏血管病变的致病机理中起了至关重要的作用. 与心肌细胞响应机械拉伸力一样, 内皮细胞同样具有感受剪切应力并将之转化为胞内生长信号的能力. 研究表明^[12,13]: 整合素介导的内皮细胞力信号转导, 主要发生在细胞与基底膜接触的聚焦粘附区域, 所谓聚焦粘附就是整合素的聚集. 大多数聚焦粘附研究结果认为聚焦粘附区域是蛋白激酶的活力所在处, 与病毒致癌基因、蛋白激酶 C 具有同源性, 是细胞的信号之源. 体外流动腔实验表明: 剪切力引起的内皮细胞形态的改变和肌动蛋白应力纤维的形成取决于胞内的钙离子、蛋白质酪氨酸激酶和微管骨架结构, 内皮细胞遭受剪切力的作用后, 在其下面的纤粘连蛋白能形成粗壮的纤维束, 并沿血流方向排列, 随着细胞的伸长和应力纤维沿血流方向的重排, 在内皮细胞的前端出现纽蛋白 (vinculin) 和 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的簇集, 这表明在整个粘附区域没有显著性变化的情况下, 内皮细胞的聚焦粘附经历了一个动态的局部重排, 在分子水平上, 这种动态重排可能受到相关蛋白的调控, 实验证明^[14,15]: 剪切力增加了 FAK 和桩蛋白 (paxillin) 的酪氨酸磷酸化以及 C-Src 和 Fyn 的酪氨酸激酶的活性, 随之引发的下游事件也得到了实验的进一步证实, 当内皮细胞与纤粘连蛋白粘附时, 剪切力可激活胞外信号调控激酶 (ERK), 但在细胞与多聚赖氨酸相连或细胞呈悬浮状态时却不发生上述反应, 这表明剪切诱导 ERK 的激活与整合素——ECM 间的特异性反应有关. 在内皮细胞中, 这种整合素介导的机械转导也受到体外血管灌注实验的证实, GRGDNP 肽 (整合素的结合域) 可抑制剪切力诱导的血管舒张并减弱剪切力诱导的蛋白质酪氨酸磷酸化作用的增加. 因此, 聚焦粘附区域的整合素参与了剪切力诱导的力转导, 并且调控了细胞的形态结构和基因表达等生物学行为.

2.4 整合素与力信号转导

目前, 越来越多研究表明整合素具有机械力学转导的功能, 并且, 主要集中于聚焦粘附区域, 起到变力学信号为化学信号的作用^[16, 17]. 采用裱衬了纤粘连蛋白或含 RGD 肽的微球对细胞进行剪切加载, 发现力可以直接传入细胞骨架 (表现为细胞硬度指数随应变增大而增高), 而若微球未裱衬或裱衬其他非整合素的配体, 则力信号不能直接传入细胞骨架. 利用磁扭转细胞计, 将机械应力直接作用于细胞表面受体证实, β_1 整合素能将机械信号传递至细胞骨架, 诱导聚焦粘附的形成, 支持力依赖性细胞硬度反应. 这说明整合素是外力传向细胞骨架的通道, 细胞通过其表面的整合素受体即时响应机械应力, 以张力整合 (tensegrity)^[18] 的形式将响应的力信号有选择地转换到细胞和核内的不同结构部件上, 如聚焦粘附络合物中的信号分子、细胞膜中的离子通道、核糖体、核膜孔、染色体、甚至可能是单个基因, 实现力化学转化, 从而调节细胞的生理机能, 对维持细胞的铺展和生长, 影响细胞的功能产生调控作用.

综上所述, 整合素的聚集和构型改变是细胞响应各种机械应力的起始, 并由此导致一系列胞内信号事件的级联反应. 对于整合素在机械转导中的作用仍需进一步研究, 如不同类型的细胞在响应不同形式的机械应力中, 不同类型的整合素作为机械转导者在功能上的专一性; 整合素与其他信号分子间的相互作用等. 目前, 生物学家在研究中已逐渐认识到了机械应力在细胞、组织、器官生长发育过程中所起的关键性作用. 因此, 了解整合素在细胞响应机械应力中的作用, 对于揭示细胞机械转导机制, 了解正常生理和病理条件下, 细胞、组织和器官的功能具有重要的生物学意义.

参 考 文 献

- Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 1997; 59: 551~ 571
- Davies P F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 1995, 75 (3): 519~ 560
- Lehoux S, Tedgui A. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension*, 1998, 32 (2): 338~ 345
- Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999, 285 (5430): 1028~ 1032
- Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, *et al*. Signal transduction by cell adhesion receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1242 (1): 77~ 98
- Yamazaki T, Komuro I, Yazak Y. Signaling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal*, 1998, 10 (10): 693~ 698
- 王红兵, 卢 晓, 黄岂平, 等. 基底膜拉伸应变对培养的大鼠血管平滑肌细胞形态的影响. *中国应用生理学杂志*, 2000, 16 (1): 37~ 40
Wang H B, Lu X, Huang Q P, *et al*. *Chin J Appl Physiol*, 2000, 16 (1): 37~ 40
- O'Callaghan C J, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cell: role of TGF β . *Hypertension*, 2000, 36 (3): 319~ 324
- Li C, Xu Q. Mechanical stress initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2000, 12 (7): 435~ 445
- Davis M J, Wu X, Timothy R, *et al*. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280 (4): H1427~ H1433
- Reusch P, Wagdy H, Wilson E, *et al*. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cell. *Circ Res*, 1996, 79 (5): 1046~ 1053
- Takahashi M, Ishida T, Tranb O, *et al*. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J Vasc Res*, 1997, 34 (3): 212~ 219
- Jalali S, del Pozo M A, Chen K D, *et al*. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (3): 1042~ 1046
- Traub O, Ishida T, Ishida M, *et al*. Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cell: potential role for a voltage-dependent sodium. *J Biol Chem*, 1999, 274 (29): 20144~ 20150
- Okuda M, Takahashi M, Suero J, *et al*. Shear stress stimulation of p130 (Cas) tyrosine phosphorylation requires calcium-dependent c-Src activation. *J Biol Chem*, 1999, 274 (38): 26803~ 26809
- Wang N, Buler J P, Ingber D E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 1993, 260 (5111): 1124~ 1127
- Tang D, Mehta D, Gunst S J. Mechanosensitive tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol*, 1999, 276 (1pt1): C250~ C258
- Ingber D E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, 1997, 59: 575~ 599

Role of Integrins in Cellular Responses to Mechanical Stress^{*}

ZHANG Hu-Jing^{**}, CAI Shao-Xi, LU Xiao

(Bioengineering Institute of Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract Mechanical stresses play critical roles in normal cellular functions and pathophysiological processes. Integrins, which are transmembrane molecules that interact with both extracellular matrices and intercellular cytoskeleton and kinases in the focal adhesion, are important in mechanotransduction. There is increasing evidence that the dynamic and specific interaction between integrin and extracellular matrices is essential for mechanotransduction.

Key words integrin, mechanical stress, extracellular matrices (ECM), mechanotransduction

^{*} This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (19732003).

^{**} Corresponding author. Address: Department of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China.

Tel: 86-23-68752597, E-mail: zhanghj715@sina.com

Received: October 12, 2001 Accepted: December 3, 2001

一种制备 GST 融合蛋白亲和层析胶的方法

彭方杨锐李文鑫

(武汉大学生命科学院生物技术系, 武汉 430072)

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合蛋白表达系统是将外源基因与 GST 基因融合后在细菌内表达的原核表达系统。这个系统使外源基因的转录和翻译效率提高, 同时, 也避免了外源蛋白受细菌本身蛋白酶的降解, 从而实现高效表达。已成为一项常规的实验室操作, 在大规模工业生产中应用广泛。然而, 该系统采用的亲和层析固定相是商品化的谷胱甘肽琼脂糖, 价格昂贵, 限制了这一系统的应用。我们提供了一种制备谷胱甘肽琼脂糖的方法, 以获得 GST 亲和层析胶, 用于纯化谷胱甘肽转移酶和 GST 融合蛋白, 这种方法简单、经济、效果也好, 现介绍如下:

取琼脂糖 Sepharose 4B 5g (5 ml) (发玛西亚公司) 用

100 ml 0.5 mol/L NaCl 淋洗, 再用蒸馏水洗净后, 放入 100 ml 三角瓶中。加入 3.25 ml 2.0 mol/L NaOH, 0.75 ml 环氧氯丙烷和 7.5 ml 56% 1, 4-二氧六环于 45℃ 水浴中振荡 2 h。滤干溶液, 加蒸馏水洗至 pH 8.0 后用 20 ml 0.1 mol/L pH 9.5 碳酸钠缓冲液淋洗。加入 pH 7.0 的磷酸缓冲液 25 ml, 谷胱甘肽溶液 5 ml (500 mg 还原型谷胱甘肽溶于水中, 用 KOH 调 pH 至 7.0, 定容 5 ml), 37℃ 振荡 24 h。用 100 ml 水洗, 加入 1 mol/L 乙醇胺终止反应, 再分别用 200 ml 水、乙酸钠溶液 (pH 4.0)、硼酸钠溶液 (pH 8.0)、水分别淋洗, 加入等体积含 50 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液 4℃ 保存 (所用的化学试剂均为分析纯)。