

文章编号:1004-7220(2009)05-0000-00

IL-8 刺激 L-选择素水解断裂对细胞膜 拓扑结构和刚度的影响

贾潇凌^{1,2,3}, 王世骥^{1,2}, 陈娟^{1,2}, 龙勉^{1,2}

(1. 中国科学院力学研究所 微重力重点实验室,北京 100190; 2. 中国科学院力学研究所 生物力学与生物工程中心,北京 100190;
3. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院,北京 100191)

摘要: 目的 研究 IL-8 刺激所致的 L-选择素水解断裂是否会引起细胞膜结构和刚度的变化,进而影响 L-选择素-配体的反应动力学。方法 分别用 IL-8、TAPI-0 + IL-8 和 TAPI-0 处理本构表达 L-选择素的 Jurkat 细胞,用以构建 L-选择素水解断裂、阻断水解断裂和阻断剂对照的细胞-分子模型。采用扫描电镜观察其表面拓扑结构,采用微管吸吮方法测量其刚度。结果 与正常组相比,水解断裂组和阻断水解断裂组细胞微绒毛减少、表面趋于光滑,而阻断剂对照组则无明显变化;无论是水解断裂组,阻断水解断裂组还是阻断剂对照组,细胞膜刚度与正常组相比均无显著性差异。结论 IL-8 刺激所致 L-选择素水解断裂会引发细胞膜拓扑结构的变化,进而影响 L-选择素-配体反应动力学的变化;而细胞膜刚度未见明显变化,表明载体刚度不是水解断裂引发 L-选择素-配体反应动力学变化的因素。

关键词: 白细胞介素-8(IL-8); L-选择素水解断裂; 拓扑结构; 刚度; 动力学
中图分类号: R318.01 文献标志码: A

Impacts of IL-8-induced L-selectin shedding on microtopology and stiffness of cell membrane

JIA Xiao-ling^{1,2,3}, WANG Shi-qi^{1,2}, CHEN Juan^{1,2}, LONG Mian^{1,2}. (1. Key Laboratory of Microgravity (National Microgravity Laboratory, Beijing 100190, China); 2. Center of Biomechanics and Bioengineering, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 3. School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective To elucidate if IL-8-induced L-selectin shedding is associated with the changes in microtopology and stiffness of cell membrane, which in turn regulates the kinetics of L-selectin binding to its ligands. **Method** Intact Jurkat cells constitutively expressing L-selectin (Case I) were incubated by IL-8 (Case II), pre-incubated by TAPI-0 following by incubating with IL-8 (Case III), or treated by TAPI-0 alone (Case IV). The microtopology and stiffness of cell membrane were measured using electron scanning microscopy and micropipette aspiration assay, respectively. **Result** The presentation of microvilli on the surface was reduced and cell membrane became smooth in Cases II and III but not in Case IV, as compared to that in Case I. No significant difference in membrane stiffness was found for all four cases. **Conclusions** Surface microtopology of a Jurkat cell was modified by IL-8 treatment, which would affect the binding kinetics of L-selectin to its ligands, whereas membrane stiffness retained the same as that for an intact cell, which would not contribute to the kinetics.

Key words: Interleukin-8(IL-8); L-selectin shedding; Microtopology; Membrane stiffness; Molecular kinetics

收稿日期:2009-04-17; 修回日期:2009-05-13

基金项目:国家自然科学基金资助(30730032 和 10332060)

作者简介:贾潇凌(1971-),讲师,研究方向:细胞和分子力学。

通讯作者:龙勉,Tel:(010) 82544131; E-mail:mlong@imech.ac.cn。

作为黏附分子选择素家族成员之一,L-选择素本构表达大多数白细胞微绒毛顶端,在血流作用下通过与血管内皮细胞上相应的配体结合,介导炎症反应中白细胞在血管壁面的滚动和稳定黏附^[1-3]。同时,L-选择素作为细胞表面的信号受体参与跨膜信号传导,如整合素的上调和细胞骨架的重排等^[4-5]。

L-选择素的一个重要特征是水解断裂(shedding),即白细胞受到化学趋化因子(如PMA、FM-LP)或细胞因子(如IL-8、PFA)激活后,L-选择素会被细胞膜上金属蛋白水解酶在胞外近膜部位水解断裂,形成镶嵌在膜上和游离在溶液中的片段(见图1)^[6-7],而蛋白水解酶的活性可被蛋白酶抑制剂(Hydroxamic acid-based metalloprotease inhibitor;如KD-IX-73-4或称TAPI-0)有效抑制且具有浓度依赖性(在50 mg/L时其抑制效果达到最大)^[8]。水解断裂的分子机制和生理作用目前尚不清楚。已有研究表明,水解断裂前后白细胞在包被有L-选择素配体的表面上的滚动行为发生改变^[9-12]。L-选择素介导白细胞的滚动与其和配体相互作用的反应动力学(结合、解离速率和反应亲和性)密切相关^[13],在已有的工作中发现,IL-8刺激L-选择素水解断裂导致反应动力学亲和性增高,结合和解离速率降低^[14],而载体表面拓扑结构和载体刚度影响选择素-配体的反应动力学^[15],因此,有理由假设:L-选择素水解断裂导致反应动力学改变与载体表面性质相关。鉴于此,本文开展IL-8刺激L-选择素水解断裂对细胞膜结构和刚度影响的研究,旨在验证细胞膜拓扑结构和刚度是否是水解断裂导致L-选择素反应动力学发生变化的因素。

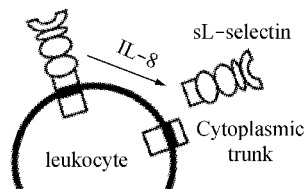


图1 L-选择素水解断裂模式图

Fig.1 Schematic of L-selectin shedding

1 材料与方法

1.1 主要试剂

水解断裂剂人白介素-8(human interleukin-8,

IL-8)(Sigma公司);水解断裂阻断剂TAPI-0(TNF- α protease inhibitor-0,TAPI-0又名KD-IX-73-4)(Peptides International公司);抗L-selectin单克隆抗体DREG56(Santa Cruz公司);荧光标记的山羊抗鼠二抗(FITC goat-anti-mouse IgG Fab)(Sigma公司)。

1.2 主要设备

流式细胞检测仪(BD FACSCalibur),扫描电子显微镜(JEDL JSM-5600LV),微管吸吮实验系统^[14,15]。

1.3 方法

1.3.1 Jurkat细胞的培养

人T淋巴瘤细胞Jurkat来自于ATCC(Clone E6-1,Number:TIB-152),培养于含有1 mmol/L左旋谷氨酰胺,100 U/mL青霉素,10 g/L链霉素和10%胎牛血清的RPMI培养基中,悬浮培养备用。

1.3.2 L-选择素水解断裂

根据表1所列条件^[14], 10^6 个Jurkat细胞分别在IL-8终浓度为50 μ g/L的培养液中37 $^{\circ}$ C孵育30 min(Case II),在进行上述IL-8刺激前先采用50 mg/L TAPI-0孵育15 min(Case III),以及只采用50 mg/L TAPI-0 0孵育15 min(Case IV),以构建L-选择素水解断裂,阻断水解断裂和阻断剂处理对照的细胞-分子模型,并与正常对照(即细胞采用常规1640培养基培养)进行比较。

表1 IL-8刺激L-选择素水解断裂的实验条件^[14]

Tab.1 Induction of L-selectin shedding by IL-8^[14]

分组	条件	处理方法
Case I	正常对照组	1 640 培养基
Case II	水解断裂组	IL-8 50 μ g/L \times 30 min
Case III	阻断水解断裂组	TAPI-0 50 mg/mL \times 15 min; IL-8 50 μ g/L \times 30 min
Case IV	阻断剂对照组	TAPI-0 50 mg/L \times 15 min

采用流式细胞仪检测L-选择素的表达以进一步验证水解或阻断水解是否发生。具体方法如文献所述^[14]:在正常及处理后的 10^6 个Jurkat细胞悬液中加入200 μ L终浓度为5 mg/L的DREG56在4 $^{\circ}$ C孵育35 min,2 500 r/min离心3 min,弃上清;流式细胞缓冲液洗3遍,悬于200 μ L的流式细胞溶液中;加入1 μ L荧光标记的山羊抗鼠二抗4 $^{\circ}$ C孵育

35 min, 2 500 r/min 离心 3 min, 弃上清; 流式细胞溶液洗 3 遍, 悬于 300 μ L 磷酸盐缓冲液中, 立即进行流式细胞仪检测。

1.3.3 细胞表面拓扑结构的观察

采用扫描电子显微镜对不同条件处理后的 Jurkat 细胞表面的拓扑结构进行观察比较。细胞采用 3% 多聚甲醛固定后干燥, 喷金。利用扫描电子显微镜 (JEDL JSM-5600LV) 观察, 放大倍数为 8 000 ~ 20 000 倍。

1.3.4 细胞膜刚度的测量

在任一负压 Δp 下, 细胞膜表面张力 T 可用拉普拉斯定律计算:

$$\Delta p = 2T \cdot (1/R_p - 1/R_m) \quad (1)$$

其中, R_p 和 R_m 分别为微管和细胞半径。定义面应变 $\Theta = \Delta A/A_0 = (A - A_0)/A_0$, 其中 ΔA 指吸吮前后细胞表面积的改变, A 和 A_0 分别为有无负压下细胞表面积, 则面应变为^[16]:

$$\Theta = \frac{\Delta A}{A_0} \approx \left[\left(\frac{R_p}{R_m} \right)^2 - \left(\frac{R_p}{R_m} \right)^3 \right] \cdot \frac{L_m}{2R_p} \quad (2)$$

L_m 是在 Δp 下细胞吸吮长度 (见图 2(d))。将测量得到的表面张力 T 对面应变 Θ (式(2)) 进行线性拟合, 斜率即为细胞膜的刚度。

采用微管吸吮技术对不同条件处理后 Jurkat 细胞膜的刚度进行检测。首先对微管内压力调零 [见图 2(a)]; 然后将其调节至第 1 个负压, 约 2 s 后细胞吸吮达到平衡 [见图 2(b)]; 再将压力恢复至零使得被吸吮的细胞恢复到初始状态, 并重复上述步

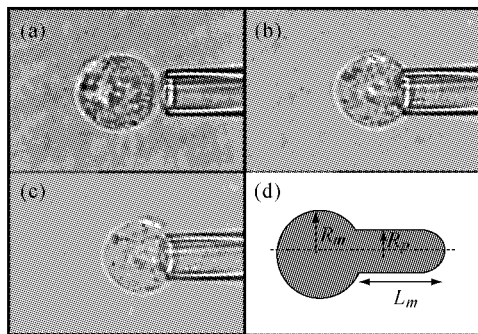


图 2 细胞膜刚度测量。其中图 2(a)-2(c) 为负压作用下细胞在微管内的变形实践过程, 图 2(d) 为细胞膜张力计算模式图。

Fig.2 Determination of cell membrane stiffness. Plotted were the time course of cell deformation in a micropipette at a suction pressure and the schematic of membrane tension calculation.

骤 [见图 2(c)]。对于一个给定细胞, 测量不少于 3 个负压变化值; 对于不同处理条件, 测量 10 个细胞并求其平均值。实验结果与正常对照比较, 通过 Student's t -检验分析其显著性差异。

2 实验结果

2.1 L-选择素水解断裂对细胞膜拓扑结构的影响

L-选择素分布在白细胞表面微绒毛的顶端。本文考察了 IL-8 刺激导致 L-选择素水解断裂的同时是否也改变了 Jurkat 细胞表面的微绒毛分布和细胞粗糙度。研究发现, 正常对照组细胞的微绒毛呈现密集的长丝状或絮团状, 表面非常粗糙 [见图 3(a)]; 水解断裂组细胞微绒毛相对减少, 粗糙度变小, 微绒毛失去典型的长丝状或絮团状而变成一些不规则的突起 [见图 3(b)], 表明 IL-8 处理可导致细胞表面拓扑结构改变; 阻断水解断裂组细胞表面粗糙度趋于恢复正常, 微绒毛重新变长但顶部仍然呈现片状 [见图 3(c)], 说明 IL-8 处理所致表面拓扑结构改变是一个可逆过程; 阻断剂对照组细胞表面粗糙度和微绒毛的形状和正常对照组几乎没有差别 [见图 3(d)], 提示阻断剂对表面拓扑结构的影响可以忽略。本文结果显示, IL-8 刺激在导致 L-选择素水解断裂同时, 也影响了细胞表面的拓扑结构。

2.2 L-选择素水解断裂对细胞膜刚度的影响

L-选择素水解断裂发生的机理很复杂, 其中一个重要的过程机理是因细胞受到激活导致细胞骨架发生重排, 而细胞骨架和细胞膜张力紧密相关^[17]。本文着重考察了 IL-8 刺激导致 L-选择素水解断裂同时是否也改变了 Jurkat 细胞膜的刚度。研究发现, 细胞膜表面张力 T 随细胞面应变 Θ 增加而线性增加, 存在个体差异性 [点, 图 4(a)]。采用公式 (2) 不仅可较好地拟合实验数据 [直线, 图 4(a)], 而且还可以获得 Jurkat 细胞膜刚度 (直线斜率): 正常对照组、水解断裂组、阻断水解断裂组和阻断剂对照组分别为 (6.81 ± 1.13) mN/m, (7.31 ± 0.55) mN/m, (6.58 ± 0.38) mN/m, (6.27 ± 0.41) mN/m [见图 4(b)], 其拟合相关系数分别为 0.51, 0.80, 0.87 和 0.85。与正常对照组 (Case I) 相比均不存在显著性差异 (P 值分别为 0.711 (Case II)、0.856 (Case III) 和 0.677 (Case IV)) 且彼此之间也无显著性差异。本文结果显示, 尽管 IL-8 刺激在导致 L-选

择素水解断裂同时改变了细胞表面的拓扑结构,但并不影响细胞膜的刚度。

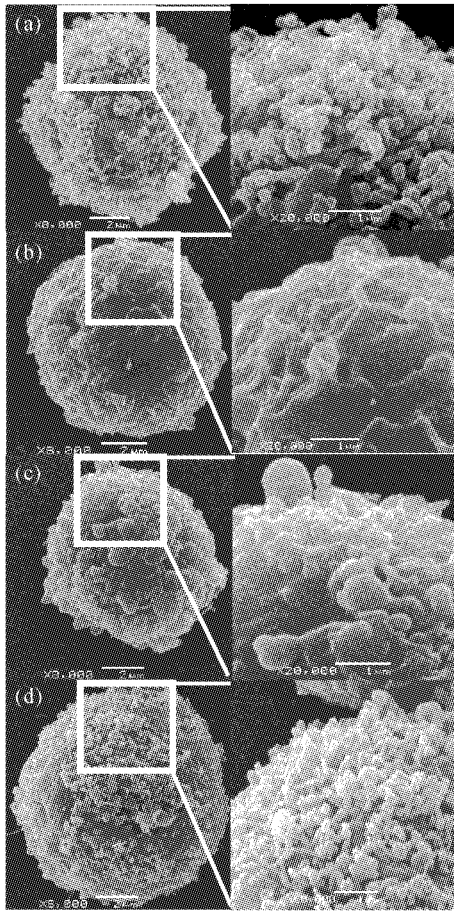


图3 不同处理条件下 Jurkat 细胞表面微拓扑结构 (a) 正常对照, (b) 水解断裂, (c) 阻断水解断裂, (d) 阻断剂对照。左列和右列分别放大倍数为 8000 × 和 20000 × 的图像。

Fig.3 Microtopology of a Jurkat cell for Cases (a), (b), (c) and d Left and right columns denoted as the SEM images with 8000 × and 20000 × magnification, respectively.

3 讨论

L-选择素水解断裂作为一种重要的生理现象,在炎症反应和血栓形成等病理生理过程中起着重要作用。已有关于 L-选择素水解断裂生物学功能的工作大多集中在比较水解断裂前后或阻断水解断裂前后白细胞滚动行为改变,由于其动力学机制不清楚,导致由此得出的结论颇有争议^[9-12],或认为 L-选择素水解断裂会增加白细胞的滚动速度^[10-12],或提示对白细胞的滚动行为并无影响^[9]。笔者已开展

的 IL-8 刺激 L-选择素水解断裂调控其与配体反应动力学的研究表明,IL-8 刺激所致水解断裂在降低 L-选择素表达的同时 L-选择素-配体相互作用的亲和性增加、结合和解离速率降低^[14]。前者可使白细胞的滚动速度加快,后者可使白细胞的滚动速度减慢,其反应动力学行为取决于两者的净作用结果。然而,IL-8 刺激所致水解断裂的结构基础(尤其是细胞表面拓扑结构和细胞膜刚度)并不清楚。

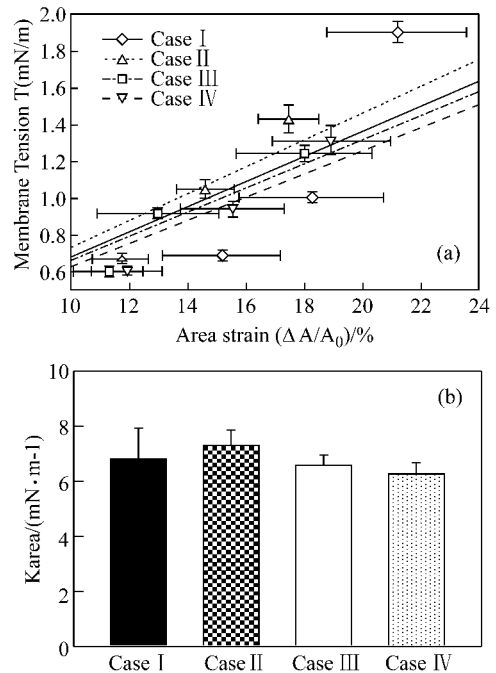


图4 (a) 不同处理条件下 Jurkat 细胞膜张力随面积应变的变化。其中数据点表示为平均值 ± 标准偏差 ($N=10$; Mean ± SE), 直线为根据式 (1.2) 拟合的直线(斜率即为细胞膜刚度); (b) 不同处理条件下细胞膜的刚度 (Mean ± SE)。

Fig.4 (a) Dependence of membrane tension on area strain for Cases I, II, III, and IV. Data (points) were presented as mean ± SE ($N=10$); (b) Summaries of cell membrane stiffness presented as mean ± SE.

选择素-配体反应动力学受到载体表面拓扑结构的影响^[15]。本课题组已有研究表明,载体表面的粗糙度和刚度影响选择素-配体结合的亲和性而不是解离速率,载体表面越光滑,表面刚度越低,则反应亲和性越高^[15]。本文采用与文献报道相似的实验条件(激活剂、阻断剂以及作用浓度、时间、温度)构建了水解断裂组、阻断水解断裂组和阻断剂对照组 3 组实验,考察水解断裂所致细胞拓扑结构的可

能变化。研究表明,IL-8 刺激明显改变细胞粗糙度,使细胞表面变得较正常组光滑,这与先前发现的水解断裂后 L-选择素-配体亲和性较正常对照组提高近 4 倍(分别为 $(0.103 \pm 0.007) \mu\text{m}$ 和 $(0.026 \pm 0.002) \mu\text{m}$)^[14]的动力学特征一致。同时,采用阻断剂预处理后细胞粗糙度趋于恢复正常,这也与已发现的反应亲和性趋于正常($(0.037 \pm 0.006) \mu\text{m}^4$)^[14]相符。只采用阻断剂的情形与之类似($(0.034 \pm 0.005) \mu\text{m}^4$)^[14]。反应亲和性的变化规律与已有报道^[15]一致,即细胞表面越光滑则 L-选择素-配体反应亲和性越高。但有意思的是,水解断裂所致的 L-选择素-配体反应亲和性改变是通过同时(但不同程度)降低其结合和解离速率来实现的^[14],而不是通过载体表面粗糙度影响其结合速率而非解离速率来完成的^[15],说明水解断裂导致细胞拓扑结构的变化是水解断裂导致 L-选择素-配体反应动力学改变的重要原因,但除此之外,还存在其他因素(如胞内信号转导)调控这一动力学过程。

除载体拓扑结构外,刚度也是影响选择素-配体反应动力学的因素之一^[16]。既然 IL-8 刺激在导致 L-选择素发生水解断裂的同时可以改变细胞表面拓扑结构,也有可能改变细胞膜刚度。研究表明,无论是水解断裂组,还是阻断水解断裂组或阻断剂对照组,其刚度和正常对照组相比均无显著性差异,提示细胞膜刚度的变化不是水解断裂导致 L-选择素-配体反应动力学发生变化的原因。在本文中还发现,在微管吸吮过程中所测量得到的面应变(图 4(a)中数据点在横轴上的方差)离散度相对较大,提示尽管采用来自同一细胞株的均一细胞、对足够样本量的细胞(每种实验条件 30 对细胞)进行力学测试,其力学性质(细胞膜刚度)仍存在个体差异性。此外,本文所采取的是膜张力与膜表面积变化率之比的简化线性模型,可初步揭示细胞刚度与所表征的黏附分子之反应动力学性质的关联。有核细胞的本构模型至今仍是尚未解决的关键细胞力学问题,通过考虑细胞膜黏弹性响应、或从薄壳本构关系出发建模等方面予以改进,将是另外一个独立的工作。

综上所述,IL-8 刺激 L-选择素水解断裂导致细胞膜拓扑结构发生改变,进而影响 L-选择素-配体的反应动力学;IL-8 刺激不引起细胞膜刚度的明显变化,故刚度不是 IL-8 刺激 L-选择素水解断裂所致动

力学改变的调控因素。

参考文献:

- [1] Bowen BR, Nguyen T, Lasky LA. Characterization of a human homologue of the murine peripheral lymph node homing receptor[J]. *J Cell Biol*, 1989, 109(1): 421-428.
- [2] Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, et al. Lectin-like cell-adhesion molecule-1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo[J]. *Blood*, 1991;77(12): 2553-2555.
- [3] Vonandrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, et al. Two-step model of leukocyte endothelial-cell interaction in inflammation - distinct roles for ICAM-1 and the leukocyte beta-2 integrins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88(17): 7538-7542.
- [4] Brenner B, Gulbins E, Busch GL, et al. L-selectin regulates actin polymerisation via activation of the small G-protein Rac2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(3):802-807.
- [5] Simon SI, Burns AR, Taylor AD, et al. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) β 2-integrin [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3):1502-1514.
- [6] Kahn J, Ingraham R H, Shirley F, et al. Membrane proximal cleavage of L-selectin: Identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin[J]. *J Cell Biol*, 1994, 125(2): 461-470.
- [7] Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high-levels and retains functional-activity[J]. *J Cell Biol*, 1992, 119(1): 229-238.
- [8] Feehan C, Darlak K, Kahn J, et al. Shedding of the lymphocyte L-selectin adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(12): 7019-7024.
- [9] Allport JR, Ding HT, Ager A, et al. L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium *in vitro* [J]. *J Immunol*, 1997, 158(9): 4365-4372.
- [10] Hafezi-Moghadam A, Ley K. Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1999, 189(6): 939-947.
- [11] Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, et al. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment [J]. *J Exp Med*, 2001; 193(7): 863-872.
- [12] Walcheck B, Kahn J, Fisher J M, et al. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding *in vitro* [J]. *Nature*, 1996, 380(6576): 720-723.

-
- [13] Alon R, Chen SQ, Fuhlbrigge R, *et al.* The kinetics and shear threshold of transient and rolling interactions of L-selectin with its ligand on leukocytes [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(20): 11631-11636.
- [14] Jia XL, Chen J, Long M. IL-8-induced L-selectin shedding regulates its binding kinetics to PSGL-1 [J]. Chin Sci Bull, Accepted.
- [15] Wu L, Xiao BT, Jia XL, *et al.* Impact of carrier stiffness and microtopology on two-dimensional kinetics of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) interactions [J]. J Biol Chem. 2007 ; 282(13): 9846-9854.
- [16] Kwok R, Evans E. Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles [J]. Biophys J, 1981, 35(3):637-652.
- [17] Ingber DE. Tensigrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction [J]. Annu Rev Physiol, 1997, 59: 575-599.