论著

文章编号:1000-5404(2010)22-2370-04

层黏连蛋白 α4 链中 αvβ3 整合素结合肽的精细鉴定与功能分析

连继勤[1],戴旭芳[2],黄 刚[1],王 喆[1],何凤田[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[1];400038 重庆,重庆师范大学教育科学学院[2])

【摘要】 目的 利用点突变、缺失突变及功能实验确定 αvβ3 整合素在已鉴定人层黏连蛋白 α4 链(human laminin alpha4,LNα4)G19 肽段中的最小结合位点及关键氨基酸残基。**方法** 采用同源序列比较确定 G19 肽中的保守氨基酸残基,点突变确定其中的关键氨基酸残基,缺失突变确定 αvβ3 整合素结合的最小肽段,并通过人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)管样结构形成实验及鸡胚尿囊膜(chick chorioallantoic membrane,CAM)实验验证鉴定肽的生物学功能。**结果** 同源性比较分析发现,G19 肽中共存在 10 个保守性氨基酸残基位点。点突变分析发现第 4 位的 I、第 10 位的 H 及第 16 位的 Y 是 αvβ3 整合素结合的关键位点,缺失突变分析确定 $G^{1124-1137}$ 肽段(G14 肽)是 αvβ3 整合素结合的最小肽段,合成的 G14 肽可以浓度依赖性地促进 HUVEC 管样结构的形成及 CAM 的血管生成。**结论** 成功鉴定了 αvβ3 整合素在 LNα4 中的最小结合位点及关键氨基酸残基。所鉴定的肽段具有促 HUVEC 成管样结构及促 CAM 血管生成的生物学功能。

【关键词】 LNα4;αvβ3 整合素;结合肽;鉴定

【中图法分类号】 Q516;Q71 **【文献标志码】** A

Identification of interacting motif of alphavbeta3 integrin in LNα4 and its function analysis

Lian Jiqin[1], Dai Xufang[2], Huang Gang[1], Wang Zhe[1], He Fengtian[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2] College of Educational Science, Chongqing Normal University, Chongqing, 400047, China)

【Abstract】 Objective To identify the binding motif of alphavbeta3 integrin in human laminin alpha 4 subunit (LNα4). Methods The conserved amino acid residues were determined by blast analysis based on G19 peptide sequence ($G^{1121-1139}$). The key sites were identified by single-site mutant and the binding motif was identified by deletion mutant. The function of identified motif was analyzed by tube-like structure formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro* and angiogenesis assay on chick chorioallantoic membrane *in vivo*. Results Total 10 conserved amino acid residues were found in G19 peptide through blast analysis, and 3 key sites binding with alphavbeta3 integrin were identified by single-site mutant. The shortest fragment between $G^{1124-1137}$ was identified by deletion mutant and fragment promoted tube-like structure formation by hUVECs and angiogenesis on CAM in a dose-dependent manner. Conclusion The key sites and the shortest fragment binding with alphavbeta3 integrin in LNα4 are identified successfully, which provides the evidence for the function of LNα4 in illness.

【Key words】 laminin alpha 4; αvβ3 integrin; binding motif; identification

Supported by the National Nature Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5112). Corresponding author: He Fengtian, Tel: 86-23-68752262, E-mail: hefengtian66@yahoo.com.cn

层黏连蛋白(laminin, LN)分子是由 α、β、γ 3 个亚基所组成的异三聚体,到目前为止已经发现了至少 14 种不同的 LN 分子,共由 5 种 α、3 种 β 与 3 种 γ 构成[1,2]。其中,层黏连蛋白 α4 链(LNα4)是构成 LN-8(α4β1γ1)和 LN-9(α4β2γ1)的一个组分,主要在脑、肌肉、骨腔等组织的血管内皮、外周神经的束膜及发育

【基金项目】 重庆市自然科学基金(2008BB5112)

【通信作者】 何凤田,电话:(023)68752262,E-mail:hefengtian66@yahoo.com.cn

中肌纤维周围的基底膜中表达，是唯一在新生与成熟血管内皮基底膜中均表达的 α 亚基，特别是在主动脉内皮、心内膜、皮肤和脑组织中的血管内皮表达量最高[3]。LNα4 与其受体 αvβ3 整合素共同分布在血管内皮基底膜中且紧密连接，在内皮细胞的黏附、增殖和迁移过程中起重要作用[4,5]。LNα4 缺失会引起机体血管生成受损，而 αvβ3 整合素的抗体则能特异性抑制由于 LNα4 过表达而引起的人真皮微血管内皮细胞的伸展与迁移[6,7]。因此，LNα4 与 αvβ3 整合素间的相互作用是影响血管生成过程的重要因素。本课题组在前期研究中对 LNα4 与 αvβ3 整合素之间的相互作用进行了深入探讨[8]，利用 LNα4 的重组表达蛋白、细胞黏附、αvβ3 整合素特异性功能阻断抗体实验及小肽合成等技术，发现 αvβ3 整合素在 LNα4 中的作用位点 $G^{1121-1139}$（G19 肽），此结合肽不含 RGD 序列，是一种新的 αvβ3 整合素结合肽。但 G19 肽尚不是 LNα4 结合 αvβ3 整合素的最短肽序列，肽段中起作用的关键氨基酸残基也尚不清楚。本研究旨在以 G19 肽为基础，精细鉴定 αvβ3 整合素所结合的最短序列及关键位点，为阐明 LNα4 的促血管生成机制提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞　　人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVEC）由本课题组分离并培养，方法参见文献[9]。

1.1.2　小肽　　由北京中科亚光生物公司合成，纯度 98%。

1.1.3　抗体　　αvβ3 整合素功能阻断性抗体 LM609 购自 Chemicon 公司，非特异性鼠 IgG 抗体购自北京中杉生物公司。

1.2　方法

1.2.1　αvβ3 整合素结合肽的解析　　将人、小鼠、牛、黑猩猩、短尾鲵、鸡、犬、斑马鱼的 LNα4 序列进行同源性比较分析，确定 G19 肽中的保守氨基酸残基并进行定点突变，合成突变小肽。在此基础上，同时结合参考文献[6]，再对 G19 肽进行分段缺失突变，以最终确定 αvβ3 整合素结合的最短肽段。

1.2.2　细胞黏附实验　　细胞模型为 HUVEC，实验前 24 h 用 0.02 mol/L 的 $MnCl_2$ 作用使细胞高表达 αvβ3 整合素。将纯化的合成肽溶于 PBS 溶液，终浓度为 200 nmol/L。按每孔 50 μl 包被 96 孔板，每一样品包被 4 孔，阳性对照为 G19 肽，阴性对照为随机合成的 19 肽段。另设一不作包被的空白对照组，用于计算附着率。实验程序参照文献[8]。测定值以阳性对照组为 100%，计算各组附着率。

1.2.3　抗体功能阻断实验　　在细胞黏附实验的基础上，实验组加入特异性 αvβ3 整合素功能阻断性抗体 LM609，对照组加入非特异性 IgG 抗体，MTT 检测细胞黏附情况并做统计学分析。

1.2.4　体外管样结构形成实验　　细胞模型为 HUVEC。在 96 孔细胞培养板中包被基质胶 Matrigel，包被量为 100 μl/孔。然后每孔加入 100 μl 细胞悬液，其中含 1.3×10^4 个细胞，用含 10% 胎牛血清的细胞培养基稀释。合成肽浓度按 1 600、800、400、200、100、50 nmol/L 进行倍比稀释，每个浓度重复 3 次。实验组采用鉴定的 αvβ3 整合素结合肽，对照组为随机合成肽。37 ℃培养过夜后用甲醇固定，倒置显微镜下观察管样结构形成情况，拍照并分别取 5 个视野进行计数并统计分析。

1.2.5　CAM 血管增生实验　　参照文献[8]进行。种蛋孵育至第 6 天开口，将浸有寡肽的滤纸片贴放在实验组的鸡尿囊绒膜上，对照组为等量随机肽，封口后继续孵化。72 h 后，打开气室，在气室端加入等体积混合的丙酮和甲醇，室温固定 15 min。而后剥开蛋壳，去除鸡胚的其他内容物，将尿囊绒膜套在 1 个倒扣的小烧杯上，观察鸡尿囊绒膜的血管生成反应，用数码相机拍照。显微镜下对滤纸片周围 10 mm 范围内的血管数目进行计数，并将对照组与实验组进行统计学分析。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　G19 肽同源序列分析

将人、小鼠、牛、黑猩猩、短尾鲵、鸡、犬、斑马鱼的 G19 肽序列进行同源性比较分析，结果表明，G19 肽中共存在 10 个保守性氨基酸残基位点。见图 1。

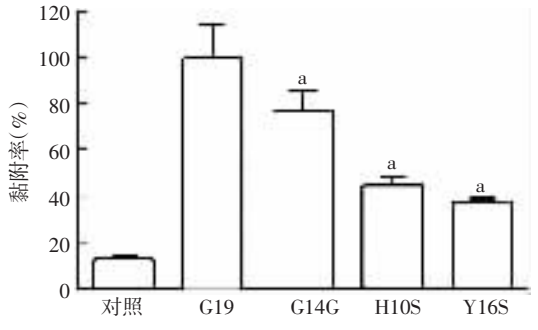
人	KAQ INDAKY HEI SI IYHND
小鼠	KAQ INDAKY HEI SI IYHND
牛	KAQ INDAKY HEI SI IYHND
黑猩猩	KAQ INDAKY HEI SI IYHND
短尾鲵	KAP INDAKY HEI SI IYHND
犬	RAQ INDAKY HEI SI IYHND
鸡	KAQ INDAKF HEI SI IYHN *
斑马鱼	KLQ INDARY HEV SV IYHH *

划线部分为保守性氨基酸残基；* 缺失突变

图 1　G19 肽同源序列分析

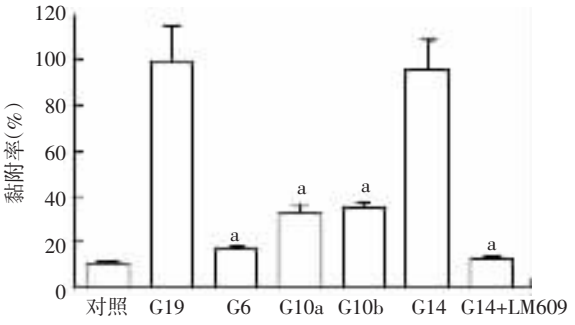
2.2　G19 肽关键位点分析

突变位点如下：I4G（第 4 位 I 突变为 G），H10S（第 10 位 H 突变为 S），Y16S（第 16 位 Y 突变为 S）。然后对合成的突变肽进行细胞黏附实验分析，结果见图 2。与 G19 肽相比，3 种突变体肽的细胞黏附能力均有不同程度的下降（$P<0.01$），尤以 H10S 与 Y16S 为甚。说明 3 个保守性氨基酸残基在 G19 肽的功能发挥中均起一定作用。



a：$P<0.01$，与G19肽比较

图2 点突变肽促细胞黏附功能分析



a：$P<0.01$，与G19肽比较

图3 缺失突变肽促细胞黏附功能分析

2.3 G19肽最短肽段分析

以2.2结果为基础，对G19肽进行缺失突变，设计如下：G6：KYHEIS；G10a：NDAKYHEIS；G10b：KYHEISIIYH；G14：INDAKYHEISIIYH。对合成的突变肽进行细胞黏附实验分析，结果见图3。与G19肽相比，G6、G10a、G10b 3种缺失突变肽的促细胞黏附能力显著下降（$P<0.01$），而G14肽则无明显差异（$P>0.05$）。说明G14肽段基本保持了与αvβ3整合素结合的能力，而这种结合能力可以被αvβ3整合素的特异阻断性抗体LM609所阻断。由此推断，αvβ3整合素在G19肽中的最短结合肽段应位于$G^{1124-1137}$之间。

2.4 G14肽促HUVEC成管样结构功能分析

如图4，表1所示，与随机肽处理的对照组相比，G19肽与G14肽能够明显促进HUVEC的管样结构形成（箭头所示），且这种作用具有一定的剂量效应。但当肽浓度达到400 nmol/L的时候，其作用达到饱和，管样结构形成数量不再呈线性增加。

2.5 G14肽促CAM血管生成活性分析

与随机肽处理的对照组相比，G19或G14肽均能显著促进CAM血管生成（图5，表2，$P<0.01$），不同直径的血管数量均明显增加。说明G14肽在体内具有促血管生成的活性。

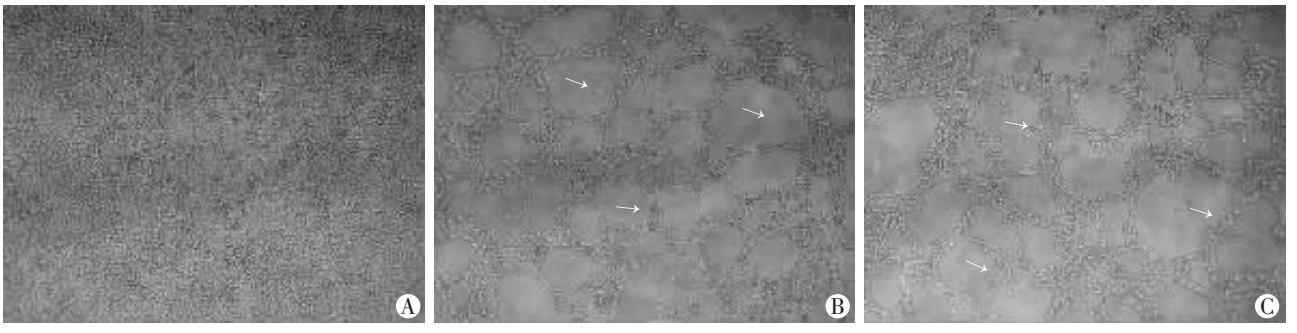
表1 不同浓度肽促HUVEC成管样结构功能分析（$\bar{x}\pm s$）

组别	50 nmol/L	100 nmol/L	200 nmol/L	400 nmol/L	800 nmol/L	1 600 nmol/L
随机肽	-	0.3±0.3	0.7±0.3	-	-	-
G19肽	8.5±1.2	20.4±2.3	28.2±3.5	36.6±3.8	38.4±3.2	39.7±2.9
G14肽	8.7±1.6	21.9±1.9	26.8±4.6	37.2±3.1	37.9±3.9	39.6±3.4

表2 400 nmol/L肽促CAM血管生成功能分析（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

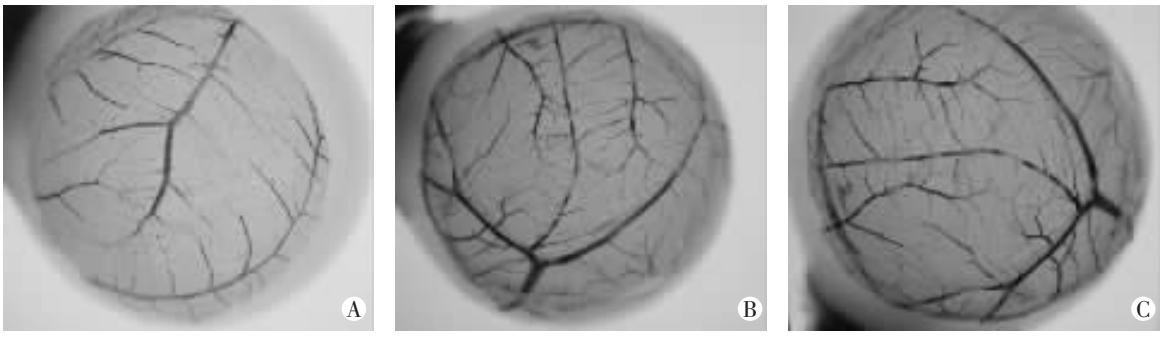
组别	血管数		
	血管直径 >1 mm	血管直径 0.1~1 mm	血管直径 <0.1 mm
随机肽	3.1±1.2	11.2±3.6	40.5±7.1
G19肽	7.3±2.6[a]	29.2±5.5[a]	92.6±11.8[a]
G14肽	6.7±3.1[a]	29.3±6.2[a]	90.9±14.4[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较



A：对照组；B：G19肽；C：G14肽 ↑：管样结构

图4 肽浓度为200 nmol/L时HUVEC成管样结构功能分析（倒置显微镜 ×10）



A：对照组；B：G19肽；C：G14肽

图5 肽浓度为400 nmol/L时CAM血管生成活性分析（LM ×4）

3 讨论

LNα4是血管生成过程中非常重要的ECM分子，而其功能的发挥则主要依赖表达于血管内皮细胞表面的整合素受体，尤其是αvβ3整合素受体[10]。本课题组在前期研究中鉴定了αvβ3整合素在LNα4中结合的一段肽$G^{1121-1139}$（G19肽），但G19肽尚不是LNα4结合αvβ3整合素的最短肽序列，肽段中起作用的关键氨基酸残基也尚不清楚。本研究首先根据G19肽的同源性序列比较结果确定了G19肽中的保守性氨基酸残基，并以此为基础进行点突变，以确定G19肽中的关键氨基酸残基。这也是目前通常采用的、有效的确定关键氨基酸残基的方法。结合Nam等[11]的报道，YH基序（指序列中连续的YH氨基酸残基）是αvβ3整合素结合的重要基序，课题组选取了第4位的I，第10位的H和第16位的Y进行突变，突变对象采用具有短侧链的氨基酸残基G和S，以尽量减少对整体肽链空间结构的影响。同时，第4位和第16位也兼顾了所有保守性氨基酸残基的分布。结果显示，这3个位点的氨基酸残基均与整个肽段的功能密切相关，是G19肽中的关键氨基酸位点。缺失突变实验也进一步证实了涵盖所有保守氨基酸残基在内的$G^{1124-1137}$肽段是αvβ3整合素所结合的最短肽段。

人脐静脉内皮细胞表面通常表达少量的αvβ3整合素受体，使用$MnCl_2$刺激后可以促进αvβ3整合素受体的表达[12]。因此，功能性的αvβ3整合素结合肽可以通过与αvβ3整合素的结合而促进细胞的黏附及管样结构的形成。G14肽与G19肽均能够有效促进HUVEC的黏附与管样结构形成且无显著差异，从而在体外实验证明了G14肽具备了结合αvβ3整合素并发挥其功能的作用。体内的CAM血管生成实验进一步证实了G14肽在促血管生成方面的功能，这也是LNα4的一项重要功能，从而印证了G14肽作为αvβ3整合素在LNα4中结合位点的重要功能。

综上所述，我们成功地鉴定了αvβ3整合素在LNα4中的最小结合位点及关键氨基酸残基，证实了G14肽所具有的促血管生成功能，从而为进一步阐明LNα4的功能及其在肿瘤转移过程中的作用提供了依据。

参考文献：

[1] Guarnieri D, Battista S, Borzacchiello A, *et al*. Effects of fibronectin and laminin on structural, mechanical and transport properties of 3D collageneous network[J]. J Mater Sci Mater Med, 2007, 18(2): 245-253.

[2] Chen J, Jing L, Gilchrist C L, *et al*. Expression of laminin isoforms, receptors, and binding proteins unique to nucleus pulposus cells of immature intervertebral disc[J]. Connect Tissue Res, 2009, 50(5): 294-306.

[3] Garcia-Nieto S, Johal R K, Shakesheff K M, *et al*. Laminin and fibronectin treatment leads to generation of dendritic cells with superior endocytic capacity[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10123.

[4] Bunch T A. Integrin alphaIIbbeta3 activation in Chinese hamster ovary cells and platelets increases clustering rather than affinity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(3): 1841-1849.

[5] Quemelo P R, Simoes D L, Peres L C. Beta1 integrin and VEGF expression in an experimental model of brain tissue heterotopia in the lung[J]. Childs Nerv Syst, 2010, 26(6): 807-810.

[6] Abrass C K, Hansen K M, Patton B L. Laminin alpha4-null mutant mice develop chronic kidney disease with persistent overexpression of platelet-derived growth factor[J]. Am J Pathol, 2010, 176(2): 839-849.

[7] Munoz J, Zhou Y, Jarrett H W. LG4-5 domains of laminin-211 binds alpha-dystroglycan to allow myotube attachment and prevent anoikis[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(1): 111-119.

[8] Lian J, Dai X, Li X, *et al*. Identification of an active site on the laminin alpha4 chain globular domain that binds to alphavbeta3 integrin and promotes angiogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(1): 248-253.

[9] Kostidou E, Topouridou K, Daniilidis A, *et al*. Oxidized laminin-1 induces increased monocyte attachment and expression of ICAM-1 in endothelial cells[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(6): 630-637.

[10] Flynn R S, Murthy K S, Grider J R, *et al*. Endogenous IGF-I and alphaVbeta3 integrin ligands regulate increased smooth muscle hyperplasia in stricturing Crohn's disease[J]. Gastroenterology, 2010, 138(1): 285-293.

[11] Nam J O, Kim J E, Jeong H W, *et al*. Identification of the alphavbeta3 integrin-interacting motif of betaig-h3 and its anti-angiogenic effect[J]. J Biol Chem, 2003, 278(28): 25902-25909.

[12] Cai K, Dong H, Chen C, *et al*. Inkjet printing of laminin gradient to investigate endothelial cellular alignment[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 72(2): 230-235.

（收稿 2010-09-19 修回 2010-10-12）

（编辑 汪勤俭）

《第三军医大学学报》荣获第五届全军医学期刊奖

据总后卫生部卫科训[2010]130号文件通知，我刊荣获第五届全军医学期刊奖，为直接授予优秀期刊奖的七种期刊之一。本刊编辑部主任冷怀明、编辑栾嘉被评为第三届全军优秀医学编辑工作者。

本刊编辑部