

文章编号:1004-7220(2017)06-0548-07

# 流体剪应力作用下趋化因子 CXCL12 诱导的 白细胞整合素 LFA-1 的激活

陈岱琳, 吴建华, 方颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 生物力学研究所, 广州 510006)

**摘要:** **目的** 探究剪应力下趋化因子诱导的白细胞上整合素 LFA-1 激活过程。**方法** 采用平行平板流动腔系统在 10 ~ 30 mPa 剪应力下, 观察分析可溶性及固定趋化因子 CXCL12 对 Jurkat 细胞在 ICAM-1 上瞬时黏附行为的影响, 提取特征参数。**结果** CXCL12 仅能介导 Jurkat 细胞的短暂栓缚(0.13 ~ 0.20 s)。只有固定的 CXCL12 才能有效激活 Jurkat 细胞上 LFA-1 与 ICAM-1 键合, 从而提高栓缚事件的发生率, 并大大延长细胞的栓缚时间(0.8 ~ 1.2 s)。激活的 LFA-1/ICAM-1 解离速率呈现明显双态性:  $k_1$  (1.09 ~ 1.24 s<sup>-1</sup>),  $k_2$  (0.28 ~ 0.7 s<sup>-1</sup>), 剪应力主要通过调节  $k_1$  及  $k_2$  对整个黏附时间的贡献率  $\beta$  来控制细胞的瞬时黏附行为。**结论** 剪应力通过 G 蛋白偶联受体与 CXCL12 的作用可在 0.2 s 内快速激活整合素 LFA-1, 进而调控白细胞的黏附过程。研究结果有助于深化趋化因子-力偶联调控整合素激活机制的认识。

**关键词:** 白细胞整合素 LFA-1; 趋化因子 CXCL12; 亲和态跃迁; 受体配体相互作用; 细胞黏附

**中图分类号:** R 318.01      **文献标志码:** A

**DOI:** 10.16156/j.1004-7220.2017.06.011

## Shear force-induced activation of integrin LFA-1 by chemokine CXCL12 under flows

CHEN Dai-lin, WU Jian-hua, FANG Ying (*Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China*)

**Abstract:** **Objective** To explore the activate process of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) triggered by chemokine under shear stresses. **Methods** Jurkat cells were perfused over ICAM-1 in the parallel-plate flow under 10-30 mPa shear stresses. The effects of soluble and immobilized Chemokines on transient adhesion behavior of Jurkat cells were observed and analyzed to obtain their tether characteristics. **Results** The immobilized CXCL12 could mediate brief tether (0.13-0.2 s) of Jurkat cells under flow. Only immobilized CXCL12 could effectively activate LFA-1 on Jurkat cells to bind ICAM-1, and then enhance cell adhesion fraction and greatly prolong the tether time (0.8-1.2 s). Two distinct activation states of LFA-1/ICAM-1 were reflected by their dissociation rate  $k_1$  (1.09-1.24 s<sup>-1</sup>) and  $k_2$  (0.28-0.7 s<sup>-1</sup>), respectively. The shear stress would affect the transient adhesion behavior of cells through regulation of  $k_1$  and  $\beta$  (the contribution ratio of high affinity to total tether time). **Conclusions** Shear stress can rapidly trigger LFA-1 activation in 0.2 s through G protein coupled receptors induced by chemokine CXCL12, and further regulate the whole adhesion process of leukocyte. These research findings will contribute to further understanding the integrin activation mechanism of chemokine-force cooperative regulation.

**Key words:** Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1); Chemokines CXCL12; Integrin activation; Receptor-ligand interaction; Cell adhesion

收稿日期:2017-04-20; 修回日期:2017-06-05

基金项目:国家自然科学基金项目(11432006,11672109,11272125,31170887)。

通信作者:方颖,副教授,博士研究生导师,E-mail: yfang@scut.edu.cn。

当机体受外来病毒或细菌入侵时,感染组织会释放趋化因子,趋化因子呈浓度梯度性扩散,并部分表达在感染组织附近的血管内皮细胞表面<sup>[1-2]</sup>。受趋化因子诱导,血液中的白细胞奔赴炎症部位,由选择素和白细胞表面受体相互作用介导被捕获至血管内壁,从而启动炎症级联反应,实现稳定黏附、爬行和跨膜迁移,以消灭外来侵入物和组织修复<sup>[2]</sup>。在这个过程中,白细胞上整合素的激活至关重要<sup>[3]</sup>;若激活不当,会导致诸如白细胞黏附缺陷症等严重的病理炎症现象<sup>[4]</sup>。

整合素由  $\alpha\beta$  异源二聚体构成, $\beta 1$ 、 $\beta 2$  和  $\beta 3$  整合素在白细胞表面均有表达,其中  $\beta 2$  整合素在白细胞发挥其免疫功能中最为重要<sup>[4-5]</sup>。整合素可通过改变其胞外域构象来调控其与配体的亲和力,一般认为存在 3 种亲和力构象:腿部弯曲折叠( $E^-$ )、头部闭合( $H^-$ )的低亲和力构象( $E^-H^-$ )、腿部舒展( $E^+$ )、头部闭合( $H^-$ )的中亲和力构象( $E^+H^-$ )、腿部伸展( $E^+$ )、头部打开( $H^+$ )的高亲和力构象( $E^+H^+$ )<sup>[6]</sup>。在正常生理环境中,整合素呈现低亲和力构象,不能与配体结合<sup>[7]</sup>;在趋化因子和选择素的作用下可通过“由内到外”的信号通路将整合素激活到中间亲和力状态,以实现其与配体的相互作用<sup>[8-9]</sup>;一旦整合素与其配体结合,即通过“由外而内”的信号通路快速激活至高亲和力状态<sup>[10]</sup>。通过这两条信号通路相互作用,整合素参与细胞骨架变化、细胞运动、黏附侵袭能力调节、基因转录及细胞的增殖与分化、存活与凋亡等生理活动<sup>[11]</sup>。

但是,Alon 等<sup>[13]</sup>通过流动腔实验发现,只有当趋化因子和细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)共同固定于流动腔底部时,才能将淋巴细胞上主要整合素——淋巴细胞功能相关性抗原(lymphocyte function-associated antigen, LFA-1)激活至伸展构象,从而使淋巴细胞稳定黏附下来;而可溶性趋化因子仅能诱导 LFA-1 头部打开( $H^+$ )但腿部依然弯曲( $E^-$ ),尽管不影响选择素介导的滚动行为<sup>[12]</sup>,却无法使淋巴细胞停留。有研究通过体外和体内实验均发现,这种弯曲但头部打开的整合素构象抑制了血流中嗜中性粒细胞的黏附、停留和聚集<sup>[14]</sup>。上述研究结果提示,在流动环境下,整合素的构象变化和亲和力之间存在更为复杂的关系。流体剪应力在白细胞和血小板初始黏附的调控中扮演

着重要角色;同样,力在整合素的激活过程中也发挥着重要作用<sup>[15-16]</sup>,但力如何与化学因子偶联调控整合素的亲和力至今尚未清晰。

为深入探讨外力和趋化因子协同调控整合素亲和态的转变过程,本文采用表达有整合素 LFA-1 人淋巴瘤 Jurkat 细胞,利用平行平板流动腔构建与生理条件相似的体外实验环境。在 10 ~ 30 mPa 壁面剪应力下让 Jurkat 细胞流经 ICAM-1 包被的流动腔底部,比较可溶性及固定在流动腔底部的趋化因子 CXCL12 对细胞瞬时黏附行为的影响;通过计算 Jurkat 细胞的黏附比率、瞬时黏附时间、细胞解离速率常数等重要参数,探索 CXCL12/CXCR4 介导激活整合素 LFA-1 的时效。实验结果证明,只有固定的趋化因子 CXCL12 才能与外部剪应力偶联,快速激活 LFA-1 的亲合态由低向中的转化;进而识别和结合流动腔底部的配体 ICAM-1 向高亲和态跃迁,极大地延长细胞的栓缚时间,为稳定黏附和跨膜迁移做准备;力始终参与并调控整合素的整个活化过程。研究结果有助于深入理解血流剪切环境下白细胞的免疫过程,为精准医疗和相关新药物的设计提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 细胞、蛋白与试剂

表面表达有 LFA-1 和 CXCR4 的 Jurkat 细胞(中国典型培养物保藏中心);ICAM-1、CXCL12 (R&D Systems 公司,美国);二甲基亚砷(Sigma 公司,美国);RPMI 1640,胎牛血清、牛血清白蛋白、青链霉素、不含钙、镁离子的 HBSS 溶液(Gibco 公司,美国)。

### 1.2 流动腔底板功能化及细胞悬浮液的配置

流动腔工作区尺寸:长  $\times$  宽  $\times$  高 = 5 mm  $\times$  5 mm  $\times$  0.254 mm。单铺实验中,蛋白分子为 CXCL12 或 ICAM-1;双铺实验中,蛋白分子为 CXCL12 + ICAM-1;分子包被方法参考文献[16]。培养好的 Jurkat 细胞用缓冲液清洗 2 次,再用 2 mL 缓冲液重悬细胞,使细胞浓度达到  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$  个/mL。

### 1.3 预刺激细胞悬浮液的配制

在 Jurkat 细胞悬浮液中加入 10 nmol/L 的趋化因子 CXCL12,预刺激 30 s,清洗 2 次后重悬至细胞浓度达到  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$  个/mL,备用。

## 1.4 流动腔实验

采用的流动腔实验系统参考文献[16]。待流场稳定后,20倍镜下以100帧/s录制不同剪应力下近壁面 Jurkat 细胞的运动。速度小于  $20 \mu\text{m/s}$  或位移图中出现水平平台的记录为一次细胞黏附,该时间长度即为键的生存时间。本文中细胞黏附仅为瞬时黏附,而非滚动黏附和稳定黏附。

## 1.5 黏附特异性实验

分组对底板进行功能化。① 对照组:用含2% BSA 的 PBS 溶液阻断1 h;② 空白组:底板不作任何处理,仅加入 PBS 溶液;③ 功能组:底板进行功能化处理(见1.2节)。每组实验平行重复3次,记录 Jurkat 细胞悬浮液流经功能化底板5 min 时段发生的细胞黏附事件。

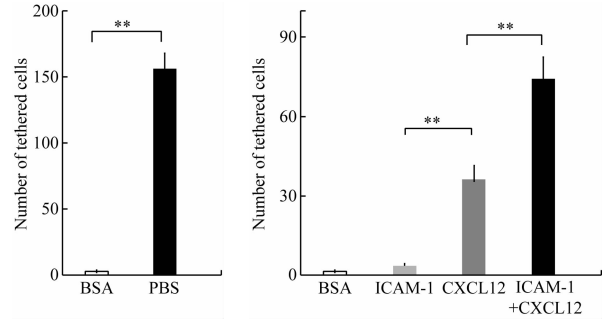
## 1.6 统计学方法

对两独立组别间平均数采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$  表示差异具有高度统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同黏附分子介导 Jurkat 细胞的特异性黏附

为了检测 Jurkat 细胞的黏附是否为黏附分子特异介导,在20 mPa 剪应力下将细胞流经5种不同流动腔底部:空白、BSA、ICAM-1 + BSA、CXCL12 + BSA 和 ICAM-1 + CXCL12 + BSA,其中 ICAM-1、CXCL12 的分子浓度均为  $10 \text{ mg/L}$ ,BSA 浓度均为  $2\%$ ,观察并记录5 min 内发生的瞬时黏附事件。空白组与2% BSA 对照组的数据表明,2% BSA 可有效抑制细胞的非特异性黏附[见图1(a)]。实验组数据表明,单铺 ICAM-1 组黏附事件数极低,与对照组无显著差异,说明在无化学因子刺激下低亲和力状态的 LFA-1 无法有效结合底板上的 ICAM-1;单铺 CXCL12 组与对照组相比,黏附事件数极显著增加,说明 CXCL12/CXCR4 确实可有效介导细胞的特异黏附;ICAM-1 + CXCL12 双铺组的细胞黏附数是对照组的21倍,是 CXCL12 单铺组的2倍,提示 ICAM-1 和 CXCL12 双铺时,除一部分是由于 CXCL12 直接介导的黏附,另一部分可能源于 CXCL12 经由 G 蛋白耦联受体导致整合素 LFA-1 的激活,即该部分的黏附是 LFA-1 与底板上的 ICAM-1 的键合所贡献的[见图1(b)]。



(a) 不同流动腔表面处理方式下

(b) 不同孵育分子

图1 LFA-1/ICAM-1 结合的特异性 (\*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 1 Binding specificity of LFA-1 with ICAM-1 (a) Under different treatment of flow chamber surface, (b) Different molecules on incubation surface

### 2.2 CXCL12 孵育方式和分子浓度对整合素 LFA-1 激活的影响

在炎症发生时,趋化因子浓度往往随感染部位的距离呈梯度状分布,且可局部表达在内皮细胞表面,呈锚定状态。为探明 CXCL12 浓度对 Jurkat 细胞黏附的影响,设置5种 CXCL12 浓度(0.5、1、5、10、15 mg/L)包被流动腔底部,在20 mPa 剪应力下观察记录实验区域近壁面流经的细胞数及发生黏附的细胞数,黏附的细胞数与流经的细胞总数之比即 Jurkat 细胞的黏附比率。结果表明,细胞黏附比率随 CXCL12 浓度的增加从1.9%增加至8.1%;当浓度为  $10 \text{ mg/L}$  时,上升趋势已经趋于平缓,与  $15 \text{ mg/L}$  基本持平,两者无显著差异;反映 Jurkat 细胞经由 CXCL2/CXCR4 介导的特异黏附是 CXCL12 浓度依赖型的,浓度对细胞黏附率实现正向调控,但最终会达到一个饱和态。另外,即使 CXCL12 浓度提高至  $15 \text{ mg/L}$ ,也仅观察到瞬时黏附现象,说明仅高浓度趋化因子不足以介导细胞的滚动黏附和稳定黏附[见图2(a)]。由此,本文后续实验中凡固定在流动腔底部的 CXCL12 浓度均定为  $10 \text{ mg/L}$ 。

为进一步探索可溶性 CXCL12(简称 sCXCL12)和固定在流动腔底板上 CXCL12(简称 mCXCL12)对 Jurkat 细胞上整合素 LFA-1 亲和力的影响,在20 mPa 剪应力下,分别将经  $10 \text{ nmol/L}$  sCXCL12 预刺激的 Jurkat 细胞灌流过单铺 ICAM-1 的流动腔底部,或未经预刺激的细胞流经单铺 CXCL12 或双铺

CXCL12 + ICAM-1 底部 (ICAM-1 的浓度均为 10 mg/L), 以比较它们之间黏附率的差异。结果表明, ICAM-1 单铺时细胞黏附比率很低, 即使 30 s、10 nmol/L sCXCL12 的预刺激也不能显著增加其黏附比率; 但当 CXCL12 与 ICAM-1 混铺时, 细胞黏附比率则大大提高, 极显著高于 sCXCL12 + ICAM-1 组, 说明只有固定的 CXCL12 才能有效激活整合素, 促使细胞黏附到 ICAM-1 上。同时, ICAM-1 + mCXCL12 组与 mCXCL12 组相比, 细胞黏附比率提高约 2 倍, 说明固定的趋化因子的确可以激活整合素, 促进细胞黏附的发生 [见图 2(b)]。

最后, 为探明 ICAM-1 浓度对 Jurkat 细胞黏附率

的影响, 计算在 20 mPa 剪切应力下细胞流经 10 mg/L CXCL12 混铺不同浓度 (0.5、5 和 10 mg/L) ICAM-1 底部的黏附比率。细胞的黏附比率为 0.6% ~ 20%, 随底板 ICAM-1 浓度的下降而显著降低, 呈明显的浓度依赖性, 10 mg/L 组比 0.5 mg/L 组提高 33 倍。当 ICAM-1 浓度为 15 mg/L 时, 细胞发生滚动黏附 [见图 2(c)] 和部分稳定黏附 (数据不在此展示)。因此, 与趋化因子混铺时, 介导 Jurkat 细胞瞬时黏附的最佳 ICAM-1 浓度为 10 mg/L。

综上所述, 固定在底面的趋化因子可以有效的激活 Jurkat 细胞整合素, 并促使细胞黏附到 ICAM-1 上, 黏附比率与 CXCL12 和 ICAM-1 的浓度正相关。

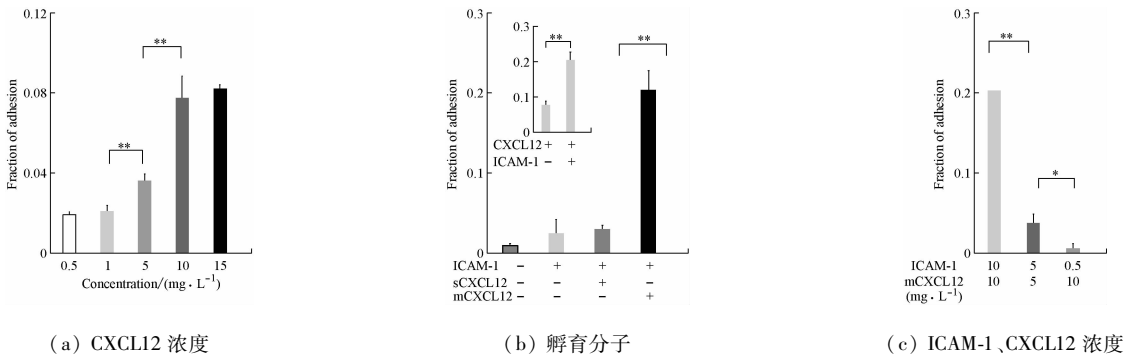


图 2 蛋白分子及其浓度对 Jurkat 细胞黏附比率的影响 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 2 Effects of molecular and its concentration on adhesion fraction of Jurkat cells (a) Concentration of CXCL12, (b) Incubation molecules, (c) Concentration of ICAM-1 and CXCL12

### 2.3 趋化因子 CXCL12 激活整合素 LFA-1 对细胞黏附时间的影响

为探明趋化因子通过“由内而外”信号通路激活 Jurkat 细胞上整合素 LFA-1 的时间尺度, 在 20 mPa 剪应力下, 详细观察记录细胞流经单铺 CXCL12 或双铺 CXCL12 + ICAM-1 底部时的黏附时间。由于底板包被的 ICAM-1 浓度仅支持 Jurkat 细胞的瞬时栓缚事件, 并不足以支持其滚动行为, 故本实验中发生的细胞黏附为单键行为<sup>[17]</sup>, 细胞黏附时间即键的生存时间。每次实验有 80 ~ 120 个有效事件, 图 3(a) 所示为 3 次重复实验共 250 个以上瞬时黏附的生存时间频数分布。单铺 CXCL12 时, 其频数分布图仅显示单峰, 采用高斯拟合服从正态分布  $N(0.1334, 0.0025)$ ,  $R^2 = 0.9698$ ; 双铺 CXCL12 + ICAM-1 时, 其频数分布出现双峰, 第 1 个峰服从正

态分布  $N(0.108, 0.014)$ , 第 2 个峰服从正态分布  $N(0.95, 0.191)$ ,  $R^2 = 0.9387$ ; 第 2 个峰出现意味着整合素的激活, 从而能与其配体 ICAM-1 结合, 大大增强了细胞与底板分子的键合力, 使瞬时黏附的生存时间延长。3 次实验获得的平均瞬时黏附的生存时间表明, 混铺底板上 Jurkat 细胞瞬时黏附的生存时间几乎是单铺时的 9 倍 [见图 3(b)]。

一般认为, 细胞的瞬时黏附是由单键的受体/配体相互作用所介导的, 故细胞的解离服从一阶解离动力学模型<sup>[17]</sup>:

$$C \xrightarrow{k_{\text{off}}} R + L \quad (1)$$

式中:  $R$ 、 $L$  和  $C$  分别为受体、配体和结合物的个数, 其动力学方程初始条件和方程可分解  $-dC/dt = k_{\text{off}}C$ , 即  $\ln(C) = -k_{\text{off}}t$ 。按细胞瞬时黏附的生存时

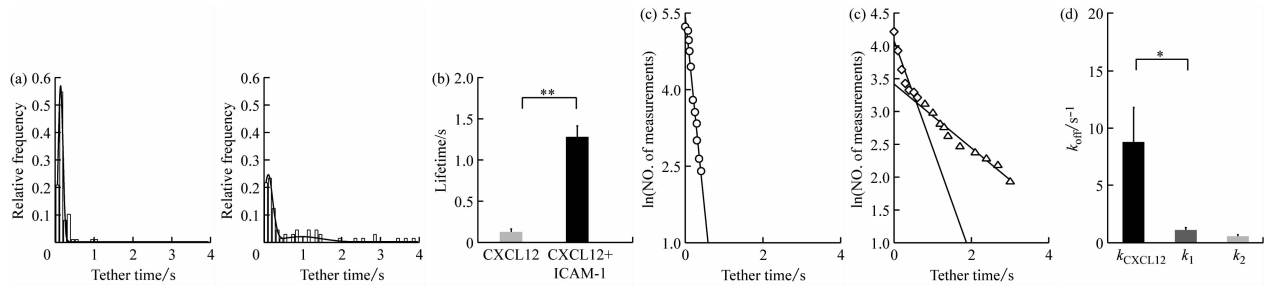


图3 20 mPa 壁面剪应力下细胞的栓缚事件 (\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ) (a) 细胞瞬时黏附时间的频率分布, (b) 单铺与混铺底板上的细胞的瞬时黏附时间, (c) 对数形式的细胞瞬时黏附时间的频数分布, (d) 解离速率

Fig. 3 Tether of Jurkat cells under 20 mPa shear stress (a) Relative frequency of tether time of Jurkat, (b) Tether time of Jurkat with CXCL12 or ICAM-1 + CXCL12, (c) Frequency distribution of tether by logarithmic form, (d) Dissociation rate

间与该时段相应细胞数的自然对数重新作图, 结果表明: 单铺 CXCL12 时, 瞬时黏附时间 (tether time) 与  $\ln(C)$  呈线性关系, 其负斜率即 CXCL12/CXCR4 的解离速率  $k_{off}$  为  $7.62 \text{ s}^{-1}$ ; 双铺 CXCL12 + ICAM-1 时, 已不能以一条直线进行拟合, 而是 2 段线性关系的组合, 第 1 段负斜率  $k_1 = 1.135 \text{ s}^{-1}$ , 第 2 段则相对平坦, 其负斜率  $k_2 = 0.57 \text{ s}^{-1}$  [见图 3(c)]。20 mPa 剪应力下, ICAM-1、CXCL12 浓度均为 10 mg/L 时, CXCL12/CXCR4 的解离速率  $k_{off}$  远大于  $k_1$  和  $k_2$  [见图 3(d)]。

综上所述, 可以推断趋化因子 CXCL12 与其配体 CXCR4 的键合并牢固, 具有快速解离的特点, 99% 的细胞瞬时黏附时间低于 0.25 s。而在双分子系统中, 细胞的瞬时黏附行为呈现明显的双态性: 从快速解离向慢速解离的跃迁, 且均远小于 CXCL12/CXCR4 的解离速率。

## 2.4 剪应力对趋化因子激活整合素 LFA-1 过程的影响

白细胞黏附是一个复杂、多步的级联反应过程, 需要多种因素共同作用。在力-化学信号偶联作用下, 细胞膜上的整合素 LFA-1 的构象改变导致亲和态转变是细胞稳定黏附和跨膜迁移的基础。为探讨剪切应力在这一过程中扮演的角色, 在 10、20、30 mPa 剪应力下观察记录 Jurkat 细胞流经单铺 CXCL12 或混铺 CXCL12 + ICAM-1 底部的黏附时间。单铺 CXCL12 组细胞的黏附时间都为 0.1 ~ 0.2 s, 相对双铺组而言波动幅度较小; 而双铺 CXCL12 + ICAM-1 组的黏附时间为 0.8 ~ 1.2 s, 比前者延长 5 倍以上, 且黏附时间受剪应力影响较大, 20 mPa 剪

应力时平均黏附时间最长; 无论单铺还是双铺分子系统均呈现非单调的复杂趋势 [见图 4(a)]。

根据一阶解离动力学模型计算细胞的解离速率  $k_{off}$ 。单铺趋化因子时细胞的解离速率要远大于双铺 ICAM-1 + CXCL12 (ICAM-1 = 10 mg/L, CXCL12 = 10 mg/L) 的解离速率, 该结果进一步验证了在双分子系统中, 整合素 LFA-1/ICAM-1 分子对的贡献作用占主导地位。在 10 ~ 30 mPa 剪应力范围内, CXCL12/CXCR4 的相互作用表现出类似“Catch Bond”的行为; 而在双铺分子系统中,  $k_1$  对剪应力不敏感,  $k_2$  随剪应力的增大而增加 [见图 4(b)]。由细胞瞬时黏附时间与剪应力的关系推断, 双分子系统的表观细胞解离速率应该随剪应力的增加先减少后增加, 在 20 mPa 剪应力时取得最低值; 而细胞的表观解离速率是由  $k_1$  和  $k_2$  构成, 因此,  $k_{off}$  和  $k_1$ 、 $k_2$  之间并不是简单的加和关系。LFA-1 亲和态跃迁模型公式为<sup>[16]</sup>:

$$T = \frac{1 - p_A}{k_1} + \frac{p_A}{k_2} \quad (2)$$

$$\beta = \frac{(k_1/k_2 - 1)p_A}{(k_1 - k_2)T} \quad (3)$$

式中:  $p_A$  为整合素 LFA-1 由中等亲和态到高等亲和态的转化概率;  $\beta$  为高等亲和力状态整合素 LFA-1 对栓缚细胞生存时间的贡献率, 即保持高等亲和态的生存时间比例。由此可知,  $\beta$  随剪应力的增大先增加后减少, 呈非单调的复杂趋势 [见图 4(c)]。

上述结果表明, 双分子系统细胞的瞬时黏附过程包含两个阶段: 整合素 LFA-1 受趋化因子 CXCL12 诱导、经“由内而外”信号通路激活到中等亲和力状态, 再通过与配体 ICAM-1 的作用经“由外而内”

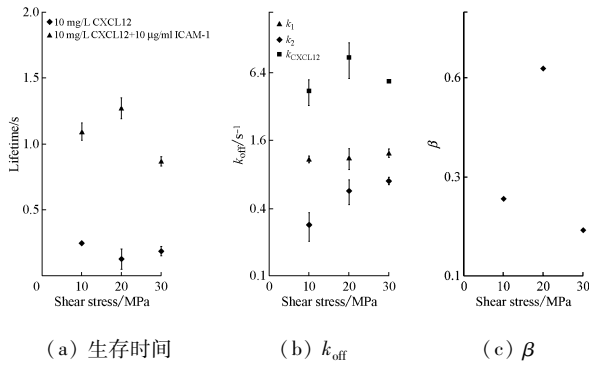


图4 不同剪切应力下动力学参数的对比  
 Fig. 4 Comparisons of kinetic parameter under different shear stresses (a) Lifetime, (b)  $k_{off}$ , (c)  $\beta$

信号通路进一步激活至高亲和力状态, 整个黏附行为均受环境剪应力的调控。

### 3 讨论

整合素介导的细胞的慢速滚动、稳定黏附以及跨膜迁移在炎症反应及肿瘤的扩散与转移过程中至关重要, 而其中整合素亲和力态的转化又发挥着关键的作用<sup>[18]</sup>。二价金属离子  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和趋化因子、选择素等均能诱导整合素构象的改变, 同时整合素是一种力敏感蛋白, 与配体的亲和力受环境外力的调控<sup>[19]</sup>。由于缺乏直接的实验数据, 有研究提出了整合素三态及三态之间的转化模型, 希望得到力载荷下低、中、高亲和力状态的解离速率<sup>[20-21]</sup>。

本实验结果表明, 流体环境中可溶性趋化因子 CXCL12 并不能诱导 Jurkat 细胞在 ICAM-1 上的栓缚。尽管 Alon 等<sup>[22]</sup> 用流式细胞仪结合位点识别的特异荧光单抗, 发现可溶性 CXCL12 预刺激 30 s 可激活  $\beta_2$  整合素至头部打开但腿部未伸展的亲和力构象 ( $E^{-}H^{+}$ ); Toffail 等<sup>[23]</sup> 使用免疫印迹法发现可溶性 CXCL12 通过磷酸化 SOS1、ARHGEF1 和 DOCK2 开启 JAK 信号通路从而激活整合素至少需要 60 s 以上。因此可以推断, 可溶性趋化因子启动“由内而外”信号通路激活 LFA-1 需要时间较长 (至少 30 s), 而且细胞上这种未充分伸展的整合素不能与内皮细胞上 ICAM-1 发生有效接触以介导细胞的栓缚。

炎症过程中, 不仅炎症部位会释放可溶性趋化因子进入血液, 而且会局部表达在激活的内皮细胞

表面, 故需要探明这种固定趋化因子对整合素激活的影响。在 10 ~ 30 mPa 剪应力下, 通过细胞在单铺 CXCL12 与混铺 CXCL12 + ICAM-1 底板上瞬时黏附行为的比较发现, 单铺 CXCL12 仅能介导细胞的短暂栓缚, 其与配体 CXCR4 的结合键具有快速解离的特点, 但这种固定的趋化因子却大大增加了 Jurkat 细胞在 ICAM-1 上的黏附比率和黏附时间 (见图 3、4)。本实验结果揭示, 固定的 CXCL12 可在其介导的不大于 0.2 s 的黏附时间内快速激活周边的整合素 LFA-1, 这或许是源于一端通过 G 蛋白偶联受体连接细胞而另一端锚定于流动腔底板的 CXCL12 才能感受并传递力信号, 扣动整合素快速激活的扳机。一旦细胞上整合素 LFA-1 激活, 便能识别并结合底板上的 ICAM-1, 从而显著延长细胞的栓缚时间。通过对细胞栓缚时间的分析并结合一阶解离动力学模型发现, 混铺 CXCL12 + ICAM-1 底板上细胞的解离呈现明显不同的双态性: 较快的解离速率  $k_1$  ( $1.09 \sim 1.24 s^{-1}$ ) 和慢速的解离速率  $k_2$  ( $0.28 \sim 0.70 s^{-1}$ ), 但均远小于 CXCL12/CXCR4 的解离速度 ( $4.47 \sim 8.73 s^{-1}$ ), 故认为前者对应 LFA-1 的中等亲和力状态, 而后者则对应高亲和力状态。由于诱导因子、加载方式及力大小的区别, 各研究组所得中等亲和力状态的解离速率存在 2 个数量级的差异<sup>[20,24]</sup>, 而高亲和力状态的解离速率则基本处于  $0.3 \sim 0.8 s^{-1}$ <sup>[16]</sup>, 本文结果比较接近 Li 等<sup>[25]</sup> 的光镊测量值和 Beste 等<sup>[26]</sup> 的微吸管测量值。

### 4 结论

剪应力下固定的趋化因子激活 Jurkat 细胞上整合素 LFA-1 的过程分两个阶段。第 1 阶段, 剪应力通过调节 CXCL12/CXCR4 的亲和力经“由内而外”信号通路快速激活邻近的 LFA-1 到中等亲和力状态; 此阶段耗时应低于 CXCL12/CXCR4 介导的细胞黏附时间 ( $< 0.25 s$ ), 远低于可溶性趋化因子及镁离子诱导激活的时间<sup>[16,22]</sup>。第 2 阶段, 整合素 LFA-1 通过与其配体 ICAM-1 的作用、经“由外而内”信号通路进一步激活至高亲和力状态; 该阶段剪应力不仅直接调控其解离速率  $k_2$ , 同时通过缩短 LFA-1 由中向高亲和力转化的时间, 以增大高亲和力部分在总观解离速率中的比例, 从而达到更长的细胞黏附时间。该研究结果不仅为本课题组前期提出的

LFA-1 亲和态激活的跃迁模型提供了新的实验证据,并为进一步理解剪应力下趋化因子调控整合素 LFA-1 的活化及其白细胞的黏附机制提供有益启发,加深血流剪切环境下的免疫过程的了解。

## 参考文献:

- [1] ROT A, ANDRIAN UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokines grammar for immune cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22(1): 891-928.
- [2] LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI, *et al.* Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 678-689.
- [3] ARNAOUT MA. Biology and structure of leukocyte  $\beta_2$  integrins and their role in inflammation [J/OL]. <https://f1000research.com/articles/5-2433/v1>.
- [4] VIJVER E, BERG TK, KUIJPERS TW. Leukocyte adhesion deficiencies [J]. *Hematol Oncol Clin N Am*, 2013, 27(1): 101-116.
- [5] GRONHOLM M, JAHAN F, BRYUSHKOVA EA, *et al.* LFA-1 integrin antibodies inhibit leukocyte 4 1-mediated adhesion by intracellular signaling [J]. *Blood*, 2016, 128(9): 1270-1281.
- [6] CAMPBELLI D, HUMPHRIES MJ. Integrin structure, activation, and interactions [J]. *CSH Perspect Biol*, 2011, 3(3): 594-601.
- [7] CARNAN CV, SPRIGER TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(5): 547-556.
- [8] KINASHI T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 5(7): 546-559.
- [9] TIWARI S, ASKARL JA, HUMPHRIES MJ, *et al.* Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(10): 1672-1680.
- [10] ABRAM CL, LOWELL CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(1): 339-362.
- [11] 赵凤龙, 李莉, 杨红, 等. 整合素介导血源性转移中肿瘤细胞与宿主细胞相互作用规律研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(2): 180-187.  
ZHAO FL, LI L, YANG H, *et al.* Integrin-mediated tumor cell-host cell interaction during hematogenous metastasis and their regulatory mechanisms [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(2): 180-187.
- [12] KUWANO Y, SPELTEN O, ZHANG H, *et al.* Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils [J]. *Blood*, 2010, 116(4): 617-624.
- [13] ALON R, FEIGELSON SW. Chemokine signaling to lymphocyte integrins under shear flow [J]. *Microcirculation*, 2009, 16(1): 3-16.
- [14] FAN Z, MCARDLE S, MARKI A, *et al.* Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent  $\beta_2$  integrin binding ligand in cis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12658.
- [15] 杨小芳, 丁孝茹, 吴建华, 等. vWF-A1A2A3 介导循环血小板翻滚运动的机制研究 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28(5): 567-573.  
YANG XF, DING XR, WU JH, *et al.* WF-A1A2A3-mediated rolling of circulating platelets in flows [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(5): 567-573.
- [16] 童洁, 刘黎, 吴建华, 等. 力诱导循环血流中白细胞整合素 LFA-1 的激活机制 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(1): 14-20.  
TONG J, LIU L, WU JH, *et al.* Mechanism of force-induced activation of integrin LFA-1 under circulating flows [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(1): 14-20.
- [17] SPRIGER TA, CHEN S, ALON R. Response to: Measurement of selectin tether bond lifetimes [J]. *Biophys J*, 2002, 83(4): 2320-2323.
- [18] ASTROF NS, AZUCENA S, SHIMAOKA M, *et al.* Importance of force linkage in mechanochemistry of adhesion receptors [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(50): 15020-15028.
- [19] SARANGAPANIKK, YAGO T, KLOPOCKI AG, *et al.* Low force decelerates I-selectin dissociation from P-selectin glycoprotein ligand-1 and endoglycan [J]. *J Biol Chem*, 2003, 279(3): 2291-2298.
- [20] CHEN W, LOU J, ZHU C. Forcing switch from short- to intermediate- and long-lived states of the  $\alpha$  domain generates LFA-1/ICAM-1 catch bonds [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35967-35978.
- [21] XIANG X, LEE C, LI T, *et al.* Structural basis and kinetics of force-induced conformational changes of an  $\alpha$ A domain-containing integrin [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27946.
- [22] SHAMRI R, GRABOVSKY V, GAUGUET JM, *et al.* Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(5): 497-506.
- [23] TOFFALI L, MONTRESOR A, MIRENDA M, *et al.* SOS1, ARHGEF1, and DOCK2 rho-GEFs mediate JAK-dependent LFA-1 activation by chemokines [J]. *J Immunol*, 2017, 198(2): 708-717.
- [24] WOJCIKIEWICZ EP, ABDULREDA MH, ZHANG XH, *et al.* Force spectroscopy of LFA-1 and its ligands, ICAM-1 and ICAM-2 [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(11): 3188-3195.
- [25] LI N, MAO D, LV S, *et al.* Distinct binding affinities of Mac-1 and LFA-1 in neutrophil activation. [J]. *J Immunol*, 2013, 190(8): 4371-4381.
- [26] BESTE MT, LOMAKINA EB, HAMMER DA, *et al.* Immobilized IL-8 triggers phagocytosis and dynamic changes in membrane microtopology in human neutrophils [J]. *Ann Biomed Eng*, 2015, 43(9): 2207-2219.