文章编号：1004-0374(2010)01-0079-05

L- 选择素在白细胞活化中的作用

陈翠霞[1*]，崔凌凌[2]，尚　新[2]，曾宪录[2*]
(1 中国石油大学(华东)生物工程与技术中心，青岛 266555；
2 东北师范大学遗传与细胞研究所，长春 130024)

摘　要：白细胞沿着血管内皮滚动、稳定黏附，最终到达炎症部位是一个复杂的、多步骤的过程，该过程需要众多分子协同完成。选择素家族分子对于白细胞沿着血管内皮的滚动起重要作用。L- 选择素是选择素家族的一员，组成性的表达在白细胞微绒毛顶端，在白细胞沿血管内皮起始黏附过程中起主要作用。除具有黏附作用外，L- 选择素还作为信号分子在黏附事件中发挥作用。该文结合作者的研究工作，综述了 L- 选择素在白细胞活化过程中的功能。

关键词：细胞黏附；L- 选择素；激酶；信号转导
中图分类号：R329.25；R332.13；R3　　文献标识码：A

The function of L-selectin in the leukocyte activation

CHEN Cui-xia[1*], CUI Ling-ling[2], SHANG Xin[2], ZENG Xian-lu[2*]
(1 Centre for Bioengineering and Biotechnology, China University of Petroleum (East China), Qingdao 266555, China;
2 Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: Lymphocyte recruitment onto inflamed tissues requires cells tethering to and rolling on vascular surfaces under flow. Recruitment of leukocytes is controlled by a variety of adhesion molecules expressing on the surface of the endothelium and circulating leukocytes. The members of selectin family play important roles during the lymphocytes rolling on the vessel. L-selectin, a member of selectin family and constitutively expressing on leukocytes, plays a fundamental role in the lymphocyte tethering on the vessel. Except for its role in adhesion, L-selectin can serve as a signal transduction molecule. We review the function of L-selectin in the leukocyte activation from its structure, adhesion and signal transduction functions here.

Key words: cell adhesion; L-selectin; kinase; signal transduction

白细胞黏附与炎症发生、血栓形成、肿瘤细胞转移、白细胞归巢、创伤愈合和修复等多种生理和病理过程密切相关。在白细胞起始黏附过程中，L- 选择素与配体结合，能引起细胞形态变化、细胞骨架重排、氧呼吸爆发、细胞因子基因表达上调等。但 L- 选择素交联引起这些生物学效应的机理还不清楚，探讨其在起始和传递信号过程中的作用已成为研究 L- 选择素作为信号分子的一个关键；研究 L- 选择素与配体结合后引起的细胞内各种信号事件将成为研究 L- 选择素作为信号分子的一个趋势。本文结合作者的研究工作，从 L- 选择素的结构、黏附功能以及信号转导功能等方面阐述 L- 选择素在白细胞活化过程中的作用。

1　L- 选择素的结构

L- 选择素是选择素家族成员之一，组成性的表达在除部分记忆细胞外所有的白细胞表面，分子结构包括 Ca^{2+} 依赖的凝集素样结构域(C-lectin domain)、表皮生长因子样结构域(EGF-like domain)、2~9 个短的补体样重复结构域(short consensus repeats, SCRs)、跨膜结构域和 1 个短的胞浆尾部结构域[1]。一旦白

收稿日期：2009-07-01；修回日期：2009-08-27
基金项目：国家自然科学基金项目(30900765); 中国石油大学(华东)博士基金(UPC-b)
* 通讯作者：0532-86981131; E-mail:chencx@upc.edu.cn

细胞受到刺激活化，L-选择素便成簇分布在白细胞表面，该特性有利于白细胞与血管内皮细胞的接触，并诱导白细胞的黏附以及细胞信号事件的起始和传递。

2 L-选择素的黏附功能

在血管中循环的白细胞向淋巴器官归巢或炎症部位聚集是一个复杂而有序的过程，可人为地将其分为三个连续的阶段：血管中的白细胞被血管内皮细胞捕获，并在血管内皮上滚动(起始黏附阶段)；白细胞稳定地黏附到内皮细胞上(稳定黏附阶段)；白细胞穿越内皮细胞之间的间隙进入周围组织(跨膜转移阶段)。选择素与配体之间的结合在上述起始黏附过程中起重要作用。L-选择素与其单抗DREG200的交联能诱导β2-整合素依赖的中性粒细胞沿脐静脉的稳定黏附和浸润[1-3]。L-选择素也能够通过调节中性粒细胞与内皮细胞之间的黏附以及细胞与细胞之间的二次黏附生成的氧化产物来调节中性粒细胞间的黏附[4,5]。

L-选择素与配体的结合在白细胞起始黏附过程中的作用不仅表现为它们作为锚定分子将白细胞捕获到活化的内皮细胞上，同时，L-选择素作为信号受体还可向白细胞内传递信号，参与白细胞的活化。

3 L-选择素的信号传递功能

探讨L-选择素在起始和传递信号过程中的作用已成为研究L-选择素作为信号分子的一个关键。20世纪90年代以来，对L-选择素的功能研究达到高潮，并取得了令人瞩目的成果。

3.1 L-选择素交联引起细胞形态改变

L-选择素与配体的交联能够引起T淋巴细胞内O_2^-的生成和细胞骨架的改变[6]。Brenner等[7]对此进行了深入研究，他们发现L-选择素交联能够引起包括$p56^{lck}$、Grb2/Sos、Ras、MAPK和Rac2参与的信号通路的活化，可将由L-选择素交联起始的信号传递到细胞内，并最终导致O_2^-的生成和细胞骨架的改变。后来，研究人员发现细胞内的JNK(Jun N-terminal kinase)和小G蛋白Rac会伴随着L-选择素与配体以及抗体的交联而活化[8]，从而调控与细胞骨架有关的分子，改变细胞形态。我们研究发现，L-选择素交联能够活化c-Abl激酶，并且c-Abl激酶活性的提高总是伴随着F-肌动蛋白的聚合[9]。因此c-Abl激酶在L-选择素交联引起的F-肌动蛋白依赖的细胞骨架的变化过程中起重要作用。

3.2 L-选择素的交联能够活化细胞激酶

L-选择素与配体结合30 s内，就能最大程度的自身磷酸化，包括其尾部丝氨酸和酪氨酸的磷酸化[4,6,8]，这些氨基酸的活化与下游分子的活化以及信号的传递有关。

L-选择素与抗体以及硫苷酯结合能够增强Lck激酶的活性[10,11]。Lck是T细胞活化时最先被活化的分子之一，当Lck激酶活性被抑制后，T细胞内的一些信号事件就被抑制。我们研究发现，L-选择素交联活化的Lck能够活化下游的Vav和Zap70激酶。Zap70是T细胞活化时最先被磷酸化的分子之一，它的缺失直接导致T细胞失去对外界信号刺激的应答。在Zap70的Interdomain B结构域的3个酪氨酸残基(Y292、Y315、Y319)共同调控着Zap70的激酶活性。Y319是TCR活化引起磷酸化的位点，该位点在调节Zap70激酶的活性中起了非常重要的作用[12]。我们的研究表明，L-选择素与其抗体交联能引起Zap70 Y319磷酸化，该磷酸化受c-Abl调控[13]。c-Abl激酶是一类非受体酪氨酸激酶，能够和细胞内的很多蛋白质相互作用，从而调控细胞骨架的变化、细胞的生长和分化以及细胞的迁移[14,15]。c-Abl激酶的活性在L-选择素交联以后，5 min内就能很大程度的提高，并被Lck激酶调控[13]。

此外，L-选择素在fMLP以及TNFα共刺激下能够引起细胞内包括MAPK在内的很多激酶的磷酸化[4,8,10]，p38MAPK的活化对于L-选择素依赖的脱颗粒步骤是十分必要的[16]。

除引起细胞内的激酶活化，L-选择素交联还能引起细胞内第二信使的释放。如L-选择素活化能够导致神经酰胺的释放，随后分解为神经鞘磷脂来行使第二信使的功能[17]，从而将细胞外的信号传递到细胞内部。L-选择素交联也可导致中性粒细胞内钙离子的瞬时增多[18]。钙离子在信号传递过程中是一个很重要的第二信使分子，很多的生理事件都依赖钙离子的存在。

3.3 L-选择素交联能引起炎症因子的释放

L-选择素与其配体或者抗体的交联能引起很多蛋白激酶和接头蛋白的活化从而起始信号，并最终导致基因的表达。在中性粒细胞中，L-选择素与硫苷酯的结合能够增强TNF-α和IL-8的表达[18]。两者都是炎症反应的介质。在我们的研究中，发现L-选择素与其抗体结合能够引起CSF-1基因的表

达。在临床上，CSF-1作为肿瘤标记，调节炎症反应。这些基因的表达除需要细胞内相关蛋白激酶的活化外，还需细胞核内很多转录因子的活化。L-选择素与硫苷脂的结合能促进NF-κB的活化[19]，NFAT(nuclear factor of activated T cells)的跨膜转移最终调节细胞内的基因表达[20]。我们发现AP-1也在L-选择素活化的T淋巴细胞以及中性粒细胞中发生转移，由c-Abl激酶调节其活性，与CSF-1基因的启动子结合，从而调节CSF-1基因的表达[21]。

综上所述，L-选择素与配体的结合能够引起细胞形态的改变，细胞内激酶活性的增强，转录因子的活化以及相关基因的表达。因此，L-选择素在白细胞内的信号起始和传递过程中具有重要作用。将L-选择素起始和传递的信号事件进行总结，如图1所示。

3.4 L-选择素胞浆尾部功能

L-选择素能够起始和传递细胞外的信号，这与L-选择素的结构是分不开的。L-选择素胞浆尾部是高度碱性的17个氨基酸。它能够调节L-选择素的脱落、微绒毛定位以及白细胞黏附和滚动等众多生理事件。据报道L-选择素胞浆尾部可以与以下不同的蛋白质相互作用(图2)。

3.4.1 α-辅肌动蛋白

L-选择素胞浆尾部C末端结构域的最后11个氨基酸可以和α-辅肌动蛋白相结合。缺少L-选择素C端11个氨基酸残基, 将导致白细胞体外黏附和滚动效率大大降低。另外，这种缺失突变的L-选择素不能与细胞骨架相互作用，表明α-辅肌动蛋白是作为L-选择素和相关的细胞骨架蛋白之间的连接而起作用的[22]。这种缺失突变的L-选择素仍能聚集到微绒毛的顶端，说明除α-辅肌动蛋白之外，还有其他的细胞骨架蛋白负责L-选择素在微绒毛上的定位。

3.4.2 钙黏素(CaM)

在静息状态下，白细胞内的CaM结合在L-选择素的胞浆尾部[23]。PMA刺激白细胞时能诱导CaM从L-选择素尾部释放，同时伴随着L-选择素的脱落。L-选择素靠近细胞质膜的2个氨基酸残基对于两者的结合起关键作用。将这2个氨基酸突变，使CaM从L-选择素的胞浆尾部解离下来，同时也导致L-选择素脱落增强。这可能是CaM负向调节L-选择素的脱落。它和L-选择素的相互结合可诱导其胞外结构域构象改变，使胞外结构域的切割位点对蛋白质水解酶具有了抵抗性，从而降低了L-选择素的脱落[24]。

3.4.3 PKC亚基

L-选择素与其配体或单克隆抗体结合后，能够使Grb2/Sos复合体结合到其胞浆尾部，并和上游Lck酪氨酸激酶形成一个复合物，该复合物能快速活化L-选择素。L-选择素的活化可导致其胞浆尾部丝氨酸的磷酸化，并与PKC家族的PKCθ和PKCα相结合[25]。亲和层析以及GST-pull down实验结果

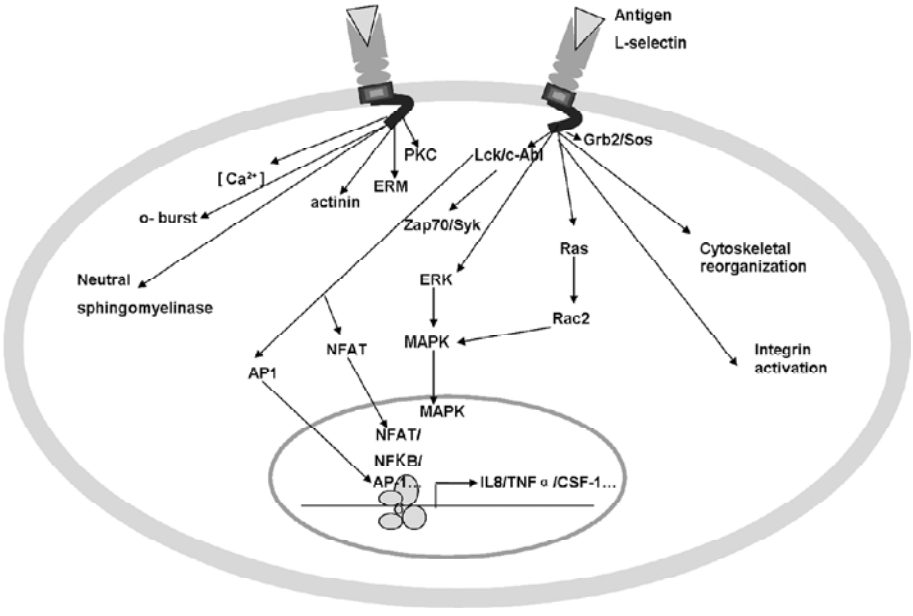

图1 L-选择素参与的信号途径

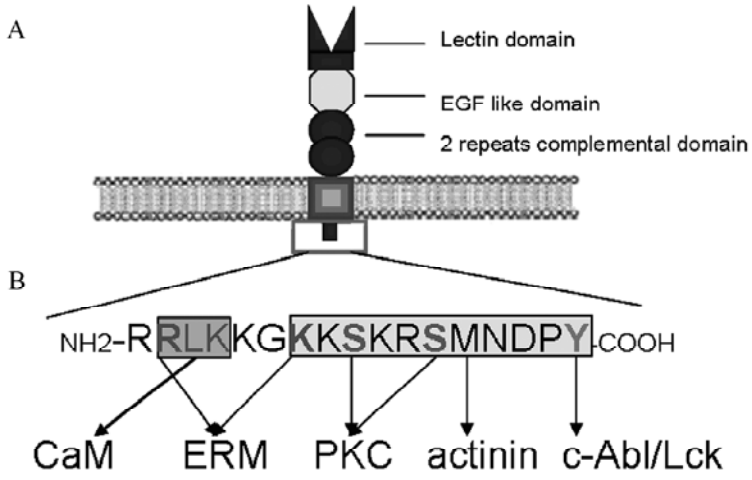

图2 L-选择素结构及胞浆尾部结合蛋白质

发现负责与PKC亚基结合的是L-选择素的S364和S367。

3.4.4 ERM蛋白质

ERM蛋白质是第一类被证明能和L-选择素胞浆尾部相互结合的蛋白质[25]。当淋巴细胞经过PMA预处理后，来自于细胞提取物的moesin能够结合到L-选择素尾部亲和层析柱上，而ezrin与亲和层析柱的结合不受PMA刺激的影响，表明moesin和ezrin与L-选择素尾部相互作用的机理是不同的。在L-选择素尾部ERM结合结构域内鉴别出了两个残基(Arg-357和Lys-362)与moesin的N-末端结构域相互作用[26]。而Arg-357是与CaM两者同时结合到L-选择素尾部还是竞争性地结合，还不得而知。

3.4.5 c-Abl/Lck激酶

c-Abl激酶是一个重要的非受体酪氨酸激酶，能够通过核质穿梭快速改变其在细胞内的定位，以适应细胞生理的需要。核内c-Abl与基因表达调控有关，胞质中c-Abl与整合素活化引起的稳定黏附信号传导有关。我们发现在L-选择素交联活化的中性粒细胞中，c-Abl的激酶活性很高，并且活化的c-Abl激酶能够与L-选择素和F-肌动蛋白共定位，以此调控F-肌动蛋白的聚合。在L-选择素与抗体结合时，c-Abl也能和L-选择素的胞浆尾部直接结合并能磷酸化L-选择素胞浆尾部(Y372)[13]。同时，我们也发现在c-Abl激酶活化之前，Lck激酶也能够通过其SH2结构域与L-选择素的胞浆尾部结合，并磷酸化L-选择素的胞浆尾部Y372[11]。该结果对了解由L-选择素引起的信号事件时间和空间活动提供了基础。

4 展望

在白细胞沿着血管内皮的起始黏附过程中，L-选择素与其配体的结合所引起的信号事件最终导致细胞骨架的改变以及整合素的活化，易于白细胞下一步的稳定黏附。L-选择素作为一个细胞信号分子，能够引起细胞内的各种信号。这些信号事件的起始和传递依赖于细胞质信号通路中关键分子的变化，包括细胞内一些蛋白分子的磷酸化和去磷酸化以及蛋白质之间的相互作用等。因此L-选择素活化细胞以后，探讨L-选择素引起的蛋白质之间的相互作用，对于研究由L-选择素引起的信号事件的传递是非常有意义的，这也将成为今后研究的一个重点。

L-选择素胞浆尾部的17个氨基酸能同时和多种蛋白质相结合。是什么机制使短短的L-选择素胞浆尾部和众多的蛋白质结合，这可能由于小部分L-选择素在任何时间都可以与不同的蛋白结合，并且这种作用是高度动态的。当L-选择素交联活化细胞以后，了解信号分子在细胞内的时间及空间分布有利于理解炎症发生时白细胞在血管内皮的活动方式。今后的研究将会集中到L-选择素的胞浆尾部在白细胞活化中的作用。通过对某些信号事件的人为控制，还有可能用于预防和治疗炎症疾病。

[参 考 文 献]

[1] Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. Physiol Rev, 1999, 79: 181-213

[2] Schaff U, Mattila PE, Simon SI, et al. Neutrophil adhesion to E-selectin under shear promotes the redistribution and co-

clustering of ADAM17 and its proteolytic substrate L-selectin. J Leukoc Biol, 2008, 83(1): 99-105
[3] Barkhausen T, Krettek C, van Griensven M. L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic post-traumatic endotoxemia and non-septic inflammation. Exp Toxicol Pathol, 2005, 57(1): 39-52
[4] Smolen JE, Petersen TK, Koch C, et al. L-selectin signaling of neutrophil adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem, 2000, 275(21): 15876-84
[5] Costa MF, Nihei J, Mengel J, et al. Requirement of L-selectin for gamma delta T lymphocyte activation and migration during allergic pleurisy: co-relation with eosinophil accumulation. Int Immunopharmacol, 2009, 9(3): 303-12
[6] Simon SI, Cherapanov V, Nadra I, et al. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. J Immunol, 1999, 163(5): 2891-901
[7] Brenner B, Gulbins E, Busch GL, et al. L-selectin regulates actin polymerisation via activation of the small G-protein Rac2. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231: 802-7
[8] Brenner B, Weinmann S, Grassmé H, et al. L-selectin activates JNK via src-like tyrosine kinases and the small G-protein Rac. Immunology, 1997, 92(2): 214-9
[9] Chen C, Ba X, Xu T, et al. c-Abl is involved in the F-actin assembly triggered by L-selectin crosslinking. J Biochem, 2006, 140: 229-35
[10] Brenner B, Gulbin E, Schlottmann K, et al. L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase $p56^{lck}$. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 15376-81
[11] Xu T, Chen L, Shang X, et al. Critical role of Lck in L-selectin signaling induced by sulfatides engagement. J Leukoc Biol, 2008, 84: 1192-201
[12] Williams BL, Sutor SL, Chini CC, et al. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-γ1 and Ras activation. EMBO J, 1999, 18: 1832-44
[13] Chen CX, Shang X, Xu T, et al. c-Abl is required for the signaling transduction induced by L-selectin ligation. Eur J Immunol, 2007, 37: 3246-58
[14] Sini P, Cannas A, Koleske AJ, et al. Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. Nat Cell Biol, 2004, 6: 268-74
[15] Woodring PJ, Hunter T, Wang JYJ. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. J Cell Sci, 2003, 116: 2613-26
[16] Lee D, Schultz JB, Knauf PA, et al. Mechanical shedding of L-selectin from the neutrophil surface during rolling on Sialyl Lewis x under flow. J Biol Chem, 2007, 282(7): 4812-20
[17] Brenner B, Grassméb HUC, Müllerb C, et al. L-selectin stimulates the neutral sphingomyelinase and induces release of ceramide. Exp Cell Res, 1998, 243: 123-8
[18] Laudanna C, Constantid G, Barons P, et al. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. J Biol Chem, 1994, 269(6): 4021-6
[19] Turutin DV, Kubareva EA, Pushkareva MA, et al. Activation of NF-κB transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking. FEBS Lett, 2003, 536: 241-54
[20] Brenner BC, Kadelb S, Grigorovich S, et al. Mechanisms of L-selectin-induced activation of the nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT). Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291: 237-44
[21] Chen C, Shang X, Cui L, et al. L-selectin ligation-induced CSF-1 gene transcription is regulated by AP-1 in a c-Abl kinase-dependent manner. Hum Immunol, 2008, 69: 501-9
[22] Dwir O, Kansas GS, Alon R. Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. J Cell Biol, 2001, 155: 145-56
[23] Matala E, Alexander SR, Kishimoto TK, et al. The cytoplasmic domain of L-selectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis. J Immunol, 2001, 167(3): 1617-23
[24] Díaz-Rodríguez E, Esparís-Ogando A, Montero JC, et al. Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. Biochem J, 2000, 346(2): 359-67
[25] Killock DJ, Parsons M, Zarrouk M, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of molecular interactions between calmodulin, ezrin/radixin/moesin, and L-selectin. J Biol Chem, 2009, 284 (13): 8833-45
[26] Ivetic A, Florey O, Deka JR, et al. Mutagenesis of the ezrin-radixin-moesin binding domain of L-selectin tail affects shedding, microvillar positioning, and leukocyte tethering. J Biol Chem, 2004, 279(32): 33263-72