

Annexin B1 与磷脂酰丝氨酸的结合活性

王 芳,张 毅,颜宏利,高远舰,刘 凡,贺 艳,孙树汉*

(第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**研究 annexin B1 与磷脂酰丝氨酸的结合活性。**方法:**在大肠杆菌中表达 annexin B1 蛋白,经离子交换层析得纯品;选用 U937 细胞,以过氧化氢诱导凋亡,制备小鼠洗涤血小板,凝血酶激活;以异硫氰酸荧光黄(FITC)标记的 annexin B1 检测凋亡细胞和活化血小板。**结果:**FITC 标记的 annexin B1 既能与凋亡细胞特异性结合,又能与活化血小板特异性结合,结合活性接近 annexin V。**结论:**研究表明 annexin B1 可结合于凋亡细胞和活化血小板膜上的磷脂酰丝氨酸(PS),而非其他膜成分,也进一步阐明 annexin B1 的抗凝血功能是通过与血小板膜磷脂结合干扰凝血过程。

[关键词] annexin B1;磷脂酰丝氨酸;活化血小板;凋亡细胞

[中图分类号] R 329.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0044-03

Binding activity of annexin B1 to externalized phosphatidylserine

WANG Fang,ZHANG Yi,YAN Hong-Li,GAO Yuan-Jian,LIU Fan,HE Yan,SUN Shu-Han* (Department of Medical Genetics,College of Basic Medical Sciences,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China)

[ABSTRACT] **Objective:**To study the binding activity of annexin B1 to externalized phosphatidylserine. **Methods:** Annexin B1 was expressed in *E. coli* and purified with ion-exchange chromatography, then annexin B1 labelled with FITC was used to detect the apoptosis of U937 human leukemic cells and the activation of platelets, which were analyzed by Becton Dickinson FACS Calibur. **Results:** Labelled annexin B1 not only bound to apoptotic cells but also specifically activated platelets. Considering the affinity, annexin B1 was similar to annexin V. **Conclusion:** Annexin B1 interacts strongly and specifically with phosphatidylserine (PS) on the outer plasma membrane leaflet of apoptotic cells and activates platelets. Additionally, annexin B1 acts as a potent anticoagulant by binding to platelet membranous phospholipids with higher affinity.

[KEY WORDS] annexin B1; phosphatidylserine; activated platelets; apoptotic cells

[Acad J Sec Mil Med Univ,2004,25(1):44-46]

Annexin B1 基因是孙树汉等^[1]首次从猪囊尾蚴 cDNA 文库中筛到的一种新基因,将该基因通过基因工程表达后可获得高活性蛋白,最初命名为 cC1,后通过生物信息学技术对其从基因结构到蛋白构象进行了多角度分析,发现 cC1 具有膜联蛋白家族(Annexins)的结构特征^[2],因当时已命名的膜联蛋白有 31 个,遂命名为 annexin 32,后根据国际专业学会修订的新的膜联蛋白命名原则,正式定名为 annexin B1。本课题组在对 annexin B1 的生理活性研究中发现,annexin B1 具有很好的抗凝血活性^[3],且能与凋亡细胞特异性结合^[4],通过这些发现和前期的一些实验结果,我们推测 annexin B1 可能通过钙依赖的磷脂结合活性发挥以上作用。但是,annexin B1 作用的靶细胞、靶分子并不十分清楚,其与磷脂的结合能力也有待研究,本实验即在前期工作的基础上,选取磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)细胞膜外露的两个模型,以异硫氰酸荧光黄(FITC)标记 annexin B1,同时联合应用 DNA 染料碘化丙啶(PI)区分死亡细胞,通过流式细胞术研究 annexin B1 与磷脂酰丝

氨酸的结合活性,以期对 annexin B1 抗凝血活性的分子机制作初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pJLA-Annexin B1 及含重组表达质粒 pJLA-annexin B1 的菌种由本室保存。U937 细胞(人髓系白血病单核细胞)购自中国科学院细胞库。DEAE Sepharose Fast Flow、Source 15Q 及 Sepharose G25 层析介质购自 Pharmacia 公司;FITC、PI 和凝血酶为 Sigma 公司产品;annexin V-FITC kit 系 Bender Medsystems 公司产品;CD49b-PE 系 BD Biosciences Pharmigen 公司产品。流式细胞仪为 Becton Dickinson FACS Calibur。过氧化氢等试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物 6~10 周龄昆明鼠,体质量 30~40 g,第二军医大学实验动物中心提供。

[基金项目] 国家高新技术发展规划(“863”)课题(2001AA213111)。

[作者简介] 王 芳(1970-),女(汉族),博士生。

*Corresponding author. E-mail:shsun888@hotmail.com

1.3 annexin B1 蛋白的表达与纯化 参照文献[2]。

1.4 FITC 标记 annexin B 按文献[5]方法进行。

1.5 U937 细胞凋亡的诱导及检测 将 U937 细胞培养至对数生长期,收集细胞悬液,除未诱导的阴性对照外,余均加过氧化氢终浓度为 1 mmol/L 的无血清培养液,未诱导的阴性对照加入无血清培养液,未诱导组及诱导组均置 CO₂ 孵箱 37 C 培养,30 min 后收集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,用结合缓冲液重悬细胞,并将细胞密度调整到 10⁷/ml,每个反应体系取 200 μl 细胞悬液,实验组加入 annexin B1-FITC 5 μl(质量浓度为 20 μg/ml),阳性对照组中加入 annexin V-FITC 5 μl(质量浓度为 20 μg/ml),再分别加入 50 μg/ml 的 PI 10 μl,室温避光 15 min。每个反应体系中再加入结合缓冲液 200 μl 后置流式细胞仪检测。

1.6 洗涤血小板的制备 选择 6~10 周龄昆明鼠,经戊巴比妥钠麻醉后,心脏取血 1 ml,加入 110 μl ACD(枸橼酸钠-枸橼酸钾缓冲液),混匀后 200×g 离心 20 min,取富血小板血浆(PRP),将富血小板血浆 600×g 离心 20 min,弃上清,用改良的 Tyroder buffer 洗涤沉淀,即获得洗涤血小板。

1.7 血小板的活化及流式细胞仪检测 洗涤血小板用含 2.0 mmol/L CaCl₂ 的改良 Tyroder buffer 重悬,并调整血小板浓度,使每个反应体系的血小板数为 10⁶,体积为 200 μl,除阴性对照外每个反应体系中加入终浓度为 0.5 U/ml 的凝血酶(thrombin),37 C 孵育 15 min。之后在实验组每 200 μl 体系中加入 annexin B1-FITC 5 μl(质量浓度为 20 μg/ml),在对照组每 200 μl 体系中加入 annexin V-FITC 5 μl(质量浓度为 20 μg/ml),以上各组均加入 PE(藻红蛋白)标记的 CD49b 25 μl(质量浓度为 0.2 mg/ml),室温避光放置 15 min,检测前每个体系加入 200 μl 含 2.0 mmol/L CaCl₂ 的改良 Tyroder buffer,置流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 蛋白纯度与免疫原性 SDS-PAGE 分析显示相对分子质量为 32 000 的单一蛋白条带,经 Western 印迹分析证实具有 annexin B1 的免疫原性(图 1)。

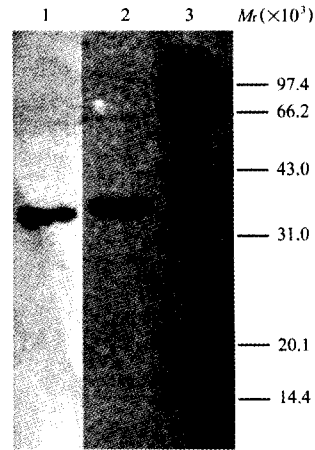


图 1 Annexin B1 的蛋白质印迹鉴定

Fig 1 Identification of annexin B1 by Western blotting

1: Proteins were transferred to nitrocellulose and probed with pig serum infected with cysticercosis; 2: Purified annexin B1 cleaved by thrombin(stained with Coomassie brilliant blue); 3: Molecular weight marker

2.2 Annexin B1 与凋亡细胞磷脂酰丝氨酸结合 经过氧化氢作用 30 min 后,U937 细胞凋亡率增高,annexin B1 检测凋亡率由 16.54% 升高为 18.57%,annexin V 检测凋亡率由 14.96% 升高为 16.02% (图 2)。

2.3 Annexin B1 与活化血小板磷脂酰丝氨酸结合 流式细胞仪检测以 CD49b-PE 设门,作为血小板标记,经凝血酶激活后 annexin B1 的结合率由 83.12% 升高为 88.88%,annexin V 的结合率由 76.67% 升高为 81.10%(图 3)。

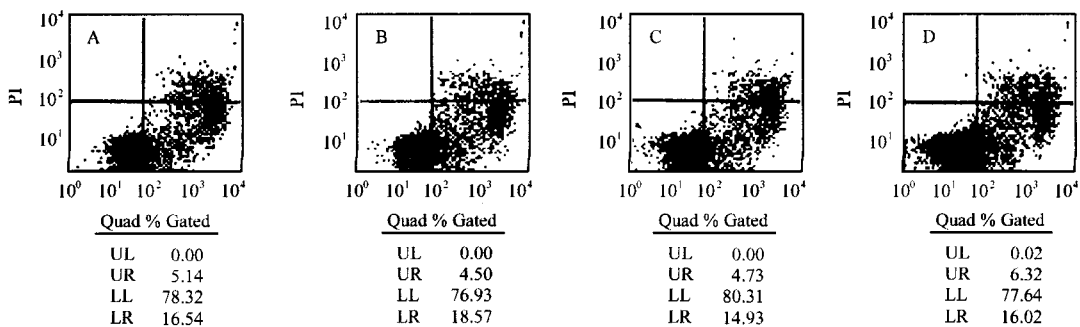


图 2 FITC 标记的 annexin B1 对凋亡 U937 细胞的检测

Fig 2 Detection of apoptotic U937 cells with FITC labeled annexin B1

A,B:Flow cytometric analysis of apoptotic U937 cells by annexin B1 and PI;

C,D:Flow cytometric analysis of apoptotic U937 cells by annexin V and PI; In B and D, U937 cells were induced by H₂O₂

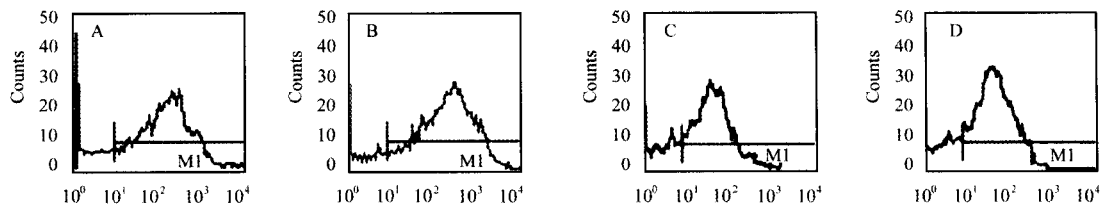


图3 FITC 标记的 annexin B1 检测活化血小板

Fig 3 Detection of activated platelets with FITC labeled annexin B1

Platelets were selected according to PE-CD49b gate.

A,B: Annexin B1; C,D: Annexin V; In C and D, platelets were stimulated by thrombin

3 讨论

磷脂酰丝氨酸是细胞膜的重要组成成分,正常时主要位于胞质膜内侧,磷脂酰丝氨酸外出现于细胞凋亡早期^[6],而且是吞噬细胞识别凋亡细胞最有特征的标志^[7],同时,研究也发现磷脂酰丝氨酸外露亦是血小板活化的标志^[9]。来源于人的膜联蛋白家族成员 annexin V 因其良好的磷脂酰丝氨酸结合活性,已被广泛应用于凋亡细胞和活化血小板的检测^[8~10]。Annexin B1 为本室首次克隆的新的 annexins 亚家族成员,源自猪囊尾蚴,通过生物信息学技术分析,其在同源性上比较接近人的 annexin A5 (即 annexin V)^[2],动物实验证实 annexin B1 具有抗凝血活性^[3]。本实验结果显示,FITC 标记的 annexin B1 能与过氧化氢诱导凋亡的 U937 细胞特异性结合,亦能与凝血酶激活的活化血小板特异性结合,这两种实验条件均为磷脂酰丝氨酸外露的细胞模型,此结果从一定程度上表明 annexin B1 系与细胞膜上的磷脂酰丝氨酸结合,而非其他膜成分。磷脂酰丝氨酸外露不仅是血小板活化的重要标志,同时也为凝血酶原酶复合物的形成提供磷脂表面,特异性磷脂酰丝氨酸结合蛋白可遮盖磷脂表面,抑制凝血酶原酶复合物的形成,从而抑制凝血过程,本试验中 annexin B1 可特异性结合磷脂酰丝氨酸,揭示 annexin B1 的抗凝血功能可能是通过与血小板膜磷脂结合而干扰凝血过程。研究亦显示 annexin B1 与 annexin V 两者的磷脂酰丝氨酸亲和力比较接近,提示 annexin B1 与 annexin V 在种系进化过程中有可能源自同一基因,这有待于进一步的研究证实。此外,实验证实 annexin B1 能与凋亡细胞外露磷脂酰丝氨酸特异性结合,为将 annexin B1 开发为凋亡诊断试剂提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 孙树汉,王俊霞,陈蕊雯,等. 囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 的分子克隆[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1997,15(1):15-20. Sun SH, Wang JX, Chen RW, et al. Molecular cloning of cDNA encoding immunodiagnostic antigens of cysticercosis [J]. *Zhongguo Jishengchongxue Yu Jishengchongbing Zazhi (Chin J Parasitol Parasitic Dis)*, 1997, 15(1):15-20.
- [2] Yan HL, Sun SH, Chen RW, et al. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 119(1):1-5.
- [3] Zhang Y, Chen RW, Sun SH. The influence of Annexin32, a new Ca²⁺-dependent phospholipid-binding protein, on coagulation time and thrombosis[J]. *Sci in China (Series C)*, 2002, 45(2):172-176.
- [4] 张毅,郭淑军,王芳,等. Annexin B1:一种新的细胞凋亡检测用蛋白[J]. 第二军医大学学报,2003,24(3):333-334. Zhang Y, Guo YJ, Wang F, et al. Annexin B1 as a novel protein for detecting apoptosis[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2003, 24(3):333-334.
- [5] 沈关心,周汝麟 主编. 现代免疫学技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2002. 127.
- [6] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 184(1):39-51.
- [7] 彭黎明,王曾礼 主编. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2000. 33.
- [8] Tzima E, Walker JH. Platelet annexin V: the ins and outs [J]. *Platelets*, 2000, 11(5):245-251.
- [9] Vidal C, Spaulding C, Picard F, et al. Flow cytometry detection of platelet procoagulant activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86(4):784-790.
- [10] Leo L, Paola JD, Judd BA, et al. Role of the adapter protein SLP-76 in GPVI-dependent platelet procoagulant responses to collagen [J]. *Blood*, 2002, 100(8):2839-2844.

[收稿日期] 2003-07-15

[修回日期] 2003-10-22

[本文编辑] 尹茶