

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.10.011

溶血性贫血突变小鼠中锚蛋白外翻介导的红细胞吞噬作用*

王 琨¹, 韩 强¹, 彭书华¹, 彭激雁², 韩林妍^{1△}

(1. 重庆市云阳县人民医院, 重庆 404500; 2. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016)

摘要:目的 探讨红细胞膜蛋白在红细胞程序性死亡过程中的作用。方法 选取 C57BL/6J 野生型(+/+)、基因敲除小鼠锚蛋白基因敲除纯合子型(nb/nb)、带 4.2 蛋白基因敲除(P4.2-/-)和带 3 蛋白基因敲除(带 3-/-)的小鼠各 3 对,采用红细胞变形仪检测带 3 蛋白、带 4.2 蛋白及锚蛋白缺乏红细胞的综合伸长指数以判定细胞程序性死亡前及死亡过程中的变形能力和渗透脆性;采用流式细胞仪检测锚蛋白及磷脂酰丝氨酸(PS)在红细胞凋亡过程中的外翻情况,以及巨噬细胞对红细胞的黏附作用。结果 不同红细胞的综合伸长指数从大到小依次为+/+、nb/nb、带 3-/-、P4.2-/-,P4.2-/-红细胞渗透脆性在正常情况及钙离子孵育情况下均较弱;与+/+红细胞比较,P4.2-/-红细胞在生理钙浓度及外加剪切力作用下外翻减弱,nb/nb 红细胞中截短锚蛋白的外翻增加;nb/nb 红细胞 PS 外翻明显增加;红细胞黏附数 nb/nb 为+/+的 4~6 倍,P4.2-/- 低于 nb/nb,但高于带 3-/-。结论 锚蛋白外翻的红细胞更易被巨噬细胞识别,其外翻的精氨酸、甘氨酸和天门冬氨酸基因序列(RGD 序列)可能是红细胞程序性死亡的潜在死亡信号。

关键词:RGD 序列;α_vβ₃ 整合素;锚蛋白;带 3 蛋白;带 4.2 蛋白;基因敲除

中图分类号:R96;R556.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)10-0045-06

Ankyrin Externalization and RGD-α_vβ₃ Integrin-Mediated Erythrophagocytosis in Hemolytic Anemic Mutant Mice

WANG Kun¹, HAN Qiang¹, PENG Shuhua¹, PENG Weiyan², HAN Linyan¹

(1. Yunyang County People's Hospital, Chongqing, China 404500; 2. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016)

Abstract: Objective To investigate the role of erythrocyte membrane protein in the process of programmed death of erythrocytes. **Methods** Mice with C57BL/6J wild-type (+/+), ankyrin gene knockout homozygous (nb/nb), band 4.2 protein gene knockout (P4.2-/-) and band 3 protein gene knockout (band 3-/-) were selected, three pairs of each type. The comprehensive elongation indexes of erythrocytes with band 3 protein, band 4.2 protein and ankyrin lacking erythrocytes were detected by red cell deformer to determine the deformability and osmotic fragility before and during programmed death of cells. The externalization of ankyrin and phosphatidylserine (PS) in the apoptosis of erythrocytes and the adhesion of macrophages to erythrocytes were detected by flow cytometry. **Results** The comprehensive elongation indexes of different erythrocytes from high to low were as follows: +/+, nb/nb, band 3-/- and P4.2-/-, the osmotic fragility of P4.2-/- erythrocytes was weak under normal conditions and calcium ion incubation. Compared with that of +/+ erythrocytes, the externalization of P4.2-/- erythrocytes decreased under the action of physiological calcium concentration and external shear force, and the externalization of truncated ankyrin increased in nb/nb erythrocytes. Compared with that of +/+ erythrocytes, the externalization of nb/nb erythrocytes PS increased significantly. The number of erythrocyte adhesion of nb/nb type was 4-6 times that of +/+ type, that of P4.2-/- type was lower than that of nb/nb type, but higher than that of band 3-/- type. **Conclusion** Ankyrin externalization and RGD-α_vβ₃ integrin-mediated erythrocytes are more easily recognized by macrophages. The externalization gene sequences of arginine, glycine and aspartate (RGD sequence) may be the potential death signal of the programmed death of erythrocytes.

Key words: RGD sequence; α_vβ₃ integrin; ankyrin; band 3 protein; band 4.2 protein; gene knockout

正常人红细胞的平均寿命为 120 d,每天有 2 × 10¹¹个红细胞被破坏和重新补充,几乎无随机破坏的红细胞出现^[1]。含有 RGD 序列[精氨酸(Arg)-甘氨酸(Gly)-天门冬氨酸(Asp)组成]的蛋白质,以及作为其受体的整合素,构成了细胞黏附的主要识别系统^[2]。已有研究表明,巨噬细胞表面的 α_vβ₃ 整合素和其他受体可介导凋亡细胞的吞噬^[3]。在人红细胞膜骨架中,血影

蛋白 α^[4],锚蛋白^[5]和带 4.2 蛋白^[6-7]均位于细胞膜磷脂双分子层内,且均为含有 RGD 序列的主要膜骨架蛋白;锚蛋白常与带 3 蛋白和带 4.2 蛋白紧密结合,将骨架蛋白与质膜紧密相连^[4]。有研究发现,红细胞膜骨架蛋白血影蛋白、锚蛋白和带 4.2 蛋白中,仅锚蛋白与 α_vβ₃ 整合素具有亲和结合力,通过带 3 蛋白基因敲除(带 3-/-)和带 4.2 蛋白基因敲除(P4.2-/-)红细胞,可

*基金项目:国家自然科学基金[81302307]。

第一作者:王琨,女,大学本科,主管检验师,研究方向为新生儿溶血病、免疫性溶血病的诊断,(电子信箱)58947756@qq.com。

△通信作者:韩林妍,女,大学本科,主管检验师,研究方向为血液微生物检测,(电子信箱)yyxrmmyhly@sohu.com。

研究蛋白外翻过程中的作用。带3蛋白缺失的红细胞具有正常水平的血影蛋白和带4.1蛋白,其膜骨架的结构接近正常状态的红细胞^[4]。带4.2-/-模型小鼠会出现轻度遗传性球形红细胞增多症^[6],但膜上含有正常数量的血影蛋白和锚蛋白,膜骨架结构基本完好无损。通常认为,带3蛋白对红细胞膜的生物合成和力学性能起关键作用。为了解锚蛋白的调节结构域,特别是RGD序列在其外翻中的作用,选取了锚蛋白敲除小鼠对缺乏锚蛋白调控结构域的红细胞进行研究。由于小鼠8号染色体上Ank-1基因的缺陷,锚蛋白基因敲除纯合子型(nb/nb)红细胞几乎完全缺乏全长210 kDa的锚蛋白^[7-10]。作为替代,出现了1种缺乏完整调控结构域,但包括完整质膜和血影蛋白结合结构域的157 kDa nb-锚蛋白(p150)。nb/nb和带3-/-红细胞特性已被证明^[5,11],故可根据红细胞特性鉴定小鼠的各个基因型。为此,本研究中对带3蛋白、带4.2蛋白和锚蛋白基因敲除的红细胞表面锚蛋白、磷脂酰丝氨酸(PS)和巨噬细胞表面受体 $\alpha_v\beta_3$ 整合素及PS受体的结合进行了考察。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:LBY-BX型红细胞变形仪(北京普利生仪器有限公司,重复性误差小于5%);BX53型显微镜(日本Olympus公司);FACScan型流式细胞仪(美国BD公司)。

试剂:15%聚乙烯吡咯烷酮(PVP,美国Sigma公司,相对分子量40 kDa,批号为9003-39-8);锚蛋白一抗、FITC偶联二抗(美国Santa Cruz公司);Annexin V-PE(藻红蛋白标记,美国BD公司);RBC缓冲液(成都市科隆化学品有限公司,含20 mmol/L Na_2HPO_4 ,5 mmol/L KH_2PO_4 ,65 mmol/L NaCl 和2.5 mmol/L CaCl_2 ,pH7.4);其余试剂均为分析纯。

动物:实验动物购自重庆医科大学动物实验室,实验动物生产许可证号SCXK(渝)2018-0003;实验动物使用许可证号SYXK(渝)2018-0003。实验动物饲养符合规范,实验涉及的动物操作均经医院动物伦理委员会批准。

1.2 方法

红细胞变形性和渗透脆性测定:实验室自行构建C57BL/6J野生型(+/+)、nb/nb、P4.2-/-和带3-/-的小鼠各3对(4~6周龄,体质量160~190 g)。带3-/-为在杂交种属(129/Sv-C57BL/6J)自交系的背景上获得。将+/+、nb/nb、P4.2-/-和带3-/-红细胞与RBC缓冲液(分加或不加 CaCl_2 两种)500 g,37℃孵育。为制造剪切力,将样品重悬于含15%PVP的RBC缓冲液中。将样品(500 μL)放入预热至37℃的红细胞变形仪中,1 000 s^{-1}

作用10 min。设定剪切速率为100~1 000 s^{-1} (相当于10.5~105 dyne/cm^2),根据10个不同剪切速率下的指数计算综合变形率指数;同时进行渗透压脆性试验,并以综合伸长指数(integrated EI)与 CaCl_2 溶液孵育时间作图。采用综合伸长指数分析红细胞程序性死亡过程中红细胞膜骨架的变形能力,以评估在一系列剪切力下红细胞的总体变形能力。考察红细胞在有或无剪切力作用下,与钙离子孵育不同时间的变形能力,数值越大表明变形能力越强。

锚蛋白和PS外翻情况检测:选取缺失带3、带4.2或锚蛋白调节域的突变红细胞,检测在上述情况下锚蛋白能否外翻到细胞表面,并将红细胞暴露在2.5 mmol/L的 CaCl_2 溶液中(无ATP供应的生理状态)以模拟生理条件。首先用含或不含2.5 mmol/L CaCl_2 的RBC缓冲液在37℃下孵育红细胞1,2,4,8 h,采用红细胞变形仪以1 000 s^{-1} 速率剪切作用10 min。红细胞(10^6 个)用4%多聚甲醛固定,不透膜,然后以一抗(1:1 000)和二抗(1:1 000)孵育。随后,用膜联蛋白Annexin V-PE孵育细胞,采用流式细胞仪分析细胞表面PS外翻情况。

巨噬细胞对红细胞的识别及黏附:取来自2~3月龄的雌性B6D2F1小鼠腹腔中的巨噬细胞(10^5 个),黏附在观察用的腔室上,孵育过夜,加入红细胞(10^6 个),显微镜下计数与巨噬细胞黏附的红细胞数。平行操作3次。

1.3 方法学处理

计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行Kruskal-Wallis检验和Bonferroni比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 程序性死亡前突变红细胞的变形性和渗透脆性

等渗溶液中、可变剪切力下红细胞的变形曲线见图1A。结果表明,+/+红细胞的综合伸长指数最初最高,P4.2-/-红细胞的最低。 CaCl_2 溶液孵育后,4 h内剪切力对带3-/-、nb/nb和P4.2-/-红细胞有显著影响,对孵育时间较长(8 h)的+/+红细胞影响不显著。综合分析,在细胞死亡过程中,综合伸长指数最低的是P4.2-/-红细胞,其次是nb/nb和带3-/-。与+/+比较,nb/nb、带3-/-和P4.2-/-红细胞均有显著差异($P < 0.0001$)。

渗透脆性试验结果见图1B。可见,P4.2-/-红细胞的渗透脆性在正常情况(孵育0 h时)下和钙离子存在情况下孵育的每个试验点均最弱。正常情况下,+/+、nb/nb和带3-/-之间无显著差异,但随着孵育时间的延长,+/+红细胞与突变红细胞之间综合伸长指数差异显著。在每项试验中,剪切力对红细胞的渗透脆性也有一定影响。

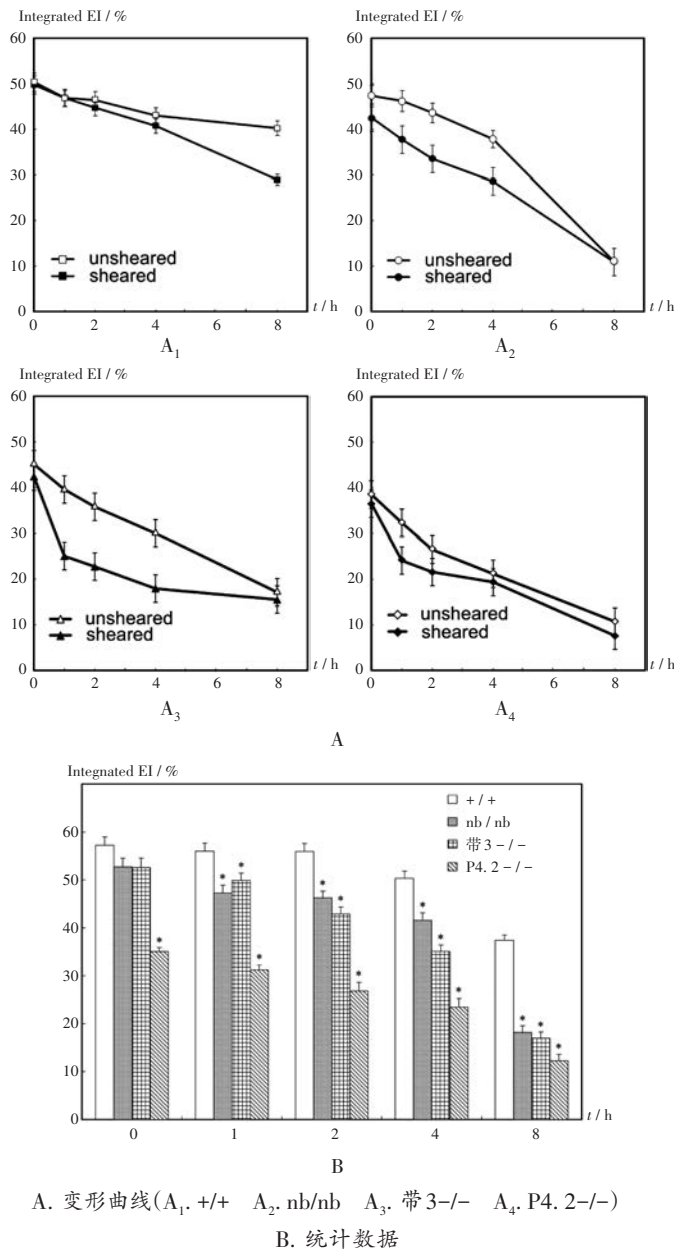


图1 正常和突变红细胞在钙离子和剪切力作用下的变形性及渗透脆性
A. Deformation profiles (A₁. +/+; A₂. nb / nb; A₃. P4.2 - / -; A₄. Band 3) B. Statistical data
Note: Compared with those of + / + type, **P* < 0.001.

2.2 锚蛋白在细胞程序性死亡过程中的外翻情况

结果见图2。+/+红细胞在无钙离子存在时,孵育8 h时仅引起少量锚蛋白外翻,而在钙离子与剪切力同时存在时则对锚蛋白外翻有一定影响;无论有无钙离子存在,带3蛋白缺失时,锚蛋白基本不发生外翻,剪切力和孵育时间也无明显影响;在钙离子存在时,剪切力作用更易加剧带4.2-/-红细胞中锚蛋白的外翻,但与

nb/nb比较,其中锚蛋白的外翻程度降低;在不含钙离子的nb/nb红细胞中,剪切力对锚蛋白外翻仍有一定影响,较长的孵育时间也会导致更多的锚蛋白外翻;nb/nb红细胞与2.5 mmol / L CaCl₂孵育数小时,在无葡萄糖或其他能源供应时,剪切力升高了外表面的锚蛋白水平。孵育1 h后,无剪切力作用也会导致锚蛋白的外翻,孵育时间较长时外翻更明显。

2.3 PS在程序性死亡过程中的外翻情况

无钙离子存在时,剪切力也会导致PS翻转,且外翻随着孵育时间的延长而增强。带3-/-红细胞的PS外翻相对较少,P4.2-/-红细胞中PS外翻情况与+/+相似。有钙离子存在时,剪切力作用可显著增加nb/nb红细胞表面PS的外翻。详见图3。

2.4 巨噬细胞对程序性死亡红细胞的识别和黏附

nb/nb红细胞的黏附数为+/+的4~6倍,P4.2-/-红细胞的黏附数低于nb/nb,但高于带3-/-。详见图4(纵坐标指每100个巨噬细胞黏附的红细胞数量)。

3 讨论

血液中红细胞并非随时保持双凹圆盘形,其常会被血液循环中的剪切力极大地扭曲,这种扭曲也是红细胞能通过脾脏的基本要求。本研究中对突变红细胞的力学特性进行了分析,以了解红细胞膜蛋白在红细胞膜骨架中的作用,从而了解红细胞膜的变形性和渗透脆性。结果表明,正常红细胞在细胞死亡前会逐渐丧失变形能力,突变红细胞的变形能力和渗透脆性较正常红细胞显著降低。在这些条件下,红细胞缺少带3蛋白、锚蛋白或带4.2蛋白可能使球状红细胞增多或膜表面积减小,表面积/体积降低并导致变形能力降低^[11]。在这3种基因型中,P4.2-/-红细胞的变形能力低于带3-/-和nb/nb,这表明带4.2蛋白在红细胞膜骨架中起着重要作用。

本研究中采用3种基因敲除小鼠,研究了细胞程序性死亡时红细胞的力学性质和锚蛋白的外翻情况。nb/nb红细胞仅有少量截短的锚蛋白种类,缺少带3正常数量的蛋白4.2,但与+/+和其他相同条件下的突变红细胞相比,nb/nb红细胞中锚蛋白的外翻更明显。本研究结果表明,截短的锚蛋白在受到钙离子及剪切力作用时更易外翻,这意味着缺失部分或全部的调控结构域可能是锚蛋白外翻的必要步骤。

带3-/-红细胞保留了50%的锚蛋白,但无带3蛋白;P4.2-/-红细胞具有正常数量的锚蛋白,但缺乏带4.2蛋白。这两种红细胞的锚蛋白外翻数量基本一致,低于正常红细胞,表明带3蛋白、带4.2蛋白的连接将锚蛋白固定在细胞膜内侧对膜蛋白的外翻非常重要。除了膜骨架,红细胞的死亡机制还涉及PS。细胞程序性

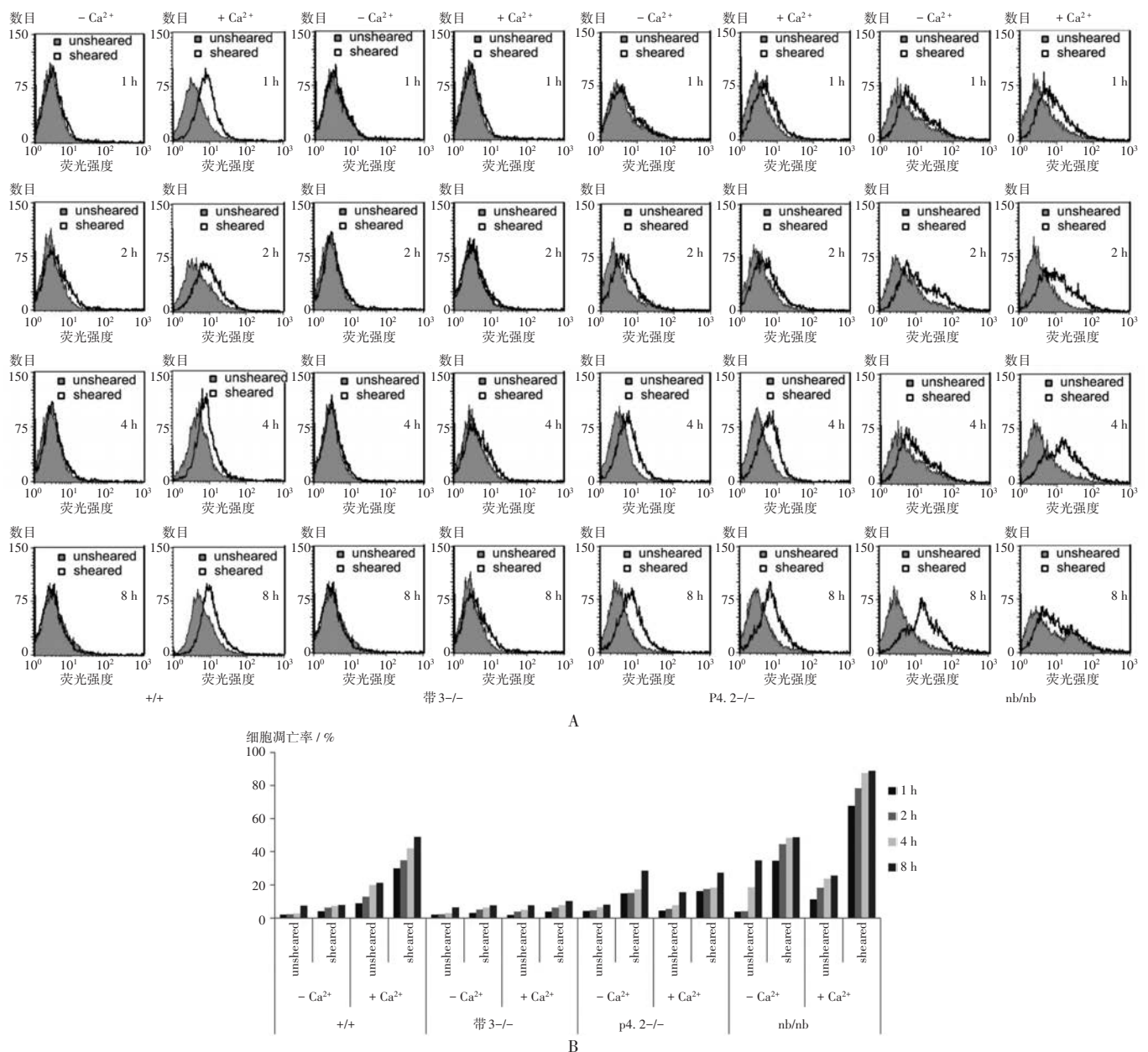


图2 锚蛋白外翻情况

A. Flow cytometry B. Statistical data

Fig.2 Externalization of ankyrin

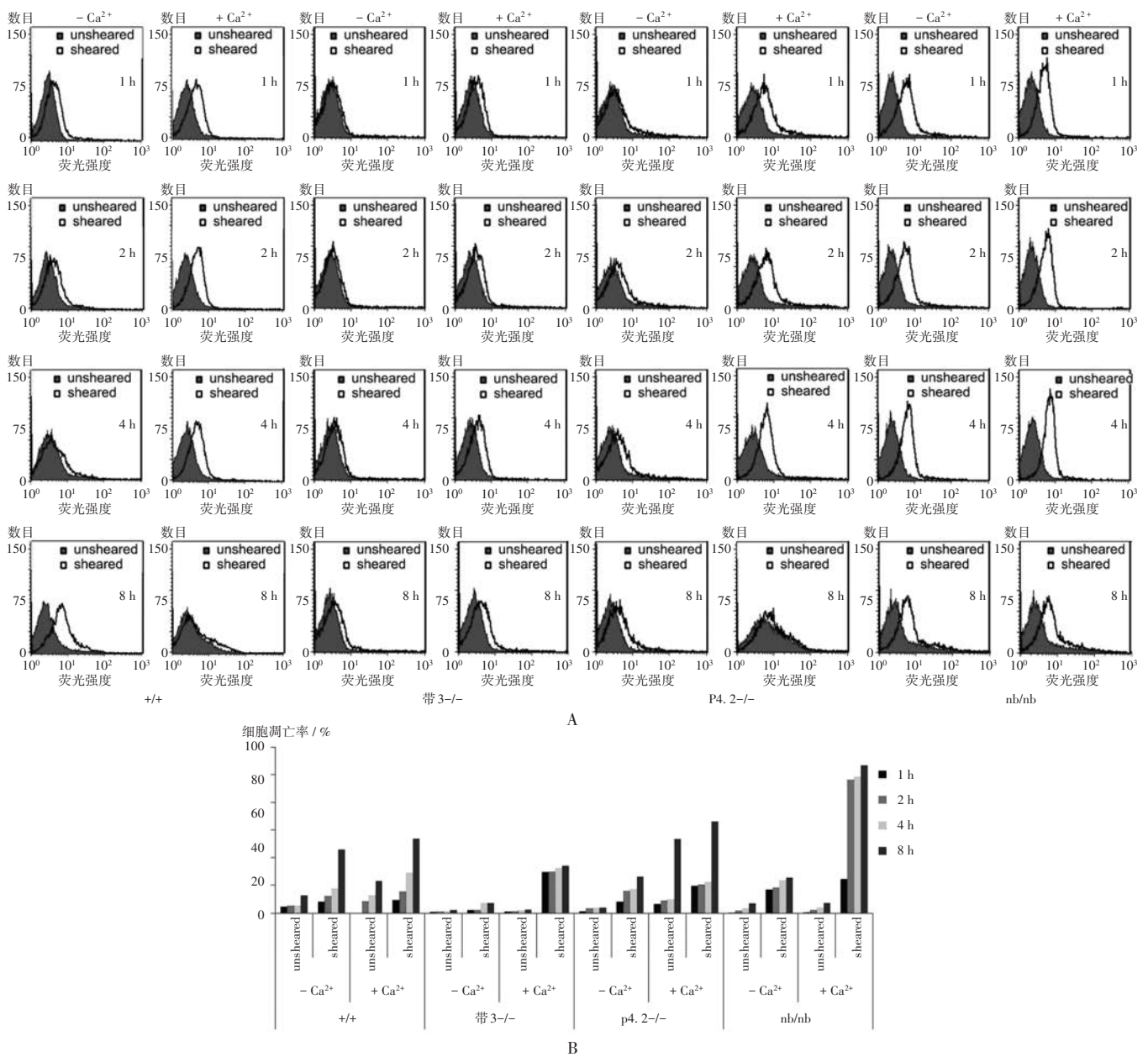
死亡过程中,带负电荷的PS从内叶转移到外叶。PS的移位是由细胞内钙离子活性的增加触发的,这一过程也激活了蛋白酶,如钙蛋白酶,这是一种半胱氨酸内肽酶,可降解锚蛋白和其他膜骨架蛋白。锚蛋白的外翻也可能携带一些PS,特别是考虑到等电点为8.95的带4.2蛋白,可能已经在膜蛋白复合体周围吸引了大量的PS。

综上所述,截短锚蛋白在生理浓度下与胞外钙离子孵育时更易外翻到红细胞表面,并随剪切力作用增强;带3蛋白,带4.2蛋白的存在对于将锚蛋白固定在细胞膜内侧至关重要;而锚蛋白外翻的红细胞更易被巨噬细胞黏附。因此,锚蛋白上外翻的RGD序列可能是

衰老或患病红细胞的潜在死亡信号。

参考文献

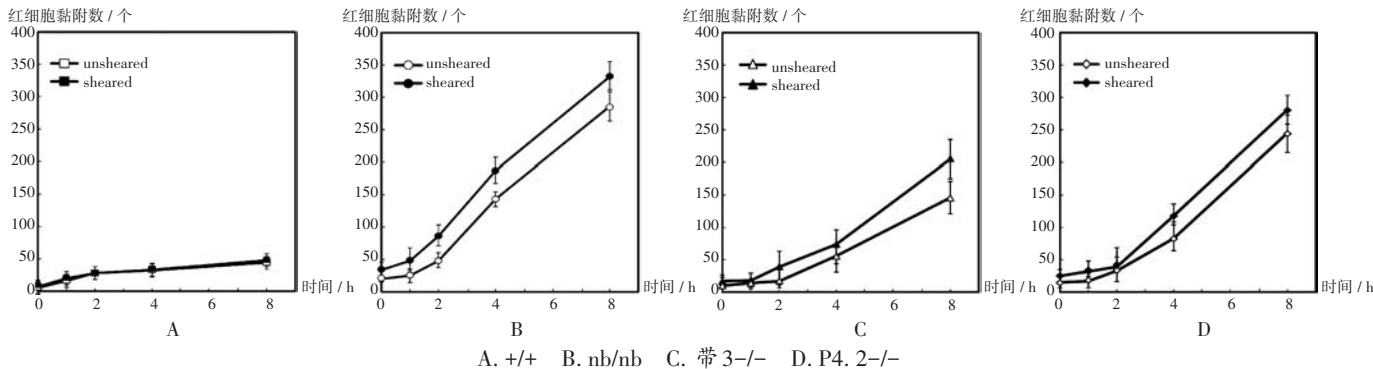
- [1] ZHOU CY, HUANG XQ, LI X, et al. Circular RNA erythrocyte membrane protein band 4.1 assuages ultraviolet irradiation - induced apoptosis of lens epithelial cells by stimulating 5' - bisphosphate nucleotidase 1 in a miR - 24 - 3p - dependent manner[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8953 - 8964.
- [2] WANG H, WEI HW, SHEN HC, et al. To study the effect of oxygen carrying capacity on expressed changes of erythrocyte membrane protein in different storage times[J]. Biosci Rep, 2020, 40(6): BSR20200799.



A. 流式细胞图 B. 统计数据
图3 PS外翻情况

A. Flow cytometry B. Statistical data

Fig.3 Externalization of PS



A. +/+ B. nb/nb C. 带3-/- D. P4.2-/-

图4 巨噬细胞对红细胞的黏附

A. +/+ B. nb / nb C. Band 3 -/- D. P4.2 -/-
Fig.4 Adhesion of macrophages to erythrocytes