



趋化因子 CCL11-糖胺聚糖-趋化因子受体 CCR3 的相互作用研究*

李冠霖 刘恒姮 丁彦之 李计强 葛保胜**

(中国石油大学(华东)化学工程学院生物工程与技术中心, 重质油国家重点实验室, 青岛 266580)

摘要 目的 探究趋化因子 CCL11 与受体 CCR3、糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 相互作用过程及机制, 为深入阐明 CCL11-GAGs-CCR3 相互作用关系提供理论参考。**方法** 利用基因工程技术, 构建筛选了 CCR3-EGFP 单分子表达水平的 CHO 稳转细胞系, 利用全内反射荧光成像 (total internal reflection fluorescence, TIRF) 与等温滴定量热 (isothermal titration calorimetry, ITC) 技术研究了不同体外溶液条件下 GAGs 与 CCL11 的相互作用, 并利用趋化实验及活细胞单分子成像实验考察了 GAGs-CCL11 对 CCR3-EGFP 稳转细胞趋化行为的调控及 CCR3-EGFP 在细胞膜上聚集状态的影响。**结果** 随着硫酸软骨素链长度的增加, 其与 CCL11 结合放热增多, 表明其相互作用力增强, 其促进 CCL11 聚集作用增强。单分子荧光成像技术结合趋化试验研究发现, 不同种类及不同比例的 GAGs 均会影响 CCL11 与 CCR3 的相互作用, GAGs 的加入, 抑制了 CCL11 对 CCR3-EGFP 稳转细胞的趋化效应及促 CCR3-EGFP 聚集的能力, 且随着硫酸软骨素分子质量的增加, 抑制作用显著增强。**结论** GAGs 的存在可以显著调控 CCL11 的聚集状态, 进而影响其与受体 CCR3 的相互作用, 本研究为进一步阐明 CCL11-GAGs-CCR3 相互作用关系提供了一定的实验基础。

关键词 趋化因子 CCL11, 趋化因子受体 CCR3, 趋化, 糖胺聚糖, 单分子成像

中图分类号 Q5, Q6, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0312

趋化因子是一种能够诱使免疫细胞产生趋化作用的细胞因子总称, 其通过与相对应趋化因子受体及内皮细胞表面的糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 相互作用行使生物学功能, 在细胞发育、肿瘤发生、血管生成、炎症反应、伤口修复和神经再生等^[1]重要细胞生理过程中发挥着重要作用。许多疾病的发生都与趋化因子及其受体的表达或调控异常相关^[2], 因此, 趋化因子及其受体多年来一直是疾病治疗和药物设计的重要作用靶点。

据报道, 大多数趋化因子及其受体均有形成二聚体或寡聚体的倾向^[3]。然而, 文献同时证实, 趋化因子单体是对其受体具有最高亲和力和促进细胞迁移的形式^[4]。那么趋化因子寡聚的目的是什么? 为了探究趋化因子寡聚的生理学意义, Proudfoot 等^[4]设计了趋化因子单体突变体 (RANTES (CCL5)、MCP-1 (CCL2) 和 MIP-1b (CCL4)), 并研究发现细胞迁移需要趋化因子寡聚。同样, GAGs 结合缺陷突变体研究表明, 趋化

因子在体内行使功能也需要与 GAGs 结合^[5], 这提示趋化因子可以在 GAGs 链上聚集并发挥作用^[6]。在细胞迁移过程中, 趋化因子通过在 GAGs 上聚集, 使其形成浓度梯度, 提供牵引趋化细胞所需的亲和力, 特别是存在血流剪切力的情况下^[7-8]。然而, Joseph 等^[9]提出, 只有游离趋化因子以及延伸的趋化梯度, 才能驱动中性粒细胞从循环到组织的运输, GAGs 结合趋化因子不能激活受体。并且, CC 型趋化因子二聚体中, 对受体激活至关重要的残基被埋入二聚体内部, 且二聚体结构与受体结合空间不相容, 因此, CC 型趋化因子二聚体不能激活受体, 诱导细胞迁移^[10]。目前为止, 对于趋化因子-糖胺聚糖 GAG-G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCR) 受体三者之间的

* 国家自然科学基金 (21373271, 42061134020) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0532-86983858, E-mail: gebaosheng@upc.edu.cn

收稿日期: 2022-07-05, 接受日期: 2023-01-13

作用关系, 以及趋化因子或其受体聚集在其中发挥的作用如何都还不清楚。探究阐明趋化因子、趋化因子受体及 GAGs 三者之间相互作用过程及机制对于深入理解趋化因子受体的激活及其发挥功能的作用机制具有重要意义。

趋化因子 CCL11 是 Eotaxins 家族的成员, 最早发现于致敏豚鼠抗原刺激后的支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中, CCL11 与其受体 CCR3 的结合^[11]会触发一系列信号转导事件, 包括细胞骨架重排、蛋白激酶 C 的激活以及受体的长期内化等^[12]。CCL11 及 CCR3 被认为是抗哮喘药物的可能靶点, 在变应性和非变应性的炎症反应中起着关键作用^[13-14], 此外, CCL11 还参与局部缺血诱导的血管壁重塑, 在许多疾病中起着潜在的作用。细胞表面最普遍的 GAGs 是硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 与硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS)。CS 以蛋白聚糖侧链的形式广泛存在于各种细胞间基质及细胞表面中^[15], 在多种生化反应中起到极为重要的作用。例如, 参与神经系统的生长、胞质分离、病毒黏附、形态形成、生长因子信号转导等^[16]。Culley 等^[17]研究发现, GAGs (如肝素) 会抑制嗜酸性粒细胞对 CCL11 的趋化反应以及抑制细胞内的钙通量, 同时抑制 CCL11 与 CCR3 的结合。趋化因子也可以与可溶性 GAG 或细胞表面受体形成复合物, 该可溶性 GAG-趋化因子复合物无法再与趋化因子受体结合, 导致生物活性被阻断^[18]。Culley 等^[17]研究证明硫酸乙酰肝素可在体外抑制趋化因子诱导的嗜酸性粒细胞活化。

本文以 CCL11-GAGs-CCR3 为研究体系, 构建了单分子表达水平的 CCR3-EGFP 稳转细胞系, 选择 3 种 GAGs (硫酸软骨素 1~3, 链长依次增加), 利用全内反射荧光成像 (total internal reflection fluorescence, TIRF)、等温滴定量热 (isothermal titration calorimetry, ITC) 和细胞趋化等技术探究 GAGs 与 CCL11 的相互作用, 以及 GAGs-CCL11 对 CCR3-EGFP 稳转细胞趋化行为的调控及 CCR3-EGFP 在细胞膜上聚集状态的影响, 以期阐明 CCL11-GAGs-CCR3 三者之间的作用关系及相关药物的设计和疾病治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary

cell, CHO) 购自中国科学院细胞库。CCL11-MKO 融合蛋白表达载体 pET-28a-*ccl11*-MKO 和 CCR3-EGFP 表达载体 pcDNA3.1-*ccr3*-*egfp* 质粒均由本实验室构建并保存; 鼠抗 anti-His 单克隆抗体, HRP-labeled Goat Anti-Mouse IgG 购自上海生工公司; 硫酸软骨素 1 (0.5 ku) 购自 Aladdin 公司; 硫酸软骨素 2 (5~20 ku) 购自 Solarbio 公司; 硫酸软骨素 3 (50~100 ku) 购自 BBI 公司; 兔抗 CCR3 单克隆抗体购自 Abcam 公司; Amersham ECL 显色试剂盒购自 GE healthcare (GE) 公司; Transwell Chambers 趋化小室购自 Corning 公司; 多聚甲醛购自源叶生物公司。

1.2 方法

1.2.1 利用 ITC 探究 GAGs 与 CCL11 的相互作用

使用 Malvern 公司 Microcal ITC200 仪器进行等温滴定量热实验。GAGs 放置于滴定针内, 空白溶液和 CCL11 样品溶液放置于样品池内。先用 GAGs 溶液滴定缓冲液作为空白对照, 再使用不同分子质量的硫酸软骨素溶液滴定 CCL11。其中样品池中样品为 350 μL , 进样器中样品为 100 μL 。ITC 实验过程中, 参比池、样品池及上样针每次实验使用前必须多次清洗干净保证无其他杂质, 加样时保证无气泡, 且所有样品均用 0.45 μm 滤膜过滤, 参比池中加入超纯水。不同样品浓度及配比的滴定实验参数的设定如表 1 所示:

Table 1 Parameter settings in ITC experiment

Parameter	Value
Number of ligand injections	19
Sample cell temperature/ $^{\circ}\text{C}$	30
Reference power/ $(\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1})$	5
Primary delay/s	60
Stirring speed/ $(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	750
$c(\text{CCL11})/(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$	50
$c(\text{chondroitin sulfate})/(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$	50

1.2.2 单分子成像技术考察 GAGs 对 CCL11-MKO 聚集状态的影响

将不同分子质量大小的 GAGs 与 CCL11-MKO (C-C motif chemokine 11-monomeric Kusabira Orange, CCL11-MKO) (文档 S1) 分别按照 1 : 1、10 : 1、100 : 1 的比例进行混合孵育, 并稀释至蛋白质浓度为 10^{-10} mol/L, 静置 20 min 后, 采用单分子 pull-down 技术将样品固定在组装的洁净样品池中, 使用 532 nm 激光对样品进行激发, 通过激发

滤光片 R532 nm 和发射滤光片 582/75 nm 采集相应波长范围的信号。采用荧光猝灭阶数分析技术^[19], 考察不同 GAG 处理后 CCL11-MKO 的聚集变化。

1.2.3 细胞趋化实验

将实验室前期构建好的 CCR3-EGFP 稳转细胞复苏后悬浮于含有 0.5% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基中, 分别取 100 μl ($1 \times 10^6/\text{ml}$) 接种于 Transwell Chambers 上层小室, 对应下层小室分别添加 500 μl 含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基及终浓度为 50 nmol/L 的 CCL11 与 CCL11-MKO, 于 37°C、5% CO_2 细胞培养箱中继续孵育 5 h。趋化结束后用多聚甲醛室温固定 15 min, 上室膜晾干后加入终浓度为 0.1% 结晶紫, 室温染色 20 min, 蒸馏水漂洗 3 次, 用棉签将上室顶层细胞擦掉, 在显微镜下进行细胞计数, 每组设 3 次平行试验。

1.2.4 CCL11-GAG 作用下 CCR3-EGFP 的活细胞单分子成像

将所构建的稳定表达 CCR3-EGFP 的稳转细胞株均匀接种至细胞培养皿 (2 cm) 中, 待细胞汇合度达到 80% 左右时, 吸出培养基, 加入摩尔比为 1:1、10:1、100:1 的硫酸软骨素 3 与 CCL11 混合溶液 (CCL11 终浓度均为 1 000 nmol/L), 4°C 孵育 15 min, 吸出培养基并用 0.22 μm 无菌滤膜过滤处理的 1×PBS 轻轻漂洗 3 遍, 加入 150 μl DMEM 无酚红培养基, 利用 TIRF 技术进行单分子成像, 将成像结果用 ImageJ 处理, 并用 Matlab 进行分析。

对每一帧荧光点的荧光强度进行统计, 取所选点前 3 帧的平均荧光强度, 得到强度分布图用 Origin 进行高斯拟合^[20-21], 考察不同 CCL11-GAG 复合体对 CCR3-EGFP 在活细胞膜上聚集作用的影响。

2 结 果

2.1 利用 ITC 研究 GAGs 与 CCL11 相互作用

研究表明, 趋化因子-GAGs 的相互作用对于 CCL11 介导的信号转导具有重要影响, 缺乏寡聚能力或与 GAGs 结合能力的趋化因子突变体在体内无法行使正常功能^[22], 故趋化因子寡聚及趋化因子与 GAGs 相互作用可能是偶联的。本文利用 ITC 技术研究了 CCL11 与 GAGs 的相互作用。不同长度的硫酸软骨素可与 CCL11 结合, 硫酸软骨素 1 号由于分子质量较小, 分子链较短, 其与 CCL11 可以看出有明显相互作用, 但由于滴定放热过少, 数据无法有效拟合 (图 1)。通过 Origin 软件对其他两种 GAGs 与 CCL11 溶液的滴定数据拟合后得到各项热力学常数 (表 2)。分析实验结果可知, 随着硫酸软骨素链长的增加, 结合放热增加, 表明其相互作用增强, 硫酸软骨素与 CCL11 的结合常数 (K_a) 由 $2.15 \times 10^6 \pm 4.66 \times 10^5$ 增大至 $3.72 \times 10^7 \pm 7.48 \times 10^6$ 。经计算, 硫酸软骨素 2 与 CCL11 的结合比为 1:1, 即平均约 1 个硫酸软骨素结合 1 个 CCL11, 硫酸软骨素 3 则逐渐转变为 1 个硫酸软骨素结合约 16 个 CCL11。

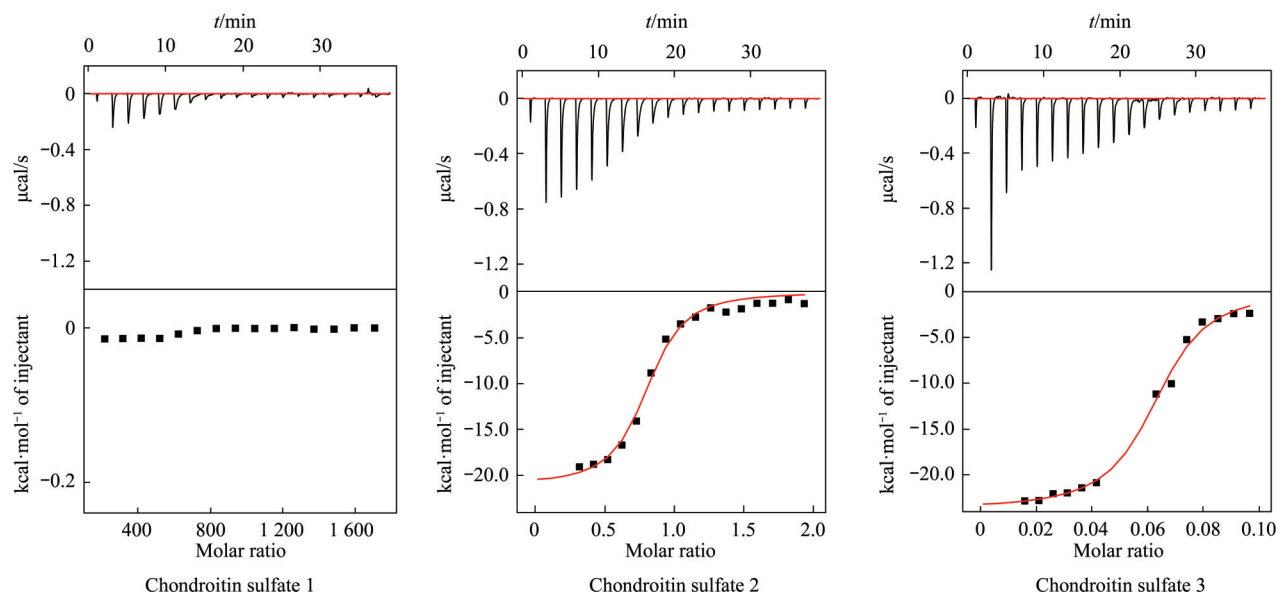


Fig. 1 Interaction analysis of chondroitin sulfate with CCL11 using ITC technique

The top figure is the titrated data, and the bottom figure is the integrated data obtained after fitting.

Table 2 The fitting data of interactions between Chondroitin sulfate and CCL11

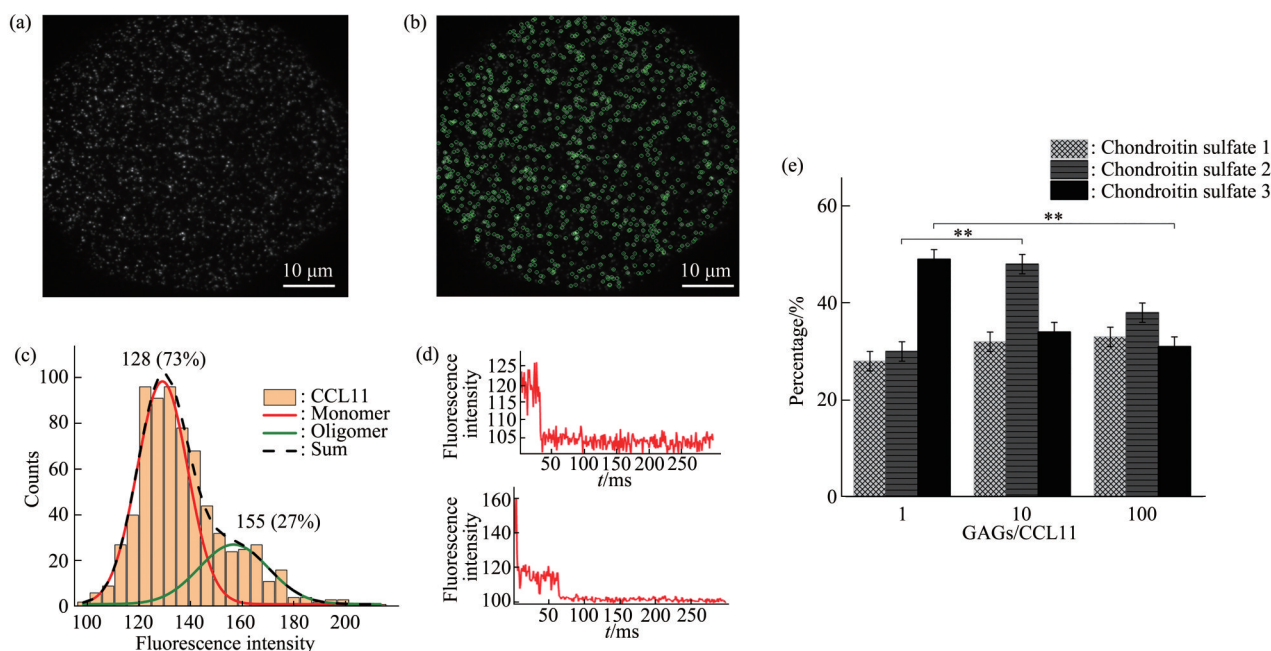
GAGs	Ratio of binding (<i>N</i>)	<i>K_a</i> /(mol ⁻¹ ·L)	ΔH /(cal·mol ⁻¹)	ΔS /(cal·mol ⁻¹ ·deg ⁻¹)
Chondroitin sulfate 2	0.780±0.016 2	2.15×10 ⁶ ±4.66×10 ⁵	-2.105×10 ⁴ ±752.0	-40.5
Chondroitin sulfate 3	0.062 2±8.63×10 ⁻⁴	3.72×10 ⁷ ±7.48×10 ⁶	-2.363×10 ⁵ ±4 606.0	-745

2.2 不同GAGs对CCL11-MKO体外聚集状态的影响

为了进一步探究不同GAGs对CCL11体外聚集状态的影响,利用单分子荧光TIRF成像技术(图2a, b),研究了不同GAGs对CCL11-MKO聚集状态的影响。图2c为pH=7、20 mmol/L NaCl条件下的荧光强度拟合结果,从图中可以得出pH=7时,溶液中CCL11-MKO单体比例约为73% ($P<0.01$),寡聚体约为27% ($P<0.05$),说明在pH=7情况下CCL11-MKO主要以单体形式存在,也存在部分二聚体形式。同时采用荧光阶数漂白分析技术进一步验证该方法的可靠性(图2d),荧光强度125时约为一阶漂白,即表示CCL11单体,荧光强度160时约为二阶漂白,表示此时CCL11为二聚体。同样可以证实,大部分的CCL11-MKO荧光颗粒以单体形式存在且荧光强度在110~140之间,单体比例约占73%。

将GAGs与CCL11-MKO混合孵育后进行单分

子成像,并根据其荧光强度拟合及荧光漂白阶数分析对其聚集状态进行统计(图2e)。随着硫酸软骨素1比例的增加,其显示出对CCL11-MKO的聚集有少量的促进作用。而硫酸软骨素2在物质的量比例为1:1和10:1时,随着比例的增加,其对CCL11-MKO的聚集有着显著促进作用。CCL11-MKO的寡聚体量在GAGs与CCL11-MKO摩尔比为10:1时达到了48%。但令人意外的是,硫酸软骨素2在GAGs与CCL11-MKO比例达到100:1时,CCL11-MKO聚集状态反而有所降低,说明随着硫酸软骨素2号比例的增加,过多的硫酸软骨素竞争结合CCL11-MKO,反而不利于CCL11-MKO聚集体的形成。同样,硫酸软骨素3号在1:1时,CCL11-MKO聚集体就达到了最大值,随着GAGs与CCL11-MKO比例增加,CCL11-MKO聚集体反而降低。这表明,随着GAGs链的加长,GAGs与CCL11的相互作用增强,倾向于形成GAGs-CCL11复合物,同时对CCL11聚集体的形成有一定促进

**Fig. 2** Total internal reflection fluorescence imaging and aggregation analysis of CCL11-MKO

(a) Fluorescence image after ImageJ processed; (b) fluorescence imaging after processed by Matlab; (c) CCL11-MKO aggregation calculated by fluorescence intensity distribution under pH=7, 20 mmol/L NaCl condition; (d) fluorescence step bleaching image of CCL11-MKO; (e) statistical results of CCL11-MKO aggregation status under GAGs conditions.

作用, 所以推测, 在体内血液流动的条件下, 长链GAGs对CCL11在内皮细胞表面特定部位的停留贡献更高。

2.3 GAGs-CCL11聚集体对CCR3-EGFP稳转细胞趋化作用的影响

CCL11对CCR3表达细胞具有典型的趋化作用, 为探究GAGs-CCL11形成的复合体与CCR3的相互作用, 本实验室构建了CCR3-EGFP稳转细胞细胞系, 并以此为基础考察了CCL11-GAGs聚集体对CCR3-EGFP稳转细胞趋化作用的影响(图3)。硫酸软骨素3的加入会对CCL11诱导的趋化作用产生抑制。不同比例的硫酸软骨素3与CCL11对CCR3-EGFP稳转细胞趋化实验结果发现, 硫酸软

骨素3加入比例为1:1时, CCL11对CCR3-EGFP稳转细胞的趋化能力显著降低, 再增加GAGs-CCL11比例, CCL11的趋化能力再没有出现显著变化, 提示该比例下, 已基本实现了对CCR3-EGFP稳转细胞趋化的最大抑制能力。针对不同分子质量大小的GAGs实验发现, 在加入比例为1:1条件下, 随着硫酸软骨素链长的增加, 趋化抑制现象逐渐增强, 由硫酸软骨素1的10%左右的抑制率, 增强到硫酸软骨素3的60%左右。结合上述单分子实验分析结果分析, 这提示硫酸软骨素的添加促进了CCL11的聚集, 导致趋化因子对受体激活至关重要的残基不再暴露, 从而抑制了CCL11对CCR3-EGFP稳转细胞的趋化作用。

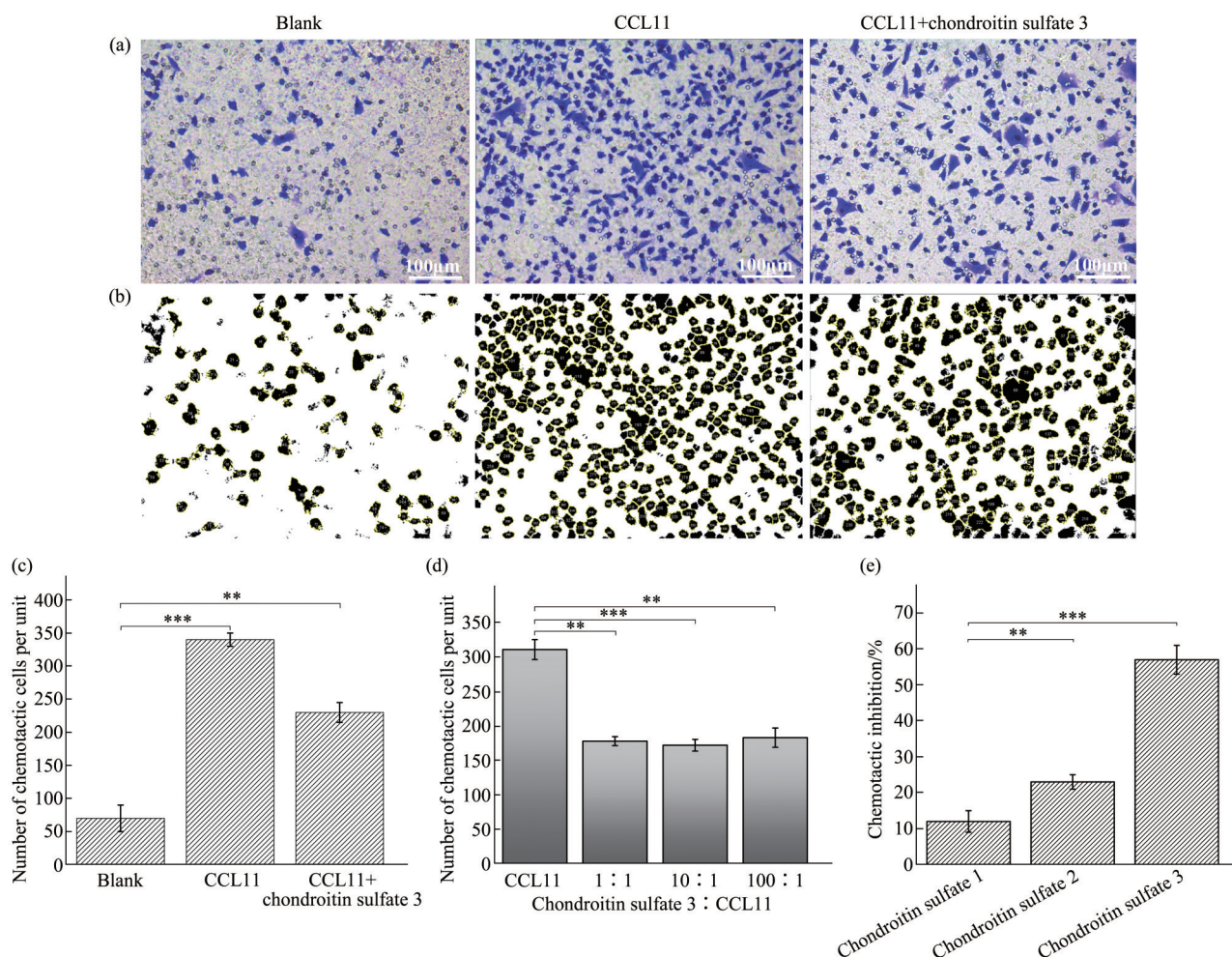


Fig. 3 Chemotaxis analysis of CCL11 on CCR3-EGFP stable transfected cells

(a) Imaging of chemotaxis cells after crystal violet staining; (b) automatic counting of cells after software processing; (c) statistics of chemotaxis results of CCL11 on CCR3-EGFP stably transfected cells; (d) chondroitin sulfate 3 and CCL11 in different ratios under the combined effect of chemotactic results statistics; (e) inhibition ratio of chemotactic effects upon different GAGs to CCL11 as 1:1.

2.4 GAGs-CCL11对活细胞膜上CCR3-EGFP聚集状态的影响

为探究 GAGs-CCL11 复合物对活细胞膜上趋化因子受体 CCR3 聚集状态的影响, 首先分析所构建的 CCR3-EGFP 是否适合单分子成像。将所构建的 CCR3-EGFP 稳转细胞株接种至底部透明培养皿中, 进行 TIRF 单分子成像 (图 4a)。CCR3-EGFP 稳转细胞轮廓清晰, CCR3-EGFP 荧光斑点均匀分散在细胞膜表面。利用 ImageJ 软件提取每个点的荧光强度, 并取前 3 帧图片中每个荧光点强度的平

均值, 利用 Origin 软件做出荧光强度分布图并进行高斯拟合。通过高斯拟合峰的数量和峰值之间的关系可以推断 CCR3-EGFP 荧光颗粒的聚集状态 (图 4b), 同时结合荧光强度与阶数漂白对应关系 (图 4c) 进行统计分析。经统计 337 个 CCR3-EGFP 颗粒分析可知, 大部分 CCR3-EGFP 荧光颗粒以单体形式存在且荧光强度在 25~55 之间, 单体约占 83% ($P<0.01$)。这表明所构建筛选的 CCR3-EGFP 稳转细胞株适合于进一步的细胞膜上单分子成像分析。

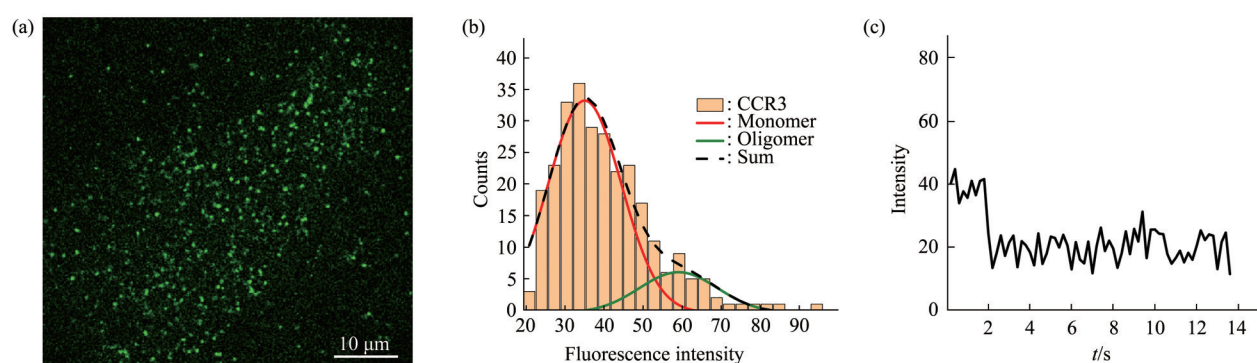


Fig. 4 Aggregation state statistics of CCR3-EGFP on CHO cell membrane

(a) Single-molecule imaging; (b) fluorescence intensity distribution statistics of CCR3-EGFP aggregation state; (c) fluorescence step bleaching image of CCR3-EGFP.

为探究 CCL11-GAGs 对 CCR3-EGFP 聚集状态的影响, 将 GAGs 与 CCL11 共同孵育后作用于 CCR3-EGFP 稳转细胞株, 通过 TIRF 进行单分子成像, 对细胞膜上 CCR3-EGFP 聚集状态进行统计。CCL11 与硫酸软骨素 3 共同作用时 CCR3-EGFP 在细胞膜上聚集状态统计结果 (图 5a, b) 为: 单独加入 CCL11 时, CCR3-EGFP 在细胞膜上的聚集状态约在 33% 左右。随着硫酸软骨素 3 的加入, CCR3-EGFP 的寡聚体降低, 在硫酸软骨素 3 号与 CCL11 为 1:1 时, CCR3-EGFP 在细胞膜上的聚集体由 33% 降为 18%, 后续增加硫酸软骨素 3 比例, 对 CCR3-EGFP 在细胞膜上的聚集状态影响不显著。

还考察了不同分子量大小 GAGs 与 CCL11 共同作用下 (比例设为 1:1) CCR3-EGFP 聚集状态进行统计, 图 5c 为结晶紫染色后趋化细胞成像, 实验结果表明: 随着硫酸软骨素链长的增加, 其对 CCL11 引起的 CCR3-EGFP 在细胞膜上聚集现象的抑制作用增强。综合以上分析, 硫酸软骨素的加入, 会在一定程度上促进 CCL11 的聚集, 但该聚集受到 GAGs 长度等因素的影响。CCL11-GAGs 复合体会抑制 CCL11 诱导的细胞膜上 CCR3-EGFP 的聚集, 并对 CCL11 诱导的细胞趋化作用产生负面影响。

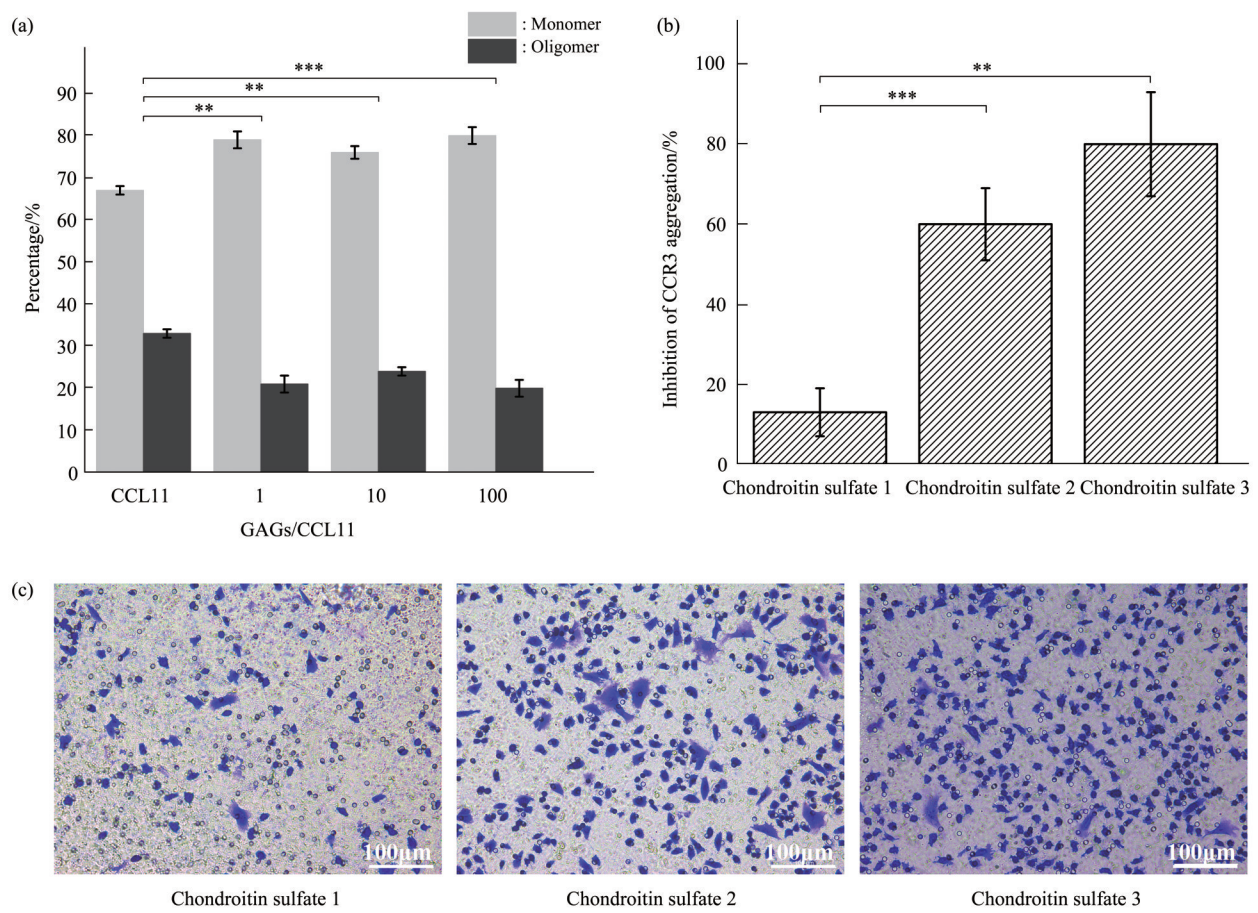


Fig. 5 Statistics of CCR3-EGFP aggregation status upon binding of GAGs-CCL11

(a) Statistics analysis of CCR3-EGFP aggregation status at different ratios of chondroitin sulfate 3 and CCL11; (b) inhibition ratio of CCR3-EGFP aggregation on cell membrane at GAGs to CCL11 ratio as 1 : 1; (c) imaging of chemotaxis cells after crystal violet staining.

3 讨 论

趋化因子是能使免疫细胞发生趋化作用的细胞因子的总称,其参与调节细胞在一系列发育、稳态和炎症过程中的迁移,并在介导白细胞黏附和细胞迁移中发挥关键作用^[23-24]。趋化因子通常与免疫细胞表面的趋化因子受体及内皮细胞表面的GAGs相互作用,从而牵引免疫细胞到达相应的病灶部位并发挥作用。研究表明,趋化因子与GAGs的相互作用是其在体内实现功能必不可少的,二者之间的相互作用非常重要^[25-26]。趋化因子CCL11是参与嗜酸性粒细胞募集和介导哮喘相关组织损伤的主要趋化因子,其与受体CCR3相互作用能够介导嗜酸性粒细胞在寄生虫感染和过敏反应部位的迁移和积累,CCR3参与炎症反应的发生、发展过程,已经被作为治疗炎症反应相关疾病的重要治疗靶

点^[27-28]。因此深入探究CCL11与GAGs及其受体CCR3的相互作用,有助于全面理解CCL11-GAGs-CCR3介导的相关疾病发病机理及其治疗途径。

本文首先利用ITC及TIRF技术探究了GAGs与CCL11之间的相互作用,结果发现不同长度的GAGs均可以与CCL11体外结合。随着硫酸软骨素链长的增加,结合放热增加,相互作用增强,由1个硫酸软骨素结合1个CCL11,逐渐转变为1个硫酸软骨素结合多个CCL11。同时单分子荧光成像实验表明,随着硫酸软骨素链长的增加,其在一定程度上对CCL11-MKO聚集作用增强,但是聚集程度并不会随着GAGs链长的增加线性提升,而是存在饱和效应,这与Ellyard等^[29]报道结果一致:GAGs可以但并不一定显著促进CCL11聚集体的生成。因此,CCL11在血流剪切力的情况下形成浓度梯度从而诱导并牵引CCR3细胞的关键因素,可能不是CCL11聚集体的形成,可能是CCL11单体

与 GAGs 相互作用的结果, 且长链的 GAGs 与 CCL11 的相互作用更强, 从而对 CCL11 在特定位点的停留有更强的稳定效应。

趋化因子受体与趋化因子结合并被激活的过程可以调节多种生理作用, 包括白细胞运输、增殖、分化和肿瘤转移等。趋化因子受体 CCR3 属于 A 类 GPCRs, 在过敏反应和其他免疫介导的炎症疾病中起关键作用。CCR3 参与哮喘、关节炎以及特异性皮炎等过敏性炎症的发展过程, 同时也是 HIV-1 病毒感染人体免疫细胞的辅助受体^[30] 以及老年性黄斑病变的有效药物靶点^[31]。CCL11 与其受体 CCR3 相互作用能够介导嗜酸性粒细胞在寄生虫感染和过敏反应部位的迁移和积累, 被认为是抗哮喘药物的可能靶点。本文通过考察 CCL11-GAGs 共同作用下对 CCR3-EGFP 稳转细胞趋化效应的影响发现, GAGs 的加入会抑制 CCL11 对 CCR3-EGFP 稳转细胞的趋化效应, 且随着硫酸软骨素链长的增加, 抑制作用增强。此现象与 GAGs 与 CCL11 相互作用相符, 随着硫酸软骨素链长增加, 其与 CCL11 相互作用增强, 使溶液中游离 CCL11 减少, 聚集体增多, 趋化效应相应降低。

研究表明, 趋化因子受体能够发生自聚形成同源寡聚体, 也可以与其他趋化因子受体结合形成异源寡聚体, 或与其他非趋化因子受体相互作用^[32], 趋化因子受体寡聚体的形成对其功能具有诸多影响。CCR5 的同源聚集被认为可以减少 HIV 感染, 而 CCL5 作为 CCR5 的激动剂, 可使受体 CCR5 二聚体更稳定^[33-34]。Hauser 等^[35] 研究表明, CCR7 二聚体和其他高阶低聚物形成了一个稳定复合体, 能够整合 G 蛋白和 Src 依赖的信号通路, 从而有效地实现细胞迁移。趋化因子受体 CXCR4 被认为是通过形成二聚体以获得适当的生物活性^[36]。

实验室前期的研究及本实验均发现, CCR3 以单体、二聚体和寡聚体的混合状态存在于细胞膜上, CCR3 的寡聚体状态可以由其结合配体 CCL11 调节。同时活细胞单分子实验表明, GAGs 的加入会抑制 CCL11 诱导的 CCR3-EGFP 聚集效应, 随着硫酸软骨素长度的增加, 抑制能力随之增强。这与上述趋化实验结果相符, 随着硫酸软骨素链长的增加, 其与 CCL11 相互作用增强, 在相同浓度下游离的 CCL11 单体比例减少, 从而大幅降低了对 CCR3-EGFP 聚集的诱导作用。

基于以上实验结果推测, 炎症反应释放的趋化因子 CCL11 最初被细胞表面的 GAGs 所捕获, 通过 CCL11 与 GAGs 的相互作用, 可以调控 CCL11 的聚集, 从而保证趋化因子在血流剪切力存在的条件下能够在某一个部位形成浓度梯度, 并牵引白细胞逆趋化因子浓度梯度到达炎症部位 (图 6)。此外, GAGs 密度也较为关键, 过高的 GAGs 密度会导致趋化因子从 GAGs 上解离下来后又再次与 GAGs 结合, 不易于趋化因子释放到血液中。“云”模型^[37-38] 认为, 趋化因子可以被细胞表面的 GAGs 所捕获, 然后再以可溶性单体形式释放并与白细胞上的受体结合, GAGs 的主要作用是将趋化因子集中在某一位置, 这些相互作用是动态的, 趋化因子经历多轮结合、分离, 再重新结合到 GAGs 上, 形成一个趋化因子“云”^[37]。趋化因子的可逆结合动力学将使它们在从 GAGs 链释放时易于获得, 以便与白细胞上的受体相互作用, 并且在“云”内多次与 GAG 再结合可防止它们因血液剪切力而扩散。值得注意的是, 体内趋化因子 CCL11-GAGs-CCR3 相互作用机制将会是一个更为复杂的过程, 该过程中还可能会有其他趋化因子、GAGs 及趋化因子受体的聚集等因素参与, 对该过程的深入研究以及该

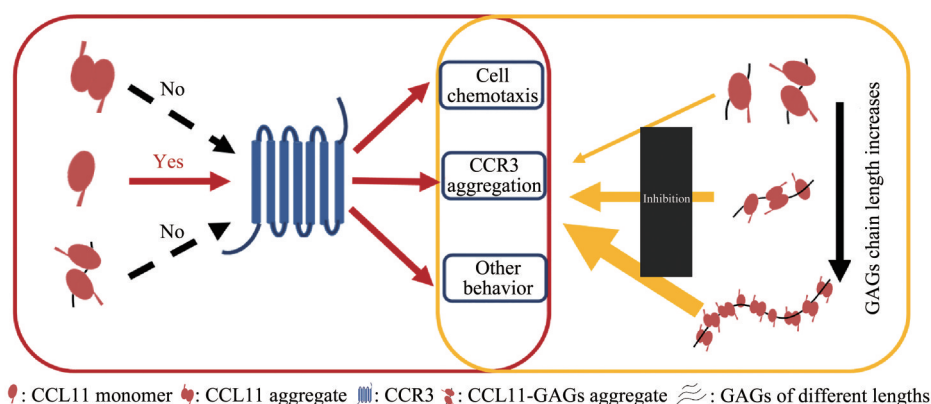


Fig. 6 Schematic diagram of chemokine (CC)-GAGs-chemokine receptor interaction

信号转导过程中下游cAMP、钙流及受体磷酸化等系列级联反应的阐明, 将为深入理解趋化因子-GAGs-趋化因子受体之间的相互作用关系及其作用机制提供重要的理论和实验基础(图6)。

4 结 论

本文利用基于TIRF的单分子荧光技术及活细胞趋化实验系统探究了三者之间的相互作用关系, 主要发现GAGs的类型及数量均对CCL11聚集及其与CCR3的相互作用产生重要影响, GAGs可以通过调控CCL11的聚集程度, 影响CCL11与CCR3的相互作用及其引起的细胞趋化作用, 从而在炎症发生过程中的细胞生理反应起到重要的参与调控作用。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn> 或 <http://www.cnki.net>):

PIBB_20220312_File S1.pdf

参 考 文 献

- [1] Fuchs JA, Brunner C, Schineis P, *et al.* Identification of chemokine ligands by biochemical fragmentation and simulated peptide evolution. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(21): 7138-7142
- [2] Chen S, Yang L, Dong H, *et al.* Human telomerase reverse transcriptase recruits the β -catenin/TCF-4 complex to transactivate chemokine (CC motif) ligand 2 expression in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, 2019, **112**: 108700
- [3] Wang X, Sharp JS, Handel TM, *et al.* Chemokine oligomerization in cell signaling and migration. *Prog Mol Biol Transl*, 2013, **117**: 531-578
- [4] Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, *et al.* Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the *in vivo* activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(4): 1885-1890
- [5] Herring C A, Singer C M, Ermakova E A, *et al.* Dynamics and thermodynamic properties of CXCL7 chemokine. *Proteins*, 2015, **83**(11): 1987-2007
- [6] Hoogewerf A J, Kuschert G S V, Proudfoot A E I, *et al.* Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, 1997, **36**(44): 13570-13578
- [7] Roy I, Getschman A E, Volkman B F, *et al.* Exploiting agonist biased signaling of chemokines to target cancer. *Mol Carcinogen*, 2017, **56**(3): 804-813
- [8] Campanella G S V, Grimm J, Manice LA, *et al.* Oligomerization of CXCL10 is necessary for endothelial cell presentation and *in vivo* activity. *J Immunol*, 2006, **177**(10): 6991-6998
- [9] Joseph P R B, Sawant K V, Rajarathnam K. Heparin-bound chemokine CXCL8 monomer and dimer are impaired for CXCR1 and CXCR2 activation: implications for gradients and neutrophil trafficking. *Open Biol*, 2017, **7**(11): 170168
- [10] Paavola C D, Hemmerich S, Grunberger D, *et al.* Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *J Biol Chem*, 1998, **273**(50): 33157-33165
- [11] Miyagaki T, Sugaya M, Murakami T, *et al.* CCL11-CCR3 interactions promote survival of anaplastic large cell lymphoma cells *via* ERK1/2 activation. *Cancer Res*, 2011, **71**(6): 2056-2065
- [12] Tian M, Chen L, Ma L, *et al.* Expression and prognostic significance of CCL11/CCR3 in glioblastoma. *Oncotarget*, 2016, **7**(22): 32617-32627
- [13] Rankin S M, Conroy D M, Williams T J. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today*, 2000, **6**(1): 20-27
- [14] Teruya-Feldstein J, Jaffe E S, Burd P R, *et al.* Differential chemokine expression in tissues involved by Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxin expression and tissue eosinophilia. *Blood*, 1999, **93**(8): 2463-2470
- [15] Sugahara K, Mikami T, Uyama T, *et al.* Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struc Biol*, 2003, **13**(5): 612-620
- [16] Li F, Shetty AK, Sugahara K. Neuritogenic activity of chondroitin/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brain and their mimicry from shark liver: involvement of the pleiotrophin and hepatocyte growth factor signaling pathways. *J Biol Chem*, 2007, **282**(5): 2956-2966
- [17] Culley F J, Fadlon E J, Kirchem A, *et al.* Proteoglycans are potent modulators of the biological responses of eosinophils to chemokines. *Eur J Immunol*, 2003, **33**(5): 1302-1310
- [18] Kuschert G S V, Coulin F, Power C A, *et al.* Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*, 1999, **38**(39): 12959-12968
- [19] Lao J, He H, Wang X, *et al.* Single-molecule imaging demonstrates ligand regulation of the oligomeric status of CXCR4 in living cells. *J Phys Chem B*, 2017, **121**(7): 1466-1474
- [20] 刘恒姮, 宋彦卓, 李计强, 等. 人趋化因子受体CCR3与 β -arrestin相互作用研究. *生物化学与生物物理进展*, 2020, **47**(11): 1207-1216
- [20] Liu H H, Song Y Z, Li J Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2020, **47**(11): 1207-1216
- [21] Li J, Ding Y, Liu H, *et al.* Oligomerization-enhanced receptor-ligand binding revealed by dual-color simultaneous tracking on living cell membranes. *J Phys Chem C*, 2021, **125**(34): 8164-8169
- [22] Ren M, Guo Q, Guo L, *et al.* Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J*, 2010, **29**(23): 3952-3966
- [23] Dyer D P, Migliorini E, Salanga C L, *et al.* Differential structural remodelling of heparan sulfate by chemokines: the role of chemokine oligomerization. *Open Biol*, 2017, **7**(1): 160286
- [24] Yoshimura T. Discovery of IL-8/CXCL8 (the story from

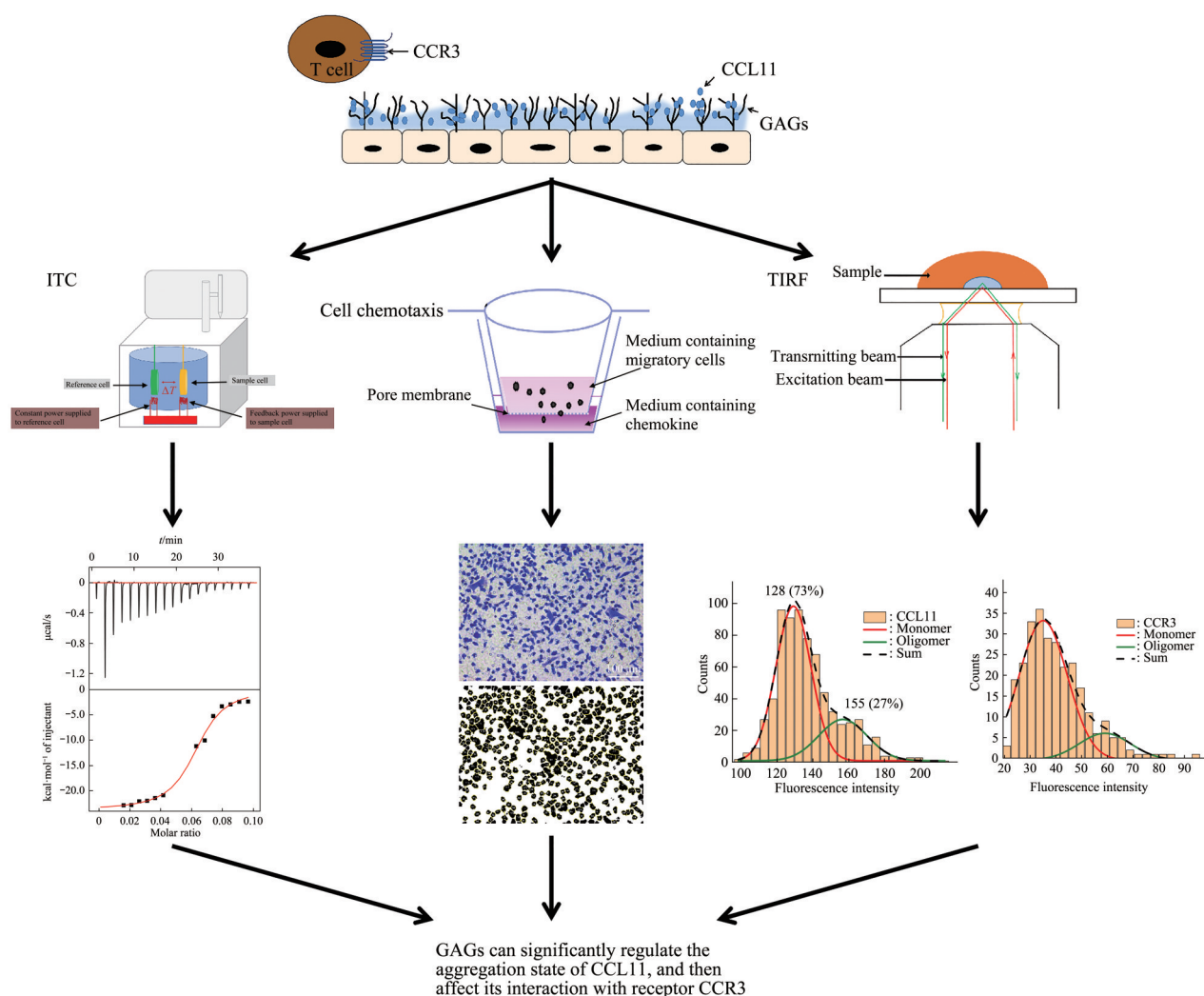
- Frederick). *Front Immunol*, 2015, **6**: 278
- [25] Ali S, O'Boyle G, Hepplewhite P, *et al.* Therapy with nonglycosaminoglycan-binding mutant CCL7: a novel strategy to limit allograft inflammation. *Am J Transplant*, 2010, **10**(1): 47-58
- [26] Sepuru K M, Rajarathnam K. Structural basis of chemokine interactions with heparan sulfate, chondroitin sulfate, and dermatan sulfate. *J Biol Chem*, 2019, **294**(43): 15650-15661
- [27] Shah S A, Kanabar V, Riffo-Vasquez Y, *et al.* Platelets independently recruit into asthmatic lungs and models of allergic inflammation *via* CCR3. *Am J Resp Cell Mol*, 2021, **64**(5): 557-568
- [28] Yamaguchi M, Takagi K, Narita K, *et al.* Stromal CCL5 promotes breast cancer progression by interacting with ccr3 in tumor cells. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(4): 1918
- [29] Ellyard J I, Simson L, Bezos A, *et al.* Eotaxin selectively binds heparin: an interaction that protects eotaxin from proteolysis and potentiates chemotactic activity *in vivo*. *J Biol Chem*, 2007, **282**(20): 15238-15247
- [30] Agrawal L, Maxwell C R, Peters P J, *et al.* Complexity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) co-receptor usage: roles of CCR3 and CCR5 in HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages and brain microglia. *J Gen Virol*, 2009, **90**(3): 710-722
- [31] Takeda A, Baffi J Z, Kleinman M E, *et al.* CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature*, 2009, **460**(7252): 225-230
- [32] Stephens B, Handel T M. Chemokine receptor oligomerization and allostery. *Prog Mol Biol Transl*, 2013, **115**: 375-420
- [33] Vila-Coro A J, Mellado M, Martín de Ana A, *et al.* HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(7): 3388-3393
- [34] Saini V, Staren D M, Ziarek J J, *et al.* The CXC chemokine receptor 4 ligands ubiquitin and stromal cell-derived factor-1 α function through distinct receptor interactions. *J Biol Chem*, 2011, **286**(38): 33466-33477
- [35] Hauser M A, Legler D F. Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *J Leukocyte Biol*, 2016, **99**(6): 869-882
- [36] Vila-Coro A J, Rodríguez-Frade J M, De Ana A N A M, *et al.* The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J*, 1999, **13**(13): 1699-1710
- [37] Majumdar R, Sixt M, Parent C A. New paradigms in the establishment and maintenance of gradients during directed cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, **30**: 33-40
- [38] Graham G J, Handel T M, Proudfoot A E I. Leukocyte adhesion: reconceptualizing chemokine presentation by glycosaminoglycans. *Trends Immunol*, 2019, **40**(6): 472-481

Study on The Interaction Between Chemokine CCL11-glycosaminoglycan-chemokine Receptor CCR3*

LI Guan-Lin, LIU Heng-Heng, DING Yan-Zhi, LI Ji-Qiang, GE Bao-Sheng**

(State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, Center for Bioengineering and Biotechnology, College of Chemical Engineering, China University of Petroleum (Huadong), Qingdao 266580, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21373271, 42061134020).

** Corresponding author.

Tel: 86-532-86983858, E-mail: gebaosheng@upc.edu.cn

Received: July 5, 2022 Accepted: January 13, 2023

Abstract Objective To illustrate the interaction process and mechanism of chemokine CCL11 with receptor CCR3 and glycosaminoglycans (GAGs) and shed light on the regulation mechanism of CCL11-GAGs-CCR3. **Methods** A stably transfected CCR3-EGFP CHO cell line with single-molecule expression level was constructed using genetic engineering. The interaction between GAGs and CCL11 under different *in vitro* solution was studied by total internal reflection fluorescence (TIRF) and isothermal titration calorimetry (ITC) technique. The regulation of GAGs-CCL11 on chemotactic behavior of CCR3-EGFP stable cells and the effect of CCR3-EGFP aggregation on cell membrane were investigated by chemotactic assay and living cell monomolecular imaging assay. **Results** With the increase of chondroitin sulfate chain length, the binding heat release of chondroitin and CCL11 increased, indicating that the interaction force was enhanced and the promotion effect of CCL11 aggregation was enhanced. Single molecule fluorescence imaging technology combined with chemotactic test showed that different types and proportions of GAGs could affect the interaction between CCL11 and CCR3. The addition of GAGs inhibited the chemotactic effect of CCL11 on CCR3-EGFP stable cells and promoted the aggregation ability of CCR3-EGFP. With the increase of molecular mass of chondroitin sulfate, the inhibitory effect was significantly enhanced. **Conclusion** GAGs can affect the aggregation state of CCL11 and its interaction with receptor CCR3. Our study provides a theoretical basis for further elucidating the interaction between CCL11-GAGs-CCR3.

Key words C-C motif chemokine 11, C-C motif chemokine receptor 3, chemotaxis, glycosaminoglycans, single-molecule imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0312