

凋亡细胞被识别和吞噬机制

王 强 丁裕斌 潘敏慧* 鲁 成

(西南农业大学蚕学与生物技术学院, 农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要 凋亡细胞能被吞噬细胞吞噬, 这对于正常组织的动态平衡和免疫反应是非常重要的。在凋亡细胞被吞噬 (engulfment) 的过程中, 吞噬细胞表面存在大量的受体来识别凋亡细胞发出的信号, 如: “吃我 (eat-me)” 信号、缺少存在于健康细胞上的 “不吃我 (don't-eat-me)” 信号以及由凋亡细胞分泌的可溶性 “来吃我 (come-get-me)” 信号。至少有 7 种线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 吞噬基因 (它们在哺乳动物中存在同系物) 组成了两条平行但部分重叠的吞噬信号通路, 并且通过一个类似于巨胞饮 (macropinocytosis) 的 “栓系-激活 (tether and tickle)” 保守机制吞噬凋亡细胞, 这个机制因吞噬细胞和凋亡细胞的种类以及细胞凋亡后的时间差异而不同。

关键词 吞噬细胞; 凋亡细胞; 吞噬; 信号途径

凋亡细胞在体内会被吞噬细胞很快地清除, 此过程一来可以参与器官的发育形成和维持体内动态平衡, 二来可以清除被损坏的细胞成分, 阻止一些细胞毒素或抗原物质向周围组织渗漏。近年来, 随着对线虫、果蝇以及哺乳动物的凋亡模型的深入研究, 揭示了凋亡细胞被吞噬的部分分子机制, 使人们能够更好地理解了凋亡细胞的被识别和吞噬过程, 如受体和配体之间的相互作用、吞噬的信号途径及可能的机制以及内源自杀程序的抗性机制等。现就凋亡细胞被吞噬的机制作一阐述。

1 吞噬受体

吞噬细胞识别并吞噬凋亡细胞的前提条件就是后者存在特定的识别信号, 并且在吞噬细胞上要具有这些信号的受体, 从而连接凋亡细胞或启动吞噬的信号通路。研究表明有多种受体参与了吞噬作用, 如磷脂酰丝氨酸 (PS) 受体、清道夫受体 (A、B、D、E、F 类)、整联蛋白 (integrins)、受体酪氨酸蛋白激酶 Mer、补体蛋白受体等^[1-6] (表 1)。这些受体的功能存在着广泛的冗余性 (redundancy), 即单独阻断某一种受体或同时阻断多种受体的功能只能部分地减缓吞噬进程, 并不能完全阻断吞噬。这种冗余性确保了一些受体有缺陷的时候, 其他一些受体仍能继续发挥作用, 迅速完成对凋亡细胞的清除。另外, 多种受体还能和同一种配体结合。这种现象从表面看会导致多个受体竞争相同的配体, 继而影响吞噬细胞的识别效率, 然而, 当凋亡细胞表面暴露出多个配体的时候, 吞噬细胞上多个受体

的同时识别将会增加黏附的几率并促进吞噬。

2 参与识别凋亡细胞的信号

2.1 “吃我” 信号 (“eat-me” signals)

吞噬细胞通过凋亡细胞表面的 “吃我” 信号识别并吞噬它们。这些信号包括: 出现在细胞表面的新分子, 如外露的 PS 或膜联蛋白 I (annexin I); 已存在的分子的修饰, 如表面分子 ICAM-3 和 CD31 的改变或细胞表面电荷的改变等^[6,7]。间接的 “吃我” 信号也能通过血清蛋白与凋亡细胞表面的特异作用而出现。最清楚的 “吃我” 信号是 PS 从质膜的内层移位到外层^[8,9]。PS 的暴露对吞噬来说是必要的, 因为它不仅是多种受体的配体, 参与吞噬细胞对凋亡细胞的栓系, 而且能激活吞噬摄取的信息通路。但是其暴露的精确机制还不清楚。从表面上看, 这个现象包括了两个方面: 一方面是氨基磷酸酯易位酶 (这种酶在健康细胞中以依赖于 ATP 的方式维持磷脂双分子层的不对称结构); 另一方面就是双向非特异性磷脂酰转移酶 (scramblase) 的激活^[9]。另外, 有报道证明: ATP 结合盒转运蛋白 (ABCA1) 在凋亡中也参与 PS 的重新分布^[10]。

研究表明, PS 并不是直接和 PS 受体结合, 而是通过与桥连分子 (bridging molecule) 膜联蛋白 I 间接结合, 使凋亡细胞对吞噬作用更加敏感。其他桥

收稿日期: 2005-01-13 接受日期: 2005-02-18

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2004AA2Z1020) 和自然科学基金 (No. 30471312) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68250793, Fax: 023-68251128, E-mail: pmh@swau.cq.cn

表1 部分参与识别和吞噬凋亡细胞的受体

受体蛋白	家族	功能
PS 受体		与磷脂酰丝氨酸结合；同其他的吞噬受体相比具有引发反应的立体特异性，在凋亡细胞的吸收过程中起着“tickle”受体的作用；抑止炎症的发生 ^[1]
Mer	受体酪氨酸蛋白激酶	通过与 Gas-6 (Gas-6 与凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合) 的相互作用参与识别凋亡胸腺细胞 ^[2]
CD-14	糖蛋白相连受体	多配体受体，赋予 COS 细胞吞噬凋亡细胞的能力；能和凋亡细胞表面的 ICAM-3 结合促进吞噬 ^[3]
SR-A	清道夫受体 A 类	识别凋亡细胞上类似于 oxLDL 的位点 ^[4]
CD36	清道夫受体 B 类	识别凋亡细胞上 oxLDL 的位点；通过血小板反应蛋白桥与玻连蛋白受体协作而促进吞噬；可以和一系列的阴离子配体如天然或修饰过的脂蛋白结合，促进长链脂肪酸的转运 ^[5]
Croquemort		
LOX-1	清道夫受体 E 类	识别凋亡细胞上类似于 oxLDL 的位点 ^[4]
CD68	清道夫受体 D 类	识别凋亡细胞上类似于 oxLDL 的位点 ^[4]
$\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$	整联蛋白	参与识别凋亡细胞；引发信号转导级联，从而补充 Dock180 和 Rac GTPase
ABCA1/CED-7	ABC 转运蛋白 A 类	引起吞噬细胞膜的脂质重排，从而促进吞噬 ^[5]
CR3	补体蛋白受体	识别凋亡细胞上的 C3b/bi 结合位点
CR4		

PS: 磷脂酰丝氨酸; LOX-1: 氧化的低密度脂蛋白受体 1; oxLDL: 氧化的低密度脂蛋白; Gas-6: 特异的生长停止因子 6; ICAM-3: 胞间黏附分子 3; GPI: 糖蛋白-I; ABCA1: ATP 结合盒转运蛋白。

连分子，如 MFG-E8(milk-globulin-ECF-factor8)、 $\beta 2$ 糖蛋白($\beta 2$ GPI)、血清蛋白 S 和 GAS6 也都可以和凋亡细胞表面的 PS 结合^[11,12]。除了 PS 的外露可以作为“吃我”信号，在凋亡细胞表面同样也存在一些目前尚未完全鉴定的“吃我”信号，如那些类似于低密度脂蛋白颗粒(oxLDL)的位点、血小板反应蛋白-1(TSP-1)结合位点、补体蛋白 C1q 或 C3b/bi 的结合位点^[9]、不同的胶凝素(collectin)[如甘露糖结合凝集素(MBL)和表面活性物质蛋白 SP-A、SP-D]的结合位点等。

2.2 “不吃我”信号(“don't-eat-me” signals)

健康细胞通过对吞噬细胞发出“不吃我”信号而避免了被吞噬。Brown 等^[13]发现：位于正常白细胞和巨噬细胞上的 CD31 分子间的同嗜性反应(相同分子间的反应)会介导白细胞脱离巨噬细胞。因此，CD31 在活细胞中传递一种排斥信号，而在凋亡细胞中产生了缺陷，表达成了黏附性的“吃我”信号，促进吞噬细胞对其识别和摄取。同样，红细胞上的 CD47 也能表达“不吃我”信号^[14]。

2.3 “来吃我”信号(“come-get-me” signals)

“不吃我”和“吃我”信号对于吞噬细胞识别凋亡细胞来说是至关重要的，但只有在两者处于一个相邻的区域的时候，这些信号才能发挥作用。因此必然存在某种“吸引”信号(“来吃我”信号)来引导吞噬细胞向凋亡细胞迁移，以便能尽快地清除凋亡细胞。运用滤孔迁移分析(transwell migration assay)证明了凋亡细胞分泌的一种趋化信号能以一种依赖于 caspase-3 的方式吸引单核细胞^[15]。进一步

的研究认为溶血磷脂酰胆碱(phospholipid lysophosphatidyl choline, LPC)能作为一种可能的“候补”(candidate)趋化因子介导单核细胞向凋亡细胞移动^[11]。

3 吞噬的信号机制

从线虫的基因互补研究发现吞噬主要有两种信号途径。其中一条由 *ced-1*、*ced-6*、*ced-7* 基因组成，三者分别同哺乳动物中编码 LDL 相关受体蛋白(LDL-related receptor protein, LRP)、吞噬连接蛋白(GULP)和 ABCA1 的基因同源^[16-18]。CED-1 是一种聚集在“尸体(corpse)”周围的跨膜蛋白受体，并且通过自身胞间区域的信号模体(motif)启动摄取信号，这些信号很有可能通过 CED-6 而被转导。CED-6 是一种接头蛋白，含有典型的蛋白质-蛋白质相互作用结构域，如 PS 结合结构域(PTB)，一个亮氨酸拉链和富含脯氨酸的区域。PTB 结构域能介导与 CED-1/LRP 的 NPXY 模体反应，再将识别信号转导入吞噬细胞的内部，引起吞噬所必需的细胞骨架的重排^[19]。CED-6 在 CED-1 和 CED-7 的下游发生作用。CED-7/ABCA1 是一种含有 12 个跨膜结构域的受体，存在于吞噬细胞和凋亡细胞上，它是 CED-1 聚集在凋亡细胞周围所必需的，并且在尸体识别过程中，能促进凋亡细胞的脂质重新分布，从而外露磷脂配体^[11]。

第二条途径由 *ced-2*、*ced-5*、*ced-10*、*ced-12* 组成。它们分别与哺乳动物中编码 Crk II、Dock180、Rac1 和吞噬迁移蛋白(ELMO)的基因同源^[20,21]。Dock180、ELMO 形成一种复合体，作为对 Rac1

具有特异性的 GDP-GTP 交换因子。CED-2/Crk II 是一种连接蛋白, 在特定的情况下, 它可能会在膜上将 Dock180-ELMO 复合体招募到含有整联蛋白的复合体上^[22]。CED-2/Crk II 和 CED-5/Dock180 以一种 GTPase 信号途径方式激活 CED-10/Rac1(Rho 家族的一种 GTP 结合蛋白, 它在 CED-1/CED-6/CED-7 和 CED-2/CED-5/CED-12 的下游作用), 通过改变肌动蛋白的聚合作用控制细胞表面的极性延伸。CED-12/ELMO 也与活化的 RhoG 作用, 决定 Rac1 在细胞内定位和(或)是否处于活化状态^[23]。这条途径大概如下: CED-12/ELMO 与 CED-5/Dock180 的羧基端结合, 然后 CED-12/ELMO 的 PH 结构域使 CED-12/ELMO-CED-5/Dock180 复合体定位在质膜上, 接着通过 CED-2/Crk II 的 SH2 结构域结合, 组成 CED-12/ELMO-CED-5/Dock180-CED-2/Crk II 三联体, 再与未确定的活化受体的胞质结构域结合, 接受来自凋亡细胞的吞噬信号。这样, 这个定位于膜上的三联体活化, 招募到一个鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF)到 CED-5/Dock180 中, 催化 GTP 与 CED-10/Rac1 结合成为活化形式, 继而作用于下游目标, 诱导胞膜皱褶和细胞骨架中肌动蛋白的改变。有趣的是, 在 *ced-2-ced-5-ced-10-ced-12* 途径中, 所有的基因都和细胞的迁移事件相关^[24], 它们在吞噬细胞对凋亡细胞分泌的“来吃我”信号作出反应的过程中, 对刺激吞噬细胞的定向移动起了关键性的作用^[9]。

线虫的遗传筛选表明, 吞噬基因的编码产物组成的这两条信息转导途径是相对平行的, 它们在功能上有一些重合, 因为同组内一个或两个基因突变对吞噬过程无显著影响, 而两组内任一基因的同时突变, 却能显著的影响吞噬细胞的吞噬能力。并且这两种表面上不相互依赖的信号途径也存在一些联系。Lauber 等^[9]提到: CED-1/LRP 可以作为一种激活 *ced-2-ced-5-ced-10-ced-12* 信号途径的膜受体, 从而将目前看来独立的两个信号途径较好的联系了起来。但仍然需要进一步的研究来确定这两种信号途径之间的精确联系。

4 凋亡细胞被吞噬的机制

吞噬作用由将被吞噬的颗粒与吞噬细胞表面特定受体的相互作用而引发。免疫球蛋白类的 Fc 受体介导的吞噬作用在形成拉链的过程中发生(拉链形成过程主要指吞噬细胞表面的受体和目标颗粒上的配体之间发生的一系列有一定顺序的连接反应), 最后导致吞噬体的形成^[25,26]。在补体受体介导的吞噬

作用中, 颗粒陷入吞噬细胞, 但是吞噬细胞只产生极其微小的膜的局部褶皱^[27]。

凋亡细胞被识别和吞噬的过程在线虫、昆虫和哺乳动物是高度保守的。近来人们认为凋亡细胞被吞噬包括两个独立的过程。受体 CD14、CD68、CD36 和 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白的参与会导致颗粒的黏连, 但只有 PS 出现时才引起摄取^[6]。吞噬凋亡细胞包括一个栓系(tethering)事件和随后的一个由 PSR 介导的摄取事件, 称为“栓系-激活(tether-tickle)”机制, 这个机制类似于巨胞饮^[28]。在“栓系-激活”机制中, 黏连配体导致凋亡细胞的栓系, 但它们自身并不引发摄取, 而吞噬细胞上的信号受体将启动摄取信号, 但它们本身可能不会引起黏连。这个机制需要 Rho 家族成员 Rac1 和 Cdc42 来调节肌动蛋白的重组^[29], 由此通过吞噬细胞的膜逐渐包围凋亡细胞而使后者内化^[30]。“栓系-激活”机制同沙门氏菌被吸收到上皮细胞的过程相似。强毒株通过它们的 type-III 分泌机制直接将 Rho 家族 GTPases 的激活剂注射到细胞内, 引起膜的变皱运动和巨胞饮。缺少侵染性毒性因子的菌株仍可能黏连到细胞表面但不会被摄取, 除非细胞被其他的刺激物如特定的生长因子激活^[28-31]。

“栓系-激活”机制是吞噬凋亡细胞的一个普遍的机制, 但是 Parnaik 等^[30]发现专职(professional)吞噬细胞(如巨噬细胞和中性粒细胞)和业余(non-professional)吞噬细胞(如内皮细胞和纤维母细胞等)中存在不同的吞噬机制。刚产生的凋亡细胞能很快的被小胶质细胞(专职吞噬细胞)识别并吞噬, 而业余吞噬细胞 BHK(baby hamster kidney)具有不同的形态和吞噬过程。BHK 细胞和活细胞结合疏松, 一旦后者变成凋亡细胞后, 将引起 BHK 细胞膜暂时的皱折, 这个过程持续数小时。最后凋亡细胞以不延伸片状伪足的过程迅速“陷入”BHK 细胞中。相对于刚产生的凋亡细胞, BHK 细胞更容易吞噬老化的凋亡细胞, 暗示了在凋亡过程中, “尸体”上的信号会发生改变, 而这些信号又刺激了业余吞噬细胞对“尸体”的吞噬。因此, 大多数的凋亡细胞会被专职吞噬细胞吞噬并清除, 而那些尚未被清除的凋亡细胞随后会被业余吞噬细胞识别并且清除。这种冗余性在缺少巨噬细胞的老鼠体内被观察到^[32]。

5 吞噬凋亡细胞的生物学意义

吞噬发生在凋亡细胞的溶解之前, 因此抑制了可能的促炎和促免疫原性的胞内内含物的释放。在凋亡细胞被吞噬过程中, 吞噬细胞能够释放抗炎症

介质如转化生长因子 β , 白细胞介素 10 和前列腺素 E2 并阻止促炎介质如肿瘤坏死因子 $\alpha^{[1]}$ 的分泌。吞噬细胞还必须有能力降解凋亡细胞^[1]。在线虫中, 凋亡细胞的 DNA 被吞噬细胞的 *nuc-1* 降解; 而在哺乳动物中, 由 *nuc-1* 的同系物 DNAase II 执行这个功能^[33]。破坏编码 DNAase II 的基因将导致正在发育的组织和器官中凋亡细胞 DNA 的大量积累, 造成胎儿肝脏的损伤^[34]。DNAase II 基因剔除小鼠在出生后不久就死亡, 可能就因为凋亡细胞的 DNA 损伤了其隔膜的功能。

凋亡细胞被吞噬和降解在处理炎症中是非常重要的。虽然在鉴定参与吞噬凋亡细胞的特定分子方面取得了长足的进步, 但每种分子的确切功能以及它们的相互作用仍不太清楚。很幸运, 关于吞噬的大量研究已经能解释一些问题。比如说特定的受体-配体可能参与吞噬过程的特定步骤如识别、栓系或摄取等。确定不同的识别-摄取机制的冗余性、单个分子的功能和对凋亡细胞的识别和吸收机制在炎症发生、免疫反应和组织重建中的调节作用是非常有价值的。后者使得人们能够调节吞噬细胞对凋亡细胞的反应, 并且建立一些有效的抗炎和免疫抑制技术。

参考文献 (References)

- [1] Krieser RJ *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**: 734
- [2] Scott RS *et al. Nature*, 2001, **411**: 207
- [3] Moffatt OD *et al. J Immunol*, 1999, **162**: 6800
- [4] Moreira ME *et al. An Acad Bras Cienc*, 2004, **76**: 93
- [5] Febbraio M *et al. J Clin Invest*, 2001, **108**: 785
- [6] Henson PM *et al. Curr Biol*, 2001, **11**: R795
- [7] Savill J *et al. Nat Rev Immunol*, 2002, **2**: 965
- [8] Fadok VA *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 1071
- [9] Lauber K *et al. Mol Cell*, 2004, **14**: 277
- [10] Hamon Y *et al. Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 399
- [11] Grimsley C *et al. Trends Cell Biol*, 2003, **13**: 648
- [12] Anderson HA *et al. Nat Immunol*, 2003, **4**: 87
- [13] Brown S *et al. Nature*, 2002, **418**: 200
- [14] Oldenborg PA *et al. Science*, 2000, **288**: 2051
- [15] Lauber K *et al. Cell*, 2003, **113**: 717
- [16] Liu QA *et al. Cell*, 1998, **93**: 961
- [17] Wu YC *et al. Cell*, 1998, **93**: 951
- [18] Zhou Z *et al. Cell*, 2001, **104**: 43
- [19] Su HP *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 11772
- [20] Wu YC *et al. Dev Cell*, 2001, **1**: 491
- [21] Wu YC *et al. Nature*, 1998, **392**: 501
- [22] Albert ML *et al. Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 899
- [23] Katoh H *et al. Nature*, 2003, **424**: 461
- [24] Cheresch DA *et al. J Cell Biol*, 1999, **146**: 1107
- [25] Allen LA *et al. J Exp Med*, 1996, **184**: 627
- [26] Maderna P *et al. Biochim Biophys Acta*, 2003, **1639**: 141
- [27] May RC *et al. J Cell Sci*, 2001, **114**: 1061
- [28] Henson PM *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**: 627
- [29] Somersan S *et al. J Cell Biol*, 2001, **155**: 501
- [30] Jarman AP *et al. Curr Biol*, 2000, **10**: R857
- [31] Francis CL *et al. Nature*, 1993, **364**: 639
- [32] Wood W *et al. Development*, 2000, **127**: 5245
- [33] Lyon CJ *et al. Gene*, 2000, **252**: 147
- [34] Kawane K *et al. Science*, 2001, **292**: 1546

Recognition and Engulfment Mechanism of Apoptotic Cells

Qiang Wang, Yu-Bin Ding, Min-Hui Pan*, Cheng Lu

(Key Sericultural Laboratory of Agriculture Ministry, College of Sericulture and Biotechnology, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

Abstract Apoptotic cells can be engulfed by phagocytes. This process is greatly crucial for normal tissue homeostasis and immune responses. During engulfment, a number of receptors on phagocytes are implicated in recognizing signals from apoptotic cells, such as “eat-me” signals, the absence of “don’t-eat-me” signals normally found on healthy cells, as well as soluble “come-get-me” signals secreted by preys. At least seven engulfment genes in *Caenorhabditis elegans* (they have homologues in mammals) constitute two parallel but partially overlapped signaling pathways to induce the engulfment of apoptotic cells by a conserved “tether and tickle” mechanism akin to macropinocytosis. However, the mechanism probably varies with the apoptotic cells and phagocytes types, even with the age of corpses.

Key words phagocytes; apoptotic cells; engulfment; signaling pathways

Received: January 13, 2005 Accepted: February 18, 2005

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2004AA2Z1020) and National Natural Science Foundation of China (No.30471312)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68250793, Fax: 86-23-68251128, E-mail: pmh@swau.cq.cn