

综述

凋亡细胞的吞噬清除

张士瑾, 王丽霞

(中国海洋大学海洋生物系, 海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛 266003)

摘要: 吞噬清除是后生动物大多数凋亡细胞的共同命运。凋亡细胞如果不被有效及时清除, 它们就会发生次级的细胞坏死, 细胞核膜和细胞核裂解, 细胞解体, 释放出有毒内容物, 导致严重炎症和狼疮样自身免疫疾病的发生。据估计人体内每天有上亿个细胞凋亡而死, 但用组化方法只能检测到极少数凋亡细胞, 说明人体对凋亡细胞清除效率很高。新近, 对凋亡细胞吞噬清除分子机制的研究取得长足进展。本文主要就吞噬信号及其识别、传导和凋亡细胞的吞噬作简要概述。

关键词: 凋亡细胞; 吞噬清除; “噬我”信号; 信号识别; 信号传导

中图分类号: Q255

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2010)11-067-04

1 细胞凋亡与吞噬作用

细胞死亡分细胞凋亡 (Apoptosis) 和细胞坏死 (Necrosis) 2 种。细胞凋亡也称细胞程序性死亡, 是细胞主动实施的、一般由生理或病理性因素引起的有序死亡。凋亡细胞主要表现是细胞体积缩小, 细胞质密度增加; 线粒体膜通透性改变, 释放细胞色素 C 到胞浆; 核质浓缩, 核膜核仁破碎, DNA 降解成为约 180~200 bp 片段 (可以通过凝胶电泳证明); 细胞膜有小泡状形成, 但胞膜结构仍然完整, 最终将凋亡细胞残骸分割包裹为几个凋亡小体。凋亡小体可迅速被周围吞噬细胞吞噬, 无有毒内容物外溢。因此, 细胞凋亡不引起周围组织的炎症反应^[1-2]。细胞坏死则是被动的、主要是由强烈理化或生物因素作用引起的细胞无序化死亡。细胞坏死主要表现为细胞胀大, 细胞膜破裂; 细胞核变化缓慢, DNA 降解不充分。坏死细胞有害内容物外溢, 产生自身抗原, 可以引起局部严重的炎症反应或者自身免疫病^[1,3-4]。

细胞凋亡可以维持有机体内环境稳定。动物生命过程中, 一些细胞不可避免发生结构和功能老化、衰老, 成为无用细胞, 即所谓“改变了的自我”。清除这些细胞有助于组织重塑、为组织行使功能除去障碍。细胞凋亡也在动物正常发育过程中发挥作用。蝌蚪变成青蛙的变态过程中尾部的消失伴随大量细胞凋亡; 哺乳动物指 (趾) 间蹼的消失、颚融合、视网膜发育以及免疫系统的正常发育也都有细胞凋亡参与。其他无用细胞或细胞组分如坏死细胞、红细胞形成时从红细胞前

体细胞排出的细胞核以及退化神经轴突的吞噬清除对动物的发育与健康也很重要^[2]。

无用细胞的清除通过吞噬作用而实现。所谓吞噬作用是细胞被其他细胞所吞食并消化的事件。具有吞噬能力的细胞叫吞噬细胞。哺乳动物体内吞噬细胞可以分成 2 类: “专业”吞噬细胞和“业余”吞噬细胞^[5-6]。“专业”吞噬细胞, 以巨噬细胞为代表, 专门吞噬无用细胞, 而“业余”吞噬细胞只有在需要时才执行吞噬功能, 大部分时间执行其他功能。果蝇体内也存在巨噬细胞和“业余”吞噬细胞 (如成虫盘细胞) 之分。相比之下, 线虫没有专门的吞噬细胞, 但体内有许多种细胞具有吞噬功能。凋亡细胞的吞噬清除在哺乳类、线虫和果蝇研究比较透彻。当吞噬细胞表面受体被靶细胞激活时, 就会诱发吞噬作用。在和靶细胞结合时, 吞噬细胞受体就向细胞内传递信号, 在多数情况下导致细胞骨架重组, 结果吞噬细胞膜延伸并包裹靶细胞, 称为 I 型吞噬作用。除此之外, 也存在另一种吞噬模式, 称为 II 型吞噬作用, 细胞膜并不延伸, 靶细胞好像是“陷入”到吞噬细胞中。吞噬方式由负责诱导吞噬作用的吞噬细胞受体决定; 受体不同, 吞噬方式也不同。I 型吞噬作用一般由免疫球蛋白 Fc 受体诱导, 而 II 型吞噬作用由补体受体诱导^[7]。

2 “噬我”信号 (Eat-me signal)

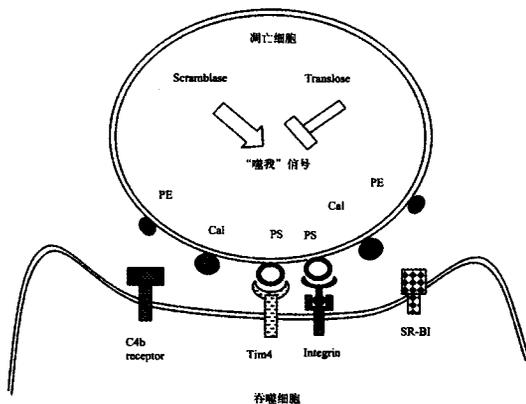
凋亡细胞和活细胞的正确区分是吞噬细胞实现吞噬清除的第一步。凋亡细胞表面发生变化, 出现多种分子, 能够吸引吞噬细胞与之结合。这些分子被统称

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972274) 资助

收稿日期: 2010-05-05; 修订日期: 2010-06-21

作者简介: 张士瑾 (1957-), 男, 教授, 博导。E-mail: sczhang@ouc.edu.cn

为凋亡细胞相关分子模式 (Apoptotic cell-associated molecular patterns; ACAMPs) 或“噬我”信号。吞噬细胞对凋亡细胞的选择性吞噬就是通过对 ACAMPs 或“噬我”信号的特异性识别而实现的。在诸多“噬我”信号分子中,一种称为磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine; PS) 的磷脂是研究比较透彻的一个^[8-9]。活细胞细胞膜脂质双层脂分子维持不对称分布:几乎所有含有末端氨基的磷脂如磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine; PE) 和 PS 都分布在细胞膜脂质双层内层,而另一些磷脂如磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine; PC) 主要分布在脂质双层外层。细胞膜脂质双层磷脂这种不对称分布由 ATP 依赖型氨基磷脂移位酶 (Aminophospholipid translocase) 和倒换酶 (scramblase) 活性平衡维持。凋亡细胞时,维持磷脂在内层和外层之间交换的移位酶和倒换酶活性平衡被改变,导致内、外层磷脂不对称分布被破坏,翻转增加。结果,主要分布于细胞膜磷脂双层膜内层的 PS 被转运到细胞膜外层,出现在凋亡细胞表面 (见图 1)。还有证据表明,PS 脂酰基氧化是 PS 外表化和作为凋亡信号被识别的先决条件。



(凋亡细胞表面标志分子:PS,磷脂酰丝氨酸;PE,磷脂酰乙醇胺;PC,磷脂酰胆碱;Cal,钙网蛋白。吞噬细胞表面受体:Tim4; Integrin; C4b receptor; SR-BI。Molecules on the apoptotic cells: PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; Cal, calreticulin. Receptors on phagocytes: Tim4; Integrin; C4b receptor; SR-BI.)

图 1 吞噬细胞识别凋亡细胞示意图

Fig. 1 Phagocytes recognize apoptotic cells

就系统演化而言,凋亡细胞 PS 由磷脂双层膜内层转移到外层可能相当保守。在老鼠、鸡和果蝇中都已经观察到类似现象。在线虫中,发现编码磷脂倒换酶 SCRM-1 基因失活会导致凋亡的生殖细胞表面 PS 减少,随后吞噬细胞对其吞噬作用下降^[7]。另外,异位表达的 MFG-8(老鼠分泌型 PS 结合蛋白)-GFP 融合蛋白可以通过把细胞表面隔离起来,避免被吞噬细胞识别而干扰吞噬作用^[9]。

活细胞中局限于细胞膜内层的任何磷脂在凋亡时

被转运到外层都可能作为标志分子标记凋亡细胞。除 PS 之外,尚不清楚细胞凋亡时外表化的 PE 是否也起“噬我”信号作用。另外,既有表面分子分布变化也可能导致“噬我”信号形成^[11]。膜蛋白 CD43 和内质网分子伴侣钙网蛋白 (Calreticulin) 在细胞凋亡时形成表面聚集体。钙网蛋白最近被认为是另一种普遍的“噬我”信号,可以和吞噬细胞结合,诱导多种凋亡细胞的吞噬。钙网蛋白水平在多种凋亡细胞表面增加,并且呈块状分布。

需要指出的是细胞凋亡在“噬我”信号形成时,抑制吞噬的信号必须同时消除^[6,12-13]。各种血细胞和内皮细胞都表达膜蛋白 CD31 或 PECAM-1(血小板内皮细胞黏连分子 1),它们具有细胞黏连分子功能。当巨噬细胞和活细胞结合时,2 种细胞间发生 CD31 同质结合,在活细胞内激活包含酪氨酸残基磷酸化的信号通路。结果,巨噬细胞受到活细胞排斥,吞噬作用不会发生。然而,细胞凋亡时 CD31 发生质和量双重变化,因此无法再传导排斥信号,因而被巨噬细胞牢固结合。还有一个参与吞噬抑制的膜蛋白是 CD47 即整连素相关蛋白,它在各种细胞表达。当活细胞表面 CD47 和吞噬细胞表面叫 SHPS(或 SIRP)受体结合时,抑制性信号传导途径被激活,从而阻止吞噬作用。细胞凋亡可以导致 CD47 活性降低,从而使抑制信号发生逆转。

3 凋亡细胞的识别与传导

包括凋亡细胞在内的大于 $2 \mu\text{m}$ 颗粒的吞噬需要吞噬细胞表面数个受体协同作用。吞噬细胞对凋亡细胞的特异性识别通过受体-配体互作完成。吞噬细胞受体可以直接和凋亡细胞配体结合,也可以通过在配体和受体之间形成“桥”的连接分子如调理素与凋亡细胞上特定的“噬我”信号分子间接结合。哺乳类吞噬细胞存在数种锚定于细胞膜上的 PS 受体 (PS receptors; PSRs),包括精巢支持细胞上 B 类清道夫 I 型受体 (SR-BI)、内皮细胞凝集素样氧化低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1)、整连素和 Mer 受体酪氨酸激酶。这些受体需要通过连接分子而被吸引向 PS 并与之结合^[8-9]。例如,整连素和 Mer 受体酪氨酸激酶可以通过与连接分子分泌型 PS-结合蛋白 MFG-E8 和 Gas6(生长抑制特异性蛋白 6)连接而识别凋亡细胞,包围在凋亡细胞表面 (见图 1)。哺乳类吞噬细胞也可能存在能够与 PS 直接结合的 PSRs。例如,新近发现 Tim4(T 细胞含免疫球蛋白和黏蛋白结构域分子)和 BAI1(脑特异性血管形成抑制因子 1),可能还有 Tim1,都可以直接结合 PS,作为凋亡细胞吞噬受体发挥作用。Tim4 的免疫球蛋白胞外结构域 (IgV) 是 1 种 1 型跨膜蛋白,可以直接和凋亡细胞表面及其 PS 结合 (见图 1)。BAI1 是 1 个

7 次跨膜蛋白,属于黏附型 G 蛋白偶联受体家族成员。BAI1 胞外结构域包含 5 个随机拷贝的血小板反应蛋白 1 型重复(TSRs),可以和 PS 特异性作用。在吞噬性成纤维细胞稳定表达 Tim4 或 BAI1 其中 1 个,就可以促进这些细胞特异性吞噬凋亡细胞,说明 Tim4 和 BAI1 可以识别凋亡细胞表面的“噬我”信号 PS,并启动吞噬作用。注射 Tim4 单克隆抗体 Kat5-18 到老鼠腹腔可以降低巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬效率,导致自身免疫病的发生,表明 Tim4 可以在体内行使功能,保证有效吞噬凋亡细胞。老鼠 Tim 家族具有 8 个成员(Tim1-8)。Tim1 和 Tim4 一样,在成纤维细胞中表达时也可以和 PS 特异性互作,促进对凋亡细胞吞噬。来自 Tim4 的可溶性 TSRs 在体内和体外都可以抑制巨噬细胞对凋亡胸腺细胞的吞噬。不仅如此,通过小片段干扰 RNA 将原代培养的老鼠星型胶质细胞 BAI1 沉默可以降低吞噬效率^[10]。

有趣的是自然界某些病原体可以通过“凋亡模拟”把 PS 暴露于细胞表面,逃避免疫细胞的识别和监控。例如,利什曼虫感染就是以类似凋亡细胞吞噬的方式发生。利什曼虫通过 ATP 依赖型氨基磷脂移位酶把 PS 暴露于细胞表面,使其能顺利进入吞噬细胞复制而不会产生炎症反应,从而避免被杀死的命运并感染宿主细胞^[14]。

起始 PS-PSR 直接结合或经连接分子介导的间接结合而诱发的吞噬信号传导途径,还不完全清楚。目前,有 2 条部分重叠的吞噬信号传导途径已经在线虫吞噬细胞中得以鉴定^[7]。它们分别是 CED1,6,7 途径和 CED2,5,10 和 12 途径。CED7 蛋白是 1 种 ABC 转运蛋白,为凋亡细胞和吞噬细胞两者所共有,因此,其作用可能是促进“噬我”信号的表达与识别。2 条吞噬信号传导途径中的其余蛋白被认为只在吞噬细胞中发挥作用。这 2 条途径可能具有保守性,因为参与其中的信号调节分子在果蝇和哺乳类存在同源蛋白。果蝇和哺乳类的 CED1、6 同源蛋白基因分别是 Draper (Drpr)和 CED6 以及 CD91(或 MEGF10)和 GULP;果蝇和哺乳类的 CED2、5、10、12 同源蛋白分别是 Crk、MBC (Myoblast city)、Rac1、CED12 以及 CrkII、DOCK180、Rac、ELMO。新近发现,Wnt 信号通路也可能参与凋亡细胞的吞噬清除,因为线虫 Wnt 受体 MOM-5(哺乳类 Frizzled)可作为吞噬受体发挥作用^[15]。

4 凋亡细胞的吞噬及其生理意义

凋亡细胞遗骸的吞噬和入侵病原体的吞噬途径两者高度相似。当凋亡细胞或凋亡小体被吞噬细胞识别并结合以后,被后者内吞进去,形成吞噬体(Phago-

some),也就是被吞噬细胞的细胞膜所包裹起来,最后被彻底降解。吞噬细胞吞噬凋亡细胞时,细胞骨架发生重组,并伴随着吞噬杯表面积的增加细胞膜发生大量转运。凋亡细胞被吞进吞噬细胞后,吞噬细胞内胞质颗粒和囊泡环绕吞噬体并与之融合,把内含物释放到凋亡细胞四周腔隙内。胞质颗粒和囊泡含有各种水解酶如蛋白酶、核酸酶、磷酸酶、酯酶和脂肪酶以及溶菌酶、抗菌肽,可以迅速分解凋亡细胞及其内容物。新近研究表明,小分子 GTP 酶 Rab5 参与调节吞噬泡和内体融合,Rab7 参与调节溶酶体和内体融合^[16-17]。另外,胞内蛋白质分选复合体 retromer 可以被募集到吞噬泡表面,直接和吞噬细胞受体 CED-1 相互作用,调节凋亡细胞的吞噬清除^[18]。

凋亡细胞吞噬清除的首要作用是避免正在死亡的细胞里面的物质渗漏出来。当凋亡细胞不能及时清除时,它们最后将成为坏死细胞。坏死细胞细胞膜通透性增加,包括有毒物质和自身抗原的内容物就会渗漏出来。前者可以破坏周围组织,诱发炎症,后者可以导致自身免疫病发生。抑制小鼠吞噬作用可以导致炎症和自身抗体产生,就是这个原因。可见,对凋亡细胞的吞噬是有机体保护自身免受死亡细胞破坏的一种被动方式^[6-7,10]。

凋亡细胞的吞噬可以主动维持组织平衡。凋亡细胞的吞噬必然引起吞噬细胞内蛋白质组成的变化,而这种变化大部分发生在转录水平。1 个典型例子是吞噬细胞吞噬凋亡细胞时产生的炎症细胞因子和抗炎细胞因子平衡的改变;炎症因子如 IL-8 表达降低,而抗炎细胞因子如 TGF- β 表达增加。因此,吞噬细胞可以通过直接清除炎症物质和产生抗炎物质 2 种方式抑制炎症。不过,尚不了解凋亡细胞的吞噬到底是如何引起编码炎症相关细胞因子基因转录水平改变的机制。吞噬作用受体好像可以传递 2 种不同信号,一种是诱导吞噬作用,另一种是激活调节细胞因子表达的转录因子^[6-7,10]。

5 结语

俄罗斯免疫学家 Elie Metchnikoff 于 1895 年首次发现吞噬作用,并把细胞免疫与细胞“吞食”其他细胞联系起来。他认为吞噬细胞是包括人在内多数动物预防急性感染的第一道防线。吞噬作用不但在病原引起的炎症反应中而且在对凋亡细胞的抗炎反应中都发挥关键作用。近年来,参与凋亡细胞识别与吞噬的分子已经得到鉴定;如果这些分子受到干扰,就可能诱发炎症和自身免疫病。正确理解这些分子特别是 PS 的生理和病理作用,对于探索凋亡细胞吞噬信号传导以及研发新型抗炎和抗癌药物都很重要。

参考文献:

- [1] Wyllie A H, Kerr J F R, Currie A R. Cell death: The significance of apoptosis [J]. *Int Rev Cytol*, 1980, 68: 251-306.
- [2] Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death [J]. *Nature*, 2000, 407: 784-788.
- [3] Albert M L. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation [J]? *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 403-416.
- [4] Henson P M, Bratton D L, Fadok A V. Apoptotic cell removal [J]. *Curr Biol*, 2001, 11: 264-275.
- [5] Clarke P G H, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena [J]. *Anat Embryol*, 1996, 193: 81-99.
- [6] Nakanishi Y, Henson P M, Shiratsuchi A. Pattern recognition in phagocytotic clearance of altered self. Target pattern recognition in innate immunity [M]. London: Landes Bioscience and Springer Science, 2009:129-138.
- [7] Fullard J F, Kate A, Baker N E. Clearance of apoptotic corpses [J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 1029-1037.
- [8] Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases [J]. *Science*, 1998, 282: 1717-1721.
- [9] Wu Y, Tibrewal N, Birge R B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: A review to a kill [J]. *Trends in Cell Biology*, 2006, 16: 189-197.
- [10] Zhou Z. New phosphatidylserine receptors: Clearance of apoptotic cells and more [J]. *Dev Cell*, 2007, 13: 759-760.
- [11] Gardai S J, McPhillips K A, Frasch S C, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte [J]. *Cell*, 2005, 123: 321-334.
- [12] Brown S, Heinisch I, Ross E, et al. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment [J]. *Nature*, 2002, 418: 200-203.
- [13] Oldenborg P A, Gresham H D, Lindberg P F. CD47-signal regulatory protein α (SIRP α) regulates Fc γ and complement receptor-mediated phagocytosis [J]. *J Exp Med*, 2001, 193: 855-861.
- [14] de Freitas Balanco J R, Moreira M E, Bonomo A, et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity [J]. *Curr Biol*, 2001, 11: 1870-1873.
- [15] Cabello J, Neukomm L J, G nesdogan U, et al. The wnt pathway controls cell death engulfment, spindle orientation, and migration through CED-1/Rac [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(2): e1000927.
- [16] Kinchen J M, Ravichandran K S. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells [J]. *Nature*, 2010, 464: 778-782.
- [17] Kinchen J K, Doukometzidis K, Almendinger J, et al. A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 556-566.
- [18] Chen D, Xiao H, Zhang K, et al. Retromer is required for apoptotic cell clearance by phagocytic receptor recycling [J]. *Sci*, 2010, 327: 1261-1264.

Phagocytotic Clearance of Apoptotic Cells

ZHANG Shi-Cui, WANG Li-Xia

(Department of Marine Biology, Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Phagocytotic removal is a common fate for the large number of cells undergoing apoptosis in metazoans. When apoptotic cells are not promptly phagocytosed, they eventually become necrotic; probability of the plasma membrane increases, and cell contents including harmful materials such as hydrolysed chromatin start to leak out, often resulting in the development of diseases such as inflammation and autoimmunity. It is estimated that as many as 10 billion of cells die by apoptosis each day in our body, yet only a small number of apoptotic cells are detected histochemically, suggesting the high efficiency of the removal process. Recently, a great progress has been made on molecular mechanisms of phagocytotic clearance of apoptotic cells, which is briefly discussed in this review.

Key words: apoptotic cells; phagocytotic clearance; eat-me signal; signal recognition; signal transduction

责任编辑 于 卫