



铝佐剂被巨噬细胞吞噬后的线粒体事件： 进展与思考

黄丽婷¹⁾ 梁桂兆²⁾ 吕凤林^{1,2)*}

(¹⁾ 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030; ²⁾ 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400030)

摘要 氢氧化铝作为疫苗佐剂被广泛运用的重要原因是能够被抗原提呈细胞 (antigen-presenting cells, APC) 如树突状细胞 (dendritic cells, DC)、巨噬细胞 (macrophages, M ϕ) 识别、吞噬, 并增强其提呈抗原的能力, 实现有效免疫应答. APC 吞噬受铝佐剂辅佐的抗原后将激活溶酶体、线粒体等细胞器, 其中线粒体表现尤为明显: 如线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mROS)、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi_m$) 及线粒体糖脂代谢等会发生一系列变化. 我们也发现了巨噬细胞可以快速吞噬铝佐剂辅佐的抗原, 并快速激活机体免疫应答. 那么, 发生“快吞噬、快激活”的物质基础应该需要更多的能量支撑, 为此我们推测线粒体的生物学行为会更加活跃, 在实现免疫应答后也许对 M ϕ 造成“大伤害”. 本文将对该现象做一综述并引出关于下一步需要解决的问题的思考.

关键词 铝佐剂, 巨噬细胞, 线粒体, ATP, 纳米颗粒

中图分类号 Q5, Q7, R392

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0201

佐剂在提高疫苗的免疫原性中至关重要, 它不仅能够辅助抗原的免疫应答, 还能够改变免疫应答的强度和类型. 佐剂主要包括抗原传递系统佐剂 (如常见的弗氏佐剂、脂质体等)、铝盐佐剂、微生物来源的佐剂、细胞因子佐剂、天然来源的佐剂以及某些化学物质^[1]. 其中, 铝佐剂由于其高安全性、低成本、可与多种抗原相互作用的优点, 是迄今为止使用最广泛的人用疫苗佐剂^[2]. 但是, 铝佐剂发挥优势的具体作用机制尚不明确, 可能的作用机制主要有: 抗原储存作用、提高机体天然免疫应答、促进吞噬作用以增强抗原递呈, 增强辅助性 T 细胞 2 (T helper cells 2, Th2) 介导的获得性免疫应答, 激活 B 细胞诱导抗体产生, 激活补体作用并诱导趋化因子释放, 直接或间接激活树突状细胞等^[3-4]. 尽管这些机制已有较为深入的研究, 也有相关实验证据的充分支持, 但是仍然存在诸多矛盾之处. 比如, 抗原储存作用不能完全解释铝佐剂增强免疫刺激的机制, 因为破伤风类毒素、鸡卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 等抗原都能直接从铝佐剂表面释放到组织液.

巨噬细胞是免疫系统的重要组成部分, 它可分为经典活化 M1 和选择性活化 M2 的巨噬细胞, 其在炎症反应过程中分泌不同的细胞因子、趋化因子等, 然后间接或直接地参与各种炎症性疾病的反应过程^[5]. M1 型巨噬细胞能产生高水平的促炎性细胞因子, 促进 Th1 细胞反应; M2 型巨噬细胞则表现出抗炎功能, 具有控制组织损伤修复和重塑的功能. M1 型巨噬细胞是通过快速供能的无氧糖酵解途径获取能量以清除入侵机体的微生物, 其三羧酸 (TCA) 循环在两个点中断: 一是异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 催化的反应; 二是琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 催化的反应; 而 M2 型巨噬细胞则依靠线粒体中的氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 来获取自身所需的腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP), 其糖酵解水平较低, 并表现出完整的 TCA 循环^[6-8], 然而糖酵解与 OXPHOS

* 通讯联系人.

Tel: 023-65102507, E-mail: lyufenglin@cqu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-30, 接受日期: 2020-11-20

在M1型巨噬细胞和M2型巨噬细胞中的具体差异还有待研究. 另外, 脂代谢也同样影响着巨噬细胞的活化^[9]. 显而易见, 糖脂代谢的差异会使巨噬细胞相应的功能受到影响.

铝佐剂辅佐的抗原注入机体后, 被巨噬细胞迅速吞噬, 后者分化为成熟的巨噬细胞, 具有更强的呈递给辅助性T细胞的能力, 也就是说, 巨噬细胞对铝佐剂敏感^[10-11]. 巨噬细胞吞噬铝佐剂后, 巨噬细胞的存活会增加, 表现为DNA合成的增加以及对外来刺激物的协同应答作用的增强^[12], 有利于免疫应答. 同时, 维持巨噬细胞的吞噬能力、增殖活力都需要以葡萄糖为主要来源的ATP, 而巨噬细胞主要依赖线粒体内的底物水平磷酸化和OXPHOS获取ATP. 越来越多的证据发现, 线粒体参与了炎症调节^[13-14]以及免疫功能^[15]的维持. 然而, 巨噬细胞在迅速吞噬铝佐剂的过程中, 线粒体的变化机制却并不清楚, 有报道称线粒体还参与了细胞损伤^[16]. 结合我们在巨噬细胞中观察到解偶联蛋白2 (uncoupling protein 2, UCP2) 的表达出现明显变化, 本文从线粒体角度综述巨噬细胞快速吞噬铝佐剂后线粒体活性氧 (mROS)、线粒体内外膜电位 ($\Delta\psi_m$) 及线粒体糖脂代谢等的变化, 推测巨噬细胞吞噬铝佐剂后可能的能量支撑机制.

1 佐剂及ATP可以刺激巨噬细胞产生活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)

ROS是由分子氧在还原时产生的单电子还原产物, 在此过程中, 活化的NADPH氧化酶可以催化将电子从NADPH转移到分子氧, 并产生超氧阴离子 O_2^- , 随后 O_2^- 通过多次歧化转化为其他ROS, 如 H_2O_2 、 $\bullet OH$ ^[17]. 巨噬细胞表面的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PPR) 识别病原体, 诱发天然免疫, 并且激活获得性免疫. 病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 和损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 以mROS依赖性方式激活炎性小体NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3, NLRP3)^[13], 说明ROS也是重要的炎性小体激活信号.

当巨噬细胞与铝佐剂共培养后, 线粒体总数不变, 但线粒体脱氢酶活性却增加, 即单个线粒体活性增加了^[18]. 线粒体呼吸过程中能够产生ROS, 铝佐剂也能明显增加ROS的生成^[18], 其具体机制有待探索. Gan^[19]发现表面活性素 (surfactin) 作

为一种非病原体相关分子模式, 可以通过多种信号通路调节天然免疫, 包括以ROS作为第二信使, 激活MAPKs信号通路, 随之激活核转录因子NF- κB , 同时, ROS也可以激活NLRP3炎性小体. 乳化性佐剂则可以通过改变巨噬细胞膜的通透性和流动性来改变巨噬细胞对抗原的吞噬能力^[20], 在吞噬过程中, H_2O_2 和 O_2^- 等ROS再通过影响TLR4 (Toll-like receptor 4) 来调节NF- κB 依赖性转录, 而NF- κB 的过表达可以增强APC的抗原提呈能力并增加免疫应答^[21]. 铝佐剂与CpG ODNs (CpG oligodeoxynucleotides) 混合会诱导强Th1反应, 不仅通过与TLR9 (Toll-like receptor 9) 的相互作用来增强免疫应答^[22], 还可以通过促进细胞凋亡和循环血细胞的再生, 增强吞噬活性和ROS水平来加强免疫保护^[23]. 由此推测, 巨噬细胞吞噬铝佐剂后, ROS作为一种中间产物, 将线粒体代谢过程同NF- κB 以及炎性小体的激活串联起来了 (图1).

除此之外, ATP处理巨噬细胞后也会产生ROS, 从而刺激磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K) 途径并随后激活Akt和ERK1/2通路^[24-25]. 同时, ATP介导的ROS依赖性PI3K激活也参与了含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny l aspartate specific proteinase 1, Caspase 1) 的激活以及白介素1 β (interleukin 1beta, IL-1 β) 和IL-18的加工, 但ROS激活免疫应答的通路还有待验证. 换言之, 活化的巨噬细胞的能量来源并不排除胞外ATP.

2 巨噬细胞通过P2X7受体维持线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 及ATP水平稳定

线粒体膜电位是由ETC复合物I (electron transport complex I, CI)、III (CIII) 和IV (CIV) 将质子从线粒体基质转运到膜内而建立的, 被认为是线粒体功能的关键指标, 其异常提示线粒体功能障碍^[26]. $\Delta\psi_m$ 的调节可能会降低细胞ATP的生物合成, 从而降低巨噬细胞的趋化活性^[27]. 一氧化碳可以通过抑制肺泡巨噬细胞中介导线粒体裂变的Fis1蛋白表达, 导致线粒体膜电位增加、线粒体形态改变, 减轻了脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的氧化应激损伤^[28]. 钙通道中 Ca^{2+} 的增加会触发线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPT) 的形成^[29], 炎性小体激活Caspase-1可以促进线粒体分解产生ROS^[30], 这些都会导致线粒体

膜电位消失,影响线粒体功能.丧失功能的线粒体,ATP迅速消失,溶酶体也会失稳,引起巨噬细胞坏死^[29].

热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60)参与线粒体跨膜电位的维持和抑制caspase-3的激活,TLR4以及髓样分化因子88(myeloid different factory 88, MyD88)在此过程中也发挥着重要作用^[31].活化的巨噬细胞会分泌IL-1 α 、IL-1 β 和IL-18等促炎性细胞因子,而IL-1 α 、IL-1 β 和IL-18信号传导也需要MyD88^[32-33].但有学者发现,TLR信号传导对铝佐剂的免疫增强作用有限,铝佐剂的作用并不依赖于MyD88^[34],换句话说,IL-1 α 、IL-1 β 和IL-18等细胞因子和MyD88在铝佐剂免疫刺激中的作用并不明确.

P2受体家族可与ATP、UTP等核苷酸特异性结合,其中P2X7受体(P2X7 receptor, P2X7R)是单核细胞和巨噬细胞表达的ATP门控通道,可参与一系列炎症反应,对ATP敏感的巨噬细胞正是因为该受体促进了缝隙连接通道的形成^[35-37].ATP可以通过该受体,并通过钾(K⁺)外排进而诱导NLRP3活化(图1).作为NLRP3的触发物,铝佐剂正是通过K⁺外排来破坏细胞膜,从而激活NLRP3^[38].有学者发现,受损或垂死的细胞会释放ATP、DNA、尿酸等信使分子,随之通过P2U和P2Y受体引起Ca²⁺升高^[39],P2X7受体也会影响尿酸、Si²⁺和Al³⁺诱导巨噬细胞ATP主动释放至胞外的过程^[40].同时,线粒体超微结构影响Ca²⁺稳态及ATP的生成^[41].另外,死亡细胞释放的DNA也可以作为刺激信号^[42].铝佐剂可以通过降低胞外核苷酸酶的水解速率来增强胞外ATP的活性^[43-44].但也有学者发现铝佐剂注射部位肌肉细胞的ATP释放并不会增强^[45].

3 糖脂代谢产生ATP参与吞噬过程

3.1 糖酵解

1分子葡萄糖通过OXPHOS途径产生约30ATP,而通过糖酵解途径产生2ATP,尽管糖酵解对葡萄糖的利用率不及OXPHOS,且主要发生在细胞基质,但是糖酵解与TCA、OXPHOS的关系密不可分.同时,干扰素调节因子5就可以通过刺激Akt信号来增强巨噬细胞的糖酵解水平和缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达,激活编码葡萄糖转运蛋白、糖酵解酶基因的转录^[46],促进炎性细胞因子的分泌,使其向M1型

巨噬细胞极化^[47].由此说明,M1型巨噬细胞需要足够的ATP和中间体以实现其特定功能,主要通过糖酵解途径完成^[48].

有研究表明,LPS活化的巨噬细胞会诱导丙酮酸激酶同工酶M2(PKM2)的表达,而PKM2正是增强糖酵解的关键分子.它在糖酵解过程中将磷酸烯醇丙酮酸和ADP催化生成丙酮酸和ATP,是糖酵解过程的限速酶.它也会与己糖激酶形成复合体,使葡萄糖经糖酵解生成乳酸和能量的过程更加迅速^[49].PKM2还可以通过其他多种机制与HIF-1 α 相互作用,并促进编码上述糖酵解酶和炎性因子(如IL-1 β)基因的表达.同时,抑制HIF-1 α 的表达也会使巨噬细胞从M1型变为M2型,也会对ATP的产生有直接影响^[50-51].

有研究发现,NLRP3激活期间,巨噬细胞中己糖激酶1的表达增加^[52].己糖激酶1表达增加意味着葡萄糖的利用和糖酵解代谢物会迅速增加.雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR,分为mTORC1和mTORC2)是代谢重编程的重要调节剂,其激活状态对细胞内和细胞外信号高度敏感,如活化DC中ROS可进一步激活Akt/mTOR途径,糖酵解随之增强从而实现最佳的T细胞增殖^[53].另外,mTORC1调节巨噬细胞中依赖己糖激酶1的糖酵解途径,后者正是NLRP3激活的关键代谢途径^[54],HIF-1 α 也会影响mTORC1下游的糖酵解途径(图1)^[55].但是铝佐剂会抑制DC中ROS的产生,并阻断mTOR信号传导^[53].因此,ROS/Akt/mTOR途径可能不适用于铝佐剂,当然,也不能否定该途径在巨噬细胞中对铝佐剂作用的影响.

3.2 三羧酸循环

TCA循环对于维持细胞生物能至关重要,该循环会产生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),为控制OXPHOS及ATP产生的电子传输链提供燃料.OXPHOS是通过消耗氧气(即呼吸)来制造ATP的过程,是动物细胞中ATP的主要来源.它由5种多聚酶复合物(CI~CV)借助电子载体(泛醌和细胞色素c)和电子供体(NADH和FADH₂)来完成,其中复合物CI至CIV构成呼吸链,在整个线粒体内膜上形成H⁺梯度,而该梯度具有两个成分——线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)和pH梯度(ΔpH)^[56].M1型巨噬细胞的TCA循环在两个点中断:一是异柠檬酸脱氢酶(IDH)催化的反应,导致柠檬酸的积累;二是琥珀酸脱氢酶(SDH)催

化的反应, 激活 HIF-1 α , 诱导炎症基因的表达. M2 型巨噬细胞则与 M1 型相反, 其 OXPHOS 水平更高, 有完整的 TCA 循环, 表现出抗炎功能^[6-8].

免疫应答基因 1 蛋白 (immune-responsive gene 1 protein, IRG1) 在 M1 型巨噬细胞中高表达, 并通过促进顺乌头酸脱羧而产生衣康酸 (itaconate)^[57]. 后者是 SDH 的抑制剂, 它可以通过抑制 SDH 来减轻线粒体的耗氧率以控制 M1 型巨噬细胞产生 mROS^[58], 达到过度炎症应答的负反馈调节. 同时, 它还具有亲电特性, 可以通过抑制 NF- κ B 的转录而降低促炎性细胞因子的表达, 并通过抑制 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 (Kelch-like ECH-associated protein, KEAP)、核因子 E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, NRF2) 的降解以降低氧化应激程度^[59-60]. 另有研究发现, IRG1 可以增强巨噬细胞 mROS 的活性, 并通过旁分泌的方式, 放大临近肿瘤细胞中的 MAPK 的活化^[61]. 以上表明, IRG1 在巨噬细胞中对 mROS 的作用尚存在争议, 但不可否认的是, 它们在控制巨噬细胞 mROS 的水平中发挥着重要作用, 巨噬细胞吞噬铝佐剂辅佐的抗原后是否有利于该细胞的提呈能力、应答能力还有待考证.

M1 型巨噬细胞中 IDH 低表达, 因此降低了 α 酮戊二酸 (α -KG) 的水平, α -KG 是脯氨酰羟化酶的辅因子, 后者抑制 I κ B 激酶 β (inhibitor kappa B kinase β , IKK β) 的激活^[62-63]; 另有研究发现, α -KG 的增加与 MyD88 参与的 TLR 信号转导共同激活 IL-1 受体相关激酶 (interleukin 1 receptor associated kinase, IRAK) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, TRAF6), 随之活化 IKK β ^[32]. 还有, α -KG 影响巨噬细胞的极化. α -KG/琥珀酸的高比率促进巨噬细胞向 M2 型极化, 而低比率则促进巨噬细胞向 M1 型极化, 表现出促炎性表型^[63]. 在处于稳态的巨噬细胞中, 琥珀酸的增加可以帮助维持 M1 型巨噬细胞中 HIF-1 α 的稳定, 后者与 ROS 密切相关; 它还可以促进 IL-1 β 细胞因子的产生, 后者与免疫应答有关. 另外, SDH 会催化琥珀酸的代谢, 也可以作为 ETC 中的复合物 CII, 成为 ROS 产生的关键因子 (图 2).

弗氏完全佐剂可以使巨噬细胞 TCA 循环中柠檬酸、琥珀酸和 α -KG 等主要中间体水平的降低, 而琥珀酸、 α -KG 影响巨噬细胞的极化, 与 HIF-1 α 的稳定密切相关^[64]. 关于 TCA 循环及 OXPHOS 在

巨噬细胞吞噬铝佐剂过程中的研究还不多, 但其中间代谢产物影响着 HIF-1 α 的稳定、ROS 的产生及 NF- κ B 通路 (图 1), 另外铝佐剂可引发炎症, 可见, 铝佐剂可通过 TCA 循环影响巨噬细胞的极化.

3.3 脂肪酸氧化

脂肪酸可以经过氧化进入 TCA 循环, 产生大量的 ATP, 但使用不同佐剂会激发不同的脂肪酸氧化能力. 佐剂系统 03 (adjuvant system 03, AS03) 是一种水包油佐剂, 在免疫小鼠引流淋巴结中引起脂质代谢相关基因快速而短暂的下调^[65], 并诱导局部和短暂的炎症反应. 同样的, 弗氏佐剂则会使脂质过氧化增加^[66], 使 ROS 氧化生物膜, 改变生物膜的结构和通透性. 然而, 使用铝佐剂时脂肪酸氧化水平的变化却未见报道. 在一项有关肥胖的研究中发现, 脂肪酸和其他脂质衍生物可以通过调节 NLRP3 的活性来影响代谢炎症过程^[67].

NLRP3 炎性小体的激活受到 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 介导的脂肪酸氧化程度的调控, 肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A (carnitine palmitoyl-transferase 1A, CPT1A) 是参与脂肪酸转运的关键酶, 当编码 NOX4 和 CPT1A 的基因缺失后, 炎性小体的激活丧失^[68]. 谷氨酰胺转运蛋白影响谷氨酰胺的摄取, 低量的谷氨酰胺会降低 mTORC1 活性, 同时还会间接上调 CPT1A 的表达, 进而介导脂肪酸氧化的升高, mTORC1 活性增强时, CPT1A 的表达又会下调, 影响脂肪酸氧化过程^[69] (图 1). 可见脂肪酸氧化的增强可以促进巨噬细胞向 M1 型极化, 使用铝佐剂后会引起局部炎症反应, 铝佐剂可能也参与了脂肪酸代谢.

4 讨 论

上述代谢途径相互关联, 不可分割. 比如 mTORC1 可以协调糖酵解和脂肪酸的合成, 柠檬酸既在 TCA 循环中充当底物又可以促进脂肪酸形成, 细胞的代谢重编程可以调节巨噬细胞的活化, 通常来说, 糖酵解驱动巨噬细胞炎性表型, OXPHOS 水平随之降低. 由于 OXPHOS 同 TCA 循环的偶联, 丙酮酸的乳酸通量会随着乙酰辅酶 A 水平的降低而增加, 糖酵解弥补了 TCA 循环链断裂而减少的 ATP 数量, 以确保 ATP 的快速生成, 保证炎性巨噬细胞的正常功能^[70]. 铝佐剂注入机体后, 往往会产生局部的炎症反应, 局部巨噬细胞会吞噬大量铝佐剂, 该过程与巨噬细胞炎性表型是密不可分的. 因此, M1 型巨噬细胞特殊的代谢方式

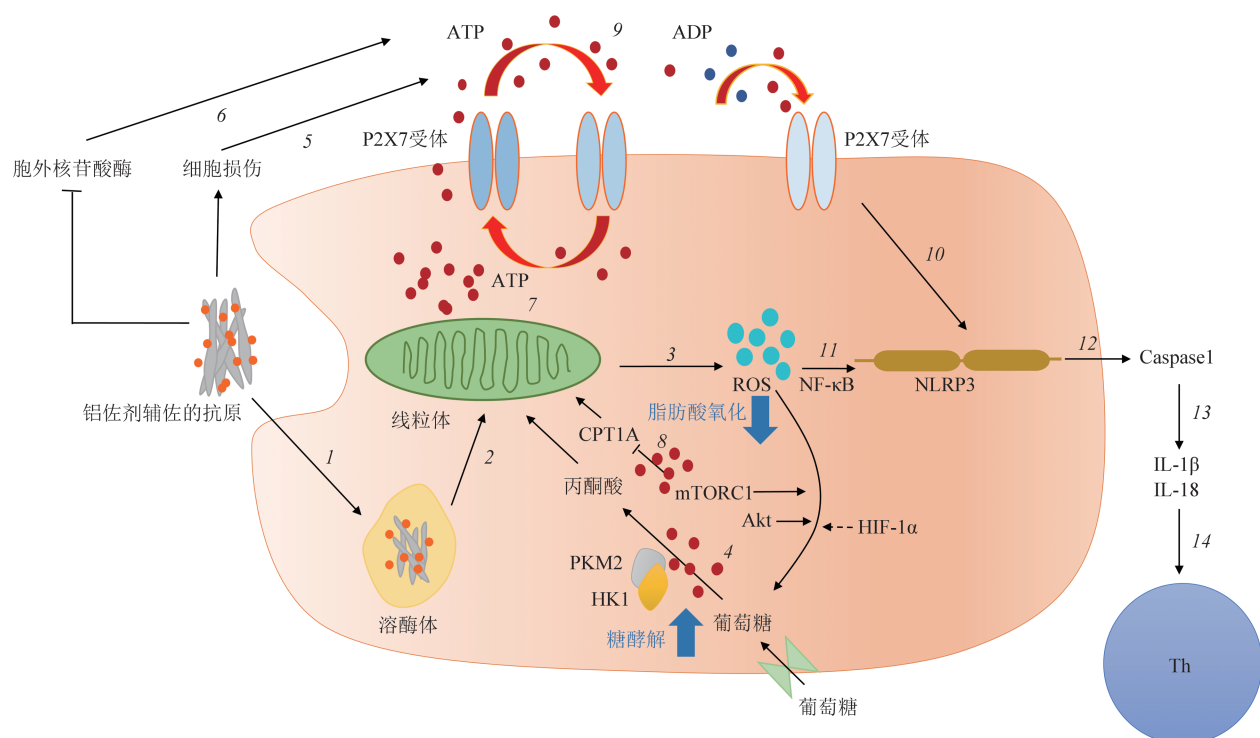


Fig. 1 The effect of antigen adjuvanted with aluminum adjuvants on macrophages: energy effect and signal pathway

图1 铝佐剂辅佐抗原在巨噬细胞中的效应：能量效应及信号通路

1: 铝佐剂（橙色，圆形）被巨噬细胞内化吞噬；2: 刺激线粒体；3: 线粒体释放出大量ROS（蓝色，圆形）；4: ROS通过Akt/mTORC1（Akt: 蛋白激酶B; mTORC1: 雷帕霉素靶蛋白）途径，增强HK1（己糖激酶1）、PKM2（丙酮酸激酶同工酶M2）复合体的活性，帮助实现最佳的糖酵解，产生大量ATP（红色，圆形）；5: 铝佐剂辅佐的抗原导致细胞损伤，ATP释放；6: 降低胞外核苷酸酶的水解速率来增强细胞外ATP的活性；7: 线粒体通过UCP2对TCA循环及糖酵解代谢产物（如丙酮酸）的调节产生大量ATP；8: mTORC1下调CPT1A（肉毒碱棕榈酰基转移酶1A）的表达，抑制脂肪酸氧化随之减少ATP的释放；9: ATP通过作用于G偶联蛋白嘌呤P2X7受体，维持胞内外ATP平衡；10: ATP通过细胞膜诱导NLRP3活化；11: ROS通过NF-κB激活NLRP3炎性小体；12: Caspase1的激活；13: IL-1β、IL-18的加工；14: Th细胞的分化。

可能是为了适应炎性微环境，还会导致线粒体代谢产物的积累，从而促进其免疫应答功能。

研究表明，尿酸、DNA、ATP和HSP70都参与了铝佐剂的免疫刺激，用铝佐剂孵育LPS活化的巨噬细胞可诱导前列腺素E2（prostaglandin E2, PGE2）的分泌，吞噬的氢氧化铝颗粒会破坏溶酶体，导致非受体型酪氨酸激酶（spleen tyrosine kinase, Syk）和p38 MAPK激酶通路的活化，从而导致PGE2的合成增加^[71]，不可否认的是，维持巨噬细胞的吞噬、增殖能力需要ATP，这主要依赖线粒体的底物水平磷酸化和OXPHOS获取ATP。

综上所述，巨噬细胞吞噬铝佐剂后，其ATP的主要来源除了糖酵解，还来自周围损伤细胞所释放的ATP，这些ATP通过P2X7受体、连接蛋白/泛神经毒素通道或其他连接通道^[40, 72]进出巨噬细

胞，以维持ATP平衡。另外，铝佐剂通过降低其胞外核苷酸酶的水解速率来增强细胞外ATP的数量^[43-44]，这也有利于巨噬细胞发挥功能（图1）。

我们在2001年就提出利用纳米铝佐剂制作多肽疫苗佐剂的设想^[73]，随后观察到乙肝疫苗表面抗原被纳米铝佐剂吸附后，在第7、14天均出现了明显的抗体应答，在狂犬疫苗中也发现了该现象^[74-75]，在铜绿假单胞菌苗抗原中也发现了早期应答现象^[76]。我们特别留意了巨噬细胞的表现，但未进一步涉及其机制。线粒体是高度活跃的细胞器，在巨噬细胞吞噬铝佐剂的过程中提供ATP作为能量供应。与此同时，我们在巨噬细胞中观察到了UCP2表达变化特别明显，LPS激活巨噬细胞后，UCP2又迅速下调，细胞对葡萄糖的使用却显著增加^[76]。UCP2与线粒体能量代谢密切相关，如

通过“质子漏 (proton leak)”作用,即质子不经过 ATP 合成酶的质子通道转移到膜内侧,而直接经过 UCP2 进入线粒体基质,使线粒体氧化磷酸化解偶联,影响ATP的合成^[77].UCP2不仅调节线粒体ATP的产生,还调节mROS的产生,而ROS被认为是重要的胞内第二信使^[78-79];UCP2可以通过调节MAPK信号途径和mROS来调控免疫细胞活化进而调控整个免疫系统功能,T细胞在活化后又

反过来增加线粒体的UCP2^[71].由此,我们推测,纳米铝佐剂所辅佐的抗原被巨噬细胞大量吞噬,被视为“危险信号”需要被快速加工、提呈,尽快实现“胞吐”,该过程需要更多ATP予以支持,线粒体的作用显得极为重要,通过下调UCP2,利于线粒体葡萄糖氧化,同时,可能帮助ATP合成酶以满足短时间内对大量吞噬抗原的加工、转运,最后快速提呈在细胞表面(图2).

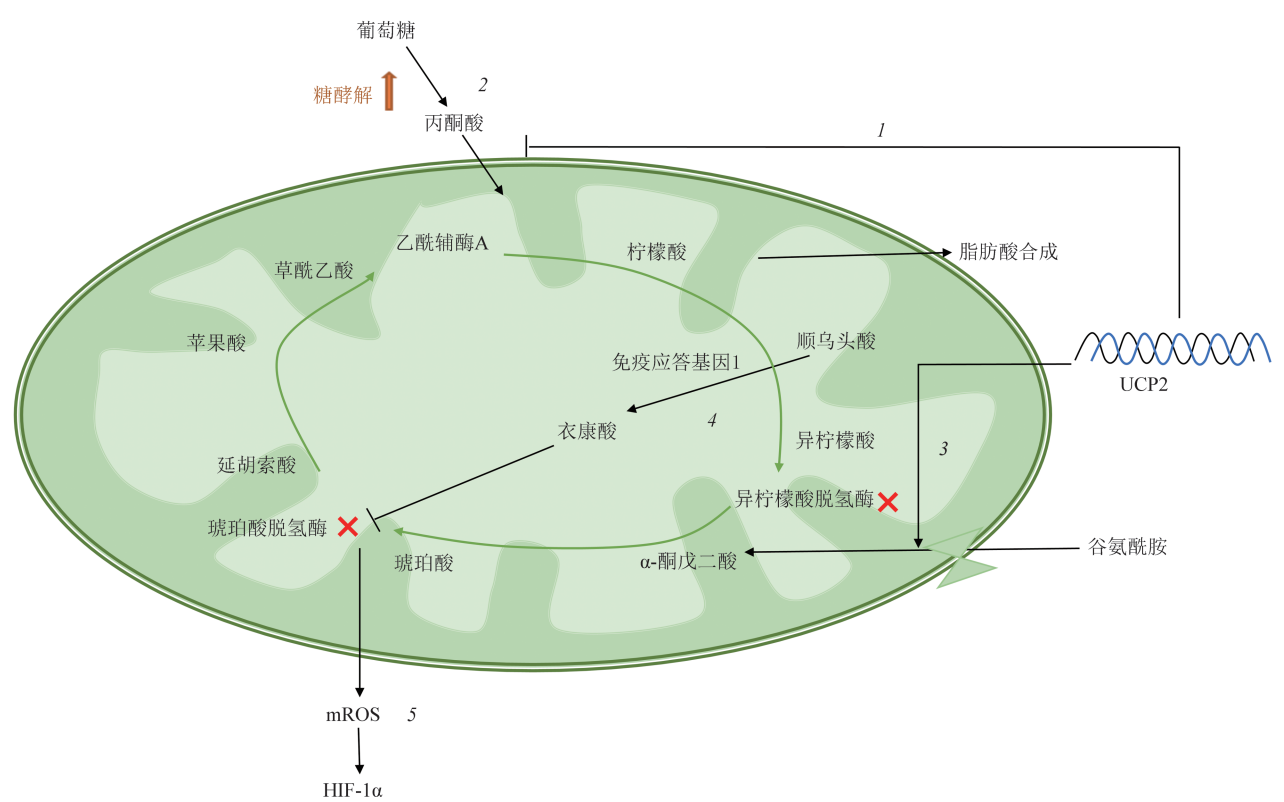


Fig. 2 The broken TCA cycle of mitochondria and the role of UCP2 in M1
图2 M1型巨噬细胞中线粒体断裂的TCA循环及UCP2的作用

巨噬细胞吞噬铝佐剂辅佐的抗原后,线粒体断裂的TCA循环及UCP2作用图解.1:UCP2表达水平改变;2:UCP2抑制糖酵解产物——丙酮酸的产生;3:UCP2帮助维持谷氨酰胺对TCA循环的补充;4:免疫应答基因1促进顺乌头酸脱羧而产生衣康酸;5:衣康酸调节mROS的产生,维持HIF-1α(缺氧诱导因子)的稳定,同时ROS和HIF-1α参与糖酵解水平的调节.

参 考 文 献

[1] 潘杭君,孙红祥.免疫佐剂的研究进展.中国兽药杂志,2004,38(1): 32-37
Pan H J,Sun H X. Chinese Journal of Veterinary Drug,2004,38(1): 32-37

[2] Gupta R K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998,32(3): 155-172

[3] Peng H, Yening Z, Zhongyu H. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. Human Vaccines &

Immunotherapeutics, 2015, 11(2): 477-488

[4] Hogenesch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. Vaccine, 2002, 20(Suppl 3): S34-S39

[5] 李丹,任亚娜,范华骅.巨噬细胞的分类及其调节性功能的差异.生命科学,2011,23(03): 249-254
Li D, Ren Y N, Fan H H. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(03): 249-254

[6] Rodriguez-Prados J-C, Traves P G, Cuenca J. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. The Journal of Immunology, 2010, 185(1): 605-614

- [7] Jha A K, Huang S C C, Sergushichev A, *et al.* Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, 2015, **42**(3): 419-430
- [8] O'Neill L A J. A broken krebs cycle in macrophages. *Immunity*, 2015, **42**(3): 393-394
- [9] Chandra P, He L, Zimmerman M, *et al.* Inhibition of fatty acid oxidation promotes macrophage control of mycobacterium tuberculosis. *mBio*, 2020, **11**(4): e01139-20
- [10] Rimaniol A-C, Gras G, Verdier F, *et al.* Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine*, 2004, **22**(23): 3127-3135
- [11] Shardlow E, Mold M, Exley C. The interaction of aluminium-based adjuvants with THP-1 macrophages *in vitro*: implications for cellular survival and systemic translocation. *J Inorg Biochem*, 2020, **203**: 110915
- [12] Hamilton J A, Byrne R, Whitty G. Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic proliferative response to GM-CSF and CSF-1. *J Leukoc Biol*, 2000, **67**(2): 226-232
- [13] Zhou R B, Yazdi A S, Menu P, *et al.* A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 2011, **469**(7329): 221-225
- [14] Wu L H, Chang H C, Ting P C, *et al.* Laminar shear stress promotes mitochondrial homeostasis in endothelial cells. *J Cell Physiol*, 2018, **233**(6): 5058-5069
- [15] Beadnell T C, Fain C, Vivian C J, *et al.* Mitochondrial genetics cooperate with nuclear genetics to selectively alter immune cell development/trafficking. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis*, 2020, **1866**(5): 1-10
- [16] Srivastava S. The mitochondrial basis of aging and age-related disorders. *Genes*, 2017, **8**(12): 398
- [17] Nguyen G T, Green E R, Mecsas J. Neutrophils to the ROScUE: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, **7**: 373
- [18] Ohlsson L, Exley C, Darabi A, *et al.* Aluminium based adjuvants and their effects on mitochondria and lysosomes of phagocytosing cells. *J Inorg Biochem*, 2013, **128**: 229-236
- [19] Gan P, Gao Z, Zhao X, *et al.* Surfactin inducing mitochondria-dependent ROS to activate MAPKs, NF- κ B and inflammasomes in macrophages for adjuvant activity. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 39303
- [20] Yang Y-W, Shen S-S. Enhanced antigen delivery *via* cell death induced by the vaccine adjuvants. *Vaccine*, 2007, **25**(45): 7763-7772
- [21] Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, *et al.* Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *Journal of Immunology*, 2004, **172**(4): 2522-2529
- [22] Davis H L, Weeranta R, Waldschmidt T J, *et al.* CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *Journal of Immunology*, 1998, **160**(2): 870-876
- [23] Sun R, Qiu L M, Yue F, *et al.* Hemocytic immune responses triggered by CpG ODNs in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, **34**(1): 38-45
- [24] Cruz C M, Rinna A, Forman H J, *et al.* ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*, 2007, **282**(5): 2871-2879
- [25] Kawamura H, Kawamura T, Kanda Y, *et al.* Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. *Immunology*, 2012, **136**(4): 448-458
- [26] Hussain S. Measurement of nanoparticle-induced mitochondrial membrane potential alterations. *Methods Mol Biol*, 2019, **1894**: 123-131
- [27] Wu G J, Tai Y T, Chen T L, *et al.* Propofol specifically inhibits mitochondrial membrane potential but not complex INADH dehydrogenase activity, thus reducing cellular ATP biosynthesis and migration of macrophages *Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1042**: 168-176
- [28] Shi J, Yu J B, Liu W, *et al.* Carbon monoxide alleviates lipopolysaccharide-induced oxidative stress injury through suppressing the expression of F1t in NR8383 cells. *Experimental Cell Research*, 2016, **349**(1): 162-167
- [29] Yang Y T T, Whiteman M, Gieseg S P. HOCl causes necrotic cell death in human monocyte derived macrophages through calcium dependent calpain activation. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res*, 2012, **1823**(2): 420-429
- [30] Yu J J, Nagasu H, Murakami T, *et al.* Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(43): 15514-15519
- [31] Cohen-Sfady M, Pevsner-Fischer M, Margalit R, *et al.* Heat shock protein 60, via MyD88 innate signaling, protects B cells from apoptosis, spontaneous and induced. *Journal of Immunology*, 2009, **183**(2): 890-896
- [32] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 2004, **4**(7): 499-511
- [33] Adachi O, Kawai T, Takeda K, *et al.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, 1998, **9**(1): 143-150
- [34] Gavin A L, Hoebe K, Duong B, *et al.* Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*, 2006, **314**(5807): 1936-1938
- [35] Solle M, Labasi J, Perregaux D G, *et al.* Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem*, 2001, **276**(1): 125-132
- [36] Fortes F S A, Pecora I L, Persechini P M, *et al.* Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. *J Cell Sci*, 2004, **117**(20): 4717-4726

- [37] 山丽梅, 赵艳玲, 金城, 等. 嘌呤 P2 受体的分子生物学研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, **21**(4): 293-296
Shan L M, Zhao Y L, Jin C, *et al.* Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2007, **21**(4): 293-296
- [38] Eisenbarth S C, Colegio O R, O'Connor W, *et al.* Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 2008, **453**(7198): 1122-1127
- [39] Oshimi Y, Miyazaki S, Oda S. ATP-induced Ca^{2+} response mediated by P-2U and P-2Y purinoceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages. *Immunology*, 1999, **98**(2): 220-227
- [40] Riteau N, Baron L, Villeret B, *et al.* ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis*, 2012, **3**(10): e403
- [41] 黄国敏, 王玉佩, 孙超, 等. 线粒体超微结构及其调控机制的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2019, **46**(12): 1141-1149
Huang G M, Wang Y P, Sun C, *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2019, **46**(12): 1141-1149
- [42] Marichal T, Ohata K, Bedoret D, *et al.* DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine*, 2011, **17**(8): 996-1002
- [43] Korchazhkina O, Wright G, Exley C. Action of Al-ATP on the isolated working rat heart. *J Inorg Biochem*, 1998, **69**(3): 153-158
- [44] Korchazhkina O, Wright G, Exley C. No effect of aluminium upon the hydrolysis of ATP in the coronary circulation of the isolated working rat heart. *J Inorg Biochem*, 1999, **76**(2): 121-126
- [45] Vono M, Taccone M, Caccin P, *et al.* The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(52): 21095-21100
- [46] Zhong H, De Marzo A M, Laughner E, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*, 1999, **59**(22): 5830-5835
- [47] Hedl M, Yan J, Abraham C. IRF5 and IRF5 disease-risk variants increase glycolysis and human M1 macrophage polarization by regulating proximal signaling and Akt2 activation. *Cell Reports*, 2016, **16**(9): 2442-2455
- [48] Jiang Z, Liu Z, Li M, *et al.* Increased glycolysis correlates with elevated immune activity in tumor immune microenvironment. *EBioMedicine*, 2019, **42**: 431-442
- [49] Palsson-Mcdermott E M, Curtis A M, Goel G, *et al.* Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the Warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metabolism*, 2015, **21**(2): 65-80
- [50] Luo W B, Hu H X, Chang R, *et al.* Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 2011, **145**(5): 732-744
- [51] Dong T F, Yan Y D, Chai H, *et al.* Pyruvate kinase M2 affects liver cancer cell behavior through up-regulation of HIF-1 alpha and Bcl-xL in culture. *Biomed Pharmacother*, 2015, **69**: 277-284
- [52] Yang Q L, Liu R C, Yu Q, *et al.* Metabolic regulation of inflammasomes in inflammation. *Immunology*, 2019, **157**(2): 95-109
- [53] Benito-Villalvilla C, Soria I, Perez-Diego M, *et al.* Alum impairs tolerogenic properties induced by allergoid-mannan conjugates inhibiting mTOR and metabolic reprogramming in human DCs. *Allergy*, 2020, **75**(3): 648-659
- [54] Moon J S, Hisata S, Park M A, *et al.* mTORC1-induced HK1-dependent glycolysis regulates NLRP3 inflammasome activation. *Cell Reports*, 2015, **12**(1): 102-115
- [55] Duvel K, Yecies J L, Menon S, *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 2010, **39**(2): 171-183
- [56] Yadava N, Schneider S S, Jerry D J, *et al.* Impaired mitochondrial metabolism and mammary carcinogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2012, **18**(1): 75-87
- [57] Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, *et al.* Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(19): 7820-7825
- [58] Yu X H, Zhang D W, Zheng X L, *et al.* Itaconate: an emerging determinant of inflammation in activated macrophages. *Immunol Cell Biol*, 2019, **97**(2): 134-141
- [59] Noe J T, Mitchell R A. Tricarboxylic acid cycle metabolites in the control of macrophage activation and effector phenotypes. *J Leukoc Biol*, 2019, **106**(2): 359-367
- [60] O'Neill L A J, Artyomov M N. Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nature Reviews Immunology*, 2019, **19**(5): 273-281
- [61] Weiss J M, Davies L C, Karwan M, *et al.* Itaconic acid mediates crosstalk between macrophage metabolism and peritoneal tumors. *J Clin Invest*, 2018, **128**(9): 3794-3805
- [62] Cummins E P, Berra E, Comerford K M, *et al.* Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I kappa B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF kappa B activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(48): 18154-18159
- [63] Liu P S, Wang H P, Li X Y, *et al.* alpha-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nature Immunology*, 2017, **18**(9): 985 - 994
- [64] Connor S C, Gray R A, Hodson M P, *et al.* An NMR-based metabolic profiling study of inflammatory pain using the rat FCA model. *Metabolomics*, 2007, **3**(1): 29-39
- [65] Givord C, Welsby I, Detienne S, *et al.* Activation of the endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 alpha by the vaccine adjuvant AS03 contributes to its immunostimulatory properties. *NPJ Vaccines*, 2018, **3**: 20
- [66] Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P. Salubrious effect of *Semecarpus anacardium* against lipid peroxidative changes in adjuvant arthritis studied in rats. *Mol Cell Biochem*, 1997, **175**(1-2): 65-69
- [67] Ralston J C, Lyons C L, Kennedy E B, *et al.* Fatty acids and NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in metabolic tissues. *Annual Reviews*, 2017, **37**: 77-102
- [68] Moon J-S, Nakahira K, Chung K-P, *et al.* NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Nature Medicine*, 2016, **22**(9): 1002-1012

- [69] Zhao X A, Petrashen A P, Sanders J A, *et al.* SLC1A5 glutamine transporter is a target of MYC and mediates reduced mTORC1 signaling and increased fatty acid oxidation in long-lived Myc hypomorphic mice. *Aging Cell*, 2019, **18**(3): e12947
- [70] Yannic N, Karsten H. Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 2018, **75**(12): 2093-2109
- [71] Wu S, Luo C, Hameed N U F, *et al.* UCP2 silencing in glioblastoma reduces cell proliferation and invasiveness by inhibiting p38 MAPK pathway. *Experimental Cell Research*, 2020, **394**(1): 112110
- [72] Dosch M, Zindel J, Jebbawi F, *et al.* Connexin-43-dependent ATP release mediates macrophage activation during sepsis. *eLife*, 2019, **8**: e42670
- [73] 吕凤林, 何凤慈. 利用纳米材料制作多肽疫苗佐剂的思考. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(6): 832-835
Lü F L, He F C. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, **28**(6): 832-835
- [74] 何萍, 吕凤林, 陈月, 等. 纳米铝佐剂吸附 HBsAg 及其免疫学效应的研究. *高等学校化学学报*, 2005, (5): 886-888
He P, Lv F L, Chen Y, *et al.* *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2005, (5): 886-888
- [75] 何萍, 吕凤林, 陈月, 等. 合成纳米铝佐剂及其对乙型肝炎、狂犬病毒辅佐效应的研究. *免疫学杂志*, 2006, **22**(1): 90-93
He P, Lv F L, Chen Y, *et al.* *Synthesis of nanoparticulate alum adjuvant and its application to the HBsAg and rabies virus. Immunological Journal*, 2006, **22**(1): 90-93
- [76] Chen Y L, Yang F, Yang J, *et al.* Aluminum (oxy) hydroxide nanorods activate an early immune response in *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(50): 43533-43542
- [77] Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg*, 2018, **1859**(9): 940-950
- [78] Zhong X Y, He J, Zhang X, *et al.* UCP2 alleviates tubular epithelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by decreasing ROS production. *Biomed Pharmacother*, 2019, **115**: 108914
- [79] Zhao R Z, Jiang S, Zhang L, *et al.* Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*, 2019, **44**(1): 3-15

Mitochondrial Events After Phagocytosis of Aluminum Adjuvant by Macrophages: Progress and Reflections

HUANG Li-Ting¹⁾, LIANG Gui-Zhao²⁾, LÜ Feng-Lin^{1,2)*}

¹⁾College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

²⁾Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Chongqing 400030, China)

Abstract The important reason why aluminum hydroxide is widely used as a vaccine adjuvant is that it can be recognized and phagocytosed by antigen presenting cells (APC) such as dendritic cells (DC) and macrophages (M ϕ). It can also enhance the immune response effectively by affecting the presentation ability of antigens. APC phagocytosis of antigens adjuvanted with aluminum adjuvant could activate lysosomes, mitochondria and other organelles, especially the mitochondria. A series of changes would occur in the mitochondria, including changes among reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial glycolipid metabolism, *etc.* Our research found that the antigens containing aluminum adjuvants can be rapidly phagocytized by macrophages and then an effective immune response can be induced. It is easy to find that the material basis of “fast phagocytosis and fast activation” should require more energy supporting. For this reason, we speculate that the biological behavior of mitochondria will be more active, and may cause “huge damage” to M ϕ after the immune response is achieved. This review will give an overview of this phenomenon and elicit the thinking that needs to be solved in the next step.

Key words aluminum adjuvants, macrophage, mitochondria, ATP, nanoparticles

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0201

* Corresponding author.

Tel: 86-23-65102507, E-mail: lyufenglin@cqu.edu.cn

Received: September 30, 2020 Accepted: November 20, 2020