

吞噬凋亡细胞的机制*

许铭炎** 徐小虎

(汕头大学医学院病理系, 汕头 515031)

摘要 被吞噬细胞吞噬是多数凋亡细胞的命运。凋亡细胞表面膜磷脂酰丝氨酸的暴露、膜碳水化合物的改变及表面糖蛋白的重新分布和聚集导致被吞噬细胞识别与摄取。吞噬细胞的多种受体参与吞噬过程, 有些受体参与栓系凋亡细胞, 有些激发巨吞饮的摄取机制。吞噬的摄取过程因吞噬细胞和凋亡细胞的类型差异而不同。至少有 7 种线虫吞噬基因及其哺乳动物同源物组成两条部分重叠而又平行的摄取信息传导通路。吞噬基因的突变可以改变凋亡细胞的进程。吞噬功能的缺陷将影响机体正常的免疫应答。

关键词 吞噬细胞, 吞噬作用, 吞噬基因, 凋亡细胞, 信息传导, 机制

学科分类号 R329.24, R329.25

由生到死, 细胞凋亡贯穿机体的一生。凋亡细胞的有效清除可抑制炎症及自身免疫反应, 对维持机体内环境的稳定具有重要意义。而这一过程的完成是由吞噬细胞来执行的。一直以来, 对细胞凋亡的研究主要集中在死亡机制的探索, 对其吞噬、清除机制的研究甚少。近年来, 利用遗传筛选结合现代细胞生物学方法, 对线虫、果蝇及哺乳动物的凋亡模型深入研究, 揭示了吞噬过程的一些分子机制。现就有关吞噬凋亡细胞的机制作一阐述。

1 吞噬细胞及其受体

执行凋亡细胞清除的吞噬细胞有两种, 一种是“专职的”, 如巨噬细胞和中性粒细胞等; 另一种是“业余的”, 指的是位于凋亡细胞周围具有识别和吞噬能力的细胞, 如内皮细胞、纤维母细胞等。两者的差别不仅在于吞噬能力的差异, 而且“专职的”吞噬细胞具有远处迁移及穿透组织的能力。

通过配体或抗体的封闭抑制实验和特定受体基因敲除的方法, 发现两类吞噬细胞运用类似的受体对凋亡细胞进行识别和摄取。主要有^[1]: $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体、清道夫受体 (scavenger receptor)、ATP 转运子 (如 ABC1)、脂多糖受体 (CD14)、磷脂酰丝氨酸受体 (phosphatidylserine receptor, PSR)、表面活性蛋白 A 和 D、酪氨酸激酶受体-MER、补体受体 CR3 和 $\text{Fc}\gamma$ 受体。此外, 还包括一类能与补体 C1q 和甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 结合的复合体受体, 如 calreticulin (CRT) 和 CD91 复合体。

研究发现, 这些吞噬受体的功能具有一定的丰

余性 (redundancy), 单独阻断一种受体的功能只能部分减缓吞噬进程, 并不能完全阻断吞噬。这种冗余性提示吞噬功能的重要性, 确保即使在某些受体功能缺陷时, 其他受体也能发挥作用, 迅速完成对凋亡细胞的清除。同时发现, 几种受体能与相同的配体结合, 如清道夫受体和 PSR 都能与磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 结合^[2]。这虽然可造成二个受体为竞争相同的配体, 而影响吞噬细胞识别目标的效率, 但如果有很多配体分子在凋亡细胞的表面展示, 吞噬细胞上几种受体的同时识别, 则可增加粘附的几率并迅速摄取。

在对凋亡细胞进行识别时, 有些受体直接与凋亡细胞表面的配体结合, 如 PSR 和清道夫受体直接与凋亡细胞表面暴露的 PS 结合。有些则需要桥梁分子或其他受体的协同作用, 如酪氨酸激酶受体 Mer^[3], 通过 Gas-6 的桥梁作用, 与凋亡细胞表面暴露的 PS 结合, 识别和吞噬凋亡的胸腺细胞。CD-36 通过血小板反应蛋白的桥梁作用与 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体结合, 介导吞噬^[3]。

最近, 运用修饰红细胞建立的吞噬模型, 评价不同吞噬细胞受体在吞噬过程中的作用^[4]。正常的红细胞不能和巨噬细胞结合, 但耦联有抗体或配体的修饰红细胞可被巨噬细胞识别、摄取, 这样, 通过检测巨噬细胞对修饰红细胞的作用, 便可了解受体在吞噬过程中的作用。给予 CD-36 或 $\alpha_v\beta_3$ 的

* 国家自然科学基金资助项目 (30070291)。

** 通讯联系人。

Tel: 0754-8900433, E-mail: xmycasey@sina.com.cn

收稿日期: 2003-05-14, 接受日期: 2003-07-28

抗体可加速红细胞栓系到巨噬细胞上,但不能被摄取.给予 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的天然配体同样可导致吞噬细胞对凋亡细胞的粘附,但也不被摄取.把PS耦联到红细胞的表面并不能增强粘附和摄取,但当把包被PS的红细胞栓系到巨噬细胞表面时,可被快速摄取.这说明,巨噬细胞表面受体CD-36和 $\alpha_v\beta_3$ 的作用主要是对凋亡细胞的识别和粘附,而PSR的作用主要是介导吞噬摄取.

2 吞噬凋亡细胞的识别机制

吞噬细胞能够识别、摄取凋亡细胞,在于凋亡细胞与正常细胞之间信号的差异,即凋亡细胞“食我”(eat me)信号的展示.凋亡细胞膜表面物质的变化是凋亡细胞与正常细胞信号差异的来源.这些变化包括^[5]:膜PS的暴露、膜碳水化合物的改变及糖蛋白在凋亡细胞表面的重新分布和聚集.

持续性的PS暴露不仅可见于哺乳动物凋亡细胞,同样也出现在两栖类和果蝇的凋亡细胞.PS是一种带负电荷的膜磷脂,正常时位于细胞膜的内层.当细胞凋亡时,由于攀缘酶(scramblase)的激活和由ATP依赖的氨基磷酸酯转移酶(aminophospholipid translocase)量的减少或活性受抑,促使PS持续暴露在膜表面.攀缘酶的作用是促使磷脂向细胞膜的外缘翻转.而氨基磷酸酯转移酶的活性正常时,在ATP的作用下促使PS进入细胞膜内层.PS的暴露对吞噬过程起着关键作用.因它是多种吞噬受体的配体.最近Hoffmann等^[4]证实,PS不仅参与了吞噬细胞对凋亡细胞的栓系,而且激活了吞噬摄取的信息通路.

凋亡细胞膜碳水化合物的改变,指的是岩藻糖和N-乙酰氨基葡萄糖等糖类物质的表达增加.这为吞噬细胞表面的胶原凝集素样受体(C1q和MBL)提供了结合的配体^[6].同时,膜碳水化合物的改变可导致糖蛋白在凋亡细胞表面的重新分布和聚集,如凝集素、血小板反应蛋白、补体、细胞间粘附因子等等.这提供了吞噬识别、摄取过程中所需的桥梁分子.新的糖蛋白可由凋亡细胞本身的内膜结构提供,或由内质网和质膜的直接融合产生,也可由活化的吞噬细胞分泌,如糖蛋白MFG-E8^[7](milk fat globule-EGF-factor 8),它是由活化的巨噬细胞分泌的一种桥梁分子.

吞噬过程的执行不仅需要胞外的吞噬配体,也需要胞内吞噬配体的协同作用.最近,Arur等^[8]运用定量蛋白质组学技术,证实了Annexin I是一

个caspase依赖的内源性吞噬配体.当细胞执行凋亡时,Annexin I从胞液中被招募,输出到质膜的外层,与PS共定位,而且PSR的聚集具有Annexin I依赖性.研究表明,不仅人凋亡细胞的吞噬需要Annexin I,同样,线虫同源物Annexin nex-I也作用于线虫凋亡细胞的吞噬.这提示Annexin I作为内源性吞噬配体具有进化保守性,由它介导吞噬的识别、摄取可能是一个普遍存在的机制.

同样,也有抑制吞噬的配体如红细胞表面的CD47^[9],它的功能是表达一种“不食我”(don't eat me)的信号.此外,Brown等^[10]发现,血小板内皮细胞粘附因子CD31在活细胞和凋亡细胞中的功能不一样.在活细胞它传递一种排斥信号,抑制巨噬细胞对其吞噬,而在凋亡细胞,则表达一种“食我”信号,促进吞噬细胞对其识别和摄取.

3 吞噬凋亡细胞的摄取机制

近来的研究表明,吞噬细胞对凋亡细胞的摄取是由吞噬基因调控的主动过程.对吞噬基因及摄取信号传导通路的深入研究,加深了对摄取机制的理解.

3.1 吞噬基因及其编码产物

对线虫的研究发现,至少有7个吞噬基因参与凋亡细胞的清除,它们分别是ced-1(cell death abnormal, ced)、ced-2、ced-5、ced-6、ced-7、ced-10和ced-12.同样,在果蝇和哺乳动物也存在线虫吞噬基因的同源物,这提示吞噬基因具有进化保守性.

ced-1编码一个位于吞噬细胞的表面并参与对凋亡细胞识别的受体CED-1^[11].它拥有一个很大的胞外区(含有16个非典型类EGF的重复序列),一个跨膜区和一个含有两个功能性基序(NPXY和YXXL)的短胞内区.当吞噬细胞识别凋亡细胞时,CED-1聚集在吞噬细胞与凋亡细胞相邻的膜表面.当CED-1突变(缺乏胞内结构域)时,可见CED-1定位于吞噬细胞和凋亡细胞之间,而凋亡细胞不被吞噬.这表明,胞内结构域对CED-1的功能至关重要,NPXY与目标分子的磷酸酪氨酸结合域(PTB)结合,而YXXL与目标分子的SH2结构域结合,传递吞噬信号.确切的CED-1哺乳动物同源物尚未知.多数人认为哺乳动物同源物为SREC,因其胞外的结构和编码序列与CED-1很类似,但其不具有胞内同源基序.而CD91/LRP^[12]

(low density lipoprotein receptor-related protein) 具有与 CED-1 功能性基序相同的结构, 被认为是 CED-1 的功能性同源物。

ced-6 编码一个接头信号分子, 它的 N 端为 PTB, 中间为亮氨酸拉链 (介导同源二聚化), C 端为富含脯氨酸的 SH3 结合位点。哺乳动物同源物为 GULP^[12]。在线虫和哺乳动物的实验中证实, CED-6 的功能具有进化保守性, 过度表达可加速凋亡细胞的吞噬, 并可部分拯救 ced-1 的突变。可见, 它可能作用于 CED-1 的下游。Su 等^[12]通过生化和酵母双杂交分析表明, 在吞噬凋亡细胞的过程中, CED-6/GULP 的 PTB 结构域与 CED-1/CD91 胞质内的 NPXY 基序相互作用。这些支持 CED-6 作为接头分子——传递受体吞噬信号的角色。

ced-7^[6]编码一个属于 ATP 结合盒 (ABC) 家族成员的蛋白质, 哺乳动物同源物是 ABC1。它属于不活泼的 ATP 酶, 作为调节蛋白或辅助蛋白参与膜的转运过程。遗传筛选分析表明, ced-7 是唯一能作用于吞噬细胞和凋亡细胞的吞噬基因。的确, 膜脂类的重新分布可同时发生在凋亡细胞和吞噬细胞, 但对双方的功能是不一样的, 作用于凋亡细胞表达一个“食我”信号, 作用于吞噬细胞则辅助 CED-1 识别“食我”信号。

ced-2 编码一个接合蛋白 CED-2, 哺乳动物同源物为 Crk II, 含有一个 SH2 和两个 SH3 结构域^[13]。ced-5 编码属于 CDM 家族蛋白 CED-5, 其果蝇的同源物为 MBC, 哺乳类同源物为 DOCK180, CDM 蛋白能与 CED-2/Crk II 的第一个 SH3 结合, 同时具有进化保守的 DHR-2^[14]结构域, 该结构域具有鸟苷酸交换因子 (GEF) 的功能, 这是活化 Rho GTP 酶所必需的。ced-10 编码 CED-10, 它的哺乳类同源物为 Rac, 是 RhoGTP 酶家族 (包括 Rho、Rac 和 Cdc42) 成员之一^[13]。ced-12 编码 CED-12, 它的哺乳类同源物为 ELMO1、ELMO2 和 ELMO3, 果蝇的同源物为 DCED-12, 它们带有一个 PH 结构域和 SH3 结合基序^[15]。

3.2 摄取的信号传递通路

线虫的遗传筛选表明, 吞噬基因的编码产物组成两条平行的信息传导通路, ced-1、ced-6 和 ced-7 为一组, ced-2、ced-5、ced-10 和 ced-12 为另一组。这两组的功能有一定的重合, 因为同组内一个或两个基因突变对吞噬过程无显著影响, 而两组内的任一基因同时突变, 显著性地影响吞噬细胞的吞噬能力。同样, 在哺乳动物中也可见类似的信号传递

通路。

ced-1、ced-6、ced-7 这条通路的信号传递过程大致如下: 首先, CED-7/ABC1 促进凋亡细胞表达“食我”信号, 辅助 CED-1 识别“食我”信号。接着, CED-1 识别凋亡细胞并与之相应的配体结合, CED-6/GULP 传递 CED-1 的吞噬信号。但 CED-6/GULP 的下游效应物尚未知, 进一步的研究将集中在 CED-1-CED-6 相互作用后的细胞结局。

ced-2、ced-5、ced-10 及 ced-12 主要作用于吞噬细胞, 它们编码的 CED 蛋白组成一个保守的 RhoGTP 酶信号传导通路。参与吞噬和细胞迁移过程中细胞形态改变的调节。首先, CED-12/ELMO 与 CED-5/DOCK180 的羧基端结合, 但 CED-5/DOCK180 羧基端的富含脯氨酸基序并非结合所必需的。然后通过 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。这样整个定位于膜的三联体活化, 招募一个 GEF 到 CED-5/DOCK180 中或者激活 CED-5/DOCK180 中 DHR-2 的 GEF 功能, 催化 GTP 与 CED-10/Rac 结合成为活化形式, 活化的 CED-10/Rac 作用于下游目标, 诱导胞膜皱折和组成细胞骨架肌动蛋白的改变^[15]。研究发现, 这种下游效应不仅需要 Rho GTP 酶家族成员的参与, 同时也需要 PI-3 激酶^[16]。但两者的作用是不一样的, RhoGTP 酶的作用是使 F-肌动蛋白和磷酸化的酪氨酸在与凋亡细胞接触部位聚集, 而细胞骨架重构和吞噬体的形成则是 PI-3 激酶作用的结果。这与 Fc 受体及补体介导的吞噬杀菌过程类似, 推测两种吞噬过程的区别在于激活 Rho GTP 酶和 PI-3 激酶上游受体及信号传导分子的差异。

3.3 摄取的机制

巨吞饮 (macropinocytosis) 是吞噬细胞对凋亡细胞摄取的主要机制^[5]。有许多受体和信号分子参与这一过程, 但它们的作用是不一样的, 有些起栓系凋亡细胞的作用, 有些则激活吞噬的信息传导通路, 诱导细胞骨架的运动形成吞噬体, 这就是所谓的“栓系-激活” (tethering and tickling) 机制^[17]。首先, 吞噬细胞的识别受体 (如 CD36、整合素等) 对凋亡细胞进行识别并把细胞栓系住, 接着凋亡细胞暴露的 PS 与吞噬细胞的 PS 受体结

合, 激活吞噬的信息传导通路并执行吞噬. 这可部分解释多种吞噬受体协同参与吞噬摄取的原因, 同时, 这种两步激活的摄取过程可以防止对非凋亡细胞的误吞.

但是 Parnaik 等^[18]发现专职吞噬细胞与业余吞噬细胞对凋亡细胞的巨吞饮过程是不一样的. 新的凋亡细胞可被小胶质细胞 (专职吞噬细胞) 快速识别, 延伸薄片状伪足包围凋亡细胞形成吞噬体, 并把凋亡细胞快速降解. 相比而言, 业余吞噬细胞 (幼仓鼠肾细胞 BHK) 在吞噬过程中则出现不同的形态和反应进程. 当 BHK 对凋亡细胞执行吞噬时, 在它们接触的地方, 一过性地诱导 BHK 细胞的胞膜出现皱折. 这样持续几个小时, 最终, 凋亡细胞快速陷入 BHK 细胞中, 但并没有薄片状伪足的延伸. 而且, 与新的凋亡细胞相比, BHK 细胞更加迅速地吞噬老的凋亡细胞, 提示在凋亡的进程中, 凋亡碎片的信号会改变. 这些改变的信号能刺激业余吞噬细胞的吞噬. 这样, 大多数的凋亡细胞可被专职吞噬细胞吞噬而清除, 但那些逃避吞噬的凋亡细胞在后来也被周围的业余吞噬细胞识别而清除.

4 吞噬凋亡细胞的生理意义

线虫的研究工作揭示了吞噬在细胞凋亡进程中所扮演的角色^[19,20]. 自杀基因 (*ced-3*) 的突变可使线虫的一些注定凋亡的细胞逃避死亡, 而吞噬基因的突变可增加这些细胞的生存率. 令人惊讶的是, 有些细胞一过性地呈现凋亡细胞的特征, 随后又恢复正常. 仔细分析发现, 这是由于受吞噬基因突变的影响, 使凋亡细胞的死亡进程受阻而逆转, 但这种逆转以细胞内的 DNA 不被破坏为前提. 这说明, 吞噬是正确完成凋亡程序的一部分, 吞噬基因与 *ced-3* 协同作用, 能促进线虫细胞的死亡. 这为一些神经降解性疾病和中风的有效治疗提供新思路——药物阻断周围吞噬细胞的吞噬, 可恢复这些病理细胞的活性; 对于肿瘤的治疗, 则可通过激活周围吞噬细胞的活性对肿瘤细胞进行有效地清除.

同时, 吞噬对维持机体内环境的稳定具有重要意义. 它的快速摄取与清除不仅可以防止凋亡细胞内容物的泄漏, 而且对维持机体正常的免疫应答至关重要. 吞噬缺陷将造成细胞残骸的沉积, 这是系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的病理机制. 吞噬过程可诱导抗炎症细胞因子 (如 TGF- β , IL-10) 产生^[5], 这使细胞凋亡过程非炎症性.

参 考 文 献

- 1 Franc N C. Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*: molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci*, 2002, **7**: d1298 ~ 1313
- 2 Fadok V A, Bratton D L, Henson P M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*, 2001, **108** (7): 957 ~ 962
- 3 Scott R S, McMahon E J, Pop S M, *et al.* Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, 2001, **411** (6834): 207 ~ 211
- 4 Hoffmann P R, deCathelineau A M, Ogden C A, *et al.* Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol*, 2001, **155** (4): 649 ~ 659
- 5 Henson P M, Bratton D L, Fadok V A. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*, 2001, **11** (19): R795 ~ 805
- 6 Nauta A J, Daha M R, Kooten C, *et al.* Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol*, 2003, **24** (3): 148 ~ 154
- 7 Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, *et al.* Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 2002, **417** (6885): 182 ~ 187
- 8 Arur S, Uche U E, Rezaul K, *et al.* Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*, 2003, **4** (4): 587 ~ 598
- 9 Oldenborg P A, Gresham H D, Lindberg F P. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med*, 2001, **193** (7): 855 ~ 862
- 10 Brown S, Heinisch I, Ross E, *et al.* Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*, 2002, **418** (6894): 200 ~ 203
- 11 Zhou Z, Hartwig E, Horvitz H R. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell*, 2001, **104** (1): 43 ~ 56
- 12 Su H P, Nakada-Tsukui K, Tosello-Tramont A C, *et al.* Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem*, 2002, **277** (14): 11772 ~ 11779
- 13 Reddien P W, Horvitz H R. CED-2/Crk II and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*, 2000, **2** (3): 131 ~ 136
- 14 Cote J F, Vuori K. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci*, 2002, **115** (Pt 24): 4901 ~ 4913
- 15 Wu Y C, Tsai M C, Cheng L C, *et al.* *C. elegans* CED-12 acts in the conserved CrkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment. *Dev Cell*, 2001, **1** (4): 491 ~ 502
- 16 Leverrier Y, Ridley A J. Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*, 2001, **11** (3): 195 ~ 199
- 17 Somersan S, Bhardwaj N. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol*, 2001, **155** (4): 501 ~ 504
- 18 Parnaik R, Raff M C, Scholes J. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol*, 2000, **10** (14): 857 ~ 860

19 Hoeppner D J, Hengartner M O, Schnabel R. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2001, **412** (6843): 202 ~ 206

20 Reddien P W, Cameron S, Horvitz H R. Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature*, 2001, **412** (6843): 198 ~ 202

Engulfment Mechanism of Apoptotic Cells*

XU Ming-Yan **, XU Xiao-Hu

(Department of Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract Ingestion by phagocytes is the fate of most cells that undergo apoptosis. During apoptosis, there are many changes on the surface of apoptotic cells, including the exposure of phosphatidylserine, the alteration of membrane carbohydrates and the redistribution or clustering of glycoproteins, which are leading to recognition and uptake by phagocytes. Many engulfment receptors have been implicated and appear to be divided into two categories, involved in tethering the apoptotic cell or triggering an uptake mechanism related to macropinocytosis. The process of uptake may vary with the apoptotic and engulfing cell types. At least seven engulfment genes in *C. elegans* have mammalian equivalents, and represent elements of signaling pathways involved in uptake, which have been proposed to define two parallel and partially redundant pathways. The mutation of engulfment genes can change the process of apoptosis. The defections of phagocytosis can affect the body's normal immune response.

Key words phagocyte, phagocytosis, engulfment genes, apoptotic cell, signal transduction, mechanism

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070291).

** Corresponding author. Tel: 86-754-8900433, E-mail: xmycasey@sina.com.cn

Received: May 14, 2003 Accepted: July 28, 2003