

· 综述 ·

死亡细胞清除的阴与阳*

陈超,全紫瑶 综述,崔天盆△ 审校

(武汉市第一医院检验科/武汉市中西医结合医院检验科,湖北武汉 430022)

摘要:机体每时每刻都有大量细胞凋亡,及时清除凋亡细胞对维持机体的免疫平衡至关重要,凋亡细胞被吞噬细胞清除过程分为:招募、识别和吞噬消化 3 个阶段。凋亡细胞清除表现为没有炎性反应或者一个已经存在的促炎反应在吞噬发生后被下调。当机体处于组织损伤和炎性反应状态或生理应激时,细胞发生凋亡或坏死,若凋亡细胞不能及时清除也会继发性坏死,细胞坏死释放内源性危险信号分子,也称为危险相关分子模式(DAMPs)。DAMPs 在结构和功能上与侵入机体的外源性的保守的微生物即病原体相关分子模式的表面结构具有相似性,可被病原体识别受体(PRRs)识别,激活相关信号通路,产生自身抗体或活化其他免疫细胞,导致自身免疫性疾病或炎性反应。

关键词:细胞凋亡; 细胞坏死; 死亡细胞清除; 胞葬

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.021

文章编号:1673-4130(2018)24-3075-07

中图法分类号:R392.1

文献标识码:A

死亡是生命的一部分,多细胞生物的出生和生命维持每日需要数以亿计的细胞死亡贯穿其生命周期。所谓细胞死亡的定义包括 3 个方面:(1)永久失去细胞膜的完整性;(2)细胞裂解为碎片(主要指凋亡小体);(3)被职业和非职业吞噬细胞吞噬。19 世纪后期 LLYA METCHINKOFF 因发现吞噬细胞(phagocytes)于 1908 年获得诺贝尔生理医学奖。细胞死亡是机体发育、应激、感染和自稳的重要组成部分,正常成人每一天有 500 亿个细胞死亡,细胞死亡后能够迅速被邻近细胞或巨噬细胞识别吞噬及消化,这个过程称为胞葬(efferocytosis)。死亡细胞自身或细胞死亡时释放的物质有利于死亡细胞的清除及免疫学转归。死亡细胞清除缺陷与自身免疫性疾病和自身炎性疾病密切相关,如系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺疾病和糖尿病等^[1]。

1 细胞死亡的主要方式

生命是由单个细胞发育而来,它需要分化成不同形式的细胞,进而形成一个复杂的有机体。在发育和后续生命中,伴随着数亿个细胞的死亡,有些细胞死亡是生理性的,有些是病理性的。很多科学家描述了自然发生的细胞死亡,然而大部分生物学家是对细胞的生命更感兴趣。1965 年,LOCKSHIN 和 WILLIAMS 首次提出程序化细胞死亡的概念,它描述了细胞死亡是细胞在胚胎发育中,在特定空间和特定时间程序化死去的一种过程。1972 年 KERR 根据这种在发育和组织稳态中发生的细胞死亡的形态学特征,提出了凋亡(apoptosis)一词(来源于希腊字,意思是

落下,好像叶子从树上落下),将它与坏死(necrosis)即一种由物理化学等因素导致的细胞死亡区分开来^[2]。

这些年来,很多研究者对细胞死亡的形态特征、理化性质、其发生的机制以及对机体的影响展开了深入研究,发现了更多不同类型的细胞死亡方式,从不同角度予以不同的分类。细胞死亡可根据其形态分类:细胞凋亡、坏死、细胞自噬或有丝分裂灾难等;可根据有无核酸酶或不同蛋白酶的酶学标准(半胱天冬酶,钙激活中性蛋白酶,组织蛋白酶和谷氨酰胺转氨酶)分类;还可以根据功能(程序性或意外,生理或病理)分类;或根据免疫学特性(有或无免疫原性)分类。2009 年和 2012 年细胞死亡命名委员会(NCCD)^[2-3]建议根据形态的标准统一分类细胞死亡,目前发现细胞死亡有凋亡、坏死、自噬性细胞死亡(autophagic cell death)、角化性细胞死亡(cornification)、非典型细胞死亡。非典型细胞死亡又包括有丝分裂灾难、失巢凋亡(anoikis)、沃勒变性(wallerian degeneration)、副凋亡(paraptosis)、细胞焦亡(pyroptosis)、焦亡性细胞坏死(pyronecrosis)、坏死性凋亡(necroptosis)、内亡(entosis)、兴奋性中毒(excitotoxicity)、胞外诱捕网致死(ETosis)、铁死亡(ferroptosis)以及红细胞衰亡(suicidal erythrocyte death or eryptosis)。2015 年和 2018 年 NCCD 建议增加功能和分子机理分类^[4-5]。2015 年 NCCD 将细胞死亡分为意外性细胞死亡(accelerated cell death)和调节性细胞死亡(regulated cell death),调节性细胞死亡又包括程序性细胞死亡(programmed cell death)。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81770038);武汉市临床医学科研项目重点项目资助(WX17A01)。

△ 通信作者,E-mail:tianpencui@126.com。

本文引用格式:崔天盆,陈超,全紫瑶.死亡细胞清除的阴与阳[J].国际检验医学杂志,2018,39(24):3075-3081.

grammed cell death)。

2 胞葬的机制

吞噬就是摄入大小超过 $0.5 \mu\text{m}$ 的颗粒。在这个过程中,巨噬细胞通过细胞骨架重排包围即将被消化的颗粒,形成一个所谓的吞噬环。环绕颗粒完成后,颗粒就被包埋在质膜小囊中,形成了吞噬小体,随后它成熟为吞噬溶酶体。

吞噬细胞不总是邻近死亡细胞,所以它们必须被招募,被引诱到死亡细胞处就餐。职业吞噬细胞(巨噬细胞和树突状细胞)和非职业吞噬细胞(如上皮细胞或内皮细胞)迁移到死亡细胞处,通过细胞表面受体识别和吞噬死亡细胞,内化(常是整个吞噬),降解和处理。对于凋亡细胞此过程是免疫耐受的;胞葬过程常分为4步:(1)“找到我(find-me)”信号招募吞噬细胞;(2)“吃我(eat-me)”信号识别和束缚死亡细胞;(3)吞噬死亡细胞;(4)处理、降解和对吞噬残骸的免疫反应。

2.1 凋亡细胞清除过程的阴与阳

2.1.1 “找到我(find-me)”信号 吞噬细胞必须被凋亡细胞分泌的所谓的“找到我(find-me)”信号所趋化,S19核糖体蛋白二聚体(dRP S19)是第一个被发现的凋亡细胞趋化信号,它是核糖体的亚单位成分。发生交联的RP S19可趋化单核细胞和巨噬细胞,其原因与G蛋白偶联受体CD88相关。内皮-单核细胞激活多肽Ⅱ(EMAPⅡ)是从甲基胆蒽A条件培养基培养的小鼠成纤维肉瘤细胞中分离到的一种多肽,EMAPⅡ对中性粒细胞和单核细胞均有化学趋化性,并能诱导中性粒细胞髓过氧化物的释放及单核细胞肿瘤坏死因子(TNF)- α 的产生^[1,6]。

生发中心B细胞在亲和力成熟过程中增加凋亡,这些凋亡细胞释放膜相关CX3CL1(或fractalkine)微颗粒,被巨噬细胞经典趋化受体CX3CR1感知,介导巨噬细胞到凋亡细胞处。

胱天蛋白酶活化磷脂酶A2导致产生和释放溶血卵磷脂(LPC),LPC被G蛋白偶联受体G2A感知,刺激巨噬细胞招募。同样凋亡细胞释放的1-磷酸-鞘氨醇(S1P)被多种G蛋白偶联受体S1P-R1-5识别,介导吞噬细胞趋化。然而这些磷脂在体内循环中的浓度高于凋亡细胞释放的浓度,它们的体内功能没有很好评估。因此,这种趋化活性仅仅是局部的。

可能最有潜力的“找到我”信号是核苷酸。通过活化缝隙连接蛋白1通道(Panx1)以胱天蛋白酶依赖释放ATP和UTP,被吞噬细胞表面嘌呤受体如P2Y2探知。体内用糖皮质激素治疗干扰核苷酸/P2Y2相互作用导致凋亡胸腺细胞增加。ATP既是“找到我”信号,同时也是危险相关分子模式(DAMPs),可警告天然免疫系统。坏死细胞释放的尿酸既是“找到我”信号,同时也是炎症小体的活化因

子,见图1。

凋亡细胞释放的乳铁蛋白(lactoferrin)是已知的“keep-out”信号或抗趋化信号(anti-chemotactic signal),死亡中性粒细胞和嗜酸性粒细胞释放,对中性粒细胞抗趋化作用;乳铁蛋白可以选择性抑制嗜酸性粒细胞的募集。但是它对单核细胞和巨噬细胞向补体成分C5a的趋化却没有影响。活细胞表达的补体调节因子如CD46和H因子抑制补体活化瀑布起到潜在抗趋化作用。总之吞噬细胞感知“找到我(find-me)”信号和“keep-out”信号,两种在体内处于平衡状态。

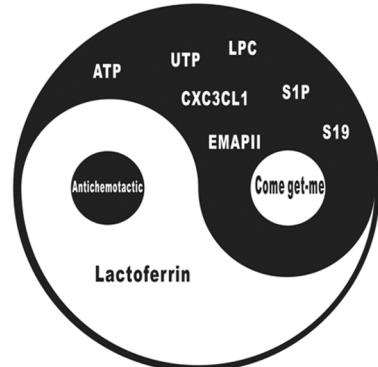


图1 细胞释放或表达趋化和抗趋化信号相互制衡

2.1.2 “吃我(eat-me)”信号 细胞死亡的环境是复杂的,有多种细胞存在,包括死亡细胞、健康细胞、免疫细胞。吞噬细胞必须从众多的细胞中区分出死亡细胞,这样才能维持稳态,促进正常的发育并避免不期望的炎症发生。

在凋亡的过程中新的分子会出现在细胞的表面。最熟知的就是磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)从细胞膜的内表面进入外表面。钙离子介导的阳离子通道TMEM16F介导脂质颠倒(lipid scrambling),胱天蛋白酶-3切割拼接酶Xkr8,完成磷脂酰丝氨酸外翻。翻转酶(flippase)ATP11C正常将氨基磷脂从胞外转移到胞浆,凋亡时胱天蛋白酶-3酶切ATP11C使其失去活性。

尽管磷脂酰丝氨酸在很多生物膜是少量组分,但是磷脂酰丝氨酸有很重要生物学功能。膜外暴露的磷脂酰丝氨酸是“吃我(eat-me)”信号,是凋亡细胞识别和清除的必需组分。吞噬细胞通过膜受体结合,如T细胞免疫球蛋白域黏蛋白域受体-4(Tim-4)、脑特异血管生成抑制因子-1(BAI-1)、稳定素-2(stabilin-2)等。也可以通过体液中的桥梁分子结合,如乳脂球表皮生长因子-8(MFG-E8)、GAS-6、蛋白S,识别吞噬细胞表面受体如整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 或TAM受体(Tyro3-Axl-Mer)。磷脂酰丝氨酸与相应受体结合后导致细胞骨架重排,完成吞噬细胞残骸^[1,7-8]。

磷脂酰丝氨酸对巨噬细胞识别和吞噬的重要性首先发现于红细胞,衰老的红细胞清除跟凋亡细胞类

似,依赖 Fas-半胱天冬酶-3/半胱天冬酶-8 信号导致的磷脂酰丝氨酸外翻;还有 N-乙酰葡萄糖胺和岩藻糖的表达增加。这些变化累积成一个对吞噬细胞来说代表强烈的“吃我(eat-me)”信号的凋亡特异性的表面模式。

正常情况下活细胞或活化细胞外膜磷脂酰丝氨酸浓度极低,不被吞噬。即使组成性表达 TMEM16F,也不被吞噬。吞噬细胞如何区别磷脂酰丝氨酸阳性的死亡细胞和活细胞呢?事实上活细胞表面表达“不吃我(don't eat-me)”信号,如 CD31、CD47 和 CD61。活细胞表面表达 CD31、CD47 和 CD61,阴性调节吞噬细胞吞噬,即使这些细胞表达磷脂酰丝氨酸也不被吞噬,见图 2。

活细胞上的 CD47,又称整联蛋白(IAP),与巨噬细胞上的信号调节蛋白 α 链(SIRPa)相互作用可以负相调控吞噬作用,并对固有免疫系统产生抑制作用。如果存在于红细胞表面的 CD47 表达减少,则脾的红髓区巨噬细胞对红细胞的吞噬作用增强,这也是溶血性贫血的发病因素之一;如果存在于血小板表面的 CD47 表达减少,则会导致巨噬细胞吞噬破坏血小板,这与特发性血小板减少性紫癜发病紧密相关。同样活细胞上的 CD31 可以与吞噬细胞上的 CD31 相互作用,提供一个空间上的排斥作用来抑制吞噬作用。不同细胞 CD31 表达不同,某些白细胞 CD31 的表达下调对有效率的吞噬是必要的。

此外,磷脂酰丝氨酸不是唯一“吃我(eat-me)”信号。其他如 ICAM-3,氧化 LDL-样分子、糖化表面蛋白、C1q 结合血清蛋白均被认为是“吃我(eat-me)”信号。胞内内质网上的钙网蛋白(calreticulin)转运到胞浆外膜也作为“吃我(eat-me)”信号被吞噬细胞识别。胞葬被“吃我(eat-me)”信号和“不吃我(don't eat-me)信号”平衡调节,很清楚死亡细胞通过表达表面识别分子促进自身被吞噬细胞识别和清除。

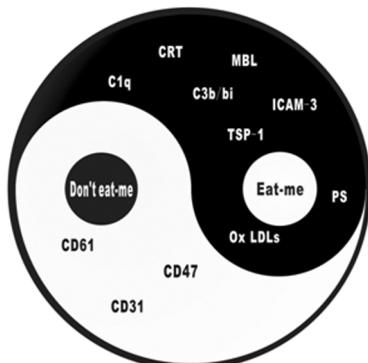


图 2 细胞表面表达“吃我”和“不吃我”信号相互制衡

2.1.3 吞噬细胞残骸 胞葬是吞噬细胞和死亡细胞复杂的共舞过程。死亡细胞通过释放“找到我”信号招募吞噬细胞到死亡细胞处,表达“吃我”信号希望被清除,吞噬细胞通过受体识别这些信号启动吞噬

过程。

死亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸被膜受体识别,如稳定素-2、BAI-1、RAGE、Tim-4(或 Tim-1/Tim-3);此外桥梁分子如 MFG-E8、Gas-6、蛋白也可以通过整合素 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 或 TAM 受体结合。磷脂酰丝氨酸与相应受体结合后导致细胞骨架重排,完成吞噬细胞残骸。其他“吃我”信号如修饰的糖蛋白和脂类可被凝聚素(lectins)受体结合;CD36 与整合素 $\alpha v\beta 3$ 可结合血小板反应蛋白-1;清道夫受体如 SR-A 可结合氧化 LDL 样结构;CD14 可结合 ICAM-3;CD91(或 LRP1)可通过钙网蛋白结合 C1q。

本文聚焦吞噬细胞通过受体结合凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸识别和清除为模型。Tim-4(或 Tim-1/Tim-3)通过 IgV 结构域结合凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸,BAI-1 通过血小板反应蛋白 1 型重复域结合凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸,稳定素-2 通过 EGF 样结构域介导磷脂酰丝氨酸识别,MFG-E8 通过 C1 和 C2 结构域结合磷脂酰丝氨酸。不同受体通过不同结构域结合磷脂酰丝氨酸增加胞葬的复杂程度。

Rho 家族小 GTP 酶介导死亡细胞吞噬,Rho 家族小 GTP 酶包括 RhoA、Rac、ROCK、Rab5 和 Cdc42。RhoA 阴性调节吞噬,抑制此酶增加吞噬。Rac1 活化转导膜筏促进吞噬。整合素 $\alpha v\beta 3$ 或 $\alpha v\beta 5$,或 Mer 招募胞浆蛋白 CrkII, CrkII 与接头蛋白 ELMO1 和 DOCK180 形成吞噬环。ELMO1 和 DOCK180 形成双向鸟嘌呤核苷酸转换因子(GEFs),后者活化 Rac1。BAI-1 也独立招募和结合 ELMO1。过表达 ELMO1 和 DOCK180 导致增加 Rac1 活性和吞噬能力。

当然不是所有“吃我”信号都需要 DOCK180/ELMO1 复合物介导 Rac1 活化。稳定素-2 需要接头蛋白 GULP 活化 Rac1 通路。CD91/LRP 结合钙网蛋白,与 GULP 相互作用。Tim-4 胞浆域很短,不需要活化 Rac1,具体信号通路未知。

GTP 结合凋亡细胞识别 Rac,促进 Arp2/3 活化,通过 Scar/WAVE 复合物,肌动蛋白聚合/细胞骨架重排。一旦吞噬完成,吞噬细胞的工作还只是刚刚开始。

除了职业吞噬细胞,不同组织表达磷脂酰丝氨酸受体略有不同,如骨髓、脾和脑表达 BAI-1;肺表达 RAGE;肾脏表达 Tim-1;窦内皮细胞表达稳定素-2。这种组织特异性表达解释为什么不同受体缺陷表现不同疾病,如高度表达神经系统 BAI-1 缺陷导致神经变性疾病;内皮细胞高表达稳定素-2 缺陷导致动脉粥样斑块。

2.1.4 胞内消化和免疫结局一旦死亡细胞残骸被吞噬细胞吞噬,其归宿就是消化和降解。RhoA 活化的后期通过酸化吞噬体促进凋亡细胞消化。GDP-结

合小GTP酶Rab5被招募到吞噬体,活化Rab5促进吞噬体膜Ⅲ型PI3K,VSP34,产生PI3P,随后HO磷脂酰丝氨酸复合物招募到Rab7到吞噬体膜,导致吞噬体与溶酶体融合。

一旦吞噬体通过与溶酶体融合而成熟,酸性蛋白酶、核酸酶活化,凋亡细胞被降解成基本组分如脂类、固醇、肽和核苷酸。溶酶体中DNA酶Ⅱ降解DNA,如果DNA酶Ⅱ缺陷导致吞噬细胞未消化DNA累积,最后导致多关节炎。

就像任何美食都会对就餐者产生深远影响,吞噬细胞面对代谢压力,吞噬死亡细胞残骸,导致胞内负荷加倍。如果这个组分是胆固醇,就会对吞噬细胞吞噬死亡细胞产生影响。为了保证吞噬细胞胞内的内环境稳定,吞噬细胞必须外排胆固醇,磷脂酰丝氨酸受体吞噬后导致PPAR γ/δ 和LXR活化,PPAR γ/δ 和LXR在细胞脂质自稳和清除凋亡细胞中扮演重要作用。这个过程导致上调吞噬受体,如TAM受体、ABCA1。PPAR $\gamma/-$ 和PPAR $\delta/-$ 吞噬细胞吞噬凋亡细胞能力下降。

凋亡细胞死亡是健康个体组织更新的组成部分,因此,大多数关于凋亡细胞被巨噬细胞吞噬后的免疫学结局是没有炎性反应或者一个已经存在的促炎反应在吞噬发生后被下调,呈现免疫耐受。巨噬细胞消化凋亡细胞后的抗炎效应的发挥主要是分泌及上调转化生长因子- β (TGF- β),血小板活化因子,IL-10和前列腺素E2。吞噬凋亡细胞抑制促炎性细胞因子TNF、IL-1和IL-12。PPAR γ/δ 在M2型巨噬细胞极化中扮演重要作用,M2型巨噬细胞是抗炎表型。许多研究揭示未成熟的树突状细胞在消化凋亡的细胞后并不能成熟为向T细胞提呈自身抗原的抗原提呈细胞,从而抑制炎性反应^[1,9]。

2.2 坏死细胞和细胞碎片的清除 原发性或者继发性坏死细胞的最终去处:(1)调理坏死细胞及其细胞碎片像凋亡细胞样被清除,(2)坏死的细胞碎片被细胞外的蛋白水解酶和核水解酶消化,随后降解的巨分子被重吸收。

坏死的细胞也能通过吞噬清除。与凋亡细胞不同,坏死的细胞经历了胞膜的破坏被裂解后导致细胞成分扩散进入细胞外间隙,这样使巨噬细胞很难收集碎片。与凋亡的细胞相比,坏死的细胞的吞噬不是那么高效,而且发生较晚。坏死的细胞吞噬的机制被认为是巨噬饮作用,胞膜完整与否不重要。巨噬细胞形成广泛的膜皱褶最后形成一个长的细的突起,后者蜿蜒包裹坏死的碎片,促使坏死细胞碎片与细胞外液体一起在巨噬饮体中被消化。而凋亡细胞被消化是通过吞噬过程中拉链样的机制,这个过程的发生需要一个未受损的质膜的存在。

原发性坏死以细胞肿胀、浆膜通透性增加、线粒

体膜高通透性和氧化呼吸爆发。继发性坏死表现为小的已释放凋亡小体和的细胞残骸,比原始活细胞少一些的胞浆(释放了凋亡小体)围绕几乎没有染色体的残核。因此原发性坏死细胞大、继发性坏死细胞小。原发性坏死通过巨噬饮被清除;而凋亡细胞和继发性坏死被吞噬清除。凋亡细胞继发性坏死失去染色体;凋亡细胞继发性坏死失去染色体被外源性蛋白-Ⅶ因子活化蛋白酶(FSAP),继发性坏死细胞的和核小体结合FASP,FASP与DNA酶Ⅰ协同促进染色体释放。最近发现继发性坏死细胞可以结合补体C1q,补体C1q结合磷脂酰丝氨酸,继发性坏死细胞表面磷脂酰丝氨酸多余凋亡细胞。结合补体C1q进而活化补体级联反应,C1q结合刺激DNA酶Ⅰ介导的染色体释放。FASP、DNA酶Ⅰ和C1q参与坏死细胞失去染色体,是继发性坏死细胞清除的生理过程。为什么外源FASP、DNA酶Ⅰ和C1q参与继发性坏死细胞清除而非原发性坏死可能是形态的不同,因为继发性坏死细胞核比原发性坏死细胞核更容易接触外源FASP、DNA酶Ⅰ和C1q^[1,10-13]。

研究发现了补体系统参与吞噬细胞识别和吸收晚期凋亡/坏死细胞的新途径,C1q,IgM,IgG,MBL,CRP,SAP,富含组氨酸糖蛋白(HRG),血小板反应蛋白-1(TSP-1),硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)等分子在补体激活过程发挥重要作用,有助于坏死细胞的清除。理解支撑这些途径的分子机制,可能有助于揭示早期凋亡细胞与晚期凋亡/坏死细胞吞噬清除的免疫结果之间的差异。

晚期凋亡和坏死细胞也可以释放内源性危险信号——警报素引发促炎反应对抗组织损伤,晚期凋亡细胞中分泌的DAMPs与原发性坏死细胞中释放的有明显差异。例如,原发性坏死细胞以自由单体形式释放HMGB1,当细胞处于继发性坏死阶段时HMGB1以核复合体的形式存在,该复合体具有强烈的促炎反应和促进对吞噬细胞的联合刺激信号的提呈作用,其他见表1。几个比较坏死细胞与凋亡细胞被未成熟树突状细胞(iDC)吞噬的研究揭示:与凋亡细胞不同,原发性和继发性坏死细胞的消化促进iDC的成熟并表达迁移到次级淋巴器官的所需的趋化因子受体,有效地将抗原提呈到CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T细胞。

免疫系统可以使用一个广泛的受体和调理素的识别晚期凋亡/坏死细胞和病原体,这一过程招募大量吞噬细胞到组织损伤或感染部位调节免疫反应的质量。TLRs作为细胞表面一种重要的PRRs,除了识别PAMPs之外,还能检测晚期凋亡/坏死细胞释放的内源性危险信号,调控抗炎或促炎免疫应答。肿瘤患者经过放疗和化疗后产生死亡肿瘤细胞释放HMGB1,与DCs表面的TLR-4结合,激活DCs和调节递呈肿瘤相关抗原,诱导特异性免疫应答杀死癌细

胞。C-型凝集素,如主要表达于巨噬细胞上的 Min-
cle,表达于 CD8 α^+ DC 细胞上 Clec9A,有研究发现其可作为巨噬细胞和树突细胞表面激活受体,识别晚期凋亡和坏死细胞释放的危险信号;Treml4 能与辐射处理的晚期凋亡和热杀死的坏死胸腺细胞特异性结合。尽管 Treml4 识别晚期凋亡/坏死细胞的生理作用还需要进一步分析,Treml4 在脾脏巨噬细胞和 CD8 α^+ DCs 高水平表达表明,Treml4 同其他调节素家族成员,可能在激活 DC 和巨噬细胞介导坏死细胞清除方面扮演着重要角色。随着越来越多的识别机制被发现,确定这些不同的识别系统所引起的下游信号通路是如何相互作用的,以及特定的信号通路是否占主导地位将成为研究的目标。

坏死细胞吞噬后的免疫结果是坏死细胞的摄入仅能增强但是不能有效诱导巨噬细胞的活化。坏死裂解的中性粒细胞通过释放巨噬细胞炎症蛋白 2,IL-8,IL-10 和 TNF- α 诱导促炎反应。在坏死中性粒细胞被摄取的过程中,从坏死中性粒细胞释放的丝氨酸蛋白酶弹性蛋白酶成为一个促炎危险信号。高迁移率族蛋白 1(HMGB-1)也是一个危险信号,它产生的炎症效应不仅有它作为趋化因子的作用,也有其诱导促炎细胞因子的能力的作用。危险信号的另一个作用在热休克蛋白 HSP72 上被揭示,与它单独作用相比,HSP72 与 LPS 协同刺激巨噬细胞会产生更强的细胞因子反应。

表 1 原发性坏死和继发性坏死的区别

项目	原发性坏死	继发性坏死
形态	大	小
入胞方式	巨胞饮	吞噬
失去染色质	否	是
HMGB-1	游离还原型	核小体结合氧化型
单尿酸微结晶	低	高
膜联蛋白 A1	低	高
非血红素铁结合糖蛋白——乳铁蛋白	低	高
前列腺素 E2	低	高
诱导胆固醇外排	否	是
IL-33	全长	截短
ATP	高	低

与坏死细胞清除有关的细胞外机制:坏死细胞碎片清除的第 2 个主要方式是细胞外酶促进清除,随后巨分子被吞噬细胞重吸收。促进水解的酶包括出现在循环和细胞外液中的核酶和水解酶系统(凝血和纤溶系统),或者由募集而来的活化吞噬细胞分泌的酶。此外,通过细胞自身释放的溶酶体酶自溶可能在某些情况下也起作用。体外实验证实,与凋亡细胞相比,坏死细胞的清除发生较晚,因为膜破裂后,细胞内成

分是自由流动的,巨噬细胞很难收集坏死细胞碎片。血浆内源性核酶 DNA 酶 I 和纤溶酶原系统成分能穿透坏死细胞,在细胞和核结构的纤溶酶原被纤溶酶原活化后,纤溶酶原被转化为活化的丝氨酸蛋白酶-纤溶酶。纤溶酶降解染色质的结构性蛋白如组蛋白,促进 DNA 酶 I 降解染色质。补体 C1q 可以结合 DNA,也能穿透坏死细胞,去结合核成分。C1q 可促进染色质被血清 DNA 酶 I 的降解。还有,C1q 可调理坏死细胞来源的核和染色质被巨噬细胞摄取^[1]。

3 死亡细胞清除的抗炎和促炎作用

细胞死亡是机体组成发育及其平衡的重要组成部分,细胞死亡后能够迅速被邻近细胞或巨噬细胞识别吞噬及消化。死细胞自身或细胞死亡时释放的物质有利于死亡细胞的清除及免疫学转归。

研究发现凋亡细胞主要通过释放 S100 核糖体蛋白二聚体、内皮-单核细胞激活多肽 II、血小板反应蛋白-1、溶血磷脂酰胆碱、1-磷酸鞘氨醇、核苷酸、Fractalkine 等趋化信号分子招来吞噬细胞,启动清除过程。大多数关于凋亡细胞被巨噬细胞吞噬后的免疫学结局是没有炎性反应或者一个已经存在的促炎反应在吞噬发生后被下调^[12-13]。巨噬细胞消化凋亡细胞后的抗炎效应的发挥主要是分泌及上调 TGF- β 、血小板活化因子、IL-10 和前列腺素 E2 的表达水平。许多研究揭示未成熟的树突状细胞(iDC)在消化凋亡的细胞后并不能成熟为向 T 细胞提呈自身抗原的抗原提呈细胞。由于细胞内的生物大分子和细胞器都有一定的寿命,当它们衰老时,溶酶体将其包围形成自噬小体,进一步消化利用。

坏死细胞则主要通过危险信号如高迁移率族蛋白 1、S100 蛋白、热休克蛋白、三磷酸腺苷、尿酸、IL-33、IL-1 α 等物质启动和介导炎性反应。然而任何一个信号都不能独立执行功能,多种信号间往往相互联系与制约,共同构成了死细胞清除的信号网络^[11-13],见图 3。

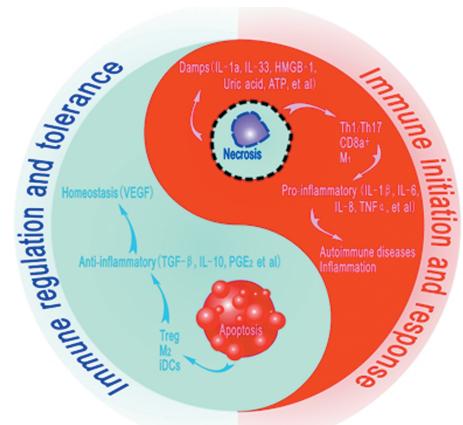


图 3 不同方式死亡细胞清除表现促炎性和抗炎性反应

坏死细胞清除与病原体清除的相似性:随着越来

越多的识别和吞噬通路被发现,人们认识到先天免疫系统的PRMs如C1qMBL、CRP、HRG有一个明显的共同特征是它们能够与各种带负电的分子如DNA、RNA、磷脂和磷酸化黏多糖等相互作用,可以识别病原体和膜受损细胞如晚期凋亡和坏死细胞。然而病原体和受损细胞膜如何能够可以暴露相似的或相同的配体以触发相同的PRMs的识别呢?这可能是与晚期凋亡和坏死细胞所暴露出来的内源性DAMPs有关。通过TLR、淀粉样蛋白、纤维凝胶蛋白-2(Ficolin-2)、C1q、MBL对普遍遗传物质DNA和RNA的识别,说明PRMs能够感知病原体衍生核酸和在晚期凋亡/坏死宿主细胞中发现的类似核酸的结构。此外,这些PRMs也有可能检测到与病原体衍生的分子相似的垂死细胞的修饰结构,如在凋亡细胞死亡过程中,磷脂和低密度脂蛋白的氧化可以产生类似于细菌和真菌多糖的PCh头基的结构,可以被CRP和某些天然抗体识别。

4 死亡细胞清除与临床

4.1 增强吞噬细胞吞噬能力,有助于凋亡清除及抗炎治疗 糖皮质激素长期作用于巨噬细胞,巨噬细胞处理凋亡细胞能力增强;他汀类药物能抑制RhoA,促进气道巨噬细胞吞噬凋亡细胞;PPAR γ 激动剂诱导CD36表达,促进气道巨噬细胞吞噬凋亡细胞;大环内酯类抗生素(如红霉素、克拉霉素、阿奇霉素等)除了抗菌作用外,也可促进吞噬能力;GM-CSF通过促进MFG-E8表达促进凋亡清除^[1]。

鱼腥草(Herba houttuyniae)可以增强白细胞的吞噬能力,具有抗炎、抗辐射作用,并有镇痛、镇咳、镇静、抗惊厥、止血、抑制浆液分泌、促进组织再生和伤口愈合等作用。柴胡(Radix bupleuri)促进吞噬细胞吞噬能力。Xu HD等黄芪多糖和黄芪甲苷(Astragalus polysaccharides and astragalosides)能促进巨噬细胞吞噬结核杆菌。葛根含大豆昔元(daidzein)通过增加Rac1活性促进吞噬细胞吞噬能力。密花石斛(Dendrobium)中的多糖促进吞噬细胞吞噬能力^[14-19]。

4.2 死亡细胞清除与检验医学——警报素既是免疫警报又是疾病警报 警报素(alarmins)机体处于组织损伤和炎症反应状态或生理应激时,细胞释放到胞外的内源性生物介质,也称为危险相关分子模式(DAMPs)。通过趋化和激活抗原递呈细胞(APC)等免疫细胞从而增强固有免疫和适应性免疫应答。它与疾病的产生发展及转归密切相关,对于临床诊疗具有重要的指导意义^[21]。

严重损伤或出血性休克时HMGB1作为机体晚期的促炎介质,在30~60 min内释放,24~48 h达到顶峰,致使各器官系统功能障碍(MODS),发生全身炎性反应综合征(SIRS),最后可能引发败血症。

在动脉粥样硬化(AS)病程中,平滑肌细胞

(SMCs)、内皮细胞、巨噬细胞、泡沫细胞、活性血小板在受刺激的情况下会分泌HMGB1,在斑块破裂后S100A12水平大幅上升,可作为评估冠状动脉疾病的生物学标记物。

中风又称脑卒中(ischemic stroke)死亡细胞的碎片释放HMGB1、HSP、ATP、S100蛋白等内源性DAMPs,激活免疫系统导致中枢神经系统损伤(CNS)。老年痴呆症(AD)是最常见的神经退行性疾病,导致渐进性的记忆丧失和认知功能障碍。HMGB1、S100B、S100A8、HSP等直接参与到神经性炎症的免疫活动中。

Pouwels S D^[22]和本文研究表明,吸烟人群相比于不吸烟人群的肺液或肺血清中HMGB1、S100A8/A9以及IL-37的含量有增加。患者在受到香烟刺激时,促使内皮细胞释放IL-33,减少了Th-2细胞相关细胞因子(IL-5、IL-13)的分泌,增加了其在巨噬细胞和NK细胞中的表达,促使TNF α 、IL-12和IFN- γ 的释放,从而加重COPD患者炎症。本文还发现吸烟导致凋亡清除分子乳脂球表皮生长因子8表达降低,导致死亡细胞清除减少,DAMPs进一步增加^[23]。

肿瘤细胞内钙离子变化以及炎症刺激时,上皮细胞释放HMGN1,细胞外的HMGN1可作为极化Th1的警报素,促进了先天性和适应性的抗肿瘤免疫应答。

总之,研究不同细胞死亡及其清除,包括警报素对免疫和疾病的预警,可能成为疾病诊断和辅助诊断的指标;药物含中药对胞葬的阴阳调控有望成为新的治疗手段和靶标。

参考文献

- [1] 崔天盆,郑承红,陈红辉.死亡细胞与清除[M].北京:科学出版社,2015:89-98.
- [2] KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1):3-11.
- [3] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS J M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1):107-120.
- [4] GALLUZZI L, BRAVO-SAN PEDRO J M, VITALE I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 [J]. Cell Death Differ, 2015, 22(1):58-73.
- [5] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(3):486-541.
- [6] 苏斌涛,崔天盆.细胞死亡清除的趋化和危险信号分子[J].医学分子生物学杂志,2011,8(6):538-541.

- [7] 崔天盆, 郑承红, 陈杰, 等. 细胞死亡方式及其清除[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(6): 843-846.
- [8] ZENT C S, ELLIOTT M R. Maxed out macs: physiologic cell clearance as a function of macrophage phagocytic capacity[J]. FEBS J, 2017, 284(7): 1021-1039.
- [9] GREEN D R, OGUIN T H, MARTINEZ J. The clearance of dying cells: table for two[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(6): 915-926.
- [10] SACHET M, LIANG Y Y, OEHLER R. The immune response to secondary necrotic cells[J]. Apoptosis, 2017, 22(10): 1189-1204.
- [11] HENSON P M. Cell Removal: Efferocytosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2017, 33: 127-144.
- [12] KUMAR S, CALIANESE D, BIRGE R B. Efferocytosis of dying cells differentially modulate immunological outcomes in tumor microenvironment [J]. Immunol Rev, 2017, 280(1): 149-164.
- [13] MARTINEZ J. Prix Fixe: Efferocytosis as a Four-Course Meal[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 403: 1-36.
- [14] POON I K, HULETT M D, PARISH C R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(3): 381-397.
- [15] HU S, CAI W, YE J, Et al. Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils[J]. Zentralbl Veterinarmed A, 1992, 39(8): 593-599.
- [16] CHENG X Q, LI H, YUE X L, et al. Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharides from the roots of *Bupleurum smithii* var. *parvifolium*[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(2): 363-368.
- [17] XU H D, YOU C G, ZHANG R L, et al. Effects of Astragalus polysaccharides and astragalosides on the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by macrophages [J]. J Int Med Res, 2007, 35(1): 84-90.
- [18] YEN J H, YANG D J, CHEN M C, et al. Daidzein enhances efferocytosis via transglutaminase 2 and augmentation of Rac1 activity[J]. Mol Immunol, 2014, 60(2): 135-142.
- [19] LAW B Y, MOK S W, WU A G, et al. New potential pharmacological functions of Chinese herbal medicines via regulation of autophagy[J]. Molecules, 2016, 21(3): 359.
- [20] MENG L Z, LV G P, HU D J, et al. Effects of polysaccharides from different species of *Dendrobium* (Shihu) on macrophage function[J]. Molecules, 2013, 18(5): 5779-5791.
- [21] 全紫瑶, 谢圣高, 崔天盆. 警报素既是免疫警报又是疾病警报[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(6): 935-938.
- [22] POUWELS S D, HESSE L, FAIZ A, et al. Susceptibility for cigarette smoke-induced DAMP release and DAMP-induced inflammation in COPD[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 311(5): L881-892.
- [23] WANG Y, LUO G, CHEN J, et al. Cigarette smoke attenuates phagocytic ability of macrophages through downregulating Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) expressions[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42642.

(收稿日期: 2018-05-19 修回日期: 2018-07-28)

• 综述 •

雷公藤甲素抗肺癌的分子机制研究及其进展^{*}

操蓓蓓¹, 巩晓婷² 综述, 王伟^{2△} 审校

(1. 浙江中医药大学医学技术学院, 浙江杭州 310053; 2. 浙江省立同德医院检验科, 浙江杭州 310012)

摘要: 肺癌是发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一, 现研究发现多种中药成分具有良好的抗肿瘤效果。雷公藤甲素(TPL)是从中药雷公藤中提取的脂溶性物质, 具有抗氧化、抗炎、免疫抑制等生物活性及药理学作用, 其抗肿瘤活性及作用机制受到了广泛关注。目前发现, TPL 抗肺癌作用的机制可能包括抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、抑制细胞侵袭转移、增强化疗药物敏感性等。本文就 TPL 抗肺癌作用的相关机制进行综述。

关键词: 雷公藤甲素; 肺癌; 分子机制**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.022**文章编号:** 1673-4130(2018)24-3081-06

肺癌是当今世界常见的恶性肿瘤之一, 发病率逐年增高。据 2015 年中国癌症统计, 约有 601 200 人死于肺癌^[1]。其中非小细胞型肺癌占 85%, 由于被确诊

中图法分类号: R285.5**文献标识码:** A

已处于中晚期, 5 年生存率低。肺癌的病因很大程度与吸烟有关, 其次是遗传因素、空气污染等。肺癌常见治疗手段为手术、化疗和放疗, 然而化疗和放疗的

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774026)。[△] 通信作者, E-mail: wangweihz8@163.com。

本文引用格式: 操蓓蓓, 巩晓婷, 王伟. 雷公藤甲素抗肺癌的分子机制研究及其进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(24): 3081-3086.