

巨胞饮的机制及功能的研究进展^{*}

秦绿叶^{1,2} 刘爽¹ 汪沉然¹ 王均辉¹ 岳鑫¹ 于常海¹

(¹北京大学神经科学研究所,北京 100083; ²河南大学医学院,开封 475000)

摘要 巨胞饮 (macropinocytosis) 是内吞的一种形式,指在某些因素刺激下,细胞膜皱褶形成大且不规则的原始内吞小泡,它们被称为巨胞饮体。巨胞饮体的直径一般为 0.5~2 μm,有时可达 5 μm。与其它内吞形式的小泡相比,巨胞饮体直径较大,为非选择性地内吞细胞外营养物质和液相大分子提供了一条有效途径。最近的研究表明,巨胞饮具有清除凋亡细胞、参与免疫反应、介导某些病原菌侵袭细胞、更新细胞膜等功能。

关键词 巨胞饮;机制;功能

中图分类号 Q25

内吞作用 (endocytosis) 是细胞质膜通过变形运动将细胞外物质转入细胞内的过程。内吞作用被广义地分为两类,吞噬作用 (phagocytosis) 和胞饮作用 (pinocytosis)。吞噬作用是指内吞大的颗粒物质 (> 200 nm); 胞饮作用是指内吞细胞外液体。胞饮作用根据其产生的机制不同分为 4 种: 网格蛋白依赖的内吞 (clathrin-dependent endocytosis)、陷穴蛋白依赖的内吞 (caveolin-dependent endocytosis)、巨胞饮 (macropinocytosis)、网格蛋白和陷穴蛋白非依赖的内吞 (clathrin-and caveolin-independent endocytosis)。

在实时微电影术的早期, Warren Lewis 首先发现了巨胞饮的存在^[1] (Lewis 1931)。以后的研究发现,巨胞饮在巨噬细胞和树突状细胞中发挥主要作用,在许多肿瘤细胞中也存在。某些细胞在受营养因子或佛波酯的刺激后会出现巨胞饮。本文就巨胞饮的特点、调节机制、信号通路以及功能作一总结。

一、巨胞饮的特点

巨胞饮是内吞的一种形式,指在某些因素刺激下,细胞膜皱褶形成大且不规则的原始内吞小泡,它们被称为巨胞饮体。巨胞饮体的直径一般为 0.5~2 μm,有时可达 5 μm。它为非选择性地内吞细胞外营养物质和液相大分子提供了一条有效途径。分子量为 70kD 的罗丹明 B 异硫氰酸盐标记的右旋糖苷 (rhodamine B isothiocyanate (RITC)-dextran) 常作为荧光标记物显示巨胞饮体的形成过程中内吞细胞外物质。分光荧光计及流式细胞仪用来检测细胞在不同状态下巨胞饮发生的效率。

(一) 与网格蛋白依赖和陷穴蛋白依赖的内吞

过程不同 巨胞饮体的形成主要在细胞膜皱褶部位,通常在伸展细胞的边缘,能显著地被细胞松弛素 D 和秋水仙碱抑制,提示微管和微丝在这个过程中扮演重要角色。巨胞饮体大小不一。由网格蛋白包被形成的小泡直径在 100~150 nm 之间,由陷穴蛋白包被形成的小泡直径在 50~80 nm 之间。巨胞饮体却没有网格蛋白或陷穴蛋白包被,其在早期形成阶段与肌动蛋白密切相关。巨胞饮体的直径较大,其表面积与体积比低于直径较小的小泡,为非选择性内吞细胞外营养物质和液相大分子提供了一条有效的途径^[1,2]。

(二) 与吞噬过程不同 在细胞吞噬过程中,由肌动蛋白富集的伪足吞噬大的颗粒物质形成吞噬体。巨胞饮体如同没有颗粒内容物的吞噬体^[3] (Araki 等, 1996)。巨胞饮和吞噬作用均是肌动蛋白依赖,网格蛋白非依赖的过程。它们受到多种蛋白的调节。两者的区别在 Dictyostelium 阿米巴变形虫中研究较多。这些调节蛋白分为三类: 第一类蛋白是正性调节吞噬和巨胞饮 (如肌动蛋白、Scar 蛋白、AP-1 连接复合体^[4]); 第二类蛋白仅正性调节吞噬,而对巨胞饮没有作用的蛋白 (如 RabB), 或负性调节巨胞饮的蛋白 (如 Rap1); 第三类蛋白仅正性调节巨胞饮,而对吞噬没有作用的蛋白 (如 LmpA), 或负性调节吞噬的蛋白 (如 profilin) (Cardelli 等, 2000)。

^{*} 国家自然科学基金 (30270426, 30470543) 和北京市自然科学基金 (7032026, 7051004) 资助课题
通讯作者

(三)细胞膜皱褶形成的程度不同,导致了巨胞饮产生的速率不同。膜皱褶的倾向和细胞的表面积与体积之比有关。细胞质突出越明显,越有可能发生巨胞饮,形成巨胞饮体。

(四)巨胞饮体在不同细胞中的最终去路有所不同。巨胞饮体在细胞内存在的时间较短,大约 5~20分钟。在巨噬细胞中,巨胞饮体向细胞中心移动,由脱水而变小,酸化。在其短暂的存在期,它们从早期胞内体样的细胞器(an early-endosome-like organelle)转变成晚期胞内体样的细胞器(a late-endosome-like organelle),然后与溶酶体完全融合(Racoosin和 Swanson 1993)。在转变过程中,它们与其它巨胞饮体和胞内体相互作用,并能从年轻的和年老的细胞器接受液体,但很少再与细胞表面融合(Berthiaume等, 1995)。相反,人 A431细胞中的巨胞饮体除了与其它巨胞饮体作用外,几乎不与胞内体作用。它们呈现为一种特殊的布雷菲德菌素 A(brefeldin-A)抗性的胞内体群,最终将内容物循环至细胞表面(Hewlett等, 1994)。

(五)细胞膜皱褶和巨胞饮的形成对细胞质的酸化非常敏感。在巨噬细胞中酸化细胞质可显著地降低细胞膜皱褶运动;相反,碱化细胞质可增强细胞膜皱褶运动(Heuser等, 1989)。在 A431细胞中细胞膜皱褶和巨胞饮可被阿米洛利和其强效类似物二甲基阿米洛利所抑制,它们是通过抑制细胞膜上的钠/氢交换蛋白,降低细胞质中的 pH 值发挥作用的(Zhuang等, 1984, Dowrick等, 1993)。但目前还不清楚细胞质的 pH 是如何影响细胞膜皱褶和巨胞饮形成的。

二、巨胞饮的产生和作用机制

在某些因素刺激下,如用生长因子或佛波酯处理,可引发细胞产生快而明显的巨胞饮反应。特异的外界刺激通过何种信号通路导致巨胞饮的产生呢?研究结果表明,巨胞饮受到以下几方面调节。

(一)PB激酶 已知 PB激酶信号通路与多种生长因子的信号转导有关。目前的研究结果表明,巨胞饮的形成存在两种机制。一种是 PB激酶依赖的细胞膜环形皱褶关闭形成巨胞饮体^[5](Amyere等, 2000),另一种是 PB激酶非依赖的,肌球蛋白 II依赖的细胞膜皱褶关闭形成巨胞饮体(Araki等, 2003)。

(二)Rac1 Rac是 Rho 蛋白家族的成员之一, Ridley等(1992)首次报道 Rac1 可促进细胞伪足和细胞膜皱褶的形成。研究表明,微注射活化形式的

Rac1 可诱导细胞膜皱褶的产生。Rac 调节肌动蛋白复合物在细胞膜的聚合,形成细胞膜皱褶前列的边缘^[6]。Grimmer等发现, A431 细胞在佛波酯(蛋白激酶 C 的强大的激活剂)的诱导下可产生巨胞饮。Rac1 被佛波酯激活后定位在细胞膜上,在这里它诱导微丝的重构,而微丝的重构又是细胞膜皱褶形成所必须的。虽然细胞膜皱褶的形成并不总是导致小泡的形成,但它的形成是巨胞饮的前提条件。佛波酯在许多类型的细胞中可刺激细胞产生细胞皱褶,目前已经明确在 Swiss 3T3 细胞中它是通过激活内源性的 Rac 发挥作用的。由生长因子如血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)(Hewlett等, 1994)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)(Racoosin 和 Swanson 1992)刺激引起巨胞饮,以及由 L-4(Salusto等, 1995)、佛波酯(Swanson 1989)引起的巨胞饮,它们引发的信号通路都导致 GTPas Rac 的活化,而 GTPas Rac 与调节巨胞饮有关。

(三)P21活化的激酶(P21-activated kinases, PAKs) P21活化的激酶(PAK1, 2, 3)是一组 62~68 kD 的丝氨酸/苏氨酸激酶,被认为是 GTPase Rac 和 Cdc42 的靶蛋白, GTP 结合形式的 Rac 和 Cdc42 通过结合一个特殊的 N 末端 p21 的结合位点增强了 PAKs 的活性,从而减弱了一个毗邻激酶区域对 PAK 的自我抑制(Knaus 和 Bokoch 1998)。已知 PAKs 在 Rac 和 Cdc-42 调节的几个信号通路中作为效应蛋白参与调节吞噬细胞 NADPH 氧化酶, p38 和 C-jun N 末端激酶的活化以及对肌动蛋白细胞骨架的调节。Dhamawardhane 等在 NIH3T3 细胞系中表达不同的 PAK 载体来研究 PAK 调节巨胞饮的机制。在 PDGF 的诱导下, PAK1(H83, 86L)和 PAK1(T423E)突变体能显著提高 NIH3T3 细胞对 70kD 右旋糖苷的吸收。野生型的 PAK1 和空载体都不能增强巨胞饮。这些结果提示 PAK 激酶的活化是生长因子诱导的巨胞饮所必须的^[7](Sells等, 1999)。

(四)肌球蛋白 肌球蛋白是促进微丝移动的蛋白,约有 13 种。肌球蛋白 II 由两条重链和两对轻链组成,形似豆芽状。轻链的作用之一是使重链头部发生构象变化,暴露出与肌动蛋白结合位点。肌球蛋白轻链磷酸化的状态受到 PAK1 的调节,最终通过肌球蛋白 II 调节细胞运动(Sells等, 1999)。肌球蛋白与肌动蛋白相互作用受到肌球蛋白轻链磷酸化的调节,提示肌球蛋白在巨胞饮中参与了细胞运动。Araki 等的研究结果表明, ML-7(一个肌球蛋

白轻链激酶抑制剂)能够显著地降低细胞膜皱褶的运动,阻断巨胞饮体的形成(Araki等, 2003)。

(五)WASP相互作用蛋白(WASP-interacting protein, WIP)在Rho蛋白家族的效应蛋白中,有一些属于Wiskott-Aldrich syndrome protein(WASP)家族。如,N-WASP介导由Cdc42诱导的伪足的形成和WAVE/Scar介导由Rac引起的细胞膜皱褶的形成。WIP在多种细胞中广泛分布,它在细胞膜皱褶形成中参与微丝的重构。Anton等研究表明在鼠纤维原3T3细胞中过表达WIP能增强由PDGF刺激引起的细胞膜皱褶的形成,微注射WIP的抗体能降低由PDGF刺激引起的细胞膜皱褶的形成。过表达缺乏肌动蛋白结合位点的WIP则阻断了由PDGF诱导的膜皱褶的形成^[8]。

(六)胆固醇 Grimmer等在A431细胞中研究了巨胞饮体的形成是否依赖细胞膜中胆固醇的存在。结果表明,去除细胞膜中的胆固醇抑制了由佛波酯诱导的细胞皱褶与巨胞饮体的形成。去除胆固醇虽然没有抑制佛波酯诱导的Rac1的激活,但却阻止了Rac1在细胞膜的定位,进而阻止了微丝的重构,细胞膜皱褶的产生,以及巨胞饮体的形成(Grimmer等, 2002)。

(七)Rab家族 Rab家族是一类小的GTPases,它们在调节巨胞饮体的最终去路中发挥重要作用。目前,在哺乳动物细胞中,已经发现50种以上的Rab家族成员^[9]。研究发现,在Rab家族的成员中,Rab7可促进巨胞饮体的成熟,Rab4和Rab5可能调节巨胞饮体与其它胞内体的相互作用。在吞噬细胞中,巨胞饮体失去转铁蛋白受体后,先获得又失去Rab7,接着再获得溶酶体膜蛋白Lgp-A14,与溶酶体完全融合^[11]。在巨胞饮体短暂的存在期中,它经历了一系列的生物化学改变和小泡融合反应,巨胞饮体的依次转变提示吞噬细胞中有一个类似细胞周期中调定点的调节控制存在。例如,当巨胞饮体从细胞膜上分离后微丝才从巨胞饮体上去除。当完成了Rac依赖的活动之后,才允许Rab5依赖的活动出现,Rab5依赖的活动完成后,才允许Rab7依赖的活动出现,等等。这种调节影响到巨胞饮体最终的去路。由于非吞噬细胞(A431细胞)缺乏使巨胞饮体成熟的机制,巨胞饮体不进行上述的阶段,从而返回到细胞表面^[11]。

巨胞饮体形成的过程受到多种因子的调节。在多种因素的刺激下,相应的受体酪氨酸激酶被激活,激活的受体快速自我磷酸化。磷酸化的残基招募

PB激酶并激活之,活化的PB激酶促使Rac-1的激活。活化的Rac1可能通过两条途径引起微丝的重构:第一,活化的Rac1激活PAK1,活化的PAK1调节肌球蛋白轻链的磷酸化状态。肌球蛋白与肌动蛋白的相互作用又受到磷酸化状态的肌球蛋白轻链的调节。肌球蛋白与肌动蛋白相互作用促进微丝的重构,细胞膜皱褶的产生,巨胞饮的形成;第二,活化的Rac1结合到其靶蛋白RSp53的氨基末端,R-Sp53的羧基末端的SH3区域与WAVE结合形成三分子复合体^[10],从而激活WAVE蛋白,活化的WAVE进一步激活肌动蛋白相关蛋白(actin-related protein)Arp2/3复合体。活化的Arp2/3复合体刺激微丝成核,促使微丝的重构,细胞膜皱褶的形成,巨胞饮的产生^[9]。更深入的调节机制还需进一步深入研究。

三、巨胞饮的功能

长期以来,巨胞饮被看作是细胞激活的一个附属事件。虽然巨胞饮提供了一条经济的途径最大程度去摄取液体,但巨胞饮功能还不是很清楚,因此对巨胞饮功能的研究引起了科学工作者的兴趣。最近的研究发现,巨胞饮主要有以下几种功能。

(一)清除凋亡细胞 在正常组织发育过程中,有效地清除凋亡的细胞是很重要的。在细胞膜的外层出现磷脂酰丝氨酸对凋亡的细胞来说是一个重大改变。许多受体曾经被提出介导凋亡细胞的吞噬,研究发现,尽管这些受体能与吞噬细胞相结合,但在没有磷脂酰丝氨酸的存在下,内吞作用是不会发生的。有研究发现,以磷脂酰丝氨酸受体介导的巨胞饮形式可促进清除凋亡细胞(Hoffmann等, 2001)。

(二)参与免疫反应 树突状细胞(dendritic cell, DC)是一类呈典型树突状或伪足状突起、膜表面高表达MHC类分子、能移行至次级淋巴器官和刺激初始型T细胞增殖活化、并具有一些相对特异性表面标志的专职抗原提呈细胞。DC在免疫应答的首要环节抗原提呈中扮演着重要的角色。DC的成熟过程是从抗原摄取型细胞向抗原递呈型细胞方向转化。未成熟DC捕获抗原的途径有三种:吞噬作用、巨胞饮、受体介导的内吞作用(Banchereau等, 1998)。DC通过巨胞饮这种方式非特异、非饱和地摄入大量的可溶性抗原,这种强大的液相吞饮能力部分弥补了其缺乏特异性抗原受体的缺点,使其能够更加有效地捕捉抗原(Sallusto等, 1995)。

(三)某些病原菌通过巨胞饮的形式来侵袭细胞 已有报道,淋球菌可通过巨胞饮的形式侵入人

的尿道上皮细胞, PI3 激酶的抑制剂 LY294002 和 wormannin 以及细胞松弛素 D 能抑制巨胞饮形式的侵入 (Zenni 等, 2000)。人类免疫缺陷病毒 I 型通过巨胞饮作用进入人的巨噬细胞 (Marechal 等, 2001)。CD-14 依赖的内毒素内吞入幼单核 THP-1X 细胞通过巨胞饮途径 (Poussin 等, 1998)。嗜肺军团菌通过巨胞饮的形式内吞入小鼠的吞噬细胞中 (Watarai 等, 2001)。沙门氏伤寒杆菌是一种肠病原体, 它可使小鼠产生一种类似于人类伤寒的一种疾病。病原体通过上皮细胞进入肠腔, 然后被巨噬细胞吞噬。伤寒杆菌通过巨胞饮形式进入吞噬细胞。由于巨胞饮体体积较大, 减缓了酸化的速率, 而使本来在通过吞噬作用形成的吞噬体 (相对小的体积) 中能最佳的发挥作用的抗菌防御体系偏离了方向, 反而增加了伤寒杆菌存活的几率。

(四)更新细胞膜 巨胞饮通过吞入细胞膜, 使细胞膜暴露在一个酸性环境, 然后再返回细胞表面而更新细胞膜。

四、结语

自从 Warren Lewis 发现巨胞饮至今, 对巨胞饮进行了深入全面的研究, 发现它具有多种功能。相信, 在不久的将来, 人类对巨胞饮的认识会更加深入。

参 考 文 献

1 Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis Trends Cell Biol,

- 1995, 5: 424 ~ 428
- 2 Riezman H, Woodman PG, Meer G, et al Molecular mechanisms of endocytosis Cell, 1997, 91: 731 ~ 738
- 3 Cardelli J. Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct Traffic, 2001, 2: 311 ~ 320
- 4 Lefkir Y, Malbouyres M, Gotthardt D, et al Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis Mol Biol Cell, 2004, 15: 861 ~ 869.
- 5 Amyere M, Mettlen M, Van Der SP, et al Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis Int J Med Microbiol, 2002, 291: 487 ~ 494.
- 6 Burridge K, Wennerberg K Rho and Rac take center stage Cell, 2004, 116: 167 ~ 179.
- 7 Dhamawardhane S, Schumann A, Sells MA, et al Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. Mol Biol Cell, 2000, 11: 3341 ~ 3352
- 8 Anton M, Saville SP, Byrne MJ, et al WIP participates in actin reorganization and ruffle formation induced by PDGF J Cell Sci, 2003, 116: 2443 ~ 2451.
- 9 Sun P, Yamamoto H, Suetsugu S, et al Small GTPase Rah/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation J Biol Chem, 2003, 278: 4063 ~ 4071.
- 10 Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, et al RSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling Nature, 2000, 408: 732 ~ 735.

肥胖时过表达的新的脂肪因子 apelin:是友是敌?

Apelin 是孤儿 G 蛋白偶联受体-血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白 (putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1, APJ) 的天然配体。Apelin 及其受体 APJ 在体内分布广泛。Boucher 等报道在分离出的人及小鼠成熟脂肪细胞有 apelin 的合成和分泌, 并认为 apelin 是一种新的脂肪因子。

肥胖时, 脂肪细胞过表达 apelin。研究表明, 胰岛素水平升高及脂肪细胞 TNF- α 水平升高是肥胖时脂肪细胞 apelin mRNA 及血浆 apelin 水平显著升高的主要机制。此外, 肥胖时脂肪细胞数量及体积的增大也是 apelin 表达升高的原因之一。

已知 apelin 是一种心血管保护物质, 具有扩张血管、降低血压和增强心肌收缩力等心血管效应。此外, apelin 还能抑制小鼠胰岛素的分泌, 参与机体糖代谢稳态的调节。由此, Castan-Laurell 等根据他们的实验研究和 apelin 的心血管调节功能推测, 肥胖时, 脂肪细胞过表达的 apelin 在肥胖引起的 2 型糖尿病、心血管功能障碍等多种病理生理过程中有着重要的保护作用。

(Mol Cell Endocrinol, 2005, Nov 17 [Epub ahead of print <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]) (张 靓 齐永芬)