

· 综述 ·

人免疫缺陷病毒感染中自体吞噬 发生机制及研究方法

吴淑玲 成军

艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)是由人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的疾病。自首例艾滋病于 1981 年由美国疾病预防控制中心公布以来, AIDS 肆虐全球, 严重威胁着人类的健康与生存。AIDS 的发病机制尚未完全清楚, 但可以明确的是 HIV 侵入人体后, 直接侵犯人体免疫系统, 攻击和杀伤的是人体免疫系统最重要、最具有进攻性的 $CD4^+$ T 淋巴细胞, 使机体逐渐丧失防御能力, 最终导致各种机会性感染和肿瘤。研究发现, HIV 进入人体后, 不仅直接感染的 $CD4^+$ T 淋巴细胞被杀死, 体内未受感染的旁观者 $CD4^+$ T 淋巴细胞也会被杀死。HIV 对正常 T 淋巴细胞的“死亡之吻”可能是通过一种被称为“自体吞噬(autophagy)”的作用实现的。

一、自体吞噬

自体吞噬是一种在演化上被保留下来的机制, 在进化过程中高度保守, 从酵母、果蝇到脊椎动物和人都可以找到参与自体吞噬的同源基因。早在上世纪 60 年代早期, Ashford 等^[1]用电子显微镜首次观察到此现象并对此过程进行了明确描述。自体吞噬, 源于希腊文, 顾名思义, 是一种自我吞食的机制, 它存在于多种不同类型的细胞中, 参与细胞的正常生长发育过程和维持代谢平衡; 在某些压力条件下, 如在损伤或营养缺乏等情况下, 该现象更为明显, 甚至在某些组织的癌变过程中也扮演着重要角色^[2]。所以, 自体吞噬一般被认为是让细胞在恶劣环境下可以继续存活而存在的机制, 饥饿时氨基酸匮乏诱导的自体吞噬能产生在分解代谢和合成代谢过程中所必需的中间代谢物^[3]。然而, 当这样的吞噬动作没有受到良好的控制时, 细胞会因过度的吞噬而走向死亡。因此, 自体吞噬的平衡点是细胞生或死的关键点。

自体吞噬属于 II 型程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)即自噬性程序性细胞死亡, 是一个吞噬自身细胞质物质并使其包被进入囊泡的过程, 其特征是通过早期激活溶酶体形成自体吞噬细胞, 最终使细胞走向死亡。相对于主要降解短半衰期蛋白质的泛素-蛋白酶体系统, 细胞的自体吞噬被认为是参与绝大多数长半衰期蛋白质的降解^[2,4]。在形态学上, 即将发生自体吞噬的细胞胞浆中出现大量游离的模型结构, 称为前自噬泡, 前自噬泡逐渐发展成为双层膜结构的空

基金项目:首都特色临床医学技术发展研究项目(Z07050700690702)

作者单位:100011 北京, 北京地坛医院传染病研究所

通讯作者:成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

泡,其中包裹着坏死性的细胞器和部分细胞浆,称为自噬泡。自体吞噬过程使进入自噬溶酶体中的物质分解为其组成成分,如蛋白质分解为氨基酸、核酸分解为核苷酸,并被细胞再利用,除可溶性胞浆蛋白之外,像线粒体、过氧化物酶体等细胞器或细胞器的一部分,如高尔基体和内质网的某中广泛存在的降解/再循环系统。

由于自体吞噬较少受到关注,而且很难在体外条件下实现,因此目前对自体吞噬的机制还不是很了解。两个泛素样蛋白系统、Ⅲ型磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶(Class Ⅲ PI3K)等可能为自体吞噬过程中的分子机制^[5-7]。参与自体吞噬过程的信号分子错综复杂,可能有以下信号途径:TOR(target of rapamycin)信号途径、Class I PI3K/PKB 途径。此外,Gαi3 蛋白和氨基酸及某些激素也参与自体吞噬过程的调节^[8-10]。

最初认为自体吞噬与凋亡(apoptosis)这两种程序性细胞死亡方式在形态、生化指标、参与分子和机理方面均存在不同,但近来研究提示二者很难明确区分^[11,12];在某些情况下它们可以相互拮抗或促进,可先后发生或同时共存于同一细胞,相同诱导因素在不同细胞中可分别诱发自体吞噬或凋亡;参与自体吞噬和凋亡的分子也可能存在交叉(如 Beclin 1)^[13]。

二、HIV 感染中自体吞噬发生机制

从 19 世纪 80 年代 AIDS 流行开始,甚至在 HIV 被鉴定出来之前,科学家们就发现 AIDS 的主要特点是 CD4⁺ T 淋巴细胞的数目减少。HIV 主要侵犯含有 CD4 表位的辅助性 T 淋巴细胞,使机体免疫功能部分或完全丧失,AIDS 的进展以 CD4⁺ T 淋巴细胞的进行性减少为特征。激发 CD4⁺ T 淋巴细胞死亡的机制尚未完全阐明,但是大量数据表明病毒诱导的 PCD 在其中扮演着重要的角色^[14-16]。近期的研究显示激发旁观者 CD4⁺ T 淋巴细胞的凋亡需要自体吞噬作用。

HIV 是逆转录病毒,其基因组全长约 9.8 kb,含有 3 个结构基因、2 个调节基因和 4 个辅助基因。HIV 根据基因差异可分为 HIV-1 型和 HIV-2 型,目前全球流行的主要是 HIV-1 型。HIV-1 感染的第一步是由其包膜糖蛋白 Env 与 CD4 及两种主要的共受体(coreceptor)CCR5、CXCR4 结合介导的。HIV-1 病毒的感染需要其 Env gp120 诱导 CD4 和共受体在细胞表面簇集,这些表面受体的簇集激活了 gp41,从而形成复合物以介导病毒包膜和靶细胞的结合。众所周知,CD4 分子是 HIV-1 感染靶细胞的主要受体,但单纯 CD4 分子对于病毒进入细胞既不是充分的,也不是唯一的途径。除 CD4 分子外,细胞膜上的其他某些分子也是 HIV 进入细胞所必需的,趋化性细胞因子受体 CXCR4 可辅助嗜 T 细胞性 HIV-1(X4 株)进入宿主细胞,CCR5 可辅助嗜单核/巨噬细胞性 HIV-1(R5 株)感染靶细胞,这些受体称为 HIV-1 入侵靶细胞的共受体,又称辅助受体。由于目前所发现的 HIV 的共受体绝大多数均是趋化性细胞因子受体,因此共受体一般多指趋化性细胞因子受体。CCR5 和 CXCR4 为趋化因子受体,属于 G 蛋白偶联受体。研究发现,使用 CCR5 的 HIV-1 株与前期炎症相关,而使用 CXCR4 的 HIV-1 株在 CD4⁺ T 淋巴细

胞的死亡和 AIDS 的快速进展中起主要作用。显然,细胞上表达的 X4 Env 与 CXCR4 结合,激发非感染 CD4⁺ T 淋巴细胞的凋亡。已经证实,不管 HIV-1 是否复制,表达 X4 Env 的转染细胞或 HIV-1 感染细胞诱导自体吞噬作用并通过 CXCR4 在非感染的 CD4⁺ T 淋巴细胞中累积凋亡基因 Beclin 1。同样的现象也发生在能同时表达野生型 CXCR4 和截短的 CD4(截短的 CD4 不能结合淋巴细胞特异性的蛋白激酶 Lck)的 T 细胞系和转染的 HEK 293 细胞中。由药物(3-甲基腺嘌呤和巴佛洛霉素 A1)或 Beclin 1/Atg6/Atg7 基因特异性的 siRNA 能在不同的环节完全抑制凋亡的过程,因此激发 CD4⁺ T 淋巴细胞的凋亡需要 Env 介导的自体吞噬,自体吞噬发生在非感染旁观者 T 细胞中 Env 诱导的凋亡之前。自体吞噬受到抑制后,CD4⁺ T 淋巴细胞仍会经历一个 Env 介导的有自体吞噬特点的细胞死亡。这些结果显示 HIV 感染的细胞能通过 Env 与 CXCR4 的接触诱导旁观者 CD4⁺ T 淋巴细胞的自体吞噬,导致自体吞噬样细胞死亡,这很可能是免疫缺陷的一个发生机制^[17-20]。

HIV-1 Env gp120 和 gp41 诱导的旁观者 CD4⁺ T 淋巴细胞的死亡是与免疫缺陷相关的一个过程。内皮组织和淋巴组织中感染细胞和非感染细胞的相互接触对于 HIV 的传播有重大意义^[21-23]。CXCR4/Env 相互作用在诱导线粒体转运膜去极化和半胱氨酸蛋白酶(caspase)活化中起到中心作用,此过程不依赖于 Fas 介导的信号途径和 Gi 蛋白活化^[24]。这种机制也许能解释疾病后期 X4 病毒株为何与 T 淋巴细胞的减少同时出现。CXCR4 主要在静息的幼稚表型细胞上表达,因此 X4 变异株显示出较强的加速未感染幼稚 CD4⁺ T 淋巴细胞死亡的有害作用^[25]。

在假设 HIV 诱导的旁观者幼稚 CD4⁺ T 淋巴细胞是免疫缺陷的中心环节的基础上,Espert 等^[18]观察了 X4 Env 是否能在已知的能诱导凋亡的条件下激发非感染 CD4⁺ CXCR4⁺ 细胞的自体吞噬。他们建立了 3 种细胞共培养模型来观察在没有病毒复制的情况下细胞表达的 Env 激发自体吞噬的能力。3 种模型均以表达 Env 的效应细胞和表达 CD4 和 CXCR4 的靶细胞为基础,建立这些模型用来进行体内研究不同的假想条件下细胞之间的相互作用。在模型 1 中首次观察到与 HEK 或 HEK Env 共培养的脐带血 CD4⁺ 靶 T 淋巴细胞的自体吞噬现象。自体吞噬作用是 Env 结合 CXCR4 后激发的。X4 Env 与 T 淋巴细胞表面的受体相互作用需要进行两个步骤:gp120 先与 CD4 结合使得 gp120 的 V3 环和 CD4i 区域得以更好的暴露,以便进一步再与 CXCR4 相互作用。为了鉴定这些受体在诱导自体吞噬中的作用,用模型 1 和模型 2 进一步深入研究,使用透射电镜进行观察,在与表达 Env 的效应细胞共培养的靶细胞中观察到自噬泡,而在与不表达 Env 的效应细胞共培养的靶细胞中观察不到自噬泡。表达 Env 的细胞诱导表达野生型 CXCR4 和截短型 CD4 的两种靶细胞中均有自噬泡的形成,而不表达 CXCR4 的细胞中则没有自噬泡,表明 Env 介导的自体吞噬与细胞类型无关,不需通过 CD4 来活化信号传导途径。

他们还观察到与表达 Env 的效应细胞共培养的表达 CD4. 403 和 CXCR4 细胞中 Beclin 1 的积聚, 而不表达 CXCR4 的细胞中则无此现象, 这表明 Env 介导的 Beclin 1 积聚依赖于靶细胞中 CXCR4 的存在, Beclin 1 的积聚加速自噬溶酶体的形成。AMD3100 是 CXCR4 的小分子抑制物, 能有效抑制 HIV-1 Env 诱导的凋亡^[26]。此实验中也观察到 AMD3100 能有效阻断 Env 诱导的凋亡, 抑制自噬泡的形成和 Beclin 1 的积聚。生理性的 CXCR4 配体 SDF-1 单独不能激发自体吞噬, 结合在 HIV-1 gp120 V3 环的苏拉明能抑制 Env 诱导的凋亡, 阻断自噬溶酶体的形成。这些结果表明了 gp120 结合 CXCR4 在激发自体吞噬中的作用, 这也是首次发现趋化因子受体能激发自体吞噬。

Env 与靶细胞上的 CXCR4 结合后既能激活凋亡^[24]又能激活自体吞噬^[18], 分别用两种途径的抑制物和特异性的 siRNA 进行研究, 发现 Env 介导的自体吞噬是 Env 介导的凋亡的前奏。发生细胞凋亡必须先有自体吞噬, 但需要强调的是, 发生了自体吞噬并不一定发生凋亡^[27-29]。在 Espert 等^[18]的研究中发现阻断自噬溶酶体形成的巴佛洛霉素 A1, 能完全抑制 Env 介导的凋亡, 表明发生凋亡需要完全的自体吞噬过程。这也意味着仅仅形成自噬泡, 不能单独诱导凋亡, 只有溶酶体降解到自噬泡中内容物才可诱发凋亡。

总之, HIV 感染后自体吞噬现象不仅发生在感染的 CD4⁺ T 淋巴细胞, 还发生于未感染的旁观者 CD4⁺ T 淋巴细胞。HIV 感染中的自体吞噬发生机制十分复杂, 它涉及 Env 的介导、CD4 两种共受体 CCR5 和 CXCR4 的重要作用、Beclin 1 的积聚加速自噬溶酶体的形成等过程。Env 介导的自体吞噬是 Env 介导的凋亡的前奏。

三、研究 HIV 感染中自体吞噬常用的方法

了解 HIV/AIDS 中的自体吞噬现象及可能发生的机制后, 再简要介绍一下研究 HIV 感染中自体吞噬常用的方法, 一般可从 3 个方面进行研究。第一、形态学方法: 电子显微镜是迄今为止研究自体吞噬唯一可信赖的方法, MDC (Monodansylcadaverine) 是一种荧光染料, 也可用作自噬泡的示踪剂^[30]。第二、检测自体吞噬的特异标记物: Beclin 被认为是哺乳动物的自体吞噬基因, 通过免疫印记检测 Beclin 1 的表达水平, 结合其他生化指标, 可对细胞的自体吞噬活性进行动态监测和判断; LC3 也是哺乳动物细胞的自体吞噬基因, 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面, 是细胞自噬泡膜的通用标记物, 通过构建 LC3 与绿色荧光蛋白或其衍生物的融合蛋白, 借助于荧光显微镜, 我们可以很方便的观察到 LC3 在细胞中的定位。细胞中新合成的 LC3 经过加工, 成为胞浆可溶性 LC3-I, 后者经泛素样加工修饰过程, 与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺结合, 称为 LC3-II。LC3-II 含量的多少在某种程度上反映了细胞的自噬活性, 在免疫印记试验中, LC3-II 较 LC3-I 更加敏感一些^[31]。第三、特异性抑制物: 3-甲基腺嘌呤是 PI3K 的抑制剂, 可特异性阻断自体吞噬中自噬泡与溶酶体的融合, 被广泛用作自体吞噬的抑制剂^[32]。另外, 巴佛洛霉素 A1、渥曼青霉素 (Wortmannin) 和 LY294002 也可用作自体吞噬的

抑制剂^[33]。

四、展望

目前分子生物学家和细胞生物学家对自体吞噬及自体吞噬性 PCD 的认识还处于初级阶段,关于自体吞噬过程中的信号转导、病理生理学意义的研究有待进一步深入,HIV 感染中 T 淋巴细胞的凋亡与自体吞噬有一定的联系和相关性,在 PCD 这样一个复杂的通路中,自体吞噬的作用同细胞凋亡一样不容忽视。随着研究的深入,一个个谜团的解开,HIV 感染中的自体吞噬发生发展过程可受到外界人为的精细调控,利用自体吞噬机制发展的临床治疗方法可更好的为人类服务。

参 考 文 献

- 1 Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*,1962,12:198-202.
- 2 Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*,2000,290:1717-1721.
- 3 Elmore SP, Qian T, Grissom SF, et al. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J*,2001,15:2286-2287.
- 4 Mortimore GE, Pösö AR. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr*, 1987,7:539-564.
- 5 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*,2004,36:2503-2518.
- 6 Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, et al. The mouse Apg10 homologue, an E2 like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J Biol Chem*,2003,278:39517-39526.
- 7 Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*,2004,36:2445-2462.
- 8 Klionsky DJ, Meijer AJ, Codogno P, et al. Autophagy and P70S6 kinase. *Autophagy*,2005,1:59-61.
- 9 Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*,2005,6:505-510.
- 10 Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*,2005,118:7-18.
- 11 Baehrecke EH. Caspase activation finds fertile ground. *Dev Cell*,2003,4:608-609.
- 12 González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, et al. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci*,2005,118:3091-3102.
- 13 Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity. *Exp Cell Res*,2005,307:26-40.
- 14 Maldarelli F, Sato H, Berthold E, et al. Rapid induction of apoptosis by cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*,1995,69:6457-6465.
- 15 Corbeil J, Richman DD. Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4⁺ T cells. *J Gen Virol*, 1995,76:681-690.
- 16 Laurent-Crawford AG, Krust B, Riviere Y, et al. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res Hum Retrovir*,1993,9:761-773.
- 17 Varbanov M, Espert L, Biard-Piechaczyk M. Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins. *AIDS Rev*, 2006,8:221-236.
- 18 Espert L, Denizot M, Grimaldi M, et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest*,2006,116:2161-2172.
- 19 Espert L, Denizot M, Grimaldi M, et al. Autophagy and CD4⁺ T lymphocyte destruction by HIV-1. *Autophagy*,2007,3:32-34.
- 20 Levine B, Sodora DL. HIV and CXCR4 in a kiss of autophagic death. *J Clin Invest*,2006,116:2078-2080.
- 21 Garcia E, Pion M, Pelchen-Matthews A, et al. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic*,2005,6:488-501.
- 22 Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, et al. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med*,2004,199:283-293.

- 23 Nobile C, Petit C, Moris A, et al. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DCSIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol*, 2005, 79:5386-5399.
- 24 Roggero R, Robert-Hebmann V, Harrington S, et al. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J Virol*, 2001, 75:7637-7650.
- 25 Hazenberg MD, Otto SA, Hamann D, et al. Depletion of naive CD4 T cells by CXCR4-using HIV-1 variants occurs mainly through increased T-cell death and activation. *AIDS*, 2003, 17:1419-1424.
- 26 Blanco J, Barretina J, Henson G, et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 efficiently inhibits cell-surface-expressed human immunodeficiency virus type 1 envelope-induced apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44:51-56.
- 27 Canu N, Tuff R, Serafino AL, et al. Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 2005, 92:1228-1242.
- 28 Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, et al. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ*, 2005, 12:1297-1309.
- 29 Jia L, Dourmashkin RR, Allen PD, et al. Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br J Haematol*, 1997, 98:673-685.
- 30 Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol*, 1995, 66:3-14.
- 31 Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 2004, 117:2805-2812.
- 32 Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79:1889-1892.
- 33 Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 1997, 243:240-246.

(收稿日期:2007-08-13)

(本文编辑:肖凡)