

· 综 述 ·

循环微粒的研究进展

焦燕综述,熊玮[△]审校

(第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

关键词:微粒体;炎症;免疫调节;血管生长

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.033

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)13-1530-03

循环微粒(circulate microparticle, cMP)是细胞激活、损伤或凋亡后从细胞膜脱落的直径小于 $1\mu\text{m}$ 的小囊泡,在糖尿病、心血管疾病、艾滋病、慢性炎症性疾病中发现循环微粒水平升高,且它的一些生物学活性(如细胞间生物活性信号的传导、免疫调节、血管生成、组织修复等)与疾病的发生、发展息息相关。对于它的认识还在不断地探索,其研究也越来越多,因此,本文主要就cMP的研究进展进行综述。

cMP是细胞受刺激或者活化后脱落于血液循环的细小颗粒^[1]。现已证实循环血液细胞及内皮细胞均可释放直径约 $0.1\sim 1.0\mu\text{m}$ 甚至更小的微粒,它们与母细胞有相似的基本特征。与凋亡小体、外来体不同,凋亡小体是细胞凋亡时以出芽方式形成的,直径大于 $1\mu\text{m}$;而外来体是由细胞活化后释放的囊泡颗粒,以外分泌的形式释放出来,直径大小为 $10.0\sim 100.0\text{nm}$ 。以往认为微粒只是单纯的无活性的细胞碎片。但越来越多研究表明cMP在生理和病理情况下充当重要的角色,尤其在抗凝、促炎、内皮损伤、血管收缩、诱导血管生长以及免疫调节等方面起重要作用,随这些领域的涉及cMP越来越受到关注。

1 微粒的产生机制

几乎每个个体在正常生理状态下都会检测到少量微粒,其中女性微粒水平微偏高,且受月经周期、昼夜节律的影响^[2-3]。cMP的水平取决于它产生和清除之间的平衡关系。在病理状态下产生的微粒数目显著增多。

微粒的形成过程包括细胞膜重塑和出芽。细胞膜骨架由肌动蛋白、肌球蛋白、肌钙蛋白、纽蛋白和踝蛋白等组成,是稳定细胞膜结构的主要物质。细胞膜骨架降解是微粒形成的前提,但细胞膜与膜骨架的相互作用机制仍不清楚。静息的正常细胞膜上存在两种酶:三磷酸腺苷(ATP)依赖性的氨基磷脂转位(ATP-dependent aminophospholipid-specific translocase, APT)与 Ca^{2+} 依赖性的脂质爬行酶(Ca-dependent nonspecific lipid scramblase, LS)。静息状态下具有活性的APT快速将磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)由细胞膜外层运向膜内层,因此这两种酶维持正常细胞膜磷脂不对称性分布。PS主要位于细胞膜内层,细胞受到促凝、促炎症刺激或发生凋亡时,可使PS与PE由内层转入外层,细胞质钙离子浓度升高,改变这两种酶的活性:APT活性受到抑制,LS被活化,使细胞膜重构,PS转位到细胞膜外层,从而导致细胞膜磷脂重新分布。研究发现,PS转移到细胞膜外层通常伴有细胞膜出泡发生。这种现象被认为是PS进入细胞膜外层时导致外层张力增加且高于内层张力,细胞膜由此形成小泡状结构,并最终发生脱落形成微粒。

微粒的形成机制通路比较复杂。细胞活化和凋亡时产生

的微粒不一样。细胞活化后的几分钟内细胞囊泡化便开始,且呈现时间和钙离子依赖,活化钙激活中性蛋白酶(calpain)而引起细胞骨架蛋白分子的变化,破坏维持细胞膜稳定的细胞骨架结构,继而细胞膜形成小泡状结构而向外突出,形成伪足;Calpain进一步作用于伪足,使其变形断裂,小泡状结构发生脱落成为血液中的微粒。细胞活化时依赖小乌甘酸三磷酸酶(Rho GTP酶)类激活Rho相关蛋白激酶(ROCK蛋白),它是Rho GTP酶类是细胞内调节细胞骨架肌动蛋白的信号分子,丝氨酸-苏氨酸激酶的两种亚型(ROCK I、ROCK II)被认为是Rho蛋白的效应器。ROCK蛋白被激活后促使肌球蛋白-肌动蛋白丝与质膜连接,使其收缩力增加,导致细胞收缩。而细胞凋亡时细胞膜出芽其ROCK蛋白主要被半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(caspase3)激活介导细胞收缩效应^[4],与Rho蛋白无关。由此可知,微粒的形成与ROCK蛋白的激活和细胞膜骨架结构紊乱有关。大多数微粒的形成以细胞膜骨架降解为前提,近年来提出少数微粒的产生不需要它的降解,且不伴随PS的暴露。研究发现,巨核细胞释放微粒时不伴随细丝蛋白的降解和PS的暴露^[5]。有学者提出了脂筏机制,脂筏与细胞膜骨架相互作用并参与激活信号时对微粒的产生有所影响^[6]。由于目前对于微粒的形成机制尚未完全明确,这此发现将会为cMP的产生机制提供更好的方向。

2 微粒的结构组成

微粒主要是由磷脂和蛋白质组成,但对微粒内部的具体成分,目前尚不完全清楚,可能含有细胞质成分和少量核碎片,近年来研究证明微粒还包括一些细胞受体、细胞质蛋白、核酸(RNA、microRNA、DNA)以及细胞因子^[7]。其中,微粒蛋白的成分与细胞受刺激的状态有密切关系,细胞凋亡和活化时产生的微粒所含的蛋白不同,因此,其生物学活性有差异。微粒表达不同的表面标记抗原,比如凋亡内皮细胞产生表达结构性标志(CD31和CD105)的内皮细胞微粒(endothelial microparticles, EMPs)显著增加,而表达可诱导标志(CD54和CD62E)的EMPs增加只在活化内皮细胞产生。这些表型可以作为标记物为判断微粒来源以及细胞功能状态提供有效的信息。

3 微粒的检测

目前微粒的检测方法主要包括激光共聚焦显微镜检测、流式细胞仪检测、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测、功能分析检测、细胞微粒的氟硼二吡咯一马来酰亚胺染色法和细胞微粒蛋白质组学为基础的分析等,目前主要用ELISA和流式细胞仪检测。现已有多种流式细胞标记物检测微粒,它们主要用于检测微粒的活化状态及其细胞来源。其中抗CD14、抗CD3/CD4/CD8、抗CD20和抗CD31/CD42b/CD62E抗体分别用于检测源于单核细胞、T淋

作者简介:焦燕(1987~),在读硕士研究生,主要从事慢性阻塞性肺疾病防治研究。△ 通讯作者, Tel: (023) 68765136; E-mail: xiongwei 64

@126.com。

巴细胞、B 淋巴细胞和内皮细胞所释放的微粒^[8]。但流式细胞仪检测的微粒受波长的限制,直径小于 0.3 μm 微粒难以检测。随着流式细胞检测技术的提高,尤其是阻抗式流式细胞仪的运用可以检测到 20 nm 左右大小的微粒。其他技术如数字捕获流式细胞仪、动态光散射、薄束光以及电化学阻抗谱等提高了微粒的检测。ELISA 法,以 Annex-inV 捕获微粒最为常用^[9],但这种方法易受其他可溶性抗原的干扰。此外全血或者血浆的储存时间和方式、样本的处理方式、不同的检测方法等都会影响微粒检测的结果,这些问题都值得探索。

4 微粒的分类、生物活性以及临床运用

根据微粒的来源,将微粒分为血小板微粒(platelet microparticles, PMPs)、粒细胞微粒(granulocyte microparticles, GMPs)、红细胞微粒(erythrocyte microparticles)、EMP 及淋巴细胞微粒(lymphocyte-derived microparticles, LMPs)等。研究者证实,在健康人群中,PMPs 在循环血液中所占的比例大约有 60%~70%,LMPs、GMPs 以及 EMPs 等所占比例大约是 30%~40%。最近有文献报道,在健康个体中,cMP 主要以 PMPs 和 EMPs 为主,分别占 38.5% 和 43.8%。微粒具有很多生物学活性,比如促凝、促炎、内皮损伤、血管收缩、血管生长以及免疫调节等。PMPs 和 EMPs 的研究较多。近年来粒细胞微粒广泛引起了人们的关注,尤其是在慢性炎症方面。

4.1 粒细胞微粒 粒细胞微粒包括中性粒细胞微粒、LMPs、单核细胞微粒等。在 cMP 中所占的比例较小。炎症细胞释放的微粒在免疫调节和炎症方面占有重要地位,主要通过释放一系列的炎症介质、细胞因子以及相关的黏附分子介导炎症反应。激活的多核中性粒细胞释放的微粒能使相关分子受体、髓过氧化物酶、弹性蛋白酶的表达升高,在一定程度上起到抗炎功效。粒细胞微粒在炎症调节方面有双重性,既有抗炎又有促炎作用。被甲酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP) 激活的粒细胞释放的微粒作用于人类内皮细胞使白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8 的表达上调加重炎症反应;被酵母多糖激活的人类巨噬细胞所释放的微粒使肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、IL-10、IL-8 的表达下调,减轻炎症反应。研究证实粒细胞微粒(单核细胞微粒和巨噬细胞微粒)通过分泌细胞因子和黏附分子加重气道损伤,主要通过上调 IL-8、细胞间黏附分子(ICAM-1)、单核细胞趋化因子(MCP-1)加重炎症反应^[10]。

T 淋巴细胞释放的微粒近年备受关注,尤其与慢性炎症的关系。研究证实,LMPs 本身能促进炎症介质的释放和黏附分子的表达,从而加重炎症反应。T 淋巴细胞释放的微粒可被巨噬细胞吞噬,进而引起巨噬细胞的凋亡从而释放更多的微粒,这一过程是通过花生四烯酸酯调节进行的^[11]。在自身免疫性疾病和慢性炎症性疾病中,往往伴随大量的淋巴细胞和巨噬细胞浸润,LMPs 可以直接调节单核巨噬细胞产生细胞因子和炎症介质,释放的 LMPs 促使巨噬细胞凋亡,进而释放更多的微粒导致炎症的扩大和反复。文献报道,在丙型肝炎中,流式细胞技术检测到患者的血液循环中有大量的 LMPs。通过研究发现 CD8+T 淋巴细胞在活化或凋亡时释放的微粒能促使肝星状细胞上基质金属蛋白酶(matrix metal proteinase, MMP)-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13 的表达,在一定程度上能够防治肝硬化的形成。因此,LMPs 可成为临床上防治肝硬化一种新的治疗手段^[12]。近年来,微粒在自身免疫性疾病的研究有很大进展,在皮炎患者的血液、风湿性关节炎滑膜里均发现大量的 LMPs 以及单核细胞微粒,微粒的大小和所含蛋白

成分均与健康人有差别,且不同微粒之间的水平差异也有统计学意义^[13]。因此,粒细胞微粒在慢性炎症以及自身免疫性疾病中的研究有助于在临床上更为广泛的应用,为研究慢性炎症性疾病开启新的窗口。

粒细胞微粒在调节血管张力以及血管生长方面均有重要作用。LMPs 对血管张力的调节通过下调氧化亚氮合酶(nitric oxide, NOS)和上调小窝蛋白(caveolin-1)来实现,或直接作用于平滑肌细胞而影响血管收缩功能。在调节血管生长方面有双重性,有研究发现 LMPs 通过上调还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)亚基、抑制血管内皮生长因子受体 2(VEGF-2)磷酸化减少血管内皮细胞的增殖和迁移^[14]。此外,LMPs 通过上调血管内皮生长因子(VEGF)、IL-1 β 等的表达来促进血管的生长^[15]。

4.2 PMPs 是 cMP 中首次被发现的微粒,所占的比例最高。研究发现,PMPs 在鼠中的寿命为 30 min,而在兔子体内却小于 10 min,正常血小板在外周血液中的寿命应为 10 d,相比之下 PMPs 寿命周期明显变短。它在凝血中发挥的重要生物学活性。在病理状态下,PMPs 的数目增多,它们为凝血蛋白组装提供组织因子(tissue factor, TF)和阴离子磷脂表面,PS 是介导这两个复合物形成的最有效的阴离子磷脂,因此能够介导凝血的产生。生理状态下血液中也存在少量的 PMPs,其功能是抗凝作用,主要是通过促进蛋白酶 C 抗凝血酶来实现^[16],说明 PMPs 在凝血系统上有调控点,具体机制尚不明确。近年来研究发现 PMPs 不仅在凝血系统发挥功效,在癌症、败血症、动脉粥样硬化、糖尿病的血液循环中均发现 PMPs 的水平显著提高^[17]。研究证实,PMPs 无论来自血浆分离还是血小板刺激,均能作用于不同的细胞使其表达黏附分子,释放大量的细胞因子、调节血管反应性、诱导血管生成以及肿瘤的生长转移。PMPs 刺激细胞表达相关受体和相关转移受体,如 P-选择素、GP II b/III a 等^[18];PMPs 能促使单核细胞与内皮细胞黏附,提高环氧合酶-2(COX-2)的表达,加重炎症反应。体外实验发现 PMPs 通过刺激前列腺癌细胞分泌 MMP-2,协助癌细胞迁移发生远处转移,且 MMP 的分泌并不受内源性血小板相关血管生长因子调节^[19]。此外,PMPs 在细胞信号传导中,它能够激活内源性信号通路细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI-3K) / 蛋白激酶 B(Protein kinase B, PKB) PI3-kinase/Akt,以及 STAT 蛋白。因此,对于 PMPs 的研究已深入到炎症、组织修复、肿瘤等诸多方面。

4.3 EMPs EMPs 是第二大 cMP。它主要通过内皮细胞的活化或者凋亡产生。研究发现 MMP、NADPH 氧化酶、尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂(uridyllyl phosphate adenosine, uPA)及其受体以及生长因子受体、免疫球蛋白、补体、主要组织相容性复合体在 EMPs 上也有所表达^[20]。其表面表达的蛋白如内皮细胞蛋白 C、血栓素、组织因子、黏附分子(ICAM-1)、血小板内皮黏附分子、血管细胞内皮因子、E-选择素)和 PS 暴露的位点能够调节凝血系统的平衡^[21]。EMPs 表面表达的相关分子受体赋予它不同的生物活性,在血栓形成、血管生成、炎症反应、细胞凋亡、调节血管张力等方面均起了重要的作用。通过给大鼠注射 EMPs,发现能够引起大鼠的急性肺损伤;体外实验发现 EMPs 释放大量的炎症因子、过氧化物酶,上调 IL-1 β 、TNF- α 的表达使大量的中性粒细胞聚集和激活,加重炎症反应^[22]。临床上许多疾病如糖尿病、高血压、动脉粥样硬化的患者血液循环中均发现 EMPs 的水平升高,升高的 EMPs 与疾

病的进展有关系,这也说明 EMPs 将来可作为临床上治疗的靶点。

4.4 红细胞微粒 红细胞微粒在 cMP 中所占比例较小,目前对于它的研究也较少,研究证明在疟疾患者血液循环的红细胞微粒可以作为诊断此病的一项指标^[23]。红细胞释放的微粒表达 Duffy 抗原,研究证实这种抗原在炎症反应起重要作用,主要由趋化因子配体 1(CXCL1)的聚集以及与血小板之间的相互作用而引起的,刺激血小板释放 α 糖蛋白颗粒使其放大炎症反应^[24],且可以把此抗原作为靶点防治输血反应。

5 结 语

cMP 作为细胞凋亡或者活化后形成的细胞脱落产物,在不同程度上反映了疾病的病理状态。微粒在免疫调节、慢性炎症方面将会是今后研究的重点,对不同状态下微粒的形成机制以及它们的生物活性的研究将是今后研究的难点。在糖尿病、高血压、心血管、血液系统乃至在妇产科方面的疾病的运用,将会使微粒成为临床上一种新的诊疗手段。

参考文献:

- [1] Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings[J]. *Thromb Res*, 2008, 123(1):8-23.
- [2] Madden LA, Vince RV, Sandström ME, et al. Microparticle-associated vascular adhesion molecule-1 and tissue factor follow a circadian rhythm in healthy human subjects [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 99(5):909-915.
- [3] Burnier L, Fontana P, Kwak B, et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(3):439-451.
- [4] Sapet C, Simoncini S, Loriod B, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle Generation; identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2 [J]. *Blood*, 2006, 108(6):1868-1876.
- [5] Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles [J]. *Blood*, 2009, 113(5):1112-1121.
- [6] Bodin S, Tronchère H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1610(2):247-257.
- [7] Pap E, Pállinger E, Pásztoi M, et al. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer [J]. *Inflamm Res*, 2009, 58(1):1-8.
- [8] Gelderman MP, Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 484(1):79-93.
- [9] Lu JC, Fang C, Xu HR, et al. Preliminary investigations on the standardization and quality control for the determination of gamma-glutamyltranspeptidase activity in seminal plasma [J]. *Andrologia*, 2007, 39(1):1-6.
- [10] Cerri C, Chimenti D, Conti I, et al. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells [J]. *J Immunol*, 2006, 177(3):1975-1980.
- [11] Huber LC, Jüngel A, Distler JH, et al. The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(2):363-374.
- [12] Kornek M, Popov Y, Libermann TA, et al. Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells [J]. *Hepatology*, 2011, 53(1):230-242.
- [13] Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, et al. Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis [J]. *Immunol Lett*, 2010, 128(2):124-130.
- [14] Yang C, Mwaikambo BR, Zhu T, et al. Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(2):R467-R476.
- [15] Soleti R, Benameur T, Porro C, et al. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(4):580-588.
- [16] Zwicker JL. Tissue factor-bearing microparticles and Cancer [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2008, 34(2):195-198.
- [17] Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers [J]. *Transfus Med Rev*, 2006, 20(1):1-26.
- [18] Li X, Cong H. Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome [J]. *Tex Heart Inst J*, 2009, 36(2):134-139.
- [19] Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate Cancer cells via upregulation of MMP-2 production [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(8):1773-1777.
- [20] Mayr M, Grainger D, Mayr U, et al. Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009, 2(4):379-388.
- [21] Pérez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, et al. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects [J]. *Haematologica*, 2009, 94(3):387-394.
- [22] Buesing KL, Densmore JC, Kaul S, et al. Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury [J]. *J Surg Res*, 2011, 166(1):32-39.
- [23] Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, et al. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria [J]. *Infect Dis*, 2011, 203(5):700-706.
- [24] Xiong Z, Cavaretta J, Qu L, et al. Red blood cell microparticles show altered inflammatory chemokine binding and release ligand upon interaction with platelets [J]. *Transfusion (Paris)*, 2011, 51(3):610-621.