

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01229

• 综 述 •

隧道纳米管形成的促进机制研究进展

王晓晴¹, 于晓雯², 刘明媛¹, 管阳太^{1,3*}

1. 第二军医大学长海医院神经内科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院老年病科, 上海 200433
3. 上海交通大学医学院附属仁济医院神经内科, 上海 200127

[摘要] 隧道纳米管(tunneling nanotubes, TNT)是近年来发现的新型动物细胞间的连接方式。其形成伴有重要的生理、病理意义。但 TNT 的形成条件、促进机制尚不完全清楚。已知细胞状态(炎症条件和应激反应)、分子层面(Fas 配体、细胞黏附分子和受-配体交互作用、M-Sec/TNFAip2/B94 及脂质分子)、病原微生物感染对其形成有重要促进作用。本文就 TNT 形成促进机制作一综述。

[关键词] 细胞间接合部;隧道纳米管;细胞学;分子生物学;微生物学

[中图分类号] R 329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)11-1229-04

Progress in promoting mechanism of tunneling nanotubes formation

WANG Xiao-qing¹, YU Xiao-wen², LIU Ming-yuan¹, GUAN Yang-tai^{1,3*}

1. Department of Neurology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Geriatrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Neurology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

[Abstract] Tunneling nanotubes (TNT) is a newly discovered connection mode between animal cells, and its formation is of great importance in physiological and pathological processes of animals and humans. The forming conditions and the promoting mechanism of TNT are not fully understood yet. It has been known that the state of cells (such as inflammatory conditions and stress reaction), molecular level (Fas ligand, cell adhesion molecules and the ligand interactions, M-Sec/TNFAip2/B94 and lipid molecules), and pathogenic infection are important for the formation of TNT. In this paper we reviewed the promoting mechanisms for TNT formation.

[Key words] intercellular junctions; tunneling nanotubes; cytology; molecular biology; microbiology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(11):1229-1232]

植物细胞通过胞间连丝相连接,这已被人类广泛认识超过一个世纪。近来,在动物细胞中也发现了一种与植物细胞间的胞间连丝类似的管状结构——隧道纳米管(tunneling nanotubes, TNT)^[1],这种哺乳动物细胞间的膜通道由肌动蛋白细胞骨架支撑,长度变异较大(50~700 nm),可以传输运载体、钙离子、线粒体、内质网等。TNT 具有动态性、异质性,不同于细胞伪足插入细胞培养基,它只存在于细胞间。TNT 的发现为药物研究提供了新的靶

点,如挽救受损细胞、抑制病毒传播等,但目前缺乏特征性的 TNT 示踪物质,且 TNT 的形成不如缝隙连接等紧密、稳定^[2],这制约了 TNT 研究的进展^[3]。本文将从细胞水平、分子层面及病原学因素等方面对促进 TNT 形成的机制作一综述。

1 细胞状态

1.1 炎症条件 炎症条件可以诱导 TNT 及 TNT 类似结构的形成。革兰阴性菌内毒素可以诱导哺乳

[收稿日期] 2015-03-28 **[接受日期]** 2015-08-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81200924, 81230027),上海市自然科学基金(12ZR1427400)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81200924, 81230027) and Natural Science Foundations of Shanghai (12ZR1427400)。

[作者简介] 王晓晴,博士。E-mail: xiaojingwang1988@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31158004, E-mail: yangtaiguan@126.com

动物产生快速炎症反应,这种反应是组织损伤或感染时发生的主要反应。在小鼠角膜,偶尔可以观察到具有 TNT 特征的胞膜桥连两个或更多的细胞,但在角膜受到创伤和内毒素侵袭时纳米管形成频率显著增加^[4-5]。研究发现 TNT 类似结构可以在骨髓间充质干细胞和内毒素侵袭的肺泡细胞间形成,线粒体通过 TNT 进行转移,从而促进组织修复。骨髓间充质干细胞与肺泡上皮细胞形成包含连接蛋白-43 的缝隙连接是形成 TNT 的先决条件^[6]。佛波酯或钙离子载体激活的小神经胶质细胞之间、TNF- α 处理过的腹膜间皮细胞及经过革兰阴性菌内毒素、干扰素处理的单核巨噬细胞之间也观察到了 TNT 形成增加^[5-6]。

1.2 细胞应激 星形胶质细胞、海马神经元在氧化应激时也可形成 TNT。研究发现氧化应激所产生的过氧化氢会改变细胞膜的流动性,介导细胞骨架重构,并通过激活 p38 MAPK 通路促进 TNT 的形成^[7]。后续研究进一步证明这个 TNT 的形成依赖于 p53 转录因子、表皮生长因子受体和 Akt/PI3K/mTOR 通路的激活,微生物碱及一氧化氮在人类中性粒细胞中会引发长管状延长的突起形成,这些突起可视作 TNT 的前体,中性粒细胞可依靠这些突起捕获感染组织的细菌^[8]。应激状态产生及随后发生的细胞因子与通路的激活共同促进了 TNT 的形成。

2 分子层面

2.1 Fas 配体 Fas 配体-受体通过激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase) 介导细胞凋亡,这在调控免疫系统及肿瘤进展方面意义重大。研究证实, Fas 配体可以促使 T 细胞的 TNT 形成及所连接细胞的凋亡信号转导,而这种 TNT 形成依赖于 RhoGTPases^[9-10]。Fas 信号激活 RhoGTPase 家族, RhoGTPase 反过来促进 Fas 介导的细胞凋亡,这与现有的结论相符合。通过 Fas 配体途径介导的 TNT 形成并不依赖于 Caspase 激活,说明 Fas 信号介导的 TNT 形成与细胞凋亡的主要机制并不完全相同,从而成为一种独立的 TNT 形成促进因素。

2.2 细胞黏附分子和受-配体交互作用 黏附分子和受-配体交互作用是启动 TNT 形成或稳定已形成的 TNT 的基础。丝状伪足桥梁,也被称为 cytonemes,是连接反转录病毒感染细胞和未感染靶细胞之间形成的细膜管。研究发现,反转录病毒感染细胞与未感染细胞初始接触后,已感染细胞的病

毒其囊膜糖蛋白与靶细胞受体分子产生强有力的缔合,形成稳定桥连,进而稳定易感染细胞与未感染细胞间的 TNT 结构,这种感染与未感染的细胞之间的 TNT 结构形成依赖于该两种细胞之间的初始接触,从而触发感染病毒的细胞伸出丝状伪足,伪足表面的糖蛋白与未感染病毒的细胞表面受体作用,使伪足与健康细胞融合而形成 TNT 质膜管道^[11-12]。

2.3 M-Sec/TNFaip2/B94 研究发现,细胞皮质的肌动蛋白网络调控着细胞表面结构及其外部形状,提示 TNT 形成可能的内在机制是肌球蛋白分子马达的运动导致了局部皮质的收缩、膜的突起^[13-14]。而 M-Sec 克隆形成于肿瘤坏死因子刺激过的内皮细胞,首次发现后被鉴定为 TNF- α 介导蛋白 2 (TNFaip2, 也称 B94)^[13]。M-Sec 基因编码一个长度 73 000 的胞内蛋白,该蛋白与 Sce6 (exocyst 复合物的组成成分之一) 同源。至今 M-Sec 的功能也尚未完全明确。但 Sowinski 等^[15]发现, RNA 干扰导致的 M-Sec 转录减少大大降低了 TNT 的形成以及巨噬细胞系 (Raw264.7) 之间钙离子的传递,过表达 M-Sec 的 HeLa 细胞则有更多的膜突起形成。M-Sec 是 TNT 形成的胞膜出芽过程里的中心因素,可能与触发肌动蛋白分子有关,由此说明 M-Sec 具有促进 TNT 形成的作用。

2.4 脂质分子 与胞间连丝管膜一样,脂质是 TNT 结构形成及发挥功能的基石,也使其具有动态变化的特点,胞间连丝管膜的曲率与 TNT 不同,这成为二者的鉴别点之一^[16]。研究表明,细胞膜上脂质与蛋白质的亲和性丛集或可因膜弯曲的能量要求降低从而介导 TNT 形成。在即将生成丝状伪足或胞膜突起的细胞膜位点上观察到了脂质结构——脂筏的形成(脂筏是这种伪足变化的重要启动因素),说明脂筏可能是膜管状结构的基本特征之一。而无胆固醇培养基明显抑制了 TNT 的形成,从而证实胆固醇在 TNT 结构稳定性中的作用^[17]。

3 病原学因素

3.1 人类免疫缺陷病毒负调控因子(HIV Nef) 细胞间病毒的传播会导致感染的进展,这已成为感染性疾病研究的重要议题之一。已有文献报道病毒通过 TNT 和(或) TNT 状结构在细胞间转移^[18-19]。HIV-1 感染人类的辅助性 T 细胞(特别是 CD4⁺ T 细胞)、巨噬细胞和树突状细胞等免疫系统细胞,使得慢性进行性 CD4⁺ T 细胞的缺失,从而导致严重的获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)。Sowinski 等^[15]证实, TNT 直接连接 HIV-1 感染的 CD4⁺ T

细胞,病毒以 TNT 物理连接为途径传播至未感染细胞。HIV-1 负调控因子(Nef)是一种相对分子质量 27 000~35 000 的 HIV-1 辅助蛋白,可以改变 T 淋巴细胞和树突状细胞肌动蛋白细胞骨架结构和内吞活动,与 TNT 和(或) TNT 样结构的形成相关^[20-21]。

3.2 人类 T 细胞白血病病毒(human T-cell leukemia virus, HTLV) HTLV 是人 RNA 反转录病毒,分 HTLV-1 和 HTLV-2 两个型别,其中 HTLV-1 可引起人 T 细胞白血病/淋巴瘤和热带痉挛性轻截瘫/HTLV-1 相关性脊髓病等。HTLV-1 在感染的细胞中几乎不分泌,但能通过病毒学突触等方式有效地实现细胞间接触传递^[22]。Van Prooyen 等^[23]发现 HTLV-1 在 Jurkat 细胞的异位表达诱导 TNT 状细胞导管的形成,使病毒 p8 本身快速传递到邻近细胞。这些导管的形成依赖于肌动蛋白细胞骨架组织。HTLV p8 过表达也增加病毒学突触的形成和病毒传播。研究者认为 HTLV-1 经由病毒学突触与靶细胞接触时,HTLV-1 下调 p8 近端 TCR 信号并导致 T 细胞无反应性^[24-25]。他们提出了一个模型:其中 p8 会侵入邻近的细胞,有利于迅速传递病毒,并且在同一时间,诱导 T 细胞无反应性从而避免感染细胞的免疫识别。

4 展望

迄今为止对 TNT 的了解尚处于起步阶段,研究不够深入也不够成熟,其重要性也未得到足够的重视,许多问题尚不明确,还存在着许多争议。促进 TNT 形成的机制也不完全清楚。细胞状态改变、分子层面联系、病原微生物感染可促进 TNT 形成,并对机体产生多样化的作用。缝隙连接在 Ca^{2+} 离子流及 TNT 电信号传递中起重要作用,支持着低电压门控钙通道电信号的双边传递。有研究在排除了缝隙连接、ATP 释放、活跃的钙离子运动以及 TNT 介导的动作电位所致的钙离子流等影响后,发现 TNT 具有运输钙离子流的功能^[26]。内质网、线粒体、运载体、病毒等经 TNT 传输也已在多种细胞中观察到^[27]。在干细胞领域,许多种类干细胞,特别是骨髓间充质干细胞已被发现与多种细胞之间形成稳定、数目繁多的 TNT 样连接结构^[28-29],TNT 或许是干细胞组织修复功能的一大重要机制。

至今,TNT 特征性标记物的缺乏严重制约了 TNT 相关研究的发展。但显微技术的进步已在渐渐弥补关于 TNT 研究的空白。TNT 在细胞间传输的物质对动物体有正面及反面的双重作用,如何利

用好这一点成为一个有前景的议题。在临床应用方面国际上多家研究机构已在进行摸索。相关的应用如改善细胞能量供给挽救受损细胞、运输病原体协助免疫细胞限制其扩散、抑制病毒传播等有待进一步研究进行佐证。

[参考文献]

- [1] Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport[J]. *Science*, 2004,303:1007-1010.
- [2] Gerdes H H, Bukoreshtliev N V, Barroso J. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581:2194-2201.
- [3] Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo M A, Chauveau A, Köhler K, et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission[J]. *Nat Cell Biol*, 2008,10:211-219.
- [4] 刘 鸿,王毅刚,石文芳,钱其军. 隧道纳米管:一种新型的细胞间通讯方式[J]. *细胞生物学杂志*, 2008,30: 445-450.
- [5] Chinnery H R, Pearlman E, McMenamin P G. Cutting edge: membrane nanotubes *in vivo*: a feature of MHC class II⁺ cells in the mouse cornea[J]. *J Immunol*, 2008,180:5779-5783.
- [6] Islam M N, Das S R, Emin M T, Wei M, Sun L, Westphalen K, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury[J]. *Nat Med*, 2013, 18:759-765.
- [7] Zhu D H, Tan K S, Zhang X L, Sun A Y, Sun G, Lee J. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes[J]. *J Cell Sci*, 2005,118:3695-3703.
- [8] Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation [J]. *Cell Death Differ*, 2011,18:732-742.
- [9] Luchetti F, Canonico B, Arcangeletti M, Guescini M, Cesarini E, Stocchi V, et al. Fas signalling promotes intercellular communication in T cells[J]. *PLoS One*, 2012,7:e35766.
- [10] Arkwright P D, Luchetti F, Tour J, Roberts C, Ayub R, Morales A P, et al. Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes[J]. *Cell Res*, 2011,20:72-88.
- [11] Lehmann M J, Sherer N M, Marks C B, Pypaert M,

- Mothes W. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells [J]. *J Cell Biol*,2005,170:317-325.
- [12] Sherer N M, Lehmann M J, Jimenez-Soto L F, Horensavitz C, Pypaert M, Mothes W. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission[J]. *Nat Cell Biol*,2007,9:310-315.
- [13] Sarma V, Wolf F W, Marks R M, Shows T B, Dixit V M. Cloning of a novel tumor necrosis factor- α -inducible primary response gene that is differentially expressed in development and capillary tube-like formation *in vitro* [J]. *J Immunol*,1992,148:3302-3312.
- [14] Hase K, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, et al. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex [J]. *Nat Cell Biol*,2009,11:1427-1432.
- [15] Sowinski S, Alakoskela J M, Jolly C, Davis D M. Optimized methods for imaging membrane nanotubes between T cells and trafficking of HIV-1 [J]. *Methods*,2011,53:27-33.
- [16] Callan-Jones A, Sorre B, Bassereau P. Curvature-driven lipid sorting in biomembranes [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,2011,3 pii: a004648.
- [17] Lokar M, Kabaso D, Resnik N, Sepcic K, Kralj-Iglic V, Veranic P, et al. The role of cholesterol-sphingomyelin membrane nanodomains in the stability of intercellular membrane nanotubes [J]. *Int J Nanomedicine*,2012,7:1891-1902.
- [18] Aggarwal A, Iemma T L, Shih I, Newsome T P, McAllery S, Cunningham A L, et al. Mobilization of HIV spread by diaphanous 2 dependent filopodia in infected dendritic cells [J]. *PLoS Pathog*,2012,8: e1002762.
- [19] Eugenin E A, Gaskill P J, Berman J W. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages; a potential mechanism for intercellular HIV trafficking [J]. *Cell Immunol*,2009,254:142-148.
- [20] Nikolic D S, Lehmann M, Felts R, Garcia E, Blanchet F P, Subramaniam S, et al. HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation [J]. *Blood*,2012,118:4841-4852.
- [21] Nobile C, Rudnicka D, Hasan M, Aulner N, Porrot F, Machu C, et al. HIV-1 Nef inhibits ruffles, induces filopodia, and modulates migration of infected lymphocytes [J]. *J Virol*,2012,84:2282-2293.
- [22] Bangham C R. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1 [J]. *J Gen Virol*,2003,84:3177-3189.
- [23] Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2010,107:20738-20743.
- [24] Fukumoto R, Dunder M, Nicot C, Adams A, Valeri V W, Samelson L E, et al. Inhibition of T-cell receptor signal transduction and viral expression by the linker for activation of T cells interacting p12I protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 [J]. *J Virol*,2007,81:9088-9099.
- [25] Fukumoto R, Andresen V, Bialuk I, Cecchinato V, Walser J C, Valeri V W, et al. *In vivo* genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein [J]. *Blood*,2009,113:3726-3734.
- [26] Watkins S C, Salter R D. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules [J]. *Immunity*,2005,23:309-318.
- [27] Bukoreshtliev N V, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso J F, Gerdes H H. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells [J]. *FEBS Lett*,2009,583:1481-1488.
- [28] Figeac F, Lesault P F, Coz O L, Damy T, Souktani R, Trebeau C, et al. Nanotubular crosstalk with distressed cardiomyocytes stimulates the paracrine repair function of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*,2014,32:216-230.
- [29] Vallabhaneni K C, Haller H, Dumler I. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes [J]. *Stem Cells Dev*,2012,20:3104-3113.