

M细胞及其功能的研究进展

薛海燕, 李珊, 韩波, 王战勇

(陕西科技大学 食品与生物工程学院, 西安 710021)

摘要: M细胞是淋巴滤泡表面的一种特殊细胞, 存在于肠上皮细胞之间, 它能摄取、提呈抗原, 启动黏膜免疫反应。M细胞的深入研究对了解黏膜免疫反应及疫苗研制有重要意义。为进一步研究M细胞的作用机制和在疫苗中的应用, 类人M细胞体外模型的建立方法也在不断优化。本文主要介绍了M细胞的形态、功能及类人M细胞模型的体外建立方法。

关键词: M细胞; 抗原提呈; 免疫反应; 体外模型

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2017)03-0238-04

肠黏膜淋巴组织是机体最大的免疫系统, 由肠系膜淋巴结、派尔结(Peyer's patch, PP)、隔离的淋巴囊泡和大量散布在小肠上皮固有层中的淋巴细胞构成^[1]。PP是小肠黏膜内淋巴系统最集中的组织, 主要聚集在哺乳动物肠道中, 通过一层单层上皮细胞与小肠内腔隔开, 覆盖在PP表面的这层单层细胞就是与滤泡相关的上皮细胞(follicle-associated epithelium, FAE)。FAE的构成与肠腔的抗原诱导免疫反应密切相关^[2], 它包含大量吸收性的肠细胞、微量膜状肠上皮细胞及微褶皱细胞(microfold cell, M cell)^[3], 其中M细胞专门负责从小肠内腔吸收抗原并将其跨黏膜转运到肠上皮细胞下层的特化细胞。

M细胞是一类特殊的上皮细胞, 存在于阑尾和胃肠道的黏膜相关淋巴组织(mucosal-associated lymphoid tissue, MALT)中。1965年, 它第一次由Schmedt从家兔的阑尾组织中识别出来^[4], 最初被称为淋巴上皮细胞。1972年, Owen和Jones用电子显微镜研究人体内回肠的PP, 发现了一种表面有微褶皱的特殊肠上皮细胞, 便称其为微褶皱细胞。然而M细胞的形态学和酶学特点与相邻的肠上皮细胞有所不同, M细胞可以将小肠内腔中的抗原物质运送到底层的黏膜淋巴组织, 启动免疫

应答处理抗原。因此, 与M细胞形态结构有关的研究有助于深入了解黏膜免疫机制, 对口服疫苗的研制也有着重要的意义, 同时体外类人M细胞模型的建立对进一步研究其功能及吸收转运模式也具有参考价值。

1 M细胞形态

在人类和大鼠体内, M细胞占FAE的(5~10)%。M细胞呈现出与其他淋巴肠上皮细胞不同的特性, 比如缺失刷状缘组织(也就是显示缺乏顶膜微绒毛)^[5]。同时, M细胞不具有消化营养物质的特征, 可能因为缺少边缘刷酶系比如碱性磷酸酶。而且在不同的种属、肠道的不同区段、同一FAE中的不同M细胞, 其表面表达的糖蛋白均有差异, 其他肠上皮细胞表面的细胞黏附分子整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 只在肠上皮细胞基底面表达, 而M细胞表面的 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素在顶层表达, 说明M细胞与其他肠上皮细胞的 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素分布有所区别^[6]。表面特异性分子糖蛋白GP2和碳趋化因子配体CCL9是M细胞成熟的标志^[7], 同时, M细胞基底部细胞膜向顶部突起, 细胞内凹形成特有的“袋形囊腔”, 这是M细胞完全分化的标志。呈口袋形状的M细胞的细胞质层较薄, 可以快速完成胞吞-胞吐过程。它的转运机制与被转运物性质有关, 如体积大小、表面pH值、表面电荷、疏水性, 以及是否存在M细胞特异性受体。M细胞这种独特的形态结构特点, 与肠黏膜免疫密切相关, 它能特异性结合肠道大分子物质及微生物并将其摄取、转运至位于其下的APC进行识别、处理并激活T、B淋巴细胞, 从而激发肠道黏膜感染与免疫应答作用。因此可以说

收稿日期: 2016-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301405); 陕西省科技统筹计划项目[2013KTZB02-02-05(2)]; 陕西省教育厅专项项目(16JK1101)

作者简介: 李珊(1993—), 女, 硕士生, 主要从事细胞生物相关机制研究

通信作者: 薛海燕(E-mail: xuehaiyan@sust.edu.cn)

M 细胞是启动肠道黏膜免疫应答的“门户”^[8]。

2 M 细胞的功能

2.1 跨上皮抗原运输功能 M 细胞的跨上皮运输途径是先通过肠腔, 然后穿过上皮屏障和潜在的免疫细胞, 运输过程一般分为 3 个阶段。首先, 被运输物质出现在顶端膜, 然后内含体的内吞小泡包裹被运输物质, 最后在基底外侧膜胞外分泌, 一个完整的胞吞胞吐作用序列最少只需 10 min 左右, 因此它的介导转运是一个非常高效、迅速的过程^[9]。M 细胞不仅能够运输微生物, 它也能运输颗粒物包括乳胶珠、碳粒、脂质体和大分子物质如铁蛋白、辣根过氧化物酶、霍乱毒素结合亚基、外源凝集素及抗病毒抗体^[10]。如前所述, M 细胞在体内的转运机制与被转运物性质有关。在体外, 它也被证明可以转运微生物包括霍乱弧菌、沙门菌等^[11], 是通过跨细胞的内吞作用完成的, 其过程具有温度依赖性, 在 25 °C 或更低温度下则会被抑制^[12]。

研究表明, M 细胞的溶酶体体积和溶菌酶活性是正常细胞的 1/16, 因此在胞吞过程中, 抗原结构不会发生重大变化, 使之完整地释放进入口袋。有一些证据表明, M 细胞也可能具有一定的酶活性, 例如, 天冬氨酸蛋白酶组织蛋白酶 E (已被定位在人类和大鼠 M 细胞, 通常存在于提呈抗原的细胞溶酶体室内), 它可以分解蛋白、抗原并促进其他酶的活化作用, 这表明了 M 细胞在抗原处理中体现的分解作用^[13]。

2.2 诱导免疫应答 M 细胞感应抗原后通过释放使 T 细胞和 B 细胞增殖的共刺激信号诱导免疫应答, 从兔 FAE 分离出的 M 细胞被证明能够分泌 IL-1 和体外脂多糖, 可以诱导 T 细胞增殖^[14], 进一步启动黏膜免疫反应。M 细胞“囊泡”的细胞质是不连续的, 使 FAE 下丰富的淋巴细胞能尽快地

与抗原发生作用, 产生抗原特异性的淋巴母细胞进一步分化成浆细胞, 浆细胞分泌的 IgA 则进入黏膜组织, 而后者可以促进免疫应答的诱导。

同时, 肠上皮细胞是主要的营养物质吸收通道, 大多数食物被分解为小分子后被吸收, 结构较复杂的大分子则很难通过上皮细胞。而具有特异性体质的人群在摄入特定食物后会发生食物过敏反应, 过敏原只有具有一定结构才能引起免疫应答反应, M 细胞能够通过胞吞和胞吐摄取较大颗粒, 因此它可能也在食物或其分解物中过敏原的摄入、加工和提呈过程中发挥着作用。

3 M 细胞的体外模型

以前关于 M 细胞的研究, 依赖于体内或原位的培养方法, 然而, 体外 M 细胞模型的发展为研究覆盖在 PP 上的 FAE 及关于 M 细胞自身的表型和生理特点提供了一种可重复的方法^[15]。这种模式有利于研究 M 细胞对抗原转运的过程以及其与淋巴细胞的交互作用。一般采用人类腺癌类肠上皮细胞系 Caco-2, 通过与 PP 或人类淋巴细胞系共培养分化成 M 细胞, 模仿其活性。Caco-2 细胞能够表现出小肠上皮细胞的形态与功能, 一般被用作肠上皮细胞模型^[16], 与 Caco-2 细胞模型相比, 类人 M 细胞为体外模拟人体内肠道环境提供了更好的模型。Des Rieux 等^[17]利用 M 细胞模型研究多肽类药物毒蜥素的运输情况, 发现 M 细胞运输毒蜥素的效率是 Caco-2 单层细胞的近 20 倍, 且被转运的毒蜥素分子结构完整。Lyu 等^[18]研究发现, M 细胞模型运输槲寄生凝集素的效率与速度都明显高于 Caco-2 单层细胞膜。因此, 类人 M 细胞模型的构建可以进一步研究肠道对生物大分子的摄取过程。现代 M 样细胞较为优化的诱导过程如图 1 所示。

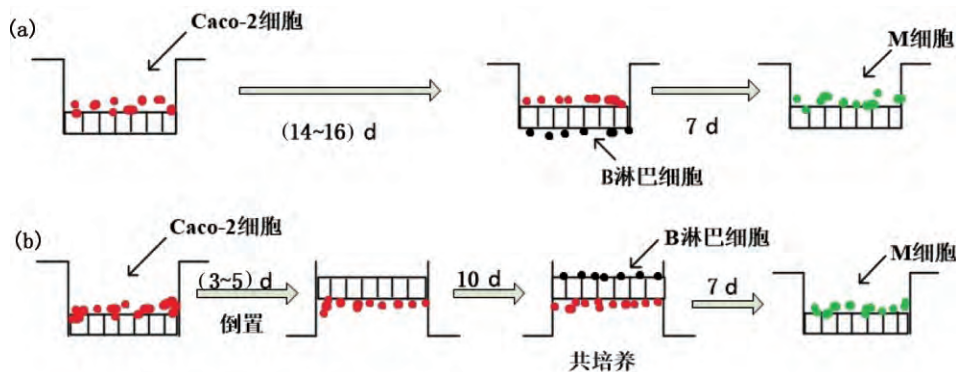


图 1 Caco-2 细胞和淋巴细胞共培养制备 M 细胞模型过程示意图

M细胞的培养涉及到一个两室的 Transwell 系,图 1a 中是将 Caco-2 细胞和淋巴细胞分别放在顶层和基底室共培养,图 1b 是将 Caco-2 细胞倒置培养,在底部加入淋巴细胞,使淋巴细胞分泌的细胞因子加速将 Caco-2 细胞分化为 M 细胞。在共培养体系中,M 细胞主要表征的相似程度决定着这个体系的生成效率,比如,细胞内凹、顶端碱性磷酸酶明显减少、微绒毛消失。同时,肠上皮细胞 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的表达只在基底或者侧表面,而 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素在 M 细胞的顶端表达,所以将顶端 $\alpha 5 \beta 1$ 重分配作为判断类人 M 细胞模型是否构建成功的一个指标。M 细胞体外模型在抗原与肠上皮细胞的相互作用以及在分子机制测定等方面显示出了巨大的研究潜力。

4 M 细胞的应用研究进展

疫苗接种是免疫学最成功的应用之一^[19],同时,肌肉注射也是现代常用的免疫方式,它会诱导机体产生相应的系统性免疫应答,然而对黏膜免疫反应效果并不显著。人体 90% 的感染发生在黏膜区域,有效的黏膜免疫应答能够抵抗经肠道入侵的病原体。使用口服黏膜疫苗建立保护性免疫可以避免一些最初的病原体感染,也能克服当前注射疫苗的局限性^[20],例如,口服疫苗会降低传统注射方式感染病菌的可能性并减少人的疼痛感。

不同的黏膜免疫途径和黏膜免疫部位会产生局部的特异性黏膜免疫应答,在特定的黏膜区域给予抗原免疫之后会产生有效的黏膜免疫应答。因此,合适的免疫方式对于诱发有效的免疫应答十分重要。M 细胞在胃肠道聚集,口服疫苗能够促进 M 细胞对抗原的吸收,建立肠道的局部免疫,从而有效抵抗肠道病原体的入侵。一般的流感疫苗,通过鼻腔路线传递,但是黏膜疫苗通过口服路线传递,比如轮状病毒、脊髓灰质炎病毒、伤寒和霍乱弧菌的疫苗^[21]。同时有文献显示,M 细胞靶向性疫苗 CS-FimH-pvP1 经口服免疫小鼠后,对 CVB3 诱导的病毒性心肌炎具有保护作用^[22];将可以特异性结合在 M 细胞表面的可卡苗与口服疫苗偶联,喂服免疫小鼠,发现其 IgA 水平显著增高^[23];口服霍乱疫苗的保护作用在前两年越南爆发的霍乱弧菌的瘟疫中也已得到了验证^[24];PELA 包裹霍乱弧菌外膜蛋白制成的口服疫苗,经过免疫实验,表明微球会进入 M 细胞等器官,开启免疫应答^[25]。

5 结语

M 细胞可以通过体内实验、分离组织或者外植体培养的方法进行研究。其中,M 细胞体外模型的建立需要严格的实验要求和操作能力,该模型可以促进对抗原通过 FAE 运输的研究,比如口服疫苗的发展和肠道致病菌的研究。然而,关于 M 细胞的研究有诸多待解决的问题,比如,病原体对 M 细胞的黏附机制、控制病原体通过 M 细胞内化成多种不同的结果的因素、M 细胞模型的功能与体内 M 细胞一致性等问题。

参考文献

- [1] 庞广昌,陈庆森,胡志和,等. 食品与机体中的移动通讯网络[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 1-9.
- [2] Schulz O, Pabst O. Antigen sampling in the small intestine [J]. Trend Immunol, 2013, 34(4): 155-161.
- [3] Anzini M, Moretti M, Merlo M, *et al.* Controversial issues and working practice in myocarditis: from scientific data to clinical grounds[J]. G Ital Cardiol, 2013, 14(7-8): 504-516.
- [4] Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles[J]. Gastroenterology, 1974, 66(2): 189-203.
- [5] Corr S, Hill C, Gahan M. An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of listeria monocytogenes, across M cells[J]. Microb Pathog, 2006, 41(6): 241-250.
- [6] Pavot V, Rochereau N, Genin C, *et al.* New insights in mucosal vaccine development[J]. Vaccine, 2011, 30(2): 142-154.
- [7] Ogra PL. Mucosal immunity: Some historical perspective on host-pathogen interactions and implications for mucosal vaccines[J]. Immunol Cell Biol, 2003, 81(1): 23-33.
- [8] Hsieh EH, Lo DD. Jagged1 and Notch1 help edit M cell patterning in Peyer's patch follicle epithelium[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 37(2): 306-312.
- [9] Des Rieux A, Ragnarsson EG, Gulberg E, *et al.* Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium[J]. Eur J Pharm Sci, 2005, 25(4-5): 455-465.
- [10] Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW. Keynote review: Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting[J]. Drug Discovery Today, 2005, 10(17): 1145-1157.
- [11] Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organised mucosal lymphoid tissues[J]. Nat Immunol, 2001, 2(11): 1004-1009.
- [12] Jensen VB, Harty JT, Jones BD. Interaction of the invasive pathogens Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes,

- and *Shigella flexneri* with M-cells and murine Peyer's patches [J]. *Infect Immun*, 2013, 66(8): 3758-3766.
- [13] Liang E, Kabcenell AK, Coleman JR. Permeability measurement of micromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using in vitro converted M cells[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2001, 46(2): 93-101.
- [14] Allan CH, Mendlick DL, Trier JS. Rat intestinal M-cells contain acidic endosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determination[J]. *Gastroenterology*, 2014, 104(3): 698-708.
- [15] Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, *et al.* Conversion by Peyers' patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport[J]. *Science*, 1997, 277(5328): 949-952.
- [16] Wang B, Li B. Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model[J]. *Food Chem*, 2016, 218: 1-8.
- [17] Des Rieux A, Fievez V, Momtaz M, *et al.* Helodermin-loaded nanoparticles: Characterization and transport across an in vitro model of the follicle-associated epithelium[J]. *Cont Rel*, 2007, 118(3): 294-302.
- [18] Lyu SY, Park WB. Mistletoe lectin transport by M-cells in follicle-associated epithelium (FAE) and IL-12 secretion in dendritic cells situated below FAE in vitro[J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(9): 1433-1441.
- [19] des Rieux A, Fievez V, Theate I, *et al.* An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 30(5): 380-391.
- [20] Kim SH, Jang YS. Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines[J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46(3): e85
- [21] Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, *et al.* M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis[J]. *Mucosal Immunol*, 2012, 5(2): 216-225
- [22] 樊向梅. 新型 M 细胞靶向性 DNA 疫苗的制备及其对 CVB3 病毒性心肌炎的免疫保护作用[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [23] Langermann S, Susan P, Aradana S, *et al.* Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer surface A of *borrelia burgdorferi* [J]. *Nature*, 2014, 374(6506): 552-555.
- [24] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, *et al.* 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(2): 136.
- [25] 陈天游, 曾明. 多聚脂质体疫苗载体与肠道 M 细胞的定向结合[J]. 国外医学(预防、诊断、治疗用生物制品分册), 2003, 26(1): 42.