

[文章编号] 1000-4718(2010)02-0401-04

细胞自噬与肿瘤*

杜海磊, 邱伟华[△], 杨卫平

(上海交通大学附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所, 上海 200025)

Autophagy and tumor

DU Hai-lei, QIU Wei-hua, YANG Wei-ping

(Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine,

Shanghai 200025, China. E-mail: drqwh2003@yahoo.com)

【ABSTRACT】 Autophagy is a vacuolar process of cytoplasmic degradation by lysosome which ubiquitously occurring in all eukaryotic cells. The researches of autophagy have made great progress with the development of the yeast model and genetic technology. This review will summarize the determination of autophagy, its relationship with apoptosis and its role in the tumor treatment in order to give a comprehensive understanding of the function of autophagy.

[关键词] 自吞噬作用; 细胞凋亡; 溶酶体; 肿瘤; 信号转导

[KEY WORDS] Autophagocytosis, Apoptosis, Lysosomes, Neoplasms, Signal transduction

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

自噬又称为 II型程序性细胞死亡 (type II programmed cell death)是以胞质内出现双层膜结构包裹长寿命蛋白和细胞器的自噬体为特征的细胞“自我消化”的一系列生化过程^[1]。自噬现象最早是 Ashford 和 Porter于 1962 年用电子显微镜在人的肝细胞中观察到。近年来随着酵母模型的建立, 分子生物学及基因技术的发展, 对自噬的研究有了很大的进展。

1 细胞自噬的分类

根据细胞内底物运送到溶酶体腔方式的不同, 哺乳动物细胞 autophagy 可分为 3 种主要方式^[2]: 大自噬 (macroautophagy)、小自噬 (microautophagy) 和分子伴侣介导自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)。在大自噬中, 细胞浆中可溶性蛋白和变性坏死的细胞器被非溶酶体来源的双层膜结构所包裹, 即自噬泡 (phagophore), 并由自噬泡将其携带到溶酶体中降解加工; 小自噬形式的 autophagy 与之不同, 溶酶体膜自身变形, 包裹吞噬细胞浆中的底物。CMA 为胞浆内蛋白结合到分子伴侣后转运到溶酶体腔中, 被溶酶体酶消化。CMA 的底物是可溶的蛋白分子, 所以 CMA 降解途径在清除蛋白质时有选择

性, 而前两者无明显的选择性^[3]。因此自噬可被认为是真核细胞中广泛存在的降解再循环系统。本文主要概述大自噬 (macroautophagy, 以下简称自噬)。

2 细胞自噬的过程

自噬是胞浆大分子物质和细胞器在双层膜包裹泡中大量降解的生物学过程。在此过程中自噬体的形成是关键。其发生过程大致分为 3 个阶段: (1)在饥饿、氧化应激损伤等情况下, 粗面内质网的非核糖体区域、高尔基体等来源的自噬体膜脱落形成杯状分隔膜, 包绕在被降解物周围; (2)分隔膜逐渐延伸, 将要被降解的胞浆成分完全包绕形成自噬体; (3)自噬体通过细胞骨架微管系统运输至溶酶体, 与之融合形成自噬溶酶体并降解其内成分, 自噬体膜脱落再循环利用。正常量的自噬水平通过上述过程降解受损和老化的细胞器从而对细胞稳态起到重要作用^[4]。

3 细胞自噬的检测

细胞自噬是一个动态的多阶段、多基因参与调控的细胞生理过程。由于在特定的细胞、组织和器官中一些自噬的检测方法可能完全起不了作用, 因

[收稿日期] 2008-09-04

[修回日期] 2009-03-30

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No 30872511)

△通讯作者 Tel 021-64370045-666041; E-mail drqwh2003@yahoo.com

此目前尚没有适用于在任何情况下监测自噬的绝对标准^[5],因此自噬的监测需根据各种检测方法结果做出综合判断。总体而言在高等真核生物中自噬的检测主要包括两个方面的内容:(1)自噬泡(phagophore)和自噬体(autophagosome)形成的稳态监测方法,检测内容包括自噬体数量、LC3-II蛋白水平、LC3(或A tg18)斑点以及TOR和A tg1激酶活性等;(2)细胞自噬的过程(Flux)监测,检测内容包括自噬性蛋白降解速率、LC3-II蛋白的动态变化、GFP-A tg8/LC3复合物游离GFP的释放、p62蛋白水平检测等^[6]。

3.1 自噬泡和自噬体形成的稳态监测方法

①电镜 细胞自噬最早是由Ashford通过电镜首先发现的。在定性检测细胞自噬发生的一系列超微结构(如隔离膜、自噬泡、自噬溶酶体)方面,电镜观察形象而生动,能有效地鉴别自噬、凋亡和坏死,被称为自噬检测的金标准。通过电镜不仅可观察到自噬体典型的双层膜结构,还可量化细胞内自噬体占胞质总体积的大小,从而判断自噬的激活或抑制。但成熟哺乳动物的自噬体尚涉及过渡到单层膜的结构(如自噬溶酶体),加之一些病原微生物在感染过程中干扰正常自噬体双层膜的形成。因此在自噬相关超微结构的鉴别中,双层膜结构不是自噬的必备条件^[7]。自噬电镜检测必须由分析自噬方面有经验的专家完成^[8]。

② A tg8/LC3 Western blotting A tg8/LC3蛋白是一种可以结合磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)的泛素样蛋白。LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3)是A tg8在哺乳动物中基因的同源物。LC3有前LC3、LC3I和LC3II3种形式。A tg8-PE/LC3-II是唯一能可靠关联自噬体的蛋白标记物,LC3 Western blotting可以很容易地监测到自噬发生时LC3II量的变化。研究发现LC3II量的改变是组织和细胞依赖的,因此可能出现电镜下检测到自噬体体积聚但LC3量却不能很好与之相关的现象^[9]。可见A tg8/LC3 Western blotting必须结合其它监测综合分析自噬。

③ TOR和A tg1激酶活性 研究表明,抑制TOR可以诱导自噬的发生,TORC1(TOR complex 1)对自噬起到负调节的作用。通过其靶蛋白和下游效应物的磷酸化可以监测TORC1的活性,从而间接反应自噬。TORC1活性的下降可以诱导自噬的发生。相反,在体外A tg1激酶活性的增高可以诱导自噬的发生。因此检测TORC1和A tg1激酶的活性可以验证自噬是否诱导成功^[10]。然而自噬尚存在不依赖

TOR诱导的机制,加之A tg1激酶的生理性底物尚未鉴定成功,使目前通过检测A tg1激酶活性核实自噬诱导成功的应用受到了限制^[11]。

3.2 细胞自噬过程(Flux)监测

①自噬性蛋白降解速率 自噬性蛋白降解速率是一种行之有效的具有高度量化的自噬过程检测方法。通过纳入放射性氨基酸(如¹⁴C亮氨酸和缬氨酸)来标记最能代表细胞自噬的蛋白,并测量完整细胞蛋白标记处释放的随时间变化的放射性^[5]。据放射强度来量化自噬过程的强弱。这种方法对体外培养的细胞行之有效,但却不能用于动物实验。

② LC3II蛋白的动态变化 最近补充的一种监测自噬的方法是观察胞质内LC3II的水平及其与LC3I的比率,这种方法在监测自噬变化方面比仅仅检测总LC3II的水平更加准确而全面。其有效性已经在大鼠肝细胞及肝癌细胞自噬蛋白水解过程中得以验证^[12]。需要注意的是在应用LC3-II和LC3-I比率分析时,蛋白必须是可溶性的胞浆内形式而不是总的蛋白量。由于在许多标准的细胞系中(包括HeLa细胞、HEK293细胞)尚未发现可溶性的胞质LC3II蛋白,因此其是否适用于其它细胞系尚待研究证实。

③ GFP-A tg8/LC3复合物游离GFP的释放 当GFP-A tg8/LC3B(GFP-LC3)被递送到溶酶体后A tg8/LC3被其降解,而GFP蛋白相对抗水解故从复合物中游离出来。因此通过Western blotting检测GFP-A tg8/LC3复合物游离GFP的释放可以既动态又量化的监测到自噬体内膜的分解过程^[13]。同时GFP-LC3向溶酶体的移动过程还可通过荧光显微镜进行动态观察及定位。GFP-A tg8/LC3复合物游离GFP的释放检测受到细胞类型及培养环境的限制(如pH)。研究表明不同酸性环境可检测出不同的游离GFP水平,因此运用GFP-A tg8/LC3复合物游离GFP的释放检测时必须考虑对GFP蛋白最佳的pH范围^[14]。

④ p62 Western blotting p62蛋白起着连接LC3蛋白和泛素化底物的作用,被纳入完整的自吞噬体中,并由自噬溶酶体降解。研究发现在野生型MEFs细胞的饥饿诱导过程中p62蛋白量减少,表明自噬参与调节了p62蛋白的降解。相反在A tg5^{-/-}的MEFs细胞中p62含量却并未减少,同时其基础表达水平上升,提示p62蛋白含量的增多可能是自噬被抑制的一种很好的指示^[15,16]。然而p62蛋白还参与了蛋白酶体的降解,当蛋白酶受抑制时其表达量增高可不依赖于自噬而发生变化。因此仅仅检测p62还不

足以评估自噬过程^[17]。

4 细胞自噬与凋亡

细胞凋亡与自噬作为 I型和 II型程序性细胞死亡,通常共存于同 1个细胞内,而两者的作用和功能却相互影响、制约和平衡,可在不同的状态下产生不同的结果。自噬通常有助于细胞存活,而细胞凋亡却无一例外地最终导致细胞死亡。在饥饿和致 DNA 损伤药物的作用下,细胞自体吞噬可延缓细胞凋亡的发生,并最终可能避免细胞的死亡;在 VCR 诱导的 HepG2 细胞凋亡中自噬是凋亡所必需的^[18];而在哺乳动物的胚胎发育期间细胞自体吞噬既不延缓也不促进细胞凋亡。最近的研究证实自噬和凋亡 2条通路间存在着交叉反应,受到某些共同因子和成分的作用。抑制凋亡同样会抑制自噬的形成,相反凋亡的激活则会诱导自噬发生。自噬与凋亡这 2条通道受共同的因素激发,具有相似的调控途径,可以互相重叠地发挥功能,而且 1条通道可以调节和改变另 1条通道的活性。长期以来认为可激活细胞凋亡的多种信号如鞘脂类、死亡受体信号分子、丝氨酸或苏氨酸死亡激酶以及与线粒体有关的细胞死亡蛋白,同样可以激活细胞自体吞噬。反之抑制细胞凋亡的信号通道如一级 PI3K 或者 Akt 信号通道和压力激活 NF- κB 信号通道也可抑制细胞自体吞噬^[19]因此,自噬和凋亡之间存在依生物学背景而变化的复杂动态关系,而目前这种关系尚未被完全认识^[20]。

5 细胞自噬与肿瘤

自噬与肿瘤的发生和发展具有重要关系,并且为肿瘤治疗提供了新思路,是目前国际肿瘤研究中的热点。自噬在肿瘤进展中的角色随疾病病程而不断发生动态变化,自噬初期可以作为肿瘤发生的一种抑制因素,对自噬的抑制可使蛋白降解减少,合成代谢增加,最终导致原癌细胞持续增殖。在肿瘤生长过程中,尤其是当肿瘤内还没有形成足够的血管为其扩增提供营养时,肿瘤细胞可以通过自噬来克服营养缺乏和低氧的环境得以生存。同时自噬对线粒体的分隔可防止促凋亡因子如细胞色素和凋亡诱导因子 (apoptosis induced factor AIF) 的扩散。此外,自噬可以清除电离辐射时受损的大分子或细胞器(如线粒体),保护肿瘤细胞免受电离辐射的作用,从而逃避凋亡而存活下来。因此自噬对肿瘤细胞具有抑制和促进的双重作用^[21]。

肿瘤细胞的特点之一是逃避凋亡。近年来的研究发现抗肿瘤药物作用于肿瘤细胞的过程中自噬具有特殊的意义,能使肿瘤细胞在还没有形成足够的血管为其扩增提供营养时,通过自噬来克服营养缺

乏和低氧的环境,从而避免进入凋亡途径。此外还存在涉及自噬的非凋亡途径发生的死亡。抗肿瘤药物引起肿瘤细胞发生自噬与药物的种类、肿瘤细胞的类型、药物的浓度、药物作用细胞的时间等因素有关^[22]。近年来,随着分子生物学的进步和药理学的深入探索,为恶性肿瘤的药物治疗提供了不少新靶点,抗肿瘤药正从传统的细胞毒药物向针对多环节作用的新型抗肿瘤药物发展(如肿瘤血管生成抑制剂、肿瘤分化诱导剂等)。肿瘤预后不佳的重要因素是肿瘤细胞对放、化疗药物的耐受。Kessel 等^[23]发现在白血病 L1210 细胞中,抗癌药 XK469 及其类似物 SH80 可诱发自噬并使细胞生长停滞在 G₂/M 期,从而消除肿瘤细胞对化疗药物的耐受性;在人淋巴瘤细胞中,自噬抑制剂氯喹可增强肿瘤细胞对凋亡诱导剂的敏感性,因而还可以考虑自噬抑制剂与凋亡诱导剂合用治疗肿瘤^[24];而在肿瘤发生的晚期阶段,肿瘤细胞可能通过细胞自噬在低血管化的环境中生长,因而可考虑抑制自噬活性,以达到治疗肿瘤的目的。已有研究证实通过抑制自噬可以增强 5-FU 诱导的细胞凋亡性死亡^[25]。由于自噬与肿瘤存在双重关系,诱发自噬并不一定会导致肿瘤细胞的死亡。因此,目前尚不能盲目地将自噬诱导剂、抑制剂应用于临床,否则不但不能阻止肿瘤的发生,反而会促进肿瘤的发展。寻找靶向于自噬分子机制的抗肿瘤药物对于肿瘤的分子治疗具有重要的意义。如何使抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞产生自噬,继而引起细胞死亡?如何来消除自噬对肿瘤细胞的保护作用?这些都是药物诱导肿瘤细胞自噬治疗肿瘤时需解决的问题。相信随着对自噬研究的不断深入和药剂学、基因技术的飞速发展,靶向性药物及自噬基因的靶向治疗将为肿瘤治疗和联合化疗开辟新的天地。

6 结语

自噬贯穿于正常细胞生长发育和生理病理过程,因此对细胞自噬作用和自噬性细胞死亡的研究不仅具有理论意义,而且也具有非常重要的应用价值。自噬基因的发现使我们从分子水平认识了自噬,但对自噬起源、信号转导及其对细胞生存影响的了解尚不全面。随着对自噬作用机制的深入研究,我们期望可以通过调控细胞的自噬水平,控制癌症及其它疾病的发展。

[参考文献]

- [1] Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve[J]. Autophagy, 2008, 4(6): 740–743.
- [2] Crotzer VL, Blüm JS. Autophagy and intracellular surveillance.

- lance M odulating MHC class II antigen presentation w ith stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(22): 7779 – 7780
- [3] Majeski AE, Fred Dice JE. M echanisms of chaperone- m ediated autophagy[J]. Int J Biochem Cell Biol 2004, 36 (12): 2435– 2444
- [4] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al Autophagy fights disease through cellular self- digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069– 1075
- [5] Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. M ethods for monitoring autophagy from yeast to human[J]. Autophagy, 2007, 3(3): 181– 206
- [6] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. Autophagy, 2008, 4(2): 151– 175
- [7] Brimingham CL, Canadien V, Gouin E, et al L isteria monocytogenes evades killing by autophagy during colonization of host cells[J]. Autophagy, 2007, 3(5): 442– 451
- [8] Kovács AL, Pálffy Z, Réz G, et al Sequestration revisited integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results[J]. Autophagy, 2007, 3(6): 655 – 662
- [9] Tanida I, Minematsu- Ikeguchi N, Ueno T, et al Lysosomal turnover but not a cellular level of endogenous LC3 is a marker for autophagy[J]. Autophagy, 2005, 1(2): 84– 91.
- [10] Kanada Y, Funakoshi T, Shintani T, et al Tor- m ediated induction of autophagy via an A pg1 protein kinase complex [J]. Cell Biol 2000, 150(6): 1507– 1513
- [11] Scherz- Shouval R, Shvets E, Fass E, et al Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4[J]. EMBO J 2007, 26(7): 1749– 1760
- [12] Karim MR, Kanazawa T, Daigaku Y, et al Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4- II- E cells[J]. Autophagy 2007, 3 (6): 553– 560
- [13] Gutierrez MG, Saka HA, Chinen I, et al Protective role of autophagy against vibrio cholera cytolsin a pore- forming toxin from V. cholerae[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(6): 1829– 1834
- [14] Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent- tagged LC3[J]. Autophagy, 2007, 3 (5): 452– 460
- [15] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress[J]. Nat Med 2007, 13 (5): 619– 624
- [16] Wang QJ, Ding Y, Kohtz S, et al Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration[J]. J Neurosci 2006, 26(31): 8057– 8068
- [17] Bardagi- Gorce F, Francis T, Nan L, et al Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease[J]. Life Sci 2005, 77(20): 2594– 2602
- [18] Zhan ZZ, Chen S, Ye Y, et al Autophagy protects human gastric cancer cell from apoptosis induced by the microtubule- targeting agent Taxol[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhalt 2007, 42(2): 123– 127.
- [19] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al Autophagy fights disease through cellular self- digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069– 1075
- [20] 王海杰, 谭玉珍, 何 韬, 等. 尘粒对巨噬细胞自噬的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1524 – 1528
- [21] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. Oncogene 2004, 23 (16): 2891– 2906
- [22] Yu YX, Gu ZL, Qin ZH, et al The role of autophagy in pharmacological actions of anticancer drugs[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 22(2): 137– 140
- [23] Kessel D, Reiners JJ, Haseldine ST, et al The role of autophagy in the death of L1210 leukemia cells initiated by the new antitumor agents XK469 and SH80[J]. Mol Cancer Ther 2007, 6(1): 370– 379.
- [24] Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, et al Autophagy inhibition enhances therapy- induced apoptosis in a Myc- induced model of lymphoma[J]. J Clin Invest 2007, 117(2): 326 – 336
- [25] Li J, Hou N, Faried A, et al Inhibition of autophagy by 3- MA enhances the effect of 5- FU – induced apoptosis in colon cancer cells[J]. Ann Surg Oncol 2009, 16(3): 761– 771.