

## 自噬的诱导机制及其在肿瘤治疗中的作用

魏清 综述 万小云 审校

(浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

**[摘要]** 自噬是发生在细胞中由初级溶酶体处理内源性底物的重要过程。自噬的分子诱导机制非常复杂且具有高度的保守性,其可能与 PI3-Akt-mTOR 信号转导通路、RAS-RAF-1-MEK-ERK1/2 信号转导通路等有关。近年研究表明,自噬活性的变化与人类肿瘤的发生发展密切相关。因此,通过调节自噬活性治疗肿瘤可能成为肿瘤治疗领域的一个新靶点。

**[关键词]** 自噬; 诱导机制; 肿瘤治疗

**[中图分类号]** R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2008)01-0045-04

## Induction mechanisms of autophagy and its role in cancer therapy

WEI Qing, WAN Xiao-yun

(Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

**[Abstract]** Autophagy is an important process in which preformed lysosomes process endogenous substrates in cells. The molecular inductive mechanisms of autophagy which may relate with PI3K-Akt-mTOR and RAS-RAF-1-MEK-ERK1/2 signalling translations are not only very complex, but highly conserved. Recent researches indicated that the changes of autophagy were associated with the genesis and development of tumor. Therefore, regulating the activities of autophagy may be a new target of cancer therapy.

**[Key words]** autophagy; inductive mechanisms; cancer therapy

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(1):0045-04]

自噬 (autophagy) 是发生在细胞中由初级溶酶体处理内源性底物的重要过程,生命体借此维持蛋白代谢平衡及细胞内环境的稳定,这一过程在细胞清除废物、结构重建以及生长发育中起重要作用。然而自噬活性过高或过低亦可导致多种疾病的发生,如多种恶性肿瘤。自噬的分子诱导机制复杂且具有高度的保守性,PI3K-Akt-mTOR 信号转导通路, RAS-RAF-1-MEK-ERK1/2 通路及 III 型 PI3K 复合物等均参与调节自噬活性,从而在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用。因此,通过调节自噬活性治疗肿瘤可能成为肿瘤治疗领域的一个新靶点。

### 1 自噬及自噬的诱导机制

1.1 自噬 细胞内环境稳态的维持需要其各组分处于不断合成与代谢的动态平衡中。蛋白质的降解除可由泛素-蛋白酶体系统外,还可经由自噬进行,自噬主要降解内源性长寿命蛋白及蛋白聚集体。此外,自噬还可降解受损的胞内细胞器,从而为细胞生长提供氨基酸、ATP 等。

自噬可由细胞营养如氨基酸、生长因子缺乏,低氧,感染及细胞器受损等刺激诱导。自噬被诱导后,细胞内的包裹膜(可能由内质网、高尔基体及其他一些膜间隔组成)延伸,包裹含有大分子物质及受损细胞器的细胞质,形成具有双层或多层膜的液泡即自

收稿日期:2007-06-13 修回日期:2007-08-27

作者简介:魏清(1981-),女,河南南阳人,硕士研究生,主要从事妇科肿瘤研究。

基金项目:浙江省自然科学基金(Y206100) This work was supported by Zhejiang Nature and Sciences Grant (Y206100)

噬体或自噬囊泡(酵母)。自噬体/自噬囊泡形成后,其外膜与溶酶体融合形成自噬溶酶体,而内膜及自噬体内容物则被多种溶酶体酶消化降解成氨基酸、核苷酸以及游离脂肪酸等小分子物质。这些小分子物质再经自噬溶酶体外膜溢出,参与再循环,继续合成大分子蛋白质、ATP以及细胞器<sup>[1-2]</sup>。细胞自噬的整个过程被进化上高度保守的一系列自噬相关基因 Atg (autophagy-related gene) 所控制。

## 1.2 自噬的诱导机制

### 1.2.1 I型PI3K-Akt-mTOR信号转导通路

mTOR (mammalian target of rapamycin) 是该通路的关键性效应因子,它是一种进化上高度保守的丝苏氨酸蛋白激酶,属PI3K相关激酶(PI3K-related kinases, PIKKs) 家族成员。mTOR的抑制与活化由TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex, TSC) 控制, TSC1/TSC2 激活后可作为GTP酶活化蛋白来激活GTP酶,使有活性Rheb-GTP转为失活Rheb-GDP,从而抑制mTOR的活化<sup>[3]</sup>。

生长因子、胰岛素等均可激活该通路而抑制自噬的发生。在生长因子、胰岛素的刺激下,胞膜上的相应受体表达增加,配体与受体发生作用后,膜上的酪氨酸激酶受体或胰岛素受体作用底物IRS-1, IRS-2 活化,从而使膜上的PI3K表达增多。在活化的PI3K P110 催化亚基作用下,PI(4,5)P2 转化为PI(3,4,5)P3,从而募集AKT及PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) 至细胞膜上。AKT上的Thr308被PDK1磷酸化, Ser473 则被PDK2磷酸化, AKT被激活。AKT属cAMP, cGMP依赖蛋白激酶C家族成员。活化的AKT从细胞膜上释放下来,并磷酸化TSC2使之失活, Rheb则被活化,进而激活mTOR复合物,抑制自噬。mTOR复合物mTOR-Raptor (regulatory associated protein of TOR, Raptor)-GβL (G-protein-β-subunit-like protein) 的活化在促mRNA的翻译中发挥重要作用<sup>[4]</sup>:它与活化的PDK1共同磷酸化翻译调节因子S6K1, S6K2 (ribosomal S6 kinase) 而促进蛋白质的翻译,促进细胞生长;它还能抑制eIF4E-BP (eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins), 使之释放出eIF4E,从而促进依赖eIF4E的蛋白质翻译。此外,活化的mTOR-Raptor及S6K1还可磷酸化IRS-1使之失活,从而负反馈抑制PI3K-AKT-mTOR信号转导通路<sup>[5]</sup>。

反之,在生长因子、胰岛素等缺乏的情况下,PI3K-AKT-mTOR信号转导通路被抑制, mTOR的失

活导致Atg13去磷酸化后与Atg1紧密结合,并与其他多种Atg蛋白(如酵母中的Atg11, Atg17, Atg20, Atg24, Vac8等)结合形成Atg1-Atg13复合物, Atg1进而被Atg13磷酸化,诱发自噬<sup>[6]</sup>。但是在Atg1-Atg13复合物中,各种Atg蛋白的具体作用尚未阐明, Atg1-Atg13复合物诱导自噬的机制亦不清楚。另外Lee等<sup>[7]</sup>研究发现,在果蝇及哺乳动物中,当营养缺乏时,Atg1可阻断S6K上Thr389的磷酸化过程而抑制S6K的活性,从而抑制mTOR/S6K依赖的细胞生长,故认为自噬与细胞生长之间存在一定关系。

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) 基因属抑癌基因,其产物是一种脂质磷酸酶,可水解PI(3,4,5)P3为PI(4,5)P2,从而对抗I型PI3K的脂质激酶活性,促进自噬的发生<sup>[8]</sup>。在人类多种恶性肿瘤中,由于PTEN基因经常缺失或突变,因而自噬活性下降。

### 1.2.2 RAS-RAF-1-MEK-ERK1/2信号转导通路

RAS属GTP酶家族成员,其活化形式是RAS-GTP。当细胞内氨基酸、生长因子缺乏时, RAS活化后与RAF-1高亲和残基结合,并募集RAF-1至膜上与RAS-GTP结合,然后RAF-1在多种激酶的作用下其ser338被磷酸化而活化。RAF-1属丝苏氨酸蛋白激酶,活化后可磷酸化MEK (MAPK/ERK kinase) 上ATP结合位点(T环)处的丝氨酸, T环上氨基酸残基的磷酸化利于细胞外信号调控激酶1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 接近MEK上的催化亚基。另外, MEK是一种少见的具有双重特异性的激酶,可同时磷酸化ERK1/2上靠近T环处的丝氨酸和酪氨酸残基而使ERK1/2活化。

ERK1/2属细胞分裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 亚家族成员,为丝苏氨酸蛋白激酶。在人结肠癌细胞株HT-29中,活化的ERK1/2可使Gα干扰蛋白(Gα-interacting protein, GAIP)的RGS结构域上的151位丝/苏氨酸残基磷酸化而活化, GAIP是一种GTP酶活化蛋白,可使GTP转化为GDP,因而使Gαi3蛋白从无活性(Gαi3-GTP)转化为有活性(Gαi3-GDP)形式,活化的Gαi3蛋白可促进自噬前体的形成,从而诱导自噬的发生<sup>[9]</sup>。

1.2.3 III型PI3K复合物 该复合物多可诱导自噬的发生。III型PI3K/Vps34(酵母)发挥作用与其亚基P150/Vps15(酵母)有关, P150/Vps15能将酶锚定在细胞膜上。在酵母中, Atg14与Atg6(哺乳

动物 Beclin1 类似物)、Vps34 均有亲和力,因而可形成由 Atg6-Atg14-Vps34 组成的 III 型 PI3K 复合物<sup>[10]</sup>。

在哺乳动物中,尚未发现有 Atg14 类似的桥联蛋白。Beclin1 是抑癌基因 BECN1 的产物,该基因在很多肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌中均存在缺失或突变<sup>[11]</sup>。当氨基酸缺乏时,Beclin1-Bcl2 复合物分离,释放出 Beclin1,进而与 III 型 PI3K 结合,形成 Beclin1-III 型 PI3K 复合物。

活化的 PI3K 可使 PtdIn3 磷酸化为 PI-(3)P,PI-(3)P 可募集含有 FYVE 或 PX 结构域的蛋白质至自噬前体膜上,这些蛋白质为自噬体/自噬囊泡形成所必需。另外,Beclin1 也可促进自噬囊泡的形成,诱发自噬。

此外,可能还有  $Ca^{2+}$ -CaMKK $\beta$  (calmodulin-dependent kinase kinase- $\beta$ )-AMPK (AMP-activated protein kinase) 信号转导通路<sup>[12]</sup> 及活性氧<sup>[13]</sup> (reactive oxygen species, ROS) 等促进自噬的发生。

## 2 自噬与肿瘤

**2.1 自噬在肿瘤中的作用** 研究发现<sup>[14]</sup>,在多种人类肿瘤中均存在自噬活性的改变。在肝癌、胰腺癌以及乳腺癌等中,肿瘤细胞的自噬活性比其来源的正常细胞的自噬活性要低,并且在细胞密度增高或血清、氨基酸缺乏时自噬活性也不增加。由此可见,自噬与肿瘤之间存在着一定的关系,然而,自噬究竟是抑制还是促进肿瘤的发生、发展,仍然是当今国际上争论的热点。

自噬可抑制肿瘤的发生。首先,自噬可清除受损细胞器以避免有害自由基及突变的发生,从而避免更大的损伤。然而,在人类多种肿瘤中,自噬诱导基因 BECN1 均存在缺失或突变,从而失去对肿瘤的抑制作用<sup>[11]</sup>。在体外实验中,将 BECN1 重新导入人乳腺癌细胞株 MCF-7 中,自噬可被诱发,从而抑制细胞增殖及肿瘤形成<sup>[15]</sup>。其次,自噬可限制 DNA 损伤,维持基因组完整性。在永生鼠肾上皮细胞中,自噬活性降低可导致细胞 DNA 损伤,基因扩增,染色体非整倍性等。这种基因组的不稳定增加了致癌性突变率,促进了肿瘤的发生<sup>[16]</sup>。再次,自噬可抑制细胞生长,诱发凋亡性细胞死亡。Scott 等<sup>[17]</sup> 研究发现,Atg1 高表达所诱导的自噬可使细胞明显缩小,从而控制细胞生长。同时发现自噬可诱发细胞死亡,但是这种细胞死亡具有明显的凋亡特征,因而认为自噬可能是通过诱发凋亡而导致细胞死亡。

然而,当快速生长的肿瘤细胞缺乏营养时,如肿瘤晚期,位于中央的肿瘤细胞缺乏足够的血供,自噬被诱发,通过降解胞内蛋白质及细胞器为肿瘤细胞的生长提供营养及能量。因此,在肿瘤发生的晚期阶段,自噬可能利于肿瘤细胞在低血管化的环境中生长。另外,Herman-Antosiewicz 等<sup>[18]</sup> 发现在用莱菔硫烷治疗人前列腺细胞时可诱发自噬,而且这种自噬可抑制前列腺癌细胞发生凋亡性死亡而使肿瘤细胞存活,因而认为自噬为肿瘤细胞提供了一种逃避凋亡性细胞死亡的机制,从而导致肿瘤对药物的耐受。提示自噬可能在不同肿瘤或同一肿瘤的不同阶段发挥不同的作用。

**2.2 自噬在肿瘤治疗中的应用前景** 在肿瘤发生、发展过程中,诱发自噬的一个重要通路即 PI3K-Akt-mTOR 通路的失调是一频发事件,如抑癌基因 PTEN, TSC1, TSC2 等经常性的突变或缺失,癌蛋白 I 型 PI3K, AKT, PDK1 的频繁激活,因此, mTOR 可作为肿瘤治疗的一个靶点。目前发现的 mTOR 抑制剂有雷帕霉素及其衍生物 CCI-779, RAD001 及 AP23573 等。

在人乳癌 MCF-7 细胞中,神经鞘氨醇激酶 1 (sphingosine kinase 1, Sk1) 可通过增加 LC3 阳性自噬体的形成而诱发自噬的发生<sup>[19]</sup>。在鼠白血病 L1210 细胞中,利用光动力学治疗 (photodynamic treatment, PDT) 肿瘤可同时诱发自噬以及凋亡,从而抑制肿瘤发展<sup>[20]</sup>。在治疗肿瘤的化疗药物中,他莫昔芬、神经酰胺通过上调 Beclin1 并抑制 AKT 促进自噬的发生。此外,治疗恶性胶质瘤的替莫唑胺、三氧化二砷,治疗卵巢癌的白藜芦醇、金雀异黄素,治疗结肠癌的大豆 B 组三萜皂苷,慢性髓细胞性白血病的酪氨酸激酶抑制剂 imatinib, 乳腺癌的冬凌草素甲,肝癌的龙葵提取物、刀豆球蛋白 A, 放疗等亦可诱发自噬。

众所周知,导致肿瘤预后不佳的一个重要因素是肿瘤对放、化疗药物的耐受。而 Kessel 等<sup>[21]</sup> 发现在白血病 L1210 细胞中,抗癌药物 XK469 及其类似物 SH80 可诱发自噬并使细胞生长停滞在 G<sub>2</sub>-M 期,从而消除肿瘤细胞对化疗药物的耐受性。

由于在肿瘤发生的晚期阶段,自噬可能利用肿瘤细胞在低血管化的环境中生长,因而还可考虑抑制自噬活性。氯喹可通过破坏溶酶体的结构和功能阻止自噬降解,在胰腺癌细胞株中,组织转谷氨酰胺酶亦可抑制自噬的发生<sup>[22]</sup>。此外,自噬抑制剂尚

有3-甲基腺嘌呤(3-MA)等。

此外,还可考虑联合用药,如在恶性胶质瘤细胞体外实验中,PI3K抑制剂LY294002,AKT抑制剂UCN-01能协同增强mTOR抑制剂雷帕霉素诱发自噬<sup>[23]</sup>。用IR(ionizing radiation)体外治疗人恶性胶质瘤细胞时,特异性抑制DNA-PK(DNA-PK可修复由IR诱导的DNA双链断裂)可增强IR诱导的自噬性细胞死亡作用<sup>[24]</sup>。另外,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<sup>[25]</sup>,因而可以考虑自噬抑制剂与凋亡诱导剂的合用。但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、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。

### 参 考 文 献

- [1] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2679-2688.
- [2] Yang Z, Huang J, Geng J, et al. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(12): 5094-5104.
- [3] Inoki K, Li Y, Xu T, et al. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(15): 1829-1834.
- [4] Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(1): 200-216.
- [5] Shah OJ, Hunter T. Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(17): 6425-6434.
- [6] Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, et al. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(5): 2544-2553.
- [7] Lee SB, Kim S, Lee J, et al. ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase[J]. *EMBO Reports*, 2007, 8(4): 360-365.
- [8] Leslie NR, Yang X, Downes CP, et al. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-dependent and -independent roles for PTEN in the control of cell migration[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(2): 115-125.
- [9] Pattingre S, Petiot A, Codogno P. Analyses of Galpha-interacting protein and activator of G-protein-signaling-3 functions in macroautophagy[J]. *Methods Enzymol*, 2004, 390: 17-31.
- [10] Devrim G, Adi K. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism[J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2891-2906.
- [11] Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1809-1820.
- [12] Hyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2[J]. *Mol Cell*, 2007, 25(2): 193-205.
- [13] 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.
- [14] Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1603(2): 113-128.
- [15] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672-676.
- [16] Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(11): 1367-1381.
- [17] Scott RC, Juhsz G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(1): 1-11.
- [18] Herman-Antosiewicz A, Johnson DE, Singh SV. Sulforaphane causes autophagy to inhibit release of cytochrome C and apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5828-5835.
- [19] Lavie G, Scarlatti F, Sala G, et al. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(13): 8518-8527.
- [20] Kessel D, Vicente MG, Reiners JJ Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy[J]. *Lasers Surg Med*, 2006, 38(5): 482-488.
- [21] Kessel D, Reiners JJ, Hazeldine 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.
- [22] Akar U, Ozpolat B, Mehta K, et al. Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(3): 241-249.
- [23] Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, et al. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3336-3346.
- [24] Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, et al. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4368-4375.
- [25] 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.