

①

自噬的分子机制与病理生理意义

叶青 综述 郑民华 审校

(上海市微创外科临床医学中心,上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所,上海 200025)

[摘要] 自噬是以细胞质空泡化为特征的溶酶体依赖性的降解途径。自噬可以降解胞质内受损的结构,并产生氨基酸、游离脂肪酸等物质以供蛋白质和能量的合成,使细胞能够适应缺氧和饥饿等环境。自噬的过程受一系列复杂的信号分子的调控,调控机制的失效与肿瘤、神经退行性疾病、衰老等有重要的联系。

[关键词] 自噬; 自噬体; 溶酶体; 信号转导

[中图分类号] Q255 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2007)04-0358-05

Molecular mechanism of autophagy associated with diseases

YE Qing, ZHENG Min-hua

(Shanghai Minimally Invasive Surgery Center, Institute of Digestive Surgery, Rui-jin Hospital,
Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] Autophagy is a vacuolar process of cytoplasmic degradation by lysosome. Cells may exploit autophagy as a means to adapt to hypoxic and nutrient limiting environments by eliminating defective cell structures and producing substrates such as amino acids, free fatty acids for ongoing protein synthesis and energy production. The process is controlled by complex signalling pathways. Irregularity of autophagy is associated with such as several diseased states cancer, neurodegenerative diseases, and aging.

[Key words] autophagy; autophagosome; lysosome; signaling transduction

[Int J Pathol Clin Med, 2007,27(4):0358-05]

自噬 (autophagy) 是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,是真核细胞特有的生命现象。自噬现象最早是 Ashford 和 Porten 于 1962 年用电子显微镜在人的肝细胞中观察到。但直到近 10 年,随着酵母模型的建立和基因技术的发展,人们对自噬分子机制和形态特点的了解才逐渐深入,并认识到自噬性细胞死亡有别于凋亡 (I 型程序性死亡),而被称为 II 型程序性死亡。

1 自噬的概念

1.1 自噬的过程及形态特征 自噬的发生过程大致分为 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 (部分的胞浆和细胞内需降解的细胞器、蛋白质) 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 (autophagosome);(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^[1-2]。自噬体直径一般为 300 ~ 900 nm,平均 500 nm。自噬体形成之初,胞浆与核质变暗,但胞核结构无明显变化,可见线粒体和内质网膨胀,高尔基体增大,胞膜特化结构如微绒毛、连接复合物等消失,胞膜发泡并出现内陷。自噬后期,自噬体的体积和数量都有所增加,其内常充满髓磷脂或液体,出现灰白色成分,少数可见核固缩,这些特征可作为形态学检查的依据。

1.2 自噬的分类 根据底物进入溶酶体途径的不同可将自噬分为 3 种类型:微自噬 (microautoph-

①收稿日期:2007-04-02 修回日期:2007-05-21

作者简介:叶青(1981-),男,福建福州人,博士研究生,主要从事结直肠癌肿瘤的基础与临床研究。

agy)、巨自噬(macroautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)。巨自噬即通常所指的自噬,胞质被来源于内质网的非核糖体区域、高尔基体等脱落的双层膜所包绕。在微自噬中也发生相同的包绕过程,但包绕底物的是自身发生内陷的溶酶体膜。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]。

1.3 自噬的功能 自噬过程经历的时间相对较短($T_{1/2}$ 为8 min),说明自噬是细胞对于环境变化的有效反应,对新陈代谢起着举足轻重的作用:(1)自噬是对外源性刺激(包括营养缺乏、细胞密度负荷、低氧、氧化应激、感染等)的适应性反应,其降解产物氨基酸、核苷酸、游离脂肪酸等可供物质能量循环;(2)自噬作为细胞保持稳定状态的管家机制,可调控长寿命蛋白、过氧化物体、线粒体和内质网的更新;(3)自噬参与一定的组织特异性融合;(4)自噬既可以作为一种防御机制清除胞质内受损的细胞器、代谢产物,进行亚细胞水平上的重构,保护受损的细胞,同时它作为一种细胞死亡程序诱导细胞主动性死亡^[4]。

2 自噬的分子机制

2.1 自噬形成的分子机制 在酵母的研究中发现了4组酵母自噬相关基因atg(autophagy related gene),它们的编码蛋白在自噬的诱导、产生、成熟、再循环中起重要作用。(1)上游自噬信号被激活,Atg1-Atg11-Atg17-Atg20-Atg24复合物和Atg8-Atg13复合物因Atg1和Atg13的去磷酸化而结合促进下游自噬信号激活。(2)Ⅲ型磷脂酰肌醇三磷酸激酶(Class III PI3k)复合物(Atg6-Atg14-Vps15-Class III PI3k)磷酸化磷脂酰肌醇(PI)为3-磷脂酰肌醇(PI3P),募集胞浆中含-FYVE-或-PX-基序的蛋白质,用于自噬体膜的形成^[4]。(3)Atg8和Atg12泛素样蛋白系统:Atg8的修饰过程对自噬体的形成必不可少。它被半胱氨酸酶Atg4/Atg2切割后具备形成硫酯键的活性,在E1样酶Atg7、E2样酶Atg3的共同作用下与磷脂酰乙醇胺PE连接。Atg12系统直接参与自噬体前体的形成,Atg12首先由E1样酶Atg7活化,之后转运至E2样酶Atg10,最后与Atg5结合,形成自噬体前体,Atg12-Atg5与Atg16形成六聚体复合物(Atg12-Atg5-Atg16)₂,一方面促进了自噬泡的

伸展扩张,使之由开始的小囊泡样、杯样结构逐渐发展为半环状、环状结构。Atg5复合物与自噬体膜的结合还促进了Atg8-PE向自噬泡的募集,最后孤立的自噬体前体膜连接形成完整的自噬体^[46]。(4)Atg2-Atg9-Atg18复合物参与其他ATG蛋白从成熟自噬体上脱离和循环利用^[4]。近些年在人及其他高等动物中克隆出部分atg的同源基因及编码蛋白。Atg8在人类存在3种同源体:GABARAP(γ -氨基丁酸受体相关蛋白)、GATE-16(高尔基体相关ATP酶增强子)和LC3(微管相关蛋白3)。LC3被Atg4的同源体hATG4B加工形成LC3-I,LC3-I的PE修饰形式LC3-II位于自噬体的内膜和外膜,其与荧光蛋白形成融合蛋白后,很容易在细胞内定位,所以LC3通常被用作哺乳动物细胞中自噬体膜的标记蛋白^[7]。在体外培养的鼠胚胎干细胞中,Atg5的同源体参与自噬体的形成,Atg5和Atg12在人类的同源体hATG5和hATG12也相互连接。其他的酵母Atg蛋白在人类的同源体见表1^[8]。还有研究发现反义Atg6,Atg5和Atg10等能明显抑制细胞自噬体的形成,降低胞质空泡化程度低。而LAMP1和LAMP2编码溶酶体相关膜蛋白,用LAMP2siRNA处理细胞,空泡化程度没有降低反而增高^[9],LAMP-2基因缺陷的小鼠死亡率增加,幸存的小鼠出现多组织广泛的自噬性空泡^[10],这是因为形成的自噬体没有与溶酶体融合降解,导致自噬体大量积聚。

2.2 自噬的调控机制

2.2.1 依赖mTOR(mammalian target of rapamycin)途径的自噬 mTOR作为氨基酸、ATP、生长因子、胰岛素等的感受器,对细胞生长具有重要调节作用,抑制自噬的发生,发挥“门卫(gatekeeper)”作用。mTOR的上下游信号转导途径较为复杂,mTOR上游通路:胰岛素、生长因子(胰岛素样生长因子,血小板源性生长因子和表皮生长因子等)结合于跨膜胰岛素受体或酪氨酸激酶受体(IR,RTK)后,激活I型磷脂酰肌醇三磷酸激酶(Class I PI3K),使PIP被磷酸化为PIP3,PIP3结合于Akt/PKB和它的活化分子PDK1。结节性硬化复合物TSC1/2蛋白位于Class I PI3K/PKB途径的下游,同时也能整合胰岛素、生长因子、能量代谢等信号,抑制mTOR的激酶活性,对自噬发挥正向调节作用。TSC2蛋白能够负调节一种小分子鸟苷三磷酸酶Rheb,使具有mTOR结合活性的GTP-Rheb转变为GDP-Rheb。TSC2被AKT磷酸化后,这种负调节作用减弱,mTOR活性增强。

而 AMPK(AMP 活化蛋白激酶)磷酸化 TSC2 后起相反作用。在细胞氧化应激、能量不足时,AMP/ATP 比值增加,AMPK 活性增强,磷酸化激活 TSC1/2 蛋白,从而抑制 mTOR、促进自噬形成^[11-13]。mTOR 下游通路:mTOR 活性抑制时,促进自噬体形成,在酵母中是通过 Atg1 和 Atg13 去磷酸化而促进下游自噬信号,在人类中的机制尚不明了。mTOR 活性增强时,通过磷酸化 S6K1 激活之,进而磷酸化核糖体蛋白 S6(p70S6)来促进 mRNA 翻译,同时促使核糖体与内质网的黏附而抑制内质网膜脱落形成自噬体膜。mTOR 同时也磷酸化 4E-BPs 并抑制其活性,解

除了对真核细胞翻译启动因子 eIF4E 的抑制。有研究发现氨基酸依赖的 mTOR 信号导致胰岛素依赖的 mTOR 信号被抑制,这是因为 S6K1 还可磷酸化 IRS1,导致其与 Class I PI3K 结合减弱,抑制了 Class I PI3K 的下游信号,这可能是在氨基酸丰富条件下避免 mTOR 信号过分激活的一种反馈机制。所以在氨基酸丰富时,mTOR 信号激活,自噬被抑制,S6K1 活性增强,增加了 mRNA 翻译、蛋白质合成,氨基酸缺乏时,原料减少,蛋白质合成减少,同时 mTOR 信号被抑制,自噬增强,S6K1 活性减弱,负反馈 IRS/Class I PI3K 的作用减弱,也增强了自噬^[12-13]。

表 1 哺乳动物自噬相关基因^[8]
Table 1 Mammalian autophagy-related genes^[8]

Yeast	Human	Mouse	Comment
Atg1	ULK1		Unc-51-like kinase interacts with GATE-16 and GABARAP
Atg3	hATG3/hAPG3	mATG3/mAPG3	an E2-like enzyme for LC3, GABARAP, and GATE-16
Atg4	hATG4A/HsATG4A/HsAPG4A/autophagin-2		Cysteine protease for GATE-16
	hATG4B/HsATG4B/hAPG4B/autophagin-1		Cysteine protease for LC3, GABARAP, and GATE-16; Delipidating enzyme for LC3- II and GABARAP
	hAtg4C/HsAUTL1/autophagin-3	Cysteine protease	
	hATG4D/autophagin-4		
Atg5	hATG5/hAPG5		target protein of Atg12
Atg6	beclin 1	beclin 1	related to tumorigenesis
Atg7	hATG7/HsGSA7/hAPG7	mATG7/mAPG7	an E1-like enzyme for Atg12 and Atg8 homologues
Atg8	LC3		modifier for autophagosomes
	GABARAP		modifier
	GATE-16		modifier
Atg10		mATG10/mAPG10	an E2-like enzyme for Atg12
Atg12	hATG12/hAPG12	mATG12/mAPG12	modifier for autophagosome
Atg16		ATG16L/APG16L	interacts with Atg5

2.2.2 不依赖 mTOR 途径的自噬 经典的自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)通过抑制 Class III PI3K(hVps30)的活性抑制自噬形成,siRNA 导致 Class III PI3K 活性的下降大大减少了细胞中自噬的发生,因为 Class I PI3K 的产物 PI3P 是自噬抑制信号,Class III PI3K 的产物 PIP 为激活信号,另外抑癌基因 PTEN 可以水解 PI3P,所以它也是一个促自噬因子。此外,Atg6 的哺乳动物同源体 beclin1 和抑癌基因 UVRAG 作为自噬正调控子,抗凋亡因子 bcl-2 作为自噬负调控子共同参与组成 Class III PI3 复合物调控

自噬^[14]。GTP 结合的 G 蛋白亚基 Gαi3 是自噬的抑制因子,而 GDP 结合的 Gαi3 蛋白则是自噬的活化因子。GAIP(G alpha interacting protein)作为 RGS(regulators of G-protein signaling)家族成员之一,通过 Gαi3 蛋白加速 GTP 的水解,促进自噬的发生。另外死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase,DAPK)和 DAPK 相关蛋白激酶(DAPK-related protein kinase-1,DRP-1)在肿瘤细胞中也可诱导自噬。在用三苯氧胺治疗的乳腺癌 MCF-7 细胞中发现,DRP-1 的低表达可以降低饥饿水平和自噬。在

宫颈癌 HeLa 细胞中发现, DAPK 的低表达可以降低 INF- γ 诱导的自噬^[13-14]。还有实验发现胰岛素, 氨基酸等通过激活 p38MAPK (p38 α) 而抑制自噬, 且不依赖于 mTOR 途径^[13]。PKA、casein 激酶 II、MAP 激酶、calcium 途径也存在于自噬过程错综复杂的调控网络中, 但其机制还不甚清楚。

3 自噬的病理意义

自噬既广泛存在于正常的生理过程中, 如清除细胞废物、结构重建、生长分化等, 又是细胞对不良环境的一种防御机制, 如对抗营养缺乏、电离辐射, 同时还参与多种疾病的病理过程, 无论是自噬过度还是自噬不足都可能导致疾病发生。

3.1 自噬与肿瘤 已证实自噬与癌前病变、癌细胞增殖及其抑制关系密切。Beclin-1 基因与酵母自噬基因 Atg6/Vps30 同源。40% ~ 75% 的人类偶发性乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌细胞中, beclin-1 呈单等位基因缺失。转染 beclin-1 的 MCF-7 细胞自噬增强、细胞生长、克隆形成及乳腺肿瘤形成受抑制。另有研究证明, beclin-1 等位基因敲除的小鼠自发性恶变的概率增加, 提示 beclin-1 是哺乳动物的抑癌基因, beclin-1 的过度表达抑制肿瘤是通过增强自噬实现的^[15]。如: 他莫昔芬可诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 发生自噬^[15], 由神经酰胺介导上调 beclin-1 表达发挥作用。三氧化二砷缓解早幼粒细胞性白血病和多发性骨髓瘤的病情也是通过增加 beclin-1 的表达诱导肿瘤细胞自噬性死亡^[16]。但是有些肿瘤细胞保持了较高的自噬活性, 如肺癌细胞及人宫颈癌 HeLa 细胞等。研究表明, 持续缺乏血清或氨基酸约 3 h, HeLa 细胞中的自噬部分从 4% 上升到 37%。这些肿瘤细胞所具有的高自噬活性对肿瘤细胞在恶劣环境中的生存起到了一定的保护作用, 也可能使一些抗肿瘤药物的作用减弱^[17]。目前认为自噬对于肿瘤细胞存在双向效应。因此, 可能是肿瘤发展不同阶段、组织类型、细胞分化状态、周围环境以及特定的基因特征和信号转导途径共同影响着自噬的活性和结果, 一些自噬因大分子物质循环和有害物质的隔离使肿瘤细胞生存, 一些自噬超过某一阈值大量降解蛋白质与细胞器导致自噬性死亡。

3.2 自噬与其他疾病的关系

3.2.1 自噬与病原体感染 细菌可以被胞质内的自噬体内化, 并被溶酶体降解从而减少细胞内具有复制能力的病原体。还有研究发现自噬消化胞质蛋白能够促进 MHCII 抗原加工过程。IFN- γ 能够诱

导巨噬细胞和其他细胞发生自噬, 在自噬协同下处理 MHCII 抗原加工和呈递。故自噬可以被认为是一种获得性免疫机制, 参与清除入侵的病原体^[18]。然而, 还有一些细菌将自己隐蔽在自噬体双层膜结构内, 宿主的防御机制对其施加了强大的进化压力从而使其获得相应的方法对抗宿主的清除机制而存活^[19]。

3.2.2 自噬与神经退行性疾病 自噬参与异常蛋白质的降解, 有利于防止神经元内异常蛋白质的蓄积, 如帕金森病中的 Synuclein 蛋白的蓄积与自噬能力下降有关。然而自噬作用过度活跃会造成线粒体功能障碍, 如亨廷顿氏舞蹈病与亨廷顿蛋白 (Htt) 的蓄积, Htt 激发自噬伴随着细胞凋亡蛋白酶的激活和大量线粒体的受损^[20-21]。

3.2.3 自噬与衰老 几乎所有的衰老组织都存在溶酶体系统形态学和酶学的改变。随着年龄的增长, 细胞内自噬作用开始减弱, 导致细胞适应外界环境和自身防御反应的能力降低, 损伤的细胞结构及大量氧自由基等活性氧化物不能有效地被清除, 细胞稳态发生变化, 加速细胞老化。维持正常的自噬功能与长寿相关。实验表明, 生命早期即对摄入能量进行限制(一种缓衰老的干预方法)的高龄鼠, 自噬的调节水平与年轻的老鼠十分相似。最近还首次在线虫中发现了自噬与长寿的相关性, 这更是为自噬和衰老的关系提供了相应的基因学证据^[22]。

4 结语

自噬是广泛存在于真核细胞中的生命现象, 贯穿于正常细胞生长发育和生理病理过程。自噬基因的发现使人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。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。通过调控细胞的自噬水平, 有望控制肿瘤及神经退行性疾病的发展, 延缓衰老, 提高生存质量。

参考文献

- [1] Klionsky D J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(1): 7-18.
- [2] Wang C W, Kiiomyk D J. The molecular mechanism of autophagy [J]. *Mol Med*, 2003, 9(3-4): 65-76.
- [3] Majeski A E, Fred Dice J F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2435-2444.
- [4] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2679-2688.
- [5] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. Ubiquitin-like system me-

- diates protein lipidation[J]. *Nature*,2000,408(6811):488-492.
- [6] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice[J]. *J Cell Biol*,2005,169(3):425-434.
- [7] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2004,36(12):2503-2518.
- [8] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC₃ conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004,36(12):2503-2518.
- [9] Kroemer G, Guhde G, Suter A, et al. Lysosomes and autophagy in cell death control[J]. *Nat Rev Cancer*,2005,5(11):886-897.
- [10] Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2 deficient mice[J]. *Nature*,2000,406(6798):902-906.
- [11] 朱伦,陈增良. mTOR的结构与功能[J]. *国际病理科学与临床杂志*,2006,26(1):31-34.
ZHU Lun, CHEN Zeng-liang. Structure and function of mammalian target of rapamycin[J]. *Int Pathol Clin Med*, 2006,26(1):31-34.
- [12] Guertin D A, Sabatini D M. An expanding role for mTOR in cancer[J]. *Trends Mol Med*,2005,11(8):353-361.
- [13] Meijer A J, Codogno P. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease[J]. *Mol Aspects Med*,2006,27(5-6):411-425.
- [14] Ng G, Huang J. The Significance of autophagy in cancer[J]. *Mol Carcinog*,2005,43(4):183-187.
- [15] Scarlatti F, Bauvy C, Ventrucci A, et al. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of Beclin 1[J]. *J Biol Chem*,2004,279(18):18384-18391.
- [16] Qian W, Liu J, Jin J, et al. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1[J]. *Leuk Res*,2007,31(3):329 - 339.
- [17] Cuervo A M. Autophagy: in sickness and in health[J]. *Trends Cell Biol*,2004,14(2):70-77.
- [18] Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy[J]. *Science*,2005,307(5709):593-596.
- [19] Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, et al. Escape of intracellular Shigella from autophagy[J]. *Science*,2005,307(5710):727-731.
- [20] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice[J]. *Nature*, 2006,441(7095):880-884.
- [21] Yamamoto A, Cremona M L, Rothman J E. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway[J]. *J Cell Biol*,2006,172(5):719-731.
- [22] Katic M, Kahn C R. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity[J]. *Cell Mol Life Sci*,2005,62(3):320-343.