

· 综述 ·

纳米材料诱导的自噬与凋亡在抑制肿瘤生长 和治疗中的作用及研究进展

王一博 孙宾 王丹丹 唐琪 孙宏晨*

(吉林大学口腔医院病理科 吉林 长春 130021)

[摘要] 细胞自噬是细胞自身调节的重要生理反应,它与纳米颗粒有着密切的关联,近年来纳米与细胞自噬的研究成为生物医学领域的研究热点,有研究表明通过纳米颗粒有效的诱导在特定细胞中的自噬,可以加速病变细胞的死亡,对于治疗肿瘤和神经系统疾病等有着重要意义。本文介绍了细胞的自噬与凋亡过程、自噬与凋亡相互作用机制,阐述了不同类别的纳米颗粒诱导的自噬效应,并对纳米材料诱导自噬应用进行了展望,指出在研究中重点加强纳米颗粒与细胞自噬作用机理研究和纳米颗粒的可控性研究,更好地应用于生命科学。

[关键词] 自噬 凋亡 纳米颗粒 毒性

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2017)11—1230—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.11.025

Effect and Progress of Autophagy Induced by Nanoparticles on Inhibition of Tumor Growth and Treatment. WANG Yi-bo, SUN Bing, WANG Dan-dan, TANG Qi, SUN Hong-chen*. *Department of Pathology, Stomatology Hospital, Jinin University, Changchun 130021, China.*

[Abstract] Cell autophagy is an important physiological response of cell self-regulation. It is closely related to nanoparticles. In recent years, nanoparticle and autophagy have become a hotspot in biomedical research. The results show that the effective induction of autophagy by nanoparticles in the specific cells can accelerate the death of diseased cells, which has important significance for the treatment of tumors and nervous system diseases. In this paper, the progress of autophagy and apoptosis and the mechanism of autophagy and apoptosis were introduced. The autophagy induced by different nanoparticles was discussed. The application of nanomaterials in autophagy was also discussed. It is our duty to focus on the study of mechanism of nanoparticle and cell autophagy and the controllability of nanoparticles so as to better apply to life science and help to cure diseases.

[Key words] Autophagy Apoptosis Nanoparticles Toxicity

尽管自噬 (autophagy) 的发现时间 (Ashford 等, 1962 年) 早于细胞凋亡 (apoptosis) 的发现时间 (Kerr 等, 1972 年), 但对细胞自噬的相关研究并没有细胞凋亡研究充分, 人们对自噬的深入了解也是近十多年来, 随着基因技术等的发展才逐渐深入了解。通过对自噬和凋亡的研究发现它们之间是通过 Beclin-1 等相关分子互相作用, 显示了它们之间的密切联系, 并且这种作用机制随着纳米材料在医学领域愈来愈深入的研究变得更加清楚, 同时纳米材料利用自噬和凋亡的相互作用机制给恶性肿瘤等疾病的治疗提供了新的方向和方法。

1 细胞的自噬与凋亡

自噬与凋亡一样都是细胞重要的生理反应, 在正常生理状态下, 自噬维持在低的基础水平, 但是可以被一些特定的细胞应激状态所诱发, 其中最常见的是细胞营养的匮乏^[1,2]。在许多肿瘤细胞中, 自噬体先包封受损细胞器或损坏的蛋白质聚集体, 通过与溶酶体结合使其降解, 最后产生的小分子代谢产物用于新的生物合成, 完成能量代谢^[3], 这一过程使得肿瘤细胞在应激、营养匮乏的环境下存活下来。自噬过程既有调节元件, 亦有效应元件。调节元件是指促进或抑制自噬进程的氨基酸和激素, 后者是调节自噬体形成并将其输送到溶酶体的蛋白质。而细胞凋亡 (又称 I 型程序死亡) 是指为维持细胞内环境稳定, 更好地适应生存环境, 主动进行的一种由基因控制有一定顺序和规律的细胞死亡。细胞凋亡主要是通过体外信号刺激或细胞内信号刺激诱导激活半胱氨酸蛋白酶 Caspase, 导致细胞凋亡的发生。

有研究表明自噬和凋亡过程的调控网络彼此互相关联,

基金项目 国家自然科学基金 (编号: 81271111、8132010801)

吉林省自然科学基金 (编号: 30672338)

作者简介 王一博 (1988~), 男, 吉林长春人, 博士在读, 主要从事口腔组织病理学研究。

* **通讯作者** 孙宏晨, E-mail: hcsun@jlu.edu.cn

呈现为一种近似互斥的关系^[4,5],也有学者通过顺铂与口腔鳞癌 Tca83 作用研究,证实了 Tca83 细胞中自噬的双重作用^[6],后在 MTT 法开展颊舌肌卫星细胞自噬与凋亡的研究中,对自噬与凋亡的相互关系进一步讨论^[7],揭示出自噬和凋亡能够通过降解彼此的相关蛋白使其自噬和凋亡过程受到抑制,同时凋亡的抑制可促进自噬的发生。

2 自噬与凋亡相互作用机制

调控细胞存活的信号激活 PI3K-AKT-mTOR 通路后,被激活的 AKT 通过抑制蛋白水解酶 Caspase-9 的活性和磷酸化下游的靶蛋白两个方向阻断细胞的凋亡,同样也阻断细胞的自噬。但是当细胞存活信号不足时,PI3K 下调,进而诱导细胞的自噬和(或)凋亡^[8,9]。另外一个与凋亡和自噬相关联的是 Beclin-1,研究表明该蛋白是诱导自噬所必须的蛋白。Beclin-1 蛋白是凋亡调节蛋白 BH3 亚群的成员,其 BH3 结构域可以结合于 Bcl-2/Bcl-xL 的 BH3 结合,从而抑制自噬^[10,11]。在应激状态下,BH3 亚群中的 Bad 蛋白作为应激传感器结合于 Bcl-2/Bcl-xL 替换 Beclin-1^[12],从而释放 Beclin-1 诱导自噬。同理,它们也可以继续释放促凋亡因子 Bax 和 Bak 诱导凋亡。

敲除 Beclin-1 基因的小鼠表现出癌症的易感性增加,说明 Beclin-1 基因诱导自噬(或与凋亡一起)可以阻滞肿瘤的发生^[13,14]。同样,研究表明自噬也是肿瘤在其发展过程中需要克服的障碍^[15]。但是,令人迷惑的是,营养匮乏、放疗及特定的毒性药物等可以提高自噬的程度,而这种自噬缓解了上述应激状态的杀伤作用,从而表现出对肿瘤细胞的保护作用^[16],而且,受应激严重影响的肿瘤细胞可以通过自噬退缩至一种可逆性的静默状态^[17],这种状态可以永久存在并且可能出现肿瘤的再生长。与 TGF- β 信号类似,自噬似乎也具有互相对立的作用,在肿瘤初期抑制肿瘤的发生,后期促进肿瘤的发展。在充分了解细胞自噬和凋亡关系和作用机制后,接下来我们能否通过一些人工手段诱发肿瘤细胞自噬或凋亡呢?近年来纳米科技的发展和其在生物医药领域的相应研究让我们看到了可能性。

3 纳米材料诱导自噬效应的研究现状

目前多种纳米材料诱导细胞自噬的研究越来越受到医学研究人员的青睐,并且取得了一定成果。

3.1 自噬与纳米颗粒尺寸 Seleverstov O 等(2006)首次描述并探讨了细胞自噬产生与否跟纳米颗粒的尺寸的关系,研究发现绿色(525 nm)量子点能够诱导人间质干细胞的自噬,而红色(605 nm)量子点不能^[18]。Stern ST 等(2008),通过 TEM 观察发现,运用纳米级硒化镉和磷化铟镓 QDs 处理过的猪肾细胞 LLC-PK1 中出现自噬小体,经过 Western blot 检测后,发现与自噬有密切关联的 LC3 II 蛋白的表达量明显增高,并且通过溶酶体示踪染料标示细胞内出现自噬溶酶体,研究结果证实了硒化镉和磷化铟镓 QDs 能够诱导细胞产生自噬^[19]。Mishra A 等(2016)采用同等质量剂量的 10nm、50nm、100nm AgNPs 处理人类肝源性肝癌(HepG2)细胞,结果显示 10nmAgNPs 的细胞反应比最高,证明了

10nm AgNPs 诱导细胞自噬的潜力^[20]。

3.2 非金属元素及化合物的诱导自噬 富勒烯(C60)及其衍生物由于其特殊的结构而具有许多奇异的生物活性,因此在生物医药领域具有广泛的应用。Zhang Q 等(2009),Wei PF 等(2010)研究发现,两种 C60 纳米颗粒均能通过调控细胞的自噬效应,在低浓度条件下有效地杀死 HeLa 和 Dox 抗性 MCF-7 细胞,而对正常细胞毒性不显著。Wei PF 等第一次证实了,C60(Nd)纳米颗粒比 C60 纳米颗粒更有效地增加癌细胞对化疗药物敏感性^[21,22]。

石墨烯作为一种新型的纳米材料,因其成本低、高强度、高稳定性、强吸光能力、易于加工等优点,被广泛应用于生物医药领域,比如使用氧化石墨烯(GO)进行药物的靶向运输以及肿瘤治疗等^[23]。Chen GY 等(2013)通过研究不仅发现了氧化石墨烯(GO)诱导肺癌细胞、巨噬细胞和人胚肾细胞等产生浓度依赖的、非尺寸依赖的自噬特点外,还发现自噬过程受 TLRs 影响^[24]。Markovic ZM 等(2012)通过运用石墨烯量子点优良的发光特性,GQD 100 经蓝光(470 nm,1 W)辐照后产生活性氧,如单线态氧,并通过引起氧化应激杀死人类神经胶质瘤 U251 细胞。研究发现在 GQD 被光活化后,能够使肿瘤细胞凋亡(磷脂酰丝氨酸外化、DNA 片段化)和引起显著的自噬(自噬泡形成、LC3-I / LC3-II 转化等)效应,这些均表明 GQD 在光动力治疗(PDT)中的潜在价值,但也提出了对其可能存在的毒性的担忧^[25]。Fude W 等(2014)研究结果表明,石墨烯量子点对细胞活力和细胞膜的完整性影响轻微,但能够显著增加活性氧(ROS)的生成,促进细胞凋亡以及自噬性细胞死亡与 Bax 蛋白的表达水平。并且,低浓度的量子点能够显著增加肿瘤坏死因子,白细胞介素(interleukin-1 β)IL-8,而高浓度的量子点引起相反的效果^[26]。

3.3 金属元素及金属氧化物的诱导自噬 纳米金颗粒(即胶体金)的直径介于 1~100 nm 之间,它具有良好的生物相容性和光电性等特点,广泛应用于细胞成像、肿瘤治疗和药物载体等生物医药相关领域。JJ Li 等(2010),在未知纳米金粒子(AuNPs)对细胞是否具有毒性的前提下,开展纳米金粒子(AuNPs)对人肺胚成纤维细胞 MRC-5 的生物效应研究,经过 Western blot 检测后,发现自噬相关的蛋白表达量显著升高,表明 20nm 的纳米金能够诱导细胞产生自噬^[27]。Panzarini E 等(2015)研究结果表明 AgNPs 诱导的细胞毒性取决于 AgNPs 的数量和类型并且提供初步的证据证明 AgNPs 能够诱导 HeLa 自噬^[28],Farah 等(2016)研究再次表明纳米银颗粒(AgNPs)的抗癌潜力,证实了新合成的 AOAgnPs 对 MCF-7 乳腺癌细胞诱导自噬效应^[29]。

也有研究表明金属氧化物(如 Fe₂O₃、CuO、Al₂O₃、ZnO 以及多数稀土金属氧化物)均能诱导自噬效应。随着自噬在肿瘤治疗中的应用研究,MI Khan 等(2012)研究了 Fe₂O₃ 纳米颗粒分别与人正常肺成纤维细胞 MR-90 和人肺癌细胞 A549I 的相互作用,研究结果显示,Fe₂O₃ 纳米颗粒可以诱导癌细胞(A549)的自噬,造成癌细胞大量死亡,而对正常

细胞(IMR-90)不具有毒性作用,证实了 Fe_2O_3 纳米颗粒能够的选择性地诱导细胞自噬。查明了 Fe_2O_3 纳米颗粒杀伤癌细胞是通过经典的 Akt-AMPK-mTOR 信号通路诱导癌细胞产生自噬的分子机制^[30]。Yang Lu 等(2013)经实验研究发现磁性纳米颗粒锰(II)氧化物也能够引起自噬,这是迄今为止关于磁性纳米晶体引起细胞自噬现象为数不多的报道。在自噬过程中自噬小体和溶酶体融合的过程未被破坏并且产生了许多自噬小体,实现了真正的功能性自噬。此外,在抗癌治疗中通过调控自噬, MnO NCS 结合化疗药阿霉素能够更好的发挥治疗作用^[31]。

金属氧化物中另一个重要组成部分就是稀土类氧化物, Chen Feng 等(2005)经过实验观察发现纳米氧化钨是一种新的具有生物功能的纳米材料,能够诱导非小细胞肺癌 NCI-H460 自噬,对非小细胞肺癌的治疗有重大意义^[32]。L Yu 等(2009)对四种轻稀土氧化物,氧化铈、氧化钐、氧化钕、氧化铽分别与海拉细胞相互作用进行了研究,通过实验观察发现与自噬过程有密切关联的 LC3II 蛋白的表达量显著增多,同样在被荧光共定位实验 GFP 标记的与自噬有密切关联的蛋白中也出现大量绿色荧光亮点等均表明了这几种轻稀土金属氧化物对海拉细胞诱导自噬作用^[33]。

Zhang Ying 等(2010)通过实验发现稀土氧化物引起的空泡的大小依赖于自噬途径,并进一步明确了大量空泡化和稀土氧化物诱导自噬过程间的关系,指出了稀土氧化物对空泡形成规模效应^[34-39]。

4 纳米材料诱导细胞自噬应用展望

近年来的研究成果表明,在激活凋亡潜伏期长期型肿瘤细胞的自噬后,能够加速肿瘤细胞死亡。但纳米颗粒作用后产生的细胞自噬有利也有弊。有利的方面,主要表现为纳米颗粒能够在特定细胞中引起的自噬,可以减少病变细胞,达到治愈疾病的目的。不利的方面,主要是由于在使用纳米颗粒药物治疗过程中,纳米颗粒不仅诱导特定病变细胞自噬,也会引发正常细胞的自噬,导致健康细胞中毒。

总的来看,细胞对纳米材料的响应状态给生物医学领域带了新的研究方向。但目前纳米材料在生物医学域的应用正处于初级阶段,还存在许多没有解决的问题,比如每一种纳米颗粒诱导自噬的分子水平的机制是什么?怎么去定向的调控自噬等。因此有必要进一步加强纳米颗粒诱发的自噬过程以及原理研究、加强参与自噬过程的分子研究、相互作用过程的中信号转导研究以及病理生理学研究等。

参考文献

- [1] Mizushima N. Autophagy process and function [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(22): 2861-2873
- [2] Levine B, and Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42
- [3] Sinha S, and Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein [J]. *Oncogene*, 2008, 27(1): 137-148
- [4] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, and White E. Role of autophagy in cancer [J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2008, 7(12): 961-967
- [5] Maiuri M C, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(9): 741
- [6] 白宇, 全海英, 张桐菲, 等. 顺铂诱导的自噬在口腔鳞癌 Tca83 细胞中的作用 [J]. *口腔医学研究*, 2012, 28(6): 566-569
- [7] 江丽斌, 秦文, 刘文佳, 等. 低氧环境下自噬对颊舌肌卫星细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(3): 209-212
- [8] Guan J L, Simon A K, Prescott M, et al. Autophagy in stem cells [J]. *Autophagy*, 2013, 9(6): 830-849
- [9] Bernard S, Eilers M. Control of cell proliferation and growth by Myc proteins [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2006, 42: 329-342
- [10] Maiuri M C, Toumelin G L, Criollo A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1 [J]. *Embo Journal*, 2007, 26(26): 2527-2539
- [11] Oberstein A, Jeffrey P D, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(17): 13123
- [12] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205
- [13] Degenhardt K, Chen G, Lindsten T, et al. BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(3): 193-203
- [14] Yue Z, Jin S, Yang C, et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 100(25): 15077-15082
- [15] White E, and DiPaola R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer [J]. *Clin. Cancer Res*, 2009, 15(17): 5308-5316
- [16] Apel A, Zentgraf H, Buchler M W, et al. Autophagy - A double edged sword in oncology [J]. *Int. J. Cancer*, 2009, 125(5): 991-995
- [17] Lu Z, Luo R Z, Lu Y, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells [J]. *J. Clin. Invest*, 2008, 118(12): 3917-3929
- [18] Seleverstov O, Zabirnyk O, Zscharnack M, et al. Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation [J]. *Nano Lett*, 2007, 6(12): 2826-2832
- [19] Stern S T, Zolnik B S, McLeland C B, et al. Induction of autophagy in porcine kidney cells by quantum dots: A common cellular response to nanomaterials [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 106(1): 140-152
- [20] Mishra A, Zheng J, Tang X, et al. Silver Nanoparticle-Induced Autophagic - Lysosomal Disruption and NLRP3 - In-

- flammasome Activation in HepG2 Cells is Size-Dependent [J]. *Toxicological Sciences*, 2016, 150(2) : kfw011
- [21] Zhang Q, Yang WJ, Man N, et al. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C60 nanocrystal [J]. *Autophagy*, 2009, 5(8) : 1107-1117
- [22] Wei PF, Zhang L, Lu Y, et al. C60(Nd) nanoparticles enhance chemotherapeutic susceptibility of cancer cells by modulation of autophagy [J]. *Nanotechnology*, 2010, 21(49) : 495101
- [23] 崔之芬, 诸颖, 李晓明, 等. 纳米颗粒诱导的自噬效应及在生物医药领域的应用[J]. *科学通报*, 2013, 58(34) : 3521-3529
- [24] Chen GY, Yang HJ, Lu CH, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(27) : 6559-6569
- [25] Markovic ZM, Ristic BZ, Arsikin KM, et al. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29) : 7084-7092
- [26] Fude W, Chan J, Hao L, et al. Effects of fullerene C₆₀ nanoparticles on A549 cells [J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2014, 37(2) : 656-61
- [27] Li JJ, Hartono D, Ong CN, et al. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(23) : 5996-6003
- [28] Panzarini E, Mariano S, Dini L. Glycans coated silver nanoparticles induces autophagy and necrosis in HeLa cells [C]. *Nanoforum*, 2015, 1667(1) : 020017
- [29] Farah MA, Ali MA, Chen SM, et al. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species [J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2016, 141 : 158
- [30] Zhang YJ, Zheng F, Yang TL, et al. Tuning the autophagy-inducing activity of lanthanide-based nanocrystals through specific surface-coating peptides [J]. *Nat Mater*, 2012, 11(9) : 817-826
- [31] Khan MI, Mohammad A, Patil G, et al. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5) : 1477-1488
- [32] Sun TT, Yan YW, Zhao Y, et al. Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8) : e43442
- [33] Li HY, Li YH, Jiao J, et al. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response [J]. *Nat Nanotech*, 2011, 6(10) : 645-650
- [34] Lu Y, Zhang L, Li J, et al. MnO nanocrystals: A platform for integration of MRI and genuine autophagy induction for chemotherapy [J]. *AdvFunct Mater*, 2013(12), 23 : 1534-1546
- [35] Yu KN, Yoon TJ, Tehrani AM, et al. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation [J]. *Toxicol in Vitro*, 2013, 27(4) : 1187-1195
- [36] Chen Y, Yang LS, Feng C, et al. Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1) : 52-60
- [37] Yu L, Lu Y, Man N, et al. Rare earth oxide nanocrystals induce autophagy in HeLa cells [J]. *Small*, 2009, 5(24) : 2784-2787
- [38] Zhang Y, Yu CG, Huang GY, et al. Nano rare earth oxides induced size dependent vacuolization, an independent pathway from autophagy [J]. *Int J Nanomed*, 2010, 5(24) : 601-609
- [39] Man N, Yu L, Yu SH, et al. Rare earth oxide nanocrystals as a new class of autophagy inducers [J]. *Autophagy*, 2010, 6(2) : 310-311

[收稿日期: 2017-02-14]

(本文编辑 雷丽)