

哺乳动物自噬的调控因素

Regulation factors of mammalian autophagy

刘文玲, 贺修胜*

LIU Wenling, HE Xiusheng*

(南华大学衡阳医学院肿瘤研究所, 肿瘤细胞与分子病理学湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421000)

摘要: 自噬是一种溶酶体降解过程, 对于细胞适应饥饿和代谢至关重要。它通过对过量的蛋白质以及年老的细胞器的分解代谢来维持体内平衡。根据细胞如何将带降解的物质运送到溶酶体内, 自噬可分以下三种类型: 大自噬 (macroautophagy), 小自噬 (microautophagy) 以及分子伴侣介导的自噬 (chaperon-mediated autophagy, CMA)。自噬广泛参与生物体的许多生理及病理过程, 且自噬发生的分子机制复杂。在此, 本文就近年来自噬相关的调控因子作一综述。

关键词: 自噬; 分子机制; 调控因素

Key words: Autophagy; molecular mechanism; regulatory factors

中图分类号: R3; R36 **文献标识码:** A

自噬是细胞中的“自食”现象, 也称为 2 型非凋亡细胞死亡, 其可以将细胞内错误的蛋白质以及受损的细胞器转运到溶酶体中进行彻底的消化和降解。研究者通过对酵母和高等生物的研究, 发现自噬不仅是细胞在饥饿和压力环境中的适应性反应, 而且该过程是高度保守的^[1]。细胞内物质可以通过以下三种方式转运到溶酶体中: 分子伴侣介导的自噬以及大、小自噬^[2]; 其中, 大自噬是最主要的自噬形式, 即本文中所提到的自噬。在哺乳动物中, 自噬可以被许多刺激因素诱导, 例如营养和生长因子缺乏、缺氧、DNA 损伤等。一方面, 自噬可提供核苷、氨基酸等大分子物质并产生能量, 使细胞能够在这些压力下继续生存, 得以发挥作用; 另一方面, 自噬通过消除细胞中受损或有毒的有害物质来减少异常蛋白质和老化细胞器的积累, 从而维持细胞内环境的稳定性。尽管自噬通常被认为是细胞的一种保护机制, 但在某些条件下, 自噬也可导致细胞程序性死亡。自噬与生物体的许多生理和病理过程密切相关, 包括衰老^[3], 神经退行性疾病、心血管疾病、肝脏疾病、肌病、炎症和感染、代谢性疾病以及癌症。

自噬在癌症发生、进展和转移的不同阶段有着截然不同的作用。在肿瘤形成的早期阶段, 自噬通

过消除细胞中异常的蛋白质分子和细胞器来抑制肿瘤发生, 从而维持细胞稳态; 当肿瘤形成之后, 肿瘤细胞通过自噬降解过量的细胞器和蛋白质聚合物, 满足肿瘤生长的需要并抵御放化疗药物对肿瘤细胞的杀伤, 从而促进肿瘤的发展。此外, 自噬还可以通过其在肿瘤微环境中的对其他细胞的作用来影响癌症的进展。

有研究表明, 自噬除了典型的降解功能, 还能影响酵母和哺乳动物的分泌途径^[4]。本文总结自噬中涉及的相关分子机制及其调节因子。

1 自噬的概述

自噬是一个多步骤的过程, 包括自噬小体的形成, 自噬小体与溶酶体结合以及降解吞噬多余的蛋白质和细胞器。近年来, 在对酵母的研究中发现了超过 30 种自噬相关基因 (ATGs) 和蛋白质 (Atgs), 许多蛋白质和基因的同源物也在哺乳动物和其他高等真核生物中被发现^[5]。

自噬小体的形成主要分为三个阶段: 起始, 成核以及延伸。在酵母中, 这个过程在自噬体组装位点 (Pre-autophagosomal structure/Phagophore assembly site, PAS) 发生。而在哺乳动物中, 自噬小体是由内质网来源的双层膜形成。在哺乳动物中, 自噬小体的形成已有大量文章叙述^[5-7], 见图 1-图 3。

一些关键的调节因子可与 III 类 PI3K 复合物

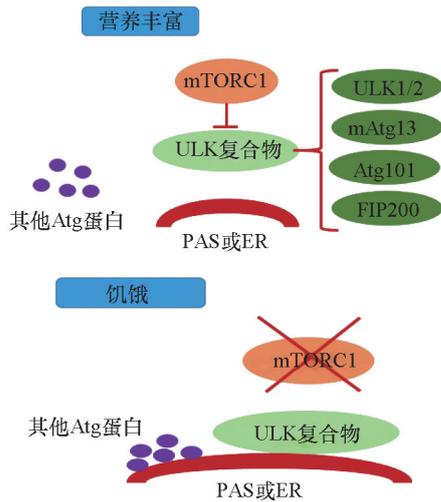


图1 自噬的起始信号

当营养丰富时, mTORC1 与 ULK 复合物结合以抑制自噬; 在自噬诱导条件下, 例如饥饿时, mTORC1 与 ULK 复合物解离, 促进自噬小泡成核和延伸

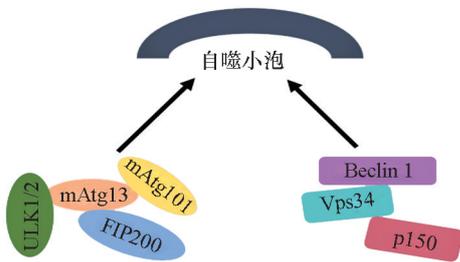


图2 自噬小泡的成核

自噬小泡的成核依赖于 III 类 PI3K 复合物的形成, 其包括 Beclin 1, Vps34 以及 p150

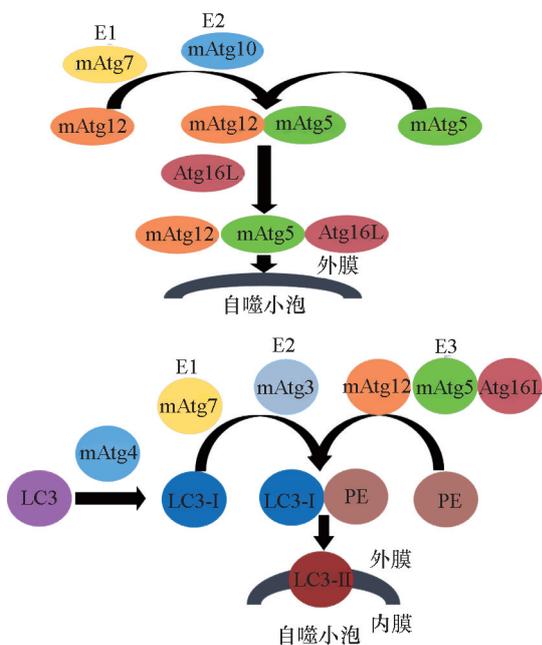


图3 自噬小泡的延长

自噬小泡膜的延伸, LC3-II 的生成需要两个泛素样系统。第一个途径产生的 mAtg12-mAtg5-Atg16L 复合物可以促进第二个途径 LC3 的脂化形成 LC3-II

相互作用, 进而调节自噬小泡成核。例如 Atg14 样蛋白 (Atg14 L, 酵母 Atg14 的同源物) 也被称为 Barkor (Beclin 1-associated autophagy-related key regulator), 它可直接作用于 Beclin 1, 将 PI3 K 复合物带至自噬小体表面并促进自噬。紫外线辐射电阻相关基因 (UVRAG, 酵母 Vps38 的直系同源基因) 也可以通过与 Beclin 1 的相互作用促进自噬。Bax 结合因子 1 (Bif-1) 通过 UVRAG 与 Beclin 1 结合, 从而调节自噬以抑制肿瘤的发生。而 Rubicon (RUN domain Beclin 1-interacting and cysteine-rich containing protein) 可通过与 Beclin 1 结合, 使 Beclin 1 与 Atg14L 解离而负性调节自噬。此外, 还有很多蛋白可与 Beclin 1 相互作用从而调控自噬: Ambra (activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy) 可以促进自噬, 而细胞凋亡调节剂 Bcl-2、丝氨酸氨酸激酶 AKT 和表皮生长因子受体可以抑制自噬的发生。

LC3-II 是自噬小体的标志性分子, 它定位于自噬小泡的外膜和内膜, LC3-II 的含量与自噬小体的数目成正比。在自噬小泡延长过程中, mAtg12-mAtg5-Atg16 L 复合物具有 E3 样连接酶生物学活性, 能够促进 LC3-I 与 PE 结合从而产生 LC3-II。在酵母中, Atg4 还能分解 Atg8-PE, 从而调节自噬小体的形成。

Atg2A 和 Atg2B 在自噬小泡关闭中起关键作用。介导自噬小体成熟并随后与溶酶体融合的其他主要分子包括 syntaxin-17、可溶性 N-乙酰马来酰亚胺敏感因子结合蛋白受体 (SNARE) 家族中的囊泡相关膜蛋白 3 (VAMP-3)、小 G 蛋白 (the small GTPase) Rab7 和 C 型 Vps 复合体。

哺乳动物的自噬小体可以直接与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 也可以先与内涵体形成自噬内涵体 (amphisomes) 后再与溶酶体融合。有研究表明内涵体分选转运复合体 (ESCRT) 系统可以干扰自噬小体和溶酶体的融合, 导致自噬小体聚集, 从而妨碍降解。此外, 也有研究发现, ESCRT 相关蛋白质 PDCD6IP (Alix) 与自噬核心调节因子 mAtg12 和 mAtg3 之间的相互作用可促进晚期自噬内涵体或自噬小体与溶酶体的融合^[7]。

细胞自噬也受到微管和肌动蛋白丝的调控: 微管可促进自噬小体的合成, 自噬小体通过微管系统转运至溶酶体, 形成自噬溶酶体; 肌动蛋白丝支撑自噬小泡的扩张, 其可促进自噬小体的运动以及自噬小体与溶酶体的融合。

2 自噬的调控因素

2.1 营养和生长因子缺乏

营养和生长因子缺乏主要通过两种信号传导途径上调自噬:mTORC1 和 5'-腺苷酸激活蛋白激酶 (AMPK)。mTORC1 是一个中心代谢传感器,可以整合各种上游营养途径的信号通路调控细胞代谢、生长、增殖和存活。氨基酸可以通过 RAS 相关 GTP 结合蛋白 (Rag GTPase) 激活 mTORC1。hVps34 是氨基酸激活 mTORC1 过程中的中间产物。此外,在一种结肠癌细胞系中,氨基酸可以通过 Ras-Raf1-MEK-ERK 信号通路阻断 Galpha 相互作用蛋白 (GAIP) 来下调自噬。结节性硬化症复合物 1 (Tuberous sclerosis complex1, TSC1) 和结节性硬化症复合物 2 (TSC2) 可以形成一个具有二磷酸鸟苷 (guanosinetriphate, GTP) 酶活性的异二聚体 TSC1/2, 它能使 Rheb 失活从而抑制 mTORC1 的激活; 而生长因子可以抑制 TSC1/2, 通过 PI3K-Akt 信号通路激活 mTORC1。

AMPK 是一种细胞能量变化感受器,在能量稳态调控中起重要作用。当细胞内葡萄糖含量缺乏时,可以激活 AMPK 以上调自噬。在低能量状态时,AMP/ATP 比率增加,导致 AMPK 活化,活化的 AMPK 直接磷酸化 TSC1/2, 负性调控 mTOR。此外,AMPK 还可以通过直接磷酸化其他蛋白质来发挥它的效应,例如 mTORC1 成员 mTOR-Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), ULK1 (自噬启动复合物) 和 Beclin 1 (在 III 型 PI3K 复合物中与 Atg14L 结合促进自噬)。

研究还表明,饥饿诱导的自噬与转录水平密切相关。在营养缺乏时,转录因子 EB 可以上调自噬相关基因以及溶酶体基因的表达水平。核受体过氧化物酶体增殖剂激活受体- α (PPAR α) (促进自噬) 和法尼醇 X 受体 (FXR) (抑制自噬) 通过互相竞争 ATG 启动子结合共享位点,来共同调节饥饿诱导的自噬。此外,Akt 信号可以通过 Forkhead box O3 (FoxO3) 调节自噬的转录调控,FoxO3 能够调控肌肉细胞中几种 ATGs 的转录,其中包括 LC3B 和 ATG12。

2.2 低氧

低氧环境能促进自噬。缺氧诱导因子 HIF-1 通过增加 Bcl-2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3 (BNIP3) 和 BNIP3 样蛋白 (BNIP3L) 的表达,从而促进自噬。AMPK 也是中心压力感受器,它可以通过磷酸化 TSC2,对 mTOR 进行负向调节。血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 通过自分泌信号传导途径调节 HIF-1 的活性从而调控自噬。

2.3 氧化应激

活性氧 (ROS) 是具有高反应的含氧活性介质。它主要包括超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 (HO)、一氧化氮 (NO) 等,它通过几种机制诱导自噬。例如, H_2O_2 通过直接氧化 mAtg4 活性位点附近的 81 位半胱氨酸残基使 mAtg4 失去活性,从而防止 mAtg4 催化吞噬小泡膜上 LC3 的脂化。此外,ROS 可通过细胞的氧化应激来调节自噬。JNKs 是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族的成员,是一种进化上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它与 c-Jun-N 端结合,并通过激活转录因子 c-Jun 上调 Beclin 1 的表达水平,诱导细胞自噬的发生。肿瘤抑制因子 p53 也可被氧化应激激活,并通过上调 Sestrins 的转录,阻断 mTOR。

2.4 内质网应激

内质网应激通过未折叠蛋白反应 (UPR) 和钙依赖信号通路调节自噬。当未折叠蛋白在内质网中积累时,它可以引起 UPR 效应分子蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like ER kinase, PERK) 的激活,活化的 PERK 能够磷酸化真核细胞翻译起始因子 2 α (translation initiation factor 2 α , eIF2 α),从而活化自噬相关蛋白 mAtg12 触发自噬,增加 LC3-II。肌醇必须酶 1 (IRE1) 是 UPR 的另一种效应分子,IRE1 的持续激活会导致 JNK 信号通路的激活,从而调节 ER 诱导的自噬。ER 应激也可以诱导 Ca^{2+} 向胞浆释放,细胞内钙离子水平的增加可刺激钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶- β (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β , CaMKK- β) 活化 AMPK,诱导自噬。

2.5 DNA 损伤

细胞毒性化学治疗剂、紫外线辐射和电离辐射 (IR) 可以造成 DNA 的损伤,从而诱导自噬。一旦细胞中的 DNA 受损,将激活肿瘤抑制因子 p53, p53 转录上调与自噬相关的各种基因,包括编码溶酶体蛋白损伤相关自噬调节蛋白 (Damage-regulated autophagy modulator, DRAM)^[8] 以及一些核心 Atgs。引起 DNA 损伤诱导自噬的其他效应分子包括转录因子 E2F1^[9] 和聚 ADP-核糖聚合酶 1 (poly ADP-ribose polymerase 1, PARP-1)。

2.6 电离辐射

IR 通常用于治疗多种恶性肿瘤,研究表明 IR 可诱导自噬。在一些细胞系中,加入自噬抑制剂或者转入自噬抑制基因可以增强其放疗的敏感性,自噬起到一种细胞保护作用。但在某些细胞系中,自噬诱导剂也能增强放疗敏感性,此时自噬的作用与细胞毒素一致。当自噬作为一种保护机制时,p53

在这一过程中起着重要作用。

2.7 免疫系统的激活

自噬与免疫密切相关,包括抗菌免疫防御、炎症、获得性免疫以及几种免疫分子都可以调节自噬^[10-11]。已被证明的自噬调节介质包括 Toll 样受体(TLRs)、白介素 1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、干扰素- γ (IFN- γ)^[12]、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、高迁移率族蛋白 1(HMGB1)^[13]和转化生长因子- β (TGF- β)^[14]。已证明的自噬抑制剂包括白介素 10(IL-10)^[15]和白介素 13(IL-13)。尽管白介素-4(IL-4)一般被认为是自噬抑制剂,但近期有研究表明 IL-4 是过敏性哮喘中 Th2 细胞因子的关键效应因子,它能促进 B 细胞在体内和体外的自噬诱导^[16]。

2.8 抑癌基因 p53

抑癌基因 p53 分为核内 p53 和细胞质 p53。核内 p53 促进参与多个与自噬调节相关基因和自噬小体生成相关基因的转录,例如 DRAM^[17]、核心 ATGs(ATG7、ATG10、ULK1、ULK2 和 UVRAG)等。核内 P53 也能通过参与 mTORC1 的调节机制促进自噬,例如 Sestrin1 和 Sestrin2、AMPK β 1 以及 TSC2。相反,细胞质 p53 则可通过调节 mTORC1 的活性来抑制自噬^[18]。

2.9 表观遗传修饰和信使 RNA 沉默

除了上述方法能调节自噬,也有证据表明表观遗传和 microRNA(miRNA)能介导自噬^[19]。例如,诱导自噬后,组蛋白 4 第 16 位赖氨酸乙酰化(histone 4 acetylation at lysine 16, H4K16ac)的表达下调与某些自噬相关基因表达降低有关。此外,甲基转移酶 G9a 可通过催化 histone 3 赖氨酸 9(H3K9)的活性来抑制包括 LC3 在内的 ATGs 的表达^[20]。

3 小结与展望

自噬是进化上高度保守的分解代谢途径,其与许多疾病的病理过程密切相关。随着对自噬机制研究的深入,可以通过调节自噬来预防和控制包括自身免疫性疾病、神经系统疾病、癌症等疾病,并对防止老化、延长寿命起积极作用。因此,研究自噬的作用机制和调控方式都将成为疾病研究的重要方向。

参考文献:

[1] LIU J, DEBNATH J. The evolving, multifaceted roles of autophagy in cancer [J]. *Adv Cancer Res*, 2016, 130: 1-53.
 [2] XU CY, KANG WY, CHEN YM, et al. DJ-1 inhibits α -synuclein aggregation by regulating chaperone-mediated autophagy [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 308.
 [3] FILFAN M, SANDU RE, ZĂVĂLEANU AD, et al. Autophagy in

aging and disease [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2017, 58(1): 27-31.

- [4] PONPUAK M, MANDELL MA, KIMURA T, et al. Secretory autophagy [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 35: 106-16.
 [5] FARRÉ JC, SUBRAMANI S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(9): 537-52.
 [6] SØRENG K, NEUFELD TP, SIMONSEN A. Membrane trafficking in autophagy [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 336: 1-92.
 [7] MURROW L, MALHOTRA R, DEBNATH J. ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(3): 300-10.
 [8] LIU K, LOU J, WEN T, et al. Depending on the stage of hepatosteatosis, p53 causes apoptosis primarily through either DRAM-induced autophagy or BAX [J]. *Liver Int*, 2013, 33(10): 1566-74.
 [9] WANG P, LONG M, ZHANG S, et al. Hypoxia inducible factor-1 α regulates autophagy via the p27-E2F1 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 2107-12.
 [10] GKIKAS I, PALIKARAS K, TAVERNARAKIS N. The role of mitophagy in innate immunity [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1283.
 [11] DERETIC V, KLIONSKY DJ. Autophagy and inflammation: a special review issue [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 179-80.
 [12] CHEN R, JI G, XI L, et al. Role of autophagy in regulating the immune response of dendritic cells to *Talaromyces marneffeii* infection [J]. *Microb Pathog*, 2018, 123.
 [13] SUN Q, LOUGHRAN P, SHAPIRO R, et al. Redox-dependent regulation of hepatocyte absent in melanoma 2 inflammasome activation in sterile liver injury in mice [J]. *Hepatology*, 2017, 65(1): 253-68.
 [14] NÜCHEL J, GHATAK S, ZUK AV, et al. TGFBI is secreted through an unconventional pathway dependent on the autophagic machinery and cytoskeletal regulators [J]. *Autophagy*, 2018, 14(3): 465-86.
 [15] SHI J, WANG H, GUAN H, et al. IL10 inhibits starvation-induced autophagy in hypertrophic scar fibroblasts via cross talk between the IL10-IL10R-STAT3 and IL10-AKT-mTOR pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2133.
 [16] XIA F, DENG C, JIANG Y, et al. IL4 (interleukin 4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma [J]. *Autophagy*, 2018, 14(3): 450-64.
 [17] MEMMERT S, AVB N, DAMANAKI A, et al. Damage-regulated autophagy modulator 1 in oral inflammation and infection [J]. *Clin Oral Investig*, 2018.
 [18] TANG J, DI J, CAO H, et al. p53-mediated autophagic regulation: a prospective strategy for cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2015, 363(2): 101-7.
 [19] FÜLLGRABE J, KLIONSKY DJ, JOSEPH B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 65-74.
 [20] DE NARVAJAS A A, GOMEZ TS, ZHANG JS, et al. Epigenetic regulation of autophagy by the methyltransferase G9a [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(20): 3983-93.

(本文编辑:蒋湘莲)