

DOI: 10.13376/j.cbls/2016028

文章编号: 1004-0374(2016)02-0208-08



范祖森, 博士, 中国科学院“百人计划”研究员、中国科学院特聘核心骨干研究员、国科大岗位教授、博士生导师, 任中科院感染与免疫重点实验室副主任。范祖森课题组从事免疫细胞发育分化、肿瘤干细胞、肿瘤靶标发现与肿瘤免疫治疗等领域的研究, 在肿瘤免疫与肿瘤治疗领域培养出一支优秀的科研团队。在肿瘤免疫与免疫活性细胞清除病原体机制研究方面, 取得了一系列连续性、系统性、原创性、突破性的研究成果, 发表了一系列重要研究论文, 在该领域产生了重要的国际影响。

细胞自噬与免疫研究进展

夏朋延, 王 硕, 范祖森
(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘 要: 细胞自噬是细胞基本的代谢过程, 它对维持细胞的生存和组织自稳等发挥着重要作用。自噬形成分为起始、延伸、成熟和终止 4 个阶段。自噬在不同的阶段均受到来自于细胞内部和外部的诸多调控, 多种复合物参与自噬小体的形成。自噬参与了细胞内许多重要的生理活动, 如细胞周期调控、细胞增殖、细胞凋亡、干细胞干性的维持、多能性诱导干细胞 (iPS) 的建立以及对外来病原微生物的清除等过程。近年来, 大量的研究表明, 自噬参与了淋巴细胞的发育、固有免疫和适应性免疫应答的调节, 对机体的免疫反应有着十分重要的调节作用。对自噬在免疫系统中的深入研究将加深我们对免疫机制的认识, 为清除病原微生物感染, 防治自身免疫性疾病提供新策略和新靶点。

关键词: 细胞自噬; 自噬复合物; 淋巴细胞发育; 免疫应答; 自身免疫病

中图分类号: Q25; R593 **文献标志码:** A

Research progress on autophagy and immunity

XIA Peng-Yan, WANG Shuo, FAN Zu-Sen*
(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Autophagy is a basic metabolic progress that is essential for cell survival and tissue homeostasis. Autophagy formation includes four stages such as initiation, elongation, maturation and termination. Autophagy can be regulated by many intracellular or extracellular stimuli and participates in many cellular activities such as cell cycle, cell proliferation, apoptosis, self-renewal of stem cells, iPS generation as well as eliminating invading pathogens. Meanwhile, many recent studies have illustrated that autophagy is involved in the lymphocyte development, regulation of innate immunity and adaptive immunity, indicating an essential role of autophagy in immune response. Elucidating the regulation mechanisms of autophagy in immune responses will provide new therapeutic strategy in prevention and treatment of infectious and immune diseases.

Key words: autophagy; autophagic complex; lymphocyte development; immune response; autoimmune disease

收稿日期: 2015-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31429001, 31300645)

*通信作者: E-mail: fanz@moon.ibp.ac.cn

真核细胞内有两种降解蛋白质的途径^[1]。一种是依赖于蛋白酶体的途径, 蛋白质通过与泛素分子连接被转到蛋白酶体中进行降解; 另一种则是依赖于溶酶体的途径(也被称作为自噬)。蛋白酶体途径主要降解半衰期很短的蛋白质, 而自噬则降解半衰期很长的蛋白质。自噬的过程分为起始、延伸、成熟和结束4个阶段^[2]。细胞受到自噬刺激后, 细胞内会形成双层膜的结构; 随后, 双层膜的结构不断延伸并将底物包裹起来形成自噬小体; 在自噬的成熟阶段, 闭合的双层膜结构与溶酶体融合; 最后, 自噬小体在溶酶体内多种酶的作用下被降解掉。自噬参与了机体内许多重要的生理活动, 如细胞周期、细胞死亡、干细胞的自我更新、多功能诱导干细胞的建立以及抵御外来病原微生物等。

自噬主要有3类形式, 包括巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬^[3]。巨自噬是最为常见的自噬形式。它包含了自噬的活化、自噬双层膜的延伸、自噬小体的闭合、自噬小体与溶酶体融合等步骤。微自噬是指溶酶体直接将底物吞噬掉的过程, 它没有双层膜的形成过程。分子伴侣介导的自噬是指在分子伴侣的协助下, 底物直接进入溶酶体中的过程。

1 参与自噬调控的复合物

现在已知的大部分与自噬相关的基因来自于对酵母细胞的研究, 这些自噬相关的基因被命名为自噬基因^[4-6]。酵母细胞中与自噬相关的蛋白质组成了以下复合物: 由 Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31 等组成的 Atg1 蛋白复合物; 由 Atg2 和 Atg18 组成的能够结合 PI(3)P 的蛋白复合物; 由 Atg12、Atg5、Atg16 等组成的蛋白复合物; 由 Atg6、Atg14、Vps15、Vps34 等组成的磷脂酰肌醇(-3)激酶(PI3K)蛋白复合物。此外, Atg9 和能够被磷脂酰激醇修饰的 Atg8 在自噬过程中也发挥了重要的作用^[5,7]。

与酵母细胞类似, 在哺乳动物中起作用的自噬核心复合物有: 在自噬起始过程中起作用的 ULK 复合物; 在自噬小体形成过程中发挥作用的 PI3K 复合物; 两个类似于泛素化连接的复合物, 即 Atg12、Atg5 复合物和 Atg3、Atg8 复合物。

1.1 ULK复合物

同酵母中的 Atg1 蛋白复合物一样, ULK1/2 是自噬发生过程中处于最上游的调控基因。酵母中的 ULK 复合物包含有 Atg1 和 Atg13, 而哺乳动物中的 ULK 复合物包含 ULK1/2、Atg13、Atg101 和

FIP200 等^[8-9], Atg101 和 FIP200 在酵母细胞中没有同源物。这些组分的存在说明, 在不同的物种中, 自噬会受到不同信号的调控。ULK 复合物主要定位于细胞浆, 在自噬发生的初期, ULK 复合物开始组装并与自噬双层膜结合, 对自噬小体的形成至关重要。酵母细胞中的 Atg1 是高度保守的蛋白激酶, 在由 Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31 等组成的复合物中, Atg13 对于 Atg1 的活性必不可少。在酵母细胞中还存在着一种独特的自噬形式, 也即细胞质到液泡运输途径。此种自噬形式将酵母细胞质中的氨基肽酶和甘露糖苷酶运输到液泡中进行降解。同经典的自噬不同, 此种自噬形式不需要外源的刺激, 它是酵母细胞蛋白质分选的重要组成途径。Atg1 复合物参与了此液泡运输过程^[6,10]。

哺乳动物中的 ULK 复合物则要复杂许多。ULK 复合物包含5个成员: ULK1、ULK2、ULK3、ULK4 和 STK36^[11-14]。这些蛋白质都有一个保守的 N 端结构域。缺少 ULK1 会阻碍某些细胞中自噬的发生。其他的 ULK 同源蛋白在自噬过程中发挥了一定的冗余作用。ULK1 通过蛋白的 C 端和 mAtg13、FIP200 等结合, 而 ULK3、ULK4 和 STK36 等蛋白并没有与 mAtg13、FIP200 等结合的序列, 所以这些蛋白质在自噬中的具体功能并不清楚。ULK1 能够直接与 FIP200 结合, 同时 mAtg13 能够增强 ULK1 与 FIP200 的结合能力。FIP200 与 mAtg13 共同调节了 ULK1 的激酶活性。

ULK1 受到一系列信号的精密调控。在营养充足的条件下, mTORC1 复合物和 ULK1 复合物结合, 并磷酸化 mAtg13 和 ULK1, 从而抑制了自噬的发生。当细胞处于饥饿的状态时, mTORC1 对 ULK1 复合物的抑制得到解除, ULK1 复合物的活性恢复, 自噬过程被启动。当细胞处于低糖环境时, 细胞内感知糖浓度的 AMPK 激酶被激活, 活化后的 AMPK 磷酸化 mTORC1 从而解除 mTORC1 对 ULK1 复合物的抑制作用^[15]。同时, AMPK 也能直接作用于 ULK1, 通过对 ULK1 进行磷酸化修饰而启动自噬的发生。

1.2 磷脂酰肌醇(-3)激酶(PI3K)复合物

高等动物细胞内主要有4类PI3K复合物^[16]。第一类PI3K复合物能够催化磷脂酰肌醇生成磷脂酰肌醇3-磷酸(PI(3)P)、磷脂酰肌醇3,4-二磷酸(PI(3,4)P₂)以及磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸(PI(3,4,5)P₃)^[17]。活化后的PI3K能够催化细胞膜上的磷脂酰肌醇发生化学反应, 生成PI(3,4)P₂以及PI(3,4,5)P₃。

附着在细胞膜上的磷脂酰肌醇产物能够招募 AKT 激酶,从而活化下游的信号。第二类 PI3K 复合物由 3 个具有催化活性的蛋白质组成,与第一类 PI3K 复合物不同的是,它们不需要调节亚基的协助^[16]。此类 PI3K 复合物能够催化磷脂酰肌醇生成 PI(3)P,也能够催化磷脂酰肌醇磷酸生成 PI(3,4)P₂。此类复合物受到细胞膜表面酪氨酸激酶和 G 蛋白耦联受体的活化。第三类 PI3K 复合物由催化亚基 Vps34 和调节亚基 Vps15 组成,能够催化磷脂酰肌醇生成 PI(3)P^[18],它主要在自噬过程中发挥作用。在酵母细胞中,第三类 PI3K 复合物又可以分为两种组型:第一种含有 Vps34、Vps15、Atg6 和 Atg14 等组分,在经典的自噬过程中发挥作用;第二种包含 Vps34、Vps15、Atg6 和 Vps38 等组分,它们在细胞质到液泡运输途径中起作用。在哺乳动物细胞中也包含两类 PI3K 复合物,即含有 Atg14L 的 PI3K 复合物和含有 UVRAG 的 PI3K 复合物。与酵母细胞不同,这两种复合物均在自噬的起始阶段发挥作用。

在自噬发生的过程中,第三类 PI3K 复合物中的 Vps34 的活性受到了许多调节蛋白的调控。与 Vps34 结合的 Beclin 1 蛋白的翻译后修饰能够调节 Vps34 的活性。在营养充足的条件下,定位于内质网上的 Bcl-2 能与 Beclin 1 结合并抑制 Vps34 的活性^[19]。当自噬发生的时候, DAPK 蛋白激酶能够对 Beclin 1 进行磷酸化修饰,磷酸化后的 Beclin 1 不再与 Bcl-2 结合,从而诱导了自噬的发生^[20]。此外, JNK1 在自噬刺激信号存在的时候能够将 Bcl-2 磷酸化,磷酸化后的 Bcl-2 与 Beclin 1 的结合能力减弱,从而解除 Bcl-2 对自噬的抑制。蛋白质的泛素化修饰也能够影响 Vps34 的活性。在巨噬细胞中, TLR4 诱导 TRAF6 对 Beclin 1 进行多泛素化修饰,泛素化修饰的 Beclin 1 与 Vps34 的结合能力增强,引起自噬进程中 Vps34 活性的升高^[21]。在小鼠胚胎成纤维细胞发生自噬的过程中, Beclin 1 被 Ambra1 泛素化,引起 Vps34 活性的增强^[22]。另外,在细胞分裂期,细胞周期激酶 Cdk1 能够将 Vps34 磷酸化,磷酸化后的 Vps34 与 Beclin 1 的结合减弱,从而导致自噬活性在细胞分裂期的丧失^[23]。

1.3 Atg12-Atg5-Atg16 蛋白复合物

Atg12-Atg5-Atg16 组成的类似于泛素连接的系统在自噬双层膜延伸过程中发挥了十分重要的作用^[24-25]。首先, Atg12 在 Atg7 的作用下与 Atg7 形成共价连接。然后, Atg12 又在 Atg10 的协助下,将 Atg7 置换出去,形成 Atg12 和 Atg10 的共价结

合蛋白。最后,在 Atg5 的作用下, Atg12 与 Atg5 形成 Atg12-Atg5 共价体。自身是二聚体的 Atg16 蛋白通过与 Atg5 结合使 Atg12-Atg5 复合物形成同源二聚体,该二聚体在自噬小体双层膜形成的过程中对双层膜的弯曲至关重要。

Atg12 除了和 Atg5 共价连接,它还能和 Atg3 进行共价结合^[26]。与 Atg12 在自噬中的重要作用不同的是, Atg12-Atg3 复合物并不会影响自噬过程中 Atg8-PE 的形成。Atg12-Atg3 复合体在维持线粒体的稳态方面起着重要的作用。在 Atg12-Atg3 复合体缺失的细胞中,线粒体的形态发生了很大的改变,线粒体的功能出现异常,依赖于线粒体的凋亡通路受到了影响, Atg12-Atg3 复合体缺失细胞的凋亡受到了明显的抑制。

Atg5 除了在自噬中发挥作用外,它还具有促进凋亡的功能^[27]。在肿瘤细胞中, Atg5 缺失的细胞表现出对化疗的抵抗。这是因为在凋亡发生时, Atg5 会被钙蛋白酶切割后形成截短的 Atg5,而截短后的 Atg5 能够从细胞浆转移到线粒体中并与 Bcl-X_L 结合,从而促进细胞的凋亡发生。

自噬与细胞的凋亡存在着紧密的联系。在 Atg5 缺失的细胞中,自噬小体消失,细胞会出现自噬性细胞死亡。而当自噬在晚期受到抑制的时候,自噬小体会在细胞内大量聚集,这时的细胞既表现有自噬性细胞死亡的特征,也表现出经典的细胞凋亡的特征。在神经细胞中特异性地敲除 Atg5 或 Atg7 会导致神经细胞内出现大量的包涵体,神经系统出现退行性病变,并最终引起神经细胞的凋亡。而在 T 细胞中条件性地敲除 Atg5 后,成熟 T 细胞的凋亡会增加。自噬受阻引起细胞凋亡的机制尚不清楚,但可能的解释是,当细胞内的自噬受阻的时候,由于细胞不能及时得到必要的营养物质,可能会刺激细胞内的凋亡通路,从而引发细胞走向死亡。

1.4 Atg8-PE 复合物

Atg8 在哺乳动物中的同源蛋白是 LC3,它在自噬小体双层膜延伸的过程中起着重要的作用^[28-29]。在自噬发生的过程中, LC3 在 Atg4B 的作用下第 120 位的甘氨酸发生分解,截短后的 LC3 与 Atg7 形成共价复合体。随后, Atg3 替换掉了上述复合物中的 Atg7,并在 Atg12-Atg5-Atg16 的协助下与磷脂酰激醇 (PE) 连接,形成 LC3-PE 复合体。

当酵母细胞发生自噬时, Atg8 定位于自噬前体组装位点^[30-32],这个过程除了需要 Atg3、Atg7 等对 Atg8 的磷脂酰激醇修饰,还需要 Atg12-Atg5-

Atg16 和 Atg9 的帮助。Atg9 是跨膜蛋白, 它有 6 个跨膜结构域, 不同物种之间高度保守。Atg9 定位于自噬前体组装位点, 通过自身聚集而招募其他自噬复合物到达自噬前体组装位点。Atg9 在胞浆中呈斑点状分布, 而且不断地在胞浆与自噬前体组装位点间转运。这个转运过程可能为自噬前体提供了双层膜的结构, 因为拥有 6 次跨膜结构域的 Atg9 在转动过程中携带了部分磷脂双分子层。哺乳动物细胞中的 Atg9 主要定位于高尔基体外侧和晚期内涵体上, 并在两者之间不断地转运。酵母细胞中 Atg9 的转运依赖 Atg27 和 Atg23 两个蛋白。Atg9 需要不断地从自噬前体组装位点中脱离出来回到内涵体上重新运输磷脂双分子层, 这个过程受到 Atg1 复合体的调控。

LC3-PE 除了参与自噬小体双层膜的延伸, 它还参与了对底物的识别过程。LC3-PE 定位于自噬小体双层膜的两侧, 外侧的 LC3-PE 在自噬小体与溶酶体融合后会从双层膜上脱离, 并可逆地去掉连接在其蛋白上的磷脂酰激醇, 从而循环利用, 而内侧的 LC3-PE 则被包裹进溶酶体降解掉。在自噬小体形成的过程中, 内侧的 LC3-PE 会和一些连接底物的接头分子结合, 将底物包裹进自噬小体中。

2 自噬与造血干细胞的发育

血液细胞是组成机体血液系统的重要组分, 是维持生命活动所必需的。体内的造血作用依赖于骨髓内的一群极少量的造血干细胞, 它们拥有自我更新和不断产生各类血液细胞谱系的能力。造血干细胞在小鼠胚胎发育过程中最早出现在 E10.5 的主动脉-性腺-中肾区域。造血干细胞分为长期造血干细胞和短期造血干细胞。长期造血干细胞具有自我更新和分化的能力, 维持生命过程中造血系统中的血细胞来源。大多数长期造血干细胞都处于细胞周期的静息期, 但是一旦受到外界刺激, 长期造血干细胞能够快速增殖分化形成成熟的血液细胞, 同时, 又能维持干细胞数量在一定的水平。短期造血干细胞则失去了自我更新的能力, 它只能分化形成成熟的血液细胞。短期造血干细胞在向下游分化的过程中首先分化成淋巴系祖细胞和髓系祖细胞。淋巴系祖细胞能在不同的细胞因子刺激下分化成 T、B 和 NK 细胞; 髓系祖细胞可以分化成粒-巨噬细胞祖细胞和巨核-红细胞祖细胞。粒-巨噬细胞祖细胞最终分化成为单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、DC 细胞; 巨核-红细胞祖细胞最终分化成为巨核

细胞和红细胞。长期造血干细胞发育分化成血液细胞谱系主要受两方面的调控: (1) 骨髓微环境的外部信号, 包括生长因子、细胞-细胞之间与细胞-基质之间的相互作用; (2) 谱系相关的转录因子的表达, 此过程受到表观遗传的精细调节。造血干细胞移植已经被广泛应用于再生障碍性贫血、白血病等血液病的治疗, 有着广阔的临床应用前景。因此, 造血干细胞的发育分化机制是医学领域的前沿课题, 人们期望通过了解造血干细胞发育分化的命运决定机制, 以期获得大量有功能的造血干细胞, 为治疗血液病及血液替代等临床问题提供新策略。

在造血干细胞发育分化的过程中, 自噬起到了重要的调节作用^[33]。在 Atg7 基因缺失的小鼠中, 小鼠骨髓中造血干细胞的功能发生明显异常^[34]。自噬基因缺失的造血干细胞更倾向于向髓系细胞分化, 表现为小鼠骨髓中髓系细胞的异常增生, 而小鼠也会在很短的时间内由于贫血而死亡。在这些小鼠的造血干细胞和其下游的前体细胞中, 细胞内出现了大量聚集的线粒体, 细胞内 ROS 的水平也明显升高, 细胞内的 DNA 损伤增加, 细胞的增殖失去了控制并异常扩增。造血干细胞的数量出现了显著的下降, 虽然由其分化出来的前体细胞的数量有所增加, 但是这些细胞的功能却是异常的。同时, 这些自噬缺陷的造血细胞也失去了长期的骨髓重建的能力。这说明, 自噬所介导的基本生理活动对于造血干细胞的发育分化是必需的。

另外, 造血干细胞在饥饿或者是缺乏生长因子的时候, 细胞内会产生大量的自噬小体。而造血干细胞中自噬活性的增加能够帮助造血干细胞调整细胞内的能量代谢活动, 避免细胞因外界刺激而走向细胞凋亡。当用自噬抑制剂抑制造血干细胞的自噬活动的时候, 造血干细胞会出现明显的凋亡增加的情况, 而且在自噬缺失的小鼠中, 饥饿能够引起明显的造血干细胞数量的下降。这些结果都说明, 自噬在维持造血干细胞的稳态方面有着重要的作用。而在分子机制方面, FOXO3A 能够启动一系列自噬基因的表达, 对提高造血干细胞自噬的活性有着关键的作用。而 FOXO3A 位于 PI3K-AKT 的下游, 当细胞处于饥饿状态时, FOXO3A 会聚集在细胞核中启动关键的自噬基因的转录, 促进自噬活性的增强。

异常的自噬活动也可能改变了造血干细胞的增殖, 从而影响了造血干细胞的发育分化。FIP200 是自噬过程中的一个重要调节蛋白, 其在造血干细胞中的缺失会引起新生小鼠死亡和严重的贫血^[35]。

FIP200 缺失的造血干细胞不能够在骨髓移植实验中重构受体小鼠的造血系统, 说明 FIP200 的缺失影响了造血干细胞长期的自我更新或者是正常的分化潜能。在分子机制方面, FIP200 影响了造血干细胞的细胞周期, 它使得造血干细胞进入到了快速增殖的状态, 而细胞的凋亡并没有明显的改变。

3 自噬与T、B淋巴细胞的发育

初始 T 细胞接受刺激后, 分化为 Th1 和 Th2 细胞, 对于适应性免疫的建立至关重要。在这个过程中, 细胞内出现了异常多的自噬小体^[36], 过度的自噬对于机体和细胞而言是非常有害的。当细胞处于饥饿或者是外界压力的条件时, 细胞很容易出现死亡的情况。而当用自噬的抑制剂处理细胞或者是敲低细胞内自噬基因的表达的时候, 这种由 Th2 极化的细胞死亡会得到有效的缓解。另外, 自噬对 B 细胞的发育也同样重要。如果自噬出现异常, pro-B 细胞向 pre-B 细胞的发育就会受到影响。上述结果说明, 在细胞发育的特定时期, 自噬可能起到了决定细胞命运的作用。这在诱导多功能胚胎干细胞(iPSC)的过程中更加明显。在将 MEF 细胞诱导成多功能胚胎干细胞的过程中, 自噬会经历一个短暂升高的过程, 随后又恢复本底水平^[37]。在这期间, 细胞内的转录因子 Sox2 能够结合到 mTOR 的启动子区域抑制 mTOR 的转录。Sox2 本身就是一个 DNA 结合蛋白, 它能够启动许多基因的开放。但是, Sox2 在启动子区域抑制一个基因的表达, 则还需要一些转录辅助因子的协助。生化分析表明, Sox2 能够在多功能胚胎干细胞形成的过程中招募 NuRD 复合物到 mTOR 的启动子区域, 而 NuRD 复合物则是一个能够抑制基因转录的蛋白质重塑复合物。在 NuRD 复合物的作用下, mTOR 基因的转录受到了抑制, mTOR 蛋白的水平有所下降, 从而解除了其对自噬的抑制作用。自噬活性的增加对降低细胞重编程过程中那些不需要的长周期蛋白和降低细胞内的 ROS 的水平起到了关键的调节作用。

在自噬缺陷的小鼠中, B 细胞和 T 细胞的分化和功能受到了影响, 而 pDCs 的发育分化却不受影响。当在 T 细胞中条件性地敲除自噬关键基因 Atg5 的时候, CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的正常发育就会受到影响。在 T 细胞发育的早期, 细胞内有自噬小体产生。自噬基因 Atg5 缺失的 T 细胞虽然也能够发育成熟, 但是其胸腺中最终产生的细胞数量却显著减少, 同时, 外周血中的 CD8⁺ T 细胞的凋亡

比例明显增加, 并且 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞在受到 TCR 刺激后增殖受到抑制。

4 自噬与MHC的递呈

自噬在将侵入细胞内的病原微生物降解的同时, 也能够把这些病原微生物的抗原递呈到 MHC-II 类分子上, 并被机体免疫系统的 T 细胞或者是 NKT 细胞识别, 从而为建立对特定病原的特异性免疫反应提供条件。

递呈在 MHC-I 类分子上的多肽片段大多来自于细胞浆或者是细胞核内半衰期较短的蛋白, 也有一些是蛋白质合成过程中由核糖体产生的半成品^[38]。蛋白质被蛋白酶体降解后形成的片段被运输到内质网中并在那里进行抗原处理, 随后与 MHC-I 类分子结合并被运输到抗原递呈细胞的表面, 从而介导了向 CD8⁺ T 细胞的抗原呈递活动。MHC-II 类分子的组装发生在晚期溶酶体中。MHC-II 类分子在分子伴侣 Ii 的协助下进入到晚期溶酶体中。Ii 不但能够促进未成熟的多肽在内质网中与 MHC-II 类分子的组装, 它也能够促进组装好的 MHC-II 类分子进入到晚期溶酶体中。在晚期溶酶体中, Ii 在溶酶体酶的作用下被降解掉, 取而代之的则是与 MHC-II 类分子有着高亲和力的多肽分子。这样的晚期溶酶体结构被称作 MIIC。随后, 被组装好的 MHC-II 类分子被运输到抗原递呈细胞的表面。

在哺乳动物中, 自噬小体在与溶酶体融合前会先与晚期溶酶体融合形成中间囊泡。中间囊泡的结构与 MHC-II 类分子进行抗原呈递的溶酶体结构非常类似。这说明中间囊泡有可能参与了 MHC-II 类分子的抗原呈递活动^[39]。在人上皮细胞系中, 如由单核细胞分化而来的树突状细胞和由 EBV 病毒转化而成的 B 细胞系, 其中大部分的 MIIC 结构都来自于自噬小体。在 MHC-II 类分子呈递的抗原中, 有大约 1/4 来自于细胞内部。而细胞内部蛋白降解的一个重要途径就是自噬。另外, 有实验表明, 在自噬过程中被降解掉的 LC3 也会被 MHC-II 呈递到细胞表面。此外, 自噬的另一个底物 GAPDH 是细胞浆中被 MHC-II 呈递的主要物质。

对自噬底物的抗原递呈能够引起 T 细胞的活化。B 细胞、巨噬细胞和成纤维细胞都能够对高表达的补体 C5 进行抗原呈递^[40]。B 细胞和成纤维细胞能够将细胞内的 C5 直接呈递给 CD4⁺ T 细胞, 而巨噬细胞则只能在溶酶体降解途径被阻止的时候才能够对 C5 进行抗原递呈。除了 C5 的抗原递呈, 巨

噬细胞在呈递肿瘤抗原 MUC1 和 NeoR 的时候也需要自噬。另一方面, 自噬蛋白 LC3 与抗原协同的抗原呈递能够加大抗原呈递的效率。例如, LC3 能够促进肿瘤抗原 NY-ESO-1 的呈递, 也能够提高流感病毒蛋白 MP1 的递呈效率, 这些过程依赖于细胞内的自噬活动。

此外, 自噬也参与了对病原微生物的抗原递呈活动。Mtb 的抗原呈递是通过自噬进行的。自噬的诱导剂雷帕霉素能够提高抗原递呈细胞对 Mtb 蛋白的呈递效率。另外, EBV 病毒的核抗原 EBNA1 也是通过自噬递呈的。在病毒感染过程中, EBNA1 蛋白和自噬小体存在着明显的共定位, 而且在电镜下能够观察到清楚的自噬小体结构包裹着 EBNA1 蛋白。

5 自噬与自身免疫病

自噬调节了细胞内的代谢平衡, 对某些生命活动起到了关键的调控作用。自噬的异常与机体的许多疾病有关。越来越多的实验证据表明, 自噬在抗细菌感染和某些自身免疫疾病中起着重要的作用。

从 Atg16L 缺陷的小鼠中分离出的巨噬细胞与正常细胞相比, 在脂多糖 (LPS) 刺激的情况下, 其内部活化的 caspase1 和分泌出来的 IL-1 β 的水平明显升高。在造血系统中条件性地敲除 Atg16L 会引起较高的炎症水平, 细胞分泌的 IL-1 β 的水平也显著提高^[41]。

克隆氏症 (Crohn's disease) 是一种炎症性的肠胃病。患者往往会出现胃部或者是小肠的充血、发炎症状, 严重者会出现严重的腹泻及便血的情况, 更甚者需要做肠道切除手术。通过对克隆氏症患者进行基因组的分析, 研究者发现, 患者的 Atg16L 基因存在突变^[41]。而 Atg16 在自噬双层膜延伸的过程中起着关键的作用。这说明自噬与自身的免疫系统疾病存在着某种联系。

Atg16L 突变的患者除了对 LPS 的刺激异常外, 在胞壁酰二肽刺激下也会有异常高的 IL-1 β 分泌。从外周血中分离出来的外周血单核细胞在 MDP 的刺激下, 其细胞分泌的 IL-1 β 有显著的增高。另外, Atg16L 也能通过 NOD2 影响细胞因子的分泌。在正常的淋巴细胞中, 当有细菌感染的时候, NOD2 通过与 Atg16L 相互结合将 Atg16L 招募到细菌感染的部位, 并诱发自噬从而将病原菌包裹进自噬小体中^[42]。

Atg16L 在细胞清除外来病原体的过程中至关

重要, 其蛋白的微小突变都可能影响其功能的发挥。当人上皮细胞中的 Atg16L 第 300 位的苏氨酸突变成丙氨酸 (T300A) 或者其蛋白 C 端缺失的时候, 自噬就不能够发生。T300A 突变会影响小鼠在特定的情况下对细胞的清除。在高表达 Atg16L 的小鼠潘氏细胞中, 线粒体的形态出现异常, 细胞内的囊泡结构形态变得不规则, 溶酶体的分布也不同于正常的细胞, 与此同时, 促炎症因子的表达量也明显升高。

风湿性关节炎是一种慢性的炎症疾病。其产生原因是 TNF- α 引起了关节滑膜的炎症反应, 当炎症发生时, 关节处的滑膜会增厚, 影响了关节的正常运动。有研究表明, 在风湿性关节炎产生的过程中, 自噬也参与其中。患者关节处的破骨细胞在 TNF- α 的作用下其细胞内的 Atg7 和 Beclin 1 的表达量升高, 自噬的活性随之增强。强烈的自噬活动会促进患者关节处的单核细胞转变成破骨细胞, 造成关节处骨质被吸收。

白癜风是一类严重的皮肤病, 其发病受到遗传因素和环境因素的影响。UVRAG 是在自噬过程中发挥调节作用的蛋白, 它参与了对 Beclin 1-Vps34 复合物的调控, 同时也能够调节溶酶体的成熟过程。在非节段型白癜风患者中, UVRAG 基因的多态性与该疾病存在着联系, 但是其机制还不甚清楚。

在系统性红斑狼疮的小鼠模型中, 淋巴细胞的自噬活性显著降低, 其外周 T 细胞中含有大量的自噬小体。这说明在 T 细胞早期发育过程中, 自噬扮演了一个十分重要的角色。对系统性红斑狼疮患者的 T 细胞进行形态学的分析发现, 其中含有许多巨大的线粒体, 这可能和自噬功能的异常有关。外周血中针对自身的抗体能够引发 T 细胞自噬的产生, 自噬小体的数量虽然明显增加, 但是其降解底物的能力却受到了抑制。如果受损伤的线粒体不能及时得到清除便会激发自身固有免疫系统的活化。系统性红斑狼疮患者线粒体会持续地极化, 从而造成了 T 细胞的坏死。坏死的 T 细胞碎片激活了类浆状树突细胞的免疫活性。

6 结语和展望

自噬是细胞基本的代谢过程, 它能降解细胞内的蛋白质和细胞器, 以最有效的方式重复利用这些成分, 来维持细胞的生存和组织自稳。自噬参与了细胞内许多重要的生理过程, 如细胞凋亡、细胞增殖、干细胞 (ES) 干性的维持、多能性诱导干细胞 (iPS)

的建立以及机体对外来病原微生物的清除等。自噬是真核细胞清除入侵病原微生物的最原始的天然免疫方式。近年来, 已有大量的研究表明, 自噬参与淋巴细胞的发育、固有免疫和适应性免疫应答途径。对自噬在免疫系统中的深入研究将加深我们对免疫机制的认识, 为清除病原微生物感染、防治自身免疫性疾病提供新策略和新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1178-90
- [2] Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy-unanswered questions. *J Cell Sci*, 2011, 124: 161-70
- [3] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451: 1069-75
- [4] Reggiori F. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol*, 2006, 74: 1-30
- [5] Suzuki K, Ohsumi Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2007, 581: 2156-61
- [6] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 1102-9
- [7] Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22: 132-9
- [8] Hara T, Takamura A, Kishi C, et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*, 2008, 181: 497-510
- [9] Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 1992-2003
- [10] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 2005, 12 Suppl: 21542-52
- [11] Chan EY, Tooze SA. Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy*, 2009, 5: 758-65
- [12] Maloverjan A, Piirsoo M, Michelson P, et al. Identification of a novel serine/threonine kinase ULK3 as a positive regulator of Hedgehog pathway. *Exp Cell Res*, 2010, 316: 627-37
- [13] Yan J, Kuroyanagi H, Kuroiwa A, et al. Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to *C. elegans* UNC-51. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246: 222-7
- [14] Yan J, Kuroyanagi H, Tomemori T, et al. Mouse ULK2, a novel member of the UNC-51-like protein kinases: unique features of functional domains. *Oncogene*, 1999, 18: 5850-9
- [15] Kim S, Zaghoul NA, Bubenshchikova E, et al. Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 351-60
- [16] Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11: 219-25
- [17] Okkenhaug K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 675-704
- [18] Lindmo K, Stenmark H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci*, 2006, 119: 605-14
- [19] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005, 122: 927-39
- [20] Zalckvar E, Berissi H, Mizrachi L, et al. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-X-L and induction of autophagy. *EMBO Rep*, 2009, 10: 285-92
- [21] Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal*, 2010, 3: ra42
- [22] Xia P, Wang S, Du Y, et al. WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. *EMBO J*, 2013, 32: 2685-96
- [23] Furuya T, Kim M, Lipinski M, et al. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol Cell*, 2010, 38: 500-11
- [24] Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J*, 2012, 31: 4304-17
- [25] Walczak M, Martens S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy*, 2013, 9: 424-5
- [26] Radoshevich L, Murrow L, Chen N, et al. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell*, 2010, 142: 590-600
- [27] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 1124-32
- [28] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 2000, 408: 488-92
- [29] Paz Y, Elazar Z, Fass D. Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem*, 2000, 275: 25445-50
- [30] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 19: 5720-8
- [31] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2805-12
- [32] Kirisako T, Baba M, Ishihara N, et al. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*, 1999, 147: 435-46
- [33] Warr MR, Binnewies M, Flach J, et al. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem

- cells. *Nature*, 2013, 494: 323-7
- [34] Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*, 2011, 208: 455-67
- [35] Liu F, Lee JY, Wei H, et al. FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*, 2010, 116: 4806-14
- [36] Li C, Capan E, Zhao Y, et al. Autophagy is induced in CD4⁺ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J Immunol*, 2006, 177: 5163-8
- [37] Wang S, Xia P, Ye B, et al. Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 617-25
- [38] Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 1999, 50: 213-9
- [39] Schmid D, Pypaert M, Munz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*, 2007, 26: 79-92
- [40] Brazil MI, Weiss S, Stockinger B. Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol*, 1997, 27: 1506-14
- [41] Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*, 2008, 456: 264-8
- [42] Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*, 2010, 11: 55-62