doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.13.049

内质网应激诱导自噬的分子机制 *

潘 玲 张翠薇 马程功 文 雪 马跃荣△

（成都中医药大学 四川 成都 610072）

摘要：在真核细胞中，内质网对蛋白质的折叠和运输至关重要，多种病理因素对内质网稳态的扰乱，可导致内质网腔中未折叠或错误折叠蛋白蓄积，即内质网应激（ERS）。细胞为此通过激活一种叫做未折叠蛋白反应（UPR）的防御反应来恢复内质网稳态。自噬是一种被描述为＂自我吞食＂的细胞代谢过程，其通过批量清除和降解未折叠蛋白以及破损细胞器在 ERS 时作为一种重要的保护机制。近年的研究显示这两个系统动态互联，且 ERS 可以通过多种方式诱导自噬的发生。在本文中，我们将总结目前关于 ERS 尤其是 UPR 诱导自噬的分子机制的相关知识，以进一步指导关于 ERS 与自噬关系的的研究。

关键词：内质网应激；未折叠蛋白反应；自噬；凋亡

中图分类号：Q291；Q75 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2017）13-2590-04

The Molecular Mechanism of Autophagy Induced by Endoplasmic Reticulum Stress*

PAN Ling, ZHANG Cui-wei, MA Cheng-gong, WEN Xue, MA Yue-rong△

(Chengdu University of traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, 610072, China)

ABSTRACT: In eukaryotic cells, the endoplasmic reticulum (ER) is essential for the folding and translocation of proteins. The disturbance of the endoplasmic reticulum homeostasis, caused by multiple pathological factors will lead to the accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER lumen, known as endoplasmic reticulum stress(ERS). Cells react to ERS by activating an defensive process known as the Unfolded Protein Response (UPR) to restore the endoplasmic reticulum homeostasis. Autophagy is a cellular catabolic process which can be described as a "self-eating", it emerged as an essential protective mechanism upon ER stress through the bulk removal and degradation of unfolded proteins and damaged organelles. Recent studies show that these 2 systems are interconnected, and the ER stress can induce autophagy in a variety of ways. In this review, we will summarize the current knowledge about the molecular mechanism of autophagy by Endoplasmic Reticulum Stress especially the UPR, to guide further study on ER stress and autophagy.

Key words: Endoplasmic reticulum stress; Unfolded protein response; Autophagy; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q291; Q75 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)13-2590-04

前言

内质网作为真核细胞重要的膜性细胞器之一，在细胞的生理调控中扮演着十分重要的角色。它不仅是细胞内重要的 Ca^{2+} 贮存库，而且是细胞内脂质代谢以及蛋白质合成后折叠与聚集的场所[1]。内质网对蛋白质的正确折叠涉及到多种机制，其功能的正常是细胞存活以及机体生理功能正常的关键。多种生理、病理的干扰因素，如营养素的过量或限制、Ca^{2+} 代谢、氧化还原失衡、炎症、缺氧均可扰乱内质网稳态，导致的未折叠或错误折叠蛋白在内质网腔中的积累、聚集，即我们所说的内质网应激（endoplasmic reticulum stress, ERS）[2]。为了应对 ERS 所带来的不利影响（主要是细胞凋亡），细胞通过激活一种被称为未折叠蛋白反应（unfolded protein response ,UPR）的自适应反应，来恢复内质网的平衡及功能，促使细胞存活。自噬，是一种进化上保守、溶酶体介导的细胞内大分子物质降解系统，其通过清除未折叠蛋白、蛋白质聚合体及破损细胞器（如线粒体）在响应细胞应力刺激，维持细胞稳态中起着重要的促生存作用。尽管越来越多的研究表明，ERS 尤其是 UPR 信号可以诱导自噬的发生，并与其共同作用于多种疾病，然而关于 ERS 介导自噬的具体机制及其具体靶分子仍未阐明，在此，我们将当前已知关于 ERS 诱导自噬发生的分子机制作一系统综述，以期为今后的相关基础研究提供一定思路。

1 UPR 信号

急性 ERS 所诱导的 UPR 信号级联主要通过暂时减少蛋白质的合成，提高蛋白质的折叠和运输能力以及增加内质网相关蛋白降解和自噬来恢复内质网的蛋白质折叠平衡，促使细胞存活（见图 1）。具体来说，UPR 信号级联是由位于内质网的三

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81473522）

作者简介：潘玲（1990-），硕士研究生，主要研究方向：肾脏病理，E-mail: 309274282@qq.com

△ 通讯作者：马跃荣，教授，博士生导师，E-mail: mayr666@163.com

（收稿日期：2016-05-23 接受日期：2016-06-07）

种跨膜信号转导蛋白所启动的：蛋白激酶样内质网激酶(PERK/EIF2AK3)、激活转录因子 6 (ATF6) 及肌醇需要酶 1(IRE1/ERN1)[3]。正常细胞条件下,它们与内质网上的分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78(GRP78,也称为 BIP)结合形成稳定的复合体,保持三者的非活性状态。ERS 时,内质网腔中蓄积的未折叠或异常折叠蛋白优先与 GRP78 结合使得三者与 GRP78 解离并激活,从而触发 UPR 信号通路。

PERK 与 GRP78 解离后通过二聚体化及自身磷酸化而被激活。活化的 PERK 磷酸化真核起始因子 2a (eIF2a)的 Ser51 位点(即 eIF2a p),直接导致整体蛋白质的合成抑制,减轻内质网负荷。并通过激活 eIF2a 下游的激活转录因子 4(ATF4),增强 C /EBP 同源蛋白 (CHOP) 及自噬相关基因的表达 [4]。此外,PERK 尚可磷酸化并激活核因子 E2 相关因子 2(NRF2),一种参与调控抗氧化反应的转录因子[5]。

ATF6 与 GRP78 解离后，通过与衣被蛋白Ⅱ（COPⅡ)结合,易位至高尔基复合体中,依次被位点 1 蛋白酶(S1P) 、位点 2 蛋白酶(S2P) 切割,形成只含有 N 端胞质结构域的 50 kDa 活性片段,即裂解形式的 ATF6,其易位到细胞核内作为转录因子结合于 ERS 反应元件(ER stress element,ERSE),导致分子伴侣 GRP78 以及 UPR 基因 XBP1、CHOP 等的转录激活[6],从而增加内质网的蛋白质折叠容量。

IRE1 的激活是其二聚化及自身磷酸化的结果，激活后的 IRE1 可从 X- 盒结合蛋白 1(XBP1) mRNA 中切除一个 26 碱基的核苷酸序列,形成剪切型 XBP1(XBP1S) mRNA,翻译产生 XBP1S,增强分子伴侣 GRP78、GRP94 以及内质网相关性降解(ER- associated degradation,ERAD) 组件的转录活性[7]来减轻内质网负荷。然而,长期的内质网应激时,IRE1 参与炎症和凋亡通路的激活：其通过与肿瘤坏死因子 -α 受体相关因子 2(TRAF2)结合,募集凋亡信号调节激酶(ASK1),导致 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)的激活从而触发凋亡信号[8],并通过激活核因子 κB(NF-κB)信号,控制一系列促炎症基因的表达来参与炎症活动[9]。

如上所述,UPR 信号级联在急性 ERS 时扮演着重要的促活作用,然而,在应激条件过强或 ERS 长期未得到良好解决的情况下细胞凋亡程序终将被激活[10]。现有的观点认为,UPR 并不能直接导致细胞死亡，而是通过引发下游分子 CHOP、Caspase、JNK 等的激活来诱导细胞凋亡[11]。

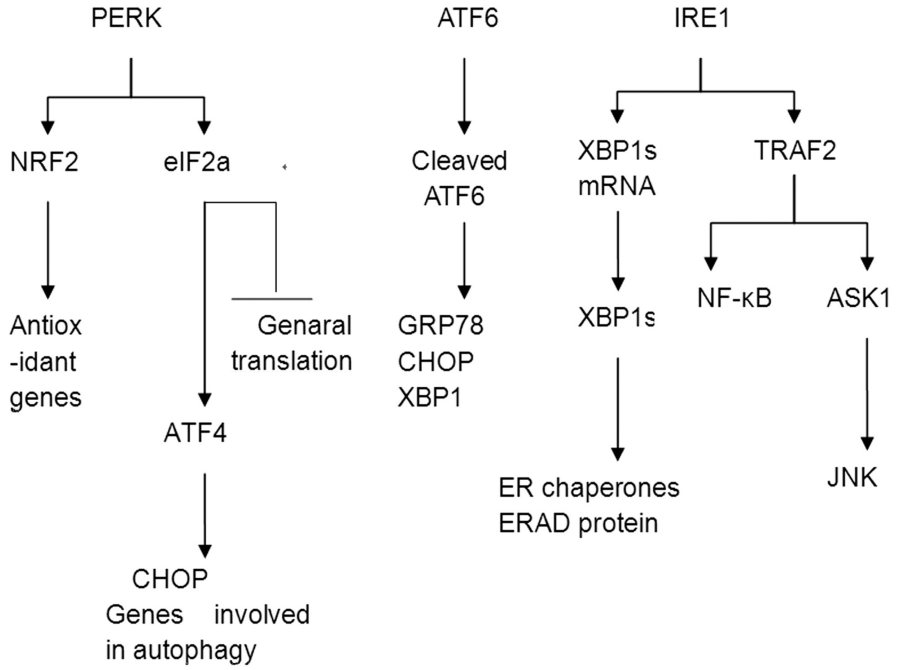

图 1 UPR 级联示意图

Fig. 1 UPR cascade display intent

其中带箭头的横线表示促进作用,不带箭头的为抑制作用

The line with the arrow indicates the promotion, without arrows for inhibition.

2 自噬

自噬作为真核细胞重要的降解 / 回收系统,通过消除和降解多余的蛋白质及受损细胞器,从而实现细胞器的更新以及营养素的回收利用,并在维持细胞稳态中发挥重要作用。根据将细胞底物运送到溶酶体的方式可将其分为三种类型：微自噬(microautophagy)、巨自噬(macroautophagy)及分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy,CMA)[12]。三者间,巨自噬是降解能力最高且当前研究最多的自噬类型。下面以其进行讨论,简称自噬。

自噬是由细胞质内形成的一种被称为分隔膜或吞噬泡的孤立双层膜结构所启动的,随后分隔膜通过逐渐延伸,将需被降解的胞质部分完全包绕形成自噬体。自噬体形成后其外膜与溶酶体直接融合,形成自噬溶酶体,并在溶酶体中的水解酶的作用下被降解，从而实现降解产物在细胞内的再循环利用,为细胞的新陈代谢提供能量并帮助维持细胞内环境的稳定。自噬

是一个多步骤的过程,涉及到 38 个已知的自噬相关基因(Atg)[13]。在此,我们简单阐述自噬不同阶段(自噬诱导、成核、自噬体膜的延伸过程)所涉及的核心机制。

ULK1 复合物的激活在自噬的起始步骤起着重要作用,是双层膜结构诱导必不可少的物质。该复合体主要由 ULK1/2、mAtg13、FIP200、Atg101 等成分构成,通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)复合物 1 和 5' 单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)引起的一系列的磷酸化事件来实现自身激活[14]。mTORC1 作为公认的细胞自噬负性调控因子,在营养充沛的情况下,可通过磷酸化 ULK1 及 mAtg13,维持自噬起始分子 ULK1 复合物的非活性状态,抑制自噬的发生[15];饥饿或其他环境压力条件下,mTORC1 的活性则被抑制,并使得其对 ULK1 和 mAtg13 的磷酸化作用减弱,最终导致 ULK1 复合物的激活,从而开启自噬发生的第一步。自噬调控的另一个潜在候选人 AMPK,则被认为是自噬的正调控因子。胞内能量呈低水平时,AMPK 被激活,其一方面可通过磷酸化 ULK1 的 Ser317 和 Ser777 位点来直接激活其活性,从而促进自噬[16];另一方面可通过磷酸化 TSC1/2 复合体从而抑制 mTORC1 的活性来诱导自噬[17]。

成核过程则与磷脂酰肌醇 3- 激酶复合物(即 PI3K/ Vps34-Beclin1 复合物)密切相关。磷脂酰肌醇 -3- 磷酸(PI3P)是其唯一的磷酸化产物,其生成后可使大量自噬相关蛋白定位到自噬前体[18],并促进 DFCP 的积累,形成欧米伽体,为自噬体的形成提供平台。PI3K 抑制剂 3-MA、渥曼青霉素(wortmannin)以及 LY294002 均可抑制自噬体的形成,从而强调了 PI3K 复合物在自噬过程中的重要性。PI3K 复合物的激活是建立在抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 从 Beclin1 蛋白的 BH3 结构域分离的基础上的[19]。

自噬体膜的延伸 / 闭合阶段主要依赖于两个泛素样共轭系统,即 Atg12 和微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)。Atg12 在 E1 样酶 Atg7 和 E2 样酶 Atg10 的作用下,其 C 端甘氨酸残基与 Atg5 结合,形成 Atg12- Atg5 复合物,进而在 Atg16L 的寡聚化作用下形成 Atg12- Atg5-Atg16L 复合物[20],构成自噬囊泡的双层膜骨架结构,促进 LC3 与 PE 的结合,并为脂化的 LC3 定位到自噬体膜上提供平台。LC3 是酵母 Atg8 分子在哺乳动物中的同源物之一,合成后以前体形式存在,通过被 Atg4B 切割暴露其 C 端甘氨基酸残基形成胞浆内的 LC3-I。自噬发生时,LC3 -I 通过连续两个分别由 E1 样酶 Atg7 和 E2 样酶 Atg3 催化的泛素样反应与磷脂酰乙醇胺(PE)结合形成 LC3-II[21]并定位于自噬体膜的内、外层上。

自噬的最后阶段,即自噬体的成熟阶段,自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体来完成底物的降解。

3 ERS 介导自噬的分子机制

越来越多的观念认为,ERS 可诱导自噬的发生[22,23],目前发现 ERS 主要通过 Ca2+ 释放以及 UPR 信号来介导自噬。

3.1 Ca^{2+} 释放

内质网作为细胞内重要的 Ca^{2+} 存储器,在 Ca^{2+} 对自噬的调控中起着重要作用。静息状态下,定位于内质网中的 Bcl-2 可通过阻止内质网内的 Ca^{2+} 向细胞质流动从而维持内质网中 Ca^{2+} 存储水平。ERS 时,JNK 介导的 Bcl-2 磷酸化可影响后者控制内质网 Ca^{2+} 存储的能力[24]。引起 ERS 诱导的 Ca^{2+} 释放的另一个因素是 CHOP 介导的 ER 氧化还原 1a(ERO1a)的转录上调。后者在静息条件下可为新生蛋白质的折叠提供一个方便通过折叠酶形成二硫键的氧化环境,从而在内质网中扮演着保护角色。然而,高水平的 ERO1a 可刺激肌醇 1,4,5- 三磷酸肌醇受体(IP3R)的活性,导致 Ca^{2+} 从内质网释放进入细胞质[25]。ERS 时 Ca^{2+} 的持续升高被认为主要通过钙调蛋白依赖性激酶 -β(calmodulin-dependent kinase kinase-β, CaMKK-β)介导的 AMPK 活化[26],并最终通过激活 TSC1/2 复合物来抑制 mTORC1 的活性,从而促进自噬。

3.2 UPR 与自噬

研究显示,UPR 的三个下游分子可通过不同的分子机制来调控自噬的发生,下面分别述之。

3.2.1 IRE1 分支 衣霉素和胡萝卜素作用于 IRE1、ATF6、PERK 缺乏的小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)的一项实验中发现 LC3 阳性的自噬囊泡的聚集呈 IRE1 依赖[27]。在使用衣霉素处理的人类乳腺癌细胞中,诱导的 ERS 被发现通过 IRE1-JNK-Beclin1 通路来上调自噬[28]。

3.2.2 PERK 分支 PERK 激活后通过磷酸化其下游底物 eIF2a,选择性转录上调 Atg12、Atg5、LC3 等[29],促进自噬体膜的延伸。其中,Atg12 由 ATF4 转录上调,Atg5 、LC3 则由 CHOP 转录上调。PERK 激活 ATF4 后,一方面可诱导发育及 DNA 损伤反应调节基因 1(REDD1)的表达,导致 TSC 激活,抑制 mTORC1,随后激活 ULK1 感应复合物[30];另一方面则通过转录上调另一种转录因子即 CHOP,目标表达 Tribbles 同源蛋白 3 (TRB3),直接抑制 Akt,从而减轻 Akt 对 TSC 的抑制性影响,随后抑制 mTORC1 通路,激活 ULK1/2 复合体,发生自噬。此外,CHOP 的表达上调的另一个作用在于导致 Bcl-2 的抑制,使得 Beclin1 基因活化从而促进自噬发生。

3.2.3 ATF6 分支 ATF6 分支在内质网应激诱导的自噬中描述较少,然而近年的一些研究显示其在自噬的调控中起着积极作用:ERS 时,ATF6 则主要通过转录上调 GRP78 来防止 Akt Ser473 位点的磷酸化[31],导致 mTOR 活性的减弱以及随后的自噬诱导[32]。此外,有实验证实 ATF6 通过上调死亡相关蛋白激酶 1(DAPK1)的表达在 IFN-γ 依赖的自噬诱导中起着重要作用[33]。而在一项关于丙型肝炎病毒(HCV)感染诱导的自噬机制研究中则发现,ATF6 的激活可上调 DNA 损伤诱导转录物 3(DDIT3,即 CHOP)的表达,后者可通过直接与 LC3B 的 253-99 基础启动子区结合上调自噬基因 LC3B 的表达,从而促进自噬[34]。

4 结论与展望

自噬是真核生物细胞中广泛存在的一个分解代谢过程,其能帮助细胞应对严苛的应力条件威胁,从而在维持基本的细胞代谢中起着重要作用。ERS 时多途径诱导的自噬可帮助减轻内质网压力并促使细胞生存,并在长期应激条件下触发凋亡途径,由于两者间有着如此复杂的串扰,因此,更好的了解 ERS 与自噬促生存或促凋亡信号转变的关键节点,通过治疗性干预 UPR 通路的靶分子来调控自噬从而减轻内质网压力,可望为多种疾病的的治疗提供新的有效策略。

参 考 文 献(References)

[1] Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73 (1): 79-94

[2] Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease [J]. Nature, 2016, 529 (7586): 326-335

[3] Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response [J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(3): 141-148

[4] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(2): 89-102

[5] Del Vecchio CA, Feng Y, Sokol ES, et al. De-differentiation confers multidrug resistance via noncanonical PERK-Nrf2 signaling[J]. PLoS Biol, 2014, 12(9): e1001945

[6] Maurel M, Chevet E, Tavernier J, et al. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(5): 245-254

[7] Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response[J]. Cell Dev Biol, 2007, 18(6): 716-731

[8] Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1[J]. Science, 2000, 287(5453): 664-666

[9] Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(7): 931-935

[10] Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12): 3460-3470

[11] Liu MQ, Chen Z, Chen LX. Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(4): 425-443

[12] Xie Y, Kang R, Sun X, et al. Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy[J]. Autophagy, 2015, 11 (1): 28-45

[13] Araki Y, Ku WC, Akioka M, et al. Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity[J]. J Cell Biol, 2013, 203(2): 299-313

[14] Lin MG, Hurley JH. Structure and function of the ULK1 complex in autophagy[J]. Curr Opin Cell Biol, 2016, 39: 61-68

[15] Puente C, Hendrickson RC, Jiang X. Nutrient-regulated phosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy[J]. J Biol Chem, 2016, 291(11): 6026-6035

[16] Kim J, Kim YC, Fang C, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy[J]. Cell, 2013, 152(1-2): 290-303

[17] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling[J]. Cell Res, 2014, 24(1): 42-57

[18] Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34[J]. Biochem J, 2008, 410(1): 1-17

[19] Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM, et al. Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(14): 2425-2441

[20] Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, et al. Autophagy: regulation and role in development[J]. Autophagy, 2013, 9(7): 951-972

[21] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology [J]. Physiological Reviews, 2010, 90(4): 1383-1435

[22] Deegan S, Saveljeva S, Gupta S, et al. ER stress responses in the absence of apoptosome: a comparative study in CASP9 proficient vs deficient mouse embryonic fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 451(3): 367-373

[23] Meng XX, Yao M, Zhang XD, et al. ER stress-induced autophagy in melanoma[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015, 42(8): 811-816

[24] Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, et al. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca^{2+} homeostasis and apoptosis [J]. EMBO J, 2004, 23 (5): 1207-1216

[25] Taylor CW, Pantazaka E. Targeting and clustering of IP3 receptors: key determinants of spatially organized Ca^{2+} signals [J]. Chaos, 2009, 19(3): 037102

[26] Cárdenas C, Foskett JK. Mitochondrial Ca (2+) signals in autophagy [J]. Cell Calcium, 2012, 52(1): 44-51

[27] Ogata M, Hino S, Saito A, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26 (24): 9220-9231

[28] Cheng X, Liu H, Jiang CC, et al. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy through IRE1/JNK/beclin-1 in breast cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(3): 772-781

[29] Bchir W, Maurin AC, Carraro V, et al. The eIF2α/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(16): 7683-7699

[30] Lan YC, Chang CL, Sung MT, et al. ZOL-induced cell death was caused by endoplasmic reticulum stress activating PERK-eIF2α-CHOP pathway to induce REDD1 expression and inhibit the mTOR pathway[J]. Anticancer Res, 2013, 33(9): 3807-3814

[31] Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17894

[32] Qin L, Wang Z, Tao L, et al. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy [J]. Autophagy, 2010, 6(2): 239-247

[33] Gade P, Ramachandran G, Maachani UB, et al. An IFN-γ-stimulated ATF6-C/EBP-β-signaling pathway critical for the expression of Death Associated Protein Kinase 1 and induction of autophagy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(26): 10316-10321

[34] Ji Wang, Rongyan Kang, He Huang, et al. Hepatitis C virus core protein activates autophagy through EIF2AK3 and ATF6 UPR pathway-mediated MAP1LC3B and ATG12 expression [J]. Autophagy, 2014, 10(5): 766-784