

细胞自噬研究技术进展及其应用

王海杰* 谭玉珍

(复旦大学上海医学院人体解剖与组织胚胎学系, 上海 200032)

摘要 在生理状态下, 细胞通过自噬清除衰老细胞器和异常长寿蛋白质, 维持自身结构和功能的恒定, 参与胚胎发育、免疫调节和延长寿命。病理状态下细胞自噬水平显著升高, 以耐受饥饿、缺血和凋亡。自噬功能障碍与某些慢性感染疾病、神经变性疾病、溶酶体贮积症和肿瘤等密切相关。掌握和合理应用自噬研究技术对于提高细胞自噬研究水平有着重要意义。该文对哺乳类细胞自噬研究技术进展及其应用作了概述。

关键词 自噬; 巨自噬; 微自噬; 分子伴侣介导的自噬

自噬(autophagy)是细胞受到刺激后吞噬自身的细胞质或细胞器, 最终将吞噬物在溶酶体内降解的过程。按吞噬物进入溶酶体的途径, 可将细胞自噬分为巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)三类。在巨自噬中, 自噬前体包裹吞噬物形成自噬体, 然后自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 自噬体内容物被溶酶体酶降解。在微自噬中, 溶酶体膜凹陷和包裹吞噬物后形成自噬体, 然后吞噬物被降解。分子伴侣介导的自噬是指通过分子伴侣运载和溶酶体膜受体转运将细胞质内蛋白质转运入溶酶体^[1]。Ashford等^[2]最早发现, 在肝灌流液中加入高血糖素后, 肝细胞的溶酶体增多并发生自食(self-eating)现象。后来人们将该现象命名为自噬。随着技术方法的发明和改进, 近年来哺乳类动物细胞自噬机制的研究进展非常迅速^[3]。Science期刊在2005年将自噬列为科技领域的六大研究方向之一, 同年Autophagy创刊。2008年, Autophagy提出了检测细胞自噬的纲目^[4]。如何应用理想的技术方法对于正确评价生理和病理状态下细胞自噬活动和水平至关重要。因此, 本文结合我们科研组的实验体会, 对常用的哺乳类细胞自噬研究技术进展及其优缺点作一概述, 以供人们在细胞自噬实验中参考。

1 电镜技术

1.1 普通透射电镜技术

鉴于在超薄切片上能够清晰地观察到自噬结构的形态和构造, 迄今为止透射电镜技术仍为细胞

自噬研究的重要技术。实验指标包括细胞自噬水平和自噬结构的变化, 前者是指发生自噬的细胞出现率, 后者以自噬细胞内自噬结构数目或自噬结构与细胞质的断面面积之比衡量。

Ashford等^[2]最早在透射电镜下观察到, 高血糖素处理后肝细胞的溶酶体内出现线粒体、粗面内质网、微体和细胞质, 有的吞噬物包裹有双层膜。Deter等^[5]在透射电镜下确认自噬泡内含有线粒体、微体和膜性结构等。Ericsson^[6]用透射电镜技术较详细地研究了自噬体。在巨自噬中, 自噬前体(autophagosome precursor)为游离双层膜结构, 内腔电子密度很低。自噬前体多呈新月形或半环形。随着自噬前体不断延长、曲度增大和包裹吞噬物, 内腔变窄甚至双层膜紧密相贴^[7]。需将自噬前体与内质网和吞饮泡鉴别。自噬体(autophagosome)为双层膜包被的圆形或椭圆形结构, 内含细胞质、长寿蛋白质和异常蛋白聚集物, 损伤或多余细胞器如线粒体、粗面内质网和微体、病毒和细菌等^[8]。除严重饥饿和组织缺血外, 自噬体内的线粒体常呈变性状态如膜不完整和嵴断裂。有时自噬前体可包裹自噬体, 形成多层膜结构, 即复合自噬体(multiple autophagosome)^[7]。自噬溶酶体(autophagolysosome或autolysosome)内可见含单层膜包被的自噬体^[7,9]。值得注意的是, 在晚期自噬溶酶体内自噬体膜被降解, 不易将

收稿日期: 2011-01-26 接受日期: 2011-02-26

国家自然科学基金(No.30570948)和高等学校博士点专项科研基金(No.20030246036)资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 021-54237430, E-mail: hjwang@shmu.edu.cn

其与异噬溶酶体区别。哺乳类动物细胞的微自噬不如酵母菌和植物细胞显著。在微自噬早期可见溶酶体膜特征性凹陷^[7,9],但形成自噬体后易与巨自噬来源的自噬溶酶体混淆,尽管自噬体很小。有人将微自噬和巨自噬过程中溶酶体内的自噬体分别称为微自噬体(microautophagic body)和巨自噬体(macroautophagic body)^[10]。与巨自噬相比,细胞很少发生微自噬。人们常采用抑制巨自噬方法,诱发微自噬,从而研究细胞的微自噬活动。在三类自噬过程中,都可能出现残留体(residual body)。若进入溶酶体的内容物不能被降解则残留于溶酶体内,以残留体形式长期存留于细胞内或通过胞吐排出细胞。虽然在透射电镜下能够辨认残留体,但不能得知来自哪类自噬途径或是否来自异噬途径。

透射电镜技术常用于观察自噬结构。尽管可利用大量切片测量自噬结构断面积以比较细胞自噬程度,但评价自噬结构数目的可靠性欠佳。超薄切片上反映的细胞自噬水平和自噬结构分布较局限,不能从细胞整体上呈现自噬结构变化。另外,粗面内质网常围绕线粒体以有利于将钙离子输送入线粒体,或许将粗面内质网误认为自噬体的双层膜。肿胀线粒体和液泡也可造成自噬结构的错觉^[11],在个别切面上难以确认自噬结构^[10]。因此,在超薄切片上需仔细辨认自噬结构,并结合其他技术方法对细胞自噬作出综合评价。

1.2 冷冻蚀刻技术

在冷冻蚀刻标本上可观察到自噬体和两性体(amphisome)的膜立体结构特点,如跨膜蛋白质颗粒分布。两性体是指自噬体与异噬体融合形成的结构。Gordon等^[12]最早观察到两性体现象,即微注射的放射性乳糖和摄入细胞内的半乳糖苷酶进入同一膜包被结构中。Réz等^[13]利用冷冻蚀刻技术观察了自噬结构的构造。自噬体的跨膜蛋白质颗粒很少,为溶酶体膜1/100。异噬体膜的蛋白质颗粒丰富,而两性体膜的蛋白质颗粒比自噬体膜多,这是因为两性体膜是异噬体膜与自噬体外膜融合而成的缘故^[14]。Marzella等^[15]分离自噬结构成功,这为提高通过超薄切片和冷冻蚀刻观察自噬结构的针对性奠定了良好基础。采用非连续梯度密度离心法可分离出自噬体^[16]或两性体^[17],能够较客观地计数自噬结构。由于冷冻蚀刻技术主要显示膜结构,在细胞自噬研究中应用较局限。

1.3 免疫电镜技术

在普通超薄切片上,由于难以确认两性体含有的异噬途径来源的结构,故不能很好地将两性体与自噬溶酶体区别。因此,可通过免疫电镜技术利用细胞外源性胶体金颗粒标记异噬体和两性体内异噬内容物^[18]。另外,可标记位于自噬前体和自噬体外膜上的LC3。该方法可用于鉴别自噬前体、自噬体和自噬溶酶体。除分离和培养的细胞外,可用肝脏和肌组织的冰冻切片作免疫胶体金标记^[19]。因细胞内LC3蛋白较少,免疫胶体金标记程度并不很显著^[20]。标记时须用高质量的特异性抗体。虽然免疫电镜技术具有标记自噬结构的优点,但对于初学者在短时间内难以掌握标记技巧。

2 化学和免疫化学染色法

2.1 MDC染色

甲丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine, MDC)自发荧光,可标记培养细胞的自噬结构。MDC使用剂量一般为0.05 mmol/L或0.1 mmol/L,染色时间不宜超过1 h。洗液应为pH7.4,染色前不需要固定^[21]。有人提出,自噬体多呈中性。MDC是嗜酸性染色剂,可能显示晚期内吞体、两性体和溶酶体^[22-23],而自噬前体和有的自噬体可不被着色,故MDC染色的特异性不高。

2.2 LC3免疫染色

微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)是酵母Atg8的同源体,调控微管蛋白的组装和去组装,参与自噬体形成^[24]。LC3普遍分布于各种组织的细胞,主要在自噬体表达。由于可被酸性水解酶降解,LC3在两性体和自噬溶酶体存在较少。LC3容易结合蛋白质聚集物,从而造成假阳性结果,故在蛋白质聚集的细胞作染色时应正确分析实验结果。有时LC3阳性结构重叠,观察时易误认为体积较大的自噬结构。在此种情况下,可用共聚焦激光扫描显微镜逐层扫描及其建立三维图像,以便进一步确认。LC3染色法可弥补透射电镜观察法的弱点,能较准确地计数自噬结构数目。

2.3 LAMP-2A免疫染色

在分子伴侣介导的自噬,细胞内错误折叠蛋白质与分子伴侣hsc70(heat shock cognate protein of 70 kDa,热休克相关蛋白70)结合,然后再与受体溶酶体膜相关蛋白2A(lysosome-associated membrane protein type 2A, LAMP-2A)结合,蛋白质转运入溶酶体腔后被降解^[23]。

持续饥饿、氧化应激、对毒性物质反应等应激状态下, LAMP-2A表达显著升高, LAMP-2A与hsc70共存的溶酶体增多, 并趋向于细胞核周围分布, 可作LAMP-2A染色或与hsc70双染色^[24], 以分析分子伴侣介导的自噬水平。

2.4 Beclin免疫染色

Beclin表达增强可作为评价自噬水平升高的重要指标。Beclin-1是酵母Atg6的同源体^[25], 表达于反面高尔基网状结构, 与III型PI3K(class III phosphatidylinositol 3-kinase)和Atg14L结合形成复合体, 调控自噬前体产生和自噬体形成^[26]。

3 基因转染技术

在建立GFP-LC3转基因小鼠模型^[27]或体外培养GFP-LC3细胞基础上, 可有效地标记和观察GFP-LC3阳性自噬结构。GFP结合于LC3的N端。正常状态下GFP-LC3蛋白位于细胞质, 自噬激活后结合于自噬膜结构, 此时GFP即可显示自噬体等。在GFP-LC3转基因小鼠中, 能够观察到不同器官和组织的自噬程度。可利用GFP-LC3转染细胞观察活细胞的实时自噬活动变化。一般情况下, 转染的GFP-LC3不影响细胞内源性LC3的表达。应注意, 有时转染GFP-LC3可激活自噬。为了避免外源性基因影响细胞自噬, 常用稳定转染, 而不用瞬时转染。在共聚焦显微镜下观察时, 使用GFP或FITC滤片^[22]。转染和观察时应尽量降低图像背景, 并慎重分析和解释实验结果^[4]。GFP-LC3可与蛋白质聚合物结合, 实验中需仔细分析。在神经细胞和肌细胞等, 应注意排除自发光结构如脂褐素的干扰。由于GFP很容易在自噬溶酶体内被降解, 这不一定反映自噬溶酶体在自噬方面的降解水平。Kimura等^[28]根据RFP在溶酶体内耐受降解, 研究了RFP-LC3和GFP-LC3同时转染的效果。RFP-LC3和GFP-LC3在自噬前体和自噬体共表达, 呈黄色。自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体后, GFP信号消失, 但RFP信号仍存在, 故RFP-LC3(红色)作为自噬溶酶体标志。近来, 有人用RFP-LC3转染细胞^[29], 以有利于观察自噬溶酶体。

4 分子生物学技术

4.1 LC3

包括LC3-I和LC3-II两种存在形式。LC3-I是可溶性的, 存在于细胞质中。LC3在C端与Atg4结合形

成LC3-I。在自噬过程中, LC3-I与脑磷脂结合形成LC3-II即LC3酯化, 随后LC3-II组装入自噬前体膜。在自噬溶酶体内, 与溶酶体膜融合的自噬体外膜上的LC3-II在Atg4作用下与脑磷脂分离即去酯化, LC3循环入细胞质, 而自噬体内膜上的LC3-II被降解^[30]。因此, LC3-II在自噬前体和自噬体的内外膜特异表达^[24]。可采用免疫印迹和免疫沉淀法检测LC3-I和LC3-II的表达变化, 通过其表达特点评价细胞自噬活动。自噬水平升高时, LC3-I表达水平下降, 而LC3-II表达增强。LC3-II的表达与自噬结构形成成正比。LC3-II和LC3-I表达比值可作为细胞自噬实验的重要指标^[31]。但是, 如果自噬体的微管运输、与溶酶体融合迟缓或自噬溶酶体降解功能下降, 可致LC3-II表达水平显著升高, 故此种情况下LC3-II的表达不能真实反映自噬体形成程度。用Bafilomycin A1(抑制Na⁺H⁺泵)、羟氯喹(使溶酶体pH升高)或E64d和抑胃酶素A(蛋白酶抑制剂)抑制LC3-II在自噬溶酶体内降解后, 可确切比较分析LC3-II表达检测结果^[30,32], 从而判断自噬体在自噬溶酶体内降解是否正常。由于LC3-II是LC3和脑磷脂结合体, LC3-II提纯可能不佳, 因而影响LC3-II检测结果。尽管LC3-II分子量大于LC3-I, 由于LC3-II疏水性较强其电泳速度较快^[33]。LC3包括LC3A、LC3B和LC3C三个亚型, 但在自噬水平升高时仅LC3B在自噬结构表达^[34]。因此, 最好选用LC3B抗体检测LC3-I和LC3-II的表达变化。

4.2 自噬相关基因

在研究自噬机制和基因缺陷性疾病方面, 可采用PCR和免疫印迹技术检测自噬相关基因Atg或其蛋白的表达变化^[23,34]。迄今为止, 已在酵母等发现30多种Atg, 许多酵母Atg在哺乳类动物细胞高度保守。关于这些基因在哺乳类动物细胞的表达差异尚需深入研究。

5 自噬激活剂和抑制剂

人们通过促进或抑制细胞自噬, 研究细胞自噬的作用和分子机理^[34-35]。常用的激活剂和抑制剂如下。

5.1 雷帕霉素(rapamycin)

雷帕霉素可特异性阻断mTOR(mammalian target of rapamycin)对于Atg1的抑制作用, 在体外或体内实验都可有效地激活细胞自噬。近来发现, To-

rin1^[36]和PP242^[37]的mTOR抑制作用较强, 是理想的自噬诱导剂。有人建议将依赖性与非依赖性mTOR抑制剂结合使用, 以便较好地提高诱导自噬效率^[38]。细胞缺乏营养或动物饥饿是诱导自噬显著增强的理想实验条件, 可用于细胞自噬机制和不同形式自噬相互关系的研究。

5.2 3-MA

Seglen等^[39]提出3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)是特异性自噬抑制剂。3-MA的靶点为III型PI3K^[40], 抑制自噬体的形成。尽管3-MA是常用的自噬抑制剂, 但只有当浓度 ≥ 10 mmol/L时抑制效果较佳, 故特异性不是很高。需认识到3-MA可作用于其他激酶, 影响糖原代谢、溶酶体酸化、内吞、线粒体通透性改变和蛋白质水解等细胞功能^[38]。另外, 渥曼青霉素(wortmannin)和LY294002也是通过阻断III型PI3K抑制自噬^[41], 但这两种抑制剂可作用于I型PI3K, 故特异性较低。亮肽素(leupeptin)能够抑制自噬溶酶体内容物的降解。值得指出的是, 自噬基因敲除和RNA干扰也是研究细胞自噬功能机制的理想技术方法^[38]。

除上述各类方法外, 人们还利用酶化学法(如乳酸脱氢酶活性)、放射性标记(如^{[14]C}亮氨酸和^{[14]C}缬氨酸)、细胞器标记(如LysoTracker Green和MitoTracker Red)、细胞骨架标记(微管和微丝)和钙离子标记等研究细胞自噬活动及其机制。

6 小结

细胞自噬具有广泛的生物学意义, 涉及细胞生理病理变化和某些疾病的发生^[1,42]。掌握和正确应用检测自噬的各种技术方法, 对于深入探讨细胞自噬机制以及通过调节自噬达到预防和治疗相关疾病的目的有着重要价值。鉴于细胞自噬反映在亚细胞、蛋白质和基因等水平, 应综合使用理想实验技术方法, 正确评价实验结果和提高研究水平。不可否认目前使用的技术方法仍不能满足细胞自噬研究的需要, 致使某些实验研究工作受限制。因此, 有望随着新技术和新方法的不断发明促进细胞自噬研究更加深入和广泛。

参考文献(References)

1 Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, *et al.* Regulation of mammalian au-

tophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90: 1383-435.

2 Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 1962; 12: 198-202.

3 Glick D, Barth A, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J Pathology* 2010; 221(1): 3-12.

4 Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Alev G, Askew DS, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4(2): 151-75.

5 Deter RL, Baudhuin P, De Duve C. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol* 1967; 35(2): C11-6.

6 Ericsson JL. Studies on induced cellular autophagy. II. Characterization of the membranes bordering autophagosomes in parenchymal liver cells. *Exp Cell Res* 1969; 56(2): 393-405.

7 何 韬, 谭玉珍, 王海杰. 自噬在巨噬细胞清除凋亡淋巴细胞中的作用. *解剖学报* 2008; 39(4): 65-9.

8 Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagosomes: Biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(4): 415-22.

9 王海杰, 谭玉珍, 何 韬, 俞 彰. 巨噬细胞吞噬尘粒后的自噬变化. *中国病理生理杂志* 2008; 24(8): 1524-8.

10 Klionsky DJ. *Autophagy*. Texas: Landes Bioscience, 2003, 107-14.

11 Eskelinen EL. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy* 2008; 4(2): 257-60.

12 Gordon PB, Seglen PO. Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 151(1): 40-7.

13 Réz G, Meldolesi J. Freeze-fracture of drug-induced autophagocytosis in the mouse exocrine pancreas. *Lab Invest* 1980; 43(3): 269-77.

14 Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C, Seglen PO. Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol* 2000; 79(12): 871-82.

15 Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H. Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: Morphological and biochemical characterization. *J Cell Biol* 1982; 93(1): 144-54.

16 Strømhaug PE, Berg TO, Fengsrud M, Seglen PO. Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem J* 1998; 335 (2): 217-24.

17 Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. Isolation and characterization of rat liver amphisomes: Evidence fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* 1998; 273(34): 21883-92.

18 Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* 1997; 136(1): 61-70.

19 Eskelinen EL. Fine structure of the autophagosome. *Methods*

- Mol Biol 2008; 445: 11-28.
- 20 Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 2004; 117(20): 4837-48.
- 21 Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 1995; 66(1): 3-14.
- 22 Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2491-502.
- 23 Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 2007; 3(3): 181-206.
- 24 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19(21): 5720-8.
- 23 Cuervo AM, Dice JF. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med* 1998; 76(1): 6-12.
- 24 Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol Biol* 2008; 445: 227-44.
- 25 Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402(6762): 672-6.
- 26 Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; 2(4): 330-5.
- 27 Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004; 15(3): 1101-11.
- 28 Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 2007; 3(5): 452-60.
- 29 Perry CN, Kyo S, Hariharan N, Takagi H, Sadoshima J, Gottlieb RA. Novel methods for measuring cardiac autophagy *in vivo*. *Methods Enzymol* 2009; 453: 325-42.
- 30 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol* 2008; 445: 77-88.
- 31 Karim MR, Kanazawa T, Daigaku Y, Fujimura S, Miotto G, Kadowaki M. Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4-II-E cells. *Autophagy* 2007; 3(6): 553-60.
- 32 Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, *et al.* In search of an "autophagometer". *Autophagy* 2009; 5(5): 585-9.
- 33 Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3(6): 542-5.
- 34 Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: Assays and artifacts. *J Pathol* 2010; 221(2): 117-24.
- 35 Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, *et al.* Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol* 2008; 445: 29-76.
- 36 Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, *et al.* An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 2009; 284(12): 8023-32.
- 37 Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, *et al.* Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 2009; 7(2): e38.
- 38 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140(3): 313-26.
- 39 Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(6): 1889-92.
- 40 Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 2000; 275(2): 992-8.
- 41 Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997; 243(1-2): 240-6.
- 42 Kundu M, Thompson CB. Autophagy: Basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 427-55.

Progress and Application of Techniques for Investigating Cell Autophagy

Wang Haijie*, Tan Yuzhen

(*Department of Anatomy, Histology and Embryology, Shanghai Medical School of Fudan University, Shanghai 200032, China*)

Abstract In physiological state, cells remove senescent organelles and abnormal long-lived proteins via autophagy to maintain homeostasis of their structures and functions. Autophagy is involved in embryonic development, immunological regulation and longevity. Significant increase of autophagic level is beneficial for cells to tolerate starvation, ischemia and apoptosis under pathological conditions. Autophagic dysfunction is implicated in some chronic infectious diseases, neurodegenerative diseases, lysosomal storage diseases and tumors. It is important to understand and apply reasonably the techniques monitoring autophagy for promoting investigation of cell autophagy. This review focuses on the techniques monitoring autophagy and their application in investigating autophagy.

Key words autophagy; macroautophagy; microautophagy; chaperone-mediated autophagy

Received: January 26, 2011 Accepted: February 26, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570948) and Scientific Research Foundation of State Education Commission (No.20030246036)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-54237430, E-mail: hjwang@shmu.edu.cn