

教学研究

细胞自噬的诱导及检测技术在细胞生物学 实验教学中的应用实例

翟欢欢 薛秀花 张 伟*

(北京师范大学生命科学院, 北京 100875)

摘要 细胞自噬是一种在进化上高度保守的溶酶体吞噬降解自身成分的胞内代谢途径。它与多种生理功能有关,如在饥饿、刺激等不利环境条件下,细胞通过自噬降解多余或异常的大分子,为细胞的生存提供能量及原材料,促进生物体的生长发育、细胞分化及对环境变化产生应答。但是,过度的自噬可以导致细胞死亡,因此自噬又被称为II型程序性细胞死亡,这是除凋亡和坏死之外的一种新的细胞死亡方式。另外,自噬异常与多种病理过程如肿瘤、神经退行性病变、病原体感染等密切相关。由于细胞自噬在生理和病理过程中都发挥着重要作用,因此,自噬成为细胞生物学领域的一个新的研究热点。以细胞自噬为研究内容,设计了适合在本科生课程中开设的细胞自噬的诱导及观察实验项目,对该实验项目的实验原理、实验设计与安排等进行了详细的介绍,为该项目在实验课程中的推广提供了有益的参考。

关键词 细胞自噬; 饥饿诱导; 细胞生物学实验教学

1 引言

随着细胞生物学的迅速发展,涌现出了一些新的研究领域和研究热点。细胞自噬即是在这种科学发展背景下诞生出的一个全新的研究领域^[1]。细胞自噬(autophagy)最早是由Ashford和Porten^[2]于1962年用电子显微镜在人的肝细胞中观察到的,是细胞内初级溶酶体降解内源性底物的生理过程。近年来,随着对自噬研究的不断深入,发现细胞自噬不仅可以清除细胞废物、重建结构,从而影响细胞的生长发育,还与多种肿瘤的发生发展以及神经退行性疾病有关^[1,3]。另外,自噬涉及的分子机制错综复杂^[4,5-6],相关的研究方法与技术手段较多^[7],为了让更多的本科生了解该领域的基本研究方法,我们设计了细胞自噬的诱导与观察实验项目。一方面,该研究项目可推动细胞生物学实验教学内容的更新;另一方面,通过本实验项目的学习有助于培养学生的综合科研能力,为细胞生物学研究型人才的培养提供新的科研训练内容。

2 实验原理

细胞自噬是细胞自身组分的降解和重利用过程,参与细胞器的循环和能量的管理过程。根据底物进入

溶酶体途径的不同,哺乳动物细胞的自噬作用可分为三种方式:巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)^[3]。巨自噬即通常所说的细胞自噬,是由细胞双层膜结构非选择性地包裹胞质及胞器^[3,7];微自噬是直接由溶酶体膜内陷形成自噬小体膜将底物包裹并降解的过程;分子伴侣介导的自噬是特殊蛋白质与分子伴侣结合后,转运到溶酶体被降解。当细胞受饥饿等刺激时,细胞内质网膜内陷包裹细胞质和胞器形成自噬小体,然后与溶酶体结合成熟为自噬溶酶体,利用溶酶体酶降解包裹物。

LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3)是哺乳动物中酵母Atg8的同源物,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬的形成^[8]。LC3分为三种形式:LC3前体、LC3-I型和LC3-II型。在哺乳动物细胞中,LC3的形成及成熟过程与ATG蛋白的类泛素化过程有关。LC3经翻译后修饰形成LC3前体,再

收稿日期: 2011-09-28 接受日期: 2011-11-18

国家自然科学基金(No.30300173)和北京市优秀人才计划(No.2007 D0503100293)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-58809699, E-mail: zhangwei@bnu.edu.cn

在哺乳动物Atg4的催化下, C端剪切形成含有一个甘氨酸残基的LC3-I型, 定位于细胞溶质中。当细胞受体外环境如饥饿或体内信号分子调控如mTOR等条件刺激时, Atg12经Atg7等泛素化激活后, 将LC3-I型转移到Atg3上, Atg3作为泛素连接酶将LC3-I与PE结合, C端酯化形成LC3-II型, 与自噬体膜紧密结合, 促进自噬小体的形成^[9]。研究表明, GFP-LC3过表达并不影响细胞的自噬活性, 而且LC3的数量直接反应自噬小体的数量。因此, LC3可以作为细胞自噬过程中的分子标记物^[10]。通过构建LC3与绿色荧光蛋白(GFP)或其衍生物的融合蛋白, 借助于荧光显微镜, 即可观察到LC3在细胞中的定位。自噬体的形状取决于细胞的类型, 有些细胞中自噬体的直径较大, GFP-LC3荧光信号呈环状或半月形, 在有些细胞中自噬体相对较小, GFP-LC3荧光信号呈点状。在本实验中, 将LC3基因与GFP基因融合, 使之在乳腺癌细胞中表达。在自噬发生前, LC3弥散在细胞质中, 在荧光显微镜下呈绿色背景; 当自噬发生时, LC3聚集在自噬小体膜上, 在荧光显微镜下呈绿色小点。需要指出的是, 与自噬体相比, 自噬溶酶体表面的LC3相对较少, 此处的GFP-LC3荧光信号也会减少或消失。

细胞自噬具有多种生理和病理功能, 例如饥饿适应性、清除胞内蛋白和细胞器、促进发育、抗衰老、抑制或促进细胞死亡、抗癌和抗原表达。但是, 自噬的功能是十分复杂的, 很难简单地说明自噬在生理和病理过程中所起的作用^[11]。一方面, 细胞自噬是营养缺陷下的适应机制, 当细胞营养不足时, 细胞可以通过自噬将多余的细胞器和细胞质降解^[12], 形成的小分子重新用于物质循环, 以保证细胞的基本生存, 同时降解过程中释放的能量可以被重新用于细胞中的合成反应, 以便能量循环^[13]。因此, 自噬在生物体生长发育、细胞分化及对环境的应答方面极为关键; 另一方面, 自噬在神经退化性疾病及肿瘤发生过程中也发挥了重要作用。当敲除了神经组织特异性的自噬基因之后, 神经退化性疾病产生, 如在阿尔茨海默症、亨廷顿舞蹈症和帕金森症等神经退化性疾病中, 都发现了大量自噬泡的积累。而且, 在人类乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌中, 一种或多种自噬基因发生了单缺失或双缺失。如在鼠*Beclin1*^{-/-}模型中, 发生了自发性的恶性肿瘤^[14]。在本实验中, 主要探索了饥饿对自噬产生的影响, 为本科生了解自噬的检测方法及发生机理提供了新的模式。

3 教学设计与安排

3.1 教学目的

- (1)了解细胞自噬的基本过程;
- (2)掌握基因转染技术;
- (3)学习细胞自噬的诱导及检测方法;
- (4)巩固荧光显微镜的使用方法;
- (5)了解GFP在科研中的应用。

3.2 教学重点与难点

- (1)教学重点: 细胞自噬的检测方法;
- (2)教学难点: 细胞自噬过程的讲解、细胞培养、荧光显微镜观察。

3.3 实验材料与设备

(1)实验材料: GFP-LC3表达质粒(本校张俊杰实验室惠赠), MDA-MB-231细胞(来自ATCC, 属人类乳腺癌细胞系, 是贴壁生长的上皮细胞), Lipofectamine2000 DMEM培养基(Invitrogen公司), 胎牛血清(北京民海生物科技有限公司), EBSS溶液(Invitrogen公司; 其营养单一, 用于诱导细胞自噬), 0.25%胰酶(Amresco公司)。

(2)实验仪器: 超净工作台、CO₂培养箱(Thermo Fisher公司)、倒置荧光显微镜(Olympus LX51)、无菌离心管、无菌吸头、35 mm培养皿。

3.4 教学安排

(1)学时安排: 课上4学时, 分两次进行, 每次2学时; 课前准备2学时, 由助教或学生完成。

(2)课前准备: MDA-MB-231细胞的培养由实验教师提前两天准备, 供学生接种传代; GFP-LC3表达质粒的提取与纯化由助教准备GFP-LC3及空载体pEGFP-C1质粒, 并严格检测其纯度和浓度($D_{260}/D_{280}=1.7\sim 1.9$)。

(3)实验分组: 根据无菌室的具体条件进行分组, 建议2~4人为一小组; 根据协调分工、通力合作的基本要求为各小组制定实验任务, 包括细胞培养前期准备、实验结果观察、实验数据分析和实验报告撰写等。

3.5 实验步骤

(1)将MDA-MB-231细胞(约 4×10^5)接种于35 mm培养皿中, 采用不含抗生素的培养基, 37 °C、5% CO₂条件下培养至80%~90%丰度。

(2)按照如下条件准备A液和B液(每组4个平行样)

A液: 用250 μL无血清DMEM培养基加入4 μg GFP-LC3质粒(或4 μg GFP)。

B液: 用250 μL无血清DMEM培养基稀释10 μL Lipofectamine2000, 轻轻混匀并室温孵育5 min。

(3)将上述A液与B液轻轻混合,室温静置20 min。

(4)将混合液500 μ L加入步骤(1)准备好的细胞中,用无抗生素无血清的DMEM培养基补至终体积2 mL。轻轻混匀,4~6 h后更换含10%血清的DMEM培养基在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养条件下继续培养24~48 h。

(5)细胞的饥饿处理:以4 h的时间间隔将培养基换成EBSS,分别饥饿0, 4, 8, 12 h。

(6)在荧光显微镜下观察自噬现象。

3.6 实验中需要注意的问题

为保证该实验的正常进行,我们进行了多次重

复实验,将本实验在具体实践中的注意事项总结如下,教师要指导学生特别注意。

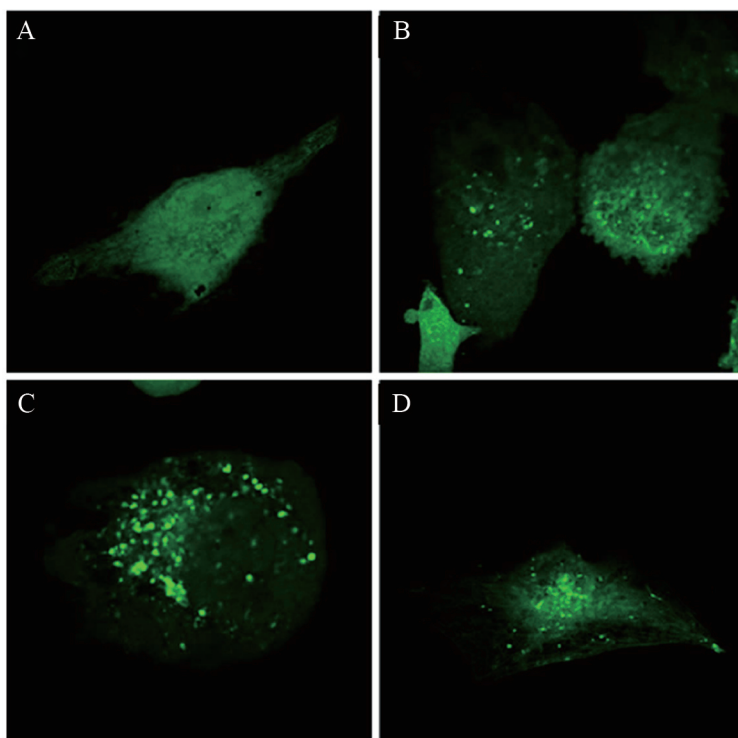
(1)接种细胞时,尽量保证每个平皿中接种细胞数量一致,在平皿内表面均匀分布。

(2)转染前细胞应处于指数生长期,且丰度高于80%。

(3)实验条件允许下应该每组设置4个平行样品组。

3.7 实验结果的观察细胞

经饥饿处理0, 4, 8, 12 h后利用倒置荧光显微镜在488 nm激发波长下进行观察,结果如图1所示。



稳定表达GFP-LC3的MDA-MB-231细胞经饥饿0小时(A)、4小时(B)、8小时(C)和12小时(D)后观察到的荧光图像。
Fluorescence of MDA-MB-231 cells stably expressing GFP-LC3 starved for 0 hour (A), 4 hours (B), 8 hours (C) and 12 hours (D).

图1 饥饿诱导的自噬

Fig.1 Autophagy induced by starvation

4 讨论

4.1 开设该实验项目的意义

细胞自噬是一种在进化上高度保守的溶酶体吞噬降解自身成分的胞内代谢途径,它参与了多种生理及病理过程。以在乳腺癌细胞中的研究为例,抑制乳腺癌的自噬作用则可增强细胞对酪氨酸激酶抑制因子的敏感性,靶向细胞自噬信号通路是乳腺癌治疗的新途径。本研究项目在基因转染技术条件的基础上开展,利用GFP-LC3为检测标记物,向同学们直观展示了饥饿对细胞的诱导作用,不仅使同学

们了解了细胞自噬的检测方法,同时也使同学们对细胞自噬现象具有了感性认识。

4.2 实验安排的可行性

本实验经过研究生课题组的反复验证,实验结果容易获得并且真实可靠。本实验涉及的实验技术有细胞培养、脂质体转染与荧光显微镜观察等细胞生物学的基本技能,很多高校已开展涉及上述相关技术的实验教学内容,具备了开设本实验的技术与设备条件。

本实验安排4课时,分两次完成,课前准备由助教来完成;课后观察实验结果可由学生在课余时间自行

安排。该课程也可作为综合性实验开展, 学生第1天接种MDA-MB-231细胞于培养皿中; 第2天转染GFP-LC3, 4~6 h后换液; 第3天每隔4 h饥饿细胞, 显微镜下观察。

4.3 本实验的推广与应用

(1)实验条件: 要求具备细胞培养的基本条件。

(2)教师的要求: 实验教师需要熟练掌握细胞培养的基本操作方法。

(3)可在已开设GFP报告基因转染技术相关实验的院校推广采用。

参考文献 (References)

- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42.
- Mathew R, Karantz-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(12): 961-7.
- Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(2): 124-31.
- Turcotte S, Giaccia AJ. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(2): 246-51.
- Corcelle EA, Puustinen P, Jäättelä Ja. Apoptosis and autophagy: Targeting autophagy signalling in cancer cells-“trick or treats”? *FEBS J* 2009; 276(21): 6084-96.
- Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: Their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12(Suppl 2): 1509-18.
- Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2491-502.
- Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290(5497): 1717-21.
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23(7): 798-803.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432(7020): 1032-6.
- Noboru M. Physiological functions of Autophagy. *Autopha Infec Immun* 2009; 335: 71-84.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; 120(2): 237-48.
- Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(2): 206-11.
- Noboru M. Autophagy: Process and function. *Genes Dev* 2007; 21(22): 2861-73.

The Application Example of Autophagy Induction and Testing Technology in Course of Cell Biology Experiment

Zhai Huanhuan, Xue Xiuhua, Zhang Wei*

(College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Cell autophagy is a highly conservative intracellular process, which degrades its own composition with lysosome. It relates to many physiological functions. It degrades excess or abnormal macromolecular during starvation, stimulation or something unfit for survival, in order to provide energy and raw materials for cells survival, promote the growth and development of the organism and cell differentiation, and respond to the environment changes. However, excessive autophagy can cause cell death, so autophagy is also known as type II programmed cell death, which is a new way to cause cell death besides apoptosis and necrosis. In addition, abnormal autophagy relates to a variety of pathological process such as cancer, neural degenerative diseases and pathogen infection, etc. Autophagy plays an important role in physiological and pathological process, so it becomes a new hotspot in the research of cell biology. In this paper, with autophagy as the research subject, we design the experiment about autophagy induction and observation suitable for undergraduate students. This paper introduces the experiment principle, the experiment design and arrangement in details, which provides valuable references for the popularization of this technology in experiment course.

Key words autophagy; starvation induction; cell biology experiment

Received: September 28, 2011 Accepted: November 18, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30300173) and the Beijing Talents Foundation (No.2007D0503100293)

*Corresponding author. Tel: 86-10-58809699, E-mail: zhangwei@bnu.edu.cn