

分枝菌酸诱导巨噬细胞泡沫细胞化对细胞自噬的影响

李黎 陈全* 喻岚 刘革力 张路渝

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 基础医学院免疫学教研室, 重庆 400016)

摘要 研究分枝菌酸(mycolic acid, MA)诱导的巨噬细胞泡沫细胞化对巨噬细胞自噬的影响, 探讨MA促巨噬细胞泡沫细胞化的机制。构建LC3真核表达质粒(pEGFP-LC3B), 转染RAW264.7细胞后获得其稳定转染细胞株(RAW264.7/pEGFP-LC3B); 用MA诱导RAW264.7/pEGFP-LC3B获得RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞。实验分为三组: RAW264.7细胞组、RAW264.7/pEGFP-LC3B细胞组及MA诱导的RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞组。通过RT-PCR法检测各组细胞中自噬相关基因*Becn1*、*LC3B*的转录水平, Western blot法检测各组细胞自噬标志蛋白LC3B II/I的表达水平。RT-PCR检测结果显示, RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞组的*Becn1*基因及*LC3B*基因的转录水平明显较其他两组低($P < 0.05$)。Western blot检测结果显示, RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞组LC3B II/I比值明显较其他两组低($P < 0.05$)。由此可见, 当巨噬细胞被MA诱导成为泡沫巨噬细胞后, 其自噬功能显著降低。该研究证明, MA可能通过抑制巨噬细胞自噬, 引起脂代谢失衡, 进而发生巨噬细胞泡沫细胞化。

关键词 结核分枝杆菌; 分枝菌酸; 巨噬细胞; 泡沫细胞; 自噬

Effects of Foam Cell Formation Induced by Mycolic Acid on the Autophagy of Macrophages

Li Li, Chen Quan*, Yu Lan, Liu Geli, Zhang Luyu

(Molecular Medicine and Cancer Research Centre, Department of Immunology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This paper was to study the effect of foam cell formation induced by mycolic acid (MA) on the autophagy of RAW264.7 macrophages, and explore the mechanisms of MA promoting foam cell formation of macrophage. The pEGFP-LC3B plasmid encoding LC3 was constructed, then transfected into RAW264.7 cell in order to obtain the stable transfected cell line (RAW264.7/pEGFP-LC3B). The foam cell was prepared by MA inducing RAW264.7/pEGFP-LC3B. There were 3 groups in the experiment: RAW264.7 cell group, RAW264.7/pEGFP-LC3B group and RAW264.7/pEGFP-LC3B foam cell group. RT-PCR was performed to detect the gene transcription level of *Becn1* and *LC3B*, and the expression level of autophagy marker protein LC3B II/I of each group was assessed by Western blot. The RT-PCR results showed that the gene transcription levels of *Becn1* and *LC3B* in RAW264.7/pEGFP-LC3B foam cell group were lower than those of the other two groups ($P < 0.05$), and the Western blot results showed that the ratio of LC3B II/I in RAW264.7/pEGFP-LC3B foam cell group was lower than those of the other two groups ($P < 0.05$). Therefore, when the macrophages were induced into foam cells by

收稿日期: 2015-01-22 接受日期: 2015-03-16

重庆市科委自然科学基金(批准号: cstc2012jjA10033)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485248, E-mail: quanchen@tom.com

Received: January 22, 2015 Accepted: March 16, 2015

This work was supported by Natural Science Foundation of Chongqing Science & Technology Commission (Grant No.cstc2012jjA10033)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485248, E-mail: quanchen@tom.com

网络出版时间: 2015-06-01 14:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1445.004.html>

MA, their autophagy level was significantly reduced. This study suggests that MA promotes foam cell formation of macrophages by inhibiting autophagy to unbalance cell's lipid metabolism.

Keywords *Mycobacterium tuberculosis*; mycolic acid; macrophage; foam cells; autophagy

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)所致结核病是严重危害人类健康的重要传染病^[1]。MTB属胞内寄生菌,感染巨噬细胞后,可逐渐导致巨噬细胞泡沫细胞化,泡沫细胞不但参与结核肉芽肿病变的形成,并且与MTB的潜伏与持留有关^[2]。分枝菌酸(mycolic acid, MA)是组成MTB胞壁的主要脂质之一,是一种长链脂肪酸,参与了泡沫巨噬细胞的形成,但其具体机制不明^[3]。Inami等^[4]研究表明,发生脂质沉积或长期高脂饲养肥胖大鼠的肝细胞,其自噬功能降低。我们推测,当巨噬细胞被MA诱导成泡沫巨噬细胞后,其自噬功能也可能被抑制。为了探讨MA促巨噬细胞泡沫细胞化的机制,本研究在前期所建的MA诱导的泡沫细胞模型的基础上^[5],通过检测MA所致泡沫细胞中自噬相关基因*Becn1*、*LC3B*的转录水平和自噬标志蛋白LC3B的表达水平,以期探明MA诱导巨噬细胞泡沫细胞化对细胞自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7、pEGFP-C1质粒、*Escherichia coli* Top10大肠杆菌由本室保存。DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶和Trizol购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;BCG分枝菌酸(MA,规格5 mg)和聚苯乙烯微球(Polystyrene Latex Beads,直径为0.8 μm,置于贮存液中)、兔抗小鼠LC3B抗体、兔抗小鼠β-actin抗体为Sigma-Aldrich产品。蛋白质marker、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、ECL增强化学发光试剂盒、PVDF膜购自碧云天生物技术研究;RNA逆转录试剂盒、Taqmix DNA聚合酶、DNA marker及琼脂糖为TaKaRa产品;PCR及RT-PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成。

小鼠*LC3B*基因(378 bp) PCR引物序列: LC3B1: 5'-GCC TCG AGC TAT GCC GTC CGA GAA GAC C-3'; LC3B2: 5'-GCG GAT CCT TAC ACA GCC ATT GCT GT-3'。

*Becn1*基因(480 bp) PCR引物序列: *Becn1*: 5'-ATG GAG GGG TCT AAG GCG TCC A-3'; *Becn2*:

5'-GTA GTT CTG ACA TTC ATT CTC A-3'。

内参*GAPDH*(270 bp) PCR基因引物序列: GAPDH1: 5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G-3'; GAPDH2: 5'-AGC ACC GGC CTC ACC CCA TTT G-3'。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pEGFP-LC3B的构建 培养 RAW264.7细胞至对数生长期,裂解后用组织/细胞总RNA抽提试剂盒提取总RNA, -80 °C保存。以LC3B1和LC3B2为引物,通过RT-PCR法扩增并回收378 bp基因片段。其中,逆转录条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s; PCR条件为: 95 °C预变性3 min; 94 °C变性1 min, 60 °C退火1 min, 72 °C延伸45 s, 共循环30次; 72 °C继续延伸15 min。用*Xho* I和*Bam*HI I酶切*LC3B*基因片段和pEGFP-C1质粒,纯化回收目的基因片段和载体大片段,用DNA连接酶于16 °C下连接4 h,转化至感受态TOP10大肠杆菌,卡那霉素抗性筛选并挑取阳性克隆,经酶切鉴定及测序鉴定后,阳性克隆质粒命名为pEGFP-LC3B。

1.2.2 RAW264.7/pEGFP-LC3B细胞系的建立 培养RAW264.7细胞至对数生长期,将pEGFP-LC3B质粒用Lipofectamine™ 2000转染RAW264.7细胞,转染后4~6 h更换含血清的新鲜完全培养基,24 h后置于倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况。转染后24 h将细胞以≥1:6的比例传代,待细胞贴壁后用800 μg/mL G418加压筛选培养4W,筛选出表达绿色荧光的RAW264.7/pEGFP-LC3B稳定转染细胞株。

1.2.3 RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞的制备 按前期所建的泡沫细胞制备方法^[5],以75 μg/mL MA包被的聚苯乙烯微球为吞噬颗粒,诱导RAW264.7/pEGFP-LC3B细胞泡沫细胞化,5 d后获得RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞。细胞经油红O染色,显微镜下观察泡沫细胞形态。

1.2.4 细胞分组 将细胞分为三组: RAW264.7细胞组、RAW264.7/pEGFP-LC3B细胞组及MA诱导的RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞组。

1.2.5 RT-PCR法检测自噬相关基因*Becn1*、*LC3B*的转录水平 分别提取各组细胞的总RNA,用逆转录

试剂盒将所提取的RNA逆转录为cDNA。分别以上述各组cDNA为模板, *Becn1*和*Becn2*为引物, 用RT-PCR法分析各组细胞*Becn1*基因的转录水平。PCR条件是: 95 °C预变性3 min; 94 °C变性1 min, 60 °C退火70 s, 72 °C延伸45 s, 循环30次; 72 °C继续延伸15 min。以*LC3B1*和*LC3B2*为引物, 用RT-PCR法分析各组细胞*LC3B*基因的转录水平, PCR条件是: 95 °C预变性3 min; 94 °C变性1 min, 60 °C退火1 min, 72 °C延伸45 s, 循环30次; 72 °C继续延伸15 min。

1.2.6 Western blot法检测自噬标志蛋白LC3B II/I的比值变化 分别取上述各组对数生长期细胞, PBS洗涤3次, 提取总蛋白, 经SDS-PAGE电泳分离后, 200 mA转膜至PVDF膜上。室温下, 50 g/L脱脂奶粉封闭膜2 h, 用兔抗小鼠LC3B抗体(1:1 000) 4 °C孵育过夜, 洗涤后换HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h。TBST洗涤后, 采用化学发光试剂盒在凝胶成像系统上成像显影, 使用Quantity One软件分析条带灰度值。

1.2.7 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组pEGFP-LC3B质粒的鉴定

重组质粒pEGFP-LC3B经*Xho*I和*Bam*H I双酶切后, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可在约4 700 bp及378 bp处各见一条条带, 与预期相符(图1)。利用pEGFP-C1载体通用测序引物对重组质粒pEGFP-LC3B中的*LC3B*目的基因进行DNA序列分析。测序结果表明, 重组质粒pEGFP-LC3B中的*LC3B*基因序列与GenBank(NM_026160.4)上所登录的序列完全一致, 提示pEGFP-LC3B质粒构建成功。

2.2 荧光显微镜下观察RAW264.7/pEGFP-LC3B稳定转染细胞株

将pEGFP-LC3B质粒转染RAW264.7细胞, 经G418压力筛选后, RAW264.7/pEGFP-LC3B细胞均带绿色荧光, 提示稳定转染细胞株构建成功(图2)。

2.3 RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞的油红O染色

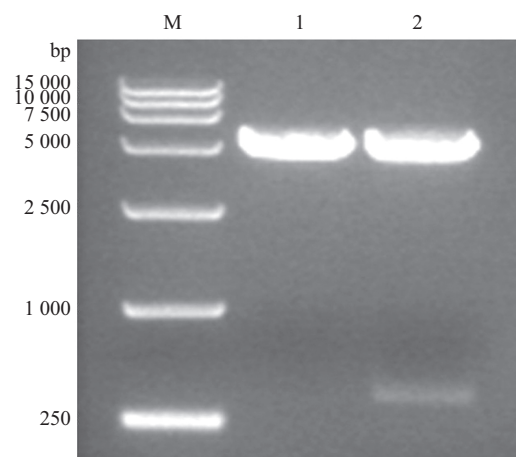
将上述细胞经75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的MA诱导5 d, 油红O染色后可看到细胞未破裂、脂滴无外溢, 呈现完整的泡沫细胞形态(图3), 说明RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞制备成功。

2.4 RT-PCR法检测自噬相关基因*Becn1*的转录水平

各组细胞的RT-PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后, 均可见480 bp大小的*Becn1*基因和270 bp大小的内参*GAPDH*基因。其中, RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞组*Becn1*基因的相对转录水平为 0.48 ± 0.03 , 与RAW264.7空白细胞组(0.83 ± 0.05)和RAW264.7/pEGFP-LC3B非泡沫细胞组(0.88 ± 0.05)比较, 其转录水平明显减弱, 差异具有显著性($P < 0.05$); 同时, RAW264.7/pEGFP-LC3B非泡沫细胞组与RAW264.7空白细胞组相比, 差异无显著性($P > 0.05$)。结果表明, 巨噬细胞被MA诱导成泡沫巨噬细胞后, 其*Becn1*基因的转录水平显著降低(图4)。

2.5 RT-PCR法检测自噬相关基因*LC3B*的转录水平

三组细胞的RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳后, 均可见378 bp大小的*LC3B*基因和270 bp大小的内参*GAPDH*基因。其中, RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞组*LC3B*基因的相对转录水平为 0.54 ± 0.03 , 与RAW264.7空白细胞组(0.71 ± 0.04)和RAW264.7/pEGFP-LC3B非泡沫细胞组(0.82 ± 0.06)比较, 其*LC3B*基因的转录水平明显减弱, 差异具有显著性($P < 0.05$); 同时, RAW264.7/pEGFP-LC3B非泡沫细胞组与RAW264.7空白细胞组相比, 由于其转入了外源性*LC3B*基因, 故其*LC3B*基因的转录水平



M: DNA分子量标准; 1: *Xho*I和*Bam*H I双酶切pEGFP-C1空质粒; 2: *Xho*I和*Bam*H I双酶切pEGFP-LC3B重组质粒。

M: DNA marker; 1: pEGFP-C1 digested with *Xho*I and *Bam*H I; 2: pEGFP-LC3B digested with *Xho*I and *Bam*H I.

图1 重组质粒pEGFP-LC3B的双酶切鉴定

Fig.1 Restrictive enzyme digestion analysis of pEGFP-LC3B plasmid

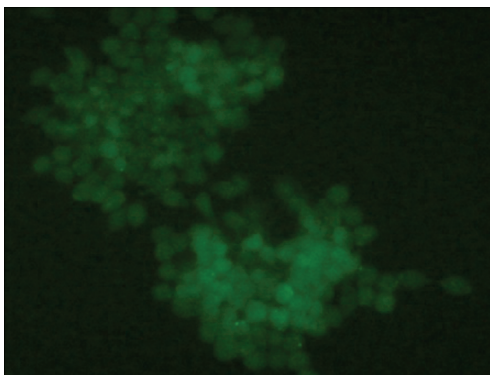


图2 pEGFP-LC3B质粒稳定转染RAW264.7细胞的荧光显微镜观察(200×)

Fig.2 RAW264.7 cell line stably transfected with pEGFP-LC3B (200×)

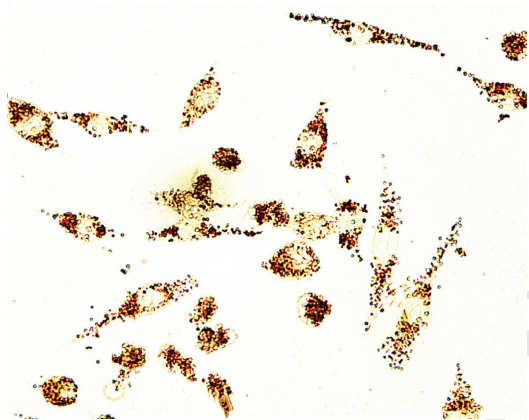
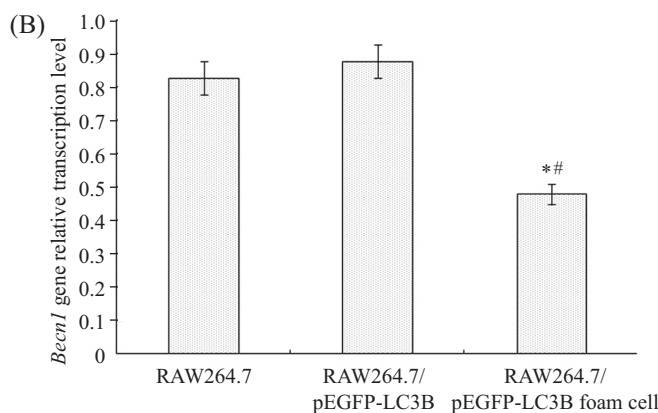
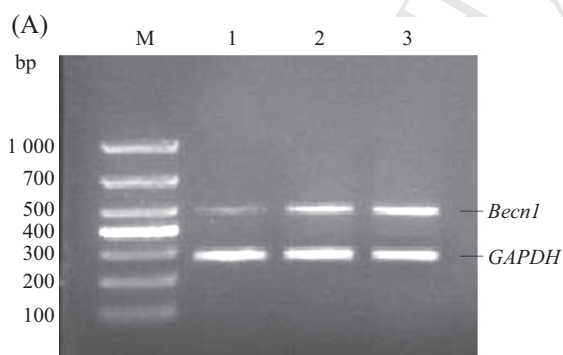


图3 MA诱导的RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞经油红O染色后的形态(200×)

Fig.3 The morphology of RAW264.7/pEGFP-LC3B foam cell induced by MA after oil red O staining (200×)



A: RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图; B: *Becn1*基因与内参基因条带灰度比值柱状图。M: DNA分子量标准; 1: RAW264.7/PEGFP-LC3B泡沫细胞组; 2: RAW264.7空白细胞组; 3: RAW264.7/PEGFP-LC3B非泡沫细胞组。* $P < 0.05$, 与RAW264.7空白细胞组比较; # $P < 0.05$, 与RAW264.7/PEGFP-LC3B非泡沫细胞组比较。

A: agarose gel electrophoresis of RT-PCR products; B: histogram of gray level ratio of *Becn1* gene and reference gene band. M: DNA marker; 1: RAW264.7/PEGFP-LC3B foam cell group; 2: RAW264.7 group; 3: RAW264.7/PEGFP-LC3B group. * $P < 0.05$ vs RAW264.7 group; # $P < 0.05$ vs RAW264.7/PEGFP-LC3B group.

图4 RT-PCR法检测*Becn1*基因的转录水平

Fig.4 Detection of transcription level of *Becn1* gene by RT-PCR

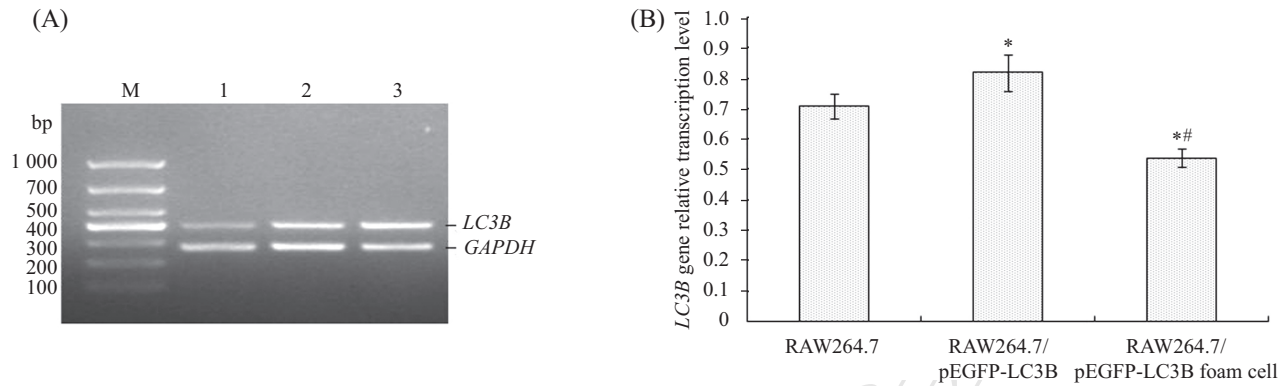
明显高于RAW264.7空白细胞组, 差异具有显著性($P < 0.05$)。结果表明, 巨噬细胞被MA诱导成泡沫细胞后, 其*LC3B*基因的转录水平显著降低(图5)。

2.6 Western blot法检测LC3B II/I相对比值

Western blot结果显示, RAW264.7/pEGFP-LC3B泡沫细胞组自噬标志蛋白LC3B II/I比值为 0.57 ± 0.03 , 与RAW264.7空白细胞组(0.86 ± 0.04)和RAW264.7/pEGFP-LC3B非泡沫细胞组(0.88 ± 0.04)比较, 其LC3B II/I的比值明显降低, 差异具有显著性($P < 0.05$) (图6)。结果表明, 巨噬细胞被MA诱导成泡沫细胞后, 其自噬功能明显下降。

3 讨论

MTB感染巨噬细胞后, 可诱导被感染巨噬细胞发生泡沫细胞化, 进而形成泡沫巨噬细胞。一旦巨噬细胞成为泡沫巨噬细胞, 其对IFN- γ ((interferon- γ))的反应性下降, 抗原提呈能力也降低, 泡沫巨噬细胞便成了MTB的“避难所”, 这是MTB潜伏的一个重要因素^[6]。分枝菌酸(MA)是MTB菌体的主要成分和致病因素之一, MA参与了泡沫巨噬细胞的形成, 但其具体机制不明^[3,7]。自噬是在真核生物中广泛存在的, 依赖自身溶酶体来降解、清除及回收再利用胞内大分子和受损细胞器的病理生理过程^[8]。已有研究表明, MTB感染可抑制巨噬细胞的自噬功能^[9], 而自噬功能在清除脂质在细胞内的聚集、维持细胞的脂代谢平衡中发挥了重要作用^[10]。鉴于上述报道, 我们

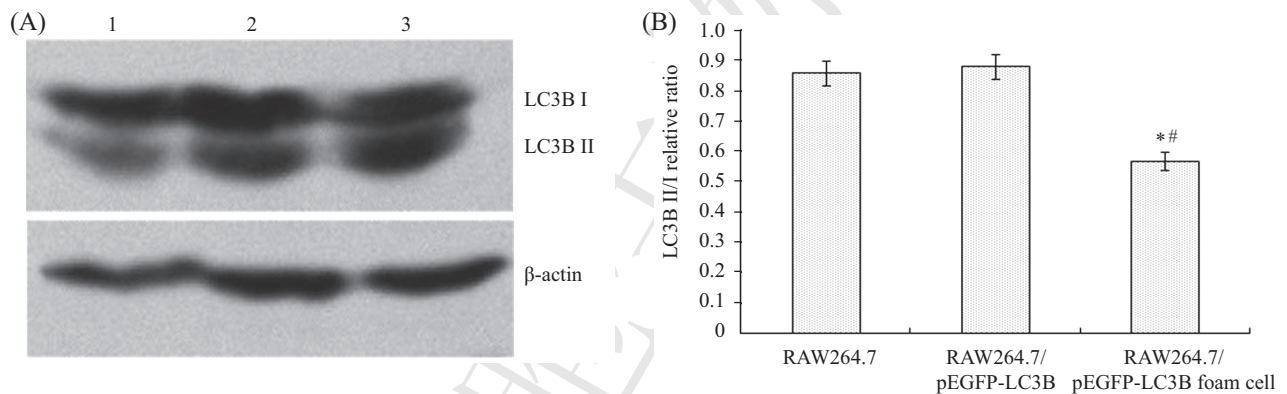


A: RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图; B: *LC3B*基因与内参基因条带灰度比值柱状图。M: DNA分子量标准; 1: RAW264.7/PEGFP-LC3B泡沫细胞组; 2: RAW264.7空白细胞组; 3: RAW264.7/PEGFP-LC3B非泡沫细胞组。* $P < 0.05$, 与RAW264.7空白细胞组比较; # $P < 0.05$, 与RAW264.7/PEGFP-LC3B非泡沫细胞组比较。

A: agarose gel electrophoresis of RT-PCR products; B: histogram of gray level ratio of *LC3B* gene and reference gene band. M: DNA marker; 1: RAW264.7/PEGFP-LC3B foam cell group; 2: RAW264.7 group; 3: RAW264.7/PEGFP-LC3B group. * $P < 0.05$ vs RAW264.7 group; # $P < 0.05$ vs RAW264.7/PEGFP-LC3B group.

图5 RT-PCR法检测*LC3B*基因的转录水平

Fig.5 Detection of transcription level of *LC3B* gene by RT-PCR



A: Western blot结果图; B: LC3B II/I相对比值柱状图(LC3B II和LC3B I条带灰度值分别与相应内参条带灰度值相比,即为LC3B II和LC3B I各自相对表达值,该两值再相比,即为LC3B II/I相对比值)。1: RAW264.7/PEGFP-LC3B泡沫细胞组; 2: RAW264.7空白细胞组; 3: RAW264.7/PEGFP-LC3B非泡沫细胞组。* $P < 0.05$, 与RAW264.7细胞比较; # $P < 0.05$, 与RAW264.7/PEGFP-LC3B细胞比较。

A: Western blot results; B: histogram of LC3B II/I relative ratio (the ratio of band gray level of LC3B II/ β -actin and LC3B I/ β -actin was the LC3B II/I relative ratio). 1: RAW264.7/PEGFP-LC3B foam cell group; 2: RAW264.7 group; 3: RAW264.7/PEGFP-LC3B group. * $P < 0.05$ vs RAW264.7 group; # $P < 0.05$ vs RAW264.7/PEGFP-LC3B group.

图6 Western blot检测LC3B II和LC3B I蛋白的表达

Fig.6 Western blot analysis of LC3B II and LC3B I protein

推测: 在MA促泡沫细胞化过程中, 巨噬细胞的自噬功能可能被抑制, 导致细胞脂代谢失衡, 进而发生巨噬细胞泡沫细胞化。

在细胞自噬形成过程中, LC3B前体经过加工成为胞质可溶性LC3B I, 再经泛素样加工修饰过程成为LC3B II, 与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)结合, 定位于自噬体膜的内外表面, 故LC3B II/I的比值间接反映了自噬体的含量, 是目前广泛用来检测自噬体的分子标记^[11-12]。为了有效、直观地研究自噬效应及其机制, 本研究

以真核表达质粒pEGFP-C1为载体, 将*LC3B*基因克隆至pEGFP-C1质粒的增强荧光基团EGFP的下游, 构建了pEGFP-LC3B重组质粒, 并将其稳定转染至鼠系巨噬细胞株RAW264.7细胞。由于本研究未对重组细胞进行自噬增强效应的研究, 故没有观察到重组细胞因自噬体形成而出现的荧光斑点。

RAW264.7细胞性质稳定、贴壁易养, 通常用于泡沫细胞的相关研究。前期实验已表明, 当包被聚苯乙烯微球的分枝菌酸浓度达到75 $\mu\text{g/mL}$ 、诱导5 d时, 细胞内总胆固醇和游离胆固醇的值最高, 且

细胞未破裂、脂滴无外溢, 呈现完整的泡沫细胞形态^[5]。故本研究以75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MA包被直径为0.8 μm 的聚苯乙烯微球为巨噬细胞吞噬颗粒, 以诱导巨噬细胞形成泡沫巨噬细胞。

本研究检测了各组细胞的自噬相关基因 *Becn1*、*LC3B*的转录水平和自噬标志蛋白LC3B II/I的表达水平。结果表明, 当巨噬细胞被MA诱导成泡沫细胞后, 其自噬功能是显著减低的。该结果证实, 在MA诱导巨噬细胞发生泡沫细胞化后, 巨噬细胞自身的自噬功能被抑制, 导致其通过自噬机制处理脂质的能力降低, 脂代谢失衡, 脂质在细胞内聚集, 从而形成泡沫细胞。Ding等^[13]认为, 过量摄入酒精的大鼠其氧化应激加强, 减弱了雷帕霉素靶蛋白的信号, 抑制了细胞自噬, 如果激活细胞自噬, 就可逆转脂肪肝的形成。但是, 由MA诱导而成的泡沫巨噬细胞能否通过增强自噬而恢复巨噬细胞的表型及功能, 有待进一步研究。本研究初步探索了分枝菌酸促巨噬细胞泡沫细胞化的机制, 为研究开发与自噬相关的抗MTB治疗途径奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 WHO. WHO global tuberculosis control report 2010. *Cent Eur J Public Health* 2010; 18(4): 237.
- 2 Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 2009; 10(9): 943-8.
- 3 Korf J, Stoltz A, Verschoor J, de Baetselier P, Grooten J. The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. *Eur J Immunol* 2005; 35(3): 890-900.
- 4 Inami Y, Yamashina S, Izumi K, Ueno T, Tanida I, Ikejima K, *et al.* Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412(4): 618-25.
- 5 喻 岚, 陈 全, 李 黎, 刘革力, 张路渝. 分枝菌酸诱导巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*(Yu Lan, Chen Quan, Li Li, Liu Geli, Zhang Luyu. Establishment and characterization of macrophage-derived foam cell model induced by mycolic acid. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*) 2014; 30(9): 983-5.
- 6 Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, *et al.* Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 2008; 4(11): e1000204.
- 7 Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol* 2014; 21(1): 67-85.
- 8 Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; 7(3): 279-96.
- 9 Goletti D, Petruccioli E, Romagnoli A, Piacentini M, Fimia GM. Autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* infection: A passer-partout to flush the intruder out? *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24(4): 335-43.
- 10 Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, *et al.* Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; 458(7242): 1131-5.
- 11 Wu J, Dang Y, Su W, Liu C, Ma H, Shan Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B—two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339(1): 437-42.
- 12 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2503-18.
- 13 Ding WX, Li M, Chen X, Ni HM, Lin CW, Gao W, *et al.* Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology* 2010; 139(5): 1740-52.