

涡虫自噬的研究进展

康 静^{1,2} 董自梅¹ 陈广文^{1*}

(¹河南师范大学生命科学院, 新乡 453007; ²新乡医学院生命科学技术学院, 新乡 453003)

摘要 涡虫是动物界最早出现两侧对称、三胚层、营自由爬行生活的动物类群, 在动物系统演化中占有重要地位。涡虫再生和抗饥饿能力极强, 在再生和饥饿的过程中, 通过细胞增殖、分化、自噬、凋亡完成身体的重塑。涡虫作为一种体内研究自噬的新型模式生物, 可以替代其他模式生物, 克服了只能在特定时间或者特定器官开展工作的困扰, 在体内实施动态检测。该文在重点介绍了涡虫与自噬相关的基因以及信号通路研究概况的同时, 期望为自噬研究打开一个新视角。

关键词 涡虫; 自噬; 进展

Advance of the Autophagy in Planarian

Kang Jing^{1,2}, Dong Zimei¹, Chen Guangwen^{1*}

(¹College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;
²College of Life Science, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract Planarians are the earliest free-living platyhelminthes with triploblast and bilateral-symmetry, and also the important animal group which transits from water-inhabitation to land. It is required to continuous dynamic adjustment of many processes by the way of proliferation, differentiation, autophagy and apoptosis for maintaining the normal homeostatic balance in planarians. Planarians provide a new *in vivo* model organism to study autophagy and this makes them very different from other models where autophagy only occurs at very specific times and/or in very specific organs. This review aims to provide a general view of planarians as an autophagy model organism, placing more emphasis on those genes and signaling pathways related to autophagy.

Keywords planarian; autophagy; research advance

1 引言

自噬是生物为了保持组织平衡在漫长的进化过程中产生的一种自我调节能力, 同时是一种营养和能量循环回收的途径。当机体发生自噬时, 组织内出现双层膜结构的自噬体, 自噬体可以包裹一些物质(例如蛋白质和细胞器), 这些物质最终与溶酶体结合发生溶解。自噬最初是在酵母中发现的, 自噬的发生受到一系列蛋白质的调控, 目前在不同生物体中已成功克隆出30多个自噬相关的基因^[1], 其命名被统一为酵母自噬相关基因*Atg*(autophagy-related gene)。哺乳动物自噬基因的命名与酵母相

似, 但也有个别差异, 如酵母的*Atg8*在哺乳动物被称为*LC3*(microtubute-associated protein 1 light chain 3), 酵母的*Atg6*在哺乳动物则被称为*Beclin1*^[2]。研究发现, 这些自噬基因从酵母到哺乳动物具有较强的保守性, 是自噬发生过程中必不可少的分子, 任何一种自噬基因的缺失或突变都会导致自噬不能发生或者发生异常, 自噬基因在进化上具有高度的保守性^[3]。

近年来, 随着自噬基因及其功能相继被发现, 自噬成为继凋亡(apoptosis)之后生命科学前沿研究领域之一^[1]。自噬除维持生理状态下机体的稳态功能外, 越来越多的研究表明, 细胞自噬与细胞内稳

收稿日期: 2015-08-28 接受日期: 2015-11-27

国家自然科学基金(批准号: 31471965、31170357、30870368、30670247和30170119)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3326190, E-mail: chengw0183@sina.com

Received: August 28, 2015 Accepted: November 27, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471965, 31170357, 30870368, 30670247 and 30170119)

*Corresponding author. Tel: +86-373-3326190, E-mail: chengw0183@sina.com

网络出版时间: 2016-02-02 14:18:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160202.1418.006.html>

态、癌症、心力衰竭、神经退行性疾病、传染病与衰老等相关^[1,4-5]。自噬和凋亡之间存在着三种不同类型的相互作用,且每一种类型都对应着相应的特定的细胞类型、刺激和环境。第一,自噬与凋亡相互合作,共同促进细胞死亡。两者可以相互独立或者一个会影响另一个;自噬也可以作为凋亡的上游调节因子直接调节或通过细胞凋亡调节细胞死亡。第二,自噬可以通过促进细胞存活而拮抗细胞凋亡。例如,通过去除因氧化应激受损的细胞器或降解变性的大分子物质为饥饿的细胞提供生存所需要的营养和能量,或通过降解未折叠蛋白质来抑制内质网应激,自噬的这些功能将会阻遏促凋亡刺激的产生,从而起到拮抗细胞凋亡的作用。第三,自噬有时虽然自身并没有导致细胞死亡,但却参与了细胞凋亡过程。如一些依赖ATP的凋亡过程^[6-7]。细胞在正常的生理活动中,自噬被严格控制在正常的基础水平,当机体受到胁迫时才被诱导^[8],如生物体在饥饿过程中,细胞通过自噬提供生存所需的营养和能量^[8-10]。自噬可能是一种死亡的替换方式,当凋亡受到抑制时,自噬是一种有效的应对压力的方式^[9]。

自噬在发育生物学中的作用也越来越受重视^[10-11]。Rowland等^[12]在观察鳞翅目昆虫节间肌肉退化过程中发现有自噬现象。哺乳动物早期胚胎发育过程中,卵母细胞中的蛋白质和RNA通过自噬被降解为小分子物质,从而激活受精卵细胞RNA的翻译和转录^[13-14]。此外,自噬在神经元的发育中也有重要作用^[15-16]。在自噬相关基因*AMBRA1*(activating molecule in Beclin1 regulated autophagy protein 1)突变的胚胎模型中,不仅在胚胎形成初期时神经的形成受到了影响,而且在神经索分化的过程中大脑结构也出现了异常,同时伴随*SHh*(sonic hedgehog)基因异位表达。*SHh*基因为胚胎发育的关键调控基因,在神经系统形成、眼睛发育、小脑细胞分裂等过程中发挥重要作用^[10,16-17]。

20世纪初,当孟德尔的遗传学实验刚启动,最先使用果蝇作为模式生物,接着使用线虫、斑马鱼和小鼠作为模式生物,而涡虫则不被看好,原因则是因为涡虫强大的可塑性不符合遗传学定律。一直到50年代,由于遗传学的发展,对涡虫再生的研究才拉开了序幕。到90年代,由于细胞生物学和分子生物学技术的发展,对于涡虫再生研究主要集中在干细胞的研究,尽管工作进展迅速,但相对于其他

模式动物而言仍有很大差距。然而,进入21世纪以来,对涡虫的研究获得了长足进步。2003年3月,地中海涡虫的基因组全序列测序完成,地中海涡虫全序列的数据可以在网上查询。自从2007年第一个与自噬相关的*Gtdap-1*(*Girardia tigrina* death-associated protein-1)基因在地中海涡虫中被证实以来,关于涡虫自噬的研究工作引起了大批科研工作者的兴趣。涡虫是扁形动物门的代表动物,具有极强的再生能力。头部或者尾部切除后在一周内可以完全再生出缺失组织,即使是小到虫体1/279的涡虫组织也能够再在很短时间内再生出一个完整的个体^[1]。并且涡虫与切割再生相关的许多基因与高等动物具有较高的同源性。生物重塑的过程被认为是再发育过程,而在这个过程中,自噬在涡虫体内持续发生,而不是像其他模式动物一样仅在特定时期、特定的器官发生,这不仅为自噬的动力学研究,同时也为高等动物再发育研究提供了可能性^[3-5]。

2 自噬在涡虫中的研究

关于涡虫身体重塑过程中,细胞死亡及其作用目前文献较少。Melendez等^[9]认为,在涡虫的再生和饥饿过程中,发生了细胞死亡、性器官消失等现象,这些可能提示了在身体重塑过程中细胞死亡扮演了重要角色。涡虫在外界食物供应不足或再生的情况下,组织需要重塑,需要大量的能量和营养,在这个过程中,自噬发挥着重要的作用^[20]。关于涡虫细胞死亡的研究主要集中在细胞凋亡方面,自噬的研究起步较晚^[6]。70年代后期至80年代早期,Bowen等^[21-25]借助于电镜观察和酸性磷酸酶活性测定技术,在多目涡虫(*Polycelis tenuis* Iijima)的再生和饥饿过程中发现了细胞自噬现象。自噬的早期特征包括胞质囊泡形成、内质网内陷的增加、溶酶体数量增加、酸性磷酸酶活力升高及之后发生的细胞核溶解等。自噬现象大多数发生在肠表皮细胞、腺体细胞及色素细胞中,而在神经细胞中没有观察到自噬现象。

2.1 涡虫饥饿过程中的自噬

Baguna等^[26]在检测涡虫(*Polycelis tenuis* Iijima)饥饿状态下有丝分裂能力时发现,其有丝分裂能力不仅保持稳定,且有轻微的增加。测量不同饥饿时期体内有丝分裂细胞数量,发现涡虫固定实质细胞比例减少,干细胞比例增加,其他类型细胞比例保持不变,细胞总量减少。这意味着,在涡虫饥饿状态下

行退行性生长时, 尽管细胞总量减少了, 但细胞的有丝分裂活动并没有降低^[27-28]。食物供应充足时, 涡虫实质细胞比例增加, 但干细胞比例下降, 细胞总量保持不变; 有性个体在饥饿状态下, 生殖细胞发生自噬, 以保证神经细胞的增殖^[29-33]。

当三角涡虫(*Dugesia mediterranea*)饥饿5周后, 体长缩小至原来的32%。饥饿过程中酸性磷酸酶活性有4次调高。第1次调高发生在饥饿初期, 是由于消化食物的需要; 第2次是饥饿6~7 d, 当细胞内出现大量的分泌囊泡、内质网塌陷、溶酶体数量增加、细胞溶解和自噬现象发生时; 第3次调高是饥饿14~15 d, 肠道细胞大量溶解; 第4次调高是饥饿25~26 d, 生殖细胞发生溶解时。在饥饿过程中, 腺细胞、色素细胞、实质细胞发生自噬和溶解, 溶酶体大量出现, 胞内空间增加, 胞外基质减少, 脂质和糖原出现; 神经细胞无变化, 咽和排泄器官也是完整的; 体内各类型细胞的比例发生变化。实验结果显示, 细胞溶解具有选择性, 细胞通过自噬供应能量使机体度过饥饿环境^[24]。

2.2 涡虫再生过程中的自噬

涡虫具有极强的再生能力, 自耳突后切割涡虫, 在17 °C培养条件下, 涡虫再生的高峰期有两个: 分别在切割后4~8 h和2~3 d。切割后第7 d, 涡虫完成所有器官和组织的再生和重塑, 并且使身体恢复到一个合适的比例^[34]。在再生过程中, 形成芽基需要能量供应, 然而在咽形成之前, 涡虫无法进食, 推测在这个过程中, 自噬扮演了重要的角色。Oviedo等^[35]发现, 在涡虫的实质细胞和干细胞之间有连接系统, 该系统对干细胞的稳定特别重要, 可能原因是细胞自噬产生的营养物质传递给了干细胞。

研究发现, 经耳突后切割涡虫其体内酸性磷酸酶活性有2个高峰期。第1个高峰期是在切割0~12 h后, 酸性磷酸酶活性达到峰值, 靠近伤口处大量实质组织细胞和肠皮层细胞被吞噬, 伤口被一层薄膜覆盖, 自噬现象发生; 第2个高峰期是在切割40~48 h后, 酸性磷酸酶活性再次调高。自48 h开始, 细胞自溶减少, 自噬出现, 发生的部位集中在伤口和芽基处, 发生自噬细胞类型为肠上皮细胞、腺细胞和生殖细胞^[25]。

2.3 涡虫生殖过程中自噬

Harrath等^[36]研究三角涡虫(*Dugesia arabica*)时发现, 由于卵巢过分分裂生殖使涡虫卵巢增生, 进而导致不育。通过电镜观察, 在增生的卵母细胞死亡初期, 有一些细胞与溶酶体结合形成自噬体发生自噬。而在增生卵母细胞死亡后期, 在细胞质中观察到凋亡小体, 发生凋亡现象。因此, 我们认为, 卵巢细胞中已分化卵母细胞的死亡机制是导致涡虫不育的重要原因。

2.4 涡虫自噬的分子机制

在哺乳动物细胞内, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在所有的真核生物中控制着细胞生长和增殖, 是自噬启动阶段的关键调节因子, 活化的mTOR可抑制自噬的发生^[38]。因此, 在癌症治疗药物的选择过程中, mTOR信号通路是目前最重要的靶向药物信号系统^[39]。在涡虫自噬的分子研究中, mTOR信号通路依然是最重要的研究热点。下面以mTOR信号通路为标准阐述涡虫自噬的分子机制(表1)。

2.4.1 mTOR信号通路对涡虫自噬的调控 通过对地中海涡虫mTOR信号通路的研究发现, *Smed-tor*和*Smed-raptor*基因的RNA干扰实验造成了涡虫再生

表1 涡虫自噬相关基因

Table 1 The related genes of autophagy in freshwater planarian

基因 Genes	信号通路 Signal pathway	涡虫模型 Model	参考文献 References
<i>Smed-tor</i>	mTOR dependent	<i>Schmidtea mediterranea</i>	[37-38]
<i>Smed-raptor</i>	mTOR dependent	<i>Schmidtea mediterranea</i>	[37-38]
<i>Smed-PTEN-1</i>	mTOR dependent	<i>Schmidtea mediterranea</i>	[42]
<i>Smed-PTEN-2</i>	mTOR dependent	<i>Schmidtea mediterranea</i>	[42]
<i>Smed-p53</i>	mTOR dependent	<i>Schmidtea mediterranea</i>	[43]
<i>Smed-SMG-1</i>	mTOR dependent	<i>Schmidtea mediterranea</i>	[37]
<i>Gtdap-1</i>	mTOR dependent	<i>Girardia tigrina</i>	[44]
<i>Smed-GSK3</i>	Wnt dependent	<i>Schmidtea mediterranea</i>	[47]
<i>MORN2</i>	Unknown	<i>Dugesia japonica</i>	[48]

过程中第一次有丝分裂高峰期的缺失, 导致涡虫丧失了芽基再生功能^[37-38]。Gonzalez-Estevez等^[37]研究发现, 第1次有丝分裂高峰期(切割后6 h)对mTOR信号通路的激活是必要的; mTOR复合体1对芽基的形成和生长十分必要, 其中Smed-tor和Smed-raptor功能区发挥重要作用^[37]。此外, mTOR信号通路对维持细胞之间的平衡(细胞分裂和死亡)是至关重要的, 其功能障碍会导致在营养缺乏的条件下组织退化和有机体退行性生长。mTORC1复合物是mTOR信号通路的必要和重要功能区域。mTOR信号通路在地中海涡虫体内系统地控制成体干细胞水平^[38]。我们认为, 涡虫可以作为一种新的用于研究mTOR功能的模式动物。

2.4.2 mTOR依赖性基因对涡虫自噬的调控 *PTEN* 基因(gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten), 又称为*MMAC1*(mutated in multiple advanced cancer 1)和*TEPI*(TGF-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1)^[40]。它定位于染色体10q23.3, 由9个外显子组成, 编码由403个氨基酸组成的蛋白质, 具有磷酸酶的活性。*PTEN*蛋白不仅通过拮抗酪氨酸激酶等磷酸化酶的活性而抑制肿瘤的发生发展, 而且通过减弱PIP3(phosphatidylinositol 3-phosphate)信号传导, 增加PIP2(phosphatidylinositol 2-phosphate)水平, 从而在PI3K-Akt-mTOR信号通路中发挥重要作用^[41]。Oviedo等^[42]研究地中海涡虫时发现了2个基因: *Smed-PTEN-1*、*Smed-PTEN-2*, 它们能够调节地中海涡虫的干细胞功能。*Smed-PTEN-1*和*Smed-PTEN-2*的RNA干扰实验结果显示, 涡虫再生紊乱, 干细胞异常增殖, 动物在不久后死亡(细胞内有溶酶体出现); 同时也检测到*Smed-Akt*基因表达量有显著升高。通过添加一定剂量的雷帕霉素, 可以阻止由于*PTEN*的缺失导致涡虫疯狂生长, 进而死亡等现象的发生。这种现象间接说明了*PTEN*通过PI3K-Akt-mTOR信号通路在涡虫再生过程中发挥着重要的作用。

在哺乳动物细胞核中, p53可通过sestrin1/2蛋白激活AMPK-mTOR信号通路, 从而抑制mTOR, 上调自噬水平; 也可通过激活DAPK1(death-associated protein kinase 1), 磷酸化Beclin1, 促进细胞自噬; 还能通过激活抗凋亡蛋白Bcl-2家族, 解除Bcl-2/xL与Beclin1之间的抑制作用而上调细胞自噬^[43]。Pearson等^[43]通过对地中海涡虫研究发现, *Smed-p53*和*Smed-*

*PTEN*的RNA干扰实验表型结果类似: 涡虫再生紊乱, 干细胞增殖异常。实验结果证实了p53通过一系列信号通路的调节, 在涡虫再生过程中和肿瘤抑制过程中发挥着重要的作用。

mTOR(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)和SMG-1(suppressor with morphogenetic effect on genitalia-1)(生殖器形成抑制蛋白)都属于PIKK(phosphatidylinositolkinase-relatedkinase)家族成员之一。其中, SMG-1是最新发现的成员, 因与秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的CeSMG-1蛋白同源而得名^[37]。Gonzalez-Estevez等^[37]通过对地中海涡虫研究发现, *Smed-SMG-1*和*Smed-PTEN*、*Smed-p53*的RNA干扰实验表型结果类似。但是, 切片结果显示有区别: 涡虫眼睛前端干细胞增殖异常, 腹侧上皮细胞肥大。*Smed-tor/Smed-raptor*分别与*Smed-SMG-1*联合进行双核糖核酸干扰(RNAi)实验, 结果显示, 涡虫仅出现*Smed-tor*、*Smed-raptor* RNAi表型, 未出现*Smed-SMG-1* RNAi表型。结果证实, *Smed-SMG-1* RNAi表型(无控制生长)需要mTOR信号。同时, Gonzalez-Estevez等^[37]发现, 涡虫早期*Smed-SMG-1* RNAi表型特征和癌症病人早期特征十分相似, 暗示*SMG-1*可能是潜在的癌症抑制基因。果真如此, 开发*SMG-1*基因相关药物用于癌症的治疗具有广阔前景。

Koren等^[44]研究发现, 人类死亡关联蛋白-1(death-associated protein-1, DAP-1)可作为mTOR的直接磷酸化底物, 在氨基酸缺乏等应激条件下, mTOR失活不能抑制DAP-1活力, 自噬发生; 而当营养充足时, DAP-1被mTOR磷酸化失活, 自噬受到抑制。Gonzalez-Estevez等^[45]对涡虫(*Girardia tigrina*)的*Gtdap-1*基因研究时发现, 涡虫的再生过程中存在自噬现象。*Gtdap-1*蛋白和DAP-1属于同源性蛋白质, 在再生和饥饿过程中, 有性涡虫的生殖器官中*Gtdap-1*基因高表达, 提示*Gtdap-1*基因在身体重塑过程中的主要功能是清除某些对机体存活不是必需的组织 and 器官。再生第5 d, 机体重塑达到顶峰, 此时细胞总量的44%表达*Gtdap-1*基因, 干细胞总量的39%也表达*Gtdap-1*基因。电镜观察结果表明, 在自噬细胞中*Gtdap-1*基因高表达, 并且电镜下仅仅观察到细胞的自噬形态, 并未发现细胞凋亡形态的出现。*Gtdap-1*基因RNA干扰实验导致涡虫重塑缺陷、再生缓慢和干细胞增殖率降低。

2.4.3 其他基因对涡虫自噬的调控 GSK3(glycogen synthase kinase 3)是Wnt信号通路中的关键蛋白,同时受到PI3K-Akt-mTOR通路的调控^[46]。通过对地中海涡虫*Smed-GSK3*基因的研究发现,自噬对再生过程中的涡虫中枢神经系统起保护作用。*Smed-GSK3*在再生涡虫和非再生涡虫的中枢神经系统(central nervous system, CNS)中表达,而且用药物抑制*Smed-GSK3*后神经再生受到抑制^[47]。由于神经元细胞自身不仅不能分化且不能清除新陈代谢过程中长期积累的废物,所以需要自噬来清理^[4]。

对于日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)来说,尽管长期生活在存在大量病原菌的水体环境中,仍能健康存活下来。科学家对此感到好奇,因此,通过喂食涡虫病原菌实验发现了*MORN2*基因,该基因可以促进由自噬介导的抗性机制抵抗病原菌的攻击,使涡虫喂食病原菌后仍能够生存^[48]。

目前,对涡虫中自噬发生的分子机制属于探讨阶段,其发生的确切机制尚不清楚。

3 结论与展望

毋庸置疑,涡虫由于其在动物系统演化中的特殊地位和惊人的再生能力,已成为研究自噬现象及发生机制的模式生物之一。自噬的发生是一个多基因参与的基因网络协同作用的过程。近年来,随着分子生物学技术的快速发展,与自噬相关的新基因不断被发现并对其功能的研究逐步深入。尽管如此,关于涡虫自噬现象仍有许多问题亟待解决,如相关基因的调控机制、基因间的相互作用关系以及控制自噬形成的信号通路等,需要更多的学者做进一步深入研究,以期为高等脊椎动物自噬形成机制及人类疾病(如癌症和神经退行性疾病)的治疗提供参考。

参考文献 (References)

- 1 李乐兴,戴汉川. 细胞自噬调控的分子机制研究进展. 中国细胞生物学学报(Li Lexing, Dai Hanchuan. Research progress of the molecular mechanism of autophagy regulation. Chinese Journal of Cell Biology) 2015; 37(2): 263-70.
- 2 方梦蝶,刘波,刘伟. 自噬的分子细胞机制研究进展. 中国细胞生物学学报(Fang Mengdie, Liu Bo, Liu Wei. Molecular cell mechanism of autophagy. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(4): 382-90.
- 3 Gozuaelk D, Kimichi A. Autophagy and cell death. Curr Top Dev Biol 2007; 78: 217-45.
- 4 Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, Kellner E, Ehmer B, Drew AF, et al. VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. Cancer Cell 2012; 21(4): 532-46.
- 5 Menghini R, Casagrande V, Marino A, Marchetti V, Cardellini M, Stoehr R, et al. MiR-216a: A link between endothelial dysfunction and autophagy. Cell Death Dis 2014; 5(1): 1029-38.
- 6 Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AL. Conversation between apoptosis and autophagy: "Is It Your Turn or Mine?" Apoptosis 2011; 16(4): 321-33.
- 7 Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. Int J Biochem Cell Biol 2004; 6(12): 2405-19.
- 8 Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: Cell makeover rather than cell death. Dev Cell 2008; 15(3): 344-57.
- 9 Melendez A, Neufeld TP. The cell biology of autophagy in metazoans: A developing story. Development 2008; 135(14): 2347-60.
- 10 Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. Science 2008; 321(5885): 117-20.
- 11 Tsukamoto S, Kuma A, Mizushima N. The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. Autophagy 2008; 4(8): 1076-8.
- 12 Rowland AM, Richmond JE, Olsen JG, Hall DH, Bamber BA. Presynaptic terminals independently regulate synaptic clustering and autophagy of GABAA receptors in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci 2006; 26(6): 1711-20.
- 13 Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. Nature 2007; 447(7148): 1121-5.
- 14 Cecconi F, Di BS, Nardacci R, Fuoco C, Corazzari M, Giunta L, et al. A novel role for autophagy in neurodevelopment. Autophagy 2007; 3(5): 506-8.
- 15 Morgan TH. Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. Arch Entw Mech Org 1898; 7: 364-97.
- 16 Morgan TH. Growth and regeneration in *Planaria lugubris*. Arch Entw Mech Org 1902; 13: 179-212.
- 17 Gonzalez-Estevez C. Autophagy in freshwater planarians. Methods Enzymol 2008; 451: 439-65.
- 18 Gonzalez-Estevez C, Salo E. Autophagy and apoptosis in planarians. Apoptosis 2010; 15(3): 279-92.
- 19 Gonzalez-Estevez C. Autophagy meets planarians. Autophagy 2009; 5(3): 290-7.
- 20 Gonzalez-Estevez C, Felix DA, Rodriguez-Esteban G, Aboobaker AA. Decreased neoblast progeny and increased cell death during starvation-induced planarian degrowth. Int J Dev Biol 2012; 56(1/2/3): 83-91.
- 21 Bowen ID, Ryder TA, Thompson JA. The fine structure of the planarian *Polycelis tenuis* Iijima. II. The intestine and gastrodermal phagocytosis. Protoplasma 1974; 79(1): 1-17.
- 22 Bowen ID, Ryder TA. Cell autolysis and deletion in the planarian *Polycelis tenuis* Iijima. Cell Tissue Res 1974; 154(2): 265-71.
- 23 Bowen ID, Ryder TA. Use of the p-nitrophenyl phosphate method for the demonstration of cid phosphatase during starvation and cell autolysis in the planarian *Polycelis tenuis* Iijima. Histochem J 1976; 8(3): 319-29.

- 24 Bowen ID, Ryder TA, Dark C. The effects of starvation on the planarian Worm *Polycelis tenuis* Iijima. *Cell Tissue Res* 1976; 169(2): 193-209.
- 25 Bowen ID, den Hollander JE. Cell death and acid phosphatase activity in the regenerating planarian *Polycelis tenuis* Iijima. *Differentiation* 1982; 21(3): 160-7.
- 26 Baguna J. Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp.I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation. *J Exp Zool* 1976; 195: 53-64.
- 27 Baguna J and Romero R. Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* 1981; 84: 181-94.
- 28 Romero R. Anàlisi cellular quantitativa del creixement i de la reproducció a diferents espècies de planaris (Ph.D. dissertation). Universitat de Barcelona, Barcelona, 1987.
- 29 Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: More than a namesake. *Br J Pharmacol* 2009; 156(6): 885-98.
- 30 Yen TH, Wright NA. The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Rev* 2006; 2(6): 203-12.
- 31 Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. Cell death in the skin. *Apoptosis* 2009; 14(4): 549-69.
- 32 Mori C, Nakamura N, Kimura S, Irie H, Takigawa T, Shiota K. Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec* 1995; 242(1): 103-10.
- 33 Zuzarte-Luis V, Hurlle JM. Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 261-9.
- 34 Salo E, Baguna J. Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia* (G) *tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol* 1984; 83: 63-80.
- 35 Oviedo NJ, Levin M. *Smedinx-11* is a planarian stem cell gap junction gene required for regeneration and homeostasis. *Development* 2007; 134(17): 3121-31.
- 36 Harrath AH, Semlali A, Mansour L, Ahmed M, Sirotkin A, Alomar S. Infertility in the hyperplastic ovary of freshwater planarians: the role of programmed cell death Gtdap-1 promotes autophagy and is required for planarian remodeling during regeneration and starvation. *Cell Tissue Res* 2014; 358(2): 607-20.
- 37 Gonzalez-Estevez C, Felix DA, Smith MD, Paps J, Morley SJ, James V, et al. SMG-1 and mTORC1 act antagonistically to regulate response to injury and growth in planarians. *PLoS Genet* 2012; 8(3): e1002619.
- 38 Peiris TH, Weckerle F, Ozamoto E, Ramirez D, Davidian D, Garcia-Ojeda ME, et al. TOR signaling regulates planarian stem cells and controls localized and organismal growth. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 7): 1657-65.
- 39 杨晨, 李萍, 梁廷明. 细胞自噬与肿瘤的关系研究进展. *生命科学* (Cui Danrui, Liu Bo, Liu Wei. The role of autophagy in tumorigenesis. *Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2015; 27(2): 151-60.
- 40 Malemud CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: A fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis. *Future Med Chem* 2015; 7(9): 1137-47.
- 41 Chen JH, Zhang P, Chen WD, Li DD, Wu XQ, Deng R, et al. ATM-mediated PTEN phosphorylation promotes PTEN nuclear translocation and autophagy in response to DNA-damaging agents in cancer cells. *Autophagy* 2015; 11(2): 239-52.
- 42 Oviedo NJ, Pearson BJ, Levin M, Sánchez AA. Planarian PTEN homologs regulate stem cells and regeneration through TOR signaling. *Dis Model Mech* 2008; 1(2/3):131-43.
- 43 Pearson BJ, Sanchez AA. A planarian p53 homolog regulates proliferation and self-renewal in adult stem cell lineages. *Development* 2010; 137(2): 213-21.
- 44 Koren I, Reem E, Kimchi A. DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr Biol* 2010; 20(12): 1093-8.
- 45 Gonzalez-Estevez C, Felix DA, Aboobaker AA, Salo E. Gtdap-1 and the role of autophagy during planarian regeneration and starvation. *Autophagy* 2007; 3(6): 640-2.
- 46 Penas C, Mishra JK, Wood SD, Schürer SC, Roush WR, Ayad NG. GSK3 inhibitors stabilize Wee1 and reduce cerebellar granule cell progenitor proliferation. *Cell Cycle* 2015; 14(3): 417-24.
- 47 Adell T, Marsal M, Salo E. Planarian GSK3s are involved in neural regeneration. *Dev Genes Evol* 2008; 218(2): 89-103.
- 48 Abnave P, Mottola G, Gimenez G, Boucherit N, Trouplin V, Torre C, A. Screening in planarians identifies MORN2 as a key component in LC3-associated phagocytosis and resistance to bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2014; 16(3): 338-50.