

自噬小体的超微结构分析

王自彬¹, 王静², 王玲¹, 赵文娥^{1*}

(¹南京医科大学分析测试中心, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属逸夫医院检验科, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:分析研究自噬小体的超微结构。方法:应用透射电镜技术整理分析本中心收到的用于自噬研究的细胞标本,发现自噬小体的特征结构,并对细胞内易与自噬小体混淆的其他细胞结构进行分析。结果:自噬小体具有双层或多层膜的特征,并且其内包含细胞器和胞浆成分,可以与细胞内其他易于混淆的细胞结构相区分。结论:双层或多层膜的球状结构,内含胞浆成分,如线粒体、内质网、核糖体等,是自噬小体的结构特征。

[关键词] 自噬小体;透射电镜;超微结构

[中图分类号] Q24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)04-426-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160409

Ultrastructural analysis of autophagosome

Wang Zibin¹, Wang Jing², Wang Ling¹, Zhao Wene^{1*}

(¹Analytical and Testing Center of NJMU, Nanjing 210029; ²Clinical Laboratory of Affiliated Yifu Hospital of NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the ultrastructure of autophagosome. **Methods:** We used transmission electron microscopy to analyze the cell samples of autophagy, and to find the characteristic structure of the autophagosome, and to identify the other cell structures which was similar to autophagosome. **Result:** Autophagosome had the characteristics of double layer or multilayer membrane and inclusions, it could be identified from the other cell structure. **Conclusion:** Double layer or multilayer membrane and inclusions are the characteristics of the autophagosome structure which contains mitochondria, endoplasmic reticulum, ribosome and other cytoplasm components.

[Key words] autophagosome; transmission electron microscopy; ultrastructure

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04):426-429]

20 世纪 50 年代, Christian de Duve 在透射电镜下观察到自噬小体 (autophagosome), 因而被公认为自噬研究的鼻祖。自噬小体在形态上表现为双层或多层膜包裹部分细胞质和细胞内需要降解的细胞器等物质, 随后与溶酶体结合形成自噬溶酶体 (autophagolysosome), 降解其内所包裹的物质, 以实现细胞内的稳态和细胞器的更新^[1]。根据细胞内底物运送到溶酶体腔方式的不同, 哺乳动物细胞的自噬可分为 3 种主要方式: 大自噬 (macroautophagy)、小自噬 (microautophagy) 和分子伴侣介导自噬 (chaperone-mediated autophagy)^[2-3]。大自噬就是我们通常所

说的自噬, 下文所指自噬均指大自噬。目前, 自噬检测的金标准是在透射电镜下观察到细胞质中存在膜状结构的自噬小体及其他相关亚细胞结构。但是, 细胞内结构复杂多变, 存在多种膜结构的细胞器, 其在生理和病理状态时表现不同, 极易与自噬小体相混淆。随着近来自噬研究的热潮, 本中心收到大量用于自噬研究的细胞标本, 针对研究者对自噬小体形态结构的疑问, 我们整理了部分典型的自噬小体结构, 提供了大量高分辨的照片, 并与细胞内易与自噬小体混淆的其他细胞结构进行比较分析, 以期研究者鉴别自噬小体的形态结构时提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(2015NJMUZD008)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wzb0909@126.com

南京医科大学分析测试中心电镜平台所接收的已经诱导发生自噬的细胞标本(主要为人B淋巴瘤细胞)。对标本后期数据的采集、分析、使用情况均已征得送样人的同意。

1.2 方法

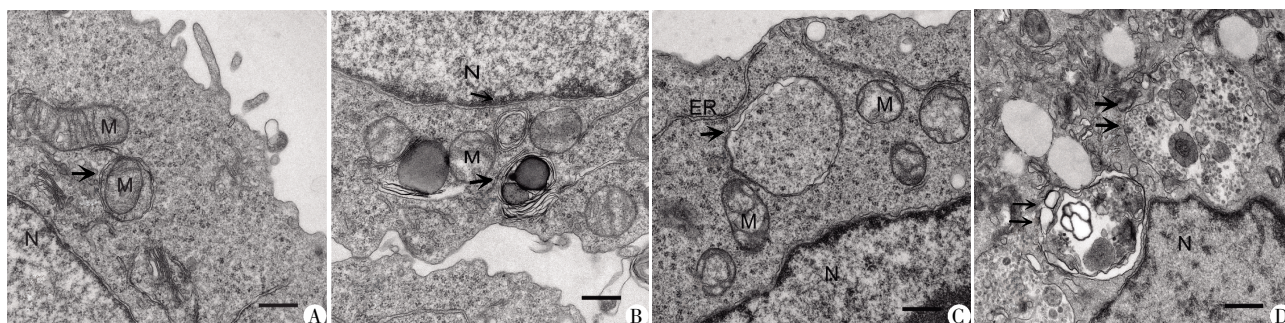
干扰素 α -2a分别刺激细胞36h和48h,诱导自噬发生。收集细胞,固定于4℃2.5%戊二醛溶液中4h。0.1mol/L磷酸缓冲液漂洗4次,每次15min。1%锇酸溶液4℃后固定2h。50%、70%、90%、100%梯度丙酮脱水各15min。100%丙酮:树脂=1:1渗透2h,100%丙酮:树脂=1:2渗透2h,纯树脂渗透过夜,Epon 812树脂包埋,烘箱聚合(37℃12h,45℃12h,60℃48h)。超薄切片,厚度60~70nm,醋酸铀、硝酸铅染色,透射电镜(Tecnai G2 Spirit Bio

TWIN,FEI公司,美国)观察。

2 结果

2.1 典型的自噬小体超微结构

典型的自噬小体是由膜(大部分表现为双层膜,有时会有多层或单层膜)包裹部分胞质和细胞内需要降解的细胞器、蛋白质等形成封闭的、圆球形的结构,直径0.5~1.5 μ m。自噬小体内所包含物质多种多样,线粒体、内质网、核糖体、脂滴以及一些不明物质等(图1A、B、C)。随着自噬过程的发展,自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,期间自噬小体的内膜被溶酶体酶降解,其表现为单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆成分(图1D)。



A~C:自噬小体(箭);D:自噬溶酶体(双箭)。M:线粒体,N:细胞核,ER:内质网,标尺=500 nm。

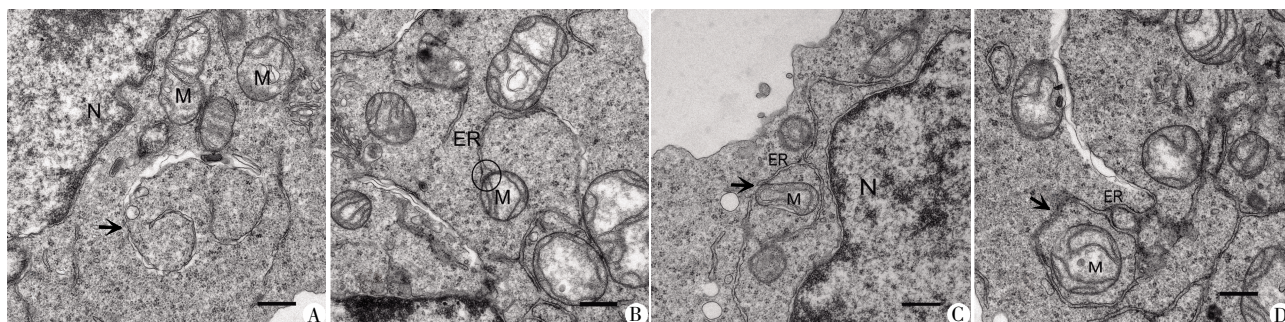
图1 典型的自噬小体和自噬溶酶体结构

Figure 1 Typical structure of autophagosome and autophagolysosome

2.2 自噬小体的发生过程

在已经诱导自噬的哺乳动物细胞内,在胞质某处形成一个由两层膜组成的碗状结构,此结构被称为吞噬泡(phagophore),此为自噬发生的证据之一(图2A)。随着吞噬泡的不断延伸,其将胞质中的成分,包括细胞器,全部揽入“碗”中。然后,双层膜闭合,形成一个封闭的、圆球状的自噬小体,

此为自噬发生的证据之二。我们观察发现,内质网在自噬小体的形成过程中起到关键作用,内质网逐步包裹吞噬需要降解的线粒体。内质网的一端与线粒体接触,此接触点是自噬发生的关键(图2B);通过内质网的延长逐渐包裹住线粒体(图2C);内质网的延长端闭合,完全包裹住线粒体形成自噬小体(图2D)。



A:吞噬泡形成(箭);B:内质网与线粒体接触点(圆圈内);C、D:内质网逐渐延伸包裹线粒体形成自噬小体(箭)。M:线粒体,N:细胞核,ER:内质网,标尺=500 nm。

图2 自噬小体的发生过程

Figure 2 Autophagosome formed by endoplasmic reticulum

2.3 易与自噬小体混淆的细胞结构

2.3.1 损伤的线粒体

当细胞受到缺氧、中毒、感染等致病因素侵袭时，线粒体常表现为线粒体嵴数目减少，排列紊乱，甚至整个线粒体嵴溶解消失，形成空泡状线粒体(图 3A)，有时线粒体内可见电子密度较高的髓鞘样结构。线粒体的内、外膜均保持完整，形成双层膜结构的圆球状物，极易与自噬小体结构混淆。此时，需要综合观察整个细胞的线粒体状态以及双层膜结构里是否含有内容物来判断是否是自噬小体。

2.3.2 异噬溶酶体

在透射电镜下，溶酶体多为圆形，由单层膜包围而成，内含高电子密度的物质。细胞通过胞吞作用，吞噬进入细胞的外来异物、病毒、细菌等形成吞噬体，与初级溶酶体融合形成异噬溶酶体(heterophagolysosome)(图 3B)。异噬溶酶体形状多不规则，电子密度较高，以此可以与自噬小体区分。

2.3.3 高尔基体运输小泡

在高尔基复合体周围可以观察到直径 100~

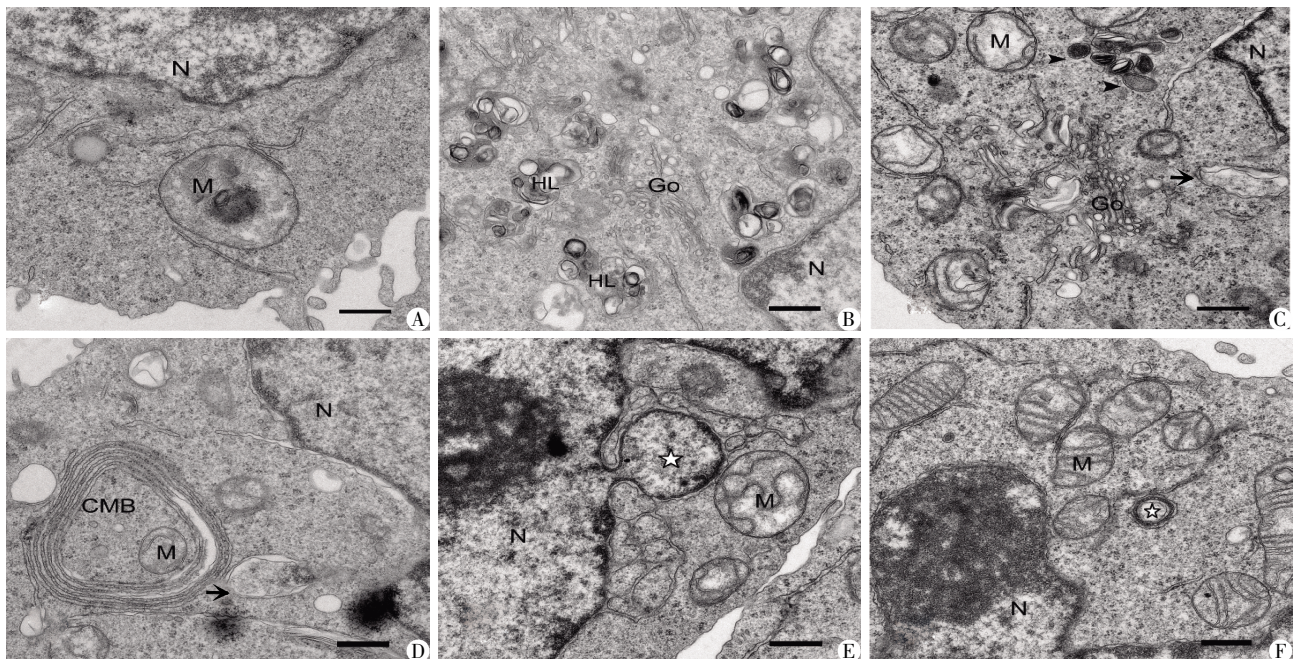
500 nm 的囊泡，单层或双层膜包裹，内含高尔基体加工、浓缩后的分泌产物，称为 CVT(cytoplasm to vacuole targeting)小泡(图 3C)。其直径较自噬小体小，并且内含物颜色均匀，电子密度较高，以此可以与自噬小体区分。

2.3.4 同心膜性小体

同心膜性小体 (concentric membranous bodies, CMB)由成对的内质网膜围绕成同心圆小体，分为 3 种亚型：由粗面内质网围成；由滑面内质网围成；由滑面内质网夹以糖原颗粒围成。小体中心常围有线粒体、脂滴以及溶酶体等(图 3D)。同心膜性小体的特征较为明显，由内质网组成，膜的层数较多，同心圆排列，以此可以与自噬小体区分。

2.3.5 细胞核被膜出芽

核膜表面形成芽状突起，从细胞核脱落进入胞质中，其外被双层核膜，核被膜光滑，没有核孔复合体结构或极少，内含染色质等核内物质(图 3E、F)。核膜出芽与自噬小体一样同为双层膜包裹，但是其内层膜下由深色的染色质聚集，其内包含物与核内物质颜色类似，以此可以与自噬小体区分。



A: 损伤空泡化的线粒体; B: 溶酶体; C: CVT 小体(箭头)和自噬小体(箭); D: 同心膜性小体和自噬小体(箭); E、F: 细胞核被膜出芽(星)。M: 线粒体, N: 细胞核, ER: 内质网, HL: 异噬溶酶体, CMB: 同心膜性小体, 标尺=500 nm。

图 3 几种易与自噬小体混淆的细胞结构

Figure 3 Several cellular structures which are confused with autophagosome

3 讨论

目前普遍认为自噬是一种细胞内的防御和应激调控机制，细胞通过自噬和溶酶体清除、消化降

解受损衰老的细胞器、变性蛋白质及核酸等，其为细胞的修复和重建提供必需的原料，实现胞内物质的循环利用^[4]。自噬在生理和病理情况下都能见到，其在肿瘤^[5]、神经退行性病变^[6]、感染^[7]、衰老^[8]等疾

病的发病中具有重要作用。自噬的基本功能可能是细胞保护作用,例如饥饿条件下保持细胞内环境的稳态,清除受损的蛋白质、细胞器等。但是,自噬的过分激活又是有害的,例如化疗时肿瘤细胞变得具有抗药性。所以,针对不同的疾病情况,选择激活还是抑制自噬是将来的研究目标^[9]。

自噬发生的关键是自噬小体的形成,而在透射电镜下观察到自噬小体结构是检测自噬发生的金标准。本研究展示了较为典型的自噬小体结构,具有双层或多层膜,并具有受损细胞器等内含物,这是判断是否是自噬小体的基本标准。有时,可见只包含部分胞质的双层膜结构,也可将其判断为自噬小体。自噬小体的发生发展可以分为 5 个步骤:诱导、扩展、吞噬泡形成、融合和内含物降解^[10-11]。首先可观察到的是碗状的吞噬泡形成,随着吞噬泡的不断延伸,可以选择性或非选择性地将周围胞质包裹进吞噬泡内,双层膜闭合,自噬小体形成。关于最先形成吞噬泡的膜的来源,目前较公认的说法是来源于内质网^[12-13],但是随着研究的深入,其他细胞器也可能是自噬小体膜的来源^[14]。随着自噬过程的发展,自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,期间自噬小体的内膜被溶酶体酶降解,其表现为单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆成分。自噬溶酶体多为单层膜包裹,并且其直径大于自噬小体,较易于鉴别。

面对细胞内复杂多变的多种膜结构的细胞器,辨别是否是自噬小体,不仅要掌握自噬小体的结构特点,更需要长期经验的积累,本文中列举的几个例子是最易与自噬小体混淆的细胞内结构。但是随着研究的深入,有报道显示除内质网外,线粒体^[15]、高尔基复合体^[16]和核膜^[17]可能也是自噬小体膜的来源。因此,本文所列举的例子可能也是一种特化的自噬小体结构,有待进一步研究。

随着研究的深入,已经从自噬的结构研究进入到功能研究,但是对自噬小体的膜来源一直存在较多争议,是自噬研究的三大热点之一,难点是未能找到区分自噬小体膜与细胞内其他膜结构的特异标记物^[10]。发现自噬小体特异标记,并利用免疫胶体金标记技术和透射电镜 3D 成像技术是研究自噬发生发展过程的有力武器。

[参考文献]

- [1] Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells[J]. *Autophagy*, 2005, 1(1): 1-10
- [2] Loos B, Engelbrecht AM, Lockshin RA, et al. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Un-

- swered questions[J]. *Autophagy*, 2013, 9(9): 1270-1285
- [3] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075
- [4] Kelekar A. Autophagy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1066: 259-271
- [5] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672-676
- [6] Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(9): 1107-1117
- [7] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages[J]. *Cell*, 2004, 119(6): 753-766
- [8] Del Roso A, Vittorini S, Cavallini G, et al. Ageing-related changes in the *in vivo* function of rat liver macroautophagy and proteolysis[J]. *Exp Gerontol*, 2003, 38(5): 519-527
- [9] Yang Z, Klionsky DJ. Eat or be eaten: a history of macroautophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9): 814-822
- [10] Mari M, Tooze SA, Reggiori F. The puzzling origin of the autophagosomal membrane[J]. *F1000 Biol Rep*, 2011, 3: 25
- [11] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(10): 1102-1109
- [12] Chan SN, Tang BL. Location and membrane sources for autophagosome formation—from ER-mitochondria contact sites to Golgi-endosome-derived carriers[J]. *Mol Membr Biol*, 2013, 30(8): 394-402
- [13] Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 389-393
- [14] Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9): 831-835
- [15] Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation[J]. *Cell*, 2010, 141(4): 656-667
- [16] Van Der Vaart A, Reggiori F. The golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes[J]. *Autophagy*, 2010, 6(6): 800-801
- [17] English L, Chemali M, Duron J, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(5): 480-487

[收稿日期] 2015-07-28