

几个能量代谢相关蛋白在HeLa细胞自噬过程中表达下调

刘丹慧 韩姗姗 李潞云 曲业敏 林虹 文杰 吕建新*

(温州医学院细胞与分子医学研究所, 浙江省医学遗传学重点实验室, 蛋白质组学研究所, 温州 325035)

摘要 自噬是真核细胞中的一种保守的代谢信号通路。人们已经知道自噬与肿瘤发生等疾病密切相关, 但对于自噬的分子机制仍然不是很清楚。鉴定更多的自噬相关蛋白对于进一步阐明自噬的分子机制具有重要意义。该研究使用饥饿法处理HeLa细胞, 通过电镜观察以及检测自噬标记蛋白LC3-I的转换, 证实HeLa细胞发生了明显的自噬。之后, 使用双向电泳结合串联质谱分析鉴定细胞自噬时发生变化的蛋白质。结果发现果糖二磷酸醛缩酶A、GAPDH和ATP合成酶O亚基的量在HeLa细胞发生自噬后明显降低。实时定量PCR结果证明饥饿诱导后, 这三种蛋白的mRNA水平都发生了明显的下降。使用自噬抑制剂3-Methyladenine预处理HeLa细胞后再行饥饿, 三种蛋白mRNA的表达水平与正常细胞相当而明显高于饥饿诱导的细胞。结果表明这三种蛋白在饥饿诱导的自噬中表达下调, 其分子机制还有待进一步研究。

关键词 自噬; 饥饿; 双向电泳; 质谱; 差异蛋白

细胞自噬(autophagy)指细胞在缺乏营养和能量供应时, 部分细胞质与细胞器被包裹进一种特异性的双层膜或者多层膜结构的自噬体(autophagosome)中, 形成的自噬体再与溶酶体融合形成自噬溶酶体(autolysosome), 胞质和细胞器成分在这里被降解为核苷酸、氨基酸、游离脂肪酸等小分子物质, 这些小分子物质可以被重新利用合成大分子或者合成ATP^[1]。自噬对于清除细胞内的损伤细胞器、代谢产物以及冗余蛋白, 进而维持细胞稳态起着非常重要的作用。自噬系统的异常与机体免疫、感染、炎症、肿瘤、心血管病、衰老和神经退行性病等重要的机体生理过程以及重大疾病密切相关^[2]。

在正常状态下, 所有哺乳动物细胞都表现出低水平的自噬, 这对维持细胞稳态具有非常重要的作用^[3]。当细胞受到饥饿、氧化应激、病毒感染等外界刺激时, 自噬水平迅速上升, 起到促进细胞存活的作用。如果促存活机制失败, 细胞启动死亡程序, 发生II型程序性细胞死亡^[4]。自噬与肿瘤的发生发展密切相关, 一方面, 在肿瘤发生阶段, 由于肿瘤细胞的生长常超越其血供应而处于营养缺乏的环境中, 很可能利用自噬维持其生存^[5]; 另一方面, 肿瘤细胞可以通过自噬发生自发性或者化疗诱导的细胞死

亡。使用自噬诱导剂使抗凋亡的肿瘤细胞发生自噬性死亡可能是对肿瘤进行化疗的一个新方向^[6]。但是, 人们发现在乳腺癌、卵巢癌以及前列腺癌等肿瘤细胞中, 重要的自噬相关基因*Beclin 1*发生了缺失^[7], 这使一些通过诱导自噬来杀伤肿瘤细胞的药物不能发挥很好的效果。

虽然人们早在1962年就在胰高血糖素处理的小鼠肝细胞中观察到了自噬现象^[8], 但直到20世纪90年代, 人们才在酵母中发现并鉴定了自噬相关基因*Atg* (autophagy related genes), 从而对自噬的分子机制有了一定的了解^[9]。到目前为止, 已经在酵母中鉴定了34种*Atg*基因, 这些基因在哺乳动物中具有很高的保守性^[10]。*Atg*可以根据功能的不同分成三类: 1)泛素样蛋白结合系统, 包括*Atg8*和*Atg12*。二者与自噬泡的延伸与形成有关; 2)磷脂酰肌醇3磷酸激酶复合物(PI3K complex); 3)丝、苏氨酸激酶复合物, 包括*Atg1*、*Atg13*和*Atg17*, 这个复合物在酵母细

收稿日期: 2010-12-23 接受日期: 2011-03-02

浙江省自然科学基金(No.Y2090378)、浙江省教育厅项目(No.20070909)、引进大院名校共建创新载体以奖代补基金(No.2008E80046)和温州医学院校内课题(No.QTJ06011)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-86689771, E-mail: jxlu313@163.com

胞中与自噬的诱导相关。在自噬泡形成并包裹待降解细胞质和细胞器时, Atg12-Atg5复合物与Atg16结合, 类E1酶蛋白Atg7激活Atg12, 形成Atg10, 后者是一种类E2酶蛋白。然后Atg10再与Atg5结合, 从而形成自噬前体复合物^[11]。

虽然人们已经对自噬的分子机制有了一定的了解, 但仍有一些关键问题有待解决, 对自噬信号通路的调节机制也还不清楚。近年来, 多个课题组使用蛋白质组学方法对自噬的发生及调节机制进行了研究^[12-15]。国内, 姜雅欣等^[16]分析了HeLa细胞饥饿诱导的自噬相关蛋白, 发现了数个可能参与饥饿诱导的细胞自噬相关蛋白。最近, Behrends等^[13]对发生基础水平自噬的细胞进行研究, 发现并鉴定了409个可能参与到自噬调节的蛋白以及751对可能发生的相互作用。本研究中, 我们使用饥饿法诱导HeLa细胞自噬, 使用双向电泳结合质谱分析的方法鉴定HeLa细胞自噬后发生明显变化的蛋白质, 并使用定量PCR在mRNA水平上对这些改变进行验证。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养, 自噬的诱导及抑制

人宫颈癌细胞株HeLa购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 于含10% FBS(Gibco)、 1×10^5 U/L青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养基(Gibco)中, 37 °C, 5% CO₂条件下正常培养。诱导自噬时用HBSS洗3次, 加入HBSS培养2 h, 以DMEM正常培养的细胞为对照。抑制自噬时, 以5 mmol/L 3-Methyladenine (3-MA, Sigma)预处理细胞12 h后再进行饥饿。

1.2 电镜检测

收集细胞, 以2.5%戊二醛固定10 min, 加少量胎牛血清混匀并离心使其成团, 再逐滴加入戊二醛固定液包裹整个细胞团, 4 °C固定后, 以生理盐水漂洗, 再分别经以下步骤固定与漂洗: 2.5%戊二醛, 4 °C, 2 h以上, 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 每次15 min; 1%锇酸1 h, 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 每次15 min。样品块于1%醋酸铀中染2 h, 经梯度脱水(50%、70%、80%、90%、100%丙酮各15 min, 100%丙酮2次, 各10 min), 浸透(丙酮:包埋液=1:1, 37 °C烘箱2 h; 丙酮:包埋液=1:4, 37 °C烘箱过夜; 纯包埋液45 °C烘箱2 h), 包埋聚合(45 °C烘箱3 h, 65 °C烘箱48 h)。此后经超薄切片于透射电子显微镜H-7500(日本日立株式会社)下观察。

1.3 蛋白质提取及免疫印迹

细胞经Western及IP细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司)裂解, BCA法(碧云天生物技术有限公司)测蛋白质浓度, 按照Western blot标准流程操作, ECL显色试剂盒(碧云天生物技术有限公司)显色, X光片曝光。LC3抗体、 β -actin抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG, 辣根酶标记山羊抗鼠IgG购自Abcam公司。

1.4 双向电泳

细胞以双向裂解液(7 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 4% CHAPS, 1 mmol/L cocktail, 1% DTT, 0.2% Biolyte, 蛋白酶抑制剂)裂解, Clean Up试剂盒(Bio-Rad)清洗浓缩蛋白, Bradford法测定浓度。一向胶条采用IPG pH3-10NL, 蛋白上样量为300 μ g, 分别经0 V 4 h, 50 V 8 h, 250 V 30 min, 1 000 V 30 min, 逐步线性升至10 000 V, 维持至65 000 Vh。等电聚焦完成后, IPG胶条经平衡液(2% SDS, 30% 甘油, 6 mol/L尿素, 0.05 mol/L Tris-HCl, pH8.8)平衡2次, 每次15 min。然后转移至12% SDS-PAGE电泳至指示剂接近前沿, 固定, 以不含戊二醛的银染法染色。显色完毕后, 凝胶用GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) 扫描仪扫描, 并采用2-DE图谱分析软件PDQuest7.4.0对上述所建立的双向图谱进行分析。

1.5 质谱分析

分别筛选饥饿组样品与对照组样品中产生的稳定、差异明显的蛋白质斑点, 切下后由高等学校蛋白质组学研究院进行LC-MS/MS分析, 并查询SWISS-PROT等数据库进行蛋白质鉴定。

1.6 Real-Time PCR

TRIzol(Invitrogen)法提RNA, 以PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)将其逆转录, 并采用SYBR® Premix Ex Taq™ Perfect Real Time (TaKaRa)试剂盒于Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems执行Real-Time PCR。所用引物分别为: ALDOA(5'-CGG GAA GAA GGA GAA CCT G-3', 5'-GAC CGC TCG GAG TGT ACT TT-3'), GAPDH (5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3', 5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'), ATP5O (5'-TGA ATC CCT ATG TGA AGC GT-3', 5'-CGA CTC CTT GGG TAT TGC T-3'), 内参为 β -actin (5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC-3', 5'-TCG GTG AGG ATC TTC ATG AGG TA-3')。

2 结果

2.1 饥饿诱导HeLa细胞发生自噬

细胞自噬的一个典型形态学特征是在电镜下出现大量双层或多层膜结构的自噬体^[4]。使用HBSS代替完全培养基培养HeLa细胞2 h后, 使用透射电镜观察细胞结构, 可以发现细胞内出现双层膜结构的自噬体, 内部包含待降解的线粒体和其他组分, 如图1A箭头所示。说明HeLa细胞发生了自噬。

为了进一步在分子水平上说明HeLa细胞发生了自噬, 我们对微管相关蛋白轻链3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)的转换进行了检测。LC3是另一个被广泛用来检测自噬的标记分子。LC3在体内以LC3-I的形式合成, 细胞发生自噬时, LC3-I与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)结合, 形成LC3-II。虽然LC3-II实际分子量更大, 但由于其疏水性很强, 电泳时其迁移率反而更快^[17]。

如图1B所示, 饥饿0.5 h后, LC3-I的量就发生明显下降, LC3-II的量明显增加。延长处理时间至2 h后, LC3-II的量也明显降低。这可能是由于LC3-II在自噬体中被组织蛋白酶降解所致^[18]。

对自噬体和LC3转换的检测证明饥饿2 h可以诱导HeLa细胞发生明显的自噬。

2.2 双向电泳结合质谱分析鉴定HeLa细胞自噬时的差异蛋白

经过三组平行实验的对比, 结果显示饥饿组 and 对照组蛋白质斑点分布模式基本一致, 组间匹配性较好。经PDQuest软件分析, DMEM培养的正常对照组细胞线粒体蛋白可以检测到 965 ± 105 个点, HBSS培养的自噬细胞线粒体蛋白可以检测到 913 ± 48 个点, 这些蛋白质等电点和相对分子质量分布范围较广。通过重复比较, 确定了饥饿后高表达的36个点, 饥饿后低表达的24个点。我们选择了

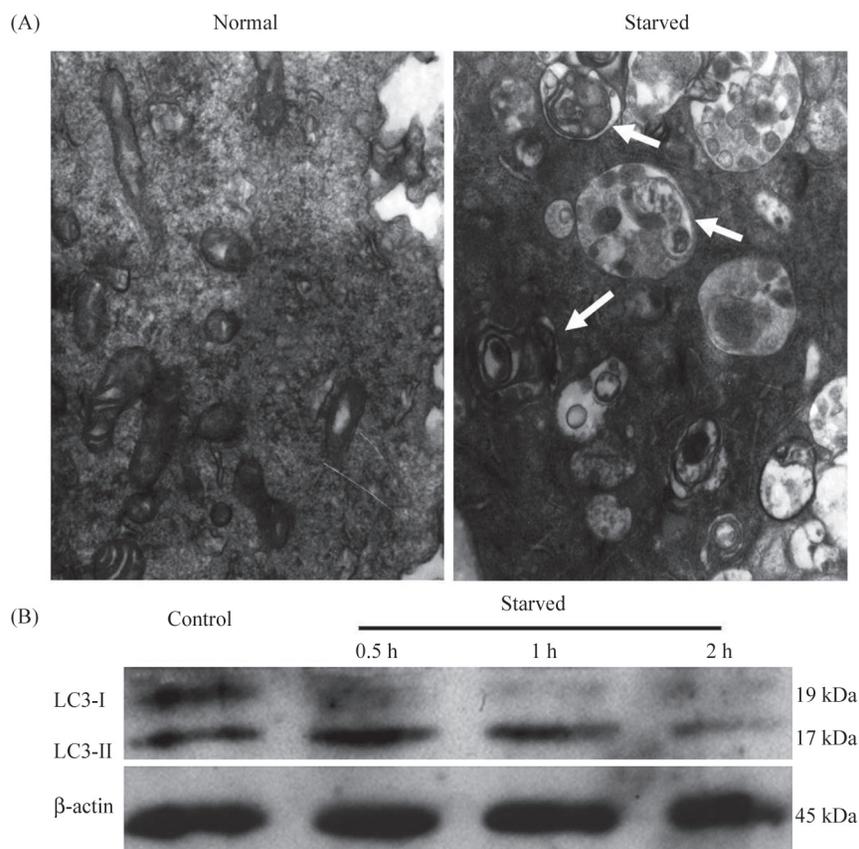


图1 饥饿诱导HeLa细胞发生自噬

A: HeLa细胞在HBSS中培养2小时后, 透射电镜法检测自噬体的形成(20 000 \times); B: HeLa细胞在HBSS中培养不同时间后, Western blot检测LC3-I的表达以及其转化为LC3-II的情况。 β -actin为对照。

Fig.1 Autophagy is induced in starved HeLa cells

A: representative transmission electron microscopy images of the normal and starved HeLa cells. The formation of autophagic vacuoles was indicated by arrows (20 000 \times); B: Western blot analysis of LC3 expression in HeLa cells starved for indicated times. β -actin was probed as a loading control.

三个在自噬发生时含量明显下降的蛋白点进行后续鉴定研究(图2A), 这三种蛋白的量与正常细胞相比分别下降了68%、74%和81%(图2B)。差异蛋白质点经过LC-MS/MS质谱鉴定, 结果提示这

三个蛋白质分别为果糖二磷酸醛缩酶A (fructose-bisphosphate aldolase A, ALDOA)、GAPDH和ATP合成酶O亚基(ATP synthase subunit O, ATP5O)(表1)。

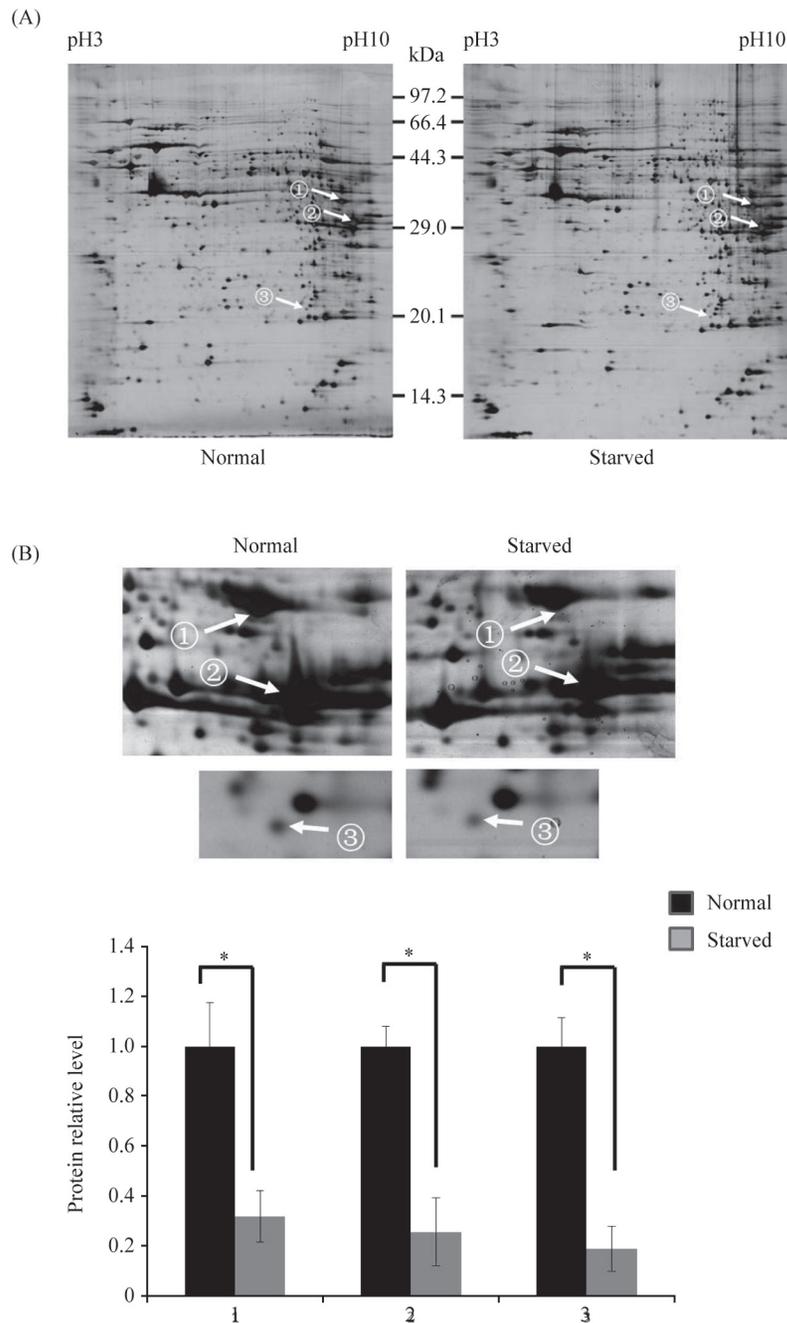


图2 双向电泳筛选HeLa细胞自噬后的差异蛋白

A: 饥饿法诱导HeLa细胞自噬后, 提取300 μg 正常或饥饿细胞的细胞质蛋白进行双向电泳, 银染后扫描, 采用2-DE图谱分析软件PDQuest7.4.0对双向图谱进行分析, 箭头所指为差异蛋白质点; B: 2DE图谱中差异蛋白点区域的局部放大以及使用PDQuest软件对差异蛋白含量进行灰度统计结果(* $P < 0.05$)。

Fig.2 Screening of differentially expressed proteins in autophagic HeLa cells

A: about 300 μg cell lysates of normal and starved HeLa cells were loaded, electrophoresed and silver stained. The arrows show the differentially expressed proteins; B: augmented figures of differentially expressed proteins and spots density calculated with PDQuest software. The data were normalized to the level of that in normal HeLa cells (* $P < 0.05$).

表1 差异蛋白质点的LC-MS/MS鉴定

Table 1 The changed protein spot identified by LC-MS/MS

序号 Spot No.	序列号 SWISS-PROT accession No.	蛋白质 Protein name	分子量/等电点 Theoretical Mw (kDa)/PI	二级质谱鉴定的肽段 MS/MS peptides sequence	与对照组的灰度比 Ratio
1	SplP04075	Fructose-bisphosphate aldolase	39.8766/8.06	GLAADESTGSIK FSHEEIAMATVTALR	0.32
2	SplP04406	Glyceraldehyde-3-phosphate- dehydrogenase	36.2246/8.73	GALQNIIPASTGAAK VPTANVSVDLTCR	0.26
3	SplP48047	ATP synthase subunit O, mitochondriale	23.377/9.97	TDPSILGGMIVR LVRPPVQVYGI EGRFS PLTTNLINLLAENGR	0.19

2.3 RT-PCR结果证实差异蛋白在mRNA水平表达下调

差异蛋白量减少的原因可能是其表达量降低,也可能是由于在自噬过程中被包裹进自噬体,然后被降解。因此,我们使用定量PCR对实验结果进行了验证。结果显示,双向电泳结合质谱分析鉴定得到的三种蛋白的mRNA水平都发生了下降。与正常细胞相比,ALDOA、GAPDH和ATP5O的mRNA水平分别降低了35.3%、35.7%和29.3% (图3),这个结果一方面说明我们双向电泳的结果是可靠的,另一方面说明这些差异蛋白量的减少与其mRNA水平的下调有关。

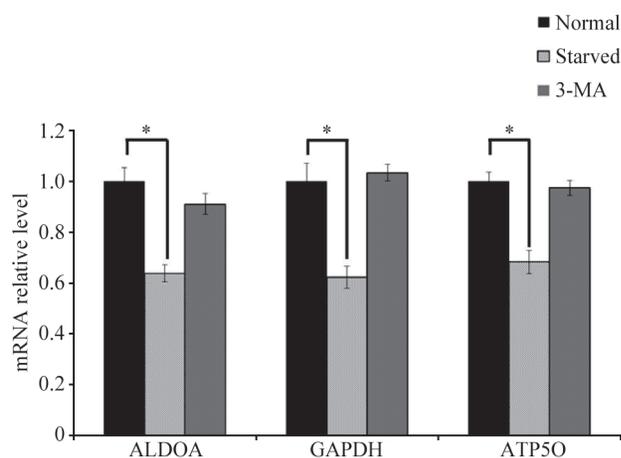


图3 差异蛋白的mRNA验证

提取正常与饥饿以及3-MA预处理后再行饥饿的HeLa细胞总RNA,反转录后使用SYBR试剂盒检测差异蛋白的mRNA水平(* $P < 0.05$)。

Fig.3 The mRNA validation of changed proteins

The total RNA of starved HeLa cells with or without 3-MA pretreatment and normal HeLa cells were extracted and reverse transcribed. The mRNA level of changed proteins were analyzed with SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Perfect Real Time Kit (TaKaRa) according to the manufacture's instruction. The data were expressed as mean \pm SEM ($n=3$), * $P < 0.05$.

由于饥饿可以诱导细胞发生多种生理反应,为了检测这三种蛋白量的降低是否与自噬相关,我们使用自噬抑制剂3-MA对HeLa细胞进行预处理后再进行饥饿诱导,然后检测mRNA的表达情况,结果发现,3-MA处理后,三种mRNA水平都与正常细胞接近,而明显高于饥饿诱导的细胞(图3)。这个结果证明,ALDOA、GAPDH和ATP5O蛋白表达量的降低应该是由于细胞发生自噬引起的,有可能参与了自噬的发生及调控。

3 讨论

人们已经比较清楚地知道,自噬与机体免疫、感染、炎症、肿瘤、心血管病、衰老和神经退行性疾病等重要的机体生理过程以及重大疾病密切相关^[2]。虽然随着ATG分子的鉴定以及对其功能的研究,自噬的分子机制已经得到了部分阐释,但对其的了解还远远不如我们对细胞凋亡等其他生理过程透彻。这也制约了我们对自噬在各种相关疾病中的作用机制的研究,以及以其为干预目标来影响这些疾病的进程。

近年来,多个课题组选择蛋白质组学方法来寻找参与到自噬发生及调节过程的蛋白分子^[12]。2010年,Behrends等^[13]发现并鉴定了409个可能参与自噬调节的蛋白以及751对可能发生的相互作用。Gao等^[14]为了研究自噬体膜的形成,分离了LC3阳性的自噬体并对其蛋白组分进行了研究。Bertin等^[19]用CpG-ODN诱导肿瘤细胞自噬后进行蛋白质组学研究,鉴定了多个可能参与到这一过程的蛋白分子。

本研究中,我们使用饥饿法处理HeLa细胞2 h后,透射电镜观察检测到自噬体的形成,Western blot法检测到了LC3-I的转换。这两种方法是国际上用

来检测及评估自噬的金标准。这说明我们成功的建立了饥饿法诱导HeLa细胞自噬的研究模型。

分离到正常细胞以及自噬细胞的细胞质后,我们使用双向电泳结合质谱的方法对这个过程中发生自噬的蛋白分子进行了鉴定。结果发现GAPDH、果糖二磷酸醛缩酶A(ALDOA)以及ATP合成酶O亚基(ATP5O)三种蛋白的量发生了明显下降。其中,有文献报道CpG-ODN诱导肿瘤细胞自噬后,GAPDH的量会发生下调^[19],后两种蛋白为我们首次报道。为了进一步验证我们的结果,我们又设计了特异性引物,使用定量PCR的方法对这三种蛋白的mRNA水平进行了检测,发现这三种蛋白的mRNA水平较正常细胞明显下降。这说明,三种蛋白在胞浆中的表达水平变化至少部分是由于其转录水平发生了变化。

3-MA是一种PI3K通路抑制剂,它可以通过特异性阻断自噬体的形成来抑制自噬,被广泛用作自噬抑制剂^[20]。为了检测我们鉴定得到的三种蛋白是否与自噬相关,我们使用3-MA对HeLa细胞进行预处理后再行饥饿,之后提取其总RNA,检测三种mRNA的表达情况。结果表明,3-MA处理后,三种mRNA水平都与正常细胞接近,明显高于饥饿诱导的细胞。这说明ALDOA、GAPDH和ATP5O蛋白表达量的降低应该是由饥饿诱导的自噬引起的,它们可能参与了自噬的进程。

GAPDH可以氧化磷酸化甘油醛-3-磷酸,使糖降解产生能量。由于GAPDH在细胞中表达量很高且持续稳定,所以也被当作看家基因^[21]。Colell等^[22]在研究不依赖caspase的细胞死亡(caspase independent cell death, CICD)时发现,GAPDH是CICD的一种关键性调节因子,GAPDH一方面可以增强细胞糖酵解水平,另一面可以进入细胞核执行转录调控的功能,ATG12这一重要的自噬基因可能受GAPDH的调控。这样通过调节细胞能量代谢以及自噬水平,GAPDH可以抑制细胞发生CICD。另外,CpG-ODN诱导肿瘤细胞自噬后,GAPDH的量会发生下调,这与我们的结果一致^[19]。

ALDOA是糖酵解过程中的一个重要酶分子,可以将1,6-二磷酸果糖分解成甘油三磷酸和磷酸二羟丙酮。ATP合成酶位于线粒体内膜,是生物体能量转换的核心酶。由位于膜外侧的F1亚基和跨膜蛋白FO组成。FO亚基可以将跨膜质子驱动力转换成扭力矩,驱动F1亚基组成的“转子”旋转。目前还

没有这两种酶与自噬相关关系的报道。

我们鉴定得到的这三种蛋白都与细胞物质代谢与能量合成密切相关。我们推测细胞在营养物质匮乏的条件下,可能会降低这些代谢相关酶的表达,以节约有限的资源,同时,这些代谢关键酶的减少可能会进一步诱导细胞发生自噬,其与自噬的关系及相关机制还有待进一步研究。

我们感谢高等学校蛋白质组学研究院何大澄教授、肖雪媛教授、黄凌云老师在蛋白质质谱鉴定方面提供的帮助。

参考文献 (References)

- 1 Meijer AJ. Autophagy research: Lessons from metabolism. *Autophagy* 2009; 5(1): 3-5.
- 2 Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(1): 3-13.
- 3 Melendez A, Talloczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 2003; 301(5638): 1387-91.
- 4 Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007; 78: 217-45.
- 5 Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: Dynamics of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett* 2009; 278(2): 130-8.
- 6 Ito H, Aoki H, Kuhnel F, Kondo Y, Kubicka S, Wirth T, *et al.* Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(9): 625-36.
- 7 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.
- 8 Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 1962; 12: 198-202.
- 9 Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 2003; 5(4): 539-45.
- 10 Kanki T, Klionsky DJ. The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Mol Microbiol* 2010; 75(4): 795-800.
- 11 Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Dong Z. Autophagy: Molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(2): F244-56.
- 12 Zimmermann AC, Zarei M, Eiselein S, Dengjel J. Quantitative proteomics for the analysis of spatio-temporal protein dynamics

- during autophagy. *Autophagy* 2010; 6(8): 1009-16.
- 13 Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 2010; 466(7302): 68-76.
- 14 Gao W, Kang JH, Liao Y, Ding WX, Gambotto AA, Watkins SC, *et al.* Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment. *J Biol Chem* 2010; 285(2): 1371-83.
- 15 Kohler K, Brunner E, Guan XL, Boucke K, Greber UF, Mohanty S, *et al.* A combined proteomic and genetic analysis identifies a role for the lipid desaturase Desat1 in starvation-induced autophagy in *Drosophila*. *Autophagy* 2009; 5(7): 980-90.
- 16 娄雅欣, 陈丽娜, 钟丽君, 杨彬, 彭嘉柔. 应用蛋白质组学技术初步分析HeLa细胞饥饿诱导的自噬相关蛋白. *分析测试学报* 2007; 26(5): 638-41.
- 17 Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3(6): 542-5.
- 18 Kuma A, Matsui M, Mizushima N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: Caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* 2007; 3(4): 323-8.
- 19 Bertin S, Samson M, Pons C, Guignon JM, Gavelli A, Baque P, *et al.* Comparative proteomics study reveals that bacterial CpG motifs induce tumor cell autophagy *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7(12): 2311-22.
- 20 Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(3): 761-71.
- 21 Song S, Finkel T. GAPDH and the search for alternative energy. *Nat Cell Biol* 2007; 9(8): 869-70.
- 22 Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, *et al.* GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 2007; 129(5): 983-97.

Several Catabolic Proteins are Down-regulated in Starvation Induced Autophagy in HeLa Cells

Dan-Hui Liu, Shan-Shan Han, Lu-Yun Li, Ye-Min Qu, Hong Lin, Jie Wen, Jian-Xin Lü*

(Institute of Molecular & Cellular Medicine, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Institute of Proteomics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Autophagy is a conserved catabolic pathway that plays an important role in maintaining cell homeostasis by degrading damaged cytosolic components and redundant proteins in eukaryotic cells. Autophagy plays a protective role against various human diseases, including cancer. Although many autophagy related proteins have been investigated, there are many unsolved problems about the mechanism of the occurrence and regulation of autophagy. In this study, autophagy was induced in HeLa cells by starvation. The occurrence of autophagy was confirmed with transmission electron microscopy and LC3-I conversion, which are hallmarks of autophagy. We used 2-DE coupled with LC-MS/MS to analyze the differential protein expression in starved HeLa cells. We found fructose-bisphosphate aldolase A, GAPDH and ATP synthase O subunit were significantly decreased in starvation-induced autophagy. This was confirmed with real-time quantitative PCR. To address if these proteins were directly related with autophagy, HeLa cells were pretreated with the autophagy inhibitor 3-MA, and the total RNA were extracted for real-time quantitative PCR after starvation. The data revealed 3-MA can rescue the mRNA decrease of fructose-bisphosphate aldolase A, GAPDH and ATP synthase O subunit. Taken together, our results indicate that these proteins may be involved in the regulation of autophagy, and the mechanism need further investigation.

Key words autophagy; starvation; 2-DE; Mass spectrum; differential proteins

Received: December 23, 2010 Accepted: March 2, 2011

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090378), the Foundation of Department of Education of Zhejiang Province (No.20070909), the Foundation for Zhejiang Provincial Innovation Vector Constructed with Famous Colleges (No.2008E80046) and an Intramural Grant from Wenzhou Medical College (No.QTJ06011)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689771, E-mail: jxlu313@163.com