

自噬在细胞冷应激中的作用研究

胡春兰^{1,2} 陈良标^{1,2} 胡成枫^{1,2} 韩兵社^{1,2*}

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

²上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要 有研究证明, 自噬在生物应对多种不良环境过程中发挥着重要作用, 但是自噬在细胞应对低温环境过程中的功能研究却甚少。该研究给予HeLa细胞(人宫颈癌细胞)不同程度的急性冷刺激, 探讨此过程中自噬的发生和功能。将HeLa细胞培养于37 °C(对照组)或经不同程度的低温(10、18、28 °C)处理, 观察对照组与低温处理组细胞表达自噬标志物EGFP-LC3(enhanced green fluorescent protein-microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)的变化, 以监测自噬小体形成。结果显示, 低温处理诱导HeLa细胞发生不同程度的自噬现象: 10 °C处理3~6 h的细胞内的自噬小体增多且体积增大, 18 °C处理的细胞内的自噬小体在3 d时最明显, 28 °C处理的细胞始终维持在较低水平。研究还发现, HeLa细胞在自噬减弱消失的同时发生细胞死亡, 自噬特异性的化学抑制剂Bafilomycin A1处理可以进一步降低不同程度的低温胁迫下HeLa细胞的存活率, 表明自噬在细胞低温应激过程中发挥着保护作用。Bafilomycin A1处理伴随有细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增高, 提示低温胁迫下自噬可能通过调控细胞内ROS水平来保护细胞。该研究结果表明, 自噬在真核细胞冷应激中具有重要作用。

关键词 自噬; 冷应激; 活性氧; HeLa细胞

The Role of Autophagy in the Cold-Stress Response in HeLa Cells

Hu Chunlan^{1,2}, Chen Liangbiao^{1,2}, Hu Chengfeng^{1,2}, Han Bingshe^{1,2*}

(¹College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; ²Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Although it has been reported that autophagy is required for organisms surviving various unfavorable environmental conditions, the detailed role of autophagy under cold stress is still unclear. In this study, we investigated the role of autophagy under cold stress in HeLa cells (human cervical adenocarcinoma cells). A putative autophagosome marker EGFP-LC3 (enhanced green fluorescent protein-microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) was used to monitor the process of autophagy in HeLa cells cultured at 37 °C (control) or cold stress conditions (10, 8, 28 °C). The results showed that cold stress caused autophagy in HeLa cells in time- and temperature-dependent manners: substantial autophagosome accumulation was observed during 3-6 h at 10 °C, while the most significant autophagy was detected after 3 d at 18 °C, and only very low level of autophagosome formation was observed at 28 °C. Further study showed that HeLa cells underwent decreased cell viability following the turnover of autophagosome, and Bafilomycin A1 treatment enhanced cold stress-induced decrease of cell viability, indicating a protective

收稿日期: 2016-03-16 接受日期: 2016-07-22

国家自然科学基金重点项目(批准号: 31130049)、上海市自然科学基金项目(批准号: 13ZR1419500)和上海市教委水产高峰学科项目资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-61900473, Email: bs-han@shou.edu.cn

Received: March 16, 2016 Accepted: July 22, 2016

This work was supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.31130049), Natural Science Foundation of Shanghai (Grant No.13ZR1419500) and Shanghai Municipal Education Commission Peak Aquatic Disciplines

*Corresponding author. Tel: +86-21-61900473, E-mail: bs-han@shou.edu.cn

网络出版时间: 2016-09-13 15:58:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160913.1558.010.html>

role of autophagy in HeLa cells against cold stress. Bafilomycin A1 treatment also enhanced cold stress-induced production of intracellular production of reactive oxygen species (ROS), indicating the involvement of ROS in the protective function of autophagy under cold stress. Our data suggested the essential role of autophagy in HeLa cells under cold stress.

Keywords autophagy; cold stress; ROS; HeLa cells

自噬是真核生物特有的一种通过包裹胞内物质,与溶酶体融合并降解细胞内多余的细胞器及物质的生理现象^[1-2]。自噬在真核生物中高度保守,主要由信号转导、细胞质隔离、囊泡形成、囊泡与溶酶体/液泡进行靶向对接和融合、在溶酶体内进行分解这几个基本步骤组成。真核细胞通过自噬获得氨基酸和其他小分子物质,这些物质重新被细胞利用或者用于产生能量^[3-4]。自噬主要分为微自噬(microautophagy)、巨自噬(macroautophagy)及分子伴侣介导的自噬(chaperon-mediated autophagy)这三种类型^[5],它们的主要功能也都已阐述清楚,研究的最为透彻的是巨自噬,也是本研究的主要对象,以下皆统称为自噬。自噬的主要功能之一是保护细胞,在细胞受到外界应激性死亡压力时,细胞通过启动自噬来保护细胞,降解细胞中冗余或者损伤的细胞器及蛋白质,以维持细胞的存活。

检测自噬的方法在不断发展,除经典的电镜检测外,另一种基于微管相关蛋白(microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3)转换的可动态监测自噬的方法被广泛接受。自噬发生时,LC3I会发生剪切修饰形成LC3II,LC3II特异地定位在自噬小体的膜上,并在自噬溶酶体中降解,故LC3可以特异标记自噬小体,成为自噬的一个标志蛋白^[6]。目前对于自噬的研究主要集中在疾病、程序性凋亡及饥饿应激等方面,对于自噬在冷应激过程中的功能研究并不多。本研究通过EGFP-LC3特异地标记自噬小体的发生^[7],在给予HeLa细胞急性冷刺激后,监测自噬发生的情况,进而研究自噬与低温胁迫之间的联系,确定自噬在低温应激中发挥的功能。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一种具有高活性的小分子化合物,是细胞内很多生理过程的正常代谢产物,细胞膜、线粒体、内质网及过氧化物酶都是ROS的主要来源^[8-9]。作为一种信号分子,ROS在生物体内的很多信号转导以及维持内环境稳定等方面起着重要作用。研究表明,在很多环境压力下,ROS的含量会显著上升,进而造成细胞结构性损伤^[10]。

很多基于饥饿、病原体感染及缺氧等压力胁迫下的研究表明,ROS会诱导细胞发生自噬^[11-12],而由ROS诱导的自噬又会反过来清除细胞内的ROS^[13-14]。因此,我们也在本文中探讨了低温应激下自噬和ROS的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

pEGFP-LC3(#11546)质粒购自Addgene公司。HeLa细胞购自ATCC(American Type Culture Collection)。TurboFect Transfection Reagent(#R0531)购自Thermo Fisher Scientific公司。质粒中量抽提试剂盒购自美国Omega公司。鼠抗GAPDH、羊抗鼠二抗购自杭州华安生物技术有限公司。兔抗LC3、羊抗兔二抗购自Cell Signaling Technology公司。增强型化学发光试剂(ECL)购自Thermo Fisher Scientific公司。凝胶电泳成像系统购自Bio-Rad公司。激光共聚焦显微镜-LSM 710购自Zeiss公司。Bafilomycin A1购自Thermo Fisher Scientific公司。LysoTracker[®] Red DND-99购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养、转染和处理

HeLa细胞采用DMEM高糖培养基(Hyclone公司),含10%胎牛血清(Gibco公司)及1%的双抗(Hyclone公司),37 °C、5% CO₂及95%湿度进行培养。低温处理分别在28、18、10 °C进行,其他条件不变。

pEGFP-LC3质粒中量提取按照Omega中量抽提试剂盒进行提取。转染前1 d将盖玻片灭菌后放入24孔板中,将野生型HeLa细胞(wide type, WT)接种到加有盖玻片的24孔板中进行细胞爬片。第2 d根据TurboFect Transfection Reagent说明进行pEGFP-LC3的转染,转染24 h后换上新鲜培养基。将24孔板置于荧光倒置显微镜下观察,任意选取15个视野进行观察,结合明场与荧光暗场统计细胞的表达效率。

Bafilomycin A1阻断实验:取生长状态良好的野生型HeLa细胞(wide type, WT),实验前1 d按65%汇合度接种细胞于6孔板,37 °C培养。第2 d加入0.05 nmol/L的Bafilomycin A1预处理1 h,放入10、18、

28 °C培养。

1.3 自噬检测

1.3.1 荧光共定位 HeLa细胞pEGFP-LC3转染24 h后, 换上新鲜培养基后将4个24孔板分别放置于10、18、28、37 °C培养。在低温处理3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d后, 每个温度各取1个孔, 吸去培养基, 用1 mL PBS洗涤, LysoTracker[®] Red DND-99处理细胞, 用1 mL PBS洗涤后, 倒置在加有10 μL封片剂的载玻片上。封片0.5 h后在荧光共聚焦显微镜下观察EGFP-LC3和LysoTracker[®] Red DND-99的信号和共定位情况。每个温度下任取20个视野, 统计明暗视野下EGFP-LC3的聚集情况。

1.3.2 Western blot 收集细胞, 吸去培养基, 3 mL预冷的PBS洗涤1遍, 加入细胞裂解液, 用细胞刮板将细胞刮下后收集于EP管中, 置于冰上。放入超声破碎仪中超声5 min(超声5 s停5 s)。超声结束后, 4 °C 12 000 r/min离心10 min取上清。用Bradford法测定蛋白质浓度, 加入SDS-PAGE上样缓冲液后煮沸10 min, 取30 μg蛋白质进行Western blot。Western blot采用12%的SDS-PAGE胶进行电泳, 湿转法转膜后用LC3及GAPGH的一抗及相应二抗进行孵育检测蛋白质水平。

1.4 存活率检测

存活率检测采用台盼蓝计数法进行测定: 胰蛋白酶消化细胞后, 用培养基终止反应, 然后与同时收集培养基中的悬浮细胞合并。收集细胞于10 mL离心管中, PBS洗涤2次, 再用500 μL PBS重悬细胞。取90 μL细胞悬液于1.5 mL EP管中, 加入10 μL台盼蓝染液, 混匀, 染色3 min后用血球计数板对死细胞及活细胞进行计数, 存活率=活细胞数/(死细胞数+活细胞数)。

1.5 ROS检测

细胞处理结束以后, 胰蛋白酶消化收集细胞, 培养基中止反应, PBS洗涤2次并重悬到相应的EP管中, 加入1 mL DCFH-DA(Sigma公司)探针稀释液(终浓度20 μmol/L), 在各自处理温度(37、28、18、10 °C)孵育30 min。离心去除探针液, 用PBS洗3次, 加入500 μL PBS重悬细胞, 用Accuri C6流式细胞仪(BD Biosciences公司)检测ROS含量。

2 结果

2.1 低温胁迫下HeLa细胞自噬的检测

为了检测低温下HeLa细胞自噬发生的情况, 我

们使用了瞬间表达EGFP-LC3的HeLa细胞。图1A和图1B显示, EGFP-LC3正常生长的细胞内绿色荧光呈现弥散状; 而在低温胁迫6 h时, EGFP-LC3荧光点发生聚集, 形成绿色的自噬荧光点, 标记了自噬小体的发生。这些绿色的EGFP-LC3荧光点部分和LysoTracker Red的信号发生了重叠和共定位, 表示自噬小体和溶酶体的融合。

同时, Western blot结果显示, HeLa细胞内源性的LC3蛋白质在低温刺激下LC3I转变成LC3II的进程加快(图1C)。这些结果表明, HeLa细胞在低温胁迫下发生了自噬。同时, 我们还比较了不同程度的低温环境下自噬发生的情况。结果显示, 在低温处理6 h时, 28 °C处理的细胞未产生明显自噬, 10 °C处理的细胞内自噬荧光点明显多于18 °C处理的细胞(图1A~图1C), 说明低温下HeLa细胞自噬的强度与温度密切相关。

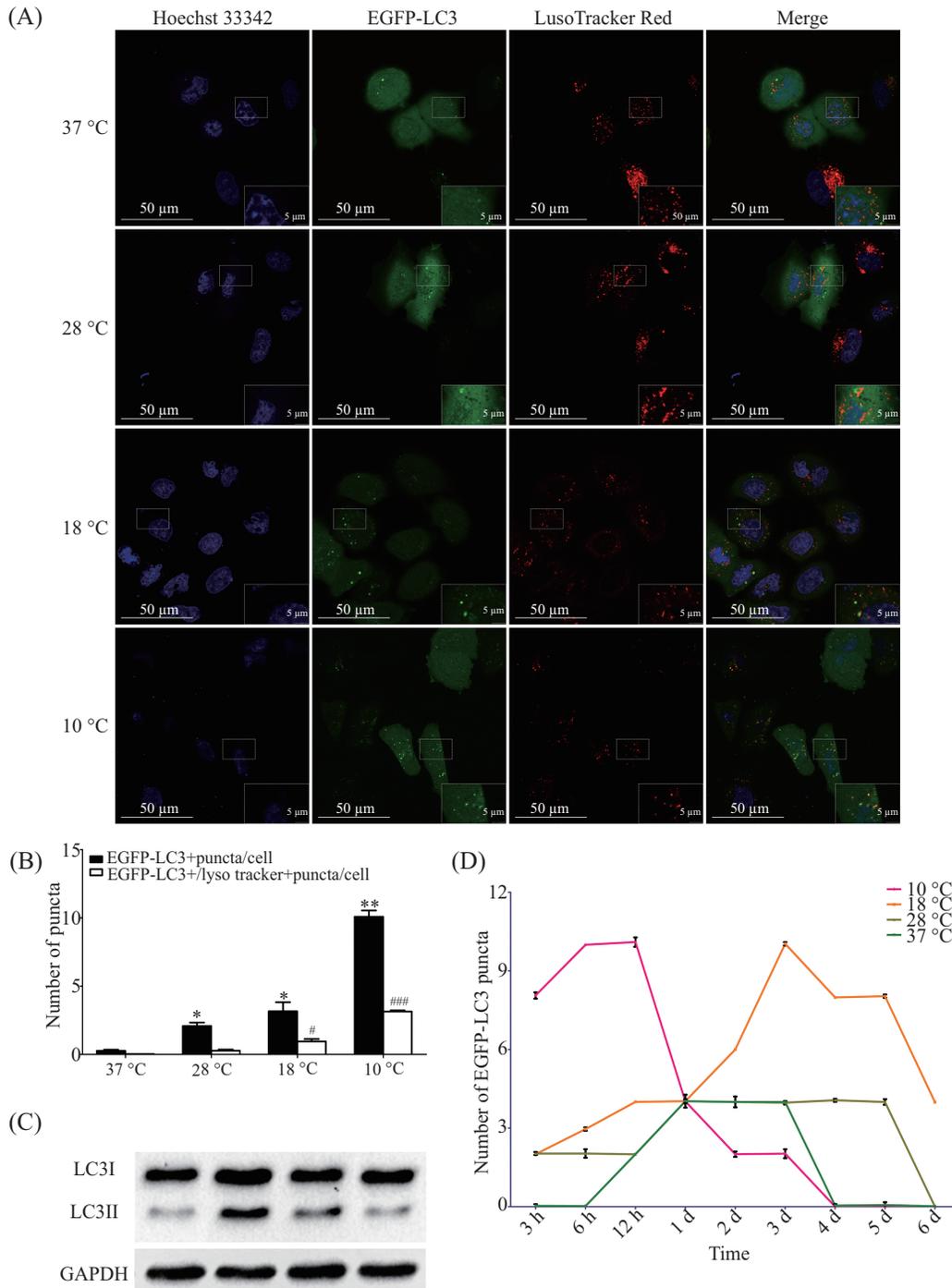
为了确定低温胁迫下自噬随时间及温度的变化趋势, 我们实时监测了自噬小体的状态(图1D): 在10 °C下细胞在3 h时就发生很强的自噬, 在6 h至12 h时到达一个巅峰, 随之开始下降, 在3 d时细胞开始出现空泡, 4 d细胞的自噬荧光点基本消失, 而此时细胞开始发生皱缩并死亡。18 °C培养的细胞也在3 h出现自噬, 但它的自噬强度远没有10 °C强, 自噬呈现缓慢增长的趋势, 在3 d达到最高, 紧接着开始缓慢下降, 在4 d时出现空泡。28 °C培养下的细胞内的自噬始终维持在较低水平, 并未出现显著增高。

2.2 急性冷刺激下细胞存活状态的检测

上述结果显示, 低温可以诱导细胞发生自噬, 我们通过台盼蓝染色的方法监测了低温状态下细胞的存活状况。结果发现, 不同低温培养条件下细胞存活率都有下降, 温度越低, 存活率下降越快(图2)。10 °C培养下的细胞在3~4 d时存活率开始快速下降, 而此时细胞内的自噬水平已经显著下调(图1D)。这些结果提示, 细胞自噬的发生和细胞存活率可能有着一定的因果关系。

2.3 自噬在细胞受到急性冷刺激时的功能

由于同时有报道在不同条件下自噬可以抑制或者促进细胞死亡, 为了确定细胞受到低温胁迫时自噬的生物学功能, 我们使用自噬抑制剂Bafilomycin A1研究了低温条件下自噬对于细胞死亡的影响。Bafilomycin A1通过阻断自噬小体与溶酶体的结合, 进而阻断自噬。由图3可见, 37 °C培养的HeLa细胞

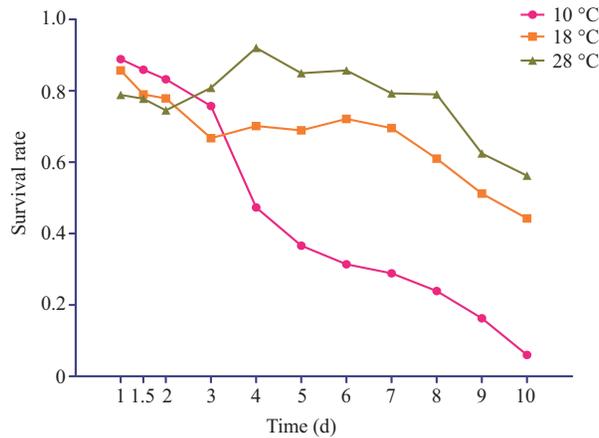


A: pEGFP-LC3转染后37 °C正常培养的HeLa细胞, 未观察到明显的自噬。在处理6 h的细胞中, 可看到10 °C自噬荧光点非常多且明显, 18、28 °C的自噬荧光点存在但较少。B: 直方图为37、28、18、10 °C下处理6 h后, 以单个细胞内的平均荧光点的个数作为标准, 每个样品计算300个细胞内自噬荧光点以及共定位点的平均值。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与37 °C EGFP-LC3+组比较; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与37 °C EGFP-LC3+/lyso tracker+组比较。C: 野生型HeLa细胞在37、28、18、10 °C下处理6 h, 对于内源性自噬特异蛋白LC3的Western blot检测。D: 对37、28、18、10 °C这四个温度培养的细胞的自噬强度统计。自噬强度以单个细胞内的平均自噬荧光点的个数作为标准, 每个样品计算300个细胞内自噬荧光点的平均值。

A: EGFP-LC3 expressing HeLa cells were cultured at 37, 28, 18, 10 °C for 6 h respectively, then cells were stained with LysoTracker Red/Hoechst 33344 and observed under Zeiss LSM 710 confocal fluorescence microscope. B: numbers of green puncta (autophagosomes) and yellow puncta (autolysosomes) per cell were counted, $n = 300$ cells per sample. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 37 °C EGFP-LC3+ group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ compared with 37 °C EGFP-LC3+/lyso tracker+ group. C: wild type HeLa cells were cultured at 37, 28, 18, 10 °C for 6 h respectively, whole cell lysates were subjected to Western blot using antibody against LC3, GAPDH was used as loading control; D: EGFP-LC3 transfected cells were cultured at indicated temperatures for indicated times, and autophagy was observed. Autophagy intensity was measured via average number of fluorescence puncta per cell.

图1 HeLa细胞低温环境下自噬的发生

Fig.1 Monitoring autophagy in HeLa cells under cold stress



对10、18、28 °C培养下的细胞在1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d的时候对细胞的存活率进行统计。

HeLa cells were cultured at indicated temperatures for indicated times, then cell survival was determined by trypan blue exclusion assay.

图2 台盼蓝染色统计细胞的存活率

Fig.2 Survival rate of cells determined by trypan blue exclusion assay

经0.05 nmol/L Bafilomycin A1处理后, 存活率没有变化, 而经低温及Bafilomycin A1处理后, 细胞内的自噬小体和溶酶体的荧光共定位信号显著下降。10 °C培养细胞4 d、18 °C培养细胞3 d和28 °C培养细胞13 d, 细胞的存活率在Bafilomycin A1处理和未处理细胞之间都出现了显著性差异, 自噬阻断的细胞的存活率明显低于未阻断的细胞。这些结果提示, 在低温下, 自噬对于细胞是起保护作用的。

2.4 自噬与ROS之间的相互关系

在某些外界压力胁迫下, 细胞内的ROS水平显著上调, 造成生物大分子和细胞器损伤, 最后导致细胞死亡。而饥饿诱导的自噬可以通过降低细胞内ROS水平来保护细胞。在此, 通过自噬抑制剂Bafilomycin A1阻断自噬, 来检测自噬对于低温下细胞内的ROS生成的影响。由图4可见, 低温处理后HeLa细胞内的ROS含量显著增高, 说明低温处理诱导了ROS的产生。Bafilomycin A1对于正常温度培养细胞的ROS没有显著影响, 但是在低温下, Bafilomycin A1可以在不同温度处理情况下增加ROS的产生。Bafilomycin A1可以提高18、28 °C处理多个时间点ROS的水平。在10 °C处理时, 细胞ROS产生迅速, 且水平较高, Bafilomycin A1处理主要影响早期ROS水平。这结果说明, 在低温下Bafilomycin A1使细胞内ROS水平增加, 其效果在不同温度下存在差异。

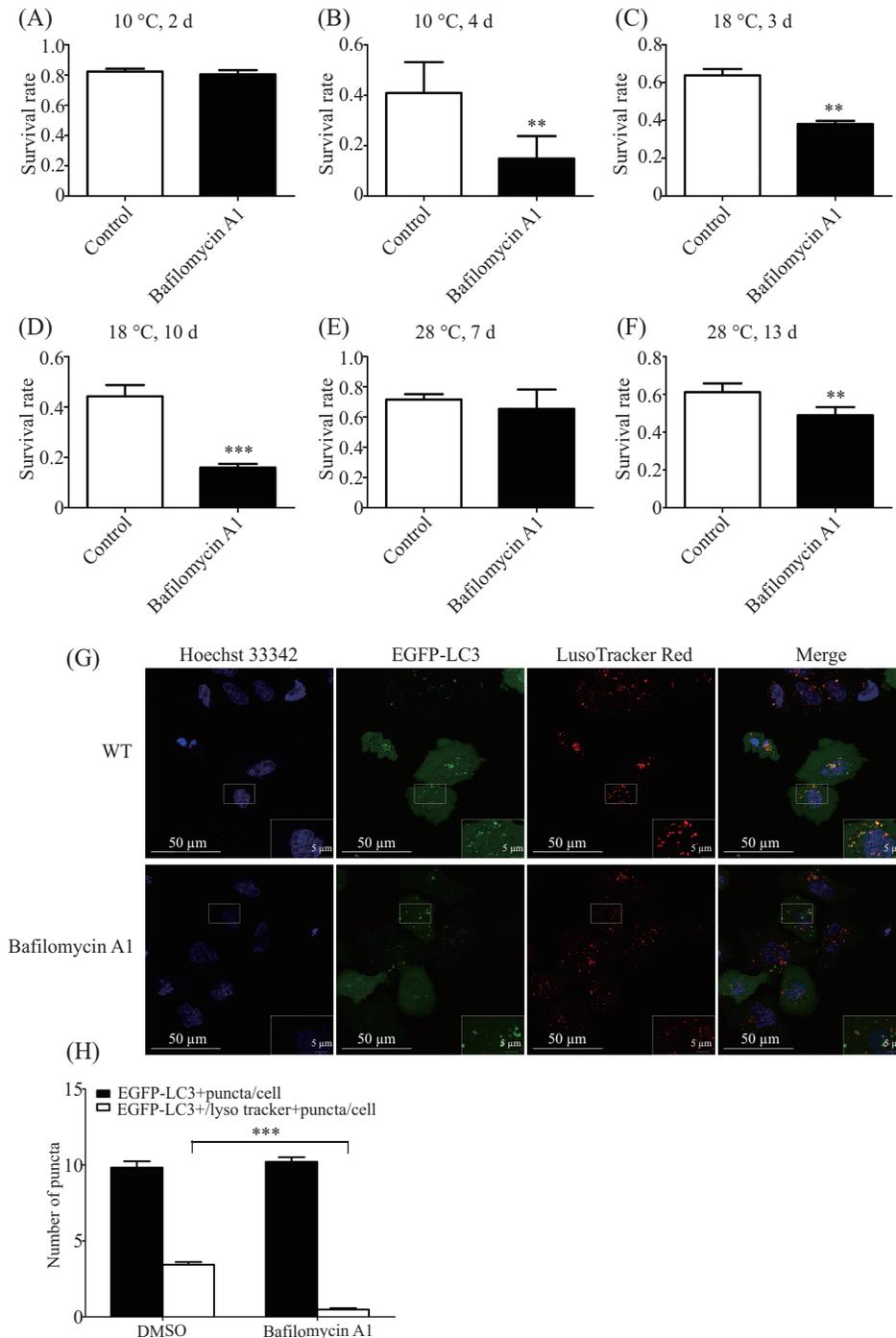
3 讨论

自噬作为一项真核生物特有的生理现象, 开始应用于不同的领域。澳大利亚学者通过对果蝇自

噬信号通路中上下游基因的敲除, 确定了自噬在果蝇程序性清除中肠中的重要作用^[15]。自噬与癌症之间的联系一直是众多学者关注的焦点, 美国学者通过在小鼠中突变自噬上游调节基因*beclin1*, 证实当*beclin1*为杂合子时, 小鼠体内的肿瘤增长更迅速^[16], 过表达*beclin1*则会抑制肿瘤的生长^[17]。这些研究阐明了自噬的新功能, 开辟了新的研究方向, 也给了我们自噬运用于低温胁迫研究的灵感。

本文对自噬的特异基因*LC3*进行标记, 通过检测自噬小体特有的*LC3II*自噬荧光点监测自噬出现的时间与强度。随后, 将HeLa细胞放置于不同温度的低温培养箱中进行培养, 模拟自然界中的急性冷刺激。在这种急性冷刺激下, HeLa细胞出现了不同程度的自噬荧光点聚集, 证实了低温可以诱导细胞产生自噬, 且温度越低, 出现自噬的时间越早, 出现的自噬程度越强。结合细胞低温下的存活率结果, 发现细胞自噬状态与细胞存活状态之间密切相关, 在低温胁迫下, 细胞先启动自噬, 当细胞内的自噬慢慢减弱并开始消失时, 细胞开始出现死亡。为了确定在低温胁迫下, 细胞内自噬所担当的角色, 使用Bafilomycin A1阻断了细胞自噬。自噬阻断后, 低温胁迫下的细胞提前开始死亡, 且细胞的存活率较未阻断的细胞出现显著性下调。这证明了细胞受到急性冷刺激时, 自噬可以保护细胞, 维持细胞的存活, 而这种保护开始减弱时, 细胞便开始死亡。

为了深入了解低温下自噬保护细胞的可能机制, 根据文献资料, 测定了细胞内的ROS^[18]。在低温下, 细胞内的ROS出现显著上调, Bafilomycin A1阻

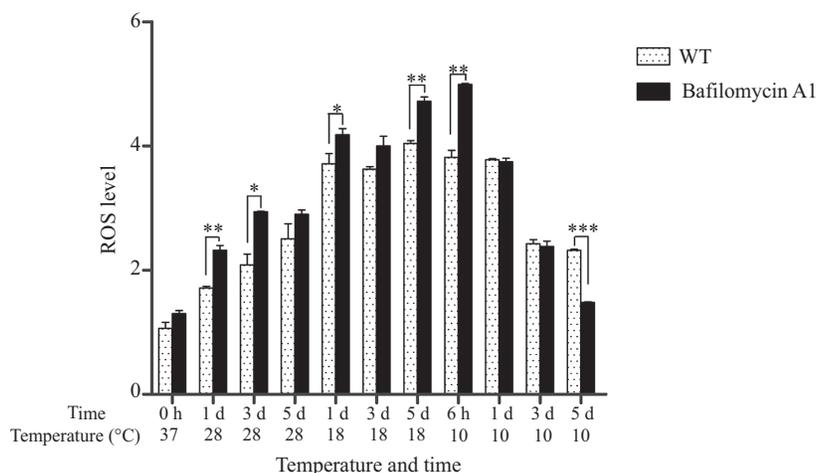


A~F: 使用0.05 nmol/L Bafilomycin A1处理HeLa细胞阻断自噬后, 在10 °C培养2、4 d(A、B), 在18 °C培养3、7 d(C、D), 在28 °C培养7、13 d(E、F), 然后台盼蓝计数法检测存活率变化, 对照组为未使用Bafilomycin A1处理。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较; G: 表达EGFP-LC3的HeLa细胞在0.05 nmol/L Bafilomycin A1处理下在10 °C培养6 h, LysoTracker Red染色后激光共聚焦荧光显微镜观察; H: 自噬小体(绿色荧光小点)和自噬溶酶体(黄色荧光小点)统计结果, 每个样品计数300个细胞。

A~F: HeLa cells were cultured at indicated temperatures for indicated times in the presence of 0.05 nmol/L Bafilomycin A1 or not, then cell survival was measured by Trypan Blue Exclusion assay. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group; G: EGFP-LC3 expressing HeLa cells were incubated at 10 °C in the presence of 0.05 nmol/L Bafilomycin A1 or not for 6 h, then stained with LysoTracker Red and Hoechst 33342 and observed under Zeiss LSM 710 confocal fluorescence microscope; H: numbers of green puncta (autophagosomes) and yellow puncta (autolysosomes) per cell were counted, $n=300$ cells per sample.

图3 自噬对低温下细胞存活率的影响

Fig.3 The effect of autophagy on viability of cells under cold stress



HeLa细胞在10、18、28、37 °C培养1~5 d, 然后通过流式细胞术检测细胞内的ROS含量。

HeLa cells were cultured at 10, 18, 28 or 37 °C for 1-5 d in the presence of 0.05 nmol/L Bafilomycin A1 or not, then ROS was measured by flow cytometry.

图4 自噬阻断后ROS含量的变化

Fig.4 The change of ROS level in HeLa cells after block of autophagy

断了细胞内的自噬后, 细胞内的ROS处于更高的水平。这些结果说明, 细胞在受到急性冷刺激后, 通过自噬来清除受损的线粒体, 进而影响细胞内的ROS水平。而低温诱导的自噬对细胞内ROS水平的影响可能参与了对细胞的保护作用, 其细节仍有待进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明, 细胞受到急性冷刺激后, 早期细胞可以发生自噬, 有利于细胞的存活。同时发现自噬抑制剂Bafilomycin A1可以增加细胞内ROS的产生, 提示自噬可能是通过降低ROS的产生参与了对细胞的保护作用。

参考文献 (References)

- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6(4): 463-77.
- Levine B. Eating oneself and uninvited guests: Autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 2005; 120(2): 159-62.
- Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J Cell Sci* 2005; 118(1): 7-18.
- Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 2003; 9(3/4): 65-76.
- Peracchio C, Alabiso O, Valente G, Isidoro C. Involvement of autophagy in ovarian cancer: A working hypothesis. *J Ovarian Res* 2012; 5(1): 22.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al*. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19(21): 5720-8.
- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* 2008; 9(4): 574-87.
- Muller F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. *J Am Aging Assoc* 2000; 23(4): 227-53.
- Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; 353(pt 2): 411-6.
- Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 794-804.
- Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 2012; 441(2): 523-40.
- Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): Implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(4): 777-90.
- Moore MN. Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 2008; 4(2): 254-6.
- Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med* 2009; 13(2): 373-87.
- Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, *et al*. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* 2010; 285(29): 22576-91.
- Xu T, Nicolson S, Denton D, Kumar S. Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2015; 22(11): 1792-802.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, *et al*. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1809-20.
- 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.