

线粒体自噬过程的超微结构分析

王静¹ 王玲² 王自彬^{2*}

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

摘要 该研究利用透射电镜技术对诱导发生自噬的哺乳动物细胞进行了观察, 发现线粒体自噬的三种亚型, 并对其超微结构特征进行了分析, 双层或多层膜包裹线粒体是线粒体自噬小体的基本形态学特征。

关键词 线粒体自噬; 自噬小体; 透射电镜; 超微结构

Ultrastructural Analysis of Mitophagy

Wang Jing¹, Wang Ling², Wang Zibin^{2*}

(¹Clinical Laboratory of Sir Run Run Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China;

²Analytical and Testing Center of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract We used transmission electron microscopy to analyze the autophagy samples of mammalian cell and investigate the ultrastructure character of mitophagy. There are three types of mitophagy. The mitochondrias packaged by double layer or multilayer membrane is the characteristic structure of mitophagy.

Keywords mitophagy; autophagosome; transmission electron microscopy; ultrastructure

自噬(autophagy)是一种细胞内的防御和应激调控机制, 能快速清除细胞内多余物质。Christian de Duve^[1]提出自噬的概念已经有半个多世纪, 近几年对自噬的研究取得了重要进展。在形态学上, 细胞发生自噬时在胞质内出现大量游离的膜性结构, 其不断扩张, 环绕包裹待降解物质形成自噬小体(autophagosome), 在透射电镜下观察到自噬小体结构是证明细胞发生自噬的金标准。自噬小体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, 随后经过胞内运输与溶酶体结合形成自噬溶酶体(autophagolysome), 降解所包裹的物质, 以实现细胞内的稳态和细胞器的更新^[2-3]。根据自噬对待降解底物的选择性不同, 自噬可分为线粒体自噬(mitophagy)、内质网自噬

(reticulophagy)、核糖体自噬(ribophagy)、过氧化物酶体自噬(pexophagy)等种类^[4-5]。线粒体自噬是指细胞受到损伤刺激时, 线粒体发生去极化, 损伤的线粒体被特异地包裹进自噬小体降解, 维持细胞内环境的稳定^[6]。现有的研究认为, 线粒体自噬可分为三种亚型, 不同亚型的形成机制及超微结构存在区别^[7]。多种人类疾病的发生都与线粒体有着密切的关系, 但是对线粒体自噬的研究尚处于起步阶段, 国内尚无对线粒体自噬超微结构的详细研究。本研究采用透射电镜技术对诱导发生自噬的哺乳动物细胞标本进行了详细的观察分析, 对线粒体自噬的发生发展过程及其三种亚型的超微结构特征进行分析, 希望能为线粒体自噬研究提供形态学上的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

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哺乳动物细胞标本。主要为两种细胞: 一种是人B淋巴瘤细胞, 干扰素 α -2a处理36 h和48 h; 另一种是人乳腺癌细胞, EBSS培养基培养2 h。对标本后期的数据采集、分析、使用情况

收稿日期: 2016-10-26 接受日期: 2017-02-07

南京医科大学科技发展基金(批准号: 2015NJMUZD008)资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-86869343-826, E-mail: wzb0909@126.com

Received: October 26, 2016 Accepted: February 7, 2017

This work was supported by the Science and Technology Foundation of Nanjing Medical University (Grant No.2015NJMUZD008)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86869343-826, E-mail: wzb0909@126.com

网络出版时间: 2017-03-27 12:25:45

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170327.1225.002.html>

均已征得送样人(南京医科大学病理系)的许可。

1.2 方法

收集细胞,将细胞固定于2.5%戊二醛溶液中4 h (4 °C), 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗4次,每次15 min。1%锇酸溶液后固定2 h, 4 °C、0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗2次,每次5 min。50%、70%、90%、100%梯度丙酮脱水各15 min。100%丙酮:树脂=1:1渗透2 h, 100%丙酮:树脂=1:2渗透2 h, 纯树脂渗透过夜, Epon 812树脂包埋, 烘箱聚合(37 °C 12 h, 45 °C 12 h, 60 °C 48 h)。超薄切片, 厚度60~70 nm(切片机型号: Ultracut R, 莱卡公司), 醋酸铀、硝酸铅染色, 上机观察(透射电镜型号: Tecnai G2 Spirit Bio TWIN, FEI公司)。

2 结果

2.1 典型的自噬小体

在诱导细胞自噬发生的早期, 在胞质内可以观察到一种游离的膜性结构, 一般呈现双层脂质膜组成的类似碗状结构(图1A), 此结构被称为吞噬泡(phagophore), 是细胞发生自噬的证据之一。然后, 吞噬泡不断延伸, 将胞质内待降解的线粒体等细胞器和部分胞质包裹入内, 形成双层膜的自噬小体(图

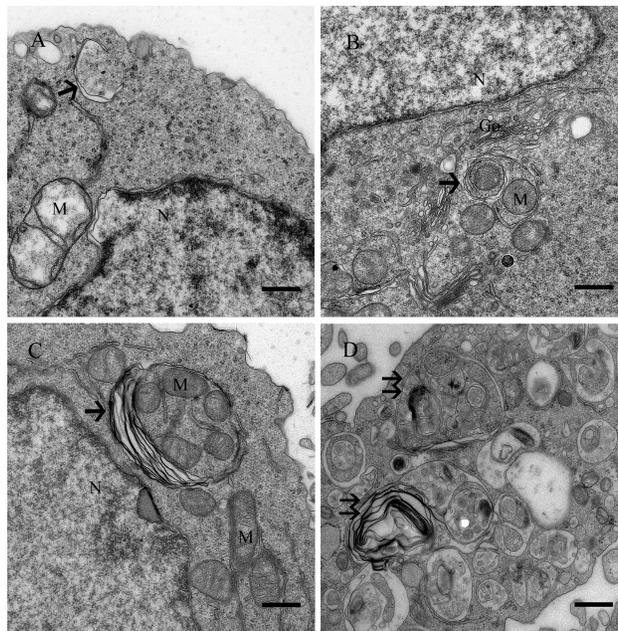
1B)。在镜下观察时, 这种包裹线粒体的自噬小体结构最为典型, 也最易与其他细胞内结构区分(图1C)。随着自噬过程的发展, 自噬小体与溶酶体融合, 形成自噬溶酶体(图1D)。自噬溶酶体形态呈现单层膜包裹待降解物质和细胞器, 包裹物质形态较难区分, 直径比自噬小体偏大。

2.2 I型线粒体自噬

I型线粒体自噬是由内质网包裹线粒体形成的自噬小体。在电镜下看到内质网的一端与线粒体外膜接触, 此接触点被称为内质网-线粒体接触位点(ER-mitochondria contact site)(图2A和图2B)。由此接触点开始, 吞噬泡不断延伸, 逐渐包裹线粒体, 形成自噬小体结构(图2C和图2D)。现有研究认为, 一些自噬相关蛋白质(Atg蛋白)在吞噬泡的某个位点聚集, 此位点被称为吞噬泡形成位点(phagophore assembly site, PAS)^[8]。我们推测, 内质网-线粒体接触位点可能也是一种PAS位点。

2.3 II型线粒体自噬

从超微结构上观察, II型线粒体自噬与I型线粒体自噬较难区分。从形态学角度分析, II型线粒体自噬发生时, 在损伤线粒体表面出现若干个游离的膜结构, 随着自噬过程的发展, 这些膜结构逐渐融合成

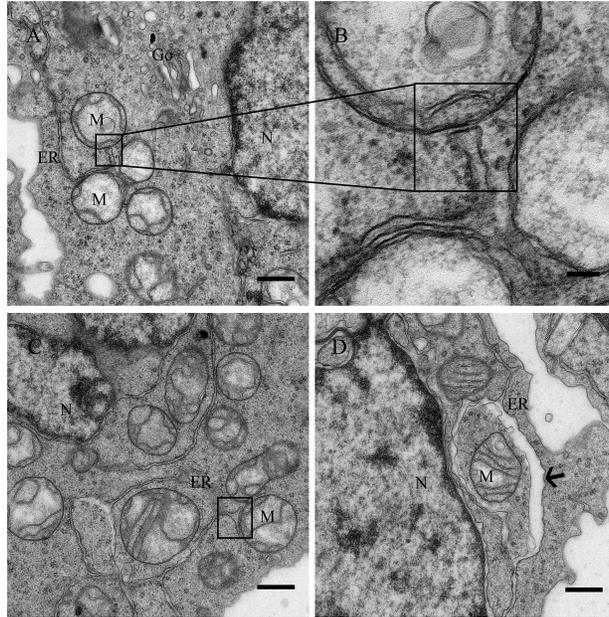


A: 吞噬泡(箭头所示); B、C: 自噬小体(箭头所示); D: 自噬溶酶体(双箭头所示)。M: 线粒体; N: 细胞核; Go: 高尔基体。标尺=500 nm。

A: a phagophore (arrow); B,C: the autophagosomes (arrows); D: an autophagolysosome (double arrows). M: mitochondria; N: nucleus; Go: Golgi complex. Scale bars=500 nm.

图1 透射电镜观察的典型自噬小体和自噬溶酶体

Fig.1 The typical structure of autophagosome and autophagolysosome under transmission electron microscopy

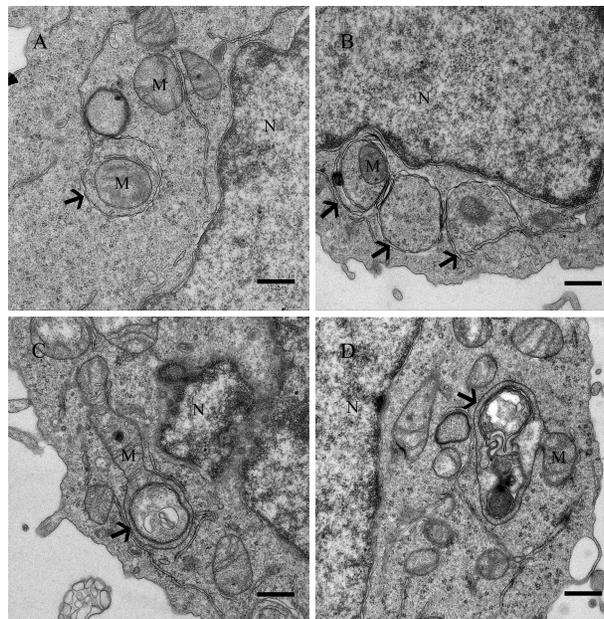


A~C: 内质网-线粒体接触位点(方框); D: 自噬小体(箭头所示)。M: 线粒体; N: 细胞核; ER: 内质网; Go: 高尔基体。A、C、D的标尺=500 nm; B的标尺=100 nm。

A-C: the ER-mitochondria contact site (boxes); D: an autophagosome (arrow). M: mitochondria; N: nucleus; ER: endoplasmic reticulum; Go: Golgi complex. Scale bars of A,C,D=500 nm; Scale bar of B=100 nm.

图2 透射电镜观察的I型线粒体自噬发生过程

Fig.2 The process of type I mitophagy under transmission electron microscopy



A、B: II型线粒体自噬小体(箭头所示); C、D: III型线粒体自噬小体(箭头所示)。M: 线粒体; N: 细胞核。标尺=500 nm。

A,B: type II mitophagy (arrows); C,D: type III mitophagy (arrows). M: mitochondria; N: nucleus. Scale bars=500 nm.

图3 透射电镜观察的II型和III型线粒体自噬

Fig.3 Type II and III mitophagy under transmission electron microscopy

一个完整的包裹线粒体的自噬小体结构(图3A和图3B)。II型线粒体自噬没有内质网-线粒体接触位点,推测II型线粒体自噬并非由内质网形成,可能是由细胞内新合成的游离膜结构形成自噬小体。

2.4 III型线粒体自噬

我们在电镜下看到损伤的线粒体内部存在一个膜包裹线粒体部分组件,形成类似自噬小体结构的囊泡,此囊泡被称为线粒体小囊泡(mitochondria-

derived vesicle, MDV), 然后MDV以出芽的方式排出线粒体。这种以MDV方式移除受损线粒体组件的方式称为III型线粒体自噬(图3C和图3D)。

3 讨论

根据细胞内底物运送到溶酶体腔的方式不同, 哺乳动物细胞的自噬可分为三种主要方式: 大自噬(macroautophagy)、小自噬(microautophagy)和分子伴侣介导自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)^[9-11]。大自噬是指胞质内的一些膜性结构通过扩张包裹变性的细胞器及部分细胞质, 形成双层或多层膜包裹的自噬小体结构。然后通过胞内运输, 自噬小体被运送到溶酶体, 自噬小体的外膜与溶酶体膜融合, 内膜及其包裹物质进入溶酶体腔, 被腔内的酸性水解酶降解。本文所指的I型和II型线粒体自噬既是一种典型的大自噬。

当前对自噬小体膜来源的研究有两种假说: 一种认为来源于内质网^[12-13]; 另一种认为来源于新合成的游离膜结构^[8]。从形态学角度分析, 可以看出I型线粒体自噬是由内质网的一端与线粒体接触, 形成PAS位点, 由此位点开始内质网膜逐渐包裹线粒体形成典型的自噬小体结构, 与内质网膜来源假说吻合^[14]。II型线粒体自噬发生时, 线粒体外形成的扁平的双层膜结构, 扩张融合包裹线粒体形成自噬小体, 与新合成的游离膜假说吻合。I型和II型线粒体自噬虽然都是由细胞质内的膜结构包裹线粒体形成自噬小体, 但是其形成过程及分子机制大不相同。有研究发现, 磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抑制剂3-MA可以阻断I型线粒体自噬发生, 但是不能阻断II型线粒体自噬^[7], 对I型和II型线粒体自噬的分子及生化区别有待深入研究。III型线粒体自噬是通过自噬作用对线粒体内的受损组件进行靶向移除, 以保证线粒体的正常功能。线粒体内膜系统形成一个小囊泡, 随后被分离出线粒体, 与溶酶体融合。III型线粒体自噬是细胞受到刺激时诱发的轻度自噬, 随着损伤的加重, 最终会导致I型和II型线粒体自噬。有研究提出, 线粒体也是一种自噬小体的膜来源, 线粒体内膜系统及外膜都可形成自噬小体, 然后以出芽的方式排出线粒体, 我们观察到的III型线粒体自噬的超微结构为这种假说提供了直接的形态学依据^[15-16]。本研究采用透射电镜技术对诱导发生自噬的哺乳动物细胞进行了详细的观察分

析, 提供了典型的自噬小体的高分辨图像, 还提供了线粒体自噬三种亚型的高分辨图像。细胞发生应激损伤时, 胞内细胞器的超微结构变化复杂, 分辨这些损伤结构与自噬小体的区别需要丰富的经验, 在电镜观察时特别要注意III型线粒体自噬和线粒体内髓鞘结构的区别。

线粒体自噬是一种选择性的降解受损线粒体的自噬过程, 对维持线粒体的正常功能起到重要作用^[17-18]。线粒体自噬不但维持细胞的正常生理功能, 还与一些细胞的发育分化密切相关, 例如促进红细胞分化^[19]。线粒体自噬还与多种细胞病理相关, 例如帕金森^[20]、活性氧(reactive oxygen species, ROS)损伤^[21]及突变mtRNA的清除^[22]等。线粒体自噬在控制线粒体质量方面发挥重要作用, 但是仍有众多谜题待解, 例如线粒体自噬的信号调控通路、损伤线粒体识别的分子机制等。随着研究的深入, 线粒体自噬必将为相关疾病的临床治疗提供新思路。

参考文献 (References)

- 1 Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res* 2014; 24(1): 9-23.
- 2 Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* 2005; 1(1): 1-10.
- 3 Klionsky DJ. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(11): 931-7.
- 4 Okamoto K. Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J Cell Biol* 2014; 205(4): 435-45.
- 5 Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* 2014; 16(6): 495-501.
- 6 Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 2013; 20(1): 31-42.
- 7 Lemasters JJ. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol* 2014; 2: 749-54.
- 8 Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 831-5.
- 9 Loos B, Engelbrecht AM, Lockshin RA, Klionsky DJ, Zakeri Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy* 2013; 9(9): 1270-85.
- 10 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451(7182): 1069-75.
- 11 Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 814-22.
- 12 Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, *et al.* Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 2013; 495(7441): 389-93.
- 13 Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. Electron tomography reveals the endoplasmic

- reticulum as a membrane source for autophagosome formation. *Autophagy* 2010; 6(2): 301-3.
- 14 Chan SN, Tang BL. Location and membrane sources for autophagosome formation—from ER-mitochondria contact sites to Golgi-endosome-derived carriers. *Mol Membr Biol* 2013; 30(8): 394-402.
- 15 Cook KL, Soto-Pantoja DR, Abu-Asab M, Clarke PA, Roberts DD, Clarke R. Mitochondria directly donate their membrane to form autophagosomes during a novel mechanism of parkin-associated mitophagy. *Cell Biosci* 2014; 4(1): 16.
- 16 Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 2010; 141(4): 656-67.
- 17 Patergnani S, Pinton P. Mitophagy and mitochondrial balance. *Methods Mol Biol* 2015; 1241: 181-94.
- 18 Maes H, Agostinis P. Autophagy and mitophagy interplay in melanoma progression. *Mitochondrion* 2014; 19 Pt A: 58-68.
- 19 Mortensen M, Ferguson DJ, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M, *et al.* Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(2): 832-7.
- 20 Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392(6676): 605-8.
- 21 Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462(2): 245-53.
- 22 Rodriguez-Enriquez S, Kai Y, Maldonado E, Currin RT, Lemasters JJ. Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes. *Autophagy* 2009; 5(8): 1099-106.