



纳米粒子在细胞自噬调控与成像研究中的应用

王则君¹, 罗耀^{1,2}, 韩玉萍^{1,2}, 陈楠^{1*}, 樊春海^{1*}

1. 中国科学院上海应用物理研究所物理生物学研究室, 上海同步辐射光源生物成像中心, 上海 201800

2. 四川大学生命科学学院, 成都 610064

*通讯作者, E-mail: chennan@sinap.ac.cn; fchh@sinap.ac.cn

收稿日期: 2016-10-27; 接受日期: 2016-12-15; 网络版发表日期: 2017-03-07

国家自然科学基金(31470970, U1332119, 31371015)和中国科学院青年创新促进会会员基金(2015211)资助

摘要 自噬是真核细胞的基本代谢过程之一, 其作用主要是降解和清除细胞内冗余或受损的蛋白质和细胞器, 循环利用胞内物质并提供能量. 自噬是细胞的一种自我保护机制, 同时也与细胞凋亡有着复杂的关联. 在病理条件下, 自噬水平的非正常上调或抑制与神经退行性疾病及肿瘤、微生物感染等疾病的发生、发展密切相关. 因此, 阐明自噬的过程和调控机理, 并据此攻克人类疾病一直是生物医药领域的研究热点. 近年来, 随着纳米技术的兴起, 纳米材料与自噬的关系也逐渐被揭示, 本文总结了国内外有关细胞自噬的最新研究进展, 并着重介绍了纳米粒子在调控自噬以及细胞自噬成像方面应用的研究进展, 并对其未来的发展方向进行了展望.

关键词 自噬, 纳米材料, 细胞成像, 纳米探针

1 引言

细胞的体内稳态需要合成代谢和分解代谢之间的平衡. 作为分解代谢的重要途径之一, 自噬主要调节细胞内长寿命蛋白质、错误折叠的蛋白质和受损细胞器的降解, 并在细胞代谢、生长发育过程中发挥重要作用. 在正常生理条件下, 细胞维持着较低的基本自噬水平, 然而在某些病理环境下, 自噬水平被异常上调或阻断, 破坏了机体的代谢平衡. 因此, 自噬与多种疾病的发生和发展都存在着直接的联系. 近年来, 细胞自噬与凋亡间的复杂关系也逐渐被揭示. 研究表明, 自噬水平的调节对于理解人体健康、长寿以及多种重要疾病的治疗有着重要的作用^[1]. 因此, 2016年诺贝尔生理学或医学奖颁给了自噬机制研究的先驱大

隅良典教授. 本文首先对自噬的定义、种类和研究意义进行了概述; 随后介绍了自噬与常见疾病的关系; 最后着重介绍利用纳米粒子调控自噬水平的研究进展, 并探讨了纳米探针在自噬成像研究方面的应用.

自噬一词源于希腊语, 意为自我(auto)吞噬(phagy). 自噬是细胞内重要的物质分解代谢过程, 是将细胞质内生物大分子和受损细胞器运输到溶酶体, 并进行降解和回收利用的细胞途径的统称. 根据生理功能和运输方式的不同进行划分, 目前已知的自噬种类主要有3种: 巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperon-mediated autophagy)^[2]. 自噬的主要细胞学过程已经得到阐明: 首先形成吞噬泡(phagophore)结构, 吞噬泡边缘融合形成可以包裹细胞质材料的、具有双层膜的囊泡结构即自噬体

引用格式: 王则君, 罗耀, 韩玉萍, 陈楠, 樊春海. 纳米粒子在细胞自噬调控与成像研究中的应用. 中国科学: 化学, 2017, 47: 778–786
Wang Z, Luo Y, Han Y, Chen N, Fan C. Nanoparticle-based regulation and imaging of cell autophagy. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 778–786, doi: 10.1360/N032016-00192

(autophagosome). 在这个阶段, 微管相关蛋白轻链3 (LC3)从细胞质形式(LC3-I)转换为磷脂酰乙醇胺(PE)标记的形式(LC3-II)并定位到自噬体外膜上. 自噬体随后与溶酶体融合形成自溶体(autolysosome), 被包裹的细胞质材料连同内膜在自溶体内被降解, 降解的产物(如氨基酸)被释放到细胞质并参与循环^[3]. 自噬水平的上调常被生理应激(如饥饿)或侵入粒子所触发, 也可以被一些药物(如雷帕霉素)刺激. 机体可以存在两种水平的自噬: 基础自噬(basal autophagy)和诱导自噬(induced autophagy). 基础自噬是指在正常的生理状态下, 细胞利用溶酶体清除失去功能的细胞器, 降解变性的蛋白质与核酸等生物大分子的过程, 对于维持细胞内正常的生理平衡至关重要(图1). 诱导自噬是指细胞在内部或外界压力条件下, 如当细胞面临饥饿、生长因子撤离、急需较高的生物能量, 或在高温、病菌感染、化学刺激下, 细胞迅速上调自噬水平, 以此来维持细胞内的营养和能量供给^[4]. 由此可见, 当机体的自噬调控出现紊乱必然导致疾病的发生.

癌症是最早在遗传学水平上被发现与自噬障碍相关联的疾病. 在多至75%的乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌病例中, 自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)之一的beclin-1都存在缺失或缺陷, 揭示自噬水平与肿瘤发生机制有着重要关联^[5]. 自噬调控缺陷与癌症在遗传上的关联性表明, 自噬极有可能是肿瘤抑制途径研究中的全新靶点. 需要指出的是, 在肿瘤发生发展

的不同阶段, 自噬所扮演的功能是会发生变化的. 例如, 在肿瘤生长后期, 癌细胞可利用自噬作用使自身在营养缺乏和缺氧的状况下得以存活. 另外, 自噬还可以保护肿瘤细胞对抗一些抗癌疗法, 并通过清除受损细胞器而保护细胞免遭凋亡. 因此, 自噬与癌症的关系是相当复杂的, 可以说是一把“双刃剑”, 而对于自噬机理研究的加深, 必然可以帮助更好地利用自噬调控来对抗癌症^[6]. 神经退行性疾病的发生往往与某些突变蛋白的聚集和积累相关. 而自噬在几种与神经退行性疾病相关的团聚突变蛋白的清除过程中发挥重要作用, 其介导的神经保护作用可能归因于毒性蛋白质的减少以及抗凋亡效应. 对于神经退行性病变, 增强自噬活力可以有效缓解病变细胞中的氧化应激压力, 继而维持神经细胞的正常生理状态^[7]. 有趣的是, Fan等^[8]发现中国的传统针灸疗法与自噬之间有着密切联系. 他们以患有帕金森症的模型小鼠作为实验对象, 发现对于小鼠的阳陵泉穴的针灸刺激可以促进小鼠大脑细胞的自噬作用, 清除一种与帕金森症密切相关的蛋白—— α 突触核蛋白, 并显著提升小鼠的运动协调能力.

2 纳米材料与自噬调控

纳米材料具有优越的物理化学性质, 如较高的比表面积、生物相容性好、容易修饰等, 因而被广泛应用于生物医学领域, 用作药物运输载体、生物传感器等. 而纳米材料与细胞自噬调控的关系也逐渐引起了研究者的关注^[9]. 纳米材料引发的自噬通常属于巨自噬. 已有研究表明, 纳米材料可以改变细胞的基础自噬水平, 而纳米材料诱导的自噬在诸如癌症、神经退行性疾病等疾病治疗方面具有较大的潜力^[10,11]. 这种现象被视为是细胞对由纳米材料带来的压力的一种适应机制, 也从侧面反映了这些纳米材料的细胞毒性(图2)^[12]. 表1中总结了部分纳米材料对自噬的影响, 下面将选取研究较多的几种纳米粒子, 针对它们与细胞自噬的关系, 分别列举说明.

2.1 量子点

由于具有优越的光学性能和纳米尺度等诸多优势, 半导体荧光量子点在生物标记和活体成像方面得到了广泛应用. 然而其细胞毒性成为了制约量子点临床应用的瓶颈, 因而受到了广泛的关注. 根据已有报

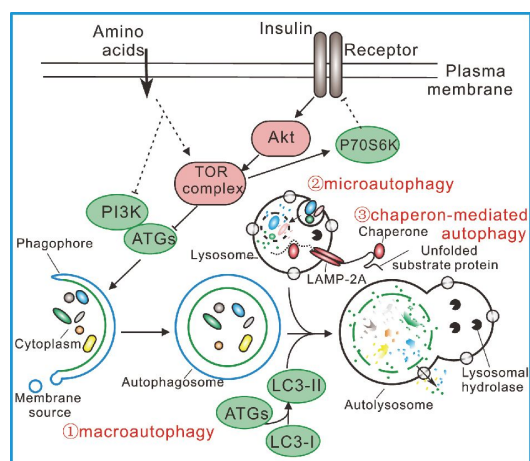


图1 细胞自噬过程与分类. 细胞具有3种不同的自噬途径: 巨自噬、微自噬、分子伴侣介导的自噬. 多种自噬相关蛋白(ATGs)和信号通路因子(mTORC、Akt等)在自噬调控中共同发挥重要作用(网络版彩图)

表 1 纳米材料对自噬影响

纳米材料种类	标记基因或通路	对机体产生的自噬相关影响
纳米金(Au)	P62, LC3	在大鼠肾上皮NRK细胞通过阻断自噬通量实现自噬体的积累, 降解自噬底物 ^[13]
量子点	LC3	在人类间充质干细胞中引发自噬, 并且与材料大小相关 ^[14]
稀土金属氧化物	LC3	四种稀土金属氧化物纳米晶体在HeLa细胞中引发自噬, 细胞出现大量空泡化, 与材料用量作用时间相关 ^[15]
纳米硅(Si)	LC3-I向LC3-II转换	增加活性氧(ROS)产生进而引发自噬和自噬细胞死亡 ^[16]
纳米银线(Ag)	LC3	自噬体在上皮, 内皮, 胃及吞噬细胞系中积累 ^[17]
纳米铁(Fe)	LC3B、Beclin-1、ATG5、p62及ERK通路	激发ERK通路, 在RAW264.7细胞中启动氧化应激并引发自噬 ^[18]
氧化铁(FeO)	LC3、ATG5、ATG12、AKT	选择性诱导A549人肺癌细胞产生自噬并引发癌细胞凋亡, 而对IMR-90正常细胞无作用 ^[19]
氧化锌(ZnO)	MAP-LC3-II、Beclin-1、Akt、PI3K、mTOR	消耗抗氧化酶诱导ROS产生, 自噬体增多并使巨噬细胞凋亡 ^[20]
氧化铜(CuO)	LC3B、Beclin-1、ATG5	诱导MCF7细胞产生自噬并抑制其体外生长 ^[21]
二氧化铈(CeO ₂)	LC3b+	通过自噬和线粒体凋亡途径在离体培养的人外周血单核细胞中诱导细胞毒性 ^[22]
二氧化钛(TiO ₂)	LC3、Beclin-1、P62	自噬积累与老鼠吸入TiO ₂ 的含量成正比 ^[23]
三氧化二砷(As ₂ O ₃)	Beclin-1、ATG6	引发U937人白血病细胞中ROS的生成并触发自噬发生 ^[24]
富勒烯(C ₆₀)	ATG5	在正常和耐药性癌细胞中通过ROS引发自噬, 并具有光增强性化学治疗效果 ^[25]

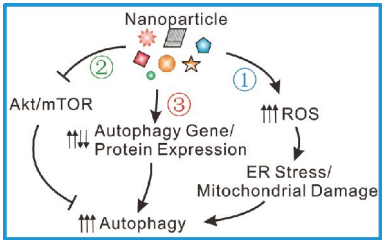


图 2 纳米颗粒引发细胞自噬. 纳米粒子进入细胞后可能从3个方面上调细胞的自噬活力, 包括: 氧化压力ROS引发的应激反应; 对于Akt/mTOR等自噬信号通路的调控; 改变自噬相关基因或蛋白的表达水平(网络版彩图)

道, 量子点可引发不同程度的细胞毒性, 表现为细胞形态改变、细胞代谢活力降低、诱导细胞产生活性氧自由基, 以及细胞自噬^[26].

Seleverstov课题组^[14]最早研究了量子点的毒性与细胞自噬的关系, 并比较了不同尺寸的量子点对于自噬活力的影响(图3(A)). 他们发现, 用于骨髓间质干细胞标记的量子点能够有效诱导细胞发生自噬. 其中用较小尺寸的QD525 nm量子点处理的间充质干细胞在72 h后就出现了自噬诱导的细胞凋亡, 其中大量的自噬体中包裹着受损的细胞器和量子点聚集. 相反, QD605 nm (粒径大小为QD525 nm的2倍)处理的间充质干细胞几乎观察不到自噬泡及受损线粒体.

Stern等^[27]通过对比相同粒径的CdSe量子点和In-GaP量子点在细胞中的毒性效应, 发现前者表现出的毒性效应较之后者高出数倍. 他们认为, 不同的元素组成可能是量子点在细胞内毒性差异的主要原因. 他们进一步比较了细胞毒性与自噬之间的关系, 明确了毒性与自噬之间的正相关性, 并将之进行了较为系统和明确的阐述.

在另一项针对量子点毒性的研究中, Kirchner等^[28]发现, 表面修饰了ZnS层的CdTe/CdS/ZnS核-壳-壳型量子点的生物相容性明显优于裸露的CdTe量子点, 提示释放的镉离子是镉量子点产生细胞毒性的主要原因. 另一方面, 在细胞内游离镉离子的浓度相同时, CdTe量子点对于细胞的毒性远大于CdCl₂. 在进一步的研究中发现, 量子点对于细胞自噬水平的提高极大地增强了细胞对于镉离子毒性的敏感性, 合理地解释了CdTe量子点与等量CdCl₂的细胞学毒性差异所在, 揭示了之前提出的量子点在细胞内发挥“纳米效应”的生物学本质. 由于自噬等代谢过程在生理和病理过程中的重要性, 这一发现还扩展了量子点可能的生物学应用. 在随后的一项工作中, Wang等^[29]发现量子点的自噬诱导效应对于帕金森疾病的体外细胞模型具有良好的保护作用. CdTe/CdS/ZnS量子点可以保护分化的小鼠PC12细胞免受1-甲基-4-苯基吡啶离子

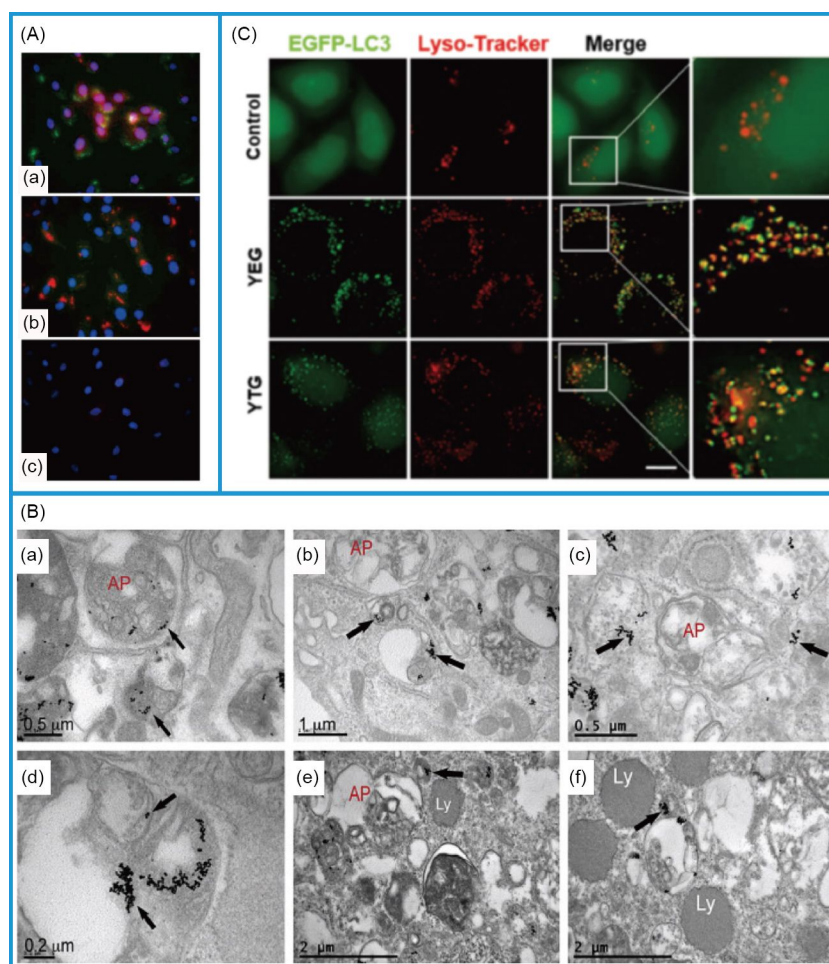


图3 纳米材料诱发自噬的成像. (A) 量子点与LC3荧光免疫染色共定位^[14]; (B) 用AuNPs处理MRC-5细胞72 h形成自噬小体及细胞结构TEM成像^[33]; (C) YEG或YTG处理HeLa细胞24 h后, 与EGFP-LC3和红色Lyso-Tracker染料的荧光协同定位^[36] (网络版彩图)

(MPP⁺)诱导的包括氧化压力上升、细胞凋亡、活力下降等细胞损伤, 同时阻碍了MPP⁺引发的 α -突触核蛋白的积累. 这项保护机制依赖于自噬效应, 进一步研究表明, beclin-1是量子点诱导自噬的关键性因子.

纳米材料引发的自噬往往与细胞的氧化应激状态相关^[11,19,30]. Markovic等^[31]将石墨烯量子点与人脑胶质瘤细胞(U251)进行共孵育并用特定波长(488 nm)的光激发石墨烯量子点后, 细胞内ROS水平急速上升. 而自噬在ROS积累的作用下产生, 并不断增强. 细胞在电镜下表现出量子点的聚集效应和自噬体的产生, 并随着共孵育时间的延长而不断加剧. 同时, 自噬标志蛋白LC3-II的表达量也显著性上升, 底物蛋白p62呈现消耗趋势. 因此, 自噬的发生与细胞毒性效应, 尤

其是细胞内ROS水平的变化具有密切的相关性. 如今, ROS引发自噬这一观点已经得到了业界认可. 综上所述, 量子点所诱发的自噬效应建立在细胞内氧化应激的基础之上, 这也是研究者对于其生物学毒性效应的关注点之一.

2.2 纳米金粒子

纳米金粒子通常被认为是生物相容性非常好的纳米材料. 然而, 近年来有报道表明, 纳米金对于细胞内的氧化压力和自噬水平有着一定的影响^[32]. Yung等^[33]用MRC-5人类肺成纤维细胞摄取纳米金, 发现纳米金引发氧化应激并伴随有自噬效应. 他们观察到纳米金处理过的细胞会逐渐形成自噬体, 同时自噬标志

蛋白LC3和ATG7的水平也发生上调. 除此之外, 处理过的成纤维细胞也产生了更多的脂质过氧化物. 通过对丙二醛蛋白(MDA)的免疫印迹分析, 证实了氧化损伤的存在. 同时, 纳米金的处理使得细胞内抗氧化压力的相关基因和蛋白的表达量显著升高(图3(B)). 该研究显示, 自噬很可能是细胞的一个自我防御机制, 它能保护细胞抵抗因氧化压力而导致的损伤.

在另一项研究中, Ma等^[13]提出纳米金其实是通过阻碍自噬体与溶酶体的融合, 阻断自噬的下游通路. 他们观察到了纳米金处理后的细胞发生自噬体的积累, 并展示了底物蛋白p62的上调, 借此说明纳米金是阻断自噬通路而非诱导自噬. 被细胞内吞的纳米金最终进入溶酶体, 引发溶酶体pH碱化进而损害了溶酶体的降解活性. 这项研究的重要性在于指出了纳米颗粒既可以诱导自噬, 又可以阻断自噬, 因为这两者都会导致LC3-II的上调和自噬体的积累, 也对自噬研究方法提出了更高的要求.

2.3 稀土金属氧化物纳米粒子

稀土金属氧化物是金属氧化物中很重要的一大类, 在纳米标记和诊疗方面有很大的应用前景. Chen等^[34]通过电子显微镜和吖啶橙染色技术发现粒径为80 nm的稀土金属氧化物Nd₂O₃能诱导NCIH460细胞产生自噬, 并导致细胞周期的停滞、细胞膜电势的中断以及蛋白酶活性的抑制等. Wen课题组^[15]阐明了多种稀土元素氧化物包括Sm₂O₃、Eu₂O₃、Gd₂O₃和Tb₂O₃等均会引发HeLa细胞的自噬效应. 研究中所采用的纳米颗粒粒径约在50 nm, GFP-LC3蛋白的积累与稀土氧化物纳米晶体的摄入量和孵育时间具有线性相关关系. 此外, Zhang等^[35]利用“噬菌体展示”技术发现了一种短肽RE-1, 在稀土金属氧化物颗粒表面包裹一层RE-1后, 能够有效地抑制纳米颗粒引发自噬效应. 进一步的小鼠实验证明, RE-1通过抑制纳米颗粒与细胞的相互作用来降低细胞自噬水平并由此提高了纳米颗粒的生物相容性. 此外, 将该短肽RE-1与肿瘤识别短肽RGD融合形成复合肽, 促进了稀土金属纳米颗粒诱导的肿瘤细胞自噬及杀伤效应. 这些研究结果表明, 未来有望通过在稀土金属氧化物上连接不同的短肽而实现在正常细胞中屏蔽自噬和在肿瘤细胞中提高自噬以增进化疗效果的目的.

Wen课题组^[36]不仅研究了稀土纳米颗粒对自噬的影响, 同时也发展了基于稀土元素的自噬成像技术.

例如, 他们合成了两种新的同时具有顺磁性和荧光性质的镧系掺杂纺锤状非晶体YF₃:Ce, Eu, Gd和YF₃:Ce, Tb, Gd(分别缩写为YEG和YTG), 并且证实这两种晶体具有优异的细胞相容性和低溶血作用. 因此, 它们可以用作磁共振成像(MRI)和荧光成像的双模式造影剂. YEG和YTG可以促进自噬体形成, 帮助正常载带物降解, 且不破坏溶酶体功能(图3(C)). 这项工作阐述了稀土非晶体如何影响自噬通路, 展现了YEG和YTG纺锤非晶体在诊断和治疗的潜力.

3 纳米技术在自噬成像研究中的应用

从酵母到哺乳动物细胞, 自噬途径在进化上是保守的. 目前已知的自噬相关基因(ATG)就有30多种, 并被多个信号级联网络所调节, 其中研究最多的通路之一是雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路^[37]. 为了更好地研究自噬, 首先需要准确地监控自噬行为. 较为经典的方法是电子显微镜成像分析, 主要用来观察包含双层膜结构的自噬体和自噬溶酶体. Atg8/LC3是目前已知的唯一一直定位在自噬体上的蛋白, 因此经常将LC3与GFP或其他荧光蛋白融合表达来实现对于自噬小体的定位和定量. 当自噬发生时, 细胞质中均匀分布的LC3-I被修饰成LC3-II, 并被转移且聚集到自噬小体上, 通过荧光显微镜观测GFP-LC3点状物的聚集或通过免疫印迹法(western blot)对LC3脂化转化进行检测是比较简便的方法^[38]. 以上常用的方法均是相对静态的观测手段, 然而自噬是一个多步骤的动态过程, 如自噬体的增加既可以源于自噬行为的增多, 又可能反映的是自噬体在转化上受到阻断. 因而自噬通量分析法(autophagic flux)的出现很好地区分了自噬体积累是由自噬诱导还是下游阻断引起的. 自噬通量分析法中具有代表性的方法包括: LC3转化(turnover assay)检测、GFP-LC3分裂(cleavage)测定法、长寿命蛋白降解法(long-lived protein degradation)等^[39].

通过可视成像技术来实时研究自噬是该领域的重要发展趋势, 而成像技术的发展很大程度上意味着利用新型的成像探针^[40,41]. 使用基于GFP-LC3融合荧光蛋白来观察定量自噬体已经成为研究自噬的常见方法, 然而鉴于传统荧光显微法和western blot法耗时耗力的特点, Qiu等^[42]结合新兴的绿色自噬荧光标记染料Cyto ID和基于成像的细胞计数仪开发了一种在

活细胞内检测自噬的新方法. 该绿色荧光染料可以有效且特异性地与RFP-LC3共定位, 实现基于流式细胞仪的定量检测. 通过测量雷帕霉素(rapamycin)和他莫昔芬(tamoxifen)在诱导自噬作用时的剂量反应动力学, 他们证明了将该方法应用于药物发现上的可能性(图4(A)).

通过细胞自噬降解线粒体的途径被称为线粒体自噬(mitophagy). 线粒体自噬是一个特异性过程, 受到多种因子的精密调节, 是细胞清除体内损伤线粒体和维持自身稳态的一种重要调节机制. 多种自噬相关因子, 如“核心”AT复合物, 酵母线粒体外膜分子Atg32、Atg33、Uth1和Aup1, 哺乳细胞线粒体外膜蛋白PINK1、NIX和胞质的Parkin等, 均在线粒体自噬中起关键作用^[43]. 对线粒体自噬的观察也可以帮助更好地理解自噬的细胞学过程和生理意义, 也是当下的研究热点之一^[44]. 基于线粒体的一些特性, 以纳米探针为代表的纳米成像技术在mitophagy的研究中得到了很好的发展^[41,45].

Tang课题组^[46]发展了一种新型的异硫氰酸酯官能化的聚集诱导发射(aggregation-induced emission, AIE)

荧光分子(TPE-Py-NCS)用于实时线粒体成像和监测线粒体自噬(图4(B)). AIE荧光分子在稀溶液中几乎是非荧光的, 而在聚集状态下变得高度发射. 实验表明, 这种荧光分子具有与Mitotracker类似的线粒体结合特异性, TPE-Py-NCS上的异硫氰酸酯官能团可以与线粒体上的蛋白质形成稳定的化学键, 保证了在活细胞和固定细胞中均能很好地染色, 其光稳定性表现也十分出色, 在经过长达10 min连续17次的激光扫描过程中, 荧光信号仅损失了20%. 而在线粒体自噬发生的过程中, 线粒体会出现快速酸化和膜去极化的现象, 因此在观察线粒体自噬时这就要求荧光染料能够耐受这样的变化, 令人惊喜的是, 这种AIE材料的荧光可以耐受羰基氰化物间氯苯腈(CCCP)对线粒体膜电位的扰动. 重要的是, 这种荧光分子解决了传统有机荧光分子在聚集状态易猝灭的特性. Chao等^[47]也设计并开发了一系列新的铱(III)络合物用于观察线粒体自噬, 称为Ir1~Ir3, 该类络合物具有单光子和双光子荧光、高量子产率、大双光子吸收截面和线粒体特异性染色的性能. 这些复合物在双光子激发下可以穿透更深的组织, 并清楚地对多细胞肿瘤球体的内部结构进行3D成

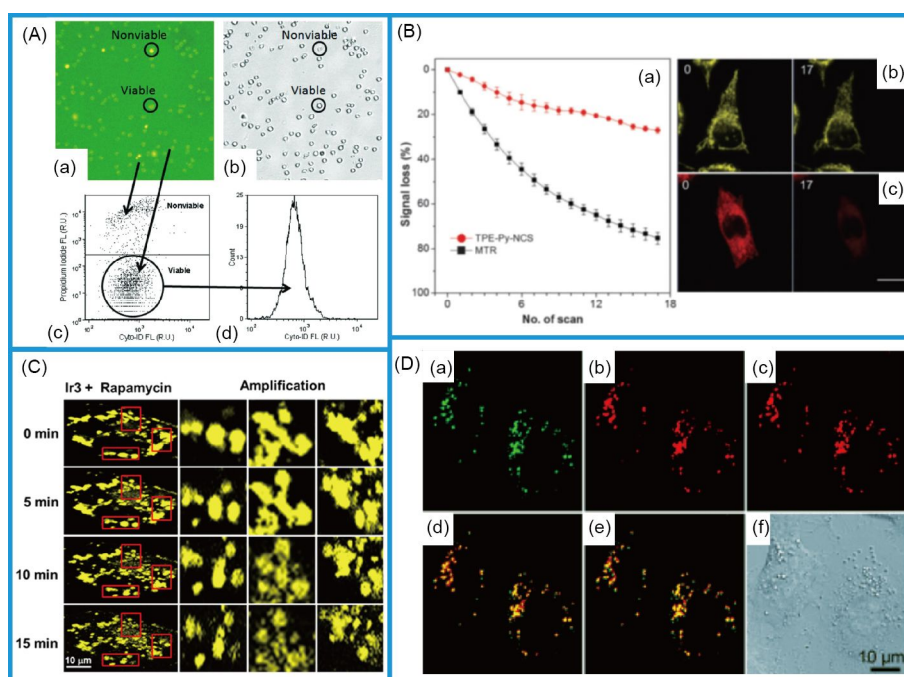


图4 借助新的成像方法研究细胞自噬过程和调控. (A) 结合Cyto ID等染料和成像细胞计数仪定量地检测活细胞的自噬水平^[42]; (B) TPE-Py-NCS和MTR发射统计法检测细胞自噬水平^[46]; (C) Ir3预染法, 线粒体形态变化的实时监控成像^[47]; (D) LysoIr2和LTG共标记的单/双光子成像^[48] (网络版彩图)

像. 在整个络合物中, -F取代的络合物**Ir3**表现出优于其他两种络合物的性质. 他们成功地使用**Ir3**跟踪记录了线粒体动力学且实现了对活细胞中线粒体自噬的实时检测. **Ir3**的使用大大简化了针对线粒体分裂和融合的各个阶段的染色程序, 并且有助于研究线粒体自噬(mitophagy)在生理细胞功能和功能障碍中的作用(图4(C)).

除了进行线粒体自噬的检测, Mao等^[48]同样开发了两种铱(III)络合物: LysoIr1和LysoIr2, 可以特异性地对溶酶体和诱导活细胞中的自噬反应进行成像. 这两个特点使它们成为跟踪自噬溶酶体的理想探针. 其中LysoIr2可以在活细胞水平特异性地观察自噬过程中溶酶体的行为. 因此, LysoIr2可以大大简化染色程序, 用来研究与溶酶体相关的自噬的关键过程, 如自噬体-溶酶体融合. 更重要的是, LysoIr1和LysoIr2显示明显的双光子吸收和发射属性, 通过最小化背景噪声和其他标记试剂的干扰, 可以大大提高其灵敏度并扩展它们与其他染色方法的兼容性. 因此LysoIr2可以实时跟踪自噬溶酶体在活细胞内的运动(图4(D)).

4 总结与展望

综上所述, 细胞保持正常自噬水平对维持机体的生理健康至关重要. 细胞自噬的紊乱可能引发致命疾

病, 如癌症、神经退行性疾病和心脏疾病, 因而可控的自噬调节方法为治疗这些疾病提供了新的可能. 目前, 多种纳米材料被证实具有诱导细胞甚至动物体产生自噬效应的能力. 然而, 如何降低纳米材料诱发自噬过程中产生的毒性, 运用纳米材料对自噬水平进行可控调节并将其应用到临床疾病诊疗中仍然是一个巨大的挑战. 面对多种多样的纳米材料, 其自噬诱导分子机制不尽相同, 每种纳米材料的质量剂量对诱导自噬程度的影响还缺乏细致的标准, 因此需要深入研究每种纳米材料引发自噬效应的分子机制, 这就对自噬研究新方法提出了更高的要求. 以往的研究大多在宏观水平上对于自噬效应进行分析和比较, 然而对于细胞自噬, 特别是纳米材料调控自噬的过程和机制, 仍然存在认知上的盲点, 如自噬体最初是怎样产生的? 自噬体膜是源于何处? 自噬机制又是如何驱动膜变形等. 新兴的纳米材料和纳米探针则为解答这一问题提供了新的契机. 例如, 特异性的纳米荧光探针帮助阐明了单细胞水平自噬体的数量、聚集状态及后续与溶酶体融合的机制等. 因而以当前成熟的生物学理论和检测手段为基础, 借助快速发展的纳米荧光探针, 结合生物标记、化学修饰和超分辨成像技术, 发展活细胞甚至活体水平的单分子实时成像方法是解决当下困难并推进自噬应用的关键.

致谢 谨以此文纪念曾支持和指导我们在纳米与自噬相关领域开展工作的黄庆研究员.

参考文献

- 1 Levine B, Kroemer G. *Cell*, 2008, 132: 27–42
- 2 Wrighton KH. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 136–137
- 3 Xie Z, Klionsky DJ. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 1102–1109
- 4 Glick D, Barth S, Macleod KF. *J Pathol*, 2010, 221: 3–12
- 5 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. *Nature*, 2008, 451: 1069–1075
- 6 Shintani T, Klionsky DJ. *Science*, 2004, 306: 990–995
- 7 Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata JI, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. *Nature*, 2006, 441: 880–884
- 8 Tian T, Sun Y, Wu H, Pei J, Zhang J, Zhang Y, Wang L, Li B, Wang L, Shi J, Hu J, Fan C. *Sci Rep*, 2016, 6: 19714
- 9 Zabirnyk O, Yezhelyev M, Seleverstov O. *Autophagy*, 2007, 3: 278–281
- 10 Stern ST, Adiseshaiah PP, Crist RM. *Part Fibre Toxicol*, 2012, 9: 20
- 11 Zhang Y, Wang Z, Li X, Wang L, Yin M, Wang L, Chen N, Fan C, Song H. *Adv Mater*, 2016, 28: 1387–1393
- 12 Zhong WY, Lü M, Liu LY, Sun JL, Zhong ZT, Zhao Y, Song HY. *Chin Sci Bull*, 2013, 58: 4031–4038
- 13 Ma X, Wu Y, Jin S, Tian Y, Zhang X, Zhao Y, Yu L, Liang XJ. *ACS Nano*, 2011, 5: 8629–8639

- 14 Seleverstov O, Zabinryk O, Zscharnack M, Bulavina L, Nowicki M, Heinrich JM, Yezhelyev M, Emmrich F, O'Regan R, Bader A. *Nano Lett*, 2006, 6: 2826–2832
- 15 Yu L, Lu Y, Man N, Yu SH, Wen LP. *Small*, 2009, 5: 2784–2787
- 16 Yu Y, Duan J, Yu Y, Li Y, Liu X, Zhou X, Ho KF, Tian L, Sun Z. *J Hazard Mater*, 2014, 270: 176–186
- 17 Verma NK, Conroy J, Lyons PE, Coleman J, O'Sullivan MP, Kornfeld H, Kelleher D, Volkov Y. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264: 451–461
- 18 Park EJ, Umh HN, Kim SW, Cho MH, Kim JH, Kim Y. *Arch Toxicol*, 2014, 88: 323–336
- 19 Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SAH, Chauhan LKS, Ahmad I. *Biomaterials*, 2012, 33: 1477–1488
- 20 Roy R, Singh SK, Chauhan LKS, Das M, Tripathi A, Dwivedi PD. *Toxicol Lett*, 2014, 227: 29–40
- 21 Laha D, Pramanik A, Maity J, Mukherjee A, Pramanik P, Laskar A, Karmakar P. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840: 1–9
- 22 Hussain S, Al-Nsour F, Rice AB, Marshburn J, Yingling B, Ji Z, Zink JI, Walker NJ, Garantzotis S. *ACS Nano*, 2012, 6: 5820–5829
- 23 Yu KN, Sung JH, Lee S, Kim JE, Kim S, Cho WY, Lee AY, Park SJ, Lim J, Park C, Chae C, Lee JK, Lee J, Kim JS, Cho MH. *Food Chem Toxicol*, 2015, 85: 106–113
- 24 Han MH, Lee WS, Lu JN, Yun JW, Kim G, Jung JM, Kim GY, Lee SJ, Kim WJ, Choi YH. *Evid-Based Compl Alt*, 2012: 201414
- 25 Zhang Q, Yang W, Man N, Zheng F, Shen Y, Sun K, Li Y, Wen LP. *Autophagy*, 2009, 5: 1107–1117
- 26 Li XM, Chen N, Su YY, He Y, Fan CH, Huang Q. *Chin Sci Bull*, 2013, 58: 1393–1402
- 27 Stern ST, Zolnik BS, McLeland CB, Clogston J, Zheng J, McNeil SE. *Toxicol Sci*, 2008, 106: 140–152
- 28 Kirchner C, Liedl T, Kuder S, Pellegrino T, Muñoz Javier A, Gaub HE, Stölzle S, Fertig N, Parak WJ. *Nano Lett*, 2005, 5: 331–338
- 29 Wang L, Li X, Han Y, Wang T, Zhao Y, Ali A, El-Sayed NN, Shi J, Wang W, Fan C, Chen N. *Sci China Chem*, 2016, 59: 1486–1491
- 30 Chen Z, Yin JJ, Zhou YT, Zhang Y, Song L, Song M, Hu S, Gu N. *ACS Nano*, 2012, 6: 4001–4012
- 31 Markovic ZM, Ristic BZ, Arsikin KM, Klisic DG, Harhaji-Trajkovic LM, Todorovic-Markovic BM, Kepic DP, Kravic-Stevovic TK, Jovanovic SP, Milenkovic MM, Milivojevic DD, Bumbasirevic VZ, Dramicanin MD, Trajkovic VS. *Biomaterials*, 2012, 33: 7084–7092
- 32 Alkilany AM, Murphy CJ. *J Nanopart Res*, 2010, 12: 2313–2333
- 33 Li JJ, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Yung LYL. *Biomaterials*, 2010, 31: 5996–6003
- 34 Chen Y, Yang L, Feng C, Wen LP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337: 52–60
- 35 Zhang Y, Zheng F, Yang T, Zhou W, Liu Y, Man N, Zhang L, Jin N, Dou Q, Zhang Y, Li Z, Wen LP. *Nat Mater*, 2012, 11: 817–826
- 36 Xu YJ, Lin J, Lu Y, Zhong SL, Wang L, Dong L, Wu YD, Peng J, Zhang L, Pan XF, Zhou W, Zhao Y, Wen LP, Yu SH. *Nanoscale*, 2016, 8: 13399–13406
- 37 Levine B, Klionsky DJ. *Dev Cell*, 2004, 6: 463–477
- 38 Bampton ETW, Goemans CG, Niranjana D, Mizushima N, Tolkovsky AM. *Autophagy*, 2005, 1: 23–36
- 39 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. *Cell*, 2010, 140: 313–326
- 40 Tian FF, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Morimoto N, Shang J, Zhang X, Liu N, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. *Autophagy*, 2010, 6: 1107–1114
- 41 Dolman NJ, Chambers KM, Mandavilli B, Batchelor RH, Janes MS. *Autophagy*, 2013, 9: 1653–1662
- 42 Chan LL, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, Kuksin D, Lin B, Qiu J. *Autophagy*, 2012, 8: 1371–1382
- 43 Youle RJ, Narendra DP. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 9–14
- 44 Hsieh CW, Chu CH, Lee HM, Yuan Yang W. *Sci Rep*, 2015, 5: 10376
- 45 Takashima I, Kawagoe R, Hamachi I, Ojida A. *Chem Eur J*, 2015, 21: 2038–2044
- 46 Zhang W, Kwok RTK, Chen Y, Chen S, Zhao E, Yu CYY, Lam JWY, Zheng Q, Tang BZ. *Chem Commun*, 2015, 51: 9022–9025
- 47 Huang H, Zhang P, Qiu K, Huang J, Chen Y, Ji L, Chao H. *Sci Rep*, 2016, 6: 20887
- 48 He L, Tan CP, Ye RR, Zhao YZ, Liu YH, Zhao Q, Ji LN, Mao ZW. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 12137–12141

Nanoparticle-based regulation and imaging of cell autophagy

Zejun Wang¹, Yao Luo^{1,2}, Yuping Han^{1,2}, Nan Chen^{1*}, Chunhai Fan^{1*}

¹ Division of Physical Biology and Bioimaging Center, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, CAS Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

² School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

*Corresponding authors (email: chennan@sinap.ac.cn; fchh@sinap.ac.cn)

Abstract: Autophagy is one of the essential metabolic processes in eukaryotic cells. It facilitates the clearance of redundant or damaged proteins and organelles. Autophagy contributes to cellular homeostasis via recycling of intracellular substances and providing energy. Overall, autophagy is a self-protective mechanism. Meanwhile, autophagy has complicated connection with apoptosis. Undesired up-regulation or inhibition of autophagy is closely related to the occurrence and development of various kinds of diseases, including neurodegenerative diseases, tumors, and microbial infections. Therefore, further understanding of the regulative mechanism of autophagy is likely to improve human health and has been actively explored in biomedical research. Especially, studies on cellular effects of nanomaterials under the context of autophagy have emerged as a novel area of interest. In this review, we summarize recent progress in the field of autophagy and focus on the applications of nanoparticles in autophagy regulation and imaging.

Keywords: autophagy, nanoparticles, cellular imaging, nanoprobe

doi: [10.1360/N032016-00192](https://doi.org/10.1360/N032016-00192)