

# 纳米材料诱导自噬引发保护作用的研究进展

詹蕙璐<sup>1,2,3</sup> 白莹<sup>1,2</sup> 庄严<sup>1,2</sup> 孟娟<sup>1,2</sup> 赵海洋<sup>1,2,3\*</sup>

(1 温州大学生命科学研究院 浙江 温州 325035 2 温州市生物医药协同创新中心 温州 325035)

(3 温州医科大学药学院 温州 325035)

**摘要** 溶酶体-自噬系统在细胞对纳米材料的适应性反应中起到关键作用。自噬在保护细胞免受损伤和保持细胞稳定方面发挥重大作用,但纳米材料引起自噬的本质尚不清楚。纳米材料被细胞认为是外来入侵者,其积累将激活机体的清除机制,引发自噬。介绍了纳米材料诱导自噬发生的自我保护机制,综合分析了纳米材料对溶酶体-自噬系统的影响及其生物学效应。

**关键词** 自噬 溶酶体 纳米材料 肝损伤

**中图分类号** Q819

自噬是一种细胞内高度保守的选择性降解的过程,用来消除异常聚集的长寿命的蛋白质和受损的细胞器<sup>[1]</sup>。自噬对维持细胞自身的稳定及细胞成分更新、保持正常的生理状态起着至关重要的作用,通过这种方式,自噬阻止了受损细胞器官在体内的积累,减少代谢压力和毒性。机体在生理病理过程中都存在自噬,基础状态下的自噬对细胞具有保护和修复作用,而自噬过度激活会引起细胞的损伤及死亡<sup>[2]</sup>。细胞自噬对于机体具有重要的生理病理学作用,与肿瘤的发生、神经系统疾病的发生、病原体感染及免疫系统应答以及细胞的分化和衰老等多个生命活动过程相关<sup>[3]</sup>。

纳米颗粒(nanoparticles, NPs),是指直径小于100nm的微粒。纳米级的颗粒较正常颗粒而言,具有不同的理化特征,如表面积与体积比增大,活性位点、电荷和形状改变,表面衍生性增加,光催化活性增强,热性能更为优越等。研究已证实,NPs对人类健康存在威胁<sup>[4]</sup>,纳米氧化锌、二氧化钛、氧化铜、碳纳米管、碳富勒烯等进入机体后,引起重要器官病理性损伤几率增加,甚至诱发癌症。

近年来,纳米材料诱导的自噬已成为纳米材料生物学效应领域的一个新的突破口。一般认为纳米材料诱导的自噬具有促进细胞死亡的作用,这种促进死亡的作用可以赋予纳米材料一定的生物医学功能,但同

时这种对细胞的负面影响也限制了纳米材料在生物体中的应用。纳米材料诱导自噬的研究还不够成熟,目前普遍集中在现象学方面的研究,而在蛋白质信号通路和转录水平上对纳米材料诱导自噬的研究较少。通过对自噬的研究进一步了解细胞内部运作的原理,从而揭示疾病发生和发展的原因,对于开发相应的诊断和治疗方法具有重要意义。

## 1 自噬形成与分子机制

### 1.1 自噬形成意义

自噬是一种细胞分解代谢的过程,细胞通过溶酶体降解受损、变性和衰老的、细胞质成分形成基本的生物分子,完成细胞回收。自噬在压力和饥饿环境下支持细胞能量平衡,它主要参与去除具有长半衰期的蛋白质和蛋白质聚集物,以及受损的细胞器,短寿命的蛋白质主要被泛素-蛋白酶体系统降解<sup>[5]</sup>。几乎所有的真核细胞都存在基本的、低水平的自噬,然而在各种生理和病理应激条件下,如生长因子耗尽、饥饿和缺氧,为了维持蛋白质和细胞器的正常运转,这一水平会上调。自噬在分化、发育和免疫等许多关键的生理过程中都发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。真核细胞至少存在三种不同类型的自噬:微自噬(microautophagy)、巨自噬(macroautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)。巨自噬是真核细胞运输和降解受损蛋白质和细胞器的主要机制,这种自噬的特

收稿日期:2019-04-28 修回日期:2019-05-23

\* 通讯作者,电子信箱:haiyangwzu@163.com

征是将细胞质物质隔离在自噬体的双膜囊泡内,将物质运送到溶酶体进行降解<sup>[5]</sup>。在这篇综述中自噬一词指巨自噬。

自噬的功能主要是自我保护、自适应以维持细胞的稳态,因此自噬缺陷或损害会增加代谢压力、炎症和细胞及组织损伤的风险。自噬缺陷与神经退行性疾病、衰老、代谢综合征等多种人类疾病的发病机制密切相关,据报道<sup>[7]</sup>,核心自噬基因的缺失会增加患癌症的风险。在正常情况下,自噬的目的是通过消除衰老和受损的细胞产物来降低基因组的不稳定性和细胞毒性<sup>[8]</sup>,然而在癌症中,它也可能通过循环提供能量和营养成分进而促进恶性细胞的生长<sup>[9]</sup>。

## 1.2 自噬形成过程

自噬是由一种自噬相关蛋白 (autophagy-related protein, Atg) 调控的溶酶体蛋白质降解途径,它的主要过程包括杯状分隔膜包裹待降解物,形成自噬体;随后

自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体并降解内容物。可分为起始、成核、延伸、成熟、融合和降解六个阶段 (图1)。

第一阶段:在低能量时期,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 活性降低,消除了其对 ULK1 复合物的抑制作用,启动了自噬。AMPK 是广泛存在于真核细胞的 Ser/Thr 蛋白激酶,研究表明,活化的 AMPK 和自噬反应密切相关,AMPK 在激活的状态下可直接或间接地介导细胞自噬<sup>[10]</sup>。

第二阶段:一方面,ULK1 复合物激活 Atg9 激活,膜组分转运到自噬起始位

点<sup>[11-12]</sup>,另一方面,ULK1 复合活化 VPS34 复合物,使磷脂酰肌醇 (PI) 转化成磷脂酰肌醇 3-磷酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P),在两者作用下,隔离膜产生。

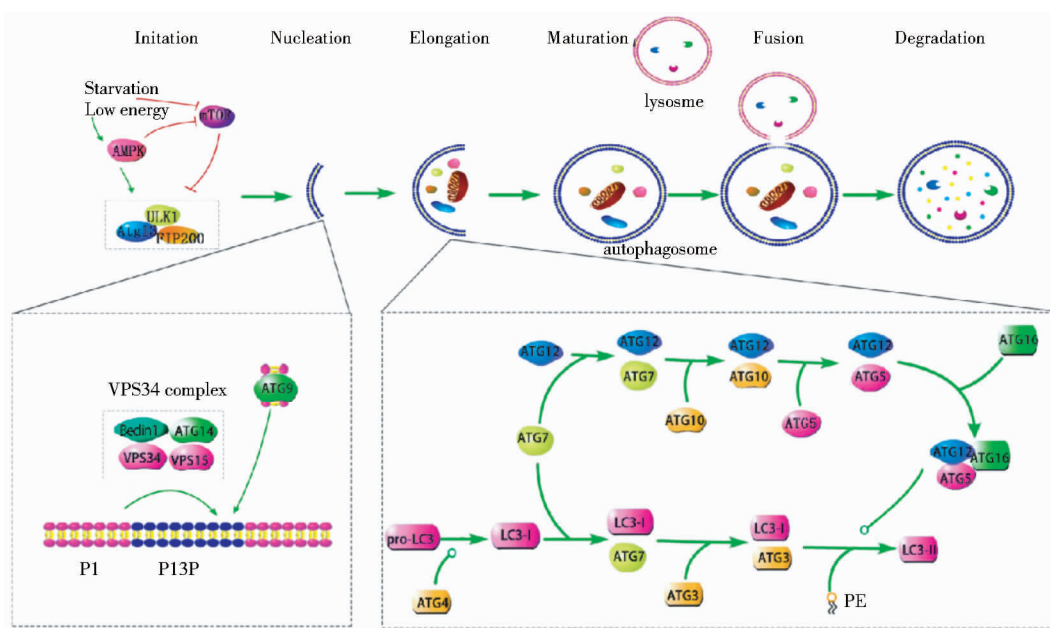


图1 自噬形成过程及其分子机制

Fig.1 Autophagy formation process and its molecular mechanism

第三阶段:此过程由两个泛素系统控制,分别是 Atg12-Atg5-Atg16 和 LC3-PE<sup>[13]</sup>。在 Atg12-Atg5-Atg16 泛素系统中,由 Atg7 先激活 Atg12,在与 Atg5 结合前,暂时与 Atg10 结合,然后异二聚体与 Atg16 结合形成 Atg12-Atg5-Atg16。LC3-PE 类泛素系统与 Atg12-Atg5-Atg16 相比,该体系富含 proLC3,proLC3 是由 Atg4 加工成 LC3-I 的前体蛋白,LC3-I 和磷脂酰乙醇胺通过 Atg7 和 Atg3 传递形成 LC3-II。最后一个步骤经过三元复

合物 Atg12-Atg5-Atg16 的催化,促进膜的不断扩张,使之由开始的小囊泡样、杯样结构逐渐发展为半环状、环状结构,物质也会被包裹降解。

第四阶段:隔离膜形成自噬体。Atg12-Atg5-Atg16 复合物从自噬体外膜脱落 LC3-II 分布于自噬体的双层膜上<sup>[10]</sup>。

第五阶段:自噬体的外膜与溶酶体融合形成自噬溶酶体,这个过程需要 Atg14 的参与。

第六阶段:自噬溶酶体的内膜和内含物被各种水解酶降解为小分子,提供给细胞重复利用。

### 1.3 自噬调控因子

自噬体的动态重排需要多个蛋白(ATGs),这些蛋白由30多个自噬基因(ATGs)编码。自噬体蛋白在形成过程中形成复合物,并经历各种翻译后修饰(如磷酸化、乙酰化、泛素化和蛋白水解酶裂解)<sup>[5]</sup>。作为自噬标记物的几种自噬核心蛋白中,最著名的是LC3、p62和Beclin-1,LC3对于自噬体的成熟和与溶酶体的融合是必不可少的。在自噬过程中,LC3被蛋白酶ATG4裂解产生LC3-I,并进一步与磷脂洗乙醇胺结合形成LC3-II,并固定在吞噬泡膜上。膜结合的LC3-II起着适配器的作用,并与p62蛋白相互作用,使物质被吞噬进入吞噬泡<sup>[14]</sup>。p62蛋白也被称为sequestosome1(SQSTM1),是自噬过程的另一个常见标志蛋白。它作为一种受体蛋白与泛素化蛋白结合,并通过膜结合的LC3蛋白将其传递给吞噬细胞进行降解。p62可被自噬降解,因此

其在细胞质中的积累被用作自噬通量减少的标志<sup>[15]</sup>。Beclin-1是自噬的第三个常见标志蛋白,这种蛋白质是PI3k复合体的组成部分,它被用作自噬诱导的标记物,介导自噬与凋亡之间的相互作用。两种激酶,AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是最著名的细胞质传感器和自噬途径的调节因子(图2)。AMPK感知能量消耗(ATP/AMP比值下降),通过启动ULK复合物的自噬磷酸化间接诱导自噬,或通过抑制mTOR-complex1(MTORC1)直接诱导自噬。p53蛋白在不同类型的应激反应中被激活,尤其是基因毒性应激,以维持基因组的稳定性<sup>[16]</sup>,其许多功能也包括参与调节自噬,尤其是在癌症中<sup>[17]</sup>。许多p53调控的基因产物可以通过AMPK-MTORC1通路刺激自噬或直接编码核心自噬和溶酶体蛋白(如ULK1、ULK2、DRAM)<sup>[18]</sup>。与促进自噬相反,p53在非应激条件下也可以抑制自噬,自噬激活是由核p53介导的,而自噬抑制是由通过细胞质中p53介导的<sup>[19]</sup>。

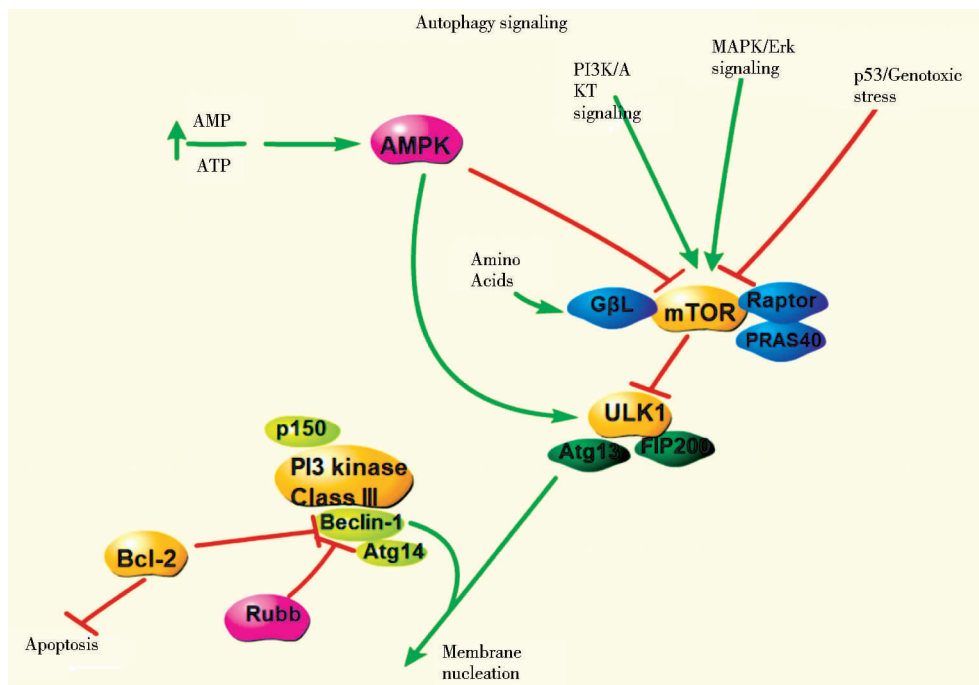


图2 自噬形成相关信号通路

Fig. 2 Autophagy formation related signaling pathway

## 2 细胞自噬是纳米材料普遍存在的生物学效应

自噬是一种II型程序性细胞死亡和应激时期的细胞存活机制<sup>[20]</sup>,多种无机或有机纳米材料也被报道能

引起不同程度的细胞自噬,氧化环境也可能触发自噬过程<sup>[21]</sup>,它能够保护细胞免受应激反应的伤害<sup>[22]</sup>,并且能够降解体内一些不溶的纳米级别的生物分子,纳米颗粒被细胞摄取后积聚在自噬体内,可以促进自噬小体的形成,进而诱导细胞产生自噬。许多报道指出,

多种纳米材料可导致自噬的发生,自噬被认为是无机和有机纳米材料引起的标志性生物学效应之一。金相关的纳米材料、金属氧化物纳米材料、量子点、富勒烯及其衍生物、稀土氧化物纳米晶体、PAMAM、脂质体等许多纳米材料<sup>[23-26]</sup>已被发现具有诱导自噬的能力。金属氧化物纳米颗粒(NPs)可诱导氧化应激,在此情况下,细胞通过自噬途径避免细胞死亡。自噬过程中NPs的自噬诱导和溶酶体激活是细胞消耗溶酶体中自身成分的过程,是唯一能够降解大量组分的细胞过程,因此可以推测NPs可能是通过自噬来清除的。纳米粒子被认为是一种外来物质,通过诱导自噬来引发细胞启动自我保护机制。纳米材料能够引起TFEB的活化,而TFEB能够促进自噬和溶酶体相关基因的表达,因此通过提高TFEB的活性来增强机体对异物(外来纳米材料、蛋白质和蛋白脂质体)的降解是一种潜在的增强机体清除能力的策略。体外研究表明,纳米金和TiO<sub>2</sub>纳米粒子能够在2~3天内诱导人成纤维细胞和脑内皮细胞自噬,从而作为一种防御机制<sup>[27-28]</sup>。NPs介导的自噬是一种适应性的细胞反应,有助于纳米材料的降解和清除。

### 2.1 氧化钕(Nd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

Chen等<sup>[29]</sup>首次报道了无机纳米材料能引起细胞自噬,平均尺寸为80 nm的纳米稀土材料Nd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>能引起非小细胞肺癌H460发生细胞自噬,Nd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>能够引发H460细胞空泡化现象(vacuolization),并能够诱导细胞发生与caspase非依赖性的细胞死亡,该过程伴随着细胞周期S期的停留、细胞膜电势中断以及蛋白酶活性的抑制等。

### 2.2 量子点(quantum dot)

量子点是由少量的原子所构成准零维(quasi-zero-dimensional)的纳米材料,量子局限效应特别显著。量子点有不同发射波长、不同的形状甚至不同的化学成分,其在体外、体内试验中通常用作荧光标签。Seleverstov等<sup>[23, 26]</sup>比较了两种尺寸的量子点在人骨髓间充质干细胞中的细胞毒性和胞内过程,第一次发现了纳米材料诱导的尺寸依赖的细胞自噬效应。Stem等<sup>[24]</sup>的研究也表明,两种尺寸相当但化学成分同的量子点均能够诱导猪肾脏细胞发生自噬,并提出能够引发细胞自噬可能是其他纳米材料的共同特性。

### 2.3 稀土金属氧化物纳米晶体

稀土元素是镧系元素系稀土类元素群的总称,位

于元素周期表中ⅢB族共17个元素。其中,原子序数较小的钪、钇、镧、铈、镨、钕、钐、铕被称为“轻稀土元素”,原子序数比较大的钆、铽、镝、钕、铒、铈、镨、镱被称为“重稀土元素”,稀土元素目前在超导工业、石油化工、陶瓷工业和工业催化领域有着广泛的应用。常见的轻稀土金属氧化物(如钐Sm、铕Eu)和重稀土金属氧化物(如钆Gd、铽Tb)的粒径为50 nm左右的纳米晶体都能在HeLa细胞中引起自噬现象<sup>[25]</sup>,该效应被确认为是纳米稀土金属氧化物的共性<sup>[30]</sup>。Zhang等<sup>[31]</sup>研究还指出,纳米稀土氧化物诱导的细胞自噬是通过经典的Atg5依赖途径起作用的,但是稀土氧化物纳米晶体造成的细胞空泡化和其引起的自噬没有必然联系,是相对独立的生物学反应。

### 2.4 纳米材料富勒烯(C60)及衍生物

C60是由五元环、六元环构成的封闭式共轭烯,具有特殊的几何结构和烯键结构,富勒烯家族及其衍生物具有一系列独特的物理化学性质,并在生物医药领域展现出其独有的应用前景。Zhang等<sup>[32]</sup>报道了20~100 nm尺寸的水溶性纳米富勒烯C60能够通过诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)来介导细胞发生自噬。这种通过ROS介导的细胞自噬效应被证明是可见光依赖性的。研究显示,经纳米C60作用后的细胞,活性氧水平明显增强,而ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)、还原性谷胱甘肽(GSH)和L-维生素C(LAA),均能减少GFP-LC3/HeLa细胞中纳米C60诱导产生的GFP-LC3绿色点状聚集。纳米C60在自噬通路中起着双重作用,一是促进自噬体的形成,二是减少自噬体的转化。纳米C60一旦进入细胞内就会被自噬体包裹,但是由于其无机材料的本性,纳米C60不能够被降解,这将导致自噬体同溶酶体融合以后的自噬途径被阻断,导致自噬溶酶体的大量聚集。纳米C60在高浓度时具有细胞毒性会引发细胞死亡;而在低浓度(0.5 μg/ml)时则不引起明显的细胞死亡,但会引起自噬并且增加癌细胞对化疗药物的敏感性,因而纳米C60可被认为是一种潜在的化疗辅助因子,并且之后的研究表明纳米C60衍生物C70、C60C16和C60Ph6晶体溶液也都具有与纳米C60类似的效果,均能导致宫颈癌HeLa细胞自噬的现象,其中C70的效果最明显。

### 2.5 其他纳米材料

金纳米颗粒在人肺成纤维细胞MRC5中能够诱发细胞自噬的发生,同时还伴随脂质过氧化、丙二醛(MDA)蛋白加合物表达上升等氧化应激的特征性反

应<sup>[28]</sup>。而铁-金核壳纳米颗粒 Fe@Au 也具有诱导自噬的能力,同时还观察到被处理细胞中有线粒体膜完整性受损的迹象,研究者认为 Fe@Au 纳米颗粒诱发的细胞毒性作用及细胞自噬主要是与未被还原的铁元素诱发线粒体损伤所致<sup>[33]</sup>。氧化铝纳米颗粒包被可溶性卵白蛋白(OVA)后,可以被用做抗原载体,用以降低疫苗疗法中激活 T 细胞所需的抗原总量。深入的机理研究发现,包被 OVA 的  $\alpha$ -氧化铝纳米颗粒在树突状细胞中将抗原携带到自噬体中,然后树突状细胞再通过细胞自噬作用将抗原提呈给 T 细胞,这无疑是纳米材料诱发自噬在生物医药领域应用的一大突破<sup>[34]</sup>。Li 等<sup>[35]</sup>研究发现粒径 6nm 以下的 PAMAM 树枝状物通过抑制 Akt-TSC2-mTOR 信号通路,能够诱导细胞发生自噬并导致细胞死亡,细胞自噬特异性抑制剂 3-MA 能逆转 PAMAM 树枝状聚合物引起的细胞死亡及其造成的小鼠肺损伤。Man 等<sup>[36]</sup>的研究发现,粒径 100nm 左右阳离子脂质体作为一种常规使用的转染试剂,能够诱导 mTOR 非依赖性的细胞自噬。

### 3 抑制自噬导致的生物学效应

二十一世纪,纳米技术及其相关产品取得了极大的进步,伴随这一趋势的不断发展,人们对纳米安全日益关注,主要聚焦在工程纳米材料可能对人类健康产生的不良影响<sup>[37-38]</sup>。尽管大多数工程纳米材料并不直接进入人体,但它们的大规模生产和广泛应用不可避免地导致人类的接触增加,主要是通过皮肤和呼吸系统进入人体体内<sup>[39]</sup>。另一方面,由于其具有独特、优越的物理化学性质,工程纳米材料在生物成像、药物输送、组织修复和再生以及癌症治疗等生物医学应用中显示出巨大的潜力<sup>[40]</sup>。一些工程纳米粒子或装置已用于临床或进入临床试验,但目前许多纳米材料仍处于临床前的研发阶段<sup>[41]</sup>。这些纳米材料,无论是用于诊断还是治疗,都是通过不同的给药途径进入人体的,无论何种方式,纳米材料都会进入血液循环,最终到达不同的器官和组织。一个有趣的现象是,许多纳米材料优先在肝脏中积累<sup>[42]</sup>,血液通过门静脉和肝动脉进入肝脏,到达肝窦,然后聚集在中央静脉并离开肝脏。肝脏作为代谢和免疫防御的主要器官,由实质细胞(肝细胞和胆管细胞)、非实质细胞(免疫细胞、肝窦内皮细胞)组成<sup>[43]</sup>,肝细胞是肝脏中最丰富的细胞,具有代谢、内分泌和分泌功能。多种纳米材料已经被证明会在各种器官中形成积累。NPs 通过产生活性氧、诱导 DNA

损伤、损伤细胞膜、改变基因组甲基化等毒性机制,诱导肝脏毒性,对肝细胞及肝脏组织产生损伤,最终影响肝脏正常功能,打破机体健康。研究普遍认为,NPs 表现出毒性作用的主要机制是产生过量 ROS,最终诱导细胞发生氧化损伤。组织学观察显示 NPs 主要分布在血管周围,提示 NPs 通过门静脉系统经肠系膜静脉吸收,然后分布于肝组织,7 天后周围血管的银染反应明显,提示内皮屏障开始塌陷,肝细胞发生大量损伤,虽然这一特性已被用来设计专门针对肝脏和治疗肝脏疾病的纳米材料,如肝纤维化<sup>[44]</sup>、肝细胞癌<sup>[44-45]</sup>、和病毒性肝炎<sup>[46]</sup>,但同时也引发了肝脏毒性问题。以前的研究报告也表明,各种纳米粒子,如 SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>、Ag、GO、UCP、CdSe/ZnS 核壳量子点、聚氨基胺(PAMAM)树状大分子等,都会引起肝脏损伤<sup>[47]</sup>。

#### 3.1 抑制自噬激活阻断能量来源

实验发现,注入 NPs 后,细胞中三磷酸腺苷(ATP)含量显著降低,且保持在降低水平,提示 ATP 可能在 Ag-NPS 给药后肝毒性的诱导中起关键作用<sup>[47]</sup>。自噬是一种高度调节的分解代谢过程,其作用于溶酶体小隔间的细胞成分,以促进蛋白质的大量降解<sup>[48]</sup>。由于自噬可以帮助降解巨大的成分,细胞依靠这种机制积累丢失/受损的细胞器、蛋白质团,甚至病原体<sup>[48]</sup>,特别是对于由于缺乏足够的营养而无法产生 ATP 或进行正常生物合成的细胞<sup>[49]</sup>,这种降解过程使自噬成为核苷酸、脂肪酸和氨基酸的潜在来源。在绝大多数的细胞中,自噬发生在较低的基础水平,但当细胞需要产生细胞内的营养和能量时,自噬水平就会迅速上调。Rikiishi<sup>[50]</sup>研究表明,在代谢应激期间,自噬提供 ATP 和其他大分子作为能量来源,以使细胞存活。

#### 3.2 抑制自噬加剧炎症小体活化

二氧化硅纳米颗粒、金纳米粒子和氧化铁纳米颗粒进入肝脏后主要在肝脏中积累,并在肝脏组织中引起炎症反应。NPs 作用于细胞会导致溶酶体的结构损伤,抑制自噬,导致 CTSB 的释放,而 CTSB 对 NPs 诱导的 NLRP3 炎症小体的激活及促炎细胞因子的释放起着关键作用<sup>[51]</sup>,因此,NPs 能通过自噬功能障碍和溶酶体 CTSB 释放激活肝细胞的 NLRP3-CASP 1 炎症通路。NLRP3 炎症小体是一种由 NLRP3、PYCARD 和 CASP 1 组成的蛋白复合体<sup>[52]</sup>,在识别多种病原体相关分子模式后,NLRP3 炎症体通过激活 CASP 1,控制 IL 1 $\beta$  和 IL 18 的成熟和分泌<sup>[53]</sup>。NLRP3、PyCard 或 CASP 1 缺乏的小鼠,在 LPS 和 ATP 的作用下,对 IL-1 $\beta$ 、和 IL 18 的



成熟和分泌有明显的调控作用<sup>[54-55]</sup>。研究者们提出了自噬诱导与 NLRP3 炎症体激活之间的反比关系,自噬缺失的细胞加剧了 NLRP3 炎症小体活化,自噬减少对肝脏炎症的显著影响是炎症依赖性巨噬细胞因子 IL-1b 和 IL-18 的选择性增加,因此自噬是肝脏炎症激活的重要调节因子,是一种与多种肝损伤相关的炎症途径。研究发现, Gas6-Axl 信号通路促进了小鼠巨噬细胞的自噬诱导,这可能是通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活来抑制急性肝脏炎症的<sup>[56]</sup>。先前的研究表明,自噬通过降低活性氧(ROS)浓度来抑制 NLRP3 炎症小体的活化<sup>[57]</sup>,支持这一观点的一些研究表明<sup>[58-60]</sup>,自噬对 ROS 的生成具有负调节作用, NLRP3 的炎症活性被 ROS 阻断所抑制,后经实验证实, Gas6-Axl 信号所形成的自噬确实抑制了 NLRP3 的炎症活性。

### 3.3 抑制自噬导致线粒体功能障碍

自噬的抑制导致聚集蛋白增加和线粒体受损,这与 ROS 的合成增加有关。活性氧(ROS)是一种含有氧原子的高活性自由基,主要以过氧化氢( $H_2O_2$ )、细胞超氧化物( $O_2 \cdot^-$ )和羟基自由基( $OH \cdot$ )的形式存在于生物系统中<sup>[61]</sup>。ROS 负责破坏基因、器官以及基因组,从而诱导肿瘤的形成,它被广泛认为是造成纳米毒性的主要因素,导致细胞膜损伤、通透性变化和细胞死亡<sup>[62]</sup>。最近的研究表明<sup>[63]</sup>线粒体在颗粒物和 ENMs 诱导的 NLRP3 细胞激活中起着重要的作用。Jurg Tschopp 研究组<sup>[64]</sup>发现线粒体来源的 ROS 是调控 NLRP3 炎症小体活化的关键信号,同时发现自噬及其线粒体自噬(mitophagy)调控了线粒体的质量,减少受损的线粒体数目,从而防止了 ROS 诱导的 NLRP3 炎症小体活化。线粒体功能障碍已被确定为氧化应激诱导的细胞毒性和遗传毒性的敏感靶点。此外,据报道, NPs 降低了肝细胞线粒体呼吸链复合物的活性,减少了谷胱甘肽、硫氧还蛋白、超氧化物歧化酶和 N-乙酰半胱氨酸等抗氧化因子<sup>[65-66]</sup>。作为对这些变化的反应,细胞诱导包括自噬在内的代偿途径,自噬是清除线粒体等受损细胞器的主要途径。

### 3.4 抑制自噬加快肝细胞凋亡

氯喹抑制自噬可通过下调肝细胞 PI3K/mTOR 信号通路促进细胞凋亡, PI3K 的上调导致 AKT 和 mTOR 通路的序贯激活,最终降低自噬水平。慢性自噬抑制通过坏死或凋亡促进细胞死亡,最终促发癌变和炎症。研究发现, NPs 在肝脏中的积累导致细胞外 LDH 含量

升高<sup>[67]</sup>,众所周知, LDH 是细胞中一种相对稳定的酶,只有当细胞膜破裂时才能漏出,因此 LDH 渗漏的增加表明,高浓度的 NPs 可影响细胞膜的完整性,并对肝细胞造成损害。ALT 和 AST 是与肝功能异常有关的两种膜结合酶,只有当肝脏受损,肝细胞膜被破坏时,这些酶才进入血液,有趣的是,随着自噬的减少,肝细胞的凋亡开始上升,其标记蛋白、caspase-3 和 TUNEL 阳性细胞的表达增加,这意味着自噬能力的下降以及高浓度的银可能会导致自我保护不足,从而导致细胞损伤。

## 4 结论与展望

目前为止许多纳米材料已经被发现能够引起自噬,包括二氧化硅、金纳米颗粒、 $\alpha$ -氧化铝、稀有氧化物、富勒烯等。不同纳米材料由于物理化学性质的差异,激活自噬的机制也不尽相同。另外,对纳米材料表面化学活性区域的修饰作用会增加纳米颗粒空间复杂性,这就需要我们深入探讨以理解与自噬相关纳米材料的设计规则,从而设计出高活性、低毒性的纳米材料。目前能够引起细胞自噬的纳米材料也被尝试用于药物增敏、清除蛋白聚集体、阻断及清除病原体 and 调节免疫等。

纳米材料引发的自噬发生过程和原理以及参与其中的分子、信号转导过程、病理生理学意义也还有待进一步深入研究。为了控制纳米材料引起的自噬活化,增强细胞对底物的清除和降解能力,需要我们在设计纳米材料时充分理解纳米材料与自噬的关系。了解自噬与纳米粒子的相互作用,对纳米粒子的设计有深远的影响,将会为纳米工程师设计下一代安全的纳米材料应用于纳米治疗提供新的思路和方法,推动人类医疗事业的快速发展。

## 参考文献

- [1] Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 2012, 441(2): 523-540.
- [2] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [3] Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, et al. Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*, 2017, 341: 112-153.
- [4] Srivastava V, Gusain D, Sharma Y C. Critical review on the toxicity of some widely used engineered nanoparticles. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2015, 54(24): 6209-6233.

- [ 5 ] He C, Klionsky D J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 67-93.
- [ 6 ] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 349-364.
- [ 7 ] Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*, 2011, 25(8): 795-800.
- [ 8 ] Eskelinen E L. The dual role of autophagy in cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(4): 294-300.
- [ 9 ] Kimmelman A C, White E. Autophagy and tumor metabolism. *Cell Metab*, 2017, 25(5): 1037-1043.
- [10] Green D R, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*, 2014, 157(1): 65-75.
- [11] Füllgrabe J, Klionsky D J, Joseph B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 65-74.
- [12] Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 13(1): 7-12.
- [13] Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke E H, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2): 81-94.
- [14] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 107-132.
- [15] Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res*, 2012, 66(6): 457-462.
- [16] Vousden K H, Lane D P. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(4): 275-283.
- [17] Denisenko T V, Pivnyuk A D, Zhivotovsky B. p53-Autophagy-Metastasis Link. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(5): 148.
- [18] Kenzelmann Broz D, Spano Mello S, Bieganski K T, et al. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev*, 2013, 27(9): 1016-1031.
- [19] Tasdemir E, Maiuri M C, Orhon I, et al. p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion. *Cell Cycle*, 2008, 7(19): 3006-3011.
- [20] Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1528-1534.
- [21] Moore M N. Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy*, 2008, 4(2): 254-256.
- [22] Ilyas G, Zhao E, Liu K, et al. Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 $\beta$ . *J Hepatol*, 2016, 64(1): 118-127.
- [23] Seleverstov O, Zabirnyk O, Zscharnack M, et al. Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation. *Nano Lett*, 2006, 6(12): 2826-2832.
- [24] Stern S T, Zolnik B S, McLeland C B, et al. Induction of autophagy in porcine kidney cells by quantum dots: a common cellular response to nanomaterials. *Toxicol Sci*, 2008, 106(1): 140-152.
- [25] Yu L, Lu Y, Man N, et al. Rare earth oxide nanocrystals induce autophagy in HeLa cells. *Small*, 2009, 5(24): 2784-2787.
- [26] Seleverstov O, Phang J M, Zabirnyk O. Semiconductor nanocrystals in autophagy research: methodology improvement at nanosized scale. *Methods Enzymol*, 2009, 452: 277-296.
- [27] Halamoda Kenzaoui B, Chapuis Bernasconi C, Guney-Ayra S, et al. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochem J*, 2012, 441(3): 813-821.
- [28] Li J J, Hartono D, Ong C N, et al. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*, 2010, 31(23): 5996-6003.
- [29] Chen Y, Yang L, Feng C, et al. Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 52-60.
- [30] Man N, Yu L, Yu S H, et al. Rare earth oxide nanocrystals as a new class of autophagy inducers. *Autophagy*, 2010, 6(2): 310-311.
- [31] Zhang Y, Yu C, Huang G, et al. Nano rare-earth oxides induced size-dependent vacuolization: an independent pathway from autophagy. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5: 601-609.
- [32] Zhang Q, Yang W, Man N, et al. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C60 nanocrystal. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1107-1117.
- [33] Wu Y N, Yang L X, Shi X Y, et al. The selective growth inhibition of oral cancer by iron core-gold shell nanoparticles through mitochondria-mediated autophagy. *Biomaterials*, 2011, 32(20): 4565-4573.
- [34] Li H, Li Y, Jiao J, et al. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6(10): 645-650.
- [35] Li C, Liu H, Sun Y, et al. PAMAM nanoparticles promote acute lung injury by inducing autophagic cell death through the Akt-TSC2-mTOR signaling pathway. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(1): 37-45.
- [36] Man N, Chen Y, Zheng F, et al. Induction of genuine autophagy

- by cationic lipids in mammalian cells. *Autophagy*, 2010, 6(4): 449-454.
- [37] Donaldson K, Poland C A. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(4): 724-734.
- [38] Pelaz B, Charron G, Pfeiffer C, et al. Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. *Small*, 2013, 9(9-10): 1573-1584.
- [39] Armstead A L, Li B. Nanotoxicity: emerging concerns regarding nanomaterial safety and occupational hard metal (WC-Co) nanoparticle exposure. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 6421-6433.
- [40] Lim E K, Kim T, Paik S, et al. Nanomaterials for theranostics: recent advances and future challenges. *Chem Rev*, 2015, 115(1): 327-394.
- [41] Etheridge M L, Campbell S A, Erdman A G, et al. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine*, 2013, 9(1): 1-14.
- [42] Wang B, He X, Zhang Z, et al. Metabolism of nanomaterials in vivo: blood circulation and organ clearance. *Acc Chem Res*, 2013, 46(3): 761-769.
- [43] Park J K, Utsumi T, Seo Y E, et al. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine*, 2016, 12(5): 1365-1374.
- [44] Zhu S, Zhang J, Zhang L, et al. Inhibition of kupffer cell autophagy abrogates nanoparticle-induced liver injury. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(9): 1601252.
- [45] Lee T Y, Liu M S, Huang L J, et al. Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10: 40.
- [46] Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, et al. Metabolic control of autophagy. *Cell*, 2014, 159(6): 1263-1276.
- [47] Keramanzadeh A, Jantzen K, Ward M B, et al. Nanomaterial-induced cell death in pulmonary and hepatic cells following exposure to three different metallic materials: The role of autophagy and apoptosis. *Nanotoxicology*, 2017, 11(2): 184-200.
- [48] Wang Q, Zhou Y, Fu R, et al. Distinct autophagy-inducing abilities of similar-sized nanoparticles in cell culture and live *C. elegans*. *Nanoscale*, 2018, 10(48): 23059-23069.
- [49] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*, 2010, 140(6): 821-832.
- [50] Rikiishi H. Novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012: 317645.
- [51] Kubes P, Mehal W Z. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, 2012, 143(5): 1158-1172.
- [52] Han J, Bae J, Choi C Y, et al. Autophagy induced by AXL receptor tyrosine kinase alleviates acute liver injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in mice. *Autophagy*, 2016, 12(12): 2326-2343.
- [53] Wei P, Yang F, Zheng Q, et al. The potential role of the NLRP3 inflammasome activation as a link between mitochondria ROS generation and neuroinflammation in postoperative cognitive dysfunction. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 73.
- [54] Saitoh T, Fujita N, Jang M H, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature*, 2008, 456(7219): 264-268.
- [55] Nakahira K, Haspel J A, Rathinam V A, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 2011, 12(3): 222-230.
- [56] Xia T, Kovochich M, Brant J, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett*, 2006, 6(8): 1794-1807.
- [57] Zhou R, Yazdi A S, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 2011, 469(7329): 221-225.
- [58] Juarez-Moreno K, Gonzalez E B, Girón-Vazquez N, et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum Exp Toxicol*, 2017, 36(9): 931-948.
- [59] Costa C S, Ronconi J V, Daufenbach J F, et al. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342(1-2): 51-56.
- [60] Cha K, Hong H W, Choi Y G, et al. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(11): 1893-1899.
- [61] Mirzoeva O K, Hann B, Hom Y K, et al. Autophagy suppression promotes apoptotic cell death in response to inhibition of the PI3K-mTOR pathway in pancreatic adenocarcinoma. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(9): 877-889.
- [62] LoPiccolo J, Blumenthal G M, Bernstein W B, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, 2008, 11(1-2): 32-50.
- [63] Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, et al. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*, 2006, 25(48): 6416-6422.
- [64] Kuraishy A, Karin M, Grivennikov S I. Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. *Immunity*, 2011, 35



- (4): 467-477. (11): 1256-1264.
- [65] Hussain S M, Frazier J M. Cellular toxicity of hydrazine in primary rat hepatocytes. *Toxicol Sci*, 2002, 69(2): 424-432. [67] Wang Y, Xu X, Gu Y, et al. Recent advance of nanoparticle-based topical drug delivery to the posterior segment of the eye. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15(7): 687-701.
- [66] Chen Q, Xue Y, Sun J. Hepatotoxicity and liver injury induced by hydroxyapatite nanoparticles. *J Appl Toxicol*, 2014, 34

## Research Progress of Autophagy Induced Protection by Nanomaterials

ZHAN Hui-lu<sup>1,2,3</sup> BAI Ying<sup>1,2</sup> ZHUANG Yan<sup>1,2</sup> MENG Juan<sup>1,2</sup> ZHAO Hai-yang<sup>1,2,3</sup>

(1 Institute of Life Sciences, Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

(2 Biomedical Collaborative Innovation Center of Wenzhou, Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

(3 School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** Lysosomal-autophagy system plays a critical part in the adaptive response of cells to nanomaterials. Autophagy has great utility in protecting cells from damage and keeping them stable. However, the essence of autophagy induced by nanomaterials is still unclear. Nanomaterials are recognized as alien invaders, the accumulation of which will activate the body's clearance mechanism. And this will lead to autophagy after the absorption of nanomaterials. This review introduces the self-protection mechanism of autophagy induced by nanomaterials, and analyzes the influence of nanomaterials on lysosomal-autophagy system and their biological effects comprehensively.

**Key words** Autophagy Lysosomal Nanomaterials Liver injury