

Src 与胶原同源插头蛋白 (Shc) 调控曲格列酮引起的 PAE 细胞自噬

袁栋栋^{1,2}, 吴向琴^{1,3}, 陈秀玲⁴, 姜学军^{1*}

¹ 中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

² 中国科学院大学, 北京 100049

³ 安徽大学生命科学学院, 合肥 230039

⁴ 中国科学院微生物研究所, 中国普通微生物菌种保藏管理中心, 北京 100101

摘要:【目的】明确 Src 与胶原同源插头蛋白 (Src homology and collagen homology, Shc) 调控曲格列酮 (troglitazone, TZ) 引起的猪血管内皮 (porcine aortic endothelial, PAE) 细胞自噬的机制。【方法】我们先利用激光共聚焦显微镜、蛋白免疫杂交检测了 TZ 引起的 PAE 细胞自噬; 然后通过 siRNA 干扰敲降 Shc, 转染 wtShc、3mShc 等质粒的方法确定了 p52Shc 参与自噬的调控; 最后通过 siRNA 干扰敲降 Ulk1 得到最终结论。【结果】通过研究发现, 敲降 Shc, 会增加细胞的自噬; 而过量表达 p52Shc 抑制了 TZ 引起的细胞自噬; p52Shc 抑制自噬与其自身的酪氨酸磷酸化位点 Tyr239、Tyr240 和 Tyr317 相关; 同时发现, p52Shc 能抑制自噬调节分子磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 及其下游底物 Unc51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase-1, Ulk1) 的活性。【结论】Shc 通过调控 AMPK 与 Ulk1 的磷酸化调节 TZ 引起的细胞自噬。

关键词: 曲格列酮 (troglitazone, TZ), 胶原同源插头蛋白 (Src homology and collagen homology, Shc), 自噬, 磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK), Unc51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase-1, Ulk1)

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 10-1072-08

自噬分为大自噬, 小自噬, 分子伴侣自噬。我们通常说的自噬指的是大自噬, 是降解细胞器的唯一途径。在细胞饥饿以及受到胁迫时, 细胞质内会出现大量自噬泡, 对于维持细胞内稳态平衡及细胞存活有重要作用^[1]。自噬一般对细胞有保护作用, 但自噬发生过度, 会引起细胞的死亡。

Troglitazone (TZ) 中文名为曲格列酮, 属于噻

唑烷二酮类药物, 是一种人工合成的 PPAR γ (过氧化酶体增殖物激活受体) 的配体^[2], 可以改善胰岛素抵抗, 增加人体组织对胰岛素的敏感性, 增强胰岛素的作用, 但由于肝毒性较大, 部分国家已停止使用。近来研究表明, 曲格列酮还能引起多种细胞凋亡^[3], 目前正针对曲格列酮及其衍生物可能在将来癌症治疗方面的应用展开研究。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31171329)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807728; E-mail: jiangxj@im.ac.cn

作者简介: 袁栋栋 (1987–), 男, 山东人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤细胞自噬信号通路的研究。E-mail: yuandongdong000@126.com

收稿日期: 2013-03-19; 修回日期: 2013-04-25

雷帕霉素(Rapamycin, Rapa), 又称作西罗莫司(Sirolimus), 是一种细菌产生的新型大环内酯类免疫抑制剂, 最早在 1975 年从复活岛土壤吸水链霉菌中提取出来, 起初将其用作抗真菌治疗, 随后又发现其有免疫抑制作用而广泛应用于器官移植后的抗排斥反应当中。雷帕霉素是自噬调节信号 mTOR (mammalian target of rapamycin) 的抑制剂, 因而被认为是一种自噬激动剂。

Src 和胶原同源插头蛋白 (Src homology and collagen homology, Shc) 是哺乳动物细胞中典型的插头蛋白, 结构包含 N 末端 phosphotyrosine binding (PTB) 结构域和 C 末端 SH2 结构域, 参与主要生长因子信号通路^[4]。Shc 有 3 个重要的 Tyr 位点, 即 Tyr239、Tyr240 和 Tyr317, 通过他们与生长受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 结合, 激活下游 Ras/Raf/MAPK 通路。Shc 抗体检测确定 p66、p52 和 p46 的 3 种蛋白变体广泛存在于细胞系中。

研究表明, MEK/ERK 信号会对自噬有正调节作用, 减少 ERK 或特异性抑制 MEK 会抑制自噬^[5], 但作为其上游的 Shc 分子在自噬的调节中发挥怎样的作用, 目前还知之甚少。有报道显示, 在缺少激活的 p66Shc 时, 自噬会上升^[6], 但具体的机制不清楚。而有关 p52Shc 对自噬的调节目前还未见报道。在本文中, 我们将研究 p52Shc 调节自噬的具体信号通路, 以期能对 Shc 调节细胞自噬有一个更加清晰的认识, 也将有助于更好地认识 TZ 所引起自噬的调节机制, 为 TZ 及其类似化合物的临床应用增加理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒: PAE 细胞、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、质粒 GFP-LC3, 质粒 Vec (GFP 空载体)、wtShc (野生型的 p52Shc) 和质粒 3 m Shc (突变了的 p52Shc, 其中的 Tyr239、Tyr240 和 Tyr317 这 3 个磷酸化位点突变, 不能与 Grb2 结合), 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: Troglitazone、Rapamycin 和多克隆抗 LC3b 抗体购自 Sigma 公司; AMPK α 1/2、pAMPK α 1/2 (Thr172)、pACC (Ser79)、pUlk1

(Ser555) 和 Erk1/2 的抗体购自 Cell Signaling technology 公司; Shc 抗体购自 BD 公司; actin 抗体、Shc、Ulk1 特异性 siRNA 和对照 siRNA 购自 Santa Cruz 生物技术公司; Attractene Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司; DharmaFECT Transfection Reagent 1 购自 Thermo 公司。

1.1.3 主要仪器: CO₂ 细胞培养箱 (NUAIRE 公司)、小型台式离心机 (Thermo 公司)、台式冷冻高速离心机 (Sigma 公司)、-20℃ 低温冰箱 (海尔公司)、-70℃ 低温冰箱 (Heraeus 公司)、Trans-Blot 电转仪 (Bio-RAD 公司)、AE-6500 型电泳槽 (ATTO 公司)、JY600C 恒压恒流电泳仪 (JUNYI 公司)、MilliQ plus 超纯水系统 (Millipore 公司)。

1.2 细胞培养

PAE 细胞用 DMEM/F12 含 10% 的胎牛血清、1% 青链双抗培养, 当细胞生长接近汇合时进行传代。

A431 细胞用 DMEM 含 10% 的胎牛血清、1% 青链双抗培养, 当细胞生长接近汇合时进行传代。

1.3 用 TZ 或 Rapa 处理细胞并收集全细胞裂解液

1.3.1 TZ 处理: 将细胞分到六孔板中, 用 DMEM/F12 含 10% 的胎牛血清、1% 青链双抗培养, 12 h 后细胞密度为 70% 左右, 换无血清的 DMEM/F12 基础培养基, 加入 TZ (终浓度 25 μ mol/L) 进行刺激。

1.3.2 Rapa 处理: 将细胞分到六孔板中, 用 DMEM 含 10% 的胎牛血清、1% 青链双抗培养, 12 h 后要求细胞密度为 70% 左右, 不换液直接加入 Rapa (终浓度 10 nmol/L) 刺激。

药物处理到指定时间后用冷的 PBS 洗过细胞后, 吸净 PBS, 用 TGH 裂解液收集细胞。(TGH 的组成: 1 mL 母液 (1% Triton X-100, 10% 甘油, 50 mmol/L Hepes, pH7.4), 5 mol/L NaCl 20 μ L, 0.5 mol/L EGTA/EDTA 10 μ L, 0.1 mol/L NaF 10 μ L, 0.1 mol/L PMSF 20 μ L, 1 mol/L DTT 2 μ L, 0.5 mol/L Na3VO4 2 μ L, Protease inhibitor 1 μ L)。

1.4 细胞转染

将细胞分到 6 cm 盘中, 要求细胞密度为 70% 以上, 使用 Attractene Transfection Reagent, 按照 Reagent: 质粒 (体积 μ L: 质量 μ g) 4.5:1.2 根据转染试剂说明书步骤进行转染, 每个 6 cm 盘使用 1.2 μ g 质粒。

1.5 转染 GFP-LC3 质粒, 制作荧光片子

用 Attractene Transfection Reagent 转染 GFP-LC3

质粒 DNA,24 h后将细胞接种到有盖玻片的 6 孔板中,培养过夜。加入药物处理指定时间后,用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min.,然后 PBS 洗 2 次,封片。在激光共聚焦显微镜下观察。

1.6 免疫印迹检测 (Western Blot)

等量样品经过 8% 或 15% SDS-PAGE 分离蛋白,转膜至 PVDF 膜上后,PVDF 膜用 5% 奶粉封闭液室温封闭1 h,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 × 45 min,将漂洗后的 PVDF 膜进入暗室曝光,适当时间后洗片。扫描记录结果,进行灰度值计算。

1.7 siRNA 干扰敲降基因

将细胞分到 6 cm 盘中,培养过夜后,要求细胞密度为 30% 左右,使用 DharmaFECT Transfection Reagent 1 按照 Reagent:siRNA(体积 μL)1: 2(siRNA 浓度为10 μmol/L),根据转染试剂说明书步骤敲降基因,每个6 cm盘使用 6 μL siRNA。

2 结果

2.1 曲格列酮促进 PAE 细胞自噬

绿色荧光蛋白 GFP-LC3 是一种常用的自噬体标记物。正常情况下,细胞基础的自噬水平很低,GFP-LC3 呈弥散状分布。而自噬发生时,自噬体的数量增加,GFP-LC3 酯化,与自噬泡结合,呈明显的点状分布。激光共聚焦显微镜结果显示,TZ 刺激后,GFP-LC3 阳性点数明显增加(图 1-A)。

LC3-II 目前是唯一的可靠的与完整的自噬体相关的蛋白标记,LC3-II 与 actin 的比值能很好的反应自噬的变化情况^[7]。我们利用免疫印记检测 TZ 刺激后 PAE 细胞中 LC3-II 的变化。结果显示,相对于对照组,TZ 增加了 LC3-II 的量(LC3-II/A 的比值明显升高),说明 TZ 诱导 PAE 细胞自噬的发生(图 1-B)。

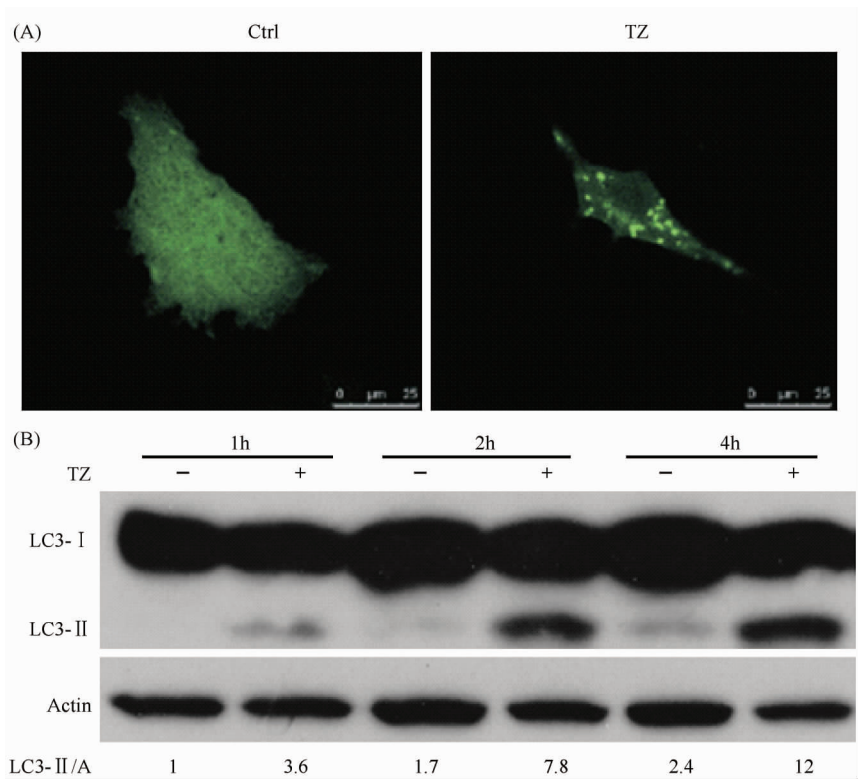


图 1. TZ 增加了细胞自噬

Figure 1. TZ enhanced autophagy in PAE cells. A: PAE cells were transfected with plasmid expressing GFP-LC3, and treated in DMEM/F12 medium with DMSO (Ctrl) or TZ (25 μmol/L) for 2 h. Following fixation, cells were immediately visualized by confocal microscopy. B: PAE cells were treated with TZ (25 μmol/L) for upon to 4 h before analyzing by immunoblotting with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification, and the ratios of LC3-II to actin were presented below the blots.

2.2 敲降 Shc 后增加基础自噬和 TZ 诱导的自噬

有报道称抑制 p66(Shc 的一种变体),LC3 的切割会增加^[8]。Shc 与 MEK/ERK 信号和 PI3K 信号关系密切^[9-10],这促使我们猜测,Shc 可能在 TZ 引起的 PAE 细胞自噬中发挥作用。我们用 siRNA 敲降 Shc,将细胞分到六孔板中,TZ 刺激,然后用 Western Blot 检测:相对于对照组,敲降 Shc,未加药处理时,LC3-II 与 actin 的比值由 1 升到 6.5;而 TZ 处理后,相对对照组,比值由 11 升到 20(图 2)。也就是说相对于对照组,PAE 细胞的基础自噬增加,TZ 诱导的 PAE 细胞自噬增加显著。这说明 Shc 参与了 TZ 引起的 PAE 细胞自噬。

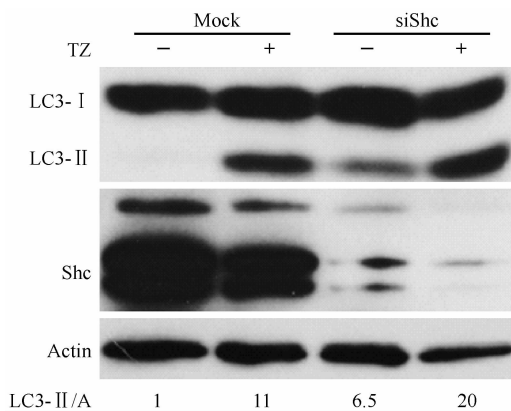


图 2. 敲降 Shc 增加基础自噬和 TZ 诱导的自噬

Figure 2. Shc depletion enhanced autophagy induced by TZ. PAE cells were transfected with Shc siRNA for 48 h, and then the cells were split and incubated for 12 h. Following treatment of TZ (25 $\mu\text{mol/L}$) for 1 h, cells were lysed and the lysates were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification. The ratios of LC3-II to actin (A) were presented below the blots.

2.3 Shc 参与 TZ 和 Rapa 引起的自噬调控

为了进一步证明 Shc 调控药物引起的细胞自噬具有广泛性,我们又在 A431 细胞中分别用 TZ 和 Rapa 进行了实验。我们用 siRNA 敲降 Shc,然后分别用 TZ 和 Rapa 处理,通过 Western blot 进行检测。用 TZ 处理 A431 细胞时,所得结果与在 PAE 细胞中类似(图 3-A);而用 Rapa 处理细胞时,我们看到:相对于对照组,敲降 Shc,未加药处理时,LC3-II 与 actin 的比值由 1 升到 1.7, Rapa 处理后,比值几乎没有变化,由 1.9 到 2.0;而在干扰组, Rapa 处理使比值由 1.7 升到 2.0(图 3-B)。也就是说相对于对

照组,干扰 Shc 后, A431 细胞的基础自噬增加, Rapa 诱导的细胞自噬增加不明显。

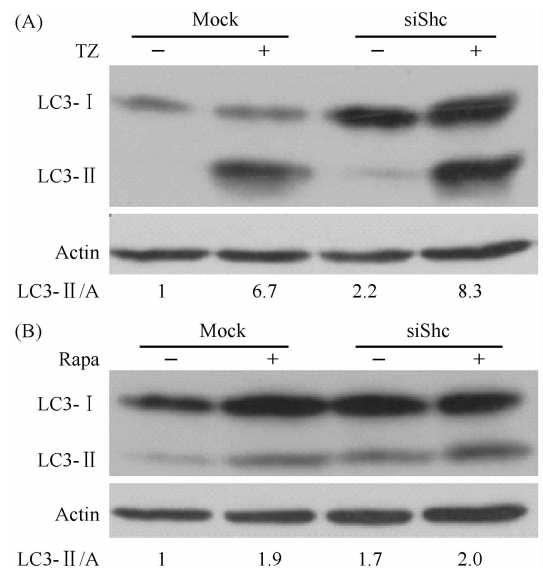


图 3. Shc 参与 TZ 和 Rapa 引起的自噬调控

Figure 3. Depletion of Shc blunted autophagy induced by Rapa in A431 cells. A431 cells were transfected with Shc siRNA for 48 h and then the cells were split and incubated for 12 h. Following treatment of TZ (25 $\mu\text{mol/L}$) for 3 h or Rapa (10 nmol/L) for 30 min. Cells were lysed and the lysates were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification. The ratios of LC3-II to actin (A) were presented below the blots.

2.4 过量表达 p52Shc 抑制 TZ 引起的自噬

Shc 在 TZ 引起的 PAE 细胞自噬中发挥作用,这促使我们进一步深入探索 Shc 的一个亚型 p52Shc 是否在该过程中起作用。我们在 PAE 细胞中分别转入 GFP 空载体 (Vec)、wtShc (野生型 p52Shc 质粒) 或 3mShc (Tyr239、Tyr240 和 Tyr317 这 3 个磷酸化位点突变了了的 p52Shc) 质粒,然后用 TZ 处理,通过 Western blot 检测 LC3-II 的表达含量的变化。结果表明过量表达 p52Shc 时,相对于对照组, TZ 处理后自噬明显降低, LC3-II/A 的值从 11 降到 1.9 (图 4-B);而过量表达它的突变体 3mShc 时这种抑制作用在 PAE 细胞中消失 (图 4-C)。上述数据表明 p52Shc 在 TZ 引起的 PAE 细胞自噬过程中起到抑制作用,而 Tyr239、Tyr240 和 Tyr317 这 3 个磷酸化位点对于信号向下游转导,调控自噬发挥重要作用。

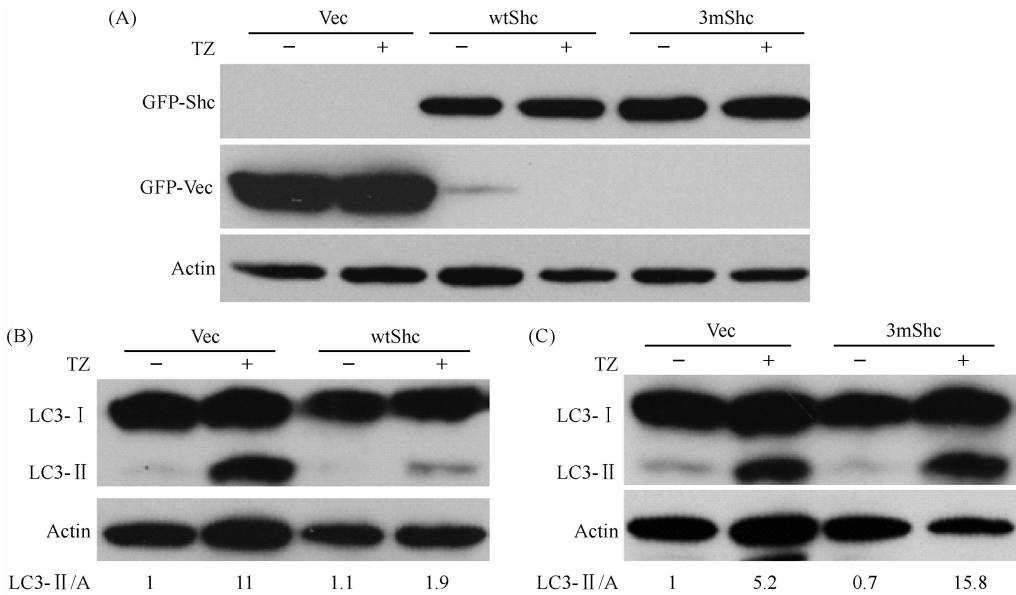


图 4. 过量表达 p52Shc 抑制 TZ 引起的自噬

Figure 4. Overexpression of p52Shc suppressed TZ-depended autophagy. A: The expression of transfected Shc was detected by immunoblotting. B and C: PAE cells were transfected with vector (Vec), wtShc or 3mShc plasmid, 24 h after transfection, cells were treated with TZ (25 μ mol/L) for 1 h before immunoblot analysis with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification. The ratios of LC3-II to actin were presented below the blots.

2.5 过量表达 p52Shc 抑制 AMPK 和 Ulk1 的活性

此前,我们实验室以前的研究发现,磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)参与了曲格列酮(TZ)诱导的 HeLa 细胞的自噬^[11]。AMPK 参与 Shc 的下游信号通路,而 Shc 在 TZ 引起的 PAE 细胞自噬过程中起到抑制作用,我们猜测 Shc 可能通过 AMPK 起作用。我们在 PAE 细胞中转染 wtShc 质粒后,检测了 AMPK 的活性。过量表达 wtShc 后,TZ 刺激引起的 AMPK 的磷酸化下降较显著,pAMPK/tErk 值从 3.0 下降到 2.3(图 5-A)。ACC 是 AMPK 的底物,它的磷酸化显示了 AMPK 的活性情况^[12]。结果显示:相对于对照组,TZ 处理后 ACC 的磷酸化明显下降,pACC/tErk 的值从 10.6 下降到 4.6(图 5-B)。AMPK 活性下降。

Ulk1 是 AMPK 的下游底物,Ser555 位点可以被 AMPK 磷酸化,引起细胞自噬^[13]。我们的结果显示,相对于对照组,转染 wtShc,TZ 处理后,Ulk1 的 Ser555 位点磷酸化明显下降,pUlk1/tErk 的值从 1.7 下降到 0.3(图 5-B)。以上数据说明 Shc 可能通过其下游底物 AMPK、Ulk1 调控自噬。

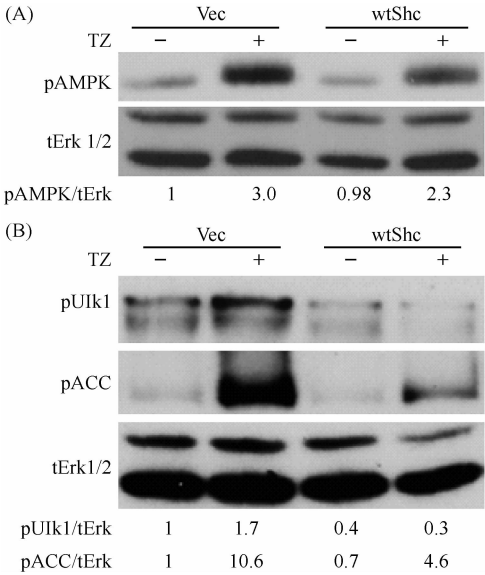


图 5. 过量表达 wtShc 抑制 AMPK 和 Ulk1 磷酸化

Figure 5. Overexpression of wtShc inhibited the phosphorylation of AMPK and Ulk1. PAE cells were transfected with vector (Vec) or wtShc plasmid. 24 h after transfection, cells were split and incubated for 12 h. Following treatment of TZ (25 μ mol/L) for 1 h, cells were lysed and the lysates were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification. The ratios of pAMPK, pUlk1 and pACC to tErk were presented below the blots. Total Erk1/2 (tErk) was as the loading control.

2.6 敲降 Ulk1 抑制 TZ 引起的 PAE 细胞自噬下降

为了进一步证实 Ulk1 在 TZ 引起的 PAE 细胞中的作用,我们用 siRNA 敲降 Ulk1,用 TZ 处理细胞,检测 PAE 细胞自噬变化情况。结果表明,敲降 Ulk1 后,相对于对照组,TZ 引起的 Ulk1 Ser555 位点磷酸化明显降低,pUlk1/tErk 值从 6.4 下降到 1.5,说明干扰效果显著(图 6-A)。而 TZ 诱导的 PAE 细胞自噬大幅减少,LC3-II/A 的值从 2.7 下降到 0.9 (图 6-B)。以上结果表明 Ulk1 在 TZ 引起的 PAE 细胞自噬过程中发挥重要作用。

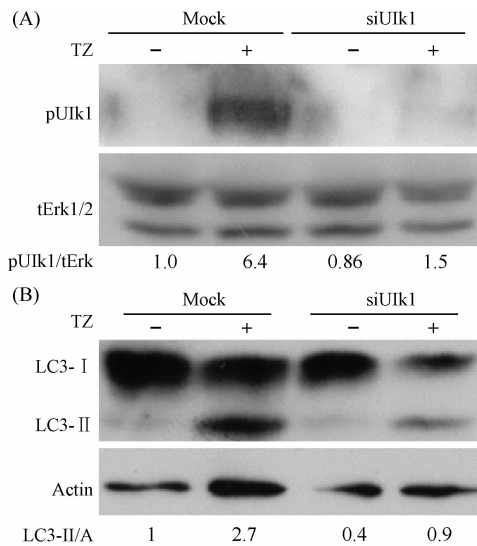


图 6. 敲降 Ulk1 抑制 TZ 引起的 PAE 细胞自噬

Figure 6. Ulk1 depletion blunted TZ-inducing autophagy. PAE cells were transfected with Ulk1 siRNA for 48 h, then the cells were split and incubated for 12 h. Following treatment of TZ (25 $\mu\text{mol/L}$) for 1 h, cells were lysed and the lysates were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification. The ratios of LC3-II to actin were presented below the blots.

3 讨论

本研究的一个重要发现是插头蛋白 Shc 的一个亚型 p52Shc 在 TZ 引起的细胞自噬中发挥调控作用,而这种作用是通过影响 AMPK 及其下游的 Ulk1 的磷酸化来完成的。这样,经典地 Ras/MAPK 信号通路,可能会通过这类插头蛋白来影响 AMPK/Ulk1 自噬信号。这种信号的相互串扰和网络循环可能是造成细胞内同样的信号,由于受不同的刺激会起相

互矛盾甚至相反作用的原因之一。

在本研究中,在 PAE 和 A431 细胞中用 siRNA 敲降 Shc,再用 TZ 处理后,相对于对照组,自噬会显著升高,说明 Shc 参与了 TZ 诱导的自噬。而用 Rapa 处理干扰 Shc 后的 A431 细胞我们却发现:相对于对照组,敲降 Shc 后,A431 细胞的基础自噬增加,Rapa 诱导的细胞自噬增加不明显,或者说 Shc 的缺失会抑制 Rapa 引起的自噬。这些结果表明,Shc 对自噬的调节具有细胞和刺激物依赖的特点,也与细胞的状态有关。

p52Shc 的 CH1 域磷酸化后,与插头蛋白 Grb2 相互作用,招募 Grb2-SOS 复合物,激活 Ras,进而激活 MAPK 信号通路^[14],后者可以调节细胞自噬。又有研究表明,抑制 Shc 的一个剪接亚型 p66Shc,会引起自噬增加^[8]。我们的结果不仅丰富了之前的研究结果,而且发现了与 p66Shc 功能不同的 p52Shc 也参与自噬的调节,而这种调节是通过 AMPK/Ulk1 来实现的。

AMPK 是细胞体内的一个感受能量的激酶,它对自噬的调节作用复杂,可能具有双向性。一般认为 AMPK 磷酸化后能诱导自噬。而有研究发现,AMPK 的激活会抑制自噬的发生^[15]。AMPK 的这种作用,可能与其反馈调控 mTOR 和其他信号通路有关^[16]。Ulk1 是细胞自噬所必需的一种蛋白^[17]。在葡萄糖饥饿条件下,它的 Ser317, Ser777 位点可以被 AMPK 磷酸化,引起自噬;mTOR 能磷酸化 Ulk1 的 Ser757 位点,阻碍它与 AMPK 的相互作用,从而抑制自噬^[18]。在能量压力条件下,通常认为 AMPK 会使 Ulk1 的 Ser555 磷酸化来促进自噬的发生^[13]。在本研究中,转染 wtShc 质粒会降低 TZ 引起的 AMPK 以及 Ulk1 的 Ser555 位点的磷酸化;而用 siRNA 敲降 Ulk1 则会明显降低 TZ 引起的 PAE 细胞自噬,证明了 p52Shc 是通过抑制其下游通路 AMPK、Ulk1 通路对自噬进行调节。

TZ 是噻唑烷二酮类药物的一种,现在研究发现该类化合物能够诱导肿瘤细胞的凋亡,深入研究可能会为该类化合物将来临床应用治疗肿瘤提供理论依据。而除了凋亡外,针对细胞自噬也成为肿瘤药物筛选的靶点。我们的研究进一步探索了 TZ 是如何引起细胞自噬的,找到了一个潜在的自噬调控靶蛋白 Shc,丰富了细胞自噬调控机制,为该类化合物更好的临床应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004, 263(1): 55-72.
- [2] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson T, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome-activated receptor γ (PPAR γ). *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(22): 12953-12956.
- [3] Okura T, Nakamura M, Takata Y, Watanabe S, Kitami Y, Hiwada K. Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 407(3): 227-235.
- [4] Wills MKB, Jones N. Teaching an old dogma new tricks: twenty years of Shc adaptor signaling. *Biochemical Journal*, 2012, 447(1): 1-16.
- [5] Wang JR, Whiterman MW, Lian HQ, Wang GX, Singh A, Huang DY, Denmark T. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(32): 21412-21424.
- [6] Brown JE, Zeiger SLH, Hettinger JC, Brooks JD, Holt B, Morrow JD, Musiek ES, Milne G, McLaughlin B. Essential role of the redox sensitive kinase p66shc in determining energetic and oxidative status and cell fate in neuronal preconditioning. *The Journal of Neuroscience*, 2010, 30(15): 5242-5252.
- [7] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 2007, 3(6): 542-545.
- [8] Kleman AM, Brown JE, Zeiger SLH, Hettinger JC, Brooks JD, Holt B, Morrow JD, Musiek ES, Milne GL, McLaughlin B. P66shc's role as an essential mitophaghiic molecule in controlling neuronal redox and energetic tone. *Autophagy*, 2010, 6(7): 948-949.
- [9] Ravichandran KS. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, 2001, 20(44): 6322-6330.
- [10] vander-Geer P, Wiley S, Gish GD, Pawson T. The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Current Biology*, 1996, 6(11): 1435-1444.
- [11] Jin X, Yuan D, Chen X, Jiang X. AMP-activated protein kinase- α is involved in the autophagy and apoptosis caused by troglitazone. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(7): 840-849. (in Chinese)
金昕,袁栋栋,陈秀玲,姜学军. 磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)参与了曲格列酮诱导的 HeLa 细胞自噬和凋亡. *微生物学报*, 2012, 52(7): 840-849.
- [12] Phoenix KN, Vumbaca F, Claffey KP. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ER α negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 113(1): 101-111.
- [13] Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, GelinoSR, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu R, Hansen M, Shaw RJ. Phosphorylation of Ulk1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 2011, 331(6016): 456-461.
- [14] Raffaello A, Rizzuto R. Mitochondrial longevity pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1813(1): 260-268.
- [15] Samari HR, Moller MT, Holden L, Asmyhr T, Seglen PO. Stimulation of hepatocytic AMP-activated protein kinase by okadaic acid and other autophagy-suppressive toxins. *Biochemical Journal*, 2005, 386(Pt 2): 237-244.
- [16] Alers S, Loffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1 /2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts and feedbacks. *Molecular and Cellular Biology*, 2012, 32(1): 2-11.
- [17] Chan EYW, Kir S, Tooze SA. SiRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multi-domain modulator of autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(35): 25464-74.
- [18] Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(2): 132-141.

Src homology and collagen homology (Shc) mediates autophagy induced by troglitazone in PAE cells

Dongdong Yuan^{1,2}, Xiangqin Wu^{1,3}, Xiuling Chen⁴, Xuejun Jiang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ College of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China

⁴ China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [**Objective**] We investigated the mechanism of Src homology and collagen homology (Shc) in autophagy caused by troglitazone (TZ). [**Methods**] To reveal the regulatory role of p52Shc in autophagy, we used confocal microscopy and immunoblotting to examine autophagy induced by TZ. Then we used small RNA interference (siRNA) to deplete Shc and plasmids transfection to overexpress wtShc as well as 3mShc in PAE cells. Finally, we reached conclusion by detecting autophagic status following the deprivation of UNC-51-like kinase -1 (Ulk1) by siRNA. [**Results**] We found that the deprivation of Shc showed to enhance autophagy, whereas p52Shc over expression suppressed TZ-depended autophagy concurring with an attenuated AMP-activated protein kinase (AMPK) and Ulk1 signaling. Besides, it demonstrated that p52Shc tyrosine sites of 239, 240 and 317 implemented a critical role in the process. [**Conclusion**] Collectively, Shc adaptor protein was involved in TZ-inducing autophagy likely via affecting AMPK and Ulk1 signaling. **Keywords:** TZ (Troglitazone), Shc (Src homology and collagen homology), autophagy, AMPK (AMP-activated protein kinase), Ulk1 (UNC-51-like kinase -1)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171329)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807728; E-mail: jiangxj@im.ac.cn

Received: 19 March 2013/Revised: 25 April 2013

微生物学一直是生命科学中领先的学科

微生物学学科的研究对象决定了它有如下两方面的显著特点:

微生物作为最简单的生命体而成为生命科学研究不可替代的基本材料,由此也奠定了微生物学在生命科学中的基础地位;

微生物极其丰富的生物多样性决定了它们具有代谢产物多样性,同时又与人类、动植物和环境有着密切的相互作用,使得微生物学也成为应用领域里十分活跃的一门学科。

摘自《国家自然科学基金 1999 年度项目指南》