

# 自噬溶酶体调控机制及其与宫颈癌变的关系

武碧玲, 王志莲\*

基金项目: 山西省基础 Research 计划(自由探索类)项目(项目编号: 20210302123271)

作者单位: 030000 太原 山西, 山西医科大学第二医院妇产科

作者简介: 武碧玲, 山西医科大学硕士研究生在读, 主要研究方向为妇科肿瘤

\* 通信作者, E-mail: ZL2009wang@163.com

【关键词】 宫颈癌变; 自噬溶酶体; HR-HPV; STX17; YKT6

【中图分类号】 R 711.74; R 329.2<sup>\*8</sup> 【文献标识码】 A

【文章编号】 1674-4020(2022)12-058-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-4020.2022.12.14

宫颈癌是全世界女性发病率及死亡人数第4位的癌症<sup>[1]</sup>, 高危人乳头瘤病毒( high risk-human papilloma virus, HR-HPV)持续感染可导致女性患宫颈癌<sup>[2]</sup>。全世界每年新发宫颈癌病例中近1/3发生在中国, 在中国宫颈癌仍是重要的公共卫生问题<sup>[3]</sup>。因此, 深入研究 HR-HPV 引起宫颈癌变的机制对于减少宫颈癌变的发生发展有非常重要的临床意义。

自噬是高度诱导的细胞内降解系统。首先, 隔离膜隔离部分细胞质形成双膜结构, 即自噬小体, 自噬小体沿着微管穿过动力蛋白-动力蛋白复合物到达核周区域, 并在此与溶酶体融合, 形成自噬溶酶体<sup>[4]</sup>, 最终降解为封闭的内容物。抑制自噬溶酶体形成是病毒篡夺自噬的最常见机制之一, 其确保了病毒颗粒的组装<sup>[5]</sup>。HR-HPV 会通过不同的细胞通路影响宫颈细胞自噬, 但它们似乎有一个共同的结果, 即抑制自噬溶酶体形成(自噬的最后一步), 这是自噬抑制的主要目标。哺乳动物自噬过程中自噬溶酶体是由两个自噬特异性 SNARE 复合体直接调控的, 即 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体和 YKT6-SNAP29-STX7 复合体。现就直接调控自噬溶酶体形成的两个复合体及其与宫颈癌变的关系进行综述。

## 1 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体

### 1.1 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体形成机制

STX17 为可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体( soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)蛋白, 包含 Qa-SNARE 基序, 其大量存在于内质网中, 具有一种特殊的 C-末端发夹结构, 这对其在自噬小体上的定位非常重

要<sup>[6]</sup>。STX17 通过 C-末端发夹结构与免疫相关 GTPase M( immunity-related GTPase M, IRGM) 结合, IRGM 进而与自噬相关基因 8( autophagy-related 8, ATG8) 结合, ATG8 提供了将该复合体运送到自噬小体的地址<sup>[7]</sup>。VAMP8 主要定位于晚期溶酶体, 由 R-SNARE 基序和跨膜结构域组成。SNAP29 主要包含 Qb-及 Qc-SNARE 基序, 缺乏任何跨膜区或膜靶向基序, 需与其他内吞因子相互作用, 如 STX17<sup>[6]</sup>。

SNARE 复合体是自噬溶酶体形成的核心机制, Qa、Qb、Qc 和 R-SNARE 蛋白形成平行四股螺旋束, 稳定复合物以促进自噬溶酶体形成。到达完整的自噬小体后, STX17 Qa-SNARE 基序可与 SNAP29 Qb-SNARE、Qc-SNARE 基序和 VAMP8 R-SNARE 基序共同组装形成 SNARE 复合物, 从而介导自噬溶酶体形成。STX17 的缺失阻断了 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体的形成, 损害了自噬溶酶体形成, 导致自噬小体积累<sup>[8]</sup>。

### 1.2 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体形成条件

STX17 可以通过其 SNARE 结构域的乙酰化来修饰, 该结构域受组蛋白乙酰转移酶 CREB 结合蛋白( CREB binding protein, CREBBP) 和组蛋白去乙酰化酶 2( histone deacetylase 2, HDAC2) 的特异性调控。在自噬过程中, 由于 CREBBP 失活导致 STX17 去乙酰化, 使 STX17 能够与 SNAP29 和同型融合蛋白分选复合物( homotypic fusion and protein sorting, HOPS) 相互作用<sup>[9]</sup>。

SNAP29 的自噬活性受 O-连接  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖( O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine, O-GlcNAc) 修饰的调节, 这种修饰引起的空间位阻阻碍了 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体的形成。饥饿时, SNAP29 上的 O-GlcNAc 水平降低, 未修饰的 SNAP29 与 STX17 及

VAMP8 形成更稳定的复合物<sup>[10]</sup>。

VAMP8 磷酸化可通过阻断 SM 样蛋白 SCFD1 到自噬溶酶体的募集抑制 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体的形成。VAMP8 在去磷酸化时促进 SCFD1 募集到自噬溶酶体,从而促进 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体的形成<sup>[11]</sup>。

### 1.3 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体形成协助因素

尽管 SNARE 蛋白是自噬溶酶体形成的核心机制,但是 SNARE 蛋白本身不能提供有效的融合,需一些栓系因子的帮助。

HOPS 是一种进化上保守的膜拴系复合物,由 4 种核心亚单位蛋白(VPS11、VPS16、VPS18 和 VPS33A)以及 2 种补充蛋白(VPS39 和 VPS41)组成。STX17 与 HOPS 复合物的多组分亚单位蛋白相互作用,将自噬小体和溶酶体膜紧密连接在一起,促进 SNARE 复合体的组装,以介导自噬溶酶体形成,敲除 HOPS 复合物组分会阻止自噬通量并导致自噬小体积聚<sup>[12]</sup>。新型冠状病毒的 ORF3a 与 HOPS 复合物组分 VPS39 相互作用并将其整合,从而阻止 HOPS 复合物与 STX17 相互作用,进而阻断了 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体的组装<sup>[13]</sup>。

RAB7 是小分子鸟苷三磷酸酶 (small guanosine triphosphatases, GTPase) 中最具特征的成员之一,定位于晚期溶酶体,是真核生物膜运输的主要调节者,在自噬途径中具有多种功能,通过在 GDP 结合的非活性状态和 GTP 结合的活性状态之间循环,发挥开关分子作用。莫能菌素敏感蛋白 1(monensin sensitivity protein 1, Mon1)-咖啡因、钙和锌 1 复合物可以激活 RAB7 并将其招募到自噬小体中<sup>[14]</sup>。PLEKHM1 是一种 RAB7 效应器,能够在溶酶体膜上招募 HOPS 复合物使其与 RAB7 共同促进 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体的组装<sup>[15]</sup>。镉通过下调 RAB7 抑制自噬溶酶体形成,而恢复 RAB7 的蛋白表达后自噬溶酶体形成随之恢复<sup>[16]</sup>。

自噬相关基因 14 (autophagy-related 14, ATG14) 是 III 类磷脂酰肌醇-3 激酶 (III phosphatidylinositol 3-kinase complex, PI3K) 复合物重要的自噬特异性调节因子,能促进无蛋白脂质体的膜连接。ATG14 通过卷曲结构域与 STX17 的 SNARE 核心区结合,稳定自噬小体上的 STX17-SNAP29 二元 t-SNARE 复合物,并为其与 VAMP8 相互作用做准备,以促进自噬溶酶体形成<sup>[17]</sup>。另外,含有 ATG14 的空泡蛋白分类 34 (vacuolar protein sorting 34, Vps34) PI3 激酶可刺激 PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate) 阳性自噬小体生成,PI3P 能吸引 Mon1-Ccz1 复合物,进而促进 RAB7 向自噬小体募集<sup>[14]</sup>。抑制细胞中 ATG14 的表达,会损害自噬溶酶体形成,而过表达 ATG14 可促进自噬溶酶体形成<sup>[18]</sup>。

## 2 YKT6-SNAP29-STX7 复合体

YKT6 是一种 R-SNARE 蛋白,其 N 端含有一个长蛋白结构域,是其募集到自噬小体所必需的,但不包含跨

膜结构域,其 C 端由一个 SNARE 结构域和一个脂化位点组成,膜靶向依赖于 C 端脂化位点<sup>[19]</sup>。

Takáts S 等<sup>[20]</sup>在果蝇及体外的研究中发现 YKT6 作为 R-SNARE 蛋白可以与含有 Qbc-SNARE 基序的 SNAP29 及含有 Qa-SNARE 基序的 STX17 结合形成三元复合体。但囊泡相关膜蛋白 7 (vesicle associated membrane protein 7, VAMP7) (作用同哺乳动物体内 VAMP8) 可取代它与 SNAP29 和 STX17 形成更紧密的四股螺旋束。且发现 YKT6 的过表达不能挽救 VAMP7 沉默所导致的自噬缺陷,但 VAMP7 的过表达可以修复 YKT6 沉默所造成的缺陷。因此猜测, YKT6 作用于 STX17 上游,在形成 STX17-SNAP29-VAMP7 复合体方面具有非规范的调节作用。

Matsui T 等<sup>[19]</sup>在 HeLa 细胞中的研究发现 STX17 基因敲除后自噬溶酶体形成有一定程度的保留, YKT6 基因的敲除抑制了部分自噬溶酶体形成,但 STX17 基因和 YKT6 基因同时敲除会完全抑制自噬溶酶体形成。且 YKT6 基因敲除后自噬溶酶体形成的缺失不能通过 STX17 的过表达来恢复, STX17 和 YKT6 的缺失对自噬溶酶体形成有相加的抑制作用,这表明 YKT6 和 STX17 是独立发挥作用的。

在 HeLa 细胞中的研究表明, YKT6 作为一种 R-SNARE 蛋白可以与含有 Qbc-SNARE 基序的 SNAP29 结合,并与多个 Qa-SNARE 蛋白结合形成足够稳定的 SNARE 复合体,溶酶体定位的 STX7 是 HeLa 细胞中的 Qa-SNARE 蛋白<sup>[19,21]</sup>。在 STX17 基因敲除的 HeLa 细胞中抑制 STX7 的表达会进一步抑制自噬溶酶体形成。在 STX17 基因敲除细胞中, STX7 与 SNAP29 和 YKT6 相互作用,在 YKT6 基因敲除细胞中, STX17 与 SNAP29 和 VAMP8 相互作用。它们对自噬小体的募集并不是相互依赖的,它们可以独立地招募到自噬体内。这些结果进一步表明,这两个复合体完全独立起作用<sup>[19]</sup>。

在研究自噬小体和溶酶体样空泡融合的体外实验中也发现了 YKT6 体外融合的机制。与 STX17-VAMP8-SNAP29 复合体形成类似, Atg14-Vps34 复合体产生 PI3P 样自噬小体,招募 GTP 形式的 RAB7 样 Ypt7, Ypt7 招募 HOPS 复合物进而招募 SNARE 蛋白进行融合,而 Ypt7 也需要 Mon1-Ccz1 复合物的激活<sup>[22]</sup>。YKT6 会被自噬相关基因 1 (autophagy-related 1, ATG1) 激酶直接磷酸化,使其 SNARE 区域处于非活性状态,无法进行 SNARE 复合体的组装,而去磷酸化的 YKT6 才具有结合活性<sup>[23-24]</sup>。

## 3 自噬溶酶体与宫颈癌变关系

HR-HPV 抑制自噬溶酶体形成与宫颈癌变密切相关。Mattosco D 等<sup>[25]</sup>的研究指出 HR-HPV 具有将病毒基因组整合到宿主 DNA 中的能力,从而使病毒癌蛋白 E6/E7 过度表达。E6 通过对 p53 的作用选择性地抑制自噬溶酶体的形成,在细胞转化过程中促进了自噬途径

的损伤。他们的研究还表明 HPV16 E6/E7 在原代人角质形成细胞中的过表达使细胞中自噬溶酶体的形成减少,而自噬小体聚集<sup>[25]</sup>。Zhang J 等<sup>[26]</sup>的研究表明自噬在 HR-HPV 感染时被抑制,以避免消化 HR-HPV,并在随后的过程中促进受感染细胞的增殖和癌变,HR-HPV 通过多种途径抑制自噬溶酶体形成,从而抑制自噬。因此,恢复自噬过程在治疗宫颈癌变中是非常重要的。提示 HR-HPV E6/E7 可通过抑制自噬溶酶体的形成来抑制自噬,而自噬受到抑制使宫颈细胞清除 HR-HPV 的能力减弱,造成 HR-HPV 持续感染,从而促进宫颈癌变。

增强宫颈癌细胞自噬溶酶体的形成会影响其活性。Li Z 等<sup>[27]</sup>的研究表明雷地黄素 A 通过抑制 HPV18 E6/E7 可诱导细胞自噬,抑制 HeLa 细胞增殖,提示抑制 HR-HPV E6/E7 可以导致自噬溶酶体的形成增多诱导自噬,从而抑制宫颈癌细胞的增殖。Xie X 等<sup>[28]</sup>的研究证实通过增强自噬溶酶体形成可显著下调宫颈癌细胞中 HPV E6 和 E7 蛋白的表达水平,并有效抑制宫颈癌细胞的生长。Zhang F 等<sup>[29]</sup>的研究显示加入苦参碱后,HeLa 和 SiHA 细胞内可见大量的自噬溶酶体,且细胞增殖受到影响,进一步证实通过增强自噬溶酶体形成可影响宫颈癌细胞增殖。

通过控制自噬溶酶体形成调控物质可控制宫颈癌变。研究表明 RAB7 的表达增加会抑制细胞感染 HR-HPV 的风险,进而控制宫颈癌变的可能性<sup>[30]</sup>,提示通过改变自噬溶酶体形成的调控机制来调控自噬溶酶体形成,从而进一步控制 HR-HPV 的感染及宫颈癌变。

#### 4 结语

目前自噬溶酶体形成在宫颈癌变中的作用已成为研究热点,研究影响该步骤的两个自噬特异性 SNARE 复合体的具体机制有望为宫颈癌发病机制提供更多依据。研究这两个 SNARE 复合体与 HR-HPV 及宫颈癌变之间的关系有望为宫颈癌前病变及宫颈癌提供相关治疗措施。但是目前鲜有此类研究,这也为今后提供了新的研究方向。

#### 【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] Senkomago V, Henley SJ, Thomas CC, et al. Human papillomavirus-attributable cancers-United States, 2012-2016 [J]. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2019, 68(33):724-728.
- [3] Zhang M, Song Y, Yu L. LncRNA PTCSC3 suppressed cervical carcinoma cell invasion and proliferation via regulating miR-574-5p [J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(11):7186-7194.
- [4] Bin Z, Yanli Y, Zhen Q, et al. GDF11 ameliorated myocardial ischemia reperfusion injury by antioxidant stress and up-regulating autophagy in STZ-induced type 1 diabetic rats [J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2020, 34(11):e201901106.
- [5] Armas-Rillo AL, Valera MS, Marrero-Hernández S, et al. Membrane dynamics associated with viral infection [J]. *Reviews in Medical Virology*, 2016, 26(3):146-160.
- [6] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes [J]. *Cell*, 2012, 151(6):1256-1269.
- [7] Kumar S, Jain A, Farzam F, et al. Mechanism of Stx17 recruitment to autophagosomes via IRGM and mammalian Atg8 proteins [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2018, 217(3):997-1013.
- [8] Vescovo T, Pagni B, Piacentini M, et al. Regulation of autophagy in cells infected with oncogenic human viruses and its impact on cancer development [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8:47.
- [9] Shen Q, Shi Y, Liu J, et al. Acetylation of STX17 (syntaxin 17) controls autophagosome maturation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(5):1157-1169.
- [10] Huang L, Yuan P, Yu P, et al. O-GlcNAc-modified SNAP29 inhibits autophagy-mediated degradation via the disturbed SNAP29-STX17-VAMP8 complex and exacerbates myocardial injury in type I diabetic rats [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 42(6):3278-3290.
- [11] Huang H, Ouyang Q, Zhu M, et al. mTOR-mediated phosphorylation of VAMP8 and SCFD1 regulates autophagosome maturation [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1):6622.
- [12] Takáts S, Pircs K, Nagy P, et al. Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in drosophila [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2014, 25(8):1338-1354.
- [13] Miao G, Zhao H, Li Y, et al. ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation [J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(4):427-442. e5.
- [14] Hegedüs K, Takáts S, Boda A, et al. The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(20):3132-3142.
- [15] Mcewan DG, Popovic D, Gubas A, et al. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins [J]. *Molecular Cell*, 2015, 57(1):39-54.
- [16] Wang T, Wang L, Zhang Y, et al. Puerarin restores autophagosome-lysosome fusion to alleviate cadmium-induced autophagy blockade via restoring the expression of Rab7 in hepatocytes [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12:632825.
- [17] Diao J, Liu R, Rong Y, et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes [J]. *Nature*, 2015, 520(7548):563-566.
- [18] Zhang H, Ge S, Ni B, et al. Augmenting ATG14 alleviates atherosclerosis and inhibits inflammation via promotion of autophagosome-lysosome fusion in macrophages [J]. *Autophagy*, 2021, 17(12):4218-4230.
- [19] Matsui T, Jiang P, Nakano S, et al. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17 [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2018, 217(8):2633-2645.