

## 细胞自噬的研究方法\*

马 泰<sup>1)</sup> 孙国平<sup>1)\*\*</sup> 李家斌<sup>2)\*\*</sup><sup>1)</sup> 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022; <sup>2)</sup> 安徽医科大学第一附属医院感染科, 合肥 230022

**摘要** 细胞自噬的研究是目前生物医学领域热点之一, 广泛参与各种生理和病理过程. 目前普遍采用的自噬检测方法包括电镜、免疫荧光、蛋白质印迹等方法检测自噬体及其标志蛋白. 研究的深入对自噬的检测方法也提出了更高的要求, 自噬功能障碍包括自噬体形成和降解障碍, 因此, 准确全面地评估自噬不仅包括自噬体的检测, 还包括动态观察整个自噬性降解的过程是否顺畅(即自噬潮分析). 另外, 通过药物或基因干预技术来人为地调控自噬以观察其在体内体外模型中的作用也是自噬分析的重要内容. 需要注意的是, 任何一种方法单独应用均不能作为自噬的依据, 对任何方法得到的结果进行解释时必须慎重, 特别是不能将自噬体的增多减少或自噬相关蛋白表达的高低等同于自噬的增强或减弱.

**关键词** 细胞自噬, 自噬体, 微管相关蛋白 1 轻链 3, 自噬潮, 检测方法

**学科分类号** Q251, Q-31

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00010

“自噬”的概念由比利时科学家 Christian de Duve 在 1963 年溶酶体国际会议上首先提出, 是指一些需降解的蛋白质和细胞器等胞浆成分被包裹, 并最终运送至溶酶体降解的过程, 自噬性降解产生的氨基酸和其他一些小分子物质可被再利用或产生能量. 现已明确, 自噬的主要功能之一实际上是在细胞受到应激性的死亡威胁时保持细胞的存活, 这是真核细胞维持稳态、实现更新的一种重要的进化保守机制. 虽然广义上的自噬包括巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperon-mediated autophagy)三种类型, 通常所说的自噬即指巨自噬, 也是目前研究最多的.

时至今日, 自噬的研究已经成为继凋亡之后生物医学最热门的领域之一, 特别是过去的 10 年见证了自噬研究的飞速发展. 除维持生理状态下机体的稳态功能外, 越来越多的研究表明自噬失调可能与肿瘤、感染、神经退行性变等疾病相关<sup>[1]</sup>. 因此, 要求研究者在探讨自噬的变化及生物学作用时, 不仅要观察自噬现象, 尚需监测自噬功能的变化并实验性调控自噬活性, 不仅研究细胞内的自噬变化, 还需要借助于整体动物模型, 并将自噬放到

整个机体水平去探讨其功能及作用.

自噬过程是一系列自噬性结构逐渐演变的过程. 自噬被诱导后, 细胞内形成一种称为隔离膜(isolation membrane)或吞噬泡(phagopore)的小囊泡样结构, 并与需降解的胞浆成分集结在一起, 然后隔离膜延伸并包裹封闭胞浆成分形成一个双层膜的结构, 即自噬体(autophosome), 自噬体与溶酶体直接融合形成自噬溶酶体(autopholysome), 或先与内涵体融合形成自噬内涵体(amphisome)后再与溶酶体融合, 包裹的胞浆成分最终在溶酶体酶的作用下被降解利用.

目前, 人们对自噬的检测主要包括基于检测自噬体的直接(观察自噬体的形态)和间接(检测自噬体表面蛋白标记)的方法以及基于自噬性降解原理设计的一些方法. 除此之外, 还可通过对自噬通路的调控来全面评价自噬功能对细胞行为或机体功能的

\* 安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2011A154)资助.

\*\* 通讯联系人.

孙国平. Tel: 0551-2923509, E-mail: sungp@ahmu.edu.cn

李家斌. Tel: 0551-2922713, E-mail: lijia斌@vip.sohu.com

收稿日期: 2012-01-06, 接受日期: 2012-02-28

影响, 如自噬抑制或激活剂、自噬相关基因的敲除及沉默等. 近年来, 一些自噬基因缺陷的动物模型及体内自噬活性分析方法的建立使得自噬研究设计更为合理、结果更具有说服力. 需要特别指出的是, 在有些文献上能看到通过一些荧光染料(如 lysotracker、monodansylcadaverine、acridine orange)标记的方法检测溶酶体的数量和活力来反映自噬, 目前认为这种方法缺乏特异性, 不能够代表自噬的出现. 此外, 还有检测一些自噬相关蛋白(如 Beclin-1、Atg5)的 mRNA 及蛋白质水平表达的方法, 实际上, 这也不能够反映自噬的激活, 因为在自噬过程中, 这些蛋白的激活表现在其翻译后的修饰以及蛋白间的相互作用, 而并不是表达量的增加. 在对待以上两种方法得出的结论时需理性看待, 避免盲从.

本文介绍了常用的自噬检测方法及其结果解释时的一些问题.

## 1 自噬性结构的电镜下形态学观察——自噬检测的金标准

透射电子显微镜是观察自噬现象的最直接、最经典的方法. 电镜检测自噬主要是基于辨认自噬体结构, 半个世纪前科学家就借助电镜最先观察到了自噬体结构. 自噬体通常是双层膜结构包含着未消化的胞浆成分或细胞器(如线粒体、内质网片段), 并未与溶酶体融合. 电镜下自噬体内容物的形态和电子密度与胞浆中的一致, 因此容易识别. 自噬体融合成自噬溶酶体后, 则变成单层膜结构, 其中含有降解不同阶段的胞浆成分. 一般来说, 降解的物质电子密度会增加, 形成黑色颗粒状或不定形的聚集, 因此也能够辨认<sup>[2]</sup>. 只是对于晚期自噬溶酶体无法识别内容物的来源. 在实际操作的时候, 如没有特殊的标记是难以区分自噬体、自噬内涵体和自噬溶酶体等不同成熟阶段结构的, 因此, 只能根据其内容物的结构完整情况大致用初始自噬囊泡(AVi)和降解自噬囊泡(AVd)来表示, 其中 AVi 内含的胞浆物质结构完整, AVd 内容物则被不同程度降解<sup>[3-4]</sup>.

虽然依照上述描述, 能够确认大部分自噬性囊泡, 但有以下问题需要注意: a. 由于普通透射电镜切片在制备过程中的处理可影响膜脂质成分, 因此切片上的自噬体并非都是两层膜结构, 有时可能仅有一层膜, 有时也可能是多层膜, 有时膜结构可能因为脂质被提取而无法辨认. 因此, 是否存在双

层界膜不能作为识别自噬体的依据; b. 避免将其他细胞器与自噬体混淆. 粗面内质网有时会包绕线粒体等细胞器, 容易误认为自噬体. 粗面内质网嵴脊有时在电镜切片上可形成杯状或环状结构, 酷似自噬体. 根据内质网上有核糖体结构而自噬体膜上无核糖体可鉴别. 另外, 线粒体也是含双层界膜的细胞器, 肿胀或含有沉淀物的线粒体外观与自噬体形态相似, 但仔细观察, 线粒体两层界膜间距一般较小且均一, 线粒体内膜折叠形成嵴, 而自噬体内膜不会折叠. c. 切片上的电子密度低(electron lucent)或空泡有时也会被误认为自噬囊泡<sup>[5]</sup>.

电镜观察仅能证明自噬性结构的存在, 难以反映自噬活性的强弱. Swanlund 等<sup>[6]</sup>介绍了一种免疫金电镜技术来对电镜结果进行定量分析. 通过图像分析软件自动测量所有自噬囊泡的面积( $\mu\text{m}^2$ ), 在结合其他检测方法的基础上, 如果一个细胞胞浆中被自噬性囊泡所占据的总面积增加, 则可说明自噬机制的上调, 同时, 这种方法得到的结论也是对其他方法得出结果的强有力验证.

## 2 基于自噬体标记蛋白 LC3 的检测方法

自噬过程由一系列自噬相关蛋白(Atg 蛋白)介导完成, 这些蛋白质在自噬体形成的不同阶段发挥作用. 微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3/Atg8)是自噬体膜上的标记蛋白. 细胞内存在两种形式的 LC3 蛋白: LC3- I 和 LC3- II. LC3 蛋白在合成后其 C 端即被 Atg4 蛋白酶切割变成 LC3- I, LC3- I 散在分布于细胞浆内. 当自噬体形成后, LC3- I 和磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)偶联形成 LC3- II 并定位于自噬体内膜和外膜. 与其他一些定位于自噬性结构膜上的 Atg 蛋白不同(仅在自噬过程的某一阶段发挥作用), LC3- II 始终稳定地保留在自噬体膜上直到与溶酶体融合, 因此被用来作为自噬体的标记, 且 LC3- II 的水平在某种程度上反映了自噬体的数量<sup>[7]</sup>.

### 2.1 细胞免疫荧光

LC3- I 在胞浆内弥散分布, LC3- II 聚集于自噬体膜上, 通过免疫荧光的方法检测内源性 LC3 或转染 GFP-LC3 融合蛋白的表达, 自噬诱导后的细胞表现为点状聚集增多. 理论上, 观察到的点状聚集的数目即为自噬体的数量, 根据点状聚集的密集程度可以判断细胞自噬的情况.

这种方法仅从总体上大致反映自噬的增加或减

少, 定量分析则存在局限性. 有人通过计数“含点状聚集的细胞数目”试图对自噬进行定量比较, 由于自噬是细胞的生理功能, 即便是在正常细胞中也不可避免地会观察到少量的点状聚集, 因此, 这种方法显然不合适, 除非制定一个标准来界定细胞内有多少点状聚集算是该细胞发生了自噬. 另外, 如采用计算机软件来采集点状聚集信号进行分析, 以“细胞群中平均每个细胞所含的点状聚集数目或者点状聚集的总面积”作为细胞免疫荧光的定量比较指标, 似乎合乎情理.

该方法存在一定的假阳性. 因为内源性 LC3 有时会同时表达促聚集蛋白, 而当转染(特别是瞬时转染体系)的 GFP-LC3 基因表达量太高时可能造成非特异性聚集<sup>[9]</sup>. 同时构建一个 LC3 蛋白 C 端甘氨酸突变的 GFP-LC3 转染体作为阴性对照, 因为该 C 端突变的 LC3 蛋白不能够与 PE 结合, 因此, 可以有效地消除非特异性聚集的影响.

## 2.2 LC3 蛋白 Conversion 实验

自噬发生后, 通过 Western-blot 可以检测到两个条带的蛋白质, 尽管 LC3-II 与 PE 结合后实际分子质量大于 LC3-I, 由于其疏水性较强, 在聚丙烯酰胺凝胶中的泳动速度要快于 LC3-I. 由于在自噬时细胞内 LC3 蛋白总的表达水平其实并无上调, 仅仅是一部分 LC3-I 转变成了 LC3-II, 那么理论上自噬时应表现为 LC3-I 的减少和 LC3-II 的增加, 通过 LC3-II/LC3-I 或者 LC3-II/(LC3-I + LC3-II) 即可反映自噬水平<sup>[9]</sup>. 但由于二者对抗体结合能力的差异导致检测敏感性的不同(LC3-II 检测敏感性高于 LC3-I), 实际检测结果 LC3-I 的减少并不与 LC3-II 的增加同步, 因此上述两个指标并不能用于比较实际的自噬水平. 单纯比较 LC3-II 蛋白的水平可能更合适<sup>[10]</sup>. 需要指出的是, 即便是比较 LC3-II 的水平, 也仅能反映自噬体的数量, LC3-II 表达的多少并不意味着自噬活性的强弱. 比如说, 当细胞自噬活性很强、自噬体降解速度很快时, 可能检测不出 LC3-II 蛋白的表达, 或仅有很弱的表达, 这种情况下的结果解释为自噬活性减弱显然是不合适的.

上述基于 LC3 的自噬体数量检测或 LC3 表达量的检测是目前大多数研究采用的方法, 但许多研究错误地将观察到的自噬体的增加减少或 LC3 表达水平的高低对应于自噬活性的强弱. 实际上, 自噬活性的增加应该表现为所有自噬性结构(包括隔离膜、自噬体、自噬溶酶体、自噬内涵体)均较基

础水平增加. 自噬功能障碍可表现在自噬通路的不同阶段, 自噬体形成的上游通路受阻(如隔离膜的集结和延伸步骤)时出现自噬体(包括自噬溶酶体和自噬内涵体)数量减少(生成减少), 相反, 自噬体形成的下游通路受阻时, 自噬体数量可能增加(降解减少). 也就是说, 自噬体的积聚状态反映的可能是自噬的激活, 也可能是自噬体形成后的自噬通路受阻. 相应地, 自噬体数量的减少可能是由于自噬活性减弱, 也可能是自噬性降解增强. 例如, 在研究神经肌肉退行性变时发现自噬体增加的现象, 最初人们认为这类病变是由于或至少部分是由自噬活性增加造成的. 后来的实验证实, 这些自噬体的累积实际上是由于自噬活性减弱致自噬体降解减少造成的. 因此在任何时间点观察到的自噬体数量都是其形成与降解间平衡的结果, 简单地检测自噬体的数量不足以全面评估自噬活性.

## 3 基于自噬性降解的检测 —— “自噬潮”分析

自噬过程是动态变化的, 而自噬体仅是整个自噬通路过程中的一个中间结构. 要说明细胞自噬活性的强弱, 必须通观整个自噬的过程是否顺利, 即通过基于自噬性降解的自噬潮(autophagic flux)分析来进一步说明自噬活性. 自噬潮是一个动态连续的概念, 涵盖了自噬体的形成、自噬性底物向溶酶体的运送以及在溶酶体内降解的整个过程. 显然, 对整个过程进行监测较单纯自噬体检测更能反映自噬活性, 因此“自噬潮”分析是反映自噬活性的可靠指标<sup>[11]</sup>.

### 3.1 长寿命蛋白降解

根据自噬机制主要负责降解长寿命蛋白的特性, 先让细胞在含有同位素标记氨基酸(如 <sup>14</sup>C- 或 <sup>3</sup>H- 缬氨酸或亮氨酸)的培养基中生长一段时间(数小时至数天), 细胞在此期间合成的蛋白质都将被同位素标记, 然后换成不含同位素的培养基, 让一些被标记的短寿命蛋白通过蛋白酶体途径降解. 在自噬诱导后, 通过检测培养上清中释放的自噬性降解产物的放射性活度即可反映细胞自噬性降解的能力. 如同时加入自噬抑制剂作为对比, 更能特异性地反映自噬引起的蛋白质降解.

### 3.2 LC3 和其他自噬性底物的降解

自噬过程中, 自噬体内膜上的 LC3-II 被溶酶体降解, 通过免疫印迹监测自噬过程中 LC3 蛋白量的变化或流式细胞仪监测 GFP-LC3 荧光强度的

变化即可反映自噬活性. 在自噬诱导一开始, GFP-LC3 点状聚集显著增多, 随后信号可能会出现下降, 代表着自噬性降解的发生. 还有其他一些自噬性降解的底物如 p62 蛋白, 最近已经认为可以通过自噬特异性被降解, 因此其表达量的变化也可用于监测自噬潮<sup>[2]</sup>.

### 3.3 LC3 蛋白 Turnover 实验<sup>[13]</sup>

在 LC3 蛋白 Conversion 实验设计中, 同时加入溶酶体抑制剂来抑制自噬体的降解, 通过比较溶酶体抑制剂存在与不存在的情况下 LC3- II 蛋白表达的差别来反映自噬性降解. 如加入溶酶体抑制剂后, LC3- II 蛋白表达明显增强, 说明整个自噬和自噬性降解过程的正常, 而增强表达的那部分 LC3 蛋白实际上反映的是被溶酶体降解的自噬体. 这种差别在加入处理因素前后的变化即反映自噬活性的大小, 如处理因素加入后此差别增加, 则代表自噬的增强, 反之亦然. 常用的溶酶体抑制剂有溶酶体酸化抑制剂氯化铵及氯喹、溶酶体融合抑制剂 bafilomycin A1 和溶酶体蛋白酶抑制剂 E64d、pepstatin A 等.

### 3.4 RFP-GFP-LC3 的溶酶体呈递

自噬诱导后, 融合表达 GFP-LC3 蛋白锚定于自噬体膜上并与自噬体一起与溶酶体融合, 由于 GFP 不易被溶酶体酶降解, 理论上, 可以追踪 GFP 荧光信号来反映自噬体呈递至溶酶体的过程来从形态学上观察自噬潮. 遗憾的是, 溶酶体内的酸性环境可以导致 GFP 荧光信号的猝灭, 因此无法实现. 相反, 红色荧光蛋白 RFP 对酸性环境具有很好的耐受性. 借助于两种荧光蛋白的这种差异,

通过构建 RFP-GFP-LC3 串联体, 在自噬诱导后, 可以观察到自噬体和自噬溶酶体分别成黄色和红色标记, 如果自噬潮增加, 两种颜色的点状聚集均增加. 如果自噬体向自噬溶酶体成熟步骤受阻, 黄色点状聚集增加, 红色不增加. 这种巧妙的设计实现了自噬体向溶酶体转化步骤的监控, 不足之处在于不能反映降解过程, 溶酶体酶的活力和酸化程度也会影响到荧光信号的检测.

### 3.5 GFP-LC3 切割

LC3 连同自噬体内膜和内容物一起被溶酶体降解, 但 GFP 在溶酶体中仅表现荧光信号猝灭, GFP 本身并不被降解, 在自噬性溶酶体降解后会释放出游离的 GFP. 有鉴于此, 通过免疫印迹的方法检测游离 GFP 蛋白的出现即意味着自噬性降解的发生. 这一方法在酵母中应用较多, 在哺乳动物自噬潮的检测方面还缺乏经验.

## 4 自噬的实验性调控

通过人为的干预来激活或者抑制自噬功能后观察细胞行为或效应分子的变化能够使研究结论更具有说服力. 目前, 实验性激活或者抑制自噬的方法有药物处理、自噬基因敲除、沉默或过表达.

常用的抑制自噬及诱导自噬的药物及机制如表 1 所示. 这些工具药普遍存在的缺陷就是特异性不强, 在抑制自噬的同时对细胞其他代谢过程也可能会有影响. 如 3-MA 抑制 Class III PI3K 的同时对 Class I PI3K 同样也有抑制作用, 继而抑制 Akt/mTOR 通路, 激活自噬.

表 1 常用的自噬抑制剂和自噬激活剂  
Table 1 Inhibitor and activator of autophagy

	工具药	作用原理
自噬抑制剂	3-MA	抑制 Class III PI3K, 抑制自噬体的形成
	长春花碱、nocodazole <sup>[14]</sup> 、bafilomycin A1 <sup>[15]</sup>	抑制自噬体与溶酶体的融合
	bafilomycin A1、氯化铵、氯喹	抑制溶酶体酸化
	E64d、pepstatin A	抑制溶酶体蛋白酶活性
自噬激活剂	营养缺乏(特别是氨基酸缺乏)	
	雷帕霉素(及其类似物 CCI-779) <sup>[16]</sup> 、Torin1 <sup>[17]</sup> 和 PP242 <sup>[18]</sup>	mTOR 抑制剂
	Lithium <sup>[19]</sup>	抑制肌醇单磷酸酶及糖原合成酶激酶 -3 $\beta$
	ABT737 <sup>[20]</sup>	BH3 类似物, 竞争性破坏 Beclin-1 与 Bcl-2 或 Bcl-X <sub>L</sub> 间的相互作用
	Trehalose <sup>[21]</sup> 和 small-molecule enhancers of rapamycin <sup>[22]</sup>	不明

通过 RNAi 干扰 Atg3、Atg5、Atg7 及 Beclin1 等自噬相关基因的表达后, 细胞表现为自噬功能缺失. 与工具药相比, 通过基因沉默或敲除技术来抑制自噬具有相对强的特异性. 有时候, 一些蛋白质在很低的表达量时仍然可以介导自噬发生, 因此, 成功基因沉默后的细胞不但不表达被抑制的蛋白质, 而且在自噬诱导剂处理后也不发生自噬. 还有学者通过构建显性负突变体, 使一些自噬相关蛋白失去功能, 从而也可抑制自噬的发生.

## 5 体内自噬分析

体内自噬分析的策略有三种: 一是传统的基于对组织切片标本进行电镜观察和 LC3 蛋白的检测<sup>[23]</sup>. 二是应用 GFP-LC3 转基因小鼠实现体内自噬的实时监测<sup>[24]</sup>, Tian 等<sup>[25]</sup>应用该转基因小鼠, 然后借助于体内成像技术经颅骨检测实验性脑卒中后缺血脑组织区域 GFP 荧光强度, 实验结果与活体外的 Western blot 及荧光免疫组化的结果一致. 三是通过构建自噬相关基因缺失的实验动物, 这为研究自噬在机体水平所发挥的作用并验证体外试验的结果提供了很好的平台. 但是, 自噬在体内是随时间不断变化的, 要想准确反映这种变化, 必须实现体内自噬活性的实时监控, 而仅凭观察到的自噬体出现无法说明自噬活性的改变.

## 6 小 结

在自噬的研究中, 首先必须分清形态学和功能学检测的不同, 避免将某一特定生理条件下检测到的自噬现象(或自噬的缺失)归于自噬功能的改变. 其次要清楚当前大部分自噬检测方法普遍反映的是自噬在某一特定“空间点”的变化, 自噬是一个随时间不断变化的动态过程, 因此, 用静态的方法去研究动态的过程得出的结论不可避免地存在一定的局限和偏倚. 换句话说, 我们检测的结果可能并未反映细胞内自噬活性的真正变化趋势, 目前对于自噬在某些生物学过程中所发挥的作用一直没有定论, 如在自噬与肿瘤的研究中, 自噬是促进肿瘤还是抑制肿瘤, 不同的研究有不同的结论. 作者认为, 归根结底可能还在于我们对自噬的认识, 即自噬检测方法的局限性. 任何一种方法单独应用均不能作为自噬的依据, 因此, 在对任何一种方法得到的结果进行解释时, 必须慎重, 特别是不能仅根据自噬体的增多减少或自噬相关蛋白表达的高低就草率地得出自噬增强或减弱的结论. 实际上, 这是目

前许多研究忽视的一个重要问题.

学术界已经达成的倾向性共识, 建议在选择自噬研究方法及其结果解释时需考虑以下问题: a. 联合不同检测原理的方法; b. 借助不同的检测技术, 避免单一技术的局限性; c. 形态和功能并举, 以形态学检测为基础, 注重整个自噬通路的变化; d. 体内体外结果互相验证; e. 避免将形态学的结果盲目地解释为功能的变化, 避免将体外的结果盲目地理解为体内的情形, 以求准确全面地反映自噬在各种生物学过程中的作用<sup>[26]</sup>.

总之, 在准确可靠的自噬功能检测及监控方法问世前, 我们还是应该以一个理性的态度去看待不同的研究结论, 更应该慎重地将研究结论应用于临床治疗.

## 参 考 文 献

- [1] Mijaljica D, Prescott M, Devenish R J. Autophagy in disease. *Methods Mol Biol*, 2010, **648**: 79–92
- [2] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, *et al.* Monitoring autophagy by electron microscopy in mammalian cells. *Methods Enzymol*, 2009, **452**: 143–164
- [3] Dunn Jr W A. Studies on the mechanisms of autophagy: Formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, 1990
- [4] Dunn Jr W A. Studies on the mechanisms of autophagy: Maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, 1990, **110**: 1935–1945
- [5] Eskelinen E L. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*, 2008, **4**(2): 257–260
- [6] Swanlund J M, Kregel K C, Oberley T D. Investigating autophagy: Quantitative morphometric analysis using electron microscopy. *Autophagy*, 2010, **6**(2): 270–277
- [7] Kimura S, Fujita N, Noda T, *et al.* Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods Enzymol*, 2009, **452**: 1–12
- [8] Kuma A, Matsui M, Mizushima N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy*, 2007, **3**: 323–328
- [9] Kadowaki M, Karim M R. Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy. *Methods Enzymol*, 2009, **452**: 199–213
- [10] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 2007, **3**(6): 542–545
- [11] Rubinsztein D C, Cuervo A M, Ravikumar B, *et al.* In search of an "autophagometer". *Autophagy*, 2009, **5**(5): 585–589
- [12] BenYounès A, Tajeddine N, Tailler M, *et al.* A fluorescence-microscopic and cytofluorometric system for monitoring the turnover of the autophagic substrate p62/SQSTM1. *Autophagy*, 2011, **7**(8): 883–891

- [13] Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, *et al.* Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 2005, **1**(2): 84–91
- [14] Jahreiss L, Menzies F M, Rubinsztein D C. The itinerary of au-tophosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lyso-somes. 2008, **9**(4): 574–587
- [15] Klionsky D J, Elazar Z, Seglen P O, *et al.* Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes?. 2008, **4**(7): 849–950
- [16] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of huntington disease. *Nat Genet*, 2004, **36**(6): 585–595
- [17] Thoreen C C, Kang S A, Chang J W, *et al.* An ATP-competitive mam-malian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*, 2009, **284** (12): 8023–8032
- [18] Feldman M E, Apsel B, Uotila A, *et al.* Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*, 2009, **7**(2): e38
- [19] Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, *et al.* A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet*, 2008, **17**(2): 170–178
- [20] Maiuri M C, Le Toumelin G, Criollo A, *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*, 2007, **26**(10): 2527–2539
- [21] Sarkar S, Davies J E, Huang Z, *et al.* Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2007, **282**(8): 5641–5652
- [22] Sarkar S, Perlstein E O, Imarisio S, *et al.* Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol*, 2007, **3**(6): 331–338
- [23] Martinet W, De Meyer G R, Andries L, *et al.* Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry: possibilities and limitations. *Autophagy*, 2006, **2**(1): 55–57
- [24] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy using GFP-LC3 transgenic mice. *Methods Enzymol*, 2009, **452**: 13–23
- [25] Tian F, Deguchi K, Yamashita T, *et al.* *In vivo* imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy*, 2010, **6**(8): 1107–1114
- [26] Klionsky D J, Abeliovich H, Agostinis P, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 2008, **4**(2): 151–175

## Methods for Autophagy Detection\*

MA Tai<sup>1)</sup>, SUN Guo-Ping<sup>1)\*\*</sup>, LI Jia-Bin<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China;

<sup>2)</sup> Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

**Abstract** Autophagy extensively participate in physiological and pathological processes, and has been focused by contemporary biomedicine scientists in recent years. Transmission electron microscopy, immunofluorescence and immunoblotting techniques were common used in detection of autophagy. Deeper research needs more accurate detection of autophagy. Dysfunction of autophagy involves formation and degeneration of autophosome, accordingly, accurate and comprehensive evaluation of autophagy includes autophosome detection, as well as the fluency of autophagic degeneration, i.e. autophagic flux assay. Additionally, artificial up- or down-regulation of autophagy by drugs or gene interferences in *in vitro* or *in vivo* models has also been considered as important part of autophagy analysis. Any method currently used alone may not been as evidence of autophagy. More careful attention should be paid on results of any assays of autophagy, especially DO NOT interpret "increase or decrease of autophosome" (also "up- or down-expression of autophagy-related proteins") as "enhancement or attenuation of autophagic function".

**Key words** cell autophagy, autophosome, microtubule-associated protein 1 light chain 3, autophagic flux, detection method

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00010

\*This work was supported by a grant from Anhui Provincial Natural Science Research Project of Colleges and Universities(KJ2011A154).

\*\*Corresponding author.

SUN Guo-Ping. Tel: 86-551-2923509, E-mail: sungp@ahmu.edu.cn

LI Jia-Bin. Tel: 86-551-2922713, E-mail: lijiaabin@vip.sohu.com

Received: January 6, 2012

Accepted: February 28, 2012