

研究报告

自噬相关基因 *ATG8* 在酵母细胞时序性寿命调控中的作用杨晓迪^{1,2}, 袁頔³, 崔晓静⁴, 华伟^{1,2}, 邓雁文³, 陈亚芹², 崔红晶^{*1,5}

1 广东省医学免疫与分子诊断重点实验室, 广东 东莞 523808

2 广东医科大学 医学技术学院, 广东 东莞 523808

3 广东医科大学 第二临床医学院, 广东 东莞 523808

4 广东医科大学附属东莞第一医院, 广东 东莞 523808

5 广东医科大学 基础医学院, 广东 东莞 523808

杨晓迪, 袁頔, 崔晓静, 华伟, 邓雁文, 陈亚芹, 崔红晶. 自噬相关基因 *ATG8* 在酵母细胞时序性寿命调控中的作用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 363-372.

YANG Xiaodi, YUAN Di, CUI Xiaojing, HUA Wei, DENG Yanwen, CHEN Yaqin, CUI Hongjing. The autophagy-related gene *ATG8* regulates the chronological lifespan of yeast cells[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 363-372.

摘要:【背景】自噬在调控细胞寿命和衰老过程中起着至关重要的作用, 本课题组前期研究发现缺失自噬相关基因 *ATG8* 缩短酵母细胞复制性寿命, 但有关其在寿命调控中的作用机制尚未明确。

【目的】研究自噬相关基因 *ATG8* 在酵母细胞寿命调控中的作用及可能机制。【方法】基于基因同源重组原理构建 *ATG8* 基因过表达酵母菌株(*ATG8 OE*), 检测 *ATG8* 基因缺失酵母菌株(*atg8Δ*)和 *ATG8 OE* 酵母菌株的时序性寿命(chronological lifespan, CLS), 采用生长曲线仪检测各菌株的增殖速率, 采用流式细胞仪检测各菌株的活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, 采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测各菌株的氧化应激相关基因转录水平, 比色法检测各菌株的细胞凋亡关键酶胱天蛋白酶-3 (Caspase-3)活性。【结果】缺失 *ATG8* 基因缩短酵母时序性寿命, 减弱细胞增殖速率; 细胞内 ROS 含量增多, 氧化应激相关基因表达下调, Caspase-3 酶活性升高; *ATG8 OE* 菌株时序性寿命和细胞增殖能力无明显变化, 活性氧含量下降, 氧化应激相关基因表达上调, Caspase-3 酶活性无明显变化。【结论】自噬相关基因 *ATG8* 在调控酵母细胞时序性寿命和氧化应激反应中具有一定作用。

关键词: 酿酒酵母; *ATG8*; 氧化应激; 时序性寿命

资助项目: 国家自然科学基金(31701050); 广东省自然科学基金(2022A1515010816); 广东省医学技术科研基金(A2022368)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31701050), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2022A1515010816), and the Guangdong Medical Research Foundation (A2022368).

*Corresponding author. E-mail: cjingjing79@126.com

Received: 2024-04-06; Accepted: 2024-07-15; Published online: 2024-07-30

The autophagy-related gene *ATG8* regulates the chronological lifespan of yeast cells

YANG Xiaodi^{1,2}, YUAN Di³, CUI Xiaojing⁴, HUA Wei^{1,2}, DENG Yanwen³, CHEN Yaqin², CUI Hongjing^{*1,5}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Immunology and Molecular Diagnostics, Dongguan 523808, Guangdong, China

2 School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China

3 The Second Clinical Medical School, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China

4 The First Dongguan Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China

5 School of Basic Medical Sciences, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China

Abstract: [Background] Autophagy plays a pivotal role in regulating the cell lifespan and aging. Our previous study showed that deletion of the autophagy-related gene *ATG8* significantly decreased the replicative lifespan of yeast cells, while the specific mechanism remains to be explored. [Objective] To study the effect and potential mechanism of *ATG8* in regulating the cellular lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] The yeast strain overexpressing *ATG8* (*ATG8 OE*) was constructed by homologous recombination. The chronological lifespans (CLS) of *ATG8*-deleted (*atg8Δ*) and *ATG8 OE* strains were measured. The proliferative rates of yeast cells were analyzed by a Bioscreen C MB instrument based on growth curves. The production of reactive oxygen species (ROS) was measured by flow cytometry. The expression levels of oxidative stress-related genes were determined by quantitative RT-PCR (RT-qPCR). The activity of the key apoptotic enzyme, Caspase-3, was measured by the colorimetric method. [Results] The deletion of *ATG8* shortened the chronological lifespan and weakened the proliferation of yeast cells. Meanwhile, it increased the production of intracellular ROS, down-regulated the expression levels of oxidative stress-related genes, and enhanced the activity of caspase-3. The overexpression of *ATG8* decreased the production of intracellular ROS and up-regulated the expression levels of oxidative stress-related genes in yeast cells. The *ATG8 OE* strain showed no significant change in the chronological lifespan, proliferation, or caspase-3 activity. [Conclusion] The autophagy-related gene *ATG8* plays a role in regulating the chronological lifespan and oxidative stress response of yeast cells.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; *ATG8*; oxidative stress; chronological lifespan

自噬是细胞或有机体在营养缺乏或氧化应激等环境应激条件下,由自噬相关基因 (autophagy related gene, *ATG*) 协同驱动,通过双膜自噬体,将包裹物(细胞质或受损伤的细胞器等)运送到溶酶体或液泡中进行降解的过程^[1-2]。

自噬与细胞适应应激、细胞分化和发育、衰老、神经退行性疾病和癌症等多种生理或病理过程密切相关^[3-4]。

酵母 Atg8 蛋白作为自噬体形成的标志物和必需调节因子,以 Atg8-磷脂酰乙醇胺

(phosphatidylethanolamine, PE)共轭形式定位在自噬体膜上,参与调控自噬发生的各个环节,在细胞自噬发生过程中起着非常重要的作用^[5-6]。LC3 作为哺乳动物细胞中的同源物,是最早被鉴定的自噬小体定位蛋白^[7]。LC3 常用作监测自噬体的数量以及自噬活性的标记分子,目前广泛应用于细胞自噬活性相关研究中^[8]。

酿酒酵母作为寿命和衰老研究的经典模式生物,其有两种寿命研究模式,包括复制性寿命和时序性寿命(chronological lifespan, CLS)^[9]。本课题组前期研究发现缺失自噬相关基因 *ATG8* 缩短酵母细胞复制性寿命^[10],但有关其在寿命中的作用机制还不明确。本文通过检测 *ATG8* 基因缺失和过表达酵母菌株的时序性寿命及氧化应激相关指标,研究 *ATG8* 基因在细胞寿命中的具体作用及调控细胞寿命的可能机制。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

酿酒酵母野生型 BY4742 菌株(*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)由美国华盛顿大学 Matt Kaerberlein 博士赠送;感受态大肠埃希菌 DH5α、载体 pRS306(低拷贝穿梭质粒),载体带有 URA 营养筛选标签,具有氨苄青霉素抗性、*ATG8* 基因缺失酵母菌株(*atg8Δ*)为本实验室保存;*ATG8* 基因过表达酵母菌株(*ATG8 OE*)为本实验室构建(表 1)。

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain	Description	Resource
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Wild-type Gift from Matt Kaerberlein
<i>atg8Δ</i>	BY4742 <i>atg8::URA3</i>	Stored in our lab
<i>ATG8 OE</i>	BY4742+pRS306- <i>ATG8-OE</i>	This study

1.2 培养基

(1) YPD 培养基(g/L): 胰蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0 (固体培养基, 另加琼脂糖 20.0)。

(2) SD/-Ura 缺陷培养基(g/L): 不含琼脂糖 SD 培养基 53.4 (固体培养基, 含琼脂糖 SD 培养基 93.4), 限制性氨基酸(Ura Do Supplement) 1.5。

(3) 完全合成葡萄糖(synthetic dextrose complete, SDC)培养基(g/L): 0.18% yeast nitrogen base (无氨基酸) 1.8, 硫酸铵 3.6, NaH₂PO₄·2H₂O 1.8, 葡萄糖 20.0, 10×氨基酸溶液 1 mL, pH 值调至 6.0, 过滤除菌。

1.3 主要试剂和仪器

酵母总 RNA 提取试剂盒, BioTek 有限公司; PrimeSTAR[®] Max DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和 TB Green Premix *Ex Taq* II 试剂盒, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 2×*Taq* Pro Universal SYBR qPCR Master Mix、5×HiScript III qRT SuperMix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DCFH-DA, Sigma 公司; 胱天蛋白酶-3 (Caspase-3)活性检测试剂盒, 上海碧云天生物科技股份有限公司; *ATG8* 多克隆抗体, Abcam 公司。

Axio Scope A1 型金相生物显微镜, ZEISS 公司; 全自动生长曲线分析仪, Bioscreen 公司; Real-time 荧光定量 PCR 仪 Light Cycler 480, Roche 公司; FACS canto II 型流式细胞仪, BD 公司; 多功能酶标仪, BioTek 公司; CO₂ 培养箱, NuAIRE 公司; 全自动数码凝胶图像分析系统, 北京天能公司。

1.4 *ATG8* 基因过表达菌株的构建和验证

过表达载体 pRS306-*ATG8-OE* 的构建参照文献[11]进行。以野生型酵母 BY4742 基因组 DNA 为模板, *ATG8-OE-F/R* 为引物(表 2), 采用 PrimeSTAR 聚合酶, PCR 扩增从 *ATG* 上游

表 2 本研究所使用的载体构建和验证引物

Table 2 Primers for constructing and detecting the vector used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
ATG8-OE-F	CGCGGATCCCCTTAAAACTCCATTG AAG
ATG8-OE-R	CGCAAGCTTATTGGTAAAAATGTTCA GGA
URA3-int-F	GGAACCTAGAGGCCTTTTGATGT
AMP-int-R	GTGACACCACGATGCCTGT
ATG8-int-F	TAAGCGTAAATATCTAGTTTCCTGC
ATG8-int-R	AACCCGTCCTTATCCTTGTG

1 000 bp 到 TAG 下游 1 000 bp 的片段。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。反应总体系为 20 μL: PrimeSTAR[®] Max DNA 聚合酶 1 μL, 5×buffer 4 μL, 上、下游引物(ATG8-int-F/R 或 ATG8-int-F、AMP-int-R 或 URA3-int-F、ATG8-int-R, 终浓度 0.8 μmol/L)各 2 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 产物纯化回收后用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切质粒 pRS306 和 PCR 产物, T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化大肠杆菌后经筛选、提质粒、酶切鉴定、基因测序正确后, 用限制性内切酶 *Hpa* I 酶切线性化过表达载体 pRS306-ATG8-OE, 转化 BY4742 酵母细胞感受态。通过 SD/-Ura 平板筛选, 阳性克隆经过 SnG Lysis buffer 和酸洗珠子破壁后, 采用苯酚和氯仿抽提方法提取基因组 DNA, 普通 PCR 方法初步验证; 以 ATG8-int-F/R 为引物, 采用实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 进一步验证。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。反应总体系为 10 μL: 2×Taq Mix 5 μL, 上、下游引物(终浓度 0.8 μmol/L) 4 μL, cDNA 1 μg。最后, 采用 Western blotting 方法检测酵母细胞中 Atg8 蛋白的表达量。

1.5 时序性寿命检测

酿酒酵母时序性寿命的检测方法参照文

献[12]进行。酵母细胞在 3 mL SDC 培养基中培养 24 h, 4 000 r/min 离心 3 min 收集菌液重悬于 15 mL SDC 培养基使浓度稀释至 OD_{600} 为 0.1, 30 °C、180 r/min 培养 3 d。取 80 μL 菌液稀释至约 1.5×10^6 个/mL, 涂布平板, 30 °C 培养 2 d 后采用单克隆计数法(colony forming units, CFU)计数, 首次存活率记为 100%。然后, 每隔 3 d 以相同的稀释倍数将菌液涂布平板, 计数 CFU, 计算酵母细胞存活率。

1.6 酵母细胞增殖速率的检测

实验方法参照文献[13]。取 OD_{600} 值约为 0.1 酵母细胞菌液于 800 μL YPD 培养基中, 混匀后取 300 μL 菌液加入生长曲线分析仪专用的 96 孔板中, 30 °C 连续培养 48 h, 每 2 h 检测 1 次 OD_{600} 值。以时间为横坐标, 以 OD_{600} 为纵坐标绘制生长曲线。

1.7 酵母细胞内活性氧含量的测定

取 OD_{600} 值约为 0.1 酵母细胞于 3 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇菌 6 h, 4 000 r/min 离心 3 min 收集菌液。用 1 mL PBS 洗涤细胞 2 次, 加入浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA, 30 °C 避光孵育 1 h, 每 20 min 颠倒混匀, 4 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, PBS 重悬, 使用流式细胞仪(激发波长: 488 nm, 发射波长: 525 nm)检测细胞荧光强度。

1.8 RT-qPCR 分析氧化应激相关基因的转录水平

取 OD_{600} 约为 0.1 的酵母细胞于 3 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养过夜, 8 000 r/min 离心 2 min 收集细胞, PBS 洗涤, 按照酵母 RNA 提取试剂盒说明书方法提取总 RNA, 使用 5×HiScript III qRT SuperMix 反转录 cDNA, 采用 SYBR Green 法在 Light Cycler 480 仪器进行 RT-qPCR (95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环); 反应总体系为 10 μL: 2×Taq

Mix 5 μ L, 上、下游引物(终浓度 0.8 μ mol/L) 4 μ L, cDNA 1 μ g。引物序列见表 3, 以 *PRP8* 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各个基因相对表达量。

1.9 Caspase-3 活性的检测

将 OD_{600} 约为 0.1 的酵母细胞接种于 3 mL YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜后 10 000 r/min 离心 1 min 收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入裂解液及等体积沉淀的玻璃珠, 冰浴、涡旋裂解 20 min, 提取酵母细胞总蛋白。按照 Caspase-3 活性检测试剂盒说明书配制反应体系, Caspase-3 可以催化底物 Ac-DEVD-pNA 产生黄色的 pNA, pNA 在 405 nm 有强吸收性, 从而可以通过测定吸光度来检测 Caspase-3 的活性。

1.10 统计学分析

通过 GraphPad 9.0 软件, 采用 *t* 检验方法进行统计学分析及相应的图表制作, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *ATG8* 基因过表达酵母菌株的鉴定

过表达载体 pRS306-*ATG8*-OE 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴定, 结果如图 1A 所示: 第一

泳道为线性化的 pRS306-*ATG8*-OE 载体片段 (6 697 bp), 第二泳道为载体骨架片段 (4 343 bp) 和目的基因片段 (2 354 bp), 与预期大小一致, 提示过表达载体 pRS306-*ATG8*-OE 构建成功。

线性化过表达载体 pRS306-*ATG8*-OE 转化 BY4742 酵母细胞, 阳性克隆基因组 DNA 经过 PCR 方法验证, 结果如图 1B 所示: 第一泳道为 *ATG8*-int-F/R 引物扩增 *ATG8* 基因部分片段 (177 bp) 和全长片段 (6 845 bp), 第二泳道为 *ATG8*-int-F 和 *AMP*-int-R 引物扩增 *ATG8* 基因部分片段至 *AMP* 基因部分片段 (2 838 bp), 第三泳道为 *URA3*-int-F 和 *ATG8*-int-R 引物扩增 *URA3* 基因部分片段至 *ATG8* 基因部分片段 (2 535 bp), 结果与预期大小一致, 提示 *ATG8* 基因过表达菌株 (*ATG8 OE*) 构建成功。

RT-qPCR 方法检测酵母菌株中 *ATG8* 基因的表达水平。结果如图 1C 所示: 相较于野生型酵母菌株, *atg8 Δ* 菌株中 *ATG8* 基因的表达水平明显下调, *ATG8 OE* 菌株 *ATG8* 基因的表达明显上调 ($P < 0.001$)。Western blotting 方法检测酵母细胞中 Atg8 蛋白的表达量, 结果如图 1D 所示: *ATG8 OE* 酵母细胞中 Atg8 蛋白表达明显上调。以上结果均提示 *ATG8 OE* 菌株构建成功。

2.2 酵母细胞时序性寿命分析

酵母细胞时序性寿命形式是指细胞在非分裂状态下所存活的时间长短。本文前期研究结果发现, *atg8 Δ* 酵母菌株复制性寿命缩短, 平均寿命减少 18.3%^[10]。本研究进一步检测野生型、*atg8 Δ* 和 *ATG8 OE* 菌株的时序性寿命, 结果如图 2 所示: 相较于野生型菌株的平均寿命 (约 42 d), *atg8 Δ* 菌株的平均寿命为 24 d, 寿命减少 42.8%, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); *ATG8 OE* 菌株的平均寿命无明显差异 ($P > 0.05$)。以上结果表明, 缺失 *ATG8* 基因缩短酵母细胞时序性寿命, 过表达 *ATG8* 基因对细胞寿命无明显影响。

表 3 本研究所使用的定量 PCR 引物

Table 3 The real-time PCR primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>PRP8</i> -F	TCATGGCTGCGTCTGAAGTA
<i>PRP8</i> -R	GGCTCAAACCTTCCGATAG
<i>SOD1</i> -F	AATCCGAGCCAACCACTGTC
<i>SOD1</i> -R	CGACGCTTCTGCCTACAACG
<i>SOD2</i> -F	GCATTACACCAAGCACCAT
<i>SOD2</i> -R	CTCGTCCAGACTGCCAAAC
<i>CTA1</i> -F	CCAACAGGACAGACCCATTC
<i>CTA1</i> -R	TTACCCAAAACGCGGTAGAG
<i>CTT1</i> -F	GATTCCGTTCTACAAGCCAGAC
<i>CTT1</i> -R	GGAGTATGGACATCCCAAGTTTC
<i>GPX1</i> -F	GACACCGATGTGGAAACTGA
<i>GPX1</i> -R	CCCTTTTGGCATAGGATTG
<i>GPX2</i> -F	AAAAGCCAAAAAGCAGGTTTACT
<i>GPX2</i> -R	CCAAGGACGATGGTTTTGTT

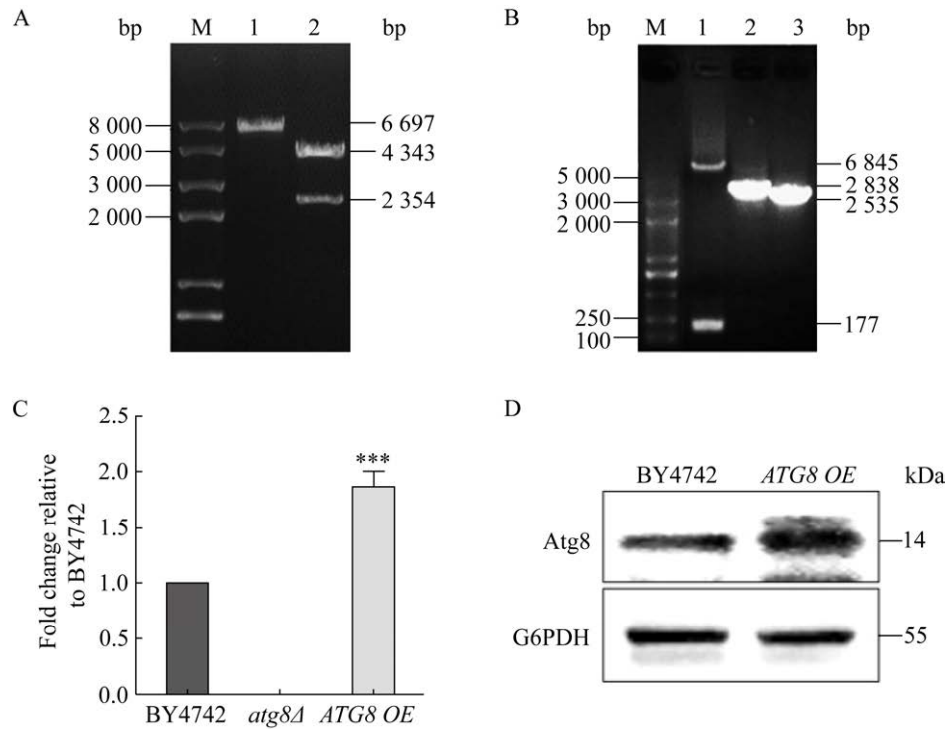


图1 *ATG8* 基因过表达酵母菌株的鉴定图 A: 过表达载体 pRS306-*ATG8*-OE 酶切电泳图。M: DNA marker; 1: 线性化的 pRS306-*ATG8*-OE 载体片段; 2: 载体骨架片段和目的基因片段。B: *ATG8* 过表达菌株 PCR 鉴定图。M: DNA marker; 1: *ATG8* 基因部分片段和全长片段; 2: *ATG8* 基因部分片段至 *AMP* 基因部分片段; 3: *URA3* 基因部分片段至 *ATG8* 基因部分片段。C: RT-qPCR 验证图。***: $P < 0.001$ 。D: Western blotting 验证图。

Figure 1 Identification of *ATG8* overexpression yeast strain. A: The electrophoresis of the digested pRS306-*ATG8*-OE. M: DNA marker; 1: Linearized pRS306-*ATG8*-OE vector fragment; 2: Vector skeleton fragment and target gene fragment. B: Identification data of the *ATG8* overexpressed strain by PCR. M: DNA marker; 1: *ATG8* gene partial fragment and full-length fragment; 2: *ATG8* gene fragment to *AMP* gene fragment; 3: *URA3* gene fragment to *ATG8* gene fragment. C: RT-qPCR. ***: $P < 0.001$. D: Western blotting.

2.3 酵母细胞增殖速率分析

通过生长曲线分析仪检测野生型、*atg8Δ* 和 *ATG8 OE* 菌株的细胞增殖速率, 结果如图 3 所示: 相较于野生型酵母细胞, *atg8Δ* 酵母细胞需 13 h 达到对数生长期; *ATG8 OE* 酵母细胞与野生型细胞增殖速率相似, 大约需 11 h 达到对数生长期。结果表明: 缺失 *ATG8* 酵母细胞的生长速率明显低于野生型酵母细胞, 增殖能力下降; 过表达 *ATG8* 酵母细胞的增殖能力无明显

变化。

2.4 酵母细胞内活性氧含量分析

本研究采用 DCFH-DA 探针法标记, 流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平, 结果如图 4 所示: 相较于野生型酵母细胞, *atg8Δ* 酵母细胞中的 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$); *ATG8 OE* 酵母细胞的 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明: 缺失 *ATG8* 上调酵母细胞 ROS 含量, 过表达 *ATG8* 下调酵母细胞 ROS 含量。

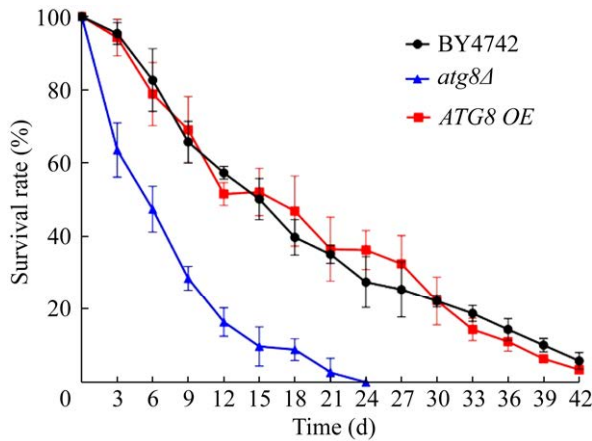


图 2 菌株 BY4742、*atg8Δ* 及 *ATG8 OE* 的时序性寿命曲线图

Figure 2 Chronological lifespan curves of the strain BY4742, *atg8Δ* and *ATG8 OE*.

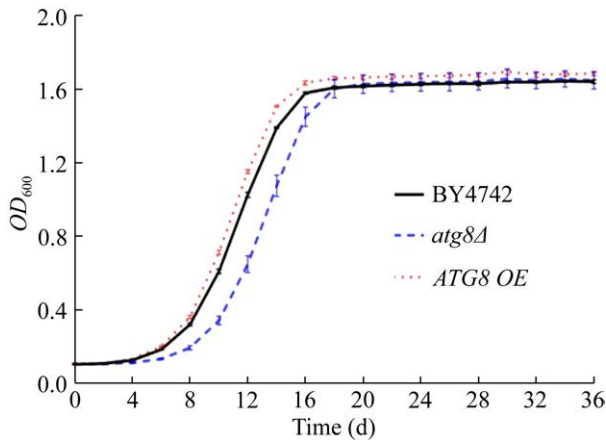


图 3 菌株 BY4742、*atg8Δ* 及 *ATG8 OE* 的生长曲线图

Figure 3 Growth curves of the strain BY4742, *atg8Δ* and *ATG8 OE*.

2.5 酵母细胞氧化应激相关基因的转录分析

抗氧化酶系统包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)等, 在抵抗 ROS 诱导的氧化应激方面发挥重要防御作用, 可以催化 ROS 或其副产物转

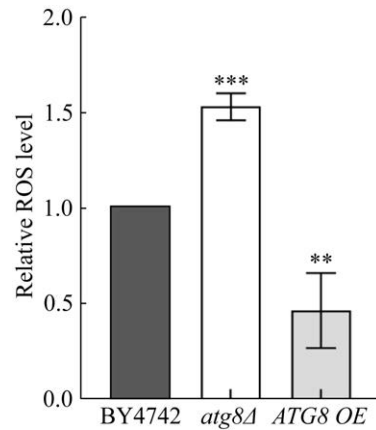


图 4 菌株 BY4742、*atg8Δ* 及 *ATG8 OE* 的活性氧含量

Figure 4 The production of intracellular ROS in the strain BY4742, *atg8Δ* and *ATG8 OE*. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

化为更稳定、危害较小的物质, 减弱对细胞的氧化损伤^[14]。本研究采用 RT-qPCR 方法检测野生型、*atg8Δ* 和 *ATG8 OE* 菌株中氧化应激相关基因的转录水平。结果如图 5 所示: 相较于野生型酵母细胞, *atg8Δ* 酵母细胞中 *CTT1* (编码过氧化氢酶 T)、*CTA1* (编码过氧化氢酶 A)、*GPX1*、*GPX2*、*SOD1* 和 *SOD2* 表达水平降低, 而 *ATG8 OE* 酵母细胞中 *CTT1*、*CTA1*、*GPX2*、*SOD1* 和 *SOD2* 等基因的转录表达水平升高。结果表明: 缺失 *ATG8* 基因下调酵母细胞内抗氧化酶相关基因的转录水平, 过表达 *ATG8* 基因上调抗氧化酶相关基因的转录水平。

2.6 酵母细胞 Caspase-3 活性分析

Caspase-3 是细胞凋亡途径中的关键酶, 其激活是细胞凋亡的重要标志^[15]。结果如图 6 所示: 相较于野生型酵母细胞, *atg8Δ* 酵母细胞的 Caspase-3 活性上调($P < 0.01$); *ATG8 OE* 酵母细胞的 Caspase-3 活性无明显差异($P > 0.05$)。结果表明: 缺失 *ATG8* 基因上调酵母细胞内 Caspase-3 酶活性; 过表达 *ATG8* 基因对 Caspase-3 酶活性无明显影响。

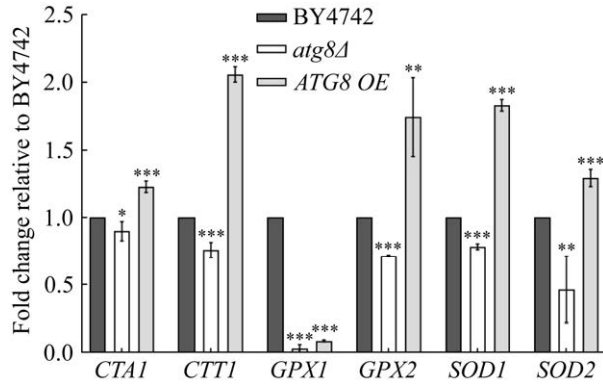


图5 菌株 BY4742、*atg8Δ* 及 *ATG8 OE* 中抗氧化酶相关基因的转录表达水平

Figure 5 The transcriptional expression levels of antioxidant enzyme related-genes in the strain BY4742, *atg8Δ* and *ATG8 OE*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

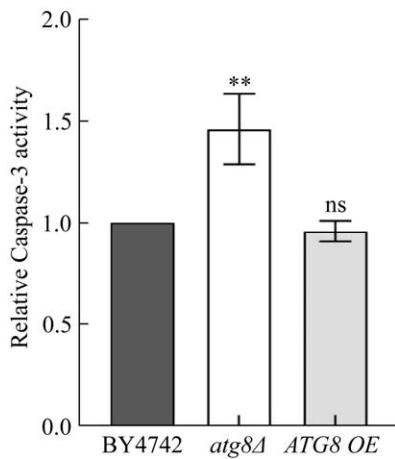


图6 菌株 BY4742、*atg8Δ* 及 *ATG8 OE* 的 Caspase-3 活性

Figure 6 The activity of the intracellular Caspase-3 in the strain BY4742, *atg8Δ* and *ATG8 OE*. **: $P < 0.01$; ns: No significant difference.

3 讨论与结论

细胞自噬是真核生物中一种高度保守的降解途径,也是细胞处于饥饿、能量限制、氧化应激和内质网应激等条件下的一种保护反应^[16]。自噬不但清除细胞内有毒成分,而且自噬过程

中产生的如氨基酸和脂类等降解产物可再循环,用于合成生物物质和产生能量^[17]。近年来研究发现,降低自噬活性促进衰老,提高自噬水平延缓衰老^[18]。自噬在调控细胞衰老方面的研究引起广泛关注。

自噬在维持线粒体正常功能方面起到至关重要的作用。早期阶段自噬通路被破坏,导致细胞内泛素化蛋白堆积,ROS含量增加,功能失调的线粒体增多^[19]。本文研究结果发现,缺失 *ATG8* 基因上调酵母细胞 ROS 水平,下调抗氧化酶基因表达。研究结果与以往文献报道相一致,Zhang 等^[20]发现 *atg1Δ*、*atg6Δ*、*atg8Δ* 和 *atg12Δ* 酵母细胞内 ROS 水平较高,并且功能异常的线粒体增多。敲除小鼠中自噬体形成的必需基因 *ATG7*,胰岛 β 细胞发生明显的氧化应激,功能障碍的线粒体堆积^[21];敲低 *ATG5* 或 *ATG10* 基因抑制自噬活性,上调癌细胞在饥饿状态下的 ROS 水平^[22];缺失 *ATG2* 和 *ATG6* 基因的新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)对过氧化氢诱导的氧化应激更敏感^[23]。在乙醇胁迫下,*atg8Δ* 酵母细胞积累更多的过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子(O_2^-)^[24];在利什曼原虫中,*ATG8* 基因缺失的寄生虫对氧化应激更敏感^[25];在过氧化氢胁迫下,*ATG8* 基因缺失使重组酵母菌株胞内 ROS 稳态失衡,并造成线粒体损伤、线粒体膜电位下降^[26]。本文的研究结果和已有文献报道结果均提示:缺失 *ATG8* 基因增强酵母细胞氧化应激反应,推测这可能与氧化应激增强引起线粒体功能损伤相关。

本文进一步研究发现,缺失 *ATG8* 基因诱导酵母细胞凋亡关键酶 Caspase-3 活性升高,显著缩短细胞时序性寿命并降低细胞增殖速率。一方面,推测缺失 *ATG8* 基因下调抗氧化酶基因的表达,过多 ROS 的累积超出酵母细胞清除能力,使得细胞内氧化应激增强,对细胞造成

氧化损伤, 加速衰老, 从而缩短细胞寿命。研究结果与文献报道相一致, ROS 诱导的氧化应激参与调控细胞衰老信号通路的多个环节, 是引起衰老的主要机制之一^[27]。另一方面, 越来越多的证据表明, 在果蝇、线虫和酿酒酵母等生物中, 细胞凋亡和衰老之间密切相关^[28]。在酵母细胞时序性衰老过程中, 细胞内 ROS 堆积, Caspase 激活^[29]。ROS 间接诱导线粒体细胞色素 C 的释放, 激活凋亡途径下游的最终执行者 Caspase-3, 经过一系列级联反应导致广泛的蛋白水解, 最终诱导细胞凋亡^[30-31]。因此, 本文推测缺失 *ATG8* 基因的酵母细胞内 ROS 含量显著升高, 间接激活 Caspase-3, 引起基因连锁反应, 诱导细胞凋亡, 是酵母细胞时序性寿命缩短的重要原因。

文献报道采用高拷贝质粒构建 *Atg8* 蛋白高表达的菌株引起线粒体过度自噬, 导致线粒体过度消耗, 进而能量产生不足, 影响菌株生长^[26]。因此, 本文通过转化低拷贝质粒实现 *ATG8* 基因在酵母细胞中的过表达, 其表型如: 凋亡关键酶 Caspase-3 活性、增殖速率和时序寿命无明显变化。然而, 过表达 *ATG8* 基因上调酵母细胞中抗氧化酶基因的转录水平, 下调 ROS 水平。一方面, 推测过表达 *ATG8* 基因通过上调抗氧化酶基因的表达, 进而下调细胞内 ROS 含量, 改善线粒体自身的氧化应激水平, 保护细胞免受氧化损伤。研究结果与文献报道相似, 过表达 *ATG8* 基因下调酿酒酵母细胞在过氧化氢胁迫下的 ROS 水平^[26]; 过表达 *ATG8* 基因增强寄生虫对应激反应的抗性^[25], 因此, 过表达 *ATG8* 基因在维持酵母细胞内氧化还原稳态和线粒体活力方面有积极作用。另一方面, 研究显示, ROS 作为参与多条细胞信号传导途径的关键因子, 在调控自噬过程中具有重要作用, 从自噬诱导至成熟必不可少^[32], 本文推测

过表达 *ATG8* 基因降低 ROS 水平, 可能对细胞的自噬过程起抑制作用, 氧化应激和细胞自噬使得过表达菌株的表型无明显变化。

综上所述, 以上研究结果提示缺失酵母自噬相关基因 *ATG8*, 增强细胞氧化应激反应, 上调凋亡关键酶 Caspase-3 活性, 缩短细胞时序性寿命。本文推测缺失 *ATG8* 可能通过调节细胞内氧化应激反应进而影响时序性寿命, 但有关 *ATG8* 基因参与调节氧化应激与寿命的具体机制, 仍有待深入研究。

REFERENCES

- [1] RAZA S. Autophagy and metabolic aging: Current understanding and future applications[J]. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 2024, 1871(6): 119753.
- [2] WATANABE Y, TAGUCHI K, TANAKA M. Roles of stress response in autophagy processes and aging-related diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(18): 13804.
- [3] SHINTANI T, KLIONSKY DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. *Science*, 2004, 306(5698): 990-995.
- [4] TSUKAMOTO S, KUMA A, MURAKAMI M, KISHI C, YAMAMOTO A, MIZUSHIMA N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos[J]. *Science*, 2008, 321(5885): 117-120.
- [5] NGUYEN TN, LAZAROU M. A unifying model for the role of the ATG8 system in autophagy[J]. *Journal of Cell Science*, 2022, 135(11): jcs258997.
- [6] YU ZQ, SUN LL, JIANG ZD, LIU XM, ZHAO D, WANG HT, HE WZ, DONG MQ, DU LL. Atg38-Atg8 interaction in fission yeast establishes a positive feedback loop to promote autophagy[J]. *Autophagy*, 2020, 16(11): 2036-2051.
- [7] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, YAMAMOTO A, KIRISAKO T, NODA T, KOMINAMI E, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [8] CUI D, HUO SS, WANG X, ZHENG ZQ, ZHANG YH, ZHANG JL, ZHONG F. Establishment of canine macrophages stably expressing GFP-tagged canine LC3 protein for effectively detecting autophagy[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 49: 101493.
- [9] ODOH CK, GUO XJ, ARNONE JT, WANG XY, ZHAO ZK. The role of NAD and NAD precursors on longevity and lifespan modulation in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biogerontology*, 2022, 23(2): 169-199.
- [10] CUI HJ, CUI XJ, YANG XD, CUI XG, SUN YX,

- YUAN D, CUI Q, DENG YW, SUN EH, CHEN YQ, GUO HS, DENG ZL, WANG JF, XU S, SUN XR, ZHAO W, LIU XG. Effect of ATG8 or SAC1 deficiency on the cell proliferation and lifespan of the long-lived PMT1 deficiency yeast cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 2024, 371: fnad121.
- [11] CUI HJ, CUI XG, JING X, YUAN Y, CHEN YQ, SUN YX, ZHAO W, LIU XG. *GAS1* deficient enhances UPR activity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 1238581.
- [12] PARRELLA E, LONGO VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease[J]. Methods, 2008, 46(4): 256-262.
- [13] ZHAO W, GUO F, KONG LY, LIU JX, HONG XS, JIANG ZW, SONG HC, CUI XJ, RUAN J, LIU XG. Yeast YPK9 deficiency results in shortened replicative lifespan and sensitivity to hydrogen peroxide[J]. Biogerontology, 2021, 22(5): 547-563.
- [14] JOMOVA K, ALOMAR SY, ALWASEL SH, NEPOVIMOVA E, KUCA K, VALKO M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants[J]. Archives of Toxicology, 2024, 98(5): 1323-1367.
- [15] ISLAM A, CHANG YC, TSAO NW, WANG SY, CHUEH PJ. *Calocedrus formosana* essential oils induce ROS-mediated autophagy and apoptosis by targeting SIRT1 in colon cancer cells[J]. Antioxidants, 2024, 13(3): 284.
- [16] LEI YC, HUANG YX, WEN X, YIN ZY, ZHANG ZH, KLIONSKY DJ. How cells deal with the fluctuating environment: autophagy regulation under stress in yeast and mammalian systems[J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 304.
- [17] 李云基, 熊罗节, 田岳凤, 翟春涛, 李玮. 端粒及线粒体自噬与细胞衰老关系的分析[J]. 中国医学创新, 2023, 20(14): 164-169.
- LI YJ, XIONG LJ, TIAN YF, ZHAI CT, LI W. Analysis of the relationship between telomere and mitophagy and cell aging[J]. Medical Innovation of China, 2023, 20(14): 164-169 (in Chinese).
- [18] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO MA, PARTRIDGE L, SERRANO M, KROEMER G. Hallmarks of aging: an expanding universe[J]. Cell, 2023, 186(2): 243-278.
- [19] LEE JS, GIORDANO S, ZHANG JH. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling[J]. The Biochemical Journal, 2012, 441(2): 523-540.
- [20] ZHANG Y, QI HY, TAYLOR R, XU WH, LIU LF, JIN SK. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains[J]. Autophagy, 2007, 3(4): 337-346.
- [21] WU JJ, QUIJANO C, CHEN E, LIU HJ, CAO L, FERGUSSON MM, ROVIRA II, GUTKIND S, DANIELS MP, KOMATSU M, FINKEL T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy[J]. Aging, 2009, 1(4): 425-437.
- [22] BENSAD K, CHEUNG EC, VOUSDEN KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy[J]. The EMBO Journal, 2009, 28(19): 3015-3026.
- [23] ZHAO XR, FENG WJ, ZHU XY, LI CX, MA XY, LI X, ZHU XD, WEI DS. Conserved autophagy pathway contributes to stress tolerance and virulence and differentially controls autophagic flux upon nutrient starvation in *Cryptococcus neoformans*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2690.
- [24] JING HJ, LIU HH, ZHANG L, GAO J, SONG HR, TAN XR. Ethanol induces autophagy regulated by mitochondrial ROS in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(12): 1982-1991.
- [25] GIRI S, SHAHA C. *Leishmania donovani* parasite requires Atg8 protein for infectivity and survival under stress[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(11): 808.
- [26] 程万琪, 侯骞尧, 刘春风, 钮成拓, 郑飞云, 李崎, 王金晶. 线粒体自噬基因对酿酒酵母抗氧化性能的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3464-3480.
- CHENG WQ, HOU QY, LIU CF, NIU CT, ZHENG FY, LI Q, WANG JJ. Effect of mitophagy related genes on the antioxidant properties of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3464-3480 (in Chinese).
- [27] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR SY, ALWASEL SH, NEPOVIMOVA E, KUCA K, VALKO M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging[J]. Archives of Toxicology, 2023, 97(10): 2499-2574.
- [28] LAUN P, HEEREN G, RINNERHALER M, RID R, KÖSSLER S, KOLLER L, BREITENBACH M. Senescence and apoptosis in yeast mother cell-specific aging and in higher cells: a short review[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1783(7): 1328-1334.
- [29] HERKER E, JUNGWIRTH H, LEHMANN KA, MALDENER C, FRÖHLICH KU, WISSING S, BÜTTNER S, FEHR M, SIGRIST S, MADEO F. Chronological aging leads to apoptosis in yeast[J]. The Journal of Cell Biology, 2004, 164(4): 501-507.
- [30] JI C, AMARNATH V, PIETENPOL JA, MARNETT LJ. 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release[J]. Chemical Research in Toxicology, 2001, 14(8): 1090-1096.
- [31] JEONG SY, SEOL DW. The role of mitochondria in apoptosis[J]. BMB Reports, 2008, 41(1): 11-22.
- [32] ZHOU J, LI XY, LIU YJ, FENG J, WU Y, SHEN HM, LU GD. Full-coverage regulations of autophagy by ROS: from induction to maturation[J]. Autophagy, 2022, 18(6): 1240-1255.