



内质网应激反应在 *PMT1* 基因调控酿酒酵母细胞寿命和自噬中的作用

崔晓静^{1,2,3}, 袁頔⁴, 杨晓迪^{1,3}, 张恒恒², 管文斌^{1,3}, 王俊芳⁵, 庞晓飞^{6*},
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 广东医科大学附属东莞第一医院检验医学科, 广东 东莞 523808

3 广东医科大学 医学技术学院, 广东 东莞 523808

4 广东医科大学 第二临床医学院, 广东 东莞 523808

5 广东医科大学 基础医学院, 广东 东莞 523808

6 山东省第二人民医院儿科, 山东 济南 250022

崔晓静, 袁頔, 杨晓迪, 张恒恒, 管文斌, 王俊芳, 庞晓飞, 崔红晶. 内质网应激反应在 *PMT1* 基因调控酿酒酵母细胞寿命和自噬中的作用[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4262-4270.

CUI Xiaojing, YUAN Di, YANG Xiaodi, ZHANG Hengheng, GUAN Wenbin, WANG Junfang, PANG Xiaofei, CUI Hongjing. Effects of endoplasmic reticulum stress on the regulation of the lifespan and autophagy of *Saccharomyces cerevisiae* by *PMT1*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4262-4270.

摘要: 【目的】研究内质网应激反应在酿酒酵母蛋白 *O*-甘露糖基转移酶-1 (protein *O*-mannosyltransferase-1, *pmt1*)基因调控细胞寿命和自噬中的作用。【方法】基于基因同源重组的原理,构建双基因缺失菌株(*pho8Δ60 pmt1Δ*)。在光学显微镜下计数 *PMT1* 基因缺失酵母菌株(*pmt1Δ*) 在衣霉素(内质网应激诱导剂)培养条件下的母细胞产生子代细胞的数量,统计菌株的复制性寿命。在 SD-N 培养中(自噬诱导培养基),通过酶标仪检测 *pho8Δ60 pmt1Δ* 菌株的碱性磷酸酶活性。在衣霉素培养条件下,通过 Western blotting 检测细胞自噬标签 Atg8 蛋白的表达水平;通过 RT-qPCR 检测 *pmt1Δ* 菌株中自噬相关基因 *ATG1* 和 *ATG8* 的表达情况。【结果】在衣霉素培养条件下, *pmt1Δ*

资助项目: 国家自然科学基金(31701050); 广东省自然科学基金(2022A1515010816); 广东省医学科研基金(A2022368); 广东医科大学博士启动项目(B2017014); 广东医科大学校级大学生创新创业训练计划(ZCDS002)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31701050), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2022A1515010816), the Guangdong Medical Research Foundation (A2022368), the Doctoral Research Start-up Fund Project of Guangdong Medical University (B2017014), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for Student of Guangdong Medical University (ZCDS002).

*Corresponding authors. E-mail: CUI Hongjing, cuihongjing@gdmu.com.cn; PANG Xiaofei, wudahao@yeah.net

Received: 2024-05-07; Accepted: 2024-09-13; Published online: 2024-09-14

菌株的复制性寿命缩短 38.7%，差异有统计学意义；*PMT1* 基因缺失酵母菌株的碱性磷酸酶活性上升；随衣霉素浓度增加，*pmt1Δ* 菌株中融合蛋白 GFP-Atg8 和游离 GFP 蛋白的表达水平逐渐升高；在衣霉素培养条件下，*pmt1Δ* 菌株中 *ATG1* 和 *ATG8* 基因表达上调。【结论】内质网应激反应减弱了 *PMT1* 基因缺失酵母细胞复制性寿命，增强了细胞自噬活性。

关键词：酿酒酵母；衣霉素；内质网应激；自噬；*PMT1*

Effects of endoplasmic reticulum stress on the regulation of the lifespan and autophagy of *Saccharomyces cerevisiae* by *PMT1*

CUI Xiaojing^{1,2,3}, YUAN Di⁴, YANG Xiaodi^{1,3}, ZHANG Hengheng², GUAN Wenbin^{1,3}, WANG Junfang⁵, PANG Xiaofei^{6*}, CUI Hongjing^{1,5*}

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

2 Department of Laboratory Medicine, the First Dongguan Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China

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

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

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

6 Department of Pediatrics, Shandong Second Provincial General Hospital, Jinan 250022, Shandong, China

Abstract: [Objective] To study the effects of endoplasmic reticulum stress on the regulation of the lifespan and autophagy of *Saccharomyces cerevisiae* by the protein *O*-mannosyltransferase 1 (*PMT1*). **[Methods]** The double deletion strain (*pho8Δ60 pmt1Δ*) was constructed based on the genetic homologous recombination. The daughter cells produced by the mother cell of the *PMT1*-deleted yeast strain (*pmt1Δ*) treated with tunicamycin (inducing endoplasmic reticulum stress) were counted under a light microscope, and the replicative lifespan of the strain was examined. A microplate reader was used to measure the alkaline phosphatase activity of the *pho8Δ60 pmt1Δ* strain in the SD-N medium (for inducing autophagy). Western blotting was employed to determine the expression level of the autophagy marker Atg8 in the presence of tunicamycin. The transcript levels of autophagy-related genes *ATG1* and *ATG8* in the *pmt1Δ* strain treated with tunicamycin were determined by RT-qPCR. **[Results]** The replicative lifespan of the *pmt1Δ* strain was shortened by 38.7%, while the alkaline phosphatase activity of *pmt1Δ* strain was increased compared with those of the wild type in the presence of tunicamycin. The expression levels of GFP-Atg8 fusion protein and free GFP in the *pmt1Δ* strain were up-regulated with the increase in the concentration of tunicamycin. The transcript levels of *ATG1* and *ATG8* were up-regulated in the *pmt1Δ* strain treated with tunicamycin. **[Conclusion]** Endoplasmic reticulum stress impairs the replicative lifespan and enhances the autophagy of *PMT1*-deleted yeast cells.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; tunicamycin; endoplasmic reticulum stress; autophagy; *PMT1*

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)通过激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)信号通路^[1],增强内质网处理未折叠或错误折叠蛋白质的能力,缓解应激压力,有助于重建或维持细胞内环境稳态,该细胞保护性信号级联反应过程在衰老和衰老相关疾病中具有重要作用^[1-2]。当 ERS 反应较轻时,UPR 信号通路通过启动自噬(autophagy),进而恢复内质网稳态,有利于细胞存活^[3];当 ERS 反应持续存在或过强时,过度诱导的自噬或激活的凋亡通路会促使细胞死亡^[3]。自噬是细胞内的一种生理活动,在多种应激条件下也是保护细胞和维持体内平衡的一种重要的机制^[4-5]。

酿酒酵母作为研究细胞寿命的理想模式生物,具有基因操作简便,寿命周期短等优点^[6]。酿酒酵母蛋白 *O*-甘露糖基转移酶家族(protein *O*-mannosyltransferases, PMTs)中的 *PMT1* 基因可以启动 *O*-甘露糖基多聚糖的组装,参与蛋白质修饰、维持细胞壁和细胞内的稳定性^[7]。本课题组前期研究发现,缺失 *PMT1* 基因可延长酵母细胞的复制性寿命,其机制与 ERS 诱导的 UPR 信号通路活性和细胞自噬活性相关^[8-9],这提示酵母细胞内蛋白质动态平衡在 *PMT1* 基因调控细胞寿命过程中发挥重要作用,但有关内质网应激反应在 *PMT1* 基因调控酵母细胞寿命和自噬中的具体作用,以及可能机制还未知,因此,本研究进一步

探究内质网应激反应在 *PMT1* 基因调控酵母细胞寿命和自噬中的作用,探讨可能的细胞机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

本研究所用的质粒 pRS306 为低拷贝穿梭载体,在大肠杆菌中具有氨苄青霉素抗性,带有 Ura3 营养筛选标签。单倍体酿酒酵母 BY4742 由美国华盛顿大学 Matt Kaeberlein 博士惠赠,过表达 Atg8 蛋白的酵母菌株 BY4742^{Atg8} 和 *pmt1Δ*^{Atg8} 为衰老研究所保存^[8],双基因缺失酵母菌株(*pho8Δ60 pmt1Δ*)为本研究构建。

1.1.2 培养基、试剂和仪器

酵母 YPD、SD 和 SD-N 等培养基参考文献[8-9]配制。

衣霉素(tunicamycin)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Western、IP 细胞裂解液和碱性磷酸酶检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司;GFP 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;G6PDH 抗体购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司。引物(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

多功能酶标仪,伯腾仪器有限公司(BioTek 公司);凝胶成像系统,Bio-Techne 公司;荧光化学发光仪,Azure Biosystems 公司。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name 序列 Sequences (5'→3')

<i>pho8Δ60</i> -box-F	TATCAGCATACGGGACATTATTTGAACGCGCATTAGCAGCAGATTGTACTGAGAGTGCAC
<i>pho8Δ60</i> -box-R	TCACGAAGAATATGACATTCTTCTTCTGTGTGATGCAGACTGTGCGGTATTTACACCCG
<i>pho8Δ60</i> -RT-F	ATGATGACTCACACATTACC
<i>pho8Δ60</i> -RT-R	ACGTAATGCAAACTGCTTG
<i>ATG1</i> -RT-F	GGGTCTAGGCGACCATCTTT
<i>ATG1</i> -RT-R	AGTTTGACTGTACGGTGGGG
<i>ATG8</i> -RT-F	TGTCAATGATACTTTGCCACCTACT
<i>ATG8</i> -RT-R	ATTTTCGATTTTAGATGTTAACGCTTC
<i>RPR8</i> -RT-F	TCATGGCTGCGTCTGAAGTA
<i>RPR8</i> -RT-R	GGCACCGTTATTAGCAGCAT

1.2 双基因缺失酵母菌株(*pho8Δ60 pmt1Δ*)的构建和验证

双基因缺失菌株的构建方法参考文献[10], 反应体系按照试剂说明书进行。以 *pho8Δ60*-RT-F 和 *pho8Δ60*-RT-R 为 PCR 引物, 质粒 pRS306 为模板, 扩增产物为 *pho8Δ60* 破坏元件(含 *URA3* 基因编码序列)。采用醋酸锂方法将破坏元件转化酵母细胞感受态(*pmt1Δ* 菌株), PCR 方法验证阳性克隆酵母菌株。

1.3 复制性寿命的检测

酵母细胞复制性寿命的检测方法按照参考文献[11]进行。在光学显微镜下分离、记录酵母母细胞在 0.25 μg/mL 衣霉素的寿命平板产生子细胞的个数, 统计绘制复制性寿命曲线图。

1.4 碱性磷酸酶活性检测

酵母细胞液泡中的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)由 *PHO8* 基因编码, 通常将缺失包括跨膜区在内的 60 个氨基酸残基编码的蛋白命名为 *Pho8Δ60*, 它到达液泡的唯一途径是自噬^[12]。将 *pho8Δ60* 酵母菌株和 *pho8Δ60 pmt1Δ* 酵母菌株培养至对数生长期, 重悬浮于 3 mL SD-N 培养基中(不含氨基酸和硫氨酸的酵母氮基)培养 6 h。提取酵母细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 碱性磷酸酶检测试剂盒测定 ALP 活性。检测方法均严格按照相应试剂盒说明书进行。

1.5 GFP-Atg8 蛋白表达水平检测

通过 Western blotting 技术检测酵母细胞中融合蛋白 GFP-Atg8 的表达水平。酵母菌株 BY4742^{Atg8} 和 *pmt1Δ*^{Atg8} 分别接种于 3 mL YPD 液体培养基中, 培养至对数生长期后(*OD*₆₀₀ 约为 0.6–0.8), 加入 30 μL 200 μg/mL 衣霉素分别培养 1 h 和 3 h。收集菌液, 加入约 0.2 g 酸洗珠子、IP 裂解液和蛋白酶抑制剂, 涡旋 10 s、冰浴 20 s, 持续 30 min, 提取酵母细胞总蛋白。12% PAGE 胶电泳, 单克隆抗体 GFP 蛋白杂交, 兔多克隆

抗体 G6PDH 为内参对照, 荧光化学发光仪显色。

1.6 RT-qPCR 检测基因转录水平

取等量(*OD*₆₀₀ 约为 0.1)的酵母菌株, 置于含或不含 2 μg/mL 衣霉素的液体培养基中培养 1 h, 提取酵母细胞总 RNA、反转录成 cDNA、RT-qPCR 均按照试剂盒说明书进行。RT-qPCR 检测自噬相关基因(*ATG1* 和 *ATG8*)的转录水平, *PRP8* 基因作为内参。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。两组间比较采用 *t* 检验进行分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 酵母 *pho8Δ60 pmt1Δ* 缺失菌株的验证

本研究在 *pmt1Δ* 酵母菌株的基础上, 进一步缺失 *pho8Δ60* 基因, 构建 *pho8Δ60 pmt1Δ* 酵母菌株。图 1A 所示, *PHO8* 基因破坏元件大小为 1 232 bp, 与预期大小相符; 图 1B 所示, 以

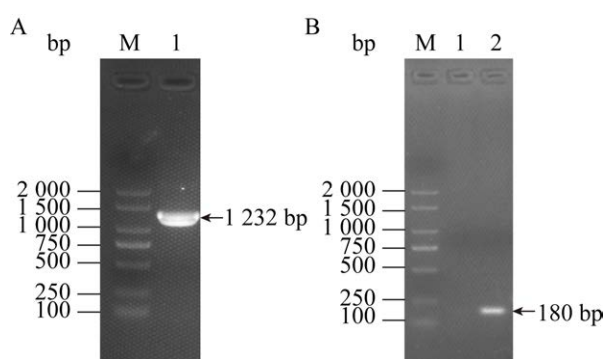


图 1 *pho8Δ60* 基因破坏元件电泳图(A)及 PCR 鉴定 *pho8Δ60 pmt1Δ* 菌株电泳图(B)

Figure 1 The electrophoresis of the *pho8Δ60* gene disruption cassette (A) and verification of the *pho8Δ60 pmt1Δ* strain by PCR (B). M: DNA marker; 1: The disruption cassette (A) and PCR products of the genomic DNA of the *pho8Δ60 pmt1Δ* strain; 2: PCR products of the genomic DNA of the BY4742 strain.

pho8Δ60-box-F 和 *pho8Δ60*-box-R 为引物, 以阳性克隆菌株基因组 DNA 为模板, PCR 产物与预期大小相符。研究结果说明, *pho8Δ60pmt1Δ* (*pho8Δ60::URA3 pmt1::LEU2*) 菌株构建成功。

2.2 *pmt1Δ* 菌株在衣霉素培养条件下的复制性寿命

衣霉素是一种核苷类抗生素, 它可以阻碍蛋白质的糖基化修饰过程, 引起未折叠蛋白质堆积增加, 诱导内质网应激反应^[13]。本研究为进一步研究内质网应激反应在长寿命 *pmt1Δ* 菌株参与细胞寿命调控中的作用, 采用在显微镜下计数 BY4742 和 *pmt1Δ* 菌株在衣霉素(0.25 μg/mL)培养条件下的母细胞产生子代细胞的数量, 绘制复制性寿命曲线图。如图 2 所示, BY4742 和 *pmt1Δ* 菌株的平均寿命均明显缩短, 与其在 YPD 培养条件的寿命比较, 分别缩短 14.6% 和 56.4%; 在衣霉素培养条件下, BY4742 菌株的平均寿命约 19.9 代, *pmt1Δ* 菌株的寿命约 12.2 代, 缩短 38.7%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果说明, 衣

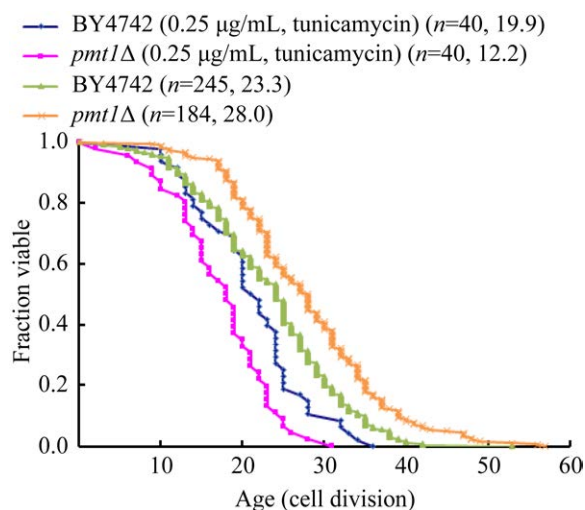


图 2 野生型和 *pmt1Δ* 菌株的复制性寿命曲线图
Figure 2 The replicative lifespan (RLS) curves of the BY4742 and *pmt1Δ* strains. BY4742: The control strain. Mean RLS is shown in parentheses, and “n” is the number of mother cells scored.

霉素明显缩短 BY4742 菌株和 *pmt1Δ* 菌株的复制性寿命, 对 *pmt1Δ* 菌株的影响作用更显著。

2.3 *pmt1Δ* 菌株中的碱性磷酸酶活性

通过测定碱性磷酸酶(ALP)活性, 研究 *pmt1Δ* 酵母细胞中的细胞自噬水平。如图 3 所示, 在 YPD 培养条件下, 与 BY4742 菌株中的 ALP 活性比较, *pmt1Δ* 菌株中的 ALP 活性上调; 在自噬诱导培养条件下(SD-N 培养基), 两种菌株中的 ALP 活性均升高, *pmt1Δ* 菌株中的 ALP 活性升高更显著。这说明, 缺失 *PMT1* 基因上调酵母细胞中碱性磷酸酶的活性, 在自噬培养条件下, 碱性磷酸酶的活性上调更显著。

2.4 在衣霉素培养条件下, *pmt1Δ* 菌株中融合蛋白 GFP-Atg8 的表达水平

通过检测酵母菌株在衣霉素培养条件下融合蛋白 GFP-Atg8 的表达水平, 研究 *pmt1Δ* 酵母细胞在内质网应激条件下的自噬活性。如图 4 所示, 随着衣霉素培养时间延长, *pmt1Δ* 菌株中的游离蛋白 GFP 占总蛋白的比例增加, 显著高于 BY4742 菌株($P < 0.01$)。以上结果提示, 衣霉素诱导 *pmt1Δ* 菌株中融合蛋白 GFP-Atg8 和游离蛋白 GFP 表达上调。

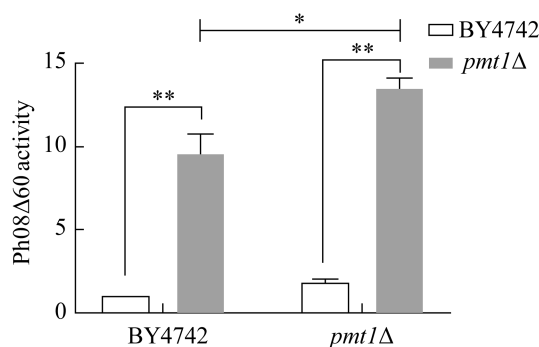


图 3 *pmt1Δ* 菌株中的碱性磷酸酶活性
Figure 3 Alkaline phosphatase activity were detected in the *pmt1Δ* strain. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

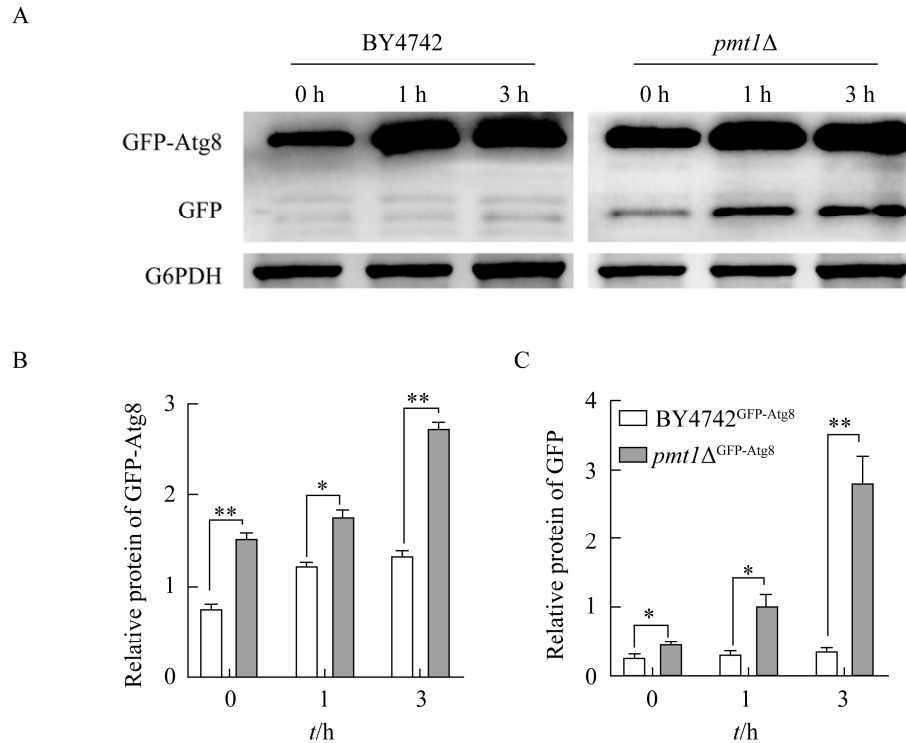


图 4 酵母菌株中融合蛋白 GFP-Atg8 的表达水平

Figure 4 Relative protein expression levels of GFP-Atg8 fusion in the yeast strains. A: Protein expression levels of GFP-Atg8 fusion and free GFP in the yeast strains treated with tunicamycin. B: The gray values of the fusion protein GFP-Atg8. C: The gray values of the free protein GFP. G6PDH: Control antibody. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$. The data represent the mean \pm SD ($n=3$)

2.5 在衣霉素培养条件下, *pmt1*Δ 菌株中自噬相关基因的转录表达水平

通过 RT-qPCR 检测参与自噬相关基因 *ATG1* 和 *ATG8* 的转录表达水平, 进一步研究 *pmt1*Δ 酵母细胞在内质网应激条件下的自噬活性。结果显示, 在 YPD 培养条件下, 与 BY4742 菌株中的 *ATG1* 和 *ATG8* 基因表达水平比较, *pmt1*Δ 菌株中的自噬相关基因表达上调; 在衣霉素培养条件下, *pmt1*Δ 菌株中 *ATG1* 和 *ATG8* 基因表达水平显著上调(图 5)。因此, 在衣霉素培养条件下, 缺失 *PMT1* 基因诱导自噬相关基因 *ATG1* 和 *ATG8* 的表达上调。

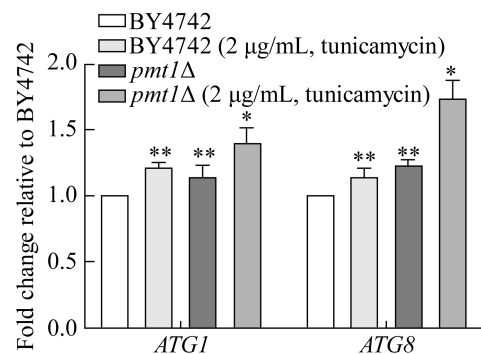


图 5 自噬相关基因 *ATG1* 和 *ATG8* 在酵母菌株中的转录表达水平

Figure 5 Relative mRNA expression levels of autophagy-related genes *ATG1* and *ATG8* in the yeast strains. The data represent the mean \pm SD ($n=3$). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

内质网应激和细胞自噬通过调控细胞内蛋白质的动态平衡,在生物体生长发育、细胞程序性死亡、抑制肿瘤和调控寿命等方面发挥着非常重要的作用^[14]。激活内质网应激,提高自噬作用效率,使得细胞内累积的受损蛋白质或细胞器明显减少,促进细胞存活;反之,聚集的毒性蛋白质超出细胞的承载能力,引起细胞衰老和衰老等相关疾病发生或发展。

在内质网应激过程中,激活的未折叠蛋白反应通路诱导伴侣蛋白等表达上调,下调错误折叠蛋白堆积,激活细胞自噬^[15]。本研究以衣霉素为内质网应激反应诱导剂,研究内质网应激在 *PMT1* 基因调控酵母细胞寿命中的作用,探讨其相关机制。在衣霉素培养条件下, *pmt1Δ* 菌株的复制性寿命明显缩短。这提示衣霉素诱导的内质网应激反应可能导致长寿命 *pmt1Δ* 菌株细胞的增殖能力减弱,寿命缩短。这一结果与以往报道相似,持续存在的内质网应激会使得细胞保护性 UPR 变成细胞毒性^[16]。持续存在的 ERS 超出细胞自身处理能力,为保护其他细胞或细胞内其他代谢的正常功能,机体将会启动细胞自噬,过度激活的自噬会导致细胞死亡^[17]。

碱性磷酸酶(ALP)活性测定是当前相对精确的研究非选择性细胞自噬水平的定量方法^[18]。去除 N-末端 60 个氨基酸的 Pho8Δ60 蛋白以非活性酶原的形式分散在整个细胞质中。当非选择性细胞自噬发生时,包裹进自噬体的 Pho8Δ60 蛋白运送至液泡,被激活为有活性的碱性磷酸酶。为研究 *pmt1Δ* 菌株的自噬活性,本研究在 *pmt1Δ* 酵母细胞的基础上,进一步缺失 *pho8Δ60* 基因,成功构建 *pho8Δ60 pmt1Δ* 双基因缺失菌株。研究发现缺失 *PMT1* 基因诱导酵母细胞内碱性磷酸酶活性上调,且在自噬培养条件下,碱性磷酸酶

的活性升高更显著。这提示,缺失 *PMT1* 基因诱导酵母细胞中非选择性自噬活性显著上调。研究发现 *pmt1Δ* 菌株中融合蛋白 GFP-Atg8 和游离蛋白 GFP 的表达水平升高,也进一步证实本研究前期关于 *PMT1* 基因在选择性自噬活性中的作用研究^[8]。

为进一步研究内质网应激反应对 *pmt1Δ* 菌株细胞自噬活性的作用,本研究检测 *pmt1Δ* 菌株在衣霉素培养条件下的融合蛋白 GFP-Atg8 的表达情况。研究发现,随着衣霉素培养时间的延长, *pmt1Δ* 菌株中的游离蛋白 GFP 占总蛋白的比例增加;在转录水平上,衣霉素诱导 *pmt1Δ* 菌株中的 *ATG1* 和 *ATG8* 基因表达上调。研究结果说明,衣霉素增强了 *pmt1Δ* 菌株的自噬活性。本研究结果与以往研究报道相一致,内皮细胞摄取细颗粒物(PM_{2.5})引发内质网应激反应,进而诱导细胞自噬^[19]。在酵母内质网自噬过程中,Atg1 控制自噬体的形成^[20],Atg8 参与自噬体膜的扩张^[21]。自噬相关蛋白 Atg39 和 Atg40 能将内质网装载到自噬体中^[22]。哺乳动物中的 FAM134B 和 RTN3 蛋白都能在体外驱动饥饿诱导的内质网自噬^[23]。酵母细胞内质网应激既激活内质网自噬,又诱导巨自噬,两种自噬过程可以独立运行,又相互协调^[24]。亨廷顿病和帕金森病的实验模型表明,内质网应激诱导的自噬增强细胞清除 polyQ 和 α -synuclein 等聚集物能力,促进细胞存活^[25-26]。自噬激活的最终转归取决于多种因素,包括刺激强度、细胞类型和细胞环境等,适度的自噬活性有利于细胞生存和发育,过度激活会导致细胞死亡。因此,ERS 和自噬之间可能存在相互诱导和协同作用。

综上所述,内质网应激反应诱导剂衣霉素缩短 *pmt1Δ* 菌株的复制性寿命,激活酵母细胞自噬活性;无论是内质网应激还是细胞自噬,适度的激活寿命相关调控通路对细胞寿命是有益的,

持续存在的激活会超出细胞承载能力,最终导致细胞死亡。然而,有关内质网应激和细胞自噬两者在 *pmt1Δ* 菌株调控细胞寿命中相互关系和具体机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] EDIRISINGHE NM, MANAMPERI NH, WANASINGHE VS, KARUNAWEEERA N. Unfolded protein response pathway in leishmaniasis: a review[J]. *Parasite Immunology*, 2023, 45(11): e13009.
- [2] HEMAGIRRI M, CHEN Y, GOPINATH SCB, SAHREEN S, ADNAN M, SASIDHARAN S. Crosstalk between protein misfolding and endoplasmic reticulum stress during ageing and their role in age-related disorders[J]. *Biochimie*, 2024, 221: 159-181.
- [3] SENFT D, RONAI ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40(3): 141-148.
- [4] NAGAYACH A, WANG CR. Autophagy in neural stem cells and glia for brain health and diseases[J]. *Neural Regeneration Research*, 2024, 19(4): 729-736.
- [5] FILIPPELLI RL, KAMYABIAZAR S, CHANG NC. Monitoring autophagy in neural stem and progenitor cells[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2515: 99-116.
- [6] HIGUCHI-SANABRIA R, PERNICE WMA, VEVEA JD, ALESSI WOLKEN DM, BOLDOGH IR, PON LA. Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(8): 1133-1146.
- [7] ZATORSKA E, GAL L, SCHMITT J, BAUSEWEIN D, SCHULDINER M, STRAHL S. Cellular consequences of diminished protein *O*-mannosyltransferase activity in baker's yeast[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(6): 1226.
- [8] 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, WEI Z, 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.
- [9] CUI HJ, LIU XG, McCORMICK M, WASKO BM, ZHAO W, HE X, YUAN Y, FANG BX, SUN XR, KENNEDY BK, SUH Y, ZHOU ZJ, KAEBERLEIN M, FENG WL. PMT1 deficiency enhances basal UPR activity and extends replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Age*, 2015, 37(3): 9788.
- [10] 崔晓静, 杨晓迪, 袁岷, 王俊芳, 崔红晶. 酵母 PHO8 与 PHO13 双基因缺失酵母菌株构建[J]. *广东医科大学学报*, 2023, 41(1): 7-15.
- [11] CUI XJ, YANG XD, YUAN D, WANG JF, CUI HJ. Construction of yeast strains with double-gene deletion of PHO8 and PHO13[J]. *Journal of Guangdong Medical University*, 2023, 41(1): 7-15 (in Chinese).
- [12] STEFFEN KK, KENNEDY BK, KAEBERLEIN M. Measuring replicative life span in the budding yeast[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2009(28). DOI:10.3791/1209 1209.
- [13] YAO ZY, LIU X, KLIONSKY DJ. MitoPho8Δ60 assay as a tool to quantitatively measure mitophagy activity[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1759: 85-93.
- [14] YAMAMOTO K, ICHIKAWA S. Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2019, 72(12): 924-933.
- [15] 张慧芳, 黄自能, 陈蔚, 孙林, 刘伏友, 肖力. 内质网自噬及其与疾病的关系研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(12): 1251-1257.
- [16] ZHANG HF, HUANG ZN, CHEN W, SUN L, LIU FY, XIAO L. Research progress of reticulophagy and its relationship with diseases[J]. *Medical Journal of Chinese PLA*, 2021, 46(12): 1251-1257 (in Chinese).
- [17] CUI YX, PARASHAR S, ZAHOR M, NEEDHAM PG, MARI M, ZHU M, CHEN SL, HO HC, REGGIORI F, FARHAN H, BRODSKY JL, FERRO-NOVICK S. A COPII subunit acts with an autophagy receptor to target endoplasmic reticulum for degradation[J]. *Science*, 2019, 365(6448): 53-60.
- [18] SCHRÖDER M, KAUFMAN RJ. ER stress and the unfolded protein response[J]. *Mutation Research*, 2005, 569(1/2): 29-63.
- [19] KRIEL J, LOOS B. The good, the bad and the autophagosome: exploring unanswered questions of autophagy-dependent cell death[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2019, 26(4): 640-652.
- [20] ARAKI Y, KIRA S, NODA T. Quantitative assay of macroautophagy using Pho8Δ60 assay and

- GFP-cleavage assay in yeast[J]. *Methods in Enzymology*, 2017, 588: 307-321.
- [19] WANG Y, TANG M. PM_{2.5} induces autophagy and apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 710: 136397.
- [20] SCHREIBER A, COLLINS BC, DAVIS C, ENCHEV RI, SEDRA A, D'ANTUONO R, AEBERSOLD R, PETER M. Multilayered regulation of autophagy by the Atg1 kinase orchestrates spatial and temporal control of autophagosome formation[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(24): 5066-5081.e10.
- [21] HIRATA E, OHYA Y, SUZUKI K. Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181047.
- [22] KHAMINETS A, HEINRICH T, MARI M, GRUMATI P, HUEBNER AK, AKUTSU M, LIEBMANN L, STOLZ A, NIETZSCHE S, KOCH N, MAUTHE M, KATONA I, QUALMANN B, WEIS J, REGGIORI F, KURTH I, HÜBNER CA, DIKIC I. Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy[J]. *Nature*, 2015, 522(7556): 354-358.
- [23] WILKINSON S. Emerging principles of selective ER autophagy[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(1): 185-205.
- [24] SHENG R, QIN ZH. History and current status of autophagy research[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206: 3-37.
- [25] FUJITA E, KOUROKU Y, ISOAI A, KUMAGAI H, MISUTANI A, MATSUDA C, HAYASHI YK, MOMOI T. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II)[J]. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(6): 618-629.
- [26] KIM DY, SHIN JY, LEE JE, KIM HN, CHUNG SJ, YOO HS, KIM SJ, CHO HJ, LEE EJ, NAM SJ, KIM SH, JANG J, LEE SE, LEE PH. A selective ER-phagy exerts neuroprotective effects *via* modulation of α -synuclein clearance in parkinsonian models[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(37): e2221929120.