

# 自噬在慢性粒细胞白血病中的研究进展

刘张玲 汤荣睿 李娟 陈瑶\*

(重庆市沙坪坝区人民医院医学检验科, 重庆 400030)

**摘要** 自噬(autophagy)是真核细胞内一种保守的自降解系统,是细胞在营养或生长因子缺乏、低氧、微生物感染、内质网应激等有害刺激的作用下,为了维持细胞的代谢平衡、细胞内环境的稳定以及促进细胞生存作出的适应性反应。自噬与慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)的发生、耐药、复发密切相关,在CML中具有促进细胞存活和诱导细胞死亡的双重效应。因此,明确不同干预条件下自噬对CML细胞的不同作用,寻找特异性的自噬调控通路,联合应用自噬诱导剂或自噬抑制剂,将有助于CML患者的治疗。该文就自噬在CML中的研究进展作一综述。

**关键词** 自噬;慢性粒细胞白血病;白血病的发生;双重作用

## Autophagy and Its Research Progress in Chronic Myeloid Leukemia

LIU Zhangling, TANG Rongrui, LI Juan, CHEN Yao\*

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Shapingba District of Chongqing, Chongqing 400030, China)

**Abstract** Autophagy is a conserved self-degrading system in eukaryotic cells. It is the adaptable response of cells to maintain the balance of metabolism, stability of intracellular environment and promote cell survival under the harmful stimuli of nutrition or growth factor deficiency, hypoxia, microbial infection, endoplasmic reticulum stress, and so on. Autophagy may play an important role in the leukemogenesis, drug-resistance and recurrence of CML (chronic myeloid leukemia), and it has dual characteristics to promote survival and death of CML cells. Therefore, clarifying diverse roles of autophagy under different interferences, finding out specific autophagy pathways and combined use of autophagy inducer or inhibitor are helpful in the treatment of CML patients. This paper makes a summary on the research progress of autophagy in CML.

**Keywords** autophagy; chronic myeloid leukemia; leukemogenesis; dual role

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一种起源于骨髓造血干细胞的恶性克隆增殖性疾病,90%以上的CML患者体内可以检测到Ph染色体t(9,22)(q34,q11)及BCR-ABL融合基因,BCR-ABL融合基因表达产生具有高酪氨酸激酶活性的p210蛋白,能够激活细胞内一系列的信号通路,从而使白血病细胞恶性增殖,凋亡受阻<sup>[1]</sup>。蛋白酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)的应用,显著提高了患者的缓解率并延长生存期,然而仍有三

分之一的患者由于原发或者继发耐药等需要其他的治疗方法<sup>[2]</sup>。因此,对TKIs的耐药成为目前CML治疗的难点。自噬是细胞对环境的变化或代谢应激做出的适应性反应,能够降解受损蛋白质、细胞器或其他胞内物质,使其降解产物为细胞在不利条件下的生存提供能量支持并保持细胞内环境的稳定<sup>[3]</sup>。近年来,越来越多的研究显示,自噬在CML的发生、耐药、复发等过程中发挥重要作用。本文就自噬在CML中的研究进展作一综述,以期探索CML的新型自噬靶向药物提供参考。

### 1 自噬的分子机制及调控

自噬是一种真核细胞特有的生命现象,是细胞

收稿日期: 2019-07-29 接受日期: 2019-12-13

\*通讯作者。Tel: 023-65365158, E-mail: 59563768@qq.com

Received: July 29, 2019 Accepted: December 13, 2019

\*Corresponding author. Tel: +86-23-65365158, E-mail: 59563768@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5257>

在营养或生长因子缺乏、低氧、内质网应激等有害刺激作用下,为了维持细胞的代谢平衡、细胞内环境的稳定以及促进细胞生存作出的适应性反应<sup>[4]</sup>。自噬的本质是溶酶体介导的受损蛋白质、细胞器或其他胞内物质的降解。

自噬的过程可以分为3个阶段。(1)启动阶段,该阶段开始形成自噬小泡膜。启动自噬的第一个步骤是激活ULK1(unc-51 like autophagy activating kinase 1),这是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它与自噬相关蛋白ATG13(autophagy-related genes 13)和FAK家族相互作用蛋白200 kDa(FAK-family interacting protein of 200 kDa, FIP200)形成复合物,驱动自噬体的形成。在营养充足的条件下,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)被PI3K/AKT信号通路激活, mTORC1磷酸化ULK1和ATG13,抑制自噬的启动。当营养缺乏时, mTORC1活化受阻, ULK1发生去磷酸化,接着ATG13和FIP200发生自身磷酸化和磷酸化,快速启动自噬<sup>[5]</sup>。此外,通过AMPK介导的能量应激反应也可以增强自噬<sup>[6]</sup>。(2)延长阶段,自噬小泡弯曲延伸,包裹吞噬的成分。泛素样结合系统参与自噬小泡的延伸。在自噬相关蛋白TG7、ATG10和ATG16的帮助下,ATG5与ATG12共价结合,启动泛素化过程。第二个泛素样结合系统为磷脂酰乙醇胺(phosphatidyletha-

nolamine, PE)与自噬相关蛋白水溶性微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)的结合。以上两个泛素样结合系统都由p62介导完成,形成自噬体<sup>[7]</sup>。(3)成熟阶段,即晚期内涵体与溶酶体的融合以及自噬体的降解。本阶段由溶酶体相关膜蛋白(lysosomal-associated membrane protein, LAMP)参与,主要为LAMP-1和LAMP-2,溶酶体最终降解细胞膜和自噬泡所包含的内容物(图1)<sup>[8]</sup>。

自噬的调控通路主要有两类:依赖mTOR(mammalian target of rapamycin)的通路和非依赖mTOR的通路<sup>[9]</sup>。mTOR是生长因子、胰岛素、ATP的感受器,能感受细胞所处微环境中营养和能量的变化。mTOR参与组成TOR1(mTOR、GβL和raptor)和TOR2(mTOR、GβL、rictor和SIN1),能在多种上游信号(Ras、ClassI-PI3K、AKT、IGF1/2、AMPK等)的作用下抑制自噬的发生。mTOR的抑制和活化由TSC1/TSC2(tuberous sclerosis complex, TSC)调控,通过AMPK信号通路磷酸化TSC2,从而抑制TOR1对特定能量缺乏的应激反应,例如葡萄糖缺乏。然而, TSC2缺陷细胞对AMPK活化剂抑制AMPK依赖的TOR1仍有反应,说明AMPK必须通过TSC2独立机制调节TOR1<sup>[3]</sup>。非依赖mTOR的通路包括ClassIII-PI3K、RAS-MAPK、Ca-AMPK、p53、PTEN、内质网应激等<sup>[10]</sup>。

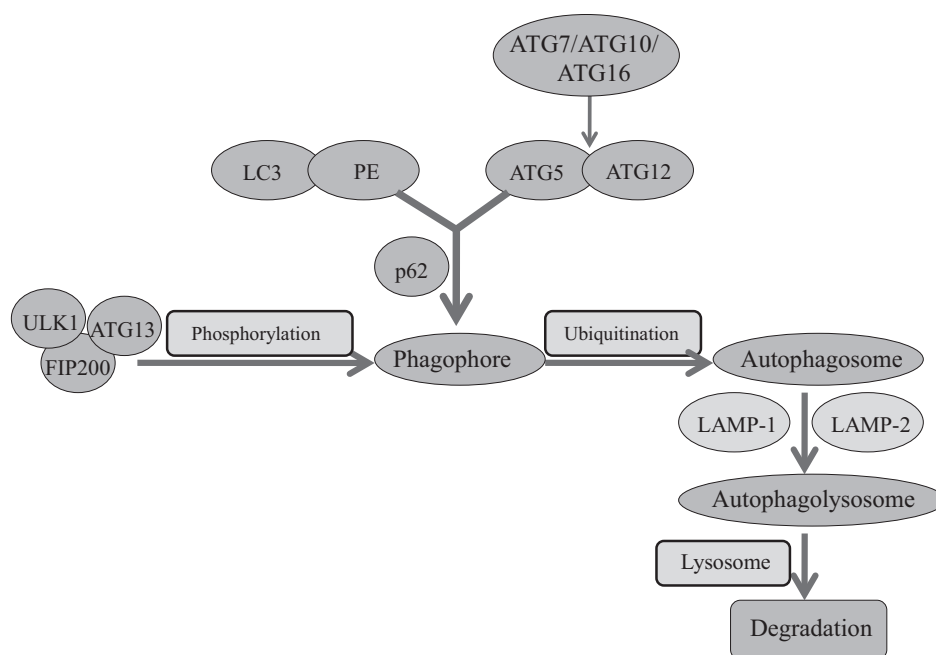


图1 自噬的主要过程

Fig.1 The main process of autophagy

## 2 自噬在肿瘤中的双重作用

自噬是一种分解代谢过程,在肿瘤抑制和促进中起到了双重作用,其激活可能帮助肿瘤细胞适应细胞应激,在某些情况下,也可能导致细胞死亡。诱导自噬被认为是一种预防癌症的有效方式,通过选择性的自噬,可以使细胞清除产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的受损线粒体,从而预防DNA突变的发生<sup>[1]</sup>。此外,自噬也可能对肿瘤细胞的存活有帮助,有研究表明,联合应用化疗药物和自噬抑制剂比单独使用化疗药物更能杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤的发生<sup>[2]</sup>。目前以自噬作为干预靶点一直存在争议,与肿瘤中相似,自噬在CML中的作用也是两方面的。

### 2.1 自噬诱导CML细胞死亡

研究发现,某些药物和基因可以通过调控信号通路,诱导CML细胞发生自噬性细胞死亡。LIU等<sup>[3]</sup>的研究发现,扁蒴藤素(pristimerin)通过产生过量的ROS,进而激活JNK信号通路,诱导细胞自噬,将K562细胞阻滞在G<sub>1</sub>期,抑制细胞增殖,诱导K562细胞发生自噬性死亡。WANG等<sup>[4]</sup>研究发现,一种NF- $\kappa$ B抑制剂甲基巴多索隆(Bardoxolone methyl, CDDO-Me),可以通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路和p38 MAPK/ERK1/2信号通路促进细胞自噬,诱导K562细胞凋亡。GAO等<sup>[5]</sup>研究发现,姜黄素可以通过诱导自噬导致K562细胞凋亡,且与姜黄素的作用时间和剂量有关,加用自噬抑制剂后,其诱导的细胞凋亡减少。也有研究发现,伊马替尼(imatinib mesylate, IM)能抑制BCR-ABL基因,从而抑制PI3K/AKT/FOXO4/ATF5/mTOR通路诱导细胞自噬<sup>[6]</sup>。

在CML中,BCR-ABL基因在细胞自噬调节中的作用一直存在争议。研究表明,经IM体外治疗后的CML细胞株和白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs)均能诱导自噬,提示BCR-ABL是自噬的负调节因子。然而,其他研究表明,高水平BCR-ABL表达的CML细胞株(如K562、KCL22)具有非常活跃的自噬通量,BCR-ABL可以通过激活mTOR信号通路引起自噬<sup>[7]</sup>。由于BCR-ABL阳性细胞表现出比正常细胞更高的ROS水平,他们推测可能是由于氧化应激直接或间接地增强AMPK通路激活自噬。此外,IM也可以通过诱导自噬基因Beclin1及ATG5的上调而诱导自噬的发生<sup>[8]</sup>。

另外, HUANG等<sup>[9]</sup>的研究表明,自噬通过JNK

途径介导p62/SQSTM1(sequestosome 1)的过表达和激活AMPK途径来促进CML细胞发生自噬性细胞死亡和细胞凋亡。携带自噬基因Beclin1的溶瘤病毒感染CML细胞可下调BCR-ABL蛋白的表达,并通过激活细胞自噬显著增加溶瘤病毒对CML细胞的杀伤作用。Beclin1主要通过激活自噬信号通路促进p62/SQSTM1和BCR-ABL共定位到自噬溶酶体降解。他们发现,在CML细胞系、原代细胞和CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>LSCs中,Beclin1的过表达均可以显著抑制细胞生长和增殖,诱导自噬。以上研究结果表明,通过Beclin1过表达诱导的自噬可能为治疗对TKIs耐药的CML和促进LSCs清除提供新的途径(图2)。

### 2.2 自噬促进CML细胞存活

同样地,自噬对CML细胞也有保护作用。自噬可以通过降解大分子蛋白质等方式为CML细胞提供营养,抑制细胞应激反应,使CML细胞得以存活。自噬抑制剂与化疗药物、靶向药物的联合使用或能成为CML治疗的新方向。

YU等<sup>[20]</sup>研究发现,在小鼠慢性髓系白血病模型中,携带ATG5基因的小鼠被敲除Beclin1基因后,其白血病负担减轻,中位生存期显著延长。其原因是活性BCR-ABL直接与Beclin1相互作用并磷酸化其酪氨酸残基233和352,从而抑制自噬的。通过模拟Beclin1蛋白的磷酸化突变体和缺陷株,他们发现,BCR-ABL诱导的Beclin1磷酸化,即正向自噬调节因子uvrag、vps15、ATG14和vps34的结合减弱,负向自噬调节因子Rubicon与BCR-ABL磷酸化Beclin1的结合增强,是Beclin1复合物形成的关键机制。由此可见,BCR-ABL与Beclin1存在相互作用,其作用的主次不同导致的细胞自噬结局也不同。

AHMAN等<sup>[21]</sup>研究发现,Ph染色体阳性细胞中存在较低水平的自噬,抑制自噬后可以将K562细胞周期阻滞并迅速诱导细胞发生凋亡。自噬抑制剂氯喹可以抑制自噬体与溶酶体的融合,当其与IM联合应用时,可以显著提高后者的细胞毒性作用<sup>[22]</sup>。这些结果显示,自噬可能与CML治疗过程中IM的耐药有关。另外,组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, SAHA)能够通过阻断自噬来克服BCR-ABL介导的细胞耐药并促进BCR-ABL阳性白血病细胞的死亡<sup>[23]</sup>。

LIU等<sup>[24]</sup>发现,一种聚ADP-核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂他唑来膦,对

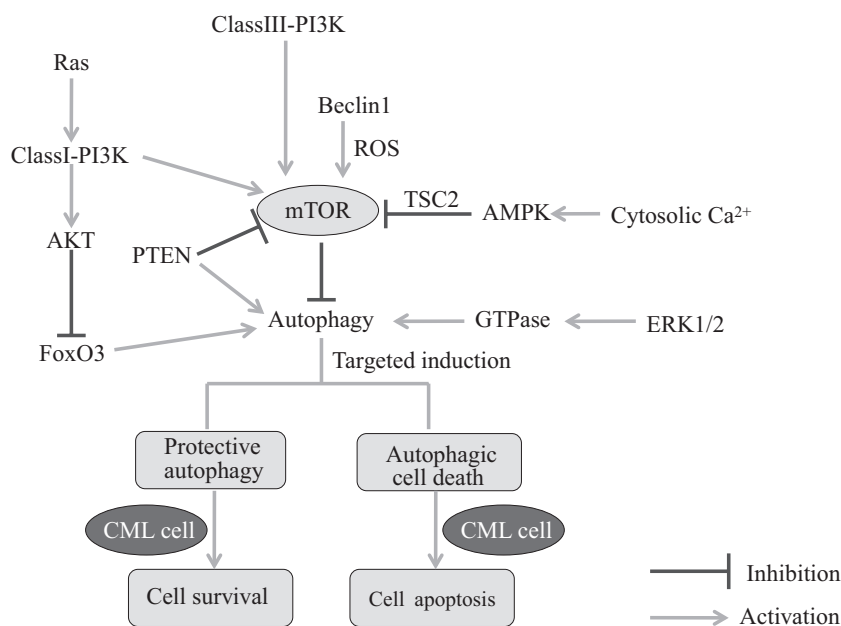


图2 自噬在CML中的双重作用

Fig.2 The dual characteristics of autophagy in CML

儿童CML患者的CML细胞具有浓度依赖性细胞毒性。在他唑来膦作用期间,通过自噬溶酶体的增加、SQSTM1的表达减少及LC3-II的表达增加可以看出,CML细胞中的自噬通路是激活的,抑制自噬可以显著增加他唑来膦在儿童CML细胞中的细胞毒性。以上结果表明,自噬在他唑来膦治疗儿童CML中起到了细胞保护作用,他唑来膦与自噬抑制剂联合治疗具有协同抗肿瘤作用,为儿童CML的治疗提供了新的思路。

### 2.3 自噬与LSCs的关系

LSCs是一群具有自我更新能力,并能产生异质性白血病细胞群体的白血病细胞。以IM为代表的TKIs抑制剂作为治疗CML的一线化疗药物,为CML的治疗带来革命性的突破。然而LSCs对TKIs是不敏感的,且停药之后,这部分保存了自我更新能力的干细胞会产生白血病细胞,使CML由慢性期变为加速期和急变期,是CML复发和耐药的重要原因。

ZHANG等<sup>[25]</sup>通过建立胚胎干细胞衍生的髓系祖细胞模型发现,CSF2/GM-CSF能够抑制自噬,触发巨噬细胞分化和mTOR信号通路的激活。mTOR信号通路通过抑制自噬来调节髓系祖细胞的巨噬细胞分化,激活或抑制mTOR信号能分别增强或减弱巨噬细胞分化。

ROTHER等<sup>[26]</sup>研究表明,在LSCs中自噬调控基因ATG4B的表达水平最高,而且在ATG4家族成员中

ATG5和Beclin1的转录水平和蛋白表达水平显著高于对照组,沉默或者基因敲除ATG4B可明显抑制自噬,减少CML干细胞和祖细胞的存活率,并使其对IM的作用更加敏感,在CD34<sup>+</sup> CML细胞中ATG4B的表达增强与MIR-34a的转录水平降低有关,ATG4B是MIR-34a的直接作用靶点。

ERTMER等<sup>[27]</sup>首先证实,IM可以以剂量依赖的方式诱导K562细胞发生自噬,而对IM耐药的LSCs的增殖分化和对化疗药物的敏感性与自噬密切相关,抑制LSCs的自噬调节通路,可以降低其耐药潜能,完全清除LSCs,有助于提高CML患者的临床疗效。

CARELLA等<sup>[28]</sup>研究表明,克拉霉素通过抑制保护性自噬,增强LSCs对TKIs的化疗敏感性,进一步证明了抑制自噬提高LSCs对TKIs的化疗敏感性是改善CML患者耐药和复发的新策略。

以上研究证明,LSCs自噬通路的激活可促进肿瘤干细胞向成熟细胞分化,提高细胞对化疗药物的敏感性。而抑制LSCs的自噬通路,可提高TKIs对BCR-ABL阳性细胞的化疗敏感性,达到完全清除白血病干细胞的目的。

### 3 小结与展望

综上所述,自噬对CML细胞具有双重作用,TKIs的靶向治疗曾为CML的治疗带来革命性突破,然而随着TKIs的广泛使用,越来越高的耐药率和复

发率也带来了巨大挑战。究其原因,是LSCs对TKIs的耐药性。TKIs激活信号通路诱导自噬,导致大量CML细胞死亡,产生大量破损细胞器、蛋白质等。同时,自噬又是LSCs的关键保护机制,LSCs需要利用保护性自噬来保护自身免受缺氧微环境和化疗药物的影响。

到底是促进自噬有利于提高TKIs疗效,还是抑制自噬有助于克服TKIs耐药及复发,目前争论不一。有研究认为,IM通过自噬降解BCR-ABL癌蛋白,但也有研究认为,IM与自噬抑制剂联合应用可以增强其杀伤白血病细胞的作用,促进CML干细胞向成熟细胞分化,清除CML干细胞<sup>[16,27]</sup>。有研究显示,自噬使CML细胞对哌立福新(perifosine)、干扰素、SAHA等化疗药物产生耐药,却有助于三氧化二砷、姜黄素等药物靶向CML细胞<sup>[29-30]</sup>。因此,自噬在CML细胞中发挥的是保护作用还是杀伤作用,需要与自噬所处的细胞环境、周围的刺激因素和最终降解的靶目标相结合考虑。细胞不同的营养状态和应激条件决定了不同的自噬通路和细胞结局。寻找特异性的自噬调控通路以及合理使用自噬调节剂靶向自噬,将有助于CML患者的治疗。目前,自噬调节剂与传统治疗方法相结合的研究还处在初级阶段,今后的重点可能要放在如何优化两者的组合来靶向清除CML细胞上。总之,自噬的研究有可能成为克服CML耐药及复发的新策略。

### 参考文献 (References)

- [1] ROWLEY J D. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining [J]. *Nature*, 1973, 243(5405): 290-3.
- [2] OTA S, MATSUKAWA T, YAMAMOTO S, et al. Severe adverse events by tyrosine kinase inhibitors decrease survival rates in patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia [J]. *Eur J Haematol*, 2018, 101(1): 95-105.
- [3] MATHIEU P, EL-HOUJEIRI L, PAUSE A. mTOR pathways in cancer and autophagy [J]. *Cancers*, 2018, 10(1): 18-32.
- [4] MOWERS E E, SHARIFI M N, MACLEOD K F. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis [J]. *FEBS J*, 2018, 5(10): 1751-66.
- [5] JUNG C H, JUN C B, RO S H, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1992-03.
- [6] BAQUERO P, DAWSON A, HELGASON G V. Autophagy and mitochondrial metabolism: insights into their role and therapeutic potential in chronic myeloid leukaemia [J]. *FEBS J*, 2019, 286(7): 1271-83.
- [7] KATHEDER N S, KHEZRI R, O'FARRELL F, et al. Microenvironmental autophagy promotes tumour growth [J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 417-20.
- [8] CUERVO A M, WONG E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 92-104.
- [9] CIRONE M, GILARDINI MONTANI M S, GRANATO M, et al. Autophagy manipulation as a strategy for efficient anticancer therapies: possible consequences [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 262-8.
- [10] ZHANG J, WANG G, ZHOU Y, et al. Mechanisms of autophagy and relevant small-molecule compounds for targeted cancer therapy [J]. *Cell Mol Life*, 2018, 75(7): 1-24.
- [11] POILLET-PEREZ L, DESPOUY G, DELAGE-MOURROUX R, et al. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy [J]. *Redox Biol*, 2015, 4(12): 184-92.
- [12] HELGASON G V, KARVELA M, TESSA L, et al. Kill one bird with twostones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML [J]. *Blood*, 2011, 118(8): 2035-43.
- [13] LIU Y, REN Z, LI X, et al. Pristimerin induces autophagy-mediated cell death in K562 cells through the ROS/JNK signaling pathway [J]. *Chem Biodivers*, 2019, doi: 10.1002/cbdv.201900325.
- [14] WANG X Y, ZHANG X H, PENG L, et al. Bardoxolone methyl (CDDO-Me or RTA402) induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Erk1/2 signaling pathways in K562 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(10): 4652-72.
- [15] GAO D, XIAO Z, LI H P. Puerarin leads to K562 cell apoptosis of chronic myelogenous leukemia via induction of autophagy [J]. *J Buon*, 2017, 22(6): 1554-62.
- [16] SHENG Z, MA L, SUN J E, et al. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription [J]. *Blood*, 2011, 118(10): 2840-8.
- [17] RABINOVITCH R C, SAMBORSKA B, FAUBERT B, et al. AMPK maintains cellular metabolic homeostasis through regulation of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(1): 1-9.
- [18] GEYLANI C, HUSEYIN A E, YUSUF B. Imatinib induces autophagy through BECLIN-1 and ATG5 genes in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Hematology*, 2011, 6(2): 95-9.
- [19] HUANG X, LI Y, SHOU L, et al. The molecular mechanisms underlying BCR/ABL degradation in chronic myeloid leukemia cells promoted by Beclin1-mediated autophagy [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 6(11): 5197-08.
- [20] YU C, GORANTLA S P, MULLER R A, et al. Phosphorylation of Beclin-1 by BCR-ABL suppresses autophagy in chronic myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2019, doi: 10.3324/haematol.2018.212027.
- [21] ALTMAN B J, JACOBS S R, MASON E F, et al. Autophagy is essential to suppress cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis [J]. *Oncogene*, 2011, 30(16): 1855-67.
- [22] MISHIMA Y, TERUI Y, MISHIMA Y, et al. Autophagy and Autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(11): 2200-8.
- [23] CAREW J S, NAWROCKI S T, KAHUE C N, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome BCR/ABL mediated drug resistance [J]. *Blood*, 2007, 110(1): 313-22.

- [24] LIU Y, SONG H, FENG X, et al. Targeting autophagy potentiates the anti-tumor effect of PARP inhibitor in pediatric chronic myeloid leukemia [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 108-16.
- [25] ZHANG M, LIU F, ZHOU P, et al. The MTOR signaling pathway regulates macrophage differentiation from mouse myeloid progenitors by inhibiting autophagy [J]. *Autophagy*, 2019, 15(7): 1150-62.
- [26] ROTHE K, LIN H, LIN K B, et al. The core autophagy protein ATG4B is a potential biomarker and therapeutic target in CML stem/progenitor cells [J]. *Blood*, 2014, 123( 23): 3622-34.
- [27] ERTMER A, HUBER V, GILCH S, et al. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy [J]. *Leukemia*, 2007, 21(5): 936-42.
- [28] CARELLA A M, BELTRAMI G, CATANIA G, et al. Inhibition of autophagy with clarithromycin: a new strategy to enhance sensitivity of CML stem cells to tyrosine kinase inhibitors [J]. *Leuk Suppl*, 2012, 1(Suppl 2): S49-50.
- [29] SHAN Z, LI Z C, YAN Y, et al. Inhibiting autophagy potentiates the anticancer activity of IFN1@/IFN $\alpha$  in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 317-27.
- [30] GOUSSETIS D J, GOUNARIS E, PLATANIASI L C. BCR-ABL-induced leukemogenesis and autophagic telrgeting by arsenic trioxide [J]. *Autophagy*, 2013, 9(1): 93-4.