

# 过表达TRAF6对人急性髓系白血病细胞自噬活性的影响

唐雨婷 陶瑶 汪路 杨丽媛 雷力 敬一佩 蒋雪珂 金红君 张伶\*  
(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该文旨在探讨过表达肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)对人急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞自噬活性的影响。利用基因表达数据库GEO分析TRAF6在AML患者白血病细胞中的mRNA表达水平。通过癌症基因组图谱TCGA分析TRAF6表达与AML患者临床预后的关系。将TRAF6重组质粒载体转染人AML细胞系(KG-1a和THP-1), 采用自噬激活剂雷帕霉素(Rapamycin)和自噬相关抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、巴弗洛霉素A1(bafilomycin A1, Baf-A1)分别处理AML细胞。荧光定量PCR、蛋白免疫印迹技术检测过表达TRAF6后白血病细胞自噬标志物(LC3和p62) mRNA和蛋白水平; 免疫荧光方法检测LC3绿色荧光斑点结构(puncta); 流式细胞术检测细胞凋亡率; CCK-8实验检测AML细胞的体外增殖能力。结果显示, AML患者白血病细胞高表达TRAF6 ( $P<0.01$ ); TRAF6高表达的白血病患者总体生存率和无事件生存率均较TRAF6低表达组显著降低( $P=0.01$ )。TRAF6重组质粒转染能够显著增加两株AML细胞系中TRAF6的mRNA和蛋白水平( $P<0.05$ )。Rapamycin处理能够激活AML细胞系自噬水平, 过表达TRAF6后AML细胞LC3 mRNA和LC3II蛋白水平表达上调( $P<0.05$ )、p62 mRNA和蛋白水平下调( $P<0.05$ )以及LC3 puncta聚集增多。用Baf-A1处理以阻断过表达TRAF6的白血病细胞系中的自噬流后, LC3II蛋白表达水平显著提高( $P<0.05$ )。3-MA处理过表达TRAF6的白血病细胞后, LC3II蛋白表达减少、p62蛋白表达增加( $P<0.05$ )。此外, 过表达TRAF6降低白血病细胞凋亡率和促进细胞的体外增殖( $P<0.001$ ), 而过表达TRAF6后联合3-MA处理则可逆转TRAF6对白血病细胞的抗凋亡和促增殖作用( $P<0.001$ )。以上研究结果提示, 过表达TRAF6能够增强AML细胞的自噬活性, 促进AML细胞的生长。

**关键词** 肿瘤坏死因子受体相关因子6; 急性髓系白血病; 自噬; 凋亡; 增殖

## Effects of TRAF6 Over-Expression on Autophagic Activity of Human Acute Myeloid Leukemia Cells

TANG Yuting, TAO Yao, WANG Lu, YANG Liyuan, LEI Li, JING Yipei,  
JIANG Xueke, JIN Hongjun, ZHANG Ling\*

(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

收稿日期: 2019-06-04 接受日期: 2019-10-09

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81873973)和重庆市渝中区科委基础与前沿研究项目(批准号: 20170411)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

Received: June 4, 2019 Accepted: October 9, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81873973) and Program of the Ministry of Science and Technology of Yuzhong District, Chongqing (Grant No.20170411)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5150>

**Abstract** This work was to investigate the effects of TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) overexpression on autophagic activity of human AML (acute myeloid leukemia) cells. The expression levels of *TRAF6* mRNA in AML patients derived from GEO (gene expression omnibus) database were analyzed. The relationship between the expression of *TRAF6* and the clinical prognosis of AML patients were explored based on TCGA (The Cancer Genome Atlas) database. The TRAF6 recombination plasmids were transfected into two human acute myeloid leukemia cell lines (KG-1a and THP-1). Autophagy activator (Rapamycin) and two different autophagy inhibitors, 3-MA (3-methyladenine) and Baf-A1 (bafilomycin A1) were used to treat the leukemic cells. The effects of TRAF6 overexpression on the mRNA and protein levels of autophagic markers LC3 and p62 in leukemic cells were determined by qRT-PCR and Western blot techniques, respectively. The LC3 puncta was determined by immunofluorescence. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The cell proliferation activity *in vitro* was evaluated by CCK-8 assay. The results showed that the expression levels of *TRAF6* mRNA in AML patients were higher than those observed in normal controls ( $P<0.01$ ). Additionally, high expression of TRAF6 showed a trend towards lower OS (overall survival) and EFS (event-free survival) ( $P=0.01$ ) in AML patients, than that in low expression of TRAF6 group. The expression levels of TRAF6 mRNA and protein were significantly increased in TRAF6 overexpression group compared with those in the control group ( $P<0.05$ ). Rapamycin treatment enhanced the autophagic activity of leukemic cells. Importantly, TRAF6 overexpression significantly upregulated LC3 mRNA and LC3II protein levels ( $P<0.05$ ), downregulated p62 mRNA and protein levels and increased the accumulation of LC3 puncta in leukemic cells ( $P<0.05$ ). Notably, Baf-A1 treatment significantly increased LC3II protein levels in TRAF6-enforced cells ( $P<0.05$ ). Exposure to 3-MA significantly downregulated LC3II protein levels and upregulated p62 protein levels in TRAF6-enforced expression cells ( $P<0.05$ ). Finally, the apoptosis rate was significantly decreased and the cell proliferation was significantly enhanced in TRAF6-enforced group ( $P<0.001$ ), while the treatment of 3-MA attenuated the ability of TRAF6 overexpression mediated growth advantage ( $P<0.001$ ). Above-mentioned results suggest that TRAF6 high expression enhances the autophagic activity and promotes leukemic cell growth.

**Keywords** tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; acute myeloid leukemia; autophagy; apoptosis; proliferation

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一类造血干细胞克隆增殖性的恶性血液疾病,以髓系白血病细胞异常增生及正常造血细胞受抑制为主要表现,呈高度异质性,是成人最常见的急性白血病类型。在过去的几十年里,尽管随着联合化疗和造血干细胞移植技术的发展,部分患者可获得长期生存,但是仍有部分患者最终会出现耐药、复发<sup>[1]</sup>。人们对AML的生物学及其基因表达谱认识的不断深入,将大大推动白血病个体化治疗的进程<sup>[2]</sup>。因此,深入研究AML的发病机制并寻找新的治疗靶点具有重要意义。

细胞自噬(autophagy)是将细胞内受损、变性或衰老的蛋白质以及细胞器运输到溶酶体进行消化降解的过程<sup>[3]</sup>。自噬作为溶酶体降解途径之一,在维持真核生物细胞结构、代谢和功能平衡中发挥着至关

重要的作用<sup>[4]</sup>。过去几十年,大量的研究报道了自噬活性失调与肿瘤、自身免疫、炎症、代谢和神经退行性疾病关系密切<sup>[5-8]</sup>。近年来,人们发现自噬活性异常在白血病的发生、发展过程中可能发挥重要作用。目前认为,自噬对于白血病的作用是具有两面性的。有文献报道,自噬受损可促使正常造血干细胞向白血病干细胞恶性转化<sup>[9]</sup>;然而,自噬激活可促进白血病细胞对标准化疗药物的治疗抵抗,自噬作为一种促存活机制发挥作用,靶向自噬提高化疗敏感性正成为临床上白血病治疗的一种新策略<sup>[10-11]</sup>。本课题组在前期研究发现,NPM1突变型白血病细胞具有较高的自噬水平,利用自噬抑制剂或激活剂改变自噬活性可影响白血病细胞的体外存活<sup>[12]</sup>。尽管目前的研究显示了自噬在白血病发生和化疗药物耐药中的重要作用,然而,AML细胞中自噬调控的分子

机制尚未完全阐明。

肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)是TRAFs家族的一员,作为炎症因子TNF、Toll样及IL-1等多种受体超家族的接头蛋白,参与细胞内多条信号通路的传导,在细胞免疫、发育、稳态和癌症中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。最新研究发现,TRAF6介导巨噬细胞中Beclin1的多聚泛素化修饰,导致Bcl-2不能与泛素化的Beclin1相互结合,释放出Beclin1参与三型磷脂酰肌醇激酶复合物的形成,从而启动细胞的自噬激活过程<sup>[15]</sup>。然而,目前关于TRAF6在白血病自噬活性的作用尚不明确。本研究以人急性髓系白血病细胞系(KG-1a和THP-1)为实验对象,观察过表达TRAF6对白血病细胞自噬活性的影响,以及TRAF6介导的自噬对白血病细胞体外生长的影响,为深入探讨白血病细胞自噬调控的分子机制和靶向自噬协助白血病治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人急性髓系白血病细胞株KG-1a和THP-1购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源库,由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室常规保存。

### 1.2 实验试剂及仪器

胎牛血清和RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司。Rapamycin、3-MA(3-Methyladenine)和Baf-A1(Bafilomycin A1)购自美国Selleck公司。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司(用于配制Rapamycin和Baf A1)。RNA提取试剂TRIzol、RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。SYBR快速荧光定量PCR试剂盒购自KAPA Biosystems公司。蛋白裂解液RIPA、BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。ECL发光试剂盒及PVDF膜购自美国Millipore公司。兔抗人TRAF6、p62单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。兔抗人LC3 I/II多克隆抗体购自美国Novus公司。兔抗人 $\beta$ -actin多克隆抗体购自美国Proteintech公司。山羊抗兔IgG二抗和山羊抗兔IgG/FITC标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Neofect™ DNA转染试剂购自北京联立信生物技术公司。CCK-8试剂盒购自日本

Dojindo公司。4%多聚甲醛固定液、封闭用正常山羊血清和DAPI染色液购自武汉博士德生物工程有限公司。Triton X-100购自上海索莱宝生物科技有限公司。

仪器包括: CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司)、超净工作台(中国苏净安泰公司)、qRT-PCR仪(美国BIO-RAD公司)、DYY-III 稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)、半干转膜仪(美国BIO-RAD公司)、凝胶成像分析仪(美国BIO-RAD公司)、荧光显微镜(日本Nikon公司)、流式细胞仪(美国BECKMAN-COULTER公司)、酶标仪(美国Biotek公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养** 细胞用含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液(100 U/mL)的RPMI 1640普通培养液置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。平均1~2天传代,以保持细胞对数生长。每次实验使用对数生长期的细胞。

**1.3.2 分析GEO数据库中白血病患者TRAF6基因表达** 从GEO(Gene Expression Omnibus)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载基因表达谱芯片数据集GSE13159,基于该数据集中542例急性髓系白血病和74例正常人群的基因表达数据,分析TRAF6基因mRNA表达水平。

**1.3.3 分析TCGA数据库中不同TRAF6表达水平白血病患者的预后情况** 从TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库(<http://www.cancergenome.nih.gov>)中收集155例AML患者TRAF6的基因表达水平和临床生存信息,根据TRAF6表达的中位数将患者分为高表达组(77例)和低表达组(78例),采用Kaplan-Meier方法分析AML患者的总体生存率(overall survival, OS)和无事件生存率(event free survival, EFS),以得到相应的Kaplan-Meier生存曲线、风险比(hazard ratio, HR)和P值。

**1.3.4 细胞转染** 以每孔 $1 \times 10^6$ 个KG-1a或THP-1细胞接种于6孔板,采用Neofect™ DNA转染试剂将pRK5-Flag-TRAF6质粒和相应空载转染白血病细胞,转染操作按说明书进行。转染24~48 h后,收集细胞用于后续实验。

**1.3.5 自噬激活剂或抑制剂处理白血病细胞** 以每孔 $1 \times 10^6$ 个KG-1a或THP-1细胞接种于6孔板,分别用Rapamycin(终浓度为5  $\mu$ mol/L)、3-MA(终浓度为2 mmol/L)或者Baf A1(终浓度为100 nmol/L)处理细

胞, 继续培养2.5 h后收集细胞用于后续检测细胞自噬活性、自噬流、增殖能力和凋亡率的改变。同时设立不加入药物的DMSO处理组和RPMI 1640组作为对照。

**1.3.6 qRT-PCR检测mRNA表达水平** 收集各组细胞, 经TRIzol试剂抽提总RNA, 检测浓度和纯度后采用逆转录试剂盒逆转录成cDNA。以 $\beta$ -actin为内参, qRT-PCR扩增各组细胞中靶基因的表达, 用于qRT-PCR反应的引物见表1。扩增反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 循环39次; 72 °C 10 min。相对定量值结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

**1.3.7 Western blot检测蛋白表达水平** 收集各组细胞, 以800 r/min离心5 min, 细胞经PBS洗涤3次, 弃上清, 加入RIPA裂解液以充分裂解细胞, 提取总蛋白质, BCA法检测蛋白质浓度。取50  $\mu$ g变性煮沸的蛋白质样品上样, 经10% SDS-PAGE凝胶电泳分离后, 通过湿转仪将蛋白质转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭3 h, 分别加入一定稀释比例的抗TRAF6、LC3、p62和 $\beta$ -actin抗体, 4 °C孵育过夜, 次日用TBST洗膜2次, TBS洗膜1次, 每次10 min, 接着加入相应的二抗室温孵育1 h, 重复上述洗膜步骤。最后用ECL化学发光试剂凝胶成像显影。设 $\beta$ -actin为内参, Western blot条带用Quantity One软件进行统计分析。

**1.3.8 免疫荧光检测LC3 puncta** 实验分为2组: 空载转染组、TRAF6转染组。收集各组细胞于离心管中, 500 r/min离心5 min, 弃上清。加入适量的PBS重悬细胞沉淀后, 转至EP管中, 1 000 r/min离心2 min, 重复洗涤2次。加入适量的PBS重悬细胞沉淀, 将细胞悬液均匀滴加在内置于6孔板中的盖玻片上。室温下干燥后, 4%多聚甲醛固定细胞20 min, 然后采用0.1% Triton X-100透膜处理20 min, 利用10%山羊

血清37 °C封闭30 min后, 加入兔抗人LC3 I/II一抗(1:200)于4 °C孵育过夜。加入山羊抗兔IgG/FITC标记二抗(1:100)于37 °C避光孵育1 h, 最后加入DAPI染液避光染核, 封片后于荧光显微镜下观察LC3绿色荧光斑点(puncta)的聚集。

**1.3.9 CCK-8检测细胞增殖** 实验分为3组: 空载转染组、TRAF6转染组、TRAF6转染联合3-MA处理组。以每孔2 000个细胞数接种于96孔板中, 每组设5个复孔, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>温箱中孵育, 培养第0、12 h、24 h、36 h和48 h时每孔加入10  $\mu$ L CCK-8试剂后继续培养3 h, 于450 nm波长下使用酶标仪测定对应孔的吸光度(*D*)值。以 $D_{450}$ 值为纵坐标、培养时间为横坐标来绘制生长曲线图。

**1.3.10 流式细胞术检测细胞凋亡率** 实验分为3组: 空载转染组、TRAF6转染组、TRAF6转染联合3-MA处理组。收集各组细胞, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS洗涤3次。用500  $\mu$ L PBS重悬细胞, 在细胞悬液中加入Annexin V-FITC/PI双标记染液, 然后按细胞凋亡试剂盒说明书操作, 最后利用流式细胞仪检测细胞凋亡率。Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>表示早期凋亡细胞, Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>表示晚期凋亡细胞, Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>表示活细胞, Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>表示坏死细胞。用早期和晚期凋亡细胞计算细胞凋亡率。

**1.3.11 统计学分析** 所有数据来自3次独立的实验。采用SPSS 22.0软件进行统计处理。Kaplan-Meier生存数据使用长秩序检验分析。定量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两样本均数比较采用 $t$ 检验, CCK-8实验结果采用两因素重复方差分析(Two-Way Repeated Measures ANOVA)。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

| 基因<br>Genes    | 序列(5'→3')<br>Primer sequences (5'→3')                                          |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| TRAF6          | Forward: TCC ACA CAA TGC AAG GAG AA<br>Reverse: GGG CTT CCA GAT GCA TAA AA     |
| LC3            | Forward: GAC CGC TGT AAG GAG GTG C<br>Reverse: CTT GAC CAA CTC GCT CAT GTT A   |
| p62            | Forward: GGG GAC TTG GTT GCC TTT T<br>Reverse: CAG CCA TCG CAG ATC ACA TT      |
| $\beta$ -actin | Forward: TAG TTG CGT TAC ACC CTT TCT TG<br>Reverse: TGC TGT CAC CTT CAC CGT TC |

## 2 结果

### 2.1 AML患者TRAF6的表达水平

为了观察临床急性髓系白血病AML大样本中TRAF6的表达水平, 利用GEO数据库中数据集GSE13159的RNA-seq基因表达数据, 分析AML患者细胞中*TRAF6*的mRNA表达水平, 结果显示, AML组( $n=542$ )的*TRAF6* mRNA表达水平较正常对照组( $n=74$ )明显升高, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ )(图1), 提示AML患者白血病细胞高表达TRAF6。

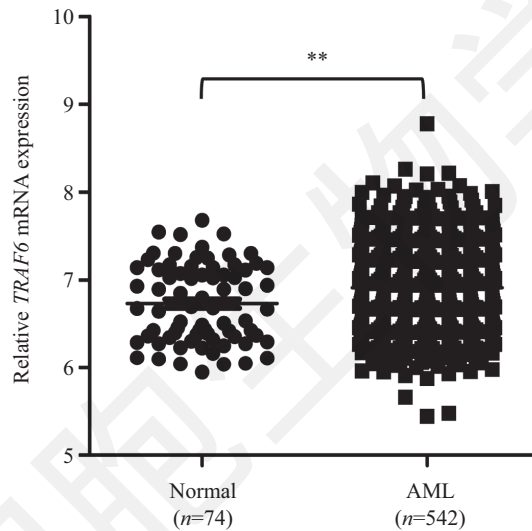
### 2.2 TRAF6表达水平对AML患者预后的影响

为探究TRAF6表达水平对临床AML患者预后的影响, 利用TCGA数据库对AML患者进行基于

*TRAF6*表达差异的Kaplan-Meier生存分析。结果显示, 与TRAF6低表达组患者相比, TRAF6高表达组患者的OS显著降低( $HR=1.7$ ,  $P=0.01$ )(图2A)。此外, TRAF6高表达组患者的EFS也显著降低( $HR=1.9$ ,  $P=0.01$ )(图2B)。以上结果表明, TRAF6高表达可能预示着AML患者的不良预后。

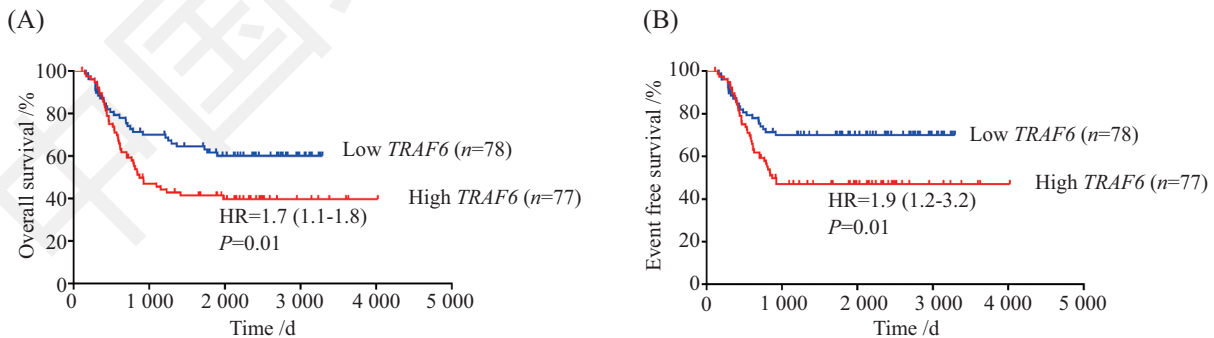
### 2.3 AML细胞系中过表达TRAF6

基于TRAF6与AML发生发展可能存在一定相关性, 在体外实验中, 将TRAF6重组质粒载体转染两种人急性髓系白血病KG-1a和THP-1细胞系。qRT-PCR检测结果显示, 与空载转染组相比, 过表达TRAF6组的KG-1a细胞中*TRAF6* mRNA相对水平显



\*\* $P<0.01$ .

图1 AML患者临床样本中*TRAF6*的表达水平  
Fig.1 The expression of *TRAF6* in clinical AML samples



A: Kaplan-Meier法分析*TRAF6*表达差异的AML患者总体生存率; B: Kaplan-Meier法分析*TRAF6*表达差异的AML患者无事件生存率;  $P=0.01$ , 与low TRAF6组比较。

A: the overall survival rates of AML patients were calculated by the Kaplan-Meier method according to *TRAF6* levels; B: the event-free survival rates of AML patients were calculated by the Kaplan-Meier method according to *TRAF6* levels;  $P=0.01$  compared with the low TRAF6 group.

图2 *TRAF6*表达水平对AML患者预后的影响

Fig.2 Impact of *TRAF6* expression levels on the prognosis of AML patients

著升高( $P<0.001$ )(图3A)。Western blot结果显示, 过表达TRAF6组中TRAF6蛋白条带灰度较空载转染组明显增强(图3B), 其蛋白相对表达水平显著性升高( $P<0.05$ )(图3C)。同样, 在THP-1细胞中, 过表达TRAF6组细胞TRAF6的mRNA和蛋白表达水平均也显著高于空载转染组(图3D~图3F)。以上结果表明, 在AML细胞系中成功过表达TRAF6。

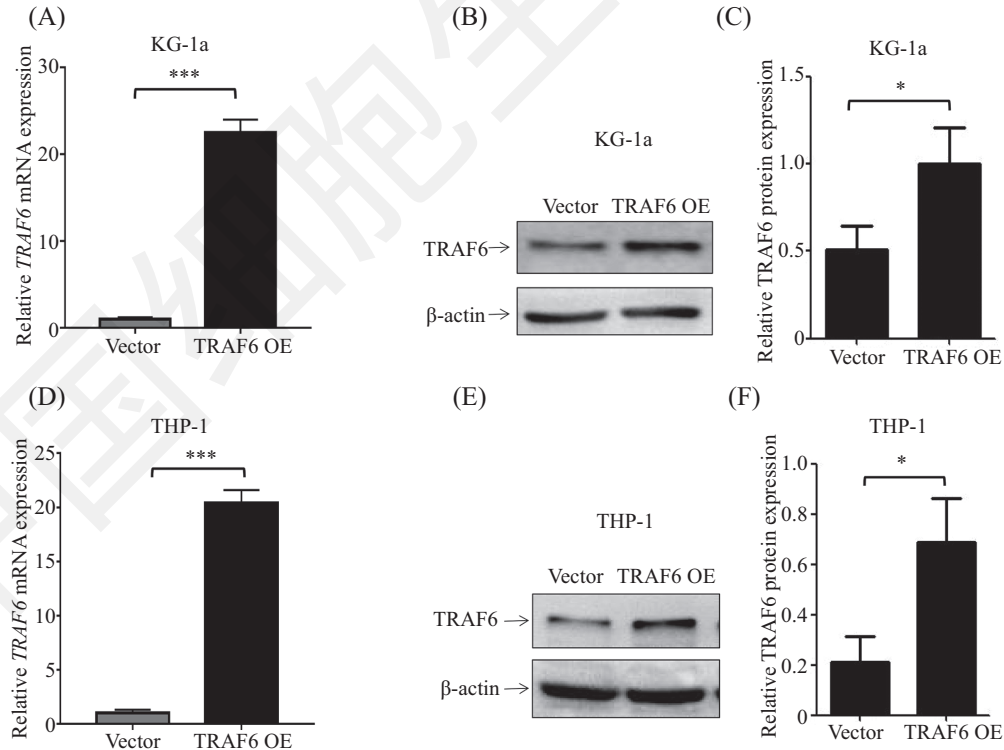
#### 2.4 过表达TRAF6对AML细胞自噬活性的影响

为了观察TRAF6对AML细胞自噬活性的影响, 首先, 利用自噬激活剂Rapamycin处理白血病细胞株, 观察细胞自噬标志物LC3和p62表达水平的改变。结果显示, 两株白血病细胞中LC3 mRNA和LC3II蛋白表达量显著上升( $P<0.01$ )、p62 mRNA和蛋白表达量显著降低( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ) (图4A~图4D)。接下来, 观察过表达TRAF6后两株细胞LC3、p62表达水平和LC3 puncta的改变。在KG-1a细胞中, 与空载转染组相比, 过表达TRAF6组LC3 mRNA水平显著性升高( $P<0.001$ ), p62 mRNA水平显著性降低( $P<0.05$ )(图4E)。Western blot结果显示, 过表达

TRAF6组LC3II蛋白表达显著增强( $P<0.05$ )、p62蛋白表达减弱( $P<0.05$ )(图4F)。此外, 免疫荧光检测结果显示, 过表达TRAF6组LC3绿色荧光斑点(puncta)聚集增多(图4I)。同样地, 在THP-1细胞中, 过表达TRAF6处理细胞后LC3 mRNA和LC3II蛋白水平、p62 mRNA和蛋白水平以及LC3 puncta聚集增多的改变与在KG-1a细胞中观察到的结果一致(图4G~图4H, 图4J)。以上结果表明, TRAF6过表达促进了AML细胞自噬活性。

#### 2.5 过表达TRAF6对AML细胞自噬流的影响

为了进一步探讨过表达TRAF6对AML细胞自噬流的影响, 采用自噬晚期抑制剂Baf-A1处理AML细胞, 检测LC3II蛋白表达情况以观察对AML细胞自噬流的影响。结果发现, Baf-A1处理KG-1a细胞后, LC3II蛋白表达量较未处理组显著上调( $P<0.05$ ), 同时, TRAF6转染联合Baf-A1处理KG-1a后, LC3II蛋白水平较单独Baf-A1处理组显著升高( $P<0.05$ )(图5A和图5B)。同样地, 在THP-1细胞中, TRAF6转染联合Baf-A1处理能够显著上调LC3II蛋白的表达水平

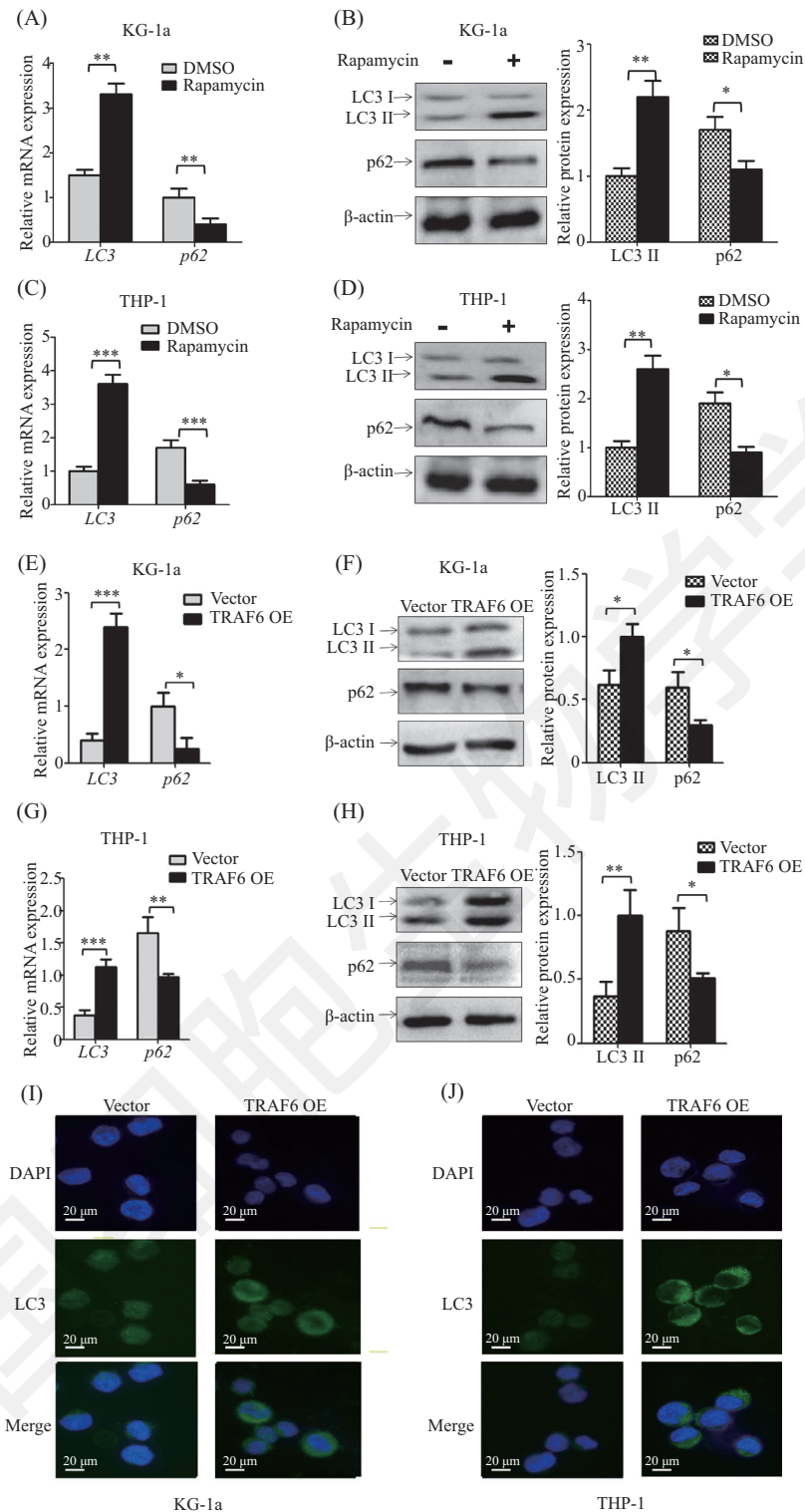


A、D: qRT-PCR检测TRAF6 mRNA表达; B、C、E、F: Western blot检测TRAF6蛋白表达及其半定量分析结果; \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

A,D: qRT-PCR was performed to analyze TRAF6 mRNA levels, normalized to  $\beta$ -actin. B,C,E,F: Western blot was performed to measure TRAF6 protein level and the relative protein expression, normalized to  $\beta$ -actin; \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图3 过表达TRAF6对白血病细胞TRAF6 mRNA和蛋白表达水平的影响

Fig.3 Effects of TRAF6 overexpression on the levels of TRAF6 mRNA and protein in leukemic cells



A, C: qRT-PCR检测Rapamycin处理(5  $\mu$ mol/L)后细胞*LC3*和*p62*的mRNA水平; B, D: Western blot检测Rapamycin处理后细胞LC3II和p62的蛋白水平; E, G: qRT-PCR检测过表达TRAF6后细胞*LC3*和*p62*的mRNA水平; F, H: Western blot检测过表达TRAF6后细胞LC3II和p62的蛋白水平; I, J: 免疫荧光检测过表达TRAF6后细胞内LC3 puncta的聚集。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。

A, C: qRT-PCR was performed to measure *LC3*, *p62* mRNA levels of AML cells treated with Rapamycin, normalized to  $\beta$ -actin; B, D: Western blot was performed to analyze LC3II, p62 protein levels in AML cells treated with Rapamycin, normalized to  $\beta$ -actin; E, G: qRT-PCR was performed to measure *LC3*, *p62* mRNA levels in TRAF6-enforced group, normalized to  $\beta$ -actin; F, H: Western blot was performed to analyze LC3II, p62 protein levels in TRAF6-enforced group, normalized to  $\beta$ -actin; I, J: immunofluorescence was performed to determine LC3 puncta in the AML cell lines. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

图4 过表达TRAF6对AML细胞自噬活性的影响

Fig.4 Effects of TRAF6 overexpression on autophagic activity in AML cells

(图5C和图5D)。这提示, TRAF6可能参与调控AML细胞自噬流的活化。

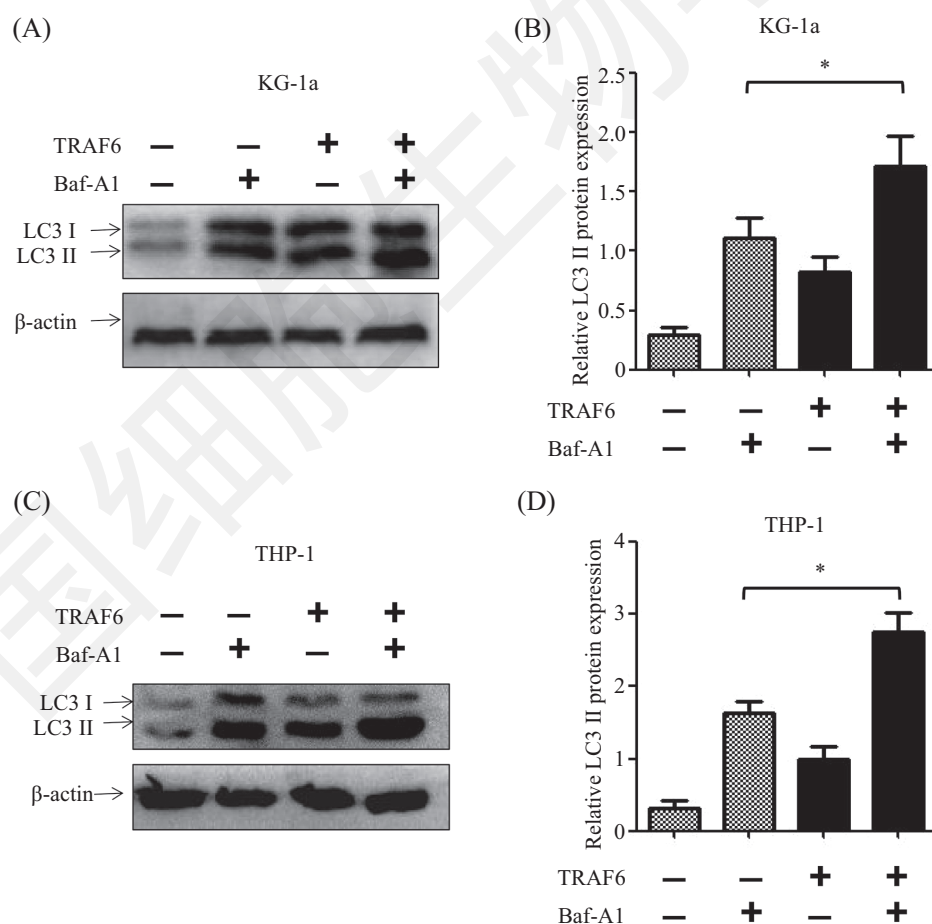
## 2.6 自噬抑制剂3-MA处理对TRAF6介导的AML细胞自噬的影响

为进一步明确TRAF6在AML细胞自噬调控中的作用, 采用自噬抑制剂3-MA处理过表达TRAF6后的白血病细胞, 观察自噬标志物的改变。3-MA是一种自噬早期抑制剂, 在自噬囊泡成核阶段发挥抑制作用, 从而阻断自噬体的形成。3-MA处理过表达TRAF6组KG-1a细胞后, LC3II蛋白表达量较未处理的过表达TRAF6组显著下调( $P<0.05$ ), p62蛋白表达显著上调( $P<0.05$ ) (图6A和图6B)。同样地, 3-MA处理THP-1细胞后, LC3II和p62蛋白表达水平的改变与在KG-1a细胞中观察到的结果一致(图6C和图6D)。上述结果进一步提示了TRAF6可能发挥了促

进AML细胞自噬的调控作用。

## 2.7 TRAF6介导的自噬活性对AML细胞生长的影响

为进一步探讨TRAF6介导的自噬在AML细胞生长中的作用, 采用3-MA处理AML细胞以观察细胞凋亡率和体外增殖能力的改变。流式细胞术检测结果显示和CCK-8检测结果表明, 与空载组比较, 过表达TRAF6的KG-1a细胞凋亡率显著降低( $P<0.001$ )(图7A), 细胞体外增殖能力明显增强( $F=136.9$ ,  $P<0.001$ )(图7C)。而加入自噬抑制剂3-MA处理则能够减弱TRAF6的抗白血病细胞凋亡( $P<0.001$ )和促白血病细胞增殖( $F=39.16$ ,  $P<0.001$ )(图7A和图7C)。同样地, 在THP-1细胞中能够观察到过表达TRAF6对AML细胞的抗凋亡和促增殖作用以及3-MA的逆转作用( $P<0.001$ )(图7B和图7D)。以上结果提示, TRAF6介

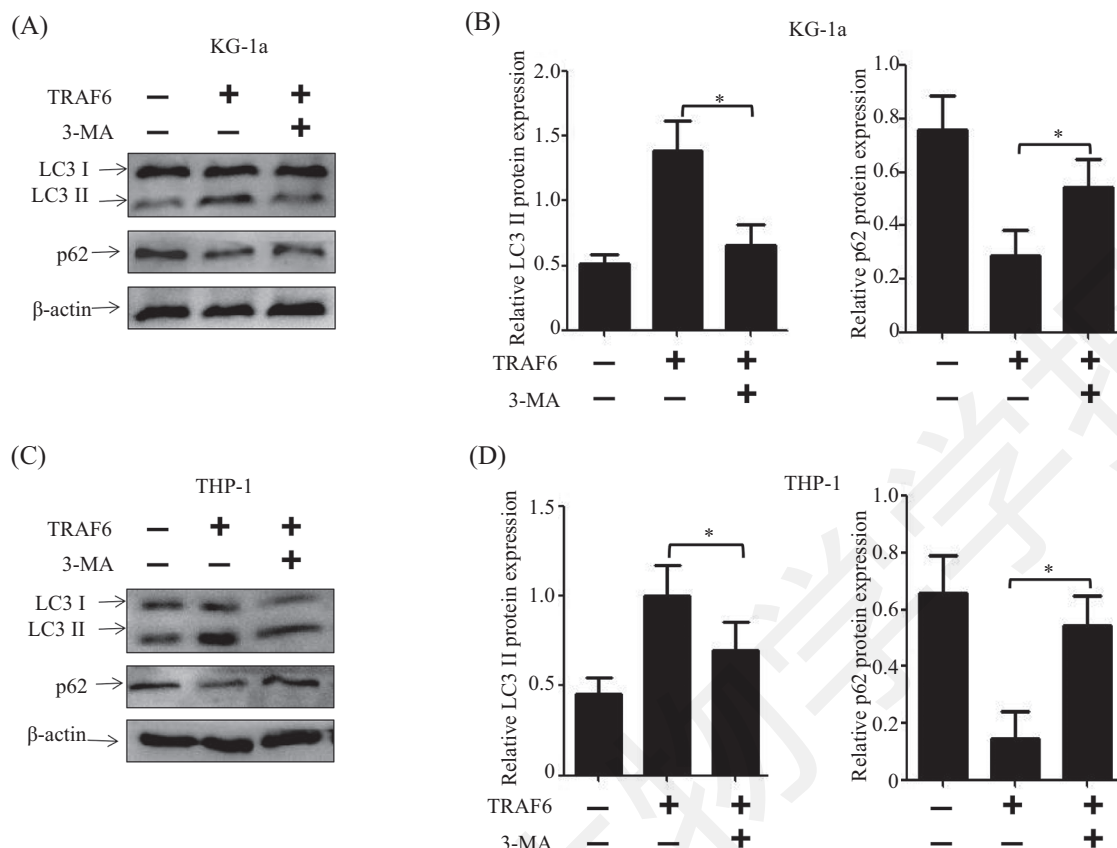


A、C: Western blot检测Baf-A1(100 nmol/L)处理后AML细胞LC3II蛋白水平; B、D: Baf-A1处理后过表达AML细胞LC3II蛋白水平的半定量分析结果; \* $P<0.05$ , 与过表达TRAF6组比较。

A,C: Western blot was performed to analyze LC3II protein levels of AML cells treated with Baf-A1 (100 nmol/L), normalized to β-actin; B,D: the relative protein expression of LC3II protein levels in AML cells treated with Baf-A1, normalized to β-actin; \* $P<0.05$ , compared with the TRAF6 OE group.

图5 过表达TRAF6对AML细胞自噬流的影响

Fig.5 Effects of TRAF6 overexpression on autophagic flux in AML cells



A、C: Western blot检测3-MA(2 mmol/L)处理后AML细胞LC3II和p62的蛋白水平及其半定量分析结果; B、D: 3-MA处理后过表达AML细胞LC3II和p62蛋白水平的半定量分析结果; \* $P < 0.05$ , 与过表达TRAF6组比较。

A、C: Western blot was performed to analyze LC3II, p62 protein levels of AML cells treated with 3-MA (2 mmol/L), normalized to  $\beta$ -actin; B、D: the relative protein expression of LC3II, p62 protein levels in AML cells treated with 3-MA, normalized to  $\beta$ -actin; \* $P < 0.05$  compared with the TRAF6 OE group.

图6 自噬抑制剂3-MA处理对TRAF6介导的AML细胞自噬的影响

Fig.6 Effects of autophagy inhibitor 3-MA treatment on TRAF6 mediated autophagy in AML cells

导的自噬活性可能促进AML细胞的生长。

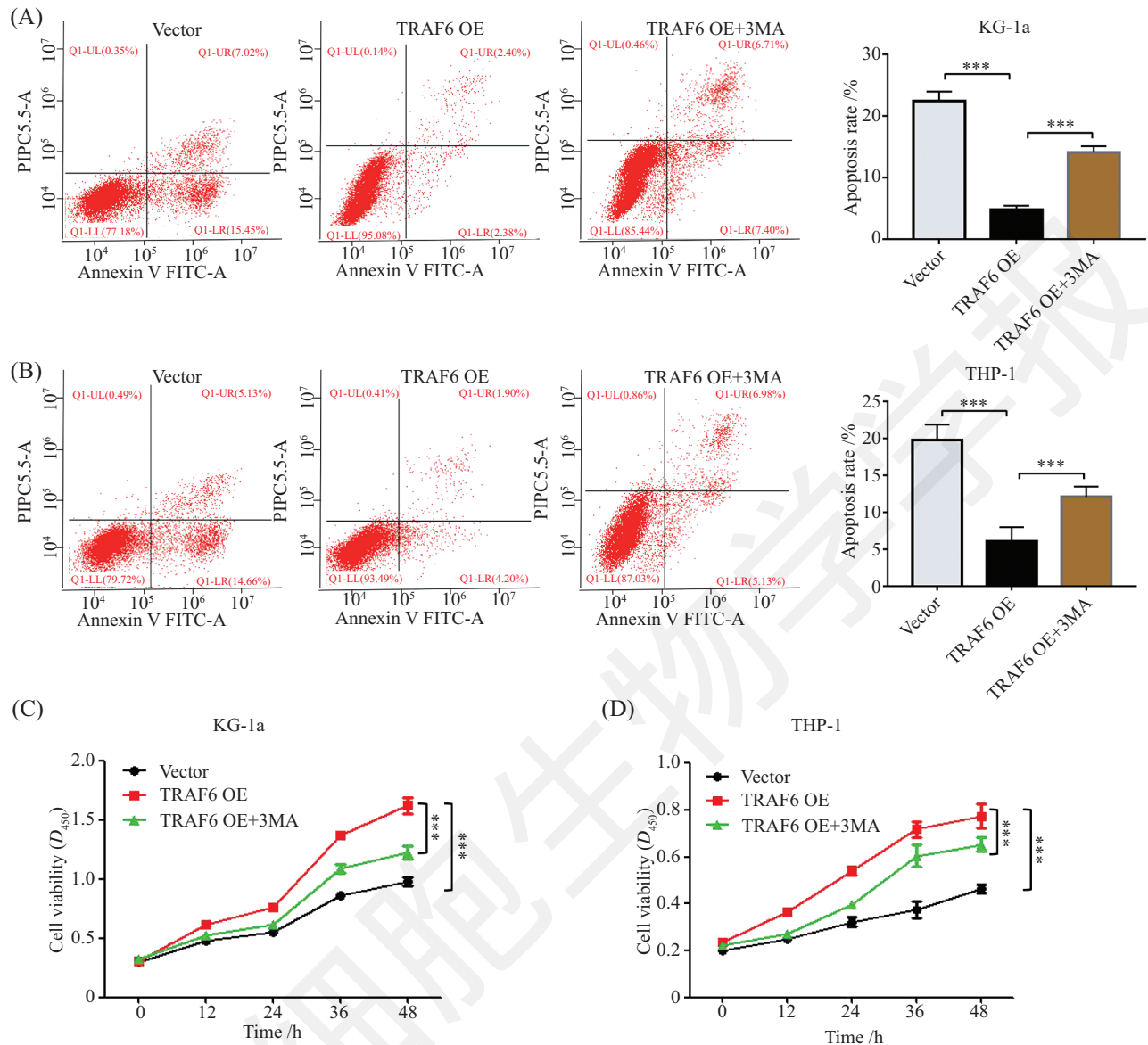
### 3 讨论

TRAF6是肿瘤坏死因子受体相关因子家族重要的成员, 是一种重要的细胞内多功能信号分子, 广泛参与免疫过程、炎症反应和凋亡效应<sup>[16-17]</sup>。最近有文献报道了TRAF6作为一种泛素连接酶E3能够泛素化修饰ULK1和Beclin1等自噬关键分子<sup>[15]</sup>, 然而, TRAF6在白血病自噬调控中的作用尚未阐明, 因此本文主要探讨过表达TRAF6对人急性髓系白血病细胞自噬活性的影响。

首先, 利用GEO数据库分析临床AML患者TRAF6的mRNA水平, 发现AML患者TRAF6表达较正常对照组明显升高。FANG等<sup>[18]</sup>在骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)患者中也发现, 低危MDS患者CD34<sup>+</sup>骨髓细胞的

TRAF6 mRNA水平较健康对照组显著增高。其次, 为了观察TRAF6表达水平与临床白血病患者预后的关系, 通过Kaplan-Meier生存分析不同TRAF6表达水平白血病患者生存时间, 结果显示, TRAF6高表达白血病患者组的总体生存率和无事件生存率均显著低于TRAF6低表达组。最近, 来自口腔鳞状细胞癌的研究报告显示, 与TRAF6表达阴性的高分化组患者比较, TRAF6表达阳性的中、低分化组患者的生存情况更差<sup>[19]</sup>。本实验结果结合以往的研究报道提示, TRAF6可能在急性髓系白血病发生发展中发挥重要作用。

为了探讨TRAF6对AML细胞自噬活性的影响, 首先, 我们观察自噬激活剂Rapamycin对白血病细胞自噬水平的影响, 证实了Rapamycin处理能够增强KG-1a和THP-1细胞株的自噬水平。接下来, 利用外源性TRAF6表达质粒转染两株AML细



A、B: 流式细胞术检测细胞凋亡率; C、D: CCK-8实验检测细胞体外增殖能力; \*\*\* $P < 0.001$ 。

A,B: apoptosis rate in leukemic cell lines was evaluated by flow cytometry; C,D: the cell viability of leukemic cells were evaluated by CCK-8 assay *in vitro*. \*\*\* $P < 0.001$ 。

图7 TRAF6介导的自噬活性对AML细胞生长的影响

Fig.7 Effects of TRAF6 mediated autophagic activation on the growth of AML cells

胞系, 结果发现两株细胞系高表达TRAF6 mRNA和蛋白水平。微管相关蛋白轻链3(microtubule associated protein light chain 3, LC3)是最早发现的自噬标记物, LC3主要以胞质和膜结合的两种状态存在。当自噬被激活时, 胞质状态的I型LC3(LC3I)被酶切降解掉一小段多肽后结合在自噬体膜上, 膜型LC3(LC3II)参与自噬体的形成。目前常采用Western blot检测LC3II蛋白的增多, 以及免疫荧光染色显微镜下观察LC3绿色荧光斑点(puncta)的聚集等方法, 来反映细胞自噬活性的

改变<sup>[20]</sup>。此外, 当自噬被激活时, 自噬受体蛋白p62可与LC3II结合而整合到自噬体中, 随着自噬体与溶酶体的融合, p62等蛋白从而被溶酶体酶降解。因此p62水平下降通常被认为是自噬激活的标志<sup>[21]</sup>。本实验研究结果显示, 过表达TRAF6能够上调白血病细胞LC3II蛋白水平、下调p62蛋白水平并促进LC3 puncta的聚集。SHI等<sup>[22]</sup>在鼠巨噬细胞系RAW 264.7的研究发现, 干扰TRAF6后能够降低LC3II蛋白表达水平, 减少LC3 puncta的聚集, 进而抑制自噬活性。

众所周知,自噬是由多个步骤组成,包括自噬体的形成、自噬体与溶酶体的融合以及自噬溶酶体的降解,这些步骤在细胞内连续出现的动态过程被称作自噬流,而自噬流的活化或者受阻可产生不同的生物学效应。为了观察过表达TRAF6对AML细胞自噬流的影响。本实验使用Baf-A1处理AML细胞。Baf-A1是一种自噬晚期抑制剂,它可抑制氢离子ATP酶活性,降低溶酶体酸性环境,阻止自噬体与溶酶体的融合,使得自噬体的溶酶体降解途径受阻,导致自噬体堆积<sup>[23]</sup>。目前Baf-A1处理观察LC3I/LC3II转化或者检测LC3II蛋白含量是最常用的自噬流检测方法。在本研究中,我们发现Baf-A1处理AML细胞使得LC3II蛋白的基础水平升高,而过表达TRAF6则能进一步增强LC3II的表达量。这提示,过表达TRAF6可能促进自噬体的形成,增强AML细胞自噬流的活化。

接下来,我们采用自噬抑制剂3-MA联合TRAF6过表达来处理AML细胞。已知3-MA是三型磷脂酰肌醇激酶的抑制剂,在自噬早期囊泡成核阶段发挥抑制作用,从而阻断自噬体的形成<sup>[24]</sup>。本研究发现,3-MA处理能够使TRAF6上调LC3II蛋白的作用减弱,同时使TRAF6下调p62蛋白的作用减弱。这进一步提示,TRAF6可能发挥促进AML细胞自噬的调控作用。已知TRAF6具有泛素连接酶E3的功能特点,能够催化底物发生K63位多聚泛素化修饰,这种非经典的泛素化修饰不会导致底物的降解,而是在激活下游信号中具有重要作用<sup>[25]</sup>。有研究报道,TRAF6能够泛素化修饰自噬启动关键分子ULK1<sup>[26]</sup>和Beclin-1<sup>[22]</sup>将其激活,或者TRAF6泛素化激活mTORC1来参与调控293T细胞自噬<sup>[27]</sup>。TRAF6具体通过何种分子机制来参与调控AML细胞自噬体的形成?还有待于深入研究。

为了进一步探讨TRAF6介导的自噬活性在白血病细胞生长中的作用,在AML细胞系中过表达TRAF6,结果显示,过表达TRAF6能够增强白血病细胞的抗凋亡能力以及促进白血病细胞体外增殖,加入自噬抑制剂3-MA能够逆转TRAF6的促生长作用。有研究报道,在人肺腺癌H1299细胞系中,过表达TRAF6能够竞争性抑制p53与促凋亡蛋白MCL-1/BAK的结合,从而发挥抗凋亡作用<sup>[28]</sup>。ZHANG等<sup>[29]</sup>发现,下调小鼠巨噬细胞TRAF6可抑制增殖相关基因*c-Myc*和*Cyclin D1*表达,从而抑制细胞体外增殖。

因此,TRAF6介导的自噬激活,是否影响了增殖相关基因或者凋亡相关通路分子表达的改变,从而促进白血病细胞生长,值得进一步探讨。

综上所述,过表达TRAF6能够增强AML细胞的自噬活性,促进AML细胞的生长。本课题的研究还需要在AML细胞系中敲除*TRAF6*后进一步证实TRAF6对自噬活性的影响,以及在动物模型和临床样本中进一步观察TRAF6对白血病自噬活性的影响,以期为目标TRAF6联合常规化疗药物治疗白血病奠定理论基础。

### 参考文献 (References)

- [1] SHORT N J, RYTTING M E, CORTES J E. Acute myeloid leukaemia [J]. *Lancet*, 2018, 392(10147): 593-606.
- [2] DOMBRET H, GARDIN C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127(1): 53-61.
- [3] MIZUSHIMA N. Autophagy: process and function [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(22): 2861-73.
- [4] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 528-42.
- [5] GALLUZZI L, PIETROCOLA F, BRAVO-SAN PEDRO J M, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression [J]. *EMBO J*, 2015, 34(7): 856-80.
- [6] RIFFELMACHER T, RICHTER F C, SIMON A K. Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 199-206.
- [7] KIMMELMAN A C, WHITE E. Autophagy and tumor metabolism [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(5): 1037-43.
- [8] DENG Z, PURTELL K, LACHANCE V, et al. Autophagy receptors and neurodegenerative diseases [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(7): 491-504.
- [9] MORTENSEN M, SOILLEUX E J, DJORDJEVIC G, et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 455-67.
- [10] KARVELA M, BAQUERO P, KUNTZ E M, et al. ATG7 regulates energy metabolism, differentiation and survival of Philadelphia-chromosome-positive cells [J]. *Autophagy*, 2016, 12(6): 936-48.
- [11] PIYA S, KORNBLAU S M, RUVOLO V R, et al. Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomesstroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2016, 128(9): 1260-9.
- [12] ZOU Q, TAN S, YANG Z, et al. NPM1 mutant mediated PML delocalization and stabilization enhances autophagy and cell survival in leukemic cells [J]. *Theranostics*, 2017, 7(8): 2289-304.
- [13] FUJIKAWA H, FAROOQ M, FUJIMOTO A, et al. Functional studies for the TRAF6 mutation associated with hypohidrotic ectodermal dysplasia [J]. *Br J Dermatol*, 2013, 168(3): 629-33.
- [14] LIU H, TAMASHIRO S, BARITAKI S, et al. TRAF6 activation in multiple myeloma: a potential therapeutic target [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2012, 12(3): 155-63.
- [15] ANTONIOLI M, DI RIENZO M, PIACENTINI M, et al.

- Emerging mechanisms in initiating and terminating autophagy [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(1): 28-41.
- [16] LV Y, KIM K, SHENG Y, et al. YAP controls endothelial activation and vascular inflammation through TRAF6 [J]. *Circ Res*, 2018, 123(1): 43-56.
- [17] WU C, SU Z, LIN M, et al. NLRP11 attenuates Toll-like receptor signalling by targeting TRAF6 for degradation via the ubiquitin ligase RNF19A [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1977.
- [18] FANG J, BOLANOS L C, CHOI K, et al. Ubiquitination of hnRNPA1 by TRAF6 links chronic innate immune signaling with myelodysplasia [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(2): 236-45.
- [19] WU Y H, WU W S, LIN L C, et al. Bortezomib enhances radiosensitivity in oral cancer through inducing autophagy-mediated TRAF6 oncoprotein degradation [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 91.
- [20] GAO W, KANG J H, LIAO Y, et al. Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(2): 1371-83.
- [21] FUJITA K, MAEDA D, XIAO Q, et al. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4): 1427-32.
- [22] SHI C S, KEHRL J H. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of beclin-1 to control TLR4-induced autophagy [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(123): ra42.
- [23] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research [J]. *Cell*, 2010, 140(3): 313-26.
- [24] WU Y, WANG X, GUO H, et al. Synthesis and screening of 3-MA derivatives for autophagy inhibitors [J]. *Autophagy*, 2013, 9(4): 595-603.
- [25] YANG W L, WANG J, CHAN C H, et al. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation [J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1134-8.
- [26] NAZIO F, STRAPPAZZON F, ANTONIOLI M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6 [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(4): 406-16.
- [27] LINARES J F, DURAN A, YAJIMA T, et al. K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells [J]. *Mol Cell*, 2013, 51(3): 283-96.
- [28] ZHANG X, LI C F, ZHANG L, et al. TRAF6 restricts p53 mitochondrial translocation, apoptosis and tumor suppression [J]. *Mol Cell*, 2016, 64(4): 803-14.
- [29] ZHANG L, WANG Y, XIAO F, et al. CKIP-1 regulates macrophage proliferation by inhibiting TRAF6-mediated Akt activation [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 742-61.