

双刃剑: 自噬与肿瘤发生发展的关系及 相关靶点小分子药物研究进展

黄晨恺 朱萱*

(南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006)

摘要 自噬是哺乳动物细胞内重要且复杂的生理活动, 同样影响着肿瘤的发生与进展。随着抗肿瘤药物的广泛使用, 肿瘤耐药问题日益突出, 影响患者预后。多年研究显示, 肿瘤自噬与耐药密切相关。目前, 已有越来越多的自噬相关小分子药物被用来调节肿瘤自噬活动, 以求其能被广泛运用于抗癌方案之中。该文将针对自噬在癌症发生发展过程中的分子机制及相关小分子药物的研究进展进行综述, 以期对肿瘤相关的自噬活动有更深入的认识, 并为后期药物开发工作提供借鉴。

关键词 自噬; 小分子药物; 肿瘤进展

Double-Edged Sword: the Relationship between Autophagy and Tumorigenesis and the Development of Small-Molecule Drugs

HUANG Chenkai, ZHU Xuan*

(Department of Digestive Disease, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Autophagy is an important and complex physiological activity in mammalian cells, which also affects the occurrence and progression of tumors. With the widely use of anti-tumor drugs, the problem of tumor resistance becomes increasingly prominent, which affects the prognosis of patients. At present, various kinds of small molecule drugs related to autophagy have been used to find out “one shot fits all” strategies to conquer drug resistance problem in tumor. This article reviews the molecular mechanism of autophagy in tumorigenesis and the research progress of related small molecule drugs, to have a deeper understanding of cancer-related autophagy activities and provide references for future drug development.

Keywords autophagy; small molecule drugs; tumorigenesis

自噬是一个高度保守的细胞生理过程, 是一种依靠自噬小体, 对受损的细胞器或蛋白质复合物进行非选择性或选择性的包裹, 将其与胞质隔离, 并与溶酶体结合, 最终形成自噬溶酶体维持细胞稳态的方式^[1]。作为真核生物中普遍存在的生理现象, 自噬在维持细胞稳态方面发挥重要作用。自噬过程失控与某些疾病甚至肿瘤的形成、进展密切相关。自噬在肿瘤不同阶段的作用不同, 且自噬活动在不同肿

瘤细胞中的作用也可能存在差异。在此我们将针对自噬在癌症治疗中的不同作用和目前自噬相关小分子药物的研究进展进行归纳总结, 以期为癌症治疗中产生的耐药问题提供新的解决思路。

1 自噬调控的分子机制

目前普遍认为体内缺氧, 细胞内外pH值变化, 营养物质的缺乏, 以及氧化、内质网应激的发生均

收稿日期: 2020-09-06

接受日期: 2020-11-10

国家自然科学基金(批准号: 81660110、81960120)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0791-88692505, E-mail: jyfyzx@163.com

Received: September 6, 2020

Accepted: November 10, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81660110, 81960120)

*Corresponding author. Tel: +86-791-88692505, E-mail: jyfyzx@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5440>

可促进癌细胞自噬^[2]。如前所述, 自噬是一种机体维持稳态的重要机制, 自噬平衡被破坏可以促进和加速肿瘤发生^[3]。自噬是精细的调节过程, 大致可分为五个阶段: 诱导、自噬泡成核、自噬泡延伸、对接和融合以及退化和回收(图1)^[4]。

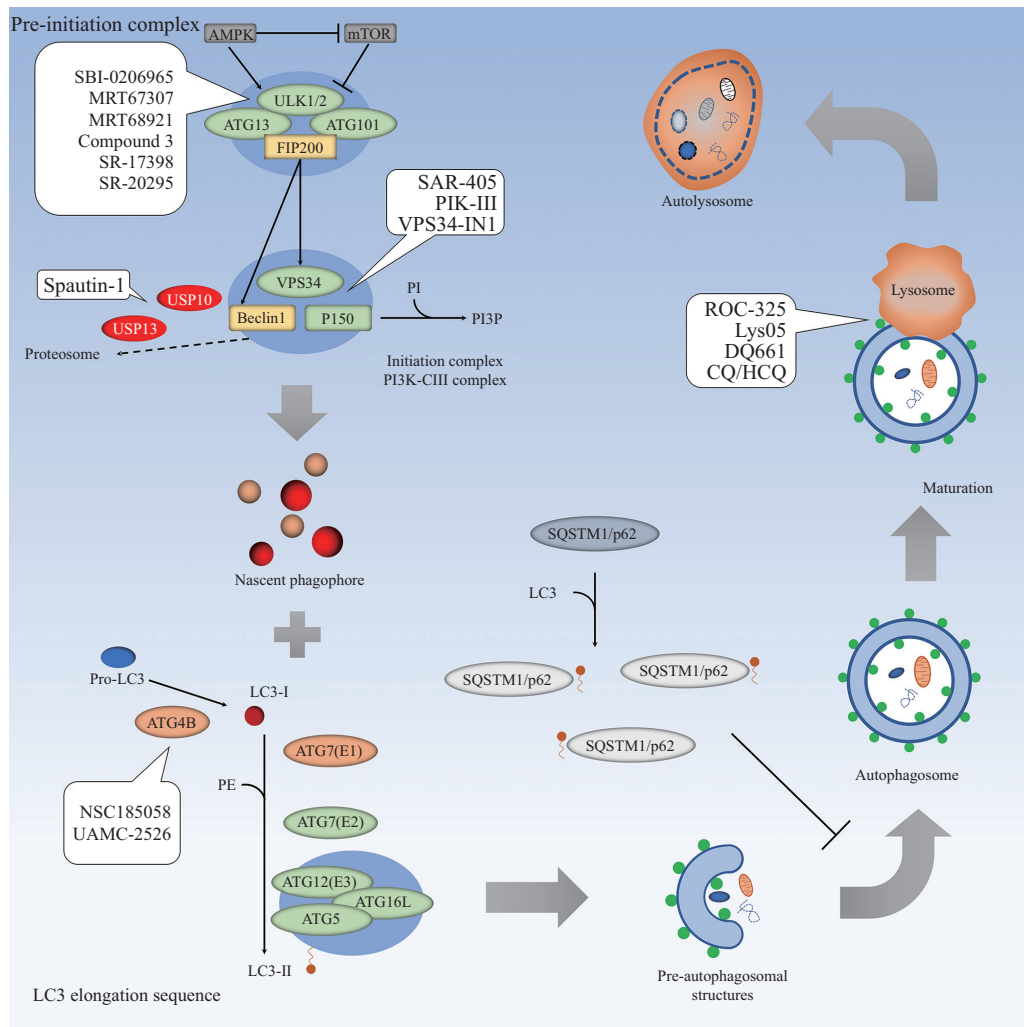
1.1 诱导

吞噬泡是自噬前体结构的装配部位, 最终形成成熟的自噬小体。目前认为UNC-51样激酶1(UNC-51 like kinase 1, ULK1)复合物是调控自噬小体组装起始步骤的重要蛋白质^[5]。结构上, ULK1复合物由ULK1/2、自噬相关基因13(autophagy-associated gene 13, ATG13)、ATG101和200 kDa的黏着斑激酶

家族相互作用蛋白(focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa, FIP200)组成^[6-8]。目前, 大多数研究都集中在发掘ULK1的作用上, 包括发现ULK1的小分子配体。ULK1和ULK2是功能同源物, 两者对于自噬调节可能至关重要。

1.2 自噬泡成核

当细胞接受自噬诱导信号后, 会在胞质内形成短小的膜样结构, 隔离膜(isolation membrane, IM)^[9]。随着相关蛋白质和脂质的累积, IM不断向周围延伸, 逐渐呈扁平状, 形成自噬前体(pre-autophagosome, PAS), 这一过程被称为自噬泡成核(vesicle nucleation)^[9]。该过程需要Beclin 1(ATG6)-III类磷脂酰肌



AMPK: AMP依赖的蛋白激酶; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; ULK: UNC-51样蛋白激酶; ATG: 自噬相关基因; FIP: 黏着斑激酶家族互作蛋白; VPS: 分拣蛋白; USP: 泛素特异性多肽酶; LC3: 轻链3; SQSTM1: 人死骨片1; CQ: 氯喹; HCQ: 羟氯喹。→: 促进作用; ⊥: 抑制作用。

AMPK: adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; ULK: UNC-51-like kinase; ATG: autophagy associated gene; FIP: focal adhesion kinase family interacting protein; VPS: vacuolar protein sorting; USP: ubiquitin specific peptidase; LC3: light chain 3; SQSTM1: sequestosome 1; CQ: chloroquine; HCQ: hydroxychloroquine. →: promotion; ⊥: inhibition.

图1 自噬过程及相关小分子药物作用靶点示意图

Fig.1 Schematic diagram of autophagy process and the targets of related small-molecule drugs

醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)复合体以及ATG12-ATG5-ATG16L1复合体等的参与^[10]。

1.3 自噬泡延伸

自噬体膜延伸受两步类泛素化反应的控制。在第一步泛素化反应中, ATG5和ATG12在ATG7和ATG10存在下彼此缀合。之后ATG5-ATG12缀合物与ATG16L相互作用, 产生ATG16L复合物, 定位于生长的自噬体膜上^[11]。在第二步泛素化反应中, 磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)和微管相关蛋白1-轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3, 也被称为ATG8和LC3)发生缀合, 最终形成膜相关的LC3-II^[11]。目前认为ATG5-ATG12缀合物在PE与LC3-I的缀合中起重要作用, 此外, ATG5-ATG12-ATG16L复合物能使LC3在自噬泡上发生脂质化^[12]。

1.4 对接和融合以及退化和回收

目前认为自噬体多在内质网上形成, 在微管蛋白的协同作用下转移到溶酶体中, 并在微管组织中心的周围聚集。随后自噬体和溶酶体融合, 使溶酶体内的水解酶降解自噬体内容物^[9]。

自噬体的对接和融合需要从成熟的自噬体中分离的ATG蛋白复合物, 并受到ATG2、ATG9和ATG18的调控^[13]。研究发现, ATG蛋白通过识别蛋白修饰靶位(如线粒体、蛋白质/聚集体等)将特定转运物底物隔离到自噬体中^[14]。这种识别过程通常发生在自噬内容物受体蛋白(autophagy cargo receptor proteins)泛素化作用结构域中, 如p62和BRCA1邻近基因1(neighbor of BRCA1 gene 1, NBR1)^[15]。

2 自噬在癌症发生发展中的作用

多年研究证实, 自噬在癌症中起双重作用, 可以发挥促进或抑制肿瘤的作用。自噬激活对肿瘤发挥何种作用由肿瘤的阶段及类型决定^[16]。

癌前状态下, 自噬能清除细胞内受损的蛋白质和细胞器(如线粒体等)。在该阶段抑制自噬导致活性氧水平升高、基因组不稳定性增加, 最终导致p62(也被称为sequestrome 1, SQSTM1)积累, 产生内质网应激并造成DNA损伤, 促成肿瘤发生^[17]。在这种情况下, 自噬通常充当肿瘤抑制因素的角色。此外, 在晚期转移性肿瘤中, 癌细胞通过自噬在代谢和氧化应激过程中获得营养和能量来促进自身存活^[18-19]。故在此阶段自噬作为促癌因素发挥作用, 可通过自

噬过程去除受损的蛋白质和细胞器, 为抵抗化疗药物提供备用能量^[20]。已有研究证实, 在癌症中晚期诱导自噬能显著提高癌细胞对抗癌药物的抗性, 且在该阶段抑制自噬能促进癌细胞死亡^[21]。

2.1 受促癌途径调控的自噬活动

研究人员已经证实, 通过PI3K-Akt-mTOR途径阻断自噬能显著抑制肿瘤的化疗抗性和使肿瘤细胞重新对药物敏感, 提升化疗疗效^[22-23]。除此之外, 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、Ras、BCR-ABL(breakpoint cluster region-c-abl oncogene 1)、信号传导及转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)、Bcl-2(B-cell lymphoma-2)、Bcl-xL(B-cell lymphoma-extra large)的促癌自噬途径在癌细胞存活中同样起着关键作用。

EGF是细胞存活的关键调节因子。研究人员发现, EGF作为重要的促癌因子, 能激活Ras-MAPK^[24]、PI3K-Akt^[25]和JAK-STAT^[26]三种促进癌症发生和进展的信号转导途径。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂可诱导自噬, 对抗化疗药物的毒性作用, 促进肿瘤细胞存活^[27]。

Ras癌蛋白是鸟嘌呤-5-三磷酸家族成员^[28]。在不同组织中的表达存在差异, Ras的活化既可以诱导自噬导致细胞死亡又可以促进肿瘤发生^[29-30]。在没有突变(癌前期)的情况下发生Ras急性激活时, 可通过Beclin 1/分选蛋白34(vacuolar protein sorting 34, VPS34)脂质激酶活化复合物导致细胞衰老或自噬依赖性细胞死亡^[31]; 在Ras慢性激活时, 虽然细胞内PI3K-Akt-mTOR途径的活化水平较低, 但此过程中部分细胞能够通过“瓶颈”效应, 进而克服因癌基激活产生的胞内应激, 产生有利于癌症的突变, 最终促进癌症的发生发展^[32]。

2.2 受抑癌途径调控的自噬活动

抑制癌症的自噬途径包含Beclin 1、紫外线抵抗相关基因(UV radiation resistance-associated gene, UVRAG)、Bif-1(Bax-interacting factor-1)、ATG5、p53和叉头转录因子(Forkhead box O1, FoxO1)等关键调节因子。

研究表明, Beclin 1能通过与III类PI3K/VPS34以及其他调节因子, 如VPS15、ATG14L/Barkor(与Beclin 1相关的自噬相关的关键调节因子)、UVRAG、Bif-1、Ambra1(activating molecule in BECN1-regulated au-

tophagy protein 1)、Rubicon、高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)、生存蛋白(Survivin)、Akt和Bcl-2/Bcl-XL等协同发挥调控自噬过程的作用^[33], 是重要的自噬相关调节蛋白之一。

*p53*通常被称为细胞基因组的“守护者”。*p53*突变在人类的癌症中最为常见。在特定的致癌刺激和缺氧或其他形式的应激条件下, *p53*通过转录依赖性和独立机制协调细胞应答以应对DNA损伤, 以此预防或修复基因组损伤或去除潜在的含有致癌基因的细胞^[34]。值得注意的是, *p53*蛋白会根据其细胞内定位影响自噬活动。目前认为细胞质内 *p53*可以促进自噬细胞死亡, 而定位于内质网的 *p53*则可抑制自噬^[35]。在饥饿条件下, *p53*通过转录后调控机制抑制自噬体膜蛋白LC3的激活, 促进细胞存活。另外, 细胞质内 *p53*可以激活编码AMP依赖的蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]、SESN2(Sestrin 2)、结节硬化1(tuberous sclerosis 1, TSC1)、TSC2和PTEN(phosphate and tension homology

deleted on chromosome ten)等, 从而抑制mTOR功能, 促进自噬^[36-37]。

3 自噬相关靶点药物的研究现状

经典的自噬抑制剂氯喹(chloroquine, CQ)和羟基氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)已被批准用于治疗疟疾。这些化合物会使溶酶体发生脱酸反应, 阻止溶酶体与自噬体融合, 抑制自噬的进展^[40]。目前已有临床研究证实, HCQ与标准治疗方案(standard of care, SOC)可以协同作用抑制癌症进展^[41-42]。在小型临床试验中, 研究人员把高剂量HCQ与SOC结合使用, 但是结果显示, 这些药物仅对患者的自噬水平产生了轻度的抑制作用, 并产生了与预期不符的结果^[43-44]。这些试验局限性包括缺乏调节自噬的效力和脱靶毒性, 从而限制了药物的治疗窗。其他的一些有关自噬靶点, 诸如ULK1/2、ATG4B、VPS34、p62、泛素特异性多肽酶(ubiquitin specific peptidase 10, USP10)以及溶酶体, 逐步进入研究人员的视野(表1), 这些靶点的

表1 主要自噬相关抑制剂与激动剂的研究进展

Table 1 Research progress of major autophagy-related inhibitors and agonists

类型 Type	名称 Name	作用 Function	研究现状 Research progress	药物特性 Characteristics	PMID
Inhibitors	SBI-0206965	ULK1 inhibitor	Preclinical research	Better selectivity to autophagy pathway	32393312
	MRT67307/68921	ULK1 inhibitor	Preclinical research	Inhibits ULK2	25833948
	NSC185058	ATG4B inhibitor	Preclinical research	Better selectivity to autophagy pathway	29232556
	3-MA	VPS34 inhibitor	Experiment reagent	Inhibit a variety of class III PI3K	33034415
	SAR405	VPS34 inhibitor	Preclinical research	Has better selectivity than 3-MA	32494661
	Bafilomycin A1	Lysosomal inhibitor	Experiment reagent	Inhibition of lysosomal function	32933997
	CQ/HCQ	Lysosomal inhibitor	Clinical trial	Inhibition of lysosomal function	32866424
	Lys05	Lysosomal inhibitor	Preclinical research	Better than HCQ	32934241
Agonists	Everolimus	mTORC1 inhibitor	For cancer treatment	Inhibition of multiple mTORC1 dependent pathways and immunosuppressive effect	33037176
	Metformin	AMPK agonist	For type 2 diabetes treatment	Mediate multiple roles unrelated to AMPK, including inhibition of respiratory complex I	33021114
	Rapamycin	mTORC1 inhibitor	As an anti-rejection drug after coronary stent implantation and for rare lung diseases	Inhibit multiple mTORC1 dependent pathways and have a strong immunosuppressive effect. Long-term administration of Rapamycin will lead to inhibition of mTORC2	32964556
	Simvastatin	AMPK agonist	For obesity and regulate blood lipid	The mechanism is unclear and has potential mitochondrial toxicity	32848049

抑制剂与SOC联用将会是未来对抗癌症耐药问题的新方案。

3.1 ULK1/2抑制剂

从功能的角度来看,起始复合物的ULK1/2依赖性磷酸化是自噬新生膜和/或吞噬泡形成中的关键调控步骤,因此,此复合物有潜力成为有效的靶点^[45]。

EGAN等^[46]率先提出筛选针对ULK1/2的小分子抑制剂的相关实验方法。他们从能同时抑制ULK1和黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)两者活性的抑制剂入手,使用基于结构-活性关系(structure-activity relationship, SAR)数据的药物化学策略筛选出ULK1/2抑制剂SBI-0206965。该研究还指出,SBI-0206965除具有上述作用外,还可以抑制VPS34和Beclin 1的磷酸化,同时还降低ATG13的凝胶迁移率。除此之外,其还能通过促进肿瘤细胞自噬进而促进肿瘤细胞凋亡。重要的是,当与mTOR抑制剂组合使用时,SBI-0206965展现出了更强的诱导癌细胞凋亡的能力。

PETHERICK等^[47]也进行了针对已知的ULK1和ULK2激酶抑制剂的体外筛选工作,最终他们筛选出MRT67307和MRT68921。值得一提的是,两者均为TANK结合蛋白1(TANK binding protein 1, TBK1, 为先天免疫应答系统的组成成分)的抑制剂。在氨基酸饥饿诱导ULK1活化后,用MRT67307或MRT68921处理小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF),会降低ATG13上318位丝氨酸磷酸化水平。另外,用MRT67307或MRT68921处理可减少LC3-I向LC3-II转化。MRT67307和MRT68921在TBK1和AMPK相关激酶上显示出明显的脱靶作用。在TBK1或AMPK调节剂肝激酶B1(liver kinase B1, LKB1)缺失的MEF细胞中,上述MRT化合物依旧能显著抑制LC3-I的修饰过程,这表明TBK1和AMPK都不是此化合物依赖性自噬抑制所必需的。PETHERICK等^[47]还指出,MRT68921能阻止野生型MEF中的自噬流形成,但不能抑制ULK1的耐药突变体形式(M92T),这表明MRT68921是通过抑制ULK1-M92位点从而抑制ATG相关功能的。

除了上述若干处于试验阶段针对ULK1/2的自噬抑制剂外,还有Compounds 1/3^[48-49]、SR-17398/20295^[50-51]等,在体外实验中均显示出了对

自噬不同程度的抑制作用。相信ULK1/2的相关抑制剂未来能成为有效的临床用药,使癌症患者获益。

3.2 ATG4B抑制剂

ATG4B是一种半胱氨酸蛋白酶,可切割LC3前体的C末端,即自噬体膜的结构成分。暴露C末端甘氨酸后,ATG7可以激活LC3-I,将其递送至ATG3,使LC3-I与磷脂酰乙醇胺偶联。脂质化的LC3-II锚定在新生的自噬体上,促进自噬体的生长和扩增^[52]。因此,ATG4被认为是自噬途径的必需酶成分,也是药物开发的热门靶标之一。

AKIN等^[53]在一系列shRNA敲除实验中验证了ATG4B在骨肉瘤Saos-2细胞中的作用。研究指出,ATG4B的丧失导致LC3-II驱动自噬体形成减少,伴随着氨基酸饥饿的细胞存活能力减弱,且体内实验也证实了ATG4B的缺失可以抑制骨肉瘤的生长。根据ATG4B的晶体结构,筛选出能与其活性位点结合的小分子物质NSC185058。HUANG等^[54]分别研究了NSC185058和ATG4B抑制剂在癌症治疗中的潜在价值。研究中他们发现ATG4B是哺乳动物STE20样蛋白激酶4(mammalian STE20-like protein kinase 4, MST4)的直接底物,能使ATG4B的383位丝氨酸发生磷酸化。同时,MST4表达水平升高与胶质母细胞瘤进展和患者生存率降低呈正相关。用shRNA抑制MST4会抑制神经胶质瘤干细胞的生长,并降低其在小鼠中的成瘤能力。故认为MST4促进肿瘤进展的机制是其激活ATG4B并促进ATG4B的磷酸化,进而促进自噬流的形成。NSC185058通过作用于这一过程,发挥了其抑制肿瘤的作用。

3.3 空泡蛋白分类蛋白34抑制剂

研究人员首先在酵母中发现VPS34,其在体内运输和自噬中具有双重作用,是PI3K蛋白家族最保守的成员之一,也是唯一的III类PI3K^[55]。研究人员发现,VSP34激酶活性可以诱导哺乳动物自噬活动。VPS34与自噬调节剂Beclin 1、ATG14和VPS15/PIK3R4同样是自噬前体复合体的重要组成部,参与哺乳动物自噬活动。研究表明,VPS34可以通过自身脂质激酶的活性,将磷脂酰肌醇转变为磷脂酰肌醇-3-磷酸酯(phosphatidylinositol-3-phosphate, PI3P),而该蛋白与自噬体前体结合,是自噬启动的关键因素之一^[55]。

RONAN等^[56]使用稳定表达EGFP-LC3的HeLa细胞利用新表型高通量筛选(high-throughput screen, HTS)技术筛选出一种有效的VPS34选择性抑制剂SAR405。其能有效抑制因饥饿或因mTOR抑制而形成的自噬体;有趣的是, SAR405与依维莫司(美国FDA批准的一种mTOR变构抑制剂)协同作用,可在体外阻断肾肿瘤细胞的增殖^[56]。

同样地, DOWDLE等^[57]进行了针对VPS34抑制剂的HTS鉴定, 筛选出经化学优化后的VPS34抑制剂PIK-III。研究指出, 去除细胞内显性负性(dominant negative, DN)的ATG4B表达后, 再用PIK-III处理可以有效阻断LC3-I向LC3-II转化。此外, 据报道, PIK-III的衍生物, 化合物19(compound 19, VPS34 inhibitor 1), 可以抑制细胞中自噬底物的降解, 具有良好的PK(pharmacokinetics)特性, 并可在RKO结肠癌异种移植瘤模型中引起瘤内LC3-II积累^[58]。

3.4 其他自噬相关靶点

自噬是一个复杂的多步骤过程, 受到从早期启动到溶酶体晚期的各种信号途径的调节。除了上述针对ULK1/2、ATG4B以及VPS34的抑制剂外, 还有诸如针对p62、USP10及溶酶体的抑制剂。

在特定光照存在下, 维替泊芬(Verteporfin)能靶向修饰p62, 通过非特异性机制诱导共价交联p62寡聚物形成^[59], 而交联后的p62寡聚体保留了其与LC3-I结合的能力。有趣的是, 在营养丰富的条件下, 维替泊芬似乎对细胞生存力没有影响, 但却能显著降低营养缺乏条件下肿瘤细胞的存活率^[60]。

Spautin-1是靶向VPS34复合物Beclin 1亚基的新型小分子, 可以有效抑制自噬活动^[60]。进一步研究表明, Beclin 1并不是Spautin-1的直接靶标, 该化合物也可以充当去泛素化酶USP10和USP13的抑制剂^[61]。另有研究表明, Spautin-1与BCR-ABL酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼联用可以促进慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)细胞凋亡, 提升治疗效果, 改善预后^[62]。

除上述靶点抑制剂外, 溶酶体抑制剂也是如今研发的重要方向之一。与CQ或HCQ相似的破坏溶酶体功能的化合物也能显著抑制自噬流的形成, 达到抑制自噬的目的。CAREW等^[63]将HCQ与乙酰胆碱酯酶抑制剂硫蒽酮连接起来合成了ROC-325^[63]。除比HCQ具有更高的细胞毒性外, ROC-325还能促进溶酶体的

脱酸和自噬体的积累, 抑制自噬流形成^[64]。在肾细胞癌异种移植模型中, ROC-325比HCQ表现出了更好的疗效及耐受性^[65]。此外, 其他的药物诸如HCQ的二价形式Lys05^[65]及新靶点棕榈酰蛋白硫酯酶1(palmitoyl-protein thioesterase 1, PPT1)抑制剂^[65]都是未来自噬研究的新方向。

4 总结与展望

自噬在癌症中起双重作用, 在某些情况下促进肿瘤生长, 在另一些情况下却能抑制肿瘤生长。是否应该在癌症治疗中尝试增强或抑制自噬这一问题, 取决于癌细胞类型、所处的状态、应激信号和其他情况。在有患癌症风险或早期癌症患者体内, 我们应尝试增强自噬; 而在肿瘤快速进展过程中, 必须抑制自噬。通过灵活使用自噬诱导剂和抑制剂, 我们可以根据具体情况精准调节自噬活动。

如前述, 自噬受某些癌基因(例如PI3KC、Akt、mTOR、Ras、Raf和Bcr-abl)、抑癌因子(例如Beclin 1、p53、FoxO1和Bcl-2)和某些miRNA的调控。自噬途径的这些调节元件是自噬诱导剂和抑制剂发展的关键目标。自噬抑制剂作为辅助疗法与细胞毒性药物组合使用是克服癌细胞对抗癌药物治疗耐药性的重要手段。可喜的是, 目前已有多种自噬相关的抗肿瘤方案进入临床试验阶段(表2)。但就目前而言, 多数调节自噬的小分子药物仍停留在细胞与动物实验阶段, 尚未有足够的证据支持其进入临床试验。比如, 目前针对ULK1/2的小分子抑制剂的发现是近年有关自噬抑制剂开发工作的重要进展之一。这些小分子在体外对ULK1/2的抑制作用很强。然而, 有关研究缺乏在动物疾病模型中评估相关小分子抑制剂对ULK1/2活性的影响。此外, 虽然在癌症治疗中使用ATG4B的小分子抑制剂或VPS34抑制剂和SOC药物联合可能使癌症患者获益, 但需要注意的是, VPS34在组织正常生理活动中的重要性, 如此联用可能会限制靶向VPS34药物的使用。在肿瘤学研究中, 迄今为止发现的大多数自噬靶向化合物均会抑制自噬途径。但过量的自噬会促进自噬依赖性细胞死亡。因此, 不断研制或改进针对自噬靶点的新型化合物, 并最终制定出行之有效的抗癌治疗方案, 仍是未来肿瘤学研究的重中之重。

表2 近5年抗肿瘤药物(方案)与自噬相关药物联合方案相关临床研究进展

Table 2 Progress of clinical trials on the combined regimen of anti-tumor drugs and autophagy-related drugs in recent five years

注册号 Registration No.	肿瘤类型 Tumor type	药物配伍 Drug compatibility	研究阶段 Research phase	状态 Status	研究结论 Conclusion	PMID
NCT03598595	Refractory osteosarcoma	Gemcitabine/HCQ	Phase II	Recruiting	Unfinished	N/A
NCT02333890	Invasive breast cancer	CQ	Phase II	Early termination	Prognosis did not improve	31392517
NCT01748500	Prostate cancer	Poly paclitaxel/pantoprazole	Phase II	Early termination	Prognosis did not improve	30952818
NCT01506973	Pancreatic cancer	Gemcitabine hydrochloride and paclitaxel sodium/HCQ	Phase II	Early termination	Prognosis did not improve	31120501
NCT01835041	Metastatic pancreatic cancer	FOLFIRINOX/CPI - 613	Phase I	Ongoing	The regimen is safe and well tolerated	28495639
NCT01687179	Lymphangiomyomatosis	Sirolimus/HCQ	Phase I	Completed	The regimen is safe and well tolerated	28192114
NCT01128296	Pancreatic adenocarcinoma	Gemcitabine/HCQ	Phase I/II	Completed	HCQ and gemcitabine were safe and well tolerated Postoperative CA19-9 and related indicators were significantly improved	25905586
NCT01144169	Renal cell carcinoma	Everolimus/HCQ	Phase I/II	Completed	The regimen was well tolerated. Progression-free survival was significantly improved in the combination group at 6 months	30635337
NCT01480154	Advanced solid tumor	MK2206/HCQ	Phase I	Ongoing, and recruiting	The regimen was well tolerated but had many side effects and poor anti-tumor effect	31463691

N/A: 尚缺。

N/A: not available.

参考文献 (References)

- [1] KIRKIN V, ROGOV V V. A diversity of selective autophagy receptors determines the specificity of the autophagy pathway [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(2): 268-85.
- [2] MAULUCCI G, CHIARPOTTO M, PAPI M, et al. Quantitative analysis of autophagic flux by confocal pH-imaging of autophagic intermediates [J]. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1905-16.
- [3] DAS C K, BANERJEE I, MANDAL M. Pro-survival autophagy: an emerging candidate of tumor progression through maintaining hallmarks of cancer [J]. *Semi Cancer Biol*, 2020, 66: 59-74.
- [4] WATANABE Y, TAGUCHI K, TANAKA M. Ubiquitin, autophagy and neurodegenerative diseases [J]. *Cells*, 2020, 9(9): E2022.
- [5] LECHAUVE C, KEITH J, KHANDROS E, et al. The autophagy-activating kinase ULK1 mediates clearance of free α -globin in β -thalassemia [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(506): eaav4881.
- [6] WANG B, MAXWELL B A, JOO J H, et al. ULK1 and ULK2 regulate stress granule disassembly through phosphorylation and activation of VCP/p97 [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 742-57.
- [7] WANG B, IYENGAR R, LI-HARMS X, et al. The autophagy-inducing kinases, ULK1 and ULK2, regulate axon guidance in the developing mouse forebrain via a noncanonical pathway [J]. *Autophagy*, 2018, 14(5): 796-811.
- [8] GOODWIN J M, DOWDLE W E, DEJESUS R, et al. Autophagy-independent lysosomal targeting regulated by ULK1/2-FIP200 and ATG9 [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(10): 2341-56.
- [9] LAMB C A, YOSHIMORI T, TOOZE S A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(12): 759-74.
- [10] FLETCHER K, ULFERTS R, JACQUIN E, et al. The WD40 domain of ATG16L1 is required for its non-canonical role in lipidation of LC3 at single membranes [J]. *EMBO J*, 2018, 37(4): e97840.
- [11] SHAID S, BRANDTS C H, SERVE H, et al. Ubiquitination and selective autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 21-30.
- [12] KIRKIN V. History of the selective autophagy research: how did it begin and where does it stand today [J]? *J Mol Biol*, 2019, 432(1): 3-27.
- [13] GÓMEZ-SÁNCHEZ R, ROSE J, GUIMARÃES R, et al. Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(8):

- 2743-63.
- [14] YAO J, QIU Y, FRONTERA E, et al. Inhibiting autophagy reduces retinal degeneration caused by protein misfolding [J]. *Autophagy*, 2018, 14(7): 1226-38.
- [15] LAMARK T, KIRKIN V, DIKIC I, et al. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(13): 1986-90.
- [16] MOWERS E E, SHARIFI M N, MACLEOD K F. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis [J]. *Febs J*, 2018, 285(10): 1751-66.
- [17] POILLET-PEREZ L, WHITE E. Role of tumor and host autophagy in cancer metabolism [J]. *Genes Dev*, 2019, 33(11/12): 610-9.
- [18] HUANG D, LI T, WANG L, et al. Hepatocellular carcinoma redirects to ketolysis for progression under nutrition deprivation stress [J]. *Cell Res*, 2016, 26(10): 1112-30.
- [19] BARTOLINI D, DALLAGLIO K, TORQUATO P, et al. Nrf2-p62 autophagy pathway and its response to oxidative stress in hepatocellular carcinoma [J]. *Transl Res*, 2018, 193: 54-71.
- [20] NOGUERA-ORTEGA E, AMARAVADI R K. Autophagy in the tumor or in the host: which plays a greater supportive role [J]? *Cancer Discov*, 2018, 8(3): 266-8.
- [21] YANG S, WANG X, CONTINO G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(7): 717-29.
- [22] AMARAL C, AUGUSTO T V, TAVARES-DA-SILVA E, et al. Hormone-dependent breast cancer: targeting autophagy and PI3K overcomes exemestane-acquired resistance [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 183: 51-61.
- [23] YANG J, PI C, WANG G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 699-707.
- [24] SANGRAR W, SHI C, MULLINS G, et al. Amplified Ras-MAPK signal states correlate with accelerated EGFR internalization, cytostasis and delayed HER2 tumor onset in Fer-deficient model systems [J]. *Oncogene*, 2015, 34(31): 4109-17.
- [25] ZHANGYUAN G, WANG F, ZHANG H, et al. VersicanV1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma through the activation of EGFR-PI3K-AKT pathway [J]. *Oncogene*, 2019, 39(6): 1213-30.
- [26] ALANAZI I, HOFFMANN P, ADELSON D L. MicroRNAs are part of the regulatory network that controls EGF induced apoptosis, including elements of the JAK/STAT pathway, in A431 cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120337.
- [27] LI L, WANG Y, JIAO L, et al. Protective autophagy decreases osimertinib cytotoxicity through regulation of stem cell-like properties in lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 452: 191-202.
- [28] SIMANSHU D K, NISSLEY D V, MCCORMICK F. RAS proteins and their regulators in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170(1): 17-33.
- [29] ZHANG X, CHENG Q, YIN H, et al. Regulation of autophagy and EMT by the interplay between p53 and RAS during cancer progression (review) [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(1): 18-24.
- [30] ZHANG P, ZHENG Z, LING L, et al. w09, a novel autophagy enhancer, induces autophagy-dependent cell apoptosis via activation of the EGFR-mediated RAS-RAF1-MAP2K-MAPK1/3 pathway [J]. *Autophagy*, 2017, 13(7): 1093-112.
- [31] SALMINEN A, KAARNIRANTA K, KAUPPINEN A, et al. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: the potential role of Beclin 1 interactome [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 106-107: 33-54.
- [32] DONG Q, YANG B, HAN J G, et al. A novel hydrogen sulfide-releasing donor, HA-ADT, suppresses the growth of human breast cancer cells through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways [J]. *Cancer Lett*, 2019, 455: 60-72.
- [33] FU LL, CHENG Y, LIU B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(5): 921-4.
- [34] PARRALES A, IWAKUMA T. Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 288.
- [35] KAMIL M, HAQUE E, IRFAN S, et al. ER chaperone GRP78 regulates autophagy by modulation of p53 localization [J]. *Front Biosci*, 2017, 9: 54-66.
- [36] RAVIKUMAR B, FUTTER M, JAHREISS L, et al. Mammalian macroautophagy at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122: 1707-11.
- [37] ZHANG F, CHEONG J K. Targeting oncogene-induced autophagy: a new approach in cancer therapy [J]? *J Cancer Res*, 2013, 2013: 1-10.
- [38] MRSCHTIK M, RYAN K M. Another DRAM involved in autophagy and cell death [J]. *Autophagy*, 2016, 12(3): 603-5.
- [39] HAY N. p53 strikes mTORC1 by employing sestrins [J]. *Cell Metabol*, 2008, 8(3): 184-5.
- [40] MAUTHE M, ORHON I, ROCCHI C, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion [J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1435-55.
- [41] AMARAVADI R K, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, YIN X M, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(4): 654-66.
- [42] ROSENFELD M R, YE X, SUPKO J G, et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme [J]. *Autophagy*, 2014, 10(8): 1359-68.
- [43] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 528.
- [44] BOONE B A, BAHARY N, ZUREIKAT A H, et al. Safety and biologic response of pre-operative autophagy inhibition in combination with gemcitabine in patients with pancreatic adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(13): 4402-10.
- [45] ZHAO Y G, ZHANG H. The incredible ULKs: Autophagy and beyond [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(4): 475-6.
- [46] EGAN D F, CHUN M G H, VAMOS M, et al. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ulk1 and identification of ulk1 substrates [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 285-97.
- [47] PETHERICK K J, CONWAY O J L, MPAMHANGA C, et al. Pharmacological inhibition of ulk1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(18): 11376-83.
- [48] LAZARUS M B, SHOKAT K M. Discovery and structure of a new inhibitor scaffold of the autophagy initiating kinase ULK1 [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2015, 23(17): 5483-8.
- [49] LAZARUS M B, NOVOTNY C J, SHOKAT K M. Structure of the human autophagy initiating kinase ulk1 in complex with po-

- tent inhibitors [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(1): 257-61.
- [50] ROSENBERG L H, LAFITTE M, GRANT W, et al. Development of an hts-compatible assay for the discovery of ulk1 inhibitors [J]. *J Biomol Screen*, 2015, 20(7): 913-20.
- [51] WOOD S D, GRANT W, ADRADOS I, et al. In silico hts and structure based optimization of indazole-derived ulk1 inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8(12): 1258-63.
- [52] FUJITA N, NODA T, YOSHIMORI T. Atg4B(C74A) hampers autophagosome closure: a useful protein for inhibiting autophagy [J]. *Autophagy*, 2009, 5(1): 88-9.
- [53] AKIN D, WANG S K, HABIBZADEGAH-TARI P, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors [J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 2021-35.
- [54] HUANG T, KIM C K, ALVAREZ A A, et al. MST4 phosphorylation of atg4b regulates autophagic activity, tumorigenicity, and radioresistance in glioblastoma [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(6): 840-55.
- [55] YOUNG L N, GOERDELER F, HURLEY J H. Structural pathway for allosteric activation of the autophagic PI 3-kinase complex I [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(43): 21508-13.
- [56] RONAN B, FLAMAND O, VESCOVI L, et al. A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 1013.
- [57] DOWDLE W E, NYFELER B, NAGEL J, et al. Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis *in vivo* [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 1069.
- [58] LIMPERT A S, LAMBERT L J, BAKAS N A, et al. Autophagy in cancer: regulation by small molecules [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(12): 1021-32.
- [59] DONOHUE E, BALGI A D, KOMATSU M, et al. Induction of covalently crosslinked p62 oligomers with reduced binding to polyubiquitinated proteins by the autophagy inhibitor verteporfin [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114964.
- [60] PELLOSI D S, CALORI I R, DE PAULA L B, et al. Multifunctional theranostic Pluronic mixed micelles improve targeted photoactivity of Verteporfin in cancer cells [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71: 1-9.
- [61] PESCE E, SONDO E, FERRERA L, et al. The autophagy inhibitor spautin-1 antagonizes rescue of mutant CFTR through an autophagy-independent and USP13-mediated mechanism [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1464.
- [62] SHAO S, LI S, QIN Y, et al. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(5): 1661-8.
- [63] NAWROCKI S T, HAN Y, VISCONTE V, et al. The novel autophagy inhibitor ROC-325 augments the antileukemic activity of azacitidine [J]. *Leukemia*, 2019, 33(12): 2971-4.
- [64] CAREW J S, NAWROCKI S T. Drain the lysosome: development of the novel orally available autophagy inhibitor ROC-325 [J]. *Autophagy*, 2017, 13(4): 765-6.
- [65] CAREW J S, ESPITIA C M, ZHAO W, et al. Disruption of autophagic degradation with ROC-325 antagonizes renal cell carcinoma pathogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(11): 2869-79.