

全反式维甲酸调控内质网应激 诱导FLT3-ITD蛋白自噬降解 促进白血病细胞凋亡

郑立敏 王丽娜 梁聪 彭春锦 汤文燕 张晓莉 李毓 唐燕来 黄礼彬 罗学群

中山大学附属第一医院儿科, 广州 510000

通信作者: 罗学群, Email: l-xuequn@126.com

【摘要】 目的 以内质网应激(ERS)为切入点,深入研究全反式维甲酸(ATRA)调控FLT3-ITD突变蛋白表达下降,导致FLT3-ITD突变阳性白血病细胞凋亡的分子机制。方法 ATRA处理FLT3-ITD突变阳性白血病细胞株(MV4-11和MOLM13),流式细胞术检测细胞凋亡,实时荧光定量PCR和Western blot法分别检测细胞ERS相关和(或)自噬相关基因及蛋白的表达。结果 低剂量ATRA可提高FLT3-ITD突变阳性白血病细胞的ERS水平;ATRA作用于ERS相关的PERK/eif2 α 信号通路,使FLT3-ITD突变阳性细胞的ERS水平持续升高,CHOP基因表达上调;FLT3-ITD突变阳性细胞经ATRA处理后,FLT3-ITD蛋白表达水平降低;细胞内与ERS有关的并且主要的两个蛋白降解途径中,与内质网关联降解(ERAD)相关的蛋白ATF6表达无明显变化,而与内质网激活自噬(ERAA)相关的自噬相关蛋白Atg5和Atg7表达明显升高。结论 ATRA通过激活PERK/eif2 α 信号通路持续上调FLT3-ITD突变阳性细胞的ERS水平,通过ERAA途径自噬降解FLT3-ITD蛋白,促进白血病细胞凋亡。研究结果为临床应用ATRA治疗难治性FLT3-ITD突变阳性白血病提供了初步实验依据。

【关键词】 白血病,髓系,急性; FLT3-ITD蛋白; 全反式维甲酸; 内质网应激

基金项目:广东省科技计划项目公益研究与能力建设(2014A020221008);广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项民生科技研究专题(201604020128);广东省中医药局科研项目(20201056);广东省医学科学技术研究基金(A2019375)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.008

Effect of endoplasmic reticulum stress induced by all-trans retinoic acid on apoptosis of FLT3-ITD mutated leukemia cells by activating autophagy in FLT3-ITD mutated protein

Zheng Limin, Wang Li'na, Liang Cong, Peng Chunjin, Tang Wenyan, Zhang Xiaoli, Li Yu, Tang Yanlai, Huang Libin, Luo Xuequn

Pediatric Department, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Luo Xuequn, Email: l-xuequn@126.com

【Abstract】 Objective Endoplasmic reticulum stress (ERS) was used as the research emphasis to further investigate the mechanisms of apoptosis of FLT3-ITD-mutated leukemia cells and decreased expression of FLT3-ITD mutated protein induced by all-trans retinoic acid (ATRA). **Methods** FLT3-ITD-mutated leukemia cell lines (MV4-11 and MOLM13) were treated with ATRA. Flow cytometry was conducted to assess cell apoptosis. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression of ERS-related and autophagy-related genes and protein, respectively. **Results** A low-dose ATRA further increased FLT3-ITD cells and ERS levels. ATRA acted on the ERS-related PERK/eif2 α signaling pathway and continued to increase the ERS of FLT3-ITD cells, resulting in an upregulation of apoptotic gene CHOP expression. After the treatment with ATRA, FLT3-ITD protein in FLT3-ITD cells was decreased. Of the two main ERS-related protein degradation pathways, ER-associated degradation (ERAD) and ER-activated autophagy (ERAA), the expression of ERAD-related protein ATF6 in FLT3-ITD cells was not significantly changed on ATRA, whereas the expression of ERAA-related proteins Atg7 and Atg5 were significantly increased. **Conclusions** ATRA further raises the ERS level of FLT3-ITD cells continuously by activating the ERS-related PERK/eif2 α signal pathway and

induces FLT3-ITD protein autophagy degradation through ERAA pathway, which induces apoptosis of FLT3-ITD-mutated leukemia cells. These results provide preliminary evidence on the use of ATRA in the treatment of refractory leukemia with FLT3-ITD.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; FLT3-ITD protein; All-trans retinoic acid; Endoplasmic reticulum stress

Fund program: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014A020221008); Science and Technology Planning Project of Guangzhou (201604020128); Scientific Research Project of Guangdong Bureau of Traditional Chinese Medicine (20201056); Medical Science and Technology Research Foundation of Guangdong Province (A2019375)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.008

FMS样酪氨酸激酶3(FMS-like tyrosine 3, FLT3)属于Ⅲ型酪氨酸受体,在急性髓系白血病(AML)患者中高表达且部分发生基因突变^[1]。其中FLT3内部串联重复(FLT3-ITD)突变最常见^[2],具有更高的致癌潜能^[3],导致疗效差和易复发^[4],是难治性AML的独立高危因素^[5-6]。靶向降低FLT3-ITD表达是治疗该类难治性白血病的关键环节。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指细胞受应激事件影响时,蛋白的翻译、转运、加工和分泌出现异常,错误折叠蛋白在内质网蓄积,无法向高尔基体和细胞膜转运,导致内质网压力升高,其形态和功能发生改变。ERS激活的错误折叠蛋白降解主要有内质网关联的降解(ER-associated degradation, ERAD)和内质网激活的自噬(ER-activated autophagy, ERAA)途径^[7-9],前者与ATF6和IRE1 α 通路介导的蛋白酶体途径相关,后者与PERK和(或)IRE1 α 通路或钙离子介导的巨自噬途径相关^[7, 10]。当ERS持续且无法缓解时,细胞发生凋亡^[11]。

研究表明,肿瘤细胞的ERS水平较正常细胞高,有利于维持其生存^[12-14]。FLT3蛋白发生ITD突变后,自发形成同源二聚体,蓄积在内质网腔内^[15],FLT3-ITD突变阳性AML细胞的ERS水平可能较高。本研究组前期研究显示,全反式维甲酸(ATRA)可诱导FLT3-ITD蛋白表达降低并促进白血病细胞凋亡^[16],但机制未明。有报道显示,ATRA能提高急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞的ERS水平^[17]。据此推测ATRA增强FLT3-ITD突变阳性AML细胞的ERS,是导致FLT3-ITD蛋白表达降低和诱导FLT3-ITD突变阳性白血病细胞凋亡的重要机制之一。本研究以FLT3-ITD突变阳性AML细胞株MV4-11和MOLM13为模型,探究ATRA诱导FLT3-ITD蛋白表达降低、促进FLT3-ITD突变白血病细胞凋亡是否与ERS相关,为FLT3-ITD突变

AML的治疗提供新思路。

材料与方 法

1. 细胞株与细胞培养:实验用的细胞株均为人类白血病细胞株, MV4-11和MOLM13为FLT3-ITD突变阳性AML细胞株, RS4-11、THP1和HL-60为FLT3-ITD突变阴性细胞株。其中MOLM13购自德国DSMZ细胞库,其他细胞株购自美国模式培养物研究所(ATCC)或中国医学科学院血液学研究所。MV4-11细胞株用含10%胎牛血清的IMDM培养液,其他细胞株用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,于含5%的CO₂、37℃培养箱中培养,根据细胞增殖情况定期更换培养液。

2. 主要试剂: ATRA(美国Sigma-Aldrich公司产品,货号R2625)溶于DMSO保存。4-PBA、GSK2606414和Guanabenz购自索拉宝公司,溶于DMSO保存, DMSO在培养基的终浓度<0.1%。PERK、p-PERK、BiP、eif2 α 、p-eif2 α 、Atg5和Atg7抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。

3. 凋亡检测:用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒[东仁化学科技(上海)有限公司产品]检测细胞凋亡。取对数生长期的细胞进行细胞计数,用培养基调整细胞密度为 $1 \times 10^5/L$,接种于12孔板内,予不同浓度的ATRA处理。处理后避光培养24、48及72 h,分别收集不同培养时间的细胞离心(1000 r/min, 10 min)。弃上清,4℃预冷的PBS洗涤细胞2次后用结合缓冲液制成细胞悬液。依次加入Annexin V-FITC和PI各5 μ l,吹打混匀,室温下避光孵育15 min。在2 h内用流式细胞仪完成各组细胞凋亡率的检测。

4. 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测基因表达水平:用TRIzol法提取总RNA。将细胞离心后弃上清,裂解于TRIzol试剂,氯仿将RNA分离后用75%乙醇和无水乙醇各洗涤2次。真空抽干乙醇溶液,

将RNA溶解于DEPC水,检测RNA的浓度和纯度。去除基因组DNA以及cDNA的合成采用Promage RR047a试剂盒。RT-qPCR以cDNA为模板扩增目的基因和内参基因。引物:GAPDH上游引物:5'-GCCAACACAGTGCTGTCTGG-3';下游引物:5'-GCTCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'。BiP上游引物:5'-CTCCTGAAGGGGAACGTCTG-3';下游引物:5'-CCACCTGAACGGCAAGAAC-3'。CHOP上游引物:5'-TCCAGCCACTCCCCATTATC-3';下游引物:5'-GCAGGGTCAAGAGTGGTGAA-3'。XBP1-s上游引物:5'-CTGAGTCCGCAGCAGGTG-3';下游引物:5'-AGGGAGGCTGGTAA GGAAC-3'。XBP1-u上游引物:5'-CAGACTACGTGCACCTCTGC-3';下游引物:5'-GGGTCCTTCTGGGTAGACCT-3'。

5. Western blot法检测蛋白表达水平: ATRA避光处理细胞24、48和72 h后,分别收集、洗涤和裂解细胞,提取细胞总蛋白及胞质蛋白进行定量和热变性处理。根据目的蛋白大小配制不同浓度的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(SDS-PAGE),根据蛋白大小选择合适的转膜条件将蛋白转移到硝酸纤维素(NC)膜上,加入一抗在4℃过夜孵育印迹,加入辣根过氧化物酶(HRP)耦联的二抗孵育1 h,用增强型化学发光法(ECL)检测确定目的蛋白的表达强弱,GAPDH或 β -actin作为内参,确保每个泳道的总蛋白及胞质蛋白上样量一致。

6. 统计学处理:实验数据均来自于3次或3次以上结果相似的独立实验,计量资料数据采用均数 \pm 标准差表示,采用SPSS 22.0软件进行数据分析,采用直方图和Kolmogorov-Smirnov检验正态性,对每组数据进行方差齐性检验,两独立样本均数比较采用Student's *t*检验,多个样本均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,统计图

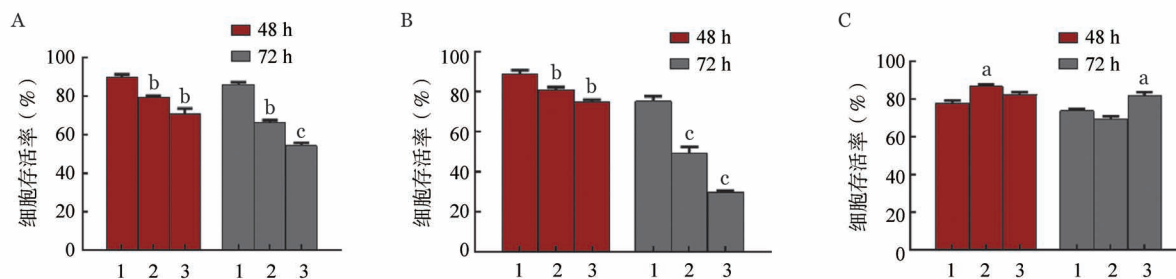
采用Graphpad Prism 8.0进行绘制。

结 果

1. 低剂量ATRA对FLT3-ITD突变阳性AML细胞凋亡的影响:不同浓度的ATRA(0、0.5和1.0 $\mu\text{mol/L}$)作用于MV4-11、MOLM13和RS4-11细胞48和72 h,流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示,ATRA对MV4-11和MOLM13细胞的促凋亡作用呈现明显的时间依赖性和剂量依赖性,其中低剂量ATRA(0.5 $\mu\text{mol/L}$)在72 h已有明显的促凋亡作用(图1A、B)。而ATRA对RS4-11细胞的促凋亡作用较弱(图1C)。提示ATRA选择性地杀伤FLT3-ITD突变阳性AML细胞。

2. ATRA对FLT3-ITD突变阳性AML细胞ERS水平的影响:BiP和XBP1-s上调是ERS的生物学标志。将不同浓度的ATRA(0、0.5和1.0 $\mu\text{mol/L}$)作用于MV4-11、MOLM13、RS4-11和HL-60细胞24、48及72 h,RT-qPCR检测ERS标志基因BiP和XBP1-s的表达。结果显示,与RS4-11和HL-60细胞比较,MV4-11和MOLM13细胞在ATRA作用下BiP基因的表达明显升高,MOLM13细胞XBP1-s基因的表达亦明显升高。与空白对照组相比,差异具有统计学意义(P 值均 < 0.05),其中0.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA对ERS水平上调作用最明显(表1)。提示低剂量ATRA可显著上调FLT3-ITD突变阳性AML细胞的ERS水平。

3. ATRA对FLT3-ITD突变阳性AML细胞的PERK/eif2 α 信号通路的影响:为进一步明确低剂量ATRA调控FLT3-ITD突变阳性细胞ERS的信号通路,我们检测了参与持续ERS最重要的PERK/eif2 α 通路。Western blot检测结果显示,0.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA作用于细胞72 h后,MV4-11和MOLM13细胞的PERK磷酸化蛋白表达增加,RS4-11和THP1



A、B分别为FLT3-ITD突变阳性细胞MV4-11和MOLM13;C为FLT3-ITD突变阴性细胞RS4-11。1:空白对照组;2:0.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA作用组;3:1.0 $\mu\text{mol/L}$ ATRA作用组。与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$

图1 全反式维甲酸(ATRA)诱导FLT3-ITD突变阳性和阴性白血病细胞株凋亡的比较(实验重复3次)

表1 全反式维甲酸(ATRA)对FLT3-ITD突变阳性和阴性白血病细胞株细胞内质网应激水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	MV4-11细胞			MOLM13细胞		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
BiP基因						
空白对照组	1.00±0.15	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.06	1.00±0.05
0.5 μmol/L ATRA组	1.74±0.15 ^b	2.33±0.13 ^c	2.50±0.11 ^c	1.49±0.05 ^b	2.24±0.09 ^c	2.41±0.12 ^c
1.0 μmol/L ATRA组	1.59±0.20 ^a	1.83±0.30 ^b	2.00±0.04 ^c	1.59±0.05 ^c	2.32±0.11 ^c	3.19±0.05 ^c
XBP1-s基因						
空白对照组	1.00±0.08	1.00±0.12	1.00±0.04	0.98±0.06	1.07±0.11	1.10±0.11
0.5 μmol/L ATRA组	0.81±0.07	1.12±0.14	0.87±0.04	1.22±0.08 ^a	2.22±0.26 ^b	1.74±0.14 ^b
1.0 μmol/L ATRA组	0.72±0.02	1.01±0.15	0.61±0.02	1.41±0.07 ^b	2.36±0.28 ^b	2.34±0.21 ^c
组别	RS4-11细胞			HL-60细胞		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
BiP基因						
空白对照组	1.00±0.36	1.00±0.14	1.00±0.07	1.00±0.03	1.00±0.15	1.00±0.14
0.5 μmol/L ATRA组	1.14±0.11	1.06±0.09	1.09±0.07	1.12±0.06	0.91±0.08	1.49±0.05
1.0 μmol/L ATRA组	1.17±0.07	1.19±0.06	1.12±0.04	1.21±0.08	1.28±0.05	1.57±0.12
XBP1-s基因						
空白对照组	1.00±0.10	1.00±0.11	1.00±0.13	1.00±0.15	1.00±0.17	1.00±0.17
0.5 μmol/L ATRA组	1.48±0.38	1.12±0.14	1.41±0.24	0.76±0.24	0.43±0.08 ^b	0.63±0.11 ^a
1.0 μmol/L ATRA组	1.34±0.25	1.25±0.12	1.18±0.17	0.69±0.14	0.36±0.06 ^b	0.67±0.07 ^a

注:表中的数据为BiP和XBP1-s基因的相对表达量,内参基因为GAPDH。与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.005$,^c $P < 0.001$

细胞的PERK磷酸化蛋白表达无明显变化(图2A);另外,ATRA处理后MV4-11和MOLM13细胞的BiP蛋白表达上升,eif2α蛋白磷酸化水平降低(图2B)。

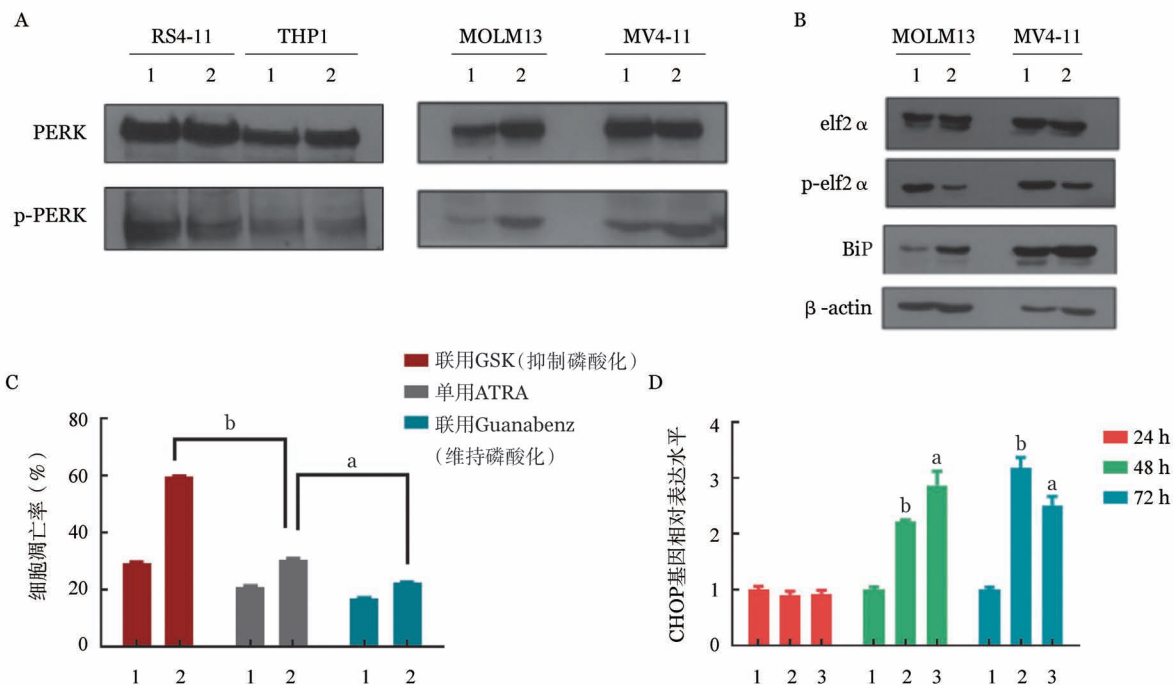
进一步使用GSK2606414(简称GSK,抑制eif2α磷酸化)和Guanabenz(维持eif2α磷酸化)分别干预eif2α的磷酸化。结果发现,将ATRA(0.5 μmol/L)与GSK(1.0 μmol/L)共处理MV4-11细胞72 h,其细胞凋亡率较单用ATRA时升高;而ATRA(0.5 μmol/L)与Guanabenz(17 μmol/L)共处理MV4-11细胞72 h,其细胞凋亡率较单用ATRA时下降。采用单因素方差分析不同处理组MV4-11细胞凋亡率,其差异具有统计学意义($F = 1656, P < 0.001$)。以单用ATRA组为对照,采用Dunnett's法两两比较,结果差异均具有统计学意义(P 值均 < 0.05)(图2C)。表明维持eif2α磷酸化可减弱ATRA的作用,ATRA通过抑制eif2α磷酸化作用于FLT3-ITD突变白血病细胞。RT-qPCR检测PERK通路下游与凋亡相关的靶基因CHOP,结果发现ATRA处理后的MV4-11细胞CHOP基因表达明显上调(图2D)($P < 0.05$)。

4. ATRA通过提高ERS水平自噬降解FLT3-ITD蛋白:4-苯基丁酸钠盐(4-PBA)是常用的ERS抑制剂。为探究ERS、ATRA和FLT3-ITD蛋白表达

三者的关系,将MV4-11细胞分为空白对照组、ATRA组和ATRA+4-PBA组,ARTA和4-PBA的剂量分别为0.5 μmol/L和2.5 mmol/L,细胞处理后避光培养72 h。Western blot检测结果显示:①与空白对照组比较,ATRA组的FLT3-ITD蛋白表达水平明显降低,而ATRA+4-PBA组的FLT3-ITD蛋白表达水平高于ATRA组,但较空白对照组低(图3A);②ATRA处理后,各组ERAD途径相关的ATF6蛋白表达量无明显变化(图3B)。另外,进一步检测ATRA处理后MV4-11和MOLM13细胞的ERAA途径相关的自噬标志物Atg5和Atg7的蛋白表达情况,Western blot结果显示,与空白对照组相比,ATRA组的Atg5和Atg7蛋白表达增高(图3C)。提示ATRA通过ERAA途径诱导FLT3-ITD蛋白自噬降解。

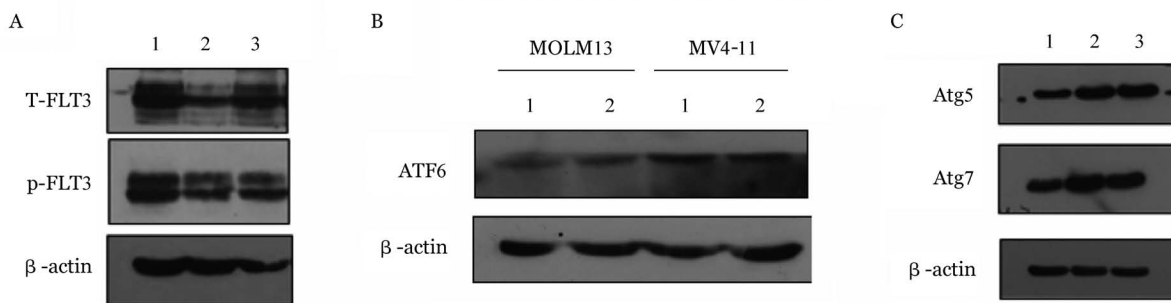
讨 论

本研究在前期研究^[16]的基础上,从ERS的角度深入探讨ATRA通过降低FLT3-ITD蛋白表达促进FLT3-ITD突变阳性白血病细胞凋亡的机制。结果显示,ATRA通过激活PERK/eif2α信号通路持续上调FLT3-ITD突变阳性细胞的ERS水平,通过ERAA



A: ATRA 作用于 FLT3-ITD 突变阳性和阴性白血病细胞株后 PERK 及其磷酸化蛋白的表达(1:空白对照组;2: ATRA 作用组); B: ATRA 作用于 FLT3-ITD 突变阳性细胞株后 BiP 和 eif2α 及其磷酸化蛋白的表达变化(1:空白对照组;2: ATRA 作用组); C: 干预 eif2α 蛋白的磷酸化后 ATRA 处理 MV4-11 细胞 72 h 对细胞凋亡率的影响(1:空白对照组;2: ATRA 作用组。与单用 ATRA 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$); D: ATRA 作用于 MV4-11 细胞后 CHOP 基因的表达情况(1:空白对照组;2: 0.5 μmol/L ATRA 作用组; 3: 1.0 μmol/L ATRA 作用组。与空白对照组比较, ^a $P < 0.005$, ^b $P < 0.001$)

图2 全反式维甲酸(ATRA)对FLT3-ITD突变阳性白血病细胞的PERK/eif2α信号通路的影响



A: ERS 水平对 ATRA 降低 MV4-11 细胞 FLT3-ITD 蛋白表达作用的影响(1:空白对照组;2: ATRA 作用组;3: ATRA+4-PBA 作用组); B: ATRA 对 FLT3-ITD 突变阳性 AML 细胞 ATF6 蛋白表达的影响(1:空白对照组;2: ATRA 作用组); C: ATRA 对 FLT3-ITD 突变阳性 MV4-11 细胞自噬相关蛋白 Atg5 和 Atg7 表达的影响(1:空白对照组;2: ATRA 作用 48 h 组;3: ATRA 作用 72 h 组)

图3 全反式维甲酸(ATRA)通过提高内质网应激(ERS)水平诱导FLT3-ITD突变蛋白自噬降解

途径诱导 FLT3-ITD 突变蛋白自噬降解,最终促进白血病细胞凋亡。

与正常细胞比较,多数肿瘤细胞 ERS 水平升高^[12]。研究表明,蛋白发生突变后,构象不稳定,在内质网中容易形成低聚物或聚合物,蓄积在内质网造成 ERS^[7]。Chunaram 等^[15]研究 FLT3 突变蛋白在细胞的分布发现,FLT3 发生 ITD 突变后,可自发形

成同源二聚体,并蓄积在内质网腔内,FLT3-ITD 突变阳性 AML 细胞的 ERS 水平可能较高。

临床上可利用肿瘤细胞 ERS 水平较高这一特点,用于肿瘤的治疗。研究显示,维莫非尼(vemurafenib)可通过提高 ERS 水平诱导 BRAFV600E 基因突变的黑色素瘤细胞凋亡^[18]。ATRA 常用于 APL 的治疗^[19],其主要机制是靶向融

合基因 PML-RAR α 中的 RAR α 部分,降解 PML-RAR α 蛋白,恢复野生型 PML 和 RAR α 基因的功能,诱导 APL 细胞分化成熟^[20]。近年研究还发现,ATRA 能提高 APL 细胞的 ERS^[17]。

ERS 过程中主要激活非折叠蛋白反应(unfolding protein response,UPR),包括 PRRK、ATF6 和 IRE1 α 通路,通过抑制翻译、协助蛋白正确折叠和激活蛋白发生泛素化和自噬降解,缓解 ERS。细胞在非 ERS 时,PERK、ATF6 和 IRE1 α 与免疫球蛋白结合分子(BIP/Grp78)结合,维持信号通路的非活化;ERS 时 UPR 信号通路被激活,BIP 与 PERK、ATF6 和 IRE1 α 分离且表达上调,XBP1-s 表达增加,PERK 和 ATF6 通路以及 XBP1-s 可进一步促进 BIP 的表达^[21-22]。因此 BIP 和 XBP1-s 常作为评估 ERS 水平的重要因子。本研究通过实验检测 ATRA 处理后白血病细胞 BIP 和 XBP1-s 的 mRNA 相对表达量变化情况,结果发现 ATRA 可上调 FLT3-ITD 突变阳性的白血病细胞 ERS,但对 FLT3-ITD 突变阴性的白血病细胞 ERS 无明显上调作用。证明 ATRA 可选择性地上调 FLT3-ITD 突变阳性的 AML 细胞系的 ERS 水平。

为此,我们提出一个问题:ATRA 调控 FLT3-ITD 白血病细胞 ERS 的信号通路是什么?有研究发现当细胞处于持续 ERS 时,PERK/eif2 α 通路起关键作用^[23]。当 PERK 磷酸化激活后,eif2 α 发生磷酸化改变,主要作用有:①抑制细胞大部分蛋白的翻译速率,缓和 ERS;②随后恢复 ATF4 蛋白表达,激活 GADD34 表达,eif2 α 进入去磷酸化状态,恢复胞内蛋白合成^[24-25],该负反馈机制在 ERS 缓解时起恢复细胞正常活动的作用。当内质网压力持续且无法缓解时,PERK/eif2 α 持续激活^[23],下游凋亡相关的靶基因 CHOP 大量表达,细胞稳态失衡,发生凋亡^[11]。本研究显示,ATRA 选择性地增强 FLT3-ITD 突变阳性 AML 细胞的 PERK 磷酸化,BiP 表达上调,提高 ERS 水平。另一方面,ATRA 抑制 eif2 α 磷酸化,使得细胞内蛋白继续大量合成,ERS 持续存在且难以缓解。我们在研究中还发现,ATRA 使 FLT3-ITD AML 细胞的 PERK 通路下游促凋亡基因 CHOP 基因表达明显上调,提示其诱导的细胞凋亡与 ERS 水平持续升高有关。

本课题组前期研究显示,ATRA 可降低 FLT3-ITD 突变蛋白表达^[16],但机制有待进一步阐明。有研究报道,ERS 可激活细胞内蛋白包括错误蛋白的降解,主要有 ERAD 和 ERAA 途径,前者与 ATF6 和 IRE1 α 通路介导的蛋白酶体途径相关,后者与 PERK

和(或)IRE1 α 通路或钙离子介导的巨自噬途径相关^[7]。本研究发现,ATRA 可降低 FLT3-ITD 蛋白的表达,其作用在高水平的 ERS 细胞内环境下更为明显,但主要通过 ERAA 通路相关的巨自噬而不是 ERAD 相关的泛素化-蛋白酶体途径降解。有研究表明^[7],蛋白发生突变后,构象不稳定,在内质网中容易形成低聚物或聚合物,蓄积在内质网内难以发生泛素化,较难通过 ERAD 途径(蛋白酶体相关)降解。FLT3-ITD 突变蛋白与野生型 FLT3 蛋白不同,会自发形成同源二聚体^[15],可解释 FLT3-ITD 主要不是通过 ERAD 途径降解的现象。ERAA 是与 PERK 通路相关的巨自噬途径^[7],本研究显示,ATRA 促进 PERK 磷酸化,激活 PERK 通路,并使自噬标志蛋白 Atg5 和 Atg7^[26] 表达上升,而与 ERAD 相关的 ATF6 蛋白无明显变化,提示 ATRA 降低 FLT3-ITD 蛋白的表达,与其上调的 ERS 水平相关,且主要通过激活 ERAA 途径自噬降解 FLT3-ITD。

综上,ATRA 可选择性地上调 FLT3-ITD 突变阳性 AML 细胞的 ERS 水平,导致 FLT3-ITD 自噬降解,最终促进白血病细胞凋亡。在 ERS 状态下,ATRA 的重要作用靶点是 ERS 的关键通路——PERK/eif2 α 通路,通过促进 PERK 磷酸化激活,抑制 eif2 α 磷酸化,使 FLT3-ITD 突变阳性 AML 细胞的 ERS 持续处于高水平,激活 ERAA 途径自噬降解 FLT3-ITD 蛋白,最终导致白血病细胞凋亡。本研究初步揭示了 ATRA 通过调控 ERS 诱导 FLT3-ITD 蛋白自噬降解促进白血病细胞凋亡的分子机制,为今后将 ATRA 用于临床治疗难治性 FLT3-ITD 突变阳性 AML 和改善预后提供初步实验依据。

参考文献

- [1] Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3 (9):650-665. DOI: 10.1038/nrc1169.
- [2] Staffas A, Kanduri M, Hovland R, et al. Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2011, 118(22):5905-5913. DOI: 10.1182/blood-2011-05-353185.
- [3] Marhäll A, Heidele F, Fischer T, et al. Internal tandem duplication mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 display a higher oncogenic potential than the activation loop D835Y mutation [J]. Ann Hematol, 2018, 97 (5):773-780. DOI: 10.1007/s00277-018-3245-5.
- [4] De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update [J]. Blood Cancer J, 2016, 6(7):e441. DOI: 10.1038/bcj.2016.50.

- [5] Wu X, Feng X, Zhao X, et al. Prognostic significance of FLT3-ITD in pediatric acute myeloid leukemia: a meta-analysis of cohort studies[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 420(1-2):121-128. DOI: 10.1007/s11010-016-2775-1.
- [6] Annesley CE, Brown P. The Biology and Targeting of FLT3 in Pediatric Leukemia[J]. *Front Oncol*, 2014, 4:263. DOI: 10.3389/fonc.2014.00263.
- [7] Ding WX, Yin XM. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome [J]. *Autophagy*, 2008, 4 (2):141-150. DOI: 10.4161/auto.5190.
- [8] Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (5):3867-3874. DOI: 10.1002/jcp.26137.
- [9] Lee WS, Yoo WH, Chae HJ. ER Stress and Autophagy [J]. *Cur Mol Med*, 2015, 15 (8): 735- 745. DOI: 10.2174/1566524015666150921105453.
- [10] Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9):663-674. DOI: 10.1038/nri2359.
- [11] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum [J]. *Genes Dev*, 1998, 12 (7):982-995. DOI: 10.1101/gad.12.7.982.
- [12] Mohamed E, Cao Y, Rodriguez PC. Endoplasmic reticulum stress regulates tumor growth and anti-tumor immunity: a promising opportunity for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(8):1069-1078. DOI: 10.1007/s00262-017-2019-6.
- [13] Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (17): 5943- 5947. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1606.
- [14] Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, et al. ER Stress and Disease: Toward Prevention and Treatment [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40 (9):1337-1343. DOI: 10.1248/bpb.b17-00342.
- [15] Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes [J]. *Mol Cell*, 2009, 36 (2): 326- 339. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.019.
- [16] Wang LN, Tang YL, Zhang YC, et al. Arsenic trioxide and all-trans-retinoic acid selectively exert synergistic cytotoxicity against FLT3-ITD AML cells via co-inhibition of FLT3 signaling pathways [J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58 (10):2426-2438. DOI: 10.1080/10428194.2017.1289522.
- [17] Masciarelli S, Capuano E, Ottone T, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide sensitize acute promyelocytic leukemia cells to ER stress [J]. *Leukemia*, 2018, 32 (2):285- 294. DOI: 10.1038/leu.2017.231.
- [18] Beck D, Niessner H, Smalley KS, et al. Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells [J]. *Sci Signal*, 2013, 6(260):ra7. DOI: 10.1126/scisignal.2003057.
- [19] Kawai Y, Watanabe K, Kizaki M, et al. Rapid improvement of coagulopathy by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia [J]. *Am J Hematol*, 1994, 46 (3):184- 188. DOI: 10.1002/ajh.2830460305.
- [20] Dos SGA, Kats L, Pandolfi PP. Synergy against PML-RAR α : targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(13):2793-2802. DOI: 10.1084/jem.20131121.
- [21] Bettigole SE, Glimcher LH. Endoplasmic reticulum stress in immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33:107- 138. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112116.
- [22] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7):519-529. DOI: 10.1038/nrm2199.
- [23] Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response [J]. *Science*, 2007, 318 (5852):944-949. DOI: 10.1126/science.1146361.
- [24] Han J, Back SH, Hur J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(5):481-490. DOI: 10.1038/ncb2738.
- [25] Novoa I, Zeng H, Harding HP, et al. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153 (5):1011-1022. DOI: 10.1083/jcb.153.5.1011.
- [26] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice [J]. *Nature*, 2006, 441 (7095):885- 889. DOI: 10.1038/nature04724.

(收稿日期:2020-06-18)

(本文编辑:王叶青)