

羟氯喹逆转慢性髓性白血病细胞 K562/IMA 对伊马替尼耐药的作用机制研究

杨毅 李文燕 盛泳佳 王瑾 陈启绪 韩晨阳

【摘要】目的 探讨羟氯喹逆转慢性髓性白血病细胞 K562/IMA 对伊马替尼(IMA)耐药的作用机制。**方法** 体外培养人慢性髓性白血病细胞 K562/IMA(对 10 μ mol/L 的 IMA 耐药),将细胞分为对照组(Con 组)、IMA 干预组(IMA 组)、羟氯喹 + IMA 干预组(HCQ+IMA 组),并在含相关药物的培养液中继续培养。采用 CCK-8 法检测细胞增殖率的变化,Annexin V-FITC/PI 染色后流式细胞术检测细胞凋亡率,Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力,免疫荧光法染色检测细胞自噬激活标志蛋白 LC3 I / II 的表达,MDC 染色检测细胞自噬酸性囊泡的产生,Western blot 法检测细胞自噬相关蛋白 p62、Beclin-1 及凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 的表达。**结果** IMA 组细胞增殖率明显高于 HCQ+IMA 组($P<0.05$),细胞凋亡率明显低于 HCQ+IMA 组($P<0.05$)。HCQ+IMA 组细胞侵袭能力明显低于 IMA 组($P<0.05$)。HCQ+IMA 组细胞 LC3 I / II 蛋白表达下调,酸性囊泡形成水平降低,与 IMA 组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。HCQ+IMA 组细胞 p62 蛋白表达水平高于 IMA 组($P<0.05$),而 Beclin-1 蛋白表达水平低于 IMA 组($P<0.05$),同时凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Caspase-9 的表达水平高于 IMA 组(均 $P<0.05$),抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平低于 IMA 组($P<0.05$)。**结论** 羟氯喹可以逆转 IMA 耐药 CML K562 细胞对 IMA 的敏感性,其作用机制或与抑制细胞自噬有关。

【关键词】 伊马替尼 羟氯喹 慢性髓性白血病 细胞自噬

Mechanism of hydroxychloroquine in reversing resistance to imatinib of chronic myeloid leukemia K562/IMA cells YANG Yi, LI Wenyan, SHENG Yongjia, et al. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China

【Abstract】Objective To study the mechanism of hydroxychloroquine in reversing resistance to imatinib of chronic myeloid leukemia K562/IMA cells. **Methods** The cultured human chronic myelogenous leukemia K562/IMA cells (resistant to imatinib IMA at 10 micromol/L) were divided into control group (Con group), imatinib treatment group (IMA group) and hydroxychloroquine + imatinib treatment group (HCQ + IMA group). CCK-8 method was used to detect the cell viability, annexin V-FITC/PI staining was used to detect the apoptotic rate, and Transwell chamber test was used to detect the ability of cell invasiveness. The expression of LC3 protein was detected by immunofluorescence staining and the production of autophagic acidic vesicles was detected by MDC staining. Western-blot was used to detect the expression levels of autophagy-related protein p62, Beclin-1, apoptosis-related protein Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9. **Results** The cell viability of IMA group was significantly higher than that of HCQ + IMA group, and the apoptotic rate of IMA group was significantly lower than that of HCQ + IMA group ($P<0.05$). The expression of LC3 and acidic vesicle formation in HCQ + IMA group were significantly lower than those in IMA group ($P<0.05$). The invasive ability of HCQ + IMA group was significantly lower than that of IMA group ($P<0.05$). In HCQ + IMA group, the level of autophagic substrate p62 was higher than that in IMA group, while the level of autophagic protein Beclin-1 was lower than that in IMA group ($P<0.05$), while the levels of apoptotic proteins Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were higher than those in IMA group, and the level of inhibiting apoptotic protein Bcl-2 was lower than that in IMA group($P<0.05$). **Conclusion** Hydroxychloroquine can reverse the sensitivity of IMA-resistant CML K562 cells to IMA, and its mechanism may be related to the inhibition of autophagy.

【Key words】 Imatinib Hydroxychloroquine Chronic myeloid leukemia Autophagy

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.15.2019-438

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY804);嘉兴市科技计划项目(2018AY32009)

作者单位:314001 嘉兴市第二医院药学部(杨毅、李文燕、盛泳佳、王瑾、韩晨阳);山东省科学院(陈启绪)

通信作者:韩晨阳, E-mail:691513770@qq.com

慢性髓性白血病(CML)是造血干细胞异常转化而产生的一种髓系恶性克隆白血病,遗传学特征表现为 t(9;22)(q34;q11)易位,产生 BCR-ABL 融合基因,该融合基因翻译的蛋白属于非受体酪氨酸激酶,其二聚体形式可以导致底物蛋白酪氨酸残基磷酸化,激活多条信息传递途径,干扰细胞的基本活动^[1-2]。目前临床治疗 CML 的方法包括以羟基脲为主要药物的化疗、INF- α 以及异基因造血干细胞移植等^[3-4]。伊马替尼(IMA)作为选择性的酪氨酸激酶抑制剂,是 CML 首选靶向治疗药物,对初发慢性期 CML 患者可达到完全细胞遗传学反应(CCR),1 年无病生存率可达到 100%^[5-6]。然而,IMA 的耐药现象在临床中也并不鲜见。研究发现,IMA 的耐药过程牵涉多种机制, α -1 酸性糖蛋白 AGP 的产生、耐药基因 MDR-1 的过度表达、BCR-ABL 基因扩增或突变是耐药产生的主要原因^[7]。因此,如何治疗 IMA 耐药的 CML 是当前临床研究的热点。

近年研究发现,细胞自噬性耐药或是耐药产生的一大机制。铂类药物、烷化剂等耐药与细胞自噬的诱导有关,CML 化疗常用药物紫杉醇可以通过细胞自噬激活产生耐药^[8]。而临床应对此种耐药常常会联合使用自噬抑制剂。研究发现,紫杉醇耐药的 CML 细胞 K562 采用羟氯喹预处理,可以显著提高细胞的药物敏感性,机制在于羟氯喹抑制酸性囊泡的产生,间接抑制细胞自噬的发生^[9-10]。基于此,本研究将细胞自噬抑制剂羟氯喹联合伊马替尼作用于 CML K562/IMA 细胞株,观察其对该细胞株耐药的影响,并探讨其作用机制,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 CML K562/IMA 细胞株(嘉兴市第二医院实验室自备,对 10 μ mol/L 的 IMA 耐药),IMA 和羟氯喹标准品(北京中科质检生物技术有限公司,批号 7330441、100582),CCK-8 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号 C0037),Transwell 小室(康宁公司),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(美国 BD 公司),单丹磺酰尸胺(MDC)染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号 25875),免疫荧光染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号 P0179),LC3 I/II、p62、Beclin-1 以及 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 的单克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号 4108、39749、3495、2772、3498、9662、9502)。电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,型号 ME204E),DP11 显微镜(日本奥林巴斯公司),PCR 仪(型号 BS97MyCycler),Western blot 电泳仪(型

号 1658001),FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 K562/IMA 细胞株复苏后,采用 RPMI 1640 完全培养基+10% FBS 培养,待细胞生长至对数期后,将细胞分为对照组(Con 组)、IMA 干预组(IMA 组)、羟氯喹+IMA 干预组(HCQ+IMA 组)。Con 组为常规培养的细胞,无药物干预;IMA 组采用含 10 μ mol/L IMA 的培养基培养;HCQ+IMA 组采用含 10 μ mol/L 羟氯喹的培养基培养(预处理)12h 后,再用含 10 μ mol/L IMA 的培养基培养。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖率 将对数生长期的 K562/IMA 细胞接种到 96 孔板中,IMA 组和 HCQ+IMA 组采用含 10 μ mol/L IMA 的培养基培养。设置时间点为 0、6、12、18、24、30、36h,待培养完成后加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液,继续培养 4h,用酶标仪在 480nm 处检测吸光度(A 值)。细胞增殖率(%)=[A(加药)-A(空白)]/[A(对照)-A(空白)] $\times$ 100%

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 染色后流式细胞术检测细胞凋亡率 将对数生长期的 K562/IMA 细胞接种到 6 孔板中,IMA 组和 HCQ+IMA 组采用浓度为 10 μ mol/L 的 IMA 干预,加药后培养 24h,收集细胞后加入 Binding Buffer 重悬。而后加入 Annexin V-FITC 液 10 μ l 混匀,避光反应 10min,再加入 10 μ l 的 PI 染色避光反应 10min,PBS 洗去多余染色液后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力 将对数生长期的 K562/IMA 细胞加入 Transwell 小室,IMA 组和 HCQ+IMA 组采用含 10 μ mol/L IMA 的培养基培养,培养基中不加 FBS,而 24 孔板下室加入完全培养基,培养基含 10%的 FBS,待培养 24h 后取出小室,弃去培养基,甲醇固定后用 0.1%的结晶紫染色,棉签擦去上层未迁移的细胞后镜下观察。

1.2.5 免疫荧光染色检测细胞自噬激活标志蛋白 LC3 I/II 表达 将对数生长期的 K562/IMA 细胞接种到 6 孔板中,IMA 组和 HCQ+IMA 组采用含 10 μ mol/L IMA 的培养基培养,将细胞培养基弃去,用甲醇固定后自然干燥,PBS 洗 3 次,1%的 Triton 液处理 30min,羊血清处理 30min,LC3 I/II 一抗(1:500)稀释后在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,次日用 PBS 洗净一抗,二抗标记后晾干封片;使用荧光分光光度计检测荧光强度。

1.2.6 MDC 染色检测细胞酸性囊泡 将对数生长期的 K562/IMA 细胞接种到 6 孔板中,IMA 组和 HCQ+IMA 组采用含 10 μ mol/L IMA 的培养基培养 6h 后弃去培养

基,用去离子水稀释漂洗液 Wash Buffer(1:1 稀释),细胞用稀释后的 Wash Buffer 重悬后调整细胞浓度为 $10^6/\text{ml}$,加入 MDC 染色液染色后室温避光染色 30min,染色后用 Wash Buffer 清洗,滴加细胞液在载玻片上,荧光显微镜下观察,激发波长为 355nm,阻断波长为 512nm,计染色阳性(黄绿色)细胞数。

1.2.7 Western blot 法检测细胞自噬相关蛋白 p62、Beclin-1 及凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 的表达 将对数生长期的 K562/IMA 细胞接种到 6 孔板中,IMA 组和 HCQ+IMA 组采用含 $10\mu\text{mol/L}$ IMA 的培养基培养 24h 后收集各组细胞。PBS 洗 2 次后,在冰上加入 NP-40 裂解液 $100\mu\text{l}$ 裂解 30min,3 000r/min 离心后收集上清液;BCA 法进行蛋白定量后调整蛋白浓度,根据蛋白分子量分别配置 8%~12% 的 SDS-PAGE 凝胶,取蛋白液用 5 $\times$ 上样缓冲液 Loading Buffer 补充体积至 $20\mu\text{l}$,煮沸 8min 后进行电泳,电压 80V,之后转换为 120V,将凝胶去除后进行 PVDF 膜的转膜;采用 300mA 恒流转膜 0.5~2h,PVDF 膜使用 5%脱脂奶粉封闭 2h;TBST 稀释一抗,一抗孵育后 PVDF 膜用 TBST 洗 2 次再用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育。孵育完成后用化学发光法检测,采用 Image Pro-Plus 6.0 软件进行光密度分析,以 GAPDH 为内参,结果以目的蛋白与内参蛋白光密度值比表示。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件;计量资

料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组细胞增殖率比较 见图 1。

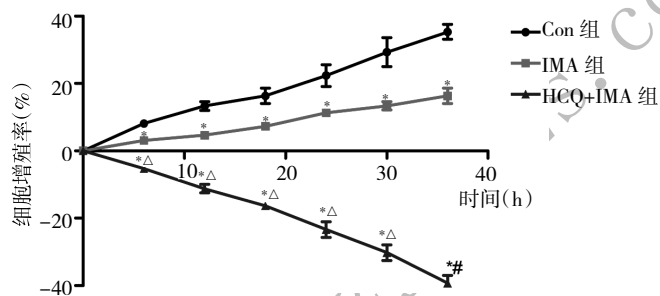


图 1 3 组细胞增殖率比较(与 Con 组比较,* $P<0.05$;与 IMA 组比较, $\Delta P<0.05$)

由图 1 可见,培养 6、12、18、24、30、36h 时,3 组细胞增殖率比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且 $\text{HCQ+IMA 组} < \text{IMA 组} < \text{Con 组}$ (均 $P<0.05$)。Con 组细胞 0~36h 时间段内呈增殖状态,随着时间的延长,细胞增殖率增高;IMA 组细胞随着时间的延长,细胞增殖率无明显变化,说明细胞生长受到抑制;HCQ+IMA 组细胞随着时间的延长,细胞增殖率出现负增长,且细胞活力逐渐降低。这说明,羟氯喹预处理后,IMA 可以明显抑制 K562/IMA 细胞的增殖。

2.2 3 组细胞凋亡率比较 见图 2。

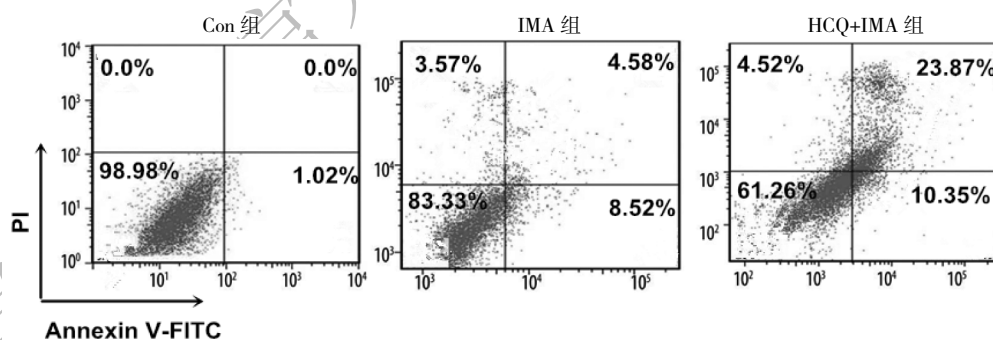


图 2 3 组细胞流式细胞图比较

由图 2 可见,Con、IMA、HCQ+IMA 组细胞凋亡率分别为 $(0.98\pm 0.22)\%$ 、 $(15.35\pm 2.14)\%$ 、 $(38.65\pm 5.32)\%$,3 组细胞凋亡率比较差异有统计学意义($P<0.05$),且 $\text{HCQ+IMA 组} > \text{IMA 组} > \text{Con 组}$ (均 $P<0.05$)。

2.3 3 组细胞侵袭能力比较 见图 3。

由图 3 可见,Con、IMA、HCQ+IMA 组细胞迁移数目分别为 (59.32 ± 8.32) 、 (63.22 ± 7.52) 、 (25.32 ± 5.32) 个/视野,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);两两比较,

$\text{HCQ+IMA 组} < \text{Con 组}$ ($P<0.05$), $\text{HCQ+IMA 组} < \text{IMA 组}$ ($P<0.05$),Con 组与 IMA 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。即 HCQ+IMA 组细胞侵袭能力低于 Con、IMA 组。

2.4 3 组细胞自噬激活标志蛋白 LC3 I/II 表达情况比较 见图 4。

由图 4 可见,Con 组细胞 LC3 I/II 蛋白为阴性表达,细胞中几乎无 LC3 I/II 蛋白的表达,说明细胞自噬

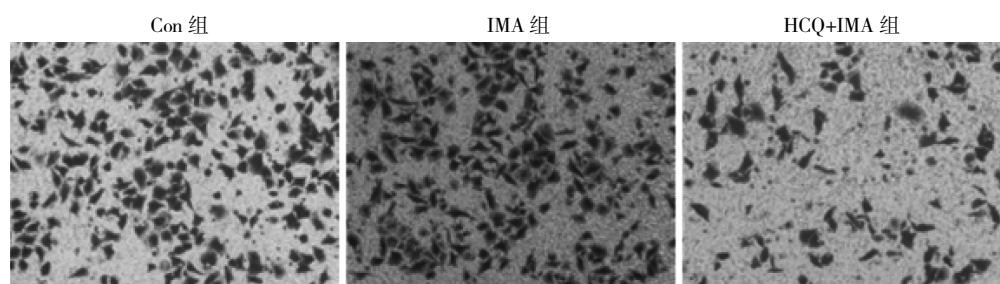


图 3 Transwell 小室检测 3 组细胞侵袭能力显微镜下所见(结晶紫染色, ×200)

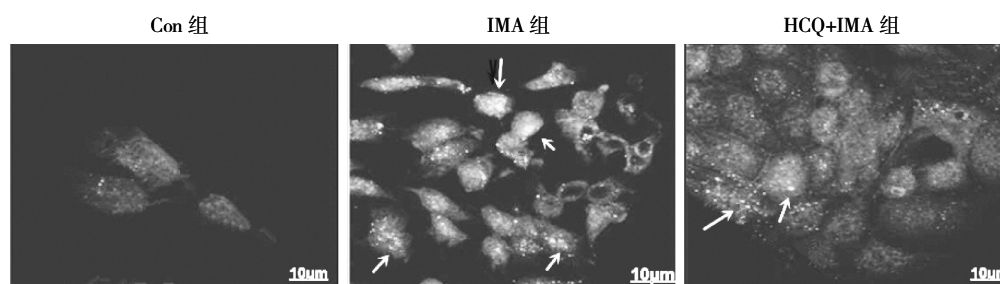


图 4 3 组细胞自噬激活标志蛋白 LC3 I/II 表达情况比较(免疫荧光染色, ×400)

未激活; IMA 组细胞 LC3 I/II 蛋白荧光强度明显高于 Con 组; 而 HCQ/IMA 组细胞与 IMA 组比较, LC3 蛋白

荧光强度明显降低, 说明细胞自噬受到了抑制。

2.5 3 组细胞酸性囊泡染色阳性细胞数比较 见图 5。

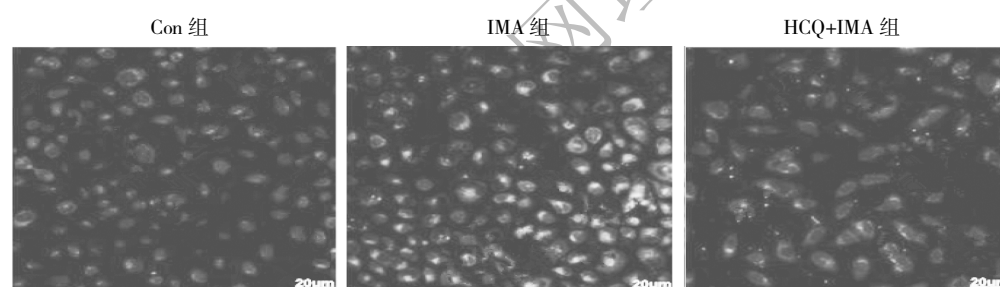
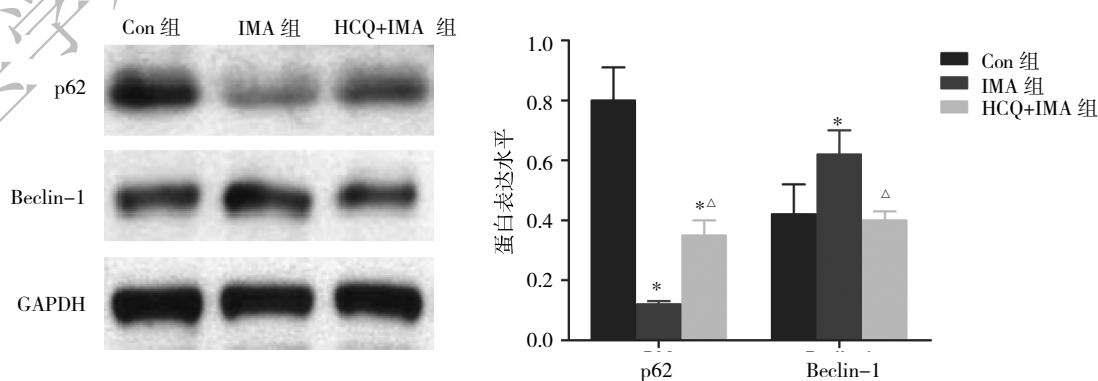


图 5 3 组细胞酸性囊泡染色阳性细胞数比较(MDC 染色, ×200)

由图 5 可见, Con、IMA、HCQ+IMA 组酸性囊泡染色阳性细胞数分别为 (16.36 ± 2.56) 、 (56.35 ± 6.68) 、 (35.65 ± 3.25) 个/视野, 3 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 IMA 组 $>$ HCQ+IMA 组 $>$ Con 组 (均 $P < 0.05$)。即羟

氯喹干预后可以减少细胞中酸性囊泡的形成。

2.6 3 组细胞自噬相关蛋白 p62、Beclin-1 及凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 表达情况比较 见图 6-7。

图 6 3 组细胞自噬相关蛋白 p62、Beclin-1 表达情况比较(与 Con 组比较, $*P < 0.05$; 与 IMA 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$)

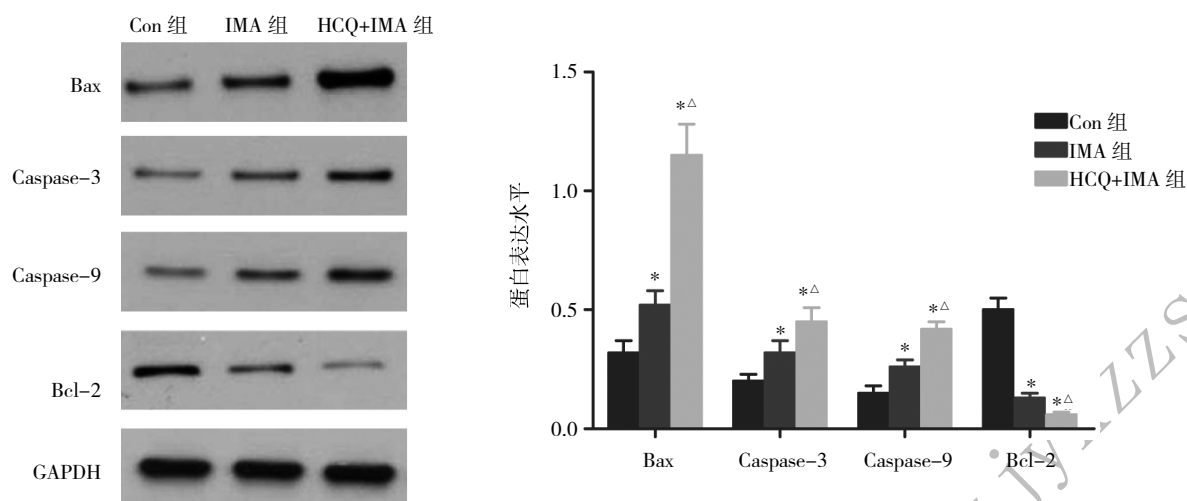


图 7 3 组细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 表达情况比较(与 Con 组比较, * $P<0.05$; 与 IMA 组比较, $\Delta P<0.05$)

由图 6 可见, 3 组细胞自噬相关蛋白 p62、Beclin-1 表达水平比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。细胞自噬底物蛋白 p62 表达水平两两比较, Con 组 (0.80 ± 0.11) > HCQ+IMA 组 (0.35 ± 0.05) > IMA 组 (0.12 ± 0.11) (均 $P<0.05$)；自噬启动调节蛋白 Beclin-1 表达水平两两比较, IMA 组 (0.62 ± 0.08) > Con 组 (0.42 ± 0.10)、HCQ+IMA 组 (0.40 ± 0.03) (均 $P<0.05$)，而 Con 组与 HCQ+IMA 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。由图 7 可见, 3 组细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 表达水平比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Caspase-9 表达水平两两比较, Con 组 (0.32 ± 0.05 、 0.20 ± 0.03 、 0.15 ± 0.03) < IMA 组 (0.52 ± 0.06 、 0.32 ± 0.05 、 0.26 ± 0.03) < HCQ+IMA 组 (1.15 ± 0.13 、 0.45 ± 0.06 、 0.42 ± 0.03) (均 $P<0.05$)；抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平两两比较, Con 组 (0.50 ± 0.05) > IMA 组 (0.13 ± 0.02) > HCQ+IMA 组 (0.06 ± 0.01) (均 $P<0.05$)。

3 讨论

20 世纪 90 年代问世的 IMA 是一种选择性的酪氨酸激酶抑制剂, 大量的临床试验已经证明, 400mg/d 剂量的 IMA 长期服用可以使得 80% 以上的初发期 CML 患者达到 CCR, 而急性期的患者可以到 34% 以上, 是一种治疗 CML 的有效药物。但是长期使用 IMA, 部分患者会出现耐药, 这种耐药主要指慢性期患者未出现完全血液学反应或者加速期和急变期患者未有效达到慢性期^[11]。对于 IMA 的耐药, 目前临床应对方法十分有限, 加大 IMA 剂量是常用的方法。有研究发现, IMA 剂量增加到 600mg/d 或 800mg/d 对 30%~50% 继发性耐药

患者有效, 但是持续时间较短, 且往往还会增加不良反应的发生^[12-13], 所以该方法的可行性还有待进一步研究。也有研究发现, 对于 IMA 耐药可以采用与信号传导通路的抑制剂联用, 比如 Ras 途径抑制剂、PI3K 途径抑制剂等^[14], 但是该类药物联合使用的作用机制未明, 临床推广需要进一步深入的研究。

细胞自噬是细胞适应性生长、分化、凋亡所必须的一种生理现象。在肿瘤组织中, 细胞自噬起到双重作用, 一方面细胞自噬可以保护正常细胞, 抑制肿瘤细胞的生长, 另一方面可以抵制外界环境对于肿瘤细胞的损伤, 进一步促进肿瘤细胞的生长。近年研究发现, 在肿瘤耐药中, 细胞自噬起了关键的作用^[15-16]。MYC 抑制剂预处理人前列腺上皮细胞后, 对雷帕霉素不敏感, 细胞自噬水平降低^[17]。急性淋巴细胞白血病细胞会通过自噬对糖皮质激素产生耐药^[18]。而细胞自噬的产生和用药剂量及用药时长有关。有研究发现, 小剂量的抗肿瘤药物使用可以使肿瘤细胞迅速启动自噬, 细胞通过自噬清除损伤的细胞器等, 从而获得更好的抗性^[19]。

笔者团队在前期研究中发现, 抑制 Beclin-1 基因的表达可以提高 K562/IMA 细胞对于 IMA 的敏感性^[20]。这提示, 细胞自噬的激活在 K562 细胞对 IMA 耐药中起一定的作用。羟氯喹是一种临床常用的类风湿性关节炎治疗药物。本研究结果显示, 羟氯喹可以抑制 K562/IMA 细胞自噬过程中酸性囊泡的产生, 抑制自噬流的传递。本研究将羟氯喹联合 IMA 作用于 K562/IMA 细胞, 结果发现, 羟氯喹预处理后可以显著提高细胞对于 IMA 的敏感性, 细胞凋亡率增高, 同时增殖率下降, 相比单用 IMA 具有明显差异。IMA 处理 K562/IMA 细胞可以提高 LC3 I/II 蛋白的表达。LC3 I/II 是自噬激

活的标志蛋白,用于自噬体的形成,而使用羟氯喹预处理后,LC3 I/II 蛋白的表达明显受抑制。p62 是自噬底物蛋白,在自噬发生后表达降低,而羟氯喹预处理后可以提高 K562/IMA 细胞 p62 表达水平;同时,细胞凋亡相关蛋白表达水平提高。这可以说明,K562/IMA 细胞启动了凋亡程序,IMA 在耐药株中重新获得了细胞杀伤的能力。

综上所述,本研究结果显示,羟氯喹可以逆转 IMA 耐药的 CML K562 细胞对 IMA 的敏感性,其作用机制或与抑制细胞自噬有关。

4 参考文献

- [1] Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial[J]. *Leukemia*, 2016, 30(5):1044-1052. DOI:10.1038/leu.2016.5.
- [2] Saubelle S, Richter J, Hochhaus A, et al. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2016, 30(8):1638-1647. DOI:10.1038/leu.2016.115.
- [3] Jabbour, Elias. Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice[J]. *American Journal of Hematology*, 2016, 91(1):59-66. DOI:10.1002/ajh.24249.
- [4] Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence[J]. *Blood*, 2017, 129(12):1595-1606. DOI:10.1182/blood-2016-09-696013.
- [5] Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 376(10):917-927. DOI:10.1056/NEJMoa1609324.
- [6] Dibaba NJ. First-line treatment of chronic myeloid leukemia: imatinib versus nilotinib and dasatinib[J]. *Community Oncology*, 2011, 8(2):65-72. DOI:10.1016/S1548-5315(12)70039-6.
- [7] Thomas J, Wang L, Clark RE, et al. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M Active transport of imatinib into and out of cells: Implications for drug resistance[J]. *Blood*, 2005, 104(12):3739-3745. DOI:10.1182/blood-2003-12-4276.
- [8] Eum KH, Lee M. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2011, 348(1-2):61-68. DOI:10.1007/s11010-010-0638-8.
- [9] 夏靖燕. 紫杉醇联合阿霉素、阿糖胞苷对白血病细胞株(K562、HL-60)增殖抑制作用的研究[D]. 浙江大学, 2003.
- [10] 王菲菲. 羟氯喹抑制自噬活性逆转白血病 K562/ADM 细胞耐药性[D]. 2016.
- [11] Miranda MB, Lauseker M, Kraus MP, et al. Secondary malignancies in chronic myeloid leukemia patients after imatinib-based treatment- long-term observation in CML Study IV [J]. *Leukemia*, 2016,352(11):185-196. DOI:10.1038/leu.2016.20.
- [12] Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial [J]. *The Lancet*, 2005, 364(9440):1127-1134. DOI:10.1016/S0140-6736(04)17098-0.
- [13] Blanke CD, Demetri GD, Von Mehren M, et al. Long-Term Results From a Randomized Phase II Trial of Standard-Versus Higher-Dose Imatinib Mesylate for Patients With Unresectable or Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors Expressing KIT [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, 26(4):620-625. DOI:10.1200/jco.2007.13.4403.
- [14] Suzuki M, Abe A, Imagama S, et al. BCR-ABL-independent and RAS/MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4[J]. *European Journal of Haematology*, 2010, 84(3):229-238. DOI:10.1111/j.1600-0609.2009.01387.x.
- [15] Cheng CY, Liu JC, Wang JJ, et al. Autophagy inhibition increased the anti-tumor effect of cisplatin on drug-resistant esophageal cancer cells[J]. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 2017, 31(3):645-652.
- [16] O'Donovan, Tracey R, O'Sullivan, et al. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics [J]. *Autophagy*, 2011, 7(5):509-524. DOI:10.4161/auto.7.5.15066.
- [17] Wall M, Poortinga G, Hannan KM, et al. Translational control of c-MYC by rapamycin promotes terminal myeloid differentiation[J]. *Blood*, 2008, 112(6):2305-2317. DOI:10.1182/blood-2007-09-111856.
- [18] Choi BR, Kwon JH, Gong SJ, et al. Expression of glucocorticoid receptor mRNAs in glucocorticoid-resistant nasal polyps [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2006, 38(5):466-473. DOI:10.1038/emmm.2006.55.
- [19] Cheng CY, Liu JC, Wang JJ, et al. Autophagy inhibition increased the anti-tumor effect of cisplatin on drug-resistant esophageal cancer cells[J]. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 2017, 31(3):645-652.
- [20] 韩晨阳, 杨毅, 郭丽, 等. 自噬基因 Beclin1 抑制后增强人髓性白血病耐药细胞 K562/IMA 对于伊马替尼的药物敏感性[J]. *中国药理学杂志*, 2019, 54(4): 284-290. DOI:CNKI:SUN:ZGYX.0.2019-04-021.

(收稿日期:2019-02-13)

(本文编辑:李媚)