

左旋门冬酰胺酶对伯基特淋巴瘤细胞株增殖、细胞周期及凋亡的影响

涂冬云^{1,2} 张猛¹ 尹纹静¹ 徐林艳¹ 桑威¹ 李振宇¹ 徐开林¹

¹徐州医科大学血液病研究所,徐州医科大学附属医院细胞研究和转化医学中心,徐州医科大学附属医院血液科,徐州 221000;²南京中医药大学附属盐城市中医院心内科,盐城 224000

通信作者:徐开林,Email:lihmd@163.com

【摘要】 目的 探讨左旋门冬酰胺酶对伯基特淋巴瘤细胞株增殖、细胞周期和凋亡的影响及其作用机制。方法 应用CCK-8法检测左旋门冬酰胺酶对伯基特淋巴瘤细胞株细胞增殖的影响,流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期,实时定量PCR和Western blot检测分析细胞周期、凋亡、自噬和PI3K/Akt/mTOR信号通路中各种分子的表达变化。结果 左旋门冬酰胺酶明显抑制多种伯基特淋巴瘤细胞株的增殖,并引起细胞周期G₀/G₁期阻滞,诱导细胞凋亡和自噬。进一步结果表明左旋门冬酰胺酶抑制c-Myc的表达,同时抑制p-PI3K、p-Akt-S473、p-mTOR、p-70S6K和p-4E-BP1的表达。PI3K抑制剂LY294002联合左旋门冬酰胺酶进一步诱导了细胞凋亡。此外,左旋门冬酰胺酶抑制STAT和ERK信号通路。结论 左旋门冬酰胺酶抑制伯基特淋巴瘤细胞株细胞增殖和G₀/G₁期细胞阻滞,诱导自噬和凋亡并通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路调控细胞凋亡。

【关键词】 伯基特淋巴瘤; 左旋门冬酰胺酶; 细胞凋亡

基金项目:江苏省科技厅社会发展重点项目(BE2019638);江苏省自然科学基金(BK20171181、BK20170257);江苏省青年医学重点人才(QNRC2016791)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.11.008

Effects of L-asparaginase on proliferation, cell cycle and apoptosis of Burkitt lymphoma cell lines

Tu Dongyun^{1,2}, Zhang Meng¹, Yin Wenjing¹, Xu Linyan¹, Sang Wei¹, Li Zhenyu¹, Xu Kailin¹

¹Institute of Hematology, Xuzhou Medical University, Cell Research and Transformation Center, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Department of Hematology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China; ²Department of Cardiology, Yancheng TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Yancheng 224000, China

Corresponding author: Xu Kailin, Email: lihmd@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of L-asparaginase on the proliferation, cell cycle, and apoptosis of Burkitt lymphoma cell lines and explore the molecular mechanism. **Methods** The effect of L-asparaginase on the cell proliferation of Burkitt lymphoma cell lines was detected using the CCK-8 method. The apoptosis rate and cell cycle were detected using flow cytometry. The expression of related molecules in cell cycle, apoptosis, autophagy, and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway was detected and analyzed using qPCR and Western blot assay. **Results** L-asparaginase significantly inhibited the proliferation of Burkitt lymphoma cell lines and caused cell cycle arrest at G₀/G₁ phase. L-asparaginase induced cell apoptosis and autophagy in Burkitt lymphoma cell lines. Further results showed that L-asparaginase inhibited the expression of c-Myc and also inhibited the expression of p-PI3K, p-Akt-S473, p-mTOR, p-70S6K, and p-4E-BP1. Combining PI3K inhibitor LY294002 with L-asparaginase further induced apoptosis. Additionally, L-Asp inhibited STAT and ERK signaling pathways. **Conclusion** L-asparaginase inhibited Burkitt lymphoma cell proliferation, arrested cell cycle, activated autophagy, and induced apoptosis by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

【Key words】 Burkitt lymphoma; L-asparaginase; Apoptosis

Fund program: Social Development Key Project of Jiangsu Provincial Science and Technology Department (BE2019638); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20171181, BK20170257); Key Young Medical Talents of Jiangsu Province (QNRC2016791)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.11.008

伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)是一种高度侵袭性B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)。根据临床和生物学特征, BL分为三种亚型:地方型、散发型和免疫缺陷相关型^[1]。地方型流行于非洲, 90%以上与EB病毒(EBV)感染相关;散发型最为常见, 15%左右与EBV相关;在免疫功能低下的患者中, BL主要与人类免疫缺陷病毒(HIV)感染相关, 其中40%~50% EBV阳性^[2]。目前短疗程、高强度的化疗方案对此病治疗效果尚可, 但化疗相关不良反应在中老年人和免疫抑制患者中十分显著^[3-4]。部分BL患者, 尤其是EBV阳性患者, 仍然存在较高的难治愈复发风险^[5]。因此有必要开发不良反应较小而治愈率较高的治疗方案。

阻断氨基酸合成的抗代谢药物已被开发并应用于多种肿瘤治疗^[6-7], 其中左旋门冬酰胺酶(L-Asp)可以耗竭天门冬酰胺和谷氨酰胺^[8], 是治疗急性淋巴细胞白血病(ALL)、NK/T细胞淋巴瘤(NKTCL)等血液系统恶性肿瘤的核心化疗药物^[9-11]。流行病学学数据表明, NKTCL的发病与EBV感染密切相关^[12]。鉴于BL和NKTCL都是与EBV高度相关的淋巴瘤, 我们尝试探索L-Asp对BL细胞株的作用, 并对其相关机制进行研究。

BL的特征是c-Myc基因的易位和重排, 导致c-Myc的结构性过表达^[13]。MYC基因家族通过改变生物能量及代谢激活原癌基因并抑制抑癌基因, 调控细胞增殖^[14]。既往研究已经确定PI3K信号是成熟B细胞中B细胞受体(BCR)介导的生存信号^[15], PI3K信号可以通过阻断c-Myc的降解维持c-Myc的活性^[16-17]。ERK信号通路与多种细胞活动有关, 包括细胞增殖、分化、存活、死亡和转化^[18]。信号转导和转录激活因子3(STAT3)是Janus激酶(JAK)/STAT信号通路中重要且研究最多的转录因子^[19]。肿瘤细胞常存在STAT3蛋白的异常持续活化, 与淋巴造血组织肿瘤的关系尤为密切^[20]。综上, 我们进一步探索了L-Asp对BL细胞株c-Myc表达、PI3K/Akt/mTOR信号通路、ERK信号通路、STAT3信号通路的影响。

材料与方法

1. 试剂:L-Asp购自中国广东广州明星药业有限公司, IMDM培养液购自美国Hyclone公司, 胎牛

血清(FBS)购自美国Gibco公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司, CCK-8试剂盒为日本同仁化学研究所产品。Annexin V/7-AAD试剂盒为美国Becton Dickinson公司产品, 碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自美国Sigma公司, 抗体P21、P27、DR5、Caspase-8、Caspase-3、PARP、Mcl-1、XIAP、Bax、Bim、Noxa、Cytochrome C、LC3B、ATG7、p-PI3K、p-Akt-S473、Akt、p-mTOR、p-70S6K、p-4E-BP1、p-STAT3、STAT3、p-ERK、ERK、ACTB均购自美国Cell Signaling Technology公司, 辣根过氧化物酶标记二抗购自美国Bio-Rad公司。

2. 细胞培养:人BL细胞株Raji、Namalwa和CA46用含10%FBS的IMDM培养液, 于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 每日于电子显微镜下观察细胞的生长状态, 2~3d按1:3的比例进行传代培养。

3. CCK-8法检测细胞增殖:将密度 2×10^4 /ml的细胞悬液按100 μl/孔接种于96孔板, 处理组每孔加入指定浓度的L-Asp, 同时设立空白组和阴性对照组, 每组设3个复孔, 培养24 h或48 h。每孔加入10 μl CCK-8溶液, 在培养箱内孵育2 h, 用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A₄₅₀)值。本实验设空白组、阴性对照组、药物处理组。按下列公式计算细胞增殖率:细胞增殖率(%)=[(药物处理组A₄₅₀-空白组A₄₅₀)/(阴性对照组A₄₅₀-空白组A₄₅₀)]×100%

4. 细胞周期的流式细胞术检测:取对数生长期的细胞接种于12孔板中(每孔 1×10^6 个细胞), 分为对照组和L-Asp处理组, 24 h后收集细胞, 计数 1×10^6 细胞, 用PBS洗细胞2遍, 70%乙醇于-20℃固定过夜, 次日取出, 用PBS洗细胞, 加入300 μl PBS重悬细胞, 加入5 μl 1 mg/ml PI和1 μl 1 mg/ml RNA酶, 避光孵育15 min, 流式细胞术检测细胞周期, 并用ModFit LT V3.3软件分析。

5. 细胞凋亡的流式细胞术检测:取对数生长期的细胞接种于12孔板中(每孔 1×10^6 个细胞), 分为对照组和L-Asp处理组, 48 h后收集细胞, 用PBS洗涤2遍, 再用1×binding buffer缓冲液制成 1×10^6 /ml细胞悬液。流式细胞管内加入100 μl细胞悬液, 加入5 μl Annexin V-PE和5 μl 7-AAD, 轻轻摇匀, 室温避光染色15 min, 加入1×binding buffer缓冲液200 μl, 30 min内上流式细胞仪检测。

6. Western blot 检测蛋白表达:收集细胞沉淀,加入适量细胞裂解液,离心收集上清,应用BCA法测定蛋白浓度,进行蛋白定量。各取50 μg总蛋白进行SDS-PAGE电泳,将蛋白样品转移到PVDF膜,5%脱脂奶粉室温慢摇,封闭1 h。弃去封闭液,一抗孵育过夜,二抗室温孵育1 h。使用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤3次后加入适量ECL底物,在Image Quant LAS400 mini下扫描,曝光成像。

7. RNA提取和实时定量PCR:将人BL细胞株接种在6孔板中(每孔 2×10^6 个细胞),并用指定浓度的L-Asp处理48 h。收集细胞,根据说明书使用TRIzol™试剂(美国Life Technologies公司产品)提取RNA。使用NanoDrop检测RNA浓度,然后使用M-MLV逆转录酶(美国Life Technologies公司产品)将RNA逆转录为cDNA。根据说明书,使用LightCycler480 SYBR® Green Supermix(美国Roche公司产品)进行定量聚合酶链反应(qPCR)。用于实时荧光qPCR(RT-qPCR)基因的引物序列见表1。PCR扩增程序如下:94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 60 °C 35个循环30 s, 72 °C 35 s,最后在72 °C延伸2 min。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目标基因的阈值循环数(Ct)和相对mRNA表达量。ACTB用作内部对照。

8. 统计学处理:采用GraphPad Prism 8软件对数据进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. L-Asp抑制BL细胞株增殖:L-Asp作用48 h后,在 > 0.1 U/ml的浓度下对Raji、Namalwa和CA46细胞的增殖有明显的抑制作用(图1),其抑制率在 $0.1 \sim 1$ U/ml的浓度区间内呈剂量依赖关系,L-Asp作用48 h的抑制率高于24 h(图2)。

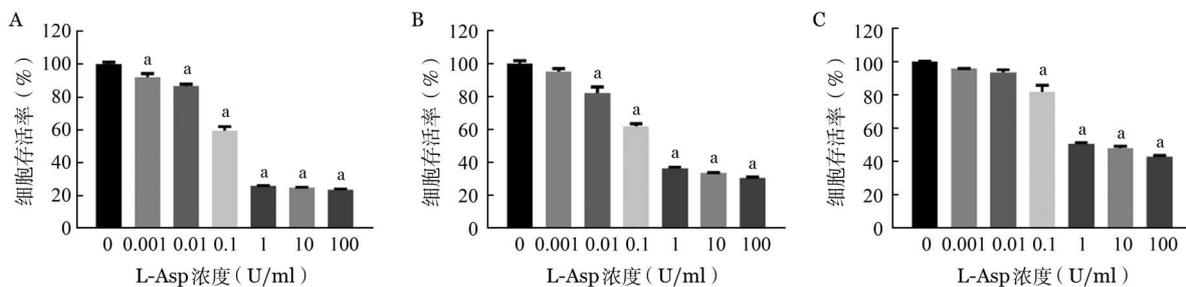
表1 实时荧光定量PCR引物序列

基因名称	引物序列
Cyclin E	5'-TTCTTGAGCAACACCCTCTTCTGCAGCC-3' (正向引物)
	5'-TCGCCATATACCGGTCAAAGAAATCTTGTGCC-3' (反向引物)
P21	5'-TGAGCCGCGACTGTGATG-3'(正向引物)
	5'-GTCTCGGTGACAAAGTCGAAGTT-3'(反向引物)
P27	5'-TGCAACCGACGATTCTTCTACTCAA-3' (正向引物)
	5'-CAAGCAGTGATGTATCTGATAAACAAGGA-3' (反向引物)
LC3B	5'-CGCACCTTCGAACAAAGAG-3'(正向引物)
	5'-CTCACCTTGTATCGTTCTATTATCA-3'(反向引物)
ATG7	5'-ACCCAGAAGAAGCTGAACGA-3'(正向引物)
	5'-CTCATTGCTGCTTGTGCCA-3'(反向引物)
ATG5	5'-TTTGAATATGAAGGCACACC-3'(正向引物)
	5'-TGCAATCCCATCCAGAGTTG-3'(反向引物)
ACTB	5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'(正向引物)
	5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'(反向引物)

2. L-Asp诱导BL细胞株发生G₀/G₁期阻滞:PI单染流式细胞术显示,0、0.4、0.8 U/ml的L-Asp作用于Raji、Namalwa和CA46细胞24 h后,与对照组相比,G₀/G₁期细胞增加,S期细胞减少,发生G₀/G₁期阻滞(图3)。RT-qPCR结果显示P21和P27的mRNA水平升高,Cyclin E的mRNA水平降低(图4)。Western blot结果同样证实L-Asp使P21和P27的表达增加(图5)。

3. L-Asp诱导BL细胞株细胞凋亡:Annexin V-PE和7-AAD双染流式细胞术显示,在Raji、Namalwa和CA46细胞中,0、0.4、0.8 U/ml的L-Asp作用48 h后,与对照组相比,凋亡细胞占比明显增多,提示L-Asp诱导BL细胞株细胞凋亡(图6)。

4. L-Asp激活BL细胞株外源性细胞凋亡通路:



a: 与L-Asp浓度为0 U/ml组相比, $P < 0.001$

图1 CCK-8法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji(A)、Namalwa(B)和CA46(C)细胞增殖活性的影响(实验重复3次)

Western blot 结果显示, L-Asp 可以诱导死亡受体 5 (DR5) 上调, 也可以诱导 Caspase-8 发生活化, 进而诱导下游效应蛋白 Caspase-3 切割活化, 其底物 PARP 水解作用增强 (图 7)。

5. L-Asp 激活 BL 细胞株内源性细胞凋亡通路: 检测 L-Asp 处理前后 BL 细胞株中 Bcl-2 家族相关蛋白的表达情况。结果显示, 与对照组相比, 实验组

的促凋亡蛋白 Bax、Bim、Noxa 表达升高, 而抗凋亡蛋白 Mcl-1、XIAP 表达降低, 电子转运蛋白 Cytochrome C 表达升高 (图 8)。

6. L-Asp 引起 BL 细胞株自噬: 用指定浓度的 L-Asp 处理三种细胞株 48 h 后, 通过 RT-qPCR 检测自噬标志物如 ATG5、ATG7、LC3B, 发现其 mRNA 水平明显升高 (图 9)。通过 Western blot 法检测自噬

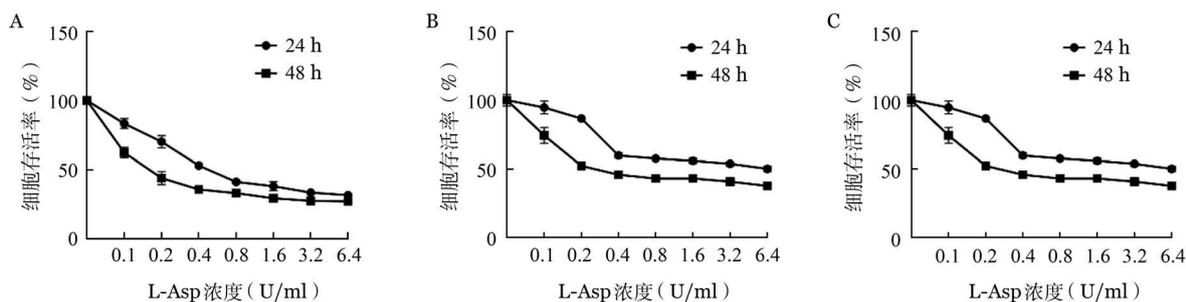
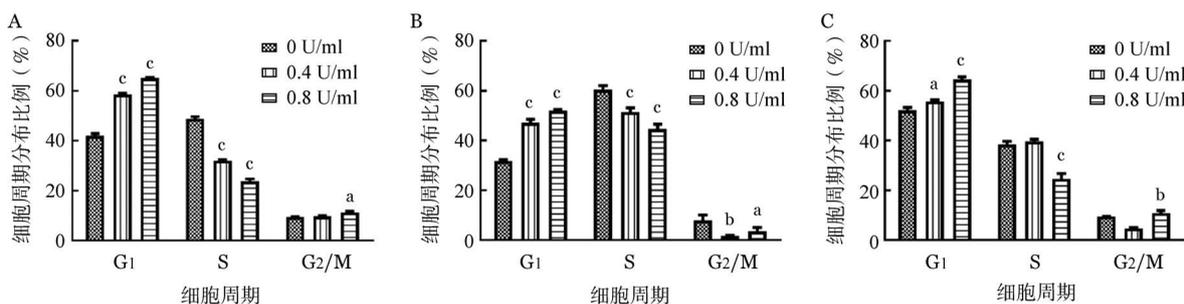
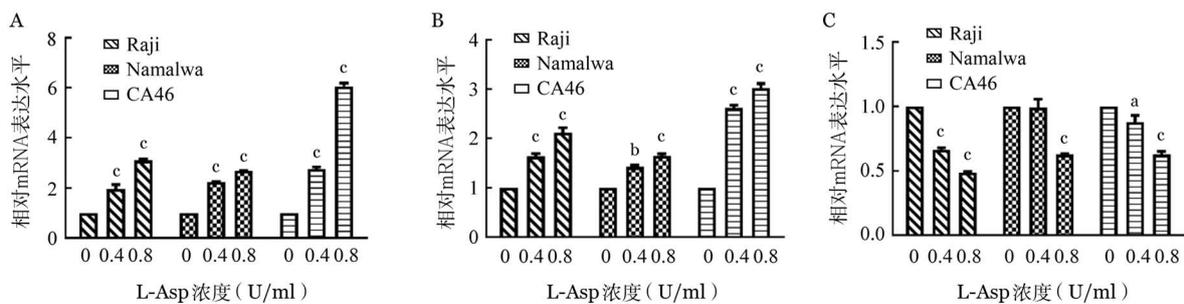


图 2 CCK-8 法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)作用 24 h、48 h 对 Raji (A)、Namalwa (B) 和 CA46 (C) 细胞增殖活性的影响 (实验重复 3 次)



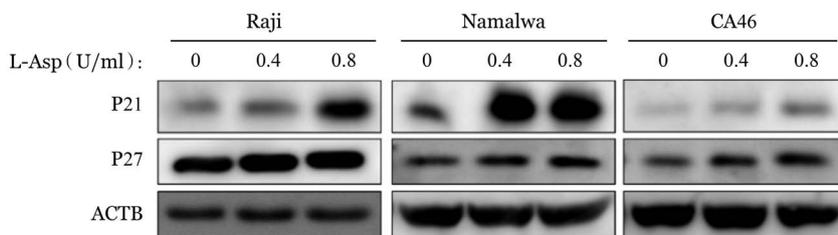
与 L-Asp 浓度为 0 U/ml 组相比, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001

图 3 流式细胞术检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对 Raji (A)、Namalwa (B) 和 CA46 (C) 细胞周期的影响 (实验重复 3 次)



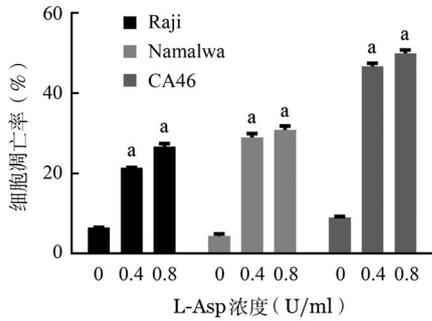
与 L-Asp 浓度为 0 U/ml 组相比, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001

图 4 实时荧光 PCR 检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对 Raji、Namalwa 和 CA46 细胞 P21 (A)、P27 (B)、Cyclin E (C) mRNA 表达水平的影响 (实验重复 3 次)



ACTB: 内部对照

图 5 Western blot 法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对 Raji、Namalwa 和 CA46 细胞 P21、P27 表达的影响



与L-Asp浓度为0 U/ml组相比,^a*P* < 0.001

图6 流式细胞术检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji、Namalwa和CA46细胞凋亡的影响(实验重复3次)

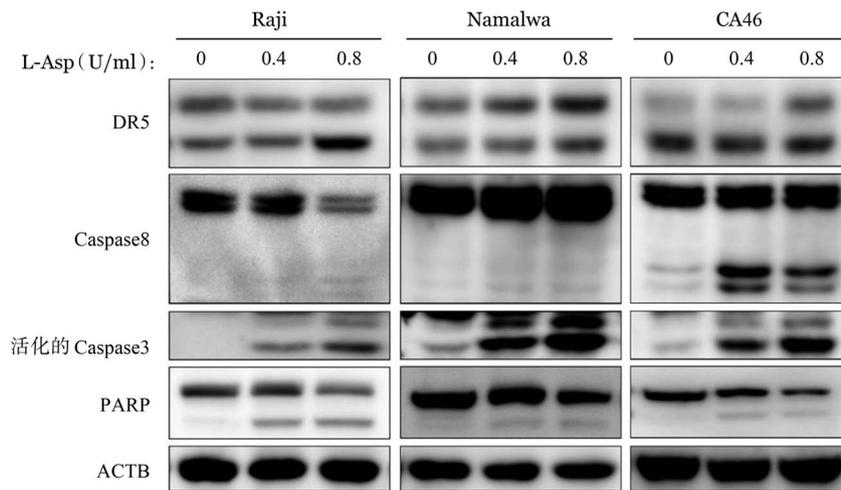
相关蛋白的表达,显示BL细胞株中LC3B、ATG7的蛋白质水平也增加(图10)。

7. L-Asp抑制BL细胞株c-Myc的表达:用L-Asp处理BL细胞株48 h后,细胞中c-Myc的蛋白

质水平降低(图11),表明L-Asp抑制BL细胞株中c-Myc的表达。

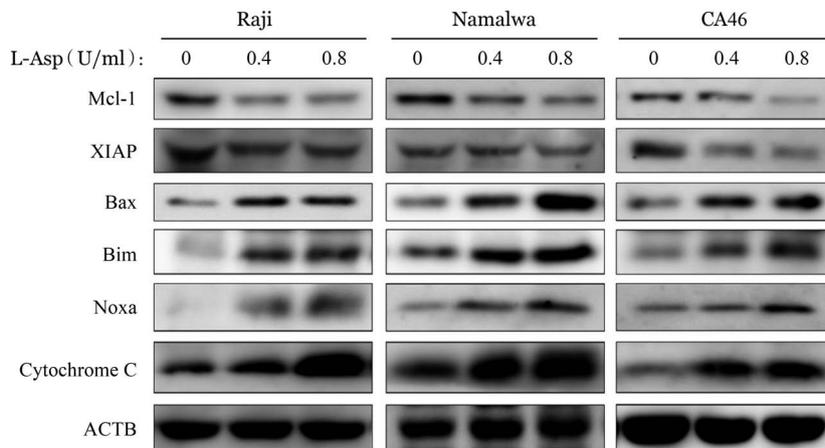
8. L-Asp抑制BL细胞株PI3K/Akt/mTOR信号通路:Western blot结果显示,L-Asp处理后,BL细胞株中p-PI3K、p-Akt-S473、p-mTOR、p-70S6K和P-4E-BP1的表达均明显降低,Akt未见明显变化,说明L-Asp可抑制BL细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路的活化(图12)。

为进一步验证L-Asp对PI3K/Akt/mTOR信号通路的调控,我们将PI3K抑制剂LY294002与L-Asp联合应用。当用L-Asp(0.4 U/ml)联合LY294002(20 μmol/L)处理BL细胞株时,p-Akt-S473和p-mTOR的水平均进一步降低(图13)。Annexin V-PE和7-AAD双染流式细胞术检测结果显示,与单独应用L-Asp或LY294002相比,联合用药组细胞凋亡明显增加(图14)。



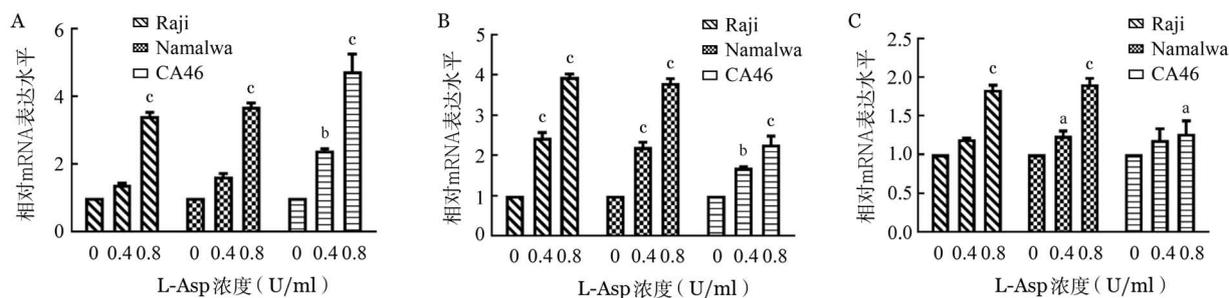
ACTB:内部对照

图7 Western blot法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji、Namalwa和CA46细胞外源性细胞凋亡通路的影响



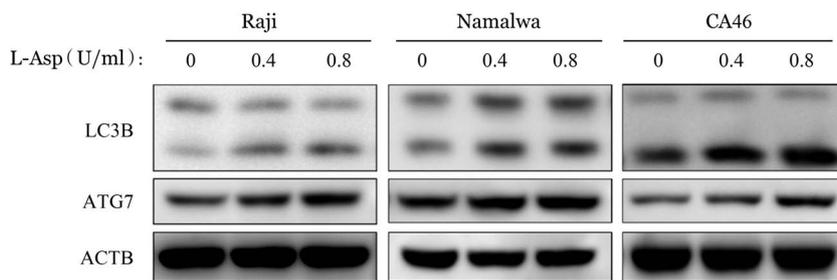
ACTB:内部对照

图8 Western blot法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji、Namalwa和CA46细胞内源性细胞凋亡通路的影响



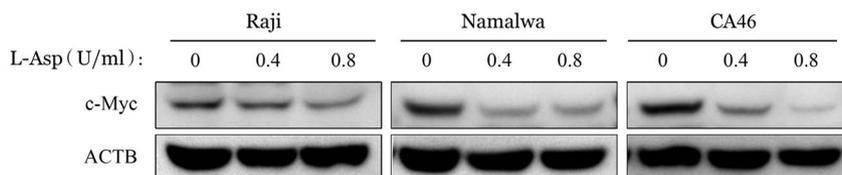
与L-Asp浓度为0 U/ml组相比, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001

图9 实时荧光定量PCR检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji、Namalwa和CA46细胞LC3B(A)、ATG5(B)、ATG7(C)mRNA水平的影响



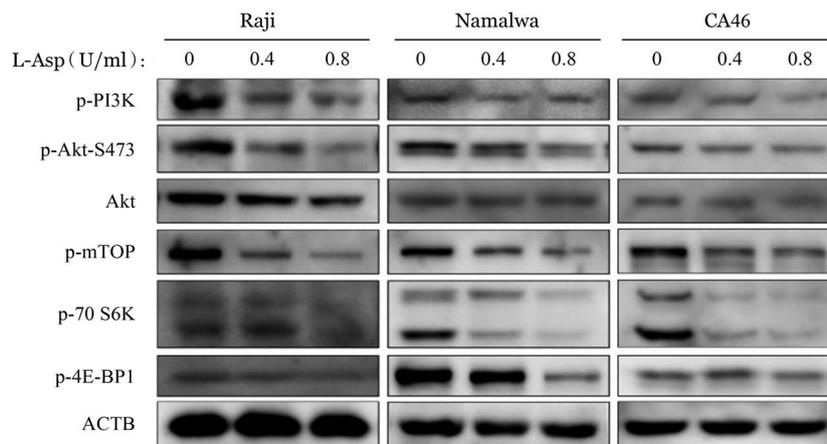
ACTB: 内部对照

图10 Western blot法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji、Namalwa和CA46细胞自噬相关蛋白表达水平的影响



ACTB: 内部对照

图11 Western blot法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji、Namalwa和CA46细胞c-Myc表达水平的影响



ACTB: 内部对照

图12 Western blot法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对Raji、Namalwa和CA46细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响

9. L-Asp对BL细胞株中ERK信号通路的影响: p-ERK的表达水平在L-Asp作用后降低, ERK的表达无明显变化(图15), 说明L-Asp可以抑制BL细

胞中ERK信号通路的活化。

10. L-Asp对BL细胞株STAT3信号通路的影响: BL细胞STAT3磷酸化(p-STAT3)水平在L-Asp

处理后降低, STAT3 为见明显变化(图 16), 表明 BL 细胞中 STAT3 信号通路的活化受到了 L-Asp 的抑制。

讨 论

L-Asp 作为一种有效的抗肿瘤细胞蛋白质合成抑制剂, 在治疗多种血液肿瘤, 特别是 ALL 和 NKTCL 中作用显著。然而, L-Asp 对 BL 的作用及其机制尚未完全阐明。在本研究中, 我们研究了 L-Asp 对 Raji、Namalwa 和 CA46 细胞株的作用, 发现 L-Asp 诱导的 BL 细胞凋亡依赖 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。

本研究发现, L-Asp 浓度 > 0.1 U/ml 时对 3 种 BL 细胞株的增殖有明显的抑制作用, 但其抑制率在 > 1 U/ml 的浓度下并不呈剂量依赖关系, 而呈现出轻微时间依赖性。与 He 等^[21]2014 年在急性髓系白血病 U937 细胞中的研究结果相符。细胞周期调节蛋白异常导致肿瘤细胞的增殖不受控制, 因此靶向细胞周期被认为是治疗肿瘤的有效方法^[22]。本研究表明, L-Asp 通过增加 P21 和 P27 的表达、降低

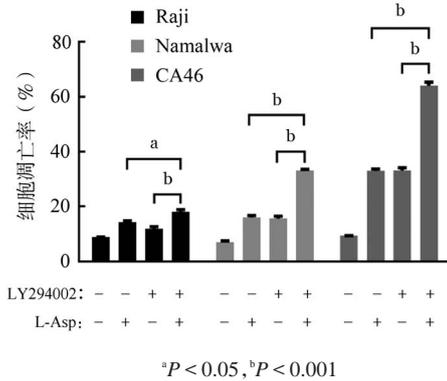


图 14 流式细胞术检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)和 PI3K 抑制剂 LY294002 对 Raji、Namalwa 和 CA46 细胞凋亡的影响(实验重复 3 次)

Cyclin E 的表达, 将 BL 细胞株的细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 与 Ueno 等^[23]证明的 L-Asp 诱导白血病细胞株 L5178Y 细胞周期停滞在 G₁ 期的研究结果一致。

L-Asp 上调了死亡受体 DR5 以及 Caspase-8 的裂解活化, 随后细胞凋亡程序的执行者 Caspase-3 激活, PARP 切割失活, 表明 L-Asp 诱导了外源性凋亡

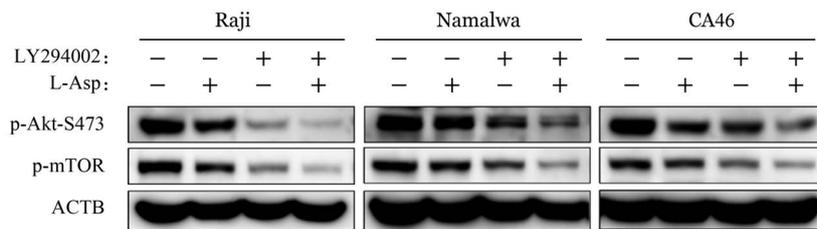


图 13 Western blot 法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)和 PI3K 抑制剂 LY294002 对 Raji、Namalwa 和 CA46 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

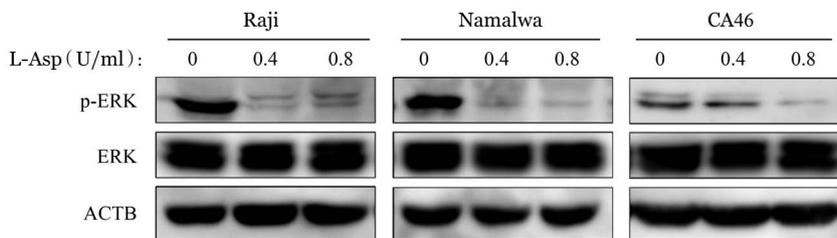


图 15 Western blot 法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对 Raji、Namalwa 和 CA46 细胞 ERK 信号通路的影响

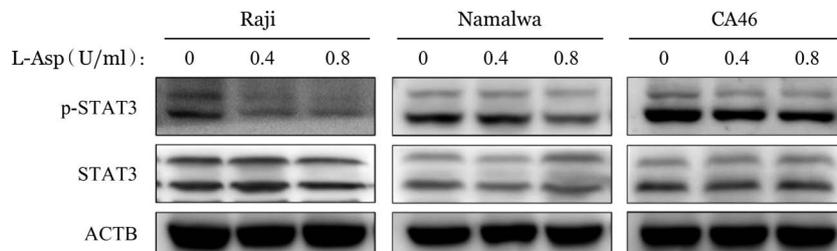


图 16 Western blot 法检测左旋门冬酰胺酶(L-Asp)对 Raji、Namalwa 和 CA46 细胞 STAT3 信号通路的影响

途径。与 Song 等^[24]证明的 L-Asp 对慢性髓性白血病(CML)细胞株 K562 和 KU812 有明显的增殖抑制和诱导凋亡作用相符。此外,我们发现抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 XIAP 的表达降低,促凋亡蛋白 Bax、Bim、Noxa 和 cytochrome C 的表达增加,表明 L-Asp 也激活了内源性凋亡途径。

肿瘤细胞生长需要门冬酰胺,然而其不能自身合成,需要从外界摄取。L-Asp 催化血液中的门冬酰胺水解为门冬氨酸和氨,快速降低血浆中左旋门冬酰胺的含量,导致左旋门冬酰胺缺乏,从而选择性杀灭肿瘤细胞^[25]。既往研究证实,氨基酸的枯竭可以诱导自噬^[26]。在正常情况下,自噬水平一般较低,在缺氧、缺乏营养或化疗时,应激诱导的自噬激活与反复化疗耐药相关^[27]。Song 等^[24]提出,L-Asp 可以诱导 CML 细胞株 K562 和 KU812 的自噬反应。我们的实验结果证明,L-Asp 可以诱导 BL 细胞株自噬,L-Asp 浓度 > 1 U/ml 时部分细胞出现耐药可能与自噬相关,但自噬与细胞存活、凋亡间的关系还需进一步研究^[28]。

PI3K/Akt/mTOR 途径的激活突变在人类癌症中经常发生,该途径的组成性激活促进细胞增殖和存活^[29]。在本研究中,我们发现在 L-Asp 作用下,BL 细胞株中 PI3K、Akt-S473 和 mTOR 的磷酸化水平以及 mTOR 磷酸化底物(p-p70S6K 和 p-4E-BP1)的表达降低,表明 L-Asp 抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路。我们通过使用 PI3K 抑制剂 LY294002 联合 L-Asp 发现抑制 PI3K 磷酸化增加了细胞凋亡,提示 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与了 L-Asp 诱导的 BL 细胞凋亡。与此同时,Western blot 结果显示,L-Asp 处理组 ERK 及 STAT3 磷酸化水平降低,提示 STAT3 及 MAPK 相关信号通路可能也参与了 L-Asp 诱导的凋亡过程,与既往研究中提出的 STAT3、ERK1/2 信号途径可能成为 BL 治疗新靶点等结果一致^[30-31],但具体机制仍待继续研究。

综上所述,L-Asp 明显抑制 BL 细胞株增殖,诱导 G₀/G₁ 期周期阻滞和细胞自噬,激活内源和外源性细胞凋亡通路,同时 L-Asp 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控细胞凋亡。

参考文献

[1] Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18 (21):3707-3721. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.21.3707.

[2] Kelly GL, Rickinson AB. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy [J]. *Hematology*

Am Soc Hematol Educ Program, 2007:277-284. DOI: 10.1182/asheducation-2007.1.277.

[3] Mead GM, Barrans SL, Qian W, et al. A prospective clinicopathologic study of dose-modified CODOX-M/IVAC in patients with sporadic Burkitt lymphoma defined using cytogenetic and immunophenotypic criteria (MRC/NCRI LY10 trial) [J]. *Blood*, 2008, 112(6):2248-2260. DOI: 10.1182/blood-2008-03-145128.

[4] 杨丹,王普,陈佳,等. COPADM 方案治疗 20 例伯基特淋巴瘤患者远期疗效分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(8):645-649. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.08.007.

[5] Colak M, Sarzhanova S, Yegin ZA, et al. Determination and Role of Epstein-Barr Virus in Patients With Lymphoproliferative Disorders [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2021, 21(5):e488-488e492. DOI: 10.1016/j.clml.2021.01.023.

[6] Tabe Y, Lorenzi PL, Konopleva M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy [J]. *Blood*, 2019, 134(13):1014-1023. DOI: 10.1182/blood.2019001034.

[7] Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(9):671-684. DOI: 10.1038/nrd3504.

[8] Zeidan A, Wang ES, Wetzler M. Pegasparaginase: where do we stand? [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(1):111-119. DOI: 10.1517/14712590802586058.

[9] Pokrovsky VS, Vinnikov D. L-Asparaginase for newly diagnosed extra-nodal NK/T-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017, 17(8):759-768. DOI: 10.1080/14737140.2017.1344100.

[10] 吴梓梁,陈福雄,叶铁真,等. 小剂量左旋门冬酰胺酶安全性及药效性的初步研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(1):14-16. DOI: 10.3760/j.issn:0253-2727.2006.01.004.

[11] 袁芳芳,魏旭东,尹青松,等. 含门冬酰胺酶方案一线治疗结外 NK/T 细胞淋巴瘤疗效的多中心回顾性研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(7):614-618. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.07.010.

[12] Asano N, Kato S, Nakamura S. Epstein-Barr virus-associated natural killer/T-cell lymphomas [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2013, 26(1):15-21. DOI: 10.1016/j.beha.2013.04.002.

[13] Casulo C, Friedberg J. Treating Burkitt Lymphoma in Adults [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2015, 10(3):266-271. DOI: 10.1007/s11899-015-0263-4.

[14] 纪濛濛,赵维莅. MYC 癌蛋白通过代谢通路影响肿瘤发生的研究进展 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(5):470-474. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.05.023.

[15] Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival [J]. *Cell*, 2009, 139(3):573-586. DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.041.

[16] Zhu J, Blenis J, Yuan J. Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(18):6584-6589. DOI: 10.1073/pnas.0802785105.

- [17] Kumar A, Marqués M, Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase activation in late G1 is required for c-Myc stabilization and S phase entry [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26 (23):9116-9125. DOI: 10.1128/MCB.00783-06.
- [18] Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, et al. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97 (8): 697-702. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00244.x.
- [19] O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (2):161-170. DOI: 10.1056/NEJMra1202117.
- [20] Zhu F, Wang KB, Rui L. STAT3 Activation and Oncogenesis in Lymphoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 12 (1). DOI: 10.3390/cancers12010019.
- [21] He Y, Li B, Zhang H, et al. L-asparaginase induces in AML U937 cells apoptosis via an AIF-mediated mechanism [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014, 19 (3):515-527. DOI: 10.2741/4222.
- [22] Hallett RM, Huang C, Motazedian A, et al. Treatment-induced cell cycle kinetics dictate tumor response to chemotherapy [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (9):7040-7052. DOI: 10.18632/oncotarget.3140.
- [23] Ueno T, Ohtawa K, Mitsui K, et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase [J]. *Leukemia*, 1997, 11 (11):1858-1861. DOI: 10.1038/sj.leu.2400834.
- [24] Song P, Ye L, Fan J, et al. Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (6):3861-3873. DOI: 10.18632/oncotarget.2869.
- [25] Jarrar M, Gaynon PS, Periclou AP, et al. Asparagine depletion after pegylated E. coli asparaginase treatment and induction outcome in children with acute lymphoblastic leukemia in first bone marrow relapse: a Children's Oncology Group study (CCG-1941) [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2006, 47 (2):141-146. DOI: 10.1002/pbc.20713.
- [26] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling [J]. *Cell Res*, 2014, 24 (1):42-57. DOI: 10.1038/cr.2013.166.
- [27] Ho CJ, Gorski SM. Molecular Mechanisms Underlying Autophagy-Mediated Treatment Resistance in Cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (11): 1175. DOI: 10.3390/cancers11111775.
- [28] Carew JS, Kelly KR, Nawrocki ST. Autophagy as a target for cancer therapy: new developments [J]. *Cancer Manag Res*, 2012, 4:357-365. DOI: 10.2147/CMAR.S26133.
- [29] Zwang Y, Jonas O, Chen C, et al. Synergistic interactions with PI3K inhibition that induce apoptosis [J]. *Elife*, 2017, 6:e24523. DOI: 10.7554/eLife.24523.
- [30] 冯可, 王超, 周虎, 等. ERK1/2抑制剂AZD8330对Burkitt淋巴瘤细胞株Raji细胞的作用及其机制研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36 (2): 148-152. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.014.
- [31] Zeng R, Tang Y, Zhou H, et al. STAT3 mediates multidrug resistance of Burkitt lymphoma cells by promoting antioxidant feedback [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488 (1):182-188. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.031.

(收稿日期:2021-06-30)

(本文编辑:律琦)

·读者·作者·编者·

关于重视引用国内文献的意见

部分作者在撰写论文时,只引用国外文献(或非中文语种的文献)。诚然,在医学的许多领域,国内的研究水平确实有待提高,有引用国外文献的必要。但是,不引用国内相关文献,将存在以下问题:①作者没有阅读国内文献,这样作者阅读的文献就不全面,作者所撰写的论文、综述等的科学性、先进性就值得商榷。②不引用国内文献,就不能准确、全面地反映国内的研究水平和进展,毕竟本刊发表的文章主要的阅读对象是中国医师。③有的作者虽然阅读了国内文献,但未引用。不引用国内文献的想法可能更为复杂,如轻视或忽略国内同行,或暗示首创权。除非是专门的国外医学文摘或国外文献综述,均应有国内文献的复习、引用和注解。本刊倡导在论文的撰写中应维护参考文献的科学性,鼓励作者在引用国外文献的同时检索并引用国内相关的文献。

本刊编辑部