

· 临床研究 ·

ALL 患儿肿瘤细胞的门冬酰胺合成酶活性研究

江华, 顾龙君, 薛惠良, 汤静燕, 陈静, 潘慈, 陈静

(上海交通大学医学院附属新华医院上海儿童医学中心血液肿瘤科, 上海 200127)

[摘要] 目的 不同类型急性淋巴细胞性白血病(ALL)对左旋门冬酰胺酶(L-Asp)敏感度不完全相同,由于L-Asp活性水平与细胞内门冬酰胺合成酶活性负相关,因此研究不同类型ALL患儿白血病细胞内门冬酰胺合成酶活性水平分布情况,有助于临床治疗中合理使用L-Asp。方法 通过HPLC-FLD及蛋白定量等技术,检测28例ALL患儿(免疫酶型T-ALL 7例,B细胞系列ALL 21例)白血病细胞内门冬酰胺合成酶活性水平。结果 T-ALL患儿肿瘤细胞内AS活性水平较B细胞系列ALL患儿的显著增高($P < 0.05$),其中T-ALL患儿肿瘤细胞内AS活性中位水平为每小时9.3 nM Asn/mg protein, B细胞系列ALL患儿为每小时5.2 nM Asn/mg protein。但无论是在B细胞系列ALL患儿还是在T-ALL患儿中,肿瘤细胞内AS活性存在多态性分布。结论 ALL患儿白血病细胞中门冬酰胺合成酶活性存在多态性分布,总体上T-ALL比B系ALL白血病细胞中门冬酰胺合成酶活性高。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 272-274]

[关键词] 白血病, 淋巴细胞性, 急性; 门冬酰胺合成酶; 儿童

[中图分类号] R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)04-0272-03

Asparagine synthetase activity in pediatric acute lymphoblastic leukemia

JIANG Hua, GU Long-Jun, XUE Hui-Liang, TANG Jing-Yan, CHEN Jing, PAN Ci, CHEN Jing. Department of Hematology/Oncology, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China (Email: jiang_hua18@yahoo.com.cn)

Abstract: **Objective** To study the cellular activity of asparagine synthetase in different types of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** The cellular activity of asparagine synthetase was detected by HPLC-FLD and Protein measurement in 28 ALL children (7 cases of T-ALL and 21 cases of B-lymphoid lineage ALL) before chemotherapy. **Results** The asparagines synthetase activity levels in T-ALL children were significantly higher than those of the B-lymphoid lineage ALL patients, with the median activity level of 9.3 nM Asn/mg protein/hr vs 5.2 nM Asn/mg protein/hr ($P < 0.05$). The distribution of the asparagine synthetase activity demonstrated a polymorphism in either T-ALL or B-lymphoid lineage ALL patients. **Conclusions** The cellular activity of asparagines synthetase in ALL patients is presented with a polymorphism distribution. The asparagines synthetase activity levels in T-ALL are significantly higher than in B-lymphoid lineage ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(4): 272-274]

Key words: Leukemia, lymphoblastic, acute; Asparagines synthetase; Child

左旋门冬酰胺酶(L-Asp)被广泛应用于临床治疗多种肿瘤性疾病,特别是恶性淋巴系增生性疾病如急性淋巴细胞性白血病(ALL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)等的联合化疗,使患者的完全缓解率和长期存活率有显著提高。在以前的研究中,我们已经证实,治疗剂量的L-Asp能很快耗竭ALL患儿血浆中门冬酰胺(Asn)水平^[1],使肿瘤细胞蛋白质合成障碍,最终细胞凋亡。由于L-Asp作用的强弱取决于其在体内的沟活性水平,而沟活性水平则与细胞内

门冬酰胺合成酶(AS)表达及其活性水平负相关^[2,3]。因此我们对ALL患儿肿瘤细胞内AS活性分布进行研究,以探讨其对治疗过程中L-Asp的合理使用的重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

骨髓或外周血肿瘤细胞比例超过70%的初治

[收稿日期] 2006-03-30; [修回日期] 2006-05-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(项目编号:30070795)

[作者简介] 江华,男,博士,主治医师。主攻方向:小儿血液肿瘤疾病。

[通讯作者] 顾龙君,教授,上海交通大学医学院上海儿童医学中心。邮编:200127。

ALL 患儿 28 例,其中男性 19 例,女性 9 例,中位年龄 $6\frac{2}{12}$ 岁,免疫学分型 T-ALL 7 例, B 细胞系列 ALL 21 例,均为我院自 2001 年 10 月至 2002 年 8 月收治的患儿。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集与保存 在化疗前抽取患儿骨髓或外周静脉血 3 mL,肝素抗凝(100 U/mL),密度梯度离心法分离单个核细胞,并于液氮保存。

1.2.2 AS 活性检测 根据文献方法^[4]并略作修改,其中 FLD 检测波长 $E_x = 334\text{ nm}$,蛋白孵育时间分别为 0,30,60,90,120 min;主要试剂中,Ficoll 淋巴细胞分离液为上海华精生物高科技有限公司生产;蛋白标准品为 Bio-Rad 公司产品;高效液相色谱分析仪(HPLC)为 HP1100 型,惠普公司产品,其中荧光检测仪(FLD)型号为 G2321A,色谱分离柱为 DiamonsilTM(钻石)C18 柱(254 cm,5 μm),迪马公司产品。

1.3 统计分析

采用两样本均数比较的 t 检验,蛋白质浓度检测以及氨基酸浓度测定的标准曲线建立采用直线回归分析。

2 结果

2.1 蛋白质浓度检测稳定性

建立蛋白质浓度检测标准曲线,直线相关系数 r 均 >0.99 ,上述系列浓度蛋白质标准品每次检测时建立的标准曲线,日间变异均 $<10\%$ 。

2.2 不同亚型 ALL 患儿肿瘤细胞内门冬酰胺合成酶活性分布

根据 AS 活性检测方法,首先建立不同时间段门冬酰胺浓度变化标准曲线,直线相关系数 r 均 >0.95 。

通过对 28 例 ALL 患儿治疗前骨髓或外周血肿瘤细胞 AS 活性进行检测发现,T-ALL 患儿肿瘤细胞内 AS 活性水平较 B 细胞系列 ALL 患儿的显著增高($t=0.14, P=0.0026, P<0.05$) (图 1),其中 T-ALL 患儿肿瘤细胞内 AS 活性中位水平为每小时 9.3 nM Asn/mg protein, B 细胞系列 ALL 患儿为每小时 5.2 nM Asn/mg protein。但无论是在 B 细胞系列 ALL 患儿还是在 T-ALL 患儿中,肿瘤细胞内 AS 活性存在多态性分布(图 2,图 3)。

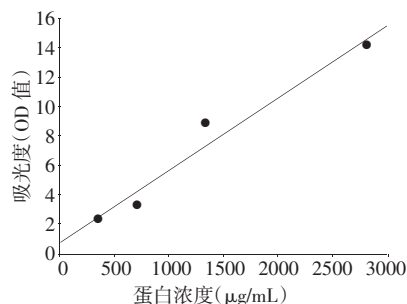


图 1 不同亚型 ALL 患儿 AS 活性分布

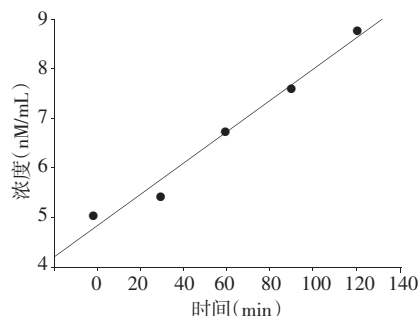


图 2 B-ALL 患儿中 AS 活性分布

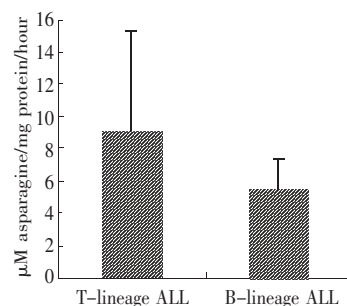


图 3 T-ALL 患儿中 AS 活性分布

3 讨论

在以前的研究中,我们已发现不同个体对 L-Asp 作用反应并不相同,我们推测其原因可能与不同个体细胞内 AS 活性不同相关^[1]。通过对其中 28 例患儿肿瘤细胞内 AS 活性检测,我们发现 T-ALL 患儿肿瘤细胞内 AS 活性水平较 B 细胞系列 ALL 患儿的显著增高,这与国外研究结果相似^[4],但同时还发现无论是 T-ALL 还是 B 细胞系列 ALL 患儿,不同个体间其 AS 活性均存在多态性分布。

Pieter 等^[5]研究表明:在 ALL 患者中,与 Common 和 Pre-B 型 ALL 相比,T-ALL 的白血病细胞对 L-Asp 存在药物抵抗。此外,体外实验证实,不同类型白血病细胞株,AS 水平及对 L-Asp 作用的影响存在差异,耐药细胞株如 MOLT-4/R 及 BAIL-1,它们的 L-Asp ID50 是敏感细胞株 MOLT-4 和 NAIL-1 的约 100 倍,而前者 AS 活性较后者显著增高^[6]。用表达 AS 基因的逆转录病毒转染敏感细胞株 MOLT-4

后, MOLT-4 的 AS 蛋白表达水平显著升高, 而且, 单独 AS 蛋白的表达就足以引起细胞对 L-Asp 耐药^[3]。由于 L-Asp 的抗肿瘤作用主要是利用肿瘤细胞内 AS 活性水平低下, 通过耗竭肿瘤细胞内的 Asn, 使其蛋白质生物合成障碍, 最终细胞死亡达到抗肿瘤目的。而目前我们的研究证实, 总体上 T-ALL 比 B 系 ALL 白血病细胞中门冬酰胺合成酶活性高。因此推测, 在一定剂量 L-Asp 作用下, 虽然能使患者血浆中的门冬酰胺水平明显下降甚至消失, 但正是由于 T-ALL 的肿瘤细胞内门冬酰胺合成酶活性水平较高, 能自身合成一定剂量的门冬酰胺满足细胞生存所需, 因此表现出对 L-Asp 的相对不敏感甚至耐药, L-Asp 停止使用后, 其血浆内门冬酰胺水平在短时间内迅速升高甚至恢复正常, 即肿瘤细胞内 AS 活性水平与血浆中 Asn 水平变化之间存在相关性。我们以前的研究也发现, T-ALL 患儿在停药后第 7 天血浆 Asn 就已部分或完全恢复^[1]。虽然食物成分也可以影响 AS 基因的表达从而影响血浆中氨基酸水平^[7], 但考虑到在 L-Asp 停用后不同亚型儿童 ALL 血浆 Asn 恢复时间上存在总体差异, 研究还是证实了肿瘤细胞内 AS 活性水平与血浆中 Asn 水平变化之间存在相关性。由于所研究病例较少, 观测时间不长, 还不能对这种相关性与临床预后之间的关系进行分析。

最近有报道^[8,9]在具有 TEL-AML1 融合基因表达的 t (12;21) 基因型 B 系 ALL 患者, 其白血病细胞内 AS 基因表达水平较 TEL-AML1 融合基因阴性患者高约 5 倍左右。而较大样本的临床研究发现, L-Asp 耐药和复发的风险仅与 TEL-AML1 融合基因阴性患者肿瘤细胞内 AS 表达和活性正相关, 但与 TEL-AML1 融合基因表达的 B 系 ALL 患者肿瘤细胞内 AS 表达高低无关^[10]。而这些具有 TEL-AML1 融合基因表达的 B 系 ALL 患者, 在临床上通常对 L-Asp 高度敏感。但由于该研究所用细胞均已在体外缺氨基酸的环境中约 24 h 左右才检测其细胞内 AS mRNA 表达水平, 而 Bain 等^[11]人发现, 当细胞在脱离氨基酸环境 4 h 左右时, 其 AS mRNA 表达水平即升高。因此我们可以推测, 正是由于具有 t (12;21) 基因型的儿童 ALL 原代肿瘤细胞中 AS 水平很低, 对环境中氨基酸浓度改变的反应最敏感, 当环境中相关氨基酸缺乏时, 为了满足细胞代谢需要, 其 AS mRNA 代偿性升高, 而其他类型白血病的原代肿瘤细胞由于其 AS 水平相对较高, 对环境中相关氨基酸浓度改变相对不敏感, 因而 AS mRNA 水平改变

不显著, 从而出现了在 24 h 左右时对 L-Asp 最敏感的具有 t (12;21) 基因型的儿童 ALL 原代肿瘤细胞内 AS mRNA 表达水平较其他类型白血病细胞的显著升高。由于研究样本较少, 不能具体描述各种基因型白血病细胞 AS 活性分布情况。因此, 我们认为, ALL 患儿白血病细胞中门冬酰胺合成酶活性存在多态性分布, 总体上 T-ALL 比 B 系 ALL 白血病细胞中门冬酰胺合成酶活性高。这可能与不同类型白血病对 L-Asp 敏感性不同相关。

[参 考 文 献]

- [1] 江华, 顾龙君, 陈静, 潘慈, 陈静, 薛惠良, 等. ALL 患儿 L-Asp 治疗相关性血浆氨基酸水平变化及其意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(2): 81-85.
- [2] Wang A, Boos J. Unphysiological effects contributing to asparaginase toxicity *in vitro* [J]. Am J Physiol, 1998, 274 (4Pt1): c1185-1186.
- [3] Aslsnain AM, Fletcher BS, Kilberg MS. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukemia cells [J]. Biochem J, 2001, 357 (Pt 1): 321-328.
- [4] Dübbers A, Würthwein G, Müller HJ, Schulze-Westhoff P, Winkelhorst M, Kurzkabe E, et al. Asparaginase synthetase activity in paediatric acute leukemias; AML-M5 subtype shows lowest activity [J]. Br J Haematol, 2000, 109(2): 427-429.
- [5] Pieters R, Den Boer ML, Durian M, Janka G, Schmiegelow K, Kaspers GJ, et al. Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia — implications for treatment of infants [J]. Leukemia, 1998, 12(9): 1344-1348.
- [6] Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, Cosic S, Schuster Sm, Kilberg MS. Amino acid control of asparagines synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells [J]. Am J Physiol, 1997, 272(5Pt1): c1691-1699.
- [7] Kilberg MS, Barbosa-Tessmann IP. Genomic sequences necessary for transcriptional activation by amino acid deprivation of mammalian cells [J]. J Nutr, 2002, 132(7): 1801-1804.
- [8] Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, Stigter RL, van Wering ER, et al. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t (12;21) + pediatric ALL [J]. Blood, 2003, 101(7): 2743-2747.
- [9] Krejci O, Starkoval I, Otova B, Madzo J, Kalinova M, Hrusak O, et al. Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells [J]. Leukemia, 2004, 18(3): 434-441.
- [10] Stams WA, den Boer ML, Holleman A, Appel IM, Beverloo HB, van Wering ER, et al. Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2005, 105(11): 4223-4225.
- [11] Bain PJ, LeBlance-Chaffin R, Chen H, Palii SS, Leach KM, Kilberg MS. The mechanism for transcriptional activation of the human ATA2 transporter gene by amino acid deprivation is different than that for asparagines synthetase [J]. J Nutr, 2002, 132 (10): 3023-3029.

(本文编辑: 吉耕中)