

PLA2G4C 通过 p38/MAPK 信号通路介导线粒体自噬促进 DLBCL 进展的实验研究

王敬如, 张琳, 李峰敏 (秦皇岛市第一医院血液内科, 河北秦皇岛 066000)

摘要: 目的 研究磷脂酶 A2 IV C 组 (phospholipase A2 group IV C, PLA2G4C) 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 中的作用及其可能调节机制。方法 通过免疫印迹法 (Western blot) 检测 PLA2G4C 在 DLBCL 组织和细胞中的表达。构建 PLA2G4C 过表达或敲低表达的 DLBCL 细胞系, 后用自噬抑制剂氯喹 (Chloroquine, CQ) 或 p38 抑制剂 SB203580 处理细胞 24h。实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 PLA2G4C 转染效率; Western blot 检测 PLA2G4C 蛋白、线粒体自噬相关蛋白 [微管相关蛋白 1 轻链 3- II / I (microtubule-associated protein 1 light chain 3- II / I, MAP1 LC3 II / I), Beclin1, p62, PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) 和 Parkin], p38/ 丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 通路相关蛋白 [磷酸化 p38/MAPK (phosphorylated-p38/MAPK, p-p38/MAPK)] 表达水平; CCK-8 法、Transwell 实验和流式细胞术分别检测细胞增殖、侵袭和凋亡能力。进一步构建异种移植瘤裸鼠模型, 观察 PLA2G4C 对裸鼠体内肿瘤生长及线粒体自噬的影响。结果 DLBCL 患者淋巴瘤组织中 PLA2G4C 蛋白表达显著高于反应性增生淋巴结组织 (3.47 ± 0.42 vs 1.01 ± 0.02), 差异具有统计学意义 ($t = -37.002, P < 0.001$); DLBCL 细胞中 PLA2G4C 蛋白水平显著高于人淋巴瘤细胞系和 B 细胞淋巴瘤细胞系, 差异具有统计学意义 ($F = 73.771, P < 0.001$)。沉默 PLA2G4C 显著降低 DLBCL 细胞活力和侵袭能力, 诱导细胞凋亡 ($t = 6.909 \sim 11.390$); 过表达 PLA2G4C 后结果与之相反 ($t = 2.392 \sim 19.778$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。且过表达 PLA2G4C 显著促进线粒体自噬的发生, 而 CQ 或 SB203580 处理则可显著逆转 PLA2G4C 过表达对 DLBCL 细胞生物学行为及线粒体自噬的作用。体内裸鼠实验显示, 敲低 PLA2G4C 显著抑制移植瘤裸鼠体内肿瘤生长及线粒体自噬相关蛋白表达, 差异具有统计学意义 ($t = 13.816 \sim 25.926$, 均 $P < 0.001$)。结论 PLA2G4C 在 DLBCL 中表达显著上调, 可能通过促进 p38/MAPK 信号通路介导的线粒体自噬, 促进肿瘤细胞增殖和侵袭, 抑制细胞凋亡, 参与 DLBCL 的发生发展。

关键词: 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤; 磷脂酶 A2 IV C 组; 线粒体自噬; p38/MAPK 信号通路

中图分类号: R446.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2024)06-061-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.06.010

Experimental Study on the Mechanism of Mitochondrial Autophagy Promoted DLBCL Progression Mediated by PLA2G4C Via p38/MAPK Signaling Pathway

WANG Jingru, ZHANG Lin, LI Fengmin (Department of Hematology, the First Hospital of Qinhuangdao, Hebei Qinhuangdao 066000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of phospholipase A2 Group IV C (PLA2G4C) in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and its possible regulatory mechanism. **Methods** The protein expression of PLA2G4C in DLBCL tissues and cells was detected by Western blot. DLBCL cell lines with PLA2G4C overexpression or knockdown expression were constructed, and the cells were treated with autophagy inhibitor Chloroquine (CQ) or p38 inhibitor SB203580 for 24 h. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the transfection efficiency of PLA2G4C; Western blot analysis was performed to detect the expression levels of PLA2G4C protein, mitochondrial autophagy related protein [microtubule-associated protein 1 light chain 3- II / I (LC3 II / I), Beclin1, p62, PTEN induced putative kinase 1 (PINK1) and Parkin] and p38/mitogen activated protein kinases (MAPK) pathway-related protein [Phosphorylated p38/MAPK(p-p38/MAPK)]; Cell proliferation, invasion and apoptosis were detected with CCK8, Transwell assay and the flow cytometry, respectively. The effects of PLA2G4C on tumor growth and mitochondrial autophagy in nude mice were further established. **Results** The PLA2G4C protein expression in lymphoma tissues of DLBCL patients was significantly higher than that in lymph nodes with reactive hyperplasia (3.47 ± 0.42 vs 1.01 ± 0.02), and the difference was statistically significant ($t = -37.002, P < 0.001$). The PLA2G4C

基金项目: 秦皇岛市重点研发计划科技支撑项目 (202101A156)。

作者简介: 王敬如 (1984-), 女, 大学本科, 中级职称, 研究方向: 淋巴瘤, E-mail: WJR8403@163.com。

protein level in DLBCL cells was significantly higher than that in human lymphoblast-like cell lines and B-cell lymphoma cell lines, and the difference was statistically significant ($F=73.771, P<0.001$). Silencing PLA2G4C significantly decreased the viability and invasion ability of DLBCL cells, and induced apoptosis, with statistical significance ($t=6.909\sim 11.390$). Overexpression of PLA2G4C gave the opposite result ($t=2.392\sim 19.778$), and the differences were statistically significant (all $P<0.001$). PLA2G4C overexpression significantly promoted the occurrence of mitochondrial autophagy, while CQ or SB203580 treatment could significantly reverse the effects of PLA2G4C overexpression on the biological behavior of DLBCL cells and mitochondrial autophagy. In vivo nude mice experiments showed that PLA2G4C knockdown significantly inhibited tumor growth and mitochondrial autophagy related protein expression in transplanted nude mice, and the differences were statistically significant ($t=13.816 \sim 25.926$, all $P<0.001$). **Conclusion** PLA2G4C is up-regulated in DLBCL, which may promote tumor cell proliferation and invasion, inhibit cell apoptosis, and participate in the occurrence and development of DLBCL by promoting mitochondrial autophagy mediated by p38/MAPK signaling pathway.

Keyword: diffuse large B-cell lymphoma; phospholipase A2 group IV C; mitochondrial autophagy; p38/MAPK signal path

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 是最常见的非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma, NHL), 约占全球 NHL 病例的 30%, 而我国发病率约占 NHL 的 50%^[1-2]。目前 DLBCL 因其高度异质性及侵袭性, 受到广泛关注。故揭示 DLBCL 发生发展的潜在分子机制具有重要临床意义。近年, 线粒体自噬作为与心血管疾病、癌症、代谢性疾病等临床疾病发病机制相关的研究热点日益受到关注。细胞线粒体自噬是指细胞通过自噬机制选择性包裹和降解受损的线粒体, 从而维持线粒体和细胞内的稳态^[3]。磷脂酶 A2 IV C 组 (phospholipase A2 group IV C, PLA2G4C) 位于内质网和线粒体中, 除磷脂酶 A2 (PLA2) 活性外, 还具有溶血磷脂和转酰化活性^[4-5]。胞质 PLA2G4C 利于花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 代谢和磷脂重塑^[6-7]。既往 OLSEN 等^[8]报道, PLA2G4C 中的 A 等位基因和 T 等位基因携带者结肠癌患者死亡风险较高, 特别是在 II 期疾病中, 可能是 II 期患者个体辅助治疗的潜在预后生物标志物。NANASHIMA 等^[9]报道, 沉默 PLA2G4C 可诱导大鼠乳腺肿瘤细胞凋亡。胶质瘤、胃癌等^[10-11]研究中也发现 PLA2 可以作为生物靶标调节肿瘤进展, 然而 PLA2G4C 在 DLBCL 中的作用尚不清楚。因此本研究通过体外构建 DLBCL 细胞模型, 观察分析了 PLA2G4C 对 DLBCL 细胞生物学行为的影响, 同时构建了异种移植瘤小鼠模型, 进一步验证 PLA2G4C 介导 DLBCL 肿瘤进展的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 ①选择 2022 年 1 月 ~ 2023 年 10 月秦皇岛市第一医院收治的 40 例 DLBCL 患者淋巴瘤组织标本进行研究, 另收集同期 40 例反应性增生淋巴结组织标本作为对照, 所有标本均通过淋巴结活检进行诊断, 并由至少两名经验丰富的病理学家进行确认。本院伦理委员会批准本研究 (批号: 2021-2016), 并与患者及其家属签

订了知情同意书。②从上海细胞库获得人淋巴瘤细胞样细胞系 (CCRF-SD)、B 细胞淋巴瘤细胞系 (DOHH2) 和 DLBCL 细胞系 (OCI-LY10, HBL-1 和 TMD8), 所有细胞系均经短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 鉴定。③从西安交通大学实验动物中心购买 24 只 4 周龄 C57BL/6 裸鼠, 全程饲养在 SPF 环境中, 温度 18℃ ~ 20℃, 湿度 40% ~ 60%, 12h 明暗交替饲养, 定期更换垫料, 自由摄食与饮水。实验动物使用许可证号: SYXK (陕) 2020-005。

1.2 仪器与试剂 RPMI-1640 培养液、胎牛血清 (FBS) 及 Trizol 试剂 (美国 Life Technologies 公司); 细胞转染试剂 Lipofectamine 3000TM (美国 Invitrogen 公司); PrimeScript 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司); SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司); RIPA 裂解缓冲液, BCA 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 免疫印记检测蛋白一抗 (Abcam 公司); 细胞计数试剂盒 -8 (CCK-8) 和 FITC-Annexin V 试剂盒 (日本 Dojindo, Kumamoto 公司); PLA2G4C 小干扰 shRNA 序列 (sh-PLA2G4C) 和过表达载体 (PLA2G4C) 由上海生物工程科技有限公司制备; 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); Thermo VarioskanTM LUX 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 免疫印记系统 (美国 BioRad 公司); 凝胶成像分析系统 (Bio-Imaging Systems 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和分组: 用含 10 g/dl 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37℃, 5% (v/v) 的 CO₂ 培养箱中培养。每 2 ~ 3 天更换一次培养液, 当细胞融合度达到 70% 左右时, 按照 Lipofectamine 3000 说明书进行细胞转染, 48h 后采用 50 μmol/L 自噬抑制剂氯喹 (Chloroquine, CQ) 或 p38 抑制剂 (SB203580) 继续处理细胞 24 h。细胞分组: 空白

对照组 (Control 组, 不做任何处理), sh-NC 组 (转染阴性对照 NC-shRNA 序列), sh-PLA2G4C 组 (转染 PLA2G4C 小干扰 shRNA 序列), Vector 组 (转染 PLA2G4C 过表达空载体), PLA2G4C 组 (转染 PLA2G4C 过表达载体), PLA2G4C+SB203580 组 (共转染 PLA2G4C 过表达载体 +p38 抑制剂), PLA2G4C+CQ 组 (共转染 PLA2G4C 过表达载体 +自噬抑制剂)。

1.3.2 qRT-PCR 检测 PLA2G4C 过表达和沉默效率: 使用 Trizol 提取待测组织和细胞的总 RNA, 使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 利用 SYBR Green 进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C 3min, 95 °C 60s, 72 °C 30s, 共 40 个循环。引物序列: PLA2G4C 正向引物 5'-ACCGTACTCTCTCTTCACGG-3', 反向引物 5'-GAATGCTGTCGGTGGATGTC-3'; 内参 GAPDH 正向引物 5'-CTCAGCAGCGACTGCCT-3', 反向引物 5'-AATCGCAAATTGCGTTCTC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对表达水平。

1.3.3 Western blot 检测 PLA2G4C, LC3 II / I, Beclin-1, p62, PINK1, Parkin, p38/MAPK 蛋白表达: 通过 RIPA 缓冲液提取总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白样品行 SDS-PAGE 分离蛋白, 转移到 PVDF 膜上, 将膜用 5g/dl 脱脂牛奶室温封闭 1h, 加入待测蛋白特异性一抗, 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜三次, 加入二抗, 室温下孵育 1h。采用 ECL 试剂盒在凝胶成像系统上进行可视化, 并用 Image J 软件进行蛋白条带灰度值分析。

1.3.4 CCK-8 测定细胞增殖活力: 将细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 分别在培养 72h 后, 将 10 μ l 的 CCK-8 溶液加入每孔中, 37 °C 继续培养 2 h, 然后使用酶标仪测量 450 nm 处的光密度值 (A 值)。

1.3.5 Transwell 测定细胞侵袭能力: 将细胞接种于含 200 μ l 无血清培养液中, 并注入 Transwell 上室中, 在下室加入含 FBS 的培养液, 培养 24 h 后, 对下室中的细胞进行 4g/dl 多聚甲醛固定, 并用结晶紫染色。随机选取 5 个视野拍照, 在显微镜下进行计数。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡: 采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒进行测定。将细胞悬液以每管 2×10^6 个细胞加入流式离心管中, 72h 后离心重悬细胞, 70ml/dl 预冷乙醇固定。每管加入 2 μ l 的 RNase A 溶液在 37 °C 下孵育 30 min, 后加入 10 μ l 的 Annexin V-FITC 和 2 μ l 的 PI 溶液, 室温下避光孵育 30 min。流式细胞仪计算细胞凋亡率。

1.3.7 异种移植模型的建立: 将 24 只 C57BL/6 裸鼠随机分为 sh-NC 组和 sh-PLA2G4C 组, 每组 12 只, 分别将用 NC-shRNA 和 sh-PLA2G4C 转染的 DLBCL 细胞皮下注射入裸鼠体内。每 3 天评估一次肿瘤生长变化, 直到第 28 天后对裸鼠实施安乐死。测量裸鼠体内最终瘤体体积和重量, 并取裸鼠瘤体组织进行实验检测。实验研究经过本院动物委员会批准使用。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 7.0 进行数据可视化, 使用 SPSS.22.0 进行统计学分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间的差异性分析采用 Student-*t* 检验, 多组间差异性分析采用单因素方差分析, 组间进一步两两比较采用 LSD 检验; 肿瘤组织和相邻正常组织差异比较采用配对 *t* 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PLA2G4C 在 DLBCL 组织和细胞中表达情况 Western blot 检测显示, DLBCL 患者淋巴瘤组织 (3.47 ± 0.42) 中 PLA2G4C 蛋白水平显著高于反应性增生淋巴结组织 (1.01 ± 0.02), 差异具有统计学意义 ($t = -37.002, P < 0.001$)。与人淋巴瘤细胞样细胞 CCRF-SD (1.01 ± 0.03) 相比, B 细胞淋巴瘤细胞系 DOHH2 (1.82 ± 0.14) 和 DLBCL 细胞系 OCI-LY10 (2.47 ± 0.13), HBL-1 (2.65 ± 0.21) 和 TMD8 (3.15 ± 0.24) 中 PLA2G4C 蛋白水平显著升高, 差异具有统计学意义 ($t = 5.948 \sim 15.714$, 均 $P < 0.001$); 组间比较差异具有统计学意义 ($F = 73.771, P < 0.001$), 其中以 TMD8 细胞升高最为明显, 故后续实验选择 TMD8 细胞进行研究。

2.2 敲低 PLA2G4C 抑制 DLBCL 细胞增殖和侵袭、诱导细胞凋亡 见表 1。qRT-PCR 结果显示, 与 Control 组和 sh-NC 组相比, 敲低 PLA2G4C 表达组 PLA2G4C 表达显著降低 ($t = 6.509, 6.608$); 与 Control 组和 Vector 组相比, 过表达 PLA2G4C 组 PLA2G4C 表达显著升高 ($t = 20.909, 20.712$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 表明敲低或过表达 PLA2G4C 细胞系构建成功。CCK-8 法, Transwell 和流式细胞术检测显示, 敲低 PLA2G4C 显著降低 TMD8 细胞活力 ($t = 7.072, 7.192$) 和侵袭能力 ($t = 6.948, 6.909$), 促进细胞凋亡 ($t = 11.390, 11.348$); 过表达 PLA2G4C 则得到与之相反的结果 ($t = 19.658, 19.778; 6.629, 6.231; 2.413, 2.392$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。

表1 敲低或过表达 PLA2G4C 对 DLBCL 细胞增殖、侵袭、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	sh-NC 组	sh-PLA2G4C 组	Vector 组	PLA2G4C 组	F	P
PLA2G4C mRNA	1.00 ± 0.01	1.01 ± 0.02	0.34 ± 0.09	1.02 ± 0.03	3.12 ± 0.26	218.214	<0.001
增殖活力 (A 值)	1.01 ± 0.02	1.02 ± 0.03	0.42 ± 0.12	1.00 ± 0.02	2.65 ± 0.19	202.089	<0.001
侵袭能力 (%)	40.33 ± 3.07	40.23 ± 3.21	22.51 ± 2.76	41.35 ± 2.98	57.33 ± 3.62	46.188	<0.001
凋亡率 (%)	7.08 ± 1.49	7.14 ± 1.63	23.41 ± 2.57	7.05 ± 1.54	3.62 ± 1.25	59.685	<0.001

2.3 敲低 PLA2G4C 抑制 DLBCL 细胞的线粒体自噬 见表 2。Western blot 结果显示, 与 Control 组和 sh-NC 组相比敲低 PLA2G4C 显著降低了细胞中 LC3 II / I 蛋白比率 ($t=14.222, 13.784$) 和 Beclin1 蛋白表达 ($t=10.086, 9.915$), 促进 p62 蛋白表达

($t=21.928, 21.666$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$); 同时发现, 敲低 PLA2G4C 显著抑制 PINK1 ($t=11.552, 10.922$, 均 $P<0.001$) 和 Parkin 蛋白 ($t=9.435, 9.592$, 均 $P<0.001$) 在线粒体的聚集。

表2 敲低 PLA2G4C 对 DLBCL 细胞线粒体自噬相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	sh-NC 组	sh-PLA2G4C 组	F	P
LC3 II / I 比率 (%)	1.01 ± 0.02	0.99 ± 0.03	0.36 ± 0.09	130.819	<0.001
Beclin1 蛋白	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.01	0.42 ± 0.12	66.682	<0.001
p62 蛋白	1.00 ± 0.01	1.02 ± 0.02	2.67 ± 0.16	316.770	<0.001
PINK1 蛋白	1.01 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.46 ± 0.10	84.382	<0.001
Parkin 蛋白	1.00 ± 0.02	1.01 ± 0.03	0.40 ± 0.13	60.346	<0.001

2.4 PLA2G4C 通过活化 p38/MAPK 通路促进 DLBCL 细胞线粒体自噬 见表 3。Western blot 结果显示, 与 Vector 组相比, 过表达 PLA2G4C 显著升高 PLA2G4C LC3 II / I 蛋白比率和 Beclin1 蛋白水平, 促进 P38/MAPK 磷酸化, 降低 p62 蛋白水平, 差异具有统计学意义 ($t=12.785, 12.710, 12.633, 12.473, 8.779$, 均 $P<0.001$); 与 PLA2G4C 组相

比, 共转染 p38 抑制剂 (SB203580) 并未明显抑制 PLA2G4C 表达水平 ($t=0.304, P>0.05$), 但显著降低 p38/MAPK 磷酸化水平, 抑制 LC3 II / I 蛋白比率和 Beclin1 蛋白表达, 促进 p62 蛋白表达 ($t=9.071, 10.491, 10.106, 7.875$, 均 $P<0.001$), 逆转了 PLA2G4C 过表达诱导的线粒体自噬。

表3 PLA2G4C 调控 p38/MAPK 对线粒体自噬的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Vector 组	PLA2G4C 组	PLA2G4C+SB203580 组	F	P
PLA2G4C mRNA	1.02 ± 0.03	3.12 ± 0.26	3.07 ± 0.23	106.446	<0.001
p-p38/MAPK 蛋白	1.01 ± 0.02	3.43 ± 0.31	1.67 ± 0.27	83.143	<0.001
LC3 II / I 比率 (%)	1.00 ± 0.03	2.89 ± 0.25	1.33 ± 0.19	92.180	<0.001
Beclin1 蛋白	1.01 ± 0.01	3.06 ± 0.28	1.42 ± 0.20	89.370	<0.001
p62 蛋白	1.02 ± 0.01	0.34 ± 0.10	0.95 ± 0.13	46.633	<0.001

2.5 PLA2G4C 通过促进线粒体自噬促进 DLBCL 细胞增殖和侵袭, 抑制细胞凋亡 见表 4。Western blot 结果显示, 与 PLA2G4C 过表达组相比, CQ 处理显著抑制 LC3 II / I 蛋白比率和 Beclin1 蛋白水平, 升高 p62 蛋白水平, 差异具有统计学意义 ($t=11.377,$

10.907, 7.262, 均 $P<0.001$)。此外发现, CQ 处理显著降低细胞增殖活力和侵袭能力, 诱导细胞凋亡, 抵消了 PLA2G4C 过表达对 DLBCL 细胞生物学行为的影响 ($t=11.407, 10.439, 2.705$, 均 $P<0.05$)。

表4 PLA2G4C 调控线粒体自噬对 DLBCL 细胞增殖、侵袭、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Vector 组	PLA2G4C 组	PLA2G4C+CQ 组	F	P
LC3 II / I 比率 (%)	1.00 ± 0.03	2.89 ± 0.25 [*]	1.23 ± 0.18	99.905	<0.001
Beclin1 蛋白	1.01 ± 0.01	3.06 ± 0.28 [*]	1.29 ± 0.20	93.846	<0.001
p62 蛋白	1.02 ± 0.01	0.34 ± 0.10 [*]	0.93 ± 0.14	41.343	<0.001
增殖活力 (A 值)	1.01 ± 0.02	2.65 ± 0.19 [*]	1.31 ± 0.16	110.512	<0.001
侵袭能力 (%)	41.35 ± 2.98	57.33 ± 3.62 [*]	29.75 ± 3.07	54.947	<0.001
凋亡率 (%)	7.05 ± 1.54	3.62 ± 1.25 [*]	6.68 ± 1.35	5.541	<0.05

注: * 与 Vector 组相比, $t=12.953, 12.633, 8.370, 13.961, 6.049, 3.033$, 均 $P<0.05$ 。

2.6 敲低 PLA2G4C 抑制裸鼠体内肿瘤生长及线粒体自噬 见表5。结果显示,敲低 PLA2G4C 表达组裸鼠体内肿瘤体积和重量显著降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.001$);此外发现,敲低 PLA2G4C 显著降低了裸鼠组织中 PLA2G4C 蛋白水平、自噬相关 LC3 II / I 蛋白比率及 Beclin1 和 PINK1 蛋白表达,差异具有统计学意义(均 $P < 0.001$)。

表5 敲低 PLA2G4C 对裸鼠体内肿瘤生长及线粒体自噬的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	sh-NC 组	sh-PLA2G4C 组	t	P
肿瘤体积 (mm ³)	687.42 ± 42.16	367.68 ± 33.67	20.528	<0.001
肿瘤重量 (mg)	453.69 ± 38.59	206.44 ± 30.49	17.415	<0.001
PLA2G4C 水平	1.01 ± 0.02	0.40 ± 0.12	17.369	<0.001
LC3 II / I 比率 (%)	1.02 ± 0.03	0.31 ± 0.09	25.926	<0.001
Beclin1 蛋白	1.00 ± 0.02	0.42 ± 0.13	15.276	<0.001
PINK1 蛋白	1.01 ± 0.01	0.49 ± 0.10	13.816	<0.001

3 讨论

DLBCL 是最常见的淋巴瘤类型,虽然 R-CHOP (利妥昔单抗-环磷酰胺阿霉素,长春新碱,泼尼松)方案的标准化疗可以延长患者生存期,但仍有超过30%的患者观察到复发或对治疗耐药^[12]。因此,研究能够提高 DLBCL 患者总体生存率的生物靶标或开发新的治疗药物是临床医生和研究人员迫在眉睫的任务。

近年研究报道,PLA2G4C 与肿瘤的发生进展密切相关,例如在胶质瘤中 PLA2G4C 被作为癌基因用于分子诊断^[10];结肠癌中 PLA2G4C 表达与患者预后相关,且可作为 II 期结肠癌患者个体辅助治疗的潜在预后生物标志物^[8];乳腺癌中 PLA2G4C 缺失通过核因子- κ B/脂质运载蛋白2途径能够诱导大鼠乳腺肿瘤细胞凋亡^[9]。上述研究证实 PLA2G4C 作为癌基因在肿瘤进展中扮演重要角色。本研究发现,沉默 PLA2G4C 明显抑制 DLBCL 细胞增殖和侵袭,促进细胞凋亡;体内实验进一步发现,敲低 PLA2G4C 表达显著抑制移植瘤裸鼠体内肿瘤生长,这与研究报道的 PLA2G4C 在其他肿瘤进展中的作用相一致。

线粒体自噬是一种进化上保守的细胞过程,通过将功能失调的线粒体靶向自噬体进行降解,选择性地消除它们^[13]。线粒体自噬介导的线粒体消除在许多过程中发挥着重要作用,包括早期胚胎发育、细胞分化、炎症和细胞凋亡;线粒体自噬失调会导致受损线粒体的积累,在致癌和肿瘤进展中发挥重要作用^[14-15]。本研究发现,PLA2G4C 过表达促进了 DLBCL 细胞线粒体自噬相关蛋白表达,当给予

自噬抑制剂氯喹(CQ)处理,自噬相关蛋白表达降低,并显著逆转了 PLA2G4C 过表达对 DLBCL 细胞生物学行为的影响,细胞增殖和侵袭受到抑制,细胞凋亡增加。研究报道,线粒体自噬受体及控制线粒体自噬的信号通路参与癌症的恶性进展^[16],如 GPR176 通过与 G 蛋白 GNAS 相互作用抑制结直肠癌细胞线粒体自噬,促进结直肠癌进展^[17];限制 Mfn2 的线粒体募集会减少启动线粒体自噬所需的 PINK1/Mfn2/Parkin 复合物的形成,导致受损线粒体和 ROS 积累,增强三阴性乳腺癌细胞活力,促进肿瘤进展^[18];使用索拉非尼治疗可以通过损害线粒体自噬使肝细胞癌细胞对葡萄糖饥饿诱导的细胞死亡敏感,抑制肿瘤进展^[19-20]。本研究结果与上述报道一致,证实 PLA2G4C 通过调控细胞线粒体自噬,参与 DLBCL 发生进展。

丝裂原激活蛋白激酶(p38/MAPK)信号通路用于细胞广泛的外部信号,通过产生大量不同的生物效应物做出适当反应,被各种促炎和应激刺激激活。越来越多的证据表明,p38/MAPK 信号级联涉及除炎症以外的各种生物反应,如细胞增殖、分化、凋亡和侵袭^[21]。相关研究也报道,LncRNA AC245100.4 通过调节 PAR2 和激活 p38-MAPK 通路促进前列腺癌细胞增殖和迁移^[22];S100A8/A9 通过调控 Akt 和 p38/MAPK 通路促进食管鳞状细胞癌的迁移和侵袭^[23];松果素通过 p38/MAPK 信号通路调节内质网应激、线粒体膜电位去极化和多半胱天冬酶活性,诱导结直肠癌细胞周期停滞和活性氧介导的细胞凋亡^[24],证实 p38/MAPK 是可作为癌症治疗的潜在治疗靶点。本研究探究 PLA2G4C 是否可通过调控 p38/MAPK 通路发挥作用,发现过表达 PLA2G4C 激活 p38/MAPK 通路,促进 DLBCL 细胞线粒体自噬,为 DLBCL 的生物靶向治疗提供了新的思路。然而肿瘤的发生发展是多基因、多通路共同作用的结果,其发生机制复杂,PLA2G4C 参与调控 DLBCL 恶性进展的分子机制还需进一步研究分析。

综上所述,PLA2G4C 作为癌基因可能通过促进 p38/MAPK 通路介导的线粒体自噬,促进肿瘤细胞增殖和侵袭,抑制细胞凋亡,参与 DLBCL 的发生发展。

参考文献:

- [1] SMITH S M, PASQUALUCCI L. Introduction to series: diffuse large B-cell lymphoma[J]. Seminars in Hematology, 2023, 60(5): 251-254.
- [2] HILTON L K, SCOTT D W, MORIN R D. Biological heterogeneity in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Seminars in Hematology, 2023, 60(5): 267-276.
- [3] LU Yingying, LI Zhijia, ZHANG Shuangqian, et al.

- Cellular mitophagy: mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation[J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 736-766.
- [4] NAKAHARA Y, MITSUI J, DATE H, et al. Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus in PLA2G4C for multiple system atrophy[J]. *medRxiv[Preprint]*, 2023.doi:10.1101/2023.05.02.23289328.
- [5] PENG Zhangxiao, CHANG Yanxin, FAN Jianhui, et al. Phospholipase A2 superfamily in cancer[J]. *Cancer Letters*, 2021, 497: 165-177.
- [6] WARD K E, SENGUPTA R, ROPA J P, et al. The cytosolic phospholipase A2 α N-terminal C2 domain binds and oligomerizes on membranes with positive curvature[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(647): 647.
- [7] OH M, JANG S Y, LEE J Y, et al. The lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor Darapladib sensitises cancer cells to ferroptosis by remodelling lipid metabolism[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5728.
- [8] OLSEN R S, ANDERSSON R E, ZAR N, et al. Prognostic significance of PLA2G4C gene polymorphism in patients with stage II colorectal cancer[J]. *Acta Oncologica*, 2016, 55(4): 474-479.
- [9] NANASHIMA N, YAMADA T, SHIMIZU T, et al. Deletion of phospholipase A2 group IVC induces apoptosis in rat mammary tumour cells by the nuclear factor- κ B/lipocalin 2 pathway[J]. *Biochemical Journal*, 2015, 469(2): 315-324.
- [10] WANG Yunju, CHANG Songbin, WANG C Y, et al. The selective lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib triggers irreversible actions on glioma cell apoptosis and mitochondrial dysfunction[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2020, 402: 115133.
- [11] LIM S C, LEE T B, KANG B S, et al. Extracellular acidity-mediated expression of cPLA2 γ confers resistance in gastric cancer cells[J]. *Anticancer Research*, 2021, 41(1): 211-218.
- [12] 陈思言, 张伶俐, 杨丽华. 弥漫性大B细胞淋巴瘤组织中 miR-448 和 KDM2B 的水平表达及临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(4): 128-133.
CHEN Siyan, ZHANG Lingli, YANG Lihua. Expression levels and clinical significance of miR-448 and KDM2B in diffuse large B-cell lymphoma tissues[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(4): 128-133.
- [13] LI Anqi, GAO Meng, LIU Bilin, et al. Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13(5): 444.
- [14] SMITH A G, MACLEOD KF. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance[J]. *Journal of Pathology*, 2019, 247(5): 708-718.
- [15] PANIGRAHI D P, PRAHARAJ P P, BHOL C S, et al. The emerging, multifaceted role of mitophagy in cancer and cancer therapeutics[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020, 66: 45-58.
- [16] 黄基峰, 张怡, 晏琛. 线粒体自噬在肿瘤干细胞中作用的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(5): 255-259.
HUANG Jifeng, ZHANG Yi, YAN Chen. Research advances in the role of mitophagy in cancer stem cells[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2020, 47(5): 255-259.
- [17] TANG Junwei, PENG Wen, JI Jiangzhou, et al. GPR176 promotes cancer progression by interacting with G protein GNAS to restrain cell mitophagy in colorectal cancer[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(12): e2205627.
- [18] JIANG Ying, KRANTZ S, QIN Xiang, et al. Caveolin-1 controls mitochondrial damage and ROS production by regulating fission - fusion dynamics and mitophagy[J]. *Redox Biology*, 2022, 52: 102304.
- [19] FENG Ji, ZHOU Jing, WU Yong, et al. Targeting mitophagy as a novel therapeutic approach in liver cancer[J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 2164-2165.
- [20] LI Yun, CHEN Hengxing, LU Daning, et al. Mitophagy is a novel protective mechanism for drug-tolerant persister (DTP) cancer cells[J]. *Autophagy*, 2023, 19(9): 2618-2619.
- [21] DENNY W A. Inhibitors and activators of the p38 mitogen-activated MAP kinase (MAPK) family as drugs to treat cancer and inflammation[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2022, 22(3): 209-220.
- [22] LIU Chi, JIANG Shan, XIE Hui, et al. Long non-coding RNA AC245100.4 contributes to prostate cancer migration via regulating PAR2 and activating p38-MAPK pathway[J]. *Medical Oncology*, 2022, 39(5): 94.
- [23] TANIGAWA K, TSUKAMOTO S, KOMA Y I, et al. S100A8/A9 induced by interaction with macrophages in esophageal squamous cell carcinoma promotes the migration and invasion of cancer cells via Akt and p38 MAPK pathways[J]. *American Journal of Pathology*, 2022, 192(3): 536-552.
- [24] KWAK A W, LEE J Y, LEE S O, et al. Echinatin induces reactive Oxygen species-mediated apoptosis via JNK/p38 MAPK signaling pathway in colorectal cancer cells[J]. *Phytotherapy Research*, 2023, 37(2): 563-577.

收稿日期: 2024-03-19

修回日期: 2024-04-18

(上接第42页)

- FoxM1 and c-myc in chemoresistance of osteosarcoma and its mechanism[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2023, 39(2): 195-200.
- [26] XIE Jindong, ZHANG Junsheng, TIAN Wenwen, et al. The pan-cancer multi-omics landscape of FOXO family

relevant to clinical outcome and drug resistance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(24): 15647.

收稿日期: 2023-12-07

修回日期: 2024-04-18