

骨髓增生异常综合征患者有核红细胞自噬水平的研究

杨丽艳 王化泉 付蓉 瞿文 阮二宝 王晓明 王国锦 吴玉红 刘鸿
宋嘉 关晶 邢莉民 李丽娟 江汇涓 刘惠 王一浩 刘春燕 张薇 邵宗鸿

【摘要】 目的 研究骨髓增生异常综合征(MDS)患者有核红细胞的自噬水平。方法 54例MDS患者为实验组,对照组33例。采用透射电镜观察自噬过程,流式细胞术检测骨髓细胞中GlycoA⁺有核红细胞自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链3B(LC3B)的表达水平,Real-time PCR法检测GlycoA⁺有核红细胞自噬相关基因AMPK、ULK1和mTOR mRNA的表达,Western blot法检测GlycoA⁺有核红细胞线粒体外膜蛋白TOM20的表达。结果 MDS患者有核红细胞中不易观察到自噬体及自噬溶酶体。相对高危组MDS患者有核红细胞LC3B表达(0.22±0.12)显著低于对照组(0.43±0.22, $P<0.001$)及相对低危组(0.40±0.16, $P=0.001$)。相对高危组患者AMPK、ULK1 mRNA表达水平明显低于对照组[AMPK:0.26(0.60)对1.00(2.07),ULK1:0.27(3.31)对1.07(4.41), P 值均 <0.017],mTOR mRNA表达水平明显高于对照组[1.82(3.74)对1.26(1.38), $P<0.017$]。相对高危组MDS患者有核红细胞LC3B水平与HGB呈正相关($r=0.529$, $P=0.009$)。相对高危组MDS患者有核红细胞TOM20蛋白(9.42±4.42)表达升高。结论 高危MDS患者有核红细胞自噬水平下降。

【关键词】 骨髓增生异常综合征; 自噬; 贫血

基金项目:国家自然科学基金(81170472、81400088);天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCYBJC27200、09JCYBJC11200);天津市抗癌重大专项攻关计划(12ZCDZSY17900)

Study on autophagy in nucleated red blood cells in patients with myelodysplastic syndromes Yang Liyan, Wang Huaquan, Fu Rong, Qu Wen, Ruan Erbao, Wang Xiaoming, Wang Guojin, Wu Yuhong, Liu Hong, Song Jia, Guan Jing, Xing Limin, Li Lijuan, Jiang Huijuan, Liu Hui, Wang Yihao, Liu Chunyan, Zhang Wei, Shao Zonghong. Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Shao Zonghong, Email: shaozonghong@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the change of autophagy level of bone marrow nucleated red blood cell (RBC) in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). **Methods** Fifty-four MDS patients and thirty-three controls were enrolled in this study. The mitophagy were observed by transmission electron microscopy (TEM). The level of autophagy-associated protein LC3B in GlycoA⁺ nucleated RBC was measured by flow cytometry. The expressions of ULK1 and mTOR mRNA in GlycoA⁺ nucleated RBC were measured by real-time PCR. The expression of the mitochondrial outer membrane protein TOM20 in GlycoA⁺ nucleated RBC was detected by Western blot. **Results** Autophagosomes or autolysosomes were scarcely observed by TEM in MDS patients. The expression of LC3B in GlycoA⁺ nucleated RBC in high-risk MDS patients (0.22±0.12) was significantly lower than that in normal controls (0.43±0.22, $P<0.001$), and lower than that in low-risk MDS patients (0.40±0.16, $P=0.001$). The expression of AMPK [0.26(0.60)] in GlycoA⁺ nucleated RBC in high-risk MDS patients was significantly lower than that in controls [1.00(2.07), $P<0.017$]. The expression of ULK1 mRNA in GlycoA⁺ nucleated RBC in high-risk MDS patients [0.27(3.31)] was significantly lower than that in controls [1.07(4.41), $P<0.017$]. The level of mTOR mRNA in GlycoA⁺ nucleated RBC in high-risk MDS patients [1.82(3.74)] was significantly higher than that in controls [1.26(1.38), $P<0.017$]. The level of LC3B in GlycoA⁺ nucleated RBC was

negatively correlated with the HGB ($r=0.529$, $P=0.009$) in high-risk MDS patients. The expression of mitochondrial outer membrane protein TOM20 in high-risk MDS patients was 9.42 ± 4.42 . **Conclusion** Autophagy is impaired in nucleated RBC of MDS patients.

【Key words】 Myelodysplastic syndromes; Autophagy; Anemia

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170472, 81400088); Application Foundation and Frontier Technology Research Program of Tianjin (14JCYBJC27200, 09JCYBJC11200); Tianjin Major Anticancer Research Program (12ZCDZSY17900)

骨髓增生异常综合征(MDS)是一组异质性克隆性造血干细胞疾病,其特征为一系或多系髓系造血细胞发育异常及高风险向急性髓系白血病(AML)转化^[1],贫血是MDS最常见的症状^[2]。过去自噬一直被视为细胞死亡的一种方式,近年来随着对自噬研究的深入,发现自噬是一种重要的机体适应性反应,在机体处于应激环境时行使重要的促存活作用^[3]。自噬通过自噬-溶酶体途径特异性地降解细胞内成分^[4],包括受损的线粒体和错误折叠的蛋白质^[5]。我们既往对MDS患者骨髓单个核细胞自噬方面的研究结果提示自噬可能对MDS起保护作用^[6]。本研究中,我们分析了MDS患者骨髓中有核红细胞自噬在MDS贫血发病机制中的作用,现报道如下。

病例与方法

1. 病例:以2015年7月至2016年7月我科收治的54例MDS患者为研究对象,其中男30例,女24例,中位年龄60.5(27~79)岁。按照2008 WHO诊断分型标准,难治性贫血(RA)2例,难治性中性粒细胞减少(RN)1例,难治性贫血伴环状铁粒幼红细胞(RARS)5例,难治性血细胞减少伴多系发育异常(RCMD)15例,难治性贫血伴有原始细胞增多1型(RAEB-1)7例,RAEB-2 23例,5q-综合征1例;54例患者均进行了染色体核型分析,其中18例核型异常,包括+8、-6、-2、-5、-7、5q-、7q-、20q-等。按国际预后积分系统(IPSS)危险度分层,低危3例、中危-1 25例、中危-2 17例、高危9例。将低危与中危-1定义为相对低危组,将中危-2与高危定义为相对高危组。对照组33例,原发免疫性血小板减少症24例,特发性白细胞减少症9例,其中男13例,女20例,中位年龄52(24~74)岁。研究方案已通过我院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

2. 透射电镜观察有核红细胞线粒体自噬过程:取MDS患者新鲜骨髓液5 ml,分离骨髓单个核细胞

(BMMNC),参照文献[7]方法制备电镜标本,采用日立H-600透射电镜进行观察。

3. 流式细胞术检测GlycoA⁺有核红细胞LC3B的表达:取骨髓液400 μ l,肝素抗凝,PBS洗涤3次,按照抗体使用说明书将GlycoA及同型对照(美国BD公司产品)分别加入Falcon管,每管中分别加入上述洗涤过的全血50 μ l,混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,加入破膜剂A 100 μ l,4 $^{\circ}$ C避光孵育5 min,加入溶血素1 ml,室温避光10 min溶解红细胞,离心弃上清,加入破膜剂B 40 μ l,随后加入LC3B-PE,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,PBS洗涤2次,上流式细胞仪进行检测。

4. 免疫磁珠法分选GlycoA⁺有核红细胞:取400 μ l BMMNC悬液,经筛网过滤,用PBS洗涤1次并计数,约 1×10^7 个细胞中加入20 μ l GlycoA磁珠抗体,4 $^{\circ}$ C孵育15 min,加入1~2 ml缓冲液洗涤1次,500 μ l缓冲液重悬细胞,磁性条件下过柱,脱离磁场洗脱并收集细胞。经验证细胞纯度可达到95%以上。

5. real-time PCR检测AMPK、ULK1和mTOR基因表达水平:取GlycoA磁珠分选的有核红细胞,TRIzol法提取总RNA样本,总RNA产物检测浓度及纯度后即按SYBR[®] Premix Ex Taq逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司产品)说明合成cDNA。引物序列由上海生工生物工程股份有限公司设计、苏州金唯智生物科技有限公司合成,以GAPDH为内参。引物序列见表1。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,共50个循环。应用7500 Real-time PCR仪(美国Applied Biosystems公司产品)和软件进行熔解及扩增曲线分析,读取扩增曲线上各组的C值及各组间相对定量的倍数,基因表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示。

6. Western blot法检测TOM20蛋白表达:在GlycoA磁珠分选的有核红细胞中加入150 μ l细胞裂解液,置于冰上裂解30 min。离心提取蛋白。调整浓度至3 μ g/ μ l,样品按4:1加入5 \times 上样缓冲液,进行SDS-PAGE。电泳后转膜,用含50 g/L脱脂奶粉

的TBST缓冲液封闭1 h,加入5%牛奶稀释的一抗(TOM20:兔抗人IgG 1:1 000;内参β-actin:兔抗人IgG 1:500),4 ℃孵育过夜。TBST洗涤3次,每次10 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(鼠抗兔1:1 000)反应1 h。TBST洗涤3次,每次10 min。化学发光法显影,ChemiDoc TM XRS⁺蛋白成像仪成像。

3. 统计学处理:应用SPSS 21.0统计软件进行分析,符合正态分布的计量资料用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐的采用LSD检验,方差不齐采用Tamhane's T2检验;不符合正态分布的计量资料用中位数(四分位间距)表示,组间比较采用Kruskal-Wallis H检验,组内两两比较调整显著性水准为0.017。相关性分析应用Pearson相关检验。

结 果

1. 透射电镜观察MDS患者有核红细胞自噬情况:我们对5例MDS患者及5例对照组患者GlycoA⁺有核红细胞进行了超微结构的分析,MDS患者不易见到自噬体及自噬溶酶体结构(图1),提示自噬体和自噬溶酶体形成障碍。由于病例数少,并未进行半定量分析。

2. MDS患者有核红细胞LC3B表达:相对高危组(23例)、相对低危组(21例)MDS患者及对照组(22例)GlycoA⁺有核红细胞LC3B表达水平分别为0.22±0.12、0.40±0.16及0.43±0.22,组间比较差异有统计学意义($F=9.882, P<0.001$),进一步采用LSD检验进行两两比较,相对高危组LC3B水平显著低

于对照组($P<0.001$)及相对低危组($P=0.001$),相对低危组LC3B水平与对照组比较差异无统计学意义($P=0.577$)。提示相对高危组MDS患者GlycoA⁺有核红细胞LC3B表达水平降低。

3. MDS患者有核红细胞 AMPK、ULK1 及 mTOR mRNA 表达:Kruskal-Wallis H 检验结果见表 2,对照组、相对低危组、相对高危组患者有核红细胞 AMPK、ULK1 及 mTOR mRNA 组间比较差异均有统计学意义(AMPK: $\chi^2=9.710, P=0.008$; ULK1: $\chi^2=14.303, P=0.001$; mTOR: $\chi^2=6.019, P=0.049$),进一步两两比较显示,相对高危组患者 AMPK、ULK1 mRNA 明显低于对照组(P 值均 <0.017),mTOR mRNA 明显高于对照组($P<0.017$)。

表 2 骨髓增生异常综合征患者 GlycoA⁺有核红细胞 AMPK、ULK1 及 mTOR mRNA 相对表达水平比较[检测例数,中位数(四分位间距)]

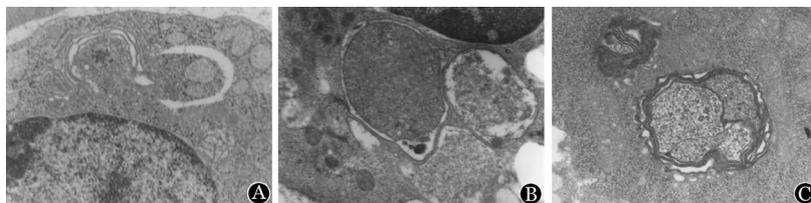
组别	例数	AMPK	ULK1	mTOR
对照组	33	19,1.00(2.07)	23,1.07(4.41)	21,1.26(1.38)
相对低危组	28	20,0.71(2.15)	21,3.93(5.86)	15,0.50(0.84)
相对高危组	26	17,0.26(0.60) ^a	14,0.27(3.31) ^{ab}	18,1.82(3.74) ^{ab}
χ^2 值		9.710	14.303	6.019
P 值		0.008	0.001	0.049

注:相对低危组为IPSS分层低危、中危-1的MDS患者,相对高危组为IPSS分层中危-2、高危的MDS患者。^a与对照组比较, $P<0.017$;^b与相对低危组比较, $P<0.017$

4. MDS患者有核红细胞LC3B水平与贫血严重度的相关性:23例相对高危组患者有核红细胞LC3B水平与HGB呈正相关($r=0.529, P=0.009$)

表 1 实时荧光定量PCR引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度(bp)
AMPK	TTGAAACCTGAAAATGTCCTGCT	GGTGAGCCACAACCTGTTCTT	113
ULK1	ACAGAGACCGTGGGCAAGT	CGACCTCAAATCGTGCTT	109
mTOR	GCAGATTTGCCAACTACC	CACGGAGAACGAGGACA	207
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA	138



A:部分细胞质与细胞器被包裹进一种特异性的双层膜或者多层膜结构的自噬体中;B:自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体;C:细胞质和细胞器成分在自噬溶酶体里降解成为核苷酸、脂肪酸、氨基酸及其他小分子物质

图 1 透射电镜观察相对高危骨髓增生异常综合征患者有核红细胞线粒体自噬过程

(图 2), 提示其与贫血严重程度呈负相关, LC3B 水平越高, 贫血越重; Pearson 相关分析提示相对低危组患者有核红细胞 LC3B 水平与 HGB 无显著相关性 ($r=0.225, P=0.277$)。

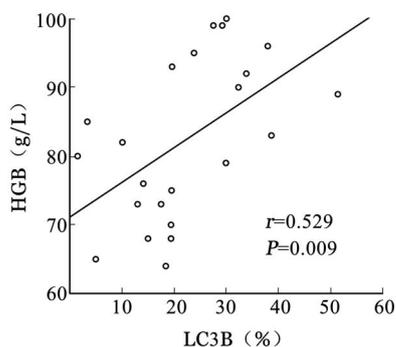


图 2 相对高危组骨髓增生异常综合征患者有核红细胞 LC3B 水平与 HGB 的相关性分析

5. MDS 患者有核红细胞 TOM20 蛋白表达: 我们检测了 3 例相对高危组、3 例相对低危组 MDS 患者及 3 例对照组患者有核红细胞 TOM20 蛋白的表达水平, 各组分别为 9.42 ± 4.42 、 3.04 ± 1.54 及 1.36 ± 0.40 , 提示相对高危组患者有核红细胞 TOM20 蛋白表达升高。

讨 论

虽然最近的研究显示 MDS 患者中存在多种突变^[8], 但是单独这些突变不能概括 MDS 的表型, 提示 MDS 患者中还存在其他通路的调节异常。贫血是 MDS 患者最常见的临床症状, 我们研究了 MDS 患者骨髓有核红细胞的自噬水平, 旨在分析其在 MDS 贫血发生机制中的作用。

首先, 我们采用透射电镜证实了 MDS 患者有核红细胞中存在自噬过程。红细胞在终末分化过程中去除细胞核和细胞器, 其中, 去除线粒体是红细胞形成的重要过程。选择性线粒体自噬特异地将线粒体定位到自噬体, 然后在溶酶体降解, 已知自噬是清除完整的、受损的、功能紊乱的线粒体的唯一方式^[9]。有研究已经证实, 缺乏 Atg1 相关丝氨酸苏氨酸激酶 ULK1, 红细胞清除线粒体、核糖体延迟, 也发生了贫血。

哺乳动物雷帕霉素靶点复合体 1 (mTORC1) 在调节自噬通路中起重要的作用。它将 PI3K/Akt 通路、细胞营养状况或能量水平的信号通路整合起来。活化的 mTORC1 通过磷酸化自噬蛋白复合体 (ULK1/2) 抑制自噬。在能量水平偏低的情况下,

AMPK 通过丝氨酸苏氨酸激酶 LKB1 活化, 然后活化 TSC2 抑制 mTORC1 活性, 最终增加自噬活性。有研究证实红细胞成熟和稳态需要 PRKAA1 (AMPK1) 依赖的自噬介导的线粒体清除^[10]。ULK1 促进传统的自噬而且促进红细胞成熟终末阶段线粒体的清除^[11]。我们的结果显示相对高危组 MDS 患者 AMPK、ULK1 表达均显著低于对照组, mTOR 表达显著高于对照组。提示相对高危组患者可能存在自噬缺陷。红细胞中 mTOR 的异常活化导致蛋白酶体介导的 ULK1 的降解, ULK1 缺乏红细胞呈大细胞性, 清除线粒体缺陷, 红细胞寿命缩短。相对高危组 MDS 患者 mTOR 蛋白活化, 可能抑制自噬水平, 促进异常线粒体的积累, 导致贫血。

条件性敲除小鼠造血干细胞必要的自噬基因 Atg7, Atg7^{-/-} 红细胞积累了大量导致细胞死亡的膜电位改变的线粒体^[12], 小鼠发展成贫血, 表现型类似 MDS。自噬不仅清除去极化的线粒体, 而且还清除 mtDNA 突变的线粒体。Li-Harms 等^[13] 利用年老的 mtDNA 突变小鼠 mtDNA 突变的积累研究了自噬与体内红细胞 mtDNA 突变相关的线粒体功能紊乱的关系。结果表明分化的红细胞中 mTOR 的异常活化通过抑制早期红系祖细胞线粒体自噬和成熟红细胞中线粒体的清除导致 mtDNA 突变小鼠发生贫血。我们的结果显示相对高危组 MDS 患者有核红细胞 LC3B 表达较相对低危组及对照组明显减低, 提示相对高危组患者自噬水平明显减低, 与 PCR 结果相一致。荷兰的一项研究提示自噬可能是清除缺陷的铁过载线粒体的保护机制, 自噬能抑制 MDS 向 AML 转化^[14]。MDS 较常发生于老年人可能与随着年龄的增长自噬水平降低有关。

自噬能够通过线粒体蛋白的降解联合自噬标志物如 LC3 II 的出现及 P62 蛋白的降解来检测。通过检测线粒体蛋白表达量的变化可反映末期线粒体总量的改变, 从而间接反映自噬的活性。TOM20 蛋白是线粒体的外膜蛋白, 我们分析了 MDS 及对照组的有核红细胞 TOM20 的表达。结果显示相对高危组高于对照组及相对低危组。

我们的结果显示相对高危 MDS 患者贫血严重程度与 LC3B 水平呈负相关, 提示有核红细胞自噬可能参与高危 MDS 贫血发病机制。一项临床试验显示雷帕霉素对部分老年 MDS 患者有效, 通过抑制线粒体功能紊乱与 mTOR 活化的恶性循环, 活化红系祖细胞自噬水平, 减轻了 MDS 患者的症状^[15]。另外, 目前治疗高危 MDS 患者的药物阿扎胞苷, 除

了减少甲基化外,也可以增加细胞的自噬与凋亡^[16],均提示诱导自噬可能治疗MDS。

总之,MDS患者有核红细胞自噬水平随危险度的升高而降低,自噬水平降低可能与MDS向AML转化有关。高危MDS自噬水平与贫血严重程度呈负相关,诱导自噬的药物(mTOR抑制剂雷帕霉素等)可能缓解MDS患者的贫血症状,抑制MDS向AML的转化。

参考文献

- [1] Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, et al. Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(7):838-874.
- [2] Prebet T, Zeidan A. Trends in Clinical Investigation for Myelodysplastic Syndromes [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2016, 16 Suppl:S57-63. DOI: 10.1016/j.clml.2016.02.012.
- [3] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. Autophagy, 2012, 8(4):445-544.
- [4] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation [J]. Nature, 2011, 469(7330):323-35. DOI: 10.1038/nature09782.
- [5] Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, et al. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines [J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0137675. DOI: 10.1371/journal.pone.0137675.
- [6] 郭利芳,崔宁博,王化泉,等.骨髓增生异常综合征患者骨髓单个核细胞自噬水平的研究[J].中华血液学杂志,2015,36(12):1016-1019. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.12.008.
- [7] 董树旭,赵轶轩,王颖,等.利用透射电镜技术分析血细胞自噬在血液病中的分布特点[J].中华血液学杂志,2015,36(2):144-147. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.013.
- [8] Cazzola M, Della PMG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance [J]. Blood, 2013, 122(25):4021-4034. DOI: 10.1182/blood-2013-09-381665.
- [9] Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria [J]. Cell Death Differ, 2013, 20(1):31-42. DOI: 10.1038/cdd.2012.81.
- [10] Zhu H, Foretz M, Xie Z, et al. PRKAA1/AMPKα1 is required for autophagy-dependent mitochondrial clearance during erythrocyte maturation [J]. Autophagy, 2014, 10(9):1522-1534. DOI: 10.4161/auto.29197.
- [11] Honda S, Arakawa S, Nishida Y, et al. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes [J]. Nat Commun, 2014, 5:4004. DOI: 10.1038/ncomms5004.
- [12] Mortensen M, Watson AS, Simon AK. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation [J]. Autophagy, 2011, 7(9):1069-1070.
- [13] Li-Harms X, Milasta S, Lynch J, et al. Mito-protective autophagy is impaired in erythroid cells of aged mtDNA-mutator mice [J]. Blood, 2015, 125(1):162-174. DOI: 10.1182/blood-2014-07-586396.
- [14] Watson AS, Mortensen M, Simon AK. Autophagy in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia [J]. Cell Cycle, 2011, 10(11):1719-1725. DOI: 10.4161/cc.10.11.15673.
- [15] Platzbecker U, Haase M, Herbst R, et al. Activity of sirolimus in patients with myelodysplastic syndrome—results of a pilot study [J]. Br J Haematol, 2005, 128(5):625-630. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05360.x.
- [16] Cluzeau T, Robert G, Puissant A, et al. Azacitidine-resistant SKM1 myeloid cells are defective for AZA-induced mitochondrial apoptosis and autophagy [J]. Cell Cycle, 2011, 10(14):2339-2343. DOI: 10.4161/cc.10.14.16308.

(收稿日期:2016-09-07)

(本文编辑:刘爽)

·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