

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

郭利芳 崔宁博 王化泉 付蓉 瞿文 阮二宝 王小明 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)患者骨髓单个核细胞(BMMNC)自噬水平的变化,探讨细胞自噬在MDS中的作用。方法 以38例MDS患者为实验组,以26例巨幼细胞贫血患者为对照组,抽取骨髓并分离BMMNC。应用透射电镜观察自噬情况;采用单丹(碘)酰戊二胺(MDC)染色法检测自噬泡水平;采用RT-PCR、免疫荧光技术及蛋白免疫印迹法检测微管相关蛋白轻链3(LC3)、Beclin1 mRNA及蛋白的表达水平。结果 MDS患者BMMNC内易见自噬泡;MDC染色显示MDS患者BMMNC含自噬泡细胞数量显著高于对照组[(9.75±2.63)%对(2.90±0.89)% , $P < 0.05$];MDS患者BMMNC LC3阳性细胞比例显著高于对照组[(6.13±1.03)%对(1.50±0.58)% , $P < 0.05$]。低危/中危-1 MDS患者BMMNC Beclin1及LC3A mRNA表达水平显著高于对照组(3.61±3.02对1.55±1.03, $P < 0.05$; 6.56±3.97对1.21±0.95, $P < 0.05$);低危/中危-1 MDS患者BMMNC自噬负性调控基因-哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)mRNA水平显著低于对照组(0.39±0.37对1.50±1.03, $P < 0.05$);中危-2/高危MDS患者BMMNC Beclin1、LC3和mTOR mRNA表达水平与对照组比较差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。蛋白免疫印迹法显示低危/中危-1患者BMMNC Beclin1蛋白表达(1.257±0.197)高于对照组(0.528±0.086)及中危-2/高危(0.622±0.118),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。中危-2/高危组和对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 低危/中危-1 MDS患者BMMNC自噬水平升高,中危-2/高危MDS组患者BMMNC自噬水平无明显改变,自噬对MDS患者可能起保护性作用,自噬水平相对不足可能与MDS的进展有关。

【关键词】 骨髓增生异常综合征; 自噬

Autophagy level of bone marrow mononuclear cells in patients with myelodysplastic syndromes

Guo Lifang, Cui Ningbo, 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 mononuclear cells (BMMNCs) in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). **Methods** Thirty-eight patients with MDS and 26 megaloblastic anemia patients were enrolled in this study. The autophagic vacuoles were observed by transmission electron microscopy (TEM) and the quantity of autophagic vacuoles was detected by monodansylcadaverine (MDC) staining. The LC3 protein positive cells were counted by immunofluorescence assays. The expression of Beclin 1, LC3A, mTOR mRNA were measured by real time PCR. The expression of Beclin 1 proteins were detected by Western blotting. **Results** The autophagic vacuoles of double membrane that surrounds lysosomes appeared in MDS patients. The percentage of MDC positive cells was significantly higher in MDS patients [(9.75±2.63)%] than that of controls [(2.90±0.89)% , $P < 0.05$]. The percentage of LC3 protein cells was also increased in MDS patients (6.13±1.03)% vs (1.5±0.58)% , $P < 0.05$. The expression of Beclin 1 and LC3A mRNA in low-risk and intermediate-1

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.12.008

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)

作者单位:300052 天津医科大学总医院血液科

通信作者:邵宗鸿,Email:shaozonghong@sina.com

MDS were higher compared with controls (3.61 ± 3.02 vs 1.55 ± 1.03 and 6.56 ± 3.97 vs 1.21 ± 0.95 respectively, both $P < 0.05$). The expression of mTOR mRNA was down-regulated in low-risk and intermediate-1 MDS compared with controls (0.39 ± 0.37 vs 1.50 ± 1.03 , $P < 0.05$). There were no significant difference in expression of Beclin 1, LC3 and mTOR mRNA among intermediate-2 and high-risk MDS and controls. Beclin 1 protein expression was higher in low-risk and intermediate-1 MDS patients (1.257 ± 0.197) than that of controls (0.528 ± 0.086) and intermediate-2 and high-risk MDS patients (0.622 ± 0.118).

Conclusion The autophagy levels were increased in low-risk and intermediate-1 MDS, while not enhanced in intermediate-2 MDS. Autophagy might be considered as a cell protective mechanism in MDS. The relatively defective autophagy in intermediate-2 and high-risk MDS might contribute to disease's progression.

【Key words】 Myelodysplastic syndrome; Autophagy

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细胞发育异常及高风险向急性髓系白血病(AML)转化^[1],发病机制至今仍不明确。近年来,自噬与肿瘤的关系受到了广泛关注。不同类型细胞在不同阶段的自噬水平不同。本研究我们通过研究MDS患者骨髓单个核细胞(BMMNC)自噬水平,探讨细胞自噬在MDS中的作用。自噬分为大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬^[2],其中大自噬为最经典的自噬方式,本研究我们检测的是大自噬水平。

病例和方法

1. 病例:2013年12月至2014年11月我科收治的MDS患者38例,其中男22例,女16例,中位年龄55(19~82)岁。诊断及分型参照文献[3]标准,其中难治性贫血(RA)2例,难治性血小板减少(RT)2例,难治性贫血伴环状铁粒幼红细胞(RARS)3例,难治性贫血细胞减少伴多系发育异常(RCMD)13例,难治性贫血伴原始细胞增多-1(RAEB-1)5例,RAEB-2 11例,5q-综合征1例。38例患者均进行染色体核型分析,其中11例核型异常,包括+8 3例、-7,5q-、7q-及20q-各2例。按国际预后积分系统(IPSS)进行危险度分层,其中低危5例,中危-1 21例,中危-2 7例,高危5例。以26例巨幼细胞贫血患者为对照组,其中男11例,女15例,中位年龄52(15~72)岁。本研究方案经我院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

2. 透射电子显微镜观察细胞内自噬泡形态:取MDS患者新鲜骨髓液3 ml,分离BMMNC,戊二醛固定细胞,1%锇酸固定细胞,丙酮脱水,中间液代换,乙醇和醋酸异戊酯1:1混合液浸泡,醋酸异戊酯浸泡,临界点干燥,粘贴样品,在离子溅射仪镀膜后于透射电子显微镜(日本Hitachi公司产品)下观察细胞自噬情况。

3. 单丹(磺)酰戊二胺(MDC)染色法观察细胞中自噬泡:分离BMMNC,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,取1 ml细胞悬液,离心弃上清。加入1 ml浓度为0.05 mmol/L的MDC,37℃、5% CO₂孵育45 min。免疫染色固定液固定10 min,30 min内荧光显微镜下UV激发观察、成像,细胞内亮绿色荧光小体即为自噬体。细胞内自噬体超过3个为自噬体阳性细胞。共计数200个细胞,并计算自噬体阳性细胞百分率。计数重复3次。

4. 免疫荧光法观察细胞中LC3蛋白的表达:分离BMMNC,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。取适量细胞滴片,固定、破膜、2% BSA后,加入兔抗人LC3抗体(美国CST公司产品,1:200稀释)4℃孵育过夜。预冷PBS洗涤3次,每次5 min。加入PE标记的鼠抗兔二抗(美国CST公司产品,1:500稀释),室温孵育60 min。PBS洗涤3次,每次10 min。加入20 μl抗荧光封片液封固。荧光显微镜观察细胞中LC3蛋白表达。共计数200个细胞。计数重复3次。

5. Real time PCR检测mTOR、LC3A和Beclin 1基因表达水平:分离BMMNC,TRIzol法提取总RNA样本,按Omniscrypt Reverse Transcription Kit逆转录试剂盒(德国Qiagen公司产品)说明合成cDNA。按等量cDNA进行qPCR反应。反应体系20 μl:SYBR® Premix Ex Taq[宝生物工程(大连)有限公司产品] 10 μl,ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μl,上下游引物各0.4 μl,样本2 μl,灭菌蒸馏水6.8 μl。引物序列见表1。反应条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,共40个循环。相对定量的倍数(RF)用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示。

6. 蛋白免疫印迹法检测Beclin1蛋白:分离BMMNC,加入300 μl细胞裂解液(PMSF:RIPA=1:100),置于冰上裂解30 min。离心提取蛋白。调整浓度至3 g/L,样品按4:1加入5×上样缓冲液,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后

转膜,用含50 g/L脱脂奶粉的TBST封闭1 h,稀释一抗(Beclin1:兔抗人IgG 1:1 000;内参 γ -Tubulin:兔抗人IgG 1:1 000),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,image J检测各蛋白条带相对灰度值,表示蛋白相对表达量。

7. 统计学处理:应用SPSS 18.0统计软件进行分析,计量资料数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。均数比较采用*t*检验,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

表1 自噬相关基因及内参引物序列

目的基因	引物序列	长度(bp)
LC3A	上游引物:5'-CGGACATCTACGAGCAGGA-3'	170
	下游引物:5'-AGAGGCAGCTCAGTTCAGGA-3'	
Beclin 1	上游引物:5'-CAAGATCCTGGACCGTGTC-3'	372
	下游引物:5'-GTGACGTTGAGCTGAGTGT-3'	
mTOR	上游引物:5'-GCAGATTTGCCAACTACC-3'	170
	下游引物:5'-CACGGAGAACGAGGACA-3'	
GAPDH	上游引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	100
	下游引物:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'	

结 果

1. 透射电镜观察MDS患者BMMNC中自噬泡:MDS患者BMMNC中自噬泡数量明显增多,其典型特征是双层膜包裹细胞器,部分与溶酶体融合(图1),而对照组BMMNC中很难找到自噬泡。

2. MDC染色观察MDS患者BMMNC中自噬泡:荧光显微镜下可见MDS患者BMMNC中存在散在绿色光点,自噬泡水平高于对照组(图2)。计数200个细胞,发现MDS组染色阳性(自噬泡)细胞数目比例[*n*=4,(9.75±2.63)%]显著高于对照组[*n*=5,(2.90±0.89)%,*P*<0.05]。

3. 免疫荧光法观察BMMNC中LC3蛋白的表

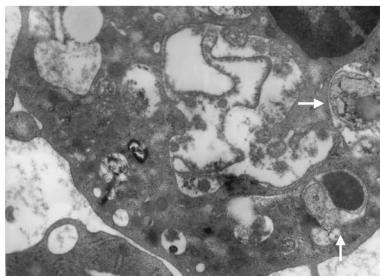
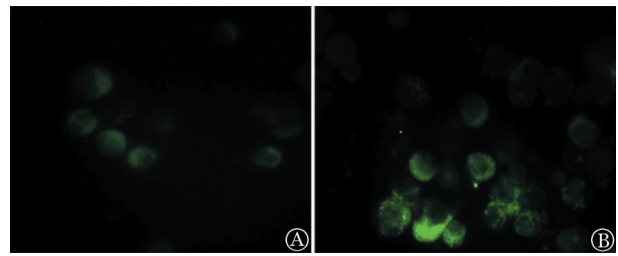


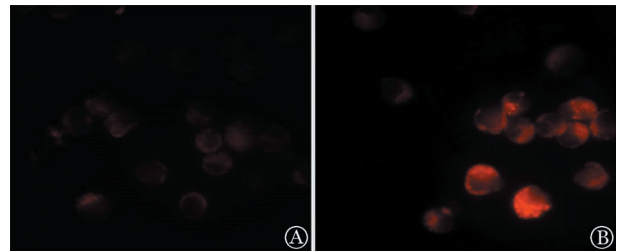
图1 透射电镜下见骨髓增生异常综合征患者骨髓单个核细胞内存在自噬现象($\times 15\ 000$,箭头所示为自噬体)



A:对照组;B:MDS组

图2 荧光显微镜观察骨髓增生异常综合征(MDS)患者骨髓单个核细胞中自噬泡

达:免疫荧光法显示LC3红色斑点散布于细胞内,MDS组荧光斑点明显强于对照组(图3)。计数200个细胞,发现MDS组LC3阳性细胞数目比例[*n*=4,(6.13±1.03)%]显著高于对照组[*n*=4,(1.50±0.58)%,*P*<0.05]。



A:对照组;B:MDS组

图3 免疫荧光法观察骨髓增生异常综合征(MDS)患者骨髓细胞中LC3蛋白的表达

4. PCR方法检测细胞自噬相关基因表达:低危/中危-1患者(*n*=14)BMMNC内LC3和Beclin1表达水平分别为6.56±3.97及3.61±3.02,均高于对照组(*n*=11,1.21±0.95及1.55±1.03)(*P*值均<0.05),负性调控基因mTOR表达水平低于对照组(0.39±0.37对1.50±1.03,*P*<0.05);中危-2/高危组(*n*=8)Beclin1、LC3和mTOR表达水平与对照组比较差异均无统计学意义(*P*值均>0.05)。

5. 蛋白免疫印迹法检测BMMNC自噬相关蛋白表达比较:对照组、低危/中危-1和中危-2/高危组BMMNC的Beclin1蛋白相对表达量分别为0.528±0.086、1.257±0.197和0.622±0.118,低危/中危-1组Beclin1的表达量明显高于对照组和中危-2/高危组(*P*值均<0.05),而中危-2/高危组和对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。

讨 论

自噬是一种经溶酶体或空泡介导的降解退化细胞质成分的途径^[4]。饥饿和氧化应激等可诱导自

噬。自噬对肿瘤具有双重作用,一方面自噬有抑制肿瘤形成作用,自噬相关基因的缺失会导致细胞线粒体功能障碍,增加氧化应激,从而导致DNA受损产生基因不稳定性,最终染色体稳定性破坏导致肿瘤发生^[4]。在已形成肿瘤组织中,自噬通过提供能量和营养可增强肿瘤细胞的存活能力^[5]。Houwerzijl等^[6]发现低危MDS患者骨髓幼稚红细胞中存在自噬活性增高。虽然近年来MDS中自噬水平的改变逐渐受到关注,但这方面研究还较少。

我们通过电子显微镜观察到本组MDS患者BMMNC内自噬泡增多。国内董树旭等^[7]也发现MDS患者骨髓细胞自噬泡增多。我们通过MDC染色发现MDS患者细胞较对照组有大量荧光颗粒存在,提示自噬水平升高。

LC3是一种自噬标志蛋白,自噬过程中LC3前体经加工修饰成为LC3A,LC3A与磷脂酰乙醇胺(PE)结合修饰为膜结合型LC3B,继而参与自噬过程。哺乳动物细胞自噬过程中,LC3含量及LC3A向LC3B转化均明显增加^[8]。通过免疫荧光法,我们观察到MDS组细胞LC3表达明显高于对照组。PCR结果也表明LC3A mRNA表达增高。

Beclin1是哺乳动物细胞调控自噬的重要因子^[9],与酵母自噬相关基因Atg6同源。Beclin1/Vps34复合物能够使某些蛋白定位于前自噬体结构,从而促进自噬体的形成。mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶点,在生物体细胞的自噬诱导过程中发挥主要的调节作用。本研究结果显示,低危/中危-1患者Beclin1 mRNA表达增高而mTOR表达降低;中危-2/高危组Beclin1、mTOR与对照组相比则表达水平无明显改变。提示低危/中危-1组骨髓细胞自噬水平高于对照组,而中危-2/高危组患者自噬水平没有明显增强。蛋白免疫印迹结果证实Beclin1蛋白表达较对照组增高。

MDS细胞中存在线粒体结构异常,且MDS患者骨髓原始红细胞、早幼红细胞中线粒体数量增加^[10]。除了调节Caspase依赖的凋亡途径外,无功能线粒体堆积还可引起细胞活性氧水平增加,引起DNA突变,最终会引起异常线粒体释放细胞色素C诱发细胞死亡或促使MDS转化为AML。本研究我们检测到低危/中危-1患者BMMNC自噬水平增加,而中危-2/高危患者自噬水平却没有升高,可能说明高水平自噬能保护低危/中危-1组患者不受由于线

粒体结构异常引起ROS形成造成的损伤,直到细胞因为其他原因凋亡,从而这些MDS转化为AML的危险性较低。而中危-2/高危组患者骨髓细胞自噬水平较对照组没有升高,可能因为细胞自噬水平不足以保护细胞不受ROS升高造成的损伤,导致DNA损伤、突变,进展为AML。

总之,低危/中危-1患者BMMNC自噬水平升高,中危-2/高危患者BMMNC自噬水平无明显改变,自噬对MDS患者可能起保护性作用,自噬水平相对不足可能与MDS疾病进展有关。

参考文献

- [1] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes[J]. *Blood*, 2009, 114(5): 937-951.
- [2] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1):27-42.
- [3] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征诊断与治疗中国专家共识(2014年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(11): 1042-1048.
- [4] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330):323-335.
- [5] White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17):5308-5316.
- [6] Houwerzijl EJ, Pol HW, Blom NR, et al. Erythroid precursors from patients with low-risk myelodysplasia demonstrate ultrastructural features of enhanced autophagy of mitochondria[J]. *Leukemia*, 2009, 23(5):886-891.
- [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.
- [8] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing[J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [9] Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, et al. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L)[J]. *Autophagy*, 2007, 3(4):374-376.
- [10] van de Loosdrecht AA, Brada SJ, Blom NR, et al. Mitochondrial disruption and limited apoptosis of erythroblasts are associated with high risk myelodysplasia. An ultrastructural analysis[J]. *Leuk Res*, 2001, 25(5):385-393.

(收稿日期:2015-06-04)

(本文编辑:刘爽)