

抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 在巨核细胞分化和成熟过程中的作用

张 磊, 杨仁池, 卢士红, 刘 斌, 任 贺, 韩之波, 韩忠朝

中国医学科学院 北京协和医学院 血液学研究所 血液病医院 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

通信作者: 杨仁池 电话: 022-23909122, 传真: 022-23909047, 电子邮件: yangrenchi@hotmail.com

摘要:目的 研究抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 在巨核细胞分化和成熟过程中的作用。方法 采用 PDBu 诱导 K562 细胞向巨核细胞分化, RNA 干扰阻断 Bcl-x_L 在 K562 细胞向巨核细胞诱导分化中的表达, RT-PCR 和流式细胞仪技术检测其改变。采用免疫磁珠从正常骨髓中富集 CD34⁺ 细胞, 在无血清培养下用 TPO 诱导其向巨核细胞分化, 免疫组织化学和流式细胞仪技术观察分化过程中 Bcl-x_L 的表达改变。结果 PDBu 诱导 K562 细胞向巨核细胞分化 24 h 后, CD61⁺ 细胞百分比迅速增加, 并且在 72 h 内维持较高的阳性率; 用 siBcl-x_L 干扰后 72 h 内, CD61⁺ 细胞百分比只有轻度增加, 同时 RT-PCR 检测显示 24 h 后 Bcl-x_L mRNA 表达显著减少, 流式细胞检测显示 Bcl-x_L 蛋白的表达也相应降低。正常骨髓中 CD34⁺ 细胞经 TPO 诱导后, 在培养 5 ~ 20 d 间 Bcl-x_L 蛋白表达阴性的巨核细胞随着培养时间延长逐渐增多, 免疫组织化学检测显示未成熟的巨核细胞 Bcl-x_L 蛋白表达呈强阳性, 而在成熟的巨核细胞中表达为阴性。结论 抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 在巨核细胞分化过程中发挥重要作用, 而在巨核细胞发育晚期 Bcl-x_L 蛋白的表达下调可能是巨核细胞成熟的关键, 并与成熟巨核细胞的特殊凋亡发生密切相关。

关键词: 巨核细胞; 凋亡; Bcl-x_L; 干扰 RNA

中图分类号: R363.2 + 1 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)03-0374-05

Role of Antiapoptotic Bcl-x_L in Megakaryocyte Differentiation and Maturation

ZHANG Lei, YANG Ren-chi, LU Shi-hong, LIU Bin, REN He, HAN Zhi-bo, HAN Zhong-chao

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Hospital of Blood Disease,
Institute of Hematology, CAMS and PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: YANG Ren-chi Tel: 022-23909122, Fax: 022-23909047, E-mail: yangrenchi@hotmail.com

ABSTRACT: Objective To investigate the role of antiapoptotic Bcl-x_L protein in megakaryocyte differentiation and maturation. **Methods** RNA interference was used to block the expression of Bcl-x_L when K562 cells were induced to differentiate into megakaryocyte (CD61⁺ cells) by PDBu, and the expression of Bcl-x_L was evaluated with flow cytometry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The CD34⁺ cell fraction was positively isolated by using the MiniMACS system from normal bone marrow. Immunohistochemical staining and flow cytometry were used to detect the expression of Bcl-x_L in the differentiation (CD41⁺ cells) of CD34⁺ cells induced by thrombopoietin (TPO). **Results** Among K562 cells induced by PDBu, the percentage of CD61⁺ cells rapidly increased in 24 hours and maintained at a high positive level in 72 hours. When exposed to si-Bcl-x_L, the percentage of CD61⁺ cells only slightly increased in 72 hours. The expression of Bcl-x_L mRNA was significantly decreased after transfection compared with that of control group, and Bcl-x_L protein expression decreased correspondingly. After the CD34⁺ bone marrow cells having been treated with TPO for 5 days to 20 days, the Bcl-x_L-megakaryocytes increased as the culture time prolonged, and there was a strong expression of Bcl-x_L in immature megakaryocyte and an obviously decreased expression in degenerating

mature megakaryocyte. **Conclusions** Increased expression of antiapoptotic Bcl-x_L may be essential to megakaryocytes maturation. The down-regulation of antiapoptotic Bcl-x_L in mature megakaryocyte may be crucial to platelets formation.

Key words : megakaryocyte ; apoptosis ; Bcl-x_L ; siRNA

Acta Acad Med Sin , 2007 29(3) 374 - 378

近年来,随着研究的不断深入,人们对血小板的产生有了更为深刻的认识。多项研究表明,成熟巨核细胞在产生血小板过程中表现出许多细胞凋亡的特征,由此推测可能是巨核细胞特殊的凋亡过程导致了血小板产生^[1-3]。Bcl-x_L是Bcl-2凋亡相关蛋白家族中的一种抗凋亡蛋白,最近研究发现,Bcl-x_L基因失活或过度表达皆能够破坏血小板产生,Bcl-x_L可能在巨核细胞的分化、成熟及血小板产生过程中发挥重要作用^[4]。本研究采用RNA干扰技术使抗凋亡蛋白Bcl-x_L基因沉默,观察Bcl-x_L基因沉默后对巨核细胞分化的影响,并同时测定骨髓CD34+细胞在向巨核细胞诱导分化过程中抗凋亡蛋白Bcl-x_L表达变化,以进一步研究抗凋亡蛋白Bcl-x_L在巨核细胞分化中的作用。

材料和方法

RNA 干扰 siRNA设计原则:使用双链siRNA, RNA应带有1个19nt的双链互补域且每个末端带1个2-核苷3'突出端。干扰的目的片段位于Bcl-x_L mRNA的第48~69核苷酸(GenBank accession number Z23115),序列是aagagaatcactaaccagaga,正义siRNA链为:gagaaucauaaccagagatt,反义siRNA链为:ucucugguuagauuucutt。使用Silencer™ siRNA Construction Kit(Ambion, Austin, TX)试剂盒合成双链siRNA,同时设计含有1个碱基突变的siRNA作为对照组。根据试剂盒所提供的转染指南使用Lipofectamine™2000将siRNA转入细胞内。采用Ambion公司生产的Silencer siRNA Construction Kit Procedure试剂盒。

K562 细胞的培养及诱导分化 使用本实验室保存的K562细胞,以 $1 \times 10^6/75 \text{ cm}^2$ 密度种植,采用1640培养基(10% FCS, 4 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/ml 庆链霉素),置37℃、5%的CO₂孵箱中进行培养,每隔2~3 d 1:3传代。将准备诱导的K562细胞以 $1 \times 10^6/75 \text{ cm}^2$ 密度种植,采用DF12培养基(1% FCS, 4 mmol/L 谷氨酰胺)培养,同时加入50 nmol/L的PDBu诱导细胞分化,置37℃、5%的CO₂孵箱

中,在24、48和72 h 3个时间点测定细胞改变。

RT-PCR 检测培养细胞中 Bcl-x_L mRNA 的表达 抗凋亡蛋白Bcl-x_L及内参照(GAPDH)引物用Generunner软件设计,Bcl-x_L正义链:accactctccaccttg,反义链:getgtagccaaattcgttg,扩增片段长度562 bp,GAPDH正义链:ggagctgggtgacttcc,反义链:caaggctctaggtgtcatt,扩增片段长度96 bp,由北京生物技术公司合成。从K562细胞提取总mRNA,RT-PCR方法扩增检测。RT-PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环;最后72℃再延伸7 min。扩增产物电泳后紫外灯照相,用Kodak Digital Science EDAS 120软件分析。

骨髓单个核细胞分离 采集正常成人骨髓5~10 ml,用ACD-A抗凝,标本采集4 h内进行分离,首先用PBS按1:1体积的比例稀释骨髓,然后缓缓加至约1:1体积的淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque)的液面上,1800 r/min离心20 min,吸取中间的细胞,PBS缓冲液洗涤2次,1500 r/min离心10 min,制备单个核细胞(mononuclear cells, MNC)悬液。若红细胞仍然很多,可用5 ml PBS缓冲液重悬细胞,用10倍体积的低渗氯化铵溶液裂解残留红细胞。

CD34+ 细胞的纯化及培养 采用MiniMACS免疫磁性吸附柱分离装置,应用CD34+细胞单选试剂盒进行细胞的分离和纯化。用无血清培养基将CD34+细胞以 5.0×10^4 个/ml的密度种植在24孔板中,同时在培养基中加入人重组TPO,浓度为100 ng/ml,每隔3 d换1次培养液。分别于培养第5、10、15和20天收集细胞,采用流式细胞技术检测Bcl-x_L和CD41a。在培养10 d时收集部分细胞进行免疫组织化学染色检测Bcl-x_L的表达。

免疫组织化学技术 把培养的悬浮细胞(1×10^5 /ml)用涂片机均匀涂到多聚赖氨酸处理过的载玻片上,冷丙酮固定15 min。采用SAB法进行Bcl-x_L抗凋亡蛋白检测,过程如下:3%过氧化氢孵育后用血清封闭,先后滴加抗人Bcl-x_L单克隆抗体、生物素标记的羊抗小鼠IgG以及辣根酶标记链霉卵白素

工作液室温孵育，DAB 显色，苏木素复染，常规脱水封片。

流式细胞仪检测

双色标记法流式细胞检测：从培养的细胞悬液中取出 1×10^5 细胞，平均分置于两个 Eppendorf 管中，其中一管为阴性对照；加入 PE 标记的鼠抗人 CD41a 抗体孵育 30 min 后，用 2% 多聚甲醛固定细胞 30 min，皂素破膜后加入 FITC 标记的鼠抗人 Bcl-x_L 抗体孵育 30 min；在 2 h 内流式细胞仪 CScalibur (B-D) 分析，计数 10^4 个细胞，CellQuest 软件分析结果。阴性对照用 PE 和 FITC 标记的鼠 IgG1 孵育。

单色标记流式细胞仪检测：从培养的细胞悬液中取出 1×10^5 细胞，平均分置于 2 个 Eppendorf 管中，其中一管为阴性对照；用 FITC 标记的鼠抗人 CD61 抗体孵育后，在 2 h 内流式细胞仪 CScalibur (B-D) 检测，计数 10^4 个细胞，CellQuest 软件分析结果；阴性对照用 PE 和 FITC 标记的鼠 IgG1 孵育。

细胞凋亡检测 采用 Annexin V 试剂盒检测细胞凋亡，具体操作过程如下：用冷 PBS 将所收集的细胞洗 2 次，然后用试剂盒提供的 $1 \times$ Binding Buffer 把细胞稀释为 1×10^6 /ml；加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 PI；置室温下避光孵育 15 min；加入 $1 \times$ Binding Buffer 后，1 h 内用流式细胞仪 CScalibur (B-D) 检测；计数 10^4 个细胞，CellQuest 软件分析结果。

统计学分析 采用 SPSS11.0 软件处理数据，Student *t* 检验试验组和对照组的差别，*P* < 0.05 表示差异有显著性。

结 果

siRNA 干扰对 K562 细胞诱导分化的影响

K562 细胞用 50 nmol/L PDBu 诱导 24 h 后，CD61 + 细胞从 (0.75 ± 0.12)% 上升到 (67.4 ± 4.8)%，并在 72 h 内维持较高阳性率。在诱导同时采用 si-Bcl-x_L 干扰，24 h 后 CD61 + 细胞仅从 (0.40 ± 0.87)% 上升到 (13.7 ± 4.5)%，72 h 后升高到 (37.8 ± 5.4)% (图 1)。

siRNA 干扰诱导分化的 K562 细胞 Bcl-x_L mRNA

和蛋白的表达改变 在干扰后 24 和 48 h，Bcl-x_L mRNA 表达显著减低，而在 72 h 后 Bcl-x_L mRNA 转录开始恢复 (图 2)。流式细胞检测 Bcl-x_L 蛋白在诱导分化的 K562 细胞中的表达与 mRNA 表达相一致，24 和 48 h 蛋白表达很低，在 72 h 蛋白表达有所升高 (图 3)。

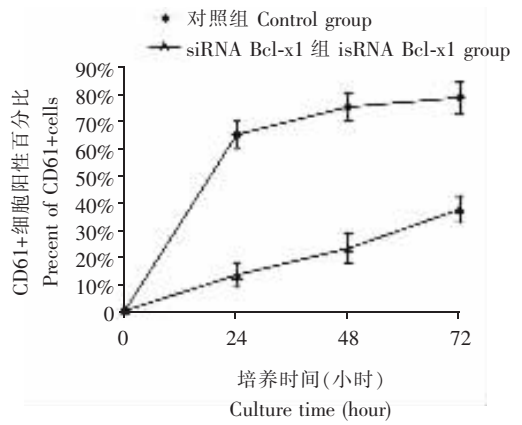


图 1 K562 细胞诱导分化过程中 CD61 + 细胞数的变化
Fig 1 Change of CD61 + cell numbers during differentiation of K562 cells induced

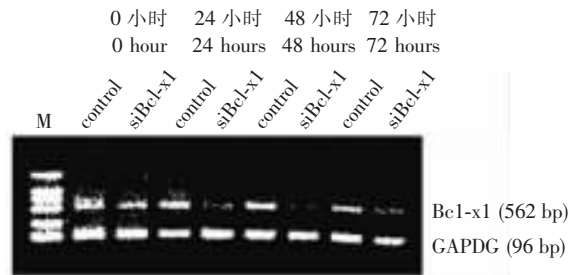


图 2 siBcl-x_L 干扰后 Bcl-x_L mRNA 的表达
Fig 2 Bcl-x_L mRNA after siBcl-x_L interference
M: 标准
M: marker

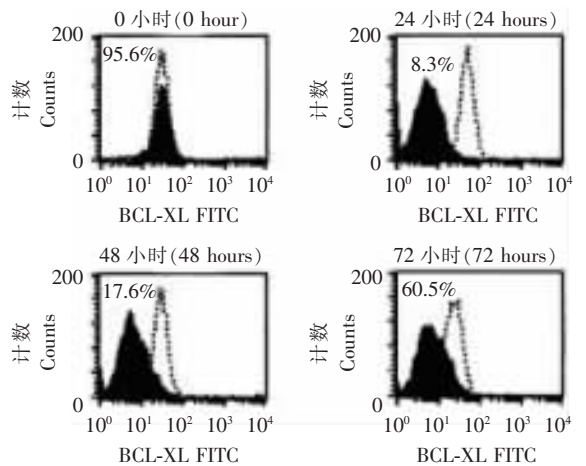


图 3 siBcl-x_L 干扰后 Bcl-x_L 蛋白的表达
Fig 3 The expression of protein Bcl-x_L after siBcl-x_L interference

siRNA 干扰诱导分化的 K562 细胞凋亡的改变

干扰组在 0、24、48 和 72 h 的凋亡率分别为 (1.2 ± 0.2)%、(19.3 ± 1.4)%、(25.5 ± 2.5)% 和 (27.5 ± 2.6)%，对照组细胞 (1 个碱基突变的 siRNA 作为对照组) 则为 (1.3 ± 0.1)%、(15.5 ± 1.2)%、(20.2 ±

2.3)% 和 (22.1 ± 3.4)% , 干扰组轻度高于对照组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。

TPO 诱导的正常骨髓 CD34⁺ 细胞向巨核细胞分化过程中 Bcl-x_L 表达 用 100 ng/ml 的 TPO 诱导分选的正常骨髓 CD34⁺ 细胞, 分别于第 5、10、15 和 20 天检测 CD41a⁺ 细胞 Bcl-x_L 蛋白的表达, 结果显示, 在培养的第 5 天, (95.2 ± 5.0)% 的 CD41a⁺ 细胞高度表达 Bcl-x_L 蛋白; 随着培养时间的延长, 第 10 和 15 天 CD41a⁺ 细胞中 Bcl-x_L 蛋白表达阴性的细胞逐渐增多, 分别为 (30.1 ± 22.1)% 和 (60.5 ± 30.2)%。到第 20 天, (96.3 ± 10.1)% CD41a⁺ 细胞为 Bcl-x_L 蛋白阴性 (图 4)。

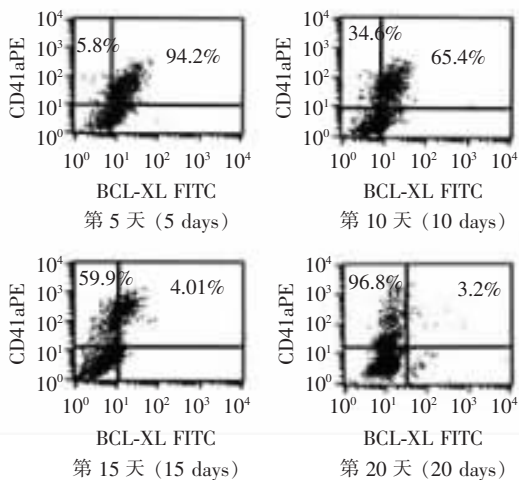


图 4 正常骨髓 CD34⁺ 细胞向巨核细胞分化过程中 Bcl-x_L 表达
Fig 4 The expression of Bcl-x_L during megakaryocyte differentiation of normal marrow CD34⁺ cells

Bcl-x_L 在未成熟和成熟巨核细胞中的表达 用无血清培养基培养正常骨髓的 CD34⁺ 细胞, 并用 TPO 诱导分化, 在培养 10 d 左右时, 将培养的细胞涂片, 进行免疫组织化学染色, 结果显示, 未成熟的巨核细胞形态规则, 细胞膜完整, 细胞核较大, 胞浆中 Bcl-x_L 表达强阳性 (图 5A); 成熟的巨核细胞体积较大, 细胞膜边缘不规则, 细胞核大, 胞浆中 Bcl-x_L 表达很弱 (图 5B)。

讨 论

近来研究表明, 成熟巨核细胞在产生血小板过程中表现出了许多细胞凋亡的特征。体外研究显示, 在培养的上清液中血小板的释放与这些细胞的凋亡同步发生, 这种时间的相关性暗示了血小板的产生和巨核细胞的凋亡可能存在密切关系^[5]。Botton

等^[6]研究发现, 成熟巨核细胞内特定局部细胞浆 caspase 激活导致了血小板产生。

Sanz 等^[4]研究了 Bcl-2 家族凋亡相关蛋白在巨核细胞分化成熟中的作用, 发现在 TPO 诱导脐血 CD34⁺ 细胞向巨核细胞分化的过程中以及用 PMA 诱导原始巨核细胞系 UT7 分化过程中, 抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 逐渐增多, 而其他凋亡相关蛋白, 如 Bcl-2、BAD 和 BAX 未有明显改变, 而成熟晚期的巨核细胞抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 显著减少。另外一些学者也发现 PMA 诱导 K562 细胞向巨核细胞分化过程中抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 表达升高^[7]。在 Bcl-x_L 基因突变小鼠模型中, 虽然骨髓中巨核细胞的数量有所增加, 但循环中血小板数量减少 85%。作者认为循环中血小板数量的减少导致骨髓巨核细胞反应性增加, 且体外培养基因突变小鼠的造血干细胞显示细胞凋亡率显著增加, 巨核细胞生成减少, 表明 Bcl-x_L 基因突变导致了巨核细胞的分化发育缺陷, 造成了循环中血小板减少^[8]。另一项研究显示 Bcl-x_L 基因过度表达的转基因小鼠中, Bcl-x_L 蛋白的过度表达损坏了成熟巨核细胞产生血小板的能力^[9]。

RNA 干扰可导致转录后基因沉默, 能在低于反义核酸几个数量级的浓度下, 使目标基因表达降低到极低水平甚至完全“剔除”^[10]。本研究采用 RNA 干扰的方法瞬时干扰了 PDBu 诱导的 K562 细胞 Bcl-x_L 基因表达, 发现在 siBcl-x_L 干扰后 24 和 48 h Bcl-x_L mRNA 表达显著减低, 而在 72 h 后 Bcl-x_L mRNA 转录开始恢复, 说明 RNA 干扰只是瞬时影响了 mRNA 表达。Bcl-x_L 蛋白的表达与 mRNA 表达相一致, 24 和 48 h 蛋白表达很低, 而在 72 h 表达有所升高。为了检测 Bcl-x_L 抗凋亡蛋白在 K562 细胞向巨核细胞分化过程中的作用, 本研究以 CD61 作为巨核细胞特异标记对 K562 细胞的分化进行了检测, 结果显示, 当 K562 细胞用 50 nmol/L PDBu 诱导 24 h 后, CD61⁺ 细胞从 (0.75 ± 0.12)% 上升到 (67.4 ± 4.8)% , 并且在 72 h 内维持了较高的阳性率; 而在 K562 细胞用 50 nmol/L PDBu 诱导同时采用 siBcl-x_L 干扰 24 h 后, CD61⁺ 细胞仅从 (0.40 ± 0.87)% 上升到 (13.7 ± 4.5)% , 72 h 后升高到 (37.8 ± 5.4)% , siBcl-x_L 干扰组中 K562 细胞向巨核细胞的分化显著减少。考虑到 Bcl-x_L 为抗凋亡蛋白, 本研究用 FITC-Annexin-V 和 PI 双染法检测了干扰后的 K562 细胞凋亡, 结果发现干扰组的细胞凋亡率轻度高于对照组, 但无统计学意义。推测其原因可能为: (1) K562 细

胞抗凋亡蛋白不仅只有 Bcl-x_L 蛋白, Bcl-2 等抗凋亡蛋白同时也起着抗细胞凋亡的作用; (2) siRNA 干扰只是瞬时干扰, 并不是真正的基因剔除。因此在 siBcl-x_L 干扰后, K562 细胞向巨核细胞分化显著减少并不是由于 siBcl-x_L 干扰后细胞大量凋亡造成的。上述结果表明抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 在巨核细胞分化过程中具有重要作用。

为了进一步研究 Bcl-x_L 在巨核细胞分化和成熟过程中的作用, 本研究观察了 Bcl-x_L 在 TPO 诱导的正常骨髓 CD34⁺ 细胞向巨核细胞分化过程中的表达变化。结果显示, 未成熟的巨核细胞形态规则, 细胞膜完整, 细胞核较大, 胞浆中 Bcl-x_L 表达强阳性; 而成熟的巨核细胞体积较大, 细胞膜边缘不规则, 细胞核大, 胞浆中 Bcl-x_L 表达很弱。同时, 本研究在诱导培养的第 5、10、15 和 20 天检测了 CD41a⁺ 细胞 Bcl-x_L 蛋白的表达。结果发现, 在培养的第 5 天, CD41a⁺ 细胞几乎全部为 Bcl-x_L 阳性, 随着培养时间的延长, 第 10 天和第 15 天 CD41a⁺ 细胞中 Bcl-x_L 阴性的细胞逐渐增多, 而到第 20 天, 大多数 CD41a⁺ 细胞为 Bcl-x_L 阴性。这些结果证实抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 在未成熟的巨核细胞中高度表达, 而在成熟的巨核细胞中表达下降。

综上所述, 抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 可能在造血干细胞向巨核细胞分化过程中, 尤其在维持未成熟巨核细胞发育过程中具有重要作用; 而在达到成熟的巨核细胞中表达明显降低, 则可能与巨核细胞成熟后发生特殊的凋亡以至血小板形成有关。未成熟的巨核细胞生存必须依赖于 TPO 的存在, 而成熟的巨核细胞失去了对 TPO 的反应能力, 即使在足量 TPO 存在的培养条件下, 成熟晚期的巨核细胞仍然发生不可避免的凋亡, 因此有学者认为成熟晚期的巨核细胞可能发生了“自发性凋亡”^[11]。然而抗凋亡蛋白 Bcl-x_L 在成熟的巨核细胞中是通过何种机制下调并可能诱导巨核细胞“自发性凋亡”有待于进一步研究。

(本文图 5 见插图第 5 页)

参 考 文 献

[1] Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of

platelets from megakaryocyte proplatelets [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12): 3348-3354.

- [2] Kaluzhny Y, Ravid K. Role of apoptotic processes in platelet biogenesis [J]. *Acta Haematol*, 2004, 111(1-2): 67-77.
- [3] Gordge MP. Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals [J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 145(3): 271-273.
- [4] Sanz C, Benet I, Richard C, et al. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes [J]. *Exp Hematol*, 2001, 29(6): 728-735.
- [5] Zauli G, Vitale M, Falcieri E, et al. *In vitro* senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes [J]. *Blood*, 1997, 90(6): 2234-2243.
- [6] De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes [J]. *Blood*, 2002, 100(4): 1310-1317.
- [7] Zhang L, Zhao H, Sun A, et al. Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34⁺ bone marrow cells in essential thrombocythemia *Haematologica* [J]. 2004, 89(10): 1199-1206.
- [8] Wagner KU, Claudio E, Rucker EB 3rd, et al. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly [J]. *Development*, 2000, 127(22): 4949-4958.
- [9] Kaluzhny Y, Yu G, Sun S, et al. Bcl-xL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation [J]. *Blood*, 2002, 100(5): 1670-1678.
- [10] Perrimon N, Mathey-Prevot B. Applications of high-throughput RNA interference screens to problems in cell and developmental biology [J]. *Genetics*, 2007, 175(1): 7-16.
- [11] Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production [J]. *Br J Haematol*, 2006, 134(5): 453-466.

(2006-06-20 收稿)