

## · 临床论著 ·

# 慢性高原病患者骨髓有核红细胞凋亡及 Bcl-2 表达研究

孙敏敏 崔森 李占全 杨发满 冀林华 柴克霞 陈杨杨

**【摘要】 目的** 慢性高原病(chronic mountain sickness, CMS)是一种高原地区常见病。通过研究 CMS 患者骨髓有核红细胞凋亡及 Bcl-2 mRNA 的表达情况,探讨其在 CMS 发病中的作用。**方法** 选取 CMS 患者、单纯性骨折患者各 16 例,分离骨髓单个核细胞并体外培养有核红细胞 72 h,采用 TUNEL 技术定量研究骨髓有核红细胞凋亡指数,用 RT-PCR 方法半定量检测 Bcl-2 mRNA 的表达。**结果** (1) CMS 患者骨髓有核红细胞凋亡指数 $[(7.35\% \pm 3.74)\%]$ 明显低于对照组 $[(18.10 \pm 8.72)\%]$  ( $P < 0.001$ )。(2) CMS 患者 Bcl-2 mRNA 的相对表达水平为 $0.75 \pm 0.15$ ,明显高于对照组 $(0.53 \pm 0.16)$  ( $P < 0.001$ )。(3) CMS 患者 Bcl-2 mRNA 表达水平与凋亡指数呈负相关( $r = -0.707, P = 0.002$ );与血红蛋白浓度未发现明显相关性;凋亡指数与血红蛋白浓度呈负相关( $r = -0.591, P = 0.016$ )。**结论** CMS 患者骨髓有核红细胞凋亡指数降低, Bcl-2 mRNA 表达升高,提示 Bcl-2 家族分子可能参与了 CMS 骨髓造血细胞凋亡异常机制。

**【关键词】** 高原病; 骨髓; 幼红细胞; 细胞凋亡; 基因, bcl-2

**Studies on expression of Bcl-2 and apoptosis of hematopoietic cells in chronic mountain sickness** SUN Min-min, CUI Sen, LI Zhan-quan, YANG Fa-man, JI Lin-hua, CHAI Ke-xia, CHEN Yang-yang. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China  
Corresponding author: CUI Sen, Email: veroncuicui@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To observe the level of Bcl-2 mRNA and to explore the change of apoptosis of erythroblasts in patients with chronic mountain sickness (CMS). **Methods** A total of 16 CMS patients and 16 control subjects participated in this study. The bone marrow specimens were collected from the subjects and the bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) were separated for culture of erythroblasts. The apoptotic index (AI) of cultured bone marrow erythroblasts were measured by terminal -deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) technique. The level of Bcl-2 mRNA in erythroblasts was measured by RT-PCR. **Results** (1) The AI of erythroblasts in CMS patients $[(7.35 \pm 3.74)\%]$  was lower than that in the controls $[(18.10 \pm 8.72)\%]$  ( $P < 0.001$ ). (2) The Bcl-2 mRNA value $(0.75 \pm 0.15)$  was higher in CMS patients than that in the controls $(0.53 \pm 0.16)$  ( $P < 0.001$ ). (3) In CMS patients, AI was negatively correlated with Bcl-2 ( $r = -0.707, P = 0.002$ ), and there was a negative correlation between AI and Hb ( $r = -0.591, P = 0.016$ ). However, the significant relationship was not found between the Hb and Bcl-2 mRNA ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The results show that apoptosis of erythroblasts is down-regulated in CMS patients, the Bcl-2 family might be related to the change of erythroblasts apoptosis in CMS patients.

**【Key words】** Mountain sickness; Bone marrow; Erythroblasts; Apoptosis; Gene, bcl-2

慢性高原病(chronic mountain sickness, CMS)是长期生活在海拔 2500 m 以上高原的世居者或移居者,对高原低氧环境逐渐失去习服而导致的临床综合征,当

患者移居到低海拔地区后,其临床症状逐渐消失,如果再返回高原则病情可复发<sup>[1]</sup>。CMS 是一种高原常见病,但其发病机制复杂。近年来研究发现 CMS 患者存在骨髓造血细胞凋亡变化,提示凋亡可能在 CMS 发病中发挥一定作用。大量研究认为 Bcl-2 家族可以通过控制线粒体外膜的通透性来调控细胞凋亡。文章通过研究 CMS 患者骨髓有核红细胞凋亡变化及 Bcl-2 mRNA 表达情况探讨线粒体途径在 CMS 患者红系凋亡变化中的可能作用。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.10.096

基金项目:青海省科技创新能力促进计划(2010-Z-723);国家自然科学基金委员会地区科学基金项目(81260300)

作者单位:810001 西宁,青海大学附属医院血液科(孙敏敏、崔森、李占全、杨发满、冀林华、柴克霞、陈杨杨);青海大学医学院(孙敏敏);恩施州中心医院血液科(陈杨杨)

通讯作者:崔森,Email:veroncuicui@hotmail.com

## 对象和方法

### 一、研究对象

CMS患者16例,均为男性,年龄(43.40 ± 14.90)岁,长期生活于海拔3000~4500 m地区。结合高原居住史及其他病史、症状、体征、骨髓细胞学分析、外周血细胞学分析、血氧饱和度及其他相关辅助检查等,严格按照第六届国际高原医学和低氧生理学术大会确定的慢性高原病国际诊断标准(青海标准)<sup>[1]</sup>确诊CMS,并排除原发性心肺疾病等引起的继发性红细胞增多症、慢性感染及真性红细胞增多症,对其中12例病例应用AS-PCR法检测骨髓细胞JAK-2 V617F突变均为阴性。以同海拔地区16例男性单纯骨折患者为对照组,年龄(43.37 ± 10.07)岁,行相关检查除外其他疾病。研究经过本院医学伦理委员会通过,并取得研究对象知情同意。研究对象一般资料见表1。

### 二、标本采集处理和骨髓有核红细胞培养

采集骨髓液5 ml,用Ficoll淋巴细胞分离液分离提取骨髓单个核细胞,制成细胞悬液,进行有核红细胞培养。培养体系为:30%小牛血清、10% BSA、10% EPO、10% IL-3、30% IMDM,共5 ml。将细胞悬液以 $2 \times 10^5$ /ml培养于培养瓶中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养72 h,取部分涂片行瑞氏染色,光镜下观察细胞形态并计数有核红细胞所占比例。培养后的细胞悬液取出一部分进行涂片,用4%多聚甲醛固定30 min,于-20℃保存,用于细胞凋亡检测;余下部分加入Trizol液中提取总RNA,并逆转录生成cDNA,于-80℃保存,用于检测mRNA表达。

### 三、有核红细胞凋亡检测

采用TUNEL法检测细胞凋亡。严格按试剂盒(北京中山金桥生物有限公司)所附说明书操作,光镜下分析结果,细胞核中出现棕色颗粒者为阳性,TUNEL染色阳性并具备凋亡特征的细胞为凋亡细胞。双盲法阅片,双人分别计数每1000个细胞中凋亡阳性染色的细胞数,每份样本计数3次,各取均值。按如下公式计算出阳性细胞百分比,即凋亡指数(apoptotic index, AI):  
AI = 凋亡细胞数/计数细胞总数 × 100%。

### 四、RT-PCR法检测Bcl-2 mRNA表达

1. 总RNA提取:用Trizol一步法提取试剂盒(In-

vitrogen公司生产)提取有核红细胞总RNA,并检测RNA质量。

2. 逆转录制备cDNA:按逆转录试剂盒(TIANGEN公司生产)说明操作逆转录获得cDNA,-80℃保存。

3. PCR扩增:目的基因Bcl-2和内参β-actin引物由Invitrogen公司合成,PCR试剂盒为TIANGEN公司产品。引物序列如下:Bcl-2上游:5'-CGACGACTTCTCCGCCGCTACCGC-3';下游:5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3',产物长度319 bp;内参β-actin上游:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3';下游:5'-TC-CCTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3',产物长度231 bp。按试剂盒操作说明进行β-actin、Bcl-2 cDNA扩增。反应条件分别为:Bcl-2:97℃预变性7 min,94℃热变性1 min,70℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环,最后72℃延伸7 min;β-actin:95℃预变性2 min,94℃热变性45 s,56℃退火45 s,72℃延伸45 s,共30个循环,最后72℃延伸7 min。扩增所得产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳分析。DNA条带用Labworks 4.0 UVP凝胶图像分析仪行灰度扫描。Bcl-2相对表达量用Bcl-2灰度值/β-actin灰度值的比值表示。

### 五、统计学分析

采用SPSS 19.0分析软件进行统计学处理。结果用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组均数比较采用独立样本t检验,各指标间相关性分析采用直线相关分析。检验水准α = 0.05。

## 结 果

### 一、有核红细胞培养情况

培养基内细胞呈悬浮生长,圆形透亮,生长良好。培养后的细胞经瑞氏染色后于显微镜下观察并计数有核红细胞比例,有核红细胞所占比例为(90.50 ± 4.96)% (图1)。

### 二、骨髓有核红细胞凋亡指数

CMS组培养的骨髓有核红细胞AI为(7.35 ± 3.74)%,明显低于对照组[(18.1 ± 8.72)%],差异具有统计学意义(P < 0.001) (图2)。

### 三、骨髓有核红细胞Bcl-2 mRNA表达

对照组和CMS组均检测到Bcl-2的表达,CMS组Bcl-2 mRNA的相对表达水平为0.75 ± 0.15,对照组

表1 研究对象一般资料( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	年龄(岁)	SaO <sub>2</sub> (%)	血红蛋白(g/L)	红细胞比容(%)
CMS组	16	43.40 ± 14.90	85.63 ± 2.67 <sup>a</sup>	211.06 ± 18.55 <sup>a</sup>	64.81 ± 5.96 <sup>a</sup>
对照组	16	43.37 ± 10.07	96.06 ± 1.46	132.81 ± 13.36	40.32 ± 3.94

注:与对照组比较,<sup>a</sup>P < 0.001

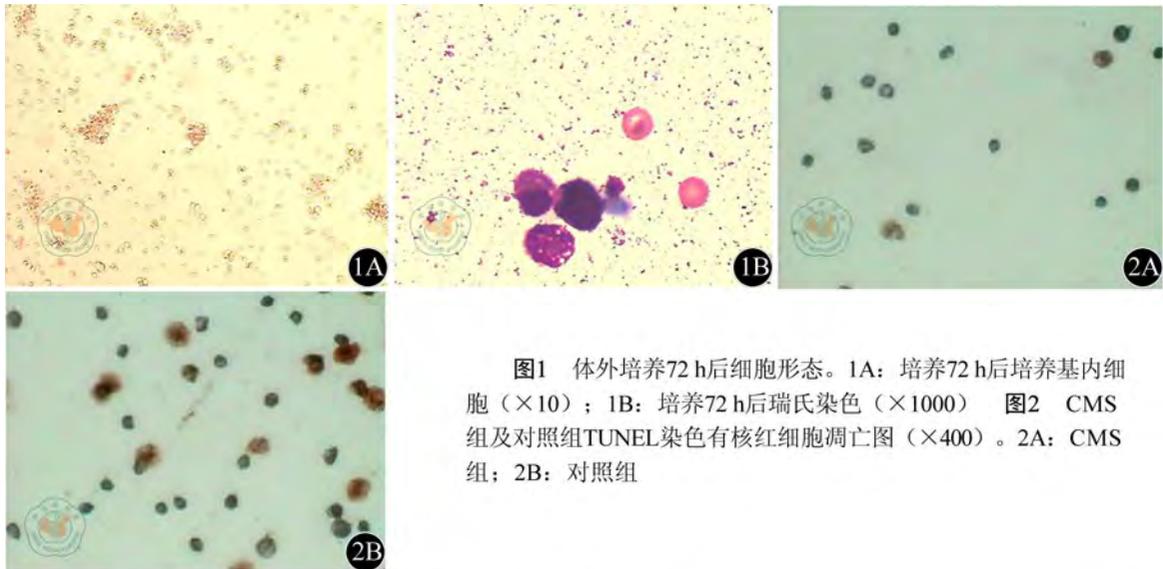


图1 体外培养72 h后细胞形态。1A: 培养72 h后培养基内细胞( $\times 10$ ); 1B: 培养72 h后瑞氏染色( $\times 1000$ ) 图2 CMS组及对照组TUNEL染色有核红细胞凋亡图( $\times 400$ )。2A: CMS组; 2B: 对照组

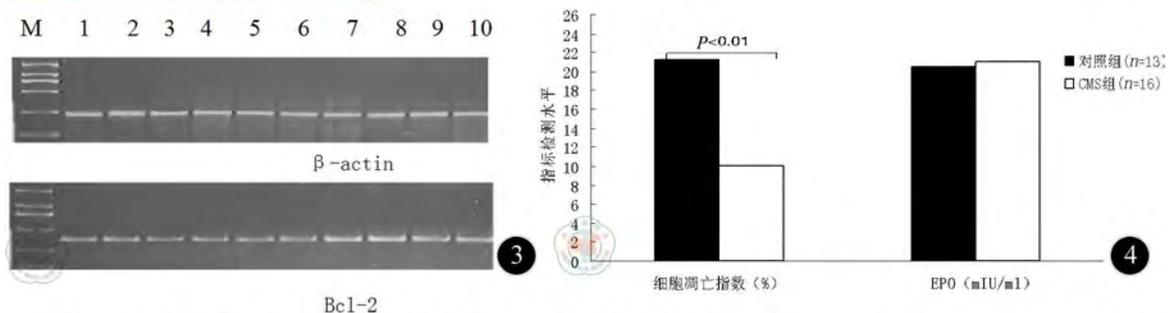


图3 CMS组与对照组骨髓有核红细胞Bcl-2 mRNA电泳图(M: DNA Marker; 1~5为对照组, 6~10为CMS组) 图4 CMS患者骨髓单个核细胞凋亡指数及血清EPO水平

为  $0.53 \pm 0.16$ , CMS组表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.001$ ) (图3)。

#### 四、相关性分析

CMS患者 Bcl-2 mRNA 表达水平与凋亡指数呈负相关 ( $r = -0.707, P = 0.002$ ), 凋亡指数与血红蛋白浓度呈负相关 ( $r = -0.591, P = 0.016$ ), Bcl-2 mRNA 表达水平与血红蛋白浓度之间未发现明显的相关性。

## 讨 论

采用红系细胞体外培养技术及 TUNEL 技术检测发现 CMS 患者有核红细胞 AI 减低, 这与邹春华等<sup>[2]</sup>的研究结果一致, 同时与崔森等<sup>[3,4]</sup>的研究相符, 说明 CMS 患者存在骨髓红系造血细胞凋亡下调; 研究还发现 CMS 患者骨髓有核红细胞 Bcl-2 表达上调, 提示 CMS 红细胞累积可能与 Bcl-2 家族对细胞凋亡的调节有关。

Bcl-2 家族蛋白广泛分布于造血干祖细胞内, 由促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白成员共同组成, 它们相互作用通过线粒体途径调节细胞凋亡。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白, 它可以通过调节内质网和线粒体中的钙平衡、抑制线粒体释放细胞色素 C、Smac/DIABLO 等抑制细胞

凋亡。

CMS 患者存在细胞内低氧, 低氧与细胞凋亡有着密切关系。研究发现低氧可造成线粒体损伤, 使其释放凋亡相关的分子, 还可刺激死亡受体途径中的 Fas/FasL 等高表达<sup>[5]</sup>而促进细胞凋亡; 另外低氧可使低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 高表达, 使 P53 蛋白水平升高进而启动细胞凋亡程序<sup>[6]</sup>。

但对于 CMS 患者来说, 骨髓细胞凋亡的调节机制更为复杂。CMS 时低氧诱导的 HIF 高表达可广泛激活众多低氧反应基因, 其中部分可以传导抗凋亡信号。虽然研究发现 CMS 患者红细胞生成素 (EPO) 水平与同一地区健康人无显著差异, 但高于低海拔居住者, 且 CMS 患者红系祖细胞对 EPO 的敏感性增加<sup>[7]</sup>。EPO 可与 EPO 受体 (EPOR) 相互作用激活 JAK2 基因<sup>[8]</sup>, 启动多种细胞信号传导途径如 PI3K、AKT kinase 及 Ras 信号途径, 发挥抑制细胞凋亡和促进细胞增殖及分化的作用。EPO 还可通过激活 STAT-5 途径, 刺激 Bcl-xl 基因的表达<sup>[9]</sup>, Bcl-xl 可通过抑制 Bid 及 Bax 活性维持线粒体膜稳定性, 阻止凋亡相关分子从线粒体释放, 而发挥抗凋亡作用, 陈杨杨等<sup>[10]</sup>发现 CMS 患者 Bcl-xl 表达升高, Bax、Bid 表达下降可能与此机制有关。因此,

CMS骨髓造血细胞凋亡下调可能与EPO的抗凋亡作用有关。鉴于此,作者研究了另外一组CMS患者血清EPO水平及骨髓单个核细胞凋亡指数,结果如图4所示(未发表)。在CMS患者骨髓单个核细胞凋亡指数低于对照组,而血清EPO水平与对照组无统计学差异,且血清EPO水平和骨髓单个核细胞凋亡指数间未发现明显相关性。提示CMS骨髓造血细胞凋亡变化不是由单独EPO水平决定的,而有着复杂的调控机制,需要进一步深入研究。

研究发现<sup>[11]</sup>缺氧诱导的VEGF高表达可促进ERK磷酸化,诱导Bcl-2表达,降低Bax表达,从而抑制线粒体释放细胞色素C,降低caspase-3的活性,抑制细胞凋亡。推测CMS患者Bcl-2表达升高,有核红细胞凋亡下调可能与VEGF激活MAPK/ERK信号途径有一定关系。

在CMS中同时存在促凋亡因素与抗凋亡因素,此项研究发现CMS患者骨髓有核红细胞凋亡下降,Bcl-2表达升高,提示抗凋亡因素在其发病机制中可能发挥一定的优势作用,引起红细胞积累;线粒体途径介导的细胞凋亡可能参与其红细胞积累机制。本研究在CMS造血细胞凋亡变化方面仅进行了初步探讨,要明确CMS造血细胞凋亡变化机制仍需要进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] León-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, et al. Consensus statement

on chronic and subacute high altitude diseases. High Alt Med Biol, 2005,6:147-157.

[2] 邹春华,贾树雅,王进,等.高原红细胞增多症骨髓红系祖细胞凋亡异常的研究.高原医学杂志,2003,13:9-11.

[3] 崔森,许存和,贾乃镛,等.慢性高原病及高原低氧条件下机体骨髓细胞凋亡异常及干预研究.高原医学杂志,2009,3:32.

[4] 蔡玉亮,崔森,李占全,等.慢性高原病患者骨髓造血细胞凋亡及caspase-8和caspase-9表达研究.中华血液学杂志,2011,32:762-765.

[5] Lee SD, Kuo WW, Lin JA, et al. Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. Int J Cardiol,2007,116:348-356.

[6] Chen D, Li M, Luo J, et al. Direct interactions between HIF-1 $\alpha$  and Mdm2 modulate p53 function. J Biol Chem,2003,278:13595-13598.

[7] Maran J, Prechal J. Polycythemia and oxygen sensing. Pathol Biol, 2004,52:280-284.

[8] Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, et al. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. Exp Cell Res,2000,253:143-156.

[9] Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, et al. Stat5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. EMBO J,1999,18:4754-4765.

[10] 陈杨杨,崔森,李占全,等.慢性高原病骨髓有核红细胞凋亡及Bcl-xl、Bax、Bid表达研究.中华血液学杂志,2012,33:326-328.

[11] Baek JH, Jang JE, Kang CM, et al. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. Oncogene,2000,19:4621-4631.

(收稿日期:2013-01-17)

(本文编辑:梁雷)

孙敏敏,崔森,李占全,等.慢性高原病患者骨髓有核红细胞凋亡及Bcl-2表达研究[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(10):4281-4284.

