

慢性高原病骨髓单个核细胞凋亡及 Fas、FasL、TNFR 和 TNF 表达研究

王传玲 崔森 李占全 冀林华 柴克霞

【摘要】 目的 慢性高原病(CMS)是高海拔地区常见病。本文通过研究 CMS 患者骨髓单个核细胞(BMMNCs)凋亡及 Fas、FasL、TNFR 和 TNF 表达情况,探讨细胞凋亡及凋亡分子在 CMS 发病中的作用。方法 选取 CMS 患者 35 例,采用电镜定性观察骨髓造血细胞凋亡情况, TUNEL 技术定量研究 BMMNCs 凋亡指数,流式细胞术检测 BMMNCs 凋亡分子 Fas、FasL、TNFR 及 TNF 表达水平,与健康对照组(20 例)比较。结果 (1) CMS 患者骨髓造血细胞存在凋亡现象, CMS 患者 BMMNCs 凋亡指数明显低于对照组,分别为 $(10.13 \pm 9.80)\%$ 及 $(21.32 \pm 11.97)\%$ ($P < 0.01$); (2) BMMNCs 凋亡分子 Fas、FasL、TNFR 及 TNF 表达水平在两组间无统计学差异。结论 CMS 患者 BMMNCs 凋亡下调,可能在 CMS 红细胞积累中发挥一定作用,但其凋亡异常的机制比较复杂,可能涉及多种凋亡信号转导途径。

【关键词】 高原病; 造血干细胞; 细胞凋亡; 抗原, CD95; 受体, 肿瘤坏死因子; FasL; TNFR

Studies on expressions of Fas, FasL, TNFR and TNF and apoptosis of bone marrow mononuclear cells in chronic mountain sickness WANG Chuan-ling*, CUI Sen, LI Zhan-quan, JI Lin-hua, CHAI Ke-xia. *Graduate School of Qinghai University, Xining 810001, China

Corresponding author: CUI Sen, Email: vernoncui@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe the expressions of Fas, FasL, TNFR and TNF and the change of apoptosis of bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) in patients with chronic mountain sickness(CMS). **Methods** The bone marrow specimens were collected from 35 CMS patients and 20 healthy adults and the BMMNCs were separated. Apoptosis was observed qualitatively by electron microscopy. The apoptotic index (AI) of BMMNCs was measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) technique. Flow cytometry was used to detect expressions of Fas, FasL, TNFR and TNF of BMMNCs. **Results** (1) There was apoptosis of BMMNCs in patients with CMS. The AI of BMMNCs in CMS patients was lower than that in the controls ($10.13\% \pm 9.80\%$ vs. $21.32\% \pm 11.97\%$, $P < 0.01$). (2) The significant difference was not found between the two groups in the expression of Fas, FasL, TNFR or TNF. **Conclusions** The results showed that apoptosis of BMMNCs was down-regulated in CMS patients, which may play a role in the accumulation of red blood cells. The mechanism of change of hematopoietic cells apoptosis in CMS patients is complicated, other apoptotic signal transduction pathways may be involved in it.

【Key words】 Mountain sickness; Hematopoietic stem cell; Apoptosis; Antigens, CD95; Receptors, tumor necrosis factor; FasL; TNFR

慢性高原病 (chronic mountain sickness, CMS) 是长期生活在海拔 2500 m 以上世居者或移居者,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,其临床症状可逐渐消失,如果再返高原则病情可复发^[1],以严重低氧血症和过度红细胞积累为显著特征。红细胞积累是细胞增殖与凋亡平衡失调的病理状态。研究提示 CMS 细胞增殖能力增强,但对细胞凋亡 (apoptosis) 的研究报道非常有限。死亡分子途径是细胞凋亡的重要信号途径,与多种疾病的发病有关。本文通过研究 CMS 患者骨髓单个核细胞 (bone marrow mononuclear cells, BMMNCs) 凋亡变化及其凋亡分子 Fas、FasL、TNFR 及 TNF 表达水平,探讨骨髓细胞凋亡及死亡分子在 CMS 发病机制中的作用。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.24.033

基金项目:中国科学院“西部之光”人才培养计划资助项目[中国科学院“科发人教字(2002)404号”文件];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(81260300)

作者单位:810001 西宁,青海大学研究生院(王传玲);青海大学附属医院血液科(崔森、李占全、冀林华、柴克霞)

通讯作者:崔森, Email: vernoncui@hotmail.com

资料与方法

一、研究对象

1. 一般资料: CMS 患者 35 例, 长期居住在海拔 3000~4500 m 地区的男性, 按照 2004 年第六届国际高原医学和低氧生理学术大会确定的 CMS 诊断标准^[1]确诊。对照组为 20 例, 同海拔地区世居健康成人或单纯骨折患者, 均为男性, 均进行血常规、尿常规、心电图、胸片、肝功能、肾功能及超声等检查示正常。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。

2. CMS 患者骨髓细胞凋亡定性研究对象: 电镜观察了 5 例 CMS 患者骨髓造血细胞凋亡情况。5 例 CMS 患者均为我院门诊及住院患者, 年龄 (38.7±8.6) 岁, Hb (217.3±15.9) g/L。

3. 骨髓单个核细胞凋亡指数研究对象: 用 TUNEL 技术测定了 16 例 CMS 患者和 13 例健康人或单纯骨折患者 BMMNCs 凋亡指数, 一般资料见表 1。

表 1 骨髓单个核细胞凋亡指数研究对象一般资料 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	Hb(g/L)	SaO ₂ (%)
对照组	13	40.6±7.4	132.1±11.3	96.3±2.8
CMS 组	16	39.8±8.8	215.8±16.0 ^a	85.1±5.1 ^a

注: 与对照组比较, ^aP<0.01

4. 骨髓单个核细胞凋亡分子研究对象: 用流式细胞术测定了 35 例 CMS 患者和 20 例健康人或单纯骨折患者 BMMNCs 凋亡分子 Fas、FasL、TNFR 及 TNF 表达水平, 一般资料见表 2。

表 2 骨髓细胞凋亡分子研究对象一般资料 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	Hb(g/L)	SaO ₂ (%)
对照组	20	42.6±15.2	131.7±17.4	94.0±2.7
CMS 组	35	44.9±14.0	210.7±20.0 ^a	86.8±5.9 ^a

注: 与对照组比较, ^aP<0.01

二、标本采集及处理

采集研究对象骨髓组织约 0.5 cm, 先后经 3% 戊二醛和 10% 四氧化锇固定, 乙醇梯度脱水, 并渗透、包埋和聚合, 切片后采用铅铂双染色法(醋酸双氧铂和柠檬酸铂)染色, 用于观察细胞凋亡情况。

采集研究对象骨髓液 4 ml, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离提取 BMMNCs, 制成单细胞悬液, 取 0.2 ml 立即行细胞涂片, 室温 (20~22 °C) 充分晾干, 用于细胞凋亡指数检测。余下细胞悬液用于检测 Fas、FasL、TNFR 及 TNF 表达情况。

三、试验方法

1. 骨髓造血细胞凋亡观察: 电镜下观察骨髓造血

细胞凋亡情况。

2. BMMNCs 凋亡指数检测: 采用 TUNEL 技术检测 BMMNCs 凋亡指数。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并具备凋亡特征的细胞为阳性。双盲法计数每 1000 个细胞中阳性染色细胞数, 每份样本计数 3 次, 取均值, 计算凋亡指数 (apoptotic index, AI), AI=凋亡细胞数/计数细胞总数×100%。

3. BMMNCs 凋亡分子 Fas、FasL、TNFR 及 TNF 表达水平检测: 采用流式细胞术检测。试剂来源: Fas、FasL、TNFR 及 TNF (美国, BD, 规格 1 ml)、Reagent A (Fix&perm A) 和 B (Fix&perm B)、PI (Sigma 公司)、FCM (美国, BD, FACSCalibur)。(1) Fas/FasL 及 TNFR 检测: 取离心管 2 只, 分别加入 BMMNCs, 数目约 1×10⁶ 个/ml。标记为 A、B, A 为阴性对照组, B 为试验组。B 中加入相应抗体 20 μl, A 不加, 混匀, 室温避光孵育 30 min。常温离心 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 ml PBS, 混匀洗涤细胞, 并将其转入流式管中, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入含 4% 多聚甲醛的 PBS 500 μl 混匀固定, 上机检测。(2) TNF 检测: 同上 2 管 A、B, 调整细胞数至约 1×10⁶ 个/ml, A 为阴性对照组, B 为试验组。分别加入 100 μl Reagent A, 混匀, 室温孵育 15 min。用 3 ml PBS+0.1% NaN₃+5% FBS 液洗涤一次, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 振荡重悬细胞。分别加入 100 μl Reagent B, B 中加入 TNF 抗体, A 中加入阴性对照, 振荡 1~2 s 并孵育 20 min。4 °C 避光 30 min。上述 3 ml 液体再洗一次, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 并将其转入流式管中, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入含 4% 多聚甲醛的 PBS 500 μl 混匀固定, 上机检测。

上机, 直接检测 5000 个细胞, 计算阳性细胞百分比 (阳性细胞/5000×100%)。

四、统计学分析

试验数据以均数±标准差表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件处理, 两组均数比较采用独立样本 t 检验, 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、电镜下 CMS 患者骨髓细胞凋亡的形态学特征

电镜下观察到 CMS 患者骨髓单个核细胞凋亡现象, 特征为: 细胞体积缩小, 细胞膜凹陷, 有分割细胞成凋亡小体的趋势, 但细胞膜完整。细胞质浓缩, 出现细胞核周带。染色质固缩、边集, 沿核膜分布, 出现核固缩、核碎裂 (图 1)。

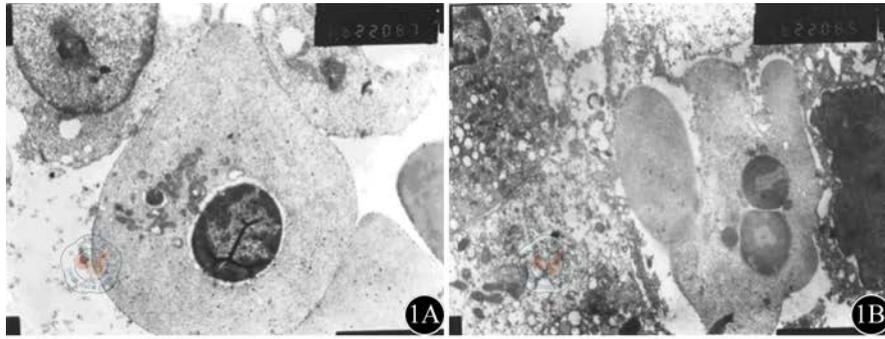


图1 CMS患者骨髓细胞凋亡电镜图

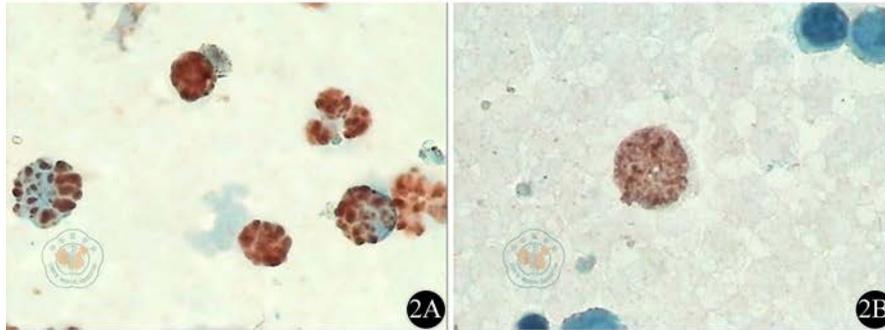


图2 骨髓单个核细胞凋亡TUNEL图。2A: 对照组; 2B: CMS组 (×1000)

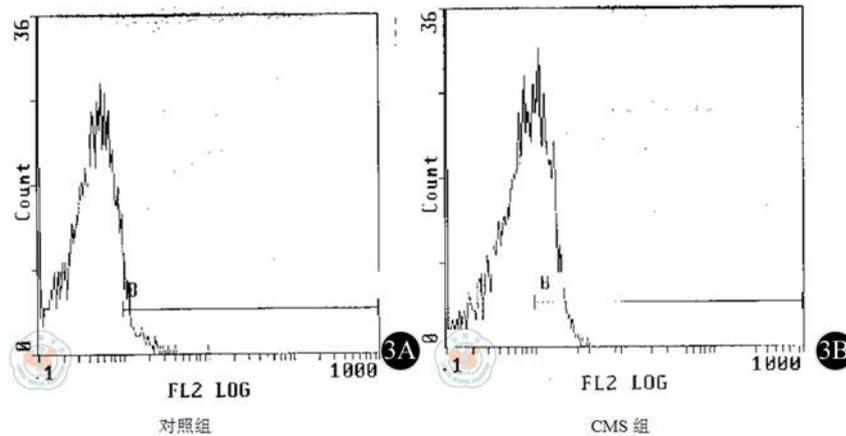


图3 流式细胞仪检测FasL结果图例。3A: 对照组; 3B: CMS组

二、骨髓单个核细胞凋亡指数

CMS患者BMMNCs AI为(10.13±9.80)%,明显低于对照组(21.32±11.97)%,差异有统计学意义(P<0.01)(图2,表3)。

表3 骨髓单个核细胞凋亡指数(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	细胞凋亡指数	SaO ₂
对照组	13	21.32±11.96	96.3±2.8
CMS组	16	10.13±9.80	85.1±5.1
t值		2.772	7.080
P值		0.010	0.000

三、骨髓单个核细胞凋亡分子表达

CMS组BMMNCs凋亡分子Fas、FasL、TNFR及TNF表达水平与对照组相比无显著差异(表4),图3

为FasL流式细胞仪检测结果图例。

表4 骨髓单个核细胞凋亡分子表达(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FasL	Fas	TNF	TNFR
对照组	20	22.15±18.46	37.50±29.52	1.02±0.97	2.61±2.46
CMS组	35	31.50±16.35	36.30±23.79	0.70±0.68	3.06±2.17
t值		1.947	0.164	1.430	0.700
P值		0.057	0.870	0.158	0.484

四、相关性分析

CMS患者BMMNCs FasL与Fas间呈正相关(r=0.409, P<0.05); TNF与TNFR间无相关性(r=0.213, P>0.05); 上述凋亡分子与Hb间、AI与SaO₂间均未发现明显相关性(均P>0.05)。

讨 论

本研究通过电镜定性观察发现 CMS 患者骨髓造血细胞凋亡现象, TUNEL 技术发现 CMS 患者骨髓单个核细胞凋亡指数与对照组相比减低, 这与蔡玉亮等^[2]研究相符; 同时研究还发现 CMS 患者骨髓单个核细胞凋亡分子 Fas、FasL、TNFR 及 TNF 表达水平与对照组相比无显著变化。

CMS 患者 BMMNCs 凋亡下调, 可能与细胞内低氧有关。低氧可以刺激缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)表达增高, 从而激活红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等缺氧反应基因^[3-5], 转导抗凋亡和细胞增殖信号。缺氧诱导 VEGF 高表达, 可通过 MAPK/ERK 途径和 PI3K/Akt 途径使 bax 基因表达下调, Bcl-x1 和 Bcl-2 基因表达上调, 使线粒体释放细胞色素 C 减少, caspase 9 激活减少^[5], 诱导凋亡下调。同时 EPO 与 EPOR (EPO receptor) 结合后可诱导 Janus 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) 磷酸化而活化, 继而激活多条信号途径, 导致 caspase-8、-9 表达减少^[2], Bcl-x1、Bcl-2 表达增加, Bax、Bid 表达下降^[6], 诱导凋亡下调, 从而导致 CMS 患者 BMMNCs 凋亡减少。

在众多凋亡信号途径中, 目前关于 Fas/FasL、TNFR/TNF 途径的研究较多。生理情况下, 成熟红细胞表达高水平的 Fas 和 FasL, 完全耐受 Fas 介导的凋亡而未成熟红细胞不表达 FasL 并且具有 EPO 依赖性。在低水平或生理水平的 EPO 时, FasL 阳性成熟红细胞可以诱导未成熟红细胞凋亡^[7]。而 CMS 高表达 EPO 或红细胞对 EPO 的敏感性增加^[8], 从而使上述诱导凋亡作用减弱, 这可能也是 CMS BMMNCs 凋亡下调的原因之一。报道称未成熟红细胞表面表达 TNFR, 而且 TNF 相关凋亡诱导配体与造血密切相关^[9], TNFR/TNF 系统在 CMS 造血细胞的增殖及凋亡平衡间可能发挥重要作用。

本研究 CMS 患者与对照组相比凋亡分子无显著差异, 但有研究发现在常规培养条件下, 大鼠骨髓间充质干细胞不表达 FasL 和 Fas 蛋白, 而在缺氧条件下表达增强^[10]。这种差异可能与高原不仅是低氧还存在低压、寒冷及强紫外线辐射有关。同时也有学者认为低氧预处理下调或抑制促凋亡基因 Fas/FasL 的表达, 可能是一种低氧预适应变化^[11]。

闫睿等^[12]发现患有缺血缺氧性脑病的新生大鼠,

肾组织中 Fas/FasL 在缺氧 1、6、12 h 时表达量高, 而在 24、48、72 h 后含量逐渐降低。大鼠外周血单核细胞 TNF- α 的表达量分别于缺氧 6、9 h 达峰值, 随后表达量逐渐下降, 至缺氧后 12 h, TNF- α mRNA 表达量与正常对照组无显著差异^[13]。由此推测 Fas、FasL、TNFR 和 TNF 在急性低氧的早期表达水平明显上调, 而随着缺氧时间的延长逐渐恢复, 甚至达到正常水平。而本研究 CMS 正是慢性缺氧状态, 骨髓造血细胞凋亡分子变化已不显著。当然, 其确切机制需要深入研究。

综上所述, 骨髓造血细胞凋亡下调可能在 CMS 红细胞积累机制发挥着一定的作用, 提示其参与 CMS 发病发展过程。Fas/FasL、TNFR/TNF 系统无明确变化, 提示造血细胞凋亡下调机制复杂, 需要进一步系统研究。

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] 蔡玉亮, 崔森, 李占全, 等. 慢性高原病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.
- [3] De maria R, Testa U, Luchetti L, et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*, 1999, 93: 796-803.
- [4] Chetty P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ*, 2004, 11: S37-44.
- [5] Brockington A, Heath PR, Holden H, et al. Downregulation of genes with a function in axon outgrowth and synapse formation in motor neurones of the VEGFdelta/delta mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics*, 2010, 11: 1471-2164.
- [6] 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: 4281-4284.
- [7] 崔森, 贾乃镛, 冀林华, 等. 高原红细胞增多症患者血清 sFas 与 sFasL 水平. *中华血液学杂志*, 2002, 23: 268-269.
- [8] Maran J, Prchal J. Polycythemia and oxygen sensing. *Pathol Biol*, 2004, 52: 280-284.
- [9] Choi JW. Relationships between tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and hematopoietic activity in healthy adults. *Ann Hematol*, 2005, 84: 728-733.
- [10] 孔宏亮, 刘宁宁, 张海鹏, 等. 缺氧环境下大鼠骨髓间充质干细胞的凋亡及 Fas、Fas-L 的表达. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2007, 16: 538-542.
- [11] 卢娜, 王宝英, 魏林郁, 等. 低氧预处理对大鼠缺血再灌注性脑损伤中凋亡及 Fas 和 Fas-L 蛋白表达的影响. *中国临床康复*, 2006, 10: 120-122.
- [12] 闫睿, 初桂兰. 缺氧缺血性脑损伤对新生大鼠肾组织 bcl-2、bax、fas、fasL 表达影响. *山东医药*, 2013, 53: 44-47.
- [13] 徐智, 吴国明, 钱桂生, 等. 缺氧条件下大鼠单核细胞 NF- κ B 活性及 TNF- α 、IL-1 β 表达变化规律的研究. *第三军医大学学报*, 2006, 28: 746-749.

(收稿日期: 2013-12-13)

(本文编辑: 梁雷)