论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1702-04

褪黑素对巨核细胞凋亡的影响及作用机制研究

周 敏[1,2],徐酉华[1],李晓辉[2],李晓静[2],徐 鸣[2],杨 默[3] ([1]重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014; [2]成都市儿童医院血液科,成都 610014; [3]香港大学李嘉诚医学院儿童及青少年科学系,香港)

摘 要:目的 探讨褪黑素(melatonin, Mel)对巨核细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法** 巨核细胞细胞株CHRF-288-11去血清诱导凋亡,加或不加Mel共培养后,流式细胞仪检测凋亡指标:Annexin V/PI、Caspase-3和JC-1,并与正常组和TPO组比较。同时检测信号通路AKT、ERK1/2,了解其参与保护作用的机制。**结果** Mel 200 nmol/L作用72 h后,CHRF细胞Annexin V/PI、Caspase-3和JC-1的表达较对照组有明显下降,分别由42.9%、29.5%、47.7%降至31.7%($P<0.05$)、21.8%($P<0.05$)和37.2%($P<0.05$)。其中,JC-1的表达与TPO组(20.7±5.2)%比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而Annexin V/PI、Caspase-3的表达与TPO组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。加入Mel后CHRF细胞的磷酸化AKT、ERK1/2水平明显增高,分别由(5.9±0.1)%、(6.1±0.4)%升至(9.5±0.1)%($P<0.05$)、(9.3±0.5)%($P<0.05$)。**结论** Mel可抑制巨核细胞凋亡,其保护机制可能通过AKT、ERK信号通路发挥作用。

关键词: 褪黑素; 巨核细胞; 凋亡; AKT; ERK
中图法分类号: R329.28;R331.14;R977.1 **文献标识码:** A

Anti-apoptotic effect of melatonin on CHRF-288-11 cells *via* AKT and ERK pathways

ZHOU Min[1,2], XU You-hua[1], LI Xiao-hui[2], LI Xiao-jing[2], XU Ming[2], YANG Mo[3] ([1]Department of Hematology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, [2]Department of Hematology, Chengdu Children's Hospital, Chengdu 610014, [3]Department of Paediatrics & Adolescent Medicine, Li Ka Shing Faculty of Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: Objective To study the anti-apoptotic effect of melatonin in megakaryocytic cells and its molecular mechanism. **Methods** The apoptosis of human megakaryocytic cell line CHRF-288-11 was induced by serum deprivation. CHRF-288-11 cells were cocultured with 10% FBS, 0.5% FBS, 0.5% FBS + melatonin (20, 50, 100, 200 and 500 nmol/L) or 0.5% FBS + TPO (50 ng/ml) for 72 h. Apoptotic cells were examined by Annexin V-FITC/PI, Caspase 3-FITC and JC-1 assays. To study the anti-apoptotic mechanism of melatonin, phospho-Akt and ERK1/2 were examined by flowcytometry with monoclonal antibodies. **Results** Melatonin (200 nmol/L) significantly protected CHRF cells from apoptosis. The population of Annexin V-positive cells, the activity of Caspase-3 and the cell rate in R2 region were significantly decreased from 42.9%, 29.5%, 47.7% to 31.7% ($n=4$, $P<0.05$), 21.8% ($n=4$, $P<0.05$), 37.2% ($n=4$, $P<0.05$) respectively. The cell population positive for phospho-AKT and ERK1/2 was significantly increased from (5.9% ±0.1%), (6.1% ±0.4)% to (9.5% ±0.1%) ($n=4$, $P<0.05$) and (9.3% ±0.5%) ($n=4$, $P<0.05$) respectively after 200 nmol/L melatonin treatment. **Conclusion** Melatonin protects megakaryocyte from apoptosis, and AKT and ERK1/2 signal pathways might be involved.

Key words: melatonin; megakaryocyte; apoptosis; AKT; ERK

基金项目: 成都市卫生局科研项目(0713)
Supported by the Scientific Research Project by Chengdu Bureau of Public Health (0713)
作者简介: 周 敏,女,四川省成都市人,硕士研究生,主治医师,主要从事血液肿瘤方面的研究。电话:(023)63638834,E-mail:zhoumin7266@126.com
通信作者: 徐酉华,电话:(023)63635564,E-mail: xuyouhua54@163.com
收稿日期: 2007-12-29;**修回日期:** 2008-03-19

血小板减少症是临床上常遇到的病症,常见于特发性血小板减少性紫癜(ITP)、肿瘤放疗、化疗和骨髓移植患者,严重影响人类健康。目前对血小板减少症尚缺乏有效的治疗手段,因此,寻找有效的药物治疗有着非常迫切的需要和重要的价值。褪黑素(melatonin, Mel)是由松果体细胞合成分泌的一类吲哚类激素。研究显示 Mel 用于防治放疗和化疗引起的血小板减少症有一定的疗效[1-4],但是其具体的作用机制尚不完全清楚。本实验以人的巨核细胞细胞株 CHRF-288-11 为研究对象,应用流式细胞术的方法,研究 Mel 对巨核细胞的凋亡影响及信号通路的改变,拟探讨 Mel 是否通过抑制巨核细胞(血小板前体细胞)凋亡,从而起到保护巨核细胞,防止血小板减少的作用。为临床应用 Mel 治疗血小板减少症提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium)培养基、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)购自美国 Gibco 公司;Melatonin购自美国 Sigma 公司;TPO(Thrombopoietin,血小板生成素)购自美国 Peprotech 公司;流式检测试剂盒 Annexin V-FITC/PI、Caspase 3-FITC、JC-1、Anti-Akt(pT308)、Anti-Phospho-ERK1/2(T202/Y204)为 BD Bioscicences 公司产品。

1.2　细胞培养

巨核细胞细胞株 CHRF-288-11 由香港大学李嘉诚医学院儿童及青少年科学系杨默博士提供。CHRF 细胞用含 10% FBS、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 IMDM 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养,每 2 ~ 3 天换液传代 1 次或收获细胞用于下列实验:细胞计数后调整细胞数为 1×10^5 ml^{-1}, 6 孔板每孔加入 2 ml, 减少 FBS 浓度为 0.5% 从而诱导细胞凋亡。

1.3　实验分组

正常组:FBS 浓度为 10%;对照组:FBS 减少为 0.5%;Mel 组: FBS 浓度 0.5%,并分别加入浓度为 20、50、100、200 和 500 nmol/L 的 Mel; TPO 组:FBS 浓度 0.5%,并加入 50 ng/ml TPO。72 h 后收获细胞用于以下各项检测。每项实验重复 4 次。

1.4　检测指标

1.4.1　细胞存活率检测　　取不同时间点的细胞与 0.4% 台盼蓝按 1:1混匀,1 min 后用细胞计数板计数细胞总数及存活率。

1.4.2　细胞凋亡率(Annexin V/PI)的检测　　收集各培养组的 CHRF 细胞,按照试剂盒说明,4 ℃预冷的 PBS 洗涤 2 次后,加入 1 × 结合缓冲液悬浮细胞,调细胞数为 1×10^6 ml^{-1}。取 100 μl 细胞悬液于 5 ml 流式试管中,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI,混匀后室温避光孵育 15 min。加入 400 μl 1 × 结合缓冲液,混匀后立即上流式细胞仪(Beckman Coulter,美国)检测。每份标本分析 10 000 个细胞,数据由 Win MDI 2.8 软件分析。

1.4.3　线粒体凋亡(JC-1 染色)的检测　　收集培养的 CHRF 细胞 1×10^6 个,按照试剂盒说明,加入 0.5 ml 新鲜配制的 JC-1 工作液,CO_2 孵箱 37 ℃孵育 15 min。1 × Assay Buffer 洗涤 2 遍后,加入 0.5 ml 1 × Assay Buffer 重新悬浮,立即上流式细胞仪检测。数据由 Win MDI 2.8 软件分析。

1.4.4　活化的 Caspase-3 检测　　收集培养的 CHRF 细胞 1×10^6 个,按照试剂盒说明,冷 PBS 洗涤后加入 0.5 ml Cytofix/Cytoperm Buffer,冰上孵育 20 min。Perm/Wash Buffer 洗涤后加入 20 μl FITC 标记的 Caspase-3 单克隆抗体,混匀后室温避光孵育 30 min。Perm/Wash Buffer 洗涤后加入 0.5 ml 重新悬浮,立即上流式细胞仪检测。数据由 Win MDI 2.8 软件分析。

1.4.5　磷酸化的 AKT、ERK1/2 的检测　　CHRF 细胞去血清培养 12 h 后,分别加入 10% FBS、50 ng/ml TPO 或 200 nmol/L Mel,30 min 后收集细胞 1×10^6 个。按照试剂盒说明书步骤,BD Fix Buffer Ⅰ 37 ℃固定 10 min, Perm Buffer Ⅲ冰上孵育 30 min 后,Stain Buffer 洗涤 2 次,加入 20 μl PE 标记的抗 Akt 抗体或抗 ERK1/2 抗体, 混匀后室温避光孵育 60 min。Stain Buffer 洗涤后重新悬浮,上流式细胞仪检测。数据由 Win MDI 2.8 软件分析。

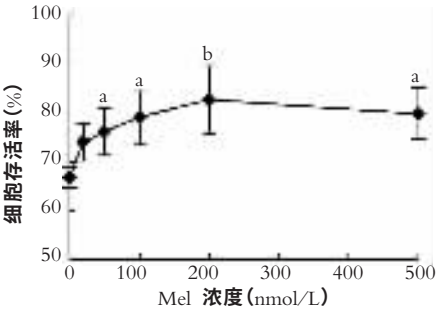
1.5　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD-t 检验。

2　结果

2.1　不同浓度的 Mel 对细胞存活率的影响

Mel(0、20、50、100、200、500 nmol/L)作用 72 h 后,CHRF 细胞的存活率显示:Mel 在浓度 50 nmol/L 以上具有保护作用,细胞存活率明显提高,与对照组比较,差异有统计学意义($n=4$, $P<0.05$)。其中,浓度 200 nmol/L 时保护作用最强,细胞存活率由(66.8% ±3.8%)升至(81.6% ±5.2%)($n=4$, $P<0.01$)。见图 1。各处理组细胞培养 72 h 后倒置相差显微镜观察显示:与正常组比较,对照组细胞体积缩小,胞膜皱缩或破裂,胞核碎裂、溶解,细胞生长密度稀疏,提示细胞有凋亡和坏死存在。在 Mel 200 nmol/L 组和 TPO 组,细胞凋亡和坏死现象与对照组比较,有较明显的改善。见图 2。



a: $P<0.05$; b: $P<0.01$, 与对照组(0 mol/L Mel)比较

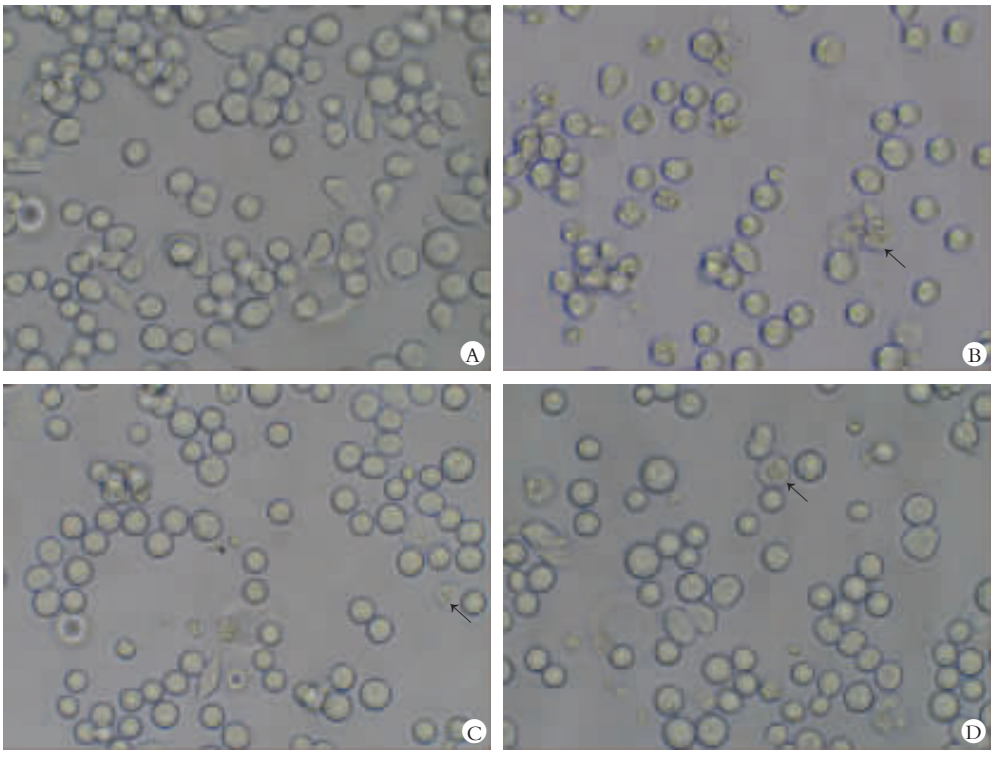
图 1　不同浓度的 Mel 作用 72 h 后细胞存活率

2.2 Annexin V/PI 检测的细胞早期凋亡和晚期凋亡

加入 200 nmol/L Mel 后 72 h,细胞的早期凋亡率(R2, Annexin V $^+$ PI$^-$)、晚期凋亡率(R1, Annexin V $^+$ PI$^+$)和总凋亡率(R1 + R2)分别从正常组的(35.3% ±6.1%)、(7.6% ±1.6%)、(42.9% ±5.8%)降为(26.8% ±6.8%)、(4.9% ±1.1%)和(31.7% ±6.8%),总凋亡率显著降低($n=4$, $P<0.05$),与 TPO 的保护作用比较[R1 + R2 为(28.8% ±7.7%)],差异无统计学意义($P>0.05$)(图3)。

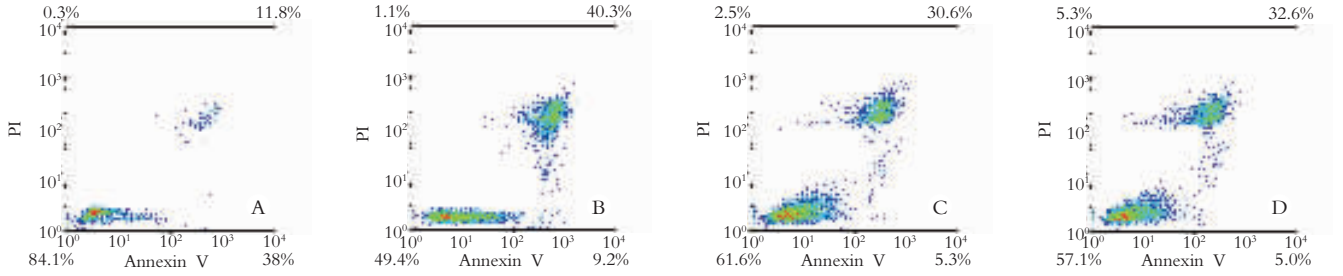
2.3 对线粒体膜完整性的保护

去血清可以诱导线粒体凋亡,R2 区细胞(JC-1 形成单体,发绿色荧光。提示线粒体膜完整性破坏,线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 消失)的比率较正常组有明显增加[(47.7% ±3.4%)比(13.8% ±1.3%),$n=4$, $P<0.01$]。加入 200 nmol/L Mel 后,R2 区细胞比率下降为(37.2% ±6.4%),与对照组比较,差异有统计学意义($n=4$, $P<0.05$)。与 TPO 组(20.7% ±5.2%)比较,差异有统计学意义($n=4$, $P<0.05$),提示 Mel 可以保护线粒体膜的完整性,抑制线粒体凋亡,但其保护作用较 TPO 弱。



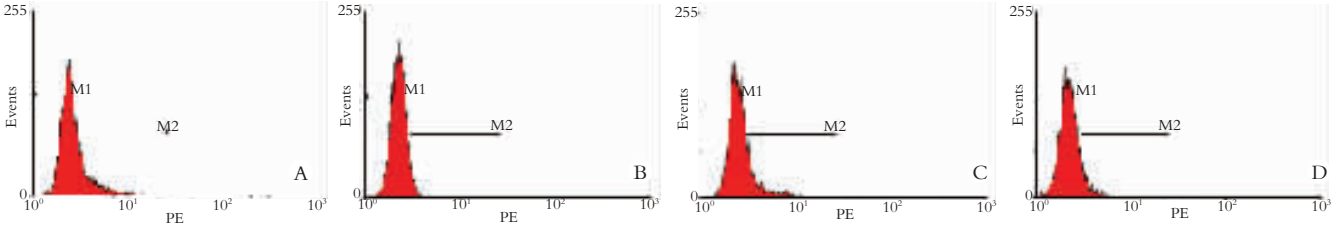
A: 正常组; B:对照组; C: TPO 组; D: Mel 200 nmol/L 组; ↑:凋亡细胞

图2 各实验组细胞在倒置显微镜下的形态变化 (×200)



A: 正常组; B:对照组; C: TPO 组; D: Mel 200 nmol/L 组

图3 Annexin V/PI 检测的细胞凋亡



A: 正常组; B:对照组; C: TPO 组; D: Mel 200 nmol/L 组

图4 磷酸化的 AKT 表达

2.4　活化的 Caspase-3 表达

去血清可能通过活化 Caspase-3 诱导细胞凋亡。Caspase-3 的表达在去血清组为(29.5% ±5.6%),较正常组(5.4% ±0.7%)明显升高,差异有统计学意义($n=4$,$P<0.001$)。当加入 200 nmol/L Mel 后,Caspase-3 的表达为(21.8% ±1.7%),与对照组(29.5% ±5.6%)比较,差异有统计学意义($n=4$,$P<0.05$)。Mel 组与 TPO 组(19.4% ±4.1%)比较,差异无统计学意义($n=4$,$P>0.05$),提示 Mel 可抑制 Caspase-3 活化,其抑制作用与 TPO 相似。

2.5　Mel 对磷酸化的 AKT、ERK1/2 的影响

加入 Mel 200 nmol/L 后 30 min,CHRF 细胞所表达的磷酸化 AKT 比率,由对照组的(5.9% ±0.1%)增加至(9.5% ±0.1%),差异有统计学意义($n=4$,$P<0.01$),提示 Mel 可增加 AKT 活性。与 TPO 组(10.7% ±0.8%)比较,差异无统计学意义($n=4$,$P>0.05$)(图 4)。

加入 Mel 200 nmol/L 后 30 min,CHRF 细胞的 ERK1/2 活性明显增加,由对照组的(6.1% ±0.4%)增加至(9.3% ±0.5%),差异有统计学意义($n=4$,$P<0.01$)。与 TPO 组(10.8% ±1.0%)比较,差异无统计学意义($n=4$,$P>0.05$)。

3　讨论

我们以前的研究证实 Mel 可以刺激巨核细胞集落形成,促进巨核细胞增殖和分化成熟,从而保护放疗小鼠的造血功能,缓解血小板减少的程度,促进血小板的恢复[3]。其他研究显示,Mel 促进血小板恢复的机制可能还有:①作为一种生长因子直接作用于骨髓巨核细胞,调节巨核细胞的成熟和血小板的生成[4]。其促进造血的作用可能和 Mel 介导产生的鸦片样物质与骨髓基质细胞上的 κ 鸦片样受体(kappa-opioid receptor,κOR)相互作用有关[5]。②通过抗氧化作用和清除自由基作用保护巨核细胞免受不良因素的伤害[6]。

Mel 除了促进巨核细胞增殖和分化成熟,是否能通过减少凋亡从而保护巨核细胞,促进血小板的恢复,目前尚少见相关报道。我们利用人的巨核细胞细胞株 CHRF 为研究对象,通过去血清诱导细胞凋亡,然后加入不同浓度的 Mel,结果显示 Mel 在 50 nmol/L 以上浓度时具有保护作用,细胞存活率明显提高($P<0.05$)。其中,浓度 200 nmol/L 时保护作用最为明显,细胞存活率由(66.8% ±3.8%)升至(81.6% ±5.2%)($P<0.01$)。通过检测凋亡指标:Annexin V/PI、Caspase-3 和 JC-1,我们的研究显示:Mel 200 nmol/L 可以明显降低 CHRF 细胞 Annexin V/PI、Caspase-3 和 JC-1 的表达($P<0.05$)。提示 Mel 可以抑制巨核细胞凋亡,其保护作用主要表现在可以减少细胞膜磷脂酰丝氨酸的外翻暴露,减少 Caspase-3 的活化和提高线粒体膜的稳定性。TPO 是调节巨核细胞增殖、分化和介导血小板生成的最主要调节因子,也是保护巨核细胞免受凋亡等伤害的最主要因子[7]。因此,我们同时作了 Mel 与 TPO 对巨核细胞的保护作用比较,结果显示:Mel 组 Annexin V/PI、Caspase-3 的表达与 TPO 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),仅 JC-1 的表达(37.2% ±6.4%)与 TPO 组(20.7% ±5.2%)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 Mel 对巨核细胞线粒体膜稳定性的保护作用较 TPO 弱,但减少细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻暴露的作用和减少 Caspase-3 活化的作用则与 TPO 相当。Mel 抗巨核细胞凋亡的作用是否有信号通路参与还不清楚。AKT 和 ERK 是联系细胞生存信号和凋亡信号的重要信号分子,能够启动细胞存活信号,阻止细胞凋亡和调控细胞增殖分化。有研究显示,Mel 对神经细胞等细胞的保护作用主要是通过信号通路 AKT 和 ERK 发挥作用[8]。本研究结果也显示,加入 Mel 后 CHRF 细胞所表达的 AKT 和 ERK1/2 活性明显增加,提示 Mel 对巨核细胞的保护作用也可能是通过激活信号通路 AKT、ERK,从而促进下游的增生信号,抑制凋亡信号。

总之,Mel 对骨髓巨核细胞有抑制凋亡,促进增殖分化等作用,即对血小板前体细胞有保护作用。提示对于血小板减少性疾病如化疗、放疗的癌症患者以及 ITP 等,可以应用 Mel 进行治疗。是否还有其他作用机制参与,值得进一步探索。

参考文献:

[1] Anwar M M, Mahfouz H A, Sayed A S. Potential protective effects of melatonin on bone marrow of rats exposed to cytotoxic drugs[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 1998, 119(2): 493 - 501.

[2] Koc M, Buyukokuroglu M E, Taysi S. The effect of melatonin on peripheral blood cells during total body irradiation in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(5): 656 - 657.

[3] 刘爱国, 杨　默, 李志光, 等. 褪黑素对照射后小鼠血小板造血的保护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, 25(6): 536 - 539.

[4] Lissoni P, Mandala M, Rossini F, *et al*. Growth Factors: Thrombopoietic Property of the Pineal Hormone Melatonin[J]. Hematology, 1999, 4(4): 335 - 343.

[5] Maestroni G J, Zammaretti F, Pedrinis E. Hematopoietic effect of melatonin involvement of type 1 kappa-opioid receptor on bone marrow macrophages and interleukin-1[J]. J Pineal Res, 1999, 27(3): 145 - 153.

[6] Reiter R J, Tan D X, Gitto E, *et al*. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage[J]. Pol J Pharmacol, 2004, 56(2): 159 - 170.

[7] Sigurjonsson O E, Gudmundsson K O, Haraldsdottir V, *et al*. Flt3/Flk-2 ligand in combination with thrombopoietin decreases apoptosis in megakaryocyte development[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(2): 183 - 191.

[8] Kilic U, Kilic E, Reiter R J, *et al*. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice[J]. J Pineal Res, 2005, 38(1): 67 - 71.

(编辑　汪勤俭)