

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-01-007

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

缺氧对 AML 骨髓单个核细胞的增殖及基因组甲基化的影响

周贵珍, 彭浪, 邹立新, 刘小柳

(长沙市第四医院血液肿瘤科, 长沙 410006)

摘要 目的 研究缺氧对急性髓系白血病(AML)患者骨髓单个核细胞的增殖及基因组甲基化的影响。方法 收集初诊 AML 患者的骨髓液, 分离单个核细胞, 以不同浓度的氧(氧含量分别为 21%、3%和 1%)处理细胞 24、48、72 h, 以常氧(氧含量 21%)作为对照。CCK-8 法、乳酸脱氢酶检测及 Hoechst 33258 染色等分析缺氧对骨髓单个核细胞的增殖、代谢及凋亡的影响。采用 5-羟甲基化胞嘧啶(5-hmC)和 5-甲基化胞嘧啶(5-mC)检测试剂盒分析缺氧对基因组甲基化状态的影响。结果 随着缺氧程度的增加, AML 细胞增殖活性增强, 代谢活性增加, 而细胞凋亡减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着缺氧程度增加, 细胞基因组 5-hmC 的含量升高, 5-mC 的含量降低 ($P < 0.05$)。浓度 1%的 O_2 培养细胞 48 h, 细胞的增殖和去甲基化最强。结论 缺氧促进 AML 患者骨髓单个核细胞的增殖与代谢, 抑制细胞凋亡, 促进细胞基因组去甲基化。

关键词: 缺氧; 急性髓系白血病; 甲基化; 5-羟甲基化胞嘧啶; 5-甲基化胞嘧啶

中图分类号: R557

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)01-0044-06

Effects of hypoxia on the proliferation and genomic methylation of acute myeloid leukemia bone marrow mononuclear cells

ZHOU Guizhen, PENG Lang, ZOU Lixin, LIU Xiaoliu

(Department of Hematology, the Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410006, China)

Abstract **Objective** To investigate the effects of hypoxia on the proliferation and genomic methylation of bone marrow mononuclear cells in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** The bone marrow fluid was collected from newly diagnosed AML patients, mononuclear cells were isolated. Cells were treated with different concentrations of oxygen (oxygen content 21%, 3%, and 1%, respectively) for 24, 48, and 72 h, with normal oxygen (oxygen content 21%) as the control. The effects of hypoxia on the proliferation, metabolism, and apoptosis of bone marrow mononuclear cells were analyzed using CCK-8

基金项目: 国家自然科学基金项目(81500141); 湖南省卫健委课题(202303046746)。

第一作者: 周贵珍, 硕士, 主治医师, 研究方向为白血病。

通信作者: 刘小柳, liuxiaoliu_2008@163.com。

method, lactate dehydrogenase detection, and Hoechst 33258 staining. The 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) and 5-methylcytosine (5-mC) detection kits were used to detect the 5-hmC and 5-mC contents in the genome of AML cells, and the impact of hypoxia on the methylation status of the genome was analyzed.

Results As the degree of hypoxia increased, the proliferative activity and metabolic activity of AML cells were increased, while apoptosis was decreased, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). As the degree of hypoxia increased, the content of 5-hmC in the cell genome was increased, while the content of 5-mC was decreased ($P < 0.05$). The proliferation and demethylation of cells were strongest when the cells were cultured at a concentration of 1% O_2 for 48 h. **Conclusion** Hypoxia promotes the proliferation and metabolism of AML bone marrow mononuclear cells, inhibits cell apoptosis, and promotes cell genome demethylation.

Keywords: hypoxia; acute myeloid leukemia; methylation; 5-hydroxymethylcytosine; 5-methylcytosine

实体瘤中存在的细胞缺氧现象^[1],在造血系统肿瘤中也同样存在^[2]。哺乳动物骨髓较其他组织相对处于低氧,其中造血干细胞处于骨髓最低氧的微环境中^[3],与正常造血组织相比,恶性造血肿瘤的骨髓更为缺氧^[4]。机体缺氧后,细胞可通过缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIF),介导相关基因的转录调控,进而参与红细胞生成、血管新生、细胞代谢等生理过程^[5]及癌细胞转移、肿瘤干细胞自我更新、肿瘤免疫逃逸等病理过程^[6]。缺氧在急性白血病中的作用仍需深入研究。

虽然表观遗传调控不涉及改变 DNA 序列,但可以对基因表达产生影响^[7],常见的表观遗传学改变包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 micro RNA 等形式。急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)属血液系统恶性肿瘤,表观遗传异常可导致抑癌基因的转录沉默、恶性克隆的增殖^[8]。TET 蛋白家族为重要的去甲基化作用酶,可使 5-甲基化胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)转化为 5-羟甲基化胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)。5-hmC 的存在导致 DNA 甲基转移酶 DNMT1 无法对胞嘧啶进行甲基化,进而导致去甲基化改变^[9]。研究发现,缺氧参与表观修饰调节,甚至认为表观修饰调节在低氧反应中发挥关键作用^[10]。本课题组既往研究发现缺氧可促进白血病细胞株 KG-1 的增殖、代谢及细胞基因组去甲基化^[11],但缺氧在 AML 患者骨髓原代细胞中的调控情况尚未明确。因此,本研究拟以 AML 患者骨髓单个核原代细胞为研究对象,观察缺氧对

AML 细胞增殖、代谢、凋亡及基因组甲基化的影响,以探讨白血病细胞缺氧与表观修饰之间的联系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 选择 2019 年 1 月至 2020 年 12 月在长沙市第四医院血液肿瘤科住院的初诊 AML 患者 10 例为研究对象,其中男 4 例,女 6 例,年龄 24~78 岁,中位年龄 56 岁。本研究由长沙市第四医院医学伦理委员会批准,参与研究的患者知情,签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂与仪器 IMDM 细胞培养基购自美国 Gibco 公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自日本 Dojindo 公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购于南京建成生物工程研究所;Hoechst33258 购自美国 Sigma 公司;甲基化 DNA 定量试剂盒和羟甲基化 DNA 定量试剂盒购自美国 Epigentek 公司。缺氧培养箱和酶标仪分别从美国的 Thermo Fisher Scientific 公司和 Bio-Rad 公司购买。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和缺氧 取患者骨髓标本 3 mL,采用密度梯度离心法(Ficoll)分离骨髓单个核细胞。采用缺氧培养箱培养骨髓单个核细胞,在 O_2 浓度分别为 21%、3%和 1%的环境中培养 24、48、72 h(培养箱温度 37 $^{\circ}C$, CO_2 浓度 5%),收集细胞用于后续相关实验。

1.2.2 细胞增殖测定 采用 CCK-8 法测定细胞增殖活性。按照试剂盒说明,将细胞接种(5×10^4 个细胞/mL)于 96 孔板中,37 °C 下孵育 24、48 和 72 h。向细胞中加入 10 μ L CCK-8 溶液避光孵育 2 h。使用酶标仪检测光密度值(OD),检测波长 450 nm。

1.2.3 乳酸脱氢酶(LDH)测定 细胞培养后,在 4 °C 条件下,1 200 r/min 离心 5 min,按照 LDH 检测试剂盒说明,吸取 20 μ L 离心后的上清液加入 96 孔酶联检测板中。每孔依次加 25 μ L 基质缓冲液、5 μ L 辅酶 1.25 μ L 二硝基苯肼,250 μ L 0.4 mol/L NaOH 溶液,室温放置 5 min,使用酶标仪检测 OD,检测波长 450 nm。

1.2.4 细胞凋亡检测 经过处理后的细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,余液重新悬浮后涂片,室温晾干,用 4% 多聚甲醛固定 1 min,细胞涂片用 PBS 浸泡 3 min,滴加 Hoechst 33258 染液,室温避光染色 10 min,PBS 洗涤 3 次、每次 2 min。甘油封片,使用荧光显微镜,观察被 Hoechst 33258 染成紫蓝色的细胞核并拍照。正常细胞核为均匀弥散荧光,而凋亡细胞核呈现出浓染致密的颗粒块状荧光。观察细胞,计数 200 个细胞,分析凋亡细胞百分率。

1.2.5 5-hmC 水平测定 采用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。细胞离心后,加入 200 μ L 缓冲液 GA、20 μ L 蛋白酶 K、200 μ L 缓冲液 GB,70 °C 放置 10 min,加入 200 μ L 无水乙醇,振荡混匀 15 s,溶液多次加入吸附柱中洗涤、离心,将基因组 DNA 置 -20 °C 冰箱中保存备用。使用 MethylFlashIM 羟甲基化 DNA 定量试剂盒来定量检测基因组 DNA 中 5-hmC 的水平。按照试剂盒说明,通过抗体的捕获,对 DNA 的羟甲基化部分进行比色。每个样本重复 3 次。

1.2.6 5-mC 水平测定 使用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。按照 MethylFlashTM 甲基化 DNA 定量试剂盒说明检测基因组 DNA 中的 5-mC 水平。每个样本重复 3 次。

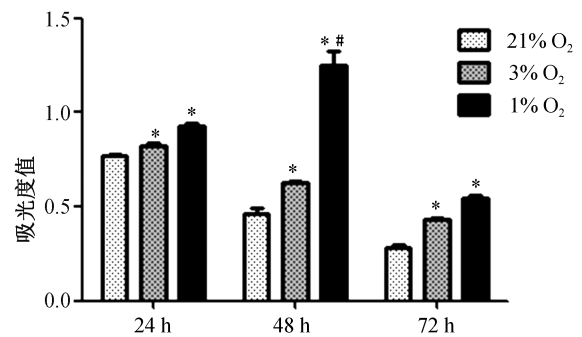
1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 以及 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析及图表制作。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧对骨髓单个核细胞增殖的影响

浓度 1% 的 O_2 培养骨髓单个核细胞,细胞增殖活性高于浓度 3% 和 21% 的 O_2 培养的细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。浓度 1% 的 O_2 培养细胞 48 h,细胞增殖的活性最强,其增殖活性高于其他 O_2 浓度培养 24 h 或 72 h 细胞的增殖活性,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 1 所示。

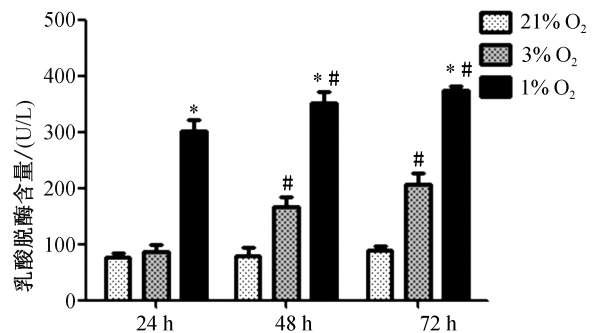


注:与浓度 21% 的 O_2 培养比较,* $P < 0.05$;与培养 24 h 和 72 h 的细胞比较,# $P < 0.05$ 。

图 1 缺氧对骨髓单个核细胞增殖活性的影响分析

2.2 缺氧对骨髓单个核细胞代谢的影响

浓度 1% 的 O_2 培养的骨髓单个核细胞释放的 LDH 量高于浓度 3% 和 21% 的 O_2 培养的细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。浓度 1% 和 3% 的 O_2 培养细胞的时间越长,骨髓单个核细胞释放的 LDH 量越多,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 2 所示。



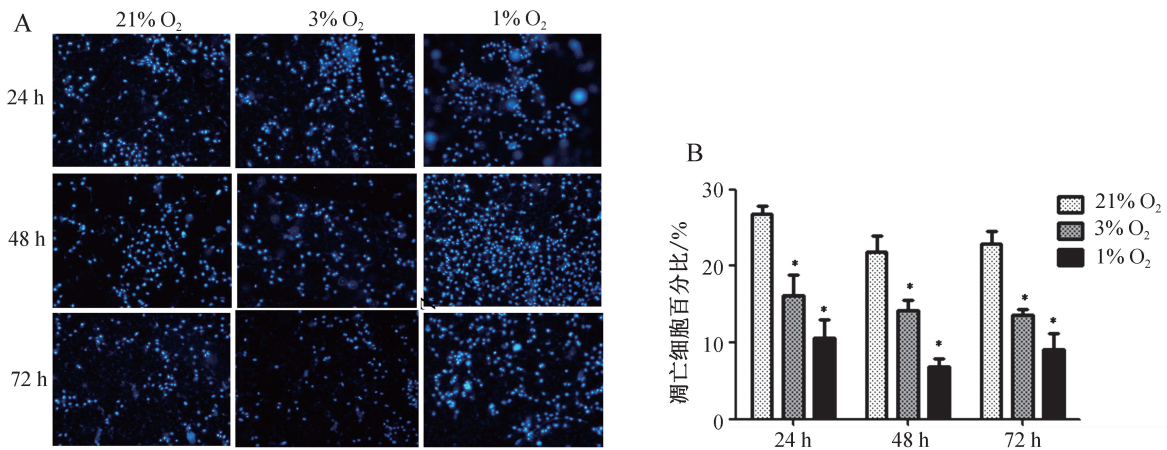
注:与浓度 21% 的 O_2 培养比较,* $P < 0.05$;与培养 24 h 的细胞比较,# $P < 0.05$ 。

图 2 缺氧对骨髓单个核细胞 LDH 的影响

2.3 缺氧对骨髓单个核细胞凋亡的影响

浓度 1% 的 O₂ 培养的骨髓单个核细胞,其细胞

凋亡比率低于浓度 3% 和 21% 的 O₂ 培养的细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 3 所示。

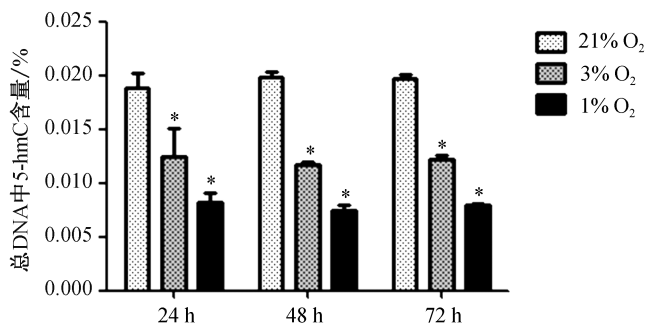


A.Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡;B. 细胞凋亡分析;与浓度 21% 的 O₂ 培养比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 骨髓单个核细胞凋亡的检测与分析

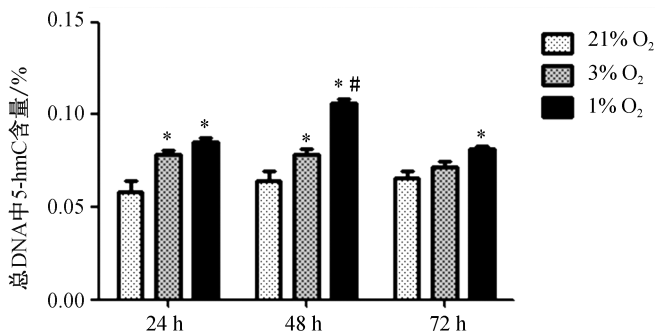
2.4 缺氧对骨髓单个核细胞基因组甲基化的影响

浓度 1% 的 O₂ 培养的骨髓单个核细胞,其基因组去甲基化程度高于浓度 3% 和 21% 的 O₂ 培养的细胞;浓度 1% 的 O₂ 培养骨髓单个核细胞 48 h,其基因组去甲基化程度最强,强于其他浓度的 O₂ 培养 24 h 或 72 h 的细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 4 所示。浓度 1% 的 O₂ 培养的骨髓单个核细胞的基因组甲基化程度低于浓度 3% 和 21% 的 O₂ 培养的细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 5 所示。



注:与浓度 21% 的 O₂ 培养比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 缺氧对骨髓单个核细胞基因组 5-mC 含量的影响



注:与浓度 21% 的 O₂ 培养比较, * $P < 0.05$;与培养 24 h 和 72 h 的细胞比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 缺氧对骨髓单个核细胞基因组 5-hmC 含量的影响

3 讨论

缺氧与白血病相互影响,白血病细胞的大量增殖导致骨髓缺氧的程度加重,而局部缺氧环境也会影响白血病细胞的增殖^[12],同时 AML 患者可能伴有贫血,这会进一步加重骨髓缺氧状态,导致恶性循环^[13]。本实验以 AML 骨髓单个核细胞为研究对象,通过 CCK-8 法检测细胞活性、生化法测定细胞培养基中 LDH 含量、Hoechst 33258 核染色检测细胞凋亡,以观察不同缺氧程度对细胞增殖、代谢和凋亡的影响,实验结果显示,随着缺氧程度增加,细胞增殖活性增强,尤其是在浓度 1% 的 O₂ 培养 48 h 时最为

明显;细胞低氧培养后,培养液中 LDH 水平升高,表明缺氧会刺激白血病细胞增殖,细胞代谢增强,细胞凋亡受阻。缺氧对肿瘤细胞和正常细胞都有一定毒性,但肿瘤细胞通过基因调控适应缺氧环境并增殖转移^[14]。Benito 等^[15]发现,在骨髓缺氧微环境中,急性淋巴细胞白血病细胞出现增殖,这与本研究结果相符合。本研究发现 AML 骨髓单个核细胞在缺氧环境中增殖和代谢活性增强,凋亡细胞受阻,这表明缺氧对 AML 发展起促进作用。

基因突变、染色体异常和表观遗传学改变等因素导致髓系干细胞失去分化成熟的能力,进而引发原始细胞快速增殖,最终导致白血病的发生,但表观调控异常在 AML 中的具体机制尚未完全明确。DNA 甲基化是一种广泛存在的表观遗传学改变。在肿瘤发生发展过程中,异常甲基化通过失活抑癌基因或激活癌基因,导致肿瘤细胞无限增殖^[16]。AML 中经常出现多个基因的异常甲基化,比如 P15INK4B、P16 等^[17]。5-hmC 作为一种新的表观遗传学标志物,被科学界誉为“第六种核苷酸”^[18]。本研究检测了 AML 原代细胞中 5-hmC 和 5-mC 的含量,结果显示,缺氧培养的细胞中 5-hmC 含量较常氧组高,而 5-mC 含量则降低,提示缺氧可能导致 AML 骨髓细胞基因组去甲基化,减少细胞基因组的甲基化程度。研究发现,缺氧环境会导致结直肠癌细胞的基因组 DNA 出现去甲基化现象^[19],本研究结果与此相符合。研究发现,肿瘤细胞的 DNA 甲基化水平呈现出整体基因组的低甲基化和特定基因启动子区的高甲基化状态^[20]。多种肿瘤中 5-hmC 的含量减少与肿瘤的发展和预后有关。Shen 等^[21]研究发现,5-hmC 缺失是导致原发性睾丸弥漫性大 B 细胞淋巴瘤预后不良的一个独立因素。

近年来,表观遗传调控剂成为急性白血病新的治疗选择,同时许多靶向 HIF 的药物临床试验正在进行中^[23],如 HIF 脯氨酰羟化酶抑制剂 roxadustat 在改善低危骨髓增生异常综合征难治性贫血中的应用^[24],HIF-2 α 抑制剂 belzutifan 在晚期肾细胞癌中的应用^[25]。能否通过抑制 HIF-1 α 的表达或降低 5-hmC 水平来治疗急性白血病? 缺氧诱导因子抑制剂与去甲基化药物联合是否可以成为白血病治疗的

新模式? 这些都可能成为未来白血病研究的重点。本研究将缺氧代谢与表观遗传调控联系起来,为 AML 发病机制的阐述、及未来多药联合治疗模式的机制研究提供新的思路。

4 结 论

缺氧促进 AML 患者骨髓单个核细胞的增殖与代谢,抑制 AML 患者骨髓单个核细胞凋亡,促进其基因组去甲基化。

参 考 文 献

- [1] LI Y, ZHAO L, LIX F. Hypoxia and the tumor microenvironment[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021,20: 1533033821-1036304.
- [2] LI L J, MAN J C, ZHAO L. Hypoxia-CXCL6 axis affects arteriolar niche remodeling in acute myeloid leukemia[J]. *Exp Biol Med*, 2021,246(1):84-96.
- [3] KUBOTA Y, TAKUBO K, SUDA T. Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2): 335-339.
- [4] ZHONG J M, WU H, BU X Y, et al. Establishment of prognosis model in acute myeloid leukemia based on hypoxia microenvironment, and exploration of hypoxia-related mechanisms[J]. *Front Genet*, 2021,12: 727392.
- [5] BAPAT A, SCHIPPEL N, SHI X J, et al. Hypoxia promotes erythroid differentiation through the development of progenitors and proerythroblasts[J]. *Exp Hematol*, 2021, 97: 32-46.e35.
- [6] WU Q H, YOU L, NEPOVIMOVA E, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape[J]. *J Hematol Oncol*, 2022,15(1):77.
- [7] PEIXOTO P, CARTRONP F, SERANDOUR A A, et al. From 1957 to nowadays: a brief history of epigenetics[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(20):7571.
- [8] VENNEY D, MOHD-SARIP A, MILLSK I. The impact of epigenetic modifications in myeloid malignancies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(9):5013.
- [9] LI F, YUANC W, XU S Y, et al. Loss of the epigenetic mark 5-hmC in psoriasis: implications for epidermal stem cell dysregulation[J]. *J Invest Dermatol*, 2020,140(6):

- 1266–1275.
- [10] MICHEALRAJK A, KUMAR S A, KIM L J Y, et al. Metabolic regulation of the epigenome drives lethal infantile ependymoma[J]. *Cell*, 2020,181(6):1329–1345.
- [11] 周贵珍.缺氧对急性髓系白血病 KG-1 细胞生物学及基因甲基化的影响[D].长沙:湖南师范大学,2020.
- [12] MAGLIULO D, BERNARDI R. Hypoxic stress and hypoxia-inducible factors in leukemias[J]. *Front Oncol*, 2022,12:973978.
- [13] WIELOCKX B, GRINENKO T, MIRTSCHINK P, et al. Hypoxia pathway proteins in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Cells*, 2019,8(2):155.
- [14] LEE P, CHANDELN S, SIMON M C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020,21(5):268–283.
- [15] BENITO J, SHI Y X, SZYMANSKA B, et al. Pronounced hypoxia in models of murine and human leukemia: high efficacy of hypoxia-activated prodrug PR-104 [J]. *PLoS One*, 2011,6(8):e23108.
- [16] NISHIYAMA A, NAKANISHI M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer[J]. *Trends Genet*, 2021,37(11):1012–1027.
- [17] LIUX L, LIU H Q, LI J, et al. Role of epigenetic in leukemia: from mechanism to therapy [J]. *Chem Biol Interact*, 2020,317:108963.
- [18] STAHL A, RIGGI N, NARDOU K, et al. 5-hydroxymethylcytosine loss in conjunctival melanoma[J]. *Dermatopathology*, 2021,8(2):176–184.
- [19] PAL A, SRIVASTAVA T, SHARMA M K, et al. Aberrant methylation and associated transcriptional mobilization of Alu elements contributes to genomic instability in hypoxia[J]. *J Cell Mol Med*, 2010,14(11):2646–2654.
- [20] SKVORTSOVA K, STIRZAKER C, TABERLAY P. The DNA methylation landscape in cancer [J]. *Essays Biochem*, 2019,63(6):797–811.
- [21] KON T, SASAKI Y, ABE Y, et al. Modulation of AMPK/TET2/5-hmC axis in response to metabolic alterations as a novel pathway for obesity-related colorectal cancer development[J]. *Sci Rep*, 2023,13(1):2858.
- [22] SHEN Y, WANG L H, OU J P, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine as a poor prognostic factor for primary testicular diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Int J Med Sci*, 2022,19(2):225–232.
- [23] ALBADARI N, DENG S S, LI W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2019,14(7):667–682.
- [24] HENRYD H, GLASPY J, HARRUP R, et al. Roxadustat for the treatment of anemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome: open-label, dose-selection, lead-in stage of a phase 3 study [J]. *Am J Hematol*, 2022,97(2):174–184.
- [25] MOTZERR J, SCHMIDINGER M, ETO M, et al. LI-TESPARK-011: belzutifan plus lenvatinib vs cabozantinib in advanced renal cell carcinoma after anti-PD-1/PD-L1 therapy[J]. *Future Oncol*, 2023,19(2):113–121.

[收稿日期:2023-11-15]

[责任编辑:涂剑,向秋 英文编辑:李佳睿]