

· 基础研究 ·

血小板受体C型凝集素样受体2在巨核细胞自噬中的作用

姜江^{1,2}, 丁育红¹, 贾慧³, 周鹭^{1*}

¹南通大学附属医院血液内科, 江苏 南通 226001; ²苏州大学附属第二医院核医学科, 江苏 苏州 225556; ³南通大学医学院, 江苏 南通 226001

[摘要] 目的:用C型凝集素样受体2(C-type lectin like receptor 2, CLEC-2)缺陷小鼠检测CLEC-2在自噬过程中的作用,从而探究CLEC-2信号通路对巨核细胞发育的影响。方法:怀孕14.5 d的小鼠胚胎取出、分离并培养巨核细胞。体外雷帕霉素处理巨核细胞,检测巨核细胞CLEC-2和CD41的表达。小鼠经雷帕霉素处理后,检测小鼠骨髓自噬蛋白的表达。结果:自噬基因在胎肝来源的巨核细胞中表达,并且表达量很高。小鼠巨核细胞在雷帕霉素处理后,CLEC-2表达下调,提示CLEC-2参与调控自噬。雷帕霉素处理后,与野生型小鼠相比,敲除小鼠的巨核细胞CD41和CD61蛋白表达明显降低($P < 0.001$)。体内实验发现雷帕霉素能显著增强敲除小鼠LC3蛋白的表达。CLEC-2的缺陷能显著降低自噬紊乱导致的高倍体巨核细胞数。CLEC-2的缺陷降低雷帕霉素诱导胎肝来源的巨核细胞周期相关蛋白Cyclin D1、Cyclin D2的表达。结论:血小板受体CLEC-2在巨核细胞自噬中具有重要的调控作用。

[关键词] C-型凝集素样受体2; 自噬; 巨核细胞; 雷帕霉素

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)06-815-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20220608

Role of platelet receptor C-type lectin like receptor 2 in autophagy of megakaryocytes

JIANG Jiang^{1,2}, DING Yuhong¹, JIA Hui³, ZHOU Lu^{1*}

¹Hematology of Department, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; ²Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 225556; ³Medical School, Nantong University, Nantong 226001, China

[Abstract] **Objective:** CLEC-2 signaling pathway is involved in the regulation of autophagy in megakaryocytes. However, the mechanism has not been fully elucidated. In this study, CLEC-2 deficient mice were used to detect whether CLEC-2 plays an important role in autophagy. **Methods:** Megakaryocytes were isolated and cultured from 14.5 day pregnant mouse embryos. The expression of CLEC-2 and CD41 in megakaryocytes were detected. After rapamycin treatment, the expression of autophagy protein was detected. **Results:** Autophagy gene was highly expressed in megakaryocytes derived from fetal liver. After rapamycin treatment, the expression of CLEC-2 was decreased, indicating that CLEC-2 was involved in the regulation of autophagy. Compared with wild-type mice, the expression of CD41 and CD61 in megakaryocytes of CLEC-2 knockout mice was significantly decreased after rapamycin treatment. *In vivo*, rapamycin can significantly enhance the expression of LC3 protein in knockout mice. The defect in CLEC-2 can significantly reduce the number of polyploid megakaryocytes caused by autophagy disorder. And it also reduced the expression of cyclin D1 and cyclin D2 in megakaryocyte derived from fetal liver induced by rapamycin. **Conclusion:** CLEC-2 plays an important role in the regulation of autophagy of megakaryocytes.

[Key words] CLEC-2; autophagy; megakaryocytes; rapamycin

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(06):815-820]

[基金项目] 南通市科技计划指令性项目(JC2019039)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xueyezhoulu2007@si-na.com

自噬在造血干细胞中的缺失会导致多系血细胞的异常分化^[1-2]。许多血液病尤其是血小板相关疾病伴随着自噬水平的上调,例如特发性血小板减

少性紫癜 (immune thrombocytopenia, ITP) 和伴随血小板减少的骨髓异常增生综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS)^[2-3]。因此,近年来自噬对巨核细胞增殖分化和血小板生成的影响受到广泛关注^[4]。

自噬是一个特殊的细胞代谢过程,能帮助细胞适应多种应激状态。细胞的自噬主要分为3种形式:微自噬、巨自噬(简称自噬)和分子伴侣介导的自噬。巨自噬是通常意义上的自噬,它通过一个双层膜的细胞器——自噬小体,将细胞内细胞器和胞浆内的组分重新利用^[5-6]。自噬小体来源于膜状的类似帽子结构的前体结构,在该结构的两极开始生长,最终形成一个完整的封闭的充满胞浆和细胞器的细胞器。研究报道,自噬对巨核细胞和血小板的发育起重要作用^[7-8]。例如在造血系统中特异性敲除自噬相关基因 Atg7 的自噬缺失小鼠 (Atg7^{fllox/fllox} Vav-Cre) 巨核祖细胞数量大量减少并出现巨大血小板症^[9]。进一步研究表明,这些小鼠的巨核细胞发育及血小板生成异常是源于细胞线粒体的功能障碍和细胞周期的阻滞^[10]。另外, Mortensen 等^[9]研究证实,在巨核细胞和血小板上特异性敲除 Atg7 基因会导致小鼠 Atg7^{fllox/fllox} PF4-Cre 自噬缺失并且血小板的功能异常。由此可见,自噬在巨核细胞发育及血小板生成中起到重要作用。

C型凝集素样受体-2(C-type lectin like receptor 2, CLEC-2)是一个非典型的C型凝集素受体,主要表达在血小板和巨核细胞表面。研究表明,特异性敲除巨核细胞 Syk 基因的小鼠 Syk^{fllox/fllox}PF4-Cre,其巨核细胞的成熟发育受到影响^[11]。另外, Syk 信号通路已被证实参与巨核细胞的自噬过程^[12]。而研究表明 CLEC-2 可以通过激活 Syk 信号通路激活 Plerγ2, 级联放大 PKC 信号通路,从而活化血小板^[13-14]。为进一步认识 CLEC-2 在体内调控巨核细胞自噬的作用,本研究使用 CLEC-2 缺陷小鼠,检测 CLEC-2 在调控自噬中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6J (B6, CD45.2) 小鼠、C57BL/6J 背景的 CLEC-2 基因敲除鼠购于苏州西山生物科技公司[动物质量合格证号为 SCXK(沪)2017-0012]。实验中使用的小鼠均在苏州大学无特定病原体 (SPF) 饲养间养殖[动物饲养合格证号为 SYXK(苏)2017-0043]。性别相同且同窝出生的野生型 (WT) 小鼠作为正常对照。实验小鼠均采用 8~12 周龄,所涉及动

物实验经由苏州大学动物管理和使用委员会批准。

雷帕霉素 (rapamycin, Rap) (Cell Signaling Technology, cat No.9904, 美国), 山羊抗兔的 IRDye 800CW、山羊抗小鼠的 IRDye 800CW 荧光二抗 (LICOR Biosciences 公司, 美国), FITC 标记的大鼠抗小鼠的 CD41 (Cat No.553848, BD Biosciences 公司, 美国), PE 标记的罗马尼亚仓鼠抗小鼠的 CD61 (Cat No.12-0611, eBioscience 公司, 美国), 红外成像系统 (LI-COR Biosciences 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 原代巨核细胞的培养

断颈处死怀孕 14.5 d 的 C57BL/6J 小鼠, C57BL/6J 背景的 CLEC-2 基因敲除小鼠, 用提前高温灭菌的直剪剖开孕鼠的腹部取出全部胚胎, 放入提前预热的 1×PBS 或者 DMEM 培养基至直径为 100 mm 的培养皿内, 接着进行胎肝计数, 分离胎肝。取完胎肝后进行胎肝单细胞悬液的制备。用 1 mL 的蓝色枪头小心将胎肝连同培养基一起吸入孔径为 70 μm 的无菌细胞筛, 研磨组织, 反复研磨之后将培养皿内的细胞悬液用新的无菌筛网过滤并收集至无菌 50 mL 离心管内, 制成单细胞悬液, 400 g 离心 5 min, 弃上清。细胞的培养过程中还需在胎肝细胞获取的第 1 天添加细胞因子血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 10 ng/mL。

1.2.2 原代巨核细胞纯化

胎肝细胞用细胞因子连续诱导分化 5 d (不换培养基), 并在第 5 天用含 1.5% BSA 的 1×PBS 溶液密度梯度沉降法纯化已诱导成熟的巨核细胞。分别在 15 mL 无菌离心管内加上 1.5 mL 3% BSA 和 1.5 mL 1.5% BSA 溶液, 再将细胞培养基小心沿着管壁加在分离液的上面。细胞纯化时间为 50 min~1 h, 纯化完毕后离心管的下部白色絮状沉淀即为成熟的巨核细胞, 不需离心只需将沉淀上方的培养基以及 BSA 溶液全部吸走即能得到巨核细胞进行后续的实验。

1.2.3 体外用药物上调细胞自噬

Rap 200 nmol/L 处理原代第 1 天获得的胎肝细胞 5 d 或者 BSA 纯化之后的巨核细胞 6 h, 对照组用 0.2% DMSO 处理。

1.2.4 蛋白检测

巨核细胞或血小板用 1×PBS 离心洗涤之后, 用新配制的含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 1×RIPA 裂解液进行冰上裂解 30 min。细胞的蛋白浓度用 BCA 试剂盒进行检测。每组样品的蛋白上样量为 30 μg, 用 SDS-PAGE 胶电泳, 纤维素膜转膜。转好的纤维

素膜用5%的脱脂牛奶在室温下封闭1 h,并和一抗在4 °C摇床上孵育过夜,第2天将纤维素膜和山羊抗兔的IRDye 800 CW 或者山羊抗小鼠的IRDye 800 CW 荧光二抗室温下共同孵育1 h,红外成像系统观察目的条带。

1.2.5 流式细胞术检测血小板表面蛋白CD41和CD61

上述分离出的胎肝巨核细胞加入500 μL的1×PBS,2 000 r/min离心5 min,再用100 μL 1×PBS重悬全血,加入FITC标记的大鼠抗小鼠的CD41抗体和PE标记的罗马尼亚仓鼠抗小鼠的CD61抗体各0.5 μL,同时室温避光孵育40 min,再用1×PBS离心洗去多余未结合的抗体并重悬细胞即可上机进行检测,并进行双阳性率分析比较。

1.2.6 小鼠骨髓的免疫荧光染色

野生型小鼠和CLEC-2敲除小鼠腹腔注射1 mg/kg Rap,24 h后腹腔注射7%水合氯醛(5 μL/g)麻醉小鼠,取出骨髓,立即置于4%多聚甲醛中4 °C固定过夜,将固定后的骨髓置于脱钙液中4 °C过夜,PBS室温摇洗,固定好的组织置于20%蔗糖中4 °C脱水过夜,次日将组织用OCT包埋,迅速放置在平整的干冰上冷冻,保存于-80 °C备用。制备好的冰冻组织切块,固定于冰冻切片机上,切成5 μm厚的冰冻切片,加入标记的CD41和LC3抗体,共聚焦显微镜观察并拍照。

1.3 统计学方法

使用Prism 6.0软件进行统计分析。所有数据均来自至少3次独立实验。数据以均数±标准误($\bar{x} \pm s_e$)表示,使用Graphpad统计分析,当数据为3组或以上时使用one way ANOVA。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

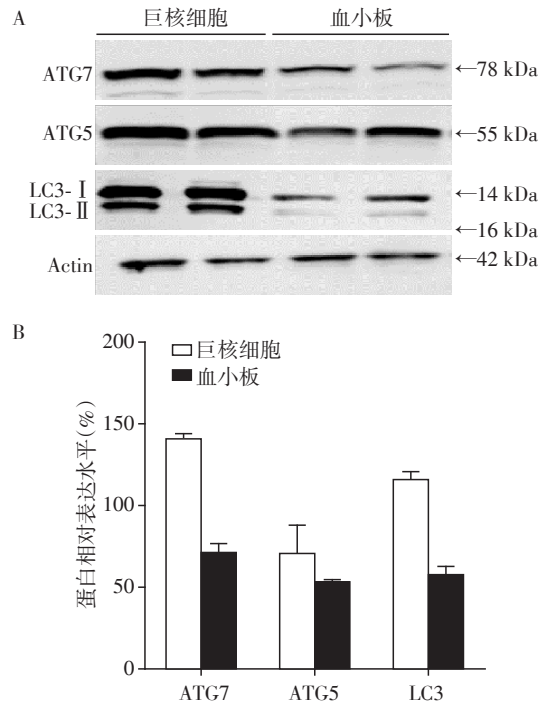
2 结果

2.1 自噬基因在胎肝来源的巨核细胞中的表达

成熟的巨核细胞可以通过原代胎肝细胞加入细胞因子体外诱导培养获得。本研究表明自噬重要相关基因ATG7、ATG5、LC3蛋白在胎肝来源的巨核细胞中均有表达(图1)。

2.2 Rap处理胎肝细胞能抑制巨核细胞CLEC-2的表达

为探讨自噬紊乱是否影响胎肝来源的巨核细胞CLEC-2的表达,在分离胎肝细胞的第一天加入Rap与细胞因子TPO共同孵育培养5 d,诱导出巨核细胞并通过流式细胞仪进行巨核细胞表面CLEC-2表达分析检测。Rap导致胎肝巨核细胞CLEC-2表



Western blot显示野生小鼠胎肝细胞诱导的巨核细胞和洗涤血小板中的ATG7、ATG5、LC3-I和LC3-II蛋白表达持续5 d。A: Western blot检测巨核细胞和洗涤血小板中各蛋白表达;B:蛋白表达半定量分析结果($n=3$)。

图1 小鼠胎肝和骨髓来源的巨核细胞和血小板中的自噬基因表达

Figure 1 Autophagy gene expression in mice fetal liver and bone marrow-derived megakaryocytes and platelets

达下调(图2)。

2.3 Rap抑制胎肝细胞来源的CLEC-2缺陷巨核细胞CD41与CD61的表达

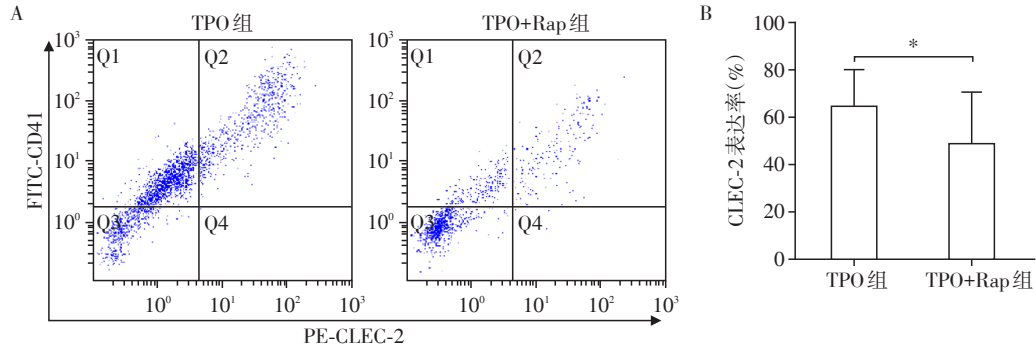
CD41和CD61是造血干细胞向巨核细胞系定向分化的特异高表达的膜表面糖蛋白。为了探究自噬改变对巨核细胞分化的影响,流式细胞仪检测了胎肝来源的巨核细胞表面CD41和CD61的表达。结果表明,和野生型小鼠相比,200 nmol/L Rap处理的CLEC-2基因敲除小鼠巨核细胞CD41和CD61的双阳性率为 $(1.0 \pm 0.1)\%$,显著下降($P < 0.01$,图3)。

2.4 Rap增强CLEC-2缺陷巨核细胞骨髓自噬基因的表达

小鼠腹腔注射Rap,24 h后取出小鼠骨髓,进行免疫荧光染色,结果表明,Rap能显著增强敲除小鼠LC3蛋白的表达,验证了CLEC-2的缺陷影响小鼠体内的自噬水平(图4)。

2.5 Rap抑制胎肝来源的CLEC-2缺陷巨核细胞的成熟

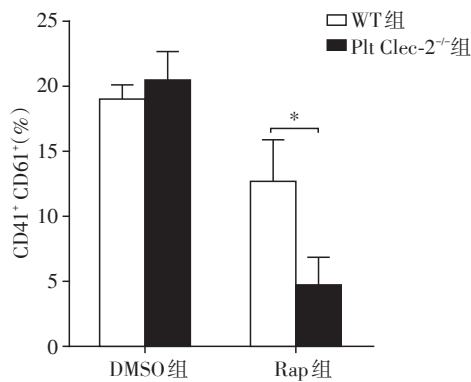
巨核细胞成熟的一个标志性特征是发生核内



A: 流式细胞仪检测巨核细胞表面CLEC-2的表达;B: 两组 CLEC-2 表达的定量比较。两组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 雷帕霉素对小鼠胎肝巨核细胞 CLEC-2 表达的影响

Figure 2 Effects of rapamycin on the expression of CLEC-2 in mice fetal liver megakaryocytes



200 nmol/L RAP 处理小鼠胎肝细胞 5 d (不改变细胞培养基), CD41、CD61 双阳性率统计表。两组比较, * $P < 0.01$ ($n=3$)。

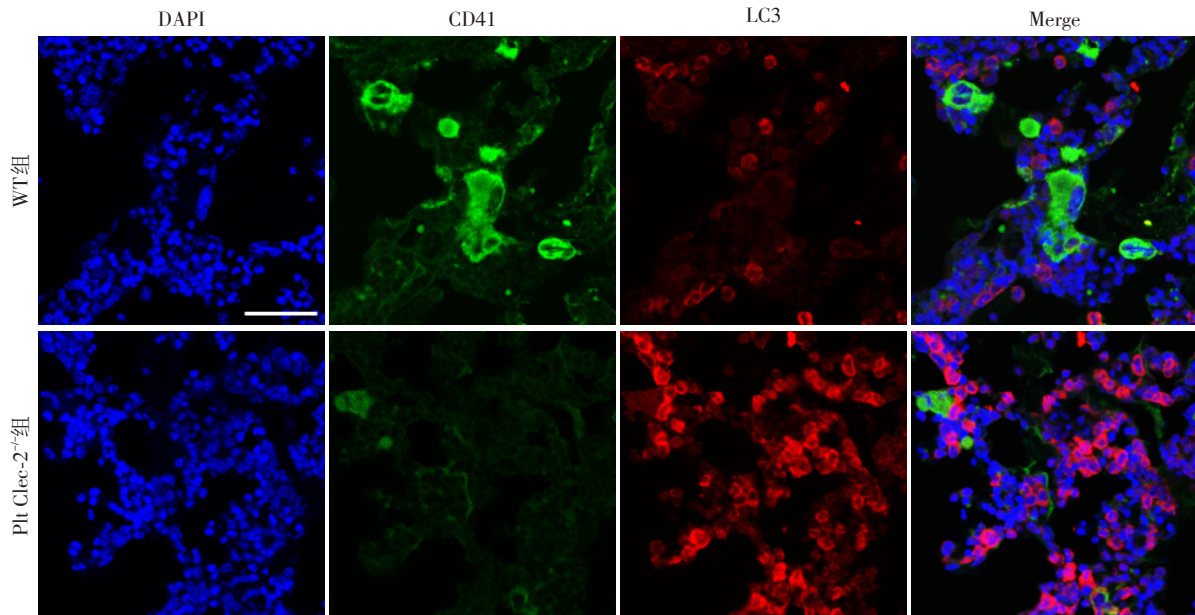
图3 流式细胞术分析 CD41 和 CD61 的表达

Figure 3 CD41 and CD61 expression analyzed by flow cytometry

有丝分裂,为了探究 CLEC-2 的缺陷是否影响自噬紊乱导致胎肝来源的巨核细胞的核内有丝分裂,在分离胎肝细胞的第 1 天就加入 Rap 与细胞因子 TPO 共同孵育培养 5 d,诱导出巨核细胞并通过流式细胞仪进行巨核细胞分析检测(图 5)。流式细胞仪的核型分析能体现巨核细胞核内有丝分裂的程度,先用 CD41 选出巨核细胞,然后用碘化丙啶标记细胞核。发现与对照组相比,CLEC-2 的缺陷能显著降低自噬紊乱导致的高倍体巨核细胞($\geq 8N$)的个数($P < 0.05$)。

2.6 CLEC-2 的缺陷降低 Rap 诱导胎肝来源的巨核细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、CyclinD2 的表达

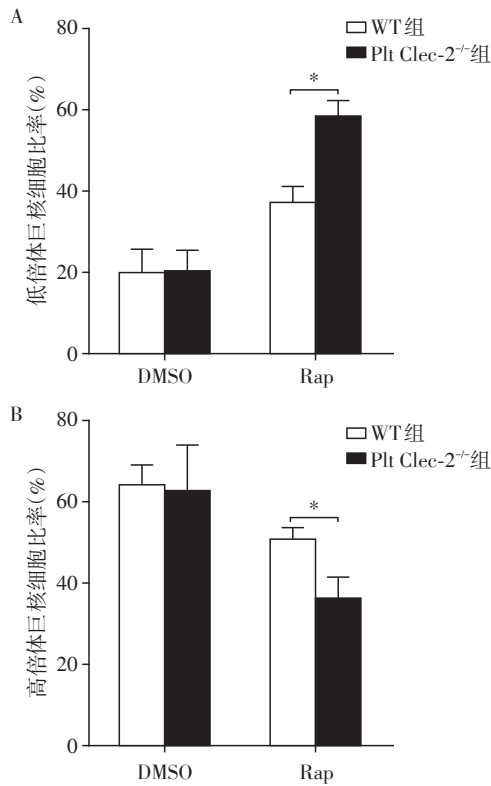
进一步探讨 CLEC-2 影响自噬的可能机制,检测跟细胞增殖相关的细胞周期蛋白以及周期监测



将 OCT 包埋的骨髓切成 10 μm 切片,并用抗 LC3 和抗 CD41 抗体染色 ($n=3$, 比例尺=10 μm)。

图4 小鼠骨髓的免疫荧光染色

Figure 4 Immunofluorescence staining of mouse bone marrow



A: 低倍体(2N~4N)巨核细胞百分比;B: 高倍体($\geq 8N$)巨核细胞百分比。两组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图5 200 nmol/L Rap 和 DMSO 诱导小鼠胎肝细胞巨核细胞的核型分析

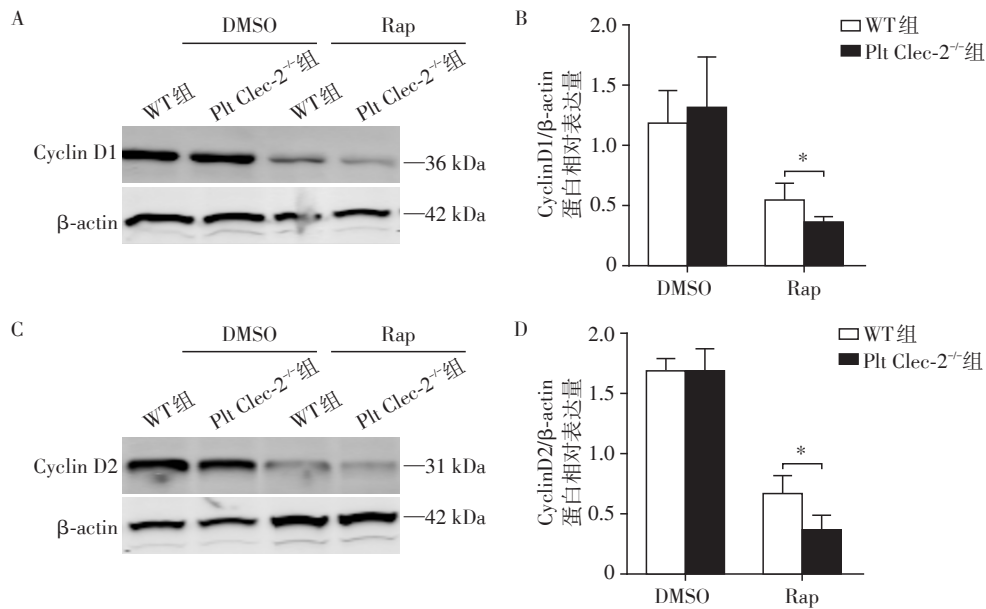
Figure 5 Karyotype analysis of megakaryocytes induced by 200 nmol/L RAP and DMSO in mice fetal liver cells

点。检测不同处理组胎肝诱导纯化的巨核细胞的 Cyclin D1、Cyclin D2 蛋白,发现 Rap 处理胎肝巨核细胞后, CLEC-2 敲除小鼠巨核细胞 CyclinD1、CyclinD2 的表达量比 WT 型小鼠低,且差异有统计学意义($P < 0.05$,图6)。

3 讨论

研究表明, CLEC-2 可以通过 Syk 信号通路激活 $\text{Plec}\gamma 2$, 级联放大 PKC 信号通路, 进而活化血小板。而且, Syk 信号通路已被证实参与调节巨核细胞的自噬过程。但其具体作用机制仍不明确。因此, 本研究的创新之处在于应用 CLEC-2 缺陷小鼠来检测 CLEC-2 在自噬过程中是否发挥重要作用。

研究表明在造血干细胞阶段进行药物干预自噬能造成巨核细胞 CLEC-2 表达的改变, 证明 CLEC-2 参与巨核细胞的自噬过程。基因敲除小鼠模型是目前最为可靠的研究工具。本研究建立了 CLEC-2 缺陷的小鼠模型。将该基因敲除之后, 巨核细胞缺失 CLEC-2 蛋白, 但并不影响小鼠的生存与发育。用 mTOR 的抑制剂 Rap 处理造血干细胞诱导自噬后, 胎肝细胞诱导出的 CLEC-2 敲除巨核细胞虽然自噬增强, 但是巨核细胞的 CD41 表达以及 CD41 和 CD61 的共表达均被抑制。这表明 CLEC-2 可能调节自噬过程, 即 CLEC-2 的缺陷显著抑制自噬过程中巨核细胞 CD41 的水平。



A、B: Western blot 检测 Rap 对胎肝来源巨核细胞中 CyclinD1 蛋白表达的影响(A)和半定量分析结果(B);C、D: Western blot 检测 Rap 对胎肝来源巨核细胞中 CyclinD2 蛋白表达的影响(C)和半定量分析结果(D)。两组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图6 Rap 对小鼠胎肝来源巨核细胞中 Cyclin D1 和 Cyclin D2 表达的影响

Figure 6 Effects of rapamycin on the expression of Cyclin D1 and Cyclin D2 in mice fetal liver derived megakaryocytes

本研究发现在巨核细胞发育的早期阶段用Rap诱导自噬后,CLEC-2的缺陷显著降低多倍体巨核细胞的数目,说明在Rap引起高倍体成熟巨核细胞形成受阻过程中,巨核细胞CLEC-2发挥重要作用。本研究结果也发现,在胎肝造血干细胞阶段干扰自噬,细胞周期相关蛋白Cyclin D1和Cyclin D2的表达均下调,而CLEC-2的缺陷加剧了这种反应。另外,也有其他报道表明,在造血干祖细胞中,自噬能通过调节Cyclin D3调控细胞的G1/S期转化来维持正常的造血稳态^[15]。因此,巨核细胞CLEC-2调控自噬-细胞周期信号通路的关系仍需要进一步探究。

综上,在巨核细胞自噬过程中,血小板CLEC-2在Rap介导的自噬中具有重要调控作用,增强自噬蛋白的表达,抑制血小板CD41的表达,影响细胞周期关键蛋白的表达。因此,本研究应用CLEC-2基因敲除小鼠发现,CLEC-2可以通过其信号通路参与调节巨核细胞自噬过程,进而影响巨核细胞的成熟发育。因此,研究CLEC-2是否可以通过激活其信号通路参与调节巨核细胞自噬过程,有望成为探讨巨核细胞自噬机制的新的切入点,同时也为有效治疗伴随自噬水平紊乱的血小板相关疾病提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] HU Y X, HAN X S, JING Q. Autophagy in development and differentiation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 469-487
- [2] LIU S Y, ZHANG X M, SUN R J, et al. Abnormal expression of autophagy-related proteins in immune thrombocytopenia [J]. *Scand J Immunol*, 2021, 93(2): e12992
- [3] GILANCHI S, ZALI H, FARANOUSH M, et al. Identification of candidate biomarkers for idiopathic thrombocytopenic *Purpura* by bioinformatics analysis of microarray data [J]. *Iran J Pharm Res*, 2020, 19(4): 275-289
- [4] WANG X, FU Y F, LIU X, et al. ROS promote ox-LDL-induced platelet activation by up-regulating autophagy through the inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1779-1793
- [5] ZHENG Z, WANG L, CHENG S, et al. Autophagy and leukemia [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 601-613
- [6] YANG X, YE F, JING Y, et al. Autophagy and tumour stem cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 301-313
- [7] ZECCHINI S, GIOVARELLI M, PERROTTA C, et al. Autophagy controls neonatal myogenesis by regulating the GH-IGF₁ system through a NFE2L2- and DDIT3-mediated mechanism [J]. *Autophagy*, 2019, 15(1): 58-77
- [8] GE C, AN N, LI L, et al. Autophagy-deficient mice are more susceptible to engrafted leukemogenesis [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2019, 77: 129-136
- [9] MORTENSEN M, SOILLEUX E J, DJORDJEVIC G, et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 455-467
- [10] DAVIZON-CASTILLO P, MCMAHON B, AGUILA S, et al. TNF-alpha-driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging [J]. *Blood*, 2019, 134(9): 727-740
- [11] HARBI M H, SMITH C W, NICOLSON P L R, et al. Novel antiplatelet strategies targeting GPVI, CLEC-2 and tyrosine kinases [J]. *Platelets*, 2021, 32(1): 29-41
- [12] SCHWEIG J E, YAO H, COPPOLA K, et al. Spleen tyrosine kinase (SYK) blocks autophagic Tau degradation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(36): 13378-13395
- [13] MARTYANOV A A, BALABIN F A, DUNSTER J L, et al. Control of platelet CLEC-2-mediated activation by receptor clustering and tyrosine kinase signaling [J]. *Biophys J*, 2020, 118(11): 2641-2655
- [14] BASAK I, BHATLEKAR S, MANNE B K, et al. miR-15a-5p regulates expression of multiple proteins in the megakaryocyte GPVI signaling pathway [J]. *J Thromb Haemost*, 2019, 17(3): 511-524
- [15] CAO Y, CAI J, ZHANG S, et al. Loss of autophagy leads to failure in megakaryopoiesis, megakaryocyte differentiation, and thrombopoiesis in mice [J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(6): 488-494

[收稿日期] 2021-05-12

(本文编辑:陈汐敏)