

研究论文

棕色脂肪激活对机体正常和异常造血的影响

成天然^{1,2} 邵雅^{1,2} 刘欢^{1,2} 赵红菲^{1,2} 赵梓含^{1,2} 姜珊³ 张诗悦^{1,2}
孙露^{1,2} 王彤^{1,2} 许元富^{1,2} 曹义海^{4*}

(¹中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 北京协和医学院, 血液与健康全国重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020; ²天津医学健康研究院, 天津 300020; ³西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061; ⁴瑞典卡罗林斯卡学院微生物和肿瘤生物学系, 索尔纳 17165)

摘要 激活棕色脂肪组织(BAT)可以抑制实体肿瘤生长, 然而其对正常或异常造血细胞的影响仍然不清楚。因此, 该研究采用 β 3-肾上腺素受体激动剂米拉贝隆分别激活野生型和白血病小鼠BAT, 观察和分析其对正常造血细胞以及白血病细胞的影响。通过流式分析了不同时间点米拉贝隆治疗组和对照组小鼠骨髓、脾脏、肝脏和外周血中白血病细胞的比例, 以及骨髓中造血干/祖及成熟细胞的比例、数目、细胞周期、凋亡和集落形成能力; 验证了脂肪组织的激活程度; 通过手术移除BAT来检测米拉贝隆激活BAT在白血病中的作用。研究结果显示, 米拉贝隆治疗组显著激活了BAT, 减少了急性白血病小鼠的骨髓、脾脏、肝脏和外周血中白血病细胞的比例, 延长了小鼠生存期。米拉贝隆对正常C57小鼠的成熟免疫细胞和骨髓造血干/祖细胞的比例和数量没有明显影响, 但在白血病小鼠中治疗组骨髓中各类成熟免疫细胞的比例和绝对数均显著高于对照组, 造血干/祖细胞的比例和绝对数均显著增加, 细胞凋亡减少, 集落形成能力增强。手术切除BAT阻断了米拉贝隆介导的抗白血病作用。研究结果表明, 通过米拉贝隆预给药可以激活棕色脂肪组织, 抑制白血病细胞的增殖, 促进白血病小鼠正常造血干/祖细胞的增殖分化和存活, 延长小鼠生存期, 为今后白血病的临床治疗提供了一种新的策略。

关键词 造血干/祖细胞; 棕色脂肪组织; 米拉贝隆; 能量代谢; 白血病

The Effects of Brown Fat Activation on Normal and Abnormal Hematopoiesis

CHENG Tianran^{1,2}, SHAO Ya^{1,2}, LIU Huan^{1,2}, ZHAO Hongfei^{1,2}, ZHAO Zihan^{1,2}, JIANG Shan³,
ZHANG Shiyue^{1,2}, SUN Lu^{1,2}, WANG Tong^{1,2}, XU Yuanfu^{1,2}, CAO Yihai^{4*}

(¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ²Tianjin Institutes of Health Science, Tianjin 300020, China; ³Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ⁴Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Solna 17165, Sweden)

Abstract Activation of BAT (brown adipose tissue) can inhibit solid tumor growth, but its effect on normal or abnormal hematopoietic cells remains unclear. Therefore, in this study, the β 3-adrenergic receptor agonist mirabegron was used to activate BAT in wild-type and leukemia mice, and the effects on normal hematopoietic cells

收稿日期: 2024-03-21 接受日期: 2024-04-24

中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2021-12M-1-017)和国家自然科学基金(批准号: 81970107)资助的课题

*通信作者。Tel: 0468-52487596, E-mail: yihai.cao@ki.se

Received: March 21, 2024 Accepted: April 24, 2024

This work was supported by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2021-12M-1-017), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970107)

*Corresponding author. Tel: +468-52487596, E-mail: yihai.cao@ki.se

and leukemia cells were observed and analyzed. The proportion of leukemia cells in bone marrow, spleen, liver, and peripheral blood of mice treated with mirabegron and control mice was analyzed at various time points. The proportion, number, cell cycle, apoptosis and colony formation ability of HS/PCs (hematopoietic stem/progenitor cells) and mature hematopoietic cells in the bone marrow of leukemia mice were analyzed. The activation degree of adipose tissue was verified. The role of BAT activation by mirabegron in leukemia was examined by surgical removal of BAT. The results showed that mirabegron treatment significantly activated BAT, reduced the proportion of leukemia cells in the bone marrow, spleen, liver and peripheral blood of acute leukemia mice, and prolonged the survival time. Mirabegron treatment had no significant effect on the proportion and number of mature immune cells and HS/PCs in the bone marrow of normal C57 mice, but in the leukemia mice, the proportion and absolute number of various mature immune cells in the bone marrow of the treatment group were significantly higher than those of the control group, the proportion and absolute number of HS/PCs in the bone marrow of the treatment group were significantly increased, the apoptosis of the cells was decreased, and the ability of colony formation was enhanced. Surgical removal of BAT blocked mirabegron-mediated anti-leukemic effects. Overall, these findings demonstrate that pretreatment with mirabegron can activate brown adipose tissue, suppress the proliferation of leukemia cells, enhance the proliferation, differentiation, and survival of normal hematopoietic stem/progenitor cells in leukemia mice, and extend the lifespan of mice. This offers a novel approach for future clinical management of leukemia.

Keywords hematopoietic stem/progenitor cells; brown adipose tissue; mirabegron; energy metabolism; leukemia

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)具有自我更新的能力,并能够生成各种造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs),最终分化成为各谱系的成熟细胞^[1]。这种原始和成熟血细胞之间的平衡受到内外因素的共同调控。白血病是一种以染色体易位为主要特征的血液系统恶性肿瘤。在白血病细胞的浸润下,造血平衡遭到严重破坏,导致成熟有功能的血细胞减少,这成为白血病患者发病和死亡的重要原因^[2]。先前的研究表明,正常的HSCs和HPCs在白血病发展过程中逐渐受到抑制,其倾向于维持在静息状态,但仍保留造血潜能^[3-4]。

产热脂肪组织(thermogenic adipose tissues, TATs)包括棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)和棕色化的白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT),由在线粒体的内膜中表达的解偶联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP 1)介导^[5],通过非寒颤生热(non-shivering thermogenesis, NST)产生热量,参与能量耗散,可减轻肥胖和糖尿病动物的体重并改善代谢功能障碍^[6]。最近的研究显示,在实验小鼠中,激活棕色脂肪组织通过降低癌细胞中的糖酵解代谢水平,显著抑制了各种实体肿瘤的生长^[7],但其对血液肿瘤的影响仍不明确。米拉贝隆(mirabegron)是一种选择性的 β_3 -肾上腺素受体激动剂,最早获批用于临床治疗膀胱过度活动综合征^[8]。米拉贝隆通过 β_3 -肾上腺素受体介

导的交感神经激活激活成年人和啮齿动物的棕色脂肪组织以调节代谢^[9]。尽管我们在先前的研究中观察到米拉贝隆对白血病细胞的影响,但其对正常和异常造血细胞功能的具体影响尚不十分清楚。

基于上述研究背景,本研究旨在通过米拉贝隆激活棕色脂肪组织,明确机体能量代谢变化对生理和病理条件下造血细胞的影响,并为探索一条治疗白血病和其他血液系统疾病的新策略提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

所有动物实验均经中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所动物管理中心及伦理委员会的批准(CIFMS2021004-EC-2)。在伦理学许可下,以人道终点为标准对每只小鼠实施安乐死。所有实验均未超过身体状况评分BCS-1(body condition scoring-1)(濒死状态)。C57BL/6雄性小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,年龄在7到8周龄之间,在12 h的黑暗和12 h的光照循环下自由进食饮水。

1.2 药物治疗

所有动物在实验前随机分组。每只小鼠分别灌胃给予10 mg/kg的米拉贝隆(Cat.No.HY-14773, MedChemExpress)或PBS,一日一次,持续3周后取小鼠骨髓骨髓、脾脏、外周血和产热脂肪组织进行分

析。对于白血病模型在注射白血病细胞当天开始给药, 一日一次。

1.3 小鼠模型

白血模型: 每只小鼠尾静脉注射 1×10^6 个 MSCV-MLL-AF9-GFP⁺ 细胞建立急性髓系白血病小鼠模型。造模当天记为第0天, 分别在第7天、第14天、第21天, 取小鼠骨髓、肝脏、脾脏、外周血和产热脂肪组织进行分析。棕色脂肪组织去除术: 麻醉7周龄小鼠后, 通过钝性剥离术暴露肩胛间棕色脂肪组织, 并在不影响周围组织血供的情况下切除棕色脂肪组织。对照组手术仅暴露棕色脂肪组织, 不切除棕色脂肪组织。缝合伤口后, 动物休息1周至术后恢复, 再行白血病造模处理。

1.4 H&E染色和免疫荧光染色

小鼠发病后将股骨、脾脏、肝脏和脂肪组织用4%多聚甲醛室温固定过夜后进行石蜡包埋, 再将样品切为5 μ m厚的薄片, 60 $^{\circ}$ C烘烤1 h, 在二甲苯中室温固定(10 min $\times$ 2次), 在99%、95%、70%乙醇中依次浸泡5 min, 脱水, PBS洗两遍。H&E染色: 组织切片室温下用苏木精(Cat.No.MB9897, Meilunbio)染色3~5 min, 流水冲洗掉苏木素染液, 1%盐酸酒精分化3 s, 水洗, 置于自来水中浸泡返蓝5 min, 伊红(Ca.No.MA0164, Meilunbio)染色15 s, 蒸馏水清洗, 用95%和99%乙醇脱水, 然后用中性树脂封片。免疫荧光染色: 将组织切片封闭后用一抗于4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 一抗包括兔抗鼠UCP1抗体(Cat.No.ab10983, Abcam, 1:100)、兔抗鼠COX4抗体(Cat.No.PA5-29992, ThermoFisher Scientific, 1:100)和羊抗鼠Perilipin-1抗体(Cat.No.ab61682, Abcam, 1:100)。第2天PBS冲洗后, 用二抗染色45 min, 二抗包括驴抗兔Alexa Fluor 647 IgG(H+L)抗体(Cat.No.ab150169, ThermoFisher Scientific, 1:500)和驴抗羊PE IgG(H+L)抗体(Cat.No.31860, ThermoFisher Scientific, 1:500)。PBS冲洗后, 用DAPI(Ca.No.C0060, Solarbio, 1:500)孵育5 min。PBS冲洗后, 中性树脂封片。

1.5 流式细胞术

GFP⁺细胞比例检测: 取小鼠骨髓、肝脏、脾脏和外周血的单个核细胞各 1×10^6 个, 用200 μ L PBSE重悬细胞沉淀, 加DAPI标记死细胞, 流式细胞仪检测GFP⁺细胞比例。造血干/祖细胞检测: 取 5×10^7 个骨髓单个核细胞, 用100 μ L PBSE重悬, 加入流式抗体 Lin⁻(CD3e、CD4、CD8a、TER-119、Ly-6G/Ly-

6C、B220、CD11b)-APC eFluor 780、c-kit-BV421、Sca-1-PE/Cyanine7、CD34-APC、CD135-PE、CD16/32-PerCP和CD127-PerCP各1 μ L, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 用流式细胞仪进行分析。成熟免疫细胞的检测: 取 5×10^6 个骨髓单个核细胞, 用100 μ L PBSE重悬, 加入流式抗体CD11b-PE、Ly6G-PE/Cyanine7、Ly6C-FITC、CD3-APC和B220-APC/Cyanine7各1 μ L, 避光孵育30 min, 加DAPI标记死细胞, 用流式细胞仪进行分析(除Lin⁻抗体购于ThermoFisher Scientific外, 其余均购自BioLegend)。

1.6 集落形成实验

使用流式细胞分选仪分选 LSK(Lin⁻、c-Kit⁺、Sca-1⁻)细胞接种到含青霉素-链霉素的混合溶液(100 $\times$)的Methocult GF M3434培养基(stem cell technologies)的24孔板内(每孔 10^4 个LSK细胞)。于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恒温培养箱内培养3~10天后, 在显微镜下观察并计数克隆。

1.7 白血病细胞凋亡和细胞周期的检测

细胞凋亡: 分选 5×10^6 个小鼠的LSK细胞, 用500 μ L缓冲液重悬后孵育30 min, 加入5 μ L APC-Annexin V及5 μ L 7-AAD(Cat.No.KGA1025, Keygenbio), 室温避光孵育15 min后, 用流式细胞仪检测骨髓白血病细胞早期凋亡(Annexin V⁺ 7-AAD⁻)细胞和晚期凋亡(Annexin V⁺ 7-AAD⁺)细胞的比例。细胞周期: 分选 5×10^6 个小鼠的LSK(Lin⁻、c-Kit⁺、Sca-1⁻)细胞, 使用固定破膜缓冲液(Cat.No.00-5523-00, ThermoFisher Scientific)固定细胞后, 加入50 μ L RNase(Cat.No.R8020, Solarbio, 100 μ g/mL)和200 μ L PI工作液(Cat.No.C0080, Solarbio, 50 μ g/mL), 室温避光孵育30 min, 用流式细胞仪检测。

1.8 RNA提取和实时荧光定量PCR

使用TRIzol(Cat.No.15596026CN, ThermoFisher Scientific)从白血病小鼠的LSK细胞和脂肪组织中分离总RNA。采用iScript cDNA合成试剂盒(Cat.No.1708891, Bio-Rad)逆转录合成cDNA, 采用SYBR Green定量RT-PCR试剂盒(Cat.No.1708880, Bio-Rad)进行RT-PCR。我们实验中使用的不同基因的特异性引物对见表1。

1.9 Western blot检测

取小鼠50 mg脂肪组织, 加入100 μ L含1%磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解和提取缓冲液(Cat.No.89900, ThermoFisher Scientific)碾

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列 Sequence
<i>Ucp1</i>	Forward: 5'-AGG CTT CCA GTA CCA TTA GGT-3' Reverse: 5'-CTG AGT GAG GCA AAG CTG ATT T-3'
<i>Cidea</i>	Forward: 5'-TGA CAT TCA TGG GAT TGC AGA C-3' Reverse: 5'-GGC CAG TTG TGA TGA CTA AGA C-3'
<i>Pgc1-α</i>	Forward: 5'-TAT GGA GTG ACA TAG AGT GTG CT-3' Reverse: 5'-CCA CTT CAA TCC ACC CAG AAA G-3'
<i>Prdm16</i>	Forward: 5'-CCA AGG CAA GGG CGA AGA A-3' Reverse: 5'-AGT CTG GTG GGA TTG GAA TGT-3'
<i>Glut1</i>	Forward: 5'-ACC AAA AGC AAC GGA GAA GAG-3' Reverse: 5'-GGC ATT CCG AAA CAG GTA ACT C-3'
<i>Glut4</i>	Forward: 5'-GTG ACT GGA ACA CTG GTC CTA-3' Reverse: 5'-CCA GCC ACG TTG CAT TGT AG-3'
<i>Bpgm</i>	Forward: 5'-GGA CCA GAA ACT TAA CAA CGA CG-3' Reverse: 5'-CAG GCT GTG TGA ATG GAC CT-3'
<i>Pgam2</i>	Forward: 5'- TGG AAC CAA GAG AAC CGT TTC-3' Reverse: 5'-TGG CAT CTT TGA TAG CGG TGG-3'
<i>Gck1</i>	Forward: 5'-TGA GCC GGA TGC AGA AGG A-3' Reverse: 5'-GCA ACA TCT TTA CAC TGG CCT-3'
<i>Pgam1</i>	Forward: 5'-AGC GAC ACT ATG GCG GTC T-3' Reverse: 5'-TGG GAC ATC ATA AGA TCG TCT CC-3'
<i>Pfklp</i>	Forward: 5'-GAA ACA TGA GGC GTT CTG TGT-3' Reverse: 5'-CCC GGC ACA TTG TTG GAG A-3'
<i>Pkm</i>	Forward: 5'-GCC GCC TGG ACA TTG ACT C-3' Reverse: 5'-CCA TGA GAG AAA TTC AGC CGA G-3'
<i>Pfkm</i>	Forward: 5'-TGT GGT CCG AGT TGG TAT CTT-3' Reverse: 5'-GCA CTT CCA ATC ACT GTG CC-3'
<i>Pfkl</i>	Forward: 5'-GGA GGC GAG AAC ATC AAG CC-3' Reverse: 5'-CGG CCT TCC CTC GTA GTG A-3'
<i>Hk1</i>	Forward: 5'-CGG AAT GGG GAG CCT TTG G-3' Reverse: 5'-GCC TTC CTT ATC CGT TTC AAT GG-3'
<i>Hk2</i>	Forward: 5'-TGA TCG CCT GCT TAT TCA CGG-3' Reverse: 5'-AAC CGC CTA GAA ATC TCC AGA-3'
<i>Hk3</i>	Forward: 5'-CAG GGG ACC TAC AGG ATT GAT-3' Reverse: 5'-GAG CAT CTT CGT CAT AGA AGG AG-3'

碎匀浆后, 再加入 150 μL 裂解液冰上裂解 20 min, 4 °C 以 12 000 r/min 离心 5 min 取上清加入相应体积的 SDS 上样缓冲液, 置于 95 °C 金属浴煮沸 10 min 至蛋白变性, -20 °C 冻存或直接上样。以 80 V 恒压电泳, 350 mA 恒流转膜 2 h、5% 牛奶室温封闭 2 h, PBS 清洗后加入一抗兔抗鼠 UCP1 抗体 (Cat.No.ab10983, Abcam, 1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 第 2 天 PBS 清洗后加入羊抗兔二抗 (Cat.No.31460, ThermoFisher Scientific, 1:5 000) 4 °C 孵育 1.5 h, 加入化学发光剂 (Cat.No.WBULS0500, Millipore), 使用 Bio-Rad Chemi Doc 化学发光成像系统曝光采集图像。

1.10 统计分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。两组间的统计学差异采用未配对 Student *t* 检验。多组间比较采用单因素方差分析。**P*<0.05 为差异有统计学意义, ***P*<0.01 为差异非常显著, ****P*<0.001 为差异极显著。

2 结果

2.1 米拉贝隆抑制白血病的发生发展并延长小鼠生存期

MLL-AF9 是急性髓系白血病中 *M4*、*M5* 常见

的融合基因, MLL-AF9转染的细胞可诱导小鼠发生急性髓系白血病^[10]。在本研究中, 我们选用了MLL-AF9急性髓系白血病小鼠模型, 旨在探讨米拉贝隆在病理环境下对C57小鼠造血系统的影响。为了研究米拉贝隆对白血病宿主体内白血病发生、发展和生存的影响, 我们建立了MLL-AF9-GFP⁺白血病小鼠模型(图1A)。将携带白血病的C57BL/6小鼠随机分为两组, 从接种白血病细胞当天开始分别使用米拉贝隆和PBS进行治疗, 观察其发病情况, 并详细记录小鼠的生存期。结果显示, 米拉贝隆治疗能显著延长白血病小鼠的生存期(图1B), 显著减轻白血病小鼠的肝脾肿大(图1C)。流式细胞术结果分析显示, 米拉贝隆治疗能抑制白血病细胞的浸润, 显著减少各时间节点白血病小鼠骨髓、肝脏、脾脏和外周血中的GFP⁺白血病细胞的比例和数量(图1D), 第14天时差异最为显著。取造模第14天小鼠骨髓、脾脏和肝脏进行H&E染色, 结果显示, 米拉贝隆能显著改善骨髓、脾脏和肝脏中白血病细胞的浸润, 并减轻器官结构的损伤(图1E)。总之, 这些结果表明, 米拉贝隆治疗可显著抑制白血

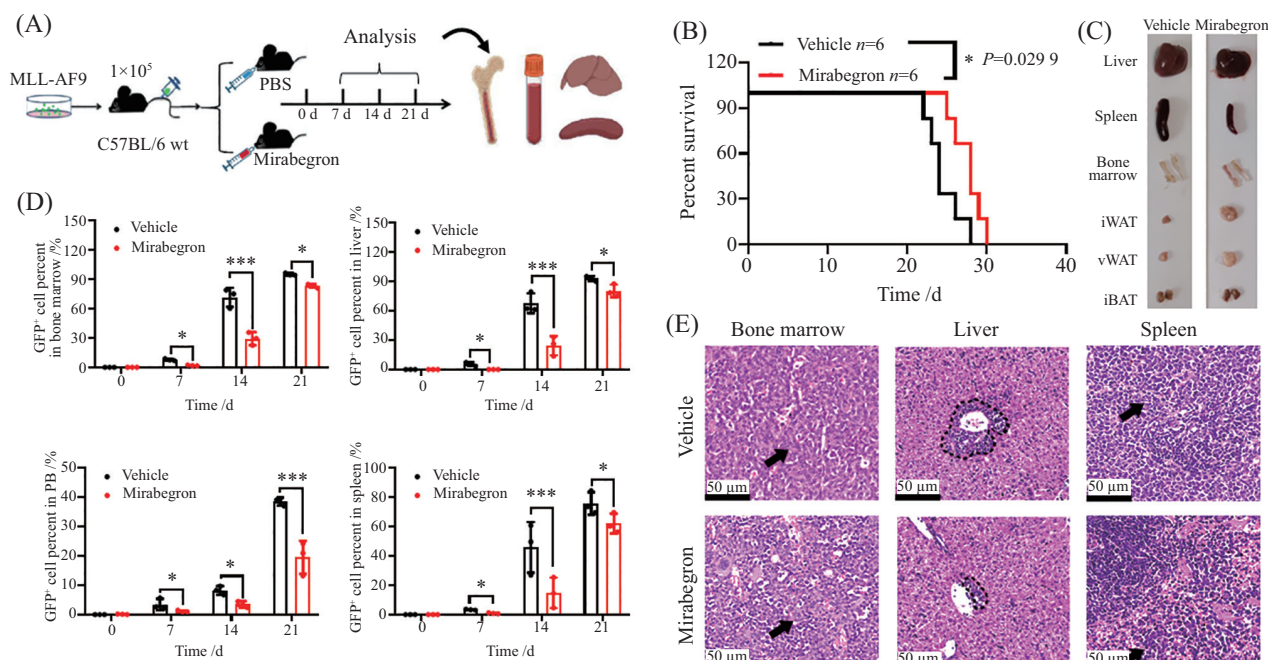
病的进展, 并提高白血病小鼠的生存率。

2.2 米拉贝隆对生理和白血病状态下成熟免疫细胞的影响

米拉贝隆治疗能够提高白血病小鼠的生存率, 但至今不清楚免疫细胞在其中所起的作用, 因此我们又开展了米拉贝隆治疗对小鼠骨髓成熟免疫细胞作用的研究。实验中通过流式细胞术分析发现米拉贝隆对正常C57小鼠骨髓、脾脏和外周血中各类成熟免疫细胞数量及比例均无明显影响(图2A和图2B)。而在白血病条件下, 米拉贝隆治疗组小鼠骨髓中粒细胞、单核细胞和B细胞的比例和绝对数均显著增高, T细胞的比例下降, 但绝对数增加。脾脏中T细胞比例增加, 但外周血中T细胞比例降低(图2C和图2D)。以上结果说明, 米拉贝隆治疗导致白血病小鼠骨髓成熟免疫细胞的绝对数显著增加。

2.3 米拉贝隆对生理和白血病状态下小鼠骨髓造血干/祖细胞的影响

为了研究米拉贝隆治疗对小鼠骨髓造血干/祖细胞的影响, 我们通过流式细胞术分析其数量及比

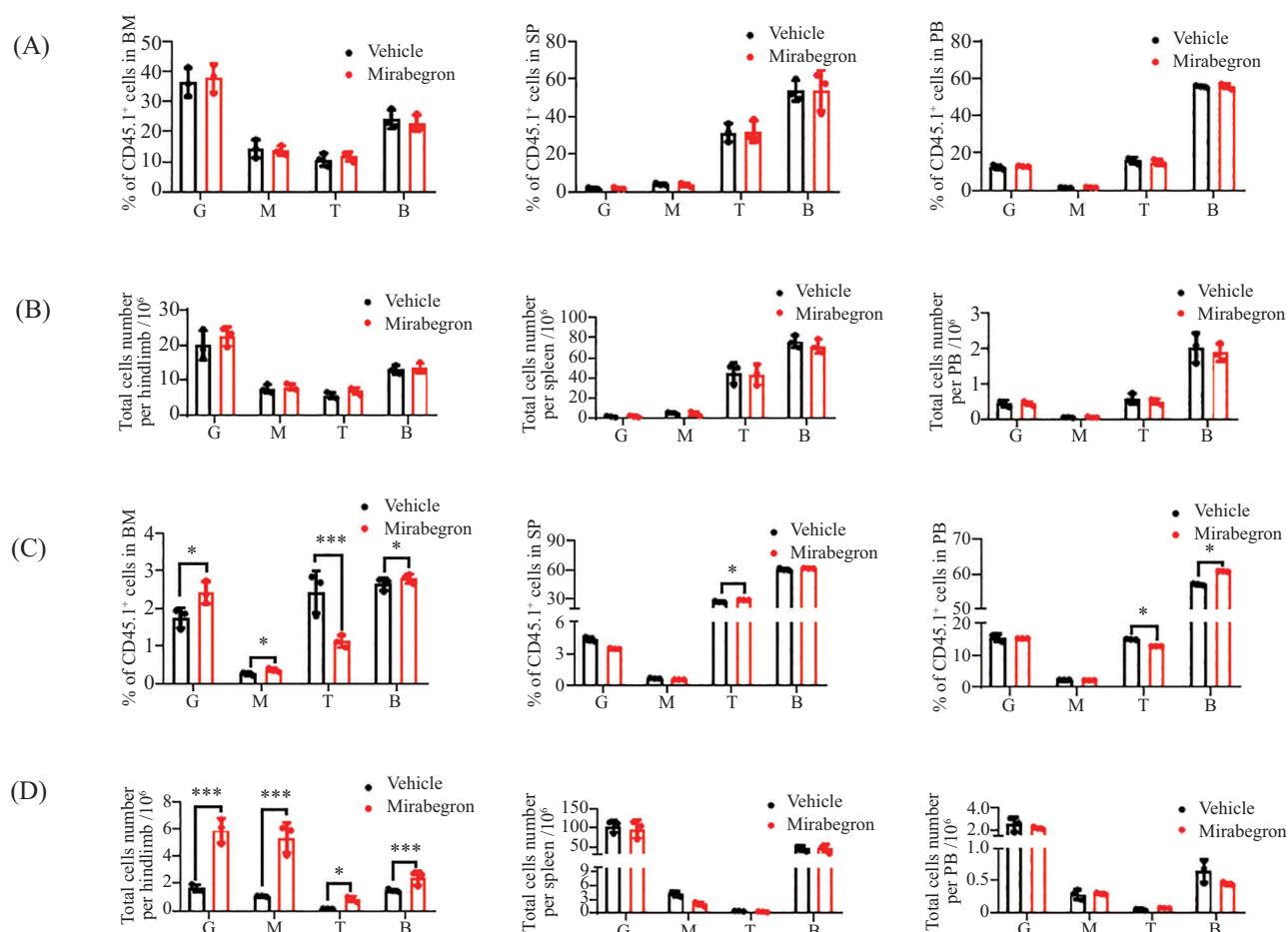


A: 米拉贝隆预防白血病的实验设计示意图。B: 白血病小鼠生存期。C: 对照组和治疗组白血病小鼠的肝脏、脾脏、股骨、颈骨、iWAT、vWAT和iBAT。D: 造模第0、7、14、21天白血病小鼠骨髓、肝脏、脾脏和外周血中GFP⁺细胞的比例。E: 造模第14天白血病小鼠骨髓、肝脏和脾脏的H&E染色。箭头指示白血病细胞区域。* $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

A: schematic diagram of experimental design for testing leukemia preventive effects of mirabegron. B: survival of leukemic mice. C: liver, spleen, femur, neck bone, iWAT, vWAT and iBAT of control and treated leukemic mice. D: proportion of GFP⁺ cells in bone marrow, liver, spleen, and peripheral blood of leukemia mice on days 0, 7, 14, and 21 of modeling. E: H&E staining of bone marrow, liver, and spleen of leukemia mice on day 14 of modeling. Arrows indicate areas of leukemia cells. * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图1 米拉贝隆抑制白血病的发生发展并延长小鼠生存期

Fig.1 Mirabegron inhibits the development and progression of leukemia and prolongs the survival of mice



A: 流式细胞术检测正常C57小鼠骨髓、脾脏和外周血中粒细胞(G)、单核细胞(M)、T细胞(T)及B细胞(B)的百分比。B: 正常C57小鼠骨髓、脾脏和外周血中粒细胞、单核细胞、T细胞及B细胞的绝对数。C: 白血病小鼠骨髓、脾脏和外周血中粒细胞、单核细胞、T细胞及B细胞的百分比。D: 白血病小鼠骨髓、脾脏和外周血中粒细胞、单核细胞、T细胞及B细胞的绝对数。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: the percentages of granulocytes (G), monocytes (M), T cells (T), and B cells (B) in bone marrow, spleen, and peripheral blood of normal C57 mice were determined by flow cytometry. B: absolute numbers of granulocytes, monocytes, T cells and B cells in bone marrow, spleen and peripheral blood of normal C57 mice. C: percentages of granulocytes, monocytes, T cells, and B cells in bone marrow, spleen, and peripheral blood of leukemic mice. D: absolute numbers of granulocytes, monocytes, T cells and B cells in bone marrow, spleen and peripheral blood of leukemic mice. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图2 米拉贝隆对生理和白血病状态下成熟免疫细胞的影响

Fig.2 Effect of mirabegron on mature immune cells in physiological and leukemic states

例。研究结果显示: 米拉贝隆治疗对正常C57小鼠骨髓造血干/祖细胞无显著影响(图3A)。而在白血病模型中, 米拉贝隆治疗组小鼠骨髓中LT-HSC(long time-HSC: Flk2⁻ CD34⁻ LSK)细胞、ST-HSC(short time-HSC: Flk2⁻ CD34⁺ LSK)细胞、MPP(multi-potent progenitor: Flk2⁺ CD34⁺ LSK)细胞、CMP(the common myeloid progenitor: CD34⁺ CD16/32⁻ LK)细胞、GMP(granulocyte/macrophage progenitors: CD34⁺ CD16/32⁺ LK)细胞、MEP(megakaryocyte/erythrocyte progenitors: CD34⁻ CD16/32⁻ LK)细胞和CLP(the common lymphoid progenitor: Flk2⁺ CD127⁺)细胞的比例和数量均显著增加(图3B)。为了阐明米拉贝隆

治疗促进白血病小鼠骨髓造血干/祖细胞数量和比例增加的原因, 我们通过流式细胞术分析了骨髓造血干/祖细胞周期和细胞凋亡情况。在骨髓中, 米拉贝隆治疗组的LSK在G₁/G₀期和G₂/M期中分布无显著性差异, 仅在S期中差异有统计学意义。米拉贝隆治疗组和对照组的LK在G₁/G₀期、S期和G₂/M期均无显著性差异(图3C)。而流式细胞术分析结果表明, 米拉贝隆治疗组小鼠骨髓造血祖细胞晚期凋亡比例显著减少(图3D)。集落形成细胞(colony-forming cell, CFC)结果显示米拉贝隆治疗组LSK培养形成的细胞形成集落的数量和大小都显著高于对照组(图3E)。以上结果说明米拉贝隆治疗促进白血病小鼠

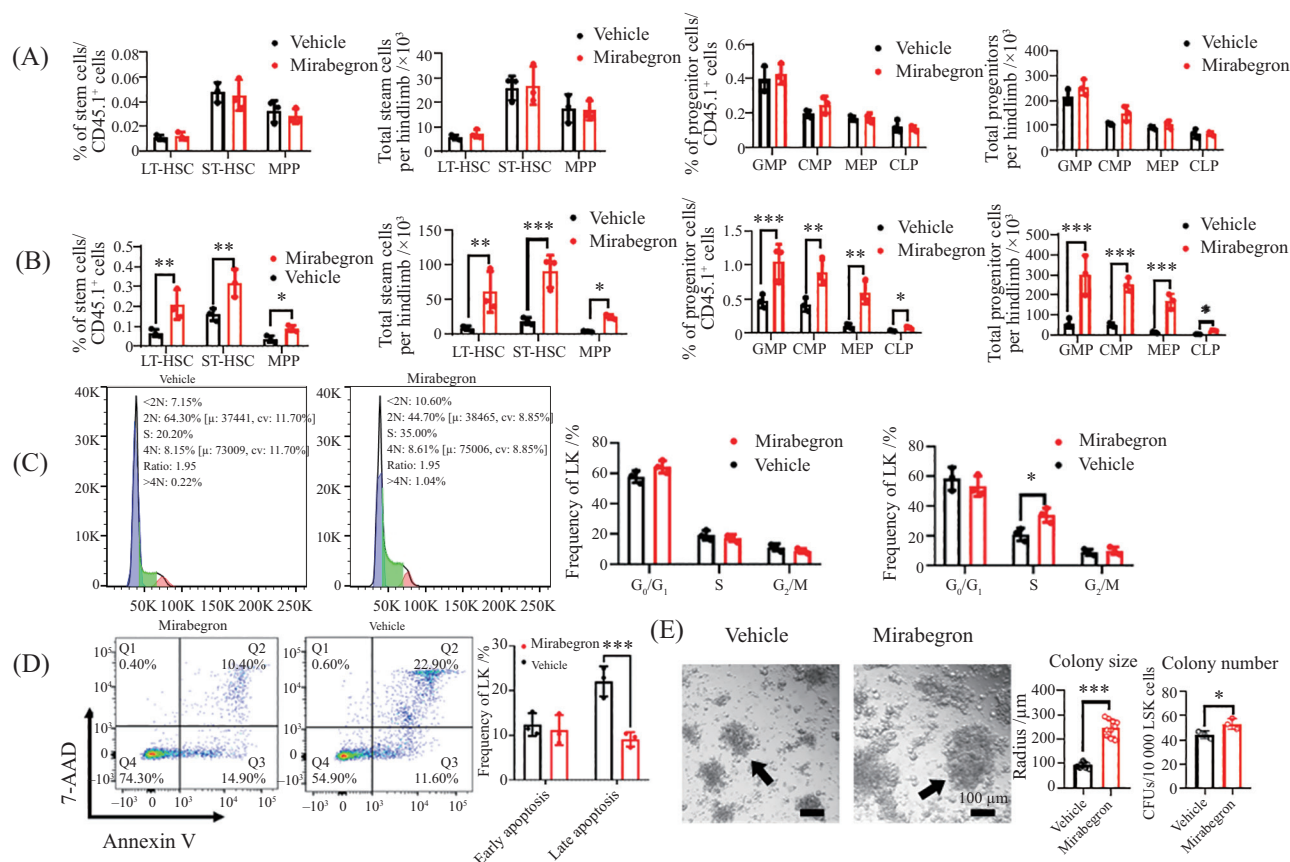


图3 米拉贝隆对生理和白血病状态下小鼠骨髓造血干/祖细胞的影响
Fig.3 Effect of mirabegron on murine bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in physiological and leukemic states

A: the percentages and absolute numbers of LT-HSC, ST-HSC, MPP, GMP, CMP, MEP, and CLP in the bone marrow of normal C57 mice were determined by flow cytometry. B: percentage and absolute numbers of LT-HSC, ST-HSC, MPP, GMP, CMP, MEP, and CLP in bone marrow of leukemic mice. C: cell cycle of LK and LSK cells in bone marrow of leukemic mice. D: apoptosis of LK cells in the bone marrow of leukemic mice. E: ten thousand LSK cells from leukemic mice were cultured in M3434 medium for seven days, and clone size and number were counted. Arrows indicate single-cell clones. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图3 米拉贝隆对生理和白血病状态下小鼠骨髓造血干/祖细胞的影响

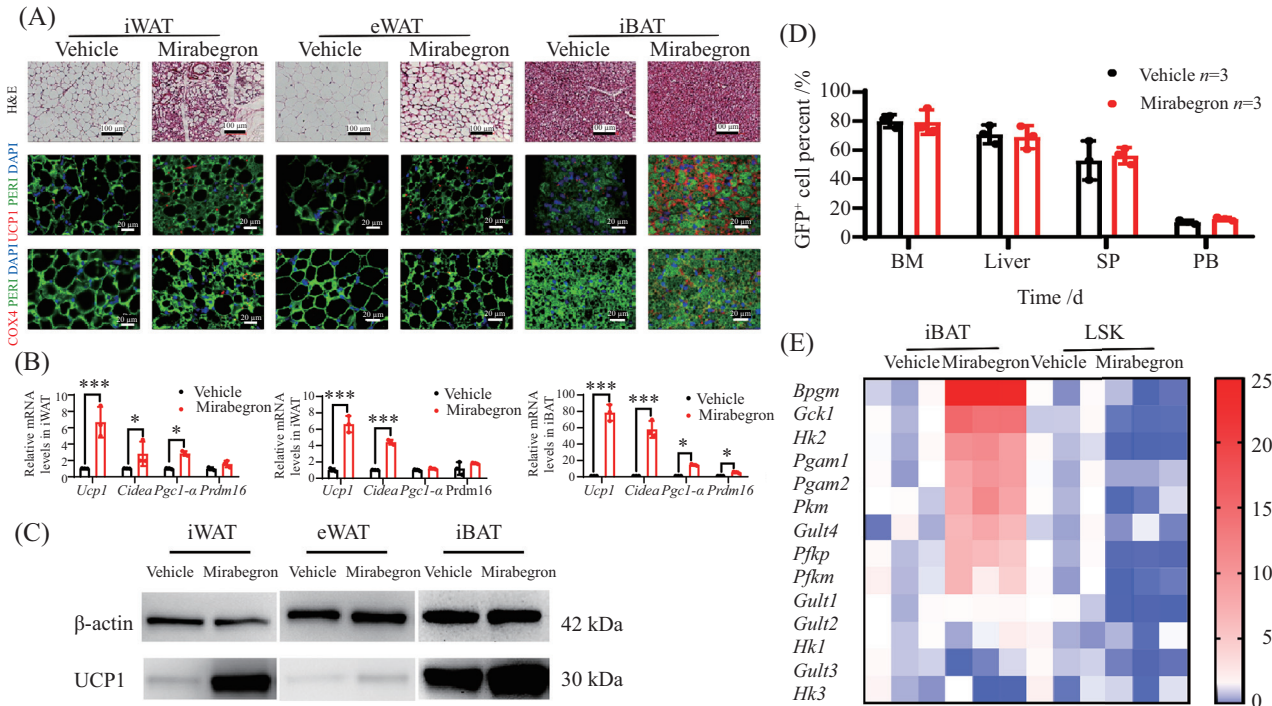
Fig.3 Effect of mirabegron on murine bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in physiological and leukemic states

骨髓造血干细胞的增殖, 抑制造血祖细胞的凋亡, 导致白血病小鼠骨髓造血干/祖细胞的比例及数量显著增加, 并增强LSK细胞的集落形成能力。

2.4 米拉贝隆通过改变全身代谢抑制白血病

我们已经证明米拉贝隆可以抑制白血病的发生发展, 但其作用的分子机制仍不清楚, 因此我们在米拉贝隆治疗的第14天取白血病小鼠的肩胛间棕色脂肪组织(intrascapular BAT, iBAT)、腹股沟白色脂肪组织(inguinal WAT, iWAT)和附睾白色脂肪组织(epididymal WAT, eWAT)进行分析。H&E染色和免疫荧光染色结果显示米拉贝隆治疗组中iBAT呈现高度致密的结构, 表现为较小的多房结构, 为iBAT激活的典型形态学表型(图4A)。与表型变化一致, UCP1在

米拉贝隆治疗组中的表达水平相应地增加。在米拉贝隆治疗条件下, iBAT中细胞色素c氧化酶亚基4(cytochrome c oxidase subunit 4, COX4)阳性的线粒体含量也显著增加(图4A), 和正常C57小鼠中观察到的结果一致。为了进一步明确产热脂肪组织在白血病小鼠中的激活情况, 提取各产热脂肪组织的总RNA和总蛋白, 通过RT-PCR分析各产热脂肪组织中棕色化基因的表达水平以及Western blot分析UCP1蛋白水平的表达。结果显示, 米拉贝隆治疗组中各产热脂肪组织的棕色化基因如*Ucp1*、*Cidea*、*Pgcl-α*、*Prdm16*等表达水平均显著升高(图4B), UCP1蛋白的含量也显著升高(图4C)。以上结果表明, 米拉贝隆在生理病理条件下均能显著激活产热脂肪组织。



A: 对照组和治疗组白血病小鼠iWAT、eWAT和iBAT的H&E和免疫荧光染色。B: 对照组和治疗组白血病小鼠iWAT、eWAT和iBAT中棕色化相关基因的表达。C: 对照组和治疗组白血病小鼠iWAT、eWAT和iBAT中UCP1蛋白的表达。D: 去BAT后对照组和治疗组白血病小鼠骨髓、肝脏、脾脏和外周血中GFP⁺细胞的比例。E: 对照组和治疗组白血病小鼠iBAT和LSK细胞糖酵解相关基因的表达热图。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: H&E and immunofluorescence staining of iWAT, eWAT, and iBAT of leukemic mice in control and treatment groups. B: expression of genes related to browning in iWAT, eWAT, and iBAT of leukemia mice in control and treatment groups. C: UCP1 protein expression in iWAT, eWAT, and iBAT of leukemia mice in control and treatment groups. D: proportion of GFP⁺ cells in bone marrow, liver, spleen, and peripheral blood of leukemia mice in control and treatment groups after BAT removal. E: heat maps of expression of glycolysis-related genes in iBAT and LSK cells of leukemic mice in control and treatment groups. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图4 米拉贝隆通过改变全身代谢抑制白血病

Fig.4 Mirabegron inhibits leukemia by altering systemic metabolism

为了进一步明确米拉贝隆抑制白血病发生发展的分子作用机制,我们在MLL-AF9-GFP⁺细胞植入前1周对野生型C57小鼠进行了棕色脂肪组织去除术。我们发现,同样是白血病造模第14天,去BAT后,米拉贝隆对骨髓、外周血和髓外部位的白血病的抑制几乎被完全解除(图4D),与该结果一致的是,米拉贝隆治疗不影响移除BAT后的白血病小鼠的生存期。同时,米拉贝隆治疗组中BAT的糖代谢相关基因表达水平上升,而白血病小鼠骨髓中造血干/祖细胞的糖代谢相关基因表达水平下降(图4E)。

3 讨论

在生理状态下,骨髓中大多数的造血干/祖细胞处于静息期,只有少数通过增殖和分化生成各种类型的成熟血细胞,以维持和形成各类血细胞占比相对稳定的造血平衡^[11-12]。骨髓中的造血细胞,如粒细胞、单核细胞、T细胞和B细胞等,是机体免疫系统

的重要组成部分^[13]。白血病作为一种血液系统的恶性肿瘤,其发病机制复杂,现有的治疗方案效果有限,因此对白血病治疗的创新性研究成为当下的迫切需求。而代谢治疗为其提供了新的方向。最近的研究提出了通过冷暴露激活棕色脂肪组织以改变全身代谢的创新性观点^[14]。越来越多的证据表明,葡萄糖代谢在这一过程中发挥着关键的作用,有助于棕色脂肪组织产生热量^[15-16]。与此同时,Glut1、Glut4以及己糖激酶等因子的缺失则被发现显著影响代谢过程^[17]。已有研究证明可以通过激活产热脂肪组织改善全身糖代谢,从而抑制实体肿瘤的发生和发展^[7]。米拉贝隆是一种已批准用于临床治疗膀胱过度活动综合征的药物,具有无明显毒性和副作用小的特点,以更为温和的方式改善全身糖代谢^[18-19]。这为探索白血病治疗的新途径提供了有希望的方向。

在本研究中,我们探讨了米拉贝隆对C57小鼠生理及病理状态下造血系统的影响。β3-肾上腺素

受体激动剂米拉贝隆模拟冷诱导的交感神经激活, 导致小鼠脂肪细胞体积减小, 呈现出致密的多房结构。UCP1和COX4的表达上调, 产热基因和棕色化相关转录因子的表达水平增加, 表明长达三周的米拉贝隆治疗在生理和病理情况下均能显著激活棕色脂肪组织, 并促进白色脂肪组织的棕色化。我们的数据显示, 米拉贝隆通过激活脂肪组织改善全身糖代谢, 对生理状态下的造血系统无明显影响。然而, 在白血病所致的病理环境下, 米拉贝隆预给药可降低骨髓、脾脏、肝脏和外周血中白血病细胞的比例, 抑制白血病细胞的髓外浸润, 改善肝脾肿大, 显著延长白血病小鼠的生存期。去除棕色脂肪组织后, 米拉贝隆的治疗效果消失, 说明其通过激活棕色脂肪组织抑制白血病的发生和发展。

众所周知白血病会抑制骨髓的正常造血, 但造血干/祖细胞仍具有正常的分化潜能^[20-21]。我们在研究中发现米拉贝隆治疗后白血病细胞的增殖受到抑制, 促进了正常造血干/祖细胞的增殖和分化, 并且还减少了正常造血祖细胞的凋亡。这表明在病理条件下, 米拉贝隆可以促进正常造血干/祖细胞的增殖分化和存活, 显著延缓了急性髓性白血病的发生和发展, 有效延长了小鼠的生存期, 为白血病的治疗争取了更多的时间窗口。

在研究中, 为确保米拉贝隆充分激活棕色脂肪组织, 我们采用了预给药的形式。研究明确了米拉贝隆可以有效抑制白血病的发生和发展。然而, 在面对已发病的白血病患者时, 米拉贝隆的治疗作用仍需进一步研究。针对中晚期白血病患者, 在强有力的诱导治疗后的维持治疗期间, 联合使用米拉贝隆可能会取得更好的治疗效果。我们将在未来的研究中继续深入探讨米拉贝隆联合传统化疗对白血病的治疗效果, 以及其在更多血液系统疾病中的潜在应用前景。

综上所述, 我们的研究结果表明, 米拉贝隆可以在生理和病理情况下激活棕色脂肪组织, 抑制白血病细胞的增殖, 促进白血病小鼠的正常造血干/祖细胞的增殖分化和存活, 延长小鼠生存期。该研究为今后有效治疗急性髓性白血病和其他类型的血液系统疾病提供了一个新的治疗概念。

参考文献 (References)

[1] PINHO S, FRENETTE P S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(5): 303-20.

[2] DINARDO C D, ERBA H P, FREEMAN S D, et al. Acute myeloid leukaemia [J]. *The Lancet*, 2023, 401(10393): 2073-86.

[3] SVENDSEN A F, YANG D, KIM K, et al. A comprehensive transcriptome signature of murine hematopoietic stem cell aging [J]. *Blood*, 2021, 138 (6): 439-51.

[4] HU M, ZENG H, CHEN S, et al. SRC-3 is involved in maintaining hematopoietic stem cell quiescence by regulation of mitochondrial metabolism in mice [J]. *Blood*, 2018, 132(9): 911-23.

[5] JOHNSON J M, PETERLIN A D, BALDERAS E, et al. Mitochondrial phosphatidylethanolamine modulates UCP1 to promote brown adipose thermogenesis [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(8): eade7864.

[6] LIU J, WANG Y, LIN L. Small molecules for fat combustion: targeting obesity [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(2): 220-36.

[7] SEKI T, YANG Y, SUN X, et al. Brown-fat-mediated tumour suppression by cold-altered global metabolism [J]. *Nature*, 2022, 608(7922): 421-8.

[8] CERO C, LEA H J, ZHU K Y, et al. β 3-adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(11): e139160.

[9] SUI W, LI H, YANG Y, et al. Bladder drug mirabegron exacerbates atherosclerosis through activation of brown fat-mediated lipolysis [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2019, 116(22): 10937-42.

[10] CORRAL J, LAVENIR I, IMPEY H, et al. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes [J]. *Cell*, 1996, 85(6): 853-61.

[11] HUANG D, CHEN C, XIE L, et al. Hematopoietic stem cell metabolism and stemness [J]. *Blood Sci*, 2019, 1(1): 12-8.

[12] YANG Y, KUEH A J, GRANT Z L, et al. The histone lysine acetyltransferase HBO1 (KAT7) regulates hematopoietic stem cell quiescence and self-renewal [J]. *Blood*, 2022, 139(6): 845-58.

[13] ZHANG Y, XIE X, HUANG Y, et al. Temporal molecular program of human hematopoietic stem and progenitor cells after birth [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(24): 2745-60.

[14] GIROTRA M, CHIANG Y H, CHARMOY M, et al. Induction of mitochondrial recycling reverts age-associated decline of the hematopoietic and immune systems [J]. *Nat Aging*, 2023, 3(9): 1057-66.

[15] BORNSTEIN M R, NEINAST M D, ZENG X, et al. Comprehensive quantification of metabolic flux during acute cold stress in mice [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(11): 2077-92.

[16] MENG J J, SHEN J W, LI G, et al. Light modulates glucose metabolism by a retina hypothalamus brown adipose tissue axis [J]. *Cell*, 2023, 186(2): 398-412.

[17] HANKIR M K, KLINGENSPOR M. Brown adipocyte glucose metabolism: a heated subject [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(9): e46404.

[18] BEL J S, TAI T C, KHAPER N, et al. Mirabegron: the most promising adipose tissue beiging agent [J]. *Physiol Rep*, 2021, 9(5): e14779.

[19] DEEKS E D. Mirabegron: a review in overactive bladder syndrome [J]. *Drugs*, 2018, 78(8): 833-44.

[20] CALVANESE V, NGUYEN A T, BOLAN T J, et al. MLLT3 governs human haematopoietic stem-cell self-renewal and engraftment [J]. *Nature*, 2019, 576(7786): 281-6.

[21] YAMASHITA M, DELLORUSSO P V, OLSON O C, et al. Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(7): 365-82.