·论　　著·

GSTM5 在骨髓增生异常综合征细胞中的表达及意义*

常　青，董腾腾，虞亚菲，张兆怡，王　驰，李绵洋△
中国人民解放军总医院第一医学中心检验科，北京 100853

摘　要：目的　探讨谷胱甘肽 S-转移酶 Mu 5(GSTM5)基因在骨髓增生异常综合征(MDS)细胞 SKM-1 中的表达及意义。**方法**　采用去甲基化药物地西他滨(DAC)、GSTM5 过表达质粒(SKM-1ovGSTM5)和谷胱甘肽抑制剂丁硫氨酸亚砜亚胺(BSO)分别处理 SKM-1 细胞。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 GSTM5 mRNA 表达水平，Western blotting 检测 GSTM5 蛋白表达水平，CCK-8 试验检测 SKM-1 细胞的增殖能力，流式细胞术检测 SKM-1 细胞凋亡率和细胞周期分布，另采用谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒测定 GSH 水平。**结果**　与对照相比，过表达 GSTM5 质粒后 SKM-1 细胞增殖能力降低($P<0.05$)，而细胞凋亡率和细胞周期分布情况差异无统计学意义($P>0.05$)。DAC 处理及过表达 GSTM5 的 SKM-1 细胞 GSH 水平均显著降低($P<0.05$)。与对照相比，BSO 处理 SKM-1 细胞后，细胞增殖能力显著降低($P<0.05$)。**结论**　GSTM5 可通过调控 GSH 水平抑制 SKM-1 细胞的增殖，并具有作为 MDS 诊断标志物的潜力。

关键词：骨髓增生异常综合征；　谷胱甘肽 S-转移酶 Mu 5；　甲基化；　谷胱甘肽
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2023.09.003　　**中图法分类号：**R733.3；R551.3
文章编号：1673-4130(2023)09-1035-04　　**文献标志码：**A

Expression and significance of GSTM5 in myelodysplastic syndrome cells*

CHANG Qing, DONG Tengteng, YU Yafei, ZHANG Zhaoyi, WANG Chi, LI Mianyang△
Department of Clinical Laboratory, the First Medical Center of the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, *China*

Abstract: Objective　To explore the expression and clinical significance of glutathione S-transferase Mu 5 (GSTM5) gene in myelodysplastic syndromes (MDS) cells (SKM-1 cells). **Methods**　SKM-1 cells were treated with demethylated drugs decitatine (DAC), GSTM5 overexpressed plasmids (SKM-1ovGSTM5) and glutathione inhibitor buthionine sulfoximine (BSO) respectively. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression level of GSTM5, Western blotting was used to detect the protein expression level of GSTM5, CCK-8 assay was used to detect the proliferation ability of SKM-1 cells, and flow cytometry was used to detect the apoptosis rate and cell cycle distribution of SKM-1 cells. In addition, glutathione (GSH) assay kit was used to detect the GSH level. **Results**　Compared with blank control, the proliferation ability of SKM-1 cells was decreased after overexpression of GSTM5 plasmid ($P<0.05$), but there was no statistical significance in cell apoptosis rate and cell cycle distribution ($P>0.05$). The GSH level of SKM-1 cells treated with DAC and overexpressed with GSTM5 significantly decreased ($P<0.05$). The proliferation ability of SKM-1 cells significantly decreased after BSO treatment ($P<0.05$). **Conclusion**　GSTM5 could inhibit the proliferation of SKM-1 cells by regulating GSH level, which has the potential as a diagnostic marker of MDS.

Key words: myelodysplastic syndromes;　glutathione S-transferase Mu 5;　methylation;　glutathione

骨髓增生异常综合征(MDS)是一组异质克隆造血干细胞疾病，主要表现为造血细胞发育不良、不同程度的造血功能低下、外周血细胞减少，并伴有进展为急性髓系白血病(AML)的风险[1-5]。DNA 甲基化在细胞的分化、增殖、凋亡等方面起着不同的作用，启动子区域的高甲基化水平会导致基因的表达沉默，进而基因功能受到抑制。在临床治疗中，高危患者更多地选用表观遗传学疗法，比如去甲基化药物[6-7]。本研究中所使用的地西他滨(DAC)即为去甲基化药物，在过去几年中被广泛用作老年高危 MDS 患者的一线治疗方案[8]。谷胱甘肽 S-转移酶 Mu 5(GSTM5)主要通过与谷胱甘肽(GSH)特异性结合，降低机体氧化应激损伤及致癌因素的易感性，从而在一定程度下保护机体。相关研究显示，GSTM5 基因的多态性与患

*　**基金项目：**国家自然科学基金面上项目(61971443)。
作者简介：常青，女，硕士研究生在读，主要从事血液病的实验室诊断研究。　△　**通信作者**，E-mail：limianyang301@126.com。

者的预后存在相关性[9]。本课题组前期关于 MDS 的研究发现，临床骨髓样本 GSTM5 基因启动子区域存在高甲基化的状态，使用 1、2、10 μmol/L DAC 处理 MDS 细胞 SKM-1 后，相较于对照组，GSTM5 基因 mRNA 表达水平均显著升高，GSTM5 基因甲基化水平显著降低，但目前尚缺乏关于 GSTM5 在 MDS 发病机制中作用的报道[10]。本研究建立了 MDS 细胞 SKM-1 的 GSTM5 过表达模型，并检测了 SKM-1 细胞的增殖、凋亡、细胞周期及 GSH 水平变化，以期为 GSTM5 基因在 MDS 发生中的作用机制研究及 MDS 的靶向治疗提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料来源　MDS 细胞 SKM-1 细胞系由中国中医科学院西苑医院周庆兵主任课题组赠送。RPMI 1640 完全培养液和无血清细胞冻存液均购自武汉普诺赛公司。去甲基化药物 DAC 购自美国 MedChemExpress(MCE)公司，谷胱甘肽抑制剂丁硫氨酸亚砜亚胺(BSO)购自美国 SIGMA 公司。CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自东仁化学公司。RNA 提取试剂盒购自新英格兰 NEBiolabs 公司。DNA 提取试剂盒、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)mix 试剂盒均购置于上海凯杰生物科技有限公司。RIPA 蛋白裂解液、浓缩胶缓冲液、分离胶缓冲液、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸、ECL 化学发光检测试剂盒均购自索莱宝公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天公司。Lipofectamine 3000、蛋白 Marker 购自美国 Thermo fisher 公司。

1.2　细胞培养和转染　将 SKM-1 细胞培养于 RPMI 1640 完全培养液中，将培养瓶置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长期细胞接种于六孔板，按说明书配制转染体系，转染 24 h 后提取细胞 RNA 和蛋白。SKM-1 细胞分组：SKM-1(对照)、SKM-1-NC(空白载体)、SKM-1ovGSTM5(GSTM5 过表达)。

1.3　DAC 和 BSO 处理　取对数生长期细胞接种于六孔板，每组 3 个复孔，分别加入 0、1、2、10 μmol/L DAC 200 μL，药物作用 72 h，此为本课题组前期试验所用药物浓度[10]；40 μmol/L BSO 200 μL，药物作用 24 h，此为本课题组预试验 BSO 处理所选用的浓度。

1.4　RT-qPCR　用试剂盒法提取 RNA，利用 NanoDrop 仪器对 RNA 进行检测后，将 RNA 逆转录为 cDNA，采用荧光染料法进行 PCR 反应，每组设置 3 个复孔。GSTM5 基因的 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。引物序列：GSTM5 正向引物为 5′-ATGCCCATGACACTGGGGTACTG-3′，反向引物为 5′-CCATGTGGTTATCCATAACCTGG-3′；GAPDH 正向引物为 5′-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3′，反向引物为 5′-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3′。

1.5　Western blotting 试验　使用蛋白裂解液提取蛋白后采用 BCA 法测定蛋白浓度，取 20 μg 蛋白上样，经电泳后转至 PVDF 膜上，用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后分别加入 GSTM5 一抗(1∶5 000)、GAPDH 一抗(1∶10 000)，4 ℃过夜，TBST 洗膜后摇床孵育相应的二抗 1 h，TBST 洗膜后使用 ECL 超敏发光液进行曝光显影，条带灰度值使用 Image J 分析。

1.6　CCK-8 试验检测细胞增殖能力　将处于对数生长期的 SKM-1 细胞加入 96 孔板内，每孔加培养体系 100 μL，每组设置 6 个复孔，分别于培养第 0、1、2、3 天避光加入 10 μL CCK-8 试剂，培养箱中孵育 2.5 h。采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.7　流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡　将 SKM-1 细胞培养 48 h 后离心收集，用 PBS 清洗细胞 2 遍，加入预冷的 75%乙醇，4 ℃固定过夜。加入含 RNA 酶(100 μg/mL)的碘化丙啶(PI，50 μg/mL)，室温避光孵育 30 min 后用流式细胞仪检测细胞周期。另加入 Annexin V-APC 和 PI，避光孵育 15 min，采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.8　GSH 检测试剂盒检定细胞 GSH 水平　用 PBS 清洗细胞 1 次，弃上清取细胞沉淀，使用试剂盒内检测缓冲液重悬细胞后，转速 10 000×g，4 ℃离心 10 min 取上清液，稀释后加入 96 孔板中，按说明书添加检测试剂，室温孵育 25 min 后，采用酶标仪检测 420 nm 处的 A 值。

1.9　统计学处理　采用 SPSS19.0、Excel 及 Graphpad Prism 9.0.0 软件处理所得数据，实验均重复 3 次或 3 次以上，呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组比较采用单因素方差分析，两组比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

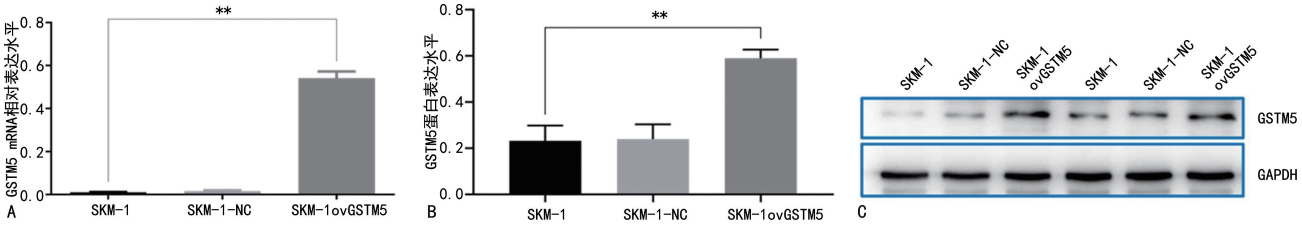
2　结　　果

2.1　SKM-1 细胞 GSTM5 基因 mRNA 及蛋白表达水平　在 SKM-1 细胞中，过表达 GSTM5 基因组的 GSTM5 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)，过表达 GSTM5 细胞模型构建成功。见图 1。

2.2　过表达 GSTM5 基因对 SKM-1 细胞增殖能力的影响　对 SKM-1 细胞系过表达 GSTM5 处理后，SKM-1 细胞的增殖能力显著降低($P<0.05$)。见图 2。

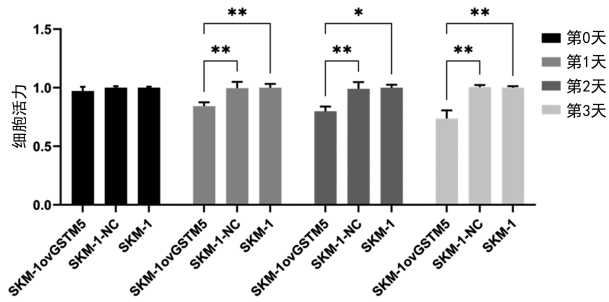
2.3　过表达 GSTM5 基因处理对细胞周期和凋亡的影响　与对照相比，SKM-1 细胞瞬时转染 GSTM5 质粒 48 h 后，细胞凋亡率和细胞周期分布情况差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

2.4　过表达 GSTM5 基因处理及 DAC 处理 SKM-1 细胞后的 GSH 水平　过表达 GSTM5 基因处理的 SKM-1 细胞 GSH 水平显著降低($P<0.05$)；在 DAC 处理组中，1、2、10 μmol/L 浓度 DAC 处理的 SKM-1 细胞 GSH 水平差异均无统计学意义($P>0.05$)，但相较于 0 μmol/L DAC 处理，SKM-1 细胞 GSH 水平均出现显著降低($P<0.05$)。见图 4。



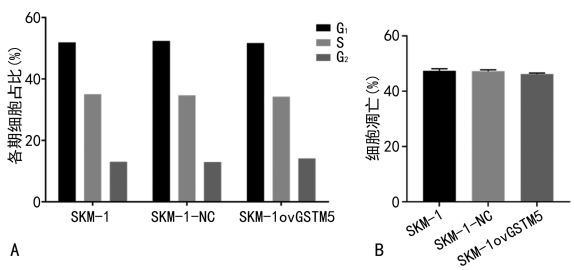
注：A 为 GSTM5 mRNA 表达水平；B、C 为 GSTM5 蛋白表达水平；** $P<0.01$。

图 1　SKM-1 细胞 GSTM5 基因的 mRNA 及蛋白表达水平



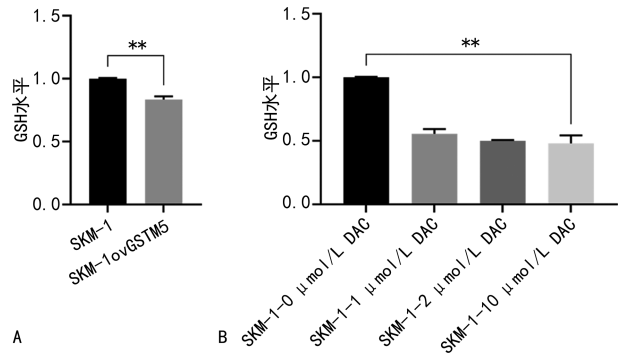
注：* $P<0.05$，** $P<0.01$。

图 2　过表达 GSTM5 基因对 SKM-1 细胞增殖能力的影响



注：A 为过表达 GSTM5 对 SKM-1 细胞周期的影响；B 为过表达 GSTM5 对 SKM-1 细胞凋亡的影响。

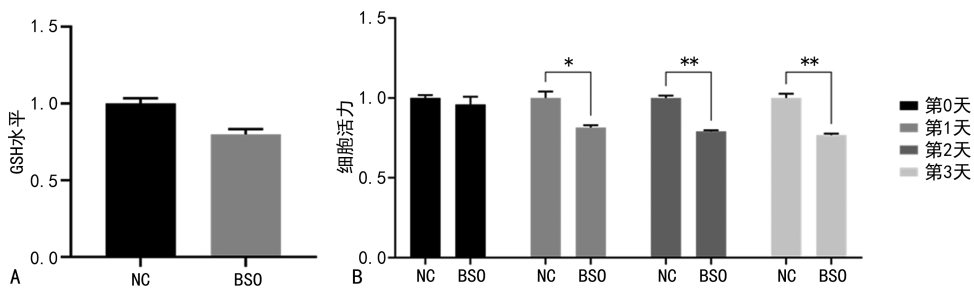
图 3　过表达 GSTM5 对 SKM-1 细胞凋亡和细胞周期的影响



注：A 为过表达 GSTM5 对 SKM-1 细胞 GSH 水平的影响；B 为不同浓度 DAC 处理对 SKM-1 细胞 GSH 水平的影响；** $P<0.01$。

图 4　过表达 GSTM5 基因和 DAC 处理对 SKM-1 细胞 GSH 水平的影响

2.5　BSO 处理对 SKM-1 细胞 GSH 水平和增殖能力的影响　GSTM5 处于高水平表达时，细胞 GSH 水平显著降低（$P<0.05$），在 40 μmol/L BSO 处理 SKM-1 细胞的第 1、2、3 天细胞的增殖均受到显著抑制（$P<0.05$）。见图 5。



注：A 为 40 μmol/L BSO 处理 SKM-1 细胞后 GSH 水平的变化；B 为 40 μmol/L BSO 处理 SKM-1 细胞后对细胞增殖能力的影响；* $P<0.05$，** $P<0.01$。

图 5　低水平 GSH 细胞模型的验证和对细胞增殖能力的影响

3　讨　论

目前 MDS 的早期鉴别诊断体系尚未建成，可应用的诊疗指标有限。在一定程度上，MDS 可以理解为介于不明原因血细胞减少症与 AML 之间的过渡状态。MDS 涵盖了较为广泛的病态表现，比如单系或多系的病态/无效造血、染色体核型异常、基因突变等。在 MDS 的早期，患者通常与健康人群血细胞指标无明显差异，这使得疾病的早期诊断较为困难[11]。有研究发现，在接受 DAC 治疗的患者中，MDS 组达到缓解的比例尚为可观，总体显著高于 AML 组[12]。DAC 作为甲基化相关研究的药物，主要用于疾病潜在治疗靶点与耐药的验证。

谷胱甘肽 S-转移酶（GSTM）通常被认为是参与致癌活性代谢物失活转化的解毒酶，参与亲电化合物的解毒，包括致癌物、治疗药物、环境毒素和氧化应激产物，这表明这些酶可能在致癌中发挥作用[13]。在胃癌相关研究中，GSTM5 的 mRNA 高表达水平与患者的低总体生存率密切相关[14]。在 Barrett's 发育不良和 Barrett's 腺癌中，转录 GSTM5 基因启动子区域甲基化和 mRNA 表达水平之间存在显著的反向相关

性，并且该病的发生可能与活性氧不良累积造成的氧化应激损伤有关[15]。在非小细胞肺癌中，GSTM5 基因变异与患者总体生存率具有相关性，并且 GSH 水平也与患者总体生存率具有相关性[15]。本研究采用 MDS 细胞 SKM-1 成功构建了 GSTM5 基因过表达细胞模型。本研究结果显示，上调 GSTM5 基因表达对 MDS 细胞 SKM-1 的增殖能力起到了显著抑制的作用，但对细胞凋亡和细胞周期的影响却不明显。

在膀胱癌的研究中，GSTM5 在膀胱癌细胞中表现为启动子区域高甲基化，过表达 GSTM5 处理后，不仅膀胱癌细胞的增殖能力受到明显抑制，细胞 GSH 水平也明显降低[17-18]。在本项研究中，同对照相比，过表达 GSTM5 与基因的 SKM-1 细胞 GSH 水平显著下降（$P<0.05$）。此外，利用 BSO 处理 SKM-1 细胞，在降低 GSH 水平后，SKM-1 细胞的增殖能力也受到了抑制。本研究结果在一定程度上说明了 GSH 水平会影响 SKM-1 细胞的增殖能力。本项研究仍有一定的局限性，但提示 GSTM5 在 SKM-1 细胞中发挥抗癌作用，并且由 GSTM5 导致的 GSH 水平降低可能介导这种抗癌作用。

综上所述，上调 GSTM5 表达可显著抑制 MDS 细胞的增殖。因此，GSTM5 可能参与 MDS 的发病，并具有作为 MDS 诊断标志物的潜力。临床医生或可根据 GSTM5 对疾病进行早期评估。

参考文献

[1] BRUZZESE A, VIGNA E, MARTINO E A, et al. Myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts[J/OL]. Hematol Oncol, 2023[2023-02-20]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36794650/.

[2] SYMEONIDIS A, CHATZILYGEROUDI T, CHONDROU V, et al. Contingent synergistic interactions between noncoding RNAs and DNA-modifying enzymes in myelodysplastic syndromes[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 16069.

[3] VAXEVANIS C K, BAUER M, SUBBARAYAN K, et al. Biglycan as a mediator of proinflammatory response and target for MDS and sAML therapy[J]. Oncoimmunology, 2022, 12(1): 2152998.

[4] BUCKSTEIN R, CHODIRKER L, YEE K W L, et al. The burden of red blood cell transfusions in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes and ring sideroblasts: an analysis of the prospective MDS-CAN registry [J]. Leuk Lymphoma, 2023, 64(3): 651-661.

[5] VIRAMETEEKUL S, REVESZ T, JAUNMUKTANE Z, et al. Pathological validation of the MDS criteria for the diagnosis of multiple system atrophy[J]. Mov Disord, 2023, 38(3): 444-452.

[6] XU T, YU X, ZHOU S, et al. DNA methylation and mRNA expression of glutathione S-transferase alpha 4 are associated with intracranial aneurysms in a gender-dependent manner[J]. Front Genet, 2023, 13: 1079455.

[7] YE J, WU M, HE L, et al. Glutathione-S-transferase P1 gene promoter methylation in cell-free DNA as a diagnostic and prognostic tool for prostate cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Int J Endocrinol, 2023, 2023: 7279243.

[8] WITT J H, FRIEDRICH M, JANDRIG B, et al. Molecular margin status after radical prostatectomy using glutathione S-transferase P1 (GSTP1) promoter hypermethylation[J]. BJU Int, 2022, 130(4): 454-462.

[9] BUTRYM A, ŁACINA P, BOGUNIA-KUBIK K, et al. ABCC3 and GSTM5 gene polymorphisms affect overall survival in Polish acute myeloid leukaemia patients[J]. Curr Probl Cancer, 2021, 45(5): 100729.

[10] 虞亚菲，王驰，常青，等. GSTM5 基因启动子家计划及表达在骨髓增生异常综合征中的临床意义[J]. 中华检验医学杂志，2022，45(5)：494-501.

[11] MATZEN S M H, RAASCHOU-JENSEN K K, KALLENBACH K. Implementation of the Ogata flow cytometric scoring system in routine diagnostics of myelodysplastic syndrome[J]. Health Sci Rep, 2018, 1(11): e90.

[12] SERIN I, DOGU M H. The use of hypomethylating agents in hematologic malignancies: treatment preferences and results[J]. Int J Hematol Oncol, 2021, 10(4): IJH37.

[13] KEARNS P R, CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS Z M, PIETERS R, et al. Mu class glutathione S-transferase mRNA isoform expression in acute lymphoblastic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2003, 120(1): 80-88.

[14] CHEN Y, LI B, WANG J, et al. Identification and verification of the prognostic value of the glutathione S-transferase Mu genes in gastric cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 20(4): 100.

[15] PENG D F, RAZVI M, CHEN H, et al. DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma[J]. Gut, 2009, 58(1): 5-15.

[16] PANKRATZ V S, SUN Z, AAKRE J, et al. Systematic evaluation of genetic variants in three biological pathways on patient survival in low-stage non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(9): 1488-1495.

[17] WANG S C, HUANG C C, SHEN C H, et al. Gene expression and DNA methylation status of glutathione S-Transferase Mu1 and Mu5 in urothelial carcinoma[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159102.

[18] JOU Y C, WANG S C, DIA Y C, et al. Anti-cancer effects and tumor marker role of glutathione S-transferase Mu 5 in human bladder cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 3056.

（收稿日期：2023-02-20　修回日期：2023-03-20）