

·论 著·

沙利度胺对多发性骨髓瘤骨髓间充质干细胞凋亡及白介素-6的影响

吴元庭 任莉 吴海英 蒋慧芳 苏传勇 陶叠红 郭淑萍

[摘要] 目的 观察沙利度胺对多发性骨髓瘤骨髓间充质干细胞(BMMSCs)凋亡及白介素-6(IL-6)的影响。方法 采用细胞凋亡检测试剂盒双染色(Annexin V-FITC/PI)检测细胞凋亡。采用实时荧光定量PCR技术(RT-qPCR)检测经沙利度胺作用于BMMSCs后IL-6、白介素-1 β (IL-1 β)及干细胞因子mRNA(SCF mRNA)的水平表达。结果 BMMSCs的分离鉴定培养,细胞形态学提示为长梭状细胞,说明分离得到较纯的BMMSCs。25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml 沙利度胺对BMMSCs作用处理48 h,与0 ng/ml组比较,仅50 ng/ml沙利度胺组的凋亡率明显增加,差异有统计学意义($t=1.12, P<0.05$)。RT-qPCR检测IL-6、IL-1 β 、SCF结果显示,0~100 ng/ml的沙利度胺处理BMMSCs 48 h后,仅100 ng/ml沙利度胺组的IL-6明显降低,差异有统计学意义($t=1.27, P<0.05$)。结论 50 ng/ml沙利度胺可增加BMMSCs凋亡,100 ng/ml沙利度胺能降低BMMSCs的IL-6。

[关键词] 沙利度胺; 多发性骨髓瘤; 骨髓间充质干细胞; 细胞因子

Effect of thalidomide on apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells and interleukin-6 in multiple myeloma

WU Yuanting, REN Li, WU Haiying, et al. The Second Medical College, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China

[Abstract] **Objective** To observe the influence of thalidomide on apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and interleukin -6 (IL-6) in patients with multiple myeloma. **Methods** Cells apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. After thalidomide acted on BMMSCs, the IL-6, IL-1 β and SCF mRNA expressions were detected by RT-qPCRs. **Results** The cell morphology showed that the BMMSCs are long spindle cells, which is indicating that the pure BMMSCs were separated. The BMMSCs were dealt with different concentrations thalidomide including 25 ng/ml, 50 ng/ml, and 100 ng/ml for 48 h. Compared with the 0 ng/ml group, the apoptotic rate of the 50 ng/ml thalidomide group was significantly increased ($t=1.12, P<0.05$). The results of RT-qPCR showed that the IL-6 of the 100 ng/ml thalidomide group was significantly decreased when compared with the blank group ($t=1.27, P<0.05$). **Conclusion** Thalidomide with concentration of 50 ng/ml increase BMMSCs apoptosis, and 100 ng/ml thalidomide reduce IL-6 level in BMMSCs.

[Key words] thalidomide; multiple myeloma; bone marrow mesenchymal stem cells; cytokines

多发性骨髓瘤是浆细胞性恶性血液肿瘤,我国发病率约为1/10万^[1],第一代的免疫调节剂沙利度胺^[2]是治疗多发性骨髓瘤临床应用久远的药物,因

其国产仿制品低廉的价格,是目前国内最为广泛使用的骨髓瘤药物之一。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)通过产生的细胞因子与造血干细胞接触,有利于骨髓微环境的形成和功能完整^[3]。骨髓微环境与多发性骨髓瘤细胞的生长、存活及耐药性均具有相关性^[4]。本次研究沙利度胺的抗血管新生和免疫调节作用对多发性骨髓瘤细胞因子影响,为沙利度胺在临床的使用提供依据。现报道如下。

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.03.004

基金资助:浙江省医药卫生科技项目(2014KYA028);
浙江省中医药科技计划(2015AZ021)

作者单位:310053 浙江杭州,浙江中医药大学第二临床医学院(吴元庭);浙江省立同德医院血液科(任莉、吴海英、蒋慧芳、苏传勇、陶叠红、郭淑萍)

通讯作者:任莉, Email:renli1996@sina.com

1 材料与方法

1.1 实验材料 BMMSCs由2015年3月至2017年6月浙江省立同德医院血液科在多发性骨髓瘤患者的骨髓分离得到。

1.2 实验方法

1.2.1 BMMSCs的分离培养与体外扩增 无菌条件下临床采取多发性骨髓瘤患者骨髓3~4 ml,乙二胺四乙酸抗凝或者直接放于染色体培养瓶中,取一支15 ml离心管,先加入与骨髓单细胞悬液等量的分离液,用吸管小心吸取骨髓单细胞悬液样本加于分离液液面上,离心,用吸管小心吸取第二层环状乳白色淋巴细胞层到另一15 ml离心管中,往所得离心管中加入10 ml清洗液混匀细胞。离心,弃上清。重悬细胞。反复清洗三次,弃上清液后以0.5 ml后续实验所需相应液体重悬细胞。将分离到的重悬细胞进行计数,10⁶个细胞/10 cm的浓度接种在培养皿(含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基)中,在37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。24 h后可见少部分贴壁细胞。继续培养,可见陆续有细胞贴壁。4 d后,换液。1周可见单克隆细胞已长至80%密度左右。进行胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 BMMSCs的形态观察及流式细胞术分离鉴定 消化收集第二代BMMSCs,进行显微镜下细胞形态观察,按1μg抗体/1×10⁶个细胞的量加入CD34 PE、CD45 PE和CD105 PE直标抗体,同时一份加入ISO IgG1对照抗体,避光孵育30 min,流式检测。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 取F2代的BMMSCs细胞,用0.25%Trypsin消化,离心5 min,计数板下计数,铺6孔板,每孔加入1×10⁵个细胞,放入培养箱中静置24 h,分别加入实验浓度沙利度胺,同时设空白对照组,48 h后收集细胞,药物作用后,离心收集细胞,磷酸缓冲盐溶液洗涤细胞两次,500 μl 1×Binding Buffer 悬浮细胞,在细胞悬浮液中加入5 μl 磷脂结合蛋白和10 μl 核酸染料,轻轻混匀后于4℃避光条件下孵育5 min,上机检测。

1.2.4 RT-qPCR检测IL-6、IL-1β、SCF mRNA表达 取上述经分离鉴定的BMMSCs细胞,Trizol法提取细胞总RNA并测定浓度。按照cDNA反转录试剂盒说明书对总RNA进行逆转录。根据mRNA浓度计算加样体积,反应总体积为30 μl,包括逆转录产物1 μl, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 1×PCR缓冲液, dNTP 0.5 mmol/L,目的基因或内参照基因上、下游引物各

0.25 μmol/L, Tap DNA合成酶1U。IL-6、IL-1β、SCF反应参数为:94℃,35 min;59℃,45 min;72℃45 min,40循环,最后再72℃延伸10 min反应参数,扩增31个循环,内参基因β-actin扩增25个循环。PCR产物直接用于电泳或者4℃保存。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0统计处理软件分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本t检验。设P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMMSCs的分离鉴定培养 病人骨髓样本经人骨髓淋巴细胞分离液分离并用低糖DMEM培养基筛选出贴壁细胞,即得到BMMSCs。流式细胞仪检测后结果提示该细胞CD34阴性表达,CD45弱阳性表达,CD105阳性表达,以上结果符合人BMMSCs的特征。说明分离得到较纯的BMMSCs。

2.2 沙利度胺对BMMSCs凋亡的影响 沙利度胺随着浓度的逐渐增加,0 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml沙利度胺处理BMMSCs 48 h后,BMMSCs的凋亡率分别是:(0.67±0.06)%、(0.73±0.12)%、(0.87±0.06)%、(0.71±0.12)%。与0 ng/ml组相比,仅50 ng/ml沙利度胺组的凋亡率明显增加,差异有统计学意义($t=1.12, P<0.05$)。

2.3 沙利度胺对BMMSCs细胞IL-6、IL-1β、SCF表达的影响见表1

表1 不同浓度沙利度胺对BMMSCs细胞IL-6、IL-1β、SCF的影响

沙利度胺浓度	IL-6	IL-1β	SCF
0 ng/ml	0.62 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.53 ± 0.02
25 ng/ml	0.67 ± 0.02	0.68 ± 0.05	0.42 ± 0.01
50 ng/ml	0.76 ± 0.01	0.82 ± 0.04	0.50 ± 0.01
100 ng/ml	0.38 ± 0.02*	0.68 ± 0.05	0.56 ± 0.02

注: *:与0 ng/ml比较, P<0.05。

由表1可见,25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml沙利度胺处理BMMSCs 48 h后,与0 ng/ml相比,仅100 ng/ml沙利度胺组的IL-6明显降低,差异有统计学意义($t=1.27, P<0.05$)。

3 讨论

沙利度胺因其镇静和止吐作用,在20世纪50年代在欧洲广泛用于妊娠早期,结果导致许多新生儿严重肢体畸形被弃用。随着时间的推移,发现沙利度胺具有抗炎活性及免疫抑制作用,有较强的抗血管生成效应,老药发挥新效能,目前被广泛运用

予多种肿瘤和免疫性疾病^[5]。有临床试验认为在多发骨髓瘤治疗中,无论是否行自体造血干细胞移植,沙利度胺都能明显延长患者无进展生存期^[6],故本次研究为探寻其作用机制。

多发性骨髓瘤细胞的生物学行为和临床结局部分依赖于多发性骨髓瘤细胞的基因组和表观遗传异常^[7]。骨髓微环境在多发骨髓瘤的发病机制及进展中的起到了关键作用^[8]。多发性骨髓瘤细胞与骨髓微环境的其他细胞成分建立复杂的相互作用(BMMSCs、破骨细胞、成骨细胞、骨祖细胞、内皮细胞、脂肪细胞、免疫细胞、树突状细胞、巨噬细胞、T细胞),还包括与细胞外基质成分(层粘连蛋白、胶原蛋白、蛋白多糖、粘多糖)及其分泌的可溶性因子(细胞因子、趋化因子和生长因子)。这些相互作用的双向的后果:一方面,多发性骨髓瘤细胞主要与BMMSCs及破骨细胞相互作用导致多发性骨髓瘤细胞的细胞信号通路激活(磷脂酰肌醇3激酶/Akt的活化,Janus激酶/信号转导和转录激活因子3,RAS/RAF/丝裂原活化蛋白激酶激酶/细胞外信号调节激酶,转录因子- κ B),促进其增殖、存活、转移,甚至耐药^[9-13];另一方面,多发性骨髓瘤细胞破坏骨髓环境平衡引起贫血、免疫抑制、以及解偶联,骨重建过程导致溶骨性病变是该病的特征性的发展^[14]。

在骨髓瘤维持治疗中,无论是否行自体造血干细胞移植,Thal能明显延长患者中位无进展生存时间,但增加了血栓栓塞、乏力、神经病变、水肿、便秘不良反应的发生率。

沙利度胺可以促进杀伤性细胞(cytokine-induced killer,CIK)的增殖,并通过诱导多发性骨髓瘤细胞表面的活化型受体的配体增加CIK对多发性骨髓瘤细胞的杀伤作用^[15]。另有研究认为多发性骨髓瘤患者外周血辅助T细胞17细胞数增多,抑制外周血辅助T细胞17细胞可能也是沙利度胺发挥抗多发性骨髓瘤作用的机制之一^[16]。在本次研究中发现BMMSCs的分离鉴定培养细胞形态学提示为长梭状细胞,符合人BMMSCs的特征,说明分离得到较纯的BMMSCs。在进一步的实验中发现50 ng/ml的沙利度胺可增加BMMSCs凋亡,而100 ng/ml的沙利度胺可降低BMMSCs的IL-6分泌。因为IL-6、血管内皮生长因子的表达均与转录因子- κ B抑制蛋白密切相关,所以IL-6的分泌减少可能也与沙利度胺能抑制转录因子- κ B信号传导有关。

综上所述,50 ng/ml沙利度胺可增加BMMSCs

凋亡,100 ng/ml的沙利度胺可降低BMMSCs的IL-6。但因本次研究样本例数较少,还需扩大样本量进一步证实。

参考文献

- 1 路瑾.立足中国实际的骨髓瘤诊治—《中国多发性骨髓瘤诊治指南(第四版)》解读[S].中国实用内科杂志,2016,36(5):376-378.
- 2 中国医师协会血液科医师分会,多发性骨髓瘤专业委员会.多发性骨髓瘤周围神经病变诊疗中国专家共识(2015年)[S].全科医学临床与教育,2015,13(6):603-606.
- 3 Chauhan D, Uchiyama H, Ahbarali Y, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- κ B[J]. Blood, 1996, 87(5):1104-1112.
- 4 Allace SR, Oken MM, Lunetta KL, et al. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients[J]. Cancer, 2002, 91(7):1219-1230.
- 5 Fayers PM, Palumbo A, Hulin C, et al. Thalidomide for previously untreated elderly patients with multiple myeloma. meta-analysis of 1685 individual patient data from 6 randomized clinical trials[J]. Blood, 2011, 118(4):1201-1216.
- 6 康晓芳,许晶,刘玮,等.沙利度胺在多发性骨髓瘤维持治疗中的Meta分析[J].中华临床医师杂志(电子版),2016,10(24):3778-3782.
- 7 Munshi NC, Avet-Loiseau H. Genomics in multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(6):1234-1242.
- 8 Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, et al. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(5):585-598.
- 9 Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, et al. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(7):1564-1573.
- 10 Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy[J]. Leukemia, 2009, 23(3):10-24.
- 11 Basak GW, Srivastava AS, Malhotra R, et al. Multiple myeloma bone marrow niche[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2009, 10(5):345-346.
- 12 Yasui H, Hideshima T, Richardson PG, et al. Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 2006, 132(3):385-397.

(下转第259页)

的认识。关于BSGI是否受月经周期的影响目前也存在分歧,Yu等^[8]认为其检查效能与月经周期无关, Kim^[5]则建议检查在月经周期的第2天到第14天之间进行;本院进行的检查虽未避开月经期,但由于样本量较小,暂不能得出统计学上的差异,目前也无这方面的前瞻性研究。目前BSGI在亚洲地区尚未得到广泛运用,报道仅局限于东亚地区,今后还需要进行更多大样本人群、长期随访的基础研究。

综上所述,BSGI在诊断亚洲女性乳腺病变中较MRM有更高的特异度,可以作为一种更为有效的辅助手段应用于筛查发现的可疑病灶,提高乳腺癌早期诊断水平。

参考文献

- 1 沈镇宙,邵智敏.乳腺肿瘤学[M].上海:上海科技出版社,2005.14-15.
- 2 Pike MC, Pearce CL. Mammographic density, MRI background parenchymal enhancement and breast cancer risk [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(8): 37-41.
- 3 DeMartini WB, Liu F, Peacock S, et al. Background parenchymal enhancement on breast MRI: impact on diagnostic performance [J]. *Am J Roentgenol*, 2012, 198(4): 373-380.
- 4 Lee HS, Ko BS, Ahn SH, et al. Diagnostic performance of breast-specific gamma imaging in the assessment of residual tumor after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 145(1): 91-100.
- 5 Kim BS. Usefulness of breast-specific gamma imaging as an adjunct modality in breast cancer patients with dense breast: a comparative study with MRI [J]. *Ann Nucl Med*, 2012, 26(2): 131-137.
- 6 Yoon HJ, Kim Y, Kim BS. Intratumoral metabolic heterogeneity predicts invasive components in breast ductal carcinoma in situ [J]. *Eur Radiol*, 2015, 25(12): 3648-3658.
- 7 Kim JS, Lee SM, Cha ES. The diagnostic sensitivity of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and breast-specific gamma imaging in women with calcified and non-calcified DCIS [J]. *Acta Radiol*, 2014, 55(6): 668-675.
- 8 Yu XY, Hu GM, Zhang ZG, et al. Retrospective and comparative analysis of ^{99m}Tc-Sestamibi breast specific gamma imaging versus mammography, ultrasound, and magnetic resonance imaging for the detection of breast cancer in Chinese women [J]. *BMC Cancer*, 2016, (16): 450-460.
- 9 Sun Y, Wei W, Yang HW, et al. Clinical usefulness of breast-specific gamma imaging as an adjunct modality to mammography for diagnosis of breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 40(3): 450-463.
- 10 DA Bluemke GC, Gatsonis CA, Chen MH, et al. Magnetic resonance imaging of the breast prior to biopsy [J]. *JAMA*, 2004, 292(22): 2735-2742.
- 11 Zhang A, Li P, Liu Q, et al. Breast-specific gamma camera imaging with Tc-MIBI has better diagnostic performance than magnetic resonance imaging in breast cancer patients: A meta-analysis [J]. *Hell J Nucl Med*, 2017, 20(1): 26-35.
- 12 Friedewald SM, Rafferty EA, Rose SL, et al. Breast cancer screening using tomosynthesis in combination with digital mammography [J]. *JAMA*, 2014, 311(24): 2499-2507.

(收稿日期 2018-01-16)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第255页)

- 13 Podar K, Richardson PG, Hideshima T, et al. The malignant clone and the bone-marrow environment [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007, 20(5): 597-612.
- 14 Garcia-Gomez A, Sanchez-Guijo F, San Miguel JF, et al. Multiple myeloma mesenchymal stromal cells: Contribution to myeloma bone disease and therapeutics [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(3): 322-343.
- 15 姚阳,贾祝霞,张修文,等.沙利度胺增强细胞因子诱导的

杀伤性细胞抗多发性骨髓瘤细胞的作用 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(S2): 19-21.

- 16 杨云,何爱丽,王剑利,等.沙利度胺对多发性骨髓瘤患者外周血Th17细胞影响的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(5): 1341-1345.

(收稿日期 2017-09-29)

(本文编辑 蔡华波)