

CD137L 在多发性骨髓瘤中的表达及生物学功能

夏莎莎 张 梓 夏瑞祥

摘要 收集多发性骨髓瘤(MM)和非血液系统疾病患者的骨髓血,分选出浆细胞。检测 CD137 配体(CD137L)患者骨髓血浆细胞中表达情况,以及 CD137L 在 MM 中对白介素 10(IL-10)分泌和对 MM 细胞增殖的影响。结果显示:MM 患者骨髓血浆细胞中 CD137L 表达水平呈高表达,下调其表达可促进 IL-10 分泌及增殖速度。

关键词 多发性骨髓瘤; CD137L; 白介素-10; 骨髓间充质干细胞

中图分类号 R 733.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1326-03

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.033

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是浆细胞单克隆性增殖的恶性肿瘤,目前尚无根治方法。CD137 配体(CD137 ligand, CD137L)是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族成员,在多种肿瘤细胞中发挥重要作用^[1-3]。CD137 / CD137L 在抗原提呈细胞表面,起双向信号传导作用,CD137L 介导的逆向信号促进 TNF 分泌而抑制白介素 10(interleukin-10, IL-10)分泌^[4]。其中,IL-10 被认为能调节免疫细胞的分化及生长,抑制免疫细胞的活化^[5]。应用抗 CD137L 抗体阻断 T 细胞 CD137-137L 信号途径,II 类细胞因子 IL-10 表达增高^[6]。研究^[7]还显示,IL-10 即可抑制机体的免疫功能从而促进肿瘤细胞免疫逃逸,也能直接促进肿瘤细胞增殖。该研究通过调节 MM 细胞内 CD137L 基因表达,探究其对 IL-10 的分泌和 MM 细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI1640 培养液购自美国 HyClone 公司;胎牛血清、胰酶均购自美国 Gibco 公司;逆转录试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司;TB Green qPCR Master Mix 试剂盒购自日本 Takara 公

司;β-actin 抗体购自美国 BD 公司;鼠抗人 IgG 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司;定制的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)购自德国凯基生物公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;鼠抗人 CD137L 单克隆抗体、人 CD138 微磁珠购自德国 miltenyi 生物公司。

1.2 标本采集 收集 2017 年 3 月~2018 年 3 月安徽医科大学第一附属医院血液科收治的 16 例 MM 患者,所有患者的诊断均符合《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2017 年修订)》^[8]。选择 14 例血小板轻度减少、骨髓象正常的患者作为实验对照组。按照人 CD138 磁珠(德国 miltenyi 公司)分选说明书的操作,分离出浆细胞。本研究已获得本院医学伦理委员会批准,所有实验对象及家属均已签订知情同意书。

1.3 细胞培养及 siRNA 转染 人 MM 细胞株 U266 细胞采用细胞悬浮培养,按 2.5×10^5 个/孔铺于 6 孔板中。配制转染体系:分别将 4 种 150 ng siRNA 溶于 200 μl 含血清培养基中,再加入 12 μl Hi-perfect 均匀混合后加入 6 孔板。

1.4 Western blot 方法检测 CD137L 蛋白相对表达量 采用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测蛋白浓度。30 μg 样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次,相应一抗(CD137L 抗体:德国 miltenyi 生物公司;β-actin:美国 BD 公司)孵育过夜, TBST 洗 3 次后,加入二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, ECL 发光法曝光、显影,用 Image Pro plus 分析软件分析各条带灰度值。

1.5 RNA 提取、逆转录及 RT-PCR 法检测 CD137L mRNA 相对表达量 通过 Trizol 法提取细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)操作方法将 mRNA 逆转录成 cDNA,按照 qPCR 试剂盒(日本 Takara 公司)说明配制反应体系。以 β-actin 为内参,计算出 CD137L mRNA 相对表达量。

1.6 共培养及 ELISA 法检测 IL-10 的分泌水平 采用密度梯度离心分离骨髓单个核细胞,培养 3 d

2019-06-18 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2018ZD020)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:夏莎莎,女,硕士研究生;

夏瑞祥,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xrx2041@163.com

后去悬浮细胞后即得骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 按 2×10^4 个/ml 接种于 6 孔板 4 h 弃上清液, 备用。按下列方法设置 4 组。A 组: MM 细胞株 U266 单独培养; B 组: BMSCs 单独培养; C 组: 未转染的 MM 细胞株 U266 与 BMSCs 共培养即 (U266-siRNA-0 + BMSCs); D 组: 转染编号为 2 的 siRNA 处理后的 MM 细胞株 U266 与 BMSCs 共培养即 (U266-siRNA-2 + BMSCs), 24 h 后收集上清液并使用 Human IL-10 ELISA Kit 测各组 IL-10 的分泌水平。

1.7 CCK8 法检测细胞增殖情况 细胞经处理后, 加入 10% CCK8 溶液, 继续培养 2 h 后用酶标仪测出波长为 450 nm 的吸光度值 (A450), 绘制细胞生长曲线。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD137L 在 MM 患者的浆细胞中呈现高表达

MM 组患者骨髓血中浆细胞的 CD137L 蛋白表达 (1.96 ± 0.51) 明显高于对照组 (1.00 ± 0.29), 差异有统计学意义 ($t = 6.460$, $P < 0.001$)。见图 1。

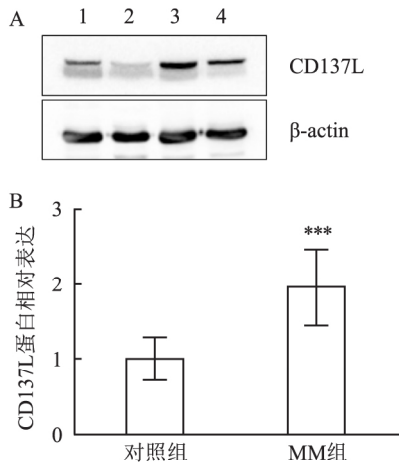


图 1 两组患者骨髓血浆细胞 CD137L 蛋白表达水平

1、2: 非血液疾病患者; 3、4: MM 患者; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

2.2 CD137L 基因沉默后 mRNA 表达明显下降

在转染后不同时间 4 条 siRNA 分别与对照组相比较, 均可明显下调 U266 细胞上 CD137L mRNA 表达水平, 差异有统计学意义 (B: $t = 10.281$, $P = 0.005$; C: $t = 21.439$, $P = 0.001$; D: $t = 4.509$, $P = 0.022$; E: $t = 16.615$, $P = 0.002$)。见图 2。

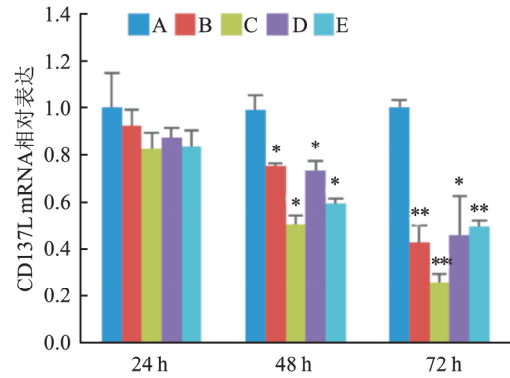


图 2 siRNA 沉默 CD137L 基因后 mRNA 表达水平

A: siRNA 对照组; D ~ E: CD137L 特异性 siRNA; 与 siRNA 对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 下调 U266 细胞的 CD137L 表达可促进 IL-10 的分泌 下调 U266 细胞内 CD137L 表达可促进共培养上清液中 IL-10 的分泌, 差异有统计学意义 ($t = 14.732$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 沉默 CD137L 基因对 U266、BMSCs 共培养体系中 IL-10 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-10 浓度 (pg/ml)
U266	47.09 ± 6.36
BMSCs	6.21 ± 0.96
U266-siRNA-0 + BMSCs	439.04 ± 24.62
U266-siRNA-2 + BMSCs	$760.41 \pm 28.66^{**}$

与 U266-siRNA-0 + BMSCs 组比较: ** $P < 0.01$

2.4 沉默 CD137L 基因促进 U266 细胞增殖 与对照组 (siRNA-0) 相比较, 沉默组 (siRNA-2) U266 细胞在 72 h 后增殖明显加快, 差异有统计学意义 ($t = 4.730$, $P = 0.021$)。见图 3。

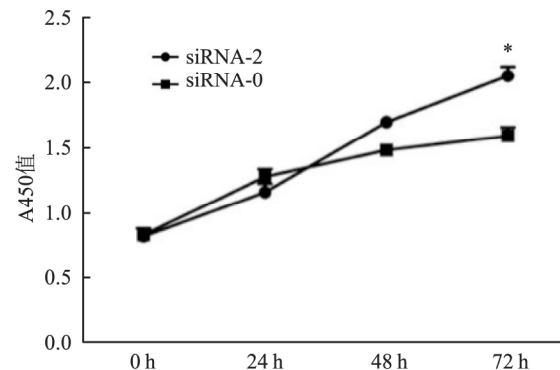


图 3 siRNA 沉默 CD137L 基因对 U266 细胞增殖的影响

siRNA-0: 对照组; siRNA-2: CD137L 特异性 siRNA; 与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

MM 是一种终末未分化的恶性肿瘤^[9]。目前

MM 已成为发病率排名第 2 的血液系统肿瘤,虽然硼替佐米等蛋白酶体抑制剂、单克隆抗体、免疫调节及自体造血干细胞移植术广泛用于 MM 的治疗,显著改善了 MM 患者的预后,但至今未有彻底治疗的方法^[10]。CD137/CD137L 介导的逆向信号能促进单核细胞释放巨噬细胞集落刺激因子从而影响细胞因子 IL-2、IL-6、IL-8、IL-10 等的分泌,其中 IL-10 是作用机制十分复杂的肿瘤免疫抑制因子。IL-10 能作为自分泌或旁分泌生长因子促进肿瘤细胞生长,并能抑制细胞程序死亡,调节宿主微环境,影响肿瘤的转移^[11-13]。本实验用 4 种 siRNA 转染 MM 细胞株 U266 降低其表面 CD137L 的表达,U266 在骨髓微环境下 IL-10 分泌水平上升,U266 细胞增殖加快,这提示 CD137L 在 MM 中可通过抑制 IL-10 的分泌影响 MM 的增殖。Gullo et al^[14] 研究显示 CD137L 分子在 MM 中呈现高表达,激活 CD137L 逆向信号可以促进炎症因子 IL-6 和 IL-8 的分泌,从而促进 MM 细胞的凋亡。同时,有研究^[15] 表明 IL-10 参与了 B 细胞向浆细胞分化。本实验以 MM 患者及非血液系统疾病患者的骨髓血为标本,验证 CD137L 分子高表达于 MM 患者的浆细胞。在 MM 中 CD137L 是 IL-10 分泌的抑制蛋白,CD137L 的逆向信号在 MM 中的作用抑制 IL-10 的分泌影响机体免疫调节,利用 CD137L 作为靶点研究对于疾病的治疗可能具有十分重要的临床意义。

参考文献

- [1] Kamijo H, Miyagaki T, Shishido-Takahashi N, et al. Aberrant CD137 ligand expression induced by GATA6 overexpression promotes tumor progression in cutaneous T-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2018, 132(18): 1922-35.
- [2] Tsuda Y, Tanikawa C, Miyamoto T, et al. Identification of a p53 target, CD137L, that mediates growth suppression and immune response of osteosarcoma cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10739.

- [3] Fu Z X, Han J S, Liu F, et al. The study on specific umbilical blood DC vaccine for Beige nude mice loaded human colorectal carcinoma to induce anti-tumor immunity [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(10): 2364-71.
- [4] Dharmadhikari B, Wu M, Abdullah N S, et al. CD137 and CD137L signals are main drivers of type 1, cell-mediated immune responses [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5(4): e1113367.
- [5] Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10 [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(5): 331-44.
- [6] 李朝虹,徐开林,潘秀英. 体外阻断 CD137-CD137L 途径控制小鼠移植瘤抗宿主病研究[C]. 第 10 届全国实验血液学会议论文汇编, 2005.
- [7] Asadullah K, Sterry W, Volk H D. Interleukin-10 therapy—review of a new approach [J]. *Pharmacol Rev*, 2003, 55(2): 241-69.
- [8] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会 MM 专业委员会. 中国 MM 诊治指南(2017 年修订) [J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(11): 866-70.
- [9] Eslick R, Talaulikar D. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment [J]. *Aust Fam Physician* 2013, 42(10): 684-8.
- [10] Hentschel N, Krusch M, Kiener P A, et al. Serum levels of sCD137 (4-1BB) ligand are prognostic factors for progression in acute myeloid leukemia but not in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Eur J Haematol* 2006, 77(2): 91-101.
- [11] Huang M, Sharma S, Mao J T, et al. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production [J]. *Immunol*, 1996, 157(12): 5512-20.
- [12] Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more [J]. *Immunol Today*, 1991, 12(8): 256-7.
- [13] Romagnani S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease [J]. *Int J Clin Lab Res*, 1991, 21(2): 152-8.
- [14] Gullo C, Koh L K, Pang W L, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in multiple myeloma cell lines by CD137 ligand signaling [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10845.
- [15] Jones K D, Aoki Y, Chang Y, et al. Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells [J]. *Blood*, 1999, 94(8): 2871-9.

Expression and biological function of CD137L in multiple myeloma

Xia Shasha Zhang Zi Xia Ruixiang

(Dept of Hemopathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Bone marrow blood was collected from patients with multiple myeloma (MM) and non-hematological diseases, and plasma cells were isolated. The expression of CD137L in bone marrow plasma cells and the effect of CD137L in MM on interleukin-10 (IL-10) secretion and MM cell proliferation were detected. The expression level of CD137L in bone marrow plasma cells of MM patients was high, and the down-regulation of its expression could promote the secretion and proliferation rate of IL-10.

Key words multiple myeloma; CD137L; IL-10; BMSC