

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.010

骨髓基质细胞 IL-1 β 、IL-6、SCF 及 TPO 在老年多发性骨髓瘤组织中的表达及意义*

王欢¹ 陈曦¹ 李静¹ 刘艳春¹ 刘庆荣¹ 陈丽娟²

(1 唐山工人医院血液科 河北 唐山 063000; 2 南京医科大学第一附属医院血液内科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨老年多发性骨髓瘤患者骨髓基质细胞白细胞介素-1(IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肝细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)水平及临床意义。**方法:**选择本院 2011 年 1 月-2014 年 6 月收治的老年多发性骨髓瘤患者作为观察组,另选择同期参加体检的志愿者作为对照组。采集两组人员骨髓标本,制备总 RNA、反转录反应、聚合酶链反应及 PCR 产物电泳检测等过程的测定两组患者 IL-1 β 、IL-6、SCF、TPO 水平。**结果:**观察组患者 IL-1 β 、IL-6、SCF、TPO 水平均明显高于对照组($P<0.05$);初发患者、复发患者及移植患者的 IL-1 β 、IL-6 比较无明显差异($P>0.05$)。移植组 SCF 水平显著低于初发组和复发组($t_{初移}=4.967, t_{难移}=5.169, P<0.05$);初发组 TPO 显著高于复发组和移植组($t_{初难}=4.736, t_{初移}=3.568, P<0.05$)。**结论:**老年多发性骨髓瘤患者骨髓基质细胞白细胞介素-1、白细胞介素-6、肝细胞因子、血小板生成素水平表达升高,在疾病的发生及发展过程中发挥重要作用。

关键词:多发性骨髓瘤;白细胞介素-1;白细胞介素-6;肝细胞因子;血小板生成素

中图分类号:R733.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)36-7042-03

Clinical Significance and Determination of IL-1 β , IL-6, SCF and TPO of Marrow Stromal Cells in Elderly Patients with Multiple Myeloma*

WANG Huan¹, CHEN Xi¹, LI Jing¹, LIU Yan-chun¹, LIU Qing-rong¹, CHEN Li-juan²

(1 Department of Hematology, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei, 063000, China;

2 Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the levels of interleukin-1 (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), stem cell factor (SCF), and thrombopoietin (TPO) in elderly multiple myeloma patients stromal cells. **Methods:** 13 cases of elderly multiple myeloma patients treated in the hospital from January 2011 to June 2014 were selected as the observation group, while another 13 healthy people were collected as the control group. Then the levels of IL-1 β , IL-6, SCF and TPO of the two groups were detected by means of RNA, reverse transcription, polymerase chain reaction and PCR. **Results:** The IL-1 β , IL-6, SCF and TPO in the observation group were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$); There was no significant difference about IL-1 β and IL-6 in the three groups ($P>0.05$); SCF levels in the transplantation group was significantly lower than those of the primary group and refractory group ($t=4.967, t=5.169, P<0.05$); TPO levels of the primary group was significantly higher than those of the refractory group and transplantation group ($t=4.736, t=3.568, P<0.05$). **Conclusion:** The interleukin-1, interleukin-6, stem cell factor and thrombopoietin may play an important role in the development of multiple myeloma for elderly patients.

Key words: Multiple myeloma; Interleukin-1; Interleukin-6; Stem cell factor; Thrombopoietin

Chinese Library Classification(CLC): R733.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)36-7042-03

前言

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)临床并不少见,相关研究表明其发病率近年有所提高,且呈年轻化趋势^[1]。MM 的主要特征为骨髓中充斥着大量单克隆性浆细胞,且患者血清含高浓度单克隆免疫球蛋白,临床表现主要表现为破骨反应及广泛的骨损害^[2-4]。MM 是一种全身性系统性疾病,其治疗较为困难,治愈难度大。正因如此,临床极为重视其研究,着眼于其发病机制的研究对其治疗、预后均有重要意义。相关研究表明,MM 患者的骨髓微环境与骨髓瘤细胞克隆性生长、停留以及患者的临

床疗效及预后等均密切相关^[5]。本研究旨在观察 MM 患者 IL-1 β 、IL-6、SCF、TPO 水平,以探讨细胞因子在疾病发生发展中的作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择老年 MM 患者 13 例作为观察组及同期体检健康人员 13 例作为对照组,均经患者及家属知情同意,且符合伦理委员会基本要求。观察组患者男 8 例,女 5 例,年龄 61~79 岁,平均 67.8 ± 4.2 岁,初发 5 例,其中,男 3 例,女 2 例,平均年龄

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071946)

作者简介:王欢(1973-),主治医师,本科,研究方向:血液恶性肿瘤的临床治疗,电话:13832903476

(收稿日期:2014-07-30 接受日期:2014-08-23)

66.1±4.5岁;复发5例,男3例,女2例,平均68.3±4.1岁;经自体外周血造血干细胞移植治疗3例,男2例,女1例,平均67.4±4.3岁。对照组男7例,女6例,年龄61~78岁,平均69.8±3.9岁。研究对象经检查均未合并先天性心脏病、过敏、严重肝肾功能不全等。两组患者的性别构成、年龄及体重指数等一般资料经统计学分析均无明显差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 诊断标准

难治性MM:患者初治时经标准方案治疗2~3疗程后无效,或者临床症状部分缓解,但停药后又短时间内复发患者。复发性MM:初次治疗后患者临床症状及相关体征等得到有效缓解,但6-11个月后发现病情加重,经VAD等治疗方案后无疗效。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞采集及培养 分别抽取两组研究对象的20 mL骨髓,抗凝处理后使用LS1077淋巴细胞分离液(购自天津市灏洋生物公司)分离单个核细胞,应用PBS(购自美国Hyclone)洗涤,然后种植于Mesencult培养液(购自加拿大Stemcell Tech公司),放置于细胞培养箱,培养箱条件为37℃,5%CO₂,待细胞贴壁48 h后换培养液,以后每隔3天更换50%培养液,倒置光镜观察细胞生长情况,当达到汇合时用0.25%胰酶(购自美国Gibco Life Tech)消化、传代,收集第二代细胞备用,流式细胞学分析证明为骨髓间充质干细胞(BM-MSC)。

1.3.2 总RNA制备 用PBS洗涤收集的第二代培养细胞2次,然后加入Tripure RNA抽提液(购自美国Roche公司),进行细胞裂解,RNA抽提严格按照使用说明书进行,并应用紫外分光光度计测定浓度。

1.3.3 逆转录反应 使用反转录试剂盒(购自美国Promega公司)进行,总体积20 μL,含总RNA 1.0 μg及随机引物0.25 μg/μL、AMV反转录酶15U。将cDNA产物置于-20℃保存。

1.3.4 聚合酶链反应 以cDNA为模板,β-actin为内参照行PCR扩增,PCR反应总体积25 μL,操作严格按照说明书进行。

1.3.5 PCR产物的电泳检测及分析 将PCR产物置于1.5%琼脂糖凝胶上,设置150V、电泳50 min,应用紫外光检测仪观察研究结果,使用Labworks 4.0凝胶分析软件进行恢复分析,计算细胞因子相对含量。

1.4 统计学处理

采用SPSS13.0统计软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采取t检测,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组骨髓中IL-1β、IL-6、SCF及TPO水平的比较

观察组MM患者的骨髓中IL-1β、IL-6、SCF及TPO水平分别为(0.6927±0.1297)、(0.9743±0.1153)、(0.7693±0.1092)及(0.7032±0.1642),均明显高于对照组($P<0.05$)。见表1。

表1 两组IL-1β、IL-6、SCF、TPO水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the levels of IL-1β, IL-6, SCF and TPO in serum of patients between two groups

Group	Case	IL-1β	IL-6	SCF	TPO
Observation group	13	0.6927±0.1297	0.9743±0.1153	0.7693±0.1092	0.7032±0.1642
Control group	13	0.2674±0.1109	0.4297±0.0654	0.4095±0.0932	0.3276±0.1076
t		8.986	14.813	9.036	6.898
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 不同类型MM患者IL-1β、IL-6、SCF及TPO水平的比较

初发MM组、难治复发组、移植治疗组IL-1β、IL-6比较均无明显统计学差异(均 $P>0.05$);移植治疗组SCF水平为

(0.3798±0.1142),显著低于初发MM组、难治复发组(均 $P<0.05$);初发MM组TPO为(0.8732±0.1732),显著高于难治复发组、移植治疗组(均 $P<0.05$)。见表2。

表2 不同类型MM患者骨髓中各指标的水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of levels of the indicators in the marrow of patients with different types($\bar{x} \pm s$)

MM	Case	IL-1β	IL-6	SCF	TPO
Primary group	5	0.6912±0.1197	0.9643±0.1143	0.7943±0.1143	0.8732±0.1732
Refractory group	5	0.6745±0.1476	0.9787±0.1047	0.7809±0.1021	0.4421±0.1069
Transplantation group	3	0.7241±0.1263	0.9642±0.1254	0.3798±0.1142	0.4673±0.1132
P		P1>0.05	P1>0.05	P1>0.05	P1<0.05
		P2>0.05	P2>0.05	P2<0.05	P2<0.05
		P3>0.05	P3>0.05	P3<0.05	P3>0.05

Note: p1, Primary group compared with Refractory group; p2, Primary group compared with Transplantation group; p3, Refractory group compared with Transplantation group.

3 讨论

MM为浆细胞恶性增殖性疾病,患者骨髓中充斥恶变浆细

胞,血、尿液中出现单克隆免疫球蛋白,常伴有骨质疏松、溶骨性病变,严重影响患者的生存质量^[6-9]。随着对MM研究的深入开展,大量研究表明骨髓造血微环境在MM的发生发展中具

有重要作用^[10]。骨髓微环境为具有复杂功能的网络结构,该网络结构具有调节骨髓瘤生长发育作用,而细胞因子紊乱、水平高低均对 MM 的发展具有重要影响^[11]。

IL-6 为细胞因子网络中重要组成成分之一,其功能为调节 B 淋巴细胞分化、增殖。目前,已有文献表明 IL-6 表达异常对 MM 发病具有重要意义^[12]。IL-6 为维持 MM 肿瘤生长存活的相关因子,其可介导肿瘤细胞增殖,导致 MM 细胞凋亡受抑制,且与骨质破坏及耐药性密切相关。本研究测定了 MM 患者的 IL-6 水平,并与正常人群水平比较,结果表明 MM 患者中其水平显著升高,与前述较为一致。IL-1 β 为破骨刺激因子,具有促进 MM 患者破骨增加作用,还可激活机体内皮细胞表达粘附分子 ICAM-1 等,进而通过增强瘤细胞、BMSC 的相互作用提高 IL-6 的表达。动物研究^[13,17]表明,IL-1 β 可刺激破骨细胞形成,还具有骨破坏、高血钙的诱导作用。本研究结果显示 MM 患者 IL-1 β 表达升高,与前述较为一致。正常情况下,SCF、TPO 二者可协同作用于造血干细胞,促进干细胞向不同方向转化。相关研究^[14-16]表明,SCF 同样具有抑制肿瘤细胞凋亡作用,且已有文献报道 SCF 在 AML、初发、难治复发 MM 患者中的表达异常,与本研究结果相一致。本研究测定了 MM 患者 IL-1 β 、IL-6、SCF、TPO 水平,均高于正常人群,表明 MM 发展与骨髓微环境存在密切关联。

对于不同时期 MM 患者细胞因子表达水平研究结果表明,IL-1 β 、IL-6 于初治、复发难治、移植治疗后均无显著差异,可能与持续较高水平表达的细胞因子与骨髓瘤细胞持续存在存在一定关系。SCF 于移植治疗后表达显著更低,可能与机体治疗后处于稳定期,瘤细胞符合降低,表达趋于正常相关^[18-20]。研究报道,SCF 既可促进白血病细胞抗凋亡,又可促进骨髓瘤细胞增生,此机制可能与 SCF 水平于不同时期患者表达水平差异相关。移植治疗方式有助于造血功能恢复,但本研究测定细胞因子水平为单中心、小样本研究,样本数较少,对此仍需更多研究给予证实。

综上所述,MM 患者 IL-1 β 、IL-6、SCF、TPO 水平表达升高,造血微环境异常与疾病发证发展具有重要关联,具有重要研究价值。

参考文献(References)

- [1] Koyama Motoko, Hashimoto Daigo, Aoyama Kazutoshi, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells [J]. Blood, 2009, 113(9): 2088-2095
- [2] Alessandro Martino, Gabriele Buda, Valentina Maggini, et al. Could age modify the effect of genetic variants in IL6 and TNF- α genes in multiple myeloma? [J]. Leukemia Research, 2012, 36(5): 594-597
- [3] W I Bensinger. Role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in myeloma [J]. Leukemia, 2009, 23(3): 442-448
- [4] Mohan RP, Gill N, Verma S, et al. A multilocular radiolucency of mandible as the first evidence of multiple myeloma: A clinico-radiographic case report [J]. Dent Res J, 2014, 11(2): 272-275
- [5] Murali Krishna Mamidi, Kavitha Ganesan Nathan, Gurbind Singh, et al. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(10): 3153-3164
- [6] Jian-liang Shen, You-zhang Huang, Shi-xia Xu, et al. Effectiveness of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow cryopreserved for 23-25 years [J]. Cryobiology, 2012, 64(3): 167-175
- [7] Feng Yongdong, Wen Jianguo, Mike Perez, et al. Bone marrow stromal cells from myeloma patients support the growth of myeloma stem cells [J]. Stem cells and development, 2010, 19(9): 1289-1296
- [8] Lei Hao, Huiqin Sun, Jin Wang, et al. Mesenchymal stromal cells for cell therapy: besides supporting hematopoiesis [J]. International Journal of Hematology, 2012, 95(1): 34-46
- [9] Zhi-Yong Zhang, Swee-Hin Teoh, James H.P Hui, et al. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application [J]. Biomaterials, 2011, 95(1): 34-46
- [10] G?sta Gahrton. Progress in allogeneic transplantation for multiple myeloma [J]. European Journal of Haematology, 2010, 85(4): 279-289
- [11] Guadalupe Martí nez-Jaramillo, Jorge Vela-Ojeda, Patricia Flores-Guzmán, et al. In vitro growth of hematopoietic progenitors and stromal bone marrow cells from patients with multiple myeloma [J]. Leukemia Research, 2010, 35(2): 250-255
- [12] Xiong T, Wei H, Chen X, et al. Effect of PARP1 inhibitor PJ34 on multi-drug resistance in human multiple myeloma cell line and its relationship with FA/BRCA pathway [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2014, 31(3): 312-316
- [13] Kitazawa Y, Li XK, Xie L, et al. Bone marrow-derived conventional, but not cloned, mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation and prevent graft-versus-host disease in rats [J]. Cell Transplant, 2012, 21(2-3): 581-590
- [14] Michaela R Reagan, Irene M Ghobrial. Multiple Myeloma Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Origin, and Tumor-Promoting Effects [J]. Clinical Cancer Research, 2012, 18(2): 342-349
- [15] Hong Yang, Simon N. Robinson, Yago Nieto. Ex Vivo Graft Purging and Expansion of Autologous Blood Progenitor Cell Products from Patients with Multiple Myeloma [J]. Cancer Research, 2011, 71(14): 5040-5049
- [16] Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Exp Mol Med, 2013, 45: e2
- [17] Wu KH, Wu HP, Chan CK, et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: from bench to bedside [J]. Cell Transplant, 2013, 22(4): 723-729
- [18] Watts SW, Thakali K, Smark C, et al. Big ET-1 processing into vasoactive peptides in arteries and veins [J]. Vascular Pharmacology, 2007, 47(5-6): 302-312
- [19] Abdelhalim MA. Effects of big endothelin-1 in comparison with endothelin-1 on the microvascular blood flow velocity and diameter of rat mesentery in vivo [J]. Microvascular Research, 2006, 72(3): 108-112
- [20] Law S, Chaudhuri S. Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges [J]. Am J Stem Cells, 2013, 2(1): 22-38