

SOX2蛋白及趋化相关基因 *CCR1*、*CCR2*、*MCP-1* 影响骨髓瘤细胞生物学特性的机制

柯金勇,汪玉芳,陆亚岚,张欣,柯善栋

(黄石市中心医院血液内科,湖北 黄石 435000)

【摘要】 目的 揭示SOX2蛋白及趋化相关基因 *CCR1*、*CCR2* 和 *MCP-1* 影响骨髓瘤细胞生物学特性的机制。方法 本研究以骨髓瘤细胞株H929为研究对象,采用随机数表法将细胞分为空白对照组、阴性对照组和实验组。空白对照组为不进行任何处理的骨髓瘤细胞株H929,阴性对照组为转染慢病毒rLV-ZPP的稳转株H929-ZPP,实验组为转染慢病毒rLV-hsox2-ZsGreen-Puro的稳转株H929-hsox2。采用Western blot检测各组细胞中SOX2蛋白表达,采用实时荧光定量PCR反应(RT-PCR)测定各组细胞中 *CCR1*、*CCR2* 和 *MCP-1* 基因表达,相应基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 代表。采用酶标仪测定细胞在450 nm处的吸光度值,计算细胞生存率。采用流式细胞仪计算各组细胞的凋亡率。结果 实验组的SOX2蛋白表达为(1.38±0.07),高于空白对照组的(1.04±0.06)和阴性对照组的(0.72±0.07),差异均有统计学意义($P<0.05$);实验组的 *CCR1*、*CCR2* 和 *MCP-1* 基因表达水平分别为(4.37±0.33)、(4.45±0.38)、(10.72±1.14),高于空白对照组的(2.14±0.15)、(2.21±0.17)和(5.17±0.35)和阴性对照组的(1.22±0.10)、(1.16±0.09)和(1.59±0.09),差异均有统计学意义($P<0.05$);实验组的细胞生存率为(40.53±2.21)%,低于空白对照组的(86.85±5.17)%和阴性对照组的(95.07±7.08)%,差异均有统计学意义($P<0.05$);实验组的细胞凋亡率为(58.56±3.25)%,高于空白对照组的(12.15±1.14)%和阴性对照组的(4.93±2.12)%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 *SOX2* 基因在细胞周期中特定时期的高表达会导致骨髓瘤细胞的凋亡。*CCR1*、*CCR2* 和 *MCP-1* 基因参与了骨髓瘤细胞恶性增殖,其在细胞中的异常表达为骨髓瘤细胞提供合适的环境,导致疾病复发和抗凋亡的发生。

【关键词】 骨髓瘤;SOX2蛋白;转录因子;趋化因子;趋化因子受体;生物学特性

【中图分类号】 R733.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)17-2377-04

Molecular mechanism of SOX2 protein and chemotaxis related genes *CCR1*, *CCR2* and *MCP-1* on biological characteristics of myeloma cells. KE Jin-yong, WANG Yu-fang, LU Ya-lan, ZHANG Xin, KE Shan-dong. Department of Hematology, the Central Hospital of Huangshi City, Huangshi 435000, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To reveal the molecular mechanism of SOX2 protein and chemotaxis related genes *CCR1*, *CCR2* and *MCP-1* on the biological characteristics of myeloma cells. **Methods** In this study, myeloma cell line H929 was taken as the research objects. Using random number method, the cells were divided into blank control group (myeloma cell strain H929 without any treatment), negative control group (stable strain H929-ZPP transfected with lentivirus rLV-ZPP) and experimental group (stable transgenic strain H929-hsox2 transfected with lentivirus rLV-hsox2-ZsGreen-Puro). Western blot was used to detect the expression of SOX2 protein in each group. The expression of *CCR1*, *CCR2* and *MCP-1* genes in the cells of each group were detected by real-time quantitative PCR reaction (RT-PCR). The relative expression level of the corresponding genes was represented by $2^{-\Delta\Delta CT}$. The absorbance value of cells at 450 nm was measured by enzyme labelling apparatus, and cell survival rate was calculated. The apoptotic rate of each group was calculated by flow cytometry. **Results** The expression of SOX2 protein in the experimental group was (1.38±0.07), which was significantly higher than (1.04±0.06) in the blank control group and (0.72±0.07) in the negative control group ($P<0.05$). The expression levels of *CCR1*, *CCR2* and *MCP-1* were (4.37±0.33), (4.45±0.38), (10.72±1.14) in the experimental group, significantly higher than (2.14±0.15), (2.21±0.17), (5.17±0.35) in the blank control group and (1.22±0.10), (1.16±0.09), (1.59±0.09) in the negative control group ($P<0.05$). The cell survival rate of the experimental group was (40.53±2.21)%, significantly lower than (86.85±5.17)% in the blank control group and (95.07±7.08)% in the negative control group ($P<0.05$). The apoptosis rate of the experimental group was (58.56±3.25)%, significantly higher than (12.15±1.14)% in the blank control group and (4.93±2.12)% in the negative control group ($P<0.05$). **Conclusion** High expression of *SOX2* gene in the cell cycle will lead to the apoptosis of myeloma cells. *CCR1*, *CCR2* and *MCP-1* genes are involved in the malignant proliferation of myeloma cells. The abnormal expression in the cells provides a suitable environment for myeloma cells, which leads to the recurrence of disease and the occurrence of anti-apoptosis.

【Key words】 Myeloma; SOX2 protein; Transcription factors; Chemokines; Chemokine receptors; Biological characteristics

肿瘤组织细胞的分化程度是影响恶性肿瘤预后的重要因素^[1]。多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种B淋巴细胞的恶性肿瘤,表现为浆细胞在骨髓

中的克隆性异常扩增^[2]。临床症状包括骨痛、贫血、肾功能不全等^[3]。MM细胞的生长和增生主要发生在骨髓内,因此骨髓微环境对于支持MM细胞的生长和存

活具有极其重要的作用^[4]。骨髓瘤细胞通过细胞与细胞、细胞与细胞外基质、蛋白或可溶性调节因子如细胞因子、趋化因子和生长因子等与骨髓微环境产生联系^[5]。SOX2是MM细胞的重要转录因子,决定着细胞分化的方向与速度^[6]。在MM细胞中,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)主要由骨髓基质细胞表达。MCP-1对MM细胞具有趋化性,且能够诱导MM细胞核骨髓基质细胞黏附,是MM发生过程中的关键因子^[7]。趋化因子受体CCR-1和CCR-2是相应趋化因子的配体。本研究旨在探究SOX2蛋白及趋化相关基因*CCR1*、*CCR2*和*MCP-1*影响骨髓瘤细胞生物学特性的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及分组^[9] 以骨髓瘤细胞株H929为研究对象。将H929细胞悬浮于含10%灭活小牛血清的培养基中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个/L。取对数生长期细胞,分别接种于24孔板和96孔板中。然后于37℃、100%湿度、5%CO₂细胞培养箱中,培养24 h,备用。将上述细胞采用随机数表法随机分为空白对照组、阴性对照组和实验组,每组包括20个培养皿。空白对照组不进行任何处理的骨髓瘤细胞株H929,阴性对照组为转染慢病毒rLV-ZPP的稳转株H929-ZPP,实验组为转染慢病毒rLV-hsox2-Zs-Green-Puro的稳转株H929-hsox2。

1.2 SOX2蛋白表达的检测

1.2.1 总蛋白的提取 取各组细胞,采用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次。然后加入蛋白裂解液裂解细胞(RIPA: PMSF=100:1),冰上裂解30 min后,采用超声细胞粉碎仪破碎细胞。使用离心机10 000×g,4℃离心10 min,取上清即为总蛋白,然后-80℃保存备用。蛋白浓度的测定采用BCA法,以牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线。

1.2.2 Western blot 检测SOX2蛋白表达^[10] 将上述总蛋白SDS-PAGE凝胶电泳后,转膜到PVDF膜上。将膜采用5%脱脂奶粉封闭液中,室温封闭40 min。然后分别加入SOX2的一抗和兔抗人SOX2多克隆抗体,孵育过夜和40 min。使用TBST进行漂洗3次后,ECL化学发光法显色。

1.3 *CCR1*、*CCR2*和*MCP-1*基因表达的测定

1.3.1 总RNA提取 取各组细胞,离心后弃去上清,然后PBS洗涤3遍,加入1 mL的Trizol(RNA抽提液),充分裂解细胞,加入0.2 mL氯仿/Trizol(1:1),涡旋震荡15 s后冰上静置5 min,然后采用离心机4℃于10 000×g离心15 min;取0.5 mL上清液,加入0.5 mL预冷的异丙醇,-20℃放置20 min;采用离心机4℃于10 000×g离心15 min;弃去上清后,采用75%乙醇/Trizol(1:1)洗涤3次;0.1% DEPC水充分溶解RNA。使用紫外分光光度仪测定上述RNA溶液在260 nm和280 nm处的吸光度,以A₂₆₀/A₂₈₀比值表征RNA浓度,比值在1.8~2.0之间为纯度合适。

1.3.2 RNA逆转录反应 采用RevertAid™ First-Strand cDNA Synthesis Kit RNA逆转录试剂盒进行RNA逆转录反应。引物设计由广东易锦生物技术有限公司设计合成。然后采用实时荧光定量PCR反应(RT-PCR)测定*CCR1*、*CCR2*和*MCP-1*基因表达。相应基因的相对表达水平用2^{-ΔΔCT}代表^[11]。

1.4 生物学特性

1.4.1 细胞增殖能力^[12] 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,然后取100 μL接种到96孔培养板中,设置4个重复试验。以等量的培养液作为空白对照。采用200 μL的PBS液对96孔板进行边缘封闭作用。将培养板置于37℃、5%二氧化碳培养箱内孵育48 h后加入10 μL/孔CCK工作液。上述条件继续培养2 h。采用酶标仪测定各孔在450 nm处的吸光度值,然后计算细胞生存率。

1.4.2 细胞凋亡水平^[13] 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,采用离心机于2 000 r/min离心10 min(4℃),弃去上清。加入300 μL的1×Binding Buffer重悬细胞后,用5 μL的Annexin V-FITC避光室温(25±2)℃标记15 min,然后采用5 μL的PI溶液避光标记5 min,最后加入200 μL的Binding Buffer,上流式细胞仪进行流式检测,并根据结果计算细胞凋亡率。

1.5 统计学方法 应用SPSS20.0统计软件(美国IBM公司)分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SOX2蛋白表达 实验组的SOX2蛋白表达高于空白对照组和阴性对照组,三组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 三组细胞的SOX2蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	SOX2蛋白表达水平
空白对照组	1.04±0.06 ^b
阴性对照组	0.72±0.07 ^a
实验组	1.38±0.07 ^{ab}
F值	16.51
P值	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与阴性对照组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 *CCR1*、*CCR2*和*MCP-1*基因表达 实验组的*CCR1*、*CCR2*和*MCP-1*基因表达水平明显高于空白对照组和阴性对照组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 三组细胞的*CCR1*、*CCR2*和*MCP-1*基因表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>CCR1</i> 基因	<i>CCR2</i> 基因	<i>MCP-1</i> 基因
空白对照组	2.14±0.15 ^b	2.21±0.17 ^b	5.17±0.35 ^b
阴性对照组	1.22±0.10 ^a	1.16±0.09 ^a	1.59±0.09 ^a
实验组	4.37±0.33 ^{ab}	4.45±0.38 ^{ab}	10.72±1.14 ^{ab}
F值	18.20	22.15	25.46
P值	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与阴性对照组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 生物学特性 实验组的细胞生存率低于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);实验组的细胞凋亡率高于空白对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 三组细胞的生存率和凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞生存率(%)	细胞凋亡率(%)
空白对照组	86.85±5.17 ^a	12.15±1.14 ^a
阴性对照组	95.07±7.08 ^a	4.93±2.12 ^a
实验组	40.53±2.21 ^{ab}	58.56±3.25 ^{ab}
F值	23.19	28.63
P值	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与阴性对照组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

多发性骨髓瘤(MM)是一种B淋巴细胞的恶性肿瘤,MM患者通常以骨痛起病。机体内表现为浆细胞在骨髓中的克隆性异常扩增^[14]。骨髓瘤细胞通过细胞与细胞、细胞与细胞外基质,蛋白或可溶性调节因子如细胞因子、趋化因子和生长因子等,与骨髓微环境产生联系^[15]。SOX2是MM细胞的重要转录因子,决定着细胞分化的方向与速度^[16]。在MM细胞中,MCP-1主要由骨髓基质细胞表达,对MM细胞具有趋化性,且能够诱导MM细胞核骨髓基质细胞黏附,是MM发生过程中的关键因子。趋化因子受体CCR-1和CCR-2是相应趋化因子的配体,在MM细胞表面CCR-1和CCR-2与相应的配体(MIP-1a和MCP-1)相互作用^[17]。趋化因子受体CCR-1和CCR-2的缺失会导致MM细胞在循环中的扩散^[18]。

本研究显示,转染慢病毒 rLV-ZPP 的稳转株 H929-ZPP(0.72)显著低于空白对照组,转染慢病毒 rLV-hsox2-ZsGreen-Puro 的稳转株 H929-hsox2 的 SOX2 蛋白表达增高至 1.38。转染慢病毒 rLV-ZPP 的稳转株 H929-ZPP (95.07%)的细胞生存率明显高于空白对照组,转染慢病毒 rLV-hsox2-ZsGreen-Puro 的稳转株 H929-hsox2 的细胞生存率明显降低至 40.53%。转染慢病毒 rLV-ZPP 的稳转株 H929-ZPP 的细胞凋亡率低于空白对照组,即转染慢病毒 rLV-hsox2-ZsGreen-Puro 的稳转株 H929-hsox2 的细胞凋亡率明显升高。这说明 SOX2 在骨髓瘤细胞的发生和发展过程中具有重要作用。具体体现在 SOX2 对骨髓瘤细胞的增殖出现明显抑制现象,且呈现促进骨髓瘤细胞的细胞凋亡。这一结果进一步说明了 SOX2 基因在细胞周期中特定时期的高表达会导致骨髓瘤细胞的凋亡。

趋化因子 CCR1 和 CCR2 可通过结合细胞膜上相应的趋化因子受体(MIP-1a 和 MCP-1)发挥作用。本研究发现,转染慢病毒 rLV-ZPP 的稳转株 H929-ZPP 明显低于空白对照组,转染慢病毒 rLV-hsox2-Zs-

Green-Puro 的稳转株 H929-hsox2 的 SOX2 蛋白表达显著性增高。该结果说明,骨髓瘤细胞中存在多种趋化及趋化因子,对其趋化迁移发挥着重要作用。在 MM 细胞表面 CCR-1 和 CCR-2 与相应的配体(MIP-1a 和 MCP-1)相互作用。趋化因子受体 CCR-1 和 CCR-2 的缺失会导致 MM 细胞在循环中的播散。

综上所述,SOX2 基因在细胞周期中特定时期的高表达会抑制骨髓瘤细胞的增殖和导致骨髓瘤细胞的凋亡^[19]。CCR1、CCR2 和 MCP-1 基因参与了骨髓瘤细胞恶性增殖,其在细胞中的异常表达为骨髓瘤细胞提供合适的环境,导致疾病复发和抗凋亡的发生^[20]。

参考文献

- [1] 葛繁梅,白庆成,高延慧,等.三氧化二砷对多发性骨髓瘤细胞生物学特性的影响[J].基础医学与临床,2008,28(2):172-176.
- [2] 肖凤君.KAI1对骨髓瘤细胞生物学特性的影响及其机制研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2010.
- [3] Rajkumar SV, Vincent. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management [J]. American Journal of Hematology, 2016, 91(7): 719-734.
- [4] Porcel JM. Pleural effusion in multiple myeloma [J]. Revista Clínica Española, 2018, 218(2): 66-67.
- [5] Palumbo A, Cavallo F, Gay F, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma [J]. N Engl J Med, 2016, 371(10): 895-905.
- [6] 吴玉姣.骨髓瘤细胞株 H929 的 SOX2 蛋白及趋化相关基因 CCR1、CCR2、MCP-1 等转录受白介素-1 β 预处理的骨髓间充质干细胞影响[D].镇江:江苏大学,2016.
- [7] 吴玉姣,费小明,叶炜,等.白细胞介素 1 β 预处理骨髓间充质干细胞可影响骨髓瘤细胞株干细胞基因及趋化因子受体基因的表达[J].中国组织工程研究,2017,21(1):54-59.
- [8] 徐毅.转录因子 SOX2、OCT4 在胃癌组织中的表达及过表达 SOX2 对胃癌细胞生物学特性影响的研究[D].福州:福建医科大学,2015.
- [9] Etsuko T, Hidehiko A, Vadim SA, et al. Biological evaluation of both enantiomers of fluoro-thalidomide using human myeloma cell line H929 and others [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182152.
- [10] Kobold S, Tams S, Luetkens T, et al. Patients with multiple myeloma develop SOX2-specific autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation [J]. Clinical & Developmental Immunology, 2011, 2011(15): 302145.
- [11] Hashida H. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion[J]. Nature Genetics, 2007, 39(4): 467-470.
- [12] 陶怡,戚春建,张学光. EB 病毒感染对骨髓瘤细胞生物学特性的影响[J].现代免疫学,2005,25(6):476-480.
- [13] Mäkilä K1, Kaukola T, Tuimala J, et al. Umbilical artery chemokine CCL16 is associated with preterm preeclampsia and fetal growth restriction [J]. Cytokine, 2012, 60(2): 377-384.
- [14] Büyükkaramikli NC, de Groot S, Fayter D, et al. Pomalidomide with Dexamethasone for treating relapsed and refractory multiple myeloma previously treated with lenalidomide and bortezomib: an evidence review group perspective of an NICE single technology appraisal [J]. Pharmacoeconomics, 2018, 36(2): 145-159.
- [15] 朱步东,任军,王湘漪,等.多发性骨髓瘤骨髓间充质干细胞生物学特性分析[J].中国实验血液学杂志,2006,14(6):1138-1142.

氧合指数等相关指标及血管外肺水指数 对急性呼吸窘迫综合征患者预后的判断价值

陈智峰, 贵春梅

(常德市第一人民医院重症医学科, 湖南 常德 415000)

【摘要】 目的 探讨氧合指数等相关指标及血管外肺水指数对急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者预后的判断价值。方法 对2016年1月至2017年4月间常德市第一人民医院ICU收治的68例ARDS患者的临床资料进行回顾性分析,依据预后将其分为存活组50例和死亡组18例,对其入住ICU之后的氧合指数等相关指标及血管外肺水指数的变化进行对比分析。结果 死亡组患者的APACHE II评分为(33.29±8.53)分,明显高于存活组的(20.17±6.81)分,差异有统计学意义($P<0.05$);存活组患者第2天及第3天的血管外肺水指数及CI指标水平较第1天呈下降趋势,且明显低于同时间段死亡组水平,差异均有统计学意义($P<0.05$);而存活组患者氧合指数指标在第2天及第3天时较第1天呈上升趋势,且明显高于同时间段死亡组水平,差异均有统计学意义($P<0.05$);血管外肺水指数与氧合指数之间呈负相关性($r=-0.91, P=0.001$),而与CVP之间无相关性($r=-0.06, P>0.05$)。结论 对氧合指数等相关指标及血管外肺水指数进行动态监测,在一定程度上有利于对急性呼吸窘迫综合征患者的预后及病情进行判定,具有重要的临床价值。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征;氧合指数;血管外肺水指数;预后价值

【中图分类号】 R442.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)17-2380-03

Value of oxygenation index and other related indicators and extravascular lung water index in predicting the prognosis of patients with acute respiratory distress syndrome. CHEN Zhi-feng, GUI Chun-mei. Department of Intensive Care, the First People's Hospital of Changde City, Changde 415000, Hunan, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the value of oxygenation index and related indexes and extravascular lung water index in predicting the prognosis of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods** The clinical data of 68 patients with ARDS were retrospectively analyzed, who were admitted to the First People's Hospital of Changde City from January 2016 to April 2017 were divided into survival group ($n=50$) and death group ($n=18$) according to their prognosis. Comparative analysis was conducted on changes of oxygenation index and other indicators and extravascular lung water index after their admission to ICU. **Results** The APACHE II score of the patients in the death group was (33.29±8.53), significantly higher than (20.17±6.81) in the survival group ($P<0.05$). The level of the extravascular lung water index and CI index on the 2nd and 3rd day of the survival group showed a downward trend compared with the first day, and were significantly lower than the level of the death group at the same time ($P<0.05$); while the oxygenation index of the surviving group showed an upward trend on the 2nd and 3rd day than on the 1st day, and were significantly higher than the level of the death group at the same time; all differences were statistically significant ($P<0.05$). Extravascular lung water index was negatively correlated with oxygenation index ($r=-0.91, P=0.001$), but had no correlation with CVP ($r=-0.06, P>0.05$). **Conclusion** Dynamic monitoring of oxygenation index and other related indicators and extravascular lung water index is helpful to determine the prognosis and condition of patients with acute respiratory distress syndrome to a certain extent, which has important clinical value.

【Key words】 Acute respiratory distress syndrome; Oxygenation index; Extravascular lung water index; Prognostic value

基金项目:湖南省卫生计生委科研计划课题医疗科研公益项目(编号:B2017189)

通讯作者:E-mail: czf002288@163.com

- [16] Card DA, Hebban PB, Li L, et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells [J]. Molecular & Cellular Biology, 2008, 28(20): 6426-6438.
- [17] Nomiya H, Hieshima K, Nakayama T, et al. Human CC chemokine liver-expressed chemokine/CCL16 is a functional ligand for CCR1, CCR2 and CCR5, and constitutively expressed by hepatocytes [J]. International Immunology, 2001, 13(13): 1021-1029.
- [18] 裴仁治, 唐善浩, 马俊霞, 等. 趋化因子受体与多发性骨髓瘤疗效关系的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(1): 73-75.

- [19] Kobold S, Luetkens T, Bartels B. M, et al. Longitudinal analysis of tetanus-and influenza-specific IgG antibodies in myeloma patients [J]. Clinical & Developmental Immunology, 2016, 2012(2012): 134081-134089.
- [20] Vandyke K, Zeissig MN1, Hewett DR, et al. HIF-2 α promotes dissemination of plasma cells in multiple myeloma by regulating CXCL12/CXCR4 and CCR1 [J]. Cancer Research, 2017, 77(20): 5452-5460.

(收稿日期:2018-04-23)