文章编号:1000-5404(2009)10-0879-04

论著

不同来源基质细胞对骨髓瘤KM3细胞增殖和凋亡的影响

高 力,张 曦,高 蕾,陈幸华 (第三军医大学新桥医院血液科,重庆 400037)

摘 要:目的 观察人脐血基质细胞及骨髓瘤患者骨髓基质细胞对骨髓瘤KM3细胞生物学特性的作用。**方法** 体外分离培养骨髓瘤骨髓基质细胞和人脐血源基质细胞,与骨髓瘤KM3细胞共培养。采用扫描电镜观察共培养后基质细胞和KM3细胞的位相关系;应用CCK-8、PI染色流式细胞仪和Annexin V/PI双标法检测不同培养条件下KM3细胞的增殖、细胞周期和凋亡率。**结果** 人脐血基质细胞比骨髓瘤患者骨髓基质细胞有更强的抑制KM细胞增殖的作用;共培养后骨髓瘤患者骨髓基质细胞使KM3细胞阻滞于G_0/G_1期[(59.70±1.28)%],人脐血基质细胞使S期的KM3细胞比例增高[(46.07±2.46)%];KM3/MM-BMSCs组KM3细胞凋亡率为(3.26±0.12)%明显低于KM3/hUCBDSCs组KM3细胞凋亡率(4.76±0.12)%($P<0.01$);KM3/MM-BMSCs组KM3细胞Bax mRNA的表达较KM3/hUCBDSCs组明显下降($P<0.01$);KM3/hUCBDSCs组KM3细胞Bcl-2 mRNA的表达较KM3细胞悬浮培养组下降($P<0.05$),KM3/MM-BMSCs组KM3细胞Bcl-2 mRNA的表达则明显升高,为悬浮培养组的1.982倍($P<0.01$)。**结论** 骨髓瘤基质细胞微环境抑制骨髓瘤细胞凋亡和死亡;而人脐血源基质细胞有更强的抑制骨髓瘤细胞增殖的作用,并促进其凋亡。

关键词: 多发性骨髓瘤;人脐血基质细胞;骨髓基质细胞;增殖;凋亡
中图法分类号: R73-362;R730.23;R733.3 **文献标识码:** A

Effect of stromal cells derived from different origins on proliferation and apoptosis of KM3 cells

GAO Li, ZHANG Xi, GAO Lei, CHEN Xing-hua (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of the human umbilical cord blood-derived stromal cells (hUCBDSCs) and multiple myeloma bone marrow stromal cells (MM BMSCs) on the biological characteristics of KM3 cells. Methods After KM3 cells were co-cultured with hUCBDSCs or MM BMSCs, the proliferation, cell cycle and the apoptotic rate were determined by growth curve plotting and flow cytometry respectively. Real-time Q-PCR was used to measure the mRNA expressions of Bcl-2 and Bax. Results As compared with MM BMSCs, hUCBDSCs markedly suppressed the proliferation of the KM3 cells. KM3 cells in the KM3/MM-BMSCs co-culture group were arrested in G_0/G_1 phrase, while KM3 cells in the KM3/hUCBDSCs co-culture group predominantly in S phrase. The apoptotic rate of KM3 cells in the KM3/ hUCBDSC co-culture group were higher than that in the KM3/MM-BMSCs co-culture group. Conclusion In comparison with MM BMSCs, hUCBDSCs inhibit the proliferation of KM3 cells and promote the apoptosis.

Key words: multiple myeloma; human umbilical cord blood-derived stromal cells; bone marrow stromal cells; proliferation; apoptosis

骨髓造血微环境在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的发病及瘤细胞的增殖、分化、凋亡中起重要作用,而骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)作为骨髓造血微环境的重要组成成分,通过与骨髓瘤细胞的直接密切接触或释放各种细胞因子,激活细胞内信号转导途径,从而影响瘤细胞的生长、存活[1]。基质细胞是造血细胞赖以生存的造血微环境,在造血调控中发挥重要作用,同时也是细胞治疗和基因治疗中的一种理想靶细胞[2]。基质细胞除广泛分

基金项目: 国家自然科学基金(30670890);重庆市医学重点学科建设基金(2006C028)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670890) and the Foundation for the Key Medical Subjects of Chongqing (2006C028)

作者简介: 高 力,女,河南省郑州市人,博士研究生,医师,主要从事造血微环境与血液系统疾病方面的研究。电话:(023)68774309,E-mail:grafwb@163.com
通信作者: 陈幸华,电话:(023)68755609

收稿日期: 2009-02-10;**修回日期:** 2009-03-03

布于骨髓内,也存在于脐血中[3]。本研究观察了在不同基质细胞中骨髓瘤 KM3 细胞的体外增殖,了解和初步探讨不同基质细胞对骨髓瘤 KM3 细胞的影响,旨在进一步了解不同造血微环境对骨髓瘤细胞的作用,为 MM 特别是复发、难治 MM 的治疗寻找新的靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

15 份脐血取自本院、西南医院妇产科健康育龄产妇足月顺产或剖腹产婴儿脐带,肝素抗凝,脐血采集量为 70 ~ 120 ml。20 例骨髓瘤患者骨髓标本均为本院门诊或住院患者,年龄 25 ~ 70 岁,平均 55 岁。15 例初治和 5 例复发、难治的 MM 患者。IgG 型 14 例,IgA 型 4 例,轻链型 2 例均符合国内诊断标准;按最新的多发性骨髓瘤国际分期系统(ISS)分期,Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 7 例,Ⅲ期 8 例。多发性骨髓瘤 KM3 细胞株由第二军医大学长征医院侯建教授惠赠。

1.2 主要试剂

胎牛血清、马血清、RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司),MSCM 培养基(美国 Sciencell Research Laboratories),1.077 g/ml Ficoll(天津灏洋生物制品公司),Annexin V 凋亡试剂盒(美国 Coulter 公司),CCK8 试剂盒(日本 Dojindo 公司),SYBR Prime-Script RT-PCR Kit(TaKaRa 公司),Bcl-2 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 分为 3 组:KM3 细胞悬浮培养组,KM3 细胞与 MM 患者骨髓基质细胞共培养组(KM3/MM-BMSCs 组),KM3 细胞与人脐血源基质细胞(hUCBDSCs)共培养组(KM3/hUCBDSCs 组)。

1.3.2 脐血基质细胞分离培养 所有标本在采集后 6 h 内分选。脐带血与 6% 明胶等比例混合,室温静置 15 ~ 30 min,吸取血浆,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,悬浮于培养基中。按 2∶1 体积加至 Percoll 表面(比重 1.077 g/L),4 ℃ 2 000 r/min 离心 20 min。吸取白膜层重新悬浮即得到脐血单个细胞悬液。采用吸附单克隆抗体-磁珠分离系统(MACS)进行分离[4]。流式细胞仪测定其纯度。将 $CD34^+$ 细胞的细胞数调为 $5 \times 10^5 ml^{-1}$,悬于 MSCM 培养基中。48 h 后首次换液,之后每 5 天换液 1 次。

1.3.3 骨髓基质细胞的培养 抽取新鲜骨髓液 2 ~ 4 ml,应用 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液密度梯度法分离单个核细胞,以 $1 \times 10^6\ ml^{-1}$ 的细胞数接种于含 10% FBS、10% 马血清、10^{-6} mol/L 的氢化可的松的 RPMI1640 培养液中。48 h 首次换液除去非贴壁细胞,此后每 3 ~ 5 天换液。

1.3.4 KM3 细胞与基质细胞共培养 原代基质细胞常规传代后,融合至 80% 时加入 $1 \times 10^4\ ml^{-1}$ 对数生长期的 KM3 细胞。

1.3.5 不同条件下 KM3 细胞生长曲线的绘制 取生长良好 hUCBDSCs 和 hBMSCs,0.25% 胰酶消化后,制成单细胞悬液,调节细胞数为 $1 \times 10^5\ ml^{-1}$,接种到 96 孔板中(A、B 组,培养液;C、D 组,hUCBDSCs;E、F 组,hBMSCs),200 μl/孔。细胞达 80% 融合,弃上清。A、C、E 组加入 100 μl RPMI1640 + 10% FBS,B、D、F 组加入 100 μl $2 \times 10^4\ ml^{-1}$ KM3 细胞,每组每个时相点接种 3 孔。自培养第 2 天开始每天于固定时相点加入 10 μl CCK-8 试剂,37 ℃,5% CO_2 培养箱内培养 4 h,终止培养,640 型分光光度计检测每孔吸光度值[$D(450)$]。

$$D(450)_{KM3} = D(450)_B - D(450)_A$$

$$D(450)_{KM3/hUCBDSCs} = D(450)_D - D(450)_C$$

$$D(450)_{KM3/hBMSCs} = D(450)_F - D(450)_E$$

3 孔吸光度取平均值,以培养时间(d)为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.3.6 不同条件下 KM3 细胞周期的测定 收集悬浮培养和分别与 hUCBDSCs 和 hBMSCs 共培养 3 d 的 KM3 细胞,70% 乙醇固定后送流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.7 不同条件下 KM3 细胞凋亡率的测定 收集悬浮培养和分别与 hUCBDSCs 和 hBMSCs 共培养 3 d 的 KM3 细胞,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.8 Real-time quantitative RT-PCR 法检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达 收集各组 KM3 细胞,常规方法抽提总 RNA,逆转录为 cDNA。以 GAPDH 为内参,采用荧光 PCR 仪进行相对定量检测各组 KM3 细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达。实验组目的基因的表达对于对照组的变化倍数 $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$,Ct 是检测到的荧光信号强度值,$\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH}$,$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{共培养组} - \Delta Ct_{悬浮培养组}$。

Bcl-2 上游 5′-CTGGTGGGAGCTTGCATCAC-3′,下游 5′-ACAGCCTGCAGCTTTGTTTC-3′,长度 180 bp;Bax 上游 5′-GCT-GTTGGGCTGGATCCAAG-3′,下游 5′-TCAGCCCATCTTCTTCCA-GA-3′,长度 228 bp;GAPDH 上游 5′-AGCCACATCGCTCAGA-CAC-3′,下游 5′-GCCCAATACGACCAAATCC-3′,长度 87 bp。扩增条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s→65 ℃ 30 s(40 个循环),72 ℃ 45 s(收集荧光信号)。

1.4 统计学处理

细胞周期和凋亡率的检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用 SPSS 10.0 统计软件对各组 KM3 细胞生长曲线、细胞周期和凋亡率的结果进行 t 检验。

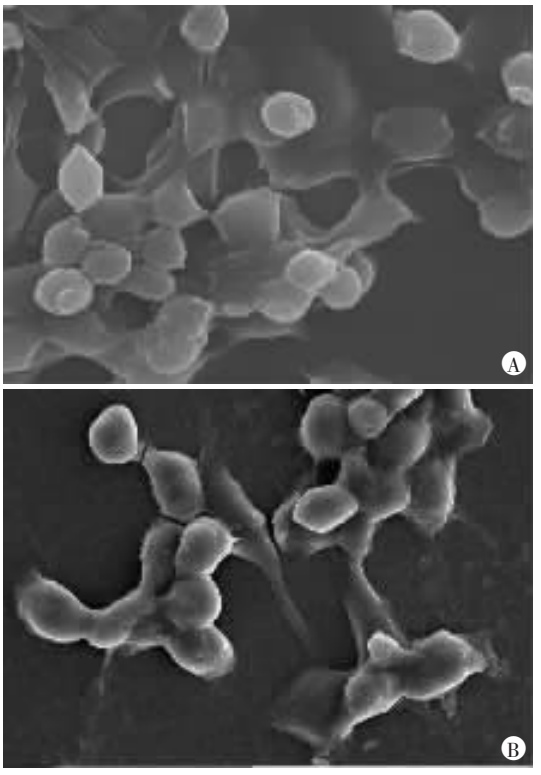
2 结果

2.1 形态学观察

KM3 细胞为悬浮生长的球形细胞,大小不一,散在分布;而 KM3 细胞与 hUCBDSCs 和 hBMSCs 共培养后可通过伪足黏附于基质细胞表层或龛于基质细胞融合所形成的“网眼”中(图 1)。

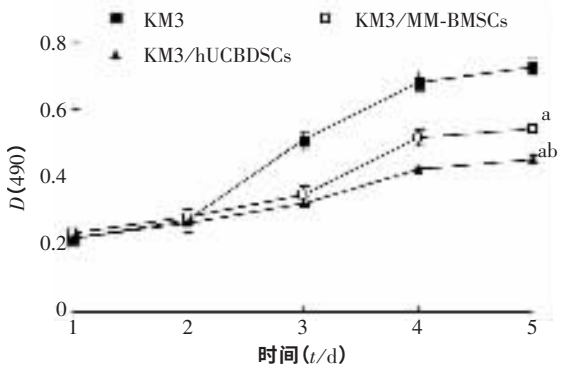
2.2 不同培养条件下 KM3 细胞生长曲线

3 组 KM3 细胞生长曲线变化趋势类似(图 2),在培养 24 h 内细胞增殖不明显,处于潜伏适应期,2 ~ 4 d KM3 细胞进入对数生长期,4 d 以后达到平台期。培养 24 h 以后,3 组的增殖速度出现差异。MM-BMSCs 与 hUCBDSCs 和 KM3 细胞共培养对其增殖有抑制作用($P < 0.01$),而 hUCBDSCs 对 KM3 细胞增殖的抑制作用强于 MM-BMSCs ($P < 0.05$)。



A:KM3 细胞与 hUCBDSCs 共培养 3 d;B:KM3 细胞与 hBMSCs 共培养 3 d

图 1　扫描电镜观察 KM3 细胞与基质细胞共培养后位相关系(×2 000)



a: $P<0.01$,与 KM3 比较;b: $P<0.05$,与 KM3/MM-BMSCs 比较

图 2　不同培养条件下 KM3 细胞生长曲线

2.3　不同培养条件下 KM3 细胞的细胞周期

与 KM3 细胞悬浮培养组比较,KM3/MM-BMSCs 组处于 G_0/G_1 期的 KM3 细胞比例增高($P<0.05$),S、G_2/M 期细胞比例降低($P<0.05$);KM3/hUCBDSCs 组 KM3 细胞处于 G_0/G_1 期的细胞比例无统计学差异($P>0.05$),S 期的细胞比例明显增高($P<0.05$),G_2/M 期的细胞比例明显减低($P<0.05$);KM3/MM-BMSCs 组和 KM3/hUCBDSCs 组相比,前者处于 G_0/G_1 期细胞比例明显增高($P<0.05$),后者 S 期细胞比例明显增高而 G_2/M 期细胞比例降低($P<0.05$)。在各组 KM3 细胞 G_0/G_1 期前均可见一亚二倍体凋亡峰。见表 1。

2.4　不同培养条件下 KM3 细胞的凋亡率

各组均存在凋亡的 KM3 细胞,3 组之间有显著差异($P<0.05$)。KM3/MM-BMSCs 组 KM3 细胞凋亡率最低为(3.26 ± 0.12)%($P<0.01$),KM3 悬浮组的凋亡率为(4.27 ± 0.27)%低于 KM3/hUCBDSCs 组 KM3 细胞凋亡率(4.76 ± 0.12)%($P<0.05$)。

表 1　各组 KM3 细胞周期中各阶段细胞百分比(%,$n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
KM3	38.07 ± 1.55	23.06 ± 0.95	38.87 ± 2.96
KM3/MM-BMSCs	59.70 ± 1.28[a]	16.12 ± 0.75[a]	24.18 ± 0.93[a]
KM3/hUCBDSCs	39.97 ± 1.96[b]	46.07 ± 2.46[ab]	13.96 ± 0.70[ab]

a: $P<0.05$, 与 KM3 比较; b: $P<0.05$, 与 KM3/MM-BMSCs 比较

2.5　Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达

KM3/hUCBDSCs 组和悬浮培养组 KM3 细胞 Bax mRNA 的表达无明显差异($P>0.05$),而 KM3/MM-BMSCs 组 KM3 细胞 Bax mRNA 的表达明显下降,为 KM3/hUCBDSCs 组的 52.5%($P<0.01$);KM3/hUCBDSCs 组 KM3 细胞 Bcl-2 mRNA 的表达下降,为悬浮培养组的 62.6%($P<0.05$),KM3/MM-BMSCs 组 KM3 细胞 Bcl-2 mRNA 的表达则明显升高,为悬浮培养组的 1.982 倍($P<0.01$)。

3　讨论

多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)是一种恶性浆细胞增殖性疾病,占血液系统恶性肿瘤的 10%,目前仍不可治愈。骨髓瘤细胞由黏附分子介导,与骨髓基质细胞及细胞外基质蛋白紧密黏附在一起,使其定居在骨髓微环境中[5]。骨髓基质细胞与骨髓瘤的发生和病理过程密切相关,其通过黏附和分泌细胞因子调节骨髓瘤细胞生长、生存、增殖、耐药和迁移[6-8],并促进破骨细胞的生长[9]。近年来,造血微环境在骨髓瘤发生发展中的作用越来越得到重视,已成为治疗 MM 特别是复发、难治 MM 的新靶位。有研究表明骨髓瘤患者的骨髓间充质干细胞是异常的,和正常人相比有 145 种基因的表达不同[5]。能否通过改造骨髓瘤细胞赖以生存的病态骨髓造血微环境以促进瘤细胞的清除?本课题组前期研究在传统经典 Dexter 基质细胞培养基础上,在国内外率先分离、培养出人脐血源基质细胞:成熟的人脐血源基质细胞包括"成纤维样"细胞,"巨噬样"细胞和"小圆样"细胞;非特异性酯酶和糖原染色阳性,过氧化物酶阴性,碱性磷酸酶部分阳性;CD29、CD30、CD31、CD44、CD50、CD68、CD106、Fn、Lm 阳性;CD34、CD45 阴性;分泌 TPO、SCF、GM-CSF 和 SDF-1 等细胞因子;提示人脐血源基质细胞具备造血基质细胞的基本特征和造血调控的物质基础[4]。而同骨髓基质细胞相比,人脐血源基质细胞作为一种新的造血微环境有来源方便、造血干细胞更原始、易于储存和免疫原性弱的特点,因此深入研究骨髓瘤 BMSCs 和 hUCBDSCs 对骨髓瘤细胞增殖、凋亡等生物学特性的影响及其机制,可为探索骨髓瘤治疗的新手段奠定基础。

KM3 细胞是从中国多发性骨髓瘤患者中分离的

非 IL-6 依赖的骨髓瘤细胞株,是体外研究骨髓瘤细胞增殖和调控较理想的模型。本实验体外分离骨髓瘤患者 BMSCs 和 hUCBDSCs 与人多发性骨髓瘤 KM3 细胞株共培养,倒置显微镜和扫描电镜观察可见 KM3 细胞通过伪足黏附于基质细胞表层,或龛于基质细胞融合所形成的"网眼"中。本实验结果显示共培养后 MM-BMSCs 与 hUCBDSCs 对 KM3 细胞增殖均有抑制作用,而 hUCBDSCs 对 KM3 细胞增殖的抑制作用强于 MM-BMSCs。Correl 等[5]研究表明 MM 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)相比正常 BMSCs 对骨髓瘤 MOLP-6 细胞有促进细胞增殖的作用。

相对于悬浮培养的 KM3 细胞,MM-BMSCs 作为滋养层使 KM3 细胞阻滞于 G_0/G_1 期,抑制其增殖、自发凋亡和死亡,KM3 细胞的凋亡率也明显低于 KM3 悬浮培养组和 KM3/hUCBDSCs 组。Nefedova 等[10]在实验中也发现骨髓瘤细胞与骨髓基质细胞共培养后抑制了骨髓瘤细胞 DNA 合成,阻滞骨髓瘤细胞处于 G_1 期。而 hUCBDSCs 使较多 KM3 细胞阻滞于 S 期,G_2/M 期减少,从而抑制了细胞增殖[11];另外 KM3/hUCBDSCs 组的 G_0/G_1 期 KM3 细胞明显低于 KM3/MM-BMSCs 组,有可能对化疗药物较敏感。提示 MM-BMSCs 和 hUCBDSCs 抑制 KM3 细胞增殖的机制可能不同。

细胞凋亡(apoptosis)是特殊的细胞死亡方式,是在基因控制下的主动死亡,有生理性的也有非生理性的,是保证个体正常发育成熟和维持生理过程中不可缺少的组成内容,也是各种癌症的重要发病机制。研究发现,部分骨髓瘤患者的瘤细胞增殖指数并不增高,从而揭示了骨髓瘤细胞的积累还与其凋亡受阻有关[12]。Bcl-2 家族成员在细胞凋亡的基因调控过程中起着至关重要的作用[13], Bcl-2 家族分为两类:一类是抗凋亡基因,代表基因是 Bcl-2;另一类是促凋亡基因,代表基因是 Bax。Bax 形成同源二聚体诱导凋亡,但随着 Bcl-2 蛋白表达量上升,越来越多的 Bax 二聚体分开,与 Bcl-2 形成比 Bax-Bax 更稳定的异源二聚体抑制凋亡,细胞内 Bcl-2 与 Bax 的比例调节凋亡发生[14]。本实验结果显示与 MM-BMSCs 共培养的 KM3 细胞 Bcl-2 mRNA 的表达量明显高于和 hUCBDSCs 共培养的 KM3 细胞,而 Bax mRNA 的表达量则明显低于和 hUCBDSCs 共培养的 KM3 细胞。提示共培养后 2 组 KM3 细胞凋亡率的变化可能与 Bcl-2 和 Bax 有关。

综上所述,骨髓瘤基质细胞微环境抑制骨髓瘤细胞凋亡和死亡,有利于其生存,逃避免疫监视和化疗药物的杀伤;而人脐血源基质细胞可抑制骨髓瘤细胞增殖和增加化疗药物的敏感性,提示从造血微环境为切入点,通过改造多发性骨髓瘤细胞赖以生存的病态骨髓造血微环境探索清除多发性骨髓瘤细胞的有效方法是可行的。

参考文献:

[1] Pui C H, Evans W E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia[J]. N Engl J Med, 2006, 354(2): 166 - 178.

[2] Leone G, Sica S, Voso M T, *et al*. Treatment of acute leukaemias with monoclonal antibodies: current status and future prospects[J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2006, 4(1): 33 - 52.

[3] Direkze N C, Jeffery R, Hodivala-Dilke K, *et al*. Bone marrow-derived stromal cells express lineage-related messenger RNA species[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1265 - 1269.

[4] Gao L, Chen X H, Zhang X, *et al*. Human umbilical cord blood-derived stromal cell, a new resource of feeder layer to expand human umbilical cord blood $CD34^+$ cells *in vitro*[J]. Blood Cells Mol Dis, 2006, 36(2): 322 - 328.

[5] Correl J, Mahtouk K, Attal M, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma[J]. Leukemia, 2007, 21(5): 1079 - 1088.

[6] Anderson K C. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions[J]. Exp Hematol, 2007, 35(4 Suppl 1): 155 - 162.

[7] Wang L H, Yang X Y, Zhang X, *et al*. Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPARgamma cross talk with NF-kappaB and C/EBP[J]. Blood, 2007, 110(13): 4373 - 4384.

[8] Ge Y, Zhan F, Barlogie B, *et al*. Fibroblast activation protein (FAP) is upregulated in myelomatous bone and supports myeloma cell survival[J]. Br J Haematol, 2006, 133(1): 83 - 92.

[9] Mitsiades C S, Mitsiades N S, Munshi N C, *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(11): 1564 - 1573.

[10] Nefedova Y, Landowski T H, Dalton W S. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cells contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms[J]. Leukemia, 2003, 17(6): 1175 - 1182.

[11] Sun C, Hu Y, Liu X, *et al*. Resveratrol downregulates the constitutional activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2006, 165(1): 9 - 19.

[12] Mitsiades N, Mitsiades C S, Poulaki V, *et al*. Biologic sequelae of nuclear factor-κB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications[J]. Blood, 2002, 99 (11): 4079 - 4086.

[13] Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, *et al*. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. Neuroimmunomodulation, 2006, 13(2): 63 - 68.

[14] 沈珠甫, 杨丽霞, 郭瑞威, 等. 神经酰胺对人内皮细胞凋亡及 bax、bcl-2 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 957 - 959.

(编辑 栾 嘉)