

## 肿瘤坏死因子预处理的骨髓间充质干细胞对骨髓瘤细胞株 H929 集落形成能力及 miRNA-15a/16 等相关基因表达的影响

徐欣欣<sup>1</sup>, 夏雷<sup>1</sup>, 杨娇<sup>1</sup>, 汤郁<sup>2</sup>, 陆化<sup>3</sup>, 朱彦<sup>1</sup>, 费小明<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 江苏大学附属医院血液科, <sup>2</sup> 风湿科, 江苏 镇江 212001; <sup>3</sup> 南京医科大学第一附属医院血液科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)表现有骨破坏和骨髓微环境的异常。近来发现 MM 患者的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)有多种异常。既往研究发现经肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  预处理的骨髓 MSC 成骨分化潜能增强。本实验进一步研究 TNF- $\alpha$  预处理的骨髓与骨髓瘤细胞株 H929 共培养后, 对 H929 的影响。方法: 骨髓 MSC 经 TNF- $\alpha$  单次(T+1 组)或多次预处理(T+7 组)后, 与 H929 直接共培养 3 d 后, 收集 H929 细胞分别检测其集落形成能力, 定量 RT-PCR 检测 POU5F1、SOX2 和 NANOG 基因, 以及微小 RAN(miRNA)-15a/16 的表达水平, 并与对照组比较。结果: 各组 H929 细胞均有 POU5F1、SOX2、NANOG 和 miRNA-15a/16 的检出。与对照组和 T+1 组相比较, T+7 组的 POU5F1 和 SOX2 基因的表达水平下降且有统计学意义( $P < 0.05$ ); miRNA-15a/16 表达水平均上升且有统计学意义( $P < 0.05$ ); CFU 数减少且有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 经 TNF- $\alpha$  多次预处理的骨髓 MSC 与 MM 细胞相互作用后, 抑制 MM 细胞作用更加明显, 具体机制有待进一步研究。

**[关键词]** 多发性骨髓瘤; 间充质干细胞; TNF- $\alpha$ ; 骨髓微环境

**[中图分类号]** R733.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)02-178-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150208

## Bone marrow derived mesenchymal stem cells co-cultured with tumor necrosis factor suppress myeloma cell line H929 malignant behavior

Xu Xinxin<sup>1</sup>, Xia Lei<sup>1</sup>, Yang Jiao<sup>1</sup>, Tang Yu<sup>2</sup>, Lu Hua<sup>3</sup>, Zhu Yan<sup>1</sup>, Fei Xiaoming<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Hematology, <sup>2</sup>Department of Rheumatology, Affiliated Hospital of Jiansu University, Zhenjiang 212001; <sup>3</sup>Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** In our previous study, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  was showed to enhance the osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells(MSC). In this study, we aimed to investigate what effects of TNF- $\alpha$  pre-treated bone marrow MSC on myeloma cells when they were in vitro co-cultured. **Methods:** Normal bone marrow MSC was treated with TNF- $\alpha$  for once(T+1 cohort) or once a day for seven days(T+7 cohort), then the TNF- $\alpha$  pre-treated MSC was directly co-cultured with myeloma cell line H929 cells for four days. At the end of co-culture, H929 cells were harvested and tested for the number of colony-forming units (CFU), mRNA levels of POU5F1, SOX2 and NANOG and microRNA levels of miRNA-15a/16 by real-time PCR. The results from T+7 cohort were statistically compared with both T+1 and control cohorts. **Results:** TNF- $\alpha$  treatment did not cause any evidently morphological alterations on bone marrow MSCs. When compared with the control and T+1 cohort, our data showed the number of CFU in H929 was statistically decreased in T+7 cohort, the mRNA levels of POU5F1 and SOX2 were statistically down-regulated in T+7 cohort as well. However, the microRNA levels of both miRNA-15a and miRNA-16 were statistically up-regulated. **Conclusion:** Multiple TNF- $\alpha$  pre-treated bone marrow MSC was showed to has inhibitory effects on MM cells.

**[Key words]** multiple myeloma; mesenchymal stem cells; TNF- $\alpha$ ; bone marrow microenvironment

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 178-182]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81202358); 镇江市社会发展项目(SH2011021)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: tfeixiaoming@ gmail.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种来源于 B 细胞的恶性肿瘤,临床表现为骨髓大量异常浆细胞,伴有贫血、骨质破坏和肾功能损害等表现<sup>[1]</sup>。近二十年来,随着沙利度胺、硼替佐米等新药物的运用,MM 患者的治疗疗效逐步提高,但 MM 目前依然是一种不能治愈的疾病。

MM 患者除了骨髓中有异常浆细胞外,骨髓微环境也存在着多种异常<sup>[2]</sup>。现在认为,骨髓微环境的异常对 MM 的发生、发展和 MM 细胞耐药等有重要影响。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是骨髓中除造血干细胞外的另一种干细胞,其对血液生成、免疫调节等均有重要的调节作用<sup>[3]</sup>。近来多项研究发现,MM 患者的 MSC 有多种异常,而这些异常被认为对 MM 细胞生存、归巢和耐药等相关<sup>[4-6]</sup>。在本课题组既往研究中也发现,正常骨髓 MSC 与 MM 细胞相互作用后,可诱导骨髓 MSC 出现多种可逆或非可逆的异常<sup>[7-8]</sup>。此外,本课题组还发现,经多次 TNF- $\alpha$  预处理后的骨髓 MSC 成骨分化潜能明显增强<sup>[9]</sup>。而 TNF- $\alpha$  是参与 MM 骨髓微环境异常中的一个重要细胞因子。因此进一步研究经单次或多次 TNF- $\alpha$  预处理的骨髓 MSC,体外与骨髓瘤细胞株 H929 共培养后,对 H929 细胞集落形成(colony-forming units, CFU)能力、miRNA 家族成员 miRNA-15a/16 以及 POU5F1 等基因的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

直径 10.0 和 3.5cm 培养皿(Corning 公司,美国);定量 PCR8 排管和 96 孔板(Axygen 公司,美国);胎牛血清(FBS)和低糖 DMEM(Gibco 公司,美国);人淋巴细胞分离液(Ficoll,天津灏洋生物制品科技有限责任公司);RNA 抽提液 TRIzol (Invitrogen 公司,美国);H4034 甲基纤维素半固体培养基(Stem Cell Technologies,加拿大);逆转录试剂盒(Fermentas 公司,美国);microRNA 的 RT 试剂盒和引物(广州锐博生物有限公司);real-time PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本);骨髓瘤细胞株 H929 来自 ATCC,由本实验室传代和保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 骨髓 MSC 的分离和培养

骨髓来源于正常供者,采集前均经其书面同意,并按道德标准并获伦理委员会批准。分离和培养的方法见我们既往文献<sup>[7-9]</sup>。

#### 1.2.2 实验分组

所有骨髓 MSC 均在直径 10.0 cm 的细胞培养皿中体外培养,取 2~3 代细胞进行实验。本实验 MSC 共分 2 组。其中第 1 组给予 20 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  处理骨髓 MSC 1 次;第 2 组每天给予 20 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  处理骨髓 MSC 1 次,共处理 7 d。

#### 1.2.3 骨髓瘤细胞与骨髓 MSC 共培养

上述第 1 组(T+1 组)和第 2 组 BMSCs(T+7 组)中分别加入  $5 \times 10^6$  个/ml 的骨髓瘤细胞株 H929。同时另取一皿不含 MSC 的培养皿,也按  $5 \times 10^6$  个/ml 的浓度加入 H929 单独培养作为对照组(C 组)。H929 细胞单独或与 MSC 共培养 3 d 后,小心吸出悬浮的 H929 细胞以备后续实验。

#### 1.2.4 集落形成实验(CFU)

取调好细胞浓度的 H929 细胞加入 H4034 培养基,涡旋打匀,37℃恒温培养箱静置 30 min 后,按  $1 \times 10^4$  个/皿接种于直径 3.5 cm 的小皿中。每一标本作复孔。CFU 标本于 37℃恒温培养箱培养 10 d 后,倒置显微镜下计数集落。总数大于 40 个细胞的团块记作一个集落。

#### 1.2.5 RNA 的提取和 RT 反应

按 TRIzol 试剂操作说明提取 H929 细胞总 RNA,所得的 RNA 样本分光光度计检测 A260/A280 比值均在 1.8~2.0。cDNA 合成按逆转录试剂盒说明书操作,取总量 1  $\mu$ g 的 RNA,65℃反应 5 min,42℃放置 1 h。

#### 1.2.6 POU5F1、SOX2 和 NANOG 基因的 real-time PCR

PCR 引物参照 GenBank 提供 NANOG(NM\_024865.2)、SOX2(NM\_003106)、POU5F1(NM\_001173531)及 GAPDH(XM\_005253678.1)。根据人类基因库设计,由 Invitrogen 公司上海部合成。引物序列见表 1。PCR 反应体系为 TAKARA 推荐使用的 25  $\mu$ l 体系。实时荧光定量 PCR 反应体系在的 Mx3000PTM 扩增仪上进行扩增,两步法 PCR 扩增标准程序:预变性 95℃ 30 s,PCR 反应 95℃ 5 s,60℃ 20 s,40 个循环。每个标本重复 3 次。所得的  $C_t$  值代入公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算 mRNA 表达水平。

#### 1.2.7 miRNA-15a/16 的 RT 和 PCR

PCR 反应中 U6、miRNA-15a/16 使用特异性 RT 引物及特异性上下游引物,均购于广州锐博生物有限公司。RNA 提取步骤同上。RT 反应步骤按 Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Primer 说明书进行。miRNA qPCR 反应按三步法:预变性 95℃ 20 s;PCR 反应 95℃ 10 s,60℃ 20 s,70℃ 10 s,40 个循

表 1 PCR 检测基因的引物序列  
Table 1 The primers' sequences for PCR reaction

基因名称	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
NANOG	上游:CCGAAGAATAGCAATGGTG	302bp
	下游:GGAGAATTTGGCTGGAAC	
SOX2	上游:TTCGATCCCAACTTTCAT	191bp
	下游:GGATTCTCGGCAGACTGAT	
POU5F1	上游:CTGTACTCCTCGGTCCCTT	209bp
	下游:GTTCCCAATTCCTTCCTTAG	
GAPDH	上游:TCAACGGATTTGGTCGTATTG	136 bp
	下游:TGGGTGGAATCATATTGGAAC	

环。每个标本重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用统计学软件 SPSS11.5 分析。以上结果均采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间数据比较用 Kruskal-Wallis *H* 检验,两组均数间比较采用秩和检验。 $P \leq 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外培养的骨髓 BMSCs 形态

骨髓 BMSCs 呈梭形贴壁生长。2~3 代骨髓 MSC 不论是经 TNF- $\alpha$  预处理 1 d 还是 7 d, 在处理过程中和处理结束后,其形态均与对照组无明显区别(结

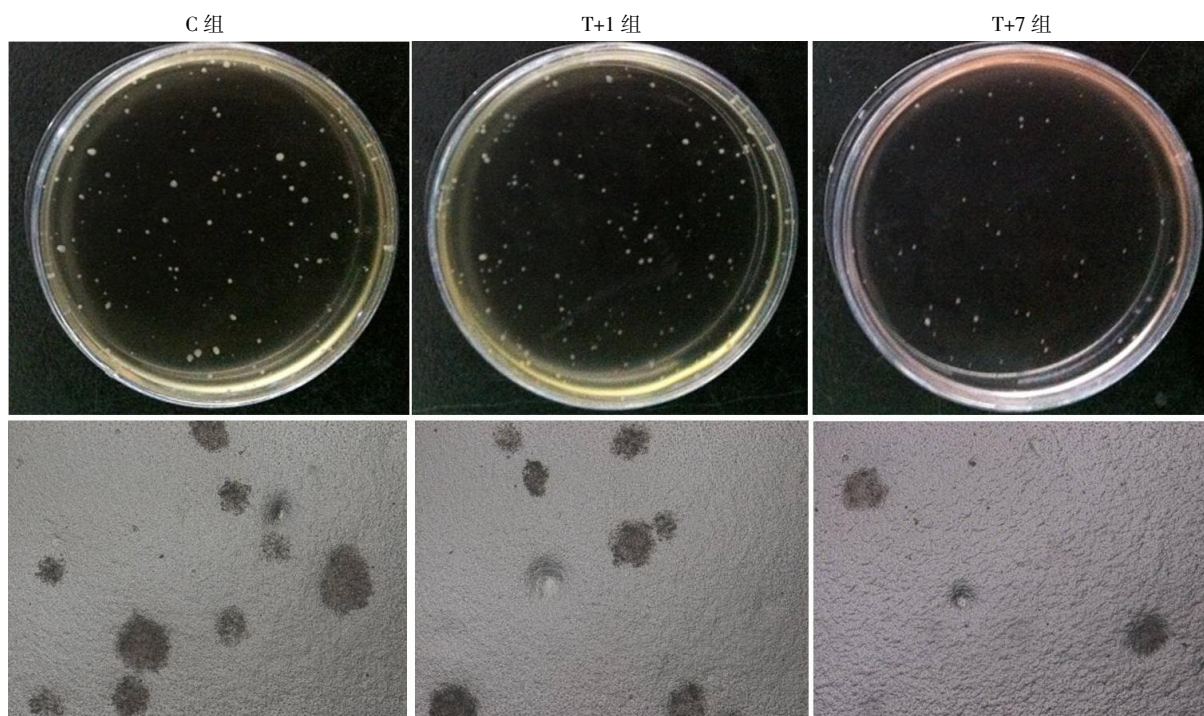
果未显示)。

### 2.2 CFU 实验

倒置显微镜下的 CFU 结果如图 1。与 T+7 组相比,C 组与 T+1 组中的 CFU 数目多。分别计数小皿中 C 组,T+1 组及 T+7 组中的 CFU 总数。经 SPSS11.5 统计后,C 组与 T+1 组中的 CFU 数目无统计学差异。然而,无论是 C 组与 T+7 组间,还是 T+1 组与 T+7 组间,均有统计学差异( $P < 0.05, n=8$ ;图 2)。

### 2.3 POU5F1、SOX2 和 NANOG 基因的 real-time RT-PCR 结果

首先,C 组、T+1 组和 T+7 组的 H929 细胞均有 POU5F1、SOX2 和 NANOG 基因基因的检出。以



图中上面照片,分别为 H929 与对照组(C 组)或经不同方案 TNF- $\alpha$  处理(T+1 组或 T+7 组)MSC 共培养后,收集的 H929 细胞在 H4034 甲基纤维素半固体培养基中培养 10 d 后,直接观察的结果;下面照片分别为 C 组、T+1 组和 T+7 组,倒置显微镜下 CFU 结果( $\times 40$ )。

图 1 实验中 3 组共培养后 H929 的 CFU 结果示意图

Figure 1 CFU results of H929 cells harvested from three co-culture cohorts

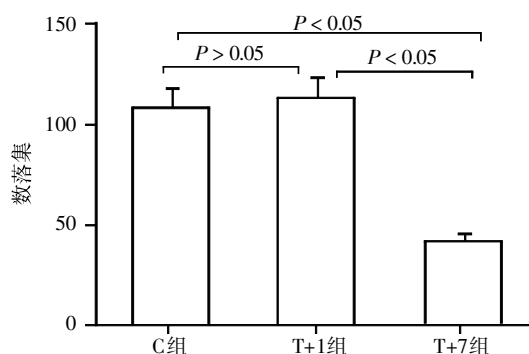
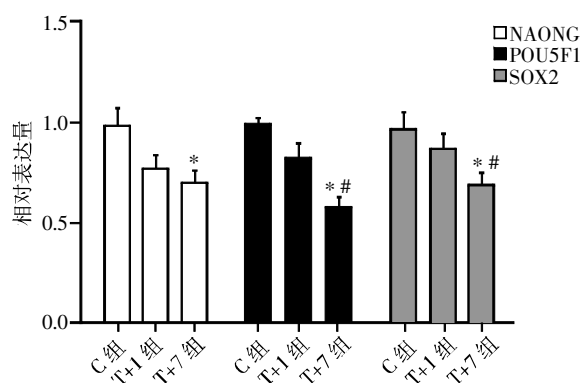


图 2 不同处理的骨髓 MSC 与 H929 细胞共培养后,3 组间 H929 细胞 CFU 数的比较

Figure 2 Comparison of CFU number among three cohorts after co-culture

GAPDH 为内参,按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法求出各基因在各标本的相对表达量。H929 细胞 POU5F1、SOX2 和 NANOG



与 C 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 T+1 组比较, # $P < 0.05$ 。

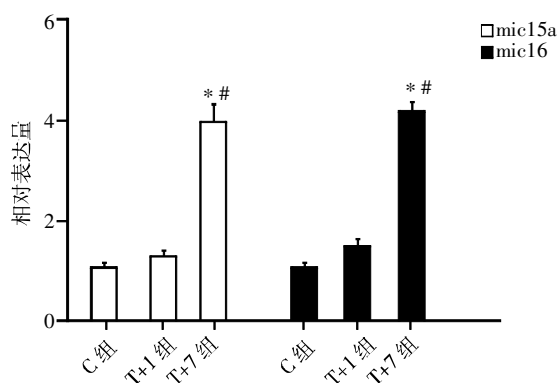
图 3 不同处理的骨髓 MSC 与 H929 细胞共培养后,3 组间 H929 细胞 real-time PCR 相对表达量的比较

Figure 3 real-PCR results of H929 cells co-cultured with bone marrow MSC

基因表达水平的均数,均是在 C 组中最高,T+1 组较 C 组低,T+7 组最低(图 3)。经统计学处理后发现:与 C 组比较,T+7 组这 3 个基因的表达水平均有统计差异( $P < 0.05, n=8$ );与 T+1 组比较,除了 NANOG 基因以外 ( $P = 0.261$ ),POU5F1 和 SOX2 均有统计学差异( $P < 0.05, n = 8$ )。

### 2.4 miRNA-15a/16 的 PCR 结果

首先,C 组、T+1 组和 T+7 组的 H929 细胞均有 miRNA-15a/16 的检出。由得到各反应管  $C_t$  值,以 U6 为内参,运用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法求出基因在各组的相对表达量。miRNA-15a 和 miRNA-16 的表达水平的均数,在 T+7 组中最高,在 T+1 组居中,C 组最低。不但 T+7 组与 C 组比较有统计学差异,而且 T+7 组与 T+1 组比较也有统计学差异 ( $P$  均  $< 0.05, n = 8$ ,图 3)。



## 3 讨论

近年来研究发现,多种肿瘤组织中均存在有慢性炎症反应,其对于肿瘤的发生和发展有重要作用<sup>[10]</sup>。与其他类型肿瘤类似,MM 患者骨髓微环境中也存在类似慢性炎症的异常,包括有血管内皮细胞、巨噬细胞等细胞成分异常,IL-6、TNF- $\alpha$  等细胞因子的异常,所有这些异常被认为与 MM 的发生和发展有密切关系<sup>[2]</sup>。

近年来发现 MM 患者的骨髓 MSC 有多种异常<sup>[4-6]</sup>。MSC 作为骨髓中一种干细胞,在一定条件下可向成骨细胞分化,可以调节 T 淋巴细胞的免疫功能。此外,其也可以分泌 IL-6、VEGF、TNF- $\alpha$  等多种细胞/炎症因子<sup>[2-3]</sup>。MSC 的上述生物学功能,均与 MM 细胞生存、凋亡等密切相关。由于在生物个体内,慢性炎症的性质、强度和持续时间总是在不断变

化着,而不同的强度或持续时间对肿瘤有不同的影响。在既往的研究中发现,骨髓 MSC 在成骨细胞诱导分化前,经多次间歇 TNF- $\alpha$  预处理后,其成骨细胞分化潜能较单次 TNF- $\alpha$  预处理有明显升高<sup>[9]</sup>。在本研究中,进一步比较经不同方案 TNF- $\alpha$  预处理后的骨髓 MSC,在体外与骨 MM 细胞共培养过程中,对 MM 细胞的影响。

本研究结果提示,与对照组和单次 TNF- $\alpha$  预处理组比较,H929 细胞株与多次 TNF- $\alpha$  预处理组共培养后,体外的 CFU 数减少,POU5F1、SOX2 和 NANOG 的转录下调,miRNA-15a/-16 表达上调。POU5F1、SOX2 和 NANOG 这 3 个基因均参与胚胎干细胞“干性”(Stemness)的调节<sup>[11]</sup>。此外,近年有报道上述 3 个基因与原代 MM 细胞的端粒酶活性和集落形成能力相关<sup>[12]</sup>。在本研究中,观察到 H929 在 CFU 减少的同时,POU5F1、SOX2 和 NANOG 这 3

个基因的转录水平下调,这与 Brennan 等<sup>[12]</sup>的结果类似。微小 RNA (microRNA; miRNA) 可以通过 mRNA 降解或阻遏其翻译来调控靶基因的表达。近来发现 miRNA 参与调节和肿瘤发生、发展、侵袭转移相关的多种基因<sup>[13]</sup>。在 MM 中,miRNA-15a/-16 表达水平与疾病的预后和 MM 细胞的增殖相关,并且参与 AKT3、MAPkinases 等信号通路和 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[14-15]</sup>。上述结果提示,炎症因子 TNF- $\alpha$  预处理的骨髓 MSC 后,不但可以促进骨髓 MSC 的成骨分化潜能,而且在与 MM 细胞株相互作用过程中,不利于 MM 细胞株恶性生物学行为。

综上所述,本研究结果提示骨髓 MSC 在经过适当的炎症因子 TNF- $\alpha$  刺激后,其生物学特性发生一些变化,而这些变化对位于其周围的 MM 细胞而言,有明显的抑制作用。这对今后的研究有两点提示:①炎症对于 MM 是一把“双刃剑”,在一定条件下,微环境中适当的炎症不利于 MM 细胞的生存;②骨髓 MSC 细胞经一定的处理后,可以用于细胞治疗来发挥抗 MM 的作用。

#### [参考文献]

- [1] 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(8):585-598
- [2] Manier S, Sacco A, Leleu X, et al. Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:157496
- [3] García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(10):1453-1468
- [4] Wang X, Zhang Z, Yao C. Angiogenic activity of mesenchymal stem cells in multiple myeloma[J]. *Cancer Invest*, 2011, 29(1):37-41
- [5] Todoerti K, Lisignoli G, Storti P, et al. Distinct transcriptional profiles characterize bone microenvironment mesenchymal cells rather than osteoblasts in relationship with multiple myeloma bone disease [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(2):141-153
- [6] Li B, Fu J, Chen P, et al. Impairment in immunomodulatory function of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(8):623-633
- [7] 李俊霞, 李 皎, 王 欢, 等. 骨髓瘤细胞可诱导骨髓间充质干细胞的基因表达谱发生暂时和(或)长期性改变 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2013, 33(1):86-92
- [8] 王 欢, 李 皎, 朱 彦, 等. 骨髓间充质干细胞与骨髓瘤细胞共培养 EphB4/ephrinB2 表达异常 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(2):177-182
- [9] 杨 姣, 夏 雷, 汤 郁, 等. 肿瘤坏死因子预处理促进骨髓间充质干细胞成骨分化潜能 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2014, 34(3):275-280
- [10] Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(7):1073-1081
- [11] Boyer LA1, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2005, 122(6):947-956
- [12] Brennan SK, Wang Q, Tressler R, et al. Telomerase inhibition targets clonogenic multiple myeloma cells through telomere length-dependent and independent mechanisms [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9) pii:e12487
- [13] Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(3-4):369-378
- [14] Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2009, 113(26):6669-6680
- [15] Corthals SL, Jongen-Lavrencic M, de Knecht Y, et al. Micro-RNA-15a and microRNA-16 expression and chromosome 13 deletions in multiple myeloma [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(5):677-681

[收稿日期] 2014-05-19