

多发性骨髓瘤患者骨髓 CD269 和 CD317 基因的差异性表达研究*

谭奎, 沈婵娟, 张玲, 刘玉霞, 李清照, 袁朝晖, 胡国瑜

(株洲市中心医院血液科实验室, 湖南株洲 412007)

摘要:目的 探讨 CD269 和 CD317 在多发性骨髓瘤(MM)患者中的差异性表达。方法 收集株洲市中心医院血液内科 2013 年 8 月~2015 年 6 月就诊的初诊多发性骨髓瘤(20 例)患者和初诊缺铁性贫血(20 例)患者骨髓标本共 40 例,应用实时定量 PCR(RQ-PCR)检测骨髓标本中 CD269 和 CD317,并结合临床特征对结果进行统计学分析。结果 多发性骨髓瘤患者 CD269 及 CD317 相对表达水平($4.418 \pm 4.568, 4.327 \pm 2.876$)高于对照组($0.600 \pm 0.838, 1.033 \pm 1.335$),差异有统计学意义($t=3.676, 4.646$, 均 $P<0.05$),且与患者的性别、年龄无关($P>0.05$),两者之间表达无相关性($r=0.041, P=0.864$),而与骨髓瘤细胞的比例呈正相关($r=0.495, P=0.026; r=0.533, P=0.016$)。结论 CD269 及 CD317 在多发性骨髓瘤患者高表达,可能参与多发性骨髓瘤的发病机制。

关键词:多发性骨髓瘤;CD269;CD317;实时定量 PCR;临床特征

中图分类号:R733.3;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)06-064-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.018

Differential Expression of CD269 and CD317 Genes in Bone Marrow of Patients with Multiple Myeloma

TAN Kui, SHEN Chan-juan, ZHANG Ling, LIU Yu-xia, LI Qing-zhao, YUAN Zhao-hui, HU Guo-yu
(Department of Hematology Laboratory, Zhuzhou Central Hospital, Hunan Zhuzhou 412007, China)

Abstract: **Objective** To explore the differential expression of CD269 and CD317 in patients with multiple myeloma(MM). **Methods** Newly diagnosed samples from patients of MM (20 cases) and iron deficiency anemia (20 cases), 40 cases in total (from 06/2015 to 08/2013, the Department of Hematology, Central Hospital of Zhuzhou City) were collected. Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) tests were used to detect the relative expression of CD269 and CD317 in bone marrow samples, and the results were statistically analyzed with clinical features. **Results** The relative expression levels of CD269 and CD317 in patients with multiple myeloma ($4.418 \pm 4.568, 4.327 \pm 2.876$) were significantly higher than those in the control group ($0.600 \pm 0.838, 1.033 \pm 1.335$), the difference was statistically significant ($t=3.676, 4.646$, all $P<0.05$) respectively, while not related with the gender, age ($P>0.05$). There was no correlation between the expression of CD269 and CD317 ($r=0.041, P=0.864$), but positively correlated with the ratio of myeloma cells ($r=0.495, P=0.026; r=0.533, P=0.016$). **Conclusion** CD269 and CD317 were highly expressed in patients with multiple myeloma and may be involved in the pathogenesis of multiple myeloma.

Keywords: multiple myeloma; CD269; CD317; RQ-PCR; clinical features

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种常见的恶性肿瘤,以骨髓中出现无限增殖的异常浆细胞为主要比例特征。浆细胞的存活及其抗体分泌功能主要由白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD) 269(又称 BCMA, TNFRSF17)调控,虽然 CD269 的作用机制至今尚未完全清楚,但是 CD269 在浆细胞的存活中发挥重要作用^[1]。CD317(又称 BST-2, Tetherin, HM1.24)为终末 B 细胞的限制性抗原,该抗原在肿瘤细胞以及分泌免疫球蛋白的成熟 B 细胞上表达,是晚期 B 细胞成熟的特异性标记。目前研究发现 CD317 是一个肿瘤相关抗原,在口腔癌^[2]、慢性 B 淋巴细胞白血病^[3]、乳腺癌^[4]等均有表达上调的现象。而其与多

发性骨髓瘤患者关系显见报道。本研究分析 CD269 和 CD317 在多发性骨髓瘤患者的表达,以及与骨髓瘤细胞的关系,初步探讨其对多发性骨髓瘤发病的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2013 年 8 月~2015 年 6 月就诊于株洲市中心医院血液内科的多发性骨髓瘤患者骨髓液和缺铁性贫血患者骨髓液共 40 例,其中多发性骨髓瘤患者 20 例,包括男性 14 例,女性 6 例,中位年龄为 59.5 ± 11.29 岁;对照组为缺铁性贫血患者 20 例,包括男性 11 例,女性 9 例,中位年龄为 56.5 ± 7.78 岁。所有骨髓样本均为 EDTA 1:9 抗凝。所有患者均为首次入院确诊,并排除

* 基金项目:湖南省卫计委科研项目,课题编号 C2015-075。

作者简介:谭奎(1984—),女,硕士,助理研究员,主要研究方向:血液系统疾病, E-mail:181925861@qq.com。

通讯作者:胡国瑜, E-mail:doctorhgy@163.com。

感染、免疫系统及其它肿瘤疾病。

1.2 试剂和仪器 TRIZOL Reagent (Invitrogen 公司), RNA 逆转录试剂盒 (ABI 公司), RQ-PCR 反应试剂盒 (ABI 公司), 内参 β -actin, CD269 和 CD317 RT-PCR 引物 (ABI 公司 序列号 4331182), 台式高速冷冻离心机 (SIGMA 公司), Real Time PCR 扩增仪 (ABI 公司 7300), 生物安全柜 (BIOBASE 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取: 取 100 μ l 骨髓液加入 300 μ l Trizol 混匀, 加入 500 μ l 氯仿, 充分混匀, 放置 5 min, 室温 12 000 r/min 离心 10 min; 小心转移上层水相 100 μ l 到新的 1.5 ml 离心管, 不要取到中间层和下层溶液; 加入等体积异丙醇, 混匀后室温静置 5 min; 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清; 加入 300 μ l 无水乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 风干 3~5 min, 50 μ l DEPC 水溶解待用。提取的样本经紫外分光光度计测定, 吸光度 A_{260nm}/A_{280nm} 值为 1.8~2.1。

1.3.2 反转录: 按照反转录试剂盒的说明书进行操作, 冰上加入以下试剂: 总 RNA 10 μ l, 10 \times RT Random Primers 2 μ l, 10 \times RT Buffer 2 μ l, Multi Scribe Reverse Transcriptase 1 μ l, dNTP Mix 0.8 μ l, RNase Inhibitor 1 μ l, 并加入无核酸酶水至 20 μ l。然后将反应管置入 PCR 反应仪中, 反应条件为: 25 $^{\circ}$ C 10 min, 37 $^{\circ}$ C 120 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 10 min, 产物在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3.3 RQ-PCR: PCR 反应体系, 按照以下顺序混合试剂: 引物 1 μ l, Mix 10 μ l, cDNA 2 μ l, 加无核酸酶水至 20 μ l, 混匀液体。将反应管置于 RQ-

PCR 反应仪中, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 再按 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 扩增 40 个循环。用水为模板作为阴性对照。

1.4 统计学分析 以 Delta Ct (Δ Ct) 及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来对结果进行分析。具体如下: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, ΔCt 值越高其目的基因在相应组织中的表达水平越低; 用 $\Delta\Delta Ct$ 法计算同一样本内目标基因与内参基因的相对表达量, 随机取对照组一样本作为标准样本, 用其目标基因与内参基因的相对表达量标准化, 得出校准样本内目标基因相对表达量为 1 时, 待测样本目标基因的相对表达量。每个样本在同样的条件下重复实验 3 次, 取三次均值为该样本待测目的基因的表达水平。采用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析。数值变量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, MM 患者与对照组 CD269 和 CD317 表达比较及其性别、年龄的比较采用 t 检验, 以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准, $P<0.05$ 作为判定有统计学意义的依据; 多发性骨髓瘤细胞 CD269 和 CD317 表达与骨髓瘤细胞比例关系采用 Spearman 非参数相关分析。

2 结果

2.1 CD269, CD317 在多发性骨髓瘤中的表达

见表 1。多发性骨髓瘤组 CD269 平均 ΔCt 为 1.9 低于对照组 CD269 平均 ΔCt 2.8, 说明多发性骨髓瘤组 CD269 平均表达水平高于对照组。多发性骨髓瘤组 CD317 平均 ΔCt 为 1.6 低于对照组 CD317 平均 ΔCt 3.9, 说明多发性骨髓瘤组 CD317 平均表达水平高于对照组。CD269 与 CD317 在 MM 的表达显著高于对照组, 差异均具有统计学意义 ($t=3.676, 4.646$, 均 $P<0.05$)。

表 1 CD269 与 CD317 在 MM 组和对照组中的表达 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	CD269 表达			CD317 表达		
	相对表达量	t	P 值	相对表达量	t	P 值
MM 组	4.418 \pm 4.568	3.676	0.000	4.327 \pm 2.876	4.646	0.003
对照组	0.600 \pm 0.838			1.033 \pm 1.335		

2.2 CD269, CD317 的表达与性别、年龄的关系 见表 2。CD269, CD317 的表达与多发性骨髓瘤患

者的性别和年龄比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 CD269 与 CD317 的表达与 MM 患者性别和年龄的关系 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

项目	CD269 表达			CD317 表达		
	相对表达量	t	P 值	相对表达量	t	P 值
性别	男	3.714 \pm 5.067	-1.055	4.808 \pm 2.773	1.152	0.888
	女	6.060 \pm 2.816		3.206 \pm 3.047		
年龄	<50	1.759 \pm 3.047	-1.099	2.321 \pm 4.021	-1.246	0.408
	≥ 50	4.887 \pm 4.697		4.670 \pm 2.859		

2.3 CD269, CD317 的表达量与骨髓瘤细胞比例的相关性分析 多发性骨髓瘤患者 CD269 和 CD317 的表达量与骨髓瘤细胞比例有较好的正相

关性 ($r=0.495, P=0.026; r=0.533, P=0.016$)。

2.4 多发性骨髓瘤患者 CD269 与 CD317 表达相关性分析 CD269 与 CD317 的表达无相关性 ($r=$

0.041, $P=0.864$)。

3 讨论 多发性骨髓瘤是骨髓内浆细胞异常增生的一种恶性肿瘤,其发病率在许多国家位居血液恶性肿瘤的第二位,男性发病率高于女性,中位发病年龄 57~63 岁^[5],并有发病年轻化趋势。CD269 基因位于 16p13, mRNA 全长约 1.2 kb^[6],属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 家族的一员。研究发现^[1] CD269 剔除缺失小鼠有正常的脾结构, B 细胞发育正常, T 细胞非依赖性免疫反应和 T 细胞依赖性免疫反应未见明显异常,但浆细胞数量明显减少,这证明 CD269 在维持浆细胞存活中的重要性。研究还发现, CD269 参与活化 JNK 信号通路,该信号通路的活化可促进 MM 细胞的存活与增殖^[7]。这些都表明 CD269 与浆细胞的存活与增殖密切相关。CD317 基因定位于 19p13.2^[8],是 1994 年通过单克隆抗体发现的终末分化 B 细胞表面标志蛋白,可能在 B 细胞的发育过程中发挥重要作用^[9]。

王金湖等^[10]人对 31 例多发性骨髓瘤患者的外周血单个核细胞进行研究发现 CD269 基因的表达高于正常健康人,并与 B 淋巴细胞刺激因子和 $\beta 2$ 微球蛋白的血清浓度显著相关,对多发性骨髓瘤的发病及预后有一定的价值。本研究发现多发性骨髓瘤患者 CD269 表达水平明显高于对照组,提示 CD269 与多发性骨髓瘤的发生有明确的相关性,该结果与王金湖等^[10,11]的结果一致。Liu 等^[12]发现 CD317 在多发性骨髓瘤细胞株 ARK-B 和 ARK 上高表达,说明 CD317 的表达与多发性骨髓瘤相关,本研究结果显示多发性骨髓瘤患者 CD317 表达水平高于对照组,差异有统计学意义,也支持 Liu 等^[12]的结论。

在多发性骨髓瘤的诊断中,骨髓细胞学检查具有特异诊断的意义。由于骨髓瘤细胞的恶性增生程度和浸润范围不一,因而导致疾病的复杂多样性。本研究发现 CD269 和 CD317 表达水平随着骨髓瘤细胞比例的增高而升高,呈正相关,骨髓瘤细胞异常增殖被认为是多发性骨髓瘤发病的中心环节,其在骨髓中的比例与其对骨髓的损伤程度呈正比,说明 CD269 和 CD317 基因高表达参与了骨髓瘤细胞的恶性克隆,可能在多发性骨髓瘤的发病中具有一定价值。但是在本研究中 CD269 和 CD317 的表达水平无明显的相关性,这其中可能存在某些基因的调控,又或者还有其它影响 CD269 和 CD317 表达的因素,当然也不排除是实验因素的局限性,这些都需要进一步实验证明。

尽管 CD269 和 CD317 在多发性骨髓瘤被认为是治疗靶点,但两者表达在多发性骨髓瘤疾病中的作用仍然不明确,对多发性骨髓瘤的疾病进程、

预后是否有关,还需要大量的研究对象进行基础研究。

参考文献:

- [1] O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells[J]. J Exp Med, 2004, 199(1): 91-98.
- [2] Fang KH, Kao HK, Chi LM, et al. Overexpression of BST2 is associated with nodal metastasis and poorer prognosis in oral cavity cancer [J]. Laryngoscope, 2014, 124(9): 354-360.
- [3] Gong S, Osei ES, Kaplan D, et al. CD317 is over-expressed in B-cell chronic lymphocytic leukemia, but not B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(2): 1613-1621.
- [4] Mahauad-Ferandez WD, Borchering NC, Zhang W, et al. Bone marrow stromal antigen 2 (BST-2) DNA is demethylated in breast tumors and breast cancer cells [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123931.
- [5] Siegel R, Ma J, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(5): 9-29.
- [6] Shu HB, Johnson H. B cell maturation protein is a receptor for the tumor necrosis factor family member-TALL-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(16): 9156-9161.
- [7] 徐光, 班永宏, 鞠少卿, 等. JNK 信号通路活化与 BCMA 表达对 MM 细胞的作用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(22): 3117-3119, 3122.
Xu G, Ban YH, Ju SQ, et al. Interaction between JNK signal pathway activation and BCMA expression collectively promotes the survival of multiple myeloma cells[J]. Int J Lab Med, 2016, 37(22): 3117-3119, 3122.
- [8] Ishikawa J, Kaisho T, Tomizawa H, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth[J]. Genomics, 1995, 26(3): 527-534.
- [9] Goto T, Kenel SJ, Abe M, et al. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B-cell[J]. Blood, 1994, 84(6): 1922-1930.
- [10] 王金湖, 倪红兵, 王旭东, 等. 多发性骨髓瘤患者 B 淋巴细胞刺激因子及其受体的表达水平[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(2): 39-41.
Wang JH, Ni HB, Wang XD, et al. Correlation of expression levels of B lys and its receptors in patients with multiple myeloma[J]. J Mod Lab Med, 2009, 24(2): 39-41.
- [11] Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 2048-2060.
- [12] Chiriva-Internati M, Liu Y, Weidanz JA, et al. Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1. 24 [J]. Blood, 2003, 102(9): 3100-3107.

收稿日期: 2017-07-05

修回日期: 2017-08-21