

IL-27在多发性骨髓瘤患者及骨髓瘤细胞系中的表达

夏天 李建平 李文倩 王莉 郝星 孙方方
戴昕 阿祥仁 彭海 宋玉君 冯建明

【摘要】 目的 研究IL-27在多发性骨髓瘤(MM)患者及骨髓瘤细胞系U266、RPMI8226培养上清中的水平及其意义。方法 采用ELISA法检测MM患者及正常对照者血浆中IL-27和IL-6表达水平;采用ELISA法检测U266、RPMI8226细胞培养上清中IL-27表达水平;实时定量RT-PCR方法检测MM患者外周血单个核细胞IL-27 mRNA表达水平。结果 MM患者血浆IL-27水平为(61.82±8.01) ng/L,明显高于正常对照组[(8.29±4.41) ng/L]($P<0.05$);MM患者血浆IL-6水平为(45.62±1.24)ng/L,也明显高于正常对照组[(2.27±0.18)ng/L]($P<0.05$);U266、RPMI8226细胞培养上清中IL-27水平分别为(50.06±5.72)和(335.47±41.88)ng/L。RT-PCR结果证实MM患者外周血单个核细胞IL-27 mRNA相对表达水平较正常对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 MM患者高表达IL-27,骨髓瘤细胞系U266、RPMI8226分泌IL-27,IL-27可能参与MM的发病机制。

【关键词】 白细胞介素27; 白细胞介素6; 多发性骨髓瘤

Expression of IL-27 in multiple myeloma and its cell lines XIA Tian*, LI Jian-ping, LI Wen-qian, WANG Li, HAO Xing, SUN Fang-fang, DAI Xin, A Xiang-ren, PENG Hai, SONG Yu-jun, FENG Jian-ming*. *Department of Hematology, Qinghai Provincial People's Hospital, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China

Corresponding author: FENG Jian-ming, Email: fjmok@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the expression and significance of IL-27 in patients with multiple myeloma (MM) and in the supernatant of MM cell lines U266 and RPMI8226 cells culture medium. **Methods** A total of 20 MM patients and 20 controls were enrolled in this study. The expressions of IL-27 and IL-6 in MM patient's blood plasma, and the expression of IL-27 in U266 and RPMI8226 culture supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of IL-27 in mononuclear cells of MM patients' peripheral blood was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The levels of IL-27 in plasma of MM patients and normal controls were (61.82±8.01) ng/L and (8.29±4.41) ng/L ($P<0.05$), and those of IL-6 were (45.62±1.24) ng/L and (2.27±0.18) ng/L ($P<0.05$), respectively. The levels of IL-27 in U266 and RPMI8226 culture supernatant were (50.06±5.72) ng/L and (335.47±41.88) ng/L. RT-PCR revealed that the levels of IL-27 mRNA were up-regulated in MM patients compared to controls. **Conclusion** High expression of IL-27 is observed in MM patients and MM cell lines U266 and RPMI8226 cells. IL-27 may play a important role in pathogenesis of MM.

【Key words】 Interleukin 27; Interleukin 6; Multiple myeloma

多发性骨髓瘤(MM)以骨髓中浆细胞恶性克隆性增生、血清或尿液中出现单克隆免疫球蛋白(M蛋白)以及广泛性溶骨病变和(或)骨质疏松为特征,

其发病机制至今不清楚,仍是一种不可治愈的疾病。既往研究表明,IL-6细胞因子家族对MM的发生、发展均起到关键性作用。IL-27是近年发现的一种新的IL-6/IL-12细胞因子家族成员,由P28和EBI3两个亚单位组成,主要由活化的抗原提呈细胞产生,在机体内发挥着促进和抑制炎症的双重作用^[1]。体外研究证实,重组人IL-27可显著抑制原代MM细胞和MM细胞系生长,原代MM细胞表面表达功能性的IL-27受体,从MM患者分选出来的破骨祖

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.07.016

基金项目:国家自然科学基金(81160071)

作者单位:810007 西宁,青海省人民医院血液科(夏天、李建平、李文倩、王莉、郝星、孙方方、戴昕、冯建明),检验科(阿祥仁、彭海、宋玉君)

通信作者:冯建明,Email: fjmok@sohu.com

细胞亦显著表达IL-27受体,在体外IL-27可直接抑制破骨细胞分化和溶骨活性^[2]。因此,我们检测IL-27在MM患者及MM细胞系中的表达情况,拟探讨IL-27在MM发生、发展中的作用及其临床意义。

对象和方法

1. 研究对象:20例初治MM患者为2010年3月至2012年8月在我院住院的患者,所有患者均符合国内MM诊断标准^[3]。其中男16例,女4例,中位年龄62(48~76)岁。临床分期:ⅢA期12例,ⅢB期8例,骨髓涂片中平均瘤细胞占0.158。IgG型11例,IgA型8例,IgD型1例。正常对照20名,为我院体检中心健康体检者,男13名,女7名,中位年龄60(43~75)岁。标本采集时均无急、慢性感染及自身免疫性疾病等。

2. 主要试剂:人淋巴细胞分离液购自中国医学科学院生物工程研究所,TRIzol试剂盒购自美国Invitrogen公司,IL-6检测ELISA试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司,IL-27检测ELISA试剂盒购自武汉伊艾博科技有限公司,逆转录试剂盒购自美国Promega公司,dNTPs购自日本TaKaRa公司,SYBR Green PCR试剂盒购自美国ABI公司。P28上游引物:5'-CGCTTTGCGGAATCTCACC-3',下游引物:5'-AAGGGCTGAAGCGTGGTG-3';EBI3上游引物:5'-GCAGACGCCAACGTCCAC-3',下游引物:5'-CCAGTCACTCAGTTCCCCGT-3';GAPDH内参基因上游引物:5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3',下游引物:5'-CAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

3. 细胞培养:MM细胞系U266、RPMI8226购自美国ATCC公司,培养于RPMI1640培养基中,培养体系包含10%FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素,在37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,选取对数生长期细胞进行实验。

4. ELISA方法检测MM患者血浆中IL-27及IL-6水平:取患者确诊后化疗前清晨空腹外周静脉血2 ml,肝素抗凝,6 h内室温下2000 r/min(离心半径8 cm)离心10 min,收集血浆-70℃储存备用。按说明书进行操作。健康对照标本处理方法同上。

5. ELISA法检测U266、RPMI8226细胞培养上清中IL-27水平:取对数生长期的U266、RPMI8226细胞,以1×10⁵/ml的细胞密度接种于24孔板,用RPMI1640完全培养基培养72 h后收集上清液,经

1500 r/min(离心半径8 cm)离心5 min,ELISA法检测IL-27表达水平,以RPMI1640完全培养基(不含细胞)作为对照,最后计算浓度时需减去RPMI1640完全培养基中所含IL-27的量。每次实验均设3个复孔,实验重复3次。

6. RT-PCR检测MM患者外周血单个核细胞(PBMC)IL-27表达水平:以淋巴细胞分离液密度梯度离心分离MM患者及正常对照者PBMC。细胞总RNA提取参照试剂盒说明进行操作,并检测RNA质量,证实无降解。逆转录反应制备cDNA,反应体系为40 μl,包括10 μl RNA,2.5 μl dNTP,2 μl Oligo-dT和400 U M-MLV逆转录酶。RT-PCR在ABI Prism Real Time 7500型PCR扩增仪中进行。RT-PCR体系(20 μl):1 μl逆转产物,上、下游引物各0.5 μl,2×SYBR Green PCR Master Mix(美国ABI公司产品)10 μl,灭菌去离子水8 μl。PCR条件:94℃预变性5 min,然后94℃变性30 s,58℃退火45 s,72℃延伸30 s,扩增40个循环,最后72℃延伸10 min。以GAPDH为内参基因,2^{-ΔΔCT}法计算IL-27 mRNA的相对表达水平,设正常对照组基因表达水平为1。

7. 统计学处理:采用SPSS 17.0统计学软件进行分析。数据用均值±标准差表示,差异分析采用t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. IL-27和IL-6在MM患者血浆中的表达:MM患者血浆IL-27水平为(61.82±8.01)ng/L,比正常对照组[(8.29±4.41)ng/L]明显升高(P=0.001);MM患者血浆IL-6水平为(45.62±1.24)ng/L,较正常对照组[(2.27±0.18)ng/L]也明显升高(P=0.014)。

2. IL-27在U266、RPMI8226细胞培养上清中的表达:U266细胞培养上清中IL-27水平为(50.06±5.72)ng/L,RPMI8226细胞培养上清中IL-27水平为(335.47±41.88)ng/L。

3. MM患者PBMC IL-27 mRNA表达水平:MM患者PBMC IL-27亚单位P28 mRNA表达水平为正常对照组的(4.51±1.26)倍,差异有统计学意义(P=0.000),EBI3 mRNA表达水平为正常对照组的(3.35±0.75)倍,差异也有统计学意义(P=0.000)。

讨 论

IL-27是2002年发现并命名的IL-6/IL-12家族成员,具有复杂的生物学功能,在抗感染免疫、抗肿瘤

瘤免疫及自身免疫性疾病中发挥着重要作用^[4]。

近年来,IL-27作为肿瘤基因治疗候选因子备受关注。Hisada等^[5]首次证实了IL-27的抗肿瘤活性,将稳定表达IL-27的小鼠结肠癌细胞C26移植到小鼠体内,发现肿瘤的生长明显受抑,并发现主要由CD8⁺T细胞、IFN- γ 和T-bet介导抗肿瘤作用。Liu等^[6]通过实验证明,转染IL-27基因的人食管鳞癌细胞在裸鼠体内能够通过活化NK细胞,促进炎症性细胞因子的分泌、诱导肿瘤细胞凋亡,产生抗肿瘤作用。Morishima等^[7]发现,IL-27可直接作用于CD8⁺T细胞,以T-bet依赖和非依赖性途径促进细胞毒性T淋巴细胞(CTL)增殖,伴随颗粒酶B表达增高,并轻微上调穿孔素表达。IL-27在裸鼠体内还可以通过上调IP-10和MIG表达抑制肿瘤血管生成,从而发挥抗肿瘤作用^[8]。

有研究者发现,初始B淋巴细胞和记忆B淋巴细胞协同表达IL-27受体亚单位WSX-1和gp130,然而生发中心B细胞几乎不表达WSX-1,生发中心B细胞向记忆B细胞转化过程中WSX-1表达逐渐增加^[9]。另外,正常浆细胞表面协同表达WSX-1和gp130,并且被IL-27作用后介导STAT1的激活而传递信号^[10]。IL-27和IL-2共同刺激浆细胞后明显上调IgM分泌,抑制IgG分泌,而IgA的表达水平无明显变化^[9-10]。MM作为一种浆细胞恶性肿瘤,IL-27在其发病机制中的作用备受关注。既往研究发现,给免疫缺陷的小鼠采用两种不同的方法分别接种U266、NCI-H929细胞,重组人IL-27可显著抑制肿瘤生长。原代MM细胞表面表达功能性IL-27受体,IL-27通过抑制血管新生显著抑制MM细胞系和原代细胞增殖,从MM患者分选出来的破骨祖细胞亦显著表达IL-27受体,在体外IL-27可直接抑制破骨细胞分化和溶骨活性^[2]。IL-27可下调一些促血管新生分子的表达,包括一些肿瘤细胞生长因子,如IL-6、血管内皮生长因子D(VEGF-D)、趋化因子CCL^[11]。此外, γ -干扰素可以抑制MM细胞系和原代MM细胞增殖,这一过程不是通过影响IL-6的分泌,而是通过下调瘤细胞表面IL-6受体 α 以及IL-6受体复合物表达来实现的,而IL-27恰好显著促进 γ -干扰素的产生。基于IL-27对MM细胞的上述作用,不难推测IL-27有望成为未来治疗MM的新手段。

我们检测了MM患者及MM细胞系中IL-27的表达情况,结果显示MM患者IL-27表达明显高于正常对照组,U266、RPMI8226细胞亦分泌IL-27,尤其

以RPMI8226细胞较为明显,提示MM细胞可能存在自分泌IL-27的现象。以此推测,IL-27会像IL-6家族其他成员一样,扮演着促MM细胞增殖的作用,但既往研究发现IL-27可作为一种抗MM细胞因子,显著抑制MM细胞增殖、血管新生和破骨细胞活性,而与其共享信号转导链gp130的IL-6在MM细胞增殖、抗凋亡、促进肿瘤血管新生、导致溶骨性破坏等起着促进作用。IL-27与IL-6在MM患者中同样高表达,共享受体亚单位gp130,但却发挥着相反的作用,此现象难以解释,若证实IL-27是一种抗MM细胞因子,MM患者高表达IL-27的现象更加奇特,难道骨髓瘤细胞自分泌IL-27却反过来抑制自身的生长,还是抗原提呈细胞或骨髓基质细胞分泌IL-27去抑制MM细胞生长。因此非常有必要进一步探讨IL-27在MM中的分泌及作用机制的研究,从而为IL-27可能成为治疗MM的候选因子提供更多理论依据。

参 考 文 献

- [1] Stumhofer JS, Hunter CA. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol Lett*, 2008, 117: 123-130.
- [2] Cocco C, Giuliani N, Di Carlo E, et al. Interleukin-27 acts as multifunctional antitumor agent in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 4188-4197.
- [3] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准. 3版. 北京:科学出版社, 2007: 382-385.
- [4] Wojno ED, Hunter CA. New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends Immunol*, 2012, 33: 91-97.
- [5] Hisada M, Kamiya S, Fujita K, et al. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res*, 2004, 64: 1152-1156.
- [6] Liu L, Wang S, Shan B, et al. IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumor effects for human oesophageal carcinoma cells. *Scand J Immunol*, 2008, 68: 22-29.
- [7] Morishima N, Owaki T, Asakawa M, et al. Augmentation of effector CD8⁺ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J Immunol*, 2005, 175: 1686-1693.
- [8] 刘丽华, 单保恩, 王士杰, 等. IL-27通过上调MIG和IP-10的表达抑制肿瘤血管形成. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16: 40-44.
- [9] Larousserie F, Charlot P, Bardel E, et al. Differential effects of IL-27 on human B cell subsets. *J Immunol*, 2006, 176: 5890-5897.
- [10] Cocco C, Morandi F, Airoidi I. Interleukin-27 and interleukin-23 modulate human plasma cell functions. *J Leukoc Biol*, 2011, 89: 729-734.
- [11] Giuliani N, Airoidi I. Novel insights into the role of interleukin-27 and interleukin-23 in human malignant and normal plasma cells. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 6963-6970.

(收稿日期:2013-02-03)

(本文编辑:刘志红)