

BAFF - R 介导的 NF - κ B 信号通路对多发性骨髓瘤细胞增殖及存活的作用研究

何 进 申娟娟 鞠少卿 孙亚军

摘要 目的 研究 B 淋巴细胞刺激因子受体 (BAFF - R) 介导的 NF - κ B 信号通路在多发性骨髓瘤 (MM) 中的作用, 并进一步研究 NF - κ B 信号通路对 MM 细胞存活的影响。方法 应用 Western blot 法分析 BAFF - R 对 NF - κ B 信号通路相关蛋白的激活情况; 同时通过 RT - PCR、ELISA、WST - 1 检测 NF - κ B 信号通路抑制剂 (BAY11 - 7082) 干预前后 BAFF - R mRNA 和蛋白表达水平以及对 MM 细胞增殖的影响。结果 BAFF - R 阻断性抗体 (0、1、5 和 15 μ g/ml) 能够减少 p52 和 p65 蛋白的入核, 增加 I κ B - α 蛋白表达量, 即 BAFF - R 能够激活 NF - κ B 信号通路。BAY11 - 7082 (1、2 和 4 μ mol/L) 显著降低 BAFF - R mRNA、蛋白表达水平, 减少 MM 细胞增殖和存活。结论 BAFF - R 激活 NF - κ B 信号通路促进多发性骨髓瘤细胞的增殖及存活, 进而参与多发性骨髓瘤的发生、发展。

关键词 B 淋巴细胞刺激因子受体 多发性骨髓瘤 NF - κ B 信号通路

中图分类号 R739.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.012

Study on NF - κ B Signaling Pathway Mediated by BAFF - R in Multiple Myeloma Cells and Its Effect on Cell Proliferation and Survival.

He Jin, Shen Xianjuan, Ju Shaoqing, et al. Hangzhou Gongshu District Hospital Which Combines Traditional Chinese Medicine with Western Medicine, Zhejiang 310015, China

Abstract Objective To investigate the effect of NF - κ B signaling pathway in multiple myeloma cells, and its effect on MM cells survival. **Methods** Protein levels of NF - κ B signaling pathway were detected by Western Blot. BAFF - R mRNA, protein and the proliferation ability of MM cells were examined before and after treated with the inhibitor of NF - κ B signaling pathway (BAY11 - 7082) by real - time PCR, ELISA and WST - 1. **Results** BAFF - R block antibody (0, 1, 5, 15 μ g/ml) reduced p52 and p65 protein into the nucleus, increased the expression of I κ B - α protein, namely BAFF - R could activate the NF - κ B signaling pathway. BAY11 - 7082 (1, 2, 4 μ mol/L) decreased BAFF - R mRNA, protein and the proliferation ability of MM cells. **Conclusion** BAFF - R activate NF - κ B signaling pathway to promote proliferation and survival of multiple myeloma cells, and then participate in the occurrence of multiple myeloma.

Key words B cells activating factor receptor; Multiple myeloma; NF - κ B signaling pathway

B 淋巴细胞刺激因子 (BAFF) 属于肿瘤坏死因子超家族成员, 是许多造血细胞的细胞存活因子, 属于 2 型跨膜蛋白。BAFF 通过与细胞表面的 3 个受体——B 细胞成熟抗原 (BCMA)、穿膜蛋白活化物 (TACI) 和 B 淋巴细胞刺激因子受体 (BAFF - R) 结合而广泛参与 B 淋巴细胞增殖和功能调节^[1]。BAFF - R 作为特异性受体在外周血 B 细胞存活中发挥重要作用^[2]。

NF - κ B 是重要的转录因子家族, 调节 B 细胞的存活和发展^[3,4]。B 细胞相关受体和一些肿瘤坏死因子可以激活 NF - κ B 信号转导途径。NF - κ B 是以无活性的 p50/p65/I κ B - α 三聚体形式普遍存在于细胞质中, 一旦 NF - κ B 信号通路被激活, 抑制蛋白 I κ B - α 发生解离使得 p50/p65 二聚体得以释放、转位入核与靶基因启动子/增强子上的 κ B 位点结合, 从而调节靶基因的表达^[5]。

BAFF 可以激活 NF - κ B 信号通路, 但 BAFF - R 在多发性骨髓瘤中介导的信号通路以及自身的转录调节的报道鲜少^[6]。BAFF - R 和 NF - κ B 信号通路之间的相互作用及其在多发性骨髓瘤细胞存活和增殖中作用尚不清楚。因此, 本实验拟研究 NF - κ B 信号通路在 BAFF - R 促进多发性骨髓瘤细胞存活中的作用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81271920); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81301498)

作者单位: 310015 杭州市拱墅区中西医结合医院 (何进); 226001 南通大学附属医院外科综合实验室 (申娟娟、鞠少卿), 医学检验中心 (鞠少卿); 226001 江苏省南通市第四人民医院检验科 (孙亚军)

通讯作者: 孙亚军, 电子邮箱: 364418408@qq.com

材料与与方法

1. 细胞培养及主要材料: MM 细胞系 KM3 (第二军医大学血液科提供) 悬浮生长于含 100ml/L 灭活胎牛血清 (Gibco 公司) 的 RPMI1640 培养基 (Gibco 公司) 中。磷酸化 IκB - α 抑制剂 BAY11 - 7082 (Calbiochem 公司); BAFF - R 抗体 (R&D 公司); p50、p65、IκB - α 抗体 (BioLengend 公司); RNA 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司); TRIzol (Invitrogen 公司); DNaseI (TaKaRa 公司); 细胞质及细胞核提取试剂盒 (Pierce 公司); DL 2000 DNA marker (上海生工生物公司); WST - 1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (碧云天公司)。

2. RT - PCR: 用 TRIzol 提取细胞的总 RNA, 并用紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度。分别取等量 RNA, 用反转录试剂盒反转合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, PCR 扩增目的条带。BAFF - R 引物序列: 5' - TGGGTCTGCTGAGCTGGA - 3' (上游引物); 5' - CCGGAGACAGAATGATGACCTT - 3' (下游引物)。同时以 β₂M 作为内参照扩增, 其引物序列为: 5' - CTATC-CAGCGTACTCCAA - 3' (上游引物); 5' - GCAGGCATACT-CATCTTTT - 3' (下游引物)。PCR 体系为 25 μl, 扩增条件为: 94℃ 预变性 2min, 94℃ 20s, 58℃ 40s, 72℃ 40s, 32 个循环后, 72℃ 5min。PCR 产物行 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 检测扩增产物。

3. WST - 1 细胞增殖检测: 收集对数生长期的 KM3 细胞, 调节细胞密度 4 × 10³ 个/孔, 加入 96 孔板, 每孔加入等体积标准 IgG 或者多克隆 BAFF - R 抗体 (终浓度达到 100μg/ml), 每孔补加培养基至 200μl, 继续培养 48h 后每孔加入 20μl WST 溶液, 培养 3h 后, 直接用酶联免疫检测仪检测, 以 450nm (650nm 参考) 波长测量各孔的吸光度 (A) 值。每组设定 5 个复孔。重复实验 3 次。

4. Western blot 法检测: 离心收集细胞, 加裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 冰上裂解 30min, 14000 × g 离心 5min, 取上清, 即为细胞总蛋白; 胞质胞核蛋白提取见细胞质及细胞核提取试剂盒说明书 (Pierce 公司), BCA 法测定蛋白浓度。蛋白与 5 × 上

样缓冲液混合煮沸 5min 后, 取 20μg 核蛋白、30μg 细胞总蛋白上样进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺 (SDS - PAGE) 凝胶电泳, 转膜并封闭。50g/L 的脱脂奶粉/TBST 按 1: 1000 稀释一抗, 4℃ 孵育过夜, 再加入 HRP 标记的相应二抗 4℃ 孵育 2h, 然后暗室中应用增强化学发光 (ECL) 液覆盖膜 2min, X 线胶片曝光, 显影, 定影。

5. 酶联免疫吸附试验 (ELISA): 根据 BAFF - R 蛋白测定试剂盒操作说明书, 测定 KM3 细胞培养液上清中 BAFF - R 蛋白浓度。

6. 统计学方法: 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析, 实验数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. BAFF - R 对多发性骨髓瘤细胞中 NF - κB 信号通路的影响: NF - κB 信号通路的活化过程包括 IκB - α 蛋白的降解、p50 和 p65 蛋白进入细胞核的过程, 实验拟检测 IκB - α 蛋白表达量的变化、p50 和 p65 蛋白在胞质和胞核中的分布情况。Western blot 法检测结果显示 BAFF - R 阻断性抗体作用后, p52 和 p65 蛋白在细胞核内的表达量减少, 当 BAFF - R 抗体浓度为 15μg/ml 时, 抑制效果更为明显 (图 1A), 表明 BAFF - R 阻断性抗体能够抑制 NF - κB 信号通路的激活作用, 间接说明 BAFF - R 介导了 NF - κB 信号通路。同时还检测了 IκB - α 蛋白的表达变化情况, 结果显示 IκB - α 蛋白表达量随着 BAFF - R 阻断性抗体浓度的增加而增加 (图 1B), 说明 BAFF - R 阻断性抗体可以阻断 NF - κB 信号通路, 间接说明 BAFF - R 能够激活多发性骨髓瘤细胞中的 NF - κB 信号通路。

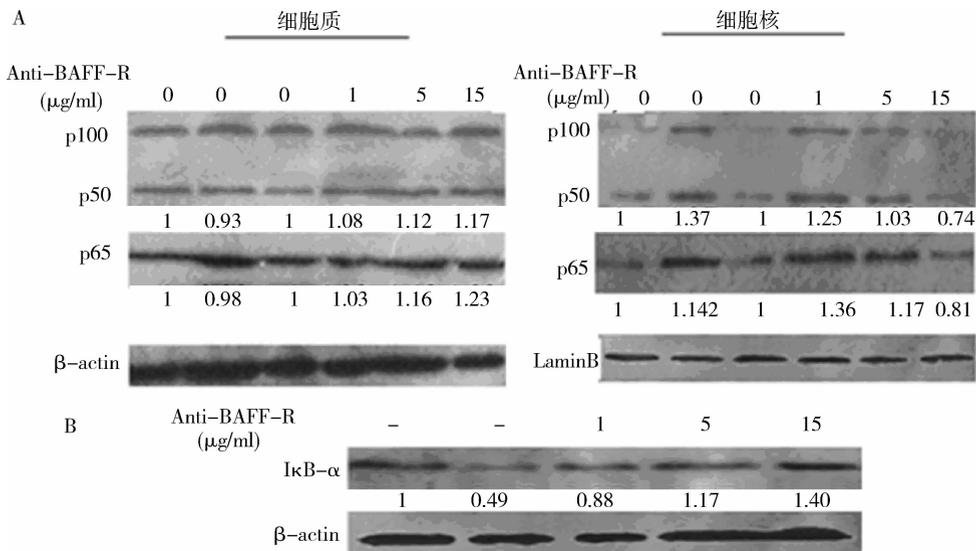


图 1 Western blot 法检测 BAFF - R 对 NF - κB 信号通路相关蛋白的表达影响

2. NF- κ B 抑制剂对细胞增殖的影响:不同浓度的 NF- κ B 抑制剂——BAY11-7082 (1、2、4 μ mol/L) 刺激 KM3 细胞,48h 后 WST-1 细胞增殖实验检测 KM3 细胞增殖能力的变化,结果显示 BAY11-7082 降低了细胞增殖能力,且 BAY11-7082 浓度越大抑制率越高,差异有统计学意义(t 分别为 10.39、14.53 和 32.18, P 均 <0.05 , 图 2)。这说明 NF- κ B 抑制剂能够抑制 KM3 细胞增殖,即 NF- κ B 信号通路参与了 MM 细胞生长。

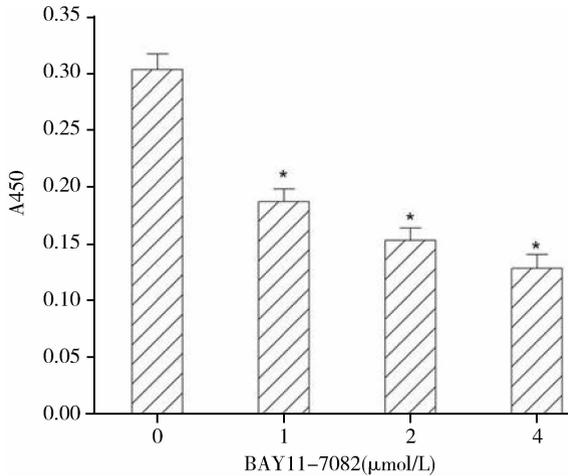


图 2 WST-1 细胞增殖实验检测 KM3 细胞增殖能力的变化与 0 μ mol/L 相比, * $P < 0.05$

3. NF- κ B 抑制剂对细胞凋亡的影响: NF- κ B 抑制剂——BAY11-7082 (4 μ mol/L) 刺激 KM3 细胞,48h 后 Western blot 法检测促凋亡蛋白 Bax 的表达变化情况,结果显示 Bax 蛋白表达增加了 38%,说明 BAY11-7082 能够显著促进细胞的凋亡,间接显示 NF- κ B 信号通路抑制细胞凋亡,促进多发性骨髓瘤细胞的生长(图 3)。

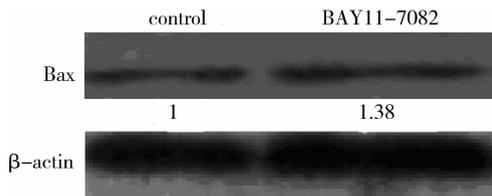


图 3 Western blot 法检测 Bax 蛋白表达变化

4. NF- κ B 抑制剂对 BAFF-R 表达的影响:不同浓度的 NF- κ B 抑制剂——BAY11-7082 (1、2、4 μ mol/L) 刺激 KM3 细胞,48h 后提取细胞 RNA 进行 RT-PCR,结果显示 BAY11-7082 能够降低 BAFF-R mRNA 的表达水平(图 4);ELISA 检测 BAFF-R 蛋白的表达水平,结果显示 BAY11-7082 作用后,

BAFF-R 蛋白表达量显著降低,且 BAY11-7082 浓度越大 BAFF-R 蛋白表达量越低,差异有统计学意义(t 分别为 43.57、199.00 和 189.20, P 均 <0.05 , 图 5),表明 NF- κ B 信号通路参与调节 BAFF-R 的表达。上述结果显示 NF- κ B 信号通路在 BAFF-R 表达及多发性骨髓瘤细胞存活中发挥重要作用。

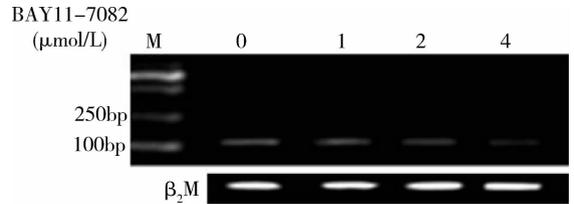


图 4 RT-PCR 检测 BAY11-7082 对 BAFF-R mRNA 表达的影响

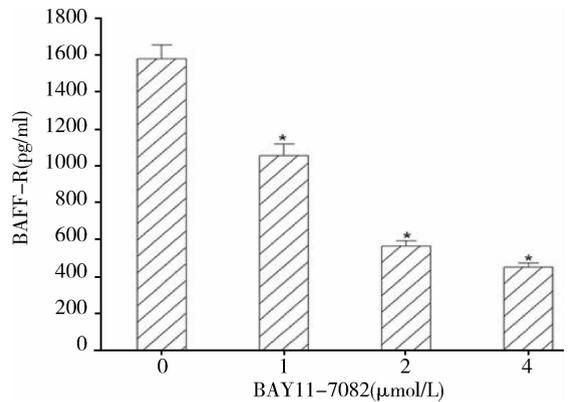


图 5 ELISA 检测 BAY11-7082 对分泌型 BAFF-R 蛋白表达的影响与 0 μ mol/L 相比, * $P < 0.05$

讨 论

多发性骨髓瘤病因十分复杂,涉及包括遗传、感染、电离辐射、抗原慢性刺激等在内的众多因素,目前一般认为以免疫发病机制为主,即骨髓微环境中黏附分子的表达和白细胞介素 IL-6 的分泌有关。最新研究表明,骨髓瘤患者中骨髓微环境还分泌白介素-10(IL-10)、白介素-11(IL-11)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、BAFF 等细胞因子。这些细胞因子在 MM 形成过程中发挥了一定的作用^[7,8]。Nardelli 等^[9]和 Shen 等^[10]研究证实,IL-10 和 IFN- γ 均能明显增强 BAFF 及受体表达,但具体机制尚待进一步研究。

B 淋巴细胞刺激因子(BAFF)是肿瘤坏死超家族成员,能够促进早期 B 淋巴细胞的成熟和存活。BAFF 与 3 个受体(TACI、BCMA、BAFF-R)结合而发

挥作用,其中 BAFF - R 作为其特异性的受体发挥主要作用,而且 BAFF 与 BAFF - R 的结合可以激活 NF - κ B 信号通路^[5,6]。本实验研究 NF - κ B 信号通路与 BAFF - R 表达、多发性骨髓瘤细胞存活之间的关系。

本研究发现 BAFF - R 抗体可以抑制 BAFF 对 NF - κ B 信号通路的激活作用,且这种抑制作用呈浓度依赖性。这些结果表明至少体外实验条件下 BAFF - R 能够激活 NF - κ B 信号通路,促进多发性骨髓瘤细胞的存活。NF - κ B 抑制剂 BAY11 - 7082 能够抑制 KM3 细胞的存活,且浓度越大抑制效果越明显。此外,BAY11 - 7082 还可以抑制 KM3 细胞中 BAFF - R mRNA 和蛋白的表达,这表明多发性骨髓瘤中 BAFF - R 的抗凋亡作用很大程度上取决于 NF - κ B 信号通路的激活。因此可以推断阻断多发性骨髓瘤中 BAFF - R 介导的 NF - κ B 信号通路可以打破 BAFF - BAFF - R 对多发性骨髓瘤细胞的保护作用,可能成为多发性骨髓瘤治疗的一种方法。

综上所述,对 BAFF - R 调节机制的研究有助于理解多发性骨髓瘤发生、发展,NF - κ B 信号通路可作为多发性骨髓瘤治疗的靶点。

参考文献

1 Fragioudaki M, Boula A, Tsirakis G, *et al.* B cell - activating factor: Its clinical significance in multiple myeloma patients[J]. *Ann Hematol*, 2012,91(9):1413 - 1418
 2 Fragioudaki M, Tsirakis G, Pappa CA, *et al.* Serum baf levels are re-

lated to angiogenesis and prognosis in patients with multiple myeloma [J]. *Leuk Res*, 2012, 36(8):1004 - 1008
 3 Fuchs O. Targeting of NF - kappaB signaling pathway, other signaling pathways and epigenetics in therapy of multiple myeloma[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*,2013,13(1):16 - 34
 4 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF - kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. *Annu Rev Immunol*,1998, 16:225 - 260
 5 Yuan H, Wang Y, Wu X, *et al.* Characterization of the 5' - flanking region and regulation of transcription of human BAFF - R gene[J]. *DNA Cell Biol*,2010,29(3):133 - 139
 6 Shinnors NP, Carlesso G, Castro I, *et al.* Bruton's tyrosine kinase mediates NF - kappa B activation and B cell survival by B cell - activating factor receptor of the TNF - R family[J]. *J Immunol*,2007,179:3872 - 3880
 7 Zdzińska B, Bojarska - Junak A, Dmoszyńska A, *et al.* Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells [J]. *Arch Immunol Ther Exp:Warsz*,2008, 56: 207 - 221
 8 Jiang P, Yueguo W, Huiming H, *et al.* B - Lymphocyte stimulator: a new biomarker for multiple myeloma [J]. *Eur J Haematol*, 2009, 82: 267 - 276
 9 Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, *et al.* Synthesis and release of B - lymphocyte stimulator from myeloid cells [J]. *Blood*,2001, 97: 198 - 204
 10 Shen X, Zhang X, Xu G, *et al.* BAFF - R gene induced by IFN - γ in multiple myeloma cells is related to NF - κ B signals[J]. *Cell Biochem Funct*,2011,29(6):513 - 520

(收稿日期:2014 - 09 - 29)

(修回日期:2014 - 10 - 09)

2011 ~ 2013 年连云港市结核病耐药监测结果分析

仲崇桥 杨皓舒 徐素珍 付鑫 王建明

摘要 目的 分析江苏省连云港市结核病耐药现状,为制定有针对性的结核病防制策略提供参考。**方法** 对连云港市 2011 ~ 2013 年确诊的 1976 例涂阳结核病患者进行痰菌培养,对分离出的 1521 株结核分枝杆菌进行 4 种一线抗结核药物耐药检测。**结果** 连云港市结核病总耐药率 17.23%,其中初始耐药率 12.67%,复治耐药率为 40.4%。初治组和复治组均以异烟肼 (INH) 耐药率最高,分别为 8.81% 和 34.8%。耐多药率为 4.34%,其中初治患者耐多药率 2.20%,复治患者耐多药率 15.20%。不同年龄和性别的患者耐多药率差异具有统计学意义。**结论** 连云港市复治结核病患者耐药率较高,应规范结核病治疗方案,加强督导管理,预防和控制耐药结核病的发生和流行。

关键词 结核分枝杆菌 结核病 耐药

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473027, 81072351);江苏省科技支撑计划基金资助项目(BE2011841);江苏高校哲学社会科学基金项目(2014SJB164)

作者单位:211166 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系(仲崇桥、王建明);222003 江苏省连云港市疾病预防控制中心慢性传染病防制科(仲崇桥、杨皓舒、徐素珍、付鑫)

通讯作者:王建明,电子邮箱:jmwang@njmu.edu.cn