

双歧杆菌脂磷壁酸对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞生物学特性的影响

秦卫玲 赵玉洁 邢会茹 武金日 窦敬芳 贺立山

摘要 目的 探讨双歧杆菌脂磷壁酸对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞增殖及细胞因子分泌情况的影响。方法 应用密度-梯度离心法分别获取多发性骨髓瘤患者及对照组骨髓间充质干细胞,应用流式细胞仪确定间充质干细胞表型,EDU法和ELISA法分别检测不同质量浓度(0.5、1.0、2.0、4.0、6.0g/L)的双歧杆菌脂磷壁酸共培养后的骨髓间充质干细胞增殖率及培养液上清中IL-17及IL-6含量变化。**结果** 多发性骨髓瘤患者与对照组骨髓间充质干细胞的形态及表型表达完全相同,当双歧杆菌脂磷壁酸干预质量浓度为1.0g/L和2.0g/L时,多发性骨髓瘤组间充质干细胞的增殖率显著高于正常对照组($P < 0.05$),质量浓度为4.0g/L和6.0g/L时,细胞增殖率反而显著低于正常对照组($P < 0.05$)。多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的IL-17和IL-6水平均显著高于正常人,应用0.5、1.0、2.0和4.0g/L双歧杆菌脂磷壁酸干预后,其细胞因子的表达水平显著下降($P < 0.05$)。**结论** 一定质量浓度的双歧杆菌脂磷壁酸可以促进多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的增殖且降低其IL-17和IL-6的表达水平。

关键词 多发性骨髓瘤 双歧杆菌脂磷壁酸 骨髓间充质干细胞 白细胞介素-17 白细胞介素-6

中图分类号 R551.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.036

Effects of Lipoteichoic acid Extracted from *Bacillus Bifidus* on Biological Characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Patients with Multiple Myeloma. Qin Weiling, Zhao Yujie, Xing Huiru, et al. Department of Hematopathy, The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan 453001, China

Abstract Objective To investigate the effect of lipoteichoic acid extracted from *Bacillus bifidus* on the proliferation and cytokine secretion of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) from the patients with multiple myeloma. **Methods** The MSCs were obtained from patients with multiple myeloma and healthy people using the method of density gradient centrifugation and were analysed by flow cytometry. Moreover the proliferation and the expression of IL-17 and IL-6 in the culture medium of cells cocultured with different concentration (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0g/L) of lipoteichoic acid were tested with EDU stain and ELISA respectively. **Results** The morphology and phenotype of MSCs from patients with multiple myeloma were the same as those were obtained from the controls. The proliferation rate of MSCs in the multiple myeloma group was significantly higher than the normal group when the concentration was 1.0g/L and 2.0g/L ($P < 0.05$). However, it showed opposite performance when the concentration was 4.0g/L and 6.0g/L ($P < 0.05$). The expression of IL-17 and IL-6 were significantly higher than those in control group, and were also significantly decreased after treated with lactobacillus with different concentration (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0g/L). **Conclusion** A certain concentration of bifidobacterium acid can promote the proliferation of MSCs and decrease the expression of IL-17 and IL-6 in patients with multiple myeloma.

Key words Multiple myeloma; Lipoteichoic acid; Bone marrow mesenchymal stem cells; Interleukin-17; Interleukin-6

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是血液系统疾病中常见的一种恶性肿瘤,多见于中老年人,以浆细胞恶性克隆增殖为主要特征,临床表现往往为溶骨性骨质破坏、高黏滞综合征、急慢性肾衰竭及凝血功能障碍为主^[1]。近年来,越来越多的研究证实多发性骨髓瘤患者的骨髓微环境与肿瘤细胞生长、增殖

以及耐药之间存在着密切联系,对该类细胞及其分泌的细胞分子调控亦已成为目前多发性骨髓瘤临床治疗的研究方向之一^[2-4]。双歧杆菌脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)是一种重要的免疫调节剂,在抗肿瘤、抗感染、降血脂和延缓衰老等方面发挥着重要的生物学作用^[5]。本实验通过研究青春双歧杆菌脂磷壁酸对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞增殖及细胞因子分泌情况的影响,初步探讨其在该疾病临床治疗应用中的可行性。

作者单位:453003 新乡医学院第三附属医院血液内科(秦卫玲、赵玉洁、邢会茹、武金日、窦敬芳);453001 新乡医学院第一附属医院血液内科(贺立山)

对象与方法

1. 研究对象:选取笔者医院 2016 年 5 月~2017 年 5 月血液科确诊的 30 例多发性骨髓瘤患者为试验组,所有患者均符合《血液病诊断及疗效标准》诊断标准^[6]。根据多发性骨髓瘤国际分期系统(ISS)进行疾病分期,其中 I 期 3 例,II 期 13 例,III 期 14 例,男性 18 例,女性 12 例,患者年龄 40~65 岁,中位数为 55 岁。对照组选择与多发性骨髓瘤患者性别、年龄相匹配的正常骨髓患者 30 例。两组人群的性别分布、年龄差异均无统计学意义。本研究提请医院伦理学委员会批准通过,并与患者签署知情同意书。

2. 主要试剂及仪器:双歧杆菌脂磷壁酸按照乐军等方法从青春双歧杆菌中分离纯化^[7]。PE 标记的 CD34、CD44 单克隆抗体购自北京索莱宝科技有限公司;人 IL-17 及 IL-6 酶联免疫(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;DMEM 培养液和胎牛血清均购自美国 Sigma 公司;细胞分离液购自于北京天根生化科技有限公司;EDU 细胞增殖检测试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司。CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司,流式细胞仪购自南京兆坤仪器有限公司。

3. 方法:(1)骨髓间充质干细胞分离、培养与鉴定:无菌条件下分别采集对照组与多发性骨髓瘤患者骨髓各 5ml,应用人淋巴细胞分离液常规离心,收集中间细胞层后应用 DMEM 完全培养液洗涤后备用。将上述细胞稀释浓度至 5.0×10^5 /L 后接种于细胞培养瓶内,添加 DMEM 完全培养液,并置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内进行孵育。待细胞融合率达到 80% 以上之后,对上述细胞进行传代培养,收集第 3 代细胞,常规胰蛋白酶消化之后添加 PE 标记的 CD34、CD44 单克隆抗体,应用流式细胞仪进行鉴定。(2)EDU 法检测细胞增殖率:将生长状态良好的上述骨髓间充质干细胞接种于 96 孔板,浓度为 5.0×10^3 个/孔,每组各设 5 个重复孔,培养 12h 后弃去原培养基,分别加

入含有相应浓度双歧杆菌脂磷壁酸(终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0g/L)的 DMEM 完全培养基,继续培养至 72h,每孔分别加入 50μmol 的 EDU 试剂,37℃、5% CO₂ 继续培养 2h,荧光显微镜下计数 EDU 阳性细胞数,确定不同浓度双歧杆菌脂磷壁酸共培养的骨髓间充质细胞的相对增殖率。(3)骨髓间充质干细胞培养液上清中 IL-17、IL-6 检测:按照 EDU 法培养多发性骨髓瘤患者及对照组骨髓间充质干细胞分别至 72h,分别应用人 IL-17、IL-6 酶联免疫检测试剂盒检测培养液上清中的 IL-17 及 IL-6 含量,操作方法严格按照试剂盒说明书进行,酶标仪读取 A₂₆₀ 值,应用酶联免疫析软件绘制标准曲线并计算其浓度。

4. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,各组数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组样本均数比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 多发性骨髓瘤患者与对照组骨髓间充质干细胞形态及鉴定结果:对照组与多发性骨髓瘤患者的骨髓间充质干细胞在接种 48h 后均呈贴壁性生长,荧光倒置显微镜下观察细胞形态无明显差异,均为长梭形或者三角形,细胞核较大,呈旋涡状生长,结果见图 1。将培养 72h 后的细胞行流式细胞仪检测后均呈现出 CD34 阴性表达、CD44 阳性表达,表明所获细胞均具有骨髓间充质干细胞特性,结果见图 2。

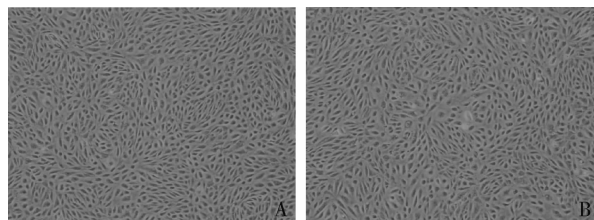


图 1 正常对照组与多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞形态(荧光染色, ×200)

A. 对照组骨髓间充质干细胞;B. 多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞。骨髓间充质干细胞均为长梭形或三角形

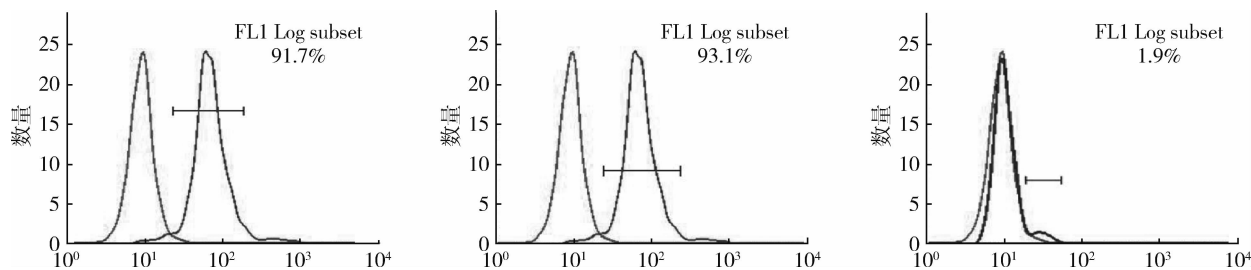


图 2 对照组与多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞流式细胞仪 CD44 检测结果

A. 对照组骨髓间充质干细胞,CD44 阳性表达率为 91.7%;B. 多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞 CD44 阳性表达率为 93.1%;C. 阴性对照

2. EDU 法检测细胞增殖率:EDU 检测结果显示双歧杆菌脂磷壁酸质量浓度为 1.0g/L 和 2.0g/L 时,多发性骨髓瘤患者的间充质干细胞增殖率显著高于对照组($P < 0.05$);当质量浓度为 4.0g/L 和 6.0g/L 时,其细胞增殖率反而低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 1、图 3。

表 1 不同浓度双歧杆菌脂磷壁酸共培养后的骨髓间充质干细胞相对增殖率($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	计数细胞数	增殖率(%)
对照组	200	78.2 ± 6.3
LTA0.5	200	80.1 ± 5.4
LTA1.0	200	90.5 ± 6.1*
LTA2.0	200	95.4 ± 4.1*
LTA4.0	200	65.2 ± 6.4#
LTA6.0	200	60.3 ± 4.6#

与对照组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$

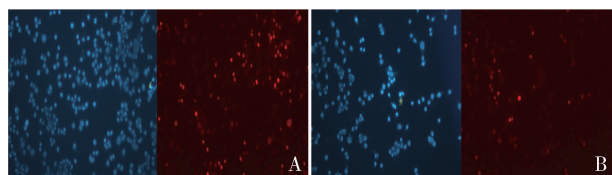


图 3 不同浓度双歧杆菌脂磷壁酸共培养后的骨髓间充质干细胞相对增殖率(EDU, ×200)

A. 2.0g/L 双歧杆菌脂磷壁酸共培养后的骨髓间充质干细胞相对增殖率;B. 6.0g/L 双歧杆菌脂磷壁酸共培养后的骨髓间充质干细胞相对增殖率

3. 骨髓间充质干细胞培养液上清中 IL-17、IL-6 检测:ELISA 结果显示对照组骨髓间充质干细胞中 IL-17、IL-6 水平显著低于多发性骨髓瘤患者, ($P < 0.05$)。经 0.5、1.0、2.0、4.0g/L 双歧杆菌脂磷壁酸干预后,多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞 IL-17、IL-6 水平均显著下降($P < 0.05$),结果如图 4 所示。

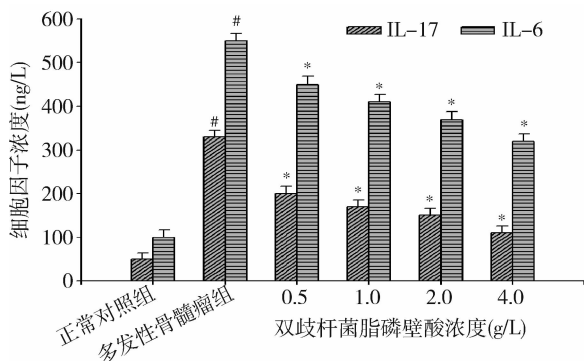


图 4 双歧杆菌脂磷壁酸对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞细胞因子分泌的影响

与对照组比较,* $P < 0.05$;与多发性骨髓瘤组比较,* $P < 0.05$

讨 论

骨髓间充质干细胞及其分泌的细胞因子是参与骨髓微环境构成的重要因素,而骨髓微环境在调控骨髓造血及骨髓来源肿瘤细胞的增殖过程中均起着举足轻重的作用。多发性骨髓瘤是骨髓浆细胞的恶性克隆增生性疾病,肿瘤细胞各项生物学特性均与骨髓微环境密切相关,因此以骨髓间充质干细胞为治疗靶点,继而通过实现骨髓微环境的干预已经成为本病治疗的可行性选择之一^[8]。Li 等^[9]证实骨髓间充质干细胞,特别是外源性骨髓间充质干细胞能够有效地促进骨形成,同时抑制多发性骨髓瘤骨病及高侵袭性骨髓瘤细胞在骨骼中的生长。林如峰等^[10]证实沙利度胺和地塞米松联合应用可以诱导多发性骨髓瘤患者间充质干细胞的凋亡并降低 IL-6 及 SCF 的表达。此次实验中进行了对照组及多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞分离与培养,经流式细胞术鉴定两组细胞均呈现出 CD34 阴性表达、CD44 阳性表达,表明所获得的两种细胞均为单一细胞,且具有骨髓间充质干细胞特性。

IL-6 是白细胞介素家族中重要的细胞因子之一,与该病情进展密切相关,可以通过旁分泌及自分泌方式促进多发性骨髓瘤细胞的生长、存活及增殖,同时刺激骨骼的重吸收。多发性骨髓瘤患者的骨髓基质细胞还可以通过持续性 IL-6 的生成,以抵抗化疗药物诱导的骨髓瘤细胞凋亡作用^[11]。张鹏宇等^[12]应用硼替佐米联合地塞米松或环磷酰胺及地塞米松治疗初治多发性骨髓瘤,证实治疗 3 个疗程后血清 IL-6 和铁蛋白水平均较治疗前显著下降。IL-17 是近年来新发现的一种促炎性细胞因子,通过与受体特异性结合,促进包括 IL-1、IL-6 及 TNF 等多种炎性因子的产生,在促进炎症发展、免疫应答及造血过程发挥重要的调节作用,近年来有关 Th17 细胞及细胞因子 IL-17 与多发性骨髓瘤的相关性研究逐渐增多。Prabhala 等^[13]研究发现, Th17 细胞不但可以诱导骨髓瘤细胞的形成,其分泌的细胞因子 IL-17 在促进骨髓瘤细胞增殖的同时,并可以抑制自身免疫功能。张耀等^[14]研究证实,多发性骨髓瘤患者外周血 Th17 细胞的百分率及细胞因子 IL-17 含量均明显高于正常人,推测其可能作为启动因素参与了多发性骨髓瘤患者的免疫发病过程,并促进了病情的进展。杨云等^[15]发现应用沙利度胺治疗后的多发性骨髓瘤患者外周血中 Th17 细胞百分率、RORγt mRNA 表达水平及血浆 IL-17 水平均比治疗前明显降低,推测抑制 Th17 细胞可能是沙利度胺发挥抗多发性骨

髓瘤细胞的作用机制之一。

双歧杆菌是人与动物肠道内的有益菌群之一,对宿主健康起着重要的调节作用,双歧杆菌脂磷壁酸最初是分离于发酵乳酸杆菌的一类含磷酸甘油残基的分子,也是该菌发挥生物学作用的重要表面结构成分^[16]。利用不同质量浓度的双歧杆菌脂磷壁酸对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞进行干预,发现质量浓度为 1.0g/L 和 2.0g/L 的双歧杆菌脂磷壁酸可以促进细胞增殖,而 4.0g/L 和 6.0g/L 的双歧杆菌脂磷壁酸对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞增殖有明显的抑制效果。另外发现,多发性骨髓瘤患者的骨髓间充质干细胞中 IL-6 和 IL-17 水平显著高于正常人($P < 0.05$),而质量浓度为 0.5、1.0、2.0 及 4.0g/L 的双歧杆菌脂磷壁酸可使其表达水显著下降($P < 0.05$)。

综上所述,多发性骨髓瘤患者的骨髓间充质干细胞 IL-17 和 IL-6 表达水平明显上升,一定质量浓度的双歧杆菌脂磷壁酸可以促进多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的增殖并可以降低 IL-17 和 IL-6 表达水平。

参考文献

- 1 马玲,傅琤琤,刘辉,等. PDD 与 PAD 方案治疗初治多发性骨髓瘤患者的疗效和安全性比较[J]. 中华血液学杂志,2015,36(4):340-343
- 2 李军,李炳宗,陈萍,等. 硼替佐米对多发性骨髓瘤患者间充质干细胞自噬活性和成骨分化潜能的影响[J]. 中华内科杂志,2012,51(2):140-142
- 3 李炳宗,庄文卓,陈萍,等. 多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞免疫调节功能异常及其在骨髓瘤骨病中的作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2010,9:853-859
- 4 Li S, Jiang Y, Li A, *et al.* Telomere length is positively associated with

the expression of IL-6 and MIP-1 α in bone marrow mesenchymal stem cells of multiple myeloma[J]. Mol Med Rep,2017,16(3):2497-2504

- 5 付艳茹,黄少磊,龚虹,等. 双歧杆菌脂磷壁酸的提取及功能的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2014,26(10):1224-1229
- 6 张之南,沈悝. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京:科学技术出版社.2007:232-234
- 7 乐军,胡宏. 非离子型去垢剂 Tritonx-114 提取两歧双歧杆菌的脂磷壁酸[J]. 中国微生态学杂志,1997,9(4):5-8
- 8 Xu S, Menu E, De Becker A, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are attracted by multiple myeloma cell-produced chemokine CCL25 and favor myeloma cell growth in vitro and in vivo[J]. Stem Cells, 2012,30(2):266-279
- 9 Li X, Ling W, Khan S, *et al.* Therapeutic effects of intrabone and systemic mesenchymal stem cell cytottherapy on myeloma bone disease and tumor growth[J]. Bone Miner Res,2012,27(8):1635-1648
- 10 林如峰,陆化,刘澎,等. 三氧化二砷、地塞米松和沙利度胺对骨髓瘤细胞 U266 凋亡及胞浆内 Ca²⁺ 浓度的影响[J]. 中国实验血液学杂志,2007,15(6):1200-1203
- 11 Salem DA, Korde N, Venzon DJ, *et al.* Expression of the IL-6 receptor alpha-chain (CD126) in normal and abnormal plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma[J]. Leuk Lymphoma,2017,25:1-9
- 12 张鹏宇,陈银霞,曹星梅,等. 硼替佐米为主的化疗方案治疗初治多发性骨髓瘤疗效观察以及对 IL-6 和铁蛋白的影响[J]. 陕西医学杂志,2016,45(11):1511-1514
- 13 Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, *et al.* Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma[J]. Blood,2010,115(26):5385-5392
- 14 张耀,宋路茜,张曦,等. 多发性骨髓瘤患者外周血 Th17 细胞功能研究[J]. 中国实验血液学杂志,2013,21(5):1187-1189
- 15 杨云,何爱丽,王剑利,等. 沙利度胺对多发性骨髓瘤患者外周血 Th17 细胞影响的研究[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23(5):1341-1345
- 16 Guo B, Xie N, Wang Y. Cooperative effect of Bifidobacterial lipoteichoic acid combined with 5-fluorouracil on hepatoma-22 cells growth and apoptosis[J]. Bull Cancer,2015,102(3):204-212
(收稿日期:2017-09-09)
(修回日期:2017-10-10)

(接第 171 页)

- 8 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华心血管病杂志,2011,39(7):579-616
- 9 张维忠,施海明,王瑞冬,等. 动态血压参数正常参照值协作研究[J]. 中华心血管病杂志,1995,23(5):325-328
- 10 Parati G, Pomidossi G, Albini F, *et al.* Relationship of 24h blood pressure mean and variability to severity of target-organ damage in hypertension[J]. J Hypertens, 1987,5(1):93-98
- 11 王渝,朱炬,张哲成,等. 血压变异性与高血压小卒中患者急性期神经功能恶化的关系[J]. 天津医药,2015,(9):1008-1011
- 12 Suchy-Dicey AM, Wallace ER, Mitchell SV, *et al.* Blood pressure variability and the risk of all-cause mortality, incident myocardial infarction and incident stroke in the cardiovascular health study[J]. Am J Hypertens,2013,26(10):1210-1217
- 13 Hata Y, Muratani H, Kimura Y, *et al.* Office blood pressure variability as a predictor of acute myocardial infarction in elderly patients receiving antihypertensive therapy[J]. J Hum Hypertens,2002,16(2):141-146
- 14 张汉,梁毅娜,余剑,等. 脑梗死急性期血压水平及其变异率对病情

严重程度的影响[J]. 岭南急诊医学杂志,2015,20(4):296-298

- 15 Chung JW, Kim N, Kang J, *et al.* Blood pressure variability and the development of early neurological deterioration following acute ischemic stroke[J]. J Hypertens, 2015, 33(10):2099-2106
- 16 孔艳玲,冯硕旦,焦凤有. 血压变异性与脑梗死患者认知功能损害的关系分析[J]. 内科,2016,11(6):882-884
- 17 Lee JH, Oh E, Oh MS, *et al.* highly variable blood pressure as a predictor of poor cognitive outcome in patients with acute lacunar infarction[J]. Cogn Behav Neurol,2014,27(4):189-198
- 18 王晓蓉,魏亚荣,何海燕,等. 动态血压监测评价硝苯地平控释片对亚急性脑梗死合并高血压患者血压参数的影响[J]. 中国综合临床,2013,29(3):281-285
- 19 Bailey EL, McBride MW, Beattie W, *et al.* Differential gene expression in multiple neurological, inflammatory and connective tissue pathways in a spontaneous model of human small vessel stroke[J]. Neuropathol Appl Neurobiol,2014,40(7):855-872
(收稿日期:2017-06-20)
(修回日期:2017-07-18)