

miR-15a 在多发性骨髓瘤患者外泌体中的表达及外泌体对肿瘤生长的影响

胡思颢¹, 金强¹, 方福瑾¹, 陈中新²

(1. 蚌埠市第三人民医院, 安徽 蚌埠 233000; 2. 蚌埠医学院第一附属医院, 安徽蚌埠 233000)

摘要: [目的] 探讨 miR-15a 在多发性骨髓瘤(MM)患者外泌体中的表达及外泌体对肿瘤发生发展的意义。[方法] 选择在我院治疗的 MM 患者 71 例及健康志愿者 20 例, 分析 miR-15a 在血浆外泌体中的表达水平; 并以人源 MM 细胞株 MM.1R 细胞为实验模型, 采用增殖实验观察外泌体对肿瘤细胞增殖的影响, 采用流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡, 采用 Western blot 检测凋亡通路相关蛋白的表达。[结果] 与健康志愿者相比, MM 患者的血浆 miR-15a 水平显著降低(4.45 ± 0.20 vs 12.86 ± 0.63 , $P < 0.001$), 且与患者临床分期有关($P = 0.023$)。当使用 MM 患者来源的外泌体处理 MM.1R 细胞后, 实验组细胞增殖率较对照组提高, 在 12h、24h、48h 时分别提高了 14.1%、34.0%、52.7% ($P < 0.01$); 而健康志愿者来源的外泌体则使细胞增殖率降低, 在 12h、24h、48h 时分别降低了 12.4%、20.8%、27.5% ($P < 0.01$)。流式细胞术结果显示, MM 患者来源外泌体抑制了肿瘤细胞凋亡, 24h 凋亡率减少了 3.3% ($P = 0.005$); 而健康志愿者来源外泌体促进了肿瘤细胞凋亡, 24h 凋亡率增加了 7.8% ($P < 0.001$)。Western blot 检测发现 MM 组的 Bcl-2 表达增加, Bax 和 caspase-3 表达下降, 与健康志愿者来源的外泌体作用相反。[结论] 促凋亡因子 miR-15a 在 MM 患者外泌体中的表达水平低于健康人群, 且 MM 患者来源的外泌体具有促进肿瘤发展的作用。

关键词: 多发性骨髓瘤; 外泌体; miR-15a; Bcl-2; 凋亡

中图分类号: R733.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)06-0491-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.06.B005

Expression of miR-15a in Exosomes of Patients with Multiple Myeloma and the Effect of Exosomes on Tumor Cell Proliferation and Apoptosis

HU En-bi¹, JIN Qiang¹, FANG Fu-jin¹, CHEN Zhong-xin²

(1. Bengbu Third People's Hospital, Bengbu 233000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression levels of miR-15a in exosomes of patients with multiple myeloma (MM) and the effects of exosomes on apoptosis and proliferation of tumor cells. [Methods] The miR-15a levels in plasma exosomes of 20 healthy subjects and 71 MM patients were detected. A human MM cell line MM.1R was used as the experimental model to explore the effect of exosomes on tumor cell proliferation. The apoptosis of tumor cells was detected by flow cytometry, and the expression of proteins related to apoptosis pathways was detected by Western blot. [Results] Plasma miR-15a levels in MM patients was significantly decreased, compared with healthy subjects (4.45 ± 0.20 vs 12.86 ± 0.63 , $P < 0.001$); and it was associated with the clinical stages ($P = 0.023$). When MM.1R cells were treated with exosomes from MM patients, the proliferation rate was higher than that of the PBS control group, increased by 14.1%, 34.0% and 52.7% after 12h, 24h and 48h of treatment, respectively ($P < 0.01$). When MM.1R cells were treated with exosomes from healthy subjects, the proliferation rate reduced by 12.4%, 20.8% and 27.5% after 12h, 24h and 48h of treatment, respectively ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that cell apoptosis was reduced by 3.3% after 24h treatment with exosomes from MM patients ($P = 0.005$); cell apoptosis increased by 7.8% 24h after treatment with exosomes from healthy subjects ($P < 0.001$). Western blot analysis showed that the expression of Bcl-2 increased, Bax and caspase-3 decreased in the MM group, which were contrary to the results of the control group. [Conclusion] The expression of miR-15a in exosomes of MM patients is down-regulated, and exosomes from MM patients can inhibit apoptosis and promote proliferation of MM cells.

Subject words: multiple myeloma; exosome; miR-15a; Bcl-2; apoptosis

通信作者: 胡思颢, 主管检验师, 学士; 安徽省蚌埠市第三人民医院检验科, 安徽省蚌埠市蚌山区胜利中路 38 号(233000); E-mail: 2319434553@qq.com

收稿日期: 2019-08-21; 修回日期: 2019-09-20

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种恶性单克隆浆细胞增殖性疾病,其发生率约占血液系统恶性肿瘤的13%及所有肿瘤的1%。MM好发于中老年群体,患者的血液或尿液中常存在单克隆蛋白,并伴有器官功能障碍、肾功能损害、溶骨性破坏、高钙血症、贫血、易感染等临床症状。其发病原因尚不清楚,可能与病毒感染和电离辐射有关^[1]。近年来由于造血干细胞移植的广泛应用,以及沙利度胺、来那度胺和硼替佐米等药物的联合用药,患者的整体生存时间得到明显延长,但MM仍然是不可治愈的疾病^[2-3]。

外泌体(exosome)是由细胞向细胞外间隙释放的一类具有脂质双分子层的微小囊泡,直径一般在40~100nm。外泌体中含有母体细胞来源的蛋白质、脂质、RNA等,在机体免疫、抗原提呈、细胞间信号传导、能量代谢等多种过程中发挥重要作用^[4]。在肿瘤性病理条件下,肿瘤细胞来源外泌体能够改变肿瘤微环境,促进肿瘤细胞增殖,加速血管新生,并帮助肿瘤组织实现免疫逃逸。本研究通过检测miR-15a在MM患者外泌体中的表达水平,分析外泌体对MM肿瘤细胞增殖、凋亡的作用,探讨了miR-15a及外泌体在MM发展过程中的意义。

1 材料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 临床样本

选择2015年8月至2018年6月在我院治疗的多发性骨髓瘤患者71例为研究对象。多发性骨髓瘤的诊断参照2015版的《中国多发性骨髓瘤诊治指南》。71例患者中男性39例,女性32例,中位年龄53.7(28~75)岁。其中,IgG型39例,IgD型14例,IgA型18例;Ⅰ期19例,Ⅱ期22例,Ⅲ期30例[采用国际分期系统(ISS)标准]。另采集20名健康志愿者的血液样本作为正常对照。本研究所有病历资料完整,并征得患者同意。本研究经我院伦理委员会批准。

1.1.2 细胞株及试剂

MM.1R人多发性骨髓瘤细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),RPMI 1640培养基(Invitrogen),胎牛血清(Gibco),MTT(北京鼎国),外泌体

提取试剂盒(北京博尔迈),miRNA提取试剂盒(Invitrogen),PCR试剂盒(Thermo Fisher),Bcl-2、Bax、caspase-3抗体(Abcam),细胞凋亡试剂盒(BD公司)。

1.2 Real-time PCR检测外泌体中miR-15a水平

按照外泌体提取试剂盒说明书所述方法提取患者和健康组血液中外泌体,然后根据miRNA提取试剂盒的方法提取外泌体miRNA,并加上Poly(A)尾后反转录成cDNA。PCR上游引物:5'-TAGCAGCA-CATAATGGTTTGTG-3',下游引物为试剂盒中提供。内参基因U6上游引物为5'-GTGCTCCCTGCTTCG-GCAGCACATATAC-3',下游为5'-AAAAATATG-GAACGCTTCACGAATTG-3',具体操作按照试剂盒说明书进行。每次实验设置3个平行组,并通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.3 MTT法检测细胞增殖

取MM患者和健康志愿者血液各10.0ml,按1.2中方法分离外泌体并用PBS重悬至1.0ml备用。取对数生长期的MM.1R人多发性骨髓瘤细胞,以 $104/\mu\text{l}$ 接种于96孔板,每组重复5次。24h后,将20 μl 的MM患者来源或健康志愿者来源的外泌体分别加入各培养孔中,对照组加入磷酸盐缓冲液(PBS)。培养12、24、48h后,去除培养基,然后加入MTT试剂孵育4h,DMSO溶解后于酶标仪490nm处测量吸光值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将5 μl 来源于MM患者或健康志愿者的外泌体加入MM.1R细胞培养液中培养24h后,收集细胞,PBS清洗3次,然后根据说明书使用annexin V/PI双染色试剂盒染色后在流式细胞仪中检测细胞凋亡,并使用Flow Jo 7.6.1软件(Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)分析数据。

1.5 Western blot检测蛋白表达

MM患者来源和健康志愿者来源的外泌体培养MM.1R细胞24h后,收集细胞,加入RIPA裂解液,使细胞充分裂解,并收集上清液。初步检测蛋白含量后,样品经12% SDS-PAGE电泳上分离,完成后转移到PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭1h,一抗4℃孵育过夜;然后加入二抗,常温孵育1h,使用WesternBright™ ECL prime蛋白质印迹检测试剂显影,Quantity One软件进行半定量分析。

1.6 统计学处理

数据统计和比较采用 SPSS 20.0 软件, 结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MM 患者血浆外泌体 miR-15a 水平

miR-15a 在 MM 患者和健康志愿者的血浆外泌体中的表达水平见 Figure 1。对照组的相对表达量为 12.86 ± 0.63 , MM 组的相对表达量为 4.45 ± 0.20 , 与对照组相比, MM 患者的平均 miR-15a 水平显著降低($P<0.01$)。初步的临床病理特征分析发现(Table 1), miR-15a 水平与 MM 患者的年龄、性别无关 ($P>0.05$), 而与 ISS 分期有关, 晚期 MM 患者的 miR-15a 水平更低(4.91 ± 0.21 vs 3.82 ± 0.25 , $P=0.023$)。

2.2 不同来源外泌体对 MM.1R 细胞增殖的影响

使用 MM 患者来源、健康志愿者来源的外泌体或者 PBS 分别处理 MM.1R 细胞 12h、24h、48h 后, 细胞的增殖率如 Figure 2 所示。患者来源的外泌体使 MM 组的细胞增殖率显著高于 PBS 对照组 ($P<0.01$), 且随着时间的增加而增加, 在 12h、24h、48h 时分别增加了 14.1%、34.0%、52.7%。与之相反, 当使用健康志愿者的外泌体处理 MM.1R 细胞后, 细胞增殖率随着时间的增加而降低, 在 12h、24h、48h 时分别降低了 12.4%、20.8%、27.5%。

2.3 不同来源外泌体对 MM.1R 细胞凋亡的影响

使用低剂量不同来源的外泌体处理 MM.1R 细胞 24h 后, 与阴性对照的 PBS 组相比, MM 组的凋亡率降低了 3.3% ($P=0.005$), Healthy 组的凋亡率增加了 7.8% ($P<0.001$), 提示 MM 患者来源的外泌体具有抑制肿瘤凋亡的作用; 健康志愿者来源的外泌体具有促进凋亡的作用 (Figure 3)。

Table 1 Relationships between miR-15a levels and age, gender, and ISS stage of MM patients

Index	n	miR-15a levels	P
Age(years)			0.203
≤ 55	37	4.34 ± 0.24	
> 55	34	4.57 ± 0.31	
Gender			0.587
Male	39	4.41 ± 0.33	
Female	32	4.50 ± 0.29	
ISS			0.023
I ~ II	41	4.91 ± 0.21	
III	30	3.82 ± 0.25	

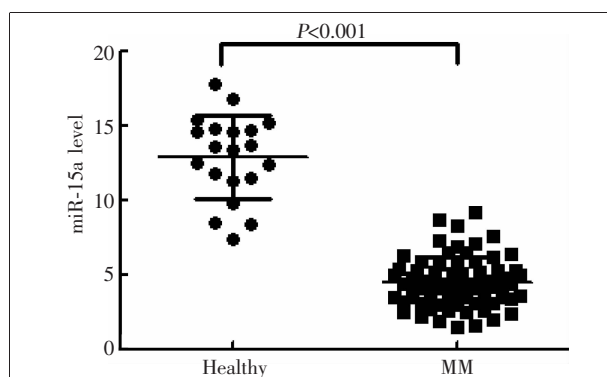


Figure 1 miR-15a levels in serum exosomes of MM patients and healthy donors

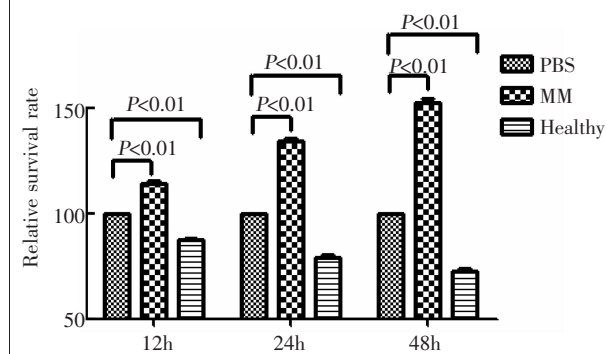


Figure 2 Relative survival rates of cells after being treated with exosomes or PBS

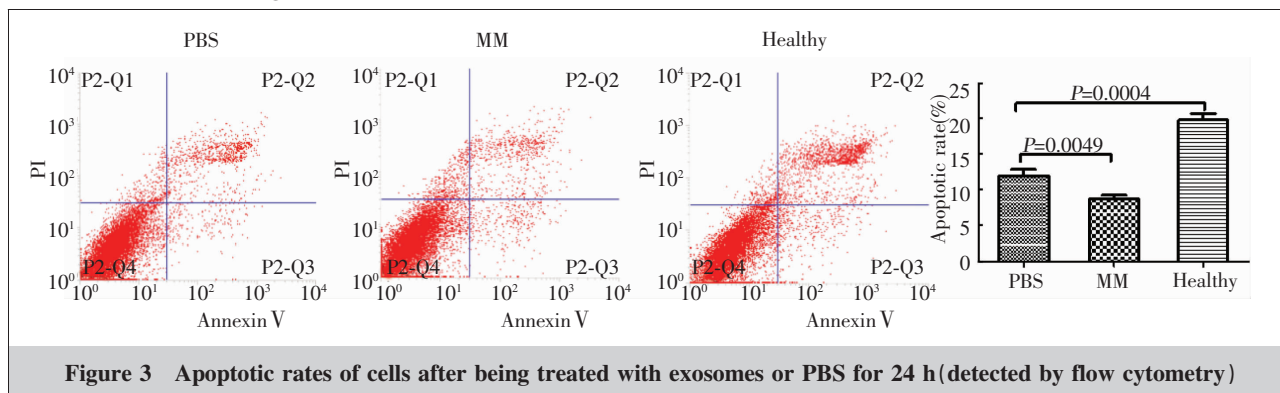
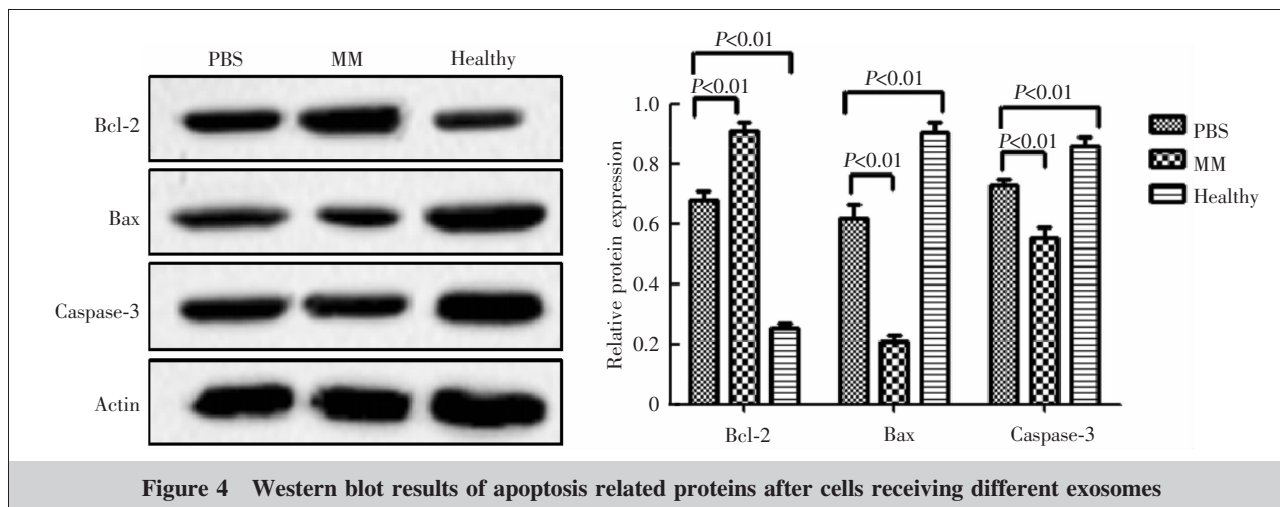


Figure 3 Apoptotic rates of cells after being treated with exosomes or PBS for 24 h(detected by flow cytometry)



2.4 细胞凋亡相关蛋白的表达

Western blot 结果显示(Figure 4),与 PBS 对照组相比,MM 组 Bcl-2 表达增加了 33.8%,Bax 表达下降了 65.9%,caspase-3 表达减少了 24.2%;Healthy 组 Bcl-2 表达降低了 62.7%,Bax 表达升高了 46.5%,caspase-3 表达增加了 17.8%,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

尽管目前已经开发出了多种针对 MM 的治疗方法,如造血干细胞移植、新型小分子药物、抗体药物、CAR-T 治疗等,但 MM 的发病机制尚不明确。研究表明,MM 细胞常伴随有多种遗传学突变,在染色体的 14q、13q、1 号位置较为常见。其中常见的断点有 22q11、19q13、17p11、14q32、11q13、8q24、6q21、1q21、1q10、1q11、IP22、IP13、IP11 等^[6-8]。这些遗传学的改变使 MM 患者和健康人群的外泌体表现出了显著差异。外泌体中携带了多种来源于细胞的 DNA、RNA、microRNA、蛋白质等物质。研究发现,与正常细胞来源的外泌体相比,MM 患者的外泌体中含有更高水平的癌症相关细胞因子、黏附分子和其他蛋白,且某些正常细胞分泌的外泌体对 MM 的发展有抑制作用^[9-10]。我们的实验结果发现,MM 患者来源的外泌体具有抑制 MM.1R 细胞凋亡、促进增殖的作用,这与文献报道基本一致。此外,我们还发现健康人群来源的外泌体可以诱导 MM.1R 细胞的凋亡,并抑制 MM.1R 细胞的增殖,与 MM 患者来源的外泌体具有相反的作用。这表明 MM 的发生和发展会改变患者的体内环境,使之适合 MM 肿瘤细胞生存。

miRNA 是外泌体的重要组成物质之一,外泌体的囊泡样结构不仅可以保护 miRNA 避免被降解,还能作为载体将 miRNA 运输到特定部位发挥生物学活性,因而在近几年成为了研究热点^[11]。MM 患者外泌体中的 miRNA 构成明显与健康人群不同。研究表明,MM 患者外泌体的 miR-15a 低表达,而 miR-15b 和 miR-21 高表达,促进了肿瘤的发展^[12]。除了在外泌体之中外,miR-15a 在正常人群和 MM 患者骨髓间充质基质细胞(BMMSCs)中的含量也不相同,MM 患者的含量显著低于正常人群^[13]。研究证实,miR-15a 能够沉默抗凋亡因子 Bcl-2 的表达,并阻碍细胞增殖^[14],但其在在外泌体中的报道较少。本研究分别检测了 miR-15a 在 MM 患者和健康志愿者外泌体中的表达,发现 MM 患者外泌体中 miR-15a 含量显著降低。这表明外泌体也参与到了 MM 的发生和发展。此外,我们还发现 miR-15a 的水平与患者的年龄、性别无关,但与临床分期有关,晚期 MM 患者对应更低的 miR-15a 水平。

MM 的发生受到多种因素的影响,其机制至今尚未阐明。研究结果发现,MM 患者外泌体中的促凋亡因子 miR-15a 的表达水平显著降低,MM 患者来源的外泌体能够抑制肿瘤细胞凋亡,而健康志愿者来源的外泌体能够促进肿瘤细胞凋亡,这提示了外泌体在多发性骨髓瘤发生、发展中的重要作用。

参考文献:

- [1] Tsang M, Le M, Ghazawi FM, et al. Multiple myeloma epidemiology and patient geographic distribution in Canada: A population study[J]. Cancer, 2019, 15: 2435-2444.

- [2] Kroemeke A, Sobczyk-Kruszelnicka M, Kwissa-Gajewska Z. Everyday life following hematopoietic stem cell transplantation: decline in physical symptoms within the first month and change-related predictors [J]. Qual Life Res, 2018, 27(1): 125–135.
- [3] Iida S, Wakabayashi M, Tsukasaki K, et al. Bortezomib plus dexamethasone versus thalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma [J]. Cancer Sci, 2018, 109(5): 1552–1561.
- [4] Rodríguez M, Silva J, López-Alfonso A, et al. Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer [J]. Gene Chromosome Canc, 2014, 53(9): 713–724.
- [5] Jiang C, Hu X, Alattar M, et al. miRNA expression profiles associated with diagnosis and prognosis in lung cancer[J]. Expert Rev Anticanc, 2014, 14(4): 453–461.
- [6] Smetana J, Oppelt J, Štok M, et al. Chromothripsis 18 in multiple myeloma patient with rapid extramedullary relapse[J]. Mol Cytogenet, 2018, 11: 7.
- [7] Rastgoo N, Pourabdollah M, Abdi J, et al. Dysregulation of EZH2/miR-138 axis contributes to drug resistance in multiple myeloma by downregulating RBPMS[J]. Leukemia, 2018, 32(11): 2471–2482.
- [8] Hyatt S, Jones RE, Heppel NH, et al. Telomere length is a critical determinant for survival in multiple myeloma[J]. Brit J Haematol, 2017, 178(1): 94–98.
- [9] Hattermann K, Knerlich-Lukoschus F, Lucius R, et al. Erythropoietin and CCL3 antagonise their functional properties during neuroinflammation [J]. Neurol Res, 2015, 37(11): 1025–1028.
- [10] Kohno H, Maeda T, Perusek L, et al. CCL3 production by microglial cells modulates disease severity in murine models of retinal degeneration [J]. J Immunol, 2014, 192(8): 3816–3827.
- [11] Wang J, Hendrix A, Hernot S, et al. Bone marrow stromal cell derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells[J]. Blood, 2014, 124(4): 555–566.
- [12] Yang YZ, Zhang XY, Wan Q. Role of exosomal miRNA in multiple myeloma progression and its possible mechanism [J]. J Exp Hematol, 2017, 25(1): 301–305. [杨雅芝, 张小燕, 万倩. 外泌小体内 miRNA 在多发骨髓瘤进展中的作用及可能机制[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(1): 301–305.]
- [13] Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, et al. BM mesenchymal stromal cell derived exosomes facilitate multiple myeloma progression[J]. J Clin Invest, 2013, 123(4): 1542–1555.
- [14] Gopalan V, Ebrahimi F, Islam F, et al. Tumour suppressor properties of miR-15a and its regulatory effects on BCL2 and SOX2 proteins in colorectal carcinomas [J]. Exp Cell Res, 2018, 370(2): 245–253.

《肿瘤学杂志》作者/通信作者校对文稿须知

作者/通信作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通信作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。
2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。
3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通信作者等信息,务必确认无误。
4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。
5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。
6. 校对完毕请作者/通信作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。
7. 由于出版周期的限制,如作者/通信作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。