

# 替代活化型巨噬细胞和多发性骨髓瘤早期治疗反应的关系及机制研究

陈芯仪 孙瑞雪 张文燕 刘霆 郑宇欢 吴侯

**【摘要】目的** 探讨替代活化型巨噬细胞(M2 M $\Phi$ )和多发性骨髓瘤(MM)早期治疗反应的关系及其在发病机制中的可能作用。**方法** 采用免疫组化法标记240例MM患者骨髓标本中的M $\Phi$ ;建立体外M2 M $\Phi$ 诱导培养体系,构建Transwell共培养模型与RPMI 8226和U266细胞共培养,CCK-8法检测M2 M $\Phi$ 对细胞增殖的影响,流式细胞术检测对地塞米松(1  $\mu$ mol/L)诱导骨髓瘤细胞凋亡的影响,ELISA法检测对TNF- $\alpha$ 和IL-6表达的影响,real time PCR法检测对趋化因子、血管内皮生长因子(VEGF)及其受体表达的影响。**结果** ①依据骨髓组织M2 M $\Phi$ 浸润程度将患者分为高浸润组(92例)和低浸润组(148例),高浸润组患者早期治疗有效率明显低于低浸润组,差异有统计学意义(23.9%对73.0%, $\chi^2=60.31$ , $P<0.001$ )。②培养24、36 h,共培养组细胞增殖能力较对照组显著上升:M2 M $\Phi$ +RPMI 8226细胞组与对照组比较, $P$ 值分别为0.005、0.020;M2 M $\Phi$ +U266细胞与对照组比较, $P$ 值分别为0.030、0.020。③地塞米松诱导后,共培养组与对照组比较,RPMI 8226细胞凋亡率下降(29.0%对71.0%, $t=4.97$ , $P=0.008$ ),U266细胞凋亡率也下降(24.9%对67.7%, $t=6.99$ , $P=0.002$ )。④共培养48 h后,与对照组比较,加入M2 M $\Phi$ 后可促进RPMI 8226和U266细胞分泌IL-6、TNF- $\alpha$ ,促进表达CCL2、CCL3、CCR2、CCR5、VEGFA、VEGFR-1和VEGFR-2。**结论** MM患者骨髓组织M2 M $\Phi$ 浸润程度和早期治疗反应相关。M2 M $\Phi$ 通过促进骨髓瘤细胞分泌系列炎症因子、趋化因子和相关受体的表达,从而促进骨髓瘤细胞增殖以及保护骨髓瘤细胞免于凋亡。

**【关键词】** 多发性骨髓瘤; 巨噬细胞; 细胞凋亡; 细胞增殖; 细胞因子类

**基金项目:** 国家自然科学基金(81470327、81100330);四川省科技支撑计划(2014SZ0202)

**Molecular mechanisms and relationship of M2- polarized macrophages with early response in multiple myeloma** Chen Xinyi, Sun Ruixue, Zhang Wenyan, Liu ting, Zheng Yuhuang, Wu yu. Department of Hematology and Research Laboratory, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Yu Wu, Email: wu\_yu@scu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between M2- polarized macrophages and early response in multiple myeloma and its molecular mechanism. **Methods** Two hundred and forty bone marrow biopsy tissue were collected and M2- polarized macrophages were stained by anti- CD163 monoclonal antibody. In vitro M2- polarized macrophages were derived from human peripheral blood mononuclear cell or THP-1 cells and identified by flow cytometry. Two myeloma cell lines RPMI 8226 and U266 were co- cultured with M2 macrophages using a transwell system. We measured myeloma cells proliferation through CCK-8 method and the pro-inflammatory cytokines expression (TNF- $\alpha$  and IL-6) by ELISA. Real time PCR was applied to measure chemokines (CCL2 and CCL3), chemokine receptors (CCR2, CCR5), VEGF and their receptors. In addition, flow cytometry was used to analyze the apoptosis of myeloma cells induced by dexamethasone. **Results** ①Patients with high percentage of M2 macrophage involvement in bone marrow showed poorer response (23.9% versus 73.0%,  $\chi^2=60.31$ ,  $P<0.001$ ). ②In vitro the proliferation of RPMI 8226 cells ( $P=0.005$  at 24 h,  $P=0.020$  at 36 h) or U266 myeloma cells ( $P=0.030$  at 24h,  $P=0.020$  at 36h) co-cultured with M2-polarized macrophages was higher than control group. ③In vitro the apoptotic rate of RPMI 8226 cells (29.0% versus 71.0%,  $t=4.97$ ,  $P=0.008$ ) or U266 myeloma

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.06.004

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院血液科[陈芯仪(现在成都市第二人民医院老年科,610021)、孙瑞雪、刘霆、郑宇欢、吴侯],病理科(张文燕)

通信作者:吴侯,Email:wu\_yu@scu.edu.cn

cells (24.9% versus 67.7%,  $t=6.99$ ,  $P=0.002$ ) co-cultured with M2-polarized macrophages was lower than control group. ④ In vitro M2-polarized macrophages promoted myeloma cells secreting higher level of IL-6, TNF- $\alpha$  and higher expression of CCL2, CCL3, CCR2, CCR5, VEGFA, VEGFR-1, -2 compared with the non-macrophage co-culture system. **Conclusion** M2-polarized macrophages promote myeloma cells proliferation and inhibit apoptosis through a very complex mechanism involving pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , chemokines and related receptors such as CCL2, CCL3, CCR2, CCR3, and VEGF as well as related VEGFR.

**【Key words】** Multiple myeloma; Macrophage; Apoptosis; Cell proliferation; Cytokines

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (81470327, 81100330); Scientific Support Project of Sichuan Province (2014SZ0202)

骨髓微环境在多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 细胞的增殖、迁移和耐药过程中具有重要作用, 并且直接影响患者的临床表现和预后<sup>[1-3]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞 (Tumor-associated macrophages, TAM) 作为肿瘤微环境的重要部分, 近年来在 MM 中的作用机制研究以及针对 TAM 及细胞因子网络的靶向治疗成为热点<sup>[4]</sup>。巨噬细胞 (M $\Phi$ ) 根据刺激活化方式以及表面标志物的不同可分为经典活化型 (M1 M $\Phi$ ) 和替代活化型 (M2 M $\Phi$ )<sup>[5]</sup>。M2 M $\Phi$  可通过复杂的自分泌、旁分泌等途径, 在肿瘤的侵袭及转移中发挥重要的作用, 与肿瘤的增殖和凋亡密切相关<sup>[6-7]</sup>。在本研究中我们通过抗 CD68 和 CD163 抗体分别标记 M $\Phi$  和 M2 M $\Phi$ , 分析其与临床分期及早期临床治疗反应的关系, 同时体外构建 M2 M $\Phi$  和骨髓瘤细胞共培养体系探索其可能的致病机制。

### 对象与方法

1. 研究对象: 研究纳入 2009 年 1 月至 2014 年 6 月在我院初诊的 240 例 MM 患者, 其中男 132 例, 女 108 例, 中位年龄 63 岁。临床国际分期系统 (ISS) 分期 I 期 35 例, II 期 45 例, III 期 160 例; 根据血清肌酐是否超过 177  $\mu\text{mol/L}$  判断是否有肾脏受累, 无肾脏受累患者 152 例, 合并肾脏受累患者共 88 例。血清 LDH 正常者 151 例, LDH 升高 (LDH > 220 U/L) 者 89 例。治疗方案包括 MTD (马法兰+沙利度胺+地塞米松)、TD (沙利度胺+地塞米松)、VAD (长春新碱+阿霉素+地塞米松) 和新药方案 (包括来那度胺和硼替佐米)。通过查阅病历资料和电话进行随访。随访截止至 2015 年 4 月 30 日。MM 的诊断及治疗反应评估参照国际统一标准<sup>[8]</sup>进行。疗效评估包括完全缓解 (CR)、非常好的部分缓解 (VGPR)、部分缓解 (PR)、疾病稳定 (SD)、疾病进展 (PD) 和复发, 有效包括 CR、VGPR 和 PR。人类 MM 细胞系 RPMI 8226 和 U266 细胞为我院血液研究室保存、

提供。

2. 主要试剂: 单抗 CD68 (鼠抗人) 购于丹麦 Dako 公司, 单抗 CD163 (兔抗人) 购于美国 Abcam 公司, PM 购于美国 Sigma-Aldrich 公司, IL4/13 购于美国 Peprotech 公司, CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司, 人 TNF- $\alpha$  和 IL-6 ELISA 试剂盒购于深圳欣博盛生物科技有限公司。

3. 免疫组化染色标记 M $\Phi$  和 M2 M $\Phi$ : 收集骨髓活检标本并连续切片, 采用单抗 CD68 和 CD163 分别标记 M $\Phi$  和 M2 M $\Phi$ , 常规免疫组化法染色。1 个高倍镜下阳性细胞数  $\geq 40$  个为高浸润, < 40 个则为低浸润, 并据此分为 M $\Phi$  高浸润组和低浸润组。

4. 细胞培养: ① 体外单核巨噬细胞 (THP-1 细胞, 由我院血液研究室保存) 诱导成 M2 M $\Phi$ : 将对数生长期 THP-1 细胞以  $1 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞密度接种于含 320 nmol/L 佛波酯的培养基中, 参照文献 [8] 方法进行, 24 h 后弃培养上清后用于后续实验。② 人外周血单核细胞诱导成 M2 M $\Phi$ : 抽取健康受试者外周血 5~10 ml, 应用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离单个核细胞, 以  $1 \times 10^6/\text{ml}$  的细胞密度接种于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 参照文献 [9] 方法进行, 流式细胞术检测 M $\Phi$  表型。

5. M2 M $\Phi$  和骨髓瘤细胞 Transwell 共培养: 将处于对数生长期的 RPMI 8226 或 U266 细胞以  $1 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞密度加入 Transwell 小室上层, 下层加入人单核细胞来源或 THP-1 细胞来源的 M2 M $\Phi$ , 并设置含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基的空白对照组。每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性: 共培养 12、24、48 h 收集小室上层 RPMI 8226 或 U266 细胞, 按 CCK-8 试剂盒说明书进行操作。

采用 ELISA 法检测细胞 IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平: 共培养 48 h 后收集 RPMI 8226 或 U266 细胞培养上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

采用流式细胞术检测对地塞米松诱导骨髓瘤

细胞凋亡的影响:实验组和对照组每孔加入 10 μl 地塞米松(1 μmol/L)溶液诱导骨髓瘤细胞凋亡,凋亡检测参照 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。

采用 real-time PCR 法检测趋化因子、血管内皮生长因子(VEGF)及其受体表达:共培养 48 h 后,收集 RPMI 8226 或 U266 细胞并提取 RNA,检测所用的序列引物见表 1。使用 UltraSYBR 实时荧光定量 PCR 预混体系,反应体系 10 μl。反应程序:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,加 60 °C 退火/延伸 1 min,共 35 个循环。溶解曲线分析为 95 °C 15 s、60 °C 1 min、95 °C 15 s、60 °C 15 s。系统自带软件中调取每个反应管的荧光信号到达设定阈值的循环数(Ct 值),以 β-actin 为内参照,根据 β-actin 的 Ct 值求出各自 ΔCt 值,再根据空白对照组的 Ct 值均数

求得各自 ΔCt 值,最后以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 值表示被检测基因的相对表达水平。

6. 统计学处理:应用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间差异统计应用 *t* 检验。各组构成比差异应用卡方检验或精确概率法检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

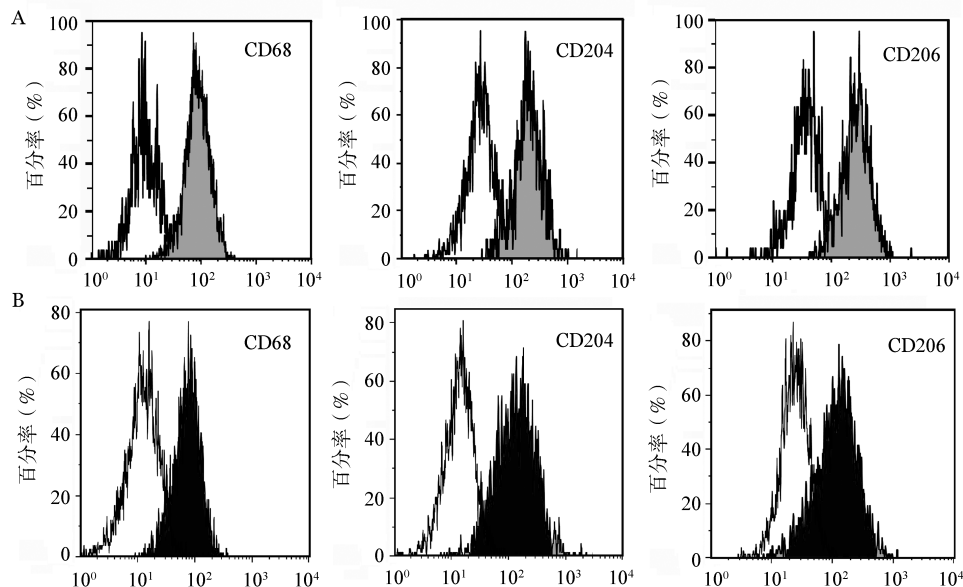
### 结 果

1. M2 MΦ 的形态和免疫表型:在倒置显微镜下观察,M2 MΦ 在体外呈贴壁生长,黏附牢固,呈长梭形,单个核,核大,细胞周边或两极可见板状伪足和突起。经流式细胞术检测,M2 MΦ 免疫表型为 CD68(+),CD204(+),CD206(+)(图 1)。

2. TAM 浸润和临床分期的关系:240 例患者中,

表 1 荧光定量 RT-PCR 检测所用的序列引物

引物名称	正义链(5'→3')	反义链(5'→3')
CCL2	AGGTGACTGGGGCATTGAT	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC
CCL3	CAGGTCTCCACTGCTGCC	CACTCAGCTCCAGGTCACT
CCR1	CTTCTCTGTTACAGCTTCC	GCCTGAAACAGCTTCCACTC
CCR2	ATGCTGTCCACATCTCGTTCTC	GGACAGAAGCAAACACAGCCAC
CCR5	GGGATAGCACTGAGCAAAGC	GTTTAGCCATCCCCAAAT
VEGFA	AGCCTTGCCTTGCTGCTCTAC	TCCTCCTTCTGCCATGGGT
VEGFB	CCTGACGATGGCCTGGAGT	TTAGGTCTGCATTCACACTGGC
VEGFC	TGCCGATGCATGTCTAAACT	TGAACAGGTCTCTTCATCCAGC
VEGFR-1	TGGGACAGTAGAAAGGGCTT	GGTCCACTCCTTACACGACAA
VEGFR-2	CATCACATCCACTGGTATTGG	GCCAAGCTTGTACCATGTGAG
VEGFR-3	CCCACGCAGACATCAAGACG	TGCAGAACTCCACGATCACC
β-actin	TGCACTGTGCGGCGAAGC	TCGAGCCATAAAAGGCAA



A:人外周血单核细胞来源的M2 MΦ;B:THP-1 细胞诱导分化的M2 MΦ

图 1 流式细胞术检测体外诱导分化的替代活化型巨噬细胞(M2 MΦ)表型(白色示同型对照)

MΦ高浸润组患者83例,ISS分期I、II、III期分别为5例(6.0%)、22例(26.5%)、56例(67.5%),低浸润组157例,ISS分期I、II、III期分别为24例(15.3%)、32例(20.4%)、101例(64.3%),差异无统计学意义( $\chi^2=4.84, P=0.060$ )。

M2 MΦ高浸润组患者92例,ISS分期I、II、III期分别为8例(8.7%)、17例(18.5%)、67例(72.8%),低浸润组148例,ISS分期I、II、III期分别为21例(14.2%)、35例(23.6%)、92例(62.2%),差异无统计学意义( $\chi^2=3.09, P=0.240$ )。

3. TAM浸润对早期治疗反应的影响:中位随访13个月。M2 MΦ高浸润组92例患者中,有效率23.9%,SD率15.2%,PD率59.8%,复发率1.1%;低浸润组有效率73.0%,SD率8.8%,PD率16.2%,复发率2.0%。M2 MΦ高浸润组患者早期治疗有效率明显低于低浸润组,差异有统计学意义( $P<0.001$ ) (表2);MΦ高浸润组与低浸润组比较,早期治疗有效率差异也有统计学意义( $P<0.001$ ) (表3)。

表2 CD163<sup>+</sup>肿瘤相关巨噬细胞浸润对早期治疗反应的影响[例(%)]

组别	例数	治疗反应	
		完全缓解	有效
高浸润组	92	2(2.2)	22(23.9)
低浸润组	148	22(14.9)	108(73.0)
$\chi^2$ 值		10.2	55.0
P值		0.001	<0.001

注:有效:包括完全缓解、非常好的部分缓解和部分缓解

4. M2 MΦ对骨髓瘤细胞体外增殖的影响:CCK-8法检测结果显示,与M2 MΦ共培养的骨髓瘤细胞增殖能力较对照组显著上升(图2)。

5. M2 MΦ对地塞米松诱导骨髓瘤细胞凋亡的影响:流式细胞术结果显示,RPMI 8226和U266细

胞与M2 MΦ共培养后的凋亡比例均较对照组明显下降,差异均有统计学意义( $P$ 值均<0.01)(图3)。

表3 CD68<sup>+</sup>肿瘤相关巨噬细胞浸润对早期治疗反应的影响[例(%)]

组别	例数	治疗反应	
		完全缓解	有效
高浸润组	83	3(3.6)	22(26.5)
低浸润组	157	21(13.4)	108(68.8)
$\chi^2$ 值		5.7	39.1
P值		0.022	<0.001

注:有效:包括完全缓解、非常好的部分缓解和部分缓解

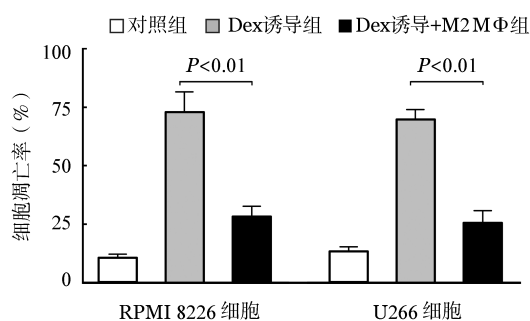
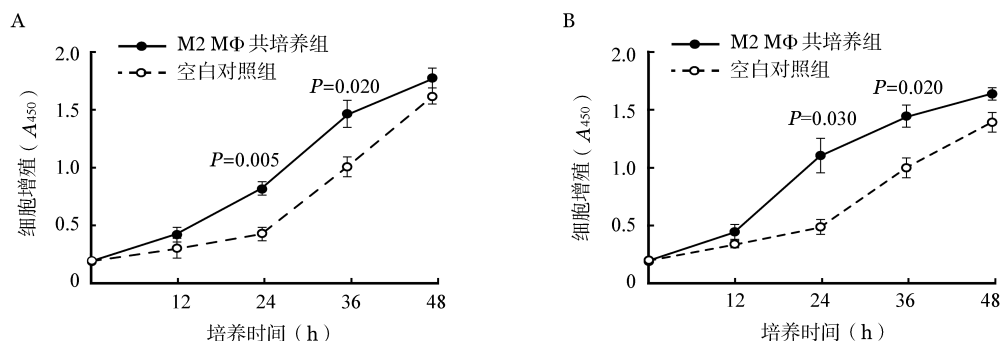


图3 流式细胞术检测替代活化型巨噬细胞(M2 MΦ)对地塞米松(Dex)诱导骨髓瘤细胞凋亡的影响

6. M2 MΦ对骨髓瘤细胞炎症因子分泌水平的影响:ELISA法检测结果显示,RPMI 8226和U266细胞与不同来源的M2 MΦ共培养后,其TNF- $\alpha$ 和IL-6分泌水平均较对照组明显增高,差异均有统计学意义( $P$ 值均<0.05)(表4、5)。

7. M2 MΦ对骨髓瘤细胞趋化因子、VEGF及受体表达的影响:real-time PCR检测结果显示RPMI 8226和U266细胞与不同来源的M2 MΦ共培养后,其趋化因子CCL2、CCL3和受体CCR2、CCR5 mRNA相对表达水平均较对照组明显增高,差异均



A:RPMI 8226 细胞;B:U266 细胞

图2 CCK-8法检测替代活化型巨噬细胞(M2 MΦ)对骨髓瘤细胞体外增殖的影响(每组设3个复孔,实验重复3次)

有统计学意义( $P$ 值均 $<0.05$ )(表6),其VEGFA及其受体VEGFR-1和VEGFR-2 mRNA相对表达水平

也明显增高,差异均有统计学意义( $P$ 值均 $<0.05$ )(表7)。

表4 CCK-8法检测替代活化型巨噬细胞(M2 MΦ)对RPMI 8226细胞TNF-α和IL-6分泌水平的影响(ng/L,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	M2 MΦ来源为单核细胞		M2 MΦ来源为THP-1细胞	
	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
空白对照组	11.963±1.173	5.590±0.081	11.281±0.216	5.598±0.205
M2 MΦ共培养组	31.944±4.760	12.737±0.848	49.078±16.603	59.386±4.479
$t$ 值	4.98	10.54	2.79	14.66
$P$ 值	0.008	$<0.001$	0.049	$<0.001$

注: $t$ 、 $P$ 值均为与空白对照组比较。每组设3个复孔,实验重复3次

表5 CCK-8法检测替代活化型巨噬细胞(M2 MΦ)对U266细胞TNF-α和IL-6分泌水平的影响(ng/L,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	M2 MΦ来源为单核细胞		M2 MΦ来源为THP-1细胞	
	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
空白对照组	12.097±1.584	5.390±0.173	11.401±1.025	5.084±0.212
M2 MΦ共培养组	30.925±1.113	16.064±0.566	28.288±4.451	12.532±0.952
$t$ 值	11.84	20.91	4.52	9.37
$P$ 值	$<0.001$	$<0.001$	0.011	$<0.001$

注: $t$ 、 $P$ 值均为与空白对照组比较。每组设3个复孔,实验重复3次

表6 real-time PCR法检测替代活化型巨噬细胞(M2 MΦ)对骨髓瘤细胞趋化因子和受体表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	CCR1	CCR2	CCR5	CCL2	CCL3
RPMI 8226细胞					
空白对照组	1.000±0.051	1.000±0.030	1.000±0.061	1.000±0.012	1.000±0.021
共培养组 <sup>a</sup>	1.833±0.698	3.237±0.533 <sup>c</sup>	2.953±0.414 <sup>c</sup>	1.601±0.153 <sup>c</sup>	2.152±0.277 <sup>c</sup>
U266细胞					
空白对照组	1.000±0.008	1.000±0.025	1.000±0.06	1.000±0.005	1.000±0.016
共培养组 <sup>a</sup>	0.661±0.272	2.077±0.147 <sup>c</sup>	1.930±0.146 <sup>c</sup>	1.710±0.049 <sup>c</sup>	1.967±0.176 <sup>c</sup>
RPMI 8226细胞					
空白对照组	1.000±0.02	1.000±0.033	1.000±0.066	1.000±0.007	1.000±0.019
共培养组 <sup>b</sup>	1.306±0.173	10.833±0.841 <sup>c</sup>	12.227±0.856 <sup>c</sup>	8.259±0.761 <sup>c</sup>	33.753±6.293 <sup>c</sup>
U266细胞					
空白对照组	1.000±0.07	1.000±0.046	1.000±0.472	1.000±0.051	1.000±0.057
共培养组 <sup>b</sup>	0.582±0.189	4.229±0.454 <sup>c</sup>	3.292±0.525 <sup>c</sup>	4.001±0.227 <sup>c</sup>	7.638±1.152 <sup>c</sup>

注:<sup>a</sup>M2 MΦ来源为单核细胞;<sup>b</sup>M2 MΦ来源为THP-1细胞;与空白对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。每组设3个复孔,实验重复3次

表7 real-time PCR法检测替代活化型巨噬细胞(M2 MΦ)对骨髓瘤细胞血管内皮生长因子(VEGF)和受体表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	VEGFA	VEGFB	VEGFC	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
RPMI 8226细胞						
空白对照组	1.000±0.020	1.000±0.021	1.000±0.027	1.000±0.005	1.000±0.019	1.000±0.031
共培养组 <sup>a</sup>	1.633±0.088 <sup>c</sup>	0.926±0.132	1.107±0.157	2.324±0.303 <sup>c</sup>	1.939±0.290 <sup>c</sup>	1.090±0.205
U266细胞						
空白对照组	1.000±0.004	1.000±0.012	1.000±0.02	1.000±0.017	1.000±0.018	1.000±0.015
共培养组 <sup>a</sup>	1.653±0.087 <sup>c</sup>	0.675±0.165	0.760±0.220	1.860±0.116 <sup>c</sup>	1.633±0.120 <sup>c</sup>	1.063±0.153
RPMI 8226细胞						
空白对照组	1.000±0.027	1.000±0.041	1.000±0.007	1.000±0.022	1.000±0.022	1.000±0.021
共培养组 <sup>b</sup>	2.259±0.209 <sup>c</sup>	0.768±0.107	1.833±0.684	15.384±1.902 <sup>c</sup>	14.225±0.438 <sup>c</sup>	1.301±0.231
U266细胞						
空白对照组	1.000±0.019	1.000±0.095	1.000±0.024	1.000±0.014	1.000±0.043	1.000±0.034
共培养组 <sup>b</sup>	2.877±0.415 <sup>c</sup>	2.170±1.003	1.734±0.426	3.362±0.391 <sup>c</sup>	4.296±0.544 <sup>c</sup>	1.426±0.659

注:<sup>a</sup>M2 MΦ来源为单核细胞;<sup>b</sup>M2 MΦ来源为THP-1细胞;与空白对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。每组设3个复孔,实验重复3次

## 讨 论

本研究首先回顾性分析240例病例资料完整的初发MM患者的临床资料。研究发现M $\Phi$ 浸润高低和临床分期之间无明显相关性,而M $\Phi$ 和M2 M $\Phi$ 浸润高低和患者早期治疗反应呈明显负相关,提示可能预后不良。M $\Phi$ 高浸润组和M2 M $\Phi$ 高浸润组患者对早期治疗反应结果一致,可能是由于骨髓浸润组织中TAM以M2 M $\Phi$ 浸润为主所致。2014年有学者报道疾病进展的MM患者骨髓组织M2 M $\Phi$ 浸润较缓解期患者增加,阻断M2 M $\Phi$ 可能成为MM的一种靶向治疗<sup>[10]</sup>。本研究结果与其一致,提示骨髓组织中M $\Phi$ 的浸润可能在MM发病机制中起重要作用,同时可能是判断对早期化疗敏感及预后的一个重要指标。

为进一步探索M2 M $\Phi$ 对骨髓瘤细胞的作用及可能机制,我们在体外诱导人外周血单核细胞和THP-1细胞分化为M2 M $\Phi$ ,并构建与骨髓瘤细胞的Transwell共培养体系,探讨M2 M $\Phi$ 在MM发病机制中的可能作用。结果显示M2 M $\Phi$ 可促进RPMI 8226和U266细胞增殖,同时能够保护骨髓瘤细胞免于激素诱导的凋亡。尽管目前激素治疗MM的具体机制并不清楚,但是有研究表明其机制可能与凋亡酶、蛋白酶激活,以及促生存转录因子(如AP-1、c-myc、NF- $\kappa$ B等)的抑制相关<sup>[11-12]</sup>。我们推测M2 M $\Phi$ 能够抑制地塞米松诱导的凋亡可能与上述机制有关,但是需要进一步的研究来证实。大量研究表明TAM主要通过血管新生、对机体免疫调节以及一系列细胞因子趋化因子等机制促进乳腺癌、胰腺癌等实体肿瘤细胞增殖<sup>[13-17]</sup>。我们的研究结果显示M2 M $\Phi$ 同样能够促进骨髓瘤细胞炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 、趋化因子及受体CCL2、CCL3、CCR2、CCR5和VEGF及受体VEGFA、VEGFR-1、VEGFR-2的表达。

IL-6是MM最主要的通过自分泌和旁分泌产生的生长因子,是促进MM细胞增殖和生存的关键性细胞因子,在MM细胞的增殖、凋亡、溶骨性改变及骨髓微环境中血管新生等方面发挥重要作用<sup>[18]</sup>。IL-6一方面可以通过活化RAS依赖的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联信号途径刺激瘤细胞增殖,活化JAK-STAT途径维持骨髓瘤细胞生存;另一方面IL-6对皮质类固醇激素、血清Starvation和Fas诱导骨髓瘤细胞凋亡有抑制作用,可提高细胞存活率<sup>[19]</sup>。骨髓瘤细胞通过分泌TNF- $\alpha$ 和VEGF等共同

促进基质细胞合成和分泌IL-6,同时VEGF等表达增加又进一步促进VEGF和TNF- $\alpha$ 的分泌,从而形成相互作用的循环<sup>[20-21]</sup>。TNF- $\alpha$ 虽不显著促进肿瘤细胞的增殖和耐药,但可通过激活NF- $\kappa$ B通路调节细胞因子、趋化因子、黏附分子和一些抗凋亡蛋白的表达。TNF- $\alpha$ 上调骨髓瘤细胞和骨髓基质细胞表达ICAM-1和VCAM-1,促进MM细胞和基质细胞间的接触,并产生黏附分子介导的细胞耐药(CAM-DR)<sup>[21]</sup>。

骨髓瘤细胞不仅表达VEGF而且表达其受体,在骨髓微环境中多种因素的调节下,VEGF与其受体结合发挥其作用。VEGF具有诱导新生血管形成、诱导骨髓瘤细胞的增殖和迁移、增加破骨细胞活性和调节免疫细胞活性等多种功能,在MM的发病机制中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。VEGF与骨髓瘤细胞表面的VEGFR-1结合导致了后者的磷酸化,从而触发细胞内多条信号途径:①aPI3-激酶/蛋白激酶C(PKC)-依赖的级联反应,介导了MM细胞在纤维连接蛋白上的迁移;②MEK-细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)途径介导的骨髓瘤细胞的增殖<sup>[23]</sup>;③通过以剂量和时间依赖性的方式上调Mcl-1和survivin介导骨髓瘤细胞的存活<sup>[24]</sup>。

研究表明趋化因子与其受体结合后可发挥多种生物学功能:介导白细胞迁移,调控血管生成,维持免疫稳定并参与次级淋巴器官的构建,在肿瘤生物学中具有生长因子和调节血管生长的作用,并参与肿瘤浸润和转移。在MM的发生、发展中,趋化因子及其受体也发挥着重要作用<sup>[25]</sup>。骨髓瘤内皮细胞可以分泌CCL2,在血管新生中扮演重要角色<sup>[26]</sup>。CCL3是骨髓瘤细胞分泌的一种趋化因子,主要与破骨细胞表达的CCR1、CCR5受体结合,作用于破骨祖细胞,增强破骨细胞的活性,导致破骨;同时可促进MM细胞增殖、迁移,增加肿瘤负荷,其机制可能是激活了AKT/PKB和MAPK信号途径<sup>[27-28]</sup>。CCR1的表达并没有增加,提示CCL2-CCR2轴和CCL3-CCR5轴在M2M $\Phi$ 和骨髓瘤细胞的相互作用中发挥重要作用。

在本研究中我们发现MM患者骨髓组织M2 M $\Phi$ 浸润程度和早期治疗反应相关。M2 M $\Phi$ 通过促进骨髓瘤细胞分泌系列炎症因子、趋化因子、VEGF和相关受体的表达,从而促进骨髓瘤细胞增殖以及保护骨髓瘤细胞免于凋亡,为骨髓瘤细胞增殖提供有利条件。针对M2 M $\Phi$ 的靶向治疗(主要是减少其数量、削弱其功能,抑制相应的细胞因子)将是治疗

MM的一个有效途径。

### 参考文献

- [1] Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, et al. Multiple myeloma [J]. *Lancet*, 2009, 374 (9686):324-339. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60221-X.
- [2] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455. DOI: 10.1038/nature12034.
- [3] De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3): 277-286. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.02.013.
- [4] Spitzer TR, Sachs DH, Cosimi B. Multiple myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(24):2364; author reply 2364. DOI: 10.1056/NEJMc1104560#SA1.
- [5] Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm [J]. *Nat Immunol*, 2010,11(10):889-896. DOI: 10.1038/ni.1937.
- [6] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23 (11):549-555.
- [7] 陈志仪, 孙瑞雪, 吴侯. 肿瘤相关巨噬细胞在多发骨髓瘤发病机制中的作用 [J]. *西部医学*, 2014, 26 (10):1259-1263, 1267. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2014.10.001.
- [8] Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2006, 20(9): 1467-1473.
- [9] Tjiu JW, Chen JS, Shun CT, et al. Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(4):1016-1025. DOI: 10.1038/jid.2008.310.
- [10] Gutiérrez-González A, Martínez-Moreno M, Samaniego R, et al. Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2016, 128(18): 2241-2252. DOI: 10.1182/blood-2016-01-695395.
- [11] Sharma S, Lichtenstein A. Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors [J]. *Blood*, 2008, 112 (4):1338-1345. DOI: 10.1182/blood-2007-11-124156.
- [12] Schmidt S, Rainer J, Ploner C, et al. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance [J]. *Cell Death Differ*, 2004,11 Suppl 1: S45-55. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401456.
- [13] Yang M, Chen J, Su F, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10:117. DOI: 10.1186/1476-4598-10-117.
- [14] Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84 (3):623-630. DOI: 10.1189/jlb.1107762.
- [15] Ruffell B, Au A, Rugo HS, et al. Leukocyte composition of human breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (8):2796-2801. DOI: 10.1073/pnas.1104303108.
- [16] Xu L, Zhu Y, Chen L, et al. Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21 (9):3142-3150. DOI: 10.1245/s10434-014-3601-1.
- [17] Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. *Immunity*, 2014, 41 (1):49-61. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- [18] Tsirakis G, Pappa CA, Kaparou M, et al. The relationship between soluble receptor of interleukin-6 with angiogenic cytokines and proliferation markers in multiple myeloma [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2):859-864. DOI: 10.1007/s13277-012-0618-6.
- [19] Gerlo S, Haegeman G, Vanden BW. Transcriptional regulation of autocrine IL-6 expression in multiple myeloma cells [J]. *Cell Signal*, 2008, 20 (8):1489-1496. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.04.004.
- [20] Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, et al. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications [J]. *Blood*, 2004,104(3):607-618. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0037.
- [21] Hideshima T, Podar K, Chauhan D, et al. Cytokines and signal transduction [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005, 18 (4): 509-524. DOI: 10.1016/j.beha.2005.01.003.
- [22] Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications [J]. *Blood*, 2005, 105(4):1383-1395. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2909.
- [23] Podar K, Tai YT, Davies FE, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration [J]. *Blood*, 2001,98(2):428-435.
- [24] Le GS, Podar K, Amiot M, et al. VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis [J]. *Blood*, 2004, 104(9):2886-2892. DOI: 10.1182/blood-2004-05-1760.
- [25] Möller C, Strömberg T, Juremalm M, et al. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2003, 17(1):203-210. DOI: 10.1038/sj.leu.2402717.
- [26] Pellegrino A, Ria R, Di PG, et al. Bone marrow endothelial cells in multiple myeloma secrete CXC-chemokines that mediate interactions with plasma cells [J]. *Br J Haematol*, 2005, 129(2): 248-256. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05443.x.
- [27] Aggarwal R, Ghobrial IM, Roodman GD. Chemokines in multiple myeloma [J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(10):1289-1295. DOI: 10.1016/j.exphem.2006.06.017.
- [28] Sezer O. Chemokine receptor expression in multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2006, 91(2):148a.

(收稿日期:2016-11-11)

(本文编辑:刘志红)