

CMTM5 表达对多发性骨髓瘤细胞增殖的影响及其机制研究

马媛¹ 史进方¹ 仇惠英² 袁靖² 章扬³ 周鹏¹ 徐晶晶¹ 韩清珍¹

¹苏州大学附属第一医院临床检测中心 215006; ²江苏血液研究所, 苏州 215006; ³安徽医科大学附属第二医院检验科, 合肥 230001

通信作者: 韩清珍, Email: gyhqz02@163.com

【摘要】 目的 探索趋化素样因子超家族成员 CMTM5 表达对多发性骨髓瘤(MM)细胞增殖活性的影响及其机制。方法 去甲基化药物地西他滨处理 MM 细胞系 U266 细胞, 采用实时荧光定量 PCR 法检测处理前后 U266 细胞 CMTM5、caspase3、caspase9 的表达水平并分析其相关性; pcDNA3.1 质粒转染 U266 细胞使 CMTM5 过表达后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性变化。结果 ①与对照组相比, U266 细胞中 CMTM5、caspase3 和 caspase9 的 mRNA 表达水平与地西他滨呈浓度和时间依赖性, 随浓度加大和时间延长表达水平增高更加显著(P 值均 < 0.01); U266 细胞中 CMTM5 表达水平与 caspase3($r = 0.937$)、caspase9($r = 0.945$)呈正相关(P 值均 < 0.001)。②过表达质粒转染的 U266 细胞, 其 CMTM5 表达水平为 133.10 ± 10.35 , 较空白对照组(0.63 ± 0.14)和质粒对照组(0.64 ± 0.11)显著增高, 差异有统计学意义(P 值均 < 0.001); CMTM5 过表达 U266 细胞组 72 h 细胞增殖活性为 0.89 ± 0.08 , 较对照组(1.32 ± 0.02 , $t = 5.005$, $P = 0.008$)和空载质粒组(1.30 ± 0.03 , $t = 4.700$, $P = 0.009$)显著降低, 差异有统计学意义。结论 MM 细胞中 CMTM5 的缺失能够被去甲基化药物地西他滨逆转, 其变化水平与 caspase3、caspase9 呈正相关。过表达 CMTM5 能够抑制 U266 细胞增殖。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 趋化素样因子超家族成员 5; DNA 甲基化; 细胞凋亡

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81501425); 江苏省医学创新团队(CXTDB2017009)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.011

Pathophysiologic mechanism of CMTM5 low expression in multiple myeloma progression

Ma Yuan¹, Shi Jinfang¹, Qiu Huiying², Yuan Jing², Zhang Yang³, Zhou Peng¹, Xu Jingjing¹, Han Qingzhen¹

¹Center for Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China;

²Institute of Hematology of Jiangsu, Suzhou 215006, China; ³Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China

Corresponding author: Han Qingzhen, Email: gyhqz02@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of chemokine-like factor superfamily member (CMTM) 5 on the proliferation of multiple myeloma cells. **Methods** RT-qPCR method was used to detect the expression and correlation of CMTM5, caspase3 and caspase9 in U266 after decitabine demethylation treatment; U266 transfected with pcDNA3.1 plasmid overexpressed CMTM5, then cell proliferation activity was detected by CCK-8 assay. **Results** Compared with the control group, the low-dose demethylation treatment increased mRNA expression of CMTM5, caspase3, and caspase9 in U266, and showed a time-dependent ($P < 0.01$). The up-trend of CMTM5, caspase3, and caspase9 in the high-demethylation drug treatment group was more significant and also showed time-dependent ($P < 0.001$); There was a significant positive correlation between CMTM5 and caspase3 ($r = 0.937$) and caspase9 ($r = 0.945$) in each group ($P < 0.001$). After transfection of U266 with the pcDNA3.1-CMTM5 plasmid, overexpression of CMTM5 inhibited the cell proliferation activity compared with the control and pcDNA3.1-vector group. **Conclusion** Decitabine has a reductive effect on the low level of CMTM5 in U266 cells, and its recovery level is significantly positively correlated with caspase 3 and caspase9. Re-expression of CMTM5 inhibits the proliferative activity of U266.

【Key words】 Multiple myeloma; Chemokine-like factor superfamily member 5; DNA methylation; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81501425); Jiangsu Province Medical Innovation Team(CXTDB2017009)
DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.011

CMTM (CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing family)即人类趋化素样因子超家族,是我国首先研究并报道的一个基因家族,共包括趋化素样因子CKLF和CMTM1~8在内的9个成员^[1]。对该家族各成员的研究发现其在正常人体内广泛表达,发挥着重要的生理作用,并且与肿瘤、造血、免疫系统、心血管等多种疾病相关^[2-3]。有文献报道,多个CMTM家族成员在多种实体肿瘤(如胰腺癌、胃癌等)组织中表达被抑制甚至缺失,其机制与基因甲基化有关,恢复其表达可以通过激活细胞凋亡途径诱导肿瘤细胞的死亡^[4-5]。在血液系统的肿瘤中,有报道称CMTM家族的表达也有降低,但是,是否通过同样的机制促进血液系统肿瘤的发生还未见报道^[6-7]。本研究以多发性骨髓瘤(MM)细胞系U266细胞为载体,研究CMTM5参与MM发生、发展的调节机制。

材料与方 法

1. 试剂与器材: TRIzol试剂、Lipofectamine 2000为美国Invitrogen公司产品,逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒为日本TaKaRa公司产品,RPMI 1640培养基、胎牛血清为美国Gibco公司产品,地西他滨为美国TargetMol公司产品,pcDNA3.1-CMTM5过表达质粒购自苏州吉玛基因股份有限公司,CCK8细胞增殖毒性试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司,NanoDrop1000为美国Thermo公司仪器,LightCycler480 PCR扩增仪为德国Roche公司仪器,多功能酶标仪为美国Bio-Rad公司仪器。

2. 细胞培养:U266细胞由苏州大学唐仲英血液研究所赠送,在含10%灭活的胎牛血清、100 U/ml青霉素、链霉素的RPMI 1640培养基,37℃、5%

CO₂孵箱中培养。2~3 d传代1次,取对数生长期细胞用于后续实验。

3. 引物及探针:引物序列详见表1。应用Primer5.0软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

4. 去甲基化实验:将U266细胞按1×10⁶/ml密度接种于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,分别加入5、10 μmol/ml地西他滨,分别于培养24、48、72 h收集细胞,测定相关基因表达水平。以不加药物处理组为对照组。

5. 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测CMTM5、caspase3、caspase9 mRNA表达水平:收集U266细胞,加入1 ml TRIzol试剂,提取细胞总RNA,按逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司产品)说明书进行操作。以逆转录得到的cDNA为模板,RT-qPCR法检测CMTM5、caspase3、caspase9 mRNA表达水平。

6. pcDNA3.1-CMTM5过表达模型的建立:选用pcDNA3.1-CMTM5过表达质粒和pcDNA3.1-vector空载对照质粒,在24孔板中接种U266细胞4×10⁵个细胞,生长至浑浊度达75%~90%时,根据说明书使用Lipofectamine™ 2000转染pcDNA3.1-CMTM5和空载体。分别在无血清培养基中按每孔0.8 μg pcDNA3.1-CMTM5/vector与2.0 μl Lipofectamine 2000的比例稀释,室温下静置5 min后混合两种稀释液,轻轻混匀后放置20 min,在准备好的细胞板中加入混合液。置于37℃、5% CO₂条件下培养5 h后更换为完全培养基,继续培养48 h收集细胞进行后续实验。

7. CCK8细胞增殖实验:取对数生长期U266细胞,以1×10⁵/ml的密度接种于96孔板。实验分组:①空白对照组:不做处理的细胞组;②质粒对照组:

表1 实时荧光定量PCR引物序列及产物大小

基因	引物序列(5'→3')	长度(bp)	退火温度(℃)
CMTM5	上游引物:AGGGCATCCTGCTGGAAAC;下游引物:GCAAGTGTGATGAAGAACTCCAGTA	115	58
caspase3	上游引物:CTGGACTGTGGCATTGAGAC;下游引物:ACAAAGCGACTGGATGAACC	159	58
caspase9	上游引物:AACAGCAAGCAGCAAAGTT;下游引物:CACGGCAGAAGTTCACATTG	247	58
β-actin	上游引物:GCTACGAGCTGCCTGACGG;下游引物:TGTTGGCGTACAGTCTTTGC	174	58

转染空载对照质粒组;③过表达质粒转染组:转染 pcDNA3.1-CMTM5 质粒组。在 37 ℃、5%CO₂ 条件下培养 24、48、72 和 96 h。按说明书进行操作,孵育 2 h 后采用全自动酶标仪测定 450 nm 波长处各孔的吸光度(A)值。

8. 统计学处理:采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。所有实验每组均设 3 复孔,实验重复 3 次,结果以均数±标准差表示。两组之间的比较采用 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关系数。双侧 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 地西他滨对 U266 细胞 CMTM5 基因表达水平的影响:24 h 处理组中,各个浓度 CMTM5 表达水平未表现出明显的差异(*P* > 0.05);48 h 处理组中,5 μmol/ml 处理组 CMTM5 表达水平有一定升高(*P* < 0.01),10 μmol/ml 处理组 CMTM5 表达水平较对照组明显升高(*P* < 0.001);72 h 处理组中,CMTM5 变化更加明显,5 μmol/ml 浓度处理组就表现出大幅度的升高(*P* < 0.001),10 μmol/ml 浓度处理组水平增高幅度最大(*P* < 0.001)(图 1A)。

2. 地西他滨对 U266 细胞 caspase3、caspase9 基因表达水平的影响:经过不同浓度地西他滨处理不

同时间后的 U266 细胞,其 caspase3、caspase9 基因表达水平的变化表现出与 CMTM5 表达水平相似的变化趋势(图 1B、C)。对该结果与相应的 CMTM5 水平进行相关性分析,通过采用不同浓度地西他滨对 U266 细胞处理后,CMTM5 表达水平与各组对应的 caspase3(*r* = 0.937)、caspase9(*r* = 0.945)表达水平均呈现高度正相关关系,结果均有统计学意义(*P* 值均 < 0.001)(图 2)。

3. pcDNA3.1 过表达质粒转染对 U266 细胞 CMTM5 表达水平的影响:将重组质粒 pcDNA3.1-CMTM5 和空载体 pcDNA3.1-vector 转染 U266 细胞,取 48 h 处理细胞进行 RT-qPCR 检测。结果显示转染细胞 48 h 后,空白对照组、质粒对照组、过表达质粒转染组 U266 细胞 CMTM5 mRNA 表达水平分别为 0.63±0.14、0.64±0.11、133.10±10.35,差异有统计学意义(*P* < 0.001)。取定量 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后,两对照组在目的基因区未见条带,转染 CMTM5 组可见一清晰条带(图 3)。

4. CMTM5 过表达对 U266 细胞增殖活性的影响:结果显示与质粒对照组、空白对照组比较,过表达质粒转染组细胞增殖活性明显受抑,转染过表达质粒组的抑制作用在 24 h 开始出现,48、72、96 h 后抑制作用更加明显,差异均有统计学意义(*P* 值均 <

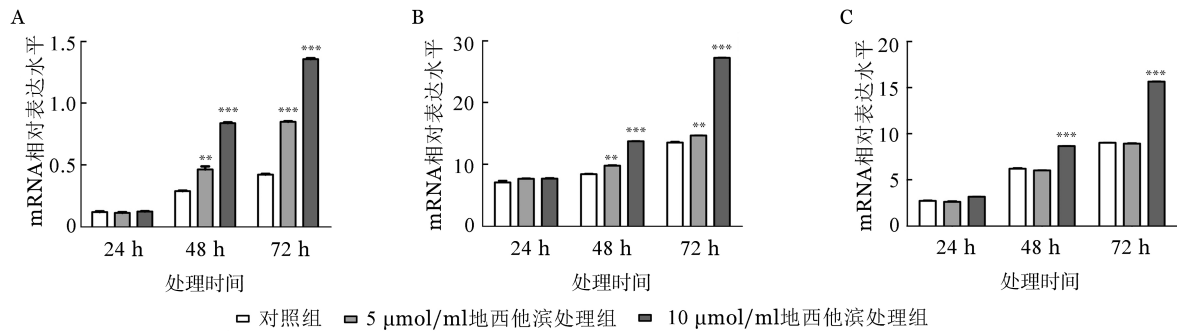


图1 不同浓度地西他滨处理不同时间对U266细胞中各分子表达的影响(设3个复孔,实验重复3次。***P* < 0.01,****P* < 0.001)

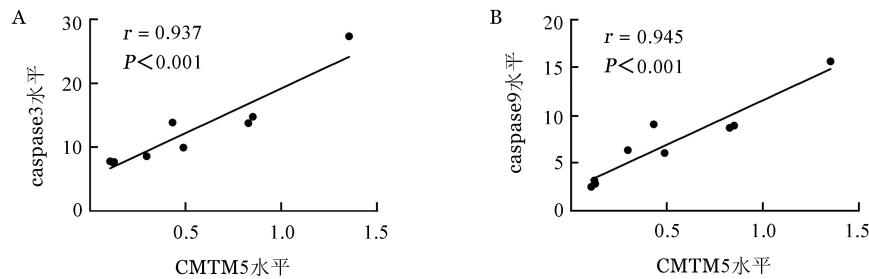
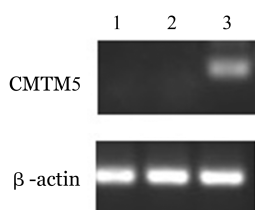


图2 不同浓度地西他滨对U266细胞处理不同时间各分子的相关性分析(*n* = 9)

0.05)(图4)。



1:空白对照组;2:质粒对照组;3:过表达质粒转染组

图3 琼脂糖凝胶电泳法检测过表达质粒转染对U266细胞CMTM5表达的影响

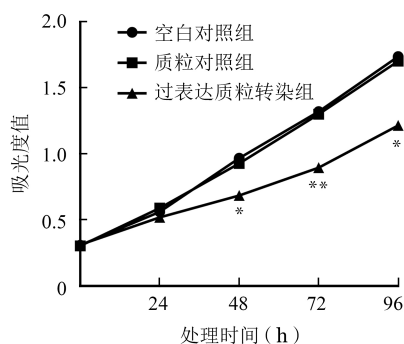


图4 CCK-8法检测过表达CMTM5对U266细胞增殖活性的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

讨 论

CMTM家族成员在肿瘤疾病中低表达或缺失与启动子反应区域CpG岛的甲基化有关。恢复其表达可以通过激活细胞凋亡途径诱导肿瘤细胞的死亡。CMTM5作为CMTM家族中的重要成员,有研究者证实其在消化系统肿瘤^[4]、前列腺癌^[8]等肿瘤疾病中均存在异常。在针对髓系白血病的研究中,发现其在急性髓系白血病(AML)和慢性髓性白血病(CML)同样表现出下调或缺失的现象,同时与白血病特异性的融合基因AML1-ETO、PML-RAR α 和BCL-ABL1呈负相关^[7]。因此认为CMTM5可能在血液系统肿瘤中也发挥着肿瘤抑制的作用。

MM的发病机制较为复杂,目前认为其病程中涉及到原癌基因的激活与抑癌基因(如P16、P53、RB等)的缺失^[9-10],而在抑癌基因的失活中,启动子部位的甲基化与疾病的出现具有密切的关联性。牛继红等^[6]研究发现CMTM5基因水平在MM治疗无效患者中较正常人普遍降低,且降低程度与其国际分期(ISS)呈相关性,但对其抗肿瘤活性的机制尚不清楚。

caspase家族是在凋亡过程中发挥重要作用的家族,其无活性的前体酶原通过接受一系列的凋亡

刺激因素而引发下游的caspase级联反应,最终导致细胞凋亡^[11]。caspase9是细胞内源性凋亡途径的上游启动因子,在级联反应传导通路的启动作用中必不可少。当细胞收到凋亡刺激信号时,线粒体膜发生去极化和电位下降而导致通透性改变,使得其内部的蛋白细胞色素C释放,在dATP条件下与Apaf-1(凋亡因子1)结合形成多聚体,caspase9无活性前体剪切活化为cleaved-caspase9,进而活化下游caspase3、6、7等级联反应下游的凋亡效应成员而发挥其启动作用^[12]。caspase3是整个家族通路中最为关键的凋亡效应因子,内源性途径和外源性途径最终都将激活caspase3,介导细胞发生最终凋亡,其活性是凋亡进入不可逆阶段的标志。

我们的研究结果证实,MM细胞系U266细胞中存在CMTM5的缺失,对该细胞系使用去甲基化药物处理后,CMTM5基因表达水平表现出了不同程度的时间依赖性和浓度依赖性的增高。因此在U266细胞中CMTM5的低表达很可能与基因甲基化的修饰有关。通过检测不同时间、不同浓度处理后的U266细胞中caspase3、caspase9基因表达水平的变化,并与CMTM5表达水平进行相关性分析,发现CMTM5与这两种在凋亡途径中发挥关键作用的重要蛋白酶表现出密切的正相关性。说明CMTM5可能参与了U266细胞启动内源性caspase途径凋亡程序的过程。在CMTM5过表达U266细胞中,CMTM5能够抑制U266细胞的增殖,从而进一步证实CMTM5的异常缺失很可能在MM的发生中起到一定作用,并且CMTM5抑制细胞增殖的作用机制可能与caspase内源性凋亡途径有关。

近来,王晓宁等^[13]也报道在MM细胞株RPMI 8226中DNA甲基化转移酶活性升高。由于MM发生机制复杂,治疗后复发率高,很多学者都在尝试联合地西他滨的多元化治疗方案。虽然没有经过严格的临床试验证实,但这些实验结果均说明,甲基化导致的某些基因的缺失很有可能也参与了MM的发生、发展过程,是其重要病因学之一。我们的实验结果提示甲基化导致的CMTM5缺失,很有可能参与了MM的发生、发展,是MM的重要病因学之一,但是还需要大量的临床研究去证实。经过更深入系统的研究后,CMTM5可以作为一种分子标志监测患者对甲基化药物的反应,也有望作为监测MM发生发展、分级和转归的一种诊断指标。

总之,我们在MM细胞系U266细胞系中,发现

基因甲基化导致CMTM家族中CMTM5的缺失,恢复CMTM5表达后可以促进肿瘤细胞内源性凋亡途径的重启,促进肿瘤细胞的凋亡,提示CMTM5可能与MM的发生、发展密切相关。

参考文献

- [1] Han W, Ding P, Xu M, et al. Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1-8 (CKLFSF1-8) by in silico cloning and experimental validation[J]. *Genomics*, 2003, 81(6): 609-617.
- [2] 黄亚胜, 张骁, 虞旗旗. 趋化素样因子超家族成员5对前列腺癌细胞EG-VEGF的影响[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2015, (6): 464-467. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6090.2015.06.007.
- [3] Wang Y, Li T, Qiu X, et al. CMTM3 can affect the transcription activity of androgen receptor and inhibit the expression level of PSA in LNCaP cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(1): 54-58. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.03.143.
- [4] Guo X, Li T, Wang Y, et al. CMTM5 induces apoptosis of pancreatic cancer cells and has synergistic effects with TNF-alpha[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(1): 139-142. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.06.148.
- [5] Wang Y, Li J, Cui Y, et al. CMTM3, located at the critical tumor suppressor locus 16q22.1, is silenced by CpG methylation in carcinomas and inhibits tumor cell growth through inducing apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (12): 5194- 5201. DOI: 10.1158/0008-5472. CAN-08-3694.
- [6] 牛继红, 鲍立, 张瑶, 等. 多发性骨髓瘤病人骨髓细胞中Cmtm5基因异常低表达[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(2): 363-367.
- [7] Niu J, Li H, Zhang Y, et al. Aberrant expression of CKLF-like MARVEL transmembrane member 5 (CMTM5) by promoter methylation in myeloid leukemia [J]. *Leuk Res*, 2011, 35 (6): 771-776. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.11.023.
- [8] Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, et al. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (5): 1553- 1560. DOI: 10.1158/1078- 0432.CCR- 09- 2546.
- [9] Guillermin G, Gyan E, Wolowicz D, et al. p16 (INK4a) and p15 (INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance [J]. *Blood*, 2001, 98 (1): 244-246.
- [10] Kalakonda N, Rothwell DG, Scarffe JH, et al. Detection of N-Ras codon 61 mutations in subpopulations of tumor cells in multiple myeloma at presentation [J]. *Blood*, 2001, 98(5): 1555-1560.
- [11] Shi CS, Li JM, Chin CC, et al. Evodiamine induces cell growth arrest, apoptosis and suppresses tumorigenesis in human urothelial cell carcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(3): 1149-1159. DOI: 10.21873/anticancer.11428.
- [12] Means JC, Venkatesan A, Gerdes B, et al. Drosophila spaghetti and doubletime link the circadian clock and light to caspases, apoptosis and tauopathy [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11 (5): e1005171. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005171.
- [13] 王晓宁, 姚建娜, 王晓娟, 等. DNMT3b基因在骨髓瘤RPMI8226细胞株中的表达及其生物学意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25 (5): 1431-1435. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2017.05.026.

(收稿日期:2018-06-22)

(本文编辑:刘志红)

·读者·作者·编者·

关于提供伦理委员会批准文件及受试对象知情同意书的通知

根据中华医学会杂志社的相关规定,当以人体为研究对象时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位、地区或国家)所制订的伦理学标准并提供该委员会的批准文件复印件,同时在正文中说明受试对象或其监护人是否知情同意。

本刊编辑部