

S100A6、Notch1 在多发性骨髓瘤患者中的表达及其临床意义

包红雨 王炎 王建宁 宋敏 孟庆齐 韩雪

【摘要】 目的 探讨S100A6、Notch1在多发性骨髓瘤(MM)患者中的表达及其临床意义。方法 以28例MM患者为研究对象,以20例白细胞、血小板略低但骨髓检查未见异常者为对照,采用real time PCR法检测骨髓单个核细胞S100A6、Notch1的表达;采用免疫组化染色法检测S100A6、Notch1蛋白在MM患者骨髓和髓外浸润组织活检病理切片中的表达;采用real time PCR法和Western blot法检测siRNA沉默骨髓瘤U266细胞S100A6基因后对Notch1 mRNA和蛋白水平的影响。并结合临床进行相关分析。结果 ①S100A6、Notch1 mRNA表达水平:初发MM患者组分别为 2.19 ± 1.25 、 2.98 ± 0.64 ,均高于对照组(0.71 ± 0.20 、 0.58 ± 0.39)和稳定期患者组(0.85 ± 0.26 、 0.72 ± 0.40)(P 值均 <0.05);伴髓外转移组(8例)分别为 3.36 ± 1.23 、 5.71 ± 3.96 ,均高于无髓外转移组(20例)(1.40 ± 0.25 、 1.16 ± 1.00)。②S100A6与Notch1 mRNA表达呈正相关($r=0.505$, $P=0.007$)。③MM患者骨髓和髓外浸润组织活检病理切片均可见浆细胞S100A6、Notch1阳性表达。④siRNA转染U266细胞48 h后S100A6基因表达沉默,Notch1 mRNA及蛋白水平明显下降。结论 S100A6、Notch1表达与MM疾病发生、进展、髓外转移相关,二者具有显著相关性,可作为MM诊断及预后的指标。

【关键词】 钙粒蛋白A; 受体,Notch1; 多发性骨髓瘤

基金项目:南京医科大学科技发展基金重点项目(2012NJMU089);江苏省“六大人才高峰”第11批次高层次人才选拔培养资助项目(WSN-019)

Clinical significance of S100A6 and Notch1 in multiple myeloma patients Bao Hongyu, Wang Yan, Wang Jianning, Song Min, Meng Qingqi, Han Xue. Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Nan Jing Medical University, Nanjing 210000, China

Corresponding author: Bao Hongyu, Email: baohongyu77@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression levels of S100A6, Notch1 in multiple myeloma (MM) patients and its clinical significance. **Methods** The expression levels of S100A6, Notch1 in 28 MM cases and 20 healthy controls were determined by real time quantitative PCR (RQ-PCR), and their relationships with clinical features and outcomes were analyzed. Immunohistochemical was used to analysis the levels of S100A6 and Notch1 in bone marrow biopsy samples and intramedullary metastases soft tissues. RQ-PCR and Western blot were used to test the changes of Notch1 mRNA and Notch1 protein in U266 MM cells after S100A6 silenced by siRNA. **Results** ①The expression levels of S100A6, Notch1 in primary MM patients was 2.19 ± 1.25 , 2.98 ± 0.64 , significantly higher than those in controls (0.71 ± 0.20 , 0.58 ± 0.39 , $P<0.05$) and patients in platform status (0.85 ± 0.26 , 0.72 ± 0.40 , $P<0.05$). 8 cases with intramedullary metastasis had significantly higher levels of S100A6 (3.36 ± 1.23) and Notch1 (5.71 ± 3.96), as compared to those without extra medullary metastases. ②S100A6 expression was positive correlation with Notch1 ($r=0.505$, $P=0.007$). ③S100A6 and Notch1 proteins were positive in plasma cells of bone marrow biopsy samples and intramedullary metastases soft tissues. ④The Notch1 mRNA and Notch1 expression decreased significantly after 48 hours treatment by S100A6 siRNA in U266 cells. **Conclusion** S100A6 and Notch1 were closely associated with MM progress and intramedullary metastasis. They have significant correlation and might be as two prognostic molecular markers in MM.

【Key words】 Calgranulin A; Receptor, Notch1; Multiple myeloma

Fund program: The Key Projects of Science and Technology Development Fund in Nanjin Medical University (2012NJMU089); The Eleventh Batches of Senior Personnel Selection and Training Projects Fund for the Six Major Talent Peak in Jiangsu Province(WSN-019)

近年来,随着硼替佐米、卡非佐米、来那度胺等新药的应用,多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者的生存质量有了很大改善。但多数患者最终产生耐药,而异基因造血干细胞移植的相关死亡率较高,故深入研究其发病机制并寻找新的靶向基因显得十分必要^[1-3]。

钙粒蛋白A6(S100A6)是S100蛋白家族的一个重要成员,通过与钙离子及靶蛋白的相互作用,在体内发挥多种生物学作用。其在多种实体肿瘤中表达异常,与肿瘤的增殖、浸润转移和凋亡密切相关^[4-6],但在血液系统肿瘤中的表达及作用尚鲜有报道。Notch信号通路是一个较为重要的涉及造血细胞增殖和凋亡的信号转导通路。Notch1能够抑制骨髓瘤细胞凋亡,且能诱导骨髓瘤细胞耐药^[7]。我们通过检测MM患者S100A6及Notch1的表达旨在探索其在MM发生、发展中的意义,并通过siRNA沉默骨髓瘤U266细胞S100A6基因后观察其对Notch1的影响,以明确二者在MM中的相关性。

对象与方法

1. 研究对象:以2010年1月至2014年12月在我院初诊的28例MM患者为研究对象,其中男16例,女12例,平均年龄62岁。MM诊断及疗效标准参照中国MM诊治指南(2015年修订)。国际分期系统(ISS)分期:I期8例,II期7例,III期13例;IgG型15例,IgA型8例,轻链型5例。28例患者均接受化疗,治疗方案包括VAD(长春新碱、多柔比星、地塞米松)、PD(硼替佐米、地塞米松)及PCD(硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松)方案。以20例白细胞、血小板略低但骨髓检查未见异常者为对照,男12例,女8例,平均年龄60岁。随访资料通过查阅病历及电话联系获得。本研究得到患者及对照者知情同意并获得医院医学伦理委员会审批通过。

2. 主要试剂与仪器: TRIzol、Lipofectamine™ 2000脂质体转染试剂为美国Invitrogen公司产品, cDNA第一链合成试剂盒为美国Thermo公司产品, 普通梯度PCR仪为美国Labnet公司产品, 荧光定量PCR仪为美国ABI公司产品, 凝胶成像仪为美国BIO-RAD公司产品。siRNA为前期研究中从设计

的靶向S100A6(Gen Bank Accession)的4条序列中确定的敲除效应最佳的干扰序列, siRNA-NC为与人类基因组序列无任何匹配的阴性对照序列,由上海吉玛制药技术有限公司合成。S100A6鼠抗人单克隆抗体购自美国BD公司,辣根过氧化物酶羊抗鼠二抗(FITC标记),购自美国Beckman Coulter公司。直标辣根过氧化物酶鼠抗人GAPDH抗体购自上海西唐生物科技有限公司。

3. real-time PCR法检测S100A6、Notch1 mRNA表达:化疗前和化疗4~6个疗程后分别采集MM患者骨髓3 ml(肝素抗凝),分离单个核细胞,对照组标本采集和处理方法同上。提取各组细胞总RNA, 逆转录为cDNA。以GAPDH为内参照,实验中所用引物序列见表1。S100A6及Notch1 mRNA表达水平以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示, $\Delta CT = CT_{目的基因} - CT_{GAPDH}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{待测标本} - \Delta CT_{内对照}$ 。

表1 检测S100A6、Notch1 mRNA表达所用引物序列

基因名称	序列(5'→3')	片段大小(bp)
S100A6	上游:CATCTTCTTTTTCGCGTCCCA	107
	下游:TTAAAAGCAGCCCTGGTGACC	
Notch1	上游:GAAGGAGCTGATCCAGAAGG	156
	下游:AGTTCACCTCTGGTCCTTG	
GAPDH	上游:GGACCTCATCAACTCACACG	115
	下游:GGTGCTCCTCCCTGTTGTT	

4. 免疫组化染色法检测MM患者骨髓及髓外浸润组织S100A6、Notch1表达:对MM患者骨髓或髓外浸润组织活检病理石蜡标本行4 μm连续切片,常规脱蜡、复水、高压热修复,3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶,5%胎牛血清封闭,滴加一抗4℃过夜,滴加二抗,DAB显色,复染,脱水,树胶封片后观察。

5. U266细胞siRNA转染:U266细胞为我科实验室常规保存细胞。细胞于含1 mmol/L L-谷氨酰胺和10%热灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基中,37℃、5%CO₂的环境下传代,取对数生长期的细胞用于实验。实验分组:①空白对照组:仅转染脂质体;②阴性对照组:转染阴性对照siRNA-NC;③S100A6 siRNA干扰组:转染S100A6 siRNA。每

组设3个复孔,实验重复3次,实验数据以平均数表示。

6. real-time PCR法检测 siRNA 转染后 U266 细胞 S100A6、Notch1 mRNA 表达:提取转染 48 h 后的各组 U266 细胞总 RNA,逆转录及 real-time PCR 法检测 S100A6、Notch1 mRNA 表达,方法同前。

7. Western blot 法检测 siRNA 转染后 U266 细胞 S100A6、Notch1 蛋白表达:收集转染 72 h 后的各组 U266 细胞 (1×10^7),加细胞裂解液裂解,行 120 g/L SDS-PAGE 电泳,转移至硝酸纤维素膜,2% 胎牛血清封闭过夜,加入抗 S100A6、Notch1 抗体孵育,0.1% Tween-PBS 洗涤后加入羊抗鼠二抗孵育,ECL 显色,暗室曝光显影。采用凝胶成像分析软件对条带进行分析。

8. 统计学处理:随访截至 2014 年 12 月 31 日。采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数 \pm 标准差表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. real-time PCR 法检测骨髓单个核细胞 S100A6、Notch1 mRNA 的表达:初发 MM 患者组 S100A6 的表达水平为 2.19 ± 1.25 ,高于对照组 (0.71 ± 0.20 , $t=3.938$, $P=0.001$) 和稳定期 MM 患者组 (0.85 ± 0.26 , $t=3.958$, $P=0.001$),差异均有统计学意义;初发 MM 患者组 Notch1 mRNA 的表达水平为 2.98 ± 0.64 ,也高于对照组 (0.58 ± 0.39 , $t=2.205$, $P=0.037$) 和稳定

期患者组 (0.72 ± 0.40 , $t=2.376$, $P=0.032$),差异均有统计学意义。

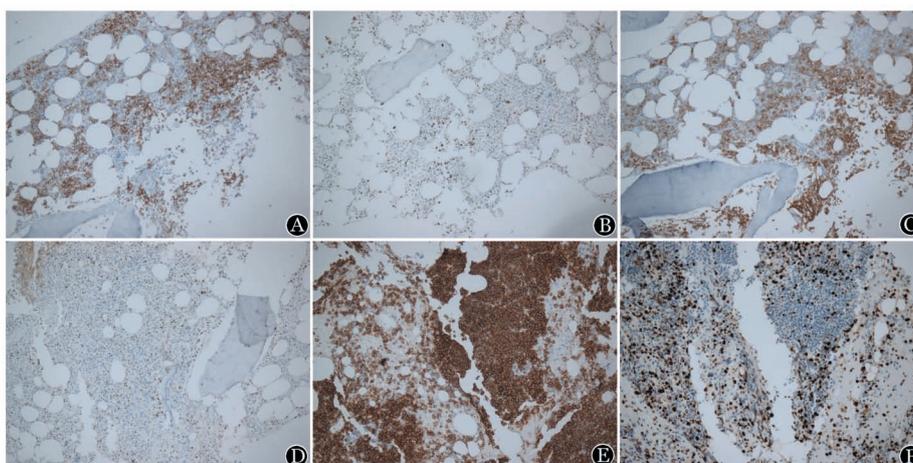
28 例 MM 患者中骨髓外转移者 8 例,无髓外转移者 20 例。骨髓外转移者 S100A6、Notch1 mRNA 的表达水平分别为 3.36 ± 1.23 、 5.71 ± 3.96 ,均高于无髓外转移者 (1.40 ± 0.25 、 1.16 ± 1.00)。

2. MM 患者骨髓单个核细胞 S100A6、Notch1 表达的相关性分析:将 28 例初发 MM 患者单个核细胞 S100A6 与 Notch1 的表达进行相关性分析, $r=0.505$, $P=0.007$,S100A6 与 Notch1 表达呈正相关。

3. MM 患者骨髓及髓外浸润组织 S100A6、Notch1 的表达:免疫组化染色法检测结果显示无髓外转移和骨髓外转移的 MM 患者骨髓活检浆细胞均可见 S100A6、Notch1 表达阳性(图 1A~D),髓外软组织转移灶中浆细胞也可见 S100A6、Notch1 表达阳性(图 1E、F)。

4. siRNA 对 S100A6、Notch1 mRNA 和蛋白表达的影响:real-time PCR 法检测结果显示,siRNA 转染 U266 细胞 48 h 后,S100A6 基因表达沉默,Notch1 mRNA 表达水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

Western blot 法检测结果显示,SiRNA 转染 U266 细胞 72 h 后,S100A6 siRNA 转染组 S100A6、Notch1 表达较空白对照组和阴性对照组明显下降。内参 GAPDH 表达三组无差别。示 S100A6 siRNA 干扰可致 U266 细胞 S100A6、Notch1 总蛋白表达下降(图 2)。



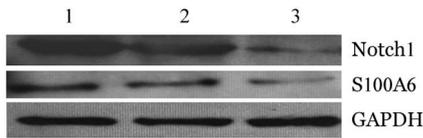
A: 无髓外转移患者骨髓活检浆细胞 S100A6 表达; B: 无髓外转移患者骨髓活检浆细胞 Notch1 表达; C: 骨髓外转移患者骨髓活检浆细胞 S100A6 表达; D: 骨髓外转移患者骨髓活检浆细胞 Notch1 表达; E: 患者髓外浸润组织浆细胞 S100A6 表达; F: 患者髓外浸润组织浆细胞 Notch1 表达

图1 免疫组化染色法检测多发性骨髓瘤患者 S100A6、Notch1 表达(低倍)

表 2 real-time PCR 法检测 siRNA 转染 U266 细胞 48 h 后对其 S100A6、Notch1 基因表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	S100A6			Notch1		
	表达水平	t 值	P 值	表达水平	t 值	P 值
阴性对照组	1.18±0.32			0.94±0.28		
空白对照组	1.27±0.41	-0.223	0.828	0.96±0.32	0.140	0.892
S100A6 siRNA 干扰组	0.05±0.02	7.694	0.002	0.08±0.03	6.959	0.002

注:表中 t、P 值均为与阴性对照组比较。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:S100A6 siRNA 干扰组

图 2 Western blot 法检测 siRNA 对 U266 细胞 S100A6、Notch1 蛋白表达的影响

讨 论

新近研究发现 Notch1 信号通路参与 MM 的发生、发展,且是影响肿瘤侵袭、耐药的关键因素^[8]。检测 MM 细胞株及 MM 患者骨髓标本结果显示存在 Notch1 蛋白的过度表达,初步表明 Notch 信号与 MM 发病相关。Notch1 的活化信号可抑制药物诱导的细胞凋亡,活化的 Notch1 可阻断骨髓瘤细胞的凋亡,而蛋白酶体抑制剂诱导 MM 细胞株凋亡的同时伴有 Notch1 表达的降低。Notch1 通过磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)-蛋白激酶 B-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)-eIF4E 途径抑制 mTOR,进一步抑制 p53,使细胞具有化疗抗性^[9]。

Notch1 信号通路与 MM 的发生具有密切的联系,骨髓瘤细胞和骨髓瘤基质细胞表达大量 Notch1 受体和配体,激活 Notch1 信号通路对骨髓瘤的发生和耐药起重要作用,因此,Notch1 信号通路成为骨髓瘤治疗的候选新靶点^[10]。但其诱导骨髓瘤细胞凋亡的机制尚未完全明确,其如何通过受体、配体、下游基因及其他效应物影响骨髓瘤的发生、转移、浸润机制亦需进一步阐明。

S100A6 的分布具有细胞、组织特异性,并与肿瘤的增殖、浸润转移和凋亡密切相关^[4-5]。S100A6 与肿瘤的相关性近年多有报道。Hua 等^[11]报道 S100A6 在肝细胞上表达增高,并对肝细胞肿瘤生长、侵袭起促进作用。Vimalachandran 等^[12]的实验表明 S100A6 在胰腺恶性细胞上的表达较良性细胞明显增高,在恶性细胞,胞核 S100A6 的表达较胞质

增高。单因素分析显示胞核高表达 S100A6 的患者生存时间明显缩短。多因素分析表明胞核高表达 S100A6 为影响胰腺癌患者生存的独立预后因素,但相关机制尚不清楚。

在血液肿瘤中,Tamai 等^[13]的研究表明 S100A6 基因上调及 p53-caspase 8-caspase 3 途径的抑制可能为 MLL-AFF1 阳性急性淋巴细胞白血病(ALL)患者预后差的原因之一。通过 siRNA 干扰 S100A6,表明 S100A6 可通过抑制 p53-caspase 8-caspase 3 途径抑制 TNF- α ,从而抑制 MLL-AFF1 阳性 ALL 细胞凋亡。但在 MM 中,S100A6 的作用尚未见报道。

我们采用 real time PCR 法检测 28 例 MM 患者骨髓单个核细胞 S100A6、Notch1 基因的表达,比较 MM 患者组与对照组、疾病初诊期与稳定期、骨髓外转移与无髓外转移者之间 S100A6、Notch1 表达的差异,并通过免疫组化染色法检测 S100A6、Notch1 蛋白在 MM 患者骨髓及髓外浸润组织活检病理切片中的表达,siRNA 沉默骨髓瘤 U266 细胞 S100A6 基因后观察其对 Notch1 的影响,以明确二者在 MM 中的相关性。结果表明:初诊的 MM 患者骨髓单个核细胞较对照组高表达 S100A6 及 Notch1 (P 值均 < 0.05),MM 患者疾病初期 S100A6 与 Notch1 基因表达均高于治疗后稳定期(P 值均 < 0.05)。骨髓外转移者 S100A6 与 Notch1 基因表达亦较无髓外转移者高,且统计学分析初诊患者的 S100A6 与 Notch1 表达明显相关。MM 患者骨髓活检及髓外浸润组织中浆细胞免疫组化 S100A6、Notch1 表达均阳性,siRNA 沉默骨髓瘤 U266 细胞 S100A6 基因后,Notch1 基因及蛋白明显下降,进一步印证 Notch1 与 S100A6 表达的相关性。

综上,我们的实验结果表明在 MM 患者中 S100A6 及 Notch1 水平与 MM 发生、发展、髓外浸润相关,可共同作为预测 MM 发病、提示预后的相关指标。S100A6、Notch1 在 MM 中的表达存在明显相关性,二者在 MM 发病中如何相互作用及具体作用机制仍需进一步实验证明。

参考文献

- [1] Afifi S, Michael A, Lesokhin A. Immunotherapy: A New Approach to Treating Multiple Myeloma with Daratumumab and Elotuzumab[J]. *Ann Pharmacother*, 2016, 50(7): 555-568. DOI: 10.1177/1060028016642786.
- [2] Shank BR, Brown VT, Schwartz RN. Multiple myeloma maintenance therapy: a review of the pharmacologic treatment[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2015, 21(1): 36-51. DOI: 10.1177/1078155213514468.
- [3] Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2015, 125(20): 3059-3068. DOI: 10.1182/blood-2014-11-568907.
- [4] Kasacka I, Piotrowska Z, Filipek A, et al. Influence of doxazosin on biosynthesis of S100A6 and atrial natriuretic factor peptides in the heart of spontaneously hypertensive rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(4): 375-381. DOI: 10.1177/1535370215611972.
- [5] Wang XH, Zhang LH, Zhong XY, et al. S100A6 overexpression is associated with poor prognosis and is epigenetically up-regulated in gastric cancer[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(2): 586-597. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091217.
- [6] Yang X, Wei KJ, Zhang L, et al. Decreased expression of S100A6 in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(2): 479-488.
- [7] Guo D, Li C, Teng Q, et al. Notch1 overexpression promotes cell growth and tumor angiogenesis in myeloma[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(1): 33-40. DOI: 10.4149/neo_2013_005.
- [8] Delgado-Calle J, Anderson J, Cregor MD, et al. Bidirectional Notch Signaling and Osteocyte-Derived Factors in the Bone Marrow Microenvironment Promote Tumor Cell Proliferation and Bone Destruction in Multiple Myeloma[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(5):1089-1100. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1703.
- [9] Chen F, Pisklakova A, Li M, et al. Gamma-secretase inhibitor enhances the cytotoxic effect of bortezomib in multiple myeloma[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011, 34(6): 545-551. DOI: 10.1007/s13402-011-0060-6.
- [10] Hu J, Zhu X, Lu Q. Antiproliferative effects of γ -secretase inhibitor, a Notch signalling inhibitor, in multiple myeloma cells and its molecular mechanism of action[J]. *J Int Med Res*, 2013, 41(4): 1017-1026. DOI: 10.1177/0300060513485912.
- [11] Hua Z, Chen J, Sun B, et al. Specific expression of osteopontin and S100A6 in hepatocellular carcinoma[J]. *Surgery*, 2011, 149(6):783-791. DOI: 10.1016/j.surg.2010.12.007.
- [12] Vimalachandran D, Greenhalf W, Thompson C, et al. High nuclear S100A6 (Calcyclin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3218-3225. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4311.
- [13] Tamai H, Miyake K, Yamaguchi H, et al. Resistance of MLL-AFF1-positive acute lymphoblastic leukemia to tumor necrosis factor- α is mediated by S100A6 upregulation[J]. *Blood Cancer J*, 2011, 1(11): e38. DOI: 10.1038/bcj.2011.37.

(收稿日期:2016-08-23)

(本文编辑:刘志红)

第十六届全国实验血液学学术会议征文通知

由中国病理生理学会实验血液学专业委员会主办,福建医科大学附属协和医院、福建省血液病研究所承办的“第十六届全国实验血液学学术会议”,拟于2017年10月20-22日在福州市召开。

会议主题包括血液肿瘤生物学和靶向治疗、干细胞和造血调控、血栓和血管生物学、血液免疫学等。本次大会采用特邀报告、大会发言和分会讨论的形式,将邀请国内外血液学领域著名专家学者就目前血液学研究的热点问题进行交流。

征文内容:以血液肿瘤生物学和靶向治疗、干细胞和造血调控、血栓和血管生物学、血液免疫学为主题,涵盖白血病、造血干细胞移植、干细胞发育、淋巴瘤/骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、红细胞疾病、止血疾病等血液系统疾病基础和临床研究。

征文要求:凡未在全国性公开刊物上发表的论文均可投稿;征文要求500字左右摘要1份。按标题、作者单位、姓名、联系方式(通讯地址、联系电话、电子邮箱)、研究目的、方法、结果、讨论与结论撰写,摘要中不要附图、表。截稿日期:2017年7月31日(以网上投稿时间为准)。论文审定后,将于2017年9月发第二轮通知。

投稿方式:本次大会只接受网上投稿,统一采用WORD文档,注明“2017会议征文”,以附件形式发送Email至大会邮箱:cseh2017@126.com,不接受任何信件投稿和纸质投稿。

本次会议已列入国家级继续医学教育项目,与会代表将获得国家级I类学分。欢迎国内外同行踊跃投稿,莅临参会。

联系人:杨婷,电话:13950210357;林振兴,电话:18020883129

中国病理生理学会实验血液学专业委员会
福建医科大学附属协和医院、福建省血液病研究所