

多发性骨髓瘤患者 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平的临床意义*

姜方毅¹, 陈桂明¹, 冯晓鸿¹, 徐晓月¹, 姚根宏^{2△}

(1. 高邮市人民医院检验科, 江苏高邮 225600; 2. 南京鼓楼医院风湿免疫科, 江苏南京 210008)

摘要:目的 探讨多发性骨髓瘤患者同源异型盒基因 B7(HOXB7) mRNA 及其蛋白水平的临床意义。**方法** 选取 2012 年 2 月至 2017 年 2 月该院收治的 120 例多发性骨髓瘤患者(病例组)和同期在该院体检的 35 名志愿者(健康组)为研究对象,比较两组研究对象 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平,观察 HOXB7 mRNA 及其蛋白在不同分期多发性骨髓瘤患者以及伴有髓外浸润多发性骨髓瘤患者中表达情况,并分析 HOXB7 与多发性骨髓瘤患者临床分期、髓外浸润情况的关系。**结果** 病例组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);Ⅲ期组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平高于Ⅰ期组、Ⅱ期组,Ⅱ期组相比Ⅰ期组也明显较高,差异有统计学意义($P < 0.05$);伴有髓外浸润多发性骨髓瘤患者 HOXB7 mRNA、HOXB7 蛋白明显高于无髓外浸润者($P < 0.05$);多发性骨髓瘤患者临床分期和伴有髓外浸润与 HOXB7 表达水平呈正相关($r = 0.352, 0.298, P < 0.05$),但与其与患者性别、年龄等均无明显相关性($P > 0.05$)。**结论** 多发性骨髓瘤患者 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平明显上调,HOXB7 基因在多发性骨髓瘤疾病发生、进展和浸润过程中发挥重要作用。**关键词:** 多发性骨髓瘤; 同源异型盒基因 B7 蛋白; 同源异型盒基因 B7 mRNA; 临床意义

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.22.010

中图法分类号:R733;R446.9

文章编号:1673-4130(2018)22-2759-04

文献标识码:A

Clinical significance of HOXB7 mRNA and its protein levels in patients with multiple myeloma*

JIANG Fangyi¹, CHEN Guiming¹, FENG Xiaohong¹, XU Xiaoyue¹, YAO Genhong^{2△}

(1. Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Gaoyou, Gaoyou, Jiangsu 225600, China; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of homeobox gene B7 (HOXB7) mRNA and its protein expression in patients with multiple myeloma. **Methods** 120 patients with multiple myeloma (case group) treated in the hospital from February 2012 to February 2017 and 35 volunteers (healthy group) were studied. The level of HOXB7 mRNA and its protein were compared between the two groups. The expressions of HOXB7 mRNA and its protein in patients with multiple myeloma in different stages and in patients with multiple myeloma and extramedullary infiltration were observed. The relationship between HOXB7 and the clinical stage, extramedullary infiltration in patients with multiple myeloma was analyzed. **Results** The levels of HOXB7 mRNA and its protein expression in case group were significantly higher than those in control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The levels of HOXB7 mRNA and its protein expression in stage III of case group were higher than those in stage II and I of case group, and the levels of HOXB7 mRNA and its protein expression in stage II of case group were higher than those in stage I of case group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of HOXB7 mRNA and its protein expression in patients with multiple myeloma and extramedullary infiltration were significantly higher than those without extramedullary infiltration ($P < 0.05$), and the clinical stage and extramedullary infiltration of multiple myeloma were positively correlated with the expression level of HOXB7 ($r = 0.352, 0.298, P < 0.05$), but there were no significant correlations with gender or age ($P > 0.05$). **Conclusion** The level of HOXB7 mRNA and its protein in patients with multiple myeloma are obviously up-regulated. HOXB7 plays an important role in the occurrence, progression and infiltration of multiple myeloma.

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81571583)。

作者简介:姜方毅,男,副主任技师,主要从事临床检验及血液病诊断方面的研究。△ 通信作者,E-mail:yaogenhong@nju.edu.cn。

本文引用格式:姜方毅,陈桂明,冯晓鸿,等.多发性骨髓瘤患者 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平的临床意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(22):2759-2761.

Key words: multiple myeloma; homeobox gene B7 protein; homeobox gene B7 mRNA; clinical significance

多发性骨髓瘤是以骨髓中浆细胞克隆性增殖同时分泌大量单克隆免疫球蛋白为主要特征的恶性血液病,常表现为恶性浆细胞增生、骨痛和乏力等,发病率占恶性血液系统肿瘤的 13%,现阶段临床上主要采用化疗及造血干细胞移植等方法对其进行治疗,虽有一定疗效,但患者病情易反复,且肿瘤有一定侵袭性,因此其 5 年生存率较低^[1]。现阶段探究多发性骨髓瘤新型致病基因及其相关发病机制有一定积极作用,有学者研究表明多发性骨髓瘤发病与血管新生有关^[2],其发生、发展和髓外浸润以及相关细胞信号传导通路失活等紧密相关,而不少基因的高表达或某些特定基因的低表达可能与多发性骨髓瘤发生有一定关联^[3]。已有研究表明,血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶等细胞因子在多发性骨髓瘤发生、发展中有一定作用,均有促进血管新生的作用,而国外一项文献报告则表明同源异型盒基因 B7(HOXB7)可特异性诱导上述细胞因子分泌,抑制内皮细胞凋亡,促进肿瘤血管生成和肿瘤生长、转移等^[4],但目前有关 HOXB7 与多发性骨髓瘤发生发展关系的研究并不多见,因而本文展开临床对照性研究,结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 2 月至 2017 年 2 月本院收治的 120 例多发性骨髓瘤患者(病例组)和同期在本院体检的 35 名志愿者(健康组)为研究对象,病例组纳入标准:(1)患者符合《血液病诊断和疗效标准》^[5]有关多发性骨髓瘤的诊断标准;(2)患者入院后采用骨髓形态或流式细胞术检查证实;(3)患者及其家属均自愿签署本研究知情同意书,并获得本院伦理委员会批准同意。病例组排除标准:(1)排除合并严重心、肝、肾等重要脏器功能障碍;(2)排除妊娠期及哺乳期女性;(3)纳入研究前接受过放化疗药物治疗者。对照组纳入、排除标准:(1)纳入既往无多发性骨髓瘤疾病史;(2)排除良恶性肿瘤者;(3)排除既往有其他血液疾病史者。病例组 120 例,其中男 65 例,女 55 例,年龄 38~70 岁,平均(52.36±3.61)岁,根据 Durie-Salmon 分期:I、II、III 期各 30、35、55 例;对照组 35 名,其中男 19 例,女 16 例,年龄 40~68 岁,平均(53.68±4.03)岁。两组上述性别、年龄基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。

1.2 仪器与试剂 Ficoll 分离液(由天津市灏洋生物制品科技有限责任公司提供),日本 TaKaRa 公司提供的 TRIzol 试剂盒以及反转录试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司提供的荧光定量 PCR 试剂盒,美国 BD 公司提供的流式细胞术抗体、FACS 溶血素、鞘液、破膜液,小鼠抗人 HOXB7 单克隆抗体(英国 abcam 公司)、Bio-Swamp 酶(武汉茵莱生物科技有限

公司);美国 GE 公司生产的 NanoVue plus 超微量分光光度仪(产品),7500 Fast Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司产品),FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司产品)。

1.3 方法 (1)骨髓单个核细胞悬液制备:在患者和正常对照个体髂后上棘抽出 4 mL 骨髓液,肝素钠常规抗凝后,3 倍骨髓液体积的 PBS 液稀释混匀,稀释骨髓液缓慢加到淋巴细胞分离液中,梯度分离,离心完毕后,将单个核细胞层吸至新的离心管内(加入 PBS 溶液 5 mL),混匀离心后重复洗涤多次,后计数。(2)原代骨髓瘤细胞分离纯化和培养:患者髂后上棘抽出骨髓液 4 mL,肝素钠生理盐水(1 200 U/mL)抗凝,3 倍骨髓液体积的 PBS/EDTA 缓冲液稀释,混匀,将稀释后骨髓液缓慢加至淋巴细胞分离液(骨髓液:淋巴细胞分离液为 1:1)上,梯度离心,400 g,30~40 min,20 °C,将单个核细胞层移至新的无菌离心管中,加入 5 mL 的 PBS/EDTA 缓冲液,混匀后离心,重复洗涤两次,重悬细胞沉淀,计数。(3)实时荧光定量 PCR。采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,RNA 定量:采用 260 nm 波长分光光度计测定 RNA 浓度, $C_{RNA}(\mu\text{g}/\text{mL})=40 \times OD_{260} \text{D 读数} \times n/1\ 000$, n 表示稀释倍数,按照反转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA,放置 -20 °C 冰箱备用,以 cDNA 为模板,以管家基因 GAPDH 为内参,对 HOXB7 基因进行荧光定量 PCR 扩增,反应条件设为:95 °C 预变性 10 min,后 95 °C 变性 15 s,60 °C 退火延伸 1 min,如此重复 40 个循环,所有样本做 3 个平行孔循环数则取其平均值;HOXB7 mRNA 相对表达量以 ΔCt 表示($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$),上海生工生物技术有限公司提供引物,所有操作严格按照说明书进行。(4)Western blot 分析,采用康成蛋白提取试剂盒对细胞蛋白进行提取,主要包含标本处理、制胶、上样、电泳、染胶、脱色等操作,所有操作严格按照说明书进行。

1.3 观察指标 (1)两组研究对象 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平表达情况;(2)病例组各亚组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平表达情况,依据 Durie-Salmon 分期将患者分为 I、II、III 期组各 30、35、55 例,比较 3 组 HOXB7 mRNA 及其蛋白表达水平;(3)HOXB7 mRNA 及其蛋白在伴有髓外浸润多发性骨髓瘤患者中表达情况,120 例患者依据是否出现髓外浸润分为浸润组($n=82$)和未浸润组($n=38$),比较两组 HOXB7 mRNA 及其蛋白表达情况。(4)HOXB7 与多发性骨髓瘤患者临床分期、髓外浸润情况的关系分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件处理数据,计数资料以率表示,采取 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,行 *t* 检验,多组间计量资料比较采用单因素方差分析(*F* 检验),采用 Pearson 相关系数进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组研究对象 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平表达情况 病例组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组研究对象 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	HOXB7 mRNA	HOXB7 蛋白
病例组($n=120$)	0.462±0.142	0.269±0.123
对照组($n=35$)	0.178±0.060	0.076±0.025
<i>t</i>	11.515	9.207
<i>P</i>	0.000	0.000

2.2 病例组各亚组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平表达情况 III 期组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平明显高于 I 期组、II 期组,差异有统计学意义($P < 0.05$);且 II 期组也明显高于 I 期组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 病例组各亚组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	HOXB7 mRNA	HOXB7 蛋白
I 期组($n=30$)	0.242±0.082	0.162±0.038
II 期组($n=35$)	0.325±0.101 ^a	0.226±0.058 ^a
III 期组($n=55$)	0.529±0.153 ^{ab}	0.318±0.112 ^{ab}
<i>F</i>	60.266	35.525
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与 I 期组比较,^a $P < 0.05$;与 II 期组比较,^b $P < 0.05$

2.3 HOXB7 mRNA 及其蛋白在伴有髓外浸润多发性骨髓瘤患者中表达情况 伴有髓外浸润多发性骨髓瘤患者 HOXB7 mRNA 及 HOXB7 蛋白明显高于无髓外浸润多发性骨髓瘤患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 HOXB7 mRNA 及其蛋白在伴有髓外浸润多发性骨髓瘤患者中表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	HOXB7 mRNA	HOXB7 蛋白
浸润组($n=82$)	0.532±0.112	0.388±0.051
未浸润组($n=38$)	0.318±0.101	0.265±0.082
<i>t</i>	10.035	10.044
<i>P</i>	0.000	0.000

2.4 HOXB7 与多发性骨髓瘤患者临床分期、髓外浸润情况的关系分析 相关性分析结果提示,多发性骨髓瘤患者临床分期和伴有髓外浸润与 HOXB7 表达水平呈正相关($r=0.352, 0.298, P < 0.05$),但其与患者性别、年龄等无明显相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

多发性骨髓瘤为临床常见血液系统恶性肿瘤,以骨髓瘤细胞在患者骨髓组织内恶性增殖、骨骼组织出

现溶骨性破坏、分泌大量单株免疫球蛋白为主要病理特点,中重度贫血、骨骼疼痛和脏器功能衰竭等为主要临床表现,对患者生活质量造成严重影响^[6]。既往文献报告表明多发性骨髓瘤患者早期经过合理治疗后,约有一半患者的受损肾功能得以有效恢复^[7],因此,早期准确诊断多发性骨髓瘤对提高其临床疗效、改善其预后尤为重要。临床上有关细胞因子在多发性骨髓瘤疾病发生进展中作用的相关研究早已涉及,近期有学者研究发现,HOXB7 基因在多种实体瘤发生和发展中发挥重要作用,如早期一项文献报告指出在乳腺癌和结肠癌、卵巢癌等实体瘤中 HOXB7 基因表达异常增高^[8],初步表明 HOXB7 基因的表达影响着癌细胞生长增殖等,其在肿瘤形成中作用显著。

国外学者研究表明,HOX 基因作为正性及负性转录因子,在调控胚胎细胞增殖及分化中发挥重要作用,其主要位于不同染色体特定区域的基因,可调节癌细胞增殖及分化^[9];然而现阶段临床有关 HOXB7 基因在多发性骨髓瘤疾病发生和发展中作用的研究较少,为此本文展开临床的对照性研究。本研究发现,病例组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平高于对照组,III 期组 HOXB7 mRNA 及其蛋白水平高于 I 期组、II 期组,II 期组相比 I 期组也明显较高,且浸润组 HOXB7 mRNA 及 HOXB7 蛋白高于未浸润组,此外多发性骨髓瘤患者临床分期和伴有髓外浸润与 HOXB7 表达水平呈正相关,初步证实了 HOXB7 基因在多发性骨髓瘤疾病发生和进展中发挥重要作用,这与既往李燕^[10]研究的观点相符。HOXB7 基因在多发性骨髓瘤中存在高表达,一旦 HOXB7 基因出现高表达,可致机体细胞发生转化或使机体细胞在生长期出现形态异常,最终诱导肿瘤发生和进展^[11],因而随着多发性骨髓瘤分期增加患者 HOXB7 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高,表明 HOXB7 基因在多发性骨髓瘤疾病进展中作用显著;HOXB7 基因可特异性诱导成纤维生长因子血管内皮生长因子等血管生长因子表达上调,并有效抑制内皮细胞凋亡,促进肿瘤血管生成和肿瘤生成及转移^[12],而多发性骨髓瘤属于一种复杂病理过程^[13],研究中通过测定不同疾病分期和是否存在髓外浸润等情况下患者 HOXB7 蛋白和 mRNA 表达水平,有利于评估 HOXB7 基因是否参与了多发性骨髓瘤疾病进展以及髓外浸润过程。本研究结果提示,多发性骨髓瘤患者临床分期和伴有髓外浸润与 HOXB7 表达水平呈正相关,因此可考虑 HOXB7 基因参与了多发性骨髓瘤发生、发展和浸润,并且其影响着多发性骨髓瘤疾病进展。

4 结论

HOXB7 基因和蛋白在多发性骨髓瘤患者中存在明显上调现象,其表达水平上调在多发性骨髓瘤病灶发生进展等病理中起到重要作用,为临床展开新型靶向药物研究提供理论依据。(下转第 2766 页)

- 2016,16(11):2120-2122.
- [2] 吴琼蔚,谢晖亮,马成斌,等. 宫腔粘连 767 例临床分析[J]. 实用妇产科杂志,2014,30(5):354-357.
- [3] CHEN Y, LIU L, LUO Y, et al. Prevalence and impact of chronic endometritis in patients with intrauterine adhesions; a prospective cohort study[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2017, 24(1):74-79.
- [4] 邓谋,朱兰. 子宫内膜的再生及宫腔粘连干细胞修复的研究进展[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(3):6-8.
- [5] 戚亚琴,王素敏. 宫腔粘连发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(5):932-935.
- [6] POST A, PANNEKOEK W J, PONSIOEN B, et al. Rap1 spatially controls ArhGAP29 to inhibit Rho signaling during endothelial barrier regulation[J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(14):2495-2502.
- [7] 何英新,唐彩霞,刘珏,等. 人工周期对宫腔粘连患者子宫内膜中 MMP-9 和 TGF- β 1 表达的影响[J]. 重庆医学, 2014, 43(2):167-169.
- [8] 中华医学会妇产科学分会. 宫腔粘连临床诊疗中国专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(12):881-887.
- [9] NOEL N L, ISAACSON K B. Review of outcomes of patients treated for intrauterine adhesions with office hysteroscopy and hormone replacement therapy[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2015, 22(6S):S184-185.
- [10] 周曼萍,何援利,乔琳,等. 转化生长因子- β 1 及 Smad2/3 在宫腔粘连患者子宫内膜组织中的表达及意义[J]. 广东医学, 2014, 35(12):1844-1846.
- [11] PAPAPOPOULOU M, PAPAOKI H, ZOLOTA V, et al. Immunohistochemical profiles of LOXL-1, FBN1, TGF- β 1 and COX-2 in pseudoexfoliation syndrome[J]. Curr Eye Res, 2017, 42(6):880-889.
- [12] 茹晓莉,段华,王永军,等. 宫腔粘连发生和预后的相关因素研究[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(29):5712-5715.
- [13] PAUL B J, PALMER K, SHARP J C, et al. ARHGAP29 mutation is associated with abnormal oral epithelial adhesions[J]. J Dent Res, 2017, 96(11, SI):1298-1305.
- [14] XU Q, DUAN H, GAN L, et al. MicroRNA-1291 promotes endometrial fibrosis by regulating the ArhGAP29-RhoA/ROCK1 signaling pathway in a murine model[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4):4501-4510.
- [15] 白羽,郑毅. 赖氨酰氧化酶样蛋白-2 在肺纤维化小鼠中的表达及意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2015, 19(9):606-610.
- [16] LI J, DU S, SHENG X, et al. MicroRNA-29b inhibits endometrial fibrosis by regulating the Sp1-TGF- β 1/Smad-CTGF axis in a rat model[J]. Reprod Sci, 2016, 23(3):386-394.

(收稿日期:2018-04-16 修回日期:2018-07-06)

(上接第 2761 页)

参考文献

- [1] 段丽娟,李超,杨如玉. 多发性骨髓瘤患者血清 β 2-微球蛋白、TNF- α 、CRP 及 IL-6 水平检测[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(5):1362-1365.
- [2] 张莉,张萍,陈江华. 多发性骨髓瘤血液透析患者的临床特点及预后分析[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(8):592-597.
- [3] 刘文华,马艳萍. 多发性骨髓瘤细胞中胰岛素样生长因子结合蛋白 7 的基因表达及甲基化调控[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(3):813-817.
- [4] ERRICO M C, JIN K, SUKUMAR S, et al. The widening sphere of influence of HOXB7 in solid tumors[J]. Cancer Res, 2016, 76(10):2857-2862.
- [5] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2007:232-234.
- [6] RAJKUMAR S V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. Am J Hematol, 2016, 91(7):719-734.
- [7] 夏祖耀,杨惠娟,陈宝安. 多发性骨髓瘤骨病治疗研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1):275-278.
- [8] KIS O, KAEDBEY R, CHOW S, et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates[J]. Nat Commun, 2017(8):15086.
- [9] MITCHELL J S, LI N, WEINHOLD N, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma [J]. Nat Commun, 2016(7):12050.
- [10] 李燕. 转录因子 HOXB7 对多发性骨髓瘤发生、发展的影响及其机制的研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2017.
- [11] NGUYEN KOVOCHICH A, ARENSMAN M, LAY A R, et al. HOXB7 promotes invasion and predicts survival in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer, 2013, 119(3):529-539.
- [12] LIU S, JIN K, HUI Y, et al. HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGF β signaling pathway [J]. Cancer Res, 2015, 75(4):709-719.
- [13] 彭晶,袁瑞丽,王晓琴,等. 多发性骨髓瘤患者外周血清中 microRNA-181a 和 microRNA-20a 表达水平的检测及其临床意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(3):625-630.
- [14] STORTI P, DONOFRIO G, COLLA S, et al. HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients [J]. Leukemia, 2011, 25(3):527-537.

(收稿日期:2018-04-12 修回日期:2018-07-02)