

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR



论文题目: LILRB4 在多发性骨髓瘤演变中的作用

学生姓名: 郑邓昊

学生学号: 516760910036

专 业: 生物医学科学 (致远荣誉计划)

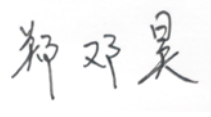
指导教师: 郑俊克

学院(系): 医学院

上海交通大学

毕业设计（论文）学术诚信声明

本人郑重声明：所呈交的毕业设计（论文），是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 

日期： 2020 年 5 月 28 日

上海交通大学 毕业设计（论文）版权使用授权书

本毕业设计（论文）作者同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权上海交通大学可以将本毕业设计（论文）的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本毕业设计（论文）。

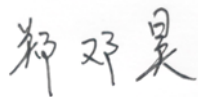
保密 ☒，在 5 年解密后适用本授权书。

本论文属于

不保密 ☐。

（请在以上方框内打“√”）

作者签名：



指导教师签名：



日期：2020 年 5 月 28 日

日期：2020 年 5 月 28 日

LILRB4 在多发性骨髓瘤演变中的作用

摘要

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM), 是一种由浆细胞恶性增殖所导致的血液系统肿瘤, 常引起患者正常造血和成骨分化的受损。同时, 由于骨髓瘤细胞大量分泌的 M 蛋白会在肾脏累积, 从而使得患者出现与肾功能受损有关的体征。因此, 多发性骨髓瘤是一种器官广泛受累且发病较为凶险的血液系统肿瘤。白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B (Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B, LILRB), 是白细胞免疫球蛋白样受体 (LIR) 家族的一个亚群, 其由细胞外免疫球蛋白结构域, 跨膜结构域以及基于细胞质免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 构成。课题组前期研究发现白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4 (LILRB4) 对于急性髓系细胞白血病的发生发展有着重要的作用, 从而提示 LILRB4 可能是血液系统相关恶性肿瘤的潜在治疗靶点之一。本文从 LILRB4 入手, 运用基因敲低、流式细胞术等技术, 发现 LILRB4 对 MM 细胞的增殖和克隆形成能力具有很强的促进作用; 敲低 LILRB4 可以显著降低 G2/M 期细胞的占比并促进 MM 细胞的凋亡。机制上, LILRB4 可通过调控含 SH2 结构域的酪氨酸蛋白磷酸酶 (SHP2) 的磷酸化和钙调素蛋白激酶 (CaMK) 的表达水平来控制环磷腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) 的磷酸化, 进而促进 MM 的发生发展。这些结果提示 LILRB4 有望成为多发性骨髓瘤的新治疗靶点并提供了重要理论支持。

关键词: 多发性骨髓瘤, 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4, 免疫抑制性受体, 含 SH2 结构域的酪氨酸蛋白磷酸酶, 环磷腺苷效应元件结合蛋白

THE ROLE OF LILRB4 IN THE DEVELOPMENT OF MULTIPLE MYELOMA

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a hematological tumor originated from the malignant proliferation of plasma cells, which can further leads to the impairment of the normal hematopoietic function and osteogenic differentiation. Meanwhile, the large amount of M proteins that are secreted by multiple myeloma cells is often accumulated in the kidneys and impaires renal function in patients. Therefore, multiple myeloma is an aggressive hematological tumor with extensive organ damage. Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B (LILRB), a subgroup of the leukocyte immunoglobulin-like receptor family (LIR), contains the extracellular immunoglobulin domains, transmembrane domains, and cytoplasmic immune receptor tyrosine-based inhibition Motif (ITIM). As reported in our previous study, leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily member B4 (LILRB4) prompts the development of acute myeloid leukemia, which suggests that LILRB4 might be a potential therapeutic target for hematological tumors. In this project, we used serveral techniques, including gene knockdown and flow cytometry analysis to evaluate the role of LILRB4 in MM development and demonstrated that LILRB4 promoted the proliferation and colony formation of MM cells. Knockdown of LILRB4 in human MM cell lines significantly reduced the frequency of G2/M phase cells and enhanced the apoptosis of MM cells. Mechanistically, LILRB4 mantained the phosphorylation of CREB by regulating the phosphorylation of SHP2 and the expression level of CaMK, thereby promoting the development of MM. These results provide several lines of evidence in supporting that LILRB4 may serve as a new therapeutic target for multiple myeloma.

Key words: Multiple myeloma, leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily member B4, immune inhibitory receptor, SHP2, CREB

目 录

第一章 绪论	1
1.1 多发性骨髓瘤研究现状	1
1.1.1 多发性骨髓瘤的病因及发病机制	1
1.1.2 多发性骨髓瘤的临床表现	2
1.1.3 多发性骨髓瘤目前的治疗方法及其局限	2
1.2 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 研究现状	3
1.2.1 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 研究现状	3
1.2.2 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4 与多发性骨髓瘤间的关系	4
1.3 本研究的目的和意义以及实验基础	4
1.3.1 研究目的和意义	4
1.3.2 研究的实验基础	4
1.4 本章小结	4
第二章 材料与方法	5
2.1 实验材料	5
2.1.1 实验细胞系	5
2.1.2 实验试剂	5
2.1.3 实验仪器	6
2.1.4 实验分析软件	6
2.2 实验方法	6
2.2.1 细胞培养	6
2.2.2 LILRB4 的 shRNA 质粒构建	7
2.2.3 慢病毒包装与感染	8
2.2.4 流式细胞术检测 LILRB4 的表达	8
2.2.5 细胞生长曲线实验	8
2.2.6 细胞周期分析	8
2.2.7 细胞凋亡分析	9
2.2.8 细胞吉姆萨染色实验	9
2.2.9 细胞克隆形成实验(CFU)	9
2.2.10 蛋白印迹实验	9
2.2.11 信号通路分析	10
2.2.12 统计分析	10
第三章 实验结果	11
3.1 LILRB 家族在多发性骨髓瘤患者中的表达情况及临床关系	11
3.2 LILRB 家族在多发性骨髓瘤细胞系中表达情况	12
3.3 LILRB4 敲低细胞系的建立与验证	13
3.3.1 shRNA 工作原理	14
3.3.2 LILRB4 的敲低细胞系建立与验证	14
3.4 LILRB4 敲低对多发性骨髓瘤细胞的影响	17
3.4.1 LILRB4 调控多发性骨髓瘤细胞的生长	17
3.4.2 LILRB4 影响多发性骨髓瘤的恶性克隆形成能力	19

3.4.3 LILRB4 的敲低诱导多发性骨髓瘤细胞的凋亡-----	22
3.5 LILRB4 调控多发性骨髓瘤发生发展的信号通路研究-----	24
3.5.1 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中的调控通路分析-----	24
3.5.2 LILRB4 对于 CaMK 通路的影响-----	25
3.6 本章小结-----	27
第四章 讨论-----	28
第五章 结论-----	31
参考文献-----	32
谢辞-----	38

第一章 绪论

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种由浆细胞恶性增殖所导致的血液系统肿瘤^[1], 常引起患者正常造血和成骨分化的受损。同时, 由于骨髓瘤细胞大量分泌的 M 蛋白会在肾脏累积, 从而使得患者出现与肾功能受损有关的体征^[2]。流行病学调查显示, 多发性骨髓瘤发病率占有恶性肿瘤的 1%, 约占有血液系统恶性肿瘤的 10%。在美国, 每年诊断出超过 30,000 例 MM 新病例, 超过 12,000 例患者死于该病, 显示出 MM 的凶险性^[3]。

白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B (LILRB), 是白细胞免疫球蛋白样受体 (LIR) 家族的一个亚群, 其由细胞外免疫球蛋白结构域, 跨膜结构域以及基于细胞质免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 构成。该受体在免疫细胞上表达, 并与抗原呈递细胞上的主要组织相容性复合体 I 类分子 (MHC I) 结合, 从而抑制免疫反应刺激信号^[4]。然而目前, 对于白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B (LILRB) 在多发性骨髓瘤发生发展中的作用却少有研究。

1.1 多发性骨髓瘤研究现状

1.1.1 多发性骨髓瘤的病因及发病机制

(1) 病因

MM 的病因目前知之甚少, 主流学说认为环境因素、遗传易感性、慢性炎症可能是其病因^[5]。在纪念斯隆-凯特琳癌症中心的一项对于 781 位“9·11”事件中参与应急救援的消防员的外周血检测中, 出现意义不明的单克隆免疫球蛋白血症的人数相较于普通人群高出了 1.8 倍, 提示环境因素作为 MM 病因的可能性^[6]。对于遗传易感性, 在 2018 年的一项研究中, 通过分析大约 10,000 名 MM 患者和 200,000 多名健康人的样本, 一共鉴定出 23 种与 MM 相关的单核苷酸多态性 (SNP)^[7]。此外, 有研究证实 MM 患者的后代罹患该病的风险增加了约一倍^[8]。关于慢性炎症, 在对戈谢病 (又称高雪氏病, Gaucher's disease) 继发 MM 的患者研究中发现, 这些患者体内的溶血脂由于戈谢病而过多, 从而导致产生大量与溶血脂结合的单克隆抗体造成长期的慢性炎症, 继而诱发 MM^[9]。而在对于爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV) 的相关研究中, 也发现了病毒感染诱发慢性炎症从而导致 MM 的现象^[10]。这些研究表明慢性炎症可能是 MM 的病因之一^[11]。

(2) 发病机制

现有的研究表明 MM 的发病机制与 B 细胞成熟期间的基因变化和肿瘤微环境的改变都有着千丝万缕的关系。在一部分的 MM 患者中, 其肿瘤细胞染色体是超二倍体组; 还有一部分患者则会出现染色体易位的情况, 且易位大多涉及 14 号染色体上编码抗体重链的部分。相关易位会造成位于另一条染色体 (例如 4 号、11 号或 16 号染色体) 的基因元件整合至编码部分前面, 将其激活, 最终在“二次打击”作用下造成浆细胞开始不受控增殖, 导致 MM^[12]。此外, 分子生物学研究表明, 肿瘤抑制基因 TP53 常在侵袭性的 MM 中完全失活, 这提示肿瘤抑制基因的失活对于 MM 的进展快慢和恶性程度也起到一定的调控作用^[13]。而对于癌基因改变, 例如 C-MYC 异常上调, 有研究显示其也与 MM 的疾病发生和进展相关^[14]。因此, 多发性骨髓瘤在基因层面的发病机制复杂且多样化, 甚至在患者疾病进展过程中, 不同的克隆之间也存在差异^[15]。

此外, MM 的发生发展与肿瘤微环境也密切相关。MM 细胞几乎仅在骨髓内生长和扩增, 因此提示骨髓微环境在支持 MM 细胞生长和存活中的重要性^[16]。值得注意的是, MM 骨髓微环境中间充质细胞和破骨细胞的占比同正常骨髓微环境相比发生了明显改变, 特别

是间充质细胞数量的增加与诊断时的浆细胞负荷密切相关^[17]。进一步的研究发现间充质基质细胞群表达更高水平的白介素 6 (IL-6) 来增强血管内皮生长因子 (VEGF) 的产生^[17], 还表达更多的生长分化因子 15 (GDF15) 来增强了 MM 细胞的自我更新^[18], 这些因子对于骨髓微环境的改造帮助了 MM 的发展。此外, 有研究表明, 基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) /趋化因子受体 4 (CXCR4) 轴对于骨髓微环境中的 MM 细胞的黏附也至关重要^[19]。而在对于 MM 骨髓微环境破骨细胞的研究中发现, MM 细胞分泌核因子 κ B 配体 (RANKL) 导致破骨细胞通过 NF κ B 途径活化, 导致骨吸收和骨形成之间的失衡, 从而破坏骨髓微环境^[20]。

综上, 多发性骨髓瘤的发病机制复杂且多样化, 其不仅与基因层面的各种复杂改变息息相关, 更与其所在的骨髓微环境有着复杂的联系, 这也造成了目前难以找到高效治疗方法和特异性治疗靶点的窘境。

1.1.2 多发性骨髓瘤的临床表现

MM 患者的主要临床表现为骨损伤、肾损害、感染易感性、贫血等^[21]。根据我国的临床资料显示, MM 伴骨痛为主要症状的患者约占 MM 患者总数的 70%, 且严重者会出现自发性骨折^[22]。此外, 约 15% 的患者会并发浆细胞瘤, 通常集中在头、胸骨、锁骨等处, 这些浆细胞瘤会浸润骨周围组织, 造成进一步的骨损伤^{[23][24]}。

此外, 由于 MM 细胞会大量分泌 M 蛋白, 这些蛋白在肾脏的沉积一方面会直接导致对肾小管的毒性作用, 另一方面这些 M 蛋白会造成肾小管内管型形成, 从而导致巨噬细胞炎症反应以及肾脏淀粉样变, 严重者甚至可导致骨髓瘤肾病^[25]。另外有报道指出, 国内 MM 患者院内感染发生率约为 27.87%, 感染部位以呼吸道最多, 其次为消化道和泌尿道, 提示 MM 患者具有感染易感性。这一方面是由于浆细胞的异常克隆导致 B 细胞的增殖和分化异常所致, 另一方面也和 CD4⁺/CD8⁺细胞比值下降有关^{[24][25]}。

最后, 根据北大医学部的一项研究显示, MM 患者体力和精神状态与贫血程度呈正相关, 而造成贫血的原因和肾功能衰退、骨髓受侵等相关; 而 M 蛋白聚集的凝血因子和纤维蛋白原等会引发凝血障碍导致出血, 进一步加重患者贫血^[24]。

综上所述, MM 患者的临床损害主要表现在骨损伤、肾损害、感染易感性、贫血等多方面, 且这些临床损害给患者带来了极大的痛苦。因此, 寻找新的、高效的、降低患者痛苦的 MM 治疗靶点迫在眉睫。

1.1.3 多发性骨髓瘤目前的治疗方法及其局限

目前, MM 处于难以治愈的状态, 且复发患者异质性较大^[21]; MM 的治疗方法主要为三种: 传统化疗、骨髓移植和免疫治疗^[21]。其中, 免疫治疗对于 MM 患者的治疗产生了相对积极的结果^[26]。例如, B 细胞成熟抗原 (BCMA) 抗体 MMAF (GSK2857916) 直接诱导 MM 细胞细胞周期的 G2/M 阻滞, 随后发生凋亡^[27]; 二代蛋白酶体抑制剂卡非佐米 (carfilzomib, CFZ), 来那度胺 (lenalidomide, LEN) 和地塞米松联合用药也在临床三期实验中取得了不错的疗效^[28]。然而, 尽管免疫治疗的出现延缓了疾病进展并延长了患者生存期, 但由于 MM 容易出现耐药克隆导致患者经常难治、复发, 造成目前 MM 患者大多数仍然无法治愈^[29], 即 10 至 15 年的无复发率仅有约 10-15%^[30]。此外, 对于使用免疫疗法治疗 MM, 目前也出现了相关副作用和干扰临床诊断测试的报告。例如, 在一项小范围研究中, 发现 CD38 单抗达雷妥尤 (daratumumab) 会干扰多参数流式细胞术对骨髓穿刺结果的分析与评估^[31]; 而 LEN 也被发现会导致 MM 患者发生较为严重的静脉血栓形成。因此, 寻找新的潜在治疗靶点以及探索相关靶点的调控机制就显得尤为重要。

1.2 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 研究现状

1.2.1 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 研究现状

白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B (LILRB)，是白细胞免疫球蛋白样受体 (LIR) 家族的成员，其结构由细胞外免疫球蛋白结构域，跨膜结构域以及细胞质免疫受体酪氨酸的抑制序列 (ITIM) 构成。该受体常在免疫细胞上表达，并与抗原呈递细胞上的主要组织相容性复合体 I 类分子 (MHC I) 结合，从而抑制免疫反应刺激信号^{[32][33]}。然而，随着近些年对于 LILRB 家族功能探究的深入，有研究提示 LILRB 的胞内段 ITIM 序列在某些情况下能够产生免疫激活作用，且与 337、389 和 419 处的酪氨酸 (Tyr) 残基突变及其在 ITIM 结构中的位置相关^[34]。

目前，LILRB 与肿瘤相关的研究中也取得了一定的进展。在一项与肺癌发生发展相关性的研究中，血管生成素样蛋白 2 (angiopoietin like protein 2, ANGPTL2) 通过与白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 2 (LILRB2) 结合来招募 LILRB2 下游的含 SH2 结构域的酪氨酸蛋白磷酸酶 (SHP2) 从而促进了肺癌的发生与发展^[35]。此外，白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4 (LILRB4) 对于急性髓系细胞白血病的发生发展有着重要的作用^[36]，从而提示 LILRB 成员可能是血液系统相关恶性肿瘤的潜在治疗靶点之一。值得注意的是，根据 TCGA 的数据显示，LILRB4 在多种恶性肿瘤中的表达量均明显上升 (图 1)，体现了 LILRB 家族的功能可能不仅限于免疫抑制，更可能在肿瘤发生发展中具有重要作用。

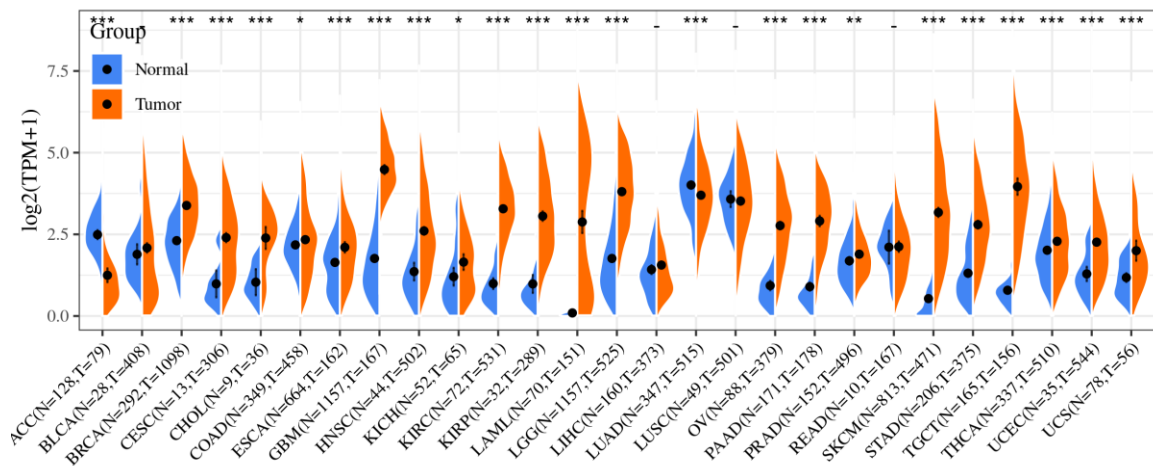


图 1: LILRB4 在不同肿瘤组织中的表达情况 (数据来源 TCGA)

Figure 1: The expression of LILRB4 in different tumors (From TCGA)

ACC: 肾上腺皮质癌, BLCA: 膀胱尿路上皮癌, BRCA: 乳腺浸润癌, CESC: 宫颈鳞状细胞癌和宫颈内膜腺癌, CHOL: 胆管癌, COAD: 结肠腺癌, ESCA: 食道癌, GBM: 胶质母细胞瘤, HNSC: 头颈部鳞状细胞癌, KICH: 肾嫌色细胞癌, KIRC: 肾脏肾透明细胞癌, KIRP: 肾肾乳头状细胞癌, LAML: 急性髓系细胞白血病, LGG: 脑低级别胶质瘤, LIHC: 肝细胞肝癌, LUAD: 肺腺癌, LUSC: 肺鳞状细胞癌, OV: 卵巢浆液性囊腺癌, PAAD: 胰腺癌, PRAD: 前列腺癌, READ: 直肠腺癌, SKCM: 皮肤黑色素瘤, STAD: 胃腺癌, TGCT: 睾丸癌, THCA: 甲状腺癌, UCEC: 子宫内膜癌, USC: 子宫肉瘤。

1.2.2 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4 与多发性骨髓瘤间的关系

MM 的发病机制与 B 细胞成熟期间的基因变化有着密切的关系^[15]。在正常情况下, LILRB1 在 B 细胞中稳定表达, 而 LILRB4 在 B 细胞亚群中表达水平较低^[37]。然而, LILRB4 在抗体异常分泌的浆细胞上的表达量相较于正常浆细胞显著升高, 而 LILRB1 则没有明显差异^[38], 这提示 LILRB4 的异常表达与 B 细胞的异常发育之间可能存在着联系。此外, 当 MM 细胞与骨髓基质细胞共培养时, LILRB4 在 MM 细胞上的表达量会升高^[39], 提示 LILRB4 在 MM 细胞与骨髓基质细胞的相互作用中发挥一定作用。值得关注的是, 在多发性骨髓瘤研究基金会 (MMRF) 牵头的一项研究中^[40], KRAS、BRAF、BCLAF1、NOTCH2、DMD、PALLD、COL11A1、NRAS、TP53 这九个基因拷贝数的异常在 MM 患者中最为常见, 且其中的 BRAF 所在的 MAPK 通路会直接受到 LILRB4 的调控^[41]。

综上, 现有的各项研究表明 LILRB4 与 MM 的发生发展有着千丝万缕的关系, 其不仅可能直接参与疾病的进展, 还可能介导 MM 细胞与骨髓微环境的互作。因此, 研究 LILRB4 在 MM 发生发展中的作用并解析其机制, 可为探索 MM 的发病机制提供新的依据, 并可能为治疗 MM 提供新的靶点。

1.3 本研究的目的和意义以及实验基础

1.3.1 研究目的和意义

由于 MM 发病机制的复杂性和多样化, 现有治疗手段的局限性以及治疗后极易复发的情况, 寻找潜在新的治疗靶点并明晰相关病理生理机制就成为了一项迫在眉睫的工作。目前, 随着有关研究的深入, LILRB4 作为血液系统相关恶性肿瘤的潜在治疗靶点进入了研究视野。然而, LILRB4 在 MM 中的表达、功能和作用却鲜有研究和报道。因此, 本研究运用基因敲低技术构建了 LILRB4 敲低的 MM 细胞系, 阐述 LILRB4 在 MM 发生发展中的作用, 为探究 MM 的发病机制以及探索 MM 新的治疗靶点提供依据和理论支持。

1.3.2 研究的实验基础

在课题组前期的研究中, LILRB4 在急性髓系细胞白血病发生发展中的作用已经得到了阐释^[36], 且该研究提示了 LILRB4 可能是血液系统相关恶性肿瘤的潜在治疗靶点之一。此外, 通过进一步的预实验, 我们发现在 MM 细胞系 RPMI8226 和 ARP-1 等中 LILRB 成员 LILRB1 和 LILRB4 均有表达, 表明 LILRB 家族可能在 MM 发生发展中发挥作用, 为本研究奠定了基础。

1.4 本章小结

MM 作为一种难以治愈的浆细胞恶性增殖所导致的血液系统肿瘤, 其复杂的病因和发病机制使得现有治疗手段疗效不佳, 患者预后不良且容易复发。而 LILRB4 在急性髓系细胞白血病中作为治疗靶点的潜力已经显现, 且课题组前期研究发现 LILRB4 在多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226 和 ARP-1 中表达较高。因此, 探究 LILRB4 在 MM 发生发展中的作用, 可解析 MM 的发病机制, 并为探索 MM 的新治疗靶点提供理论支持。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验细胞系

表2-1 实验细胞系

名称	细胞背景	来源
293T	人肾上皮细胞系	ATCC
RPMI8226	人多发性骨髓瘤细胞系(IgG 型)	ATCC
ARP-1	人多发性骨髓瘤细胞系(IgA 型)	ATCC

2.1.2 实验试剂

表2-2 实验试剂

名称	公司	货号
DMEM 细胞培养液	上海源培生物	L110KJ
1640 细胞培养液	上海源培生物	L210KJ
胎牛血清(FBS)	依科赛	FSP500
细胞培养用双抗	上海源培生物	S110JV
磷酸盐缓冲液(PBS), pH7.4	上海源培生物	B320KJ
胰酶消化液	上海源培生物	S310JV
LILRB4-APC 流式抗体	eBioscience	17-5139-42
细胞凋亡检测试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司	40302ES60
10×Cutsmart buffer	NEB	B7204S
EcoR I-HF 内切酶	NEB	R3101L
Age I-HF 内切酶	NEB	R3552L
10×H buffer	NEB	M0523S
10×T4 buffer	Takara	2011A
T4 连接酶	Takara	2011A
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	生工	A501492-0500
十二烷基磺酸钠 (SDS)	Amresco	0227-1KG
甘氨酸	生工	A610235-0500
牛血清蛋白组份五	上海湘鸿生物技术有限公司	HR016-2
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	GE	10600002
脱脂奶粉	上海翊圣生物科技有限公司	36120ES76
SHP2 抗体(1: 1000)	Abways	CY5751
p-SHP2 抗体(1: 1000)	Abways	CY5639
CREB 抗体(1: 2000)	Abways	CY5426
p-CREB 抗体(1: 2000)	Abways	CY5043
CaMK1 抗体(1: 2000)	Abcam	2331-1
GAPDH-HRP 抗体(1: 5000)	Abways	AB2000
显影液	Millipore	WBKLS0500

2.1.3 实验仪器

表2-3 实验仪器

名称	公司	型号
普通冰箱	海尔	HYC-360
超低温冰箱	Thermo Scientific	Forma 900 series
二氧化碳培养箱	Thermo Scientific	HERAcell 240i
漩涡振荡仪	Scientific industries	Vortex-Genie 2
NanoDrop 紫外分光光度计	NanoDrop	ND-2000
细胞超净台	Thermo Scientific	1300 series A2
精密电子天平	Sartorius	BS 124S
流式细胞仪	BD	Fortessa
流式细胞仪	Beckman Coulter	CytoFLEX
PCR 仪	Bio-Rad	C1000 Thermal Cycler
倒置显微镜	Nikon	DP1000
光学显微镜	ZEISS	Scope A1
细胞甩片机	GE	Cytospin 4
台式高速离心机	Thermo Fisher	Multifuge X1R
微量台式离心机	Thermo Scientific	Heraeus Fresco 17
蛋白电泳仪	Bio-Rad	
蛋白转膜仪	Bio-Rad	
显影仪	GE	ImageQuant LAS 4000

2.1.4 实验分析软件

表2-4 实验分析软件

名称	功能	版本
Flowjo	流式细胞术结果分析	X 10.0.7r2
GraphPad Prism	统计分析与图制作	6.0.1.298
Image-Pro Plus	蛋白灰度分析	6.0.0.206
Funrich	信号通路分析	3.1.3

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

(1) 293T 细胞培养

293T 细胞用含 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基于 37 °C, 含有 5 % 二氧化碳 (5 % CO₂) 和 95 % 空气的细胞培养箱中培养, 每 2 天按 1 比 4 传代。

(2) RPMI8226 细胞培养

用含 20 % FBS 的 1640 培养基于 37 °C, 含有 5 % CO₂ 和 95 % 空气的细胞培养箱中培养, 每 3 天按 1 比 2 传代。

(3) ARP-1 细胞培养

用含 10 % FBS 1640 培养基于 37 °C, 含有 5 % CO₂ 和 95 % 空气的细胞培养箱中培养, 每 2 天按 1 比 3 传代。

2.2.2 LILRB4 的 shRNA 质粒构建

通过查阅相关资料，我们设计了两组 shRNA 序列，经过质粒酶切、shRNA 退火和退火产物与质粒连接后将两组 shRNA 分别构建入 pLKO.1 GFP (addgene) 质粒中(图 3)，经过测序验证结果正确后，将质粒抽提保种。

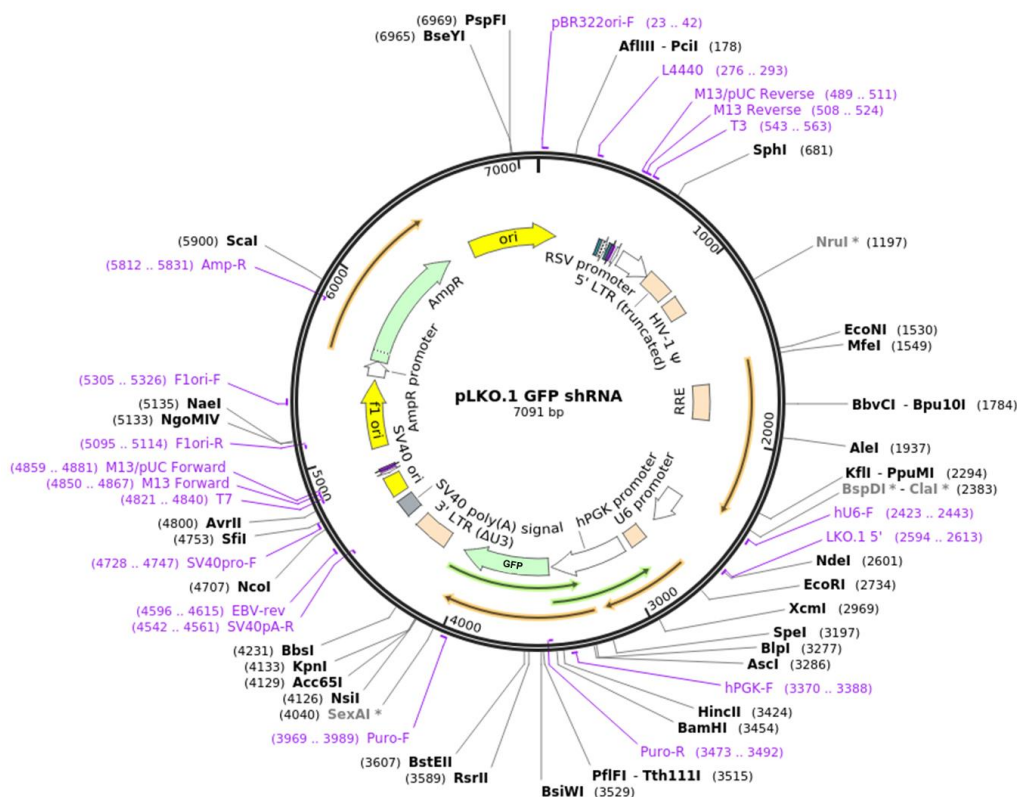


图 2: pLKO.1 GFP 图谱
Figure 2: The graph of pLKO.1 GFP

(1) 质粒的酶切

表2-5 质粒酶切体系

成分	作用	使用量
pLKO.1 GFP	载体	5 μ L
10 $\times$ Cutsmart buffer	缓冲液	3 μ L
EcoR I-HF	内切酶	2 μ L
Age I-HF	内切酶	2 μ L
ddH ₂ O	溶剂	18 μ L

首先，将酶切体系各组份加入 50 μ L EP 管后，漩涡振荡混匀，随后放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中进行酶切，时间为 3 小时。

(2) shRNA 退火

表2-6 shRNA退火体系

成分	作用	使用量
正链	构成 shRNA	5 μ L
负链	构成 shRNA	5 μ L
10 $\times$ H buffer	缓冲液	5 μ L
ddH ₂ O	溶剂	35 μ L

其次，将退火体系各组份加入 50 μL EP 管后，漩涡振荡混匀，随后放入 PCR 仪中进行退火，程序为 99 $^{\circ}\text{C}$ 解旋 5 分钟，37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 小时。

(3) 退火产物与酶切后质粒的连接

表 2-7 退火产物与质粒连接体系

成分	作用	使用量
酶切后质粒	载体	20 ng
退火产物	shRNA	2 μL
10 $\times$ T4 buffer	缓冲液	2 μL
T4 连接酶	连接	2 μL
ddH ₂ O	溶剂	补足至 20 μL

然后，将连接体系各组份加入 50 μL EP 管后，漩涡振荡混匀，随后避光室温连接 1 小时。

(4) 连接产物转化与平板克隆筛选

随后，进行连接产物的转化。先将连接产物加入 50 μL 的感受态菌 DH5 α 中置于冰上 30 分钟，之后 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 秒。再次置于冰上 5 分钟后，将所有菌液加入 500 μL 的 LB 培养液中进行活化，在活化完成后取适量的菌液进行氨苄平板克隆筛选。

(5) 测序与保种

最后，将挑选出的克隆进行扩增，经测序验证正确后，将质粒保种。

2.2.3 慢病毒包装与感染

(1) 慢病毒包装

包装前将汇合度达 100 % 的 293T 细胞按 1 比 4 传代，第二天待细胞生长至汇合度 70 %~80 % 时，开始包装病毒。将 50 μL 2.5 M CaCl_2 与质粒混合后（包装质粒比例为 pMD2G:pSPAX2:DNA 为 1: 3: 4），补加无菌去离子水至总体积为 500 μL ，混匀后，滴加至 500 μL 2 $\times$ HBS 中，静置半小时，最后加入至上述汇合度的 293T 细胞培养皿中。4-6 小时后，换成新鲜培养基。之后分别收取 48 小时和 72 小时的病毒上清，400 g，离心 5 分钟后，用 0.45 μm 无菌滤头过滤，以备感染细胞。

(2) 慢病毒感染

将过滤后的病毒液加入待感染的细胞中，按终浓度 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加入 polybrene, 37 $^{\circ}\text{C}$, 600 g, 离心感染 2 小时，然后放入细胞培养箱中静置 2 小时，最后换成新鲜培养基。如需二次感染则第二天重复上述步骤。

2.2.4 流式细胞术检测 LILRB4 的表达

首先，将细胞用磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffer saline, PBS）重悬后，400 g，离心 5 分钟，弃去上清；再用 1 mL（含 2 % FBS 的 PBS）重悬细胞后，使用细胞计数板计数，收取适量的细胞（ 1×10^5 ）移入 96 孔板中；1000 g 离心 5 分钟，弃去上清；之后，每孔加入 50 μL LILRB4-APC 抗体稀释液（抗体浓度为 1: 100 稀释），小心混匀；4 $^{\circ}\text{C}$ ，避光孵育 30 分钟；然后，每孔加入 200 μL PBS（含 2 % FBS）；随后，1000 g 离心 5 分钟，弃去上清；最后，200 μL PBS（含 2 % FBS）重悬后将液体移入流式管进行流式检测。

2.2.5 细胞生长曲线实验

将对照组的多发性骨髓瘤细胞和基因敲除组的多发性骨髓瘤细胞分别种入 24 孔板中，每孔 1×10^5 细胞，每组细胞种 3 复孔；之后，通过细胞计数板进行细胞计数，分别记录 2 天，4 天，6 天时的细胞增殖情况，绘制细胞生长曲线。

2.2.6 细胞周期分析

300 g 离心收集 1×10^6 细胞后，使用 5 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤细胞两次，每次需 300 g 离心 5 分钟并弃去上清；随后，加入 4 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70 % 乙醇，轻弹细胞后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定

过夜。第二天，300 g 离心 5 分钟并弃去乙醇后，使用 5 mL PBS 洗涤细胞一次；然后，加入 400 μ L 溴化乙锭（PI）染液（50 μ g/mL），一边轻弹细胞一边小心加入；之后，4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟；最后，将重悬液通过 40 μ m 滤网后上机进行流式检测细胞周期。

2.2.7 细胞凋亡分析

将 $1\sim 5\times 10^5$ 的细胞 300 g 离心 5 分钟并弃去液体；随后，使用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 5 mL PBS 洗涤细胞两次，每次需 300 g 离心 5 分钟并弃去液体；之后，加入 100 μ L 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞至均匀后，加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI Staining Solution，同时轻轻混匀液体；在室温避光孵育 15 分钟后，向混合液中再加入 400 μ L 1 $\times$ Binding Buffer，混匀后置于冰上，并于 1 小时内上机进行流式检测细胞凋亡情况。

2.2.8 细胞吉姆萨染色实验

将 $4\sim 8\times 10^4$ 的细胞 300 g 离心 5 分钟并弃去液体；随后，使用 5 mL PBS 洗涤细胞一次，300 g 离心 5 分钟并弃去液体后，使用 200 μ L PBS 重悬细胞；之后，吸取 100 μ L 滴加入组装好的甩片固定器中，600 g 甩片 5 分钟；将玻片取下后使用阻水笔圈出细胞位置后，向圈内滴加 A 液 20 μ L 并迅速滴加 B 液 40 μ L 混匀；室温静置 8 分钟后，使用清水小心洗去染液，并于室温静置至干燥；最后，使用显微镜进行观察与记录。

2.2.9 细胞克隆形成实验(CFU)

将 6000 个细胞小心加入 3 mL CFU 培养基中，漩涡振荡至混匀；随后，使用 1 mL 注射器将液体均分至 24 孔板的 3 个孔中，即一组细胞种 3 复孔，每孔 1 mL 培养基和 2000 个细胞。将细胞放入含有 5 % CO_2 和 95 % 空气的细胞培养箱中培养，待形成明显克隆后使用倒置显微镜进行观察与记录。

表2-8 CFU培养基配方

成分	作用	使用量
胎牛血清	提供营养	4 mL
1640 培养液	提供营养	4.6 mL
3.6 %甲基纤维素	固定克隆和细胞位置	2.4 mL
细胞培养用双抗	防止克隆生长期间发生污染	200 μ L

2.2.10 蛋白印迹实验

细胞样品，收取 1×10^6 细胞，用 30 μ L PBS 重悬；上清样品，收取所有上清，400 g 离心 5 分钟后，收取 30 μ L 上清。将上述细胞、上清样品，加入等体积 2 $\times$ SDS 裂解液（表 2-9），混匀后，放入 100 $^{\circ}$ C 加热器中煮 5 分钟，再置于冰上 5 分钟，重复该过程 3 次，完成蛋白制备。用 10 % 聚丙烯酰胺（PAGE）凝胶制备试剂盒制备凝胶，加入制备好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳；之后，220 mA 恒流转膜 2 小时，5%脱脂牛奶封闭 1 小时，加入相应一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天，PBST（Tween: PBS=1: 1000）洗膜 3 次，每次 5 分钟，随后，用相应二抗室温孵育 1 小时后，PBST 洗膜 3 次，每次 5 分钟。最后加入 HRP-显色试剂显色并拍照。

表 2-9 2 $\times$ SDS 裂解液配方

成分	作用	使用量
100 mM Tris-HCl (pH6.8)	缓冲液	5 mL
十二烷基磺酸钠 (SDS)	裂解	2 g
溴酚蓝	染料	0.1 g
甘油	增稠剂	10 mL
二硫苏糖醇 (DTT)	抗氧化	1.54 g

表2-10 10×电泳缓冲液配方

成分	作用	使用量
Tris	缓冲体系	30.4 g
甘氨酸	缓冲体系	144 g
SDS	裂解	10 g
超纯水	溶剂	定容至 1000 mL

表2-11 10×转膜液配方

成分	作用	使用量
Tris	缓冲体系	30.28 g
甘氨酸	缓冲体系	150.14 g
超纯水	溶剂	定容至 1000 mL

将 10×转膜液 100 mL 加入 700 mL 超纯水中，再向混合液中加入 200 mL 甲醇，即可配置成 1×转膜液。

2.2.11 信号通路分析

使用 MetaboAnalyst 4.0 进行在线通路相关性分析，网址为 <https://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>。

关键信号分子的深度分析使用 FunRich 3.1.3 软件。

2.2.12 统计分析

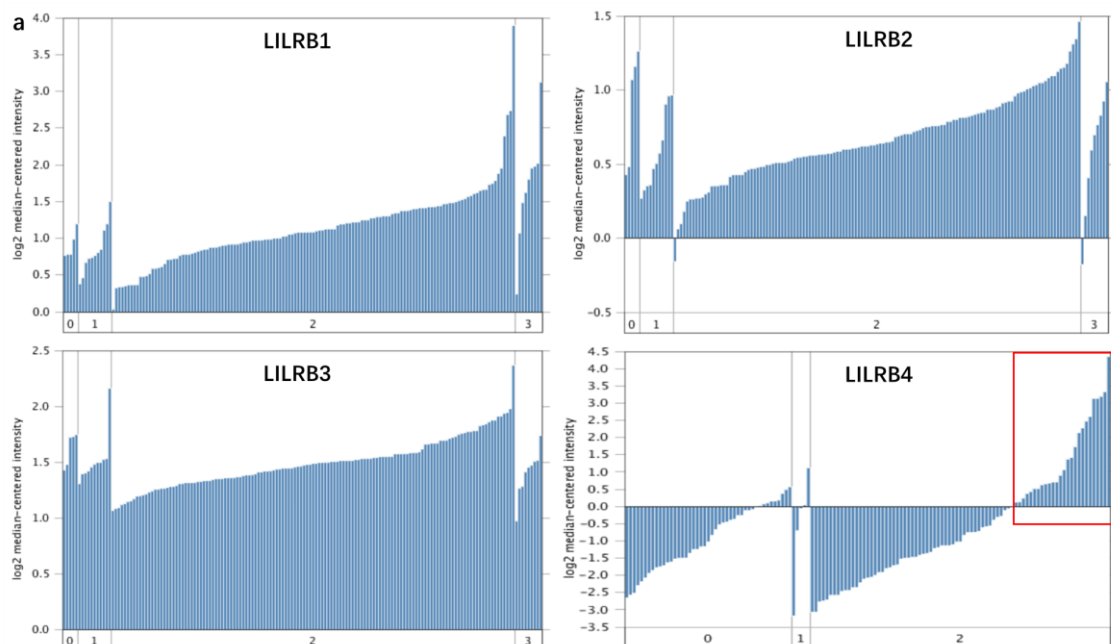
统计数据用平均数±标准差 (Mean±S.D) 表示，两组数据进行相互比较时，使用“un-paired two-tailed”进行 Student's test 分析组间差异；当数据为三组或三组以上进行比较时，使用双因素方差分析与 Sidak 多重比较检验 (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test) 计算显著性差异。数据均来自至少 3 个独立样本。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 表示有显著差异。所有统计图均用 Graphpad Prism 6.0 软件作图。

第三章 实验结果

3.1 LILRB 家族在多发性骨髓瘤患者中的表达情况及临床关系

由于目前对于 LILRB 成员在肿瘤发生发展中的研究大多集中于肿瘤的免疫微环境研究,例如 LILRB2 调控肿瘤相关巨噬细胞分化等^[42]。对于 MM 细胞上的 LILRB 成员的表达情况、功能甚至部分成员的配体都不甚明晰^[43];而对于该家族在 MM 中的表达情况和功能更是少有报道,目前仅有报告提示 LILRB4 在慢性淋巴细胞白血病中非正常的 B 细胞上有所表达,且与患者病情进展相关^[44]。因此,我们首先分析了 TCGA 数据库中 LILRB 家族在 MM 患者中的表达情况及其与病人预后的关系。

结果显示,相较于家族其他成员,LILRB4 通常在 MM 患者骨髓穿刺获得的样本中高表达,且表达量越高患者的生存期越短(图 3)。因此,LILRB4 很可能直接参与到 MM 的发生发展过程之中。



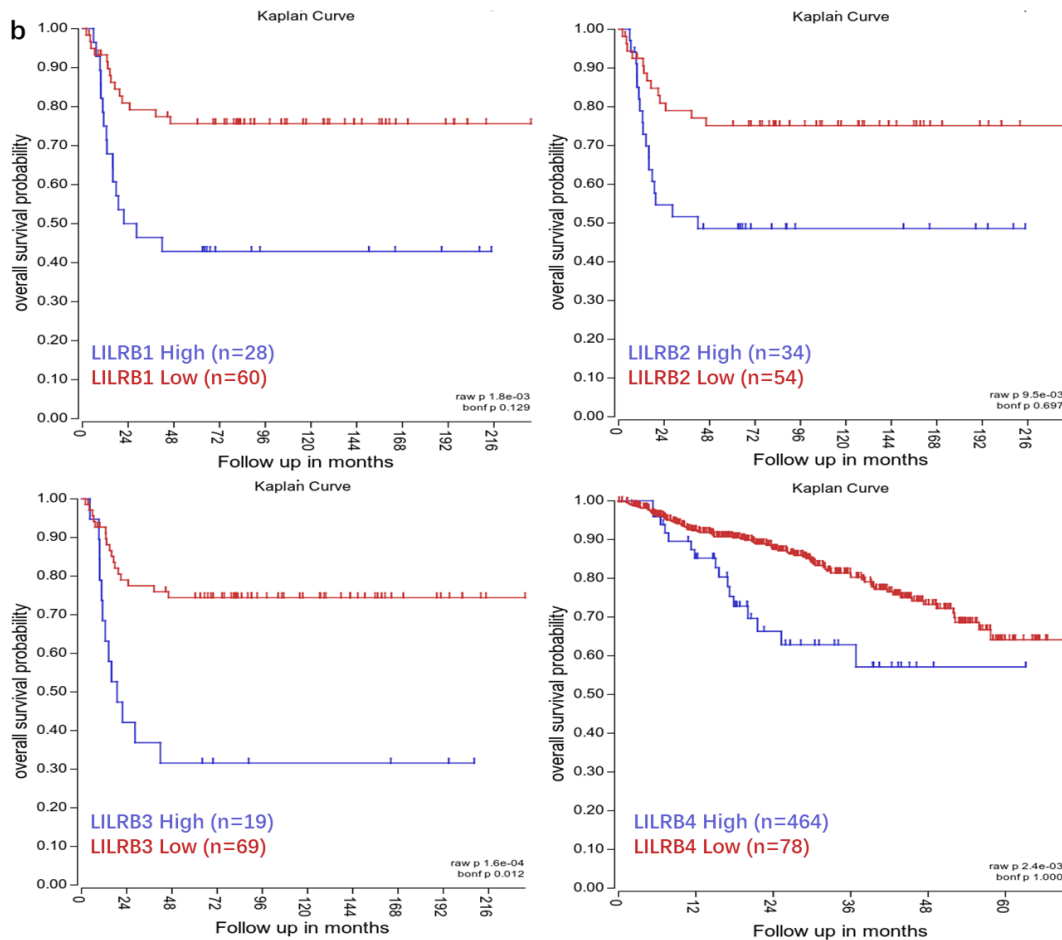


图 3: LILRB 家族与 MM 患者的临床关系 (数据来源 TCGA)

Figure 3: The clinical relationship between LILRB Family and multiple myeloma (From TCGA)

a. LILRB 家族在人骨髓穿刺标本中的表达情况, 集合 0 代表正常人群, 集合 1 代表意义不明的单克隆免疫球蛋白白血症患者, 集合 2 代表 MM 患者, LILRB4 在 MM 患者中表达情况同正常人群相比差异较大。 b. LILRB 家族表达量的高低与 MM 患者生存期的关系, LILRB 家族成员表达量越高, 患者生存期越短。

3.2 LILRB 家族在多发性骨髓瘤细胞系中表达情况

因此, 我们运用流式细胞术, 对 LILRB 家族各成员在 MM 细胞系 8226 和 ARP-1 中的表达进行了测定。流式细胞术结果显示 (图 4), 在 MM 细胞系 8226 和 ARP-1 中, LILRB1 和 LILRB4 细胞群都显著右移, 此结果提示 LILRB1 和 LILRB4 在 8226 和 ARP-1 中均明显表达, 同时可以发现 LILRB2 和 LILRB3 表达量低。因此, 在综合相关文献报道和课题组前期相关实验结果之后, 本课题主要对 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中的影响和作用进行深入的研究。

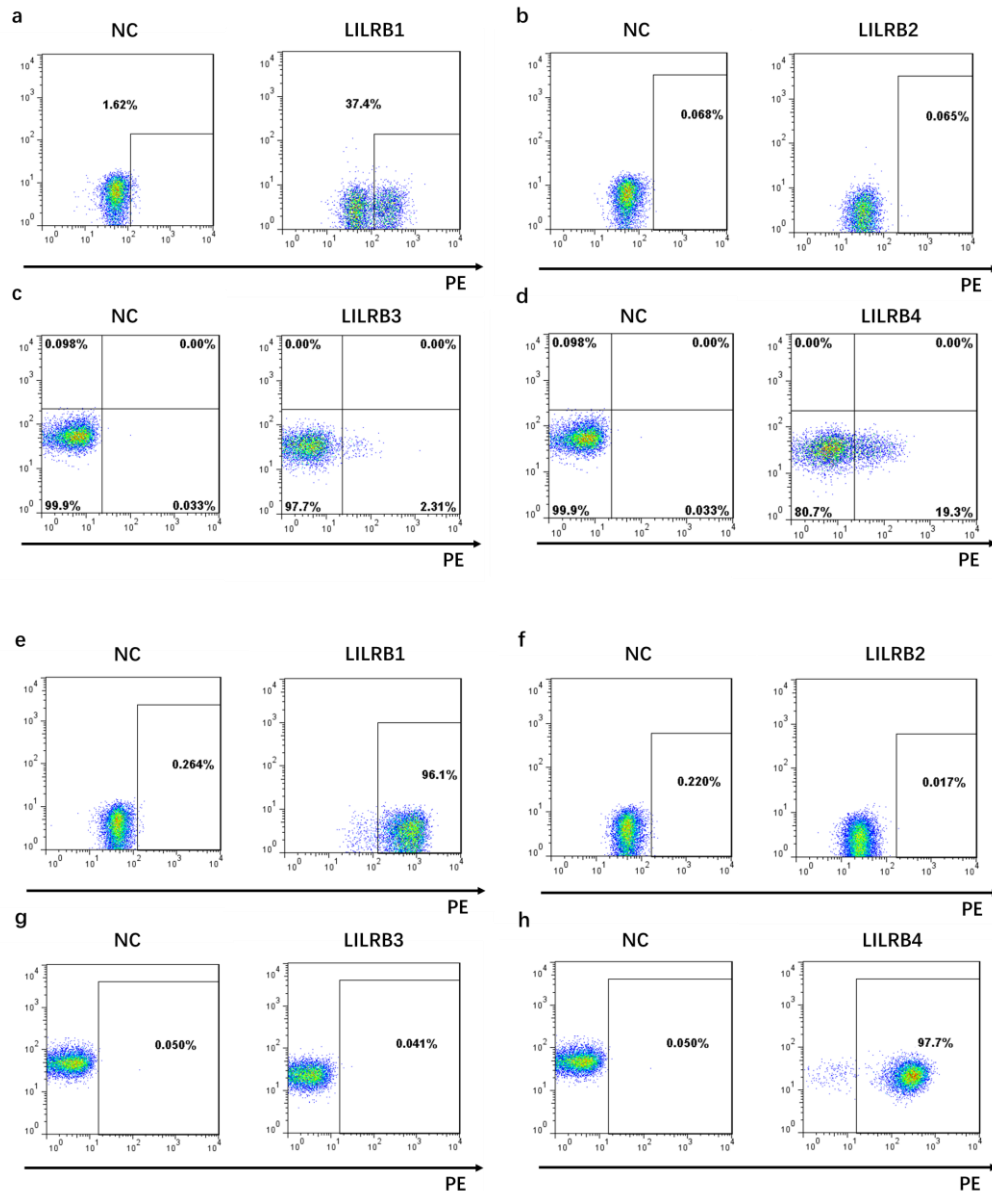


图 4: LILRB 家族各成员在多发性骨髓瘤细胞系 8226 和 ARP-1 中的表达

Figure 4: The expression of LILRBs in multiple myeloma cell line 8226 and ARP-1

流式细胞术结果显示在多发性骨髓瘤细胞系 8226 和 ARP-1 中, LILRB1 和 LILRB4 均表达, 而 LILRB2 和 LILRB3 未见表达。a. LILRB1 在 MM 细胞系 8226 中的表达。b. LILRB2 在 MM 细胞系 8226 中的表达。c. LILRB3 在 MM 细胞系 8226 中的表达。d. LILRB4 在 MM 细胞系 8226 中的表达。e. LILRB1 在 MM 细胞系 ARP-1 中的表达。f. LILRB2 在 MM 细胞系 ARP-1 中的表达。g. LILRB3 在 MM 细胞系 ARP-1 中的表达。h. LILRB4 在 MM 细胞系 ARP-1 中的表达。

3.3 LILRB4 敲低细胞系的建立与验证

我们进一步建立 LILRB4 敲低的细胞系, 并且以此为工具来观察敲低组与对照组之间表型的差异, 以此来挖掘 LILRB4 在 MM 发生发展中可能的调控机制。

3.3.1 shRNA 工作原理

RNA 干扰 (RNAi) 是抑制基因表达极为有用的一种工具。它可以由短时间转染的合成小干扰 RNA (siRNA) 或稳定转染表达的小发夹 RNA (shRNA) 触发。人工合成的 siRNA 由于使用寿命短, 无法稳定且长时间地在细胞内调节基因表达, 而 shRNA 通过慢病毒感染等手段可以在细胞内稳定表达并通过一系列生化过程被加工成 siRNA。其主要过程为在细胞核中表达的 shRNA 与 Drosha-DGCR8 蛋白复合体结合并且触发剪切加工过程; 而 shRNA 在经过切割之后, 由输出蛋白 5 (Exportin-5) 协助穿过核膜, 从而进入到细胞质中; 胞质中的 shRNA 随后被 Dicer 酶裂解并被装载到 Argonaute 蛋白 (AGO) 中形成 shRNA-RISC 复合体, 从而在细胞内实现抑制基因的表达(图 5) [45]。

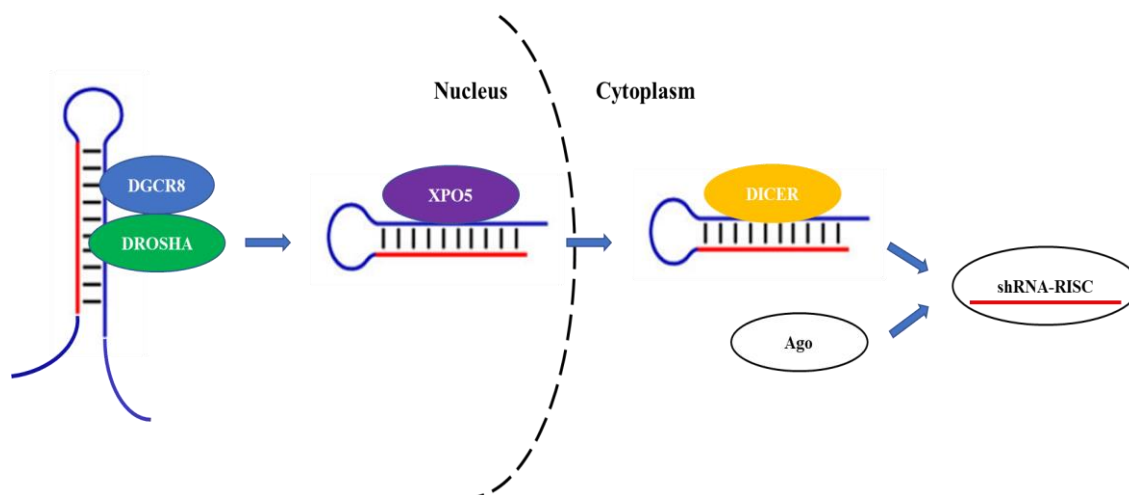


图 5: shRNA 加工形成 RISC 复合体过程

Figure 5: The formation of shRNA-RISC complex

细胞核内稳定表达的 shRNA 在经过 Drosha-DGCR8 蛋白复合体剪切, Exportin-5 蛋白(XPO5) 协助转运, Dicer 酶裂以及装载入 Argonaute 蛋白(Ago)等步骤后, 形成具有抑制基因表达功能的 shRNA-RISC 复合体。

3.3.2 LILRB4 的敲低细胞系建立与验证

由于 MM 具有不同的疾病亚型且不同亚型之间的病理特征有所不同, 因此选择了两种不同类型的 MM 细胞系 RPMI8226 和 ARP-1 进行验证。前者分离于患者骨髓, 携带 KRAS 和 TP53 突变, 以分泌 IgG λ 轻链为主, 属于 IgG 型多发性骨髓瘤细胞; 后者亦分离于患者骨髓, 以分泌 IgA κ 轻链为主, 属于 IgA 型多发性骨髓瘤细胞。我们对于两种细胞系的 LILRB4 表达情况进行了检测, 流式细胞分析结果显示两种细胞系皆高表达 LILRB4 (图 6), 两种细胞系皆符合进行 LILRB4 敲低细胞系模型建立的要求。此外, LILRB4 在两种不同亚型的多发性骨髓瘤细胞表面均有表达, 说明了 LILRB4 在多发性骨髓瘤细胞中表达的普遍性, 这也提示了 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中可能有重要作用。

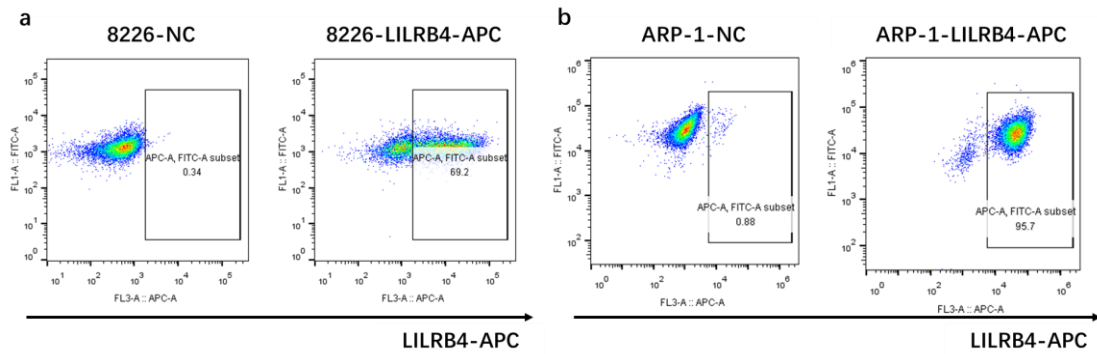


图 6: 多发性骨髓瘤 8226 细胞系和 ARP-1 细胞系中 LILRB4 表达情况

Figure 6: The expressions of LILRB4 in multiple myeloma cell lines 8226 and ARP-1

流式结果显示相较于对照组（NC），抗体标记组（APC）细胞群显著右移，提示 LILRB4 在两种多发性骨髓瘤细胞系上皆高表达。a. 运用流式细胞术测定 LILRB4 在 MM 细胞系 8226 中的表达。b. 运用流式细胞术测定 LILRB4 在 MM 细胞系 ARP-1 中的表达。

随后，我们按照前文所述方法在 293T 细胞中进行了 LILRB4 shRNA 慢病毒的包装，并使用收获的慢病毒液对两种细胞系进行了感染。在感染完成后第三天，我们对于 8226 和 ARP-1 两种细胞系的慢病毒感染效率以及 shRNA 对于 LILRB4 的敲低效率分别通过流式细胞术进行了检测。结果显示，相较于未经慢病毒感染的对照组（NC），空载质粒感染组（SCR）和两组 shRNA 感染组（shLILRB4-1, shLILRB4-2）的慢病毒感染效率都高于 75 % (图 7)，符合进行后续实验的要求。

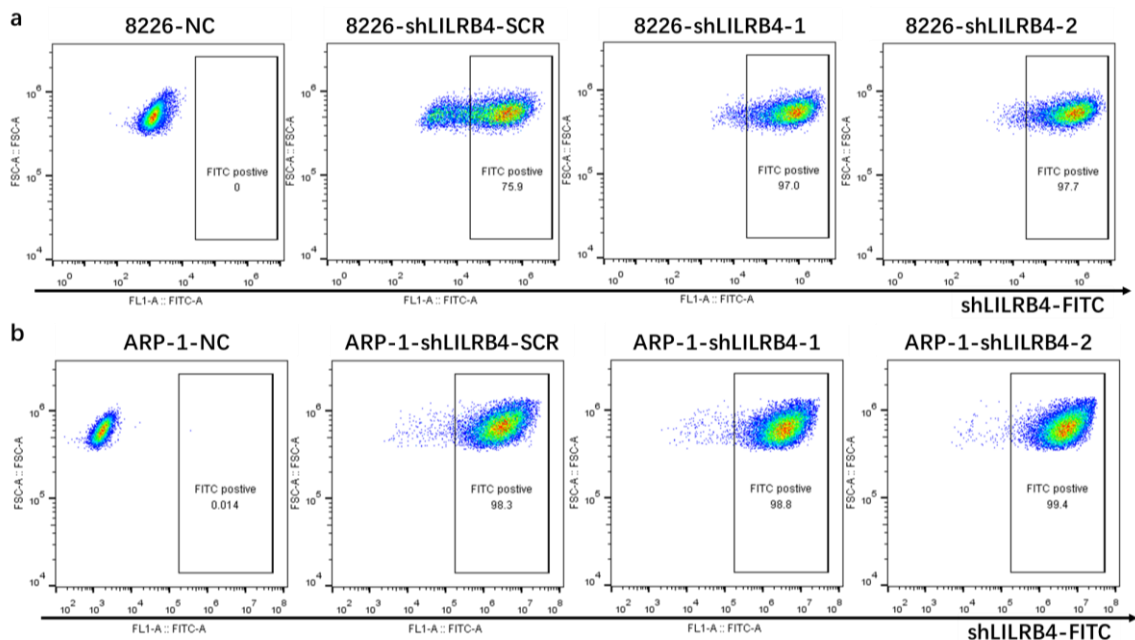


图 7: LILRB4 的 shRNA 慢病毒感染效率

Figure 7: The efficiency of LILRB4-shRNA lentivirus infection

a. 运用流式细胞术测定慢病毒在 MM 细胞系 8226 中的感染效率：空载为 75.9 %，shLILRB4-1 为 97.0 %，shLILRB4-2 为 97.7 %。b. 运用流式细胞术测定慢病毒在 MM 细胞系 ARP-1 中的感染效率：空载为 98.3 %，shLILRB4-1 为 98.8 %，shLILRB4-2 为 99.4 %。

此外, 通过 LILRB4-APC 流式抗体标记, 经过流式细胞术检测与分析, 两组 shRNA 在两种细胞系内对于 LILRB4 的敲低效率都达到 50 % 以上, LILRB4-APC 抗体的平均荧光强度和荧光强度中位数均明显下降, 即 LILRB4 蛋白表达量显著地下降。此结果表明两种多发性骨髓瘤细胞系的 LILRB4 敲低模型建立成功(图 8), 可以进行后续实验。

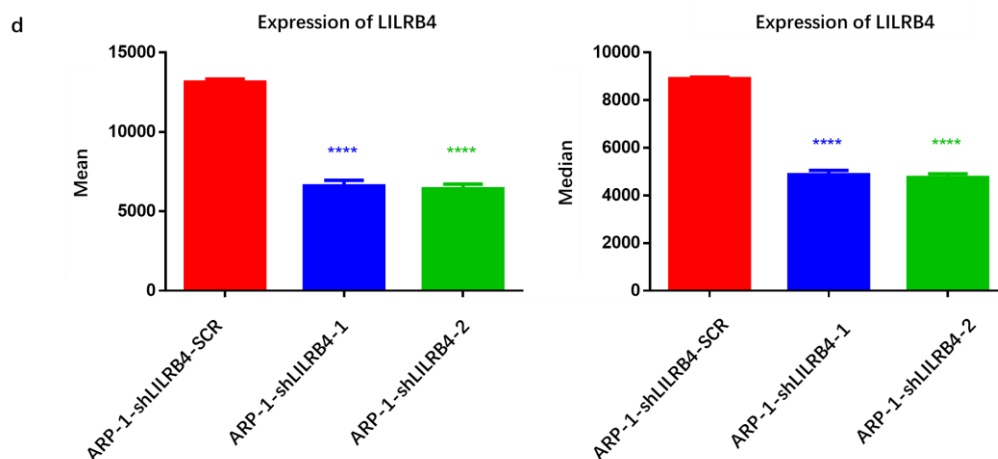
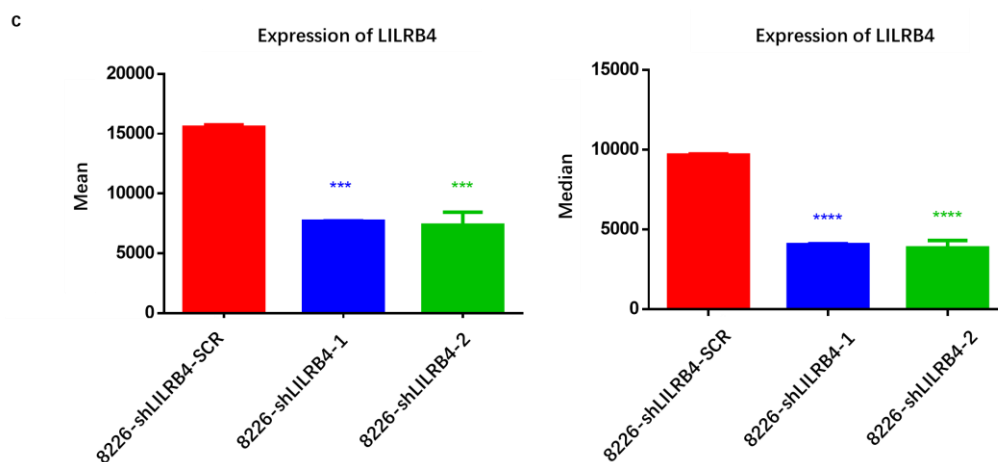
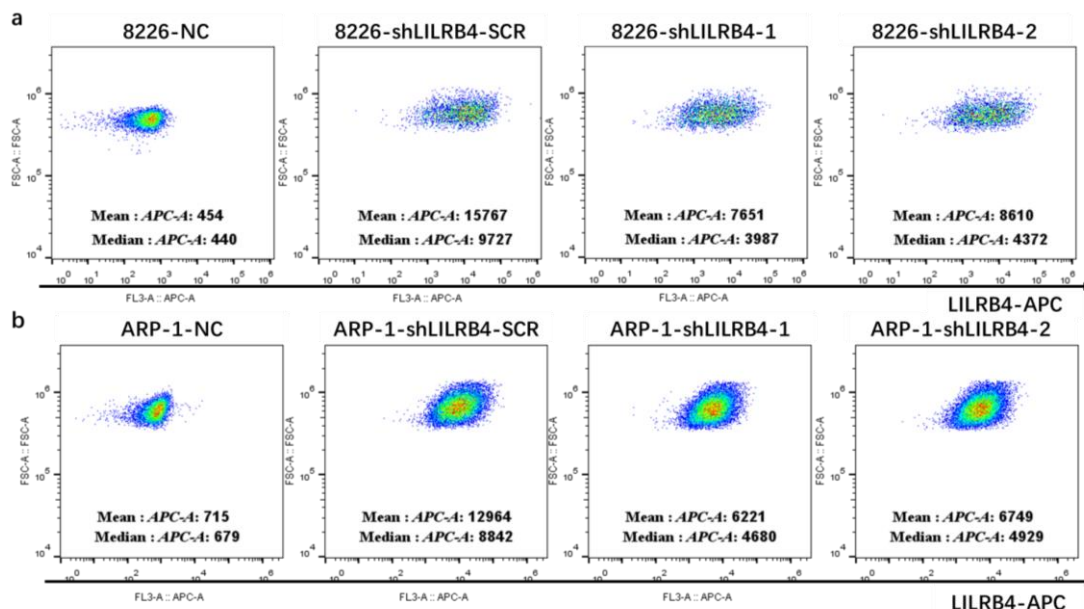


图 8: shRNA 敲低后 LILRB4 蛋白表达情况

Figure 8: The expression of LILRB4 after shRNA knockdown

a. 流式细胞术测定 LILRB4-APC 抗体标记 8226 细胞的代表性散点图。b. 流式细胞术测定 LILRB4-APC 抗体标记 ARP-1 细胞的代表性散点图。c. 流式细胞术测定 LILRB4-APC 抗体标记 8226 细胞的平均荧光强度和荧光强度中位数统计图。结果显示, 相较于空载质粒感染组 (SCR), 两组 shRNA 感染组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的平均荧光强度和荧光强度中位数均显著下降, 即蛋白表达量显著降低, 敲低成功。d. 流式细胞术测定 LILRB4-APC 抗体标记 ARP-1 细胞的平均荧光强度和荧光强度中位数统计图。结果显示, 相较于空载质粒感染组 (SCR), 两组 shRNA 感染组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的平均荧光强度和荧光强度中位数均显著下降, 即蛋白表达量显著降低, 敲低成功。 (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 表示有显著差异。)

3.4 LILRB4 敲低对多发性骨髓瘤细胞的影响

在建立了两种多发性骨髓瘤细胞系的 LILRB4 敲低模型后, 我们对于细胞的增殖能力, 恶性克隆形成能力, 细胞凋亡等方面进行了观察, 以确认 LILRB4 是否在多发性骨髓瘤发生发展过程中起到关键的调控作用。

3.4.1 LILRB4 调控多发性骨髓瘤细胞的生长

不论是 8226 细胞还是 ARP-1 细胞, 在 LILRB4 敲低后, 细胞的生长速率均显著降低 (图 9), 提示 LILRB4 对于多发性骨髓瘤细胞的生长起到助推的作用, 而 LILRB4 的敲低可以减缓多发性骨髓瘤的进展。

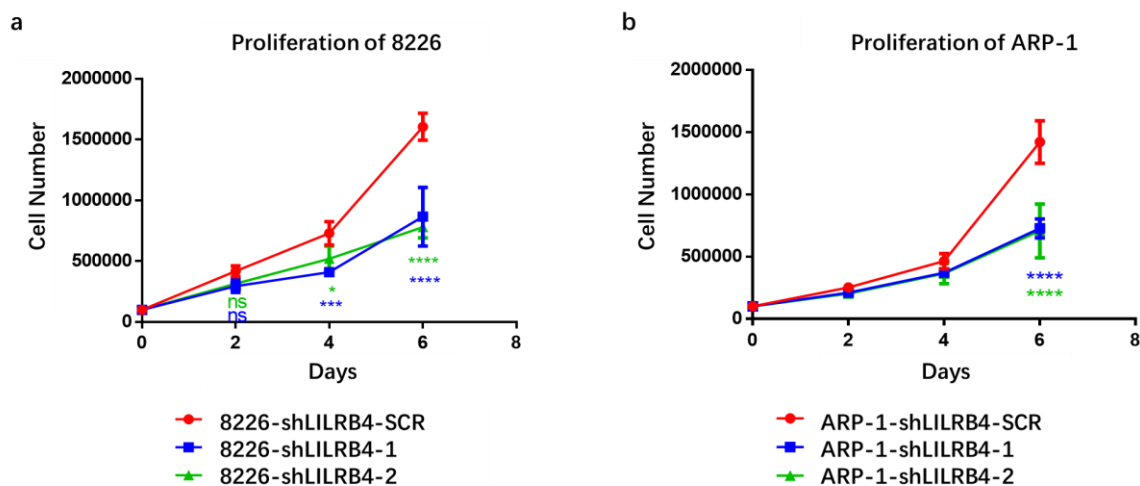


图 9: 8226 细胞系和 ARP-1 细胞系空载质粒感染组 (SCR) 和两组 shRNA 感染组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 细胞的生长曲线对比

Figure 9: The proliferation of scramble group (SCR) compared with the knockdown group (shLILRB4-1, shLILRB4-2) in multiple myeloma cell lines 8226 and ARP-1

a. 敲低 LILRB4 后, 8226 细胞生长速率显著降低。b. 敲低 LILRB4 后, ARP-1 细胞生长速率显著降低。 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 表示有显著差异。)

明确了 LILRB4 的敲低可以显著抑制多发性骨髓瘤的进展之后,我们对于其可能的调控途径进行了探究。有文献报道,在 Burkitt 淋巴瘤细胞系 Raji 中, LILRB1 敲低后, Raji 细胞出现了明显的 G0/G1 期细胞阻滞的现象^[46]。受此启发,我们对于 8226 细胞和 ARP-1 细胞及其相应 LILRB4 敲低组分别进行了细胞周期的检测。结果显示,在 MM 细胞中敲低 LILRB4 后, G2/M 期细胞的占比明显下降, G0/G1 期细胞占比略有上升(图 10)。这一结果表明, LILRB4 不同于 LILRB1, 其对于多发性骨髓瘤细胞生长的助推作用更倾向于通过促进细胞进入增殖状态来实现的,故敲低 LILRB4 后, G2/M 期细胞的占比明显下降,而 G0/G1 期出现了轻微的细胞周期阻滞现象。

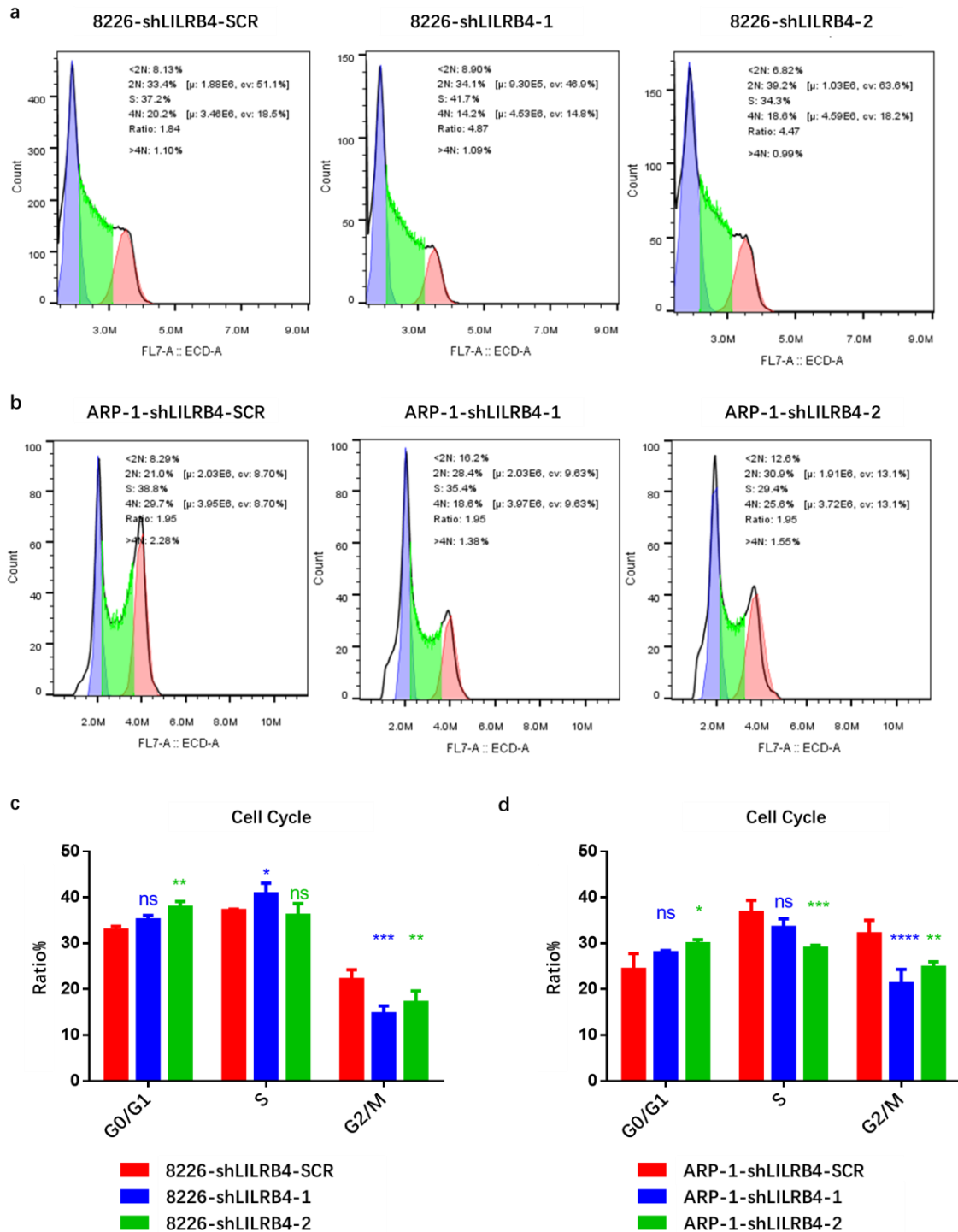


图 10: 8226 细胞系和 ARP-1 细胞系空载质粒感染组(SCR)和两组 shRNA 感染组(shLILRB4-1, shLILRB4-2) 细胞周期对比

Figure 10: The cell cycles of scramble group (SCR) compared with the knockdown group (shLILRB4-1, shLILRB4-2) in multiple myeloma cell lines 8226 and ARP-1

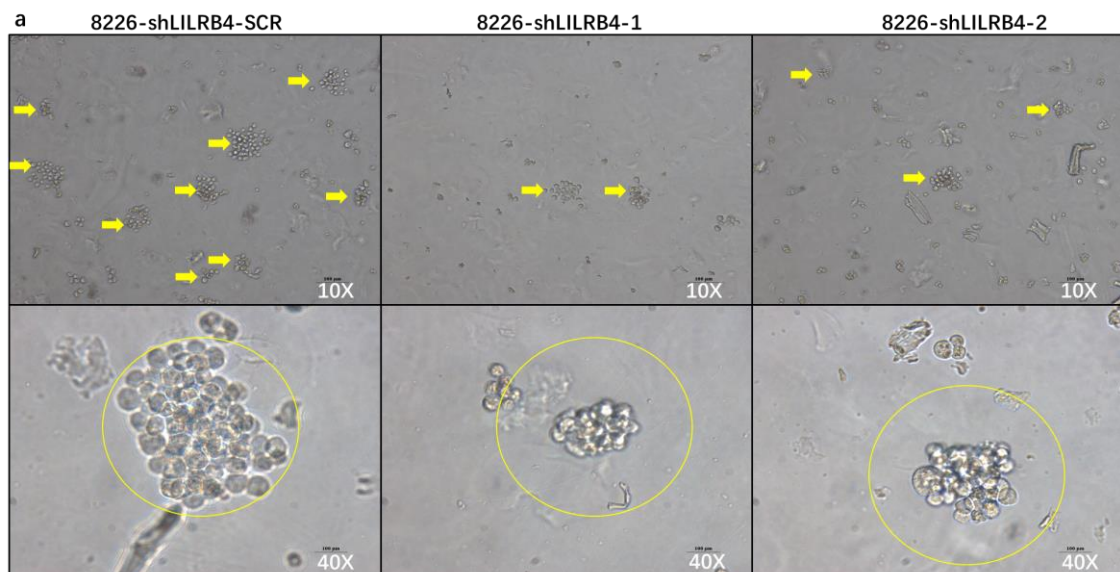
不论是 8226 细胞还是 ARP-1 细胞, 在 LILRB4 敲低后, G2/M 期细胞占比均显著降低。a. 流式分析 8226 细胞各组细胞周期代表图。b. 流式分析 ARP-1 细胞各组细胞周期代表图。c. 8226 细胞的细胞周期统计图, 结果显示 LILRB4 敲低组 G2/M 期细胞占比较空载组显著降低。d. ARP-1 细胞的细胞周期统计图, 结果显示 LILRB4 敲低组 G2/M 期细胞占比较空载组显著降低。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 表示有显著差异。)

3. 4. 2 LILRB4 影响多发性骨髓瘤的恶性克隆形成能力

在过去的 20 年中, 大量研究表明, 只有一小部分肿瘤细胞具有肿瘤启动能力, 也就是肿瘤发生的核心。它们可以自我更新, 通过细胞分裂形成子代细胞, 并分化为各种类型的子代, 这些肿瘤细胞称为肿瘤干细胞^[47]。现有研究显示, 肿瘤干细胞与疾病进程密切相关。肿瘤干细胞通过分化为各种类型子代导致肿瘤组织中细胞的多样化组成, 从而导致表型上不同的亚克隆的产生, 从而增加了抗肿瘤治疗后留下耐药克隆的机会, 进而导致临床预后差^[48]。

因此, 为了直观地观察 LILRB4 敲低后对于多发性骨髓瘤细胞克隆形成能力的影响, 我们对于建模成功后的细胞进行了克隆形成实验。结果如图 11 显示, 不论是 8226 还是 ARP-1 细胞系, LILRB4 敲低组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的细胞克隆形成能力相较于空载质粒感染组 (SCR) 显著下降, 具体表现在细胞克隆形成的大小减小, 形成的克隆数和形成的克隆密度明显减少。此外, 对于 24 孔板中每孔的总细胞数我们也进行了统计, 结果显示 LILRB4 敲低组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的总细胞数相较于空载质粒感染组 (SCR) 的总细胞数显著降低, 该结果与之前生长曲线的结果相吻合 (图 11)。

由此可见, LILRB4 的敲低显著抑制了多发性骨髓瘤细胞的增殖能力, 提示 LILRB4 具有调控多发性骨髓瘤细胞克隆形成的能力。



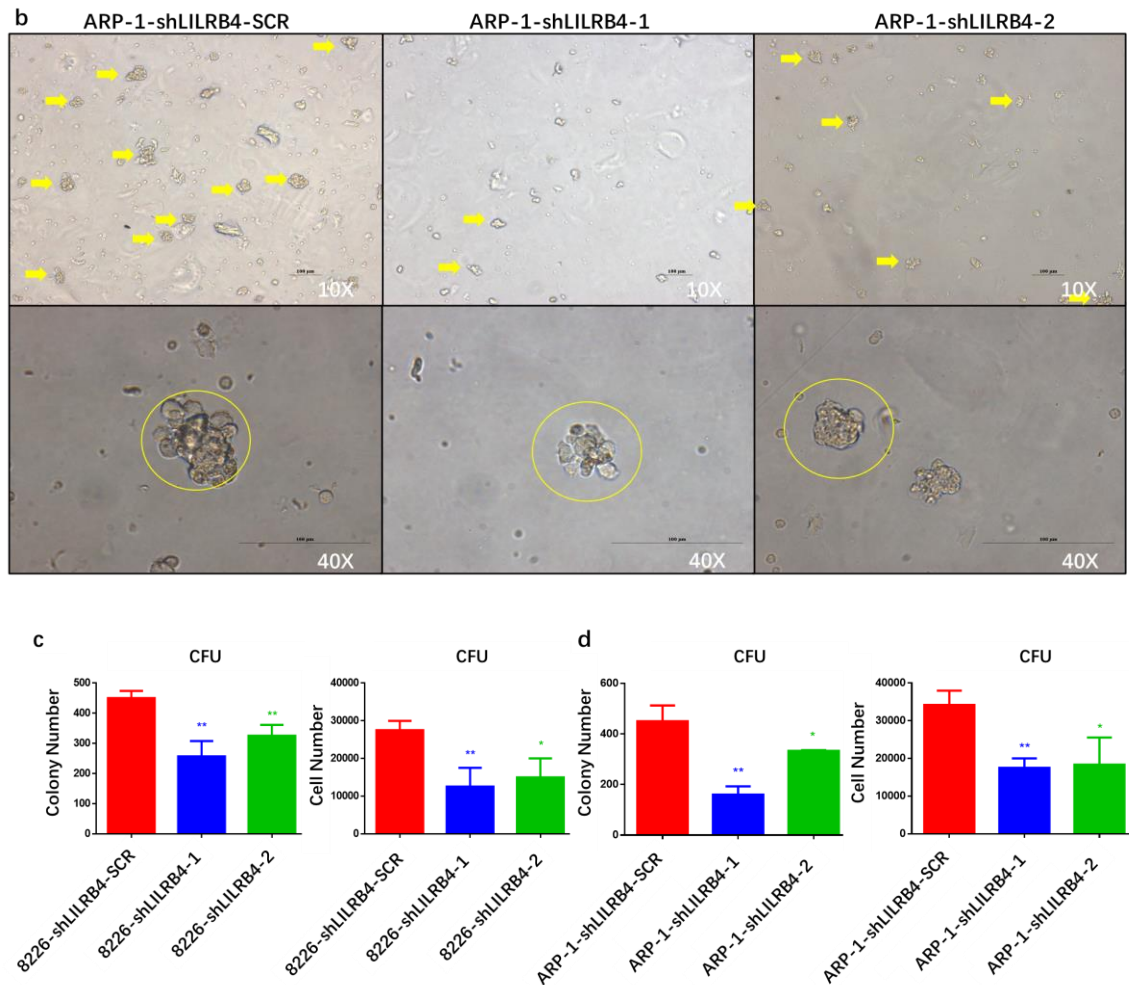


图 11: 8226 细胞系和 ARP-1 细胞系空载质粒感染组(SCR)与两组 shRNA 感染组(shLILRB4-1, shLILRB4-2)克隆形成能力

Figure 11: The CFU capabilities of scramble group (SCR) compared with the knockdown group (shLILRB4-1, shLILRB4-2) in multiple myeloma cell lines 8226 and ARP-1

不论是 8226 细胞还是 ARP-1 细胞, 在 LILRB4 敲低后, 相较于空载质粒感染组 (SCR), shRNA 感染组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的细胞克隆形成的数量减小 (圆圈所示), 形成的克隆数和形成的克隆密度明显减少 (箭头显示), 生成的总细胞数也降低。a. 8226 细胞的克隆形成代表图, 10 倍镜图片体现了形成的克隆密度; 40 倍镜图片体现了形成的单个克隆大小。b. ARP-1 细胞的克隆形成代表图, 10 倍镜图片体现了形成的克隆密度; 40 倍镜图片体现了形成的单个克隆大小。c. 8226 细胞的克隆形成总数以及细胞总细胞数统计图。d. ARP-1 细胞的克隆形成总数以及总细胞数统计图。(*p < 0.05, **p < 0.01 表示有显著差异。)

肿瘤干细胞具有自我更新和分化的能力, LILRB4 的敲低显著抑制了多发性骨髓瘤细胞的增殖能力, 那么对其分化是否产生影响呢? 据夏雯等人的研究报道, MM 细胞的核形态异常与其细胞恶性情况息息相关, 且与疾病预后指标, 如白蛋白等相关, 尤其是核形态异常情况越严重的患者, 临床常规治疗的效果也越差^[49]。鉴于此, 在初步明晰了 LILRB4 具有调控 MM 细胞克隆形成能力之后, 我们通过吉姆萨染色的方式观察 MM 细胞的核形态, 以此来观察各组之间细胞恶性程度的差别; 同时, 通过镜下观察细胞的有丝分裂情况以及退化细胞的数量, 来体现各组细胞的自我更新和分化能力的区别 (图 12)。

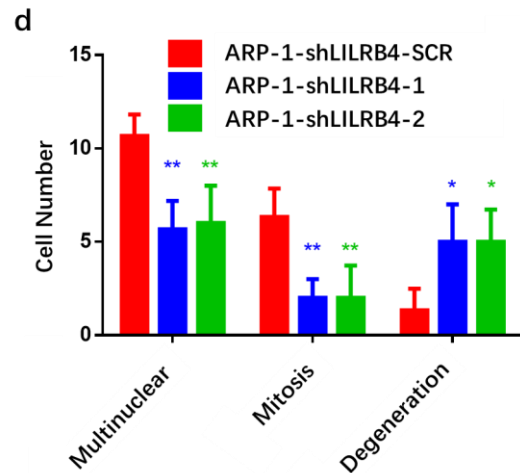
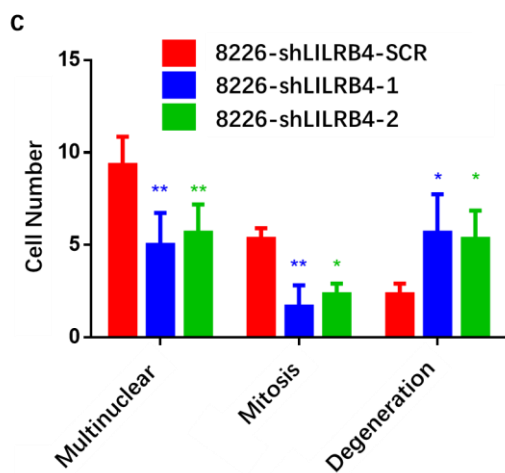
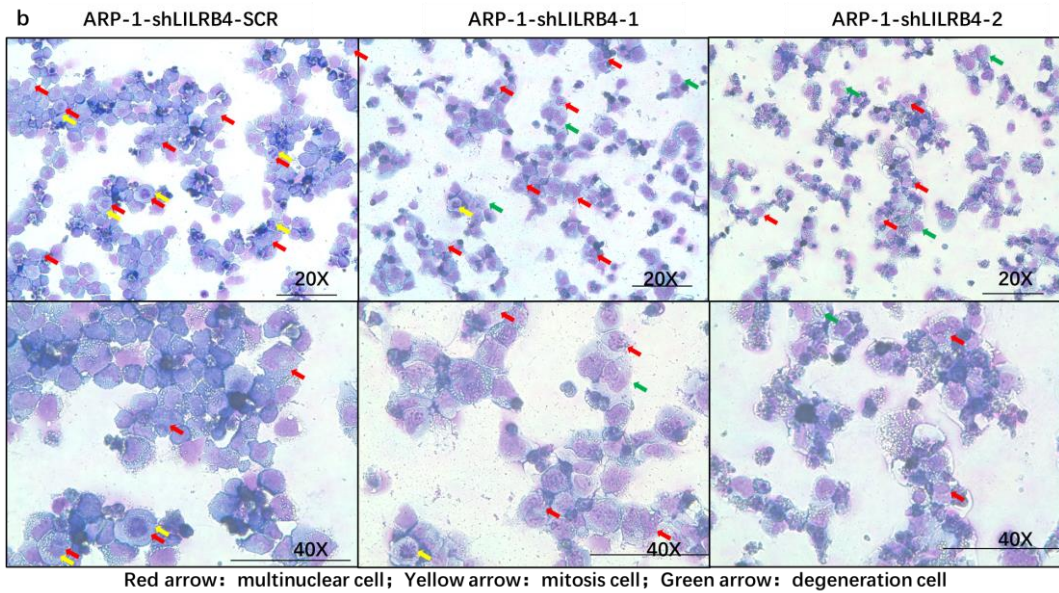
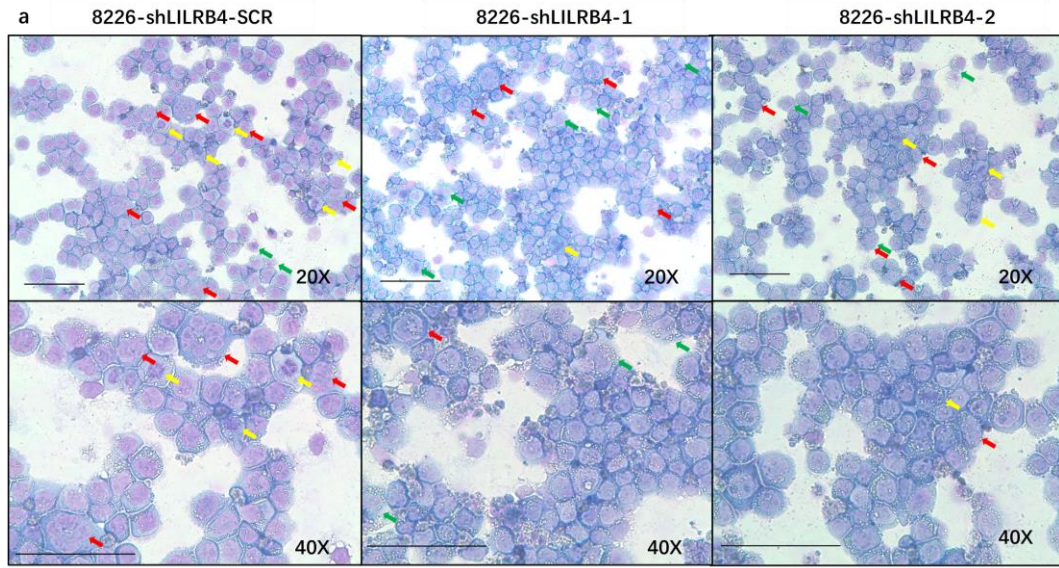


图 12: 8226 细胞系和 ARP-1 细胞系空载质粒感染组(SCR)与两组 shRNA 感染组(shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的吉姆萨染色对比

Figure 12: The giemsa staining of multiple myeloma cell lines 8226 and ARP-1 with the comparison between the scramble group (SCR) and the knockdown group (shLILRB4-1, shLILRB4-2)

相较于空载质粒感染组(SCR), shRNA 感染组(shLILRB4-1, shLILRB4-2)的多核和畸形核细胞数量明显下降, 有丝分裂期细胞数量减少也相当明显, 退化细胞数则出现了比较明显的增加。a. 8226 细胞的吉姆萨染色代表图。b. ARP-1 细胞的吉姆萨染色代表图。c. 8226 细胞的吉姆萨染色结果统计图, 多核和畸形核细胞数量明显下降, 有丝分裂期细胞数量明显减少, 退化细胞数则出现了比较明显的增加。d. ARP-1 细胞的吉姆萨染色结果统计图, 多核和畸形核细胞数量明显下降, 有丝分裂期细胞数量明显减少, 退化细胞数则出现了比较明显的增加。(红色箭头指示多核、畸形核细胞; 黄色箭头指示处于有丝分裂的细胞; 绿色箭头指示退化细胞。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 表示有显著差异。)

经过吉姆萨染色以及相关统计分析, 我们可以观察到相较于空载质粒感染组(SCR), shRNA 感染组(shLILRB4-1, shLILRB4-2)的多核和畸形核细胞数量明显下降, 有丝分裂期细胞数量减少也相当明显, 这体现了多发性骨髓瘤细胞在 LILRB4 敲低后细胞恶性的减弱以及自我更新能力的降低。此外, 通过光学显微镜观察, 我们发现在 LILRB4 敲低后, 两种 MM 细胞均出现了退化细胞的增加, 细胞表现为胞质浅染、细胞膜边缘模糊。通过查阅相关文献, 有证据显示退化细胞的增多与血液系统恶性肿瘤患者预后效果好相关, 且退化细胞的出现表明有部分肿瘤细胞出现了凋亡或者坏死^[50]。

综上所述, LILRB4 对于 MM 细胞的恶性克隆能力有助推作用, 敲低 LILRB4 后, 细胞的自我更新能力, 恶性克隆能力都受到抑制, 且有一部分细胞出现了退化与死亡, 提示 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中的重要调控作用。

3. 4. 3 LILRB4 的敲低诱导多发性骨髓瘤细胞的凋亡

细胞凋亡是一种受调控的细胞死亡机制, 其特征而在于核和细胞质的形态发生明显变化, 例如细胞核的固缩以及基因组 DNA 的内切和裂解。而在细胞凋亡的过程中, 其又分为早期凋亡和晚期凋亡两个阶段。早期凋亡的细胞, 其细胞膜结构并未完全破坏, 仅表现为细胞膜内的磷脂酰丝氨酸(PS)外翻, 使得其在钙离子介导下, 可以与膜联蛋白(Annexin)结合而被检测到。而晚期凋亡的细胞, 不仅膜结构破坏严重, 细胞膜内的 PS 外翻, 而且其细胞核也有所损伤, 故而细胞核可以被特异性的核染料溴化乙锭(PI)结合而被检测到。

在上文的各项结果中, 我们观察到在 LILRB4 敲低后, 两种多发性骨髓瘤细胞都出现了细胞退化和部分死亡的现象。Tao 等人曾报道在心肌细胞损伤过程中, LILRB4 会通过调控 NF κ B 通路的磷酸化来诱导心肌细胞 Caspase 3 升高导致心肌细胞发生凋亡^[51]。据此, 我们对于两种 MM 细胞系的凋亡情况进行了流式细胞术检测。结果显示, 在 8226 细胞中, LILRB4 敲低后(shLILRB4-1, shLILRB4-2 两组), 其早期凋亡细胞(Annexin V⁺ PI⁻, Q3 群)明显增加, 这表明 LILRB4 敲低能够诱导 8226 细胞发生早期凋亡; 而在 ARP-1 细胞中, LILRB4 敲低后(shLILRB4-1, shLILRB4-2 两组), 其早期凋亡细胞(Annexin V⁺ PI⁻, Q3 群)和晚期凋亡细胞(Annexin V⁺ PI⁺, Q2 群)均明显增加, 这表明 LILRB4 敲低能够诱导 ARP-1 细胞发生凋亡(图 13)。

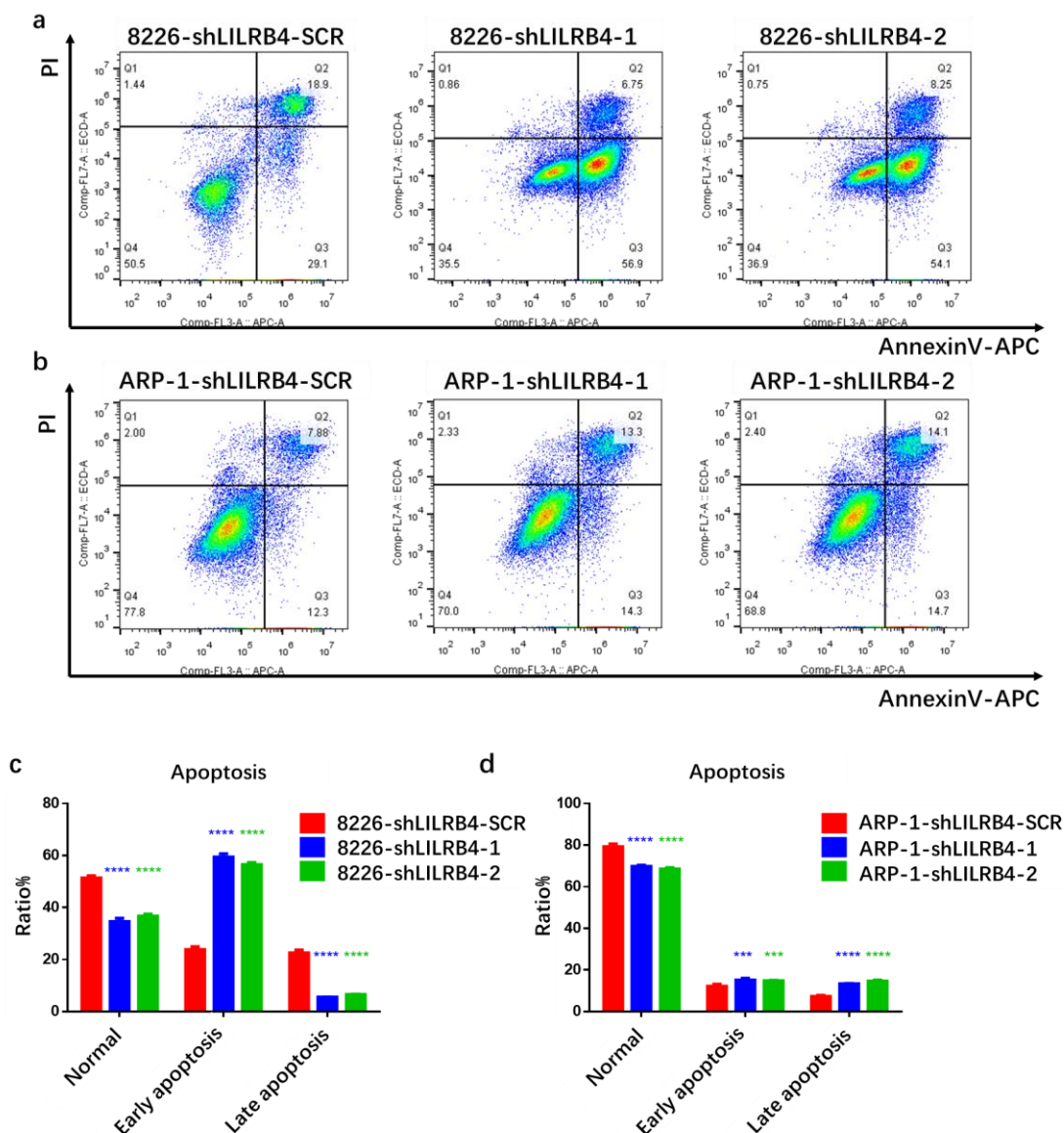


图 13: 8226 细胞系和 ARP-1 细胞系空载质粒感染组 (SCR) 与两组 shRNA 感染组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的细胞凋亡检测

Figure 13: The apoptosis of multiple myeloma cell lines 8226 and ARP-1 with the comparison between the scramble group (SCR) and the knockdown group (shLILRB4-1, shLILRB4-2)

图中 Q4 群(Annexin V⁻ PI⁺)为未出现凋亡现象的细胞, Q3 群(Annexin V⁺ PI⁺)为出现早期凋亡的细胞, Q2 群(Annexin V⁺ PI⁻)为晚期凋亡的细胞。相较于空载质粒感染组 (SCR), shRNA 感染组 (shLILRB4-1, shLILRB4-2) 的细胞凋亡现象非常明显, 提示 LILRB4 对于多发性骨髓瘤细胞的细胞命运有着重要调控作用。a. 流式检测 8226 细胞的凋亡情况代表图。b. 流式检测 ARP-1 细胞的凋亡情况代表图。c. 8226 细胞细胞凋亡结果统计图, LILRB4 敲低组早期凋亡细胞较空载组显著增加。d. ARP-1 细胞细胞凋亡结果统计图, LILRB4 敲低组早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞较空载组均显著增加。(***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$ 表示有显著差异。)

至此,我们认为 LILRB4 的敲低可以显著诱导多发性骨髓瘤细胞发生凋亡,这一结果体现了 LILRB4 对于 MM 细胞的命运有着重要调控作用,需要对于相关机制进行更深入的研究。

3.5 LILRB4 调控多发性骨髓瘤发生发展的信号通路研究

综上结果,我们发现 LILRB4 对于 MM 细胞的增殖分化、恶性克隆、细胞命运都有着非常重要的调控作用,而且相关功能可以通过细胞周期、细胞凋亡的调控以及细胞分化能力的调控来实现。但是 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中具体的分子调控机制却依然未知。鉴于此,我们查阅了相关文献来寻找潜在调控通路并运用生物信息学分析手段对于信号转导通路进行了关联性分析,并且通过蛋白印迹实验对通路进行了验证。

3.5.1 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中的调控通路分析

SHP2 是在大多数胚胎和成年组织中表达的一种酪氨酸磷酸酶,其调节许多细胞功能,例如生长,分化,迁移和存活^[52]。近几年的研究显示,SH2 的表达量与 MM 患者的预后效果呈负相关,且 SH2 表达量高的患者,其生存期也较短^[53]。此外,有研究表明 SH2 抑制剂 SHP099 是用于癌症免疫疗法的有前途的候选药物,该抑制剂和抗 PD-1 抗体的组合可以显著抑制结肠癌的进展^[54]。而在课题组前期研究中,我们发现 LILRB2/SHP2/CAMK1/CREB 信号通路对于肺癌细胞系 A549 的生长和侵袭起到重要助推作用^[35],且有文献报道核 TRAF3 通过泛素化 CREB 使 CREB 降解来调节 B 细胞存活,而该机制与 TRAF3 在 B 细胞恶性肿瘤中的作用高度相关^[55]。

基于上述资料,我们使用了在线分析软件 MetaboAnalyst 4.0 对于相关可能通路进行了筛选^[56],并进行了通路关键因子与 LILRB4 的相关性分析以及相关性图表的绘制^[57]。结果显示,LILRB4 与 SHP2 和 CaMK1 在 B 细胞受体信号转导通路中关联性高,结果同其它通路相比具有显著的统计学差异。这一结果提示在多发性骨髓瘤中,CaMK 通路受到 LILRB4 调控的可能性极大(图 14)。

此外,CaMK 通路调控细胞增殖、分化、凋亡以及细胞周期的功能已经有大量文献报道和证据支持^{[51-55][58]},这与前文使用 shRNA 敲低 LILRB4 后 MM 细胞增殖分化、恶性克隆、细胞命运都受到影响的表型相契合,更进一步表明 LILRB4-CaMK 通路在多发性骨髓瘤发生发展中的潜在调控作用。

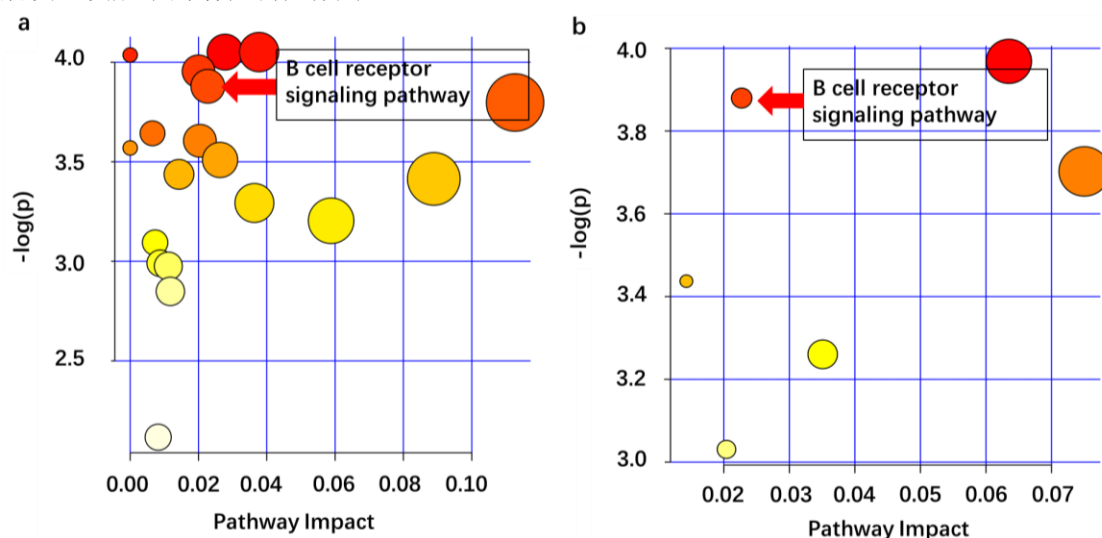


图 14: 通路关键因子与 LILRB4 的相关性分析

Figure 14: The correlation analysis between LILRB4 and key factors

a. 相关性分析结果显示 LILRB4 和 SHP2 在 B 细胞受体信号转导通路中关联性高, 提示在 多发性骨髓瘤中, SHP2 受到 LILRB4 调控的可能性极大。b. 相关性分析结果显示 LILRB4 和 CaMK1 在 B 细胞受体信号转导通路中关联性高, 提示在 多发性骨髓瘤中, CaMK1 受到 LILRB4 调控的可能性极大。

在完成了对于通路的初步筛选和关联性分析后, 我们又使用了 FunRich 对相关文献报道以及课题组前期研究的通路中的关键信号因子进行了深度分析(图 15)。结果显示 SHP2 和 CaMK1 的改变还可能造成 NF κ B 信号通路等信号通路的改变, 而这些通路 与细胞死亡和细胞间黏附等息息相关^{[19][59]}, 提示这些信号通路可能也参与了 LILRB4 敲低后, MM 细胞 凋亡现象明显、恶性克隆能力减弱等过程。

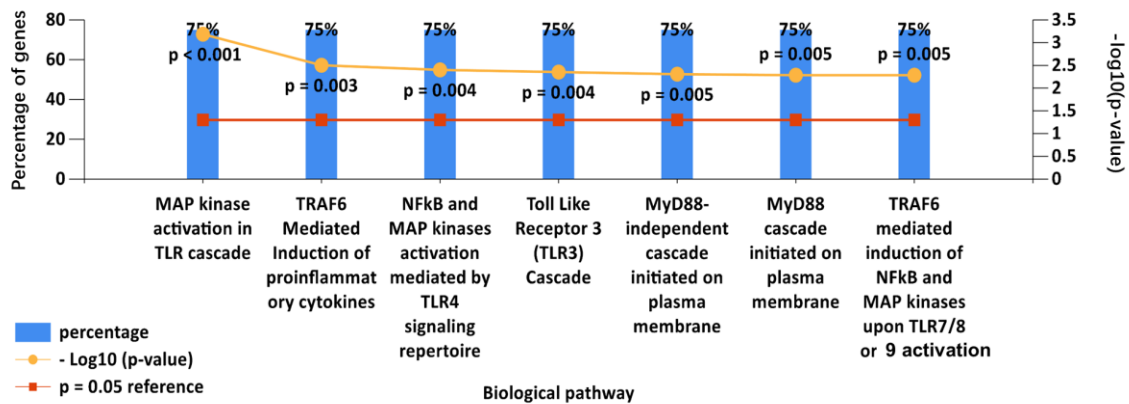


图 15: 围绕 LILRB4, SHP2 和 CaMK 改变可能发生改变通路 (FunRich 分析结果)

Figure 15: Pathways may be affected due to alterations of LILRB4, SHP2 and CaMK (FunRich analysis)

此外, 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 与髓样分化因子 8 (myeloid differentiation factor 8, MyD88) 作为 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 的下游因子, 其也与通路变化息息相关。众多研究表明, Toll 样受体突变或 MyD88 的突变是导致多发性骨髓瘤的潜在病因之一^{[60][61]}。因此, SHP2 和 CaMK 的改变可能直接干扰 MM 发生发展的驱动因素, 使得多发性骨髓瘤的进展延缓。

3. 5. 2 LILRB4 对于 CaMK 通路的影响

SHP2-CaMK-CREB 通路作为 LILRB2 的下游信号通路, 其被报道在肺癌和急性髓系细胞白血病进展中起到助推作用^{[35][62]}。然而, CaMK 通路是否受到 LILRB4 的调控却未曾有文献报道。此外, 有多篇文献表明以 LILRB 家族、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素家族 (Siglec) 为代表的这类免疫抑制性受体在一定情况下会产生免疫激活作用^{[34][63]}, 其机制与胞内段酪氨酸序列的不完全磷酸化^[64]、DAP12 募集 SHP1 和 SHP2 抑制 ITIM 作用^[65]以及 ITIM 招募 SHP1、SHP2 影响钙通路表达^[63]等调控途径紧密相关。鉴于此, 我们针对 LILRB4 在 MM 中对于 CaMK 通路的影响进行了进一步研究 (图 16)。

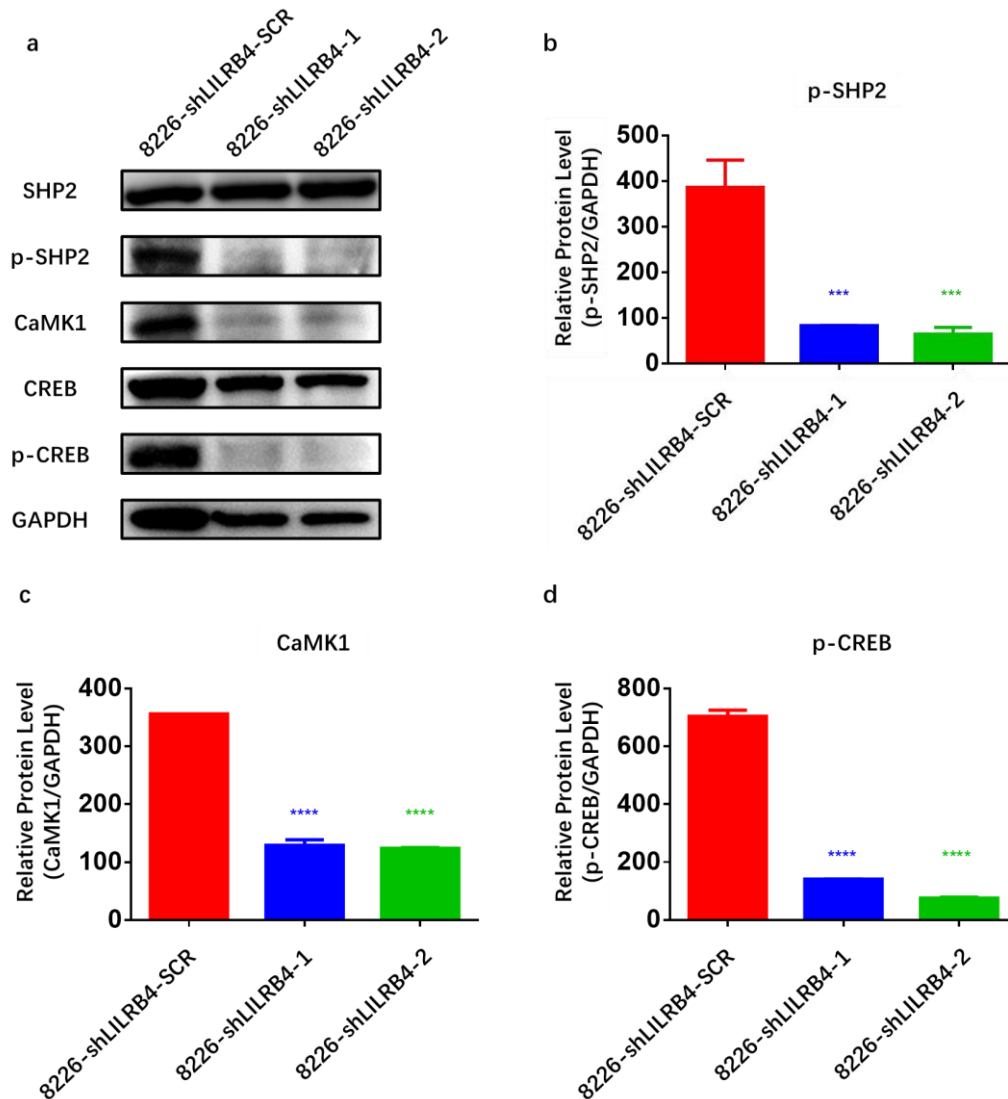


图 16: LILRB4 对于 CaMK 通路的调控作用

Figure 16: The CaMK pathway is regulated by LILRB4

a. 蛋白印迹实验代表图。b. 蛋白印迹实验统计图，敲低 LILRB4 后，p-SHP2 水平显著下降。c. 蛋白印迹实验统计图，敲低 LILRB4 后，CaMK1 水平显著下降。d. 蛋白印迹实验统计图，敲低 LILRB4 后，p-SHP2 水平显著下降。（*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 表示有显著差异。）

蛋白印迹结果表明，在 MM 中，LILRB4 对于 SHP2 的表达水平没有明显影响，即 LILRB4 对于 MM 的发生发展与招募的 SHP2 的量无关；但是其能够调控 SHP2 的磷酸化，并以此调控钙通路的表达来影响 CaMK1 的表达水平，最终达到调控 CREB 的磷酸化水平从而直接影响基因转录。此外，CREB 调控 B 细胞发育进程并与 B 细胞相关肿瘤发生相关的机制已有文献报道^[46]。因此，LILRB4 能够通过 p-SHP2-CaMK1-p-CREB 通路来调控 MM 的发生发展。

3.6 本章小结

在本章节中, 我们利用 shRNA 技术和慢病毒感染技术成功构建了不同 MM 疾病亚型的稳定敲低 LILRB4 的多发性骨髓瘤细胞系。同时, 利用流式细胞术、吉姆萨染色、蛋白印迹、信号通路分析等技术, 我们发现 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中起到重要作用, 相关作用主要体现在 LILRB4 敲低后 MM 细胞的增殖受抑制、凋亡增多、G2/M 期频率降低、恶性克隆能力减弱等。此外, 我们首次报道了 LILRB4 能够经 SHP2 的磷酸化调控 CaMK1 水平和 CREB 的磷酸化, 且该调控机制在 MM 发生发展中起到重要作用 (图 17)。此外, 利用通路的深度分析, 我们还发现了多条围绕 LILRB4-SHP2-CaMK-CREB 通路改变可能发生改变的其他通路, 其中不乏文献报道的导致多发性骨髓瘤的潜在病因通路。这些结果均体现出 LILRB4 在多发性骨髓瘤发生发展中的重要作用以及作为 MM 患者治疗靶点的潜力。

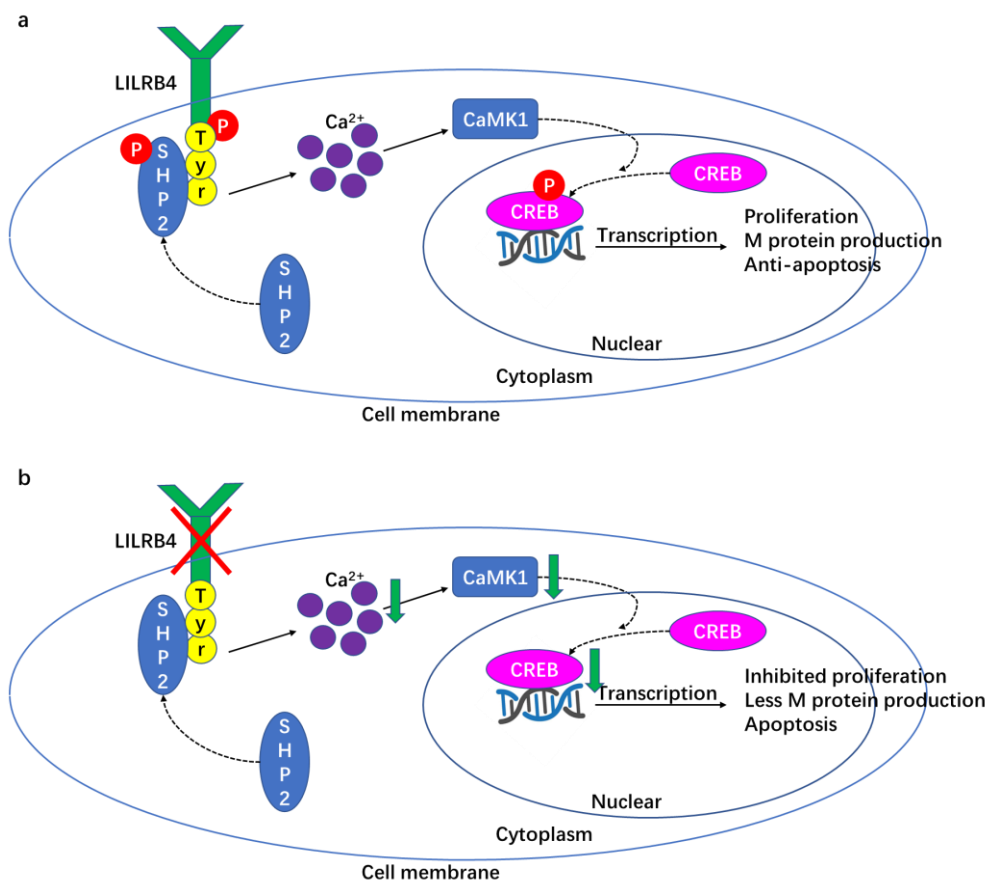


图 17: LILRB4 在 MM 中的调控机制模式图

Figure 17: The regulatory mechanism of LILRB4 in MM

a. LILRB4 促进 MM 发生发展的调控机制。b. 敲低 LILRB4 后, MM 发生发展受到抑制的机制。

第四章 讨论

在过去的数十年中,肿瘤细胞的耐药性对传统化疗手段治疗恶性肿瘤造成了一定的困难,使得许多多发性骨髓瘤患者预后效果差且容易复发。近些年随着嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 疗法等免疫治疗技术的成熟,免疫治疗为恶性肿瘤的治疗提供了新的思路以及方法,而本文所探究的白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4 (LILRB4) 作为一种对于多发性骨髓瘤 (MM) 发生发展有着重要调控作用的细胞膜表面高表达的蛋白受体,恰好可能成为免疫治疗的重要靶点。特别是近两年来,多篇文献报道了针对 LILRB4 所开发的免疫疗法对于治疗急性髓系细胞白血病和急性单核细胞白血病具有一定疗效^{[66][67]},这些结果为 LILRB4 成为 MM 的重要免疫治疗靶点提供了一定的理论基础,也为本课题未来的研究方向提供了一定的思路与借鉴意义。

然而,在将 LILRB4 作为多发性骨髓瘤的免疫治疗靶点之前,我们认为还有多个科学问题需要进一步的研究。

第一,在本文中我们成功证明了 LILRB4 在 MM 发生发展中有重要调控作用,且是通过相关信号通路实现的;但是 LILRB4 作为一个在正常浆细胞中也表达的免疫抑制性受体,为何在多发性骨髓瘤中却表现出促肿瘤作用?两者功能是否一致?这是一个值得探讨的问题。尤其是最新的研究发现,LILRB4 胞内段的免疫受体酪氨酸抑制序列 (ITIM) 的不同位点的酪氨酸磷酸化可能造成其发挥的功能不同^[34],而且在急性髓系白血病中部分位点的酪氨酸磷酸化介导了白血病细胞的侵袭和浸润^[68]。因此,我们认为 LILRB4 胞内段的 ITIM 不同位点的酪氨酸磷酸化可能与 MM 的发生发展相关。同时,异常的磷酸化或者去磷酸化是否会导致正常浆细胞向多发性骨髓瘤细胞恶性转变,这也是值得探讨的问题,可以进一步明确 LILRB4 的磷酸化修饰在 MM 发生发展中的作用。此外,LILRB4 蛋白在多发性骨髓瘤细胞中是否存在突变体、截短体,这也需要进一步观察。

第二,在本研究中我们发现敲低 LILRB4,降低 LILRB4 蛋白在多发性骨髓瘤细胞细胞膜上的表达后,MM 的发生发展受到显著抑制。而在一项关于黏膜皮肤淋巴结综合症 (又称川崎病, MCLS) 急性期患者的研究中,研究人员发现 LILRB4 在不明原因的抗体异常分泌的浆细胞上高表达,而患者在接受高剂量静脉丙种球蛋白 (IVIG) 治疗来纠正自身免疫系统紊乱后,LILRB4 在异常浆细胞上的表达量会有所下降;与之相比,LILRB1 表达量不论是在正常浆细胞上还是异常浆细胞上都处于相对稳定的状态^[38]。这给我们提示 LILRB4 可能在浆细胞非正常发育以及浆细胞异常激活中存在着特殊的作用,而且这些作用与 LILRB4 表达量的高低可能存在着联系。因此,我们认为有必要对于浆细胞发育以及激活过程中 LILRB4 的作用和表达量的变化进行进一步研究,并且进一步考量其与多发性骨髓瘤,这种以浆细胞恶性增殖并大量分泌异常免疫蛋白为特征的血液系统恶性肿瘤之间的关系。

第三,在对 LILRB4 相关通路进行深度分析时,我们发现敲低 LILRB4 不但会影响 NF κ B 等通路,还会影响与多发性骨髓瘤细胞黏附相关的信号通路,这提示我们有必要研究 LILRB4 在 MM 细胞黏附和交流中的作用。有趣的是,相关研究明确指出 MM 患者骨髓样本来源的骨髓瘤细胞中 CXCR4, CD49d 和 CD44 等与细胞黏附相关的标志物表达水平显著升高,而且活动性 MM 患者相较于长期受控的 MM 患者,这些标志物表达水平更高,显示细胞黏附分子表达量的高低直接与 MM 的进展相关^[69]。而在我们的实验结果中,敲低 LILRB4 后,MM 细胞的恶性克隆能力确实明显下降。因此,进一步探究 LILRB4 在 MM 细胞黏附和交流中的作用是非常有必要的。

第四,多发性骨髓瘤作为一种与骨髓微环境密切相关的恶性肿瘤^[16],LILRB4 是否在其

中起到一定的作用也是值得探讨和研究。有文献报导, LILRB 家族成员通过 SHP-1 介导与 RANKL 等一起调节破骨细胞前体的分化^[70]。也有研究表明 MM 细胞分泌 RANKL 导致破骨细胞通过 NF κ B 途径活化, 导致骨吸收和骨形成之间的失衡, 从而破坏骨髓微环境^[20]。而在我们的研究中, LILRB4 可能通过 SHP2 调控 MM 细胞的 NF κ B 通路, 而 RANKL 作为核因子 κ B 的配体显然也受到 LILRB4 的调控。因此, LILRB4 极有可能作为 MM 细胞中的重要调控因子来控制 RANKL 的分泌, 从而调节破骨细胞前体的分化以及诱导破骨细胞 NF κ B 途径活化, 最终导致骨平衡被破坏, 造成多发性骨髓瘤患者出现骨痛、骨平衡失调等严重的骨损伤症状。所以, 我们认为探究 LILRB4 在多发性骨髓瘤和骨髓微环境间的密切关系中可能发挥重要作用。

第五, 多发性骨髓瘤细胞是否会通过 LILRB4 相关通路调控所在的免疫微环境, 从而达到免疫逃逸的目的? 如很多肿瘤一样, 多发性骨髓瘤细胞也能够与免疫细胞互动从而实现免疫逃逸^[71]。相关报告显示, MM 患者体内 T 细胞数值和功能皆存在异常^[72], 而且 MM 患者体内循环中的可溶性 MHC I 类多肽相关序列 A(MICA)的水平会升高, 这会诱导 NKG2D 的下调和 NK 细胞的细胞毒性受损, 从而导致 MM 细胞逃避免疫监测^[73]。值得关注的是, 作为能够与 MHC I 类分子相结合的受体, LILRB4 也被发现能够协助肿瘤细胞实现免疫逃逸。有研究指出, 在急性髓系细胞白血病中, LILRB4 与载脂蛋白 E (APOE) 结合后通过招募 SHP2 并使其磷酸化来调控 NF κ B 通路下游的尿激酶受体 (uPAR) 并使得与 uPAR 相关的精氨酸酶-1 (Arginase-1) 分泌上升从而抑制 T 细胞增殖来达到免疫逃逸^[36]。由此可见, 研究 LILRB4 在多发性骨髓瘤中调控免疫微环境作用是很有必要的一项工作。

第六, 载脂蛋白 E (APOE) 作为 LILRB4 目前已知的配体^[36], 其参与脂蛋白的转化与代谢过程, 有研究显示, APOE 通过 APOE 受体 ApoER2 和极低密度脂蛋白受体 (VLDLR) 在分离的巨噬细胞中诱导抗炎表型且与个体血脂水平相关^[74]。值得注意的是, 有研究显示 MM 细胞具有异常高的葡萄糖摄入量, 而且这些细胞通常在脂肪含量相对较高的微环境中被发现 (如老年人的骨髓中)^[75]; 同时, MM 的高发与超重之间存在关联且肥胖是 MM 的不良预后因素^[76]。此外, 体外培养从 MM 患者体内分离出的骨髓脂肪组织显示其能够通过瘦素相关途径来支持 MM 生长并增强耐药性, 同时抑制凋亡^[77]。结合以上相关研究, 我们认为可以从 APOE 与 LILRB4 互作为切入点, 进一步探究骨髓脂肪组织代谢与多发性骨髓瘤代谢和多发性骨髓瘤发生发展间的关系, 从而阐明代谢与多发性骨髓瘤进展之间的关系。

第七, LILRB4 作为多发性骨髓瘤治疗靶点的安全性还需要进一步的实验验证。LILRB4 最初作为一种免疫抑制性受体被发现调控 T 细胞命运与 T 细胞激活中有重要作用^[78], 且相关调控作用与 NF κ B、BCL6、SOCS1 等多种重要蛋白以及 miR-21、miR-30b 和 miR-155 等 miRNA 相关^{[79][80]}。在这些调控途径的共同作用下, LILRB4 可以抑制 T 细胞的激活, 而这与免疫耐受息息相关, 例如经过 ILT3-Fc 治疗的 NOD / SCID 小鼠的胰岛同种异体移植排斥能够被显著抑制^[81]。因此, 以 LILRB4 为靶点设计的免疫治疗药物如单克隆抗体、CAR-T 细胞等是否会对 T 细胞的发育和激活造成影响都还需要进一步的验证。此外, 靶向 LILRB4 这类免疫检查点的免疫治疗方案是否会引发细胞因子风暴对患者造成伤害也是需要考量的一个方面。有文献报告免疫检查点抑制剂派姆单抗 (Pembrolizumab) 会诱导吞噬细胞和淋巴细胞及组织的增生, 导致嗜血性淋巴细胞增多症 (HLH) 的发展, 从而危及患者生命^[82]。综上, 我们认为 LILRB4 作为多发性骨髓瘤治疗靶点的安全性还需要进一步的实验验证。

第八, LILRB4 自身作为一种细胞膜蛋白, 其具有便于检测和便于靶向的特性, 就如在本研究中所示, 其可以高效快速的被流式细胞术检测出表达量的高低。进一步结合本文中相关机制的探究, 我们认为未来可以进一步与临床多发性骨髓瘤患者样本数据相结合, 分析 LILRB4 与 MM 患者生存期和预后效果之间的联系, 以期探明 LILRB4 是否可以作为一项合适的临床指标来表征 MM 患者的病情进展与预后情况, 以便更好地指导和改善临床治

疗策略与效果，从而使得治疗效果更上一层楼。

总而言之，LILRB4 可以作为多发性骨髓瘤的一个潜在治疗靶点和临床指标；同时，LILRB4 与多发性骨髓瘤之间的关系还需要从 LILRB4 自身的磷酸化或突变、LILRB4 表达量与浆细胞的发育和激活、LILRB4 与 MM 细胞黏附、LILRB4 与 MM 骨髓微环境、LILRB4 与 MM 免疫微环境、LILRB4 与 MM 代谢微环境等多方面进行更加深入的探究。

第五章 结论

多发性骨髓瘤（MM），作为一种难以治愈的浆细胞恶性增殖所导致的血液系统肿瘤，其复杂的病因和发病机制使得现有治疗手段疗效不佳，患者预后不良且容易复发。而随着免疫治疗的出现和发展，MM 的治疗迎来了新的思路和方法。在本研究中，我们首次报道了白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4（LILRB4）有潜力作为多发性骨髓瘤的治疗靶点。LILRB4 对于 MM 细胞的增殖、恶性克隆起到助推作用；敲低 LILRB4 可以显著降低 G2/M 期细胞的占比并促进 MM 细胞的凋亡。进一步研究发现 LILRB4 可通过调控 SHP2 的磷酸化和 CaMK1 的表达水平来控制 CREB 的磷酸化，进而促进 MM 的发生发展；而且这一强大功能在人来源的 IgG 型多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8226 和人来源的 IgA 型多发性骨髓瘤细胞 ARP-1 中皆被证实，体现了 LILRB4 作为多发性骨髓瘤潜在治疗靶点的普适性。此外，通过相关通路的深度分析，我们还发现靶向 LILRB4 可能还可以直接干扰以 MyD88 突变为代表的 MM 发生的相关通路，为临床治疗提供了一定的思路。可惜的是，受限于实验时间和实验条件，LILRB4 自身的磷酸化或突变同 MM 的关系、LILRB4 表达量和浆细胞发育和激活的关系、LILRB4 与 MM 细胞黏附的关系、LILRB4 同 MM 骨髓微环境的关系、LILRB4 和 MM 免疫微环境的关系、LILRB4 与 MM 代谢微环境的关系，这些与肿瘤发生发展关系紧密的方面在本文中并没有得到详尽的解释，这也给我们未来的研究提出了新的方向以及挑战。此外，LILRB4 在最终成为多发性骨髓瘤的免疫治疗靶点前其安全性还需得到进一步的验证，这也需要 we 和临床紧密合作来分析 LILRB4 与 MM 患者生存期和预后效果之间的联系以及用药对其的影响。

综上所述，白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4（LILRB4）在 MM 细胞的恶性增殖、分化和命运决定中发挥重要作用；作为表面受体其有成为多发性骨髓瘤潜在治疗靶点的可能，但相关机制和治疗手段还需进一步深入探索。

参考文献

- [1] Rajkumar S. V. (2018). Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology*, 93(8), 981–1114. doi:10.1002/ajh.25117
- [2] Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G., & Anderson, K. C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet*, 324-39.
- [3] Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.
- [4] Barkal, A. A., Weiskopf, K., Kao, K. S., Gordon, S. R., Rosental, B., Yiu, Y. Y., ... & McKenna, K. M. (2018). Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nature immunology*, 19(1), 76.
- [5] Rasche, L., Weinhold, N. Pathogenese des Multiplen Myeloms. *Internist* **60**, 3–9 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00108-018-0529-8>
- [6] Landgren O, Zeig-Owens R, Gircz O, et al. Multiple Myeloma and Its Precursor Disease Among Firefighters Exposed to the World Trade Center Disaster. *JAMA Oncol*. 2018;4(6):821–827. doi:10.1001/jamaoncol.2018.0509
- [7] Went, M., Sud, A., Försti, A. *et al.* Identification of multiple risk loci and regulatory mechanisms influencing susceptibility to multiple myeloma. *Nat Commun* **9**, 3707 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04989-w>
- [8] Hemminki, K., Sundquist, J. and Lorenzo Bermejo, J. (2008), Familial Risks for Cancer as the Basis for Evidence-Based Clinical Referral and Counseling. *The Oncol*, 13: 239-247. doi:10.1634/theoncologist.2007-0242
- [9] Nair, S. , Branagan, A. R. , Liu, J. , Boddupalli, C. S. , & Dhodapkar, M. V. . (2016). Clonal immunoglobulin against lysolipids in the origin of myeloma. *New England Journal of Medicine*, 374(6), 555-561.
- [10] Bosseboeuf, A. , Feron, D. , Tallet, A. , Cédric Rossi, & Hermouet, S. . (2017). Monoclonal igg in mgus and multiple myeloma targets infectious pathogens. *JCI insight*. **2**(19).
- [11] Mcshane, C. M. , Murray, L. J. , Landgren, O. , O'Rourke, M. A. , Korde, N. , & Kunzmann, A. T. , et al. (2014). Prior autoimmune disease and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: a systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(2), 332-342.
- [12] Morgan, G. J. , & Leo, R. . (2018). Maintaining therapeutic progress in multiple myeloma by integrating genetic and biological advances into the clinic. *Expert Review of Hematology* **11**(7): 513-523.
- [13] Walker, B.A., Mavrommatis, K., Wardell, C.P. *et al.* A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* **33**, 159–170 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0196-8>
- [14] Chng, W., Huang, G., Chung, T. *et al.* Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* **25**, 1026–1035 (2011). <https://doi.org/10.1038/leu.2011.53>
- [15] Chapman, M., Lawrence, M., Keats, J. *et al.* Initial genome sequencing and analysis of

- multiple myeloma. *Nature* **471**, 467–472 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09837>
- [16] Manier, S. , Kawano, Y. , Bianchi, G. , Roccaro, A. M. , & Ghobrial, I. M. . (2016). Cell autonomous and microenvironmental regulation of tumor progression in precursor states of multiple myeloma. *Current Opinion in Hematology*, 23(4), 426-433.
- [17] Noll, J. E. , Williams, S. A. , Tong, C. M. , Wang, H. , Quach, J. M. , & Purton, L. E. , et al. (2014). Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*, 99(1), 163-171.
- [18] Tanno, T. , Lim, Y. , Wang, Q. , Chesi, M. , & Matsui, W. . (2013). Growth differentiating factor 15 enhances the tumor initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood*, 123(5), 725-33. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-524025>
- [19] Roccaro, Aldo M., Mishima, Yuji, Sacco, Antonio, Moschetta, Michele, Tai, Yu-Tzu, & Shi, Jiantao, et al. (2015). Cxcr4 regulates extra-medullary myeloma through epithelial-mesenchymal-transition-like transcriptional activation. *Cell Reports* **12**(4): 622-635.
- [20] Kawano, Y., Moschetta, M., Manier, S., Glavey, S., Görgün, G.T., Roccaro, A.M., Anderson, K.C. and Ghobrial, I.M. (2015), Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev*, 263: 160-172. doi:10.1111/imr.12233
- [21] 中国医师协会血液科医师分会, 中华医学会血液学分会, & 中国多发性骨髓瘤工作组. (2013). 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2013 年修订). *中华内科杂志*, 52(9), 791–795.
- [22] 武永吉, & 李惠鹏. (1992). 125 例多发性骨髓瘤临床分析. *中华血液学杂志*(7), 349-351.
- [23] 刘淑俊, & 马明信. (1992). 多发性骨髓瘤患者骨损害意义的评价. *中华血液学杂志*, 013(007), 352-354.
- [24] 武淑兰. (2003). 浆细胞病 : 基础与临床. 浆细胞病--基础与临床. 北京大学医学出版社.
- [25] Zaidi, Adnan A, & Vesole, David H. (2010). Multiple myeloma: an old disease with new hope for the future. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 51(5), 273-285.
- [26] Cho, S. F., Lin, L., Xing, L., Yu, T., Wen, K., Anderson, K. C., & Tai, Y. T. (2017). Monoclonal Antibody: A New Treatment Strategy against Multiple Myeloma. *Antibodies*, 6(4), 18.
- [27] Tai, Y. T., Mayes, P. A., Acharya, C., Zhong, M. Y., Cea, M., Cagnetta, A., ... & Hoang, B. (2014). Novel anti - B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. *Blood*, 123(20), 3128-3138.
- [28] Siegel, D. S. , Dimopoulos, M. A. , Ludwig, H. , Facon, T. , & Stewart, A. K. . (2018). Improvement in overall survival with carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(8), 728-734.
- [29] Bazarbachi, A.H., Al Hamed, R., Malard, F. *et al.* Relapsed refractory multiple myeloma: a comprehensive overview. *Leukemia* **33**, 2343–2357 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0561-2>
- [30] Kazandjian D. (2016). Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in oncology*, 43(6), 676–681. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.11.004>
- [31] Perincheri, S., Torres, R., Tormey, C. A., Smith, B. R., Rinder, H. M., & Siddon, A. J. (2016).

- Daratumumab interferes with flow cytometric evaluation of multiple myeloma.
- [32] Kang, X., Kim, J., Deng, M., John, S., Chen, H., Wu, G., ... & Zhang, C. C. (2016). Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell cycle*, 15(1), 25-40.
- [33] Barkal, A. A., Weiskopf, K., Kao, K. S., Gordon, S. R., Rosental, B., Yiu, Y. Y., ... & McKenna, K. M. (2018). Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nature immunology*, 19(1), 76.
- [34] Park, M., Liu, R. W., An, H., Geczy, C. L., Thomas, P. S., & Tedla, N. (2017). A dual positive and negative regulation of monocyte activation by leukocyte Ig-like receptor B4 depends on the position of the tyrosine residues in its ITIMs. *Innate Immunity*, 23(4), 381–391. <https://doi.org/10.1177/1753425917699465>
- [35] Liu, X., Yu, X., Xie, J., Zhan, M., Yu, Z., Xie, L., Zeng, H., Zhang, F., Chen, G., Yi, X., & Zheng, J. (2015). ANGPTL2/LILRB2 signaling promotes the propagation of lung cancer cells. *Oncotarget*, 6(25), 21004–21015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4217>
- [36] Deng, M., Gui, X., Kim, J., Xie, L., Chen, W., Li, Z., ... & Lu, Z. (2018). LILRB4 signalling in leukaemia cells mediates T cell suppression and tumour infiltration. *Nature*, 562(7728), 605.
- [37] Belkin, D. , Torkar, M. , Chang, C. , Barten, R. , Tolaini, M. , & Haude, A. , et al. (2003). Killer cell ig-like receptor and leukocyte ig-like receptor transgenic mice exhibit tissue- and cell-specific transgene expression. *Journal of Immunology*, 171(6), 3056-3063.
- [38] Akiko, Sugahara-Tobinai, Masanori, Inui, Takaya, & Metoki, et al. (2019). Augmented ilt3/lilrb4 expression of peripheral blood antibody secreting cells in the acute phase of kawasaki disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*.
- [39] Bam, R., Khan, S., Ling, W., Randal, S. S., Li, X., Barlogie, B., Edmondson, R., & Yaccoby, S. (2015). Primary myeloma interaction and growth in coculture with healthy donor hematopoietic bone marrow. *BMC cancer*, 15, 864. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1892-7>
- [40] Munitz, A., Cole, E. T., Beichler, A., Groschwitz, K., Ahrens, R., Steinbrecher, K., Willson, T., Han, X., Denson, L., Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2010). Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) negatively regulates macrophage activation in experimental colitis. *Gastroenterology*, 139(2), 530–541. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.006>
- [41] Jonathan J Keats, David W Craig, Winnie Liang, Yellapantula Venkata, Ahmet Kurdoglu, Jessica Aldrich, Daniel Auclair, Kristi Allen, Beverly Harrison, Scott Jewell, Pamela G. Kidd, Mick Correll, Sundar Jagannath, David S. Siegel, Ravi Vij, Gregory Orloff, Todd M. Zimmerman, Mmrf CoMMpass Network, Walter Capone, John Carpten, Sagar Lonial; Interim Analysis Of The Mmrf Commpass Trial, a Longitudinal Study In Multiple Myeloma Relating Clinical Outcomes To Genomic and Immunophenotypic Profiles. *Blood* 2013; 122 (21): 532. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.532.532>
- [42] Chen, H. M., van der Touw, W., Wang, Y. S., Kang, K., Mai, S., Zhang, J., Alsina-Beauchamp, D., Duty, J. A., Mungamuri, S. K., Zhang, B., Moran, T., Flavell, R., Aaronson, S., Hu, H. M., Arase, H., Ramanathan, S., Flores, R., Pan, P. Y., & Chen, S. H. (2018). Blocking immunoinhibitory receptor LILRB2 reprograms tumor-associated myeloid cells and promotes antitumor immunity. *The Journal of clinical investigation*, 128(12), 5647–5662.

- <https://doi.org/10.1172/JCI97570>
- [43] Zhang, F., Zheng, J., Kang, X. et al. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in cancer development. *Sci. China Life Sci.* 58, 1216–1225 (2015).
<https://doi.org/10.1007/s11427-015-4925-1>
- [44] Colovai, A.I., Tsao, L., Wang, S., Lin, H., Wang, C., Seki, T., Fisher, J.G., Menes, M., Bhagat, G., Alobeid, B. and Suciu - Foca, N. (2007), Expression of inhibitory receptor ILT3 on neoplastic B cells is associated with lymphoid tissue involvement in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry*, 72B: 354-362. doi:10.1002/cyto.b.20164
- [45] Bofill-De Ros, X., & Gu, S. (2016). Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods* (San Diego, Calif.), 103, 157–166.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.003>
- [46] Naji, A., Menier, C., Maki, G. et al. Neoplastic B-cell growth is impaired by HLA-G/ILT2 interaction. *Leukemia* 26, 1889–1892 (2012). <https://doi.org/10.1038/leu.2012.62>
- [47] Kreso, A. and John E. Dick (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 14(3): 275-291.
- [48] Eun, K., Ham, S. W., & Kim, H. (2017). Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB reports*, 50(3), 117–125.
<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.3.222>
- [49] 夏雯, 杨月艳, & 朱光荣. . 多发性骨髓瘤浆细胞核异常形态的意义. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 030(6), 853–855.
- [50] 郑正津, 宋清晓, 王少元, 等. 退化细胞 ZAP-70 在慢性淋巴细胞白血病的表达及预后影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, (20) :1527–1529.
DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.20.020.
- [51] Quanzheng, Li, Gongchang, Wei, & Tao. (2018). Leukocyte immunoglobulin-like receptor b4 (lilrb4) negatively mediates the pathological cardiac hypertrophy by suppressing fibrosis, inflammation and apoptosis via the activation of NF- κ B signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 509(1): 16-23.
- [52] Coulombe, G., & Rivard, N. (2015). New and Unexpected Biological Functions for the Src-Homology 2 Domain-Containing Phosphatase SHP-2 in the Gastrointestinal Tract. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2(1), 11–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.11.001>
- [53] Beldi-Ferchiou, A., Skouri, N., Ben Ali, C., Safra, I., Abdelkefi, A., Ladeb, S., Mrad, K., Ben Othman, T., & Ben Ahmed, M. (2017). Abnormal repression of SHP-1, SHP-2 and SOCS-1 transcription sustains the activation of the JAK/STAT3 pathway and the progression of the disease in multiple myeloma. *PloS one*, 12(4), e0174835.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174835>
- [54] Zhao, M., Guo, W., Wu, Y., Yang, C., Zhong, L., Deng, G., Zhu, Y., Liu, W., Gu, Y., Lu, Y., Kong, L., Meng, X., Xu, Q., & Sun, Y. (2019). SHP2 inhibition triggers anti-tumor immunity and synergizes with PD-1 blockade. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 9(2), 304–315.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.08.009>
- [55] Mambetsariev, N., Lin, W. W., Stunz, L. L., Hanson, B. M., Hildebrand, J. M., & Bishop, G. A. (2016). Nuclear TRAF3 is a negative regulator of CREB in B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(4), 1032–1037.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1514586113>

- [56] Xia, J., Wishart, D. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat Protoc* 6, 743–760 (2011).
<https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>
- [57] Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using metaboanalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68, e86. doi: 10.1002/cpbi.86
- [58] Kahl, C. R. and A. R. Means (2004). Regulation of Cyclin D1/Cdk4 Complexes by Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase I. *Journal of Biological Chemistry* 279(15): 15411-15419.
- [59] Ramakrishnan, V., Painuly, U., Kimlinger, T., Haug, J., Rajkumar, S. V., & Kumar, S. (2014). Inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in multiple myeloma. *Leukemia*, 28(7), 1519–1528. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.2>
- [60] Thakur, K. K. , Bolshette, N. B. , Trandafir, C. , Jamdade, V. S. , Istrate, A. , & Gogoi, R. , et al. (2015). Role of toll-like receptors in multiple myeloma and recent advances. *Experimental Hematology* 43(3): 158-167.
- [61] Cao, X., Meng, Q., Cai, H. et al. Detection of MYD88 L265P and WHIM-like CXCR4 mutation in patients with IgM monoclonal gammopathy related disease. *Ann Hematol* 96, 971–976 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00277-017-2968-z>
- [62] Kang, X., Cui, C., Wang, C., Wu, G., Chen, H., Lu, Z., Chen, X., Wang, L., Huang, J., Geng, H., Zhao, M., Chen, Z., Müschen, M., Wang, H. Y., & Zhang, C. C. (2018). CAMKs support development of acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0574-8>
- [63] Alexander David Barrow, & Trowsdale, J. . (2006). You say itam and i say itim, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *European Journal of Immunology*, 36(7).
- [64] Pasquier, B. , Launay, P. , Kanamaru, Y. , Moura, I. , Pfirsch, S. , & Ruffie, C. , et al. (2005). Identification of fcγRI as an inhibitory receptor that controls inflammation dual role of fcγRI itam. *Immunity* 22(1): 31-42.
- [65] Hamerman, J. A., Tchao, N. K., Lowell, C. A., & Lanier, L. L. (2005). Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nature immunology*, 6(6), 579–586. <https://doi.org/10.1038/ni1204>
- [66] John, S., Chen, H., Deng, M., Gui, X., Wu, G., Chen, W., Li, Z., Zhang, N., An, Z., & Zhang, C. C. (2018). A Novel Anti-LILRB4 CAR-T Cell for the Treatment of Monocytic AML. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(10), 2487–2495. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.001>
- [67] Gui, X., Deng, M., Song, H., Chen, Y., Xie, J., Li, Z., He, L., Huang, F., Xu, Y., Anami, Y., Yu, H., Yu, C., Li, L., Yuan, Z., Xu, X., Wang, Q., Chai, Y., Huang, T., Shi, Y., Tsuchikama, K., ... An, Z. (2019). Disrupting LILRB4/APOE Interaction by an Efficacious Humanized Antibody Reverses T-cell Suppression and Blocks AML Development. *Cancer immunology research*, 7(8), 1244–1257. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0036>
- [68] Li, Z., Deng, M., Huang, F. et al. LILRB4 ITIMs mediate the T cell suppression and infiltration of acute myeloid leukemia cells. *Cell Mol Immunol* 17, 272–282 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0321-2>
- [69] Waldschmidt, J.M., Simon, A., Wider, D., Müller, S.J., Follo, M., Ihorst, G., Decker, S.,

- Lorenz, J., Chatterjee, M., Azab, A.K., Duyster, J., Wäsch, R. and Engelhardt, M. (2017), CXCL12 and CXCR7 are relevant targets to reverse cell adhesion - mediated drug resistance in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 179: 36-49. doi:10.1111/bjh.14807
- [70] Mori, Y., Tsuji, S., Inui, M., Sakamoto, Y., Endo, S., & Ito, Y., et al. (2008). Inhibitory Immunoglobulin-Like Receptors LILRB and PIR-B Negatively Regulate Osteoclast Development. *The Journal of Immunology* 181(7): 4742-4751.
- [71] Kawano, Y., Roccaro, A., Azzi, J., & Ghobrial, I. (2017). Multiple myeloma and the immune microenvironment. *Current Cancer Drug Targets* (2017) 17: 806. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170214102301>
- [72] Dosani, T., Carlsten, M., Maric, I., & Landgren, O. (2015). The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of myeloma and their uses in immunotherapies. *Blood cancer journal*, 5(4), e306. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.32>
- [73] Jinushi, M., Vanneman, M., Munshi, N. C., Tai, Y. T., Prabhala, R. H., Ritz, J., Neuberg, D., Anderson, K. C., Carrasco, D. R., & Dranoff, G. (2008). MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(4), 1285–1290. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711293105>
- [74] Baitsch, D., Bock, H. H., Engel, T., Telgmann, R., Müller-Tidow, C., Varga, G., Bot, M., Herz, J., Robenek, H., von Eckardstein, A., & Nofer, J. R. (2011). Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 1160–1168. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.222745>
- [75] Masarwi, M., DeSchiffart, A., Ham, J., & Reagan, M. R. (2019). Multiple Myeloma and Fatty Acid Metabolism. *JBM plus*, 3(3), e10173. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10173>
- [76] Wallin, A., & Larsson, S. C. (2011). Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies. *European Journal of Cancer* 47(11): 1606-1615.
- [77] Liu, Z., Xu, J., He, J., Liu, H., Lin, P., Wan, X., Navone, N. M., Tong, Q., Kwak, L. W., Orlowski, R. Z., & Yang, J. (2015). Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget*, 6(33), 34329 – 34341. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6020>
- [78] Suciu-Foca, N., & Cortesini, R. (2007). Central role of ilt3 in the t suppressor cell cascade. *Cellular Immunology* 248(1): 59-67.
- [79] Vlad, G., & Suciu-Foca, N. (2012). Induction of antigen-specific human T suppressor cells by membrane and soluble ILT3. *Experimental and Molecular Pathology* 93(3): 294-301.
- [80] Chang, C. C., Zhang, Q. Y., Liu, Z., Clynes, R. A., Suciu-Foca, N., & Vlad, G. (2012). Downregulation of Inflammatory MicroRNAs by Ig-like Transcript 3 Is Essential for the Differentiation of Human CD8⁺ T Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* 188(7): 3042.
- [81] Vlad, G., D'Agati, V. D., Zhang, Q. Y., Liu, Z., Ho, E. K., Mohanakumar, T., Hardy, M. A., Cortesini, R., & Suciu-Foca, N. (2008). Immunoglobulin-like transcript 3-Fc suppresses T-cell responses to allogeneic human islet transplants in hu-NOD/SCID mice. *Diabetes*, 57(7), 1878–1886. <https://doi.org/10.2337/db08-0054>
- [82] Kalmuk, J., Puchalla, J., Feng, G., Giri, A., & Kaczmar, J. (2020). Pembrolizumab-induced Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: an immunotherapeutic challenge. *Cancers of the head & neck*, 5, 3. <https://doi.org/10.1186/s41199-020-0050-3>

谢辞

如梦令·科研记事

远眺余辉落日，近寻感觉启示。兴尽夜归宿，突发奇想一处。美哉！美哉！缘来尽在此中。

经过了这一年的毕业设计，我的科研思维、实验能力和课题推进的能力都得到了很大提升。在此，首先感谢上海交通大学医学院病理生理学系，细胞分化与凋亡教育部重点实验室郑俊克研究员对我的帮助与科研思维上的指导，一日为师百日恩；同时，也感谢实验室陈迟琪师兄对于我实验技术的指导和帮助，您扎实的实验功底和高效的课题推进能力令我非常佩服，也将是我未来长期的学习对象。此外，我还想感谢课题组副研究员于卓老师、助理研究员张亚萍老师以及技术员谢莉老师，感谢你们对我实验提出的建议以及在试剂耗材和实验仪器设备使用上提供的指导和帮助。最后，感谢课题组赫肖肖师姐、来晓云师姐、黄丹师姐、陈露师姐、蒋宇师兄以及远赴大洋彼岸继续深造的谷浩师兄、郝晓鑫师兄对我的帮助，你们对我实验疑问的小小解答都让我如获至宝。最后的最后，我还想感谢 2016 级生物医学科学专业全体老师和同学，你们与我四年的相伴与成长让我完成了从知识到人生阅历的双重蜕变，祝愿生物医学科学专业可以越办越好！也希望我研究生阶段的深造能够更上一层楼！

THE ROLE OF LILRB4 IN THE DEVELOPMENT OF MULTIPLE MYELOMA

Multiple myeloma (MM) is a hematopoietic malignancy caused by the malignant proliferation of plasma cells, which often destroys normal hematopoiesis and osteogenic differentiation in patients. Meanwhile, the large amount of M protein secreted by myeloma cells usually accumulate in kidneys inducing impaired renal function. Moreover, due to the erosion of the bone marrow niche induced by MM cells, bone pain, even spontaneous fractures occur in about 70% of MM patients. What's more, abnormal cloning of plasma cells can induce abnormal proliferation and deviant differentiation of B cells, leading to infection and severe anemia in MM patients. Epidemiological investigations show that MM accounts for 1% of all malignant tumors and about 10% of all hematological malignancies. In the United States, more than 30,000 new cases of MM are diagnosed each year, and more than 12,000 patients die from this disease, showing the danger of MM. Meanwhile, the pathogenesis of MM is complex and diverse. It is not only closely related to various changes at the genetic level such as chromosomal heterotopy and TP53 mutation, but also has a tight connection with the bone marrow microenvironment. Of note, there are three main treatment methods for MM: chemotherapy, bone marrow transplantation and immunotherapy. However, due to drug-resistant MM clones, MM are often refractory and easy to relapse, causing the relapse-free rate for 10 to 15 years is only about 10-15% in MM patients. More terribly, the second-generation proteasome inhibitor lenalidomide (LEN) has been found to cause severe venous thrombosis in MM patients, which overshadows the prospect of MM treatments. Hence, it is quite important to find new therapeutic targets and explore the regulatory mechanisms of it.

Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B (LILRB) is a member of the leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR) family, which consists of the extracellular immunoglobulin domain, the transmembrane domain and the cytoplasmic immune receptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM). It is often expressed on immune cells and binds to MHC I on antigen-presenting cells, thereby suppressing immune response stimulus signals through its ITIM sequence. In recent years, some studies explore that the intracellular ITIM sequence of LILRB can produce immune activation in some cases, which is related to mutation at Tyr 337, 389 and 419. Interestingly, according to TCGA data, LILRB4 is usually highly expressed in bone marrow aspirations obtained from MM patients, and the higher the expression level of LILRB4, the shorter the survival rate of MM patients. In addition, when MM cells are co-cultured with bone marrow stromal cells, the expression level of LILRB4 in MM cells will increase. These phenomena indicate the function of LILRB4 may not only be an immunosuppressor, but may play a key role in the development of MM as well.

In the previous study of our research group, the role of LILRB4 in the development of acute myeloid leukemia (AML) has been elucidated indicating LILRB4 may be the potential therapeutic targets for hematological malignancies. What's more, preliminary experiments show that LILRB4

is expressed highly in the MM cell line ARP-1, suggesting that the LILRB4 may play a vital role in the development of MM.

Thus, this article intends to explore the role of LILRBs in the development of MM. Firstly, we select two different types of MM cell lines RPMI8226 (From ATCC) and ARP-1 (From ATCC) as disease model. The former is isolated from patient's bone marrow, carries KRAS and TP53 mutations, and mainly secretes IgG lambda light chain, belonging to IgG type MM; the latter is also isolated from patient's bone marrow, mainly secreting IgA kappa light chain, belongs to IgA type MM. These works are for the universality and objectivity of the experimental results.

Secondly, we test the expression levels of LILRBs in both cell lines, and the results of flow cytometry analysis show that both cell lines highly express LILRB1 and LILRB4 with low expression of LILRB2 and LILRB3. Based on previous research and TCGA data, we decide to research the function and mechanism of LILRB4 in MM.

Then, we design shRNA targeting LILRB4 and construct it into pLKO.1 plasmid. After sequencing validation, we obtain LILRB4-knockdown MM cell lines by lentiviral infection. We compare the proliferation, cell cycle, clone formation, malignancy and apoptosis between the knockdown groups and the scramble groups in both cell lines. Whatever it is RPMI8226 cell line or ARP-1 cell line, after LILRB4 knockdown, the proliferation rate is remarkably reduced and the proportion of G2 / M phase cells descends as well. However, the proportion of G0 / G1 phase cells increases slightly and just a little cell cycle arrest is observed. These phenomena indicate LILRB4 can promote the proliferation of MM cells through prompting more MM cells into proliferation stage, knocking down LILRB4 can inhibit the growth of MM cells.

After that, we check the clone formation abilities of MM cells. The cell clone formation abilities of the LILRB4 knockdown groups are remarkably inferior than that of the scramble group. The size of cell clone is reduced, and the number as well as the density of clones are significantly reduced. We also count the total number of cells in each well of the 24-well plate. The results show the total number of MM cells in the LILRB4 knockdown group is also dramatically less than that in the scramble group. All these results manifest knockdown LILRB4 can truly weaken the clone formation abilities of MM cells, showing LILRB4 can support MM cells' clone formation.

What's more, the malignancy of MM cells is also regulated by LILRB4. The ratio of multinuclear cells and abnormal nuclear cells significantly descends in LILRB4 knockdown groups. Meanwhile, the ratio of degenerated cells is increased, implying LILRB4 knockdown may induce MM cell death. So, we test the apoptosis of MM cells with flow cytometry and find out LILRB4 knockdown can remarkably prompt apoptosis of MM cells, indicating LILRB4 plays an important role in regulating cell fate of MM cells.

Finally, we research the regulatory pathways of LILRB4 in MM with western blot. In MM, LILRB4 has no significant effect on the expression level of tyrosine protein phosphatase containing SH2 domain (SHP2), that is, LILRB4 has no effect on the recruit of SHP2. However, it can regulate the phosphorylation of SHP2, and thereby regulate the expression of calmodulin protein kinase 1 (CaMK1). The expression level of CaMK1 eventually controls the phosphorylation of cyclophosphadenosine-responsive element binding protein (CREB) and thus directly affects gene transcription. Of note, the regulatory function and mechanisms of CREB in B cell development have been reported, which is associated with B cell tumorigenesis. Moreover, we apply software FunRich to conduct deep analysis of key signaling factors in the pathway. The results imply the changes in SHP2 and CaMK may also cause changes in signal pathways such as

NF κ B signaling pathway, which are closely related to cell death and intercellular adhesion, indicating these signaling pathways may also participate in the apoptosis of MM cells after LILRB4 knockdown. Furthermore, TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) and myeloid differentiation factor 8 (MyD88) are downstream factors of Toll like receptor, which are also related to SHP2 and CaMK changes. Numerous studies have shown that Toll-like receptor (TLR) mutation or MyD88 mutation is one of the potential causes of multiple myeloma. Hence, the changes of SHP2 and CaMK may directly interfere with the driving factors of MM, and delay the progression of MM. Therefore, LILRB4 can regulate the occurrence and development of MM through the p-SHP2-CaMK1-p-CREB pathway.

Nevertheless, there are several scientific questions derived from this article requiring further research. Whether abnormal phosphorylation or dephosphorylation of LILRB4 will cause malignant transformation of normal plasma cells to MM cells? Does LILRB4 have a special role in the abnormal development of plasma cells and abnormal activation of plasma cells? Can MM cells regulate immune microenvironment, metabolism microenvironment or bone marrow niche through LILRB4? All these questions need further research in vivo, and the safety of LILRB4 to become an immunotherapy target for MM needs to be further verified either. Thus, it is regret that we have no time to discuss these questions particularly in this article.

To sum up, although more and more therapeutic strategies for multiple myeloma have been developed nowadays, MM is still incurable due to its drug resistance and relapse. This situation brings endless hurt and pain to MM patients, and it is urgent to develop new therapeutic strategies. Here, we firstly report that LILRB4 is capable of regulating proliferation, cell cycle, malignancy and cell fate of MM cells through LILRB4-SHP2-CaMK1-CREB pathway. Knocking down LILRB4 can significantly inhibit the proliferation and malignant cloning ability of MM cells and promote the apoptosis of MM cells. These results show the importance of LILRB4 in the development and progression of multiple myeloma and manifest that LILRB4 has the potential to be a therapeutic target of MM.