

Ⅺ型胶原 $\alpha 1$ 在多发性骨髓瘤中的表达及与预后的关系

张永梅^{1△} 张志敏¹ 周洁¹ 潘志兰¹ 冯丽倩¹ 杨彦¹

[摘要] 目的:探讨Ⅺ型胶原 $\alpha 1$ (COL11A1)在多发性骨髓瘤中的表达及与患者预后的关系。方法:收集 2012 年 1 月至 2018 年 3 月初诊于本院小于 65 岁的多发性骨髓瘤患者 100 例为多发性骨髓瘤组,选择与其一般资料相匹配的 50 例健康骨髓捐献者作为对照组。采集受试者骨髓并分离单个核细胞,采用 qRT-PCR 法检测骨髓单个核细胞中 COL11A1 mRNA 水平;采用 Western Blot 法检测骨髓单个核细胞中 COL11A1 蛋白表达水平;收集患者临床病理资料,分析 COL11A1 表达水平与多发性骨髓瘤患者临床病理学指标的关系;对患者随访 3 年,利用 Kaplan-Meier 法分析不同 COL11A1 表达水平与患者 3 年累积生存率的关系;通过单因素和多因素 COX 回归分析影响多发性骨髓瘤患者预后的危险因素。结果:多发性骨髓瘤组患者骨髓单个核细胞中 COL11A1 mRNA 和蛋白表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中 COL11A1 表达与性别、免疫球蛋白分型、轻链类型、血钙水平、血红蛋白水平、血肌酐水平、染色体状态无关,差异无统计学意义($P > 0.05$),与 D-S 分期、 $\beta 2$ -微球蛋白水平、LDH 水平、血清白蛋白水平有关,差异有统计学意义($P < 0.05$);Kaplan-Meier 分析结果显示,COL11A1 高表达组患者 3 年累积生存率(46.57%)显著低于低表达组(80.00%),差异有统计学意义(对数秩 $\chi^2 = 4.995, P = 0.025$);COX 回归分析结果显示,COL11A1 表达水平、D-S 分期、ISS 分期、 $\beta 2$ -微球蛋白水平、血清白蛋白水平是影响患者预后的主要因素,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 COL11A1 高表达、D-S 分期为 II + III、ISS 分期为 II + III、 $\beta 2$ -微球蛋白 $> 3.5 \text{ mg/L}$ 、血清白蛋白 $> 35 \text{ g/L}$ 是影响多发性骨髓瘤患者预后的危险因素,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:COL11A1 在多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中呈高表达,其表达水平与患者预后密切相关。

[关键词] 多发性骨髓瘤;预后;临床特征;生存时间;Ⅺ型胶原 $\alpha 1$

[中图分类号] R738.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)08-0056-05

Expression of Type Ⅺ Collagen $\alpha 1$ Chain in Multiple Myeloma and Its Relationship with Prognosis

ZHANG Yongmei^{1△} ZHANG Zhimin¹ ZHOU Jie¹ PAN Zhilan¹ FENG Liqian¹ YANG Yan¹

¹Department of Hematology, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang 050000, China.

Abstract Objective: To investigate the expression of collagen type Ⅺ $\alpha 1$ chain (COL11A1) in multiple myeloma and its relationship with the prognosis of patients. **Methods:** 100 multiple myeloma patients who were diagnosed in hospital during January 2012 to March 2018 and were younger than 65 years old were collected as the multiple myeloma group, and other 50 healthy bone marrow donors matching their general data were selected as the control group. The bone marrow of subjects was collected, and mononuclear cells were separated; qRT-PCR method was used to detect the level of COL11A1 mRNA in bone marrow mononuclear cells; Western Blot was used to detect the expression level of COL11A1 protein in bone marrow mononuclear cells; the clinical pathological data of patients were collected and the relationship between COL11A1 expression level and clinicopathological indicators of multiple myeloma patients was analyzed; the patients were

followed up for 3 years. The Kaplan-Meier method was used to analyze the relationship between different COL11A1 expression levels and 3-year cumulative survival rate of patients; and univariate and multivariate COX regression analyses were used to analyze the risk factors that affected

基金项目:河北省卫生健康委员会资助项目(20210067)

石家庄市卫生和计划生育委员会资助项目(20160803)

¹ 石家庄市人民医院血液内科(石家庄,050000)

[△]通信作者 E-mail: zhangyongmei1986z@163.com

the prognosis of multiple myeloma patients. **Results:** The expression levels of COL11A1 mRNA and protein in bone marrow mononuclear cells of patients in the multiple myeloma group were higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); the expression of COL11A1 in bone marrow mononuclear cells of patients with multiple myeloma had nothing to do with gender, immunoglobulin typing, light chain types, blood calcium level, hemoglobin level, blood creatinine level and chromosome status ($P>0.05$), but it was related to D-S staging, β_2 -microglobulin level, LDH level and serum albumin level ($P<0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that the 3-year cumulative survival rate of patients in the COL11A1 high expression group (46.57%) was significantly lower than that in the low expression group (80.00%), and the difference was statistically significant (Log rank $\chi^2=4.995, P=0.025$); the results of COX regression analysis showed that COL11A1 expression level, D-S staging, ISS staging, β_2 -microglobulin level and serum albumin level were the main factors affecting the prognosis of patients ($P<0.05$), among which high expression of COL11A1, DS staging of stage II+III, ISS staging of stage II+III, β_2 -microglobulin >3.5 mg/L, serum albumin >35 g/L were the risk factors that affected the prognosis of multiple myeloma patients ($P<0.05$). **Conclusion:** COL11A1 is highly expressed in bone marrow mononuclear cells of patients with multiple myeloma, and its expression level is closely related to the prognosis of patients.

Keywords: multiple myeloma; prognosis; clinical features; survival time; collagen type XI $\alpha 1$

多发性骨髓瘤(Multiple Myeloma)是一种以骨髓内浆细胞异常增殖为特征的恶性浆细胞病,好发于中老年人^[1-4]。Ⅺ型胶原 $\alpha 1$ (Collagen Type XI Alpha 1, COL11A1)在骨骼形态发生和维持Ⅱ型胶原的纤维间距、直径中有重要作用^[5]。研究表明其在不同癌症中有差异表达,如乳腺癌和甲状腺乳头状癌^[6]。目前,河北省对 65 岁以下多发性骨髓瘤患者的临床特征研究较少。基于此,本研究探讨本院 COL11A1 在 65 岁以下的多发性骨髓瘤患者中的表达及与预后的关系,现报告如下。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

本研究经本院道德伦理委员会批准通过,所有样品采集均取得受试者知情同意。研究选取 2012 年 1 月至 2018 年 3 月于本院初诊小于 65 岁的 100 例多发性骨髓瘤患者骨髓为多发性骨髓瘤组。选择同期 50 例健康捐献者的骨髓作为对照组。

1.2 诊断标准

患者诊断均符合中国多发性骨髓瘤诊疗指南^[7]。

1.3 纳入标准

1)首次诊疗;2)符合诊断标准;3)所有研究对象均知情并同意。

1.4 排除标准

1)合并严重的心血管疾病、肝脏疾病及其他严重的系统疾病者;2)生存期 <6 个月;3)排除临床资料不完整者。

1.5 方法

1.5.1 样本采集 采集多发性骨髓瘤患者和健康捐献者骨髓 4~8 mL 于 EDTA-K2 抗凝管中,加入等量 Ficoll 液,形成明显分界后,以 3 000 r/min 离心 20 min,取中间白雾层(骨髓单个核细胞),采用 PBS 稀释,再以

3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集细胞沉淀并计数。采集所有研究对象空腹静脉血 5 mL 于抗凝管中,室温静置 30 min,放入离心机以 3 000 r/min 下离心 5 min 分离血清,取上清液放于 EP 管中, -30°C 保存,待统一检测。

1.5.2 观察指标 收集患者一般临床资料,包括患者性别、年龄、血常规、血肌酐、血钙离子、乳酸脱氢酶(LDH)、血清白蛋白、血清 β_2 -微球蛋白、轻链类型、染色体状态、免疫分型、D-S 分期、ISS 及 RISS 分期等情况。

1.5.3 qRT-PCR 法检测骨髓单个核细胞中 COL11A1 mRNA 水平 采用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real time PCR, qRT-PCR)法检测各组研究对象骨髓中 COL11A1 mRNA 表达水平。操作严格按照实验室程序和试剂盒说明书进行。PCR 循环参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,共设 30 个循环。GAPDH 作为内参基因,使用 Primer5.0 引物设计软件设计本研究所用引物,序列如表 1 所示。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对骨髓单个核细胞中 COL11A1 mRNA 表达水平进行定量分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
COL11A1	ACCTGACCTGC-	TCCACCACCTGTT-
	CGTCTAGAA	GCTGTA
GAPDH	GAAGGTGAAG-	GAAGATGGTGAT-
	GTCGGAGT	GGGATTTC

1.5.4 Western Blot 法检测 COL11A1 蛋白水平 采用 Western Blot 法检测骨髓单个核细胞中 COL11A1 蛋白表达水平,将分离得到的骨髓单个核细胞中加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液中,提取总蛋白并测定蛋白含量。以 GAPDH 为内参,检测 COL11A1 表达水平(COL11A1 抗体购自 abcam 公司,货号为 ab166606),具体操作过程严格按照实验步

骤进行。采用 Tanon 软件拍摄图像并对蛋白表达水平进行定量分析。

1.6 随访

通过门诊或者电话定期随访,观察患者的生存情况,随访截止时间为 2021 年 3 月,总生存时间为患者确诊时间到死亡时间或随访终止时间。至随访结束,死亡病例为 24 例,存活病例为 46 例,12 例失访。

1.7 统计学方法

采用 SPSS22.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,进行 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验;Kaplan-Meier 法分析不同 COL11A1 水平与患者生存时间的关系;采用单因素及多因素 COX 风险回归模型分析影响多发性骨髓瘤患者预后的危险因素。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓单个核细胞中 COL11A1 表达水平

多发性骨髓瘤组患者骨髓单个核细胞中 COL11A1 mRNA 和蛋白水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1 和表 2。

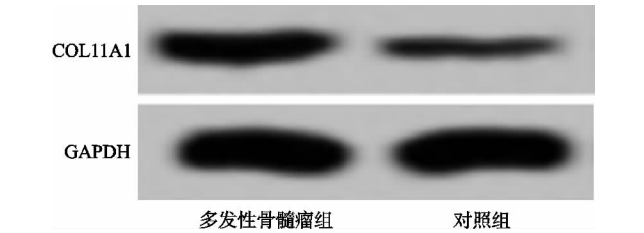


图 1 COL11A 蛋白表达 Western Blot 图

表 2 多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中 COL11A1 mRNA 和蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数/例	COL11A1 mRNA	COL11A1 蛋白
多发性骨髓瘤组	100	3.22 ± 0.33	0.62 ± 0.06
对照组	60	1.05 ± 0.07	0.25 ± 0.04
t		50.203	42.418
P		< 0.001	< 0.001

2.2 COL11A1 表达水平与多发性骨髓瘤患者临床病理参数的关系

根据 COL11A1 在患者骨髓单个核细胞中的表达水平从高到低排序,以 COL11A1 蛋白表达水平的中位数为界限,将患者分为高表达组(82 例)和低表达组(18 例)。分析结果显示多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中 COL11A1 表达与性别、免疫球蛋白分型、轻链类型、血钙、血红蛋白、血肌酐、染色体状态无关,差异无统计学意义($P > 0.05$),与 D-S 分期、ISS 分期、 β_2 -微球蛋白、LDH、血清白蛋白含量有关,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.3 Kaplan-Meier 生存分析

本研究共纳入 100 例多发性骨髓瘤患者,共有 88

例患者完成随访,随访截止时间为 2021 年 3 月。随访 3 年死亡病例为 42 例,存活病例为 46 例,存活率为 52.27%,死亡率为 47.73%。Kaplan-Meier 分析结果显示,COL11A1 高表达组的生存人数为 34 例,生存率为 46.57%(34/73),明显低于 COL11A1 低表达组的 80.00%(12/15),差异有统计学意义(Log rank $\chi^2 = 4.995, P = 0.025$),见图 2。

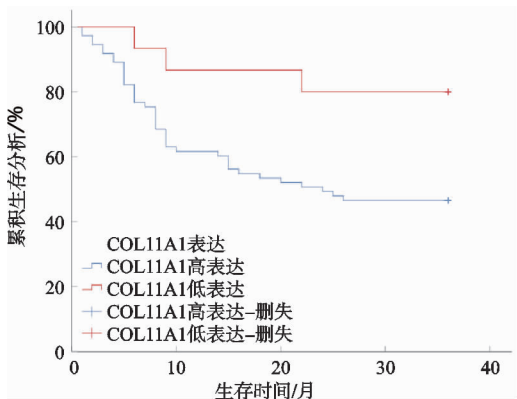


图 2 Kaplan-Meier 生存曲线分析不同 COL11A1 表达水平患者生存情况

2.4 影响多发性骨髓瘤患者生存状况的 COX 回归分析

以患者随访 3 年是否死亡为因变量,以性别、D-S 分期、ISS 分期、 β_2 -微球蛋白水平、轻链类型、血钙水平、血红蛋白水平、血肌酐水平、LDH 水平、染色体状态、血清白蛋白水平、骨髓单个核细胞中 COL11A1 表达水平为自变量,单因素 COX 风险回归模型分析结果显示,患者 COL11A1 水平、D-S 分期、ISS 分期、 β_2 -微球蛋白、血清白蛋白是影响多发性骨髓瘤患者预后的主要因素,差异有统计学意义($P < 0.05$)。多因素 COX 风险回归模型分析结果显示,COL11A1 高表达、D-S 分期为 II+III、ISS 分期为 II+III、 β_2 -微球蛋白 $> 3.5 \text{ mg/L}$ 、白蛋白 $> 35 \text{ g/L}$ 是影响多发性骨髓瘤患者预后的危险因素,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

3 讨论

多发性骨髓瘤是一种浆细胞恶性肿瘤,被认为是第二常见的血液系统恶性肿瘤^[8],且随着国家人口老龄化的加剧,其发病率正在逐年上升。多发性骨髓瘤来源于单克隆浆细胞的恶性增殖,分泌大量单克隆免疫球蛋白,损伤相应的器官和组织。多发性骨髓瘤患者起初没有观察到任何症状^[9],但随着病情的发展,出现贫血、骨痛、感染频繁等症状。迄今为止,化疗和自体造血干细胞移植是多发性骨髓瘤最有效的两种疗法^[10-11]。尽管已经对多发性骨髓瘤进行了大量研究,但对多发性骨髓瘤的病因仍然知之甚少^[12]。因此,揭示多发性骨髓瘤的发病机制,探索新的有效可靠的分子标志物,对多发性骨髓瘤患者的早期诊断、治疗以及

表 3 多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中 COL11A1 的表达与临床病理参数的关系

临床病理参数		例数/例	COL11A1/例		χ^2	P
			低表达(18 例)	高表达(82 例)		
性别	男	69	12	57	0.056	0.813
	女	31	6	25		
D-S 分期	I	38	5	33	23.757	<0.001
	II	23	9	14		
	III	39	4	35		
ISS 分期	I	40	10	30	14.702	0.005
	II	30	5	25		
	III	30	3	27		
$\beta 2$ -微球蛋白/(mg·L ⁻¹)	≤3.5	65	8	57	4.077	0.043
	>3.5	35	10	25		
	IgG	52	10	42		
免疫球蛋白分型	IgA	10	3	7	5.701	0.127
	IgD	8	3	5		
	轻链型	30	2	28		
轻链类型	κ	39	9	30	0.874	0.350
	λ	61	9	52		
血钙/(mmol·L ⁻¹)	<2.98	52	6	46	3.064	0.080
	≥2.98	48	12	36		
血红蛋白/(g·L ⁻¹)	<100	51	7	44	1.288	0.256
	≥100	49	11	38		
血肌酐/(μmol·L ⁻¹)	<94.8	55	11	44	0.331	0.565
	≥94.8	45	7	38		
LDH/(U·L ⁻¹)	<170	59	16	43	8.107	0.004
	≥170	41	2	39		
染色体	正常	65	10	55	0.861	0.354
	异常	35	8	27		
血清白蛋白/(g·L ⁻¹)	<35	53	15	38	8.108	0.004
	≥35	47	3	44		

表 4 影响多发性骨髓瘤患者生存状况的 COX 回归分析

临床病理参数	单因素 COX 风险回归模型			多因素 COX 风险回归模型		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
性别(男 vs 女)	1.072	0.558~2.059	0.835			
D-S 分期(I vs II+III)	2.335	1.151~4.738	0.018	2.431	1.040~5.680	0.040
ISS 分期(I vs II+III)	1.677	1.009~1.148	0.024	1.025	0.534~1.969	0.941
$\beta 2$ -微球蛋白(≤3.5 mg/L vs>3.5 mg/L)	2.185	1.138~4.196	0.019	2.656	1.137~6.206	0.024
轻链类型(κ vs λ)	1.213	0.631~2.329	0.562			
血钙(≤2.98 mmol/L vs>2.98 mmol/L)	1.359	0.707~2.610	0.356			
血红蛋白(≤100 g/L vs>100 g/L)	1.414	0.736~2.716	0.298			
血肌酐(≤94.8 μmol/L vs>94.8 μmol/L)	1.535	0.799~2.948	0.198			
LDH(≤170 U/L vs>170 U/L)	1.358	0.707~2.608	0.358			
染色体(异常 vs 正常)	1.662	0.865~3.192	0.127			
血清白蛋白(≤35 g/L vs>35 g/L)	2.114	1.101~4.060	0.025	2.343	1.002~5.475	0.049
COL11A1(低表达 vs 高表达)	2.302	1.095~4.839	0.028	2.159	1.124~4.147	0.021

预后具有重要的意义。

COL11A1 是小纤维胶原的成员,是由位于染色体 1p21 上的 COL11A1 基因编码,可由软骨和多种非软骨组织产生,如骨、玻璃体、皮肤、心脏等^[13],该基因变异与多种肌肉骨骼疾病有关,如骨关节炎、Stickler

综合征等。据报道,COL11A1 还在各种癌症中上调,包括结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌等^[14-15],其中王霄飞等^[16]研究发现 COL11A1 突变使胃癌患者生存结局更好,可能成为胃癌患者预后的分子标志物和临床免疫治疗的预测标志物。冯晓杰等^[17]研究表明干扰

COL11A1 基因表达可以逆转卵巢癌耐药细胞的耐药性,可以将 COL11A1 作为肿瘤细胞的新靶点。但目前 COL11A1 是否在多发性骨髓瘤中有异常表达及与患者预后的关系尚不清楚。在本研究中,笔者证实多发性骨髓瘤组患者骨髓单个核细胞中 COL11A1 mRNA 和蛋白表达明显高于健康人群,推测 COL11A1 的过表达在肿瘤的形成和进展中均起到重要作用,可能成为潜在的多发性骨髓瘤标志物,但其作用机制仍有待研究。本研究通过收集患者临床病理资料,分析了 COL11A1 表达与临床病理参数的关系,发现骨髓单个核细胞中 COL11A1 表达水平与患者的性别、免疫球蛋白分型、轻链类型、血钙、血红蛋白、血肌酐、染色体状态均无关,但与 D-S 分期、ISS 分期、 β_2 -微球蛋白、LDH、血清白蛋白含量有关,表明 COL11A1 的异常表达可能影响疾病恶性程度,且 COL11A1 的过表达可能是肿瘤早期侵袭的标志。尽管一系列治疗方法的使用可以改善多发性骨髓瘤患者的预后,但该病预后生存率依然较低,本研究通过对多发性骨髓瘤患者随访 3 年,发现骨髓单个核细胞中 COL11A1 高表达组患者 3 年累积生存率显著低于低表达组,进一步通过多因素 COX 风险回归模型分析,结果显示 COL11A1 高表达是影响多发性骨髓瘤患者预后的危险因素,提示 COL11A1 的异常高表达影响多发性骨髓瘤患者的预后,有望成为预测多发性骨髓瘤患者预后的生物学指标,为临床采取相应的对症治疗提供参考,具有广泛的应用前景。

综上所述,COL11A1 在多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞中高表达,可能参与多发性骨髓瘤的发生发展,COL11A1 高表达患者的预后较差,且 COL11A1 高表达是影响患者生存状况的危险因素,可为 COL11A1 高表达的患者优化治疗方案,改善患者预后,对减轻患者自身以及国家的经济负担方面具有十分积极的意义,但 COL11A1 在多发性骨髓瘤患者中的具体作用机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨彦,潘志兰,张志敏. 多发性骨髓瘤患者骨髓细胞周期素 D1、D3、p21 的表达及与预后的相关性研究[J]. 微循环学杂志,2021,31(3):58-62.
- [2] 王卫国,冯玉虎,许凌云,等. 多发性骨髓瘤患者 CD200 的表达及与预后的关系[J]. 现代肿瘤医学,2021,29(23):4205-4208.
- [3] 陈黎. 来那度胺联合硼替佐米治疗多发性骨髓瘤的疗效及对免疫相关细胞因子含量的影响[J]. 临床研究,2021,

29(4):53-54.

- [4] ZHANG W,CAO L,LIU X,et al. High expression of CHML predicts poor prognosis of multiple myeloma[J]. J Cancer, 2019,10(24):6048-6056.
- [5] 徐玉红,张慧雅,郑伟平,等. miR-369-3p 和 COL11A1 对卵巢癌细胞增殖迁移及侵袭的影响[J]. 中国妇幼保健, 2021,36(18):4327-4331.
- [6] ZHENG X,LIU X,ZHENG H,et al. Integrated bioinformatics analysis identified COL11A1 as an immune infiltrates correlated prognosticator in pancreatic adenocarcinoma[J]. Int Immunopharmacol,2021,90(8):106982.
- [7] 中国多发性骨髓瘤工作组. 中国多发性骨髓瘤诊治指南[J]. 中华内科杂志,2008,47(10):869-872.
- [8] XIA B,WANG X,YANG R,et al. Epstein-Barr virus infection is associated with clinical characteristics and poor prognosis of multiple myeloma[J]. Biosci Rep,2019,39(10):BSR20190284.
- [9] 贺冠强,郭敏,索晓慧,等. lncRNA TUG1 和 PCAT-1 表达水平与多发性骨髓瘤预后的关系及其诊断价值分析[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(2):171-176.
- [10] 范丹,肖方,及月茹,等. 自体造血干细胞移植治疗多发性骨髓瘤疗效观察[J]. 海南医学,2021,32(20):2615-2618.
- [11] 宁雪琴,魏小磊,郭绪涛,等. 自体造血干细胞移植可改善多发性骨髓瘤患者的临床状态[J]. 南方医科大学学报, 2021,41(9):1420-1425.
- [12] ZHANG W,ZHANG Y,YANG Z,et al. High expression of UBE2T predicts poor prognosis and survival in multiple myeloma[J]. Cancer Gene Ther,2019,26(11/12):347-355.
- [13] 刘雪影,许良璧,李大欢,等. COL11A1 在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. 中华胃肠内镜电子杂志,2021,8(1):42-45.
- [14] LI A,LI J,LIN J,et al. COL11A1 is overexpressed in gastric cancer tissues and regulates proliferation, migration and invasion of HGC-27 gastric cancer cells in vitro[J]. Oncol Rep,2017,37(1):333-340.
- [15] 穆速,李俊江,刘成远,等. COL11A1 在结直肠癌组织的表达及其对其增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 中华实验外科杂志,2021,38(6):1090-1092.
- [16] 王霄飞,王梦扬,焦林杰,等. $\alpha 1$ -II 型胶原蛋白基因突变对胃癌患者预后的影响及机制研究[J]. 中国现代普通外科进展,2021,24(8):630-639.
- [17] 冯晓杰,李雷. 干扰 COL11A1 基因表达对人卵巢癌细胞侵袭及耐药性影响[J]. 中华肿瘤防治杂志,2019,26(13):908-916.

(收稿日期:2021-12-04)