

Wnt/ β -catenin 基因对骨髓瘤患者间充质干细胞成骨潜能的影响*

黄瑞宏¹ 王宁¹ 李祎¹ 张琼丽¹ 楼瑾¹ 李明¹ 杜新¹ 卓家才¹

[摘要] 目的:探讨 Wnt/ β -catenin 基因和多发性骨髓瘤骨病的关系。方法:分离培养多发性骨髓瘤患者和正常人的骨髓间充质干细胞(MSCs),体外诱导分化成骨细胞,茜素红实验检测矿化物沉积、荧光定量 RT-PCR 方法检测成骨指标(OPN、OC、ALP、Cbfal)和 Wnt/ β -catenin mRNA 表达,分析 MSCs 细胞成骨能力变化及两组间 Wnt/ β -catenin mRNA 表达差异。结果:骨髓 MSCs 体外成骨诱导后,茜素红染色阳性,呈现明显红色钙化结节;MSCs 体外诱导成骨细胞,试验组与对照组比较,成骨指标 OPN、OC、ALP、Cbfal mRNA 表达降低($P<0.05$);骨髓 MSCs 体外成骨诱导后 β -catenin mRNA 表达降低($P<0.05$)。结论:骨髓 MSCs 体外可成功诱导分化为成骨细胞;多发性骨髓瘤患者 MSCs 向成骨细胞分化潜能比正常人降低,Wnt/ β -catenin 可作为多发性骨髓瘤骨病潜在治疗靶点。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;成骨细胞;实时聚合酶链反应;Wnt/ β -catenin

[中图分类号] R331.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)03-0160-04

Effect of Wnt/ β -catenin on osteogenic potential of mesenchymal stem cells from myeloma patients

HUANG Ruihong WANG Ning LI Yi ZHANG Qiongli
LOU Jin LI Ming DU Xin ZHUO Jiakai

(Shenzhen Institute of Hematology, Shenzhen, 518035, China)

Corresponding author: DU Xin, E-mail: duxingz@medmail.com.cn

Abstract Objective: To investigate the relationship between Wnt/ β -catenin and multiple myeloma bone disease (MBD). **Method:** Bone marrow mononuclear cells from MM and controls were isolated, cultured, expanded and then induced to osteogenic differentiation. Realtime Quantitative PCR was employed to detect the osteogenic markers, including Wnt/ β -catenin, OPN, OC, ALP, Cbfal. Alizarin red staining was conducted for detecting mineral deposition. The mRNA expressions of Wnt/ β -catenin and osteogenic potential in the two groups were analyzed. **Result:** Positive alizarin red staining and the red calcium nodules appeared on the MSC post-osteogenic induction in vitro. The mRNA expressions of OPN, OC, ALP, and Cbfal were significantly lower than those of control groups ($P<0.05$). The mRNA expression of β -catenin on the MSC post-osteogenic induction in vitro in the experimental groups was significantly lower than those of control groups ($P<0.05$). **Conclusion:** MSCs can be successfully induced to osteoblasts. The osteogenic potential of MSCs in MM patients is lower than controls. Wnt/ β -catenin may present a novel target for the future therapy of MBD.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; osteoblasts; real-time polymerase chain reaction; Wnt/ β -catenin

多发性骨髓瘤(MM)主要病理特征是骨髓中出现无限扩增的异常浆细胞;多发性骨髓瘤骨病(multiple myeloma bone disease, MBD)是其临床特点之一,MBD的骨破坏以不平衡的骨重塑为特征,其机制是溶骨性骨吸收增加,骨生成障碍。人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)具有成骨分化潜能,Wnt/ β -catenin 通路是成骨细胞增殖的关键性途径,在 MSCs 向成骨细胞转化中起着重要作用,为此,我们研究

了成骨指标和 Wnt/ β -catenin mRNA 在 MSCs 成骨细胞诱导前后的表达,探讨 Wnt/ β -catenin 在 MBD 中的治疗作用。

1 资料与方法

1.1 标本采集

10 例初治 MM 患者(试验组),男 7 例,女 3 例;年龄 40~70 岁,诊断标准依照张之南主编《血液病诊断及疗效标准》(第 3 版),在获取标本时均未接受任何化疗。正常对照组 10 例,其中男 8 例,女 2 例;年龄 35~65 岁。骨髓来源均取自髂后上棘或髂前上棘。

1.2 主要试剂和仪器

低糖 DMEM、胎牛血清购自 GIBCO 公司;

* 基金项目:深圳市科技信息局科研基金资助项目(No: 201002034)

¹ 广东省深圳市血液病研究所 深圳市第二人民医院血液科 (广东深圳,518035)

通信作者:杜新, E-mail: duxingz@medmail.com.cn

Trypsin 0.25% EDTA、Trizol 购自 Hyclong 公司;Percoll 人淋巴细胞分离液为 Pharmacia 公司产品;CD29、CD44、HLA-DR、CD34 购自 Biolegend 公司;茜素红、 β -甘油磷酸钠、地塞米松磷酸钠、维生素 C 购自 Sigma 公司;逆转录试剂盒为 MBI 公司产品;IQ SYGR PCR 试剂盒购自 BIORAD 公司;超净工作台为上海浦东跃欣仪器四厂产品;EPICSXL4CL 流式细胞仪 (BECKMAN COUNTER);real-time PCR 仪 (ABI PRISM7500) 为 Applied Biosystems 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 MSCs 采集、分离和培养 参照文献[1]的方法并稍加改动。

1.3.2 MSCs 免疫表型测定 采用流式细胞仪。

1.3.3 MSCs 体外诱导成骨细胞 选择 P3 或 P4 代 MSCs,在含 10% FBS、 1×10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/ml 抗坏血酸的骨诱导培养液中,向成骨细胞诱导分化,培养 21 d。

1.3.4 茜素红染色 10%甲醛固定诱导细胞 1 h,双蒸水冲洗 2 次,再加入含茜素红 0.1% 的染液,置 37℃ 环境下孵育 30 min 后,PBS 冲洗 2 遍,倒置显微镜下观察染色情况。

1.3.5 实时定量 PCR 用 Trizol 试剂提取 MSCs 及诱导细胞总 RNA,按试剂盒说明书步骤,将 RNA 逆转录为 cDNA,以 GAPDH 为管家基因,应用嵌入荧光染料 SYBR Green I 进行荧光定量 PCR 扩增。50 μ l 扩增体系中含 $2 \times$ Sybr green I PCR MIX 25 μ l,上游和下游引物各 1 μ l,模板 cDNA 2 μ l,去离子水 25 μ l。扩增条件:94℃ 4 min;94℃ 20 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 35 次,72℃ 检测信号。引物见表 1。

表 1 各基因上游与下游引物表

基因	碱基数/bp	引物序列
ALP	238	F:5'-GACCTCCTCGGAAGACACTCTG-3' R:5'-CGCCTGGTAGTTGTTGTGAGC-3'
Cbfa1	167	F:5'-CACGACAACCGCACCATTG-3' R:5'-GTCCCATCTGGTACCTCTCCG-3'
β -catenin	83	F:5'-GACCAGCTCTCTCTCAGAACAAGA-3' R:5'-GTTCTCCCTGGGCACCAATA-3'
osteopontin	73	F:5'-GCCGACCAAGGAAAACACTCACT-3' R:5'-GGCACAGGTGATGCCTAGGA-3'
osteocalcin	115	F:5'-CCAGGCGCTACCTGTATCAATG-3' R:5'-ATGTGGTCAGCCAACCTCGTCA-3'
GAPDH	234	F:5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3' R:5'-CTGGAAGATGGTGATGGGATT-3'

1.4 统计学分析

使用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。数据符合正态分布并且方差齐,采用两个样本的 t 检

验,不符合正态分布并且方差不齐的数据,采用两独立样本非参数检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学

相差倒置显微镜观察,原代骨髓 MSCs 接种 6 d 后看到部分细胞集落,细胞呈梭状及多形性,平行排列或呈旋涡样生长,涡中心细胞呈多层分布;14 d 左右细胞融合成片,可达 90%。传代后细胞形态体积逐呈长梭状,增殖较快,连续传代 10 代以后,细胞形态无明显变化,MM 患者 MSCs 形态与正常对照者无明显差别。见图 1、2。

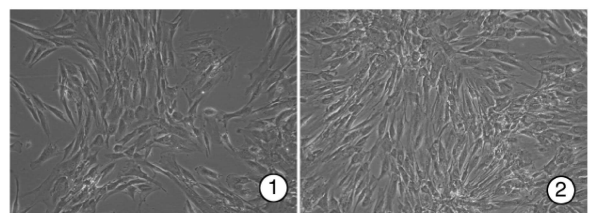


图 1 倒置显微镜下观察原代骨髓 MSCs 培养 10 d 细胞形态 $\times 200$;图 2 倒置显微镜下观察第 3 代骨髓 MSCs 培养 8 d 细胞形态变化 $\times 200$

2.2 MSCs 免疫表型

流式细胞仪检测 MSCs 表面抗原 CD44、CD29 表达阳性;造血细胞标志 HLA-DR、CD34 阴性表达,符合 MSCs 的表型,结果显示细胞的均一性较好,纯度较高,见图 3。

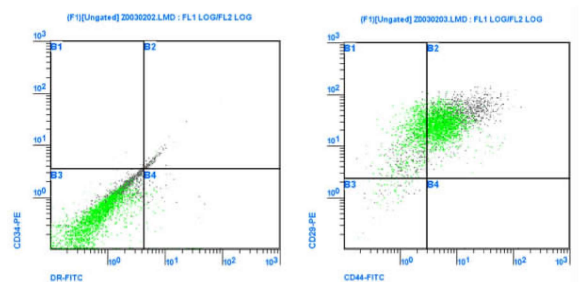


图 3 第 3 代 hMSC 细胞表面标志抗原表达

2.3 MSCs 体外成骨诱导细胞茜素红染色

诱导细胞呈现明显红色,说明成骨诱导过程中有钙盐的沉淀,成骨诱导细胞外面沉积的钙结节被染成了玫瑰红色。见图 4、5。

2.4 各基因 mRNA 水平的分析

所有标本重复测量 2 次取均值。试验组与对照组各基因, GAPDH 基因的 Ct、 Δ Ct、 $\Delta\Delta$ Ct 值及表达水平的变化倍数见表 2。MSCs 体外诱导成骨细胞,试验组与对照组相比,成骨指标 OPN、OC、ALP、Cbfa1 mRNA 表达降低(均 $P<0.05$);骨髓

表 2 试验组与对照组各基因 mRNA 2^(-ΔΔCT) $\bar{x} \pm s$

检测指标	β -catenin	OPN	OC	ALP	Cbfa1
试验组					
MSCs	0.5573 $\pm$ 0.1443	1.0963 $\pm$ 0.7567	1.3487 $\pm$ 0.9291	1.1452 $\pm$ 0.6054	0.4439 $\pm$ 0.2945
MSCs 诱导后	0.5801 $\pm$ 0.2159 ¹⁾	1.2710 $\pm$ 0.5636 ¹⁾	2.0958 $\pm$ 0.5665 ¹⁾	2.6670 $\pm$ 0.3847 ¹⁾	0.8463 $\pm$ 0.3473 ¹⁾
对照组					
MSCs	0.6678 $\pm$ 0.1591	1.2200 $\pm$ 0.9091	0.8780 $\pm$ 0.3927	1.9161 $\pm$ 0.2684	0.6736 $\pm$ 0.2513
MSCs 诱导后	0.9516 $\pm$ 0.2920	2.1096 $\pm$ 0.8267	2.8991 $\pm$ 0.3531	4.3045 $\pm$ 0.2844	1.3273 $\pm$ 0.4075

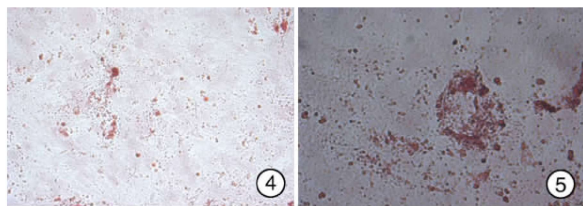
与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

图 4 倒置显微镜观察对照组 MSCs 成骨诱导 21 d 后茜素红染色细胞形态变化 $\times 200$; 图 5 倒置显微镜观察试验组 MSCs 成骨诱导 21 d 后茜素红染色细胞形态变化 $\times 400$

MSCs 体外成骨诱导后 β -catenin mRNA 表达降低($P<0.05$)。

3 讨论

MBD 突出的临床特点是进行性骨破坏, 主要包括骨质疏松、溶骨性损害、病理性骨折、高钙血症和骨痛; 溶骨性骨吸收增加, 骨生成减低共同导致了 MM 的骨损害。MM 患者 MSCs 表面 VCAM-1 和黏连素低表达, 而 IL-1 β 和 TNF- α 的表达则明显增加^[2], 参与了 MM 和 MBD 的发生与发展。MSCs 具有强大的更新能力和多向分化潜能的细胞, MSCs 分离扩增容易, 细胞增殖能力和成骨性能好, 是骨组织工程理想的种子细胞^[3]。因此, 通过提高 MM 患者 MSCs 成骨能力有望解决 MBD 成骨缺陷。

本研究结果显示 MM 患者骨髓 MSCs 成骨诱导细胞成骨指标表达降低, 与文献^[4]报道一致。OPN 是由成骨细胞分泌的一种高度磷酸化的糖蛋白; OC 是成骨细胞分化成熟的标志, 仅表达于完全分化的成骨细胞。在成骨细胞分化晚期(基质矿化期), OPN 与 OC 等一起被分泌至细胞外基质中, 与钙、磷及胶原分子结合, 形成羟基磷灰石结晶。ALP 能够水解有机磷酸酯, 破坏钙化抑制剂, 亦可与细胞质膜的磷脂酰肌醇磷脂复合体共价结合, 参与跨膜信号传导, 发挥作用。由此可见 ALP 参与了调节成骨细胞的增殖、分化及迁移, 因此 ALP 活性的提高是 MSCs 向成骨细胞分化的重要标志^[5]。Cbfa1 能调控分化的成骨细胞骨沉积速率, 无论在生理还是在病理条件下, MSCs 分化至成骨细胞均需要转录因子 Runx2/ Cbfa1 参与。体

内外的实验发现^[6], 将 Runx2/ Cbfa1 转染入骨髓和脂肪来源间充质干细胞, 可以明显提高其向 OB 分化的潜能。本研究显示 MM 患者骨髓 MSCs 成骨诱导后成骨相应指标 OPN、OC、ALP 和 Cbfa1 的表达量均较正常对照组降低, 说明 MM 患者骨髓 MSCs 成骨能力降低。

β -catenin 是一种胞内糖蛋白, 具有双重功能。一是作为附着连接的组成部分, 与钙黏蛋白结合形成复合体参与细胞间连接; 二是作为信号分子, 是 Wnt 信号途径的重要环节。Wnt/ β -catenin 经典途径^[7], 其主要组分包括: 细胞外因子(Wnt)、跨膜受体(frizzled)、 β -catenin 及核内转录因子(TCF/LEF), 当细胞外因子与跨膜受体结合后, 受体作用于胞质内的蓬乱蛋白(Dsh), Dsh 能切断 β -catenin 的降解途径, 抑制 β -catenin 蛋白降解和磷酸化, 未磷酸化的 β -catenin 进入核内刺激成骨目的基因的表达。Mustika 等^[8]发现转染了活性 β -catenin 的细胞的 ALP 活性比没有转染的要高; 在已分化的成骨细胞中稳定表达 β -catenin 可造成骨量的增加, 反之可导致骨量的减少。我们的研究结果显示, MM 患者 MSCs 体外诱导成骨细胞 β -catenin mRNA 表达降低, 变化趋势和成骨指标一致。Runx2/ Cbfa1 是成骨特异性转录因子, 成骨诱导时, 所有成骨相关信号最终均汇合至 Runx2/ Cbfa1, 调节 OB 分化^[9], 另外 Gaur 等^[10]发现 Wnt/ β -catenin 信号通路可以直接激活 Runx2/ Cbfa1 基因表达, 促进 OB 形成。以上分析与讨论说明, MM 患者骨髓 MSCs 体外诱导成骨细胞的分化过程, 最终成骨能力下降, β -catenin mRNA 的表达降低而使 Runx2/ Cbfa1 基因活化受阻可能是 MM 患者骨髓 MSCs 成骨潜能降低的重要原因之一。

综上所述, MSCs 体外可以成功诱导为成骨细胞, MM 患者骨髓 MSCs 体外诱导成骨潜能降低, Wnt/ β -catenin mRNA 表达亦较正常人降低。Runx2/ Cbfa1 是成骨特异性转录因子, Wnt/ β -catenin 信号通路对 Runx2/ Cbfa1 有直接激活作用, 所以通过分子生物学方法提高 Wnt/ β -catenin mRNA 表达或者逆转 Wnt 通路抑制剂对其活性的抑制作

(下转第 168 页)

诊断 IA, 通过 GM 测定则增加至 19 例, 其中包括 11 例原临床诊断 IFI 者, 有 1 例临床诊断 IFI 者和 8 例拟诊 IFI 者均升至临床诊断 IA。同时, GM 测定较痰培养和肺部 CT 出现典型征象早, 也使诊断的时间显著提前。

GM 测定也为流行病学分析提供了可靠的证据。由于痰培养常受到口腔念珠菌的污染, 使念珠菌培养阳性率偏高, 而痰或血的曲霉菌培养由于技术的限制阳性率又很低, 因而以往的观点认为念珠菌感染的发病率较高, 血清 GM 测定避免了培养等影响因素, 可以较准确地反映出曲霉菌感染的发生率。我们通过 GM 测定, 提示曲霉菌在 IFI 中所占比例为 51.4%, 较前有所上升, 并与国外的报道^[8]一致。

综上所述, 血清 GM 检测可以为 IA 的早期诊断和治疗提供有力的证据, 且血清中 GM 的浓度也与疾病的预后具有相关性。同时在 IA 早期诊断的阳性检出率和检出时间方面, GM 实验与 CT 影像学 and 直接微生物学证据相比优势都较为明显。本文通过研究发现, 将阳性界值标准定为单次 $I \geq 0.7$ 或连续 2 次 $I \geq 0.5$ 时, 灵敏度与单用一种界值相比灵敏度提高明显, 特异度也较为理想。按此界值判定在血液肿瘤患者的 IFI 中, 曲霉菌感染的比例较前有所上升, 并可通过观察 GM 在不同临床条件下的动态变化, 系统性地评价抗真菌治疗效果。总之, 在医学发展日新月异的今天, 我们对 IA 诊断方法和检测手段的探索将不会终止, 在实际的临床工作中, 还应结合常见的辅助检查手段来综合分析, 为 IA 早期诊断提供更加方便、可靠的实验室依据, 为血液肿瘤患者曲霉菌感染的治疗赢得先机。

参考文献

- [1] MARR K A, CARTER R A, BOECKH M, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors[J]. *Blood*, 2002, 100: 4358—4366.
- [2] MENNINK-KERSTEN M A, DONNELLY J P, VERWEIJ P E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4: 349—357.
- [3] 黄晓军, 沈志祥, 王爱霞, 等. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌感染的诊断标准与治疗原则(草案)[J]. *中华内科杂志*, 2005, 44(7): 554—556.
- [4] MARR K A, BALAJEE S A, MELANGHLIN L, et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis, variable tat affect performance[J]. *J Infect Dis*, 2004, 190: 641—649.
- [5] 纪宇, 刘代红, 许兰平, 等. 血清半乳甘露聚糖检测对造血干细胞移植后患者侵袭性曲霉菌感染的诊断价值[J]. *中华内科杂志*, 2007, 7(7): 607—610.
- [6] 《中华内科杂志》编辑委员会. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌感染的诊断标准与治疗原则(修订版)[J]. *中华内科杂志*, 2007, 7(7): 607—610.
- [7] SURMONT I, STOCKMAN W. Glucanate-containing intravenous solutions: another cause of false-positive galactomannan assay reactivity[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 1373—1373.
- [8] MENNINK-KERSTEN M A, KLONT R R, WARRIS A, et al. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection[J]. *Lancet*, 2004, 363: 325—327.

(收稿日期: 2011-07-23)

(上接第 162 页)

用, 可能提高 MSCs 向 OB 的分化潜能。因此推测 Wnt/ β -catenin 基因有可能作为 MBD 潜在的治疗靶点。

参考文献

- [1] FANG B, ZHENG C, LIAO L, et al. Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics[J]. *Blood*, 2005, 105: 2733—2740.
- [2] WALLACE S R, OKEN M M, LUNETTE K L, et al. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients[J]. *Cancer*, 2002, 91: 1219—1230.
- [3] 郭奇峰, 刘青华, 徐绘华, 等. 成人骨髓间充质干细胞的体外分离培养与鉴定[J]. *中华显微外科杂志*, 2010, 33(1): 49—51.
- [4] 李炳宗, 史明霞, 李静, 等. 肿瘤坏死因子 α 对骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞 TAZ 表达和成骨潜能的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2009, 31(1): 5—9.
- [5] MECARTY R C, GRONTHOS S, ZANNETTINO A C, et al. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *J*

Cell Physiol, 2008, 29: 381—402.

- [6] ZHANG X, YANG M, LIN L, et al. Runx2 over expression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-derived stem cells in vitro and in vivo[J]. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79: 169—178.
- [7] WESTENDORF J, KAHLER R A, SCHROEDER T M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases[J]. *Gene*, 2004, 341, 19—39.
- [8] MUSTIKA R, BUDIYANTO A, NISHIGORI C, et al. Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma[J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18: 59—62.
- [9] HONG J H, YAFFE M B. TAZ, a Beta-catenin-like molecule that regulates mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5: 176—179.
- [10] GAUR T, LENGNER C J, HOVHANNISYAN H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 33132—33140.

(收稿日期: 2011-08-05)