



多发性骨髓瘤患者成骨细胞培养及调控

高珊 付蓉 刘惠 刘鸿 宋嘉 王化泉 王国锦 邢莉民 邵宗鸿

【摘要】 目的 研究多发性骨髓瘤(MM)患者骨髓来源成骨细胞的增殖分化和成骨潜能,比较蛋白酶抑制剂硼替佐米及 MM 患者血清对成骨细胞的影响。方法 以 20 例 MM 患者和 10 名健康正常人为研究对象,采用骨髓培养法从骨髓中培养并纯化出成骨细胞,进行成骨细胞计数;成骨细胞传代培养 4 周后,行 Von Kossa's 钙染色,进行成骨细胞钙结节计数;在 MM 患者组及正常对照组成骨细胞中分别加入硼替佐米及 MM 患者血清,对比其细胞生物学特性的变化。采用流式细胞术检测 MM 患者成骨细胞抗体 CD34、CD138、CD45 的表达,采用 ELISA 法测定血清 IL-7 水平,采用 RT-PCR 法检测各组培养细胞中骨形成蛋白 2(BMP2)的表达。结果 ①成骨细胞计数(单位为 $\times 10^4/\text{ml}$):MM 患者组(6.3 ± 1.5)较正常对照组(8.2 ± 2.6)减少($P<0.05$);MM 患者组中,加硼替佐米组(8.9 ± 2.1)较不加硼替佐米组(7.8 ± 3.0)明显增多($P<0.05$),但加入 MM 血清与否差异无统计学意义[(5.9 ± 1.6)对(6.3 ± 1.5), $P>0.05$];正常对照组中,加入 MM 血清组(7.4 ± 1.1)较不加 MM 血清组(8.2 ± 2.6)有所减少($P<0.05$)。②成骨细胞钙结节计数:MM 患者组中,加硼替佐米组(8.8 ± 1.9)多于不加硼替佐米组(6.1 ± 1.6)($P<0.05$),但少于正常对照组(15.8 ± 2.2)($P<0.05$)。③各组成骨细胞均不表达 CD138、CD45、CD34。④MM 患者组血清 IL-7 水平(2.07 ± 0.71)高于正常对照组(1.62 ± 0.15)($P<0.05$)。⑤加硼替佐米 MM 患者组及正常对照组均可表达 BMP2 mRNA,不加硼替佐米的 MM 患者组 BMP2 mRNA 无明显表达。结论 骨髓培养法可用于体外培养 MM 患者成骨细胞。与正常对照者比较,MM 患者成骨细胞的增殖分化及成骨能力明显减弱。硼替佐米有促进成骨细胞增殖分化及成骨的能力;MM 患者血清可抑制成骨细胞的增殖分化。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 成骨细胞; 原代细胞培养; 硼替佐米

Culture and regulation of osteoblasts in multiple myeloma patients Gao Shan, Fu Rong, Liu Hui, Liu Hong, Song Jia, Wang Huaquan, Wang Guojin, Xing Limin, Shao Zonghong. Department of Clinical Hematology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
Corresponding author: Shao Zonghong, Email: shaozonghong@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the biological characteristics of osteoblasts cultured *in vitro* from bone marrow (BM) of multiple myeloma (MM) patients and to explore their generation and osteogenic potential. Effects of some factors such as bortezomib and MM patient serum on the osteoblasts were observed. **Methods** Twenty MM patients and 10 healthy donors as controls were enrolled in this study. Osteoblasts from MM patients' BM were cultured *in vitro*. The generation and osteogenic potential of osteoblasts from MM patients and normal subjects were compared. The changes of their osteogenic potential and biological characteristics were observed. The antigens (CD34, CD138, CD45) on osteoblasts were analyzed by flow cytometry. The levels of IL-7 were measured by ELISA. The BMP2 mRNAs were measured by RT-PCR. **Results** Osteoblasts from MM patients' BM could be cultured *in vitro*. The quantity of osteoblasts from MM patients (6.3 ± 1.5) was less than normal subjects (8.2 ± 2.6) ($P<0.05$). The osteoblasts cultured with MM patient serum (7.4 ± 1.1) were less than those without patient serum (8.2 ± 2.6) ($P<0.05$). Bortezomib increased those from MM patients after 6 days culture (8.9 ± 2.1 vs 6.3 ± 1.5) ($P<0.05$). Von Kossa staining showed that there were more calcium depositions in MM osteoblasts with bortezomib (8.8 ± 1.9) than those without bortezomib (6.1 ± 1.6) ($P<0.05$), but less than those from normal controls (15.8 ± 2.2) ($P<0.05$). CD138, CD45, CD34 were not detected on the cultured cells. The level of IL-7 in MM patients' serum (2.07 ± 0.71) was higher than that in normal controls (1.62 ± 0.15) ($P<0.05$). The

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.03.005

基金项目:天津市抗癌重大专项攻关计划(12ZCDZSY18000);中国医师协会项目(20111207、20090109)

作者单位:300052 天津医科大学总医院血液科

通信作者:邵宗鸿,Email:shaozonghong@sina.com



expression of BMP2 mRNA was seen in the normal osteoblasts and MM patients' osteoblasts cultured with bortezomib, but not be seen in those without bortezomib. **Conclusion** Osteoblasts could be cultured *in vitro* from MM patients' BM. The proliferation and osteogenic potential of osteoblasts from MM patients were decreased. Bortezomib was a positive regulatory of osteoblasts and MM patient serum was a negative one. They both could affect the proliferation and osteogenic potential of osteoblasts.

【Key words】 Multiple myeloma; Osteoblast; Primary cell culture; Bortezomib

超过 85% 的多发性骨髓瘤 (MM) 患者出现骨骼破坏, 即骨髓瘤骨病 (MBD)。研究表明 MM 细胞、骨髓基质细胞、成骨细胞及破骨细胞表达一些细胞因子, 引起破骨细胞活性增强, 成骨细胞活性减弱, 造成溶骨性损害, 而同时新骨生成障碍, 这是 MBD 发病的主要原因^[1-2]。因此加强对成骨细胞在 MBD 中作用的研究, 探索 MBD 有效的治疗方法非常重要。对于 MBD 的传统治疗, 主要包括控制原发病, 减少骨质破坏。临床常采用钙剂、1, 25-(OH)₂D₃、降钙素、双膦酸盐等。近年蛋白酶体抑制剂开始应用于临床, 在本研究中我们分别以硼替佐米及 MM 患者血清作为调控因子, 加入细胞培养体系, 观察其对成骨细胞生长及其成骨潜能的影响, 并初步探讨其作用机制。

病例和方法

1. 病例: 以 2009 年 8 月至 2012 年 6 月就诊我院的 20 例 MM 患者为研究对象, 诊断参照文献^[3] 标准。20 例患者中男 12 例, 女 8 例, 中位年龄 57 (50 ~ 71) 岁。以 10 名健康志愿者为正常对照, 其中男 7 名, 女 3 名, 中位年龄 44 (23 ~ 68) 岁。所有参与实验者均签署知情同意书, 并获得我院伦理委员会批准。

2. 试剂及仪器: 细胞培养液、胎牛血清及相关试剂均购自美国 Gibco 公司。RT-PCR 引物及相关试剂均在上海生工生物工程技术有限公司合成和购买。IL-7 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。流式细胞仪、单克隆抗体及阴性对照均为美国 BD 公司产品。

3. 骨髓培养法培养成骨细胞: 取新鲜肝素抗凝骨髓液 5 ml, 分离单个核细胞。将细胞按 3×10^5 /ml 密度接种于 6 孔板中, 加入培养液 (含 10% 的胎牛血清的高糖 DMEM、地塞米松 1×10^{-7} mmol/L、 β -甘油磷酸钠 0.01 mol/L、维生素 C 0.05 g/L、青霉素和链霉素各 100 U/L), 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每周半量换液 2 次。当细胞融合至 80% 左右时进行传代。传代后成骨细胞按 1×10^4 /ml 密度接种于 6 孔板中。实验分组: ①正常对照组; ②正常对

照+硼替佐米 (0.5 μ g/ml) 组; ③正常对照+MM 患者血清 (50 μ l/ml) 组; ④MM 患者组; ⑤MM 患者+硼替佐米 (0.5 μ g/ml) 组; ⑥MM 患者+MM 患者血清 (50 μ l/ml) 组。

传代培养的成骨细胞鉴定: ①细胞形态学观察: 取原代及传代成骨细胞在倒置相差显微镜下观察细胞形态。②细胞生长曲线及细胞倍增时间的测定: 以每孔 2×10^4 细胞, 接种于 24 孔板培养, 隔天取 3 孔, 胰酶消化后计数细胞取均值, 绘制生长曲线, 计算细胞倍增时间。③ALP 活性检测: 第 3 代细胞以 1×10^5 /ml 密度接种于放有盖玻片的 6 孔板内, 培养 3 d 后取出, PBS 冲洗后, 采用 ALP 试剂盒测定 ALP 活性。④ I 型胶原抗体免疫组化染色: 将细胞用甲醛固定, 以免抗人 I 型胶原抗体为一抗, 按 SP 试剂盒说明进行免疫组织化学染色。⑤ Von Kossa's 钙染色: 将接种第 3 代细胞且培养 25 ~ 30 d 后的盖玻片取出, Von Kossa's 钙染色后光镜 ($\times 100$) 下观察。每组取 9 个视野计数钙结节, 计算平均值。

4. 流式细胞术检测成骨细胞膜表面 CD34、CD45、CD138 的表达: 取第 3 代成骨细胞 100 μ l (1×10^5 /ml), 分别加入 CD34-FITC 或 CD45-FITC、CD138-FITC 单抗 20 μ l, 同型对照管加入鼠抗人 IgG1-FITC、IgG1-PE、IgG1-PerCP 各 20 μ l。上流式细胞仪测定细胞膜表面 CD34、CD45、CD138 的表达。

5. ELISA 法测定血清 IL-7 水平: 分别取患者和正常者外周血 2 ml, 按 ELISA 试剂盒说明进行操作, 应用 RS232 酶标测试仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值。以对应公式计算血清 IL-7 水平。

6. RT-PCR 法测定成骨细胞 BMP2 mRNA 表达: 提取 1×10^6 细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA 并进行 PCR 扩增。BMP2 上游引物: 5'-GTCCTGAGC-GAGTTCGAGTT-3'; 下游引物: 5'-TGAAGCTCT-GCTGAGGTGAT-3'; 扩增产物的长度为 308 bp。扩增条件: 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环。内参对照 β -actin 的扩增条件为: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环。取 5 μ l 扩增产物行 20



g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外透射仪下观察结果。

7. 统计学处理:采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。数据以均数±标准差表示,采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞形态:培养细胞大部分于 24 h 内贴壁,细胞体积较大,呈梭形,向四周伸出突起。传代后细胞生长加快,7~14 d 后细胞长满瓶底,呈细长梭形,平行排列生长或漩涡状生长。连续培养 2 周,细胞聚集,分泌物增多,形成多个细胞结节并逐渐增大呈黑色团块,肉眼见为白色点状物。连续传代后,细胞形态无明显变化。正常对照组较 MM 患者组细胞生长旺盛(图 1)。

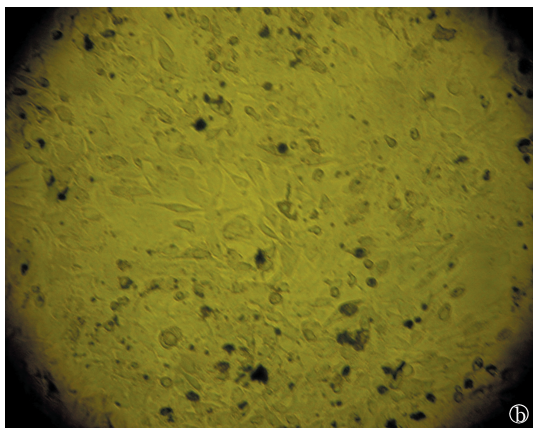
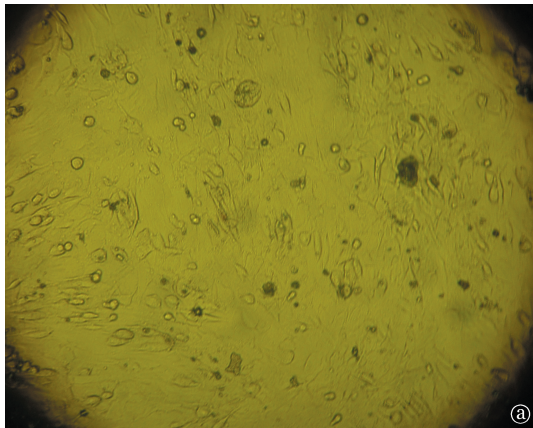


图 1 倒置相差显微镜下观察多发性骨髓瘤患者(a)和正常对照者(b)成骨细胞($\times 200$)

2. 生长曲线及倍增时间:成骨细胞对数生长期出现在传代后的第 3~6 天,之后出现生长平台期。倍增时间为 38 h。MM 患者组及正常对照组生长曲线均呈“S”型,但 MM 患者较正常对照组低平。比较培养第 3 代第 6 天时成骨细胞数,MM 患者组较正常对照组减少($P < 0.05$);MM 患者组中,加硼

替佐米较不加硼替佐米组明显增多($P < 0.05$),但加入 MM 血清与否差异无统计学意义($P > 0.05$);正常对照组中,加入 MM 血清较不加 MM 血清组有所减少($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 培养第 3 代第 6 天不同分组成骨细胞计数比较 ($\times 10^4/\text{ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	成骨细胞计数
正常对照组	10	8.2 ± 2.6
正常对照+硼替佐米组	10	7.8 ± 3.0
正常对照+MM 血清组	10	7.4 ± 1.1 ^a
MM 患者组	20	6.3 ± 1.5 ^a
MM 患者+硼替佐米组	20	8.9 ± 2.1 ^b
MM 患者+MM 血清组	20	5.9 ± 1.6 ^a

注:MM:多发性骨髓瘤; a:与正常对照组比较, $P < 0.05$; b:与 MM 患者组比较, $P < 0.05$

3. ALP 活性检测:ALP 阳性细胞其胞质呈灰色。MM 患者组阳性细胞率(48%)较正常对照组(61%)低(因实验样本较少,未行统计分析)。

4. I 型胶原抗体免疫组化染色:I 型胶原抗体阳性细胞其胞核周围呈黄褐色。MM 患者组阳性细胞率(22%)较正常对照组(38%)低(因实验样本较少,未行统计分析)。

5. 成骨细胞钙结节计数:结果显示 MM 患者组中,加硼替佐米组(8.8±1.9)多于不加硼替佐米组(6.1±1.6)($P < 0.05$),但少于正常对照组(15.8±2.2)($P < 0.05$)。

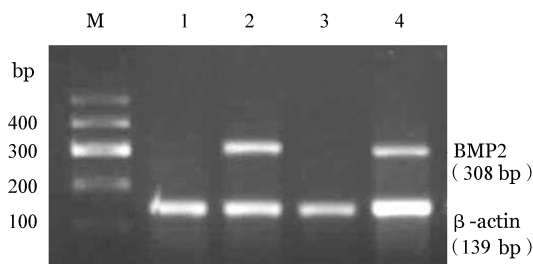
6. 成骨细胞膜表面 CD34、CD45、CD138 的表达:实验各组培养的成骨细胞均不表达 MM 细胞标志 CD138、造血细胞标志 CD45 及干细胞标志 CD34。

7. 血清 IL-7 水平检测:MM 患者血清中 IL-7 水平(2.07±0.71)高于正常对照组(1.62±0.15)($P < 0.05$)。

8. 骨细胞 BMP2 mRNA 的表达:正常对照组及 MM 患者+硼替佐米组均可表达 BMP2 mRNA,MM 患者组 BMP2 mRNA 无明显表达(图 2)。

讨 论

骨质疏松或多发溶骨性病变导致的骨痛、骨折等为 MM 主要临床表现之一。既往研究表明破骨细胞增多和激活为其主要原因,近年来,MBD 分子生物学研究取得很大进展,而成骨细胞的功能和病理变化逐渐成为研究的热点。MM 患者本身存在免



M: Marker; 1、3: MM 患者组; 2: 正常对照组; 4: MM 患者+硼替佐米组

图 2 采用 RT-PCR 法检测多发性骨髓瘤(MM)患者和正常对照者成骨细胞 BMP2 mRNA 的表达

疫系统的多种缺陷,研究其免疫功能变化,有助于寻找 MM 免疫治疗方法,进而控制 MBD 的发生、发展。

成骨细胞培养至今已有 40 余年的发展历程。目前,成骨细胞培养大体可分为酶消化法与组织块培养法,从细胞来源上可分为松质骨培养法与骨髓培养法。骨髓培养法取材简便易行,且由骨髓间充质干细胞(MSC)来源的成骨细胞在形态上与成骨细胞极其相似,但培养过程需要较多的干预措施。松质骨培养法获得细胞数量多,细胞纯度较高,但细胞增殖分化活性较低,而且对于临床工作而言,取材较困难。因此,本研究采用骨髓培养法。

以往的研究表明,地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 是 MSC 向成骨细胞分化和体外成骨的必要条件^[4]。地塞米松可促进成骨细胞分化成熟,同时提高 ALP 的活性,调节成骨细胞分泌胰岛素样生长因子,促进细胞外基质胶原合成。维生素 C 能促进细胞合成胶原,形成钙化,并能调节 ATP、ALP 活性和非胶原基质蛋白的合成。细胞基质的矿化主要依赖于成骨细胞配体的类型、配体密度以及细胞的黏附强度^[5]。本研究中,我们利用人骨髓进行体外培养,细胞形态稳定。ALP 染色、I 型胶原染色及 Von Kossa's 钙染色阳性,证实所培养的细胞为成骨细胞。但是在 MM 患者中,这些指标的表达水平均低于正常对照组。

近年来发现 Wnt 信号传导途径、Runx2 途径、NF- κ B 受体活化因子配体(RANKL)/NF- κ B 受体活化因子(RANK)/护骨素(OPG)系统及 IL-3、IL-7、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)均与成骨细胞在 MM 中受抑有关^[6-10]。

硼替佐米是近年研制并应用于临床的一种治疗 MM 的有效药物,不仅对 MM 有治疗作用,还通

过多种途径对成骨细胞产生保护及促进分化作用,从而对 MBD 具有一定的治疗作用。首先,硼替佐米可通过阻碍 MM 细胞的生长,从而减少其对成骨细胞的抑制,减少骨质破坏。其次,硼替佐米可通过促进成骨细胞产生 BMP-2, BMP-2 可转化为 Runx-2,后者形成转录因子 Runx2/Cbfa1 促进 MSC 向成骨细胞分化,并加速骨骼重建。另一方面,硼替佐米能够抑制破骨细胞的形成,并且阻碍 MM 细胞的生长,从而减少骨质破坏^[11]。近期研究表明,硼替佐米可活化 Wnt 途径,抑制其中 β 环化蛋白磷酸化,增加 TGF 表达,从而增加成骨细胞的成熟分化^[12]。对于 MBD 患者,硼替佐米能够抑制骨破坏和肿瘤生长以减轻疼痛。国外文献报道,硼替佐米对于肿瘤的治疗及 MBD 均有较好的效果^[13-15]。

在本研究中,正常对照组加入 MM 血清共培养后,成骨细胞数目较未加入组减少,证明 MM 血清中含有某些细胞因子,抑制成骨细胞的增殖分化。我们的实验结果显示,MM 患者血清中 IL-7 水平高于正常对照组。硼替佐米对正常人的成骨细胞没有明显的促进或抑制作用。在 MM 患者组中,加入硼替佐米共培养后成骨细胞计数较未加入组明显增多,说明 MM 患者成骨细胞的成骨潜在在硼替佐米的作用下有所增加,但仍比正常对照组减低。进而,我们采用 RT-PCR 法检测各组成骨细胞 BMP2 mRNA 的表达,结果显示,MM 患者+硼替佐米组和正常对照组均可表达 BMP2 mRNA,MM 患者组 BMP2 mRNA 无明显表达。此结果再次证实,硼替佐米可通过促进成骨细胞产生 BMP-2,从而促进 MSC 向成骨细胞分化,并加速骨骼重建。当然还有很多调控因子和复杂的调控途径,有待今后继续研究。

综上所述,采用骨髓培养法及条件培养基,在 MM 患者骨髓中可培养并纯化出成骨细胞。骨髓来源的成骨细胞在体外可稳定传代,在条件培养基中能够形成钙化的新骨组织。MM 患者受各种因素的影响,其成骨细胞的增殖分化能力及成骨能力较正常人明显减弱。硼替佐米可通过促进成骨细胞产生 BMP-2,从而促进成骨细胞分化,促进成骨细胞的成骨潜能。但 MM 患者成骨细胞,即使在与硼替佐米共培养中,成骨能力仍低于正常人。MM 血清含有多种细胞因子,可抑制成骨细胞的增殖分化。

参考文献

[1] Lentzsch S, Ehrlich LA, Roodman GD. Pathophysiology of mul-



tiple myeloma bone disease[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2007, 21(6):1035-1049.

[2] Terpos E, Sezer O, Croucher P, et al. Myeloma bone disease and proteasome inhibition therapies [J]. Blood, 2007, 110 (4): 1098-1104.

[3] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007: 232-235.

[4] Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone[J]. Braz Dent J, 2005, 16(2): 156-161.

[5] Harbers GM, Healy KE. The effect of ligand type and density on osteoblast adhesion, proliferation, and matrix mineralization[J]. J Biomed Mater Res A, 2005, 75(4): 855-869.

[6] Qiang YW, Shaughnessy JD Jr, Yaccoby S. Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth[J]. Blood, 2008, 112(2):374-382.

[7] Kristensen IB, Christensen JH, Lyng MB, et al. Expression of osteoblast and osteoclast regulatory genes in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma: only up-regulation of Wnt inhibitors SFRP3 and DKK1 is associated with lytic bone disease [J]. Leuk Lymphoma, 2013 Aug 5. [Epub ahead of print]

[8] Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease [J]. Blood, 2009, 113(3): 517-525.

[9] Carlson K, Ljunghall S, Simonsson B, et al. Serum osteocalcin concentrations in patients with multiple myeloma-- correlation with disease stage and survival[J]. J Intern Med, 1992, 231(2): 133-137.

[10] Noonan K, Borrello I. The immune microenvironment of myeloma[J]. Cancer Microenviron, 2011, 4(3): 313-323.

[11] Roodman GD. Bone building with bortezomib[J]. J Clin Invest, 2008, 118(2): 462-464.

[12] Qiang YW, Hu B, Chen Y, et al. Bortezomib induces osteoblast differentiation via Wnt-independent activation of beta-catenin/TCF signaling[J]. Blood, 2009, 113(18): 4319-4330.

[13] Yeh HS, Berenson JR. Treatment for myeloma bone disease[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 pt 2): 6279s-6284s.

[14] Shank BR, Brown VT, Schwartz RN. Multiple myeloma maintenance therapy: A review of the pharmacologic treatment [J]. J Oncol Pharm Pract, 2014 Jan 6. [Epub ahead of print]

[15] Mohty M, Malard F, Mohty B, et al. The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma [J]. Cancer, 2013, 120(5): 618-623.

(收稿日期:2013-08-26)

(本文编辑:刘志红)

·读者·作者·编者·

2014年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液 PBS

胎牛血清 FBS

血红蛋白 HGB

白细胞计数 WBC

血小板计数 PLT

核因子-κB NF-κB

聚合酶链反应 PCR

逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR

酶联免疫吸附实验 ELISA

动脉血氧分压 PaO₂

动脉血二氧化碳分压 PaCO₂

辅助性T淋巴细胞 Th

丙氨酸转氨酶 ALT

天冬氨酸转氨酶 AST

谷氨酰转氨酶 GGT

碱性磷酸酶 ALP

乳酸脱氢酶 LDH

凝血酶原时间 PT

部分激活的凝血活酶时间 APTT

EB病毒 EBV

巨细胞病毒 CMV

乙型肝炎病毒 HBV

丙型肝炎病毒 HCV

人类免疫缺陷病毒 HIV

自然杀伤细胞 NK细胞

白细胞介素 IL

干扰素 IFN

肿瘤坏死因子 TNF

红细胞生成素 EPO

血小板生成素 TPO

干细胞生长因子 SCF

粒细胞集落刺激因子 G-CSF

粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF

巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF

链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶 S-P

粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM

细胞毒性T淋巴细胞 CTL

佛波醇酯 TPA

噻唑蓝实验 MTT实验

弥漫性血管内凝血 DIC

磁共振成像 MRI

正电子发射断层扫描 PET

乙二醇四乙酸 EDTA

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE

二甲基亚砷 DMSO

本刊编辑部