

- [28] Antonopoulos C, Cumberbatch M, Mee JB, et al. IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(2):361-367.
- [29] Hulet BC, Ryan CA, Gildea LA, et al. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 209(2):159-166.
- [30] Ayehunie S, Snell M, Child M, et al. A plasmacytoid dendritic cell (CD123⁺/CD11c⁻) based assay system to predict contact allergenicity of chemicals [J]. *Toxicology*, 2009, 264(1/2):1-9.
- [31] Schreiner M, Peiser M, Briechle D, et al. A loose - fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential[J]. *Allergy*, 2007, 62(12):1419-1428.
- [32] Schreiner M, Peiser M, Briechle D, et al. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens[J]. *Toxicology*, 2008, 249(2/3):146-152.
- [33] Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States [J]. *Pediatrics*, 2009, 124(6):1549-1555.
- [34] Frischmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Chichester KL, et al. Dendritic cell and T cell responses in children with food allergy[J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(1):61-71.
- [35] Feng BS, Chen X, He SH, et al. Disruption of T-cell immunoglobulin and mucin domain molecule (TIM)-1/TIM4 interaction as a therapeutic strategy in a dendritic cell-induced peanut allergy model[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(1):55-61.
- [36] Temblay JN, Bertelli E, Arques JL, et al. Production of IL-12 by Peyer patch-dendritic cells is critical for the resistance to food allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(3):659-665.
- [37] Spears M, McSharry C, Donnelly L, et al. Peripheral blood dendritic cell subtypes are significantly elevated in subjects with asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(5):665-672.
- [38] 黄建安, 张腊娣, 於葛华, 等. 共刺激分子 B7-CD28/CD152 在过敏性哮喘中的作用[J]. *江苏医药杂志*, 2003, 29(11):806-807.
- [39] 毛光宇, 杨炯, 陈宏斌, 等. 过敏性哮喘患者树突状细胞对原始 T 细胞活化的影响[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2005, 4(2):115-118.
- [40] 李俊, 杨炯, 郭卫, 等. 过敏性哮喘患者树突状细胞接触抗原前后的表型变化[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(4):85-88.
- [41] 陶红, 李秋, 王莉, 等. 过敏性紫癜发病中树突状细胞与 T 辅助细胞失衡的关系[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(7):677-679.
- [42] 唐玉英, 朱保权, 付生军, 等. 过敏性紫癜患儿外周血树突状细胞 IL-6、IL-12 分泌及 CD80、CD86 表达[J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(1):58-60.
- [43] 陈永兴, 张秋业, 王娟, 等. 过敏性紫癜患儿外周血树突状细胞功能变化及黄芪的体外干预[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(1):157-160.
- [44] Suzuki M, Zheng X, Zhang X, et al. A novel allergen-specific therapy for allergy using CD40-silenced dendritic cells[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(3):737-743.
- [45] Schroeder JT, Bieneman AP, Chichester KL, et al. Decreases in human dendritic cell-dependent T(H)2-like responses after acute in vivo IgE neutralization[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(4):896-901.
- [46] Dreschler K, Bratke K, Petermann S, et al. Impact of immunotherapy on blood dendritic cells in Patients with hymenoptera venom allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127(2):487-494.

(收稿日期:2011-10-17 修回日期:2011-12-30)

· 综 述 ·

Dickkopf-1 与骨髓瘤骨病的关系及其靶向治疗的研究进展^{*}

袁忠涛 综述, 李惠民[△] 审校

(昆明医学院第一附属医院血液科, 云南昆明 650032)

关键词: 多发性骨髓瘤; 分子作用机制; 信号转导; 靶向治疗; Dickkopf 1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.029

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)16-1637-05

90% 以上的多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 患者在疾病进程中出现骨质破坏, 包括全身性骨质疏松、溶骨性破坏和病理性骨折, 即骨髓瘤骨病 (myeloma bone disease, MBD), 这是 MM 的标志之一。MBD 的骨破坏以溶骨亢进同时不伴新骨形成为主要特点^[1]。与其他肿瘤骨转移引起的溶骨病变不同, 当骨髓瘤的肿瘤负荷超过 50%, 成骨细胞 (osteoblast, OB) 的活性将严重受抑或完全缺失; 即使患者达到长期完全缓解, 破骨细胞 (osteoclast, OC) 的活性减弱, OB 活性仍无恢复, 溶骨性病变也无改善^[2]。Wnt (Wingless-type MMTV integration site) 信号是 OB 中的一条重要信号通路, 骨髓瘤细胞分泌的 Dickkopf-1 (DKK1) 蛋白可通过抑制 Wnt 信号转导通路, 经多种途径抑制 OB 分化和功能以及间接激活 OC, 导致

blast, OB) 的活性将严重受抑或完全缺失; 即使患者达到长期完全缓解, 破骨细胞 (osteoclast, OC) 的活性减弱, OB 活性仍无恢复, 溶骨性病变也无改善^[2]。Wnt (Wingless-type MMTV integration site) 信号是 OB 中的一条重要信号通路, 骨髓瘤细胞分泌的 Dickkopf-1 (DKK1) 蛋白可通过抑制 Wnt 信号转导通路, 经多种途径抑制 OB 分化和功能以及间接激活 OC, 导致

骨代谢失衡^[3]。因此,随着对 MBD 发病机制、Wnt 信号通路抑制剂 DKK1 与 MBD 关系的深入研究,DKK1 有望成为 MBD 治疗的新靶点。现就 Wnt 信号通路和 DKK1 在 MBD 发病机制中的作用以及靶向 DKK1 的干预治疗作一综述。

1 DKK1 与 Wnt 信号转导通路

1.1 DKK1 的生物学特性

DKK 家族是一类含有 255~350 个氨基酸残基的分泌型糖蛋白,在脊椎动物中由 DKK1、DKK2、DKK3 和 DKK4 四个家族成员组成。DKK1 于 1998 年被 Glinka 等在非洲爪蟾胚胎发育的研究中发现^[4]。人类 DKK1 位于染色体 10q11 上,其相对分子质量是 35×10^3 。DKK1 包括 31 个氨基酸残基组成的 N 端(信号肽端)、糖基化的 C 端和 2 个富含半胱氨酸的保守区(Cys-1 和 Cys-2),其中 Cys-2 位于 C 端附近,含有 10 个保守的半胱氨酸残基,呈高度保守状态,在抑制经典的 Wnt 信号转导通路方面起决定作用。目前已发现两类 DKK1 受体:低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP5/6)和含环状结构域的单跨膜蛋白 Krem2(Krem2)^[5]。

1.2 Wnt 信号转导通路的概述

Wnt 蛋白属于一类富含半胱氨酸残基的分泌性糖蛋白大家族,至今已在人和鼠类发现 19 个家庭成员。Wnt 信号转导通路是一条高度保守的信号通路,不仅在细胞的分化、增殖及肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,同时还参与了骨形成和重建的调节。

Wnt 信号转导通路主要分为 3 支:(1)Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)通路,即经典途径,是最早被发现且研究较为透彻的 Wnt 信号转导通路。 β -catenin 是经典 Wnt 信号通路的关键效应蛋白,它在胞质内的积聚是该信号通路激活的重要标志。正常情况下,胞质内 β -catenin 稳定在极低的水平。当胞外的 Wnt 配体与胞膜表面 7 次跨膜受体卷曲蛋白(frizzled protein, Fz)和单跨膜受体 LRP5/6 结合,Wnt 信号被激活,继而激活细胞内下游信号分子散乱蛋白(dishevelleds, Dvl)使其磷酸化,从而抑制大肠腺瘤息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC)、轴蛋白(axin)和糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)形成的降解复合物磷酸化,导致 β -catenin 磷酸化受阻,在胞质内大量积聚,并进入到核内与转录因子淋巴增强因子(lymphoid enhancing factor, LEF) 1/T 细胞因子(T cell factor, TCF)结合,解除 LEF1/TCF 的抑制作用,特异性地启动、激活下游靶基因的转录和表达,促进细胞增殖,减少细胞凋亡^[6]。激活的 Wnt 通路使 OB 内的 β -catenin 增加,转移到细胞核,刺激 OB 靶基因的表达,促进 OB 分化,上调护骨素(osteoprotegerin, OPG)的表达,间接抑制 OC 的功能,下调细胞核因子 κ B(nuclear factor kappaB, NF- κ B)受体激活蛋白配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)的表达,从而维持骨代谢的平衡^[7]。另外 Wnt1、nt3a 和 Wnt10 等参与了骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMC)向 OB 分化的过程^[8]。(2)平面细胞极性(the planar cell polarity, PCP)通路:目前这条通路的作用机制尚不完全清楚。现认为 PCP 通路主要通过 Fz 受体激活 Rho 和 Rac,使 Jun 氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)活化,调节不同种类细胞的极性和骨架,同时参与细胞增殖、分化和凋亡^[9]。(3)Wnt/ Ca^{2+} 通路:主要通过 G 蛋白激活磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)、钙调蛋白依赖的激酶 II(calmodulin-dependent protein kinase II, CamK II)和蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)等调节细胞内 Ca^{2+} 的释放。如 Wnt5a 与 Fz 受体结合,使 G 蛋白解离为 α 和 $\beta\gamma$ 亚基, α 亚基通过激活磷酸二酯酶抑制细胞

内 cGMP 的活化, $\beta\gamma$ 亚基激活 PLC,通过信号级联反应,激活 CamK II、钙调磷酸酶和 PKC,释放 Ca^{2+} ,影响基因表达^[10]。近期有实验表明内源性和外源性的 Wnt5a 能通过 Wnt/ Ca^{2+} 通路促进微结构钛表面 OB 的分化^[11]。后两条通路又称非经典途径。

1.3 Wnt 信号转导通路及其抑制剂 DKK1

Wnt 信号转导通路在细胞外受不同的抑制剂调节。根据作用机制分为两类:第一类包括分泌型卷曲相关蛋白(secreted Frizzled-related protein, sFRP)家族、Wnt 信号抑制因子-1 和 Cerberus,通过直接与 Wnt 结合,阻止配体与受体结合,从而抑制信号转导,其中 sFRP 家族参与经典和非经典途径;第二类是 DKK 家族,DKK1 能直接与 LRP5/6 结合,促进 LRP5/6 受体胞膜内吞后从 Wnt-Frizzled 复合物脱离,阻止下游信号的传导;同时 DKK1 能与 LRP6 和 Krem2 形成复合物,使 LRP6 从膜表面清除,进一步抑制 Wnt/ β -catenin 通路。而且,DKK1 是 β -catenin/TCF 下游的靶基因,并受其调控^[12]。Wnt/ β -catenin 通路对调节地塞米松诱导的骨质疏松起关键作用,DKK1 基因表达沉默能解除地塞米松对人原始 OB 分化的抑制^[13]。另外,研究者还发现 DKK1 不但参与了 Wnt/ β -catenin 通路,在 PCP 通路中也发挥着重要作用,MM 的瘤细胞可通过 JNK 信号通路激活氧化应激反应调节 DKK1 的表达^[14]。

2 MBD 的发病机制

MBD 的发生、发展是一个多因素、多系统综合作用的结果,其关键在于 MM 细胞激活 OC 的同时抑制 OB 活性,最终导致骨代谢失衡。

一直以来人们认为,OC 是 MBD 的主要效应细胞,MM 细胞以及基质细胞分泌的破骨细胞激活因子,如 RANKL、IL-6 和巨噬细胞炎性蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α)等在 MBD 发病机制中起到至关重要的作用。已知骨代谢的动态平衡通过 RANK/RANKL/OPG 系统来维持,RANKL 与 RANK 结合后促使 OC 前体细胞分化成 OC 而产生溶骨效应,同时 RANKL 通过细胞 NF- κ B 和 JNK 途径直接活化成熟的 OC,促进骨的重吸收。OPG 的分泌受抑,导致 RANKL/OPG 比值升高,促进 OC 的分化成熟和持续激活。还有 IL-6 和 MIP-1 α 等因子可通过不同的方式或作用环节促进溶骨和骨质的重吸收^[15]。

近年来,越来越多的证据显示 MM 患者 OB 功能缺陷加剧 MBD 的病理过程。MM 分泌的 DKK1 和 sFRP-2 通过抑制 Wnt 信号途径影响 OB 的分化。而且,外源性的 sFRP-2 能抑制骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)介导的 OB 分化,相应抗体中和 sFRP-2 后 OB 又恢复矿化结节的形成^[2]。另外,MM 细胞对 OB 的影响机制还包括:通过干扰早期 OB 和骨髓基质细胞合成溶骨部位的新骨成分,使新骨形成所需的骨钙蛋白和 BMP-2 严重缺乏,影响成骨;通过 Fas 配基和肿瘤坏死因子受体细胞凋亡诱导配体直接促进早期 OB 凋亡^[16]。细胞间的接触上调 IL-6 的分泌,下调 OB 的 OPG mRNA 的表达。MM 细胞还可以通过与 OB 的祖细胞相互接触直接抑制转录因子 RUNX2/CBFA1 的活性,影响骨生成^[3]。

3 DKK1 与骨髓瘤骨病

大量临床研究证实 DKK1 与 MM 和 MBD 有一定的相关性。2003 年 Tian 等^[17]描述了 DKK1 基因和蛋白在有溶骨性病变的 MM 患者浆细胞内高表达,循环中的 DKK1 主要来源于 MM 细胞。MM 患者血清和骨髓上清液 DKK1 水平明显高

于意义未定的单克隆丙种球蛋白病(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)患者和对照者,而且 DKK1 水平还与骨损害程度和范围有关^[18-20]。此外,Heider 等^[21]研究也显示不论选择何种治疗方式,对治疗有反应的 MM 患者血清 DKK1 水平明显低于治疗前,而无反应的患者治疗前后 DKK1 水平无明显变化。近期的研究认为可将血清 DKK1 作为诊断 MM 等多种肿瘤的生物标志物^[22]。

DKK1 作为 Wnt 信号转导通路的抑制剂,不仅使 OB 的分化和功能受抑,还间接增加 OC 形成,最终导致骨代谢失衡。Qiang 等^[23]研究发现重组 DKK1 和高水平 DKK1 MM 患者的血浆能抑制 OB Wnt3a 介导的 β -catenin 积聚,使 β -catenin 自分泌减少,并能抑制 BMP-2 介导的碱性磷酸酶活性,从而影响前 OB 的分化。另有实验证实,重组 DKK1 明显抑制人和小鼠 OB Wnt3a 介导的 OPG mRNA 和蛋白水平的表达;表达 DKK1 的 MM 细胞株或原始 MM 细胞与 OB 共培养,也能抑制 OB Wnt3a 介导的 OPG 的表达,从而上调 RANKL 的表达;DKK1 可以通过干扰 OB 的 Wnt 信号调节和增加 RANKL/OPG 的比值,间接增强 OC 的活性^[24]。Gunn 等^[25]研究显示 MSC 培养的条件培养液能促进 MM 细胞系分泌 DKK1,短期低水平 DKK1 可促进 MSCs 增殖,而长期高水平 DKK1 阻止 MSCs 向 OB 分化,同时未分化的 MSCs 产生的 IL-6 又刺激 MM 细胞的增殖,由此形成恶性循环。因此,DKK1 在 MBD 的发生、发展中发挥着不容忽视的作用。

Politou 等^[26]报道 MM 经自体干细胞移植 (autologous stem cell transplantation, ASCT) 后,血清 DKK1 持续下降;骨吸收标志物 NTX 和 TRACP-5b 随之下降,直至 ASCT 第 3 个月恢复正常;骨形成标志物骨钙蛋白和骨碱性磷酸酶逐渐增加,到第 8 个月正常。这些提示 DKK1 对 OB 的功能有抑制作用,ASCT 后可恢复 OB 功能,借此推测 ASCT 后随着 OB 功能的恢复,DKK1 的抑制作用也随之瓦解。Wang 等^[27]研究显示去卵巢大鼠给予 DKK1 反义寡核苷酸治疗后可解除去卵巢雌激素缺失对股骨重量、矿物质含量、骨密度及 OC 数量的影响,治疗后骨组织中 OB 数量和骨小梁增加,OC 数量显著减少,因此调控 DKK1 可改善雌激素缺乏所致骨量流失。另有实验还证实重组人 DKK1 和高浓度水平 DKK1 患者的骨髓上清液在体外可抑制 OB 前体细胞的分化,这种抑制作用可被抗人 DKK1 抗体解除^[17]。上述这些研究表明抗 DKK1 策略有望成为 MBD 靶向干预的新思路。

4 针对 DKK1 的靶向治疗

目前 MBD 的治疗主要为全身化疗、双磷酸盐类药物治疗和局部放疗等。其中双磷酸盐类药物能有效治疗肿瘤细胞诱导的高钙血症以及骨质疏松,但随着使用人数的增加和时间的延长,双磷酸盐相关的颌骨坏死逐渐引起人们的重视,而且双磷酸盐也不能完全阻断疾病进展,迫切需要不断寻找更为安全有效的治疗方法。针对 DKK1 的靶向干预可作为一条潜在的治疗策略。

4.1 硼替佐米 是第一个用于临床的蛋白酶体抑制剂,目前广泛用于治疗初发、难治或复发的 MM 患者。近年来的研究显示硼替佐米不仅能杀伤 MM 细胞,同时对 OB 具有一定的活化作用。多项临床研究显示,MM 患者经硼替佐米治疗后,DKK1 水平较治疗前降低,OB 的活动标志物水平上升。目前认为硼替佐米可以通过多种作用机制促进新骨形成和抑制骨质破坏,DKK1 为其中一个作用靶点。它能直接作用于 DKK1 和抑制 MM 细胞以减少 DKK1 和 sFRP-2 的分泌,恢复 Wnt

信号通路功能,促进 OB 分化,治疗 MBD^[28]。

4.2 DKK1 的中和抗体 Yaccoby 等^[29]建立负载人 MM 的 SCID-rab 小鼠模型,给予 DKK1 中和抗体治疗 4~6 周,小鼠的骨矿物质密度明显提高,组织学检查显示表达骨钙素的 OB 数量增多而表达抗酒石酸酸性磷酸酶的多核 OC 数量减少,更重要的是该模型中肿瘤负荷显著降低。此外,DKK1 中和抗体 Mab B3 以剂量依赖方式促进 OB 分化和钙质沉积,同时抑制 OC 的分化和陷窝形成功能^[30]。

BHQ880 是一种新型的 DKK1 单克隆抗体,具有高亲和力,能中和人和鼠的 DKK1。Heath 等^[31]在 C57BL/KaLwRij 小鼠体内建立 MBD 的模型,给予 DKK1 的中和抗体 BHQ880 治疗后,骨表面矿化率和骨形成率增加,骨小梁缺失也明显改善。Fulciniti 及同事评估了 BHQ880 对 MM 骨代谢的作用。他们研究发现 BHQ880 在体外促进 OB 的分化,消除 MM 细胞对成骨形成的不利影响,减少 IL-6 的分泌;负载 INA6MM 的 SCID-hu 小鼠经 BHQ880 治疗后,OB 和骨小梁数量显著增加,血清骨钙素水平上升;该抗体通过干扰骨髓基质细胞与 MM 细胞的黏附和减少 IL-6 的产生间接抑制 MM 细胞的生长;另外,BHQ880 能上调小鼠体内的 β -catenin,使骨髓基质细胞内的 NF- κ B 的活性降低。这些实验结果表明 DKK1 的中和抗体 BHQ880 能改善骨病和抑制肿瘤生长^[32]。

目前,BHQ880 联合标准化疗和唑来磷酸治疗初发、难治或复发 MM 患者的 I 期/II 期临床试验正在进行中,患者经 BHQ880 40 mg/kg,每 28 d 静脉给药 1 次治疗后,骨形成似乎有所增加,但有待 II/III 期临床试验的进一步证实^[33]。另有一项单剂量 I 期临床试验研究显示绝经后妇女给予 BHQ880 后尚无剂量限制毒性反应事件的报告^[34]。BHQ880 用于高风险冒烟型 MM 以及并发肾功能不全未经治疗 MM 患者的临床试验即将开始。

4.3 DKK1 多肽疫苗 Qian 等^[35]针对 DKK1 蛋白在大多数 MM 患者和细胞株均有表达,而在正常组织中极少表达的特点,合成 DKK1 抗原肽-HLA-A * 0201 四聚体,并证实其在 HLA-A * 0201 转基因小鼠体内具有免疫原性。研究者利用 DKK1 多肽作用于 HLA-A * 0201 阳性的供血者和 MM 患者外周血细胞,产生负载 DKK1 多肽的树突状细胞;DKK1 特异性 T 细胞反复接受负载 DKK1 多肽的树突状细胞的刺激,可以产生和克隆针对 MM 的活化的特异性细胞毒 T 细胞,这些细胞能识别和溶解 DKK1 阳性/HLA-A * 0201 阳性的 MM 细胞株,以及来自 MM 患者 HLA-A * 0201 阳性的原始肿瘤细胞,而不杀伤其他细胞。这一研究结果为以 DKK1 为基础的免疫治疗提供了直接有力的证据。

5 展望

MBD 的发病机制复杂,OC 和 OB 参与的不平衡骨重塑是其关键。既往认为 OC 是主要效应细胞,近年 OB 在 MBD 中的作用日益受到重视。其中,DKK1 通过抑制 Wnt 信号转导通路干扰 OB 的分化,针对其机制的治疗手段可能具有良好前景。

参考文献:

- [1] Sezer O. Myeloma bone disease: recent advances in biology, diagnosis, and treatment[J]. *Oncologist*, 2009, 14(3): 276-283.
- [2] Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(2): 283-291.

- [3] Sanderson RD, Epstein J. Myeloma bone disease[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(11):1783-1788.
- [4] Glinka A, Wu W, Delius H, et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction[J]. *Nature*, 1998, 391(6665):357-362.
- [5] Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family[J]. *Gene*, 1999, 238(2):301-313.
- [6] Barker N. The canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 468(1):5-15.
- [7] Kramer I, Halleux C, Keller H, et al. Osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(12):3071-3085.
- [8] Rawadi G. Wnt signaling and potential applications in bone diseases[J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(7):581-590.
- [9] Wagner ER, Zhu GH, Zhang BQ, et al. The therapeutic potential of the Wnt signaling pathway in bone disorders[J]. *Curr Mol Pharm*, 2011, 4(1):14-25.
- [10] Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways a prelude for more[J]. *Circ Res*, 2010, 106(12):1798-1806.
- [11] Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL. Role of non-canonical Wnt signaling in osteoblast maturation on microstructured titanium surfaces[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(6):2740-2750.
- [12] Kim Y, Reifenberger G, Lu D, et al. Influencing the Wnt signaling pathway in multiple myeloma[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(2):725-730.
- [13] Butler JS, Queally JM, Devitt BM, et al. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation[J]. *BMC Musculoskel Dis*, 2010, 11(9):210-219.
- [14] Colla S, Zhan F, Xiong W, et al. The oxidative stress response regulates DKK1 expression through the JNK signaling cascade in multiple myeloma plasma cells[J]. *Blood*, 2007, 109(10):4470-4477.
- [15] Raje N, Roodman GD. Advances in the biology and treatment of bone disease in multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6):1278-1286.
- [16] Silvestris F, Ciavarella S, Matteo MD. Bone-resorbing cells in multiple myeloma; osteoclasts, myeloma cell polykaryons, or both[J]. *Oncologist*, 2009, 14(3):264-275.
- [17] Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(26):2483-2494.
- [18] Dun XY, Jiang H, Hou J. Bone marrow plasma concentrations of Dickkopf-1 in patients with multiple myeloma[J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2009, 38(5):453-458.
- [19] Kaiser M, Miet M, Liebisch P, et al. Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma[J]. *Eur J Haematol*, 2008, 80(6):490-494.
- [20] Haaber J, Abildgaard N, Knudsen LM, et al. Myeloma cell expression of 10 candidate genes for osteolytic bone disease. Only overexpression of DKK1 correlates with clinical bone involvement at diagnosis[J]. *Br J Haematol*, 2008, 140(1):25-35.
- [21] Heider U, Kaiser M, Mieth M, et al. Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to anti-myeloma treatment[J]. *Eur J Haematol*, 2009, 82(1):31-38.
- [22] Sato N, Yamabuki T, Takano A, et al. Wnt inhibitor Dickkopf-1 as a target for passive cancer immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13):5326-5336.
- [23] Qiang YW, Barlogie B, Rudikoff S, et al. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is the underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma[J]. *Bone*, 2008, 42(4):669-680.
- [24] Qiang YW, Chen Y, Stephens O, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2008, 112(1):196-207.
- [25] Gunn WG, Conley A, Deininger L, et al. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):986-991.
- [26] Politou MC, Heath DJ, Rahemtulla A, et al. Serum concentrations of Dickkopf-1 protein are increased in patients with multiple myeloma and reduced after autologous stem cell transplantation[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(7):1728-1731.
- [27] Wang FS, Ko JY, Lin CL, et al. Knocking down Dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss: a histomorphological study in ovariectomized rats[J]. *Bone*, 2007, 40(2):485-492.
- [28] Terpos E, Sezer O, Croucher P. Myeloma bone disease and proteasome inhibition therapies[J]. *Blood*, 2007, 110(4):1098-1104.
- [29] Yaccoby S, Ling W, Zhan F, et al. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo[J]. *Blood*, 2007, 109(5):2106-2111.
- [30] Pozzi S, Hua Y, Vallet S, et al. Promoting osteoblastogenesis using a novel Dkk-1 neutralizing antibody in the treatment of multiple myeloma related bone disease[J]. *Blood*, 2008, 112(11):2739-2741.
- [31] Heath DJ, Chantry AD, Buckle CH, et al. Inhibiting Dickkopf-1(Dkk1) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(3):425-436.

- [32] Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, et al. Anti-DKK1 mAb(BHQ880) as a potential therapeutic for multiple myeloma[J]. Blood, 2009, 114(2):371-379.
- [33] Terpos E, Moulopoulos LA, Dimopoulos MA. Advances in imaging and the management of myeloma bone disease [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(14):1907-1915.
- [34] Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA, Christoulas D, et al. Dickkopf-1: a suitable target for the management of mye-

loma bone disease[J]. Expert Opin Ther Target, 2009, 13(7):839-848.

- [35] Qian J, Xie J, Hong S, et al. Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma[J]. Blood, 2007, 110(5):1587-1594.

(收稿日期:2011-11-08 修回日期:2011-12-23)

· 综 述 ·

噬菌体疗法治疗大肠埃希菌感染的研究现状及应用前景*

刘 平, 鄢亭亭, 彭 丽, 郭述良 综述, 罗永艾[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院 400016)

关键词: 细菌噬菌体; 埃希菌属; 治疗应用

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.030

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)16-1641-04

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)是医院获得性感染常见致病菌,在临床分离的致病菌中仅次于铜绿假单胞菌,排在第2位,主要引起呼吸道、泌尿道、伤口、胆道感染,腹膜炎、败血症及脑膜炎等。近年来细菌流行病学监测结果表明,大肠埃希菌耐药率逐年上升,已成为临床治疗面临的一大难题^[1]。

噬菌体(bacteriophage, phage)是感染细菌、真菌、放线菌和螺旋体等微生物的病毒的总称,分布极广,凡是有细菌的场所,就可能存在相应噬菌体的存在。裂解性噬菌体侵入宿主细胞后,随即引起宿主细胞裂解,利用这一特性可以用于治疗感染性疾病。自发现噬菌体以来,研究者就尝试采用噬菌体治疗细菌性感染。近年来,由于各种耐药性病原菌出现,新型抗生素的研发越来越困难,同时,随着大量噬菌体基因组的测序,研究者对噬菌体的进化史、噬菌体和宿主间相互作用、噬菌体生态学有了更深的了解,噬菌体疗法的知识背景和技术手段逐渐成熟以及噬菌体作为一种抗菌剂,具有特异性强、自我增殖快、来源广等一些其他抗菌剂无法比拟的优点,噬菌体疗法成为抗耐药菌研究领域的新热点^[2]。研究者报道了一系列应用噬菌体治疗大肠埃希菌感染的研究,来观察噬菌体治疗感染性疾病,特别是抗生素耐药菌导致的感染性疾病的潜力。采用噬菌体疗法的动物实验可以明确噬菌体在大肠埃希菌感染中的治疗潜力并探寻最佳治疗方案,是噬菌体疗法用于人体前非常关键的一步。现就相关文献进行综述。

1 噬菌体治疗大肠埃希菌感染的潜力

目前研究者报道了一系列应用噬菌体治疗大肠埃希菌导致的小鼠、肉鸡、牛、羊羔、猪等动物的腹泻、呼吸道感染、败血症及脑膜炎等的研究成果。大多数研究报道噬菌体可减少动物荷菌量,降低病死率,延长生存期,甚至能治愈大肠埃希菌感染^[3-18]。Smith、Huggins^[4]发现产 β -内酰胺酶的大肠埃希菌感染小鼠后立即用噬菌体 Φ 9882治疗,24~168 h小鼠存活率为100%,而生理盐水对照组存活率为0。研究发现噬菌体SPR02、DAF06可降低感染大肠埃希菌的肉鸡的病死率,当噬菌体剂量为 10^8 噬斑形成单位(plaque forming units, PFU)时病死率为0^[11-17];Smith等^[9]甚至发现低剂量105 PFU的噬菌

体B85/1、B85/2,单次给药也能治愈小牛大肠埃希菌导致的腹泻。噬菌体除用于治疗外,还能预防性应用,预防动物遭受大肠埃希菌的感染。比如将 10^2 PFU噬菌体喷洒于牛圈中,或将小牛安置于接受过噬菌体治疗的小牛曾生活过的牛圈中,即对新生小牛具有保护作用^[9]。Huff等^[11]也发现先用噬菌体喷雾给药7 d后,再用大肠埃希菌感染肉鸡,噬菌体预防组肉鸡病死率较对照组下降。

但是少数实验并未观察到噬菌体具有治疗作用,或者动物荷菌量短暂降低后又恢复到对照组水平^[19-23]。Stanford等^[21]报道将噬菌体包入聚合物胶囊,或者掺入饲料中经口给药可以减轻噬菌体被胃酸失活,但是牛体内的大肠埃希菌荷菌量并没有减少。研究发现噬菌体可减少羊肠内大肠埃希菌荷菌量,但没有根除病原菌^[20-21]。还有研究发现未用噬菌体处理的对照组体内也检出噬菌体,并且体内检出的噬菌体滴度与直肠给药组相近,口服给药组、直肠给药组、口服和直肠给药组以及对照组荷菌量无明显差异^[22]。

噬菌体疗法对不同动物的大肠埃希菌感染疗效有所不同。噬菌体疗法对小鼠、肉鸡大肠埃希菌感染有较好疗效,并能预防其遭受大肠埃希菌感染,而对大肠埃希菌导致的羊和牛的腹泻疗效不确切^[3-24],有的实验发现噬菌体能治愈大肠埃希菌导致的羊和牛的腹泻,而有的实验却发现噬菌体治疗组和空白对照组疗效无差异^[8-23]。Stanford等^[21]发现同一噬菌体对小鼠腹泻疗效好,对羊的腹泻却疗效欠佳。

2 影响噬菌体疗法疗效的因素

2.1 给药方式

2.1.1 给药途径 噬菌体治疗大肠埃希菌感染给药途径有噬菌体掺入饮用水给药、灌胃、直肠给药、腹腔注射、雾化吸入、肌肉注射等,不同给药途径的治疗效果不同。噬菌体掺入饮用水中给药对不同部位的感染疗效不同,对呼吸道感染无治疗作用^[12],但长期给药能降低腹泻小鼠肠道荷菌量^[23]。灌胃给药途径对治疗大肠埃希菌导致的小鼠、肉鸡腹泻疗效好,而对羊和牛的腹泻疗效不一^[8-9,19-24],这是否与食草动物特殊而发达的多室胃导致噬菌体失活有关,还有待进一步验证。经直肠给