

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.10.004

神经元特异性烯醇化酶和 U266 细胞株对破骨样细胞作用的研究*

袁忠涛¹, 卿 晨², 李晓进³, 张学美¹, 史明霞¹, 黄 颖¹, 李惠民^{1△}

(1. 昆明医科大学第一附属医院血液科 650032; 2. 昆明医科大学药学院暨重点实验室 650500; 3. 昆明医科大学第四附属医院血液科 650021)

[摘要] **目的** 探讨神经元特异性烯醇化酶(NSE)和人多发性骨髓瘤细胞 U266 对人破骨样细胞(OLC)功能的影响。**方法** 采用正常人外周血单个核细胞加用细胞核因子 κ B 受体激活蛋白配体(RANKL)+巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的方法诱导培养 OLC; 实验分 3 组, NSE 组: 将 6 孔培养板中培养 14 d 的 OLC, 分别加入 100 ng/mL 重组人 NSE 培养 24、48、72 h; 共培养组: 将 6 孔 Transwell 小室下室中培养 14 d 的 OLC, 各上室分别加入 1×10^5 /孔 U266 细胞进行共培养 24、48、72 h; 对照组: 单独培养的 OLC。通过实时荧光定量 PCR 比较 NSE 和 U266 细胞株对 OLC 的 RANKL、扩胃蛋白(OPG)、IL-6 和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP) mRNA 转录水平的影响。**结果** 共培养组、NSE 组和对照组 RANKL、OPG、IL-6 mRNA 在 OLC 均不表达; 与对照组相比, 共培养组、NSE 组的 TRAP mRNA 表达水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); TRAP mRNA 表达水平的升高尤其以 48 h 和 72 h 明显。**结论** 本试验中 OLC 表达 TRAP, NSE 是促进骨髓瘤骨病中 OLC 分化和成熟的因素, 提示 NSE 能增强 OLC 的活性。

[关键词] 磷酸丙酮酸水合酶; 骨髓瘤骨病; 破骨细胞; 酸性磷酸酶**[中图分类号]** R783.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)10-1309-04

Study on effect of NSE and U266 cell line on osteoclast-like cells*

Yuan Zhongtao¹, Qing Chen², Li Xiaojin³, Zhang Xuemei¹, Shi Mingxia¹, Huang Ying¹, Li Huimin^{1△}

(1. Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. College of Pharmacy, Key Laboratory, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China; 3. Department of Hematology, Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** To explore the functions of neuron-specific enolase(NSE) and human multiple myeloma U266 cells on osteoclast-like cells(OLC) function. **Methods** Normal human peripheral blood mononuclear cells were induced and cultured by adding RANKL and M-CSF to get OLC; the experiment was divided into 3 groups, the NSE group; OLC were cultured in the 6-well culture plate for 14 d and added with 100 ng/mL recombinant human NSE to culture for 24, 48, 72 h; the co-culture group; OLC were cultured in the lower well of 6-well Transwell chamber for 14 d, then added with 1×10^5 /well U266 cells in each upper well and conducted the co-culture for 24, 48, 72 h; the control group; OLC were cultured alone. The influences of NSE and U266 cell line on RANKL, OPG, IL-6 and TRAP mRNA transcriptional level of OLS were compared by using real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** RANKL, OPG, IL-6 mRNA had no expression on OLC in the co-culture group, NSE group and control group; compared with control group, the TRAP mRNA expression level in the co-culture group and the NSE group was increased, the difference was statistically significant($P < 0.01$); the increase of TRAP mRNA expression level was obvious especially at 48, 72 h. **Conclusion** OLC expressing TRAP and NSE may be one of the factors for promoting OLC differentiation and maturation in myeloma bone disease, prompting that NSE could increase the OLC viability.

[Key words] phosphopyruvate hydratase; myeloma bone disease; osteoclast; acid phosphatase

骨髓瘤骨病(myeloma bone disease, MBD)是影响多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者生存质量和预后的主要因素^[1], MBD 的发生、发展是多因素作用的结果, MM 细胞活化破骨细胞(osteoclast, OC), 抑制成骨细胞(osteoblast, OB)活性, 导致骨代谢失衡是其主要的病理生理机制, 其中 OC 为主要的效应细胞^[2]。细胞核因子 κ B(NF- κ B)受体激活蛋白(receptor activator of nuclear factor κ B, RANK)/NF- κ B 受体激活蛋白配体(receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL)/护骨蛋白(osteoprotegerin, OPG)系统是耦联 OB 和 OC 功能最重要的方式, RANKL 为 II 型跨膜蛋白, 主要由 OB 和基质细胞产生, 是介导 OC 分化和活化的关键因子^[3]。RANKL 在 MM 患者来源的浆细胞中高表达, 而且有溶骨病变患者的表达水平明显高于无溶骨病变者^[4]。RANK 属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族, 为 I 型跨膜糖蛋白, 可表达于

OC 的前体细胞和成熟的 OC 表面。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 NF- κ B 和 Jun N-终端激酶(JNK)途径, 直接活化成熟的 OC, 促进骨的重吸收^[5]。OPG 是 RANKL 的可溶性诱导受体, 可竞争性阻止 RANK 与 RANKL 结合, 抑制 OC 的分化和活化。MM 细胞除影响 RANKL 的表达外, 还可抑制 OB 和基质细胞分泌 OPG, 从而减少骨髓微环境中的 OPG。在 MM 患者中 OPG 产生明显减少, RANKL/OPG 比例失调, 造成骨代谢失衡, 促进溶骨病变的同时也促进肿瘤细胞本身的增殖, 最终造成 OC 活化与骨髓瘤进展的恶性循环^[6]。MM 细胞本身不表达 OPG, 但可通过细胞间的相互作用直接抑制骨髓基质细胞表达 OPG^[7]。破骨样细胞(osteoclast-like cell, OLC)功能与 OC 相似^[8], 人外周血单个核细胞诱导培养的 OLC 为研究提供了细胞来源。OLC 能分泌并表达特异性标志酶抗酒

* 基金项目: 云南省应用基础研究面上项目(2007C0037R)。

作者简介: 袁忠涛(1974—), 主治医师, 硕士, 主要从事血液肿瘤研究。

△ 通讯作者, E-mail: lihuimin@medmail.com.cn。

石磷酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), TRAP 能参与骨吸收的调节^[8]。神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)在多种实体瘤和 MM 等血液肿瘤中均有表达^[9-12],且与溶骨性病变有关^[13],但 NSE 在 MBD 中如何起作用,对 OC 的影响如何尚不清楚。本研究旨在通过人外周血单个核细胞诱导培养 OLC,并通过 NSE 和人多发性骨髓瘤细胞株 U266 对 OLC 的作用,观察 NSE 对 OLC 功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 外周血来源于 8 名健康志愿者,其中男 3 名,女 5 名,平均年龄(25.1 ± 2.4)岁,血常规正常;人多发性骨髓瘤细胞株 U266 由第二军医大学上海长征医院侯健教授惠赠传代培养。主要试剂:RANKL 和人巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)购自英国 Pepro-Tech 公司,TRAP 染色试剂盒购自南京建成生物研究所,TRIzol 试剂购自美国 Roche 公司,逆转录试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司,RANKL、OPG、IL-6 和 TRAP 基因扩增相关引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 人外周血单个核细胞诱导培养 OLC

1.2.1.1 分离人外周血单个核细胞 抽取外周血 20 mL,置于含 1 mL 无菌肝素钠生理盐水(1 000 U/mL)的 50 mL 离心管中,加入等量磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,充分混匀,并分为两等份(各 20 mL);另取两支 50 mL 离心管,分别加入 20 mL 淋巴细胞分离液(Ficoll),将装有 Ficoll 液的离心管倾斜 45°,用尖头吸管将等体积的稀释标本沿管壁(距离液面 1 cm 处)缓慢加入离心管,使其轻铺在 Ficoll 液上,2 000 r/min 离心 25 min,小心吸取单个核细胞层置于新的离心管;加入 5 倍体积 PBS 重复洗涤细胞 2 次(1 500 r/min 离心 10 min),获得单个核细胞;加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 α -MEM 培养液,将细胞吹打均匀。取部分细胞悬液,加入适量 NH₄Cl 裂解液裂解残存的红细胞,2 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入含 10% FBS 的 α -MEM 培养液重悬细胞,吸取 10 μ L 置于血细胞计数板上,计算细胞浓度。

1.2.1.2 细胞的纯化 将上述单个核细胞的密度重调,以 1.5×10^6 /mL 种植于 25 cm² 培养瓶,每瓶加入含 10% FBS 和 100 IU/mL 青、链霉素的 α -MEM 培养液 5 mL,置于在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内孵育。24 h 后轻轻倒去瓶中的上清液,用不含 FBS 的 α -MEM 培养基反复冲洗,去除未贴壁细胞。加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)液,常温消化 1~3 min 后置于倒置显微镜下观察,待细胞变圆,立即加入含 10% FBS 的 α -MEM 培养液终止胰蛋白酶的作用。用弯头吸管轻轻吹打细胞,待细胞脱离瓶壁,吸取细胞悬液,将细胞悬液 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。

1.2.1.3 OLC 的诱导培养 将上述分离的人外周血单个核细胞以 1.5×10^6 /mL 种植于培养瓶,进行细胞纯化;将纯化的细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 96 孔培养板(预先将牙质片层铺入培养板中)及 1×10^6 /mL 的密度接种于 6 孔和 24 孔培养板,加入含重组人 RANKL 100 ng/mL、M-CSF 50 ng/mL 和 10% FBS 的 α -MEM 培养液在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内诱导培养。

1.2.1.4 细胞形态学观察 用倒置相差显微镜观察细胞的形态变化和分化。

1.2.1.5 OLC 的鉴定 TRAP 染色:取培养 14 d 左右的细胞爬片,经洗涤、固定和清洗;按照 TRAP 染液说明书具体步骤进行染色,并用苏木素复染,清洗后自然风干;水性封片剂封片

后光镜观察 TRAP 阳性细胞,照相。骨吸收陷窝观察:取出 96 孔培养板诱导培养 28 d OLC 作用的牙质片层,经清洗、固定、风干及乙醇梯度脱水等处理,扫描电镜观察 OLC 对牙质片层的骨质破坏情况。

1.2.2 实验分组 NSE 组:将 6 孔培养板中培养 14 d 的 OLC,分别加入 100 ng/mL 重组人 NSE 培养 24、48、72 h;共培养组:将 6 孔 Transwell 小室下室中培养 14 d 的 OLC,各上室分别加入 1×10^5 /孔 U266 细胞进行共培养 24、48、72 h;对照组:单独培养的 OLC。每孔设 3 个平行复孔。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 OLC 的 RANKL、OPG、IL-6 和 TRAP mRNA 转录水平的表达情况 按预设时间点收集 NSE 组、共培养组和对照组样本,采用 Trizol 试剂盒,严格按照试剂操作说明提取单个核细胞的总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 含量及纯度,反转录合成 cDNA,以 GAPDH 作为内参照对 cDNA 产物行 PCR 扩增,各目的基因扩增引物见表 1。扩增过程为 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性;95 $^{\circ}$ C 15 s 变性,59 $^{\circ}$ C 20 s 退火,68 $^{\circ}$ C 50 s 延伸,40 个循环结束反应。实时荧光定量 PCR 检测目的基因表达:反应结束后,以 GAPDH 为内参照,实时荧光定量 PCR 检测 RANKL、OPG、IL-6 和 TRAP 基因的表达,由 ABI7300 随机软件分析扩增曲线和产物溶解曲线,按照相对定量公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因参照管家基因的相对含量,每一标本设置 3 个平行管,以 3 个平行管所得 Ct 值的均值计算,比较各组 RANKL、OPG、IL-6 和 TRAP 基因的表达情况。

表 1 扩增引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	产物片段长度(bp)
RANKL	正向引物:CGTCGCCCTGTTCTTCTA	257
	反向引物:CATCCACCATCGCTTTCT	
OPG	正向引物:GGACCACAATGAACAACACT	488
	反向引物:ACAGGGTGCTTTAGATGA	
IL-6	正向引物:GGAGACTTGCCTGGTGAA	330
	反向引物:CTGAGGTGCCATGCTAC	
TRAP	正向引物:CCCCGCGACGGCAGGGAATAA	242
	反向引物:TTCCCGGGCCGTGTGGAATG	
GAPDH	正向引物:GCATGGCCTTCCGTGTCCCC	339
	反向引物:GGCTGGTGGTCCAGGGGTCT	

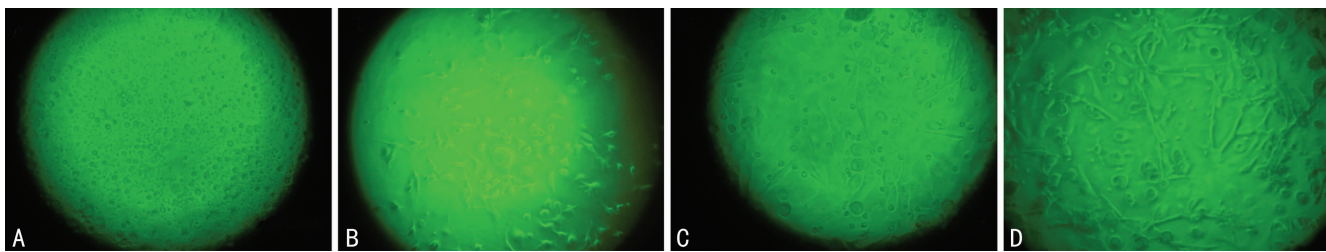
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据的统计分析,计量资料经正态性检验符合正态分布,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用重复测量资料的方差分析,其中不同分组、各时间段进一步两两比较采用 SNK 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察结果 倒置显微镜下观察诱导培养 6~7 d,有个别单个核细胞体积增大,出现融合现象,形态多为圆形或椭圆形,14 d 左右可观察到圆形、椭圆形、长条形、漏斗形或不规则形的多核巨细胞,见图 1。

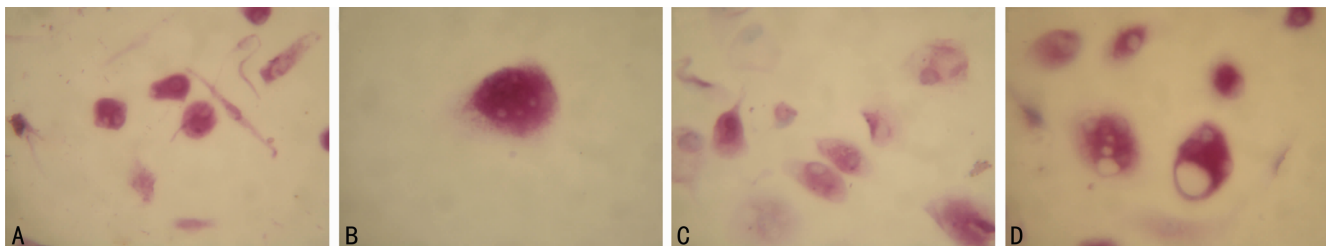
2.2 TRAP 染色结果 诱导培养 14 d,取出细胞爬片进行 TRAP 染色,可观察到圆形、椭圆形、长条形、漏斗形或不规则形的细胞,体积较大,细胞质丰富,细胞质内可见酒红色颗粒沉积,部分细胞质中可见大小不等空泡,核数个,呈淡黄色,细胞核清晰,大小不一,聚积在细胞中央或排列在细胞周边。苏木素复染后细胞核染呈蓝色,细胞质仍为酒红色,见图 2。

2.3 牙质片层扫描电镜结果 诱导培养 OLC 28 d,骨片表面可见形态不规则的吸收陷窝,常规培养组(未进行诱导培养)对照组骨片表面未见骨吸收陷窝,见图 3。



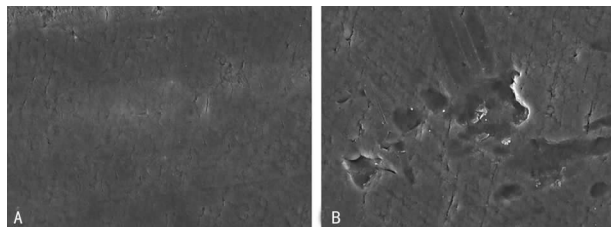
A:3 d;B:7 d;C:12 d;D:14 d。

图 1 人外周血单个核细胞经 RANKL+M-CSF 诱导下不同时间段的细胞形态(×200)



A:TRAP 染色(×200);B:TRAP 染色(×400);C:TRAP 染色+苏木素复染(×200);D:TRAP 染色+苏木素复染(×400)。

图 2 诱导培养 14 d TRAP 染色的细胞形态



A:对照组(SEM×1 000);B:诱导培养组(SEM×1 000)。

图 3 骨吸收陷窝扫描电镜观察

表 2 3 组不同时间 OLC 的 TRAP mRNA 表达情况(̄x±s)

分组	24 h	48 h	72 h
共培养组	8.65±0.41 ^a	12.31±0.66 ^{ab}	11.81±0.54 ^{ab}
NSE 组	7.46±0.58 ^a	10.51±0.47 ^{ab}	11.34±0.32 ^{ab}
对照组	3.21±0.51	3.96±0.40	3.74±0.39

^a:P<0.01,与对照组比较;^b:P<0.01,与 24 h 比较。

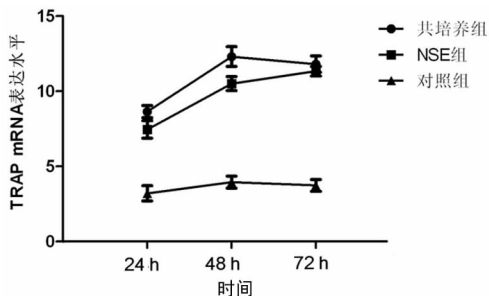


图 4 3 组不同时间 TRAP mRNA 表达水平的变化趋势图

2.4 各组 OLC 时 RANKL、OPG、IL-6 和 TRAP mRNA 表达情况 共培养组、NSE 组及对照组 RANKL、OPG、IL-6 mRNA 均不表达;共培养组、NSE 组与对照组相比,TRAP mRNA 转录水平的表达呈升高趋势,差异有统计学意义(P<0.01)。共培养组、NSE 组 48 h 和 72 h TRAP mRNA 的表达水平高于 24 h,差异有统计学意义(P<0.01),两组 48 h 和 72 h TRAP mRNA 的表达水平差异无统计学意义(P>0.05);对照组 24、

48、72 h TRAP mRNA 的表达水平差异均无统计学意义(P>0.05),见表 2、图 4。

3 讨论

正常情况下,骨形成和骨吸收处于动态平衡状态,这是骨重塑过程。OC 和 OB 是这一过程中的主要细胞,协调成骨与破骨的动态平衡,从而维持骨的相对稳定^[14]。OC 是体内生理状态下惟一有骨吸收功能的细胞,在生理性骨重建和病理性骨吸收中起重要作用^[15]。OC 在受到 MM 细胞或骨髓微环境中其他细胞的刺激下,可致细胞数量增多,功能活跃,出现溶骨增强^[16]。

OC 是高度分化的终末细胞,体外分离的细胞只能存活 7~14 d,且获得的细胞数量有限。经诱导培养的 OLC 在功能上与 OC 相似,相对容易获得、纯度较高。本试验参照文献方法^[17-19],采用正常人外周血单个核细胞加用 RANKL+M-CSF 的方法诱导培养 OLC,为 MBD 的体外研究提供可靠的细胞来源。

OC 从发育、成熟、活化再到发挥骨吸收功能经历一个复杂、多级的调节过程,而 OC 的分化和成熟是调控整个骨吸收过程的重要靶点,RANK/RANKL/OPG 系统在介导 OC 分化和成熟方面起到关键的作用。RANKL 与 OC 和破骨前体细胞膜表面表达的 RANK 结合,能促进 OC 的分化、成熟,增强其活性,抑制凋亡^[20]。本研究中 OLC 不表达 RANKL,与文献报道一致^[21]。成熟的 OC 和 OLC 分泌并高表达 TRAP,且具有噬骨功能^[8]。本试验中 OLC 表达 TRAP,并能在牙质片层片上形成骨吸收陷窝,也验证了本研究诱导培养的细胞为 OLC;而且试验结果显示共培养组和 NSE 组 TRAP 的表达上调,提示在体外 MM 细胞和 NSE 能增强 OLC 的活性。

烯醇化酶是参与糖酵解途径中 2-磷酸甘油酸转化成磷酸烯醇式丙酮酸的限速酶,它由 α、β、γ 亚基以二聚体形式组成免疫性质不同的 αα、ββ、γγ、αγ、αβ 5 种同工酶;其中 γγ、αγ 主要存在于神经元和神经内分泌细胞中,称为 NSE^[22]。另有实验证实正常的 T 和 B 淋巴细胞在特定发展阶段也表达 NSE^[23],这说明 NSE 不是神经内分泌细胞所特有的。Li 等^[24]研究发现在体外 NSE 能促进人视网膜母细胞瘤细胞的增殖,并认为 NSE 是一种神经细胞生存和营养因子。MM 细胞株 U266 表达 NSE,MM 患者血清中也发现 NSE 水平明显升高,且与临

床分期、骨损害程度及治疗效果存在相关性。应用 NSE 处理 OLC, TRAP mRNA 转录水平的表达上调, 提示 NSE 促进 OLC 的分化和增殖; NSE 具有 U266 细胞对 OLC 的类似作用; 推测 NSE 可能通过细胞代谢或作为营养因子起作用, 但是否有其他某种方式的参与尚不清楚, 目前国内外亦无这方面研究的报道, 值得进一步探讨。

参考文献

- [1] Irisawa H. Bone disease in multiple myeloma[J]. *Nihon Rinsho*, 2015, 73(1): 42-46.
- [2] Delgado-Calle J, Bellido T, Roodman GD. Role of osteocytes in multiple myeloma bone disease[J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014, 8(4): 407-413.
- [3] Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, et al. RANKL/RANK/OPG; new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1704(2): 49-57.
- [4] Heider U, Langelotz C, Jakob C, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4): 1436-1440.
- [5] Tanaka S, Nakamura K, Takahashi N, et al. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system[J]. *Immunol Rev*, 2005, 208: 30-49.
- [6] Silvestris F, Lombardi L, de Matteo M, et al. Myeloma bone disease: pathogenetic mechanisms and clinical assessment[J]. *Leuk Res*, 2007, 31(2): 129-138.
- [7] Giuliani N, Bataille R, Mancini C, et al. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment[J]. *Blood*, 2001, 98(13): 3527-3533.
- [8] Husheem M, Nyman JK, Vaaraniemi J, et al. Characterization of circulating human osteoclast progenitors: development of in vitro resorption assay[J]. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76(3): 222-230.
- [9] Takamura S, Teraki Y. Case of clear cell sarcoma in the left buttock in which serum neuron-specific enolase was a useful marker for monitoring disease progression[J]. *J Dermatol*, 2015, 42(6): 621-624.
- [10] Fujiwara H, Arima N, Ohtsubo H, et al. Clinical significance of serum neuron-specific enolase in patients with adult T-cell lymphoma[J]. *Am J Hematology*, 2002, 71(2): 80-84.
- [11] Yang HP, Mi RH, Wang Q, et al. Expression of neuron-specific enolase in multiple myeloma and implications for clinical diagnosis and treatment[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e94304.
- [12] Liu S, Otsuyama K, Ma Z, et al. Induction of multilineage markers in human myeloma cells and their down regulation by interleukin6[J]. *Int J Hematol*, 2007, 85(1): 49-58.
- [13] Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(4): 1293-1299.
- [14] Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1092: 385-396.
- [15] Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation[J]. *Bone*, 2007, 40(2): 251-264.
- [16] Raimondi L, De Luca A, Amodio N, et al. Involvement of multiple myeloma cell-derived exosomes in osteoclast differentiation[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(15): 13772-13789.
- [17] Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, et al. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand(RANKL)[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2000, 99(2): 133-140.
- [18] Sabokbar A, Athanasou NS. Generating human osteoclasts from peripheral blood[J]. *Methods Mol Med*, 2003, 80: 101-111.
- [19] 黄红铭, 姜华, 张慧, 等. 外周血单个核细胞诱导培养破骨细胞[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28(1): 10-13.
- [20] Silvestris F, Ciavarella S, De Matteo MA, et al. Bone-Resorbing cells in multiple myeloma: osteoclasts, myeloma cell polykaryons, or both? [J]. *Oncologist*, 2009, 14(3): 264-275.
- [21] Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1240: E13-18.
- [22] 梁成, 孔凡元. 神经元特异性烯醇化酶检测与临床研究[J]. *宁夏医学院学报*, 2004, 26(2): 129-131.
- [23] Haimoto H, Takahashi Y, Koshikawa T, et al. Immunohistochemical localization of gamma-enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues[J]. *Lab Invest*, 1985, 52(3): 257-263.
- [24] Li A, Lane WS, Johnson LV, et al. Neuron-specific enolase: a neuronal survival factor in the retinal extracellular matrix[J]. *J Neurosci*, 1995, 15(1): 385-393.

(收稿日期: 2015-12-15 修回日期: 2016-01-22)

(上接第 1308 页)

- [16] La Marca R, Nedeljkovic M, Yuan L, et al. Effects of auricular electrical stimulation on vagal activity in healthy men: evidence from a three-armed randomized trial[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 118(8): 537-546.
- [17] Goertz CMH, Niemtzw R, Burns SM, et al. Auricular acupuncture in the treatment of acute pain syndromes: a pilot study[J]. *Mil Med*, 2006, 171(10): 1010-1014.
- [18] 姚新宇, 杨华, 田小林, 等. 不同时机针刺经穴对直肠癌根治术患者术后恶心呕吐发生的影响: 血浆胃泌素水平的测定[J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(7): 820-823.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2015-12-28)