·论　　著·　　doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.001
网络首发　http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190212.1248.004.html(2019-02-15)

巨噬细胞炎症蛋白-1α 通过骨硬化蛋白抑制骨髓瘤骨病患者成骨细胞功能研究*

王晓桃,何玉婵,王航飞,阳少芳,张俊艳,高彤彤,吴春叶
(桂林医学院第二附属医院血液内科,广西桂林 541199)

［摘要］ **目的**　探讨巨噬细胞炎症蛋白-1α(MIP-1α)对骨髓瘤骨病(MBD)患者成骨细胞抑制功能的研究。**方法**　采用人骨髓瘤细胞株 H929 细胞及 MBD 患者骨髓基质细胞(BMSCs)分化成熟的第三代成骨细胞(OB),实验分 5 组:对照组、MIP-1α 组、骨硬化蛋白(Scl)组、抗 MIP-1α 单抗(MIP-1α-Ab)组和抗 Scl 单抗(Scl-Ab)组。分离并原代培养 BMSCs 分化的 OB,传代培养 H929;ELISA 定量检测 H929 培养上清液中的 MIP-1α 和 Scl 水平;碱性磷酸酶染色及茜素红染色鉴定 OB,Brαdford 法定量检测 OB 的碱性磷酸酶(ALP)活性;Western blot 检测 OB 的 ALP 的表达水平;茜素红染色法检测 OB 钙离子沉积结节;流式细胞仪检测 OB 的凋亡率。**结果**　体外成功分离培养 BMSCs 为 OB; Scl 组及 Scl-Ab 组 MIP-1α 水平较对照组改变不明显(均 $P>0.05$),MIP-1α 组 Scl 的水平明显高于对照组($P<0.05$),MIP-1α-Ab 组中的 Scl 水平较对照组明显下降($P<0.05$);MIP-1α-Ab 组、Scl-Ab 组中 OB 的钙离子沉积结节、ALP 活性、ALP 蛋白较对照组明显增高(均 $P<0.05$),而 OB 的凋亡率则明显低于对照组($P<0.05$); MIP-1α、Scl 组中 OB 的钙离子沉积结节、ALP 活性、ALP 蛋白较对照组组明显降低(均 $P<0.05$),而 OB 的凋亡率明显高于对照组($P<0.05$)。**结论**　MIP-1α 能抑制 MBD 患者 OB 分化成熟,促进 OB 的凋亡,其机制可能是通过增加 Scl 水平来实现的。

［关键词］ 骨髓瘤骨病;成骨细胞;巨噬细胞炎症蛋白-1α;骨硬化蛋白
［中图法分类号］ R733.3　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1671-8348(2019)08-1261-06

MIP-1α inhibiting osteoblast function in myeloma bone disease patients through increasing the sclerostin*

WANG Xiaotao, HE Yuchan, WANG Hangfei, YANG Shaofang, ZHANG Junyan, GAO Tongtong, WU Chunye
(*Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi* 541199, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**　To investigate the mechanism of macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α) inhibiting osteoblasts in patients with myeloma bone disease (MBD) by increasing the level of sclerostin (Scl). **Methods**　Human myeloma cell line H929 cells and the third generation osteoblasts (OB) differentiation from bone marrow stromal cells (BMSCs) of MBD patients were chosen as study object. The experiment was divided into five groups: control group, MIP-1α group, sclerostin (Scl) group, anti-MIP-1αmonoclonal antibody (MIP-1α-Ab) group and anti-Scl monoclonal antibody (Scl-Ab) group. MIP-1α and Scl levels in H929 supernatant were quantified by using ELISA. OB were identified by alkaline phosphatase staining and Alizarin red staining, Bradford assay was used to detect the ALP activity of OB, Western blot was used to detect the levels of ALP. The calciumion deposits noduls was tested by Alizarin red staining. The opoptosis rate of the OB was evaluated by flow cytometry. **Results**　It was successfully to isolate and culture BMSCs into OB from MBD patients in vitro, and OB was identified by positive staining of alkaline phosphatase and Alizarin red. In the Scl and Scl-Ab groups, the level of MIP-1α in H929 supernatant was not significantly different from that in the control group ($P>0.05$), but Scl levels in the MIP-1α group was significantly higher than the control group ($P<0.05$), Scl levels in MIP-1α -Ab group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The calcium deposits nodules, ALP activity and ALP protein in the MIP-1α and Scl group were higher than those of the control group ($P<0.05$), while the apoptosis rate of OB was significantly lower than that of

* **基金项目**:国家自然科学基金项目(81460038);广西自然科学基金资助项目(2017GXNSFAA198178);桂林市科技开发项目(20170109-21);广西卫计委自筹课题(Z2016044);广西中青年教师能力提升项目(KY2016YB318)。　**作者简介**:王晓桃(1975－),主任医师,博士,主要从事恶性血液病的临床与基础研究。

the control group ($P<0.05$). **Conclusion** MIP-1α can inhibit the differentiation and maturation of OB in MBD patients and promote the apoptosis of OB in vitro. The mechanism may be related to the increasing of the Scl, but the specific mechanism need to be further study.

[**Key words**] myeloma bone disease; osteoblast; inflammatory protein-1α; sclerostin

骨髓瘤骨病(myeloma bone disease,MBD)是多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)患者常见的并发症。MBD 以进行性骨质破坏、多发溶骨性病变等为特征,是 MM 患者致残的主要原因。研究表明,有 70%左右的患者因 MBD 而危及生活质量并增加死亡风险,给家庭及社会造成沉重负担[1]。因此,深入研究 MBD 发生机制,可为靶向治疗 MBD 奠定理论基础。

MBD 发生的主要机制是在骨髓微环境中,瘤细胞与骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)通过多条信号通路导致破骨细胞(osteoclast,OC)活性增强和成骨细胞(osteoblast,OB)活性减弱,造成溶骨性损害,阻碍新骨生成[2-3]。本课题组的前期研究已证实,巨噬细胞炎症蛋白-1α(macrophage inflammatory protein-1α,MIP-1α)能激活 OC,介导瘤细胞生长,并在 MBD 的发生、发展中发挥重要作用[4]。最新研究发现,MIP-1α 有抑制 OB 的作用[5],但其具体机制不明确。笔者前期研究发现,大部分 MM 患者骨髓中 MIP-1α 和骨硬化蛋白(sclerostin,Scl)水平增高,两者呈明显的正相关[6],Scl 是 Wnt/β-catenin 通路的重要抑制剂[7],β-catenin 与 T 细胞因子相互作用,诱导 OB 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)的活性,促进前体 OB 的生长和早期分化、细胞外基质成熟和矿化[8]。因此,本研究拟通过体外实验验证 MIP-1α 促进瘤细胞表达 Scl,从而抑制 OB 的分化与成熟、细胞外基质成熟和矿化促进 OB 凋亡,导致 MBD 的发生、发展。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择来自 2015 年 1—12 月本科室新确诊的 6 例 MBD 患者,其中男 4 例,女 2 例,中位年龄 64 岁(47～73 岁)。入选病例均按照国际骨髓瘤工作组的诊断标准确诊为活动性 MM,如并发 MBD 症状的 MM 患者均需行 X 线片检查骨盆、颅骨、肱骨、股骨等确诊不同程度的 MBD,如无 MBD 相关症状的 MM 患者需行全身低剂量 CT 或胸椎、腰椎 MRI 以明确有无并发 MBD。所有入选患者均签署知情同意书。细胞株:高表达 MIP-1α 和 Scl 的人骨髓瘤 H929 细胞(购自天津血液病研究所[6])及 MBD 患者 BMSCs 分化成熟的第 3 代 OB 为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 胎牛血清、小牛血清、DMEM 培养基、RPMI-1640 干粉均购自杭州四季青公司,淋巴细胞分离液、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所第一分所),Bradford 法蛋白定量试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司),二甲基亚砜(DMSO)、地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素 C、茜素红染色液(美国 Sigma 公司)。ALP 改良钙钴法染液(南京建成科技有限公司);MIP-1α 和 Scl ELISA 试剂盒(美国 Gibco 公司);MIP-1α 和 Scl 蛋白,鼠抗人 MIP-1α、Scl、IL-6 和 ALP 单克隆抗体,免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒,鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);Annexin V FITC 细胞凋亡测定试剂盒(美国 R&D 公司);凝胶电泳仪、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),IX73 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

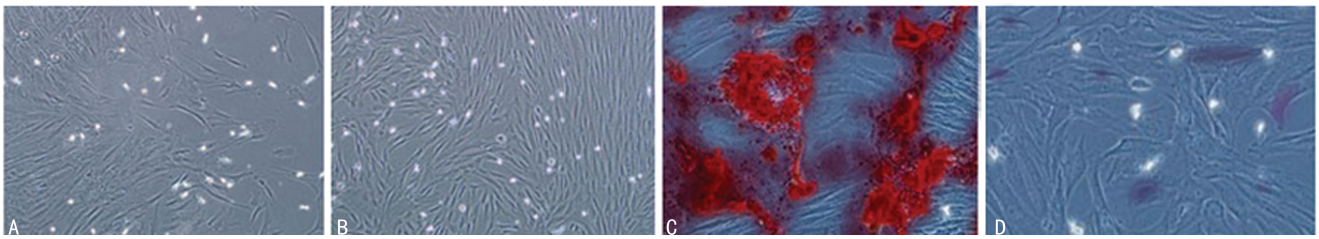
1.2.2 实验分组 实验分 5 组:对照组:常规培养基培养;MIP-1α 组:培养基加 0.2 ng/mL MIP-1α 标准品;Scl 组:培养基加 0.2 ng/mL Scl 标准品;MIP-1α 单抗(MIP-1α-Ab)组:培养基加 0.2 ng/mL MIP-1α 单抗;sclerostin 单抗(Scl-Ab)组:培养基加 0.2 ng/mL Scl 单抗。

1.2.3 纯化并原代培养 OB 并鉴定 从 MBD 患者髂后上棘处抽取骨髓 5～10 mL,肝素抗凝,结合全骨髓培养法,用等量的 PBS 稀释,按1.0∶1.5比例加入红细胞裂解液,680×g 离心 20 min,去除上清液,移至无菌培养瓶中,补足完全培养基(15%胎牛血清,1%双抗,DMEM)培养。5 d 后首次换液,并在显微镜下观察细胞开始变为梭形、贴壁,后每 3 天换液 1 次,待细胞长满视野 70%～80%后首次传代,经 0.25%胰酶消化,并接种于六孔板,改为 OB 诱导分化培养基(1×10^{-8} mol/L 地塞米松、50 g/mL 抗坏血酸及 10 mmol/L β-甘油磷酸)。每 3 天换液 1 次,并在显微镜下观察细胞形态变化,行茜素红染色,ALP 免疫组织化学鉴定为 OB 后方可进行传代培养并留做后续实验。

1.2.4 茜素红染色鉴定并观察钙离子沉积结节 BMSCs 分化的 OB 培养 14 d 后,换液,种至 6 孔板,PBS 冲洗 2 次,4%多聚甲醛固定 30 min 后,再用 PBS 冲洗 3 次,用 0.1%茜素红-Tris-HCl 染色 30 min,PBS 冲洗,干燥,封固后,倒置相差显微镜下观察钙结节。

1.2.5 OB 的定性检查 改良 Gomori 钙钴法 ALP 染色,倒置相差显微镜观察。ALP 阳性细胞表现为细胞质出现棕黑色片状颗粒。

1.2.6 H929 细胞传代培养 H929 细胞在含 10%



A:BMSCs 分离纯化培养 10 d;B:BMSCs 分离纯化培养 14 d;C:茜素红染色 BMSCs 分离纯化培养 14 d 的 OB;D:ALP 染色 BMSCs 分离纯化培养 14 d 的 OB

图 1　BMSCs 分离培养纯化 OB(×40)

澳洲胎牛血清(美国 Gibco 公司)、5%小牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中悬浮培养。

1.2.7　ELISA 定量检测 H929 细胞上清液中的 MIP-1α 和 Scl 水平　取对数生长的 H929 细胞,离心弃上清液,用无血清的 RPMI-1640 培养基重悬调整细胞数为 1×10^5/mL,为防止其他细胞因子的干扰,加入终浓度为 1.0 ng/mL 的鼠抗人 IL-6 单克隆抗体,静置 4 h,以中和骨髓瘤细胞分泌的主要生长因子 IL-6,弃上清液,PBS 冲洗 3 次,按实验分组处理细胞培养 24 h 后,收集各组的上清液,用 MIP-1α、Scl ELISA 试剂盒定量检测各组细胞上清液中的 MIP-1α、Scl 水平,ELISA 具体检测方法按试剂盒说明书进行。

1.2.8　各组 OB 活性定量检测　OB 按 1×10^5/mL 种于六孔板中培养 2 d,PBS 冲洗 2 次,根据实验分组予以更换相应的培养液,培养 3 d 后弃上清液,用 0.25%胰酶消化细胞,置于离心管,680×g 离心 10 min,去上清液,加 TritonX-100 裂解液 1 mL,反复冻融 3 次(冻约 30 min,融约 3 min)取出样品,按 ALP 试剂盒说明书配制测定管、标准管和空白管,每个管混匀后 37 ℃水浴 10 min,再加上显色剂,立即混匀,用分光光度计在波长 520 nm 下进行比色,测定各组细胞 ALP 活性,并用 Bradford 法进行细胞蛋白标准化(按蛋白检测试剂盒说明操作),最后用 ALP/总蛋白的值计数 ALP[单位:比活性(U/mg)]。

1.2.9　Western blot 检测各组细胞中的 ALP 蛋白的表达　按 1.2.3 方法鉴定 OB 后,取对数生长期的第 3 代 OB 按 1×10^5/mL 加入 6 孔培养板,按实验分组处理细胞继续培养 24 h 后,按凯基全蛋白提取试剂盒说明书提取第 3 代 OB 的总蛋白,再按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书定量后于−20 ℃保存。取 30 μg 总蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入抗 ALP(1∶500)一抗、GAPDH(1∶600),冰箱 4 ℃孵育过夜,室温培育 1 h,TBST 溶液清洗 3 遍,每遍 5 min,TBST 洗膜后用 ECL 法显影。条带用 Image J 软件分析,测定灰度值。目的条带与对应的 GAPDH 条带的灰度比值为目的蛋白相对表达水平。

1.10　流式细胞仪(FCM)检测 OB 凋亡率　将对数生长期的第 3 代 OB 置入 10%小牛血清培养基中培养过夜,调节细胞密度至 1×10^6/mL,按实验分组再在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中共同培育 24 h 后,收集细胞约 5×10^6 个进行如下操作:用 Binding Buffer 洗 1 次,室温 804.96×g 离心 10 min,收集细胞;洗涤后用 100 μL Binding Buffer 重悬细胞,加 5 μL Annexin V-FITC,避光孵育 20 min,再加 10 μL 碘化丙啶(PI,浓度为 1 mg/mL)室温下避光孵育 15 min,Binding Buffer 洗涤、重悬,立即上 FCM 检测,每个样品至少检测 5×10^6 个细胞。利用 Cell Quest 功能软件进行参数获取和数据分析。每组样品重复 3 次。

1.3　统计学处理　采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　OB 鉴定及传代　原代 BMSCs 培养 5 d 换液后,即可观察到贴壁细胞,细胞形态短小,呈长梭型,细胞之间无突起连接,培养至第 10 天,细胞明显增多、变长、变大,长梭型形态更加明显,见图 1。培养至第 14 天时,细胞基本铺满皿底,细胞排列呈螺旋状,长梭型。经茜素红染色发现培养14 d后的 OB 能见到少部分钙离子沉淀结节,ALP 染色可发现 OB 细胞细胞质中有棕褐色颗粒或大片状沉淀物体,显示 ALP 染色阳性,符合 OB 的特征。

2.2　H929 细胞上清液中 MIP-1α 和 Scl 的水平　按实验分组检测各组 H929 细胞上清液中 MIP-1α 和 Scl 蛋白水平,结果显示,MIP-1α 组上清液中的 MIP-1α 和 Scl 的水平明显高于对照组($t=6.42$、3.56,$P=0.000$、0.012),MIP-1α-Ab 组上清液中的 MIP-1α、Scl 水平明显低于对照组($t=3.42$、$2.78P$,$P=0.001$、0.012);而 Scl 及 Scl-Ab 组中的 MIP-1α 水平较对照

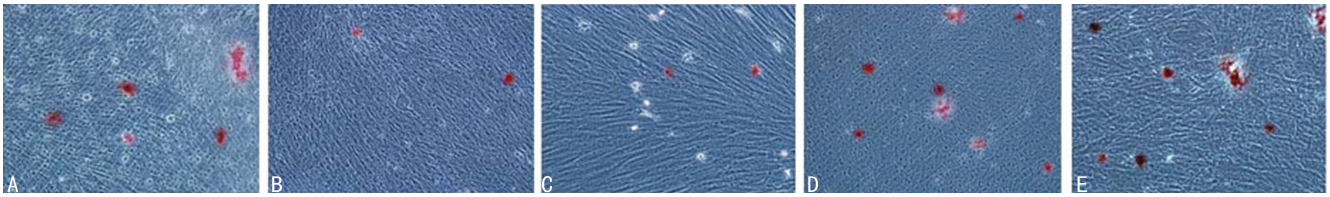
组增减不明显(t=0.618、0.744,P=0.552、0.474)、Scl 水平较对照组增减明显(t=6.97、3.17,P=0.000、0.013),见表 1。

2.3 各组 OB 的钙离子沉积结节分析 运用茜素红染色钙离子沉积结节以检测 OB 外基质成熟情况,按实验分组干预后继续培养至第 6 天,发现 MIP-1α、Scl 组较对照组钙离子沉积结节减少(P<0.05)。MIP-1α-Ab、Scl-Ab 组钙离子沉积结节较对照组明显增多(P<0.05)。但各组形态变化不显著,见表 2、图 2。

表 1 各组细胞上清液中的 MIP-1α、Scl 水平 ($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	MIP-1α	Scl
对照组	0.459±0.105	0.396±0.086
MIP-1α 组	1.059±0.131b	0.756±0.107[a]
MIP-1α-Ab 组	0.137±0.044[b]	0.287±0.049[a]
Scl 组	0.491±0.023	1.156±0.091[b]
Scl-Ab 组	0.413±0.109	0.256±0.071[a]

[a]:P<0.05,[b]:P<0.01,与对照组比较



A:对照组;B:MIP-1α 组;C:Scl 组;D:MIP-1α-Ab 组;E:Scl-Ab 组

图 2 不同组 OB 的钙离子沉积结节(×40)

2.4 各组 OB 的 ALP 活性 MIP-1α-Ab、Scl-Ab 组的 OB 较对照组细胞生长快,细胞呈长梭形更明显,有的呈纤维样生长,细胞体积增大、而 MIP-1α-Ab、Scl-Ab 组的 OB 较对照组生长慢,细胞较短小,有的呈多角形,呈树枝状突起。经 ALP 活性检测试剂盒检测后,ALP 蛋白表达阳性细胞为细胞质和核均出现棕黑色颗粒。定量检测发现 MIP-1α-Ab、Scl-Ab 组中 OB 的 ALP 的活性明显高于对照组(均 P<0.01)。而 MIP-1α、Scl 组中 OB 的 ALP 的活性明显低于对照组(均 P<0.01),见表 2。

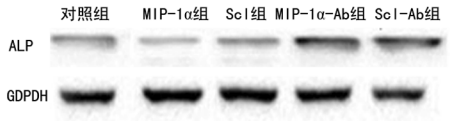
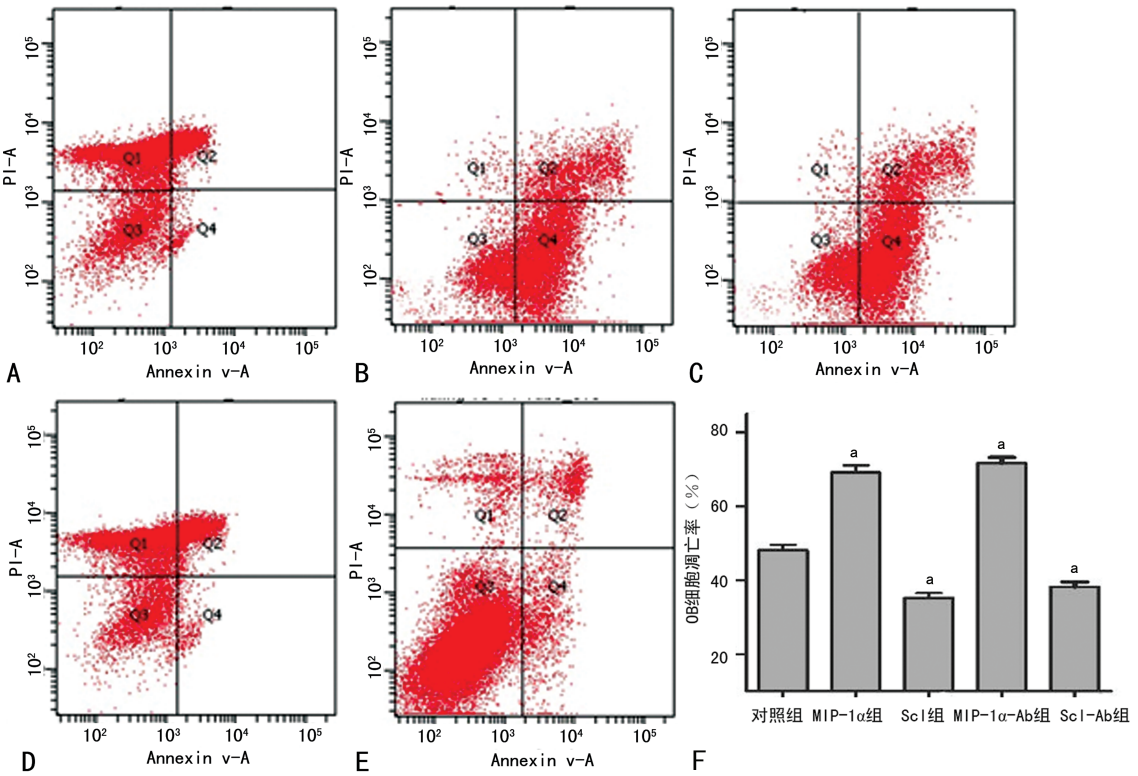


图 3 Western blot 检测各组 OB 的 ALP 蛋白质表达



A:对照组;B:MIP-1α 组;C Scl 组;D:MIP-1α-Ab 组;E:Scl-Ab 组;F:凋亡率分析;[a]:P<0.05,与对照组比较

图 4 各组 OB 细胞的凋亡率

表 2 不同组成骨细胞的钙沉积结节($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组	MIP-1α 组	Scl 组	MIP-1α-Ab 组	Scl-Ab 组
钙离子沉积结节	3.97±2.14	1.59±0.76[a]	1.64±1.36[a]	5.17±1.48[a]	6.14±2.17[a]
ALP 活性	0.348±0.032	0.168±0.008[b]	0.183±0.026[b]	0.724±0.027[b]	0.819±0.021[b]

[a]:$P<0.05$,[b]:$P<0.01$,对照组比较

2.5 各组 OB 的 ALP 蛋白表达水平 Western blot 检测结果进一步发现,培养至第 6 天发现 MIP-1α、Scl 组 OB 中 ALP 蛋白的灰度值较对照组表达减少,MIP-1α-Ab、Scl-Ab 组 OB ALP 蛋白的灰度值较对照组表达明显增多,见图 3。

2.6 各组 OB 的凋亡率 FCM 检测显示,MIP-1α、Scl 组的 OB 凋亡率明显高于对照组($t=2.19$,$P=0.02$),MIP-1α-Ab、Scl-Ab 组的 OB 凋亡率明显低于对照组($t=3.12$,$P<0.01$),见图 4。

3 讨 论

MBD 的发生、发展是多因子、多信号通路相互作用的结果,本团队既往研究发现 MIP-1α 在 MBD 的发生、发展中有重要作用,并与 Scl 具有一定的关联性。但它们之间到底如何影响并不清楚。体外研究发现高表达 MIP-1α 和 Scl 的 MM 细胞株 H929,加入 MIP-1α 试剂后,H929 细胞株表达更多的 Scl。但当加入 Scl 后,细胞表达的 MIP-1α 并不增加,说明 MIP-1α 可能通过不同方式促进骨髓瘤细胞表达 Scl,而 Scl 并不促进骨髓瘤细胞表达 MIP-1α。反之运用同样的方法,在高表达 MIP-1α 和 Scl 的 H929 细胞中加入 MIP-1α-Ab 中和 MIP-1α 后,细胞的 MIP-1α 和 Scl 水平均下降,而加入 Scl-Ab 中和 Scl 后,细胞的 MIP-1α 水平却并不下降,这说明了抑制 MIP-1α 表达,也会影响骨髓瘤细胞表达 Scl;而抑制骨髓瘤细胞表达 Scl,则并不影响骨髓瘤细胞分泌 MIP-1α。这也间接说明了骨髓瘤细胞表达 Scl 可能受 MIP-1α 调控。

MIP-1α 如何促进骨髓瘤细胞分泌 Scl,经检索国内外文献均未见明确报到。有研究报道将人骨髓瘤细胞系移植给鼠构建鼠骨髓瘤模型,发现其血浆中鼠源性 Scl 水平增高,说明 Scl 可能是由骨髓微环境产生的[9-10]。也可能是在 MM 患者中,骨髓瘤细胞与局灶的破骨祖细胞直接接触、相互黏附后,通过多种途径促进骨髓瘤细胞表达 Scl[11]。也有可能骨髓瘤细胞通过多种途径激活毗邻的破骨祖细胞,局灶增多的破骨细胞(OC)会促进骨细胞分泌 Scl 增多。还有学者认为 Scl 是由破骨祖细胞产生的[12],而 MIP-1α 是一种非常重要的 OC 激活因子。因而,根据上述实验结果,骨髓瘤细胞通过自分泌或旁分泌途径分泌 MIP-1α,当 MIP-1α 与受体结合后,使核因子 κB(NF-κB)受体激动剂配体 ligand of receptor activator of nuclear factor kappa B,RANKL)表达增高,增高的 RANKL 与骨髓巨噬细胞(bone marrow macrophages,BMM)膜上的 RANK 受体结合,再通过膜内部分特定区域激活下游信号通路,促进 BMSCs 分化破骨祖细胞增多,导致 Scl 增多。

Scl 是 SOST 基因精细编码的一种糖蛋白,是骨细胞分泌的重要信号分子,参与骨形成调节,决定骨重建过程中的骨量和结构。在 MBD 患者 BMSCs 分化 OB 的体外实验中,当加入 MIP-1α 和 Scl 干预时,OB 的凋亡率增加,钙离子沉积及 ALP 活性均下降;而加入 MIP-1α 和 Scl 单抗干预时 OB 凋亡率则减少,钙离子沉积及 ALP 的活性则增加,这说明 MIP-1α 和 Scl 可能抑制成骨祖细胞向 OB 分化、增殖,减弱细胞外基质的成熟及矿化作用,促进 OB 凋亡。结合上述实验可推测 MIP-1α 抑制 OB 分化与成熟的机制可能是通过其促进骨髓瘤细胞分泌 Scl 来实现的。Scl 是 Wnt/β-catenin 信号通路抑制剂,Scl 水平增高可直接减弱骨形态发生蛋白(BMP)的活性,抑制骨细胞的生成[13],Scl 还可抑制 Fra-1 基因表达,抑制转录因子 AP-1 的活性,从而导致 APL、骨钙素(BGP)、Ⅰ型胶原和胶原酶等基因活性下降影响骨基质的形成[14];Scl 可直接抑制 Wnt/β-catenin 及下游的信号通路,导致 OB 数量下降,骨量降低,细胞外基质成熟障碍、矿化降低。Scl 还上调 RANKL 的表达,增加 OC 形成,抑制 OB 的分化成熟。本团队在后续的实验发现,在晚期 MBD 患者中,骨髓瘤细胞负荷较高时,骨髓瘤细胞分泌的 Scl 可使 RhoA/ROCK1 信号途径失活。ROCK1 蛋白质序列中含有 Erk1/2 结合结构域,当 Scl 抑制 ROCK1 时,就会暴露 Erk1/2,从而启动 Bax 凋亡通路,促进 OC 凋亡。从而导致 MBD 的发生、发展[15]。当加入 MIP-1α 和 Scl 单抗时,可能克服骨髓瘤细胞抑制 Runx2 表达,防止 OB 和骨细胞凋亡[16];加入单抗后,还可降低骨髓瘤细胞分泌 RANKL,直接抑制破骨细胞前体分化,从而潜在地有助于 OB 的功能恢复[17]。这也间接地说明 MIP-1α 和 Scl 可导致 MBD 的发生发展。

综上所述,MIP-1α 可通过促进 MM 患者的骨髓瘤细胞分泌 Scl,Scl 通过多种途径抑制 MM 患者 BMSCs 向 OB 的分化、成熟,促进其凋亡,参与 MBD 的发生发展,MIP-1α 和 Scl 单抗可促进 MBD 患者

OB 的功能恢复和数量增加，促进 MBD 的改善，为 MIP-1α 和 Scl 单抗治疗 MBD 奠定基础，但其详细的作用途径及具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] PALMA B D, GUASCO D, PEDRAZZONI M, et al. Osteolytic lesions, cytogenetic features and bone marrow levels of cytokines and chemokines in multiple myeloma patients: role of chemokine (C-C motif) ligand 20[J]. Leukemia, 2016, 30(2): 409-416.

[2] MINARIK J, HERMANOVA Z, PETROVA P, et al. Prospective study of signalling pathways in myeloma bone disease with regard to activity of the disease, extent of skeletal involvement and correlation to bone turnover markers [J]. Eur J Haematol, 2016, 97(2): 201-207.

[3] BOLZONI M, STORTI P, BONOMINI S, et al. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules[J]. Exp Hematol, 2013, 41(4): 387-397.

[4] 王晓桃，莫东华，陈蓓莉，等. 趋化因子受体介导巨噬细胞炎症蛋白-1α 对多发性骨髓瘤细胞增殖与迁移的影响[J]. 肿瘤，2008，28(3)：232-235.

[5] VALLET S, POZZI S, PATEL K, et al. A novel role for CCL3 (MIP-1α) in myeloma-induced bone disease via osteocalcin downregulation and inhibition of osteoblast function[J]. Leukemia, 2011, 25(7): 1174-1181.

[6] WANG X T, HE Y C, ZHOU S Y, et al. Bone marrow plasma macrophage inflammatory protein-1 alpha and sclerostin in multiple myeloma: relationship with bone disease and clinical characteristics[J]. Leuk Res, 2014, 38(5): 525-531.

[7] COLUCCI S, BRUNETTI G, ORANGER A, et al. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion [J]. Blood Cancer J, 2011, 1(6): e27.

[8] RAUNER M, RACHNER T D, HOFBAUER L C, et al. Bone Formation and the Wnt Signaling Pathway[J]. N Engl J Med, 2016, 375(19): 1902-1903.

[9] BOETTNER F, KOEHLER G, WEGNER A, et al. The rule of histology in the diagnosis of periprosthetic infection: specific granulocyte counting methods and new immunohistologic staining techniques may increase the diagnostic value[J]. Open Orthop J, 2016, 26(10): 457-465.

[10] DELGADO-CALLE J, ANDERSON J, CREGOR M D, et al. Bidirectional notch signaling and osteocyte-derived factors in the bone marrow microenvironment promote tumor cell proliferation and bone destruction in multiple myeloma[J]. Cancer Res, 2016, 76(5): 1089-1100.

[11] LI X, NIU Q T, WARMINGTON KS, et al. Progressive increases in bone mass and bone strength in an ovariectomized rat model of osteoporosis after 26 weeks of treatment with a sclerostin antibody[J]. Endocrinology, 2014, 155(12): 4785-4797.

[12] ABE M. Wnt inhibitors and the suppression of bone formation in multiple myeloma[J]. Clin Calcium, 2013, 23(6): 867-875.

[13] DELGADO-CALLE J, AROZAMENA J, PÉREZ-LÓPEZ J, et al. Role of BMPs in the regulation of sclerostin as revealed by an epigenetic modifier of human bone cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 369(1/2): 27-34.

[14] OMINSKY M S, BOYCE R W, LI X, et al. Effects of sclerostin antibodies in animal models of osteoporosis [J]. Bone, 2017, 96: 63-75.

[15] DELGADO-CALLE J, SATO A Y, BELLIDO T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone[J]. Bone, 2017, 96: 29-37.

[16] LI X, NIU Q T, WARMINGTON KS, et al. Progressive increases in bone mass and bone strength in an ovariectomized rat model of osteoporosis after 26 weeks of treatment with a sclerostin antibody[J]. Endocrinology, 2014, 155(12): 4785-4797.

[17] DELGADO-CALLE J, ANDERSON J, CREGOR M D, et al. Genetic deletion of sost or pharmacological inhibition of sclerostin prevent multiple myeloma-induced bone disease without affecting tumor growth[J]. Leukemia, 2017, 31(12): 2686-2694.

（收稿日期：2018-12-20　修回日期：2019-01-05）