

- Nephrol, 2008, 3(6): 1777-1785.
- [6] Finney H, Newman DJ, Thakkar H, et al. Reference ranges for plasma cystatin C and creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children[J]. Arch Dis Child, 2000, 82(1): 71-75.
- [7] 范淑英, 马红萍, 马慧霞, 等. 新疆地区维吾尔族和汉族血清胱抑素 C 参考值范围的调查[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 812-813.
- [8] Assal HS, Tawfeek S, Rasheed EA, et al. Serum Cystatin C and Tubular Urinary Enzymes as Biomarkers of Renal Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Clinical Med Insights, 2013, 6(5): 7-13.
- [9] 刘运, 李正, 吴蓉, 等. 血清胱抑素 C 应用于急性肾损伤分级的研究[J]. 临床肾脏病杂志, 2014, 14(1): 23-27.
- [10] White CA, Knoll GA, Poggio ED. Measuring vs estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation[J]. Transplant Rev, 2010, 24(12): 18-27.
- [11] Young JJ, Hyang RL, Oh JK. Comparison of serum cystatin C and creatinine as a marker for early detection of decreasing glomerular filtration rate in renal transplants[J]. J Kor Sur Socia, 2012, 83(2): 69-74.
- [12] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [13] Sukho GK, Wang B, Libby P, et al. Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortodilatation in apolipoprotein in E-nullmice[J]. Circ Res, 2005, 96(11): 368-375.
- [14] Kimura T, Ikeda H, Fujikawa J, et al. Usefulness of serum cystatin C in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus and nephropathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2009, 83(32): 58-61.
- [15] Maryam N, Jonathan VH, John WP, et al. Albuminuria increases cystatin C excretion; implications for urinary biomarkers[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(3): 96-103.
- [16] 陈湘桂, 仇昌智, 刘醒存. 冠心病患者不同胱抑素 C 和同型半胱氨酸水平与冠状动脉病变的相关性[J]. 临床心血管杂志, 2009, 25(11): 609-611.
- [17] 向洪洲, 任为, 邹中辉, 等. 组织蛋白酶 L 及其抑制剂 Cystatin C 在人腹主动脉瘤中的表达[J]. 广东医学, 2010, 31(17): 2232-2234.
- [18] Moran A, Katz R, Smith N, et al. Cystatin C concentration as a predictor of systolic and diastolic heart failure[J]. J Card Fail, 2008, 14(1): 19-26.
- [19] Lassus J, Harjola VP, Sund R, et al. Prognostic value of cystatin C in acute heart failure in relation to other markers of renal function and NT-proBNP[J]. Eur Heart J, 2007, 28(15): 1841-1847.
- [20] Kestenbaum B, Rudser KD, de Boer IH, et al. Differences in kidney function and incident hypertension; the multi-ethnic study of atherosclerosis[J]. Ann Intern Med, 2008, 148(23): 501-508.
- [21] Ichihara K, Saito K, Itoh Y. Sources of variation and reference intervals for serum cystatin C in a healthy Japanese adult population[J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(9): 1232-1236.
- [22] 蒋祝昌, 陈仕检, 邓珊, 等. 急性脑梗死患者血清胱抑素 C 水平的变化及其意义[J]. 临床神经病学杂志, 2014, 27(2): 147.
- [23] 王玉明, 李冬梅, 余发春, 等. 散发性阿尔茨海默病与半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 和载脂蛋白 E 的基因多态性[J]. 中国老年医学杂志, 2008, 27(10): 759-760.
- [24] Wan ZH, Wang JJ, You SL, et al. Cystatin C is a biomarker for predicting acute kidney injury in patients with acute-on-chronic liver failure[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(48): 9432-9438.
- [25] 徐珂. 胱抑素 C、同型半胱氨酸、癌胚抗原联合检测在恶性肿瘤诊断中的临床价值[J]. 中国实用医刊, 2013, 40(23): 123-124.
- [26] 刘春晓, 谭鹤长, 宋雪霞, 等. Cys-C 在急性有机磷农药中毒急性肾损伤诊断中的应用[J]. 广西医科大学学报, 2013, 30(6): 931-933.
- [27] 彭建明, 陈艳玲, 官燕飞, 等. 甲状腺功能失调对血清胱抑素 C 及肌酐的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 42-43.
- [28] 姚新洁, 甄萍, 杜红利, 等. 糖皮质激素对血清胱抑素 C 表达的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(5): 105-106.

(收稿日期: 2014-10-16)

Wnt 信号通路对多发性骨髓瘤干细胞作用的研究进展

张霞 综述, 胡大春 审校

(昆明医科大学附属甘美医院检验科, 云南昆明 650011)

关键词: 多发性骨髓瘤; CD138 阴性细胞; Wnt 信号通路; 肿瘤干细胞**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 05. 045**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2015)05-0679-03

多发性骨髓瘤是血液系统恶性肿瘤, 其特点是在骨髓中克隆性浆细胞聚集, 导致 MM 患者出现多个系统的损伤。目前多种新药(如沙利度胺、雷诺度胺、硼替佐米)和造血干细胞移植应用已经延长了患者的生存期, 但这种疾病仍然很难治愈, 并伴有高风险的复发。治疗的失败和复发被认为和 MM 中的一小群 MM 干细胞群(MMSC)有关, 这些细胞群显示有肿瘤起始、自我更新和化疗耐药的潜能, 而现在的治疗可能只清除了 MM 细胞, 对 MM 干细胞作用不大或作用不明显。Wnt 蛋白为脂质修饰的分泌型蛋白, 由 Wnt 基因编码, 高水平表达有助于白血病和淋巴瘤的发病。研究表明, 所有骨髓瘤细胞系及

MMSC 均可检测到 Wnt 配体及活化 β -catenin 的过度表达, 而在生发中心 B 细胞、记忆 B 细胞及正常浆细胞中却几乎不表达。Wnt 信号通路的激活可能是 MM 发生、发展、耐药、转移的重要参与机制。本文就 MMSC 和 Wnt 信号通路的相关特性综述如下, 以期为研究针对 MMSC 中异常激活 Wnt 信号为靶点的药物或治疗提供新思路。

1 多发性骨髓瘤干细胞

肿瘤干细胞假说最先于 1983 年提出, 他认为在所有的肿瘤中都可能存在着—小部分细胞具有类似干细胞的特殊功能, 即只有很小一部分细胞具有引起肿瘤发生、维持肿瘤生长、保

持肿瘤异质性的能力。1994 年首次鉴定和分离出了人急性粒细胞白血病干细胞,证明了肿瘤干细胞的客观存在。2003 年,有研究者第一次在实体瘤人乳腺组织中分离出肿瘤干细胞为乳腺癌起源细胞。近几年来研究者已从更多组织类型的肿瘤中成功分离和鉴定了特异的肿瘤干细胞。目前,在 MM 中肿瘤干细胞也已成功地分离鉴定出来^[1-3]。

早期的多发性骨髓瘤模型研究检测表明仅有极少量细胞能够无性增殖生长^[4]。类似,1977 首次发现多发性骨髓瘤患者样本克隆有效性的细胞仅有 1/1 000~1/100 000。2004 年 Matsui 等^[5]发现多发性骨髓瘤细胞株和初次诊断的多发性骨髓瘤的骨髓中包含小群的不表达浆细胞表面抗原 CD138 特征的克隆型 B 细胞,体外培养时有较高的克隆形成能力。同时来源于临床多发性骨髓瘤患者样本的缺乏 CD138 表达的细胞也有类似的表现。这些细胞在体外和非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内均能进行无性繁殖。而 CD138⁺细胞不具备无性繁殖的功能。这些证据表明缺乏 CD138 表达的 B 细胞可能是 MM 肿瘤干细胞,具有自我更新的能力。

Yang 等^[6]提出有更多的证据表明,对于初诊和复发的多发性骨髓瘤患者来说,CD138⁻CD34⁻细胞可能是肿瘤干细胞。使用免疫磁珠微粒分选法将 CD138⁻CD34⁻细胞从人类 U266 多发性骨髓瘤细胞株中分离出来,纯化注入 NOD/SCID 小鼠做成多发性骨髓瘤小鼠模型,结果,所有的小鼠模型在 40 d 后长成了肿瘤,而且小鼠的血清和尿液中的白介素 6 水平分子表达明显提升,caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 明显下降。实验证明 CD138⁻CD34⁻细胞具有肿瘤干细胞的特点。

William 等^[7]假设多发性骨髓瘤无性繁殖的祖细胞类似于记忆性 B 细胞,同原始群 CD138⁻CD34⁻比较,初诊多发性骨髓瘤骨髓标本的细胞表达 B 细胞表面抗原 CD20 或者记忆性 B 细胞表面标记 CD27。后通过实验证实去除 CD20⁺或者 CD27⁺细胞后明显的限制了多发性骨髓瘤无性繁殖的生长。相反,去除 CD3⁺T 细胞对多发性骨髓瘤克隆性地无性繁殖没有明显的影响。因此,同正常记忆 B 细胞相似,在体外具有无性繁殖潜能多发性骨髓瘤细胞的显型可能为 CD138⁻CD20⁺CD27⁺。同时,也有实验表明循环显型细胞表达 B 细胞标记 CD19⁺,缺乏浆细胞表面抗原 CD138,将循环 B 细胞移植到 NOD/SCID 小鼠中可产生 CD19⁺和 CD138⁺肿瘤细胞,提示多发性骨髓瘤干细胞的免疫表型可能为 CD138⁻CD20⁺CD27⁺CD19⁺,并且 CD138⁻可生成 CD138⁺细胞。

2012 年有研究发现,复发、进展中的多发性骨髓瘤患者和未治疗的多发性骨髓瘤患者比较,CD138⁻细胞的表达有着明显的增加^[8]。并通过实验表明多发性骨髓瘤患者的 CD138⁻细胞的高表达和不良预后、更幼稚的细胞表型及对雷利杜胺的低敏感有关,这些特征都表明应建立对多发性骨髓瘤患者的 CD138⁻细胞治疗策略,以改善他们的不良预后。

以上的证据均表明 CD138⁻为多发性骨髓瘤的干细胞。但是也有研究者^[9]提出了不同的观点甚至于相矛盾的观点,他们通过表型、遗传学和功能学实验来定义 CD138⁻和 CD138⁺细胞,结果发现 CD138⁻亚群没有表现出幼稚 B 细胞的成分,即缺乏 CD19、CD20 和 CD27 的表达,并且两亚群有着相似的基因表达和基因谱。更重要的是,CD138⁻和 CD138⁺对化疗药物的敏感度也类似,并提出在未来,应该发现多发性骨髓瘤干细胞更可靠的免疫标记物。

2 Wnt 信号通路 与 MMSC

2.1 Wnt 信号通路 Wnt 蛋白为脂质修饰的分泌型糖蛋白,

由 Wnt 基因编码,通过自分泌和旁分泌方式发挥生物学效应。其信号转导方式包括:(1)经典途径。胞外 Wnt 蛋白通过与 frizzled(Fz)/LRP5/6 受体复合物结合,激活散乱蛋白使其磷酸化,从而抑制糖原合成激酶 3 β (GSK-3 β)/APC/Axin 降解复合物的形成,导致 β -Catenin 磷酸化受阻,泛素蛋白酶体途径降解减少,最终 β -Catenin 在胞质蓄积,通过核孔转入核内,与转录因子 T 细胞因子(TCF)/淋巴增强因子-1(LEF-1)形成复合物,激活下游致癌靶基因的转录。(2)非经典途径。一些 Wnt 蛋白,如 Wnt4 和 Wnt5A,只与 Fz 结合,不需要 LRP5/LRP6,激活其他信号通路,如钙调激酶 2 和蛋白激酶 C 组成 Wnt/Ca²⁺通路,或 N 末端蛋白激酶信号通路。多种研究资料表明,所有骨髓瘤细胞系均可检测到 Wnt 配件及活化 β -Catenin 过度表达,而在生发中心 B 细胞、记忆 B 细胞及正常浆细胞中却几乎不表达^[10-12]。原代骨髓瘤细胞中 β -Catenin 的表达明显高于健康对照,且通过 Wnt3a 或活化 catenin 刺激,可进一步促进 β -catenin 聚积及核内转移,进而促进骨髓瘤细胞的增殖,因此 Wnt 信号通路的激活是 MM 发生、发展、耐药、转移的重要参与机制。

2.2 Wnt 信号通路异常与 MMSC 在演变和调控细胞生长、形态学、运动和死亡的胚胎发育过程中,Wnt 信号通路一直被保持。此通路在成年人中也承担重要的角色,通过调整成体干细胞和壁龛来维持包括皮肤、血液、肠、大脑等组织的稳定性。同时 Wnt 信号通路也和肿瘤干细胞的调控有关,因为健康成人干细胞和肿瘤干细胞的信号通路有很多相似之处。其信号的异常活动可促进不同恶性肿瘤的发展。Wnt 通路在多发性骨髓瘤细胞中表现活跃并推动肿瘤细胞扩大性生长, β -Catenin 蛋白异常上调,且 CD138⁻细胞发生克隆增殖。

Yao 等^[13]使用高通量转录筛选技术扫描 10 000 多小分子化学复合物,最后确认 AV-65 可以去除 β -Catenin 蛋白水平和 T 细胞因子转录活性,并可以减少 c-myc、cyclin D1 和存活素的表达,从而抵制多发性骨髓瘤细胞增殖并诱导其向成熟的 CD138⁺细胞分化。这表明 Wnt 信号通路可能与 MMSC 的自我更新和分化有关。

另外,Yang 等^[14]发现在复发的多发性骨髓瘤中 RAR α 2 的含量明显增高,同时在初诊患者中其含量明显增高则表明预后不良。Yang 等^[14]在目前的研究中认为高表达的 RAR α 2 被确认为多发性骨髓瘤干细胞 CD138⁻碎片。其过表达将会导致一系列肿瘤干细胞的特征,如耐药性增加,无性繁殖增加等,Wnt 和 Hedgehog 通路的激活,侧群细胞数量的增加和醛脱氢酶水平的增加及胚胎干细胞基因的表达。因而 RAR α 2 的增高可能是 MMSC 的特征与 Wnt 信号通路异常也有关。

3 多发性骨髓瘤的治疗新策略

3.1 MMSC 相关药物 William 等^[7]通过实验发现 4 种临床化学药物(皮质类固醇地塞米松、免疫调节药物雷那度胺、蛋白酶体抑制剂硼替佐米及细胞毒素烷化环磷酸胺活性代谢物 4 HC)均能明显的抑制了 CD138⁺浆细胞的生长,但没有一种药物能够明显的抑制 CD138⁻前体细胞的生长。另外,来源于新诊断患者或者复发患者中分离出的无性繁殖前体细胞 CD138⁻对这四种药物均有着相似的耐药。说明这些临床常用化学药物可能只清除了 MM 细胞,对 MM 干细胞作用不大或作用不明显。

Yang 等^[15]发现 PTX-NPs(紫杉醇四氧化三铁纳米离子)可明显抑制用纯化 CD138⁻CD34⁻细胞注入 NOD/SCID 小鼠做成的多发性骨髓瘤小鼠模型的肿瘤生长、明显的抑制白介素

6 的分泌,并且增加 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 表达,同时诱导了肿瘤细胞的凋亡。PTX-NPs 证实成为一个潜在的抗肿瘤治疗策略,在未来的临床实验中可应用于多发性骨髓瘤肿瘤干细胞靶向治疗。

NF- κ B 转录因子家族在很多肿瘤细胞中常高表达,与肿瘤发生、生长、转移和化疗的耐药相关,阻断细胞凋亡通路,抑制细胞凋亡。Gunn 等^[16]第一次报导小白菊内酯天然产物(NF- κ B 抑制剂)有着抗多发性骨髓瘤中的 MMSC 的作用,其作用通过消除引起 MM 复发的 MMSC,而且小白菊内酯对 MMSC 的毒性作用不受骨髓基质间隔的屏障作用,从而提高 MM 患者的生存潜能。

3.2 干预 Wnt 信号通路 最近多种资料表明通过对多发性骨髓瘤细胞基因和表观遗传畸变的研究,发现其导致了 Wnt 信号通路的畸型活性,并影响着多发性骨髓瘤的起源和恶化。更重要的是,这些发现可应用于针对异常 Wnt 信号,开发新的治疗策略。Liang 等^[17]报导 CTNNB1 shRNA 干扰 RPMI8226 多发性骨髓瘤细胞株的骨髓瘤细胞,可导致其 β -Catenin 表达明显下降,凋亡明显增加。

有研究发现白皮杉醇对 MM 细胞有着明显的选择性凋亡诱导作用,显示其在 MM 患者体内积极明显的作用,同时确认白皮杉醇为 Wnt/beta-catenin 信号通路的抑制剂,并可以作为 MM 细胞凋亡潜在的诱导者,有研究也发现同常规化学药物应用相比,联合利尿酸和白皮杉醇或者乙醇胺联合白皮杉醇对多发性骨髓瘤细胞有着很好的治疗效果,而且健康细胞未受到损害。同时利尿酸和乙醇胺改变了 Wnt 通路中信号蛋白 beta-catenin 的表达,并下调了 beta-catenin 下游因子。因此联合使用抑制 Wnt 信号通路的药物可以成为多发性骨髓瘤患者的靶向治疗方向。

Yao 等^[13]为了寻找新的 Wnt 信号通路中 beta-catenin 蛋白的信号抑制子,使用高通量转录筛选技术扫描 10 000 多小分子化学复合物,最后确认 AV-65 可以去除 beta-catenin 蛋白水平和 T 细胞因子转录活性。同时减少 c-myc, cyclin D1 和存活素的表达,也就是可能通过干预 Wnt 信号通路从而抵制多发性骨髓瘤细胞的生长。

4 问题及展望

Wnt 信号通路的异常在 MM 的发生发展、MMSC 的特性中占有重要地位。现阶段及未来的研究若能解决以下几个方面的问题将有可能推动治愈 MM 策略的出现和发展。(1) MMSC 免疫表型的确定:现在有关 MMSC 的确切免疫表型及其群体属性仍存在争议,MMSC 免疫表型的确定可保证研究中 MMSC 的分离纯化,开发准确定位作用于表面抗原的单克隆抗体,促进 MMSC 临床检测及相关靶向治疗技术的发展。(2) Wnt 信号通路:Wnt 信号通路在包括 MMSC 在内的 MM 细胞的作用机制仍有许多未知因素存在。需要加强对 MMSC 中异常 Wnt 信号通路中蛋白受体进一步研究,开发更多的干扰 MMSC 中异常 Wnt 信号通路的分子的药物或抑制剂。

参考文献

[1] Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells[J]. *Blood*, 2004, 103(23): 2332-2336.

- [2] Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells[J]. *Clin Oncol*, 2008, 26 (32): 2895-2900.
- [3] Fearing BM, Hogge DE. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34 + CD38-progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2001, 9 (21): 3882-3889.
- [4] Bergsagel DE, Valeriote FA. Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor[J]. *Cancer Res*, 1968, 28(11): 2187-2196.
- [5] Chmeel LC, Schmeel FC, Kim Y, et al. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in multiple myeloma[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(11): 4719-4726.
- [6] Yang C, Wang J, Chen D, et al. Paclitaxel-Fe3O4 nanoparticles inhibit growth of CD138(-) CD34(-) tumor stem-like cells in multiple myeloma-bearing mice[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8(11): 1439-1449.
- [7] William M, Qiuju W, James P. Barber, Sarah Brennan et Clonogenic Multiple Myeloma Progenitors, Stem Cell Properties, and Drug Resistance[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 190-197.
- [8] Schmeel FC, Schmeel LC, Kim Y et al. Piceatannol exhibits selective toxicity to multiple myeloma cells and influences the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Hematol Oncol*, 2014, 32(4): 197-204.
- [9] Paino T, Sarasquete ME, Paiva B, et al. Phenotypic, genomic and functional characterization reveals no differences between CD138++ and CD138low subpopulations in multiple myeloma cell lines[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 92378.
- [10] Dutta-Simmons J, Zhang Y, Gorgun G, et al. Aurora kinase A is a target of Wnt/beta-catenin involved in multiple myeloma disease progression[J]. *Blood*, 114(11): 2699-2708.
- [11] Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma[J]. *Nature*, 2011, 471(739): 467-472.
- [12] Noda T, Nagano H, Takemasa I, et al. Activation of Wnt/ β -catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon- α /5-fluorouracil combination therapy for hepato cellylar carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(10): 1647-1658.
- [13] Yao H, Ashihara E, Strovel JW, et al. AV-65, a novel Wnt/beta-catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model[J]. *Blood Cancer J*, 2011, 1(11): 43-53.
- [14] Yang Y, Shi J, Tolomelli G, et al. RARalpha2 expression confers myeloma stem cell features[J]. *Blood*, 2013, 122(8): 1437-1447.
- [15] Yang C, Wang J, Chen D, et al. Paclitaxel-Fe3O4 nanoparticles inhibit growth of CD138(-) CD34(-) tumor stem-like cells in multiple myeloma-bearing mice[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8(12): 1439-1449.
- [16] Gunn EJ, Williams JT, Huynh DT, et al. The natural products parthenolide and andrographolide exhibit anti-cancer stem cell activity in multiple myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(6): 1085-1097.
- [17] Liang W, Yang C, Qian Y, et al. β -catenin expression on the growth of human multiple myeloma cells in vitro and in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 15, 422(4): 681-686.

(收稿日期: 2014-09-25)