

骨髓上清液 Dickkopf1 水平在多发性 骨髓瘤骨病中的临床研究

顿晓熠, 姜 华, 侯 健

(第二军医大学长征医院血液科, 上海 200003)

[摘 要] 目的: 研究多发性骨髓瘤(MM)患者骨髓上清液 Dickkopf1(DKK1)水平及其与骨髓瘤分期、溶骨性病变的关系, 探讨DKK1在多发性骨髓瘤骨病中的临床作用。方法: 采用双抗体夹心酶标免疫分析法(ELISA)检测80例初诊MM患者、10例意义未明的单克隆球蛋白血症(MGUS)患者及20例对照组骨髓上清液DKK1水平。结果: 骨髓上清液DKK1水平: MM组患者与MGUS组患者相比明显增高(9.3588 ± 7.9441 ng/ml vs 1.7620 ± 0.7529 ng/ml ($P=0.001$)); 而MGUS组患者与对照组相比无明显变化(1.7620 ± 0.7529 ng/ml vs 1.2491 ± 0.6990 ng/ml ($P>0.05$)). DKK1水平与骨髓瘤分期(Durie and Salmon分期)相关: I期和II期MM患者骨髓上清液DKK1水平明显高于I期患者(10.3471 ± 8.0169 ng/ml vs 2.4410 ± 0.6583 ng/ml ($P=0.002$)); I期MM患者与MGUS患者骨髓上清液DKK1水平无统计学显著差异($P>0.05$)。有溶骨性病变的MM患者骨髓上清液DKK1水平明显高于没有溶骨性病变的患者(11.2272 ± 7.9753 ng/ml vs 2.4348 ± 0.6634 ng/ml ($P<0.001$)); 而且DKK1水平还与骨损害的病灶数相关, 0、1~3、>3分别为(2.4348 ± 0.6634 ng/ml、(4.9845 ± 0.5852 ng/ml、(15.3342 ± 7.9187 ng/ml ($P<0.001$)). 结论: MM患者DKK1水平明显高于MGUS患者及对照组; 而且DKK1水平与骨髓瘤分期及溶骨性病变密切相关, 能反映溶骨性病变的程度和范围。

[关键词] 多发性骨髓瘤/病理学; 骨髓/病理学; 骨质溶解/病因学; 酶联免疫吸附测定

[中图分类号] R 733.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2009)05-0453-06

Bone marrow plasma concentrations of Dickkopf1 in patients with multiple myeloma

DUN Xiao-yi, JIANG Hua, HOU Jian (*Department of Hematology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China*)

[Abstract] **Objective:** To detect bone marrow plasma concentrations of Dickkopf1(DKK1) in patients with multiple myeloma(MM) and to investigate its clinical significance. **Methods:** Bone marrow plasma DKK1 levels were quantified in 80 newly diagnosed MM patients, 10 monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) patients and 20 control subjects by ELISA, using a monoclonal anti-DKK1 antibody. **Results:** Bone marrow plasma DKK1 was elevated in MM as compared with MGUS [9.3588 ± 7.9441 ng/ml vs 1.7620 ± 0.7529 ng/ml, $P=0.001$]. There was no difference between MGUS patients and control subjects [1.7620 ± 0.7529 ng/ml

收稿日期: 2009-05-22 修回日期: 2009-07-24

作者简介: 顿晓熠(1975-), 女, 在读博士, 主要从事血液肿瘤的研究。

通讯作者: 侯 健(1964-), 男, 博士, 教授, 主要从事血液系统肿瘤的研究; E-mail: houjian167@sohu.com.

vs (1.2491 ± 0.6990) ng/ml, $P > 0.05$]. Bone marrow plasma DKK1 levels were correlated with myeloma Durie and Salmon stages [(2.4410 ± 0.6583) ng/ml of stage I vs (10.3471 ± 8.0169) ng/ml of stage II/III, $P = 0.002$]. There was no difference between MM patients in stage I and MGUS patients ($P > 0.05$). Myeloma patients without lytic lesions in conventional radiography had significantly lower DKK1 levels than patients with lytic bone disease [(2.4348 ± 0.6634) ng/ml vs 11.2272 ± 7.9753 ng/ml, $P < 0.001$]. Bone marrow plasma DKK1 levels were correlated with the number of bone lesions, 0 vs 1-3 vs > 3 lesions; (2.4348 ± 0.6634) ng/ml, (4.9845 ± 0.5852) ng/ml, (15.3342 ± 7.9187) ng/ml ($P < 0.001$). **Conclusions:** Myeloma patients have increased bone marrow plasma DKK1 as compared with patients with MGUS and control subjects. Bone marrow plasma concentrations of DKK1 have close relationship with myeloma stage and lytic bone disease.

[Key words] Multiple myeloma/pathol; Bone marrow/pathol; Osteolysis/etiolo; Enzyme-linked immunosorbent assay

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2009,38(5):453-458.]

Wnt 信号传导途径在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)细胞增殖、存活和转移中起重要作用,同时也影响骨髓瘤溶骨性病变的发生。Dickkopf1(DKK1)是经典Wnt信号途径的可溶性拮抗剂,通过抑制成骨细胞前体的分化导致MM患者成骨受抑,同时未成熟的成骨细胞前体增多及DKK1能间接增强破骨细胞的活性而引起IL-6等细胞因子分泌增加,促进骨髓瘤细胞的生长和存活^[1]。骨髓瘤细胞能分泌大量的DKK1,这形成了骨破坏和MM疾病进展之间的恶性循环。为进一步了解DKK1在多发性骨髓瘤中的临床作用,我们检测了80例初诊MM患者、10例意义未明的单克隆球蛋白血症(MGUS)患者及20例缺铁性贫血患者为对照组的骨髓上清液DKK1水平,并分析了DKK1水平与骨髓瘤分期及溶骨性病变的关系,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病例 收集我院2006年1月—2009年1月期间门诊就诊及住院治疗的MM患者、MGUS患者及缺铁性贫血患者。MM患者纳入标准:符合国际骨髓瘤协作组(international myeloma working group, IMWG)关于MM的诊断标准^[2],剔除已进行过治疗的MM患者。

MGUS患者纳入标准:符合IMWG关于MGUS的诊断标准^[2]。缺铁性贫血患者纳入标准:符合张之南主编的《血液病的诊断和疗效标准》关于缺铁性贫血的诊断标准,剔除已经过治疗的患者。入选前均征得患者及家属的同意。MM患者应纳入89例,实际80例患者进入研究。符合标准的10例MGUS患者及20例缺铁性贫血患者均进入实际研究。MM患者中,男性44例,女性36例,中位年龄59.5(29~80)岁,其他临床资料见表1。MGUS患者男性6例,女性4例,中位年龄59(34~78)岁。缺铁性贫血患者男性11例,女性9例,中位年龄57(22~82)岁。上述三组患者年龄及性别基线有可比性。所有MM患者均进行X-线检查,包括颅骨、颈胸腰椎、肋骨、肱骨、股骨及骨盆,以确定有无溶骨病变或骨质疏松;对X-线检查阴性者,还将进行MRI或PET-CT检查。

1.2 骨髓瘤分期标准 使用Durie and Salmon分期, I期:符合下述4项:血红蛋白 > 100 g/L;血清钙正常;无骨质破坏;M成分水平IgG < 50 g/L, IgA < 30 g/L, 24 h轻链 < 4 g/L;瘤细胞数 $< 0.6 \times 10^{12}/m^2$ 。II期:既不符合I期又未达到III期。III期:符合下述一项或一项以上:血红蛋白 < 85 g/L;高钙血症;进展性溶骨病变;M成分水平IgG > 70 g/L, IgA > 50 g/L, 24 h轻

表1 80例MM患者一般资料

Table 1 Patient characteristics with MM

项目	例数(%)
年龄(<65岁)	60(75.0)
性别	
男	44(55.0)
女	36(45.0)
分型	
IgG型	32(40.0)
IgA型	20(25.0)
IgD型	6(7.5)
IgM型	2(2.5)
轻链型	15(18.75)
不分泌型	5(6.25)
轻链类型	
κ轻链型	45(56.25)
λ轻链型	30(37.5)
Durie-Salmon分期	
I期	10(12.5)
II期	15(18.75)
III期	55(68.75)
ISS分期	
I期	8(10.0)
II期	24(30.0)
III期	48(60.0)
无骨质破坏	17(21.25)
有骨质破坏	63(78.75)
1~3处骨质破坏	25(31.25)
>3处骨质破坏	38(47.5)

链>12 g/L;瘤细胞数>1.2×10¹²/m²。
1.3 试剂 R&D公司的DuoSet ELISA试剂盒(货号: DY1906)。
1.4 方法

表2 MM组和MGUS组及对照组骨髓上清液 DKK1 水平的比较

Table 2 Bone marrow plasma DKK1 levels in MM compared with MGUS and control

分 组	例数	DKK1/(ng·ml ⁻¹)	
		$\bar{x}\pm s$	范围
对照组	20	1.2491±0.6990*	0.4660~3.0100
MGUS组	10	1.7620±0.7529**	0.5840~3.0120
MM组	80	9.3588±7.9441***	1.6500~46.0580
		F=14.6770	
		P= 0.0001	

vs MGUS组,*P=0.853; vs MM组,**P=0.001; vs 对照组,***P=0.0001。

1.4.1 骨髓上清液制备 取患者骨髓5 ml,肝素抗凝,1 000 r/min离心10 min,取上清放在-80℃冰箱中备用。
1.4.2 DKK1检测方法 DKK1检测采用双抗体夹心酶标免疫分析法(ELISA)。使用96孔酶标板,每孔加入100 μl鼠抗人DKK1的单克隆抗体(质量浓度为4 μg/ml)包被96孔板,室温过夜。然后洗板3次,1%BSA室温封闭2 h,再洗板3次。骨髓上清液稀释后作为样品,体系为100 μl。同时,用标准品重组DKK1蛋白作倍比稀释,室温孵育2 h。然后洗板3次,每孔加入100 μl生物素标记的抗DKK1的多克隆抗体(浓度为50 ng/ml),室温孵育2 h。洗板3次,每孔加入1:200链霉菌亲和素标记的辣根过氧化物酶100 μl,室温孵育20 min。然后洗板3次,每孔加入100 μl的显色剂,室温孵育20 min。每孔加入50 μl的终止液,轻敲板,以充分混匀。在ELX-800酶标仪上进行450 nm波长检测。
1.5 统计学方法 使用13.0版本的SPSS统计学软件进行统计学分析。常规进行方差齐性检验、正态性检验。单变量多组资料之间的比较采用单因素方差分析,如有差异,两两之间的比较采用LSD和SNK法;方差不齐者采用非参数检验。P<0.05为差异具有统计学意义。
2 结 果
2.1 MM患者和MGUS患者及对照组骨髓上清液 DKK1 水平的比较 MM组患者骨髓上清液 DKK1 水平明显高于MGUS组患者及对照组,经F检验有统计学显著差异(P=0.001),而MGUS组与对照组之间比较无统计学显著差异(P>0.05),见表2。

2.2 MM患者骨髓上清液DKK1水平与骨髓瘤分期的关系 使用Durie and Salmon分期, I期MM患者骨髓上清液DKK1水平为:2.4410 ng/ml;Ⅱ和Ⅲ期患者骨髓上清液DKK1水平为:10.3471 ng/ml,约是I期的4

倍。Ⅱ和Ⅲ期患者骨髓上清液DKK1水平与I期患者骨髓上清液DKK1水平有统计学显著差异($P=0.002$);I期患者骨髓上清液DKK1水平与MGUS患者骨髓上清液DKK1水平无统计学显著差异($P>0.05$),见表3。

表3 比较不同分期MM患者骨髓上清液DKK1水平
Table 3 Bone marrow plasma DKK1 levels in defferent subgroups of patients

分 组	例数	DKK1/(ng·ml ⁻¹)	
		$\bar{x}\pm s$	范围
MGUS组	10	1.7620±0.7529*	0.5840~3.0120
MM组	80	9.3588±7.9441	1.6500~46.0580
I期	10	2.4410±0.6583**	1.6520~3.7320
Ⅱ和Ⅲ期	70	10.3471±8.0169***	1.6500~46.0580
		$F=10.3760$	
		$P=0.0001$	

vs MM(stage I)组,* $P=0.832$; vs MM(stage Ⅱ和Ⅲ)组,** $P=0.002$; vs MGUS组,*** $P=0.001$ 。

2.3 MM患者骨髓上清液DKK1水平与骨病的关系 无溶骨性病变的MM患者骨髓上清液DKK1水平较低(2.4348 ng/ml),而有溶骨性病变的MM患者骨髓上清液DKK1水平明显增高(11.2272 ng/ml)。有溶骨性病变与无溶骨性病变的MM患者骨髓上清液DKK1水平有统计学显著差异($P<0.001$)。而且,骨髓上

清液DKK1水平与骨损害的病灶数是相关的,1~3处骨损害的MM患者骨髓上清液DKK1水平为4.9845 ng/ml;>3处骨损害的MM患者骨髓上清液DKK1水平为15.3342 ng/ml;这两组之间骨髓上清液DKK1水平有统计学显著差异($P<0.001$),见表4。

表4 骨髓上清液DKK1水平与骨病之间的关系
Table 4 Bone marrow plasma DKK1 levels and correlation with the extend of bone disease in MM

分 组	例数	DKK1/(ng·ml ⁻¹)	
		$\bar{x}\pm s$	范围
无骨病组	17	2.4348±0.6634*	1.6500~3.7320
骨病组	63	11.2272±7.9753	4.5280~46.580
1~3处病变	25	4.9845±0.5852**	4.5280~7.2100
>3处病变	38	15.3342±7.9187	7.2600~46.580
		$F=43.6890$	
		$P=0.0001$	

vs 骨病组,* $P=0.0001$; vs >3处病变组,** $P=0.0001$ 。

3 讨 论

Wnt信号传导途径在胚胎发育、造血系统发育、肿瘤发生、骨发育及维持内环境稳定中都发挥重要的作用^[1]。DKK1是直接跨膜受体

相互作用而抑制Wnt信号转导的分泌性抑制因子,与跨膜蛋白Kremen1(Krml)/Kremen2(Krm2)及LRP5/6结合形成复合物,促进LRP5/6受体胞膜内吞后从Wnt受体复合物脱离,阻止经典Wnt信号下传^[3]。

本研究显示,MM 患者骨髓上清液 DKK1 水平明显高于 MGUS 患者及对照组;使用 Durie-Salmon 分期,初诊 MM I 和 II 期患者骨髓上清液 DKK1 水平明显高于 I 期患者;有溶骨性病变的 MM 患者,骨髓上清液 DKK1 水平明显高于没有溶骨性病变的患者,而且 DKK1 水平还与骨破坏的程度相关,这与 Heider^[4]等及 Tian^[5]等研究一致。经典的 Wnt 信号途径能促进成骨细胞前体的分化和多能间充质祖细胞的增殖^[1]。骨骼是许多肿瘤常见的转移部位,研究表明 Wnt 通路及 DKK1 参与了骨转移的发生^[6]。与实体肿瘤的骨转移相比,骨髓瘤骨病是破骨细胞活性增强而成骨细胞活性减弱,导致溶骨和成骨失衡,溶骨亢进,成骨减少(或消失)^[7]。近年来有关骨髓瘤骨病发病机制中成骨细胞的分化及功能障碍的研究越来越多。Roux^[8]等研究表明,当骨髓中浆细胞比例超过 50% 时,成骨细胞的功能将明显下降。Tian^[5]等研究表明骨髓中长期高浓度 DKK1 不仅能阻碍成骨细胞前体细胞的分化,还能促进其凋亡。而 DKK1 抑制剂可减少骨质破坏,促进其修复。所以,骨髓瘤细胞分泌大量 DKK1 是导致骨髓瘤骨病的重要因素。

既往研究认为^[5],DKK1 只在骨髓瘤早期升高,随疾病进展至晚期却下降,DKK1 的高表达只是在 MM 的特定阶段。MM 作为主要发生在骨髓内的恶性肿瘤,骨髓瘤细胞的生长和存活必须依赖于骨髓微环境,骨髓瘤细胞通过合成和分泌 DKK1 而调节骨髓微环境^[9]。在多发骨髓瘤中,DKK1 抑制骨髓基质细胞的分化导致 IL-6 及其他促进骨髓瘤生长的因子生成增多,骨质破坏和 MM 疾病进展形成恶性循环。同时,DKK1 还可以通过抑制骨修复而促进肿瘤的生长^[10]。本研究结果也表明 II 期和 III 期 MM 患者 DKK1 水平明显高于 I 期患者,说明 DKK1 水平能反映 MM 疾病的进展。

DKK1 水平增高不仅与骨髓瘤骨病有关,也可能是导致 MM 患者免疫缺陷和贫血的原因之一^[5]。免疫缺陷和贫血也是骨髓瘤患者的严重并发症,是由于肿瘤相关造血功能缺陷所致。造血干细胞的增殖要依赖于成骨细胞形成的骨髓干细胞龕。经典的 Wnt 信号转导途径能

调节造血干细胞的自我更新^[11]。DKK1 通过直接抑制造血干细胞的经典 Wnt 信号途径,或者通过抑制造血干细胞增殖所依赖的成骨细胞形成骨髓干细胞龕而间接抑制造血干细胞的经典 Wnt 信号途径。

综上所述,DKK1 有望成为 MM 患者的潜在治疗基因,DKK1 抗体对 MM 患者的疗效有待进一步评估,哪些患者进行抗 DKK1 治疗受益最大,何时是治疗的最佳时间(初治还是复发),目前尚不清楚。

总之,DKK1 主要由骨髓瘤细胞分泌,它能抑制成骨细胞前体细胞的分化,在骨髓瘤骨病发生机制中起重要作用,与 MM 患者的溶骨性病变及骨髓瘤分期密切相关,DKK1 水平能反映 MM 疾病的进展。

References:

- [1] PINZONE J J, HALL B M, THUDI N K, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease [J]. *Blood*, 2009, 113: 517-525.
- [2] The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders; a report of the International Myeloma Working Group [J]. *Br J Haematol*, 2003, 121: 749-757.
- [3] CHRISTODOULIDES C, LAUDES M, CAWTHORN W P, et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119: 2613-2620.
- [4] HEIDER U, KAISER M, MIETH M, et al. Serum concentration of DKK1 decrease in patient with multiple myeloma responding to anti-myeloma treatment [J]. *Eur J Haematol*, 2009, 82: 31-38.
- [5] 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: 2483-2494.
- [6] WESTENDORF J J, KAHLER R A, SCHROEDER T M. Wnt signaling in osteoblasts

- and bone diseases [J]. **Gene**, 2004, 341:19-39.
- [7] ROODMAN G D. Pathogenesis of myeloma bone disease [J]. **Blood Cells Mol Dis**, 2004, 32:290-292.
- [8] ROUX C, RAVAUD P, COHEN-SOLAL M, et al. Biologic, histologic and densitometric effects of oral risedronate on bone in patients with multiple myeloma [J]. **Bone**, 1994, 15:41-49.
- [9] QIANG Y W, BARLOGIE B, RUDIKOFF S, et al. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma [J]. **Bone**, 2008, 42:669-680.
- [10] GUNN W G, 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, 24:986-991.
- [11] LOGAN C Y, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 2004, 20:781-810.

[责任编辑 黄晓花]

我校医学院姚克教授荣获国际眼科大奖

第22届亚太白内障屈光大会近期在日本东京会展中心隆重举行,来自亚太地区30多个国家的500多位眼科医师出席本届盛会。本年度唯一的大奖“2009亚太白内障屈光手术协会认证教育者奖”颁发给了浙江大学医学院附属第二医院眼科中心主任、浙江省特级专家姚克教授,以表彰他在白内障屈光手术应用及推广教学方面所做出的突出贡献。姚克教授是获得此项亚太眼科大奖的第一位中国眼科专家,为国家、学校和医院争得了荣誉。

中国约有800万白内障患者,是亚太地区白内障患者最多的国家之一。长期以来,中国的白内障手术率非常低,除了一些患者受经济条件制约外,能开展白内障手术的医师数量相对较少是主要原因。这一状况直到姚克教授将白内障超声乳化技术引入国内后,才逐步有所缓解。十几年来,姚克教授除了自己应用超声乳化手术使3万多位白内障患者重见光明外,还不辞辛劳地奔走于全国各地,足迹遍及20多个省分,通过学术讲座、手术示范等形式积极推广和传授超声乳化手术技术,并编写出版了白内障手术视频教材,为广大基层医院眼科医师掌握超声乳化手术技术提供了直观的影像资料,受益医师数以万计。近年来,他还活跃在国际舞台上,每年都要在国际眼科会议上介绍白内障新技术,并在全球性眼科期刊“眼科世界”上发表专家述评2~3篇。经过十几年坚持不懈地努力,如今,超声乳化手术方法已成为我国白内障手术的主流方法,为数以百万计的患者带来光明,创造了不可估量的经济效益和社会效益,为我国乃至亚太地区防盲治盲工作作出了突出贡献。

目前,姚克教授带领浙二眼科中心科研团队所承担的“十一五国家科技计划项目”课题《基层白内障复明手术的关键技术及其质量控制研究》已全面启动。该课题的目标是要建立一套适合全国基层医院开展的白内障手术关键技术和白内障手术控制标准。通过建立专科医师培养计划,让更多的基层医师能够学会并开展白内障超声乳化手术;通过寻找和研发低成本的手术设备和人工晶状体,降低手术成本,让更多的贫困白内障患者能够做得起手术。项目完成后,全国基层医院的白内障手术将按照浙二眼科中心制定的标准来执行。

本届亚太白内障屈光手术协会东京年会,还特别表彰了姚克教授创建的我国首家汽车眼科医院。1996年,姚克教授在全国首创“汽车眼科医院”,并经常带队深入贫困地区,免费开展白内障复明手术。十几年来,汽车眼科医院已走遍了浙江的30多个贫困县市,行程20多万公里,为农村贫困和老年患者免费实施白内障复明手术3000余例。同时,汽车眼科医院每到一地,都与当地医院合作开展复明手术,对基层医院眼科医师手术水平的提高具有非常大的帮助。