·论著·

细胞间隙连接在多发性骨髓瘤 SP 细胞生物学行为中的作用

王子妍, 张晓慧, 芮明忠, 周 敏, 傅晋翔（苏州弘慈血液病医院血液科, 江苏 苏州 215000）

［摘要］ **目的** 观察不同来源间充质干细胞 (MSCs) 中由连接蛋白 43(Cx43) 组成的细胞间隙连接 (GJIC) 及其介导的信号对多发性骨髓瘤 (MM) 侧群细胞 (SP 细胞) 生物学行为的影响, 并探讨其可能机制。**方法** 分离培养不同来源的间充质干细胞 (MSCs); 应用流式细胞术分选 MM 细胞株 RPMI 8266 的 SP 细胞; 采用 RT-PCR 技术及蛋白印迹 (Western blot) 法检测不同来源 MSCs、RPMI 8266、SP 细胞中 Cx43 基因及蛋白水平表达; 直接共培养观察不同来源 MSCs 对 SP 细胞周期、Cx43 蛋白表达、体外集落形成能力、干细胞相关基因表达、细胞因子分泌和耐药的变化以及加入连接通道抑制剂 18α 甘草次酸 (α-GA) 后的影响。**结果** MM-MSCs 与 ND-MSCs 形态及表型无明显区别, 与 RPMI 8266 细胞均表达较高水平的 Cx43; 与 MM-MSCs 共培养可使更多 SP 细胞进入 G0 期 ($P<0.001$), SP 细胞的 c-myc、KIF4 和 SOX2 基因表达显著上调, 而 Oct-4 基因表达下调, 加入 α-GA 后, c-myc、KIF4 和 SOX2 均有不同程度下调, 但无显著性差别; 使 Cx43 表达上调, 分别为 (31.00±2)% 和 (39.00±2)%; 使体外集落形成能力上调, 加入 α-GA 可部分抑制该作用; RPMI 8266 存在少量 c-myc、KIF4、SOX2 和 Oct-4 基因表达, SP 细胞亚群中该类基因明显上调, MM-MSCs 分泌高水平的白介素 (IL)-6, 与 SP 细胞共培养后, 其上清液中 IL-6、IL-10 及 TGF-β 表达上调 (P=0.0072, P=0.037); bFGF 和 IL-17 则无明显变化。加入 α-GA 后, 上清液中 IL-6、IL-10 和 TGF-β 水平降低; MM 细胞对硼替佐米诱导的凋亡敏感, 但 SP 细胞敏感性较差, 与 MM-MSCs 共培养显著减少硼替佐米介导的细胞凋亡, 加入 α-GA 可部分恢复 MM 细胞对硼替佐米的敏感性。**结论** MM-MSCs 与多发性骨髓瘤 SP 细胞上调 Cx43 蛋白表达, 形成更多 GJIC, 并通过改变 MSCs 细胞因子分泌谱, 促进 SP 细胞增殖和耐药, 可能是最终导致 MM 复发的原因之一。

［关键词］ 多发性骨髓瘤; 细胞间隙连接; 肿瘤微环境
［中图分类号］ R96 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 1006-0111(2022)04-0326-09
［DOI］ 10.12206/j.issn.1006-0111.202105104

Role of intercellular junctions in the biological behavior of SP cells of multiple myeloma

WANG Ziyan, ZHANG Xiaohui, RUI Mingzhong, ZHOU Min, FU Jinxiang（Department of Hematology, Soochow Hopes hematonosis hospital, Suzhou 215000, China）

［**Abstract**］ **Objective** To observe the effects of the intercellular gap junction (GJIC) composed of connexin 43(Cx43) in mesenchymal stem cells (MSCs) from different sources and their signals on the biological behavior of multiple myeloma (MM) lateral population cells (SP cells), and to explore its possible mechanism. **Methods** Mesenchymal stem cells (MSCs) from different sources were isolated and cultured. SP cells of MM cell line RPMI 8266 were sorted by flow cytometry. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of Cx43 gene and protein in MSCs, RPMI 8266 and SP cells from different sources. The effects of MSCs from different sources on SP cell cycle, Cx43 protein expression, colony formation ability in vitro, stem cell related gene expression, cytokine secretion and drug resistance were observed. **Results** There was no significant difference in morphology and phenotype between MM-MSCs and ND-MSCs. Both MM-MSCs and RPMI 8266 cells expressed a higher level of Cx43. Co-culture with MM-MSCs induced more SP cells to enter G0 phase (P<0.001). The expressions of c-myc, Kif4 and Sox2 genes in SP cells were significantly up-regulated, while the expression of Oct-4 gene was down-regulated. After adding α-GA, c-myc, Kif4 and Sox2 were down-regulated in varying degrees, but there was no significant difference. The expression of Cx43 was up-regulated by (31.00±2)% and (39.00±2)%, respectively. The colony formation ability in vitro was up-regulated, and the addition of α-GA could partially inhibit this effect. A small amount of c-myc, Kif4, Sox2 and Oct-4 genes were expressed in RPMI 8266. These genes were significantly up-regulated in SP cell subpopulation. MM-MSCs secreted high levels of interleukin (IL)-6. After

［基金项目］ 国家自然科学基金(81272631)资助。
［作者简介］ 王子妍, 博士, 研究方向: 多发骨髓瘤的临床研究, Email: ziyan.wang@foxmail.com
［通信作者］ 傅晋翔, 博士, 主任医师, 研究方向: 血液病, Email: fjx3000@126.com

co-culture with SP cells, the expressions of IL-6, IL-10 and TGF-β in the supernatant of MM-MSCs were up-regulated (P=0.0072, P=0.037). bFGF and IL-17 had no significant change. After adding α-GA, the levels of IL-6, IL-10 and TGF-β in the supernatant decreased. MM cells were sensitive to bortezomib (BTZ) induced apoptosis, but SP cells were less sensitive. Co-culture with MM-MSCs significantly reduced BTZ-mediated apoptosis. The addition of α-GA partially restored the sensitivity of MM cells to bortezomib. **Conclusion**　MM-MSCs and multiple myeloma SP cells up-regulate the expression of Cx43 protein, form more GJIC, and promote the proliferation and drug resistance of SP cells by changing the cytokine secretion profile of MSCs, which may be one of the reasons for the recurrence of MM.

［**Key words**］　multiple myeloma; gap junction connexin; tumor microenvironment

细胞间隙连接(Intercellular gap junction, GJIC)是一种存在于人体所有细胞中的膜通道,由连接蛋白 (connexins, Cxs) 形成,并负责转移生物活性分子、代谢物和相邻细胞或细胞与细胞外环境间的盐离子,对细胞的增殖、分化及机体内环境稳定、新陈代谢、生长发育起至关重要作用[1]。实验证实小鼠骨髓、肝脏及脾脏基质中有 11 种不同的连接蛋白表达,但人类骨髓基质中仅仅有 3 种 Cxs (Cx31、Cx43、Cx45) 表达。多项实验均证实 Cx43 在支持正常造血过程中具有重要作用,而我们前期的研究发现,Cx43 在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的发病过程中具有重要作用,患者骨髓微环境中的 Cx43 表达水平较正常明显升高,骨髓瘤细胞与成骨细胞相互作用后可通过由 Cx43 组成的 GJIC 促进其迁移,上调 Cx43 表达对多发性骨髓瘤细胞的增殖及迁移均起到促进作用,Cx43 表达异常与骨髓瘤融合细胞发生相关[2-3]。然而 Cx43 在 MM 细胞生存及耐药中的作用尚未阐明,尤其在多发性骨髓瘤干细胞及其与微环境中作用尚不明确。有鉴于此,本研究分离、培养 MM 患者及正常志愿者来源骨髓间充质干细胞 (MM-MSCs、ND-MSCs),在直接共培养条件下观察 MM 干细胞样细胞生物学特性的变化及 MM-MSCs 对 MM 干细胞样细胞的生存及耐药的作用,并探讨其可能机制。

1　材料与方法

1.1　材料

细胞株: MM 细胞株 RPMI 8226、U266、XG4、XG7(苏州大学生物技术研究所张学光教授惠赠);试剂: FBS、PBS、LG-DMEM 完全培养液、RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司); Midi MACs 系统(德国 Milteyni 公司); Hoechst33342(美国 Sigma 公司);抗 Cx43 及 GAPDH 一抗(美国 CST 公司); RNeasy kit 试剂盒、QuantiTect reverse transcriptase kit 试剂盒、TopTaq Master Mix Kit 试剂盒(美国 Qiagen 公司); Cytometric Beads Array 试剂盒(美国 BD 公司)。

1.2　细胞培养和检测方法

1.2.1　MM 患者及正常志愿者的骨髓间充质干细胞体外分离和培养

参考文献 [4] 的方法,采用 Ficoll 分离 MM 患者及正常志愿者骨髓单个核细胞(BM-MNCs),用含 10%FBS 的 LG-DMEM 完全培养液培养,观察细胞状态, 72 h 后首次换液,以后根据情况每 2 ~ 3 d,换液 1 次。待细胞生长至 80% 融合后,胰酶消化传代。传至第三代后收获细胞进行后续实验,剩余细胞标记后冻存于液氮罐中备用。志愿者及患者骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs) 的分离、扩增和鉴定在知情同意下获得,并经医院伦理委员会批准。

1.2.2　MM 细胞株及原代 MM 细胞分离和培养

RPMI 8226、U266 采用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。XG4、XG7 采用含有 10% FBS、1 ng/ml IL-6 的 RPMI1640 培养基培养。原代 MM 细胞来自 6 例初诊 MM 患者骨髓: 用 Ficoll 分离 BM-MNCs,并用 Midi MACs 系统纯化,留取 $CD38^+$、$CD138^+$细胞,操作按说明书进行,分选后的细胞采用流式细胞术(FCM)检测其纯度, $CD38^+$、$CD138^+$细胞≥90%,采用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基培养。观察细胞状态, 48 h 后首次换液,以后根据情况每 1 ~ 2 d, 换液 1 次。传至第三代后收获细胞进行后续实验,剩余细胞标记后冻存于液氮罐中备用。

1.2.3　骨髓间充质干细胞表面抗原分析

取对数生长期 F3 代 MM-MSCs 及 ND-MSCs,用 PBS 洗涤后,调整细胞浓度为 2.0×10^6/ml, 每取 100 μl 细胞悬液,分别加入 PE 标记的 CD90、CD73、CD44、CD105、CD34、CD45 及 HLA-DR, 阴性对照为 PE 标记的同型 IgG, 室温下孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次后, FCM 上机检测。

1.2.4　MM 细胞株及原代 MM 细胞 SP 测定及分选

按文献 [5] 报道的方法,分别取 RPMI 8226、U266、XG4、XG7 及原代 MM 细胞,调整细胞浓度为 10^6/ml, 加入浓度为 1 mg/ml 的 Hoechst33342,调整其终浓度为 5 μg/ml, 混匀后置于 37 ℃ 水浴箱

中避光孵育 120 min，期间数次晃动离心管。对照组于此步骤中加入终浓度为 50 μmol/L 维拉帕米同时孵育。离心后 PBS 洗涤，用含碘化丙啶 (2 μg/m1) 的 4 ℃ 预冷 PBS 重悬细胞，并置于冰浴中。FCM 上机检测，激发波长为 350 nm，采集波长为 450 nm (蓝光) 和 675 nm(红光)，通过与对照组比较，选取染色偏弱部分的细胞即为 SP 细胞。SP 细胞分选按上述步骤准备细胞，ALTRA 流式细胞仪更换鞘液并用酒精进行清洗后换为双蒸水冲洗；分别上 Hoechst33342 管和 Hoechst33342+verapamil 管进行检测，FCM 选择 SP 分选方案，调整分选参数，全程需要振荡，分选结束后在无菌条件下分别收集主群细胞 (MP) 和侧群细胞 (SP)，备用。

1.2.5　蛋白印迹分析不同细胞 Cx43 表达水平

分别收集 RPMI8226、SP 细胞、ND-MSCs、MM-MSCs、SP 细胞+ND-MSCs、SP 细胞+ND-MSCs+25 mmol/L α-GA、SP 细胞+MM-MSCs 和 SP 细胞+MM-MSCs+25 mmol/L α-GA 各组细胞，用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次，加入细胞裂解液，置 4 ℃ 作用 30 min，12000 g/min 离心 10 min，收集上清液，BCA 法测定蛋白浓度，加入 4×SDS 凝胶加样缓冲液混匀，煮沸 10 min 使蛋白变性。然后，行聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），并转移至 PVDF 膜上，封闭 1 h 后，分别与抗 Cx43 及 GAPDH 一抗 4 ℃ 孵育过夜，TBS 液洗涤后再与 HRP 标记的二抗共孵育 1 h，洗涤后，应用 ECL 化学发光法显象和 Image 图象分析软件分析。

1.2.6　间隙连接对 SP 细胞的细胞周期影响

采用碘化吡啶 (PI) 法。实验分组：①SP 细胞+MM-MSCs；②SP 细胞+MM-MSCs+25 mmol/L 18α 甘草次酸 (α-GA)；③对照组为 RPMI 8226 细胞。实验设 3 复孔，FCM 分析其 DNA 含量，CellQuest 软件分析结果。

1.2.7　间隙连接对 SP 细胞体外集落形成能力的影响

采用甲基纤维素半固体培养法。实验分组：①SP 细胞+MM-MSC 组；②SP 细胞+MM-MSC+25 mmol/L α-GA 组。分别调整 SP 细胞和 MM-MSC 细胞浓度为 4×10^5/ml 和 2.0×10^6/ml，与等量的 2% 甲基纤维素混均后，接种于 6 孔板，每孔总体系 2 ml；置饱和湿度、37 ℃ 的 CO_2 培养箱中培养，14 d 取出，置倒置显微镜下记录集落数，≥50 细胞为集落，≤50 则为簇。

1.2.8　MM 细胞 c-myc、KIF4、SOX2 及 OCT4 基因表达

采用逆转录聚合酶链式反应（RT-PCR）方法。实验分组：①RPMI 8226 组；②新鲜分离 SP 细胞组；③SP 细胞+MM-MSC 组；④SP 细胞+MM-MSC+25 mmol/L α-GA 组。收集各组细胞，操作按试剂盒说明进行。简述如下：采用 RNeasy kit 试剂盒提取 RNA 样本，取 1μg RNA 进行逆转录，按等量 cDNA 进行 PCR 反应。所有引物序列均由上海生物工程公司设计并合成，采用 β-actin 为内参。β-actin 上游引物 5′-TCCTGTGGCATCCACG AAACT-3′，下游引物 5′-GAAGCATTTGC GGTGGACGAT-3′，其它引物见表 1。PCR 扩增条件均为：94 ℃ 5 min、94 ℃ 40 s、56 ℃ 30 s、72 ℃ 32 s，共 35 个循环。取 4 μl　PCR 产物、Marker 3.5 μl 分别加样于 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳，电压 100V 电泳 30～60 min，紫外投射仪观察目标条带，摄影，图象分析软件 Smartview2001 分析处理结果。

表 1　干细胞样基因引物序列

基因	引物序列
c-myc	5′CTTCTCTCCGTCCTCGGATTCT 3′GAAGGTGATCCAGACTCTGACCTT
Klf-4	5′GCAAGTCCCCTCTCTCCATTA 3′GTAAGGTTTCTCGCCTGTGTG
Oct-4	5′GGAGATATGCAAAGCAGAAACC 3′CTCAAAATCCTCTCGTTGTGC
Sox-2	5′CGGCAACCAGAAAAACAGC 3′TCTCCGTCTCCGACAAAAGT

1.2.9　阻断 GJIC 对 BM-MSCs 细胞因子分泌的作用

采用 CBA 检测法。取对数生长期 MM-MSCs，调整细胞数 1×10^5/ml 接种于 6 孔板，培养箱静置 4 h 弃上清，并将不同 MM 细胞按 1×10^5/ml 的浓度接种该孔中，每孔 2 ml，分组为：①RPMI 8226 细胞；②SP 细胞+MM-MSCs；③SP+MM-MSCs+α-GA（25mmol/L）；④MM-MSCs。每组设 3 个复孔，培养 24 h 后收集培养上清，利用 CBA 技术测定上清中 IL-6、IL-10、TGFβ、bFGF 和 IL-17 的变化。

1.2.10　间隙连接对 MM 细胞蛋白酶体抑制剂敏感性的影响

采用 annexinV/PI 标记细胞流式术分析法。取对数生长期 MM-MSC 细胞，调整细胞数 4×10^5/孔接种于 24 孔板；RPMI8226 或 SP 细胞，调整细胞数 2×10^4/孔接种于 24 孔板，培养箱静置 4 h 后去上清，分组如下：①RPMI8226；②RPMI8226+硼替佐米 (BTZ)；③SP+BTZ；④SP+MM-MSC+BTZ；⑤SP+MM-MSC+BTZ+α-GA。所有实验组 BTZ 及 α-GA 的终浓度分别为 20 nmol/L 和 25 mmol/L，培养 24 h 后收集细胞，FCM 检测细胞凋亡，实验设 5 复孔。

1.3　统计学处理

所有数据采用 Graphpad Prism 5.0 统计处理软件分析，以均数±标准差表示。组间分析采用 t 检验，$P<0.05$ 为差别具有统计学意义。

2　结果

2.1　MM 患者 MSCs 的形态学变化及 Cx43 表达

分离培养获得 MM-MSCs 及 ND-MSCs，表面抗原提示两者均为高表达 CD73（98.0%）、CD44（100%）、CD90（99.8%）和 CD105（100%），基本不表达 CD34（0.3%）、HLA-DR（0.2%），细胞形态两者无明显差异。见表 2 和图 1。

表 2　BM-MSCs 细胞表面抗原分析

表面抗原	CD73	CD44	CD90	CD105	CD34	HLA-DR
表达率(%)	98.00	100	99.80	100	0.30	0.20

蛋白印迹试验证实 SP 细胞仅表达极少量的 Cx43 分子，而 RPMI 8226 细胞则表达较高水平的 Cx43，两者具有显著性差异（$P<0.001$）；MM-MSCs 较 ND-MSCs 表达 Cx43 明显较多，但不具有统计学意义（$P>0.05$）；SP 细胞与 MM-MSCs 共培养后，其 Cx43 表达均有显著上调（$P<0.001$）；阻断 GJ 后，SP 细胞的 Cx43 表达则呈现明显下调（$P<0.001$），详见图 2。

2.2　不同来源 MM 细胞 SP 细胞分离

本研究对 6 例 MM 患者的原代细胞及 4 种 MM 细胞株的检测提示，采用 Hoechst 33342 染色后应用 FCM 技术可将 MM 细胞分为 2 群，即主群细胞（MP）和侧群细胞（SP）[6]。所有 MM 细胞均存在不同比例的 SP 细胞。MM 细胞株中 SP 细胞含量分别为 1.783 %、0.8256 %、0.082 %、0.177 %，而原代细胞不具备可重复性，鉴于 RPMI 8266 细胞中 SP 细胞含量较多，且稳定，此后实验采用的 SP 细胞均来自 RPMI8226，详见图 3。

2.3　MM-MSCs 对 SP 细胞周期的作用

结果分析提示 SP 亚群中处 G0 期细胞比例显著高于 MP 亚群，分别为 (44.34±1.7) % 和 (28.49±1.1) %，提示 SP 亚群中包含更多处静止期的 MM 细胞。与 MM-MSCs 共培养后发现 MM-MSCs 具有促进 SP 亚群细胞进入 G0 期的作用，其 G0 期细胞达 (82.6±0.1) % ($P<0.001$)，而加入间隙连接抑制剂 α-GA 后，MM-MSCs 对 SP 亚群的这一作用减弱，细胞进入增殖周期者增多，G0 期细胞降至 (63.42±3.86) % ($P<0.01$)，详见图 4。

2.4　SP 细胞具有更强的体外集落形成能力

我们利用克隆形成实验分析 SP 细胞体外形成集落的能力，SP 细胞单独培养、与 ND-MSCs 共培养、与 MM-MSCs 共培养、与 ND-MSCs 共培养体系中加入通道阻断剂，与 MM-MSCs 共培养体系中加入通道阻断剂后单克隆直径、克隆形成数、克隆形成率见表 3。结果显示出与 MM-MSCs 共培养

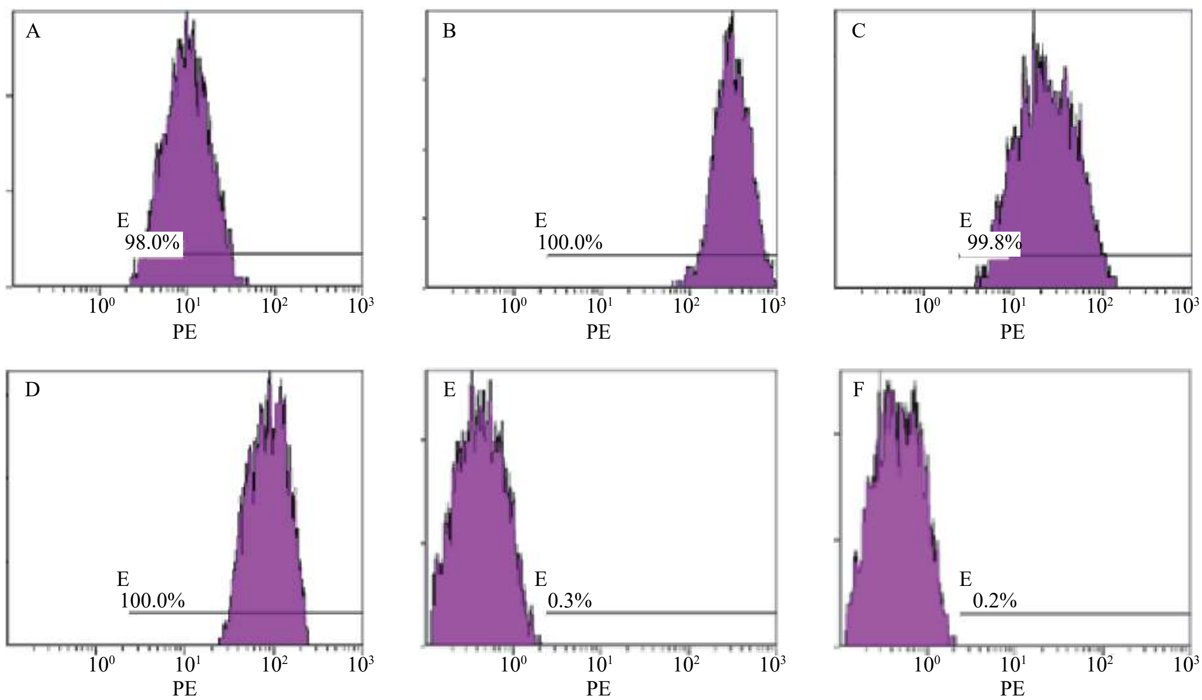

图 1　BM-MSCs 细胞表面抗原表达 R

A.PE-CD73; B.PE-CD44; C.PE-CD90; D.PE-CD105; E.PE-CD34; F.PE-HLA-D

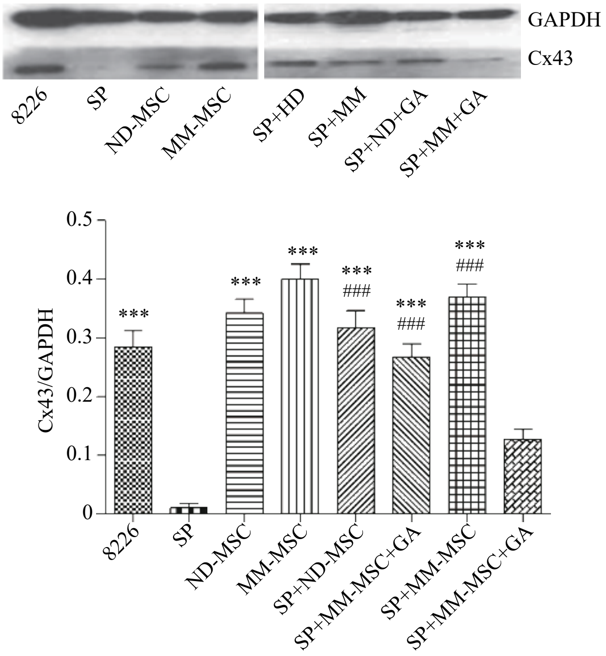

图 2 蛋白印迹分析不同细胞 Cx43 的表达

***P<0.001, 与 SP 组比较; ###P<0.001, 与 SP+MM-MSCs+GA 组比较

的 SP 细胞有更强的克隆形成能力。加入通道阻断剂后克隆形成能力均表现出一定程度的下降，单细胞克隆直径减小，克隆形成率降低，见图 5。

2.5 加入 GJ 阻断剂对 BM-MSCs 及 MM 细胞因子分泌水平的影响

CBA 分析显示，MM-MSCs 单独培养 24 h 后，其培养上清中存在高水平的 IL-6，较低水平的 TGF-β、bFGF 和 IL-17，基本无 IL-10 分泌；RPMI 8266 细胞培养 24 h 后上清中可以测得较低水平的 TGF-β 及少量 bFGF、IL-17、IL-6 及 IL-10；共培养 24 h 后，其上清中 IL-6、IL-10 和 TGF-β 水平较前明显升高（P<0.05），尤其是 IL-6 和 IL-10 水平较单独培养时显著升高（P<0.01），bFGF 和 IL-17 共培养前后则无明显变化；加入 GJ 阻断剂后，细胞因子 IL-6、IL-10 和 TGF-β 的分泌有所降低（P<0.05），见图 6。

2.6 GJ 对 SP 细胞干细胞相关基因的影响

RT-PCR 检测发现 RPMI8266 存在一定量 c-myc、KIF4、SOX2 和 Oct-4 基因表达，但 SP 细胞亚群中该类基因表达明显上调，两者具有显著性差异 (P<0.05)，将 SP 细胞与 MM-MSC 共培养后，可观察到 c-myc、KIF4 和 SOX2 基因表达的显著上调 (P<0.001)，而 Oct-4 基因表达下调，加入 GJ 阻断剂后，原上调的基因均有不同程度下调，但无明显区别 (P>0.05)，见图 7。

2.7 加入 GJ 阻断剂对硼替佐米诱导凋亡的影响

体外 PI/Annexin V 检测显示，RPMI 8226 的 MP 细胞对 BTZ 诱导的细胞凋亡敏感，而对 SP 细胞敏感性较差，其凋亡率分别为 (66.8±0.77)% 和 (25.9±0.86)%，P<0.001。与 MM-MSCs 直接共培养后，BTZ 诱导的凋亡作用较单独培养明显减弱 (P<0.05)，MM-MSCs 具有一定保护作用，加入 GJ 阻断剂后，可部分恢复 MM 细胞对硼替佐米的敏感性，证实 MM-MSCs 可保护骨髓瘤细胞免受抗

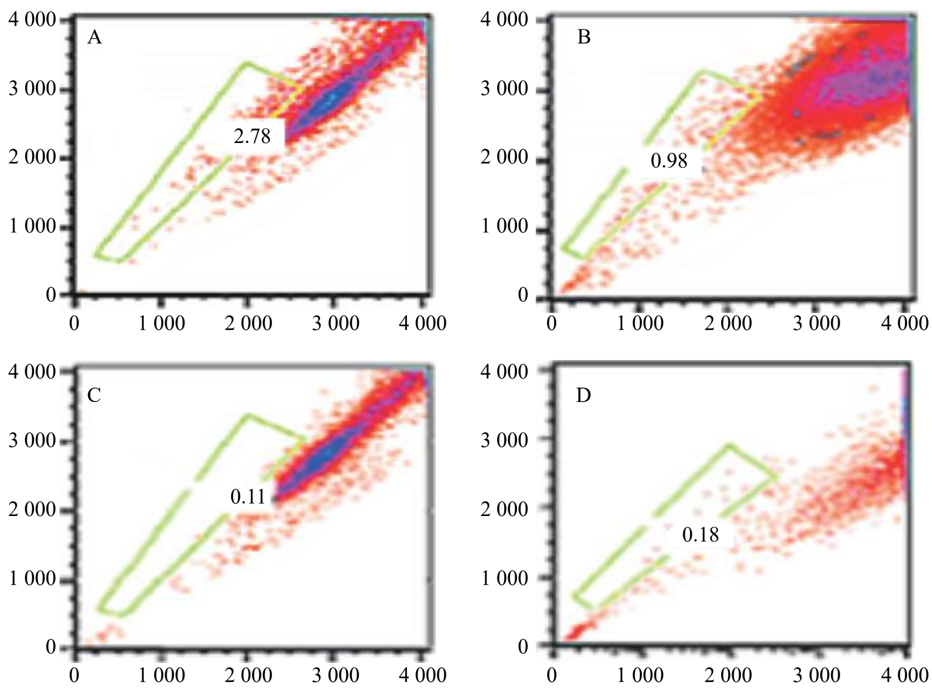

图 3 不同 MM 细胞株的 SP 流式术分选

A.RPMI 8226; B.U266; C.XG-4; D.XG-7

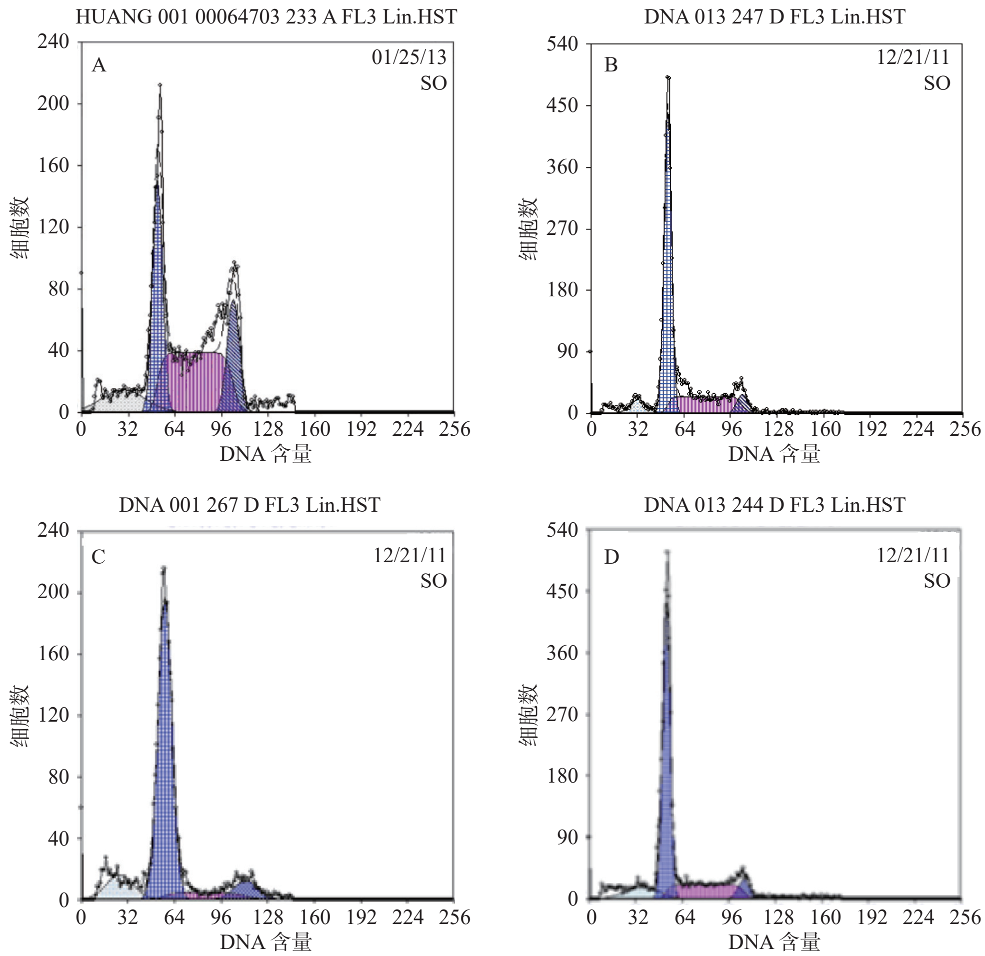

图 4　MM-MSCs 对 SP 细胞周期的作用

A. RPMI8226 单独培养; B. SP 细胞单独培养; C. SP+MM-MSCs 培养; D. SP+MM-MSCs+α-GA 培养

表 3　不同培养体系加入阻断剂前后克隆形成能力

组别	单克隆直径（cm）	克隆形成数	克隆形成率（/2000）
SP	0.28±0.16	1 722±127	86%±6%
SP+ND-MSCs	0.33±0.14	1858±89	93%±4%
SP+MM-MSCs	0.38±0.21	1900±85	95%±4%
SP+ND-MSCs+GA	0.25±0.22	1 532±112	77%±6%
SP+MM-MSCs+GA	0.31±0.17	1 755±76	88%±4%

肿瘤药物影响，而 GJIC 在其中可能起到一定作用，见图 8。

3　讨论

MM 是一种恶性浆细胞疾病，以肿瘤细胞与骨髓微环境中基质细胞的复杂的相互作用网络为特征，骨髓基质细胞可促进 MM 细胞的生存、增殖和药物抗性。骨髓间充质干细胞是骨髓基质细胞中最主要的干细胞群体，能够分化成多种细胞系，包括成纤维细胞、脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞。MSCs 可以迁移到原发肿瘤和转移部位，这意味着

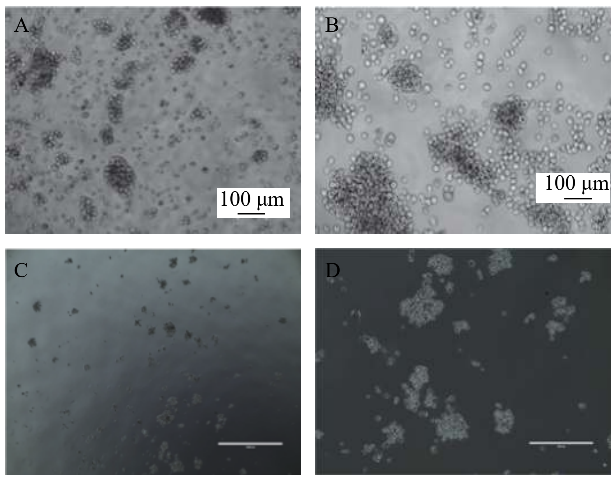

图 5　ND-NSCs 及 MM-MSCs 对 SP 细胞的体外集落形成的影响

A. SP 细胞+ND-MSCs; B. SP 细胞+MM-MSCs; C. SP 细胞+ND-MSCs+25mmol/L α-GA; D. SP 细胞+MM-MSCs+25mmol/L α-GA

这些细胞可能调节肿瘤的生长和转移。MSCs 在与 MM 细胞相互黏附及作用过程中部分细胞特性发生改变，成为肿瘤相关 BMSCs，即 MM-MSCs，MM 患者来源的骨髓间充质干细胞显示出功能异

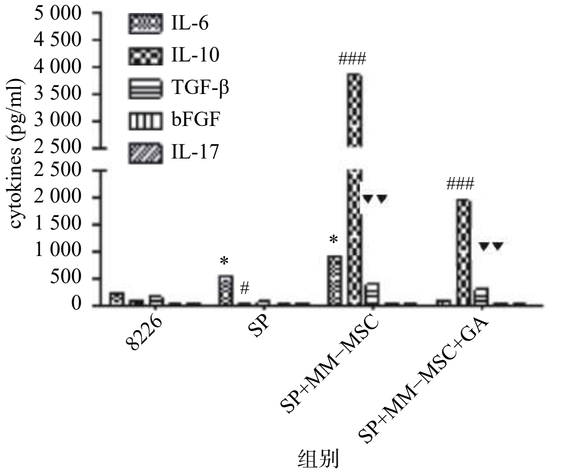

图 6　培养上清中细胞因子变化

***P<0.001, 与 8226 组 IL-6 比较; ###P<0.001, 与 IL-10 比较; ▼▼▼P<0.001, 与 TGF-β 比较*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

常, 说明骨髓间充质干细胞在骨髓瘤的发生、发展中不是旁观者, 它还可分泌多种细胞因子影响 MM 细胞的生长、生存、耐药、迁移, 在疾病的发生、发展中起了重要的作用, 目前成为治疗多发性骨髓瘤的新的研究热点[7-8]。

尽管近几年 MM 的治疗取得了长足的进步, 但目前它仍然是不可治愈的, 有证据表明 MM 细胞之间存在异质性, 尤其是可能存在 MM 干细胞亚群, 它具有自我更新及原发耐药特性, 可能是 MM 增殖、维持 MM 表型及导致疾病复发的原因, 但其耐药性的机制还没有得到充分的了解[5, 9]。理想的多发性骨髓瘤干细胞 (MMSCs) 的鉴定应依赖于 MMSCs 的表型, 但至今 MMSCs 的表型尚未得到正确的定义。Goodell 等通过 FCM 在 MM 细胞中

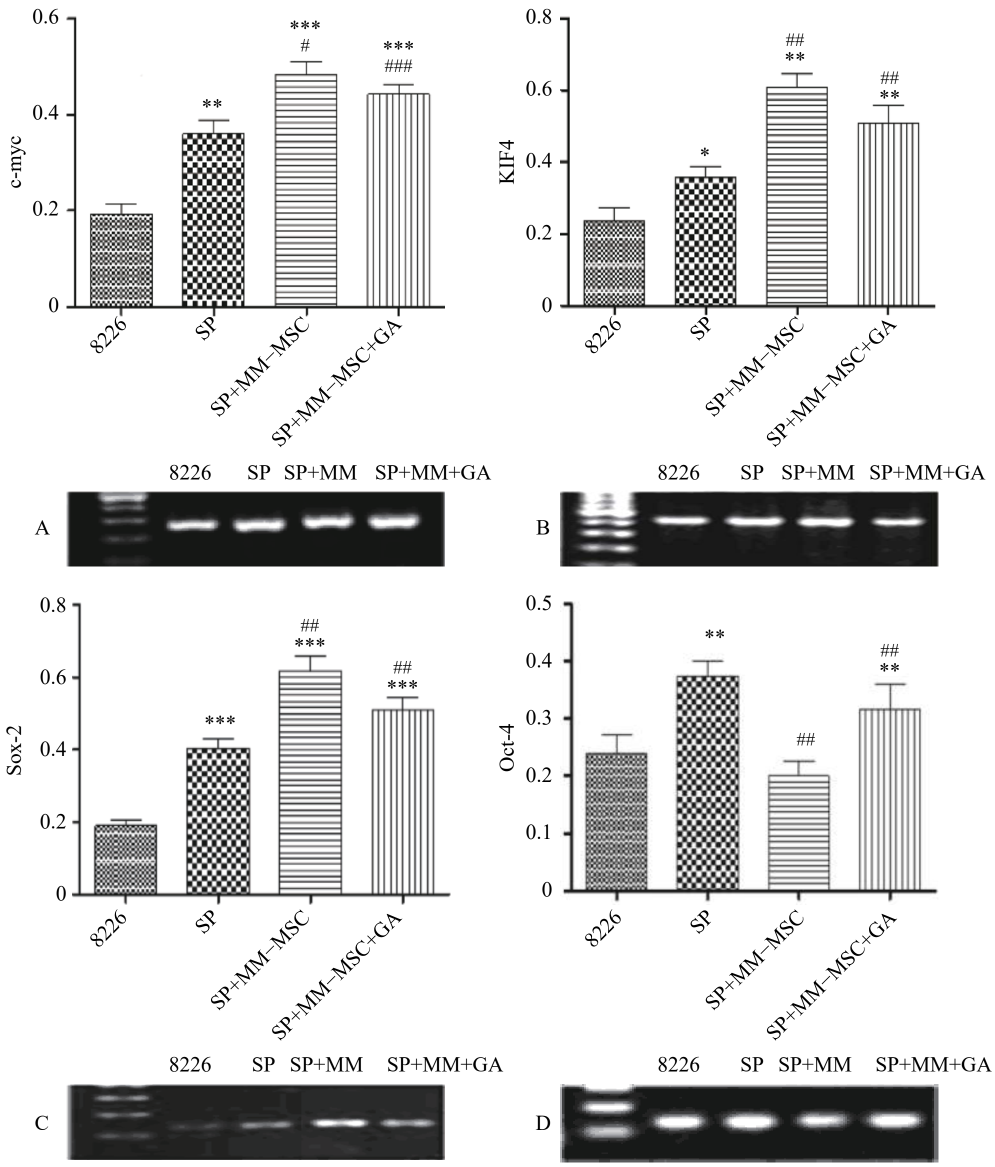

图 7　RT-PCR 分析 SP 细胞干细胞相关基因表达

A. C-myc; B. KIF4; C. SOX-2; D. Oct-4

***P<0.001, 与 8226 组比较; ###P<0.001, 与 SP 组比较, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

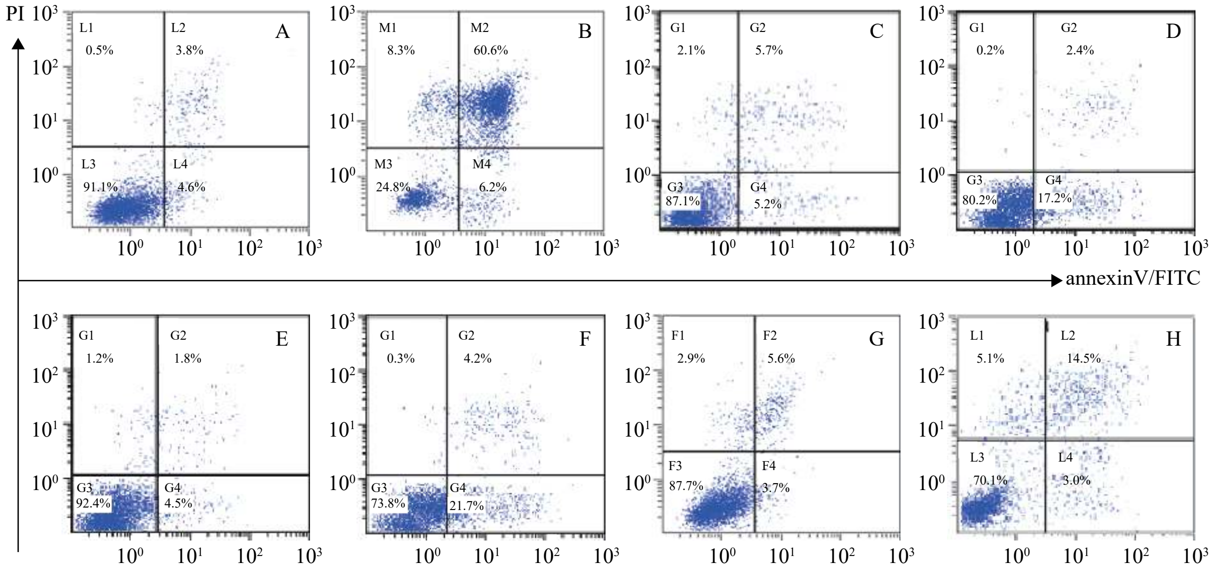

图 8　GJ 在硼替佐咪诱导的 MM 细胞凋亡中的作用

A. RPMI8226; B. RPMI8226+BTZ; C. RPMI8226+BTZ+BTZ; D. RPMI8226+BTZ+BTZ+α-GA; E. SP; F. SP+BTZ; G.SP+MM-MSCs+BTZ; H. SP+MM-MSCs+BTZ+α-GA

分离出具有干细胞特性的 SP 细胞，为拓展肿瘤干细胞的研究提供了思路。目前，SP 细胞和 ALDH1+ 已经被用来鉴定 MMSCs。MMSCs 与骨髓微环境的复杂的相互作用维持着 MMSCs 的自我更新和生存。然而，MMSCs 与周围骨髓微环境相互作用的分子需要进一步确认。

在过去的几年里，连接蛋白的异常表达，特别是 Cx43 的异常表达已经被证实与癌症复发、转移性扩散和不良预后相关。根据癌症的不同分期和类型，Cx43 既可以作为肿瘤抑制因子，也可以作为癌基因、生物标记物，我们需要更好地了解 Cx43 在肿瘤微环境中如何参与、影响肿瘤形成和进展，从而开发基于 Cx43 的临床可行疗法。Cx43 分子在细胞表面形成通道，可使小分子和一定量大分子物质在细胞间转移，这一特性使它们存在将化疗药物直接送入肿瘤细胞内的潜力，从而成为肿瘤治疗新的非常有吸引力的靶点。

为明确 MM-MSCs 与 SP 细胞的相互作用，首先我们采用 Hoechst33342 标记 FCM 术检测骨髓瘤细胞株及新鲜 MM 标本，结果证实所有检测样本中均存在 SP 细胞亚群，4 种 MM 细胞株检测 SP 细胞含量分别为 1.783 %、0.825 6 %、0.082 %、0.177 %，并成功分选 SP 细胞比例最高的 PRMI8226 细胞株的 SP 细胞。在此基础上，通过对 SP 亚群细胞的多种干细胞相关基因如 c-myc、KIF4、SOX2 和 Oct-4 表达分析，发现其与 RPMI 8226 细胞有明显不同。直接与 MM-MSCs 共培养后 SP 细胞亚群 c-myc、KIF4 和 SOX2 基因表达显著上调 (P<0.001)，而 Oct-4 基因表达下调，加入 GJIC 阻断剂后，c-myc、KIF4 和 SOX2 基因表达尽管有所下调，但并无显著性差异。对于细胞周期的分析也证实 SP 细胞亚群中处 G0 期细胞比例显著高于 MP 亚群，分别为 (44.34±1.7)% 和 (28.49±1.1)%，提示 SP 细胞亚群中包含较多处静止期 MM 细胞，推测与该群细胞化疗敏感性差可能有关。共培养后发现 MM-MSCs 有促进 SP 亚群细胞进入 G0 期的作用 (P<0.001)，其 G0 期细胞达 (82.6±0.1)%，而加入间隙连接抑制剂 α-GA 后，这一作用减弱，细胞进入周期者增多，G0 期细胞为 (63.42±3.86)%。体外集落形成试验证实从 MM 细胞分离的 SP 细胞本身具有较强的集落形成能力，但在 MM-MSCs 存在的前提下其细胞形成的体外集落细胞数更多，胞体较大且细胞折光性强，提示细胞活力较好，培养体系中加入 GJ 阻断剂后体外集落形成能力均现出一定程度的下降，克隆形成率降低，单细胞克隆直径减小。

前期我们的研究证实 MM-MSCs 与 MM 细胞可形成功能性 GJIC，并在多发性骨髓瘤的发病中扮演重要角色[2-3, 10]，为进一步观察间充质干细胞中连接蛋白 Cx43 组成的细胞间隙连接在多发性骨髓瘤 SP 细胞生存及耐药中的作用，我们通过蛋白印迹试验证实除 SP 细胞基本无 Cx43 表达外，ND-MSCs 和 MM-MSCs、MM 细胞株及初诊患者 MM 细胞均表达 Cx43 分子，与 SP 细胞相比差别显著（P<0.001）。SP 细胞与 MM-MSCs 共培养后，其 Cx43 分子表达显著上调（P<0.001），加入 α-GA 可部分下调 SP 细胞的 Cx43 表达（P<0.001）。采用

CBA 技术检测共培养前后培养液中细胞因子变化，发现在直接共培养时 MM-MSCs 细胞因子分泌谱发生变化，在原有高水平 IL-6 的基础上，IL-10 和 TGFβ 水平较前明显增加（P<0.05），尤其是 IL-6 和 IL-10 较单独培养时显著增加（P<0.01），bFGF 和 IL-17 在共培养前后水平无明显变化，采用 α-GA 阻断 MM-MSCs 与 SP 细胞间的 GJIC 后，细胞因子 IL-6、IL-10 和 TGF-β 的分泌能力下调（P<0.05）。综上，我们认为 MM-MSCs 通过多种途径影响 SP 细胞的生物学特性，增加其干细胞相关基因表达、增加静止期细胞比例、增强其体外集落形成能力、改变细胞因子分泌，而在这一过程中 Cx43 分子的表达及其形成的 GJIC 具有重要作用。

蛋白酶体抑制剂 BTZ 是 MM 治疗的一线药物，尽管 BTZ 较目前其他化疗药物更为有效，但原发性或获得性耐药仍是限制其疗效的主要原因，目前对于蛋白酶体抑制剂耐药的机制仍未阐明。本研究发现尽管 MP 和 SP 细胞均对 BTZ 敏感，但 SP 细胞敏感性较差，可能与其本身极低表达 Cx43 部分相关，其凋亡细胞分别为 (66.8±0.77)% 和 (25.9±0.86)%，P<0.001，经与 MM-MSCs 直接共培养后，BTZ 诱导的凋亡作用明显减弱 (P<0.05)，MM-MSCs 具有保护作用，而在共培养体系中加入 α-GA，可部分恢复 MM 细胞对硼替佐咪的敏感性，由此证实 MM-MSCs 促进 MM SP 细胞的生存，保护 MM SP 细胞免受抗肿瘤药物影响，GJIC 在其中起到一定作用。我们前期实验提示，过表达 MM 细胞的 Cx43 可提高 MM 细胞化疗敏感性，但与 MSCs 共培养后敏感性降低，肿瘤细胞本身 Cx43 半通道有可能通过增加癌细胞对化疗药物的通透性来降低耐药性,但与微环境中 MSCs 相互作用后这一作用产生变化，但具体机制仍在进一步研究中。

本研究发现 Cx43 及其组成的 GJIC 不但影响 MM 细胞的迁移，而且也影响恶性浆细胞的药物敏感性，证实骨髓微环境中 Cx43 及其组成的 GJIC 在 MM 发生、发展中具有重要作用，在细胞因子分泌、肿瘤生长、细胞周期变化、基因表达等多个环节中影响 MM 细胞的生物学行为，基于我们及其他相关研究结果，我们证实 MM 细胞与 MM-MSCs、造血细胞及细胞外基质通过粘附 GJIC 介导耐药，阻断肿瘤细胞与微环境的 GJIC 将有助于提高抗肿瘤效益。

【参考文献】

[1] BONACQUISTI E E, NGUYEN J. Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions[J]. Cancer Lett, 2019, 442: 439-444.

[2] ZHANG X H, SUN Y, WANG Z Y, et al. Up-regulation of connexin-43 expression in bone marrow mesenchymal stem cells plays a crucial role in adhesion and migration of multiple myeloma cells[J]. Leuk Lymphoma, 2015, 56(1): 211-218.

[3] ZHANG Y M, WANG Z Y, ZHANG L Y, et al. Impact of connexin 43 coupling on survival and migration of multiple myeloma cells[J]. Arch Med Sci, 2017, 13(6): 1335-1346.

[4] JAKUBIKOVA J, CHOLUJOVA D, HIDESHIMA T, et al. A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: biologic and clinical applications[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77326-77341.

[5] GAO M J, KONG Y Y, YANG G, et al. Multiple myeloma cancer stem cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(23): 35466-35477.

[6] BEHRENS J, KAMERITSCH P, WALLNER S, et al. The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner[J]. Eur J Cell Biol, 2010, 89(11): 828-838.

[7] BELLONI D, HELTAI S, PONZONI M, et al. Modeling multiple myeloma-bone marrow interactions and response to drugs in a 3D surrogate microenvironment[J]. Haematologica, 2018, 103(4): 707-716.

[8] XU S, DE VEIRMAN K, DE BECKER A, et al. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: a therapeutical tool or target? Leukemia, 2018, 32(7): 1500-1514.

[9] ISSA M E, CRETTON S, CUENDET M. Targeting multiple myeloma cancer stem cells with natural products - lessons from other hematological malignancies[J]. Planta Med, 2017, 83(9): 752-760.

[10] WANG Z Y, YUAN Y Q, ZHANG L Y, et al. Impact of cell fusion in myeloma marrow microenvironment on tumor progression[J]. Oncotarget, 2018, 9(57): 30997-31006.

［收稿日期］ 2021-05-22 ［修回日期］ 2021-12-10
［本文编辑］ 陈盛新