

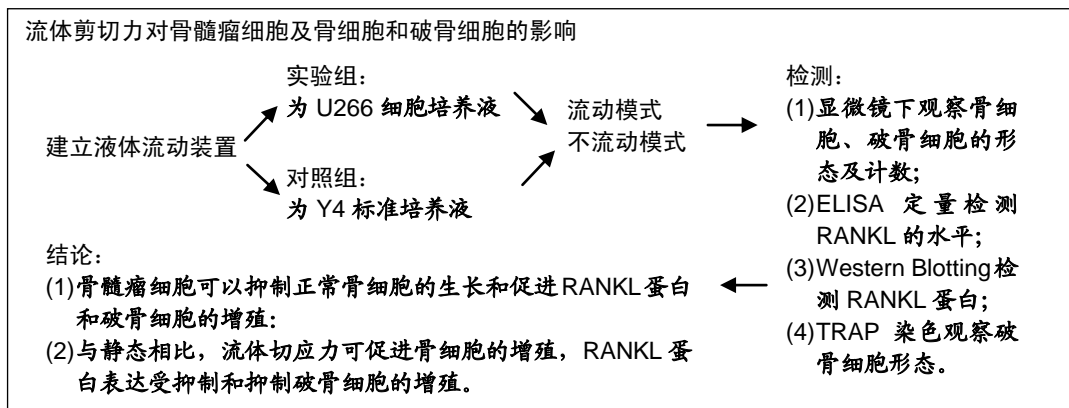
运用液体流动装置模拟的流体剪切应力下骨髓瘤细胞对骨细胞、破骨细胞和骨细胞表达RANKL的影响

王晓桃¹, 田申¹, 何玉婵¹, 吴春叶¹, 张俊艳¹, 阳少芳¹, 王航飞¹, You Lidan² (¹桂林医学院第二附属医院血液内科, 广西壮族自治区桂林市 541000; ²加拿大多伦多大学, 工程生物学实验室, 加拿大多伦多市)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0608

ORCID: 0000-0001-7223-0604(王晓桃)

文章快速阅读:



王晓桃, 女, 1975 年生, 湖南省永州市人, 2016 年广西医科大学毕业, 博士, 教授, 主要从事多发性骨髓瘤骨病的临床与基础研究。

通讯作者: 王晓桃, 博士, 教授, 桂林医学院第二附属医院血液内科, 广西壮族自治区桂林市 541000

并列通讯作者: You Lidan, 博士, 加拿大多伦多大学, 工程生物学实验室, 加拿大多伦多市

文献标识码: B

稿件接受: 2018-08-06



Wang Xiaotao, MD, Professor, Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Wang Xiaotao, Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: You Lidan, PhD, Faculty of Applied Science & Engineering, University of Toronto, Toronto, Canada

文题释义:

骨髓瘤细胞: 具有无限分裂能力, 由于该细胞并非高度分化细胞, 因此分裂能力较强, 而其他肿瘤细胞分裂能力较弱, 因此多在制备单克隆抗体时与 B 淋巴细胞融合, 使单克隆抗体迅速大量增殖。

体外低强度震动流体室装置(flow fluid chamber): 模拟骨髓瘤骨病患者轻微运动或机械运动时产生的流体剪切力在骨髓瘤环境下对骨细胞的影响。

摘要

背景: 骨髓瘤骨病因骨骼疼痛、溶骨性破坏导致患者可能懒动而导致骨质丢失增加、骨病加重。

目的: 探讨运用液体流动装置模拟人机械运动时产生的流体剪切力在骨髓瘤环境下, 瘤细胞(U266 细胞)对骨细胞(Y4 细胞)、破骨细胞的作用, 及其对骨细胞分泌的 RANKL 表达的影响。

方法: ①建立液体流动装置, 实验组为 U266 细胞培养液, 对照组为 Y4 标准培养液, 每组均设流动和不流动模式; 体外细胞传代培养骨髓瘤细胞系 U266 细胞和小鼠骨细胞系 Y4 细胞; ②再取新的 Y4 细胞, 按实验分组再培养 48 h, 显微镜下观察骨细胞、破骨细胞的形态并计数; ③ELISA 定量检测 RANKL 的水平; Western Blotting 检测 RANKL 蛋白; ④建立 RANKL+实验样品+标准培养液的体系, 取 RAW264.7 细胞体外培养, 用 RANKL 干预诱导, TRAP 染色观察 RAW264.7 细胞株分化的破骨细胞数量及状态。

结果与结论: ①与对照组相比, U266 细胞培养上清下的 Y4 细胞计数显著下降, 形态变化明显; TRAP 阳性细胞数增加和 RANKL 蛋白表达显著升高(P 均 < 0.05); ②动模式较非流量模式, Y4 细胞数量明显增多, TRAP 阳性细胞数明显减少, 骨细胞表达的 RANKL 蛋白降低(P 均 < 0.05); ③结果说明, 骨髓瘤细胞可以抑制正常骨细胞的生长和促进 RANKL 蛋白和破骨细胞的增殖。与静态相比, 流体切应力可促进骨细胞的增殖, RANKL 蛋白表达受抑制和抑制破骨细胞的增殖。因此, 推测机械运动可以防止骨髓瘤骨病进展。

关键词:

骨髓瘤骨病; 流动液体室装置; 骨细胞; 破骨细胞; 核转录因子 κ B 配体; RANKL; 组织构建

主题词:

多发性骨髓瘤; 破骨细胞; RANK 配体; 组织工程

中图分类号: R455; R318

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81460038, 项目负责人: 王晓桃); 广西自然科学基金面上项目(2017GXNSFAA198178); 桂林市科学研究与技术开发项目(20170109-49)

Effect of fluid shear force from a fluid flow device simulating mechanical motion on RANKL expression in myeloma cells, osteocytes and osteoclasts

Wang Xiaotao¹, Tian Shen¹, He Yuchan¹, Wu Chunye¹, Zhang Junyan¹, Yang Shaofang¹, Wang Hangfei¹, You Lidan² (¹Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Faculty of Applied Science & Engineering, University of Toronto, Toronto, Canada)

Abstract

BACKGROUND: Myeloma patients have less movement because of bone pain and osteolytic destruction, which result in bone loss and disease aggravation.

OBJECTIVE: To explore the effect of myeloma cells (U266 cells) on osteocytes (Y4 cells), osteoblasts and osteoclasts as well as RANKL secreted by osteocytes under fluid shear stress simulating human mechanical movement by a fluid flow device.

METHODS: A flow and no-flow model was established. U266 cell culture fluid was used in the experimental group and Y4 standard culture fluid was used in the flow and control groups. Myeloma cell line U266 and mouse osteocytes cell line Y4 were cultured and passaged *in vitro*. Y4 cells were allotted and cultured for 48 hours, and the morphology of osteocytes and osteoclasts was observed and counted under microscope. The level of RANKL was quantitatively determined by ELISA and western blot assay. The RANKL, sample and standard culture system was established, RAW264.7 cells were cultured *in vitro*, and induced by RANKL. Number and morphology of RAW264.7 cells differentiating into osteoclasts were observed by TRAP staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, Y4 cells in U266 culture supernatant exhibited morphological changes and their number was significantly decreased. The number of TRAP-positive osteoclasts was increased and the expression of RANKL protein in Y4 cells was significantly up-regulated ($P < 0.05$). Comparison between the flow model and the no-flow model showed that the number of Y4 cells was significantly increased, the expression of RANKL protein decreased and the number of TRAP-positive osteoclasts was significantly reduced ($P < 0.05$). Our study indicates that myeloma cells can inhibit the growth of normal osteocyte and might promote the expression of RANKL protein and the growth of osteoclasts. Compared with static state, fluid shear stress may promote the proliferation of osteocytes and might inhibit the expression of RANKL protein and the growth of osteoclasts. So, we hypothesize that mild exercise may prevent the progression of myeloma bone disease.

Subject headings: Multiple Myeloma; Osteoclasts; RANK Ligand; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81460038 (to WXT); the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (General Program), No. 2017GXNSFAA198178; the Scientific Research and Technology Development of Guilin, No. 20170109-49

0 引言 Introduction

多发性骨髓瘤是浆细胞恶性克隆性疾病, 骨髓瘤骨病是多发性骨髓瘤患者常见的并发症。骨髓瘤骨病以进行性骨质破坏、多发溶骨性病变等为特征, 是多发性骨髓瘤患者就诊及致残的主要原因^[1]。研究表明, 有40%左右的患者因骨髓瘤骨病而危及生活质量及增加死亡风险, 迫使患者长期或绝大部分时间卧床, 导致骨钙丢失加重, 影响骨髓瘤骨病的疗效, 给家庭及社会造成沉重负担^[2]。骨髓瘤骨病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)通过经典RANKL/RANK等信号通路导致破骨细胞活性增强和成骨细胞活性减弱, 造成溶骨性损害, 阻碍新骨生成^[3]。已有研究证实, RANKL是调节破骨细胞活性及功能的一个关键性因子, 在骨髓瘤骨病的骨质破坏中具有重要作用, 主要是瘤细胞表达^[4]。骨细胞常常在某些因素作用下也能高表达RANKL, 如某些炎症性疾病如牙周炎小鼠骨细胞高表达RANKL^[5], 小鼠骨髓瘤模型中骨细胞也高表达RANKL^[6]。而骨细胞是骨髓瘤骨病骨丢失的关键性调节因子^[7]。该研究拟通过建立流体室实验模型, 模拟骨髓瘤骨病患者机械运动时骨细胞所处的环境, 一方面观察骨髓瘤细胞(myeloma cell, MC)分泌的炎症因子对正常小鼠骨细胞、破骨细胞的影响, 另一方面通过流体运动模拟肌肉机械运动产生的剪切力对在不同介质培养下骨细胞、破骨细胞及骨细胞表达RANKL的影响, 探讨流体运动对于骨髓瘤骨病发生的作用及可能机制, 为验证轻微运动有利于骨髓瘤骨病的恢复奠定理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2015年3至12月在加拿大多伦

多大学工程生物学实验室完成。

1.3 材料 小鼠骨细胞(MLO-Y4, BD实验室); 骨髓瘤细胞(U266, University of Toronto), 小鼠巨噬细胞株RAW264.7(多伦多大学生物工程实验室提供); 细胞培养液MEM(美国Sigma公司); RANKL-Elisa试剂盒(GIBCO公司); 胎牛血清、小牛血清(美国CS公司); RANKL抗体(BD实验室); 鼠抗人RANKL单克隆抗体、山羊抗小鼠IgG(二抗)、抗兔IgG酶联(均购自美国Cell Signaling Technology公司), 抗兔IgG辣根过氧化物酶(上海羽朵生物公司), RIPA裂解缓冲液、GADPH单克隆抗体(内参照)(购自北京康为世纪生物科技有限公司), 流动液体室(flow fluid chamber)装置(多伦多大学机械工程实验室研)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 Y4细胞在含体积分数10%胎牛血清(FBS)、体积分数5%小牛血清(CS)、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的MEM培养基, 37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中贴壁培养, U266细胞在含体积分数10%胎牛血清、体积分数5%小牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的MEM培养基, 37 °C, 体积分数5% CO₂培养箱中悬浮培养。小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞株(P5)在DMEM标准培养液(体积分数10%胎牛血清, 体积分数1%小牛血清), 温度37 °C, 体积分数5%浓度CO₂的细胞培养箱中培养, 每3 d换液并传代。

1.4.2 实验分组 取U266和Y4细胞, 采用相应的培养液培养48 h后, 离心收集两种上清液培养Y4细胞, 实验组: U266上清液培养, 对照组: Y4上清液培养; 每组均设两种模式: 流动模式(Flow), 非流动模式(No-Flow)。

1.4.3 细胞再培养 取12组新的Y4细胞, 每组10⁵细胞, 种在载玻片(经紫外照射, 乙醇消毒后, 铺明胶处理)上, 按实验分组再培养48 h后, 显微镜下观察骨细胞、破骨细

胞的形态并计数, 实验重复6次。

1.4.4 液体流体室装置 随机装载实验组和对照组样本, 分别置入流体装置中, 流动模式启动并运行装置, 在压强达到1.0 Pa, 电流设置1 Hz, 流速为2 cm/s)运行2 h, 非流动模式则不启动电源运行装置, 2 h后取出各组细胞, 收集各组细胞培养液以备后续实验, 显微镜下观察细胞形态变化并计数, 实验重复3次。

1.4.5 ELISA定量检测RANKL表达 取出1.4.4中装置运行后的两种细胞用胰酶消化、离心、去除运行过程中产生的可能细胞因子, 调整每组细胞计数为 10^5 , 接种于MEM标准培养液(体积分数10%胎牛血清, 体积分数5%小牛血清, 1%PS)中继续培养24 h后, 然后收集两种培养液及相应的细胞, 采用ELISA方法检测此两种培养液中RANKL的含量, 具体步骤按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.6 Western Blotting检测RANKL蛋白 按凯基全蛋白提取试剂盒说明书提取第1.4.5实验中各组细胞的总蛋白, 定量后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取含蛋白30 μg 的提取液提取上清行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将分离后的蛋白质电转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 加入抗RANK L一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后以二抗孵育1 h, TBST洗膜后用ECL法显示抗原-抗体复合物于暗室X胶片曝光, 扫描条带并用Quail-tity One软件分析条带。

1.4.7 TRAP染色诱导RAW264.7细胞分化破骨细胞 建立RANKL+ 实验样品+标准培养液的体系, 取p5 RAW264.7用胰酶消化, 每孔2 000个细胞种于96孔板中, 在温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 细胞培养箱中培养2 h, 待细胞贴壁后, 每孔分别加入1.4.4中各组回收培养液样品50 μL , 最后分别滴加10 $\mu\text{g/L}$ 的RANKL 50 μL 进行干预诱导2 h, TRAP染色RAW264.7细胞株分化的破骨细胞数量及状态, 每种样品分别做3个副孔。TRAP染色方法严格按照试剂说明操作执行, 实验重复10次。

1.5 主要观察指标 Y4细胞的形态、数量, Y4细胞表达的RANKL量, 破骨细胞的形态及数量。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析, 参数检验的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 显微镜下观察 Y4上清液孵育的Y4细胞, 细胞形状为正常的长梭形。而用U266上清液孵育的小鼠骨细胞形态则由典型的长梭形变短梭形, 或变为三角形、棘形等不规则形状, 细胞膜明显增厚, 细胞核增大, 胞浆颜色变深, 贴壁生长细胞少, 见图1。这一研究结果提示骨髓瘤细胞可能分泌较多的细胞因子能抑制骨细胞的生长发育。

2.2 流体装置培养对骨细胞的影响 与传统的培养模式相比(非流模式)、流动模式可以促进Y4细胞分化, Y4细胞形态发生改变, 梭形细胞数量的增加表明, Y4细胞的数量

稍有增加, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。U266培养液孵育的Y4细胞, 不管是流动状态, 还是非流动状态, 较Y4上清液孵育的细胞均减少, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图2细节图。这一结果表明, 骨髓瘤细胞能抑制骨细胞的增殖和分化。与非流动模型相比, 流动模型能减轻骨髓瘤细胞对骨细胞的抑制作用。

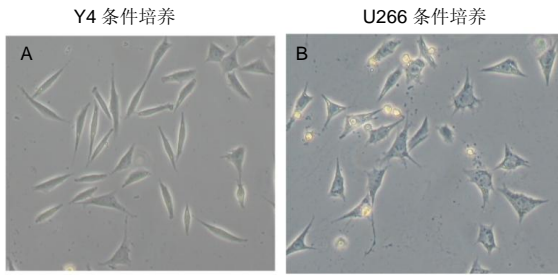
2.3 骨髓瘤细胞对正常小鼠骨细胞RANKL的表达影响 U266上清液孵育Y4细胞, 其分泌的RANKL含量高于正常培养液孵育的Y4分泌的RANKL($P < 0.01$)。不论是实验组还是对照组, 流动模式下Y4细胞分泌的RANKL低于相对应的非流动模式下RANKL, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。该发现表明, 流动模式可以抑制在骨髓瘤微环境下骨细胞分泌RANKL蛋白, 见图3A。

2.4 各组骨细胞的RANKL蛋白表达 运用Western blot方法进一步分析后, U266上清液孵育Y4细胞, 其分泌的RANKL含量高于正常培养液孵育Y4细胞分泌的RANKL。流动模式下Y4细胞分泌的RANKL低于相对应的非流动模式下。表示在相同培养介质下流动模式与非流动模式的比较有统计学意义, 或在同样模式下, Y4培养基与U266培养基培养下Y4细胞表达的RANKL有统计学意义, 见图3B。而不论是实验组还是对照组, 流动模式可抑制在骨髓瘤微环境下骨细胞RANKL蛋白的表达。

2.5 流体装置培养前后破骨细胞的改变 显微镜下观察不同样本培养液对RAW264.7细胞株诱导分化7 d后, TRAP阳性细胞明显增多, 镜下可观察到多核破骨样细胞。不论是流动状态还是非流动状态, 实验组的破骨细胞数量均明显高于对应的对照组; 而不论是实验组还是对照组, 流动组诱导分化的破骨细胞数量少于相对应得非流动组, 见图4。

3 讨论 Discussion

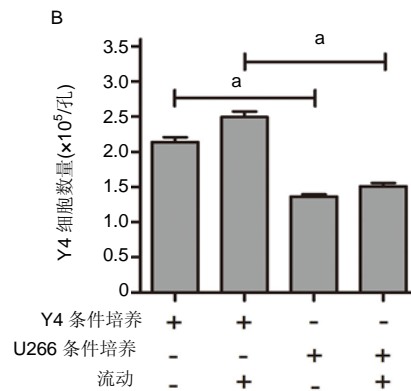
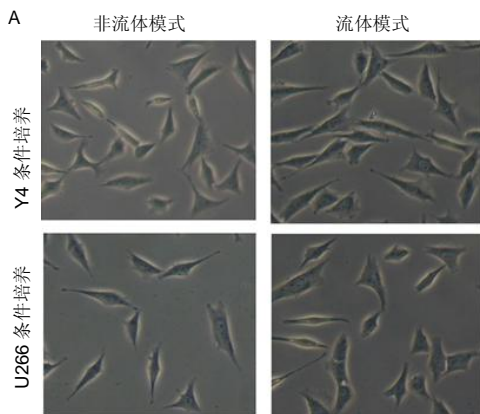
在正常骨代谢中, 成骨细胞和破骨细胞可通过OPG/RANKL/RANK系统、Wnt信号通路、泛素-蛋白酶体途径等相互作用, 维持机体骨吸收与骨形成之间的动态平衡^[7]。但在骨髓瘤骨病患者中, 这种平衡由于受到骨髓瘤细胞与骨髓微环境的作用而导致破坏, 从而形成破骨细胞活性增强、数量增加, 成骨细胞活性受抑、数量减少, 骨吸收增多而导致溶骨性破坏^[8-9]。作者采用体外细胞培养方法, 用骨髓瘤细胞(U266)的培养液培养正常小鼠骨细胞(Y4)来观察骨髓瘤细胞分泌的各种细胞因子对正常骨细胞和破骨细胞的影响。镜下观察到用U266培养液和培养的骨细胞数量减少, 形态发生了改变; 而TRAP阳性的破骨细胞数量则增多。推测骨髓瘤细胞能抑制骨细胞的生长、分化和发育、促进骨细胞凋亡而导致数量下降, 同样骨髓瘤细胞可能促进破骨细胞的分化成熟而数量增多。其原因可能在骨髓瘤骨病患者中, 因为骨髓瘤细胞的存在, 分泌多种炎症因子如肝细胞生长因子、白细胞介素3、分泌性型糖蛋



图注: 图 A 为 Y4 上清液孵育的 Y4 细胞, 为正常的长梭形; B 为 U266 上清液孵育的小鼠骨细胞, 为不规则形状, 细胞膜明显增厚, 细胞核增大。

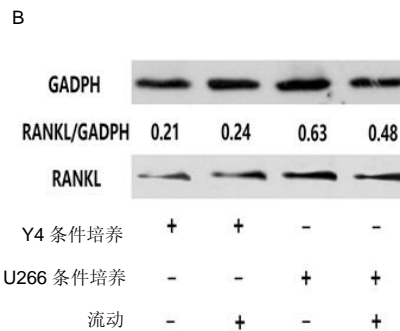
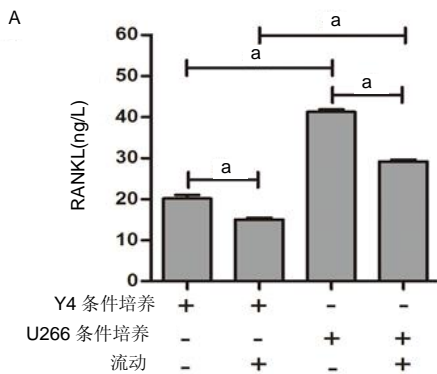
图 1 Y4 细胞在不同培养基条件下形态的变化($\times 100$)

Figure 1 Morphology of Y4 cells culture in different media under microscope ($\times 100$)



图注: 图 A 为细胞的形态学改变 ($\times 100$), 与非流模式比较, 流动模式可以促进 Y4 细胞分化, Y4 细胞形态发生改变; B 为不同条件下的 Y4 细胞的计数。^a $P < 0.05$ 。

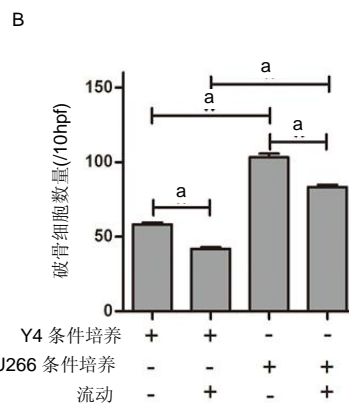
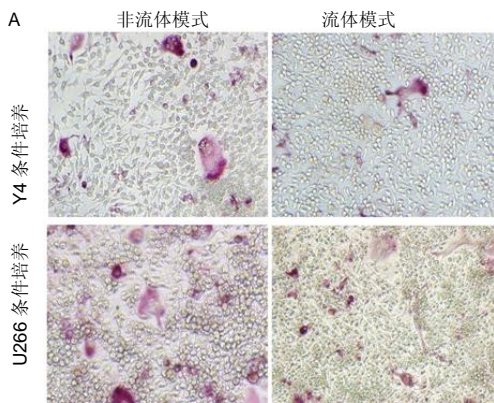
图 2 各组 Y4 细胞的形态及数量
Figure 2 Morphology and counts of Y4 cells in each group



图注: 图 A 为不同培养基下用 ELISA 法定量检测 Y4 细胞培养上清液中的 RANKL 水平 (ng/L), ^a $P < 0.05$; B 为 Western blot 法检测各组 Y4 细胞 RANKL 的表达及与参照物 GADPH 的相对灰度值。

图 3 各组 Y4 细胞 RANKL 的表达

Figure 3 Expression of RANKL in Y4 cells of each group



图注: 图 A 显微镜下观察 TRAP 法染色的破骨细胞和破骨样多核细胞的形态 ($\times 100$); B 为不同条件下破骨细胞的数量, ^a $P < 0.05$ 。

图 4 RAW264.7 细胞在不同条件下分化的破骨细胞的数量变化

Figure 4 Osteoclast number after differentiation of RAW264.7 cells under different conditions

白DKK1等通过多种途径能直接或间接导致骨髓基质细胞分化成骨潜能降低,骨细胞凋亡增加,骨细胞自噬活性升高^[10-11]。也可能是骨髓瘤细胞能分泌多种破骨细胞细胞激活因子如巨噬细胞炎症蛋白1a,当其与受体结合后,使RANKL表达增高,增高的RANKL与骨髓巨噬细胞膜上的RANK受体结合,再通过其膜内部分特定区域激活下游信号通路,这些信号通路激活后使得更多的骨髓基质细胞分化成破骨细胞,引起骨损害^[6, 12]。

临床上观察到许多多发性骨髓瘤患者因为骨骼疼痛、压缩性骨折,拒绝运动,导致生活质量下降,导致骨量丢失而促进骨髓瘤骨病恶性的发生、发展。有报道,适量运动可预防骨丢失,增加骨密度^[13-14]。为探讨适量运动是否有助于骨髓瘤骨病的恢复,该研究采用体外低强度震动流体室装置(flow fluid chamber)模拟骨髓瘤骨病患者轻微运动或机械运动时产生的流体剪切力在骨髓瘤环境下对骨细胞的影响,发现在流动模式培养下,Y4细胞的数量较非流动模式下减少得少,而形态无明显改变;而流动模式下TRAP阳性的破骨细胞数量较非流动模式下明显减少,说明在骨髓瘤分泌的多种炎症因子下,轻微运动或机械运动能轻度抑制骨细胞的凋亡,利于骨细胞数量的维持和骨髓瘤骨病的恢复;却利于破骨细胞的凋亡,减少骨髓瘤骨病的骨质破坏,延缓疾病进展等。因此,推测适度的运动或肌肉机械运动有利于骨髓瘤骨病患者的骨代谢、有利于骨骼矿物质的沉积和骨细胞的发育。国外有研究发现,低强度震动能够抑制多发性骨髓瘤小鼠模型的肿瘤进展,延缓疾病进展,并且参与骨量的保持^[15]。其机制可能是肌肉的牵张力要比单纯的重量负荷更有利于骨量的维持^[16-17],运动产生的机械刺激通过血管压力和机械应力驱动液体产生的剪切力,而剪切力是骨细胞机械化学信号转导的主要介质,骨细胞是机械感觉细胞^[18-19],当机体处于肌肉与骨骼之间通过紧密联系的“力量-效应关系”时,骨细胞可将机械负荷转化为生化信号如鞘氨醇-1-磷酸调节、一氧化氮等^[20-22]。鞘氨醇-1-磷酸则可显著增加骨保护素的水平而降低RANKL水平,从而增加骨形成,抑制骨吸收,维持骨细胞的正常发育和数量,骨细胞的稳态有利于成骨^[23-24]。

为验证流动模式下骨细胞数量能得到较好维持的机制是否通过降低骨细胞分泌的RANKL水平有关,该研究进一步检测了骨细胞培养上清液中RANKL含量及骨细胞分泌的RANKL水平,结果发现用U266培养液培养的骨细胞表达RANKL明显高于标准培养液,说明瘤细胞分泌的细胞因子能刺激骨细胞分泌更多的RANKL;同样,将U266培养液培养的Y4细胞置于流体室装置中,发现流动模式中的RANKL含量明显低于非流动模式,用Western blot法进一步验证了该结果。这些结果说明流动模式可抑制小鼠骨细胞表达RANKL,RANKL也称破骨细胞样激活因子,RANKL

能激活破骨祖细胞的发育,使破骨细胞数量增多和活性增强,导致溶骨性破坏,骨髓瘤骨病的发生和发展^[25-26]。因此,该实验进一步验证适度的运动或肌肉机械运动利于骨髓瘤骨病患者的康复的可能机制之一是该方式能抑制骨细胞或瘤细胞分泌RANKL,减少的RANKL与与骨髓巨噬细胞膜上的RANKL受体结合能力下降,从而抑制骨髓基质细胞分化更多的破骨细胞^[27-28];同样,提高骨保护素(OPG)/RANKL比例,抑制骨吸收^[29],促进骨病的恢复。

该研究通过应用流体室模型模拟肌肉机械运动时产生的流体剪切力,发现流体剪切力在骨髓瘤骨病环境下能抑制小鼠破骨细胞的分化,抑制小鼠骨细胞表达RANKL,促进小鼠骨细胞的发育,利于小鼠骨细胞数量的维持,为验证多发性骨髓瘤患者轻微运动或肌肉机械运动有利于骨髓瘤骨病的恢复奠定理论基础,但因该实验毕竟是体外实验,研究对象是小鼠骨样细胞,其生物学特性与人类骨细胞仍具有一定的差异,因而其具体机制及临床应用价值还有待深入研究。

作者贡献: 王晓桃负责课题设计、监管及论文撰写,田中负责论文实验操作,You Lidan 监督实验实施。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(81460038);广西自然科学基金面上项目(2017GXNSFAA198178),桂林市科学研究与技术开发项目(20170109-49)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道,不存在利益冲突。

伦理问题: 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Hameed A,Brady JJ,Dowling P,et al.Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management. *Cancer Growth Metastasis*. 2014;7:33-42.
- [2] Palma BD,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. *Leukemia*. 2016;30(2): 409-416.

- [3] 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. *Eur J Haematol.* 2016; 97(2):201-207.
- [4] 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. *Exp Hematol.* 2013;41(4): 387-397.e1
- [5] Graves DT, Alshabab A, Albiero ML, et al. Osteocytes play an important role in experimental periodontitis in healthy and diabetic mice through expression of RANKL. *J Clin Periodontol.* 2018;45(3):285-292.
- [6] Delgado-Calle J, Anderson J, Cregor MD, et al. Bidirectional Notch Signaling and Osteocyte-Derived Factors in the Bone Marrow Microenvironment Promote Tumor Cell Proliferation and Bone Destruction in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* 2016; 76(5):1089-1100.
- [7] Vallet S, Pozzi S, Patel K, et al. A novel role for CCL3 (MIP-1a) in myeloma-induced bone disease via osteocalcin downregulation and inhibition of osteoblast function. *Leukemia.* 2011;25(7):1174-1181.
- [8] Wang XT, He YC, Zhou SY, et al. Bone marrow plasma macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and sclerostin in multiple myeloma: Relationship with bone disease and clinical characteristics. 2014;38(5):525-531.
- [9] Walker RE, Lawson MA, Buckle CH, et al. Myeloma bone disease: pathogenesis, current treatments and future targets. *Br Med Bull.* 2014;111(1):117-138.
- [10] Colucci S, Brunetti G, Oranger A, et al. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood Cancer J.* 2011;22(1):1-7.
- [11] Higgs JT, Lee JH, Wang H, et al. Mesenchymal stem cells expressing osteoprotegerin variants inhibit osteolysis in a murine model of multiple myeloma. *Blood Adv.* 2017;1(25): 2375-2385.
- [12] Palma BD, 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. *Leukemia.* 2016;30(2):409-416.
- [13] Groeneveldt L, Mein G, Garrod R, et al. A mixed exercise training programme is feasible and safe and may improve quality of life and muscle strength in multiple myeloma survivors. *BMC Cancer.* 2013;13(31):1-10.
- [14] Miceli TS, Colson K, Faiman BM, et al. Maintaining bone health in patients with multiple myeloma: survivorship care plan of the International Myeloma Foundation Nurse Leadership Board. *Clin J Oncol Nurs.* 2011;15 Suppl:9-23.
- [15] Pagnotti GM, Chan ME, Adler BJ, et al. Low intensity vibration mitigates tumor progression and protects bone quantity and quality in a murine model of myeloma. *Bone.* 2016;90:69-79.
- [16] Li X, Niu QT, 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. *Endocrinology.* 2014;155(12):4785-4797.
- [17] McGrath RP, Kraemer WJ, Vincent BM, et al. Muscle-Strength Is Protective Against Osteoporosis in an Ethnically Diverse Sample of adults. *J Strength Cond Res.* 2017;31(9): 2586-2589.
- [18] Middleton K, Al-Dujaili S, Mei X, et al. Microfluidic co-culture platform for investigating osteocyte-osteoclast signalling during fluid shear stress mechanostimulation. *J Biomech.* 2017;59:35-42.
- [19] Shah KM, Orton P, Mani N, et al. Osteocyte physiology and response to fluid shear stress are impaired following exposure to cobalt and chromium: Implications for bone health following joint replacement. *J Orthop Res.* 2017;35(8):1716-1723.
- [20] Sartawi Z, Schipani E, Ryan KB, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) signalling: Role in bone biology and potential therapeutic target for bone repair. *Pharmacol Res.* 2017;125(Pt B):232-245.
- [21] Meshcheryakova A, Mechtcheriakova D, Pietschmann P. Sphingosine 1-phosphate signaling in bone remodeling: multifaceted roles and therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(7):725-737.
- [22] Zhang J, Ding C, Meng X, et al. Nitric oxide modulates the responses of osteoclast formation to static magnetic fields. *Electromagn Biol Med.* 2017;13:1-12.
- [23] Xiao L, Zhu L, Yang S, et al. Different correlation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and regulatory T cells in rat periapical lesions. *J Endod.* 2015;41(4):479-486.
- [24] Kim BJ, Shin KO, Kim H, et al. The effect of sphingosine-1-phosphate on bone metabolism in humans depends on its plasma/bone marrow gradient. *J Endocrinol Invest.* 2016;39(3):297-303.
- [25] Yuan M, Chen J, Zeng Z. Knockdown of macrophage inhibitory cytokine-1 in RPMI-8226 human multiple myeloma cells inhibits osteoclastic differentiation through inhibiting the RANKL-Erk1/2 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2016;14(6): 5199-5204.
- [26] Pitari MR, Rossi M, Amodio N, et al. Inhibition of miR-21 restores RANKL/OPG ratio in multiple myeloma-derived bone marrow stromal cells and impairs the resorbing activity of mature osteoclasts. *Oncotarget.* 2015;6(29):27343-27358.
- [27] Kristensen IB, Christensen JH, Lyng MB, et al. Expression of osteoblast and osteoclast regulatory genes in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma: only up-regulation of Wnt inhibitors SFRP3 and DKK1 is associated with lytic bone disease. *Leuk Lymphoma.* 2014; 55(4):911-919.
- [28] 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. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;369(1-2):27-34.
- [29] 陈少龙, 赵良功, 滕元君, 等. 周期性和持续性流体剪切力对成骨细胞 OPG、RANKL 蛋白表达的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2015, 32(1):120-123, 133.