

# 乙酰肝素酶通过转录因子 Runx2 调控 多发性骨髓瘤细胞功能

潘倩影 水 炜 牛媛媛 张常然

**摘要** 目的 探讨在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)细胞中乙酰肝素酶(heparanase, HPSE)与 Runt 相关的转录因子 2 (runt related transcription factor 2, Runx2)之间的关系。方法 采用 Western blot 法比较不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 的表达含量,采用染色质免疫共沉淀的方法比较不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 结合 RANKL、MMP9 启动子区域的 DNA 含量。结果 在骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 的表达含量同步于 HPSE 表达水平,HPSE 高表达的骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 结合 RANKL、MMP9 启动子区域的 DNA 含量增加。结论 HPSE 通过转录因子 Runx2 调控骨髓瘤细胞功能,HPSE 及 Runx2 可能是潜在的治疗 MM 的分子靶点。

**关键词** 乙酰肝素酶 Runx2 多发性骨髓瘤

**中图分类号** R733.3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.09.024

**Heparanase Regulates Multiple Myeloma Cell Function through the Transcription Factor Runx2.** Pan Qianying, Shui Wei, Niu Yuanyuan, et al. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong 510080, China

**Abstract Objective** To investigate the relationship between heparanase (HPSE) and Runt related transcription factor 2 (Runx2) in multiple myeloma (MM) cells. **Methods** Western blot was used to compare the expression of transcription factor Runx2 in myeloma cells with different HPSE expression levels, and chromatin immunoprecipitation was used to compare the DNA content of transcription factor Runx2 combined with RANKL and MMP9 promoter regions in myeloma cells with different HPSE expression levels. **Results** In our study, we found that the expression level of transcription factor Runx2 in myeloma cells was synchronized with the expression level of HPSE. In myeloma cells with high expression of HPSE, and the DNA content of transcription factor Runx2 binding to RANKL and MMP9 promoter regions was increased. **Conclusion** HPSE regulates myeloma cell function through the transcription factor Runx2. HPSE and Runx2 may be potential molecular targets for the treatment of MM.

**Key words** Heparanase; Runx2; Multiple myeloma

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种血液系统恶性肿瘤,以克隆性的浆细胞在骨髓中异常增生为特征<sup>[1]</sup>。乙酰肝素酶(heparanase, HPSE)是一种存在于哺乳动物体内的内源性 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶,其可以切割细胞表面的乙酰肝素链,使连接在乙酰肝素链上的具有生物学活性的细胞因子,如 FGF-2、HGF、TGF- $\beta$ 、PDGF、KGF 等释放到骨髓微环境中,通过与骨髓微环境中的各种细胞表面受体结合,调节各种细胞功能<sup>[2]</sup>。HPSE 被发现在 MM 患者中表达升高,且与 MM 患者的不良预后密切相关;在细

胞和动物模型中,HPSE 表达上调可以促进骨髓瘤细胞生长、转移以及肿瘤新生血管生成,但其中涉及的具体机制尚未完全阐明<sup>[3]</sup>。Runt 相关的转录因子 2 (runt related transcription factor 2, Runx2)是 Runt 相关的基因家族成员,其作为骨和软骨形成相关的转录因子,被认为是骨形成的主要调控者之一<sup>[4]</sup>。近年来,Runx2 被发现在包括 MM 在内的多种肿瘤中表达增高,且肿瘤中异常的 Runx2 表达与肿瘤骨转移、疾病进展以及不良预后密切相关<sup>[5]</sup>。在肿瘤细胞中,Runx2 作为重要的转录因子可以被多种因素调节,也可以通过调控下游多种信号因子的表达影响细胞功能。关于 HPSE 与 Runx2 的关系,目前研究较少。本研究试图通过检测在不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中 Runx2 的含量以及 Runx2 对下游基因 RANKL、MMP9 调控等方式,以探讨在骨髓瘤细胞中 HPSE 与 Runx2 之间的关系。

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(18zxxt23)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院血液内科(潘倩影),东院全科医学科(水炜、牛媛媛、张常然)

通讯作者:张常然,主任医师,硕士生导师,电子信箱:zhcr2303@sina.com

## 材料与与方法

1. 试剂与材料: Runx2 抗体(英国 Abcam 公司), Lamin A/C 抗体、 $\beta$ -actin 抗体(美国 Cell Signaling 公司), 重组人 HPSE(recombinant human heparanase, rhHPSE) 药物(美国 R&D 公司), HPSE 抑制剂 PD98059 药物(美国 Sigma-Aldrich 公司); 人 CAG 骨髓瘤细胞系来自美国阿拉巴马大学伯明翰分校病理系 Dr. Yang Yang 实验室; CAG 细胞通过转染包含 HPSE cDNA 的质粒载体构建 HPSE 过表达细胞即 HPSE-high 细胞, 通过转染空质粒载体构建对照细胞即 HPSE-low 细胞; CAG 细胞通过转染包含 HPSE shRNA 的慢病毒载体构建 HPSE 沉默表达细胞即 HPSE k/d 细胞, 通过转染包含 non-target shRNA 的慢病毒载体构建对照细胞即 shRNA control 细胞。

2. 目标基因质粒构建及转染: 将人 HPSE cDNA 亚克隆入 pIRES2-EGFP 真核表达载体(Clontech, 日本 TaKaRa 公司)中, 构建出重组质粒。将重组质粒以及空载体与 Lipofectin 和 Opti-MEM I 转染试剂(Invitrogen, 美国 Thermo Fisher 公司)混合后转染人 CAG 骨髓瘤细胞, 细胞转染后予 G418 进行抗药性筛选及进行流式细胞仪 GFP 阳性细胞分选, 得到稳定转染的 HPSE 过表达细胞以及对照细胞。

3. 目标基因沉默表达: 分别将包含 HPSE shRNA 以及 non-target shRNA 的慢病毒颗粒(美国 Sigma-Aldrich 公司)与人 CAG 骨髓瘤细胞共培养, 48h 后加入嘌呤霉素溶液进行耐药细胞筛选, 药物浓度依据嘌呤霉素杀伤曲线所得, 继续培养一段时间, 待细胞获得重建并生长至较佳状态时, 收取细胞, 提取蛋白进行 Western blot 法检测, 评估预定基因沉默表达情况, 以筛选出效果最佳的 HPSE k/d 细胞以及对照细胞。HPSE shRNA 序列: 5'-CCGGCCATAATGTCACCAAG-TACTTCTCGAGAAGTACTTGGTGACATTATGGTTTTT-TG-3', non-target shRNA 序列: 5'-CCGGCAA-CAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTC-ATCTTG-TTGTTTTT-3'。

4. 细胞培养: 人 CAG 骨髓瘤细胞用 RPMI1640 培养基、10% 胎牛血清(美国 Thermo Fisher 公司)培养, 培养液中加入 100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素、1% L-谷氨酰胺, 培养环境为 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>, 培养液每 2 天更换 1 次, 实验所用的细胞进入对数生长期后按照 1:3~1:4 的比例传代。

5. Western blot 法: 采用 80 $\mu$ l RIPA 细胞裂解液裂解细胞, 漩涡振荡后再加入 20 $\mu$ l 5 $\times$ 蛋白上样缓冲

液, 金属浴 100℃ 加热 40min。取等量总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 使用 PVDF 膜 70V 恒压湿法转膜 1h 后, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1h, 先后与一抗和二抗孵育, 最后 ECL 显色。Western blot 法条带采用 Image J 软件进行定量分析。

6. 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP): 经预处理的细胞用终浓度为 1% 的甲醛溶液固定 10min, 使转录因子与 DNA 交联, 用细胞裂解液破膜后, 通过超声将 DNA 打碎成 250~1000bp 片段。用 Runx2 特异性抗体沉淀 DNA-蛋白复合物, 用蛋白 A+G 琼脂糖吸附复合物, 经洗去非特异性吸附后, 解交联, 沉淀的 DNA 片段于 -20℃ 保存备用。

7. qPCR 扩增 ChIP 后 DNA 产物: 针对 RANKL 启动子、MMP9 启动子区域的 DNA 序列设计引物, RANKL 启动子引物: (F) 5'-CAGAAGATGGCACTCACTGCA-3', (R) 5'-CACCATCGCTTTCTCTGCTCT-3'; MMP9 启动子引物: (F) 5'-TGACAGCGACAAGAAGTG-3', (R) 5'-CAGTGAAGCGGTACATAGG-3'。扩增条件: 94℃ 5min 预变性, 94℃ 变性 30s, 退火温度 30s, 72℃ 1min, 35 个循环后, 每个循环结束后进行荧光信号收集。每个反应设 3 个复孔, 以 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup>  计算 DNA 相对表达水平。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。各组实验所得数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两组间比较使用 *t* 检验进行统计学分析, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 的表达含量: 为了研究在骨髓瘤细胞中 HPSE 与转录因子 Runx2 的相关性, 笔者检测不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中 Runx2 的表达含量。首先, 通过转染质粒的方法构建 HPSE 过表达骨髓瘤细胞 HPSE-high 和对照细胞 HPSE-low, 通过 Western blot 法检测发现与对照细胞比较, HPSE-high 骨髓瘤细胞中 Runx2 表达升高; 通过转染包含 shRNA 慢病毒颗粒的方法构建 HPSE 沉默表达骨髓瘤细胞 HPSE k/d 和对照细胞 shRNA control, 通过 Western blot 法检测发现与对照细胞比较, HPSE k/d 骨髓瘤细胞中 Runx2 表达减少; 其次, 在培养 HPSE 低表达的骨髓瘤细胞 HPSE-low 时加入不同浓度外源性的 rhHPSE, 培养 48h 后, 通过 Western blot 法检测发现随着药物浓度的增加, HPSE-low 骨髓瘤细胞中 Runx2 的表达逐渐升高; 再次, 在培养 HPSE 过表达

的骨髓瘤细胞 HPSE - high 时加入 HPSE 抑制剂 PD98059, 培养 48h 后, 通过 Western blot 法检测发现

与对照组比较, 加入 HPSE 抑制剂可抑制 HPSE - high 骨髓瘤细胞中 Runx2 的表达(图 1)。

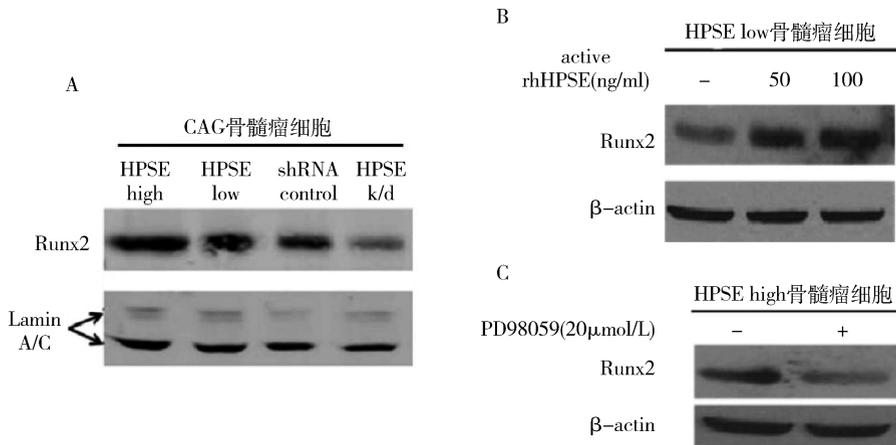


图 1 不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 的表达含量

A. 不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中 Runx2 的表达; B. 在 HPSE - low 骨髓瘤细胞培养过程中加入不同浓度的 rhHPSE, Western blot 法检测 Runx2 的表达; C. 在 HPSE - high 骨髓瘤细胞培养过程中加入 HPSE 抑制剂 PD98059, Western blot 法检测 Runx2 的表达

2. 不同 HPSE 表达水平的骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 结合 RANKL、MMP9 启动子区域的 DNA 含量; 为了研究在 HPSE 高表达骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 对下游基因的调控作用是否增强, 采用染色质免疫共沉淀的方法, 在 HPSE 高表达骨髓瘤细胞 HPSE - high 与对照细胞 HPSE - low 中, 使用 Runx2 特异性抗体沉淀 DNA - 蛋白复合物, 采用 qPCR 的方法分别检测转录因子 Runx2 所结合的与骨髓瘤细胞侵袭功能相关的重要分子 RANKL、MMP9 启动子区域 DNA 表达含量, 发现与对照细胞比较, HPSE - high 骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 结合的 RANKL、MMP9 启动子区域 DNA 含量显著升高(图 2)。

性肿瘤, 约占血液系统肿瘤的 10%。MM 以恶性的浆细胞增生、血清和尿中存在单克隆免疫球蛋白为特征, 其可以导致贫血、肾功能不全、广泛的骨损害、高钙血症以及严重的感染等一系列不良事件<sup>[1]</sup>。尽管在过去的 20 年间针对 MM 的治疗已取得很大进展, 但 MM 仍旧不可治愈<sup>[6]</sup>。因此, 有待识别更多的分子靶点以用于新药的研发。

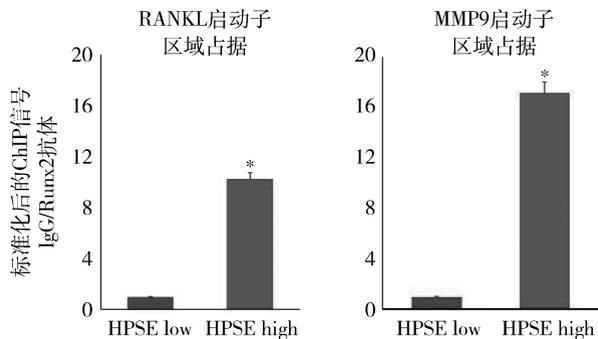


图 2 不同 HPSE 表达水平骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 结合 RANKL 和 MMP9 启动子区域的 DNA 含量

与 HPSE low 组比较, \*  $P < 0.05$

### 讨 论

多发性骨髓瘤(MM)是一种来源于浆细胞的恶

乙酰肝素酶(HPSE)是一种内源性  $\beta - D -$  葡萄糖醛酸酶, 其在 MM 患者中高表达, 且与不良预后密切相关<sup>[3,7]</sup>。HPSE 的上调促进骨髓瘤细胞生长、骨转移和新生血管生成, 但其中所涉及相关机制尚待进一步研究<sup>[8,9]</sup>。笔者研究显示骨髓瘤源性的 HPSE 可作用于骨髓微环境, 诱导骨髓瘤细胞展现间质样特征, 增加其播散至远处的能力, 促进骨髓瘤骨转移的发生<sup>[10]</sup>。Runx2 是 Runt 相关的基因家族成员, 其作为骨和软骨形成相关的转录因子, 被认为是骨形成的主要调控者之一<sup>[4]</sup>。近年来 Runx2 被发现在包括 MM 在内的多种肿瘤中表达增高, 且肿瘤中异常的 Runx2 表达与肿瘤骨转移、疾病进展以及不良预后密切相关<sup>[11]</sup>。Trotter 等<sup>[12]</sup>研究发现, 骨髓瘤细胞中 Runx2 表达增高可以促进骨转移的发生, 其可以作为骨髓瘤骨病的一个主要调控因子。关于 HPSE 与 Runx2 的关系, 目前尚无文献报道 HPSE 可以直接促进 Runx2 的活化, 但 HPSE 切割后的硫酸乙酰肝素蛋白多糖链可以协同 FGF2 信号调控 Runx2 的表达和活化<sup>[13]</sup>。笔者研究发现在骨髓瘤细胞中转录因子

Runx2 的表达含量同步于 HPSE 表达水平,提示 HPSE 可能通过直接或间接的方式促进转录因子 Runx2 的表达和活化。

研究显示,在骨髓瘤细胞中 HPSE 促进肿瘤细胞发生骨转移和新生血管生成通过调控相关蛋白的表达实现。其中,RANKL 属于肿瘤坏死因子超家族的成员,主要由骨髓基质细胞、成骨细胞和活化的 T 淋巴细胞产生。在正常情况下,巨噬细胞集落刺激因子可以刺激前体破骨细胞数目增加,RANKL 通过与前体破骨细胞上 RANK 受体相结合,刺激其分化为成熟破骨细胞并且减少破骨细胞凋亡,进而增加破骨活性<sup>[14]</sup>。在 MM 中,骨髓瘤细胞在与骨髓微环境作用下可刺激骨髓基质细胞和成骨细胞产生更多的 RANKL,增加骨质破坏。Yang 等<sup>[15]</sup>研究发现,骨髓瘤细胞中 HPSE 的表达可以刺激 RANKL 表达和分泌,引起局灶性和系统性的溶骨性骨破坏。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类锌依赖的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑内肽酶,具有降解 ECM 成分的功能。ECM 的降解与肿瘤细胞转移和血管生成密切相关,因此, MMPs 被认为是肿瘤生长和血管生成强有力的启动子。在 MM 中, MMP9 的表达增高,且与疾病复发和短的生存期密切相关。Purushothaman 等<sup>[16]</sup>研究显示,骨髓瘤细胞中 HPSE 的表达升高促进 MMP9 的表达和分泌增多,从而增加肿瘤细胞的侵袭性表型。Runx2 作为转录因子可以激活包括 RANKL、MMP9 等多种下游的靶基因,导致肿瘤细胞的多种行为发生改变<sup>[17,18]</sup>。笔者研究发现 HPSE 高表达的骨髓瘤细胞中转录因子 Runx2 结合 RANKL、MMP9 启动子区域的 DNA 含量增高,提示 HPSE 高表达的骨髓瘤细胞可以通过转录因子 Runx2 调控使 RANKL、MMP9 的表达增加,进而增强骨髓瘤细胞的骨转移和侵袭性特征。因此,笔者提出 HPSE 可通过转录因子 Runx2 调控骨髓瘤细胞的功能。

综上所述,本研究验证了在骨髓瘤细胞中 HPSE 表达增高可以促进转录因子 Runx2 的表达,同时可以通过增加 Runx2 与调控 RANKL、MMP9 启动子区域 DNA 相结合的方式达到调控骨髓瘤细胞功能的目的。该研究探讨了 HPSE 可以促进 MM 疾病进展中的相关机制,HPSE 及 Runx2 有望成为治疗 MM 的分子靶点。今后将在临床样本中验证 HPSE 与 Runx2 的相关性,以及探寻在骨髓瘤细胞中 HPSE 促进 Runx2 表达和活化的相关机制。

## 参考文献

- Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, *et al.* Multiple myeloma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17046
- Vlodavsky I, Singh P, Boyango I, *et al.* Heparanase: from basic research to therapeutic applications in cancer and inflammation[J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 29: 54-75
- Purushothaman A, Sanderson RD. Heparanase: a dynamic promoter of myeloma progression[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1221: 331-349
- Ito Y, Bae SC, Chuang LS. The RUNX family: developmental regulators in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(2): 81-95
- Pratap J, Lian JB, Javed A, *et al.* Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(4): 589-600
- 中国医师协会血液科医师分会, 中华医学会血液学会分, 中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)[J]. *中华内科杂志*, 2020, 59(5): 341-346
- 袁梅, 郑冬, 李娟, 等. 多发性骨髓瘤乙酰肝素酶表达及其临床意义的探讨[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(11): 867-870
- Mahtouk K, Hose D, Raynaud P, *et al.* Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4914-4923
- 关瑞宇, 苏继荣. 乙酰肝素酶在肿瘤侵袭转移中的表达及其相关调控[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2016, 2: 270-274
- Li J, Pan Q, Rowan PD, *et al.* Heparanase promotes myeloma progression by inducing mesenchymal features and motility of myeloma cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11299-11309
- 耿文文, 张斌, 曹旭晨. Runx2 与肿瘤转移[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, 39(12): 892-894
- Trotter TN, Li M, Pan Q, *et al.* Myeloma cell-derived Runx2 promotes myeloma progression in bone[J]. *Blood*, 2015, 125(23): 3598-3608
- Tepluk NM, Haupt LM, Ling L, *et al.* The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(1): 144-154
- Okamoto K. Role of RANKL in cancer development and metastasis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 71-81
- Yang Y, Ren Y, Ramani VC, *et al.* Heparanase enhances local and systemic osteolysis in multiple myeloma by upregulating the expression and secretion of RANKL[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8329-8338
- Purushothaman A, Chen L, Yang Y, *et al.* Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32628-32636
- Sun SS, Zhang L, Yang J, *et al.* Role of runt-related transcription factor 2 in signal network of tumors as an inter-mediator[J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(1): 1-7
- 曹自, 孙保存, 赵秀兰, 等. Runx2 通过促进 MMP9 的表达增强肝细胞肝癌迁移侵袭能力[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(9): 424-428

(收稿日期: 2020-03-29)

(修回日期: 2020-04-24)