

IL-1 β 和TNF- α 通过骨髓MSCs降低多西环素对骨髓瘤细胞株H929的细胞毒性作用

陆萍¹, 费小明^{1,2*}, 汤郁³, 叶炜¹, 颜玲玲¹, 朱彦¹

¹江苏大学附属医院血液科, ²输血科, ³风湿科, 江苏 镇江 212001

[摘要] 目的:骨髓来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在骨髓微环境中参与骨髓瘤细胞的耐药性。本研究旨在通过体外实验,研究经细胞因子预处理的骨髓MSCs在与骨髓瘤细胞株H929共培养条件下,是否影响多西环素(doxycycline, DOX)对骨髓瘤细胞株的细胞毒性作用,并初步探讨其可能的作用机制。方法:经白细胞介素(interleudin, IL)-1 β 或肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 预处理的人骨髓MSCs,与H929细胞共培养,并以DOX处理细胞,分别采用CCK8法和流式细胞术(FCM),检测DOX对H929细胞增殖和凋亡的影响;采用FCM和实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测IL-1 β 或TNF- α 处理后,骨髓MSCs中血管细胞黏附分子(VCAM-1)表达;Western blot法检测在DOX存在时,不同处理的骨髓MSCs作为共培养饲养层细胞的条件下,H929细胞p-Erk1/2的变化。结果:DOX可抑制骨髓瘤细胞株H929的增殖并诱导其凋亡。骨髓MSCs与H929共培养可以减少DOX对H929的细胞毒性作用,而经IL-1 β 或TNF- α 预处理的人骨髓MSCs再与H929共培养,则可以进一步降低DOX的细胞毒性作用。骨髓MSCs经IL-1 β 或TNF- α 处理后,其VCAM-1 mRNA转录水平和蛋白表达水平均升高。经预处理的骨髓MSCs与H929共培养后,可以降低DOX对骨髓瘤细胞株p-Erk1/2的下调作用。结论:DOX在体外对骨髓瘤细胞株表现出剂量和时间依赖性的细胞毒性作用;而IL-1 β 和TNF- α 可通过骨髓MSCs来间接拮抗DOX对H929的细胞毒性作用;IL-1 β 和TNF- α 的这一作用机制可能与上调骨髓MSCs的VCAM-1表达与上调p-Erk1/2有关。

[关键词] 多发性骨髓瘤;多西环素;骨髓间充质干细胞;IL-1 β ;TNF- α ;p-Erk1/2

[中图分类号] R733.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)04-470-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180409

IL-1 β and TNF- α reduce cytotoxic effects of doxycycline to myeloma cell line H929 via bone marrow derived mesenchymal stem cells

Lu Ping¹, Fei Xiaoming^{1,2*}, Tang Yu³, Ye Wei¹, Yan Lingling¹, Zhu Yan¹

¹Department of Hematology, ²Department of Blood Transfusion, ³Department of Rheumatism, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

[Abstract] **Objective:** Bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) in bone marrow microenvironment was found to be involved in the chemoresistance of myeloma cells. In this study, we investigate the role of IL-1 β or TNF- α -treated bone marrow MSCs in chemosensitivity of myeloma cell line H929 to doxycycline (DOX) *in vitro*, and find some possible mechanisms. **Methods:** CCK8 assay was employed to measure the proliferative rate of H929 cells in the presence of DOX at different concentration, either alone or co-culture with bone marrow MSCs pretreated with IL-1 β or TNF- α or not. The apoptotic ratio of H929 cells treated with DOX in the presence of IL-1 β or TNF- α -treated bone marrow MSCs or not was determine by flow cytometry (FCM). FCM was also used with real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) to measure vascular cell adhesion molecule type one (VCAM-1) on MSCs. The p-Erk1/2 expression level in H929 was measured by Western blot. **Results:** DOX inhibited the proliferation and induced apoptosis of H929 in a time and dose-dependent manner. IL-1 β or TNF- α -pretreated bone marrow MSCs reduced the cytotoxic effects of DOX in H929 cells. Expression level of p-Erk1/2 was down-regulated in H929 cells in the presence of DOX treatment, and this down-regulating effect of DOX was most pronounced when H929 cells were co-cultured with IL-1 β or TNF- α -pretreated bone marrow MSCs. In addition, we found that VCAM-1 expression of bone marrow MSCs was up-regulated by IL-1 β or TNF- α treatment. **Conclusion:**

[基金项目] 国家自然科学基金(81202358, 81571582);江苏省卫生计生科研项目(Z201512)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: feixiaomingujs@aliyun.com

DOX was shown to have cytotoxicity to myeloma cells line H929 in a time and dose-dependent manner *in vitro*. IL-1 β or TNF- α could abrogate the cytotoxic effects of DOX in H929 cells indirectly *via* bone marrow MSCs. Erk pathway in H929 cells and VCAM-1 expression on MSCs may be involved in this myeloma-protective effects by IL-1 β or TNF- α .

[Key words] multiple myeloma; doxycycline; mesenchymal stem cells; IL-1 β ; TNF- α ; p-Erk1/2

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(04):470-475]

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种浆细胞恶性肿瘤,随着蛋白酶体抑制剂、抗CD38抗体等新治疗药物的临床应用,其治疗效果虽有明显提高,但目前仍是一种不可治愈的疾病^[1]。MM一旦复发,其治疗将会十分困难。MM细胞的耐药有多种机制,除了MM细胞的克隆演化和筛选,还与异常的骨髓微环境有关^[1-2]。因此,如何逆转骨髓微环境的异常是当前MM研究的一项重要内容。

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是存在于骨髓中的一种干细胞,其对血液生成、成骨分化等均有重要作用^[3]。近来有研究发现,MM患者的骨髓MSCs有多种异常,其中一些异常被认为与MM细胞生存及耐药等相关^[4-6]。此外,还存在多种可溶性细胞因子如白细胞介素(IL)-1 β 或肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平的失衡,这些异常水平的细胞因子也参与MM细胞的耐药^[2,7]。我们既往的实验结果显示,正常人骨髓MSCs经IL-1 β 或TNF- α 处理后,不但其自身的成骨潜能发生改变,而且其与骨髓瘤细胞株相互作用后,对骨髓瘤细胞株的集落形成能力等也有影响^[8-9]。既往也有报道表明,与骨髓MSCs相互作用后,MM细胞对抗骨髓瘤药物的敏感性下降^[10]。目前,关于细胞因子预处理的MSCs与MM细胞相互作用对MM细胞耐药性的影响及其机制尚不清楚,故本实验就此进行相应的体外研究。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640培养液、低糖DMEM培养液、胎牛血清(FBS)均为(Gibco公司,美国);多西环素(doxycycline, DOX, 美国);IL-1 β 和TNF- α (Peprotech公司,美国);细胞增殖计数试剂盒(CCK8)(同仁公司,日本);青霉素-链霉素溶液(杭州碧云天公司);p-Erk1/2及GAPDH抗体(Cell Signaling Technology公司,美国)产品;FITC-鼠抗人VCAM-1(CD106)抗体和Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(BD公司,美国);逆转录试剂盒(Vazyme公司,美国);PCR引物

由美国Gene Copoeia公司设计及合成,GAPDH和血管细胞黏附分子(VCAM-1)的引物货号分别为HQP006940和HQP018466;SYBR Green试剂盒(TaKaRa公司,日本)。酶标仪(Heraeus公司,德国);垂直电泳仪和转膜装置(Cosmobio公司,日本);Mx3000p PCR扩增仪(Agilent公司,美国);流式细胞仪(Coulter公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人骨髓瘤细胞株H929来自美国菌种保藏中心(ATCC),培养于含10%FBS的RPMI1640培养液中,传代后取对数生长期细胞作为实验对象。骨髓MSCs来源于正常志愿者骨髓,采集前均经其书面同意。骨髓MSCs的分离、培养和传代的具体方法详见既往报道^[8-9]。收集P3~5代细胞用于实验,贴壁并融合至80%以上开始后续处理。用于处理骨髓MSCs的IL-1 β 和TNF- α 的终浓度分别为10 ng/mL和20 ng/mL;对于需要多天处理的实验,每天更换含相应终浓度IL-1 β 或TNF- α 的低糖DMEM培养液。6孔板中单独培养的骨髓MSCs细胞数为 5×10^4 个/孔;对于骨髓MSCs与H929细胞株共培养体系,在96孔板中加入骨髓MSCs细胞数为6 000个/孔,细胞因子预处理后加入H929数量为 2×10^4 个/孔,之后用DOX处理。共培养体系培养液为含10%FBS的低糖DMEM。

1.2.2 多西环素的配制

DOX加适量PBS反复振荡溶解后配制成浓度为5 mg/mL的储存液,用0.22 μ m的微孔滤膜过滤,分装后于-20 $^{\circ}$ C保存。实验时用无血清培养液稀释至所需终浓度。

1.2.3 CCK8法检测骨髓瘤细胞株增殖率

取96孔板,选对数生长期H929细胞,调整细胞总数至 2×10^4 个/孔,加入的DOX终浓度分别为2.5、5、10、20 μ g/mL,每组3个复孔。对于需骨髓MSCs共培养的标本,则加入MSCs数量为6 000个/孔。CCK8细胞增殖检测按说明书操作。细胞增殖抑制

率按以下公式计算:细胞增殖抑制率(%)=[1-(加药组吸光度值-空白组吸光度值)÷(对照组吸光度值-空白组吸光度值)]×100%。

1.2.4 Western blot法测定蛋白的表达

收集细胞,冰上裂解细胞,分别提取各组细胞总蛋白,用12%的凝胶电泳分离蛋白,然后转膜至0.45 μm PVDF膜上,用5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,相应的一抗4℃孵育过夜,第2天洗膜后二抗孵育1 h,洗膜之后曝光。具体操作步骤见既往文献^[9]。

1.2.5 流式细胞仪检测

被检细胞用含1% FBS的PBS缓冲液调至终浓度为1×10⁶个/mL,在室温下与相应荧光直标单抗避光孵育20 min,于流式细胞仪检测,每份标本检测1×10⁴个细胞。细胞凋亡检测按试剂盒操作步骤处理细胞后上机检测。

1.2.6 逆转录和实时荧光定量PCR

按TRIzol试剂操作说明提取H929细胞总RNA,所得的RNA样本于分光光度计检测D(260 nm)/D(280 nm)比值均在1.8~2.0。cDNA合成按逆转录试剂盒说明书操作,取总量1 μg的RNA,65℃反应5 min,42℃放置1 h。实时荧光定量PCR反应体系在Mx3000p扩增仪上进行扩增,两步法PCR扩增标准程序:预变性95℃ 30 s,PCR反应95℃ 5 s,60℃ 20 s,40个循环。每个标本3个复孔。以2^{-ΔΔC_t}计算mRNA表达水平。

1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism 5.0软件进行图表统计分析,用Image-pro plus 6.0软件处理Western blot灰度值。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析并进行LSD-*t*检验,多因素的组间均数比较采用析因设计方差分析,*P* ≤ 0.05为差异有统计学意义。

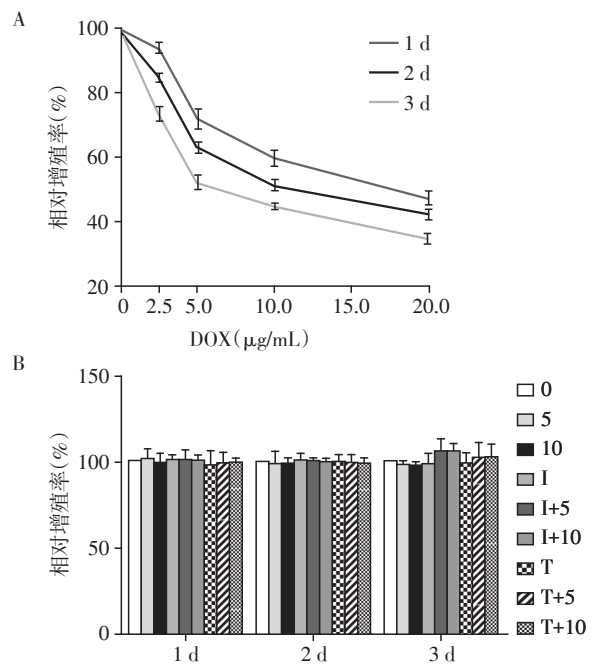
2 结果

2.1 DOX对骨髓瘤细胞株H929和骨髓MSCs增殖的影响

用不同浓度DOX处理H929细胞株1、2、3 d后,CCK8法检测结果提示,与相同培养时间的未处理组相比,4种浓度的DOX对H929的增殖均有抑制作用(*P* < 0.05),并且相同处理时间下,这一抑制作用随着DOX浓度增加而更加明显(*P* < 0.05)。相同浓度情况下,处理时间越长,DOX对H929的增殖抑制作用越强(*P* < 0.05,图1A)。根据上述结果,我们选取5、10 μg/mL浓度的DOX进行H929细胞株的后

续实验。

由于共培养体系中含有H929细胞株与骨髓MSCs两种细胞成分,为了排除DOX或(和)细胞因子作用于骨髓MSCs对共培养体系CCK8结果的影响,我们用DOX或(和)细胞因子处理骨髓MSCs后检测其增殖率。CCK8结果提示,DOX与IL-1β或TNF-α分别或联合作用于骨髓MSCs,各组间的增殖率均无明显差异(均*P* > 0.05,图1B)。上述结果表明本实验条件下,DOX、IL-1β或TNF-α不会通过骨髓MSCs影响CCK8检测结果。



A:不同浓度DOX分别处理H929细胞株不同时间后,CCK8法检测H929细胞株相对增殖率(均*P* < 0.05, *n*=4); B:骨髓MSCs经DOX及细胞因子处理后的相对增殖率。0:无处理;5:5 μg/mL DOX处理;10:10 μg/mL DOX处理。I:IL-1β预处理1 d;I+5:IL-1β预处理1 d后加入5 μg/mL的DOX;I+10:IL-1β预处理1 d后加入10 μg/mL的DOX。T:TNF-α预处理1 d;T+5:TNF-α预处理1 d后加入5 μg/mL的DOX;T+10:TNF-α预处理1 d后加入10 μg/mL的DOX。

图1 DOX处理H929或骨髓MSCs的相对增殖率

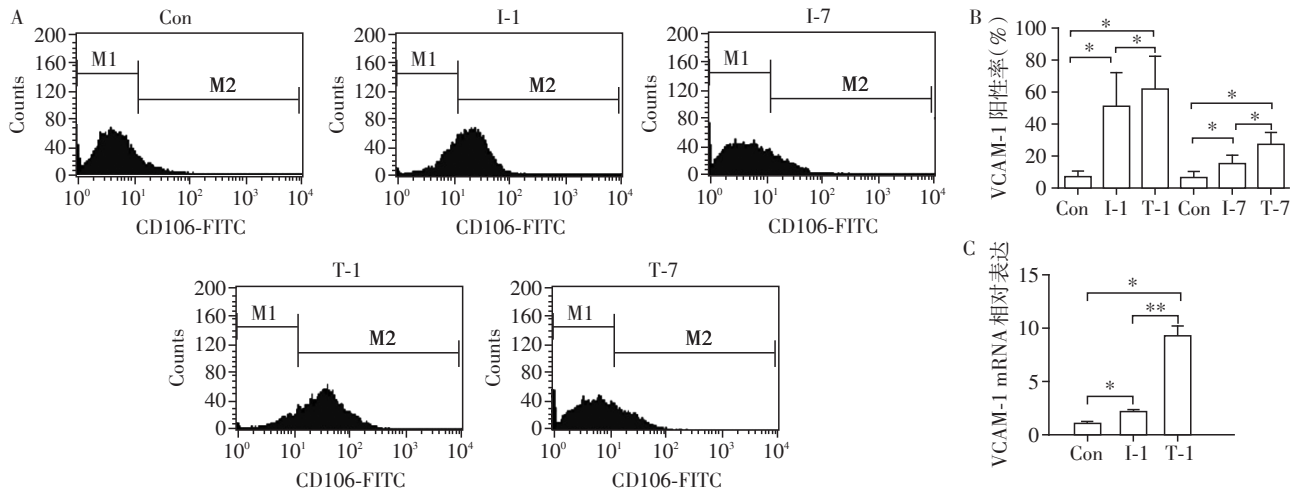
Figure 1 The relative proliferation rate of H929 or bone marrow MSCs treated with DOX

2.2 细胞因子上调骨髓MSCs表面VCAM-1的表达

骨髓MSCs表面VCAM-1的检测结果显示:①IL-1β或TNF-α处理后,表达VCAM-1的骨髓MSCs细胞增多,且相同时间TNF-α处理组比IL-1β处理组VCAM-1阳性率更高(*P*均 < 0.05,图2A、B);②骨髓MSCs经细胞因子处理1 d组的VCAM-1阳性率高于处理7 d组(*P* < 0.05,图中未显示)。因此后续细胞因子预处理实验均采用1 d时间处理。

与上述结果一致,VCAM-1 mRNA 检测结果表明,与对照组相比,骨髓MSCs经IL-1 β 或TNF- α 处理后,其VCAM-1 mRNA 表达水平增高($P < 0.01$),并

且TNF- α 对其的上调作用比IL-1 β 更加明显($P < 0.05$,图2C)。由此可见,细胞因子可以从mRNA和蛋白水平上调骨髓MSCs的VCAM-1表达。



A、B:经IL-1 β 或TNF- α 处理后骨髓MSCs的VCAM-1阳性率;C:骨髓MSCs的VCAM-1 mRNA相对表达量;Con:无处理的MSCs;I-1:IL-1 β 处理1 d;T-1:TNF- α 处理1 d;I-7:IL-1 β 处理7 d;T-7:TNF- α 处理7 d;两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;n=4。

图2 IL-1 β 或TNF- α 可上调骨髓MSCs的VCAM-1表达

Figure 2 VCAM-1 expression level of bone marrow MSCs was up-regulated by IL-1 β or TNF- α

2.3 细胞因子预处理的骨髓MSCs可以部分逆转DOX对骨髓瘤细胞株的抑制作用

为了进一步研究共培养体系中,IL-1 β 或TNF- α 预处理的骨髓MSCs是否会影响H929对DOX的敏感性,我们检测了DOX对H929的凋亡诱导作用。H929细胞株经5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两个浓度DOX处理2 d后均发生了细胞凋亡。然而,相同条件DOX处理的共培养体系中,H929凋亡率降低,并且与未进行预处理的MSCs共培养组相比,IL-1 β 或TNF- α 预处理MSCs共培养组中H929细胞的凋亡率明显下降,进一步降低了DOX诱导的H929细胞的凋亡作用(图3A~B)。

此外,与未进行预处理的骨髓MSCs共培养组比较,5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DOX作用2 d或3 d情况下,IL-1 β 或TNF- α 预处理的骨髓MSCs作为饲养层细胞,均可降低DOX对H929细胞株的增殖抑制作用($P < 0.05$,图3C)。

2.4 细胞因子预处理的骨髓MSCs可上调骨髓瘤细胞株p-Erk1/2的表达

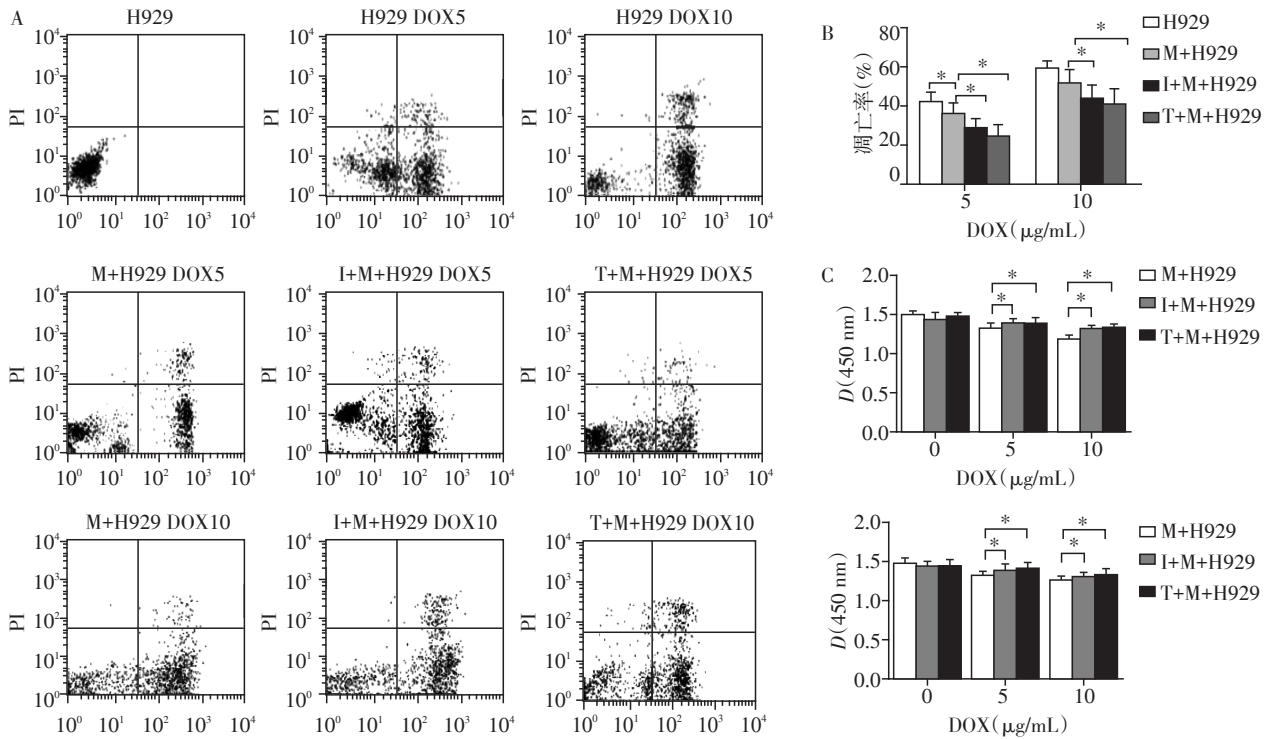
既往研究发现,DOX处理骨髓瘤细胞株H929或U266后,可下调两种细胞株的p-Erk1/2水平。为了进一步研究细胞因子预处理的骨髓MSCs在共培养体系中对H929细胞株p-Erk1/2表达的影响,我们用Western blot法检测H929细胞p-Erk1/2表达水平的变化。结果与既往实验符合,DOX处理2 d后,

H929的p-Erk1/2水平下调,且相比5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DOX浓度,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理后下调更加明显(图4A)。此外,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DOX处理2 d后,与对照组相比,MSCs共培养组中H929的p-Erk1/2表达不降反增;若骨髓MSCs经IL-1 β 或TNF- α 预处理,则H929的p-Erk1/2表达上调作用将更加明显(图4B、D)。

3 讨论

DOX是一种已经在临床上应用多年的四环素类抗生素,除了抗微生物作用外,还有研究指出其对肺癌、结肠癌、淋巴瘤等有抗肿瘤作用^[11-12]。虽然近年发现DOX对轻链型淀粉样变性有治疗作用^[13],但目前尚没有关于DOX抗MM作用的报道。我们在既往研究中发现DOX在体外对MM细胞株也有明显的细胞毒性作用^[14],并且常规处方剂量的DOX即可在人体内达到15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度^[15],故其有望成为潜在的抗MM药物。

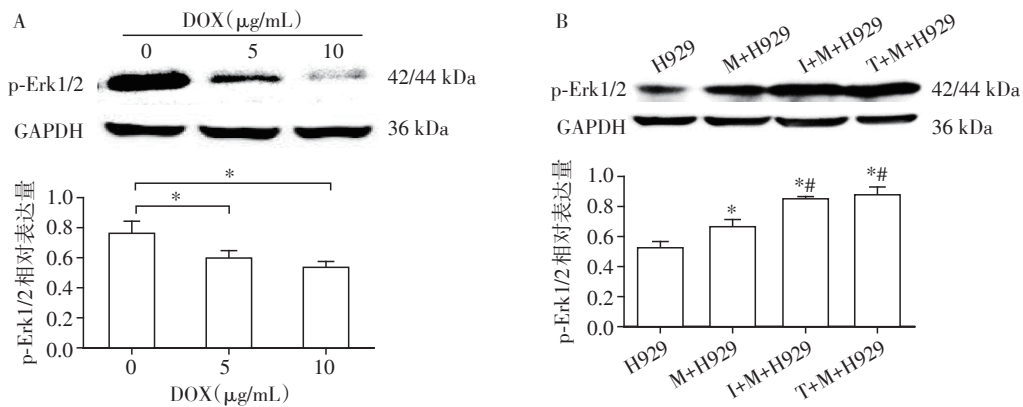
由于MM患者骨髓微环境的异常在疾病发生、发展过程中起着重要作用,目前有些常用的抗MM药物在异常的骨髓微环境中的抗MM作用会有所下降^[10]。我们在对DOX的研究中也发现类似现象:DOX对MM细胞株H929有明显的细胞毒性作用,但其作用在骨髓MSCs存在时有所下降;若细胞因子预处理骨髓MSCs后再与H929共培养,DOX的毒性作



A: 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ DOX 条件下,不同培养 H929 的流式凋亡检测;B: 两种浓度 DOX 条件下 H929 细胞株的凋亡比例(两组比较, $^*P < 0.05; n=3$); C、D: 不同浓度 DOX 处理 2 d(C) 和 3 d(D) 条件下, CCK8 法检测 H929 在共培养体系中的增殖抑制作用。M+H929、I+M+H929、T+M+H929 分别为无预处理的 MSCs 共培养组、经 IL-1 β 或 TNF- α 预处理 1 d 后的 MSCs 共培养组; 两组比较, $^*P < 0.05; n=4$ 。

图3 IL-1 β 或 TNF- α 预处理的骨髓 MSCs 可降低 DOX 诱导的 H929 细胞凋亡和增殖抑制作用

Figure 3 The apoptosis and proliferation inhibition of H929 induced by DOX could be reduced by IL-1 β or TNF- α -pre-treated bone marrow MSCs



A: 经 0、5、10 $\mu\text{g/mL}$ DOX 处理后 H929 的 p-Erk1/2 检测结果(两组比较, $^*P < 0.05, n=3$); B: 5 $\mu\text{g/mL}$ DOX 处理后的 H929 在共培养体系中 p-Erk1/2 检测结果。M+H929、I+M+H929、T+M+H929 分别为无预处理、经 IL-1 β 预处理 1 d、经 TNF- α 预处理 1 d 的 MSCs 共培养组; 与 H929 组比较, $^*P < 0.05$, 与 M+H929 组比较, $^*P < 0.05 (n=3)$ 。

图4 Western blot 检测经预处理的骨髓 MSCs 在共培养体系中对 H929 细胞株 p-Erk1/2 蛋白表达的影响

Figure 4 The p-Erk1/2 expression level in H929 co-cultured with pretreated bone marrow MSCs

用将进一步降低。以上结果提示, DOX 的抗骨髓瘤作用也受异常骨髓微环境的影响。

目前 DOX 的抗 MM 作用机制尚不明确, 在前期研究中发现 p-Erk1/2 可能参与 DOX 对 MM 细胞的毒

性作用^[14]。用 DOX 处理 H929 细胞后, H929 的 p-Erk1/2 表达下降。在本研究中我们发现, 细胞因子预处理的 MSCs 与 H929 细胞共培养可减少 DOX 对 H929 细胞 p-Erk1/2 水平的抑制作用。Erk 通路不仅

参与MM细胞的增殖和生长,也参与MM细胞与周围微环境的相互作用,因此抑制Erk通路对MM细胞生存不利^[16-17]。此外,血液肿瘤细胞可以通过VCAM-CD49细胞表面黏附分子相互作用,介导异常微环境引起的耐药^[18-19]。本实验也观察到,IL-1 β 或TNF- α 预处理后,骨髓MSCs的VCAM-1表达上调。由此推测,骨髓MSCs的VCAM-1以及H929细胞的Erk1/2通路均参与细胞因子介导的H929对DOX的耐药。

综上所述,骨髓微环境的细胞因子如IL-1 β 或TNF- α 可以通过骨髓MSCs间接介导骨髓瘤细胞株对DOX的耐药性,并且细胞因子的这一作用可能与骨髓MSCs的细胞表面黏附分子VCAM-1以及骨髓瘤细胞株H929的Erk1/2通路有关。本研究结果表明,为了提高DOX在体内的抗MM作用,克服骨髓微环境异常导致的MM对DOX敏感性下降,也许需要与拮抗MM细胞Erk1/2通路的策略同时使用。

[参考文献]

- [1] Thumallapally N, Yu H, Asti D, et al. Salvage therapies in relapsed and/or refractory myeloma: what is current and what is the future?[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 4843-4858
- [2] Manier S, Sacco A, Leleu X, et al. Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 157496
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147
- [4] Xu S, Evans H, Buckle C, et al. Impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients is associated with a blockade in the deactivation of the Notch signaling pathway [J]. *Leukemia*, 2012, 26(12): 2546-2549
- [5] Wang X, Zhang Z, Yao C. Angiogenic activity of mesenchymal stem cells in multiple myeloma [J]. *Cancer Invest*, 2011, 29(1): 37-41
- [6] Li B, Fu J, Chen P, et al. Impairment in immunomodulatory function of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(8): 623-633
- [7] Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of

human multiple myeloma: therapeutic applications [J]. *Oncogene*, 2001, 20(33): 4519-4527

- [8] 徐欣欣,夏雷,杨娇,等. 肿瘤坏死因子预处理的骨髓间充质干细胞对骨髓瘤细胞株H929集落形成能力及miRNA-15a/16等相关基因表达的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(2): 178-182
- [9] 杨皎,夏雷,雷芳,等. 多次肿瘤坏死因子预处理骨髓间充质干细胞促进其成骨分化潜能[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(3): 275-280
- [10] Bar-Natan M, Stroopinsky D, Luptakova K, et al. Bone marrow stroma protects myeloma cells from cytotoxic damage via induction of the oncoprotein MUC1 [J]. *Br J Haematol*, 2017, 176(6): 929-938
- [11] 王丽娅,徐明娟,吴薇. 多西环素抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2012, 41(8): 14-16
- [12] Pulvino M, Chen L, Oleksyn D, et al. Inhibition of COP9-signalosome(CSN)deneddylating activity and tumor growth of diffuse large B-cell lymphomas by doxycycline [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(17): 14796-14813
- [13] Wechalekar AD, Whelan C. Encouraging impact of doxycycline on early mortality in cardiac light chain (AL) amyloidosis [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(3): e546
- [14] 颜玲玲,费小明,汤郁,等. 多西环素对人多发性骨髓瘤细胞增殖的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2017, 27(3): 239-242, 247
- [15] Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(2): 256-265
- [16] Chang-Yew Leow C, Gerondakis S, Spencer A. MEK inhibitors as a chemotherapeutic intervention in multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2013, 3: e105
- [17] Ramakrishnan V, Kimlinger T, Haug J, et al. Anti-myeloma activity of Akt inhibition is linked to the activation status of PI3K/Akt and MEK/ERK pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50005
- [18] André T, Najjar M, Stamatopoulos B, et al. Immune impairments in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(2): 213-224
- [19] Abe M, Hiura K, Ozaki S, et al. Vicious cycle between myeloma cell binding to bone marrow stromal cells via VLA-4-VCAM-1 adhesion and macrophage inflammatory protein-1 α and MIP-1 β production [J]. *J Bone Miner Metab*, 2009, 27(1): 16-23

[收稿日期] 2017-08-03