论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1850-04

APE1/Ref-1 siRNA 抑制多发性骨髓瘤骨髓基质细胞 IL-6 及 IL-8 分泌的体外研究

谢家印,王 东,李梦侠,向德兵,杨镇洲,杨宇馨,李增鹏,曾林立,仲召阳,王 阁 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

摘 要:目的 体外通过 APE1/Ref-1 siRNA 敲低多发性骨髓瘤骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs) APE1/Ref-1 的表达,观察 BMSCs 的增殖及分泌细胞因子 IL-6、IL-8 的变化,初步探讨 BMSCs APE1/Ref-1 表达的功能特点。**方法** 通过免疫细胞化学染色法定量检测 35 例初治、11 例复发/难治多发性骨髓瘤患者及 10 例正常人 BMSCs APE1/Ref-1 的表达特点及其差异,经 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 后,流式细胞仪检测 BMSCs 细胞周期的变化;ELISA 法检测 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 的水平变化情况。**结果** 多发性骨髓瘤 BMSCs 的 APE1/Ref-1 蛋白阳性表达率显著高于正常 BMSCs APE1/Ref-1 蛋白阳性表达率($P<0.05$),且多发性骨髓瘤 BMSCs 的 APE1/Ref-1 呈细胞核及核浆共同表达方式。Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染敲低多发性骨髓瘤及正常 BMSCs APE1/Ref-1 的表达量呈进行性减少($P<0.01$),同时发现 APE1/Ref-1 siRNA 对多发性骨髓瘤 BMSCs 抑制作用更明显。Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 后对正常人及骨髓瘤患者 BMSCs 分泌细胞因子 IL-6、IL-8 的量有显著的抑制作用,特别是感染 72 h 后,骨髓瘤患者及正常人的BMSCs 分泌 IL-6[初治患者(246.29±46.51)pg/ml,复发/难治患者(365.09±75.25)pg/ml]、IL-8[初治患者(118.77±18.08)pg/ml,复发/难治患者(188.71±33.76)pg/ml]的量最低,与其他时段比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 多发性骨髓瘤BMSCs APE1/Ref-1 的表达特点不同于正常 BMSCs,可能导致其功能差异;APE1/Ref-1 siRNA 敲低了 MM BMSCs APE1/Ref-1 的表达,同时明显抑制了其 IL-6、IL-8 的分泌,减少了对骨髓瘤细胞的促增殖和凋亡作用。

关键词: 多发性骨髓瘤;骨髓基质细胞;RNA 干扰;白细胞介素-6;白细胞介素-8
中图法分类号: R392.11; R394.3; R733.3 **文献标识码:** A

APE1/Ref-1 siRNA inhibits IL-6 and IL-8 secretion by cultured bone marrow stromal cells isolated from multiple myeloma patients

XIE Jia-yin, WANG Dong, LI Meng-xia, XIANG De-bing, YANG Zhen-zhou, YANG Yu-xin, LI Zeng-peng, ZENG Lin-li, ZHONG Zhao-yang, WANG Ge (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the possible roles of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) expression in the bone marrow stromal cells (BMSCs) form multiple myeloma (MM) patients. **Methods** The expression of APE1/Ref-1 protein in BMSCs isolated from the bone marrow samples of 35 initial cases, 11 relapse/refractory cases with MM and 10 cases health individuals were detected by immunocytochemistry. Before and after the transfection of the adenoviral vector Adv5-APE1/Ref-1 siRNA, the concentrations of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in the supernatant of BMSCs were measured with ELISA, and the cell cycles proliferation of BMSCs were detected with flow cytometry. **Results** The expression of APE1/Ref-1 protein in the cultured BMSCs was significantly higher than in normal BMSCs ($P<0.05$). APE1/Ref-1 siRNA obviously inhibited the expression of the protein in MM or normal BMSCs. Transfected with Adv5-APE1/Ref-1 siRNA, the MM or normal BMSCs gradually decreased the levels of IL-6 and IL-8 secretion in a time course. In 72 h after the transfection, the amounts of IL-6 and IL-8 in the BMSCs supernatant reached the lowest levels as following, IL-6 (246.29±46.51) pg/ml and IL-8 (118.77±18.08) pg/ml in initial MM

基金项目: 国家自然科学基金(30772520)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772520)
作者简介: 谢家印,男,四川省安岳县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事 DNA 损伤修复与肿瘤放化疗敏感性方面的研究,发表论文 20 篇。电话:(023)68757157,E-mail:xiejia505@sina.com
通信作者: 王 东,电话:(023)68757151,E-mail:dongwang64@hotmail.com
收稿日期: 2009-04-16;**修回日期:** 2009-06-04

group, and IL-6 (365.09 ± 75.25) pg/ml and IL-8 (188.71 ± 33.76) pg/ml in relapse/refractory group ($P<0.01$). **Conclusion** The abnormal expression of APE1/Ref-1 protein in MM BMSCs may lead to many changes of biological function. APE1/Ref-1 siRNA knocks down the expression of APE1/Ref-1 protein in BMSCs, and inhibits the production of IL-6 and IL-8 in MM BMSCs, thus indirectly reduces the proliferation or benefit apoptosis of myeloma cells.

Key words: multiple myeloma; bone marrow stromal cells; apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1; interleukin-8; interleukin-6

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种常见的 B 细胞来源恶性肿瘤,约占全部血液肿瘤的 10% 左右[1],尽管目前其疗效已有很大提高,但 MM 至今仍是一种不可治愈的疾病。研究表明骨髓瘤细胞微环境促进了骨髓瘤细胞的生长,抑制了肿瘤细胞的凋亡,特别是骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)与骨髓瘤细胞之间的直接接触和可溶性因子如细胞因子、生长因子的作用更加突出,常常是多发性骨髓瘤难治、复发的主要原因之一[2]。APE1/Ref-1 是一种体内分布广泛的多功能蛋白质,O'Hara 等[3]和 Frossi 等[4]报道 APE1/Ref-1 可以通过氧化还原机制促进 IL-6 和 IL-8 的表达。本研究通过检测 MM BMSCs APE1/Ref-1 特点,体外通过 APE1/Ref-1 siRNA 敲低 MM BMSCs APE1/Ref-1 的表达,观察 BMSCs 的细胞周期及分泌细胞因子 IL-6、IL-8 的变化情况。

1　材料与方法

1.1　标本采集及骨髓基质细胞培养

46 例多发性骨髓瘤患者(35 例初治,11 例难治/复发)及 10 例正常人均来自本院 2008 年 1 月至 2009 年 2 月住院病例,患者均知情同意。抽取骨髓 5 ~ 10 ml,肝素抗凝,加入淋巴细胞分离液后密度离心,分离单个核细胞并计数以 1×10^6/ml 接种于 50 ml 的培养瓶内,加入 15% 胎牛血清的 DMEM 培基(含青霉素钠 100 U/ml 和链霉素 100 mg/L),在 37 ℃,饱和湿度,5% CO_2 条件下培养箱中连续培养,第 3 天换液,清除未贴壁细胞,继续培养且每周换液 1 ~ 2 次,待基本长满单层进行传代培养,以 0.25% 胰酶-EDTA 0.5 ~ 1 ml 覆盖细胞层,于 37 ℃培养箱中消化 3 ~ 5 min,转移至离心管中,加 PBS 后 300 × g 离心 10 min。按 2×10^4/ml 重新接种于 50 ml 培养瓶中,部分骨髓基质细胞予以 -196 ℃冷冻保存,另一部分细胞继续传代,本实验采用 2 ~ 3 代的基质细胞。

1.2　免疫细胞化学染色法

将骨髓基质细胞悬液按固定的细胞浓度滴于涂有凝胶的载玻片上,全部标本均经 10% 甲醛固定,具体实验步骤参照文献[5]。以 PBS 替代一抗作为阴性对照,已知 APE1/Ref-1 阳性的卵巢癌标本作为阳性对照。Ref-1 免疫组化阳性信号为棕黄色细小颗粒状,定位于细胞核/细胞质,染色标本进行图像分析。

1.3　Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs

实验分组包括感染组:APE1/Ref-1 siRNA(+)和未感染组:APE1/Ref-1 siRNA(-),将 2 ~ 3 代 BMSCs(2×10^5)接种于直径 50 cm 的培养皿中,待细胞 50% 融合后,分别加入 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs。我们在前期研究中已筛选出抑制 APE1/Ref-1 表达超过 90% 的 APE1/Ref-1 特异 siRNA[5],腺病毒表达载体 Ad5v-APE1/Ref-1 siRNA 由本室向德兵博士构建,其滴度为 1.6×10^{10} IU/ml,通过预实验后确定以 50 MOI 有效工作浓度的 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染骨髓基质细胞,感染后 0、24、48、72、96 h 分别留培养上清液,-80 ℃保存标本待用。

1.4　BMSCs 细胞周期测定

5×10^5 BMSCs 以 70% 乙醇固定 24 h,300 × g 离心 5 min 后弃上清,实验步骤参照文献[6]。

1.5　ELISA 法检测 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 的水平

实验分组为 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染组、未感染组。将第 2 ~ 3 代的 BMSCs 以 5×10^4/ml 接种于 24 孔板,以含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养,待细胞 80% 融合后弃上清,以不含 FBS 的 DMEM 培养液培养,分别加入 50 MOI Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 于培养 0、24、48、72、96 h 取培养上清液,经 1 500 r/min 离心 5 min,保存于 -80 ℃待测,用 ELISA 法(Gene May 公司试剂盒)测定 BMSC 分泌细胞因子 IL-6、IL-8 的水平。

1.6　图像分析

利用 Image Pro Plus 彩色图像分析系统对染色标本进行图像分析,每例患者或者正常人随机选取 5 个标本,每张标本选取 5 个高倍视野(×400),测定细胞染色灰度值,灰度值越低,表明其染色程度越深,其表达的蛋白量越多。

1.7　统计学分析

将测得的数据用 SPSS 10.0 进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行方差分析及 t 检验,率的比较用 χ^2 检验。

2　结果

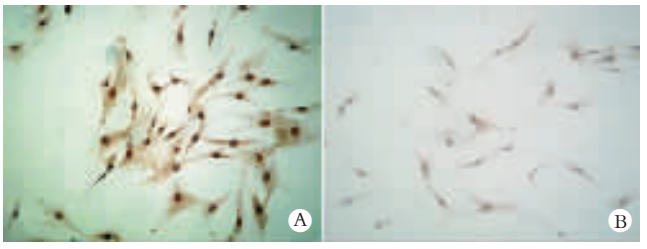
2.1　APE1/Ref-1 在多发性骨髓瘤 BMSCs 的表达特点

正常骨髓基质细胞 APE1/Ref-1 呈细胞核阳性表达为主,而多发性骨髓瘤 BMSCs 的 APE1/Ref-1 呈细胞核、细核质共同表达。正常骨髓基质细胞 APE1/Ref-1 蛋白阳性表达率为 72.6%,而多发性骨髓瘤 BMSCs 的 APE1/Ref-1 蛋白阳性表达率为 83.3%,特别是复发、难治性骨髓瘤 BMSCs 的阳性表达率为 100%,两者差异有统计学意义($P<0.05$),而均显著高于正常骨髓基质细胞 APE1/Ref-1 的表达($P<0.01$)。

2.2　Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染抑制多发性骨髓瘤 BMSCs APE1/Ref-1 表达

正常人未感染组 BMSCs APE1/Ref-1 染色深度明显低于 MM 患者,表明骨髓瘤患者的骨髓基质细胞 APE1/Ref-1 蛋白数量明显高于正常人($P<0.01$);Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染多发性骨髓瘤患者和正常人 BMSCs 后最高的抑制效果均在第 2 天,与相同时间未感染组比较差异有统计学意义($P<0.01$),

表明通过免疫细胞化学染色证实 APE1/Ref-1 siRNA 明显抑制了骨髓瘤 BMSCs 和正常人 BMSCs APE1/Ref-1 蛋白的表达(图1)。4 个时段多发性骨髓瘤 BMSCs 未感染组和正常人 BMSCs 未感染组内灰度值差异均无统计学意义($P>0.05$)。MM 患者 48 h APE1/Ref-1 siRNA(+)与 96h APE1/Ref-1 siRNA(+)灰度值比较差异有统计学意义($P<0.05$),而正常人 48 h 时 APE1/Ref-1 siRNA(+)组与 72 h 时 APE1/Ref-1 siRNA(+)组灰度值比较差异有统计学意义($P<0.05$),表明 APE1/Ref-1 siRNA 对多发性骨髓瘤 BMSCs 抑制作用更明显,见表1。



A:未感染组;B:感染组

图1 免疫细胞化学检测 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 对多发性骨髓瘤 BMSC 细胞 APE1/Ref-1 的抑制作用 (S-P×200)

表1 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染不同时间对多发性骨髓瘤 BMSCs Ref-1 表达的影响($\bar{x}\pm s$,灰度值)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
感染组				
正常人	155.40±13.76	172.53±18.51[c]	152.75±13.09	141.15±12.88
骨髓瘤患者	145.51±12.45	160.73±16.88[b]	153.62±13.54	149.92±13.72
未感染组				
正常人	139.56±11.62[a]	140.96±12.11[a]	138.78±11.32[a]	140.08±11.92[a]
骨髓瘤患者	128.69±9.76	130.70±10.16	129.02±10.89	127.92±9.65

a:$P<0.01$,与骨髓瘤患者比较;b:$P<0.05$,与 96 h 比较;c:$P<0.05$,与 72 h 比较

2.3 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染对多发性骨髓瘤 BMSCs 细胞周期的影响

流式细胞仪检测 BMSCs 细胞周期显示:MM 患者 BMSCs 的细胞周期中 G_0+G_1 比例明显低于正常人($P<0.05$),而 $S+G_2$ 比例显著高于正常人组($P<0.05$);采用 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 后,对 MM 患者和正常人 BMSCs 的细胞周期中 G_0+G_1 比例或者 $S+G_2$ 比例均无显著影响($P>0.05$)。见表2。

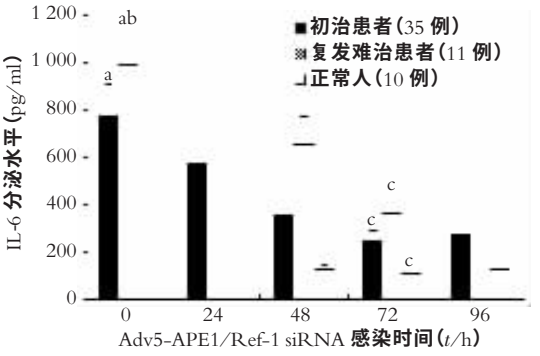
表2 Adv5-Ref-1 siRNA 感染对多发性骨髓瘤 BMSCs 细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	G_0+G_1	$S+G_2$
感染组		
正常人	92.68±16.65	6.22±1.21
骨髓瘤患者	85.87±14.14[a]	11.82±2.43[a]
未感染组		
正常人	94.22±17.15	5.12±1.13
骨髓瘤患者	88.31±15.27	10.96±1.89

a:$P<0.05$,与正常人比较

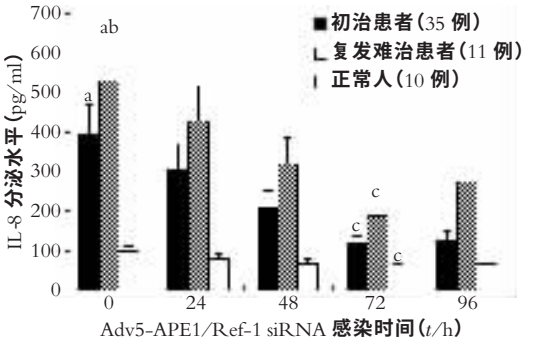
2.4 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 对多发性骨髓瘤 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 的抑制作用

通过 ELISA 方法检测了 35 例初治及 11 例难治/复发患者、10 例正常人的 BMSCs 培养上清液,在有或者无 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染的干预条件下,观察不同时段 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 的水平,其结果显示:多发性骨髓瘤患者 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 的水平显著高于正常人($P<0.01$),特别是复发/难治患者 BMSCs 分泌 IL-6(989.15±153.69)pg/ml、IL-8(530.70±109.89)pg/ml 的水平显著高于初治组患者的水平($P<0.01$,$P<0.05$),见图2、3。



a:$P<0.01$,与正常人比较;b:$P<0.01$,与初治患者比较;c:$P<0.05$,与 96 h 比较

图2 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染不同时间对多发性骨髓瘤 BMSCs 分泌 IL-6 的影响



a:$P<0.01$,与正常人比较;b:$P<0.05$,与初治患者比较;c:$P<0.01$,与 96 h 比较

图3 Adv5-APE1/Ref-1siRNA 感染不同时间对多发性骨髓瘤 BMSCs 分泌 IL-8 的影响

经 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 后 72 h,感染组其 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 的量最低,与其他时段比较差异有统计学意义($P<0.01$);也发现 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 对多发性骨髓瘤患者 BMSCs IL-6、IL-8 分泌抑制作用比正常人更强。经 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 后 96 h,感染组其 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 与其组内 72 h 比较有不同程度回升($P<0.05$),特别是复发/难治患者的 IL-8 回升更明显($P<0.01$),表明 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 引起的 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 是有时间依赖性的,同时提示 IL-8 可能对复发/难治患者瘤细胞的增殖有重要作用。经 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 后 72 h,感染组其 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 的量最低,与其他时段比较差异有统计学意义($P<0.01$);也发现 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 对多发性骨髓瘤患者 BMSCs IL-6、IL-8 分泌抑制作用比正常人更强。经 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 后 96 h,感染组其 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 与其组内 72 h 比较有不同程度回升($P<0.05$),特别是复发/难治患者的 IL-8 回升更明显($P<0.01$),表明 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 引起的 BMSCs 分泌 IL-6、IL-8 是有时间依赖性的,同时提示 IL-8 可能对复发/难治患者瘤细胞的增殖有重要作用。

3　讨论

多发性骨髓瘤是一种 B 细胞来源的恶性肿瘤,由 B 细胞发育异常所形成的恶变性浆细胞迁移至骨髓并发生克隆性增殖而产生;研究证实 MM 细胞生长、存活及增殖与 BMSCs 关系密切[2,7],推测可能是单纯针对 MM 细胞治疗效果不佳的关键所在。已有研究表明在介导 MM 细胞和 BMSCs 两者 crosstalk 的众多细胞因子中,氧化还原敏感细胞因子 IL-6 和 IL-8 更具有突出的作用[7]。

氧化还原因子/脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox-factor 1,APE1/Ref-1)是一种独特的 DNA 损伤修复、氧化还原双功能蛋白,除具有碱基切除修复功能外,还可通过氧化还原激活多种转录因子调控氧化应激、细胞凋亡等重要功能[8]。体外利用 APE1/Ref-1-siRNA 基因转染胚胎干细胞,发现 APE1/Ref-1 通过其氧化还原功能区调节胚胎干细胞的造血分化和存活[9];但就其 APE1/Ref-1 在造血干细胞,甚至在骨髓基质细胞(包括间充质干细胞)中的表达定位及其功能还不明确。本研究发现多发性骨髓瘤 BMSCs 的 APE1/Ref-1 蛋白阳性表达率为 83.3%,特别是复发、难治性骨髓瘤 BMSCs 的阳性表达率为 100%,显著高于正常骨髓基质细胞 APE1/Ref-1 蛋白阳性表达率(72.6%),图像分析 APE1/Ref-1 蛋白定量也证实 MM BMSCsAPE1/Ref-1 蛋白量明显高于正常 BMSCs;表达定位分析发现正常骨髓基质细胞 APE1/Ref-1 呈细胞核阳性表达为主;而多发性骨髓瘤 BMSCs 的 APE1/Ref-1 呈细胞核表达、单纯细胞质表达或核浆共同表达;结合前期研究表明 APE1/Ref-1 的细胞质异位表达可能与其相应的生物学功能发生改变有关;为此多发性骨髓瘤 BMSCs 的 APE1/Ref-1 细胞质异位表达与其黏附、分泌细胞因子等功能是否有关有待进一步研究。

RNAi 是指由双链 RNA(double-stranded RNA,dsRNAs)介导的同源 RNA 特异降解现象,目前已成为基因组研究领域中的重要工具,正逐渐应用于肿瘤基因治疗领域。本研究采用 50 MOI 的 Ad5/F35-APE1/Ref-1 siRNA 腺病毒对骨髓基质细胞的转导效率可达 99%。本研究显示,Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染正常人和 MM 患者 BMSCs 48h 后其灰度值最高,表明 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 显著抑制了 BMSCs APE1/Ref-1 的表达;然后采用流式细胞仪检测了 MM 患者 BMSCs 的细胞周期发现 G_0+G_1 比例明显低于正常人,而 $S+G_2$ 却相反;提示 MM 患者 BMSCs 增殖可能比正常人 BMSCs 活跃,符合其病理特点;但 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 感染 BMSCs 并没有对 MM 组和正常人组 BMSCs 的细胞周期产生显著影响,提示 APE1/Ref-1 可能通过其他机制影响 BMSCs 的功能。

MM 复发/难治部分因素可能与 BMSCs 分泌细胞因子和生长因子有关,下调 MSCs 分泌 IL-6、IL-8、IL-1β 等细胞因子以及减少或中断 BMSCs 与 MM 细胞间的黏附可能是治疗 MM 的有效途径。有人比较了 MM 患者及正常人骨髓 BMSCs 形态学无明显差异,但黏附分子的表达及细胞因子的分泌有明显不同,MM 患者 BMSCs 表达 VCAM-1 及分泌 FN 减少,而分泌细胞因子 IL-1β、IL-6、SCF、TNF-α 等明显增加[6]。IL-8 属于 C-X-C 亚家族,是一种多细胞来源的趋化性细胞因子,最近研究发现骨髓 MSCs 分泌 IL-8,多数骨髓瘤细胞株及骨髓患者的骨髓瘤细胞表达 IL-8 受体 CXCR1/2,参与 MM 患者骨髓血管生成,近而与 MM 疾病进展有关[10]。本实验发现 Adv5-APE1/Ref-1 siRNA 对多发性骨髓瘤患者 BMSCs IL-6、IL-8 分泌抑制作用比正常人更强,推测 APE1/Ref-1 可能通过其氧化还原功能参与了 BMSCs 分泌 2 种因子的过程,其作用机制有待进一步证实。

参考文献:

[1] Kyle R A, Therneau T M, Rajkumar S V, *et al*. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades[J]. Cancer, 2004, 101(11): 2667-2674.

[2] Wallase S R, Oken M M, Lunetta K L, *et al*. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients[J]. Cancer, 2002, 91(7): 1219-1230.

[3] O'Hara A M, Bhattacharyya A, Mifflin R C, *et al*. Interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells is dependent on apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1[J]. J Immunol, 2006, 177(11): 7990-7999.

[4] Frossi B, De-Carli M, Daniel K C, *et al*. Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(8): 2168-2177.

[5] Yang Z Z, Chen X H, Wang D. Experimental study enhancing the chemosensitivity of multiple myeloma to melphalan by using a tissue-specific APE1-silencing RNA expression vector[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2007, 7(4): 296-304.

[6] Wallace S R, Oken M M, Lunetta K L, *et al*. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients[J]. Cancer, 2001, 91(7): 1219-1230.

[7] 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(4): 986-991.

[8] Evans A R, Limp-Foster M, Kelley M R. Going APE over ref-1[J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83-108.

[9] Zou G M, Luo M H, Reed A, *et al*. Ape1 regulates hematopoietic differentiation of embryonic stem cells through its redox functional domain[J]. Blood, 2007, 109(5): 1917-1922.

[10] Kline M, Donovan K, Wellik L, *et al*. Cytokine and chemokine profiles in multiple myeloma; significance of stromal interaction and correlation of IL-8 production with disease progression[J]. Leuk Res, 2007, 31(5): 591-598.

(编辑　张　维)