DOI:10.16016/j.1000-5404.201907123

沉默 NUPR1 降低人多发性骨髓瘤 U266 细胞自噬并促进其迁移和侵袭

李星欣,黎安茂,曾沉思,陈建斌 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血液内科

[摘要] **目的** 探讨沉默核蛋白 1(nuclear protein 1, NUPR1)对人多发性骨髓瘤细胞自噬、迁移和侵袭的影响及其机制。**方法** 用含有 NUPR1-shRNA 慢病毒载体的病毒感染骨髓瘤 U266 细胞,通过流式细胞术检测转染效率,实验分为阴性对照组(转染无关序列 shRNA 慢病毒)和敲低组(转染 NUPR1-shRNA 慢病毒)。qRT-PCR 检测 NUPR1mRNA 表达,Western blot 检测 NUPR1、自噬相关蛋白(LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、Beclin1、ATG5 和 P62)、迁移和侵袭相关蛋白(MMP9、CXCR4)以及通路蛋白(p-AKT/T-AKT 和 p-mTOR/T-mTOR)的表达;透射电子显微镜(TEM)观察自噬小体;Transwell 检测细胞迁移和侵袭能力。**结果** 与阴性对照组比较,敲低组 NUPR1 mRNA 和蛋白表达显著下调($P<0.05$),自噬相关蛋白 ATG5、Beclin1 和 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的表达明显降低($P<0.05$),而 MMP9、CXCR4、P62、p-AKT/T-AKT 和 p-mTOR/T- mTOR 蛋白表达明显增高($P<0.05$);敲低组自噬小体明显减少,细胞迁移和侵袭能力增强,雷帕霉素可阻断该促进作用。**结论** 沉默 NUPR1 可能通过降低自噬水平促进 U266 细胞迁移和侵袭,并可能与 AKT/mTOR 通路激活有关。

[关键词] 核蛋白 1;多发性骨髓瘤;自噬;迁移;侵袭
[中图法分类号] R73-37; R730.23; R733.3 [文献标志码] A

Silencing NUPR1 down-regulates autophagy and promotes migration and invasion in human multiple myeloma U266 cells

LI Xingxin, LI Anmao, ZENG Chensi, CHEN Jianbin Departments of Hematology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of silencing nuclear protein 1 (NUPR1) on autophagy, migration and invasion in human multiple myeloma (MM) U266 cells and its possible mechanism. **Methods** NUPR1-shRNA was transfected into MM U266 cells, and the transfection rate was detected by flow cytometry. Then the cells were divided into negative control cells (transfected with unrelated sequence RNA lentiviral vector) and NUPR1 knockdown cells (transfected with NUPR1-shRNA lentiviral vector). The interference effect of NUPR1 was detected by qRT-PCR, and the expression levels of autophagy related proteins (Beclin1, ATG5, LC3Ⅱ/LC3Ⅰ, P62), migration and invasion associated proteins (MMP9, CXCR4) and pathway proteins (p-AKT/T-AKT, p-mTOR/T-mTOR) were measured by Western blotting. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe autophagosomes. Transwell test was employed to detect cell migration and invasion. **Results** The expression of NUPR1 at mRNA and protein level was significantly decreased in NUPR1 knockdown cells ($P<0.05$). The protein levels of autophagy related proteins, ATG5, Beclin1 and LC3Ⅱ/LC3Ⅰ were significantly lower, while those of f MMP9, CXCR4, P62, p-AKT/T-AKT and p-mTOR/T-mTOR were increased obviously in the NUPR1 knockdown cells than the negative control cells ($P<0.05$). There were significantly reduced autophagosomes in NUPR1 knockdown cells. While, migratory and invasive abilities were enhanced in NUPR1 knock down group, and rapamycin reduced the promoting effects. **Conclusion** Silencing NUPR1 may promotes migration and invasion by down-regulating autophagy in U266 cells, which may be related to activation of the AKT/mTOR pathway.

[**Key words**] nuclear protein 1; multiple myeloma; autophagy; migration; invasion

Corresponding author: CHEN Jianbin, E-mail: cqchenjianbin2007@126.com

[通信作者] 陈建斌,E-mail: cqchenjianbin2007@126.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)是浆细胞恶性增殖性肿瘤,其发病率逐渐上升,已成为血液系统第二大肿瘤[1-2]。目前广泛应用的蛋白酶体抑制剂、自体造血干细胞移植和相关化疗方案的改善,极大地提高了疗效。然而,相当多的患者可能在几年,甚至几个月内复发。相关研究表明,微小残留病灶(minimal residual disease,MRD)的形成是 MM 复发和难治的重要原因之一,而肿瘤的迁移和侵袭与 MRD 的形成密切相关[3]。

转录调节因子核蛋白 1(nuclear protein 1, NUPR1)又称作 p8 和 Com1,是一种参与调控细胞生物学行为及多种信号通路的小分子蛋白[4-5]。国内外研究报道 NUPR1 在乳腺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌等肿瘤中过度表达[6]。研究显示,敲低 NUPR1 可抑制 HepG2 肝癌细胞和非小细胞肺癌细胞的迁移,但其机制尚未阐明[7-8]。另有研究表明,NUPR1 与肿瘤细胞自噬调节相关[9],而自噬被证明在 MM 的病理生理学中起着至关重要的作用[10],还可参与调节肿瘤细胞的迁移和侵袭。我们前期研究表明 MM 细胞内自噬水平较高[11-12]。于是,我们推测 MM 细胞中较高水平自噬可能与 NUPR1 高表达相关。因此,本研究通过敲低 NUPR1 表达来观察其对骨髓瘤 U266 细胞自噬、迁移和侵袭能力的影响及相互间是否存在关联,以进一步明确 NUPR1 在 MM 中的作用,为 MM 靶向治疗提供新的可能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 人多发性骨髓瘤 U266 细胞株 由侯健教授(上海仁济医院)惠赠。

1.1.2 实验试剂 慢病毒和聚凝胺(Polybrene)购于吉凯基因公司;雷帕霉素(50 mg)和 RPMI1640 购于 Sigma Aldrich 公司;胎牛血清购于 PAN-Biotech GmbH 公司; TRIzol、PCR 试剂盒及 PCR 引物均购于 TaKaRa 公司;蛋白提取、浓度测定(BCA 法)试剂盒和蛋白免疫印迹实验相关试剂均购于碧云天公司; PVDF 膜购于 Milipore 公司;嘌呤霉素(Puromycin)购于赛默飞世尔科技公司; NUPR1 抗体购于 Novus Biologicals 公司; LC3、AKT、p-AKT、MMP9、CXCR4 和 ATG5 抗体均购于万类生物科技公司;Beclin1、β-actin、mTOR、p-mTOR 和 P62 抗体均购于 Proteintech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 慢病毒载体的构建 运用专业软件确定 NUPR1 基因的特异性 shRNA 干扰序列为 5′-CCAAGCTGCAGAATTCAGA-3′;同时设计无关序列为 5′-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3′。由上海吉凯基因公司完成 shRNA 序列慢病毒载体的构建、包装及效价测定。

1.2.2 稳定株制备 取对数生长期的 U266 细胞,分装于 2 个孔,每孔接种 5×10^4 个细胞,于 24 孔板中培养。转染无关序列 shRNA 慢病毒的细胞作为阴性对照组,转染 NUPR1-shRNA 慢病毒的细胞作为敲低组,细胞感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 100,同时加入 Polybrene(5 μg/mL),培养 12 h 后更换培养液。于 72 h 后观察和测定绿色荧光率。观察到荧光后,用 0.5 mg/L 的 Puromycin 持续筛选(每 1~2 天更换新配制溶液)。2 周后获得稳定转染细胞株。

1.2.3 qRT-PCR 检测 提取各组细胞 RNA 并逆转录获得 cDNA(总体系 20 μL)。依照 PCR 反应条件(95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s)进行 50 个循环。每组 3 个复孔,重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

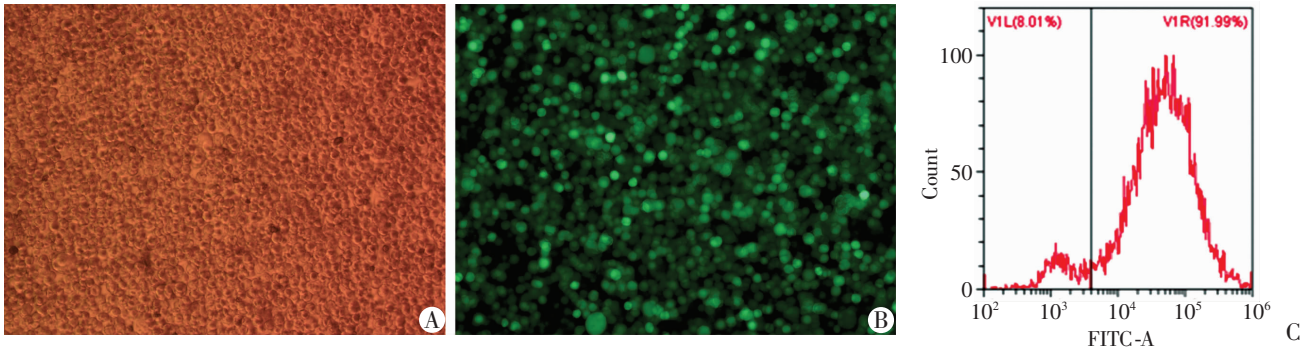
基因	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
NUPR1	上游:AGGACTTATTCCCGCTGACTGA 下游:TGCCGTGCGTGTCTATTTATTG	194
β-actin	上游:CCACGAACTACCTTCAACTCC 下游:GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT	132

1.2.4 Western blot 检测 提取各组蛋白后进行凝胶电泳(上样量为 30 μg),然后转膜和封闭。在 PVDF 膜上滴加一抗于 4 ℃孵育过夜,翌日分 3 次清洗(TBST, 30 min),待加入二抗后置于 37 ℃孵箱,60 min 后取出清洗(方法同前),ECL 法显影,以 β-actin 作为内参测定灰度值。实验重复 3 次。

1.2.5 透射电镜观察自噬 分别收集阴性对照组及敲低组细胞(每组 1×10^6 个)于 2 mL EP 管中,1 200 r/min 离心 10 min 后,弃上清,4 ℃戊二醛固定 24 h 后 0.1 mol/L PBS 洗 30 min(分为 3 次),然后 4 ℃ 1%锇酸固定和电子转染 2 h,最后制成超薄切片,使用透射电子显微镜进行观察并拍照。

1.2.6 迁移实验 取对数生长期的阴性对照组和敲低组细胞分别给予 100 ng/mL 雷帕霉素处理 24 h 后,收集各组细胞(包括未用雷帕霉素处理的细胞),用无血清培养基重悬,取 1×10^5 个细胞 400 μL 放入 Transwell 小室上层。下室加入含 10% FBS 的培养基 600 μL,37 ℃孵育 24 h。然后收集各组下室细胞,制成 20 μL 细胞悬液,用细胞计数板于显微镜下计数。迁移细胞数=计数板四大格细胞均数$\times10^4\times0.02$ 个。

1.2.7 侵袭实验 将基质胶用无血清 RPMI 1640 按 1∶8稀释混匀,取 50 μL 覆盖在小室上室面,37 ℃放置 30 min。余下操作方法同迁移实验。



A:相差显微镜观察敲低组 U266 细胞形态(×100);B:荧光显微镜观察敲低组 U266 细胞荧光表达(×100);C:流式细胞仪检测细胞荧光表达

图 1　NUPR1-shRNA 慢病毒感染后荧光表达观察和测定

1.3　统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,独立样本 t 检验用于两组间比较,配对样本 t 检验用于雷帕霉素处理前后同组间比较。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　NUPR1-shRNA 慢病毒成功转染 U266 细胞

2.1.1　观察和测定荧光表达情况　　NUPR1-shRNA 慢病毒转染 U266 细胞后转染率达 90%(图 1),说明细胞转染成功。

2.1.2　在 mRNA 和蛋白水平成功敲低 NUPR1　　敲低组 NUPR1 mRNA 和蛋白相对表达量均较阴性对照组显著降低($P<0.05$,图 2、表 2)。

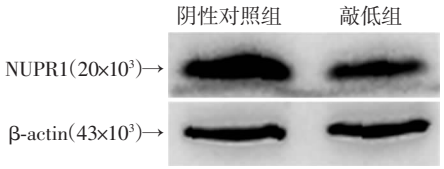


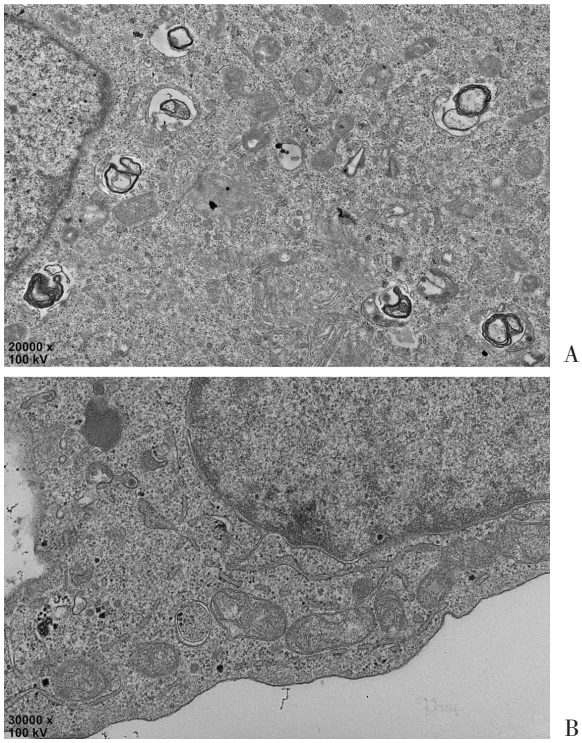
图 2　各组 U266 细胞 NUPR1 蛋白表达

表 2　两组 NUPR1 mRNA 和蛋白水平相对表达量比较($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	mRNA 相对表达量	蛋白相对表达量
阴性对照组	1.057±0.208	1.337±0.365
敲低组	0.046±0.039	0.483±0.212
P 值	0.001	0.025

2.2　沉默 NUPR1 下调 U266 细胞自噬水平

2.2.1　透射电镜观察自噬小体　　NUPR1 沉默后,U266 细胞自噬小体明显减少(图 3)。



A:阴性对照组(×20 000);B:敲低组(×30 000)

图 3　TEM 观察沉默 NUPR1 后 U266 细胞自噬小体

2.2.2　自噬相关蛋白表达　　Western blot 检测发现,敲低组 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、Beclin1 和 ATG5 蛋白相对表达量较阴性对照组明显减少,而 P62 蛋白相对表达量显著高于阴性对照组($P<0.05$)。经雷帕霉素处理后,阴性对照组和敲低组 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、Beclin1 和 ATG5 蛋白相对表达量均较处理前明显增加,但敲低组仍低于阴性对照组($P<0.001$);两组 P62 蛋白相对表达量均较处理前显著降低,但敲低组仍高于阴性对照组($P<0.05$,表 3、图 4)。

表 3　两组自噬相关蛋白相对表达量比较($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	LC3Ⅱ/LC3Ⅰ		Beclin1		ATG5		P62	
	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后
阴性对照组	1.813±0.469	3.363±0.296	1.550±0.147	2.753±0.193	1.286±0.258	1.883±0.229	2.430±0.376	0.677±0.121
敲低组	0.803±0.155	1.513±0.060	1.030±0.139	1.580±0.080	0.780±0.107	1.097±0.031	3.610±0.338	1.233±0.260
P 值	0.024	<0.001	0.011	0.001	0.035	0.004	0.016	0.028

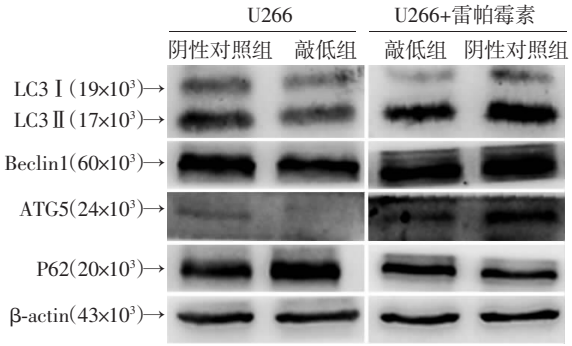
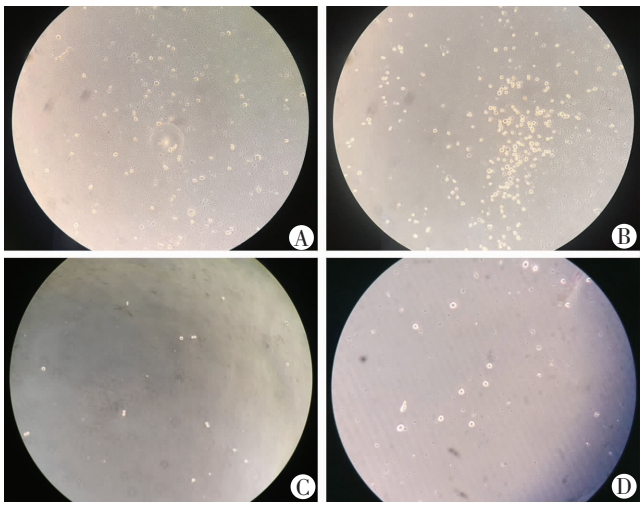


图 4　雷帕霉素处理前后对各组细胞自噬蛋白的影响

2.3　沉默 NUPR1 增强 U266 细胞迁移和侵袭能力

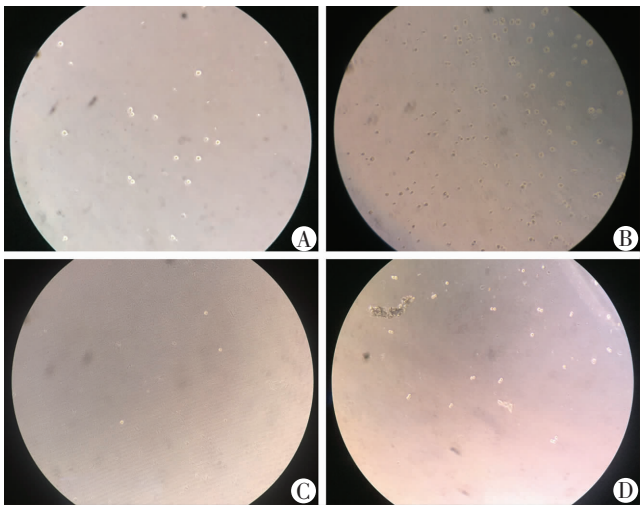
2.3.1　迁移实验　　敲低组穿过小室的细胞数为(825±129),显著多于阴性对照组[(411±113),*P*=0.014]。雷帕霉素处理后,两组穿过小室的细胞数均较处理前明显减少,但敲低组仍多于阴性对照组[(327±27) *vs* (207±44),*P*=0.016,图 5]。



A:阴性对照组; B:敲低组;C:阴性对照组+雷帕霉素; D:敲低组+雷帕霉素

图 5　沉默 NUPR1 对 U266 细胞迁移能力的影响　(×40)

2.3.2　侵袭实验　　敲低组穿过小室的细胞数为(326±59),显著多于阴性对照组[(175±60),*P*=0.037]。雷帕霉素处理后,两组穿过小室的细胞数均较处理前明显减少,但敲低组仍多于阴性对照组[(125±24) *vs* (70±17),*P*=0.035,图 6]。



A:阴性对照组; B:敲低组;C:阴性对照组+雷帕霉素; D:敲低组+雷帕霉素

图 6　沉默 NUPR1 对 U266 细胞侵袭能力的影响　(×40)

2.3.3　迁移和侵袭相关蛋白检测　　敲低组细胞 MMP9 和 CXCR4 蛋白相对表达量均显著高于阴性对照组。经雷帕霉素处理后,两组 MMP9 和 CXCR4 蛋白相对表达量均较处理前减少,但敲低组仍高于阴性对照组(*P*<0.05,表 4、图 7)。

表 4　两组迁移和侵袭相关蛋白相对表达量比较($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	MMP9		CXCR4	
	处理前	处理后	处理前	处理后
阴性对照组	0.617±0.045	0.289±0.009	0.890±0.431	0.550±0.099
敲低组	1.239±0.028	0.642±0.024	2.481±0.817	1.205±0.180
P 值	<0.001	<0.001	0.041	0.016

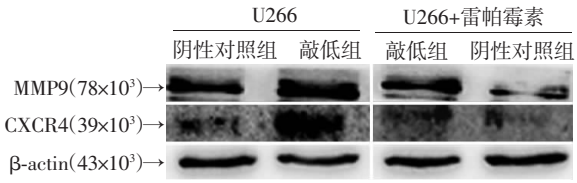


图 7　沉默 NUPR1 对 U266 细胞 MMP9 和 CXCR4 蛋白表达的影响

2.4　AKT/mTOR 信号通路蛋白表达

Western blot 结果表明,敲低组 p-AKT/T-AKT 和

p-mTOR/T-mTOR 蛋白相对表达量较阴性对照组明显增加。雷帕霉素处理后,两组 p-AKT/T-AKT 和 p-mTOR/T-mTOR 蛋白相对表达量均较处理前减少,但敲低组仍显著高于阴性对照组(P<0.001,图 8、表 5)。

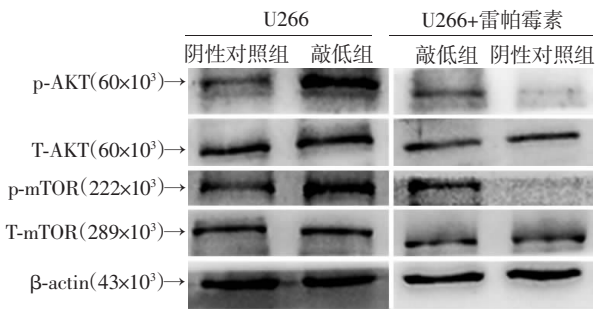


图 8 沉默 NUPR1 对 AKT、mTOR 蛋白表达的影响

表 5 两组 AKT/mTOR 信号通路蛋白相对表达量比较(n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	p-AKT/T-AKT		p-mTOR/T-mTOR	
	处理前	处理后	处理前	处理后
阴性对照组	1.223±0.127	0.427±0.040	1.493±0.051	0.343±0.252
敲低组	1.749±0.201	0.900±0.056	2.017±0.280	0.937±0.031
P 值	0.019	<0.001	0.034	<0.001

3 讨论

本课题组既往研究发现 NUPR1 在 MM 中高表达,且下调 NUPR1 表达可抑制 U266 细胞增殖,促进细胞凋亡[12]。为更全面了解 NUPR1 在 MM 中的作用,本研究靶向敲低 NUPR1 观察其对 MM 自噬和迁袭的影响,结果显示,NUPR1 在 mRNA 和蛋白水平敲低均有效,在 mRNA 水平敲低效果较蛋白水平更显著。基因翻译水平变化往往滞后于转录水平,且蛋白质较 mRNA 结构更稳定,降解速度更缓慢,因而出现上述情况。

本研究显示,沉默 NUPR1 后,自噬小体明显减少,自噬标志性蛋白 LC3 Ⅰ向 LC3 Ⅱ转化减少。此外,自噬底物相关蛋白 P62 的表达增加,Beclin1 和 ATG5 表达降低。由此可见,沉默 NUPR1 对 U266 细胞自噬有抑制作用。MM 细胞较高水平的自噬对其生存具有保护作用,若抑制 MM 细胞自噬,将促进其死亡[13]。

有学者认为 MM 患者骨髓中 MMP9 和 CXCR12 均呈高表达[14]。MMP9 是一种锌肽酶,主要作用于细胞外基质降解过程,表达上调能增强肿瘤细胞的迁袭能力[15]。CXCR12 与其受体 CXCR4 结合可促进肿瘤细胞黏附于血管内皮细胞,进而加速癌细胞的转移。为进一步探明沉默 NUPR1 对 MM 细胞迁移和侵袭的影响,本研究利用 RNA 干扰技术沉默 NUPR1 后发现,U266 细胞迁袭能力增加。同时,检测 MMP9 和 CXCR4 蛋白表达增加。提示沉默 NUPR1 可提高 U266 细胞迁移和侵袭能力。

那么,沉默 NUPR1 对 MM 细胞自噬、迁移和侵袭的影响相互间是否存在关联呢? 我们运用自噬诱导剂雷帕霉素处理后发现,U266 细胞自噬水平较处理前有所恢复,同时迁移和侵袭能力较处理前降低。该结果表明,随着 NUPR1 沉默,U266 细胞迁移和侵袭能力的改变可能与自噬水平降低相关。我们推测自噬流的抑制导致 MMP9 及 CXCR4 蛋白部分降解途径受阻而在细胞中累积。

我们前期研究结果提示 NUPR1 在 MM 中可能具有促癌作用,而本研究发现沉默 NUPR1 能促进 MM 的迁移和侵袭。多项研究发现 NUPR1 对于不同肿瘤作用不一,甚至同一种肿瘤中也可能发挥相反的作用[16-17]。我们认为肿瘤的发生、发展是一个动态变化的复杂过程,每个环节有多种因子参与调节。NUPR1 所发挥的作用是综合调控多种因子总效应的结果。故其可能在 MM 发展的不同阶段发挥不同作用。

研究表明,MM 的增殖、自噬和迁袭能力的调控均与 AKT/mTOR 信号通路相关[18-21]。为进一步探究 NUPR1 影响 MM 细胞这些生物学行为是否与该通路有关,本研究检测了 AKT、mTOR 蛋白及其磷酸化水平。结果发现沉默 NUPR1 可上调 AKT 及其下游的 mTOR 磷酸化水平,在用雷帕霉素(一种 mTOR 的特殊抑制剂)处理后,敲低组 AKT 和 mTOR 磷酸化水平降低,同时细胞自噬水平较处理前增高,迁袭能力较处理前降低,即 NUPR1 可能通过 AKT/mTOR 途径调控 U266 细胞自噬、迁移和侵袭。

综上所述,沉默 NUPR1 可降低 U266 细胞自噬水平并增强其迁移、侵袭能力。微小残留病灶导致 MM 难治的问题仍比较棘手。若通过干扰 NUPR1 的表达能够影响 MM 细胞死亡和迁袭能力,减少 MRD 形成,将对 MM 的防治有着重要意义。本实验仅初步观察了 NUPR1 对 MM 自噬、迁移和侵袭的影响,其具体参与调控的基因及相关机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] AL-HUJAILY E M, OLDHAM R A, HARI P, *et al*. Development of novel immunotherapies for multiple myeloma[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): E1506. DOI: 10.3390/ijms17091506.

[2] BARWICK B G, GUPTA V A, VERTINO P M, *et al*. Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1121. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01121.

[3] YANAMANDRA U, KUMAR S K. Minimal residual disease analysis in myeloma-when, why and where[J]. Leuk Lymphoma, 2018, 59(8): 1772-1784. DOI: 10.1080/

10428194.2017.1386304.

[4] MATSUNAGA K, FUJISAWA K, TAKAMI T, *et al*. NUPR1 Acts as a pro-survival factor in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and is induced by the hypoxia mimetic reagent deferoxamine[J]. J Clin Biochem Nutr, 2019, 64(3): 209-216. DOI:10.3164/jcbn.18-112.

[5] TAN L, YAMMANI R R. Nupr1 regulates palmitate-induced apoptosis in human articular chondrocytes[J]. Biosci Rep, 2019, 39(2): BSR20181473. DOI:10.1042/BSR20181473.

[6] 李丁. 转录调节因子 NUPR1 在相关疾病发生发展中的作用及其机制研究进展[J]. 山东医药, 2018,58(35): 111-114. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2018.35.031.
LI D. Advances in the role of transcriptional regulatory factor NUPR1 in the development of related diseases and its mechanism[J]. Shandong Med J, 2018, 58(35): 111-114. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2018.35.031.

[7] 黄红艳, 张彦斌, 王小利, 等. 靶向敲低核蛋白 1 抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖及迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(6): 782-786.
HUANG H Y, ZHANG Y B, WANG X L, *et al*. Nuclear protein 1 knockdown inhibits proliferation and migration of HepG2 cells[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2015, 31(6): 782-786.

[8] 邓跃林, 陈艳丽, 吴华杰, 等. Nupr1 调控非小细胞肺癌细胞迁移、凋亡机制的研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(19): 3636-3640. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2017.19.009.
DENG Y L, CHEN Y L, WU H J, *et al*. Nupr1 regulates the migration and apoptosis of non-small cell lung cancer cells[J]. Prog Mod Biomed, 2017, 17(19): 3636-3640. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.19.009.

[9] MU Y, YAN X, LI D, *et al*. NUPR1 maintains autolysosomal efflux by activating SNAP25 transcription in cancer cells[J]. Autophagy, 2018, 14(4): 654-670. DOI: 10.1080/15548627.2017.1338556.

[10] WU H, LIU C, YANG Q, *et al*. MIR145-3p promotes autophagy and enhances bortezomib sensitivity in multiple myeloma by targeting HDAC4[J]. Autophagy, 2019,15(9): 1-15. DOI: 10.1080/15548627.2019.1635380.

[11] 李星欣, 曾沉思, 杨泽松, 等. 沉默 NUPR1 基因对人多发性骨髓瘤 U266 细胞自噬的影响及机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(2): 146-151.
LI X X, ZENG C S, YANG Z S, *et al*. Effect of silencing NUPR1 gene on autophagy in human multiple myeloma U266 cells and its mechanism[J]. J Chongqing Med Univ, 2019, 44(2): 146-151.

[12] ZENG C, LI X, LI A, *et al*. Knockdown of NUPR1 inhibits the growth of U266 and RPMI8226 multiple myeloma cell lines via activating PTEN and caspase activation-dependent apoptosis[J]. Oncol Rep, 2018, 40(3): 1487-1494. DOI: 10.3892/or.2018.6544.

[13] 王纪珍,陈君敏,曾志勇,等.自噬调节药物对多发性骨髓瘤细胞增殖、凋亡和自噬的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(3): 817-823. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2018.03.031.
WANG J Z, CHEN J M, ZENG Z Y, *et al*. Effects of autophagy regulating drugs on proliferation, apoptosis and autophagy of multiple myeloma cells[J]. J Exp Hematol, 2018, 26(3): 817-823. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2018.03.031.

[14] SKLIRIS A, LABROPOULOU V T, PAPACHRISTOU D J, *et al*. Cell-surface serglycin promotes adhesion of myeloma cells to collagen type I and affects the expression of matrix metalloproteinases[J]. FEBS J, 2013, 280(10): 2342-2352. DOI:10.1111/febs.12179.

[15] YANG G L, TAO H R, WANG H W, *et al*. Ara-C increases gastric cancer cell invasion by upregulating CD-147-MMP-2/MMP-9 *via* the ERK signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 2045-2051. DOI:10.3892/or.2015.3748.

[16] CANO C E, HAMIDI T, GARCIA M N, *et al*. Genetic inactivation of Nupr1 Acts as a dominant suppressor event in a two-hit model of pancreatic carcinogenesis[J]. Gut, 2014, 63(6): 984-995. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305221.

[17] HAMIDI T, ALGÜL H, CANO C E, *et al*. Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis[J]. J Clin Invest, 2012, 122(6): 2092-2103. DOI:10.1172/JCI60144.

[18] ZHANG L, WANG H D, ZHU J H, *et al*. Mollugin induces tumor cell apoptosis and autophagy *via* the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and ERK signaling pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(1): 247-254. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.05.101.

[19] TONG Y, ZHU W, HUANG X, *et al*. PI3K inhibitor LY294002 inhibits activation of the Akt/mTOR pathway induced by an oncolytic adenovirus expressing TRAIL and sensitizes multiple myeloma cells to the oncolytic virus[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1581-1588. DOI: 10.3892/or.2014.3020.

[20] HU J, HU W X. Targeting signaling pathways in multiple myeloma: Pathogenesis and implication for treatments[J]. Cancer Lett, 2018, 414: 214-221. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.11.020.

[21] 罗国平, 刘芬, 谷文, 等. 褐藻糖胶对 U266 细胞自噬、迁移及侵袭的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(3): 312-317. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.03.007.
LUO G P, LIU F, GU W, *et al*. Effect of fucoidan on autophagy, migration and invasion of U266 cells[J]. J Shagnhai Jiaotong Univ(Med Sci), 2017, 37(3): 312-317. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.03.007.

(**收稿**:2019-07-16;**修回**:2019-09-12)

(编辑 汪勤俭)