MLL-NRIP3融合基因诱发白血病的生物学特性研究

陈仰鹏, 郭惠东, 初雅婧, 竺晓凡, 程涛, 袁卫平*

中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

* 联系人, E-mail: wpyuan@ihcams.ac.cn

收稿日期: 2017-10-07; 接受日期: 2017-10-30; 网络版发表日期: 2017-12-14

国家自然科学基金(批准号: 81600136, 81629001, 81421002)、天津市科学技术委员会应用基础研究青年项目(批准号: 17JCQNJC098000)和协和青年科研基金(批准号: 3332016092)资助

摘要 白血病是起源于造血干祖细胞的恶性增殖性肿瘤, 是儿童时期最常见的恶性肿瘤, 在成人恶性肿瘤中的发生比例也在逐渐上升, 严重危害着人类健康与生存. *MLL*重排白血病(简称*MLL-r*)是其中一类具有独特生物学行为的白血病, *MLL*融合蛋白是影响预后的不良因素之一. *MLL*融合基因*MLL-NRIP3* (简称*NRIP3*)是近年来发现的新型*MLL-r*. 有文献报道运用*MLL-NRIP3*融合基因可以建立白血病小鼠(*Mus musculus*)模型, 并在白血病小鼠模型上研究其关联基因的敲降或过表达对白血病进程的影响, 但未对其本身生物学特性进行单独研究. 为了更加充分认识这一新的白血病类型, 本研究将检测这类白血病的基本生物学表型, 包括移植白血病细胞后受体小鼠生存期; 白血病细胞迁移能力和黏附能力; 白血病干细胞(LSCs)的比例、数目与功能; 细胞周期和细胞凋亡等, 并验证白血病复发、难治的关键细胞LSCs的表面标志是否同样适用于*MLL-NRIP3*白血病细胞. 结果显示, 与研究较为成熟的*MLL-AF9* (简称*AF9*)相比, *MLL-NRIP3*受体小鼠生存期较*MLL-AF9*延长, 白血病细胞的迁移能力较*MLL-AF9*弱, 黏附能力反较*MLL-AF9*强, 而两者在细胞周期和细胞凋亡方面的生物学特性基本一致. 体外克隆形成实验和极限稀释实验提示*MLL-NRIP3*白血病LSC数目、比例及功能较*MLL-AF9*白血病LSC降低. 由此可得出结论: *MLL-NRIP3*诱发的白血病小鼠模型是低LSCs富集型*MLL-r*.

关键词 急性髓系白血病, *MLL-NRIP3*, *MLL-AF9*, 生物学表型分析

白血病是起源于造血干祖细胞的造血系统恶性肿瘤. 恶性增殖的白血病细胞增殖失控和凋亡受阻, 从而导致具有生存优势的白血病细胞在血液系统不断积聚并侵袭其他器官系统, 临床症状以贫血、出血、感染和浸润征象为主, 病情发展可导致死亡, 严重影响人类的健康与生存^[1,2]. 对于白血病克隆形成的进程

现存在很多假说, 通常认为是单一造血干祖细胞来源恶变产生白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs). 而LSCs的存在正是目前白血病难治和复发的关键因素, 所以研究LSCs对于探索白血病的生物学特性具有重要意义^[3].

MLL (mixed lineage leukemia)重排白血病是一类

引用格式: 陈仰鹏, 郭惠东, 初雅婧, 等. *MLL-NRIP3*融合基因诱发白血病的生物学特性研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1375–1385
Chen Y P, Guo H D, Chu Y J, et al. Biological characterization of *MLL-NRIP3* fusion gene induced leukemia (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1375–1385, doi: [10.1360/N052017-00267](https://doi.org/10.1360/N052017-00267)

具有独特生物学行为的白血病. 11q23染色体易位导致 *MLL* 基因重排, 使 *MLL* 基因与其他基因发生融合, 进而表达 *MLL* 融合蛋白^[4]. 研究表明, 无论在急性淋巴细胞白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) 还是在急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 中, *MLL* 融合是一个严重不良预后的因素, 所以 *MLL-r* 研究尤为重要^[5-7]. *MLL* 融合蛋白存在多种形式, 但其中有5种融合蛋白占整体比例超过2/3, 包括: t(4;11) (*MLL-AF4*), t(9;11) (*MLL-AF9*), t(10;11) (*MLL-AF10*), t(11;19) (*MLL-ENL*) 和 t(11;19) (*MLL-ELL*)^[8-10]. 为了方便对不同类型的 *MLL-r* 白血病的研究, 已有文献根据白血病中 LSCs 的数目、比例将 *MLL-r* 白血病人分为高 LSCs 富集型 *MLL-r* 和低 LSCs 富集型 *MLL-r*^[11]. LSCs 被认为是白血病复发、难治的关键性因素, 也是影响白血病疾病进程和白血病细胞增殖性和侵袭性的关键细胞^[12,13], 为了更好地研究 LSCs, 需要对这一群细胞进行精准富集、鉴定, 从而筛选出针对 LSCs 的特异分子标志, 用于靶向治疗. 但目前富集 LSCs 的表面分子标志尚有分歧. 文献报道的较为成熟的 LSCs 表面分子标志有两套: 一套表面分子标志是在白血病细胞群中按照正常造血系统中的粒系单核系祖细胞 GMP 的表面分子, 即 Lin⁻Sca-1⁻IL-7R⁻c-Kit⁺CD34⁺FcγRII/III⁺ 进行标记, 简称 L-GMP^[14]; 另一套表面分子标志标记的是 c-kit⁺Gr-1⁻ 细胞群, 简称 K⁺G⁻^[15]. 本文将使用这两种方法检测 LSCs 比例及数目.

2009年, Erasmus MC Sophia Children's Hospital 等机构发现了全球首例新型 *MLL* 基因重排类型, 即 *MLL-NRIP3*^[16]. 本课题组及其他课题组发现, *MLL-NRIP3* 融合基因在体外同样具有使正常造血干祖细胞恶性转化为白血病细胞的能力, 并验证了 *MLL-NRIP3* 在小鼠 (*Mus musculus*) 模型中所诱发的确为急性髓系白血病^[17,18], 但 *MLL-NRIP3* 其本身是否具有与其他 *MLL-r* 相似的基本生物学特性尚未阐述清晰. 因此, 全面认识这一新的 *MLL* 基因重排类型, 丰富对 *MLL-r* 的理解, 研究 *MLL-NRIP3* 白血病的生物学特性显得尤为重要.

为了更好地研究 *MLL-NRIP3* 白血病, 本文主要以研究比较成熟的 *MLL-AF9* 白血病作为对照, 在 *MLL-NRIP3* 和 *MLL-AF9* 白血病受体小鼠模型中, 观察 *MLL-NRIP3* 和 *MLL-AF9* 白血病小鼠生存期, 并通过极限稀释试验^[15,19,20] 和流式分析检测 LSCs 的比例、数目和功能. 同时通过流式分析 *MLL-NRIP3* 和 *MLL-AF9* 白血病

细胞周期、凋亡等基本生物学特征.

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

实验小鼠: C57BL/6J (白细胞抗原表型为 CD45.2); B6-Ly5.2; B6.SJL (白细胞抗原表型为 CD45.1); B6-Ly5.1. 细胞系: 293T 细胞系.

实验试剂: 0.25% 胰蛋白酶 (Trypsin, 含 EDTA): 为 Gibco 产品 (美国); MethoCult™ M3231 (CFC 培养基): 为 Stem cell technologies 产品 (美国); DMSO: 为 Sigma-Aldrich 产品 (美国); Lipofectamine 2000 (转染试剂): 为 Invitrogen 产品 (美国); Polybrene: 为 Sigma-Aldrich 产品; Retronectin: 为 TaKaRa 产品 (日本); mSCF, mIL-3, mIL-6, mGM-CSF 等细胞因子: 来自 Pepro Tech 产品 (美国); CD3 (145-2C11): PE-Cy7, Biotin, PE; CD4 (GK1.5 or RM4-5): PE-Cy7, Biotin; CD8a (53-6.7): PE-Cy7, Biotin; B220 (RA3-6B2): PE-Cy7, Biotin, PerCP-Cy5.5; Mac-1 (M1/70): PE-Cy7, Biotin, Alexa Fluor 780; Gr-1 (RB6-8C5): PE-Cy7, Biotin, PE Sca-1 (D7): PE, PE-Cy7, Biotin; c-Kit (2B8): APC, PE, PE-Cy7; CD34 (RAM34): APC, FITC, BV421.

实验仪器: 超净台: 北京东联哈尔仪器制造有限公司; CO₂ 细胞培养箱: Thermo, 德国; 荧光倒置显微镜 TE2000-S: Nikon, 日本; 普通倒置显微镜: Nikon; 常温台式离心机: Thermo; 小型离心机 (Micro one): Tomy, 日本; 涡旋震荡器 (VORTEX): Scientific Industries, 美国; 小摇床: 培英, 苏州; 超纯水系统: Millipore, 德国/ELGA; 普通 PCR 仪: Bio-Rad/ABI, 美国; 流式: LSR II/LSR Fortessa/Canto II/Aria III/Influx: BD, 美国.

1.2 病毒包装及滴度测定

复苏 293T 细胞培养箱中培养, 当 293T 细胞汇合度达到 80%~90% 时 1:3 传代. 配备质粒和 lipofectamine 2000 混合液: 15 μg 质粒体系: MSCV-*MLL-AF9*-GFP/MSCV-*MLL-NRIP3*-GFP: 30 μL Lipofectamine 2000+500 μL OPTI-MEM 室温静置 5 min; 15 μg 质粒 (MSCV-*MLL-AF9*-GFP/MSCV-*MLL-NRIP3*-GFP 7 μg; Pkat 5 μg; VSVG 3 μg)+500 μL OPTI-MEM. 将质粒和 Lipofectamine 2000 混合液轻轻混匀, 室温静置 20 min. 将 10 cm² 皿中培养基更换为 5 mL 新鲜

DMEM+10% FBS; 将质粒混合液逐滴加入10 cm²皿中, 1 mL/皿, 混匀, 37℃ 5% CO₂培养箱培养; 在培养48 h后于荧光显微镜下观察是否有荧光, 并且细胞是否发生融合, 融合细胞为产毒细胞; 分别在培养后48和72 h用0.45 μm滤器过滤收集病毒上清。在6孔板中接种293T细胞, 1×10⁵细胞/孔; 24 h后按: 原液, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000的方案对病毒进行稀释, 将病毒加入孔中, 并加入Polybrene至终浓度为6 g/mL, 继续在培养箱中培养; 感染后48 h, 收集感染的细胞, 用流式检测GFP阳性率。按照如下公式进行滴度计算: 病毒滴度(TU/mL)=GFP⁺细胞%×Day 1接种的293T细胞数×稀释倍数×病毒原液体积(mL); 感染复数MOI=TU×Volume/待感染细胞数目。

1.3 小鼠骨髓c-Kit⁺细胞富集

处死小鼠, 75%乙醇溶液浸泡消毒, 使用高压消毒后的手术器械及无菌纱布取小鼠双侧后肢骨, 分离出胫骨、股骨和髌骨。使用1 mL注射器在3 mL PBE液体中从骨两端反复冲洗骨髓腔获取骨髓细胞; 将收集的骨髓细胞用300目尼龙膜过滤, 而后4℃, 450×g离心5 min, 弃上清; 每10⁸细胞加入10 μL CD117 Microbeads, 混匀冰上静置15 min; 每10⁸细胞加入3 mL PBE Buffer洗一次, 4℃, 450×g离心5 min, 弃上清, 每10⁸细胞用500 μL PBE Buffer重悬; 将细胞悬液加入LS柱中, 重力作用自然流尽; 向LS柱中加入3 mL PBE Buffer, 用活塞快速推出吸附于柱子上的细胞, 收集于15 mL离心管中。

1.4 病毒感染c-Kit⁺细胞

配 *MLL-NRIP3/MLL-AF9* 感染用培养基: IMDM+15% FBS+Cytokine (mSCF 50 ng/mL, mIL-3 10 ng/mL, mIL-6 10 ng/mL); Retronectin (10 μg/孔)包被的Non-tissue culture treated 24孔板; 预刺激: c-Kit⁺细胞4℃, 450×g离心5 min, 弃上清, 用适量感染用培养基(含mSCF 50 ng/mL, mIL-3 10 ng/mL, mIL-6 10 ng/mL)重悬, 保证每孔5×10⁵~1×10⁶细胞, 体积为0.5 mL; 加入*MLL-NRIP3/MLL-AF9*病毒, 1.5 mL病毒/孔, 再加入polybrene至终浓度6 μg/mL; 将24孔板33℃, 650×g离心90 min; 培养48 h后, 收集感染后的细胞, 检测GFP⁺比例; 将感染后的细胞移植致死剂量(9.5Gy)照射小鼠, 保证每只小鼠移植的GFP⁺细胞数目不少于2×10⁵, 同时GFP⁺细胞可作为保护细胞共移植; 移植后定期观

察小鼠状态。移植后两周可取尾血检测GFP⁺细胞比例。当小鼠濒危, 处死小鼠, 冻存细胞。

1.5 AML模型的建立

受体小鼠处理: 实验中所用受体小鼠除特殊注明外均为8~10周CD45.2雌鼠。移植前一天至移植后一周内饮水中加抗生素(拜诺欣), 给予亚致死剂量(4.5Gy)照射后4~12 h内进行移植实验。

尾静脉移植: 用适量PBS重悬AML细胞, 每只受体小鼠移植1×10⁴~1×10⁵细胞, 注射体积为400 μL/只。

1.6 细胞迁移实验与细胞黏附实验

细胞接种: Transwell小室内(上层室): N个细胞/100 μL体积, 细胞培养于1% FBS的IMDM中; 下层室: 10% FBS的IMDM 500 μL; 顺序应为: 先加下层500 μL 10% FBS的IMDM培养液, 放入5或8 μm孔径的transwell, 再加入100 μL含1% FBS的IMDM细胞悬液; 37℃孵育4或6 h, 流式检测下层细胞数目。

用PBS将Fibronectin (1 μg/μL)稀释为50 ng/μL (1:20稀释), 然后在96孔板中每孔加入100 μL稀释后的Fibronectin, 4℃放置18 h; 用预冷PBS洗一遍, 0.2% BSA (PBS配)室温封闭2 h; 将培养于1% FBS IMDM中的细胞悬液种于处理过的96孔板中, 分别选取时间间隔(30 min, 45 min, 1 h, 2 h)用PBS100 μL洗3~5次; 用5 mmol/L EDTA洗下黏附细胞, 流式上机分析(5 mmol/L EDTA配制: 10 mL PBS+0.1 mL 0.5 mol/L EDTA)。

1.7 AML细胞凋亡检测

每管样品管中加入5×10⁶/50 μL细胞, 同时配5个单阳管, 每管10⁶/50 μL细胞; 样品管中加入表面Marker抗体(加入1 μL Mac-1, 1 μL CD117, 1 μL Gr-1, 5 μL Annexin V, 5 μL 7-AAD), 每个单阳管中加入相应抗体(分别加入1 μL Mac-1, 1 μL CD117, 1 μL Gr-1, 5 μL Annexin V, 5 μL 7-AAD), 冰上孵育30 min; 每管加入1 mL Binding Buffer洗一遍, 4℃, 450×g离心5 min; 弃上清, 留约50 μL液体, 每管样品管中加入5 μL APC Annexin V和5 μL 7-AAD。Annexin V和7-AAD单阳管中加入各自抗体5 μL, 混匀后室温避光孵育15 min; 每管加入300 μL Binding Buffer重悬, 过300目尼龙膜, 1 h内上机检测。

1.8 AML细胞周期(Ki67)检测

样品管中加入 $5 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ 细胞(破膜剂使用BD IntraSure Kit),同时配5个单阳管,每管 $10^6/50 \mu\text{L}$ 细胞;样品管中加入表面Marker抗体(加入 $1 \mu\text{L}$ Mac-1, $1 \mu\text{L}$ CD117, $1 \mu\text{L}$ Gr-1),单阳管中加入相应抗体(分别加入 $1 \mu\text{L}$ Mac-1, $1 \mu\text{L}$ CD117, $1 \mu\text{L}$ Gr-1),冰上孵育30 min;管加入 $100 \mu\text{L}$ Reagent A混匀,室温避光放置5 min;管加入 1 mL BD FACS lysing buffer (固定裂红液),室温避光孵育10 min, 4°C , $800 \times g$ 离心5 min,弃上清,留约 $50 \mu\text{L}$ 液体;管加入 $50 \mu\text{L}$ Reagent B,样品管中加入APC-Ki67 $5 \mu\text{L}$, FITC单阳管中加Ki67 $1 \mu\text{L}$,室温避光孵育30 min;每管加入 1 mL PBE洗一遍, 4°C , $800 \times g$ 离心5 min,弃上清。 $300 \mu\text{L}$ 重悬。过 $300 \mu\text{m}$ 尼龙膜至流式管中。上机前加Hoechst 33342终浓度至 $10 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 。

1.9 极限稀释实验

受体小鼠处理:实验中所用受体小鼠除特殊注明外均为8~10周CD45.2雌鼠。移植前一天至移植后一周内饮水中加抗生素(拜诺欣),给予亚致死剂量(4.5Gy)照射后4~12 h内进行移植实验。

尾静脉移植:流式分选AML细胞,用适量的PBS重悬AML细胞并以下梯度剂量:10000, 5000, 1000, 100细胞静脉移植到预处理小鼠体内,记录小鼠生存情况。通过ELDA software进行极限稀释分析,绘制泊松分布图。

2 结果

2.1 *MLL-NRIP3*和*MLL-AF9*白血病细胞在受体小鼠模型中的功能特性比较

为研究*MLL-NRIP3*白血病细胞生物学特性,设置了非照射和照射两种受体小鼠模型,分别移植 1×10^5 和 1×10^4 个细胞,观察其发病情况,并记录生存期。结果显示,在非照射受体小鼠模型中,移植两种细胞梯度的*MLL-NRIP3*白血病小鼠的生存期都较*MLL-AF9*白血病小鼠明显延长。另外,在亚致死剂量(4.5Gy)照射受体小鼠模型中,移植 1×10^5 个细胞的*MLL-NRIP3*白血病小鼠的生存期与*MLL-AF9*白血病小鼠生存期无显著性差异,而移植 1×10^4 个细胞的*MLL-NRIP3*白血病小鼠的生存期较*MLL-AF9*白血病小鼠明显延长,与非照射受体小鼠模型的结果一致。

图1 两种白血病小鼠的生存曲线图

A: 非照射小鼠移植不同剂量细胞(左: 1×10^5 ; 右: 1×10^4)后两种白血病小鼠的生存曲线图; B: 亚致死剂量照射小鼠移植不同剂量细胞(左: 1×10^5 ; 右: 1×10^4)后两种白血病小鼠的生存曲线图。NRIP3: *MLL-NRIP3*; AF9: *MLL-AF9*。后文图表中述及*MLL-NRIP3*和*MLL-AF9*均使用简写

2.2 检测 *MLL-NRIP3* 和 *MLL-AF9* 白血病细胞迁移和黏附能力

图1显示 *MLL-NRIP3* 白血病小鼠的生存期总体较 *MLL-AF9* 白血病小鼠延长, 造成两者生存期差异可能与白血病进程的急缓有关, 而决定白血病进程的急缓主要可能与其侵袭能力和增殖能力有关, 即 *MLL-NRIP3* 与 *MLL-AF9* 白血病细胞在白血病受体模型中可能存在着侵袭性和增殖能力的差异. 为此进行迁移试验、黏附试验和体内归巢实验, 寻找 *MLL-NRIP3* 与 *MLL-AF9* 白血病细胞在受体小鼠模型侵袭性差异的来源. 图2结果可见, 当接种 5×10^5 或 1×10^6 个细胞时, *MLL-NRIP3* 白血病细胞体外迁移能力较 *MLL-AF9* 白血病细胞弱, 尽管其黏附能力较 *MLL-AF9* 白血病细胞强. 而两种模型的白血病细胞在体内归巢能力无显著性差异.

2.3 *MLL-NRIP3* 和 *MLL-AF9* 白血病干细胞数目的检测

MLL-NRIP3 与 *MLL-AF9* 白血病细胞在侵袭性和增殖能力方面差异的原因, 也可能与两者 LSCs 比例、数目差异有关^[13]. 而 LSCs 比例和数目亦是两个白血病模型比较的关键. 已报道 L-GMP 和 K^+G^- 可作为 *MLL-AF9* 白血病中 LSCs 的表面分子标志, 并通过极限稀释实验

证实两套表面分子标志分选得到的细胞群确实是 LSCs, 但这两套表面分子标志是否同样适用于 *MLL-NRIP3* 白血病细胞尚未见报道. 因此, 根据上述两套表面分子标志, 检测 *MLL-NRIP3* 和 *MLL-AF9* 模型中 LSCs 的比例(图3A和C), 验证两套表面标志在 *MLL-NRIP3* 白血病细胞中是否依旧能作为 LSCs 细胞群的表面标志, 并与 *MLL-AF9* 的 LSCs 进行对比. 图3B显示 *MLL-NRIP3* 白血病小鼠脾脏细胞的 L-GMP 比例显著低于 *MLL-AF9* 白血病小鼠脾脏细胞. 如图3C显示, 当 K^+G^- 作为检测 LSCs 表面标志时, 无论在骨髓(BM)还是在脾脏(SP)中, *MLL-NRIP3* 中的 LSCs 比例都高于 *MLL-AF9* 的 LSCs 比例. 而且, 在骨髓中 *MLL-NRIP3* 中的 LSCs 绝对数高于 *MLL-AF9* 的 LSCs 绝对数. 可见两套表面分子标志实验得到的结论相悖. 为进一步明确结论相悖的原因, 依据 c-Kit 与 Gr-1 这套表面标志将细胞分为 K^+G^+ , K^+G^- , K^-G^+ , K^-G^- 4 个组别. 图3D显示, 无论在骨髓和脾脏中, *MLL-NRIP3* 组的 K^+G^- 确是比 *MLL-AF9* 的 K^+G^- 的比例高. 但 *MLL-AF9* 组的 K^+G^+ 比例却反而比 *MLL-NRIP3* 组 K^+G^+ 高, 综上所述, L-GMP 作为表面分子标志时, *MLL-NRIP3* 白血病中 LSCs 比例明显少于 *MLL-AF9* 白血病; 而 K^+G^- 这套表面标志暂时无法确定是否能反映 *MLL-NRIP3* 白血病 LSCs 真实的数目和比例.

图2 白血病细胞迁移和黏附能力

A: 两种白血病模型细胞在迁移试验中, 完成迁移的细胞数目; B: 两种白血病模型细胞在黏附试验中, 完成黏附的细胞数目; C: 两种白血病模型细胞在归巢实验中, 归巢细胞的比例. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

图3 两个模型白血病干细胞数目的检测

A: 两个模型中L-GMP作为表面标志的流式图; B: 两个模型中L-GMP作为表面标志时骨髓和脾脏对应的比例; C: 显示当 K^+G^- 为检测LSCs表面标志两个模型的流式图和对应LSCs比例, 以及LSCs在骨髓中的绝对数; D: 两种模型中骨髓和脾脏 K^+G^- , K^+G^+ , K^-G^+ , K^-G^- 4个不同的细胞群组的构成百分比柱形图. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

2.4 *MLL-NRIP3*和*MLL-AF9*白血病干细胞功能特性的比较

由于L-GMP与 K^+G^- 两组LSCs表面标志在两个模型中得出了不同的分析结果, 因此进一步通过极限稀释实验分析*MLL-AF9*和*MLL-NRIP3*两个模型中LSCs的富集情况. 极限稀释结果(图4A和B)表明, 在*MLL-NRIP3*中2240个白血病细胞中大约含有1个LSC, 而在*MLL-AF9*中1082个白血病细胞中大约含有1个LSC, 即*MLL-NRIP3*白血病中LSCs比例较*MLL-AF9*白血病少, 说明*MLL-NRIP3*白血病相对于*MLL-AF9*白血病是低LSCs富集型. 并且, 当L-GMP作为表面标志检

测LSCs比例时所获得的结果与此次极限稀释结果一致, 进一步证明*MLL-NRIP3*白血病相对于*MLL-AF9*白血病是低LSCs富集型*MLL-r*这一结论. 然而, 使用 K^+G^- 这套表面标志检测LSCs比例时所得结果仍与此次极限稀释结果相悖, 故评估了c-Kit和Gr-1这套表面分子标志分选所得细胞的功能, 并对分选得到的细胞群进行体外克隆形成试验. 如图4C所示, 尽管*MLL-NRIP3*白血病细胞的 K^+G^- 比例和绝对数高于*MLL-AF9*白血病细胞, 但*MLL-NRIP3*白血病组体外克隆形成的数目却较*MLL-AF9*白血病组少, 再次验证了*MLL-NRIP3*白血病相对于*MLL-AF9*白血病是低LSCs富集型*MLL-r*.

图 4 白血病小鼠模型极限稀释实验和克隆形成实验

A和B: *MLL-r*白血病小鼠模型极限稀释实验结果; C: *MLL-r*白血病小鼠模型分选K⁺G⁺, K⁺G⁻, K⁻G⁺, K⁻G⁻克隆形成实验结果, 以及*MLL-r*白血病小鼠模型K⁺G⁺, K⁺G⁻, K⁻G⁺, K⁻G⁻克隆结晶紫染色. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

2.5 *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病干细胞周期检测

本课题组已在上述实验对*MLL-NRIP3*和*MLL-AF9*白血病模型中LSCs的数目、比例和功能已进行了检测, 为阐明两者LSCs表型差异的原因, 同时为了进一步检测*MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病在周期、凋亡异同, 分析了两个模型的细胞周期和细胞凋亡的情况. 由图5B (图5B即是图5A中细胞周期各期分布比例的柱形统计图)可以看出, 在骨髓中, 两种白血病模型的LSCs在G₀期和G₂/S/M期中分布无显著性差异, 仅在G₁期中差异有统计学意义. 在脾脏中, 两种白血病模型的LSCs在G₀, G₁期和G₂/S/M期均无显著性差异. 无论在骨髓还是脾脏中, 两种白血病模型的非LSCs白血病细胞的细胞周期亦无显著性差异. 由此推断, 无论是在骨髓中还是在脾脏中, 两种白血病模型的白血病细胞的细胞周期分布无显著性差异.

2.6 *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病干细胞凋亡检测

图6B (图6B即是图6A中细胞凋亡比例的柱形统计

图)显示, 无论是在骨髓中还是在脾脏中, *MLL-NRIP3*白血病LSCs凋亡比例较*MLL-AF9*白血病LSCs的低, 但差异无统计学意义.

3 讨论

急性白血病作为儿童时期最常见的恶性肿瘤以及它在成人中日渐提高的发病率都充分说明了其在人类疾病谱中已经占据相当重要的位置^[21,22]. 白血病的发生是多个基因突变, 多种机制参与的. 对于急性髓系白血病而言, 现已经明确一类遗传学打击产生的*MLL*蛋白异常可导致造血细胞分化发育障碍. 其中, 2009年发现的新型*MLL*重排: *MLL-NRIP3*白血病具有独特的生物学特性. 而*NRIP3*基因除了在*MLL-r*中发挥重要作用外, 也参与其他肿瘤性疾病的发生、发展, 如*PIK3CA*突变乳腺癌中*NRIP3*基因mRNA的相对表达量较非*PIK3CA*突变乳腺癌显著增高^[23]; 在雄激素依赖前列腺癌中*NRIP3*基因也呈现高水平表达^[24]. 另外, *NRIP3*基因还与其他恶性肿瘤如胶质母细胞瘤、肺癌等密切相关^[25,26]. 故*NRIP3*基因在恶性肿瘤中的作用机制的探索意义重大, 研究*MLL-NRIP3*白血病亦

图5 LSCs细胞周期检测

A: *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病小鼠模型LSCs细胞周期检测的流式图; B: *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病小鼠模型LSCs细胞周期检测中各期比例的柱形图; C: *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病小鼠模型非LSCs细胞周期检测的流式图; D: *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病小鼠模型非LSCs细胞周期检测中各期比例的柱形图。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

显得尤为重要。2014年,本课题组及其合作者^[17]共同发现*MLL-NRIP3*融合基因在体外同样具有使正常造血干祖细胞恶性转化为白血病细胞的能力,并成功建立了*MLL-NRIP3*白血病(急性髓系白血病)小鼠模型。

本研究通过已成功建立的*MLL-NRIP3*和*MLL-AF9*白血病小鼠模型,对两者的生物学特性进行比较和研究。首先,通过观察非照射和亚致死剂量照射白血病

受体小鼠模型生存期的差异,发现*MLL-NRIP3*白血病小鼠的生存期都较*MLL-AF9*白血病小鼠明显延长,而生存期差异可能部分源于这两种白血病细胞侵袭性和增殖能力等的不同。其次,已知*MLL-r*白血病模型中可以按照其含有LSCs的数目分为高LSCs富集型*MLL-r*和低LSCs富集型*MLL-r*^[11,27]。而L-GMP和K⁺G⁻可作为*MLL-AF9*白血病中LSCs的表面分子标志并通过极限

图 6 LSCs细胞凋亡检测

A: *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病小鼠模型LSCs细胞凋亡检测的流式图; B: *MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病小鼠模型LSCs细胞凋亡检测比例的柱形图

稀释实验来验证两套表面分子标志分选得到的细胞群是否是LSCs^[14,15]。通过此方法, 选用L-GMP和K⁺G⁻分群, 通过不同实验, 比较研究了*MLL-NRIP3*和*MLL-AF9*白血病骨髓和脾脏中的LSCs, 确定了*MLL-NRIP3*白血病相对于*MLL-AF9*白血病是低LSCs富集型*MLL-r*, 这也可能是*MLL-NRIP3*白血病小鼠的生存期较*MLL-AF9*白血病小鼠明显延长的原因。而*MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病模型中的LSCs在细胞周期和凋亡两方面的生物学特性基本一致, 排除这两方面生物学特性对白血病小鼠生存期差异的影响。

本课题组此前的工作发现, 在*MLL-NRIP3*与*MLL-AF9*白血病模型中敲除*Rictor*基因会导致LSCs的耗竭, 并最终终止*MLL-r*发生^[18]。这与运用高LSCs富集型*MLL-r*和低LSCs富集型*MLL-r*的分类方法解释两种模型生存期差异的结论吻合。有意思的是, 在体内试验中^[17]单纯使用*MLL-NRIP3*基因融合虽然能导致白血病的发生, 但也需要经历较长一段时间才能发生。随后作者证实了下调*SETD2*是协同*MLL-NRIP3*融合白血病基因激活的协同分子级联事件, 表明*MLL-NRIP3*白血病与*SETD2*-H3K36me3信号通路间的关联。但目前尚未有针对*SETD2*变异在非*MLL-r*中的白血病发生的相关研究, 这一研究, 可能会完善对*MLL*融合基因

-*SETD2*-H3K36me3信号通路的认识和理解^[28]。另外, 本研究发现, K⁺G⁻这套表面标志不能确切反映LSCs的比例和数目, 虽然进行了极限稀释实验和体外克隆形成实验对LSCs功能进行阐明, 但未对K⁺G⁻这套表面分子标志分析LSCs比例、数目与L-GMP分析结果相悖原因进行探究。如果想进一步解决该问题, 需要在后续实验中增加克隆形成实验和极限稀释实验的样本量, 并结合干细胞多药耐药相关蛋白进行干细胞分离等方法, 确定K⁺G⁻是否能反映*MLL-NRIP3*白血病LSCs的真实比例和数目。如K⁺G⁻确实不能反映*MLL-NRIP3*白血病LSCs的真实比例和数目, 与L-GMP分析结果相悖也就可能发生。另外, 还可以寻找其他合适表面分子标志与K⁺G⁻这套表面分子标志进行配伍, 并在极限稀释实验中验证何种表面分子标志能反映LSCs比例和数目, 完善K⁺G⁻这套表面分子标志。

4 结论

研究表明, *MLL-NRIP3*白血病相对于*MLL-AF9*白血病是属于低LSCs富集型*MLL-r*; *MLL-NRIP3*白血病细胞迁移能力较*MLL-AF9*白血病细胞差, 但黏附能力反较*MLL-AF9*白血病细胞强; 而两者在细胞周期和细胞凋亡两方面生物学特性基本一致。

参考文献

- 1 Löwenberg B, Downing J R, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1999, 341: 1051–1062
- 2 Beutler E L M, Collier B S, et al. Williams Hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill Education, 2004
- 3 Dick J E. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 44–46
- 4 Coenen E A, Raimondi S C, Harbott J, et al. Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 *de novo* pediatric 11q23/MLL-rearranged AML patients: results of an international study. *Blood*, 2011, 117: 7102–7111
- 5 Cozzio A, Passegue E, Ayton P M, et al. Similar mll-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*, 2003, 17: 3029–3035
- 6 Schoch C, Schnittger S, Klaus M, et al. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood*, 2003, 102: 2395–2402
- 7 Liedtke M, Cleary M L. Therapeutic targeting of MLL. *Blood*, 2009, 113: 6061–6068
- 8 Slany R K. When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematol Oncol*, 2005, 23: 1–9
- 9 Krivtsov A V, Armstrong S A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 823–833
- 10 Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*, 2013, 27: 2165–2176
- 11 Somervaille T C, Cleary M L. Grist for the MLL: how do MLL oncogenic fusion proteins generate leukemia stem cells? *Int J Hematol*, 2010, 91: 735–741
- 12 Wong S H K, Goode D L, Iwasaki M, et al. The H3K4-methyl epigenome regulates leukemia stem cell oncogenic potential. *Cancer Cell*, 2015, 28: 198–209
- 13 Wang Y, Cheng Q, Liu J, et al. Leukemia stem cell-released microvesicles promote the survival and migration of myeloid leukemia cells and these effects can be inhibited by microRNA34a overexpression. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1–8
- 14 Krivtsov A V, Twomey D, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 2006, 442: 818–822
- 15 Wang Y, Krivtsov A V, Sinha A U, et al. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*, 2010, 327: 1650–1653
- 16 Balgobind B V, Zwaan C M, Meyer C, et al. NRIP3: a novel translocation partner of MLL detected in a pediatric acute myeloid leukemia with complex chromosome 11 rearrangements. *Haematologica*, 2009, 94: 1033–1033
- 17 Zhu X, He F, Zeng H, et al. Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. *Nat Genet*, 2014, 46: 287–293
- 18 Fang Y, Yang Y, Hua C, et al. Rictor has a pivotal role in maintaining quiescence as well as stemness of leukemia stem cells in MLL-driven leukemia. *Leukemia*, 2017, 31: 414–422
- 19 Ploemacher R E, van der Sluijs J P, Voerman J S, et al. An *in vitro* limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood*, 1989, 74: 2755–2763
- 20 Szilvassy S J, Humphries R K, Lansdorp P M, et al. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 8736–8740
- 21 Sandler D P, Ross J A. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol*, 1997, 24: 23–16
- 22 Mejia-Aranguré J M, McNally R J Q. Acute leukemia in children. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1–2
- 23 Cizkova M, Cizeron-Clairac G, Vacher S, et al. Gene expression profiling reveals new aspects of PIK3CA mutation in ERalpha-positive breast cancer: major implication of the Wnt signaling pathway. *PLoS ONE*, 2010, 5: e15647
- 24 Stanbrough M, Bubley G J, Ross K, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*, 2006, 66: 2815–2825
- 25 Dong H, Luo L, Hong S, et al. Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol*, 2010, 4: 163
- 26 Brzezińska E, Dutkowska A, Antczak A. The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 309–325
- 27 He J, Nguyen A T, Zhang Y. KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2011, 117: 3869–3880
- 28 Fontebasso A M, Schwartzentruber J, Khuong-Quang D A, et al. Mutations in *SETD2* and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol*, 2013, 125: 659–669

Biological characterization of *MLL-NRIP3* fusion gene induced leukemia

CHEN YangPeng, GUO HuiDong, CHU YaJing, ZHU XiaoFan, CHENG Tao & YUAN WeiPing

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Leukemia, originating from hematopoietic stem or progenitor cells, is a malignant proliferative tumor which seriously endangers human health and survival. It is the most common childhood malignancy with an increasing proportion of malignancy in adults. Acute myeloid leukemia (AML) involving *MLL* (mixed lineage leukemia, *MLL-r*) translocation is recognized as an aggressive form of hematopoietic malignancies that exhibit a blockade of differentiation, disruption of genetic and epigenetic regulation, and poor prognosis. Although *MLL-NRIP3* fusion gene has been reported recently in establishing leukemia mouse model and its effect on leukemia progression in *MLL-r* mouse model has also been demonstrated, its leukemia biological characteristics were still not well characterized. Here we investigate the basic biological phenotypes of two *MLL-r* mouse models (*MLL-AF9* and *MLL-NRIP3*), including: the survival of recipient mice transplanted with leukemia cells; the migration and adhesion abilities of leukocyte cells; the number and the function of leukemia stem cells (LSCs), cell cycle and cell apoptosis, and investigate whether the surface markers of LSCs reported previously are equally applicable to *MLL-NRIP3* leukemia cells. The results showed that the survival time of *MLL-NRIP3* recipient mice was longer than that of *MLL-AF9*. The migration ability of *MLL-NRIP3* leukemia cells was less capable than *MLL-AF9*, while adhesion was stronger than *MLL-AF9* cells. Cell cycle and cell apoptosis of two *MLL-r* leukemia cells basically had no difference. *Colony-forming* unit assay and limiting dilution assay both revealed that *MLL-AF9* leukemia had a higher number of functional LSCs than *MLL-NRIP3*. In summary, *MLL-NRIP3* induced leukemia is a low LSCs-enriched *MLL-r*.

acute myeloid leukemia, *MLL-NRIP3*, *MLL-AF9*, biological phenotype analysis

doi: [10.1360/N052017-00267](https://doi.org/10.1360/N052017-00267)