

内皮细胞靶向的可溶性 Notch 配体 hD1R 蛋白对急性髓系白血病细胞增殖的影响

田登梅 梁英民 张永清

【摘要】 目的 探讨内皮细胞靶向的可溶性 Notch 配体 hD1R 蛋白对急性髓系白血病(AML)细胞增殖的影响。方法 以 24 例初诊 AML 患者为研究对象(AML 组),以 9 例白细胞或血小板计数低,但骨髓象未见异常者为对照(对照组),采用实时定量 PCR 法检测其骨髓 CD34⁺细胞 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1 mRNA 水平;诱导、表达及纯化内皮细胞靶向的可溶性 hD1R 融合蛋白。以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)作为支持细胞,联合应用重组人干细胞因子(SCF)、TPO、Flt-3 配体(FL)、IL-6、IL-3 五种人源性生长因子(5GF)及 hD1R 蛋白为共培养条件,分别将 AML 组和对照组的 CD34⁺细胞进行体外培养,分析在 hD1R 组、PBS 组(PBS 代替 hD1R)、5GF 组、 γ -分泌酶抑制剂(GSI)组(hD1R+GSI)4 种不同培养条件下 CD34⁺细胞增殖、凋亡情况。并用实时定量 PCR 法检测培养后的 AML 组和对照组细胞内 Hes1、Bcl-2 mRNA 表达。结果 ①与对照组相比,AML 组细胞 Notch1、Hes1 mRNA 水平明显下降,Notch4 mRNA 水平明显升高(P 值均 <0.05)。②在不同体外培养条件下,hD1R 组、PBS 组 AML 细胞总数分别为 $(0.74 \pm 0.13) \times 10^5$ 、 $(2.16 \pm 0.21) \times 10^5$,差异有统计学意义($t = 5.70, P < 0.01$)。③hD1R 组培养条件下,AML 组、对照组细胞凋亡率分别为 $(18.48 \pm 2.51)\%$ 、 $(3.19 \pm 0.58)\%$,差异有统计学意义($t = 5.94, P < 0.01$)。AML 组不同培养条件下细胞凋亡率比较,hD1R 组、5GF 组较 PBS 组明显升高(P 值均 <0.05),GSI 组较 hD1R 组明显降低($P < 0.05$)。④hD1R 蛋白明显上调 AML 细胞 Hes1 表达($P < 0.01$),下调抗凋亡基因 Bcl-2 表达($P < 0.05$)。结论 hD1R 蛋白可有效激活 AML 细胞内 Notch 信号,下调 Bcl-2 基因,抑制 AML 细胞增殖,促进细胞凋亡。

【关键词】 白血病,髓样,急性; hD1R 蛋白; Notch 信号; 细胞增殖; 细胞凋亡

基金项目:国家自然科学基金(81400075)

Effect of endothelial cell-targeted soluble Notch ligand hD1R protein on the proliferation of acute myeloid leukemia cells Tian Dengmei^{*}, Liang Yingmin, Zhang Yongqing^{*}. *Department of Hematology, The 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China*
Corresponding author: Zhang Yongqing, Email: zhangyongqing0725@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of endothelial cell-targeted soluble Notch ligand hD1R protein on the proliferation of acute myeloid leukemia (AML) cells. **Methods** The expression levels of Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Hes1 in bone marrow CD34⁺ cells from 24 cases of untreated AML (AML group) and 9 healthy controls (control group) were determined by real time quantitative polymerase chain reaction (PCR). Recombinant hD1R protein was first induced and purified. Bone marrow CD34⁺ cells were co-cultured on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) supplemented with a cocktail containing 5 types of human cytokines (5GF) and soluble hD1R. The cultured cells were tested under different culture conditions including PBS group (PBS replaces HUVEC), hD1R group, 5GF group, GSI group (hD1R plus GSI). Proliferation and apoptosis of cultured cells were also analyzed. Real time quantitative PCR was used to test the expression levels of Hes1 and Bcl-2 in cultured cells. **Results** The expression levels of Notch1 and Hes1 in primary AML patients were significantly lower, and Notch4 expression was higher compared to the control group ($P < 0.05$). Cell counting showed a remarkable decrease of AML cells number in the culture with hD1R compared with that in the PBS group [$(0.74 \pm 0.13) \times 10^5$ vs $(2.16 \pm 0.21) \times 10^5$, $P < 0.01$]. FACS analysis showed that the percentage of AML cells was

(18.48±2.51)% in apoptosis, which was higher than that of control cells (3.19±0.58)% after co-culture with hD1R. AML cells in the hD1R group underwent significantly increased apoptosis compared with those in the PBS one ($P < 0.05$). Moreover, apoptosis of AML cells in the GSI group was lower than that in the hD1R one ($P < 0.05$). Apoptosis in the PBS group also decreased compared with that in the 5GF one ($P < 0.05$). Finally, hD1R up-regulated Hes1 expression and inhibited Bcl-2 one in the AML cells. **Conclusion** hD1R effectively activated Notch signaling and down-regulated Bcl-2 mRNA in AML cells, which lead to cell apoptosis.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; hD1R protein; Notch signals; Cell proliferation; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81400075)

近年来,随着联合化疗和造血干细胞移植技术的发展,急性髓系白血病(AML)的疗效有了明显改善,但仅有35%~40%成年患者可获得长期生存,多数患者最终出现耐药、复发^[1-2]。因而深入研究其发病机制并寻找有效的治疗方法十分必要。

Notch 信号通路是进化上高度保守的信号途径,介导相邻细胞间的信号转导^[3]。造血细胞与造血微环境的基质细胞分别表达 Notch 受体和配体,激活 Notch 信号通路,对细胞增殖分化起着重要作用^[4]。研究显示 Notch 信号通路的异常与多种血液系统的恶性肿瘤如淋巴瘤、白血病等发病相关^[5-6]。我们在前期的研究中构建表达了一种新型内皮细胞靶向的可溶性融合蛋白 hD1R,由人 Notch 配体 Delta-like1 (hDll1)的截短体即 hDll1 第 127~225 位氨基酸和血管内皮细胞靶向蛋白质基序 RGD 组成。其中 RGD 是以精氨酸(R)-甘氨酸(G)-门冬氨酸(D)为核心的多肽,可以特异识别血管内皮细胞表面的整合素分子,从而将与之融合蛋白分子锚定于血管内皮细胞表面。同时我们也建立了以 hD1R 蛋白结合人脐静脉内皮细胞(HUVEC)及外源性生长因子为基础的共培养体系^[7-8]。本研究中我们在共培养体系的基础上,观察了 hD1R 蛋白对 AML 细胞增殖的影响,为 AML 的治疗提供实验依据。

对象与方法

一、研究对象

以 2015 年 12 月至 2016 年 6 月在我院初诊的 24 例 AML 患者为研究对象,其中男 14 例,女 10 例,中位年龄 45(18~65)岁。AML 患者同时采用 FAB 和 WHO 标准进行分型诊断^[9],其中 M₁ 1 例, M₂ 4 例, M₃ 2 例, M₄ 4 例, M_{4E} 2 例, M₅ 4 例,慢性髓性白血病急变期 4 例,骨髓增生异常综合征转白血病 3 例。以 9 例白细胞或血小板计数略低,但骨髓象未见异常者为对照,男 5 例,女 4 例,中位年龄 43(20~54)

岁。本研究得到患者及对照者知情同意并获得医院医学伦理委员会审批通过。

二、主要试剂与仪器

PrimeScript RT Reagent kit、SYBR Premix Ex Taq™ II 为日本 TaKaRa 公司产品, TRIzol 为美国 Invitrogen 公司产品, Human CD34 MicroBead Kit、MS 分选柱为德国 Miltenyi Biotec 公司产品,重组人干细胞因子(SCF)、TPO、Flt-3 配体(FL)、IL-6、IL-3 为美国 Peprotech 公司产品,人淋巴细胞分离液为碧云天生物技术有限公司产品, StemSpan™ 无血清培养液为加拿大 Stemcell 公司产品, M199、胎牛血清(FBS)为美国 Gibco 公司产品, γ -分泌酶抑制剂(GSI)、内皮细胞生长添加剂(ECGS)、II 型胶原酶为美国 Sigma 公司产品, FITC anti-human CD34、FITC anti-IgG 为美国 Biologend 公司产品, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒为美国 Biotech 公司产品。

三、实验方法

1. 重组 hD1R 融合蛋白诱导表达及纯化:表达载体 pET32a-hD1R 由空军军医大学遗传与发育教研室馈赠。蛋白纯化检验参照我们的前期研究^[10]。

2. HUVEC 的分离、培养:具体实验步骤参照我们的前期研究^[7-8]。

3. 骨髓 CD34⁺细胞分离、培养:采集患者及对照者骨髓 15 ml,肝素抗凝,样品采集后在 4 h 内分选。用淋巴细胞分离液(1.077 g/ml)分离单个核细胞。按照 Human CD34 MicroBead Kit 说明书进行分选。获得 CD34⁺细胞,冻存于 -80 °C 用于后续实验。

将冻存的 CD34⁺细胞解冻复苏,用 StemSpan™ 无血清培养液重悬,接种于含 HUVEC 作为支持细胞的 6 孔板中培养,细胞密度为 1×10^5 /ml,并加入 5 种重组人生长因子(5GF): TPO (20 ng/ml)、SCF (120 ng/ml)、FL (50 ng/ml)、IL-6 (5 ng/ml)、IL-3 (5 ng/ml),置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱

中培养,培养 48 h 后,收集悬浮细胞,经锥虫蓝染色法计算细胞活率,采用流式细胞术进行活细胞绝对计数。分别将 AML 组和对照组细胞按以下不同培养条件分组观察:①HUVEC+5GF+hD1R+CD34⁺细胞共同培养(hD1R 组);②HUVEC+5GF+PBS+CD34⁺细胞共同培养(PBS 组);③5GF+CD34⁺细胞共同培养(5GF 组);④HUVEC+5GF+hD1R+GSI+CD34⁺细胞共同培养(GSI 组)。在培养过程中使用 hD1R 的工作浓度为 2.5 μg/ml,使用 GSI 的工作浓度为 10 μmol/L。

4. 实时定量 PCR 检测基因 mRNA 水平:将 CD34⁺细胞在不同培养条件下培养 48 h 后,收集悬浮细胞,加 TRIzol 裂解细胞,按试剂说明提取细胞总 RNA,用实时定量 PCR 检测相关基因的 mRNA 水平。实时定量 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司设计并合成。引物序列见表 1。实时定量 PCR 条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 30 s,60 °C 延伸 34 s,共进行 45 个循环。每个样本设 3 个复孔,以 GAPDH 作为内参照。实验结果用 ABI 7500 软件进行分析,采用 2^{-ΔΔCt} 法表示。

5. 流式细胞术检测细胞凋亡率:收集体外培养 48 h 后悬浮细胞,流式液洗涤细胞。每管 5×10⁵ 细胞,加入所需流式抗体或 70%乙醇的固定液重悬细胞,4 °C 孵育 30 min,洗涤细胞 2 次,用 300 μl 流式液或 400 μl PI 溶液重悬细胞(PI 溶液:PI 50 μg/ml, RNaseA 100 μg/ml, TritonX-100 0.2%),上 BD FACS Calibur™ 流式细胞仪检测细胞凋亡率,将 Annexin

V⁺细胞定义为凋亡细胞。Cellquest 软件分析结果。

四、统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,两组间比较采用 *t* 检验,组间差异采用方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 骨髓 CD34⁺细胞 Notch 受体 mRNA 表达:通过实时定量 PCR 检测 Notch 受体 mRNA 在 AML 患者骨髓 CD34⁺细胞的表达,结果显示 AML 组 Notch1 mRNA 的表达水平明显低于对照组(*t* = 3.33, *P* = 0.005),而 Notch2、Notch3 mRNA 的表达水平与对照组比较差异无统计学意义(*P* 值均 > 0.05)。AML 组 Notch4 mRNA 的表达水平较对照组升高,差异有统计学意义(*t* = 2.15, *P* = 0.045)。Notch 信号靶基因 Hes1 mRNA 的表达水平 AML 组较对照组明显减低,差异有统计学意义(*t* = 3.81, *P* = 0.002)(表 2)。

2. 重组 Notch 配体 hD1R 蛋白对 AML 患者骨髓 CD34⁺细胞增殖的影响:CD34⁺细胞在不同条件下培养 48 h 后,收集悬浮细胞、计数。结果显示在 hD1R 培养条件下,AML 组细胞数较起始细胞数减少约 20%,而对照组细胞数较起始细胞数增加 1 倍以上。在 PBS 培养条件下,AML 组细胞数与对照组比较差异无统计学意义。AML 组细胞在 hD1R 培养条件下较 PBS 条件下细胞数明显减少,差异有统计学意义(*P* < 0.01)(表 3)。其次,在 hD1R 培养条件

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')		产物长度(bp)
	上游引物	下游引物	
GAPDH	CTTTTGCCTCGCCAGCCGAG	CCAGGCGCCCAATACGACCA	90
Notch1	GCCAGAGTGGACAGGTCAGT	ACACACACGCGAGTTGTAGCC	120
Notch2	CAGGCAGGATTTGATGGAGT	GGCACAAGCAAGAGAAGGAG	115
Notch3	TGGCGCCTCTTCAACAACA	ATCCCAGCCGCACTCCTC	189
Notch4	TGCCTCTGCCCTCTGGT	TGGCCTGTCTTCTGTGCTCT	106
Hes1	ACGACACCGGATAAACCAAAA	CCGCGAGCTATCTTCTTCA	147
Bcl-2	CCTGTCGATGACTGAGTACC	GAGACAGCCAGGAGAATCA	128

表 2 Notch 受体 mRNA 在急性髓系白血病(AML)患者骨髓 CD34⁺细胞中的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Notch1	Notch2	Nocth3	Nocth4	Hes1
AML 组	24	0.87 ± 0.17	1.41 ± 0.22	0.46 ± 0.09	0.58 ± 0.07	0.37 ± 0.06
对照组	9	1.99 ± 0.29	2.31 ± 0.41	0.53 ± 0.11	0.33 ± 0.09	0.83 ± 0.11
<i>t</i> 值		3.33	1.94	0.49	2.15	3.81
<i>P</i> 值		0.005	0.076	0.624	0.045	0.002

下加入 Notch 信号通路的阻断剂 GSI(GSI 组)后, AML 组细胞数较 hD1R 培养条件下明显增加($P < 0.05$),提示 GSI 可以逆转 hD1R 对 AML 细胞的作用。此外,我们也观察 HUVEC 对 AML 细胞增殖的影响,在仅有 5 种生长因子培养条件下(5GF 组),AML 组细胞数与仅有 HUVEC 联合 5 种生长因子(PBS 组)相比明显减低($P < 0.05$)。对照组细胞在不同培养条件下增殖的情况:hD1R 组较 PBS 组细胞数明显增加,加用 GSI 后,明显抑制了 hD1R 的扩增作用,与我们前期的结果是一致的(表 3)。

3. 细胞凋亡分析:hD1R 培养条件下 AML 组细胞凋亡率明显高于对照组($t = 5.94, P = 0.009$),在 PBS、5GF 培养条件下 AML 组与对照组细胞凋亡率差异无统计学意义(表 4,图 1)。在 hD1R 培养条件下加入 GSI 后 AML 组细胞凋亡率与对照组比较差

异无统计学意义。AML 组细胞不同培养条件组比较,hD1R 组细胞凋亡率明显高于 PBS 组,加用 GSI 后,细胞凋亡率明显降低,差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)。此外,我们也观察了 HUVEC 对 AML 细胞凋亡的影响,在 5GF 组 AML 细胞凋亡率较 PBS 组明显升高($P = 0.035$)。最后,我们也观察对照组细胞在不同培养条件下凋亡情况:hD1R 组与 PBS 组比较差异有统计学意义($P = 0.034$),加用 GSI 后,细胞凋亡率增加,hD1R 组与 GSI 组比较差异有统计学意义($P = 0.040$)。PBS 组较 5GF 组凋亡率虽有减低,但差异无统计学意义($P = 0.080$)(表 4)。

4. 实时定量 PCR 法检测细胞内 Hes1 mRNA 表达:为了解 hD1R 是否激活 AML 细胞内的 Notch 信号通路,我们采用实时定量 PCR 法检测了在不同培养条件下培养 48 h 后 AML 组细胞内 Hes1 mRNA 的

表 3 不同培养条件下骨髓 CD34⁺细胞增殖情况($\times 10^5/ml, \bar{x} \pm s$)

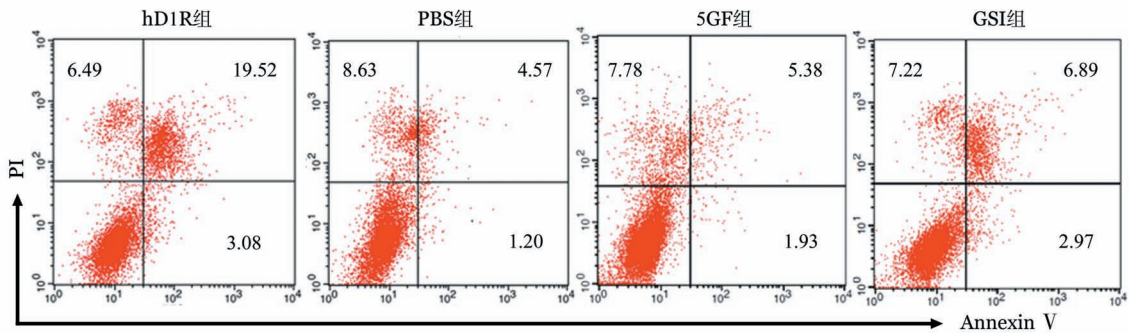
组别	例数	起始细胞数	hD1R 组	PBS 组	5GF 组	GSI 组
AML 组	24	1.00	0.74 \pm 0.13	1.55 \pm 0.19 ^a	1.10 \pm 0.10	1.47 \pm 0.14 ^b
对照组	9	1.00	2.16 \pm 0.21	1.36 \pm 0.11 ^b	1.01 \pm 0.05	1.41 \pm 0.15 ^b
<i>t</i> 值			5.70	1.10	0.82	0.28
<i>P</i> 值			0.005	0.323	0.458	0.790

注:AML:急性髓系白血病。hD1R 组:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)+五种人源性生长因子(5GF)+hD1R+CD34⁺细胞;PBS 组:HUVEC+5GF+PBS+CD34⁺细胞;5GF 组:5GF+CD34⁺细胞; γ -分泌酶抑制剂(GSI)组:HUVEC+5GF+hD1R+GSI+CD34⁺细胞。与 hD1R 组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

表 4 不同培养条件下骨髓 CD34⁺细胞凋亡情况($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	hD1R 组	PBS 组	5GF 组	GSI 组
AML 组	24	18.48 \pm 2.51	4.17 \pm 0.69 ^a	6.93 \pm 0.67 ^a	4.13 \pm 0.46 ^a
对照组	9	3.19 \pm 0.58	5.53 \pm 0.68 ^a	7.27 \pm 0.75	5.22 \pm 0.57 ^a
<i>t</i> 值		5.94	1.41	0.33	1.37
<i>P</i> 值		0.009	0.217	0.753	0.230

注:AML:急性髓系白血病。hD1R 组:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)+五种人源性生长因子(5GF)+hD1R+CD34⁺细胞;PBS 组:HUVEC+5GF+PBS+CD34⁺细胞;5GF 组:5GF+CD34⁺细胞; γ -分泌酶抑制剂(GSI)组:HUVEC+5GF+hD1R+GSI+CD34⁺细胞。与 hD1R 组比较,^a $P < 0.05$



hD1R 组:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)+五种人源性生长因子(5GF)+hD1R+CD34⁺细胞;PBS 组:HUVEC+5GF+PBS+CD34⁺细胞;5GF 组:5GF+CD34⁺细胞; γ -分泌酶抑制剂(GSI)组:HUVEC+5GF+hD1R+GSI+CD34⁺细胞

图 1 不同培养条件下急性髓系白血病细胞凋亡的典型流式分析图

表达水平。hDIR 组、PBS 组、GSI 组 Hes1 mRNA 的表达水平分别为 7.36 ± 0.69 、 0.81 ± 0.32 、 1.54 ± 0.50 ，hDIR 组明显高于 PBS 组 ($t = 12.18$, $P = 0.000$)。在 hDIR 组培养条件下加入 GSI 可明显抑制 Notch 信号通路下游基因 Hes1 的表达。提示 hDIR 通过靶向结合在 HUVEC 表面, 可有效激活 AML 细胞内的 Notch 信号。

5. 实时定量 PCR 法检测细胞内 Bcl-2 mRNA 表达: 为了解 hDIR 激活 AML 细胞内 Notch 信号促进细胞凋亡的原因, 我们采用实时定量 PCR 法检测了在不同培养条件下培养 48 h 后 AML 细胞内抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达水平。hDIR 组、PBS 组 AML 细胞内 Bcl-2 mRNA 的表达水平分别为 0.28 ± 0.07 、 0.72 ± 0.14 , hDIR 组明显低于 PBS 组 ($t = 2.77$, $P = 0.028$)。提示 hDIR 激活 AML 细胞内的 Notch 信号通路, 下调了抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达水平, 促进 AML 细胞凋亡。

讨 论

在造血系统中, Notch 信号通路通过造血微环境中细胞间的相互作用控制细胞命运。除了在生理条件下精确调控细胞的增殖、分化外, 在血液肿瘤细胞中, Notch 信号的异常激活起着不同的抑癌和促癌作用^[11]。研究显示, Notch 信号首先被证实可促进人类 T 淋巴母细胞白血病的发生发展^[5]。Notch 受体突变也被证实在成熟 B 细胞白血病及淋巴瘤发病中起重要作用^[6,12]。然而, Notch 信号在 AML 中的作用却颇有争议。Tohda 等^[13]研究显示 Notch-Jagged 信号途径异常导致细胞过度自我更新, 促进 AML 的发生。而 Yan 等^[14]报道 Notch1 过表达可以抑制 K562 细胞的增殖。因而, Notch 信号在 AML 中的作用还有待进一步明确。

在本研究中我们用实时定量 PCR 法检测了对照组和初发 AML 患者骨髓 CD34⁺ 细胞 Notch 受体及相关分子的表达。首先研究显示 Notch 信号相关分子在对照组细胞都有表达, 提示 Notch 信号参与调控正常造血干/祖细胞 (HSPC) 的生理学特性。其次, 在初发 AML 细胞 Notch1~4 受体均有表达, 但 Notch 信号通路下游基因 Hes1 的表达却是降低的, 提示初发的 AML 细胞尽管有 Notch 受体表达, 但 Notch 信号并无异常激活, 相对静默, 从而揭示 Notch 信号对 AML 细胞在体内生长的生理抑制作用。这与 Lobry 等^[15]及 Kannan 等^[16]的研究结果是一致的。此外, 在 AML 细胞 Notch4 受体的表达明

显上调, 大量研究证实 Notch4 受体优先表达于血管内皮细胞, 在 AML 细胞高表达, 可能与异常的血管生成信号转导有关, 导致 AML 患者骨髓中新生血管增加, 满足细胞恶性增殖的营养需求^[17-18]。

在上述研究的基础上, 我们用前期研究中构建表达的一种新型内皮细胞靶向的可溶性 Notch 配体 hDIR 融合蛋白, 分析了激活 Notch 信号对 AML 细胞的影响。由于 Notch 受体和配体都是细胞表面膜蛋白, 只有将 Notch 配体表达在细胞表面或固相化在培养介质表面上才能有效激活 Notch 信号^[19]。由此, 我们前期的研究将 hDIR 蛋白靶向锚定在具有活力的 HUVEC 表面, 可达到有效激活 Notch 信号的作用。同时我们建立了以 hDIR 蛋白结合 HUVEC 及外源性生长因子为基础的共培养体系, 对脐血 HSPC 进行共培养, 起到了最佳的扩增作用^[7-8]。而且 Butler 等^[20]的研究也表明内皮细胞对 Notch 依赖的造血干细胞 (HSC) 自我更新和再生起关键作用, 也支持了我们的结果。在本研究中, 我们仍采用上述的共培养体系, 观察了 hDIR 蛋白对 AML 患者和正常对照骨髓 CD34⁺ 细胞的作用。研究发现 hDIR 蛋白明显促进了正常对照细胞的增殖, 这与我们前期的结果是一致的^[7-8]。此外, hDIR 蛋白可明显激活 AML 细胞内的 Notch 信号, 下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 抑制了 AML 细胞的增殖, 促进了凋亡。在临床实践中, AML 患者的骨髓中, AML 细胞和残余的正常 HSPC 互相竞争的结果决定了患者的临床表现和疾病进程, 若能在对 AML 细胞治疗的同时, 高选择性增加体内残余的正常细胞, 将在一定程度上降低并发症相关的死亡率。我们的研究为 AML 治疗提供了新的思路。

近来, 骨髓血管龛倍受关注, 骨髓血管内皮细胞与 AML 细胞紧密的交互作用, 为 AML 细胞生存提供了有利的保护环境, 也是 AML 复发、耐药的重要原因^[21-23]。在本研究中, 我们用 PBS 代替 hDIR 蛋白, 在仅有 HUVEC 和生长因子的培养条件下, AML 细胞较 5GF 组有明显增殖, 且细胞凋亡也明显减少, 表明 HUVEC 对 AML 细胞增殖有明显的支持作用, 与上述观点是一致的。但在加用了 hDIR 蛋白后, AML 细胞发生了明显凋亡, 主要考虑 AML 细胞内 Notch 信号的激活, 下调抗凋亡基因 Bcl-2 表达, 促进了 AML 细胞凋亡。我们的前期研究结果显示 hDIR 蛋白主要抑制 HUVEC 出芽及管腔形成的能力, 抑制新生血管的生成^[10]。但对于本研究中体外采用的融合 HUVEC (confluent HUVEC), 我们尚未

观察到hDIR蛋白对其明显的作用。关于hDIR蛋白对AML患者骨髓血管龕的作用,我们还在进一步研究中,这也将成为AML治疗新的靶点。

综上所述,我们的研究结果支持了在AML细胞尚无Notch信号通路的异常改变,激活AML细胞Notch信号,促进细胞凋亡。改良的Notch配体hDIR蛋白对AML细胞有抑制作用,为进一步临床应用提供了实验依据。

参考文献

- [1] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373 (12):1136-1152. DOI: 10.1056/NEJMra1406184.
- [2] Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127 (1):53-61. DOI: 10.1182/blood-2015-08-604520.
- [3] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling [J]. *Science*, 1995, 268 (5208):225-232.
- [4] Ohishi K, Varnum-Finney B, Bernstein ID. The notch pathway: modulation of cell fate decisions in hematopoiesis [J]. *Int J Hematol*, 2002, 75 (5):449-459.
- [5] Aster JC, Xu L, Karnell FG, et al. Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (20):7505-7515.
- [6] Del GI, Rossi D, Chiaretti S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL [J]. *Haematologica*, 2012, 97 (3): 437-441. DOI: 10.3324/haematol.2011.060129.
- [7] Tian DM, Liang L, Zhao XC, et al. Endothelium-targeted Delta-like 1 promotes hematopoietic stem cell expansion ex vivo and engraftment in hematopoietic tissues in vivo [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 11 (2):693-706. DOI: 10.1016/j.scr.2013.04.008.
- [8] Tian DM, Liang YM, Zhang YQ. Endothelium-targeted human Delta-like 1 enhances the regeneration and homing of human cord blood stem and progenitor cells [J]. *J Transl Med*, 2016, 14: 5. DOI: 10.1186/s12967-015-0761-0.
- [9] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127 (20):2391-2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- [10] Zhao XC, Dou GR, Wang L, et al. Inhibition of tumor angiogenesis and tumor growth by the DSL domain of human Delta-like 1 targeted to vascular endothelial cells [J]. *Neoplasia*, 2013, 15 (7):815-825.
- [11] Koch U, Radtke F. Notch and cancer: a double-edged sword [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64 (21):2746-2762. DOI: 10.1007/s00018-007-7164-1.
- [12] Di IM, Baldoni S, Rosati E, et al. A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation [J]. *Br J Haematol*, 2009, 146 (6):689-691. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07816.x.
- [13] Tohda S, Nara N. Expression of Notch1 and Jagged1 proteins in acute myeloid leukemia cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42 (3): 467-472. DOI: 10.3109/10428190109064603.
- [14] Yin DD, Fan FY, Hu XB, et al. Notch signaling inhibits the growth of the human chronic myeloid leukemia cell line K562 [J]. *Leuk Res*, 2009, 33 (1): 109-114. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.06.023.
- [15] Lobry C, Ntziachristos P, Ndiaye-Lobry D, et al. Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation [J]. *J Exp Med*, 2013, 210 (2):301-319. DOI: 10.1084/jem.20121484.
- [16] Kannan S, Sutphin RM, Hall MG, et al. Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach [J]. *J Exp Med*, 2013, 210 (2):321-337. DOI: 10.1084/jem.20121527.
- [17] Padró T, Ruiz S, Bieker R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2000, 95 (8):2637-2644.
- [18] Wu J, Iwata F, Grass JA, et al. Molecular determinants of NOTCH4 transcription in vascular endothelium [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 (4):1458-1474. DOI: 10.1128/MCB.25.4.1458-1474.2005.
- [19] Varnum-Finney B, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability [J]. *Blood*, 2003, 101 (5):1784-1789. DOI: 10.1182/blood-2002-06-1862.
- [20] Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6 (3):251-264. DOI: 10.1016/j.stem.2010.02.001.
- [21] Cogle CR, Goldman DC, Madlambayan GJ, et al. Functional integration of acute myeloid leukemia into the vascular niche [J]. *Leukemia*, 2014, 28 (10):1978-1987. DOI: 10.1038/leu.2014.109.
- [22] Loges S, Heil G, Bruweleit M, et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (6):1109-1117. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.058.
- [23] Duarte D, Hawkins ED, Akinduro O, et al. Inhibition of endosteal vascular niche remodeling rescues hematopoietic stem cell loss in AML [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22 (1):64-77.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.006.

(收稿日期:2018-04-23)

(本文编辑:王叶青)