

# 全反式维甲酸对 NPM1 突变的白血病细胞系 U937 细胞的作用及其机制研究

邱少伟 万玉玲 贾玉娇 饶青 王敏 王建祥

**【摘要】** 目的 探讨全反式维甲酸(ATRA)对NPM1突变的白血病细胞系U937细胞的作用及其机制。方法 转染NPM1突变型(A型)质粒至U937细胞系构建稳定克隆A1和A2,利用Western blot法和荧光共聚焦技术鉴定细胞。MTT法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡,显微镜下计数检测集落形成能力,Western blot法检测细胞增殖相关信号通路蛋白表达。结果 ①NPM1突变型U937细胞A1和A2经ATRA处理后,细胞增殖活性分别为对照组(未经ATRA处理组)水平的52.6%和35.8%,差异均有统计学意义( $t = 3.649, P = 0.010; t = 4.906, P = 0.002$ )。②突变型细胞A1和A2的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例经ATRA处理后较对照组分别增加20.1%和35.8%,差异均有统计学意义( $t = 4.544, P = 0.010; t = 15.850, P < 0.001$ )。③U937细胞经ATRA处理后集落生长受抑制,其中空载体组集落数目下降了32.7%,野生型组下降了57.9%,突变型组(A1)下降了90.9%,差异均有统计学意义( $t = 8.507, P = 0.010; t = 22.090, P < 0.001; t = 90.200, P < 0.001$ )。④突变型U937细胞经ATRA处理后p-ERK水平明显降低。⑤突变型U937细胞接受化疗药物联合ATRA处理后细胞凋亡率明显高于化疗药物单药处理组,在化疗药物处理后添加ATRA能导致更多的细胞凋亡。结论 ATRA能够抑制NPM1突变的U937细胞增殖和克隆形成,将细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,显著降低其ERK磷酸化水平。在NPM1突变的U937细胞中,当ATRA在化疗药物处理后添加能够与化疗药物发挥更强的协同杀伤效果。

**【关键词】** NPM1突变; 白血病,髓样,急性; 全反式维甲酸

**基金项目:**国家自然科学基金重点项目(81430004);天津市应用基础与前沿技术研究计划(16JCQNJC12200);天津市血液病临床医学研究中心建设(15ZXLC SY00010)

**Study of the effects and mechanism of all-trans retinoic acid on leukemic cell line U937 cells with NPM1 mutation** Qiu Shaowei, Wan Yuling, Jia Yujiao, Rao Qing, Wang Min, Wang Jianxiang. Institute of Hematology & Blood Disease Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Wang Jianxiang, Email: wangjx@ihcams.ac.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect and mechanism of all-trans retinoic acid (ATRA) on leukemic cell line U937 cells with NPM1 mutation. **Methods** Human acute myeloid leukemia cell line U937 was explored, NPM1 mutated (A type) plasmids were transfected into U937 to form stable clones A1 and A2, which were identified by Western blot and Co-immunoprecipitation. The cell proliferation was measured by methylthiazolyl tetrazolium bromide (MTT); cell cycle and cell apoptosis were explored by flow cytometric; cell colony formation was measured by microscope count, the molecular pathways related to cell proliferation were measured by Western blot. **Results** ①The cell proliferations of mutant A1 and A2 were inhibited significantly by 52.6% and 35.8% ( $P < 0.05$ ), respectively under ATRA exposure. ②The percentages of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> stage of mutant A1 and A2 increased by 20.1% and 35.8%, respectively under ATRA exposure. ③All the U937 leukemic cells were inhibited under ATRA exposure; the decreased percentages of vector, wild-type and mutant NPM1 cells were 32.7%, 57.9% and 90.9% respectively. ④p-ERK decreased obviously after ATRA exposure in NPM1 mutated leukemic cells. ⑤More mutant NPM1 cells inclined to apoptosis under the exposure of ATRA and cytotoxic drugs than cytotoxic drugs alone, meanwhile more cells apoptosis occurred when ATRA was administrated after

cytotoxic drugs exposure. **Conclusions** ATRA could inhibit cell proliferation and colony formation, blocked the cell cycle in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> stage accompanied by the significant reduction of p-ERK in U937 leukemic cells with NPM1 mutation. Besides, ATRA could synergize with drugs to suppress the leukemic cells survival more effectively when ATRA was administered after the cytotoxic drugs exposure in U937 leukemic cells with NPM1 mutation.

**【Key words】** NPM1 mutation; Leukemia, myeloid, acute; All-trans retinoic acid

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81430004); Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (16JCQNJC12200); Tianjin Hematology Clinical Medicine Research Center Construction (15ZXLCYS00010)

NPM1 蛋白是一种核仁磷酸蛋白,主要位于细胞核仁的颗粒区,在胞核和胞质之间穿梭,主要参与核糖体生物合成、中心粒复制等过程<sup>[1-2]</sup>。而 NPM1 突变位于基因的第 12 号外显子,存在近 50 种不同的突变,其中 A 型突变是最常见的类型,占有所有突变的 75%~80%,是 NPM1 基因编码序列的 956~959 位插入 TCTG 四个核苷酸的重复序列,导致了氨基酸的 288 和 290 位的色氨酸取代,并产生新的 C 末端出核信号(NES),从而导致了 NPM1 蛋白从细胞核中排出,过多地积累在胞质中<sup>[3-4]</sup>。近 1/3 的急性髓系白血病(AML)患者存在 NPM1 突变,其中多数染色体核型正常。存在 NPM1 突变的 AML 患者对化疗敏感,NCCN 指南和欧洲白血病网(ENL)指南均把单纯 NPM1 突变的类型列入预后良好组,化疗可获得和移植类似的长期生存率<sup>[5-6]</sup>。

全反式维甲酸(ATRA)作为急性早幼粒细胞白血病(APL)的标准治疗已得到广泛应用。临床上一一直在探索 ATRA 能否应用于非 APL 类型的 AML 的治疗<sup>[7-8]</sup>。Schlenk 等<sup>[9]</sup>发现 ATRA 联合化疗药物可以提高非 APL 型 AML 患者的完全缓解(CR)率、无病生存率和总体生存率。但是上述研究结果并未得到其他研究者的广泛认同<sup>[10-12]</sup>。近几年,有研究者发现 ATRA 对于单纯 NPM1 突变的 AML 患者具有更好的疗效<sup>[13]</sup>,但同时其他随机对照试验并未证实上述结果<sup>[14-15]</sup>。因此,ATRA 联合化疗药物是否有助于提高单纯 NPM1 突变 AML 患者的疗效仍存在争议。本研究旨在通过构建野生型和突变型(A 型) NPM1 载体,转染 AML 细胞系 U937 细胞,建立稳定的 NPM1 野生型和突变型(A 型)细胞系,通过体外实验来探讨 ATRA 对 NPM1 突变的白血病细胞系的影响。

## 材料与方 法

1. 细胞培养:人类白血病细胞系 U937 细胞由本实验室保存,于含 10% 灭活胎牛血清(FBS)的

RPMI 1640 培养基,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。

2. 质粒构建、转染及单克隆细胞系建立:野生型和突变型(A 型) NPM1 质粒均由原代患者骨髓细胞中通过 PCR 扩增得来,通过酶切位点克隆进入 pcDNA3.1-myc 质粒中。将 pcDNA3.1 空载体、野生型 NPM1 质粒、突变型 NPM1 质粒通过 lipofectamine2000 转染至 U937 细胞,通过极限稀释法、Western blot 法鉴定和挑选单克隆细胞系。

3. NPM1 蛋白定位检测:取对数生长期细胞,经过 PBS 洗涤后离心涂片,4% 多聚甲醛固定,0.25% TritonX-100 室温孵育,2% 马血清室温封闭 30 min, NPM1 突变蛋白抗体(鼠源,特异性显示突变 NPM1 蛋白,与野生型 NPM1 蛋白无交叉性)室温避光孵育 1 h,3 μl DAPI 染核封片,放置激光共聚焦显微镜下(德国 Leica 公司产品)观察 NPM1 蛋白亚细胞定位情况。

4. 细胞周期鉴定:将细胞离心后用 PBS 洗涤,放置于 75% 乙醇固定至少 24 h,3 μl RNA 酶和 150 μl 碘化丙锭(PI)室温孵育 10~15 min,通过流式细胞仪(FACS LSR II,美国 BD Bioscience 公司产品)测定细胞周期。

5. 细胞增殖测定:将对数生长期细胞以每孔  $1 \times 10^4$  接种于 96 孔板,检测时间点加入 10 μl MTT,4 h 后加入 10% SDS 100 μl 孵育 12~16 h,通过酶标仪(美国 BioTek Instruments 公司产品)测定 546 nm 波长处的吸光度(A)值,计算细胞增殖活性。

6. 细胞凋亡测定:将对数生长期细胞与化疗药物孵育后,收集细胞离心,PBS 洗涤后重悬于 50 μl 结合缓冲液中,分别加入 2 μl Annexin V 和 3.5 μl PI,混匀后避光孵育 15 min,最后加入 100~150 μl 结合缓冲液,通过流式细胞仪检测细胞凋亡比例。

7. 集落形成检测:收集对数生长期细胞,将细胞吹散成单个细胞悬于含 2% FBS 的 IMDM 培养液中,制成  $1 \times 10^5$ /ml 的细胞悬液,将细胞悬液与甲基

纤维素培养基按 1:10 比例吹打混合均匀,将混合体系转移接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ l;置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、湿度 $\geq$ 95% 条件下孵箱培养 7 d,计数集落并照相。

8. 统计学处理:采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。两组比较采用独立样本 *t* 检验,多组数据比较采用方差分析,每组设 3 个复孔,实验至少重复 3 次。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

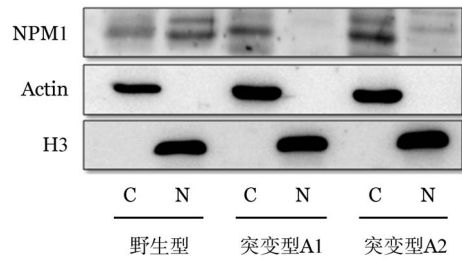
## 结 果

### 一、突变型 NPM1 单克隆细胞的鉴定

野生型 NPM1 蛋白可在胞质和胞核中同时检测到,而突变型 NPM1 蛋白仅存在于胞质中,空载体中仅存在野生型 NPM1 蛋白。如图 1 所示,分别提取胞质和胞核蛋白,Western blot 法检测结果显示,突变型单克隆 A1 和 A2 中 NPM1 蛋白均只在胞质中表达,而野生型克隆的 NPM1 蛋白胞质和胞核中均有表达。通过激光共聚焦显微镜观察发现突变型 NPM1 蛋白主要分布于胞质中,几乎不分布于胞核中(图 2),因此构建的突变的 NPM1 单克隆细胞 A1 和 A2 可用于后续实验。

### 二、ATRA 对野生型和突变型 NPM1 细胞系生物学特性的影响

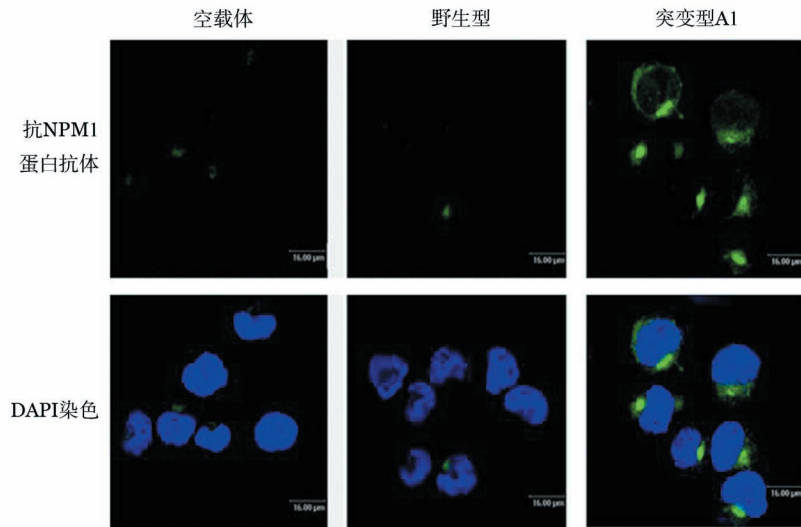
1. 细胞增殖:空载体、NPM1 野生型和突变型 A1、A2 细胞培养 72 h 后相对细胞增殖率(与 0 h 时 A 值的比值)分别为 3.79 $\pm$ 0.79、4.68 $\pm$ 1.28、2.49 $\pm$ 0.85 和 2.85 $\pm$ 0.80,而经 3  $\mu$ mol/L ATRA 处理 72 h 的四组细



Actin:胞质蛋白内参;H3:胞核蛋白内参;C:细胞质;N:细胞核  
图 1 Western blot 法检测 NPM1 蛋白在 NPM1 野生型和突变型 A1、A2 细胞胞核和胞质中的表达

胞相对细胞增殖率分别为 3.04 $\pm$ 1.21、3.76 $\pm$ 0.63、1.32 $\pm$ 0.04 和 1.02 $\pm$ 0.38。空载体和野生型细胞经 ATRA 处理后细胞增殖基本不受影响,而突变型 A1 和 A2 细胞经 ATRA 处理后相对细胞增殖率分别为对照组的 52.6% 和 35.8%,差异均有统计学意义( $t = 3.649, P = 0.010; t = 4.906, P = 0.002$ )。

2. 细胞周期:空载体、NPM1 野生型和突变型 A1、A2 细胞经 48 h 孵育,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例分别为 (50.6 $\pm$ 4.8)%、(36.4 $\pm$ 3.2)%、(54.1 $\pm$ 3.7)% 和 (50.6 $\pm$ 2.1)% ,而经 3  $\mu$ mol/L ATRA 处理后的四组细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例分别为 (63.8 $\pm$ 4.7)%、(43.8 $\pm$ 1.9)%、(65.0 $\pm$ 2.6)% 和 (68.7 $\pm$ 0.8)%。野生型组的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例基本无变化,而空载体、突变型 A1 和 A2 组的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例经 ATRA 处理后较对照组分别增加 26.1%、20.1% 和 35.8%,差异均有统计学意义( $t = 3.667, P = 0.020; t = 4.544, P = 0.010; t = 15.850, P <$



绿色荧光代表突变的 NPM1 蛋白,蓝色荧光代表细胞核,分辨率为 16  $\mu$ m

图 2 激光共聚焦显微镜下观察 NPM1 蛋白在空载体、NPM1 野生型、突变型 A1 细胞中的荧光定位情况

0.001)。

3. 细胞集落:空载体、野生型和突变型 A1 细胞经过 7 d 孵育,细胞集落数目分别为  $652.33 \pm 9.53$ 、 $772.67 \pm 13.86$ 、 $688.67 \pm 5.93$ , 而经  $3 \mu\text{mol/L}$  ATRA 处理后的三组细胞集落数目分别为  $439.33 \pm 23.15$ 、 $325.33 \pm 14.77$ 、 $63.00 \pm 3.61$ 。ATRA 处理后三组细胞集落数目分别下降了 32.7%、57.9%、90.9%, 差异均有统计学意义 ( $t = 8.507, P = 0.010$ ;  $t = 22.090, P < 0.001$ ;  $t = 90.200, P < 0.001$ ), 但突变型 NPM1 组的抑制程度明显高于空载体和野生型组。图 3 可以更直观地看出三组细胞集落经过 ATRA 处理后镜下形态, 空载体组的集落基本无变化, 野生型组的集落变得更加弥散, 而突变型组的集落明显减少。

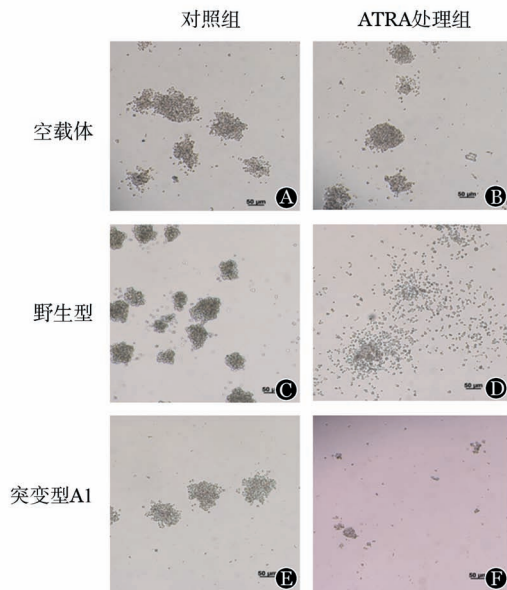


图 3 倒置显微镜下观察空载体(A、B)、NPM1 野生型(C、D)、突变型 A1(E、F)细胞在  $3 \mu\text{mol/L}$  全反式维甲酸(ATRA)处理 7 d 后的集落形成情况(分辨率为  $50 \mu\text{m}$ )

4. p-AKT 和 p-ERK 水平的检测:如上述结果显示, ATRA 可明显抑制 NPM1 突变型细胞的增殖能力, 故通过 Western blot 法检测细胞增殖相关的分子 p-AKT 和 p-ERK 水平。如图 4 所示, 空载体细胞经过 ATRA 处理后 p-AKT 水平上升, 而 p-ERK 水平下降; 野生型细胞经过 ATRA 处理后 p-AKT 和 p-ERK 水平变化不明显; 而突变型细胞经过 ATRA 处理后 p-AKT 水平变化不明显, p-ERK 水平却明显降低, 降低的程度明显强于空载体组细胞。

三、维甲酸和化疗药物联合作用对转染 NPM1 突变型 A1 细胞的影响

为了检测 ATRA 与化疗药物联合是否具有协同

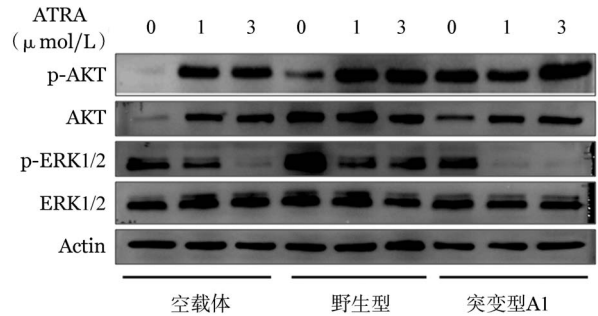


图 4 Western blot 法检测空载体、NPM1 野生型、突变型 A1 细胞在不同浓度全反式维甲酸(ATRA)作用 48 h 后 p-AKT 和 p-ERK 水平的变化

作用以及 ATRA 与化疗药物的添加时机是否会对疗效产生影响, ATRA 分别在加入化疗药物(柔红霉素  $0.01 \mu\text{g/ml}$ 、依托泊苷  $0.1 \mu\text{g/ml}$ )前 24、12、0 h 及加入后 12 h 时间点添加, 白血病细胞与化疗药物孵育 48 h 后检测细胞凋亡率。由表 1 可见, 空载体组和突变型组细胞在柔红霉素或依托泊苷化疗药物联合 ATRA 处理后与化疗药物单药处理情况相比, 细胞凋亡率明显增高, 而野生型组细胞未出现此种现象 ( $t = 1.075, P = 0.400$ ;  $t = 2.356, P = 0.140$ )。空载体组细胞在柔红霉素和依托泊苷单药处理下调亡率分别为  $(62.6 \pm 2.5)\%$  和  $(20.1 \pm 5.9)\%$ ; 而当 ATRA 和化疗药物同时添加时, 调亡比例升高至  $(76.5 \pm 1.2)\%$  和  $(67.1 \pm 0.8)\%$ , 升高幅度分别为 22.2% 和 234.0% ( $t = 8.722, P = 0.010$ ;  $t = 13.640, P = 0.005$ )。突变型 A1 细胞相对应的增高幅度分别为 44.3% 和 496.0% ( $t = 12.170, P = 0.001$ ;  $t = 60.700, P < 0.001$ ), 由此可见 ATRA 联合化疗药物对突变型细胞比空载体细胞具有更强的杀伤能力。实验进一步发现 ATRA 的添加时机也对两药联合作用的效果产生影响, 突变型细胞中以 ATRA 预处理 24 h 再分别加入柔红霉素、依托泊苷, 细胞凋亡比例分别为  $(39.2 \pm 2.3)\%$  和  $(29.3 \pm 0.6)\%$ , 而化疗药物处理 12 h 后再加入 ATRA, 细胞凋亡比例分别增高至  $(53.8 \pm 2.9)\%$  和  $(37.0 \pm 4.2)\%$ , 增加幅度分别为 37.3% 和 26.3% ( $t = 6.832, P = 0.006$ ;  $t = 3.144, P = 0.088$ )。

### 讨 论

ATRA 在非 APL 型 AML 中的应用一直受到关注, 近些年某些临床试验结果显示 ATRA 可能对伴 NPM1 突变的 AML 具有更好的疗效。本研究通过体外实验发现, 携带 NPM1 突变的 U937 细胞经 ATRA 处理后细胞增殖变慢, 细胞周期阻滞于  $G_0/G_1$

**表 1** 空载体、NPM1 野生型、突变型 A1 细胞经化疗药物单药及与全反式维甲酸(ATRA)联合作用后凋亡细胞比例(% , $\bar{x}\pm s$ )

| 组别                   | 空载体组     | 野生型组     | 突变型 A1 组 |
|----------------------|----------|----------|----------|
| 柔红霉素单药               | 62.6±2.5 | 48.7±2.1 | 35.0±1.9 |
| 柔红霉素联合 ATRA          |          |          |          |
| 柔红霉素作用前 24 h 加入 ATRA | 69.0±2.2 | 46.0±2.0 | 39.2±2.3 |
| 柔红霉素作用前 12 h 加入 ATRA | 75.5±1.3 | 50.0±1.0 | 48.7±3.0 |
| 同时加入                 | 76.5±1.2 | 47.3±0.6 | 50.5±2.7 |
| 柔红霉素作用后 12 h 加入 ATRA | 77.5±1.3 | 46.7±2.1 | 53.8±2.9 |
| 依托泊苷单药               | 20.1±5.9 | 26.8±1.1 | 6.1±0.4  |
| 依托泊苷联合 ATRA          |          |          |          |
| 依托泊苷作用前 24 h 加入 ATRA | 59.4±0.4 | 27.8±6.4 | 29.3±0.6 |
| 依托泊苷作用前 12 h 加入 ATRA | 73.8±2.8 | 30.0±2.5 | 35.4±2.1 |
| 同时加入                 | 67.1±0.8 | 28.6±3.5 | 36.2±0.8 |
| 依托泊苷作用后 12 h 加入 ATRA | 67.2±1.5 | 27.5±1.2 | 37.0±4.2 |

注:每组设 3 个复孔,实验重复 3 次

期,集落形成能力减弱,同时伴随着 p-ERK 水平的明显下降。有研究报道 ATRA 对 NPM1 突变的白血病发挥作用主要是通过降解 NPM1 突变蛋白,改变 PML 小体细胞定位来实现<sup>[16-17]</sup>。

本研究同时发现当 ATRA 与化疗药物同时处理 NPM1 突变的细胞系,联合用药比化疗药物单药使用对白血病细胞的杀伤作用更强,且 ATRA 添加时机晚于化疗药物则杀伤效果更好,但对照组也呈现出相似的趋势,两组之间差异无统计学意义。当我们分析 ATRA 与化疗药物联合应用的既往临床试验,可发现 ATRA 的添加时机可能会对化疗疗效产生一定影响。在澳大利亚-德国临床试验中,ATRA 是在化疗后的第 3~6 天(45 mg/m<sup>2</sup>)或第 3~28 天(15 mg/m<sup>2</sup>)应用,结果显示 ATRA 有助于提高化疗疗效<sup>[9,13,18]</sup>。而在 MRC 的临床试验中,ATRA 在化疗期间的第 1~60 天应用(45 mg/m<sup>2</sup>),美国 MD Anderson 临床试验中 ATRA 是从化疗前 2 天或者化疗当天应用直至化疗结束<sup>[10]</sup>,该两组试验都没有显示出 ATRA 的疗效优势。尽管从这些临床试验结果和本研究体外实验结果可以推测 ATRA 添加时机可能影响疗效,但确定的结论需要通过合理的前瞻性对照临床试验进一步验证。

虽然本研究对 ATRA 与 NPM1 突变的关系进行了探索,但仍存在不少问题需要解决,如本研究主要在 U937 细胞系中进行,还需要通过原代细胞或小鼠模型进一步验证。最近研究发现,亚砷酸可能同样对 NPM1 突变的白血病具有良好的效果,且作用效果比 ATRA 更强<sup>[16-17]</sup>。临床中 NPM1 突变常常同时合并 DNMT3A、FLT3-ITD 或 IDH1/2 突变,一

旦合并这些突变,ATRA 或亚砷酸对白血病细胞的作用是否会受影响,这些都是需要阐明和解决的问题。

通过目前的数据,我们相信 ATRA 确实能够对 NPM1 突变的白血病细胞的增殖产生抑制作用,如果它的功能能够进一步被阐明,那么对于 NPM1 突变类型白血病的治疗则是重要的进展。

#### 参考文献

- [1] Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein [J]. *J Biochem*, 2008, 143(4):441-448. DOI: 10.1093/jb/mvm222.
- [2] Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al. Nucleophosmin and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(7):493-505. DOI: 10.1038/nrc1885.
- [3] Falini B, Sportoletti P, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives[J]. *Curr Opin Oncol*, 2009, 21(6):573-581. DOI: 10.1097/CCO.0b013e3283313dfa.
- [4] Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, et al. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(34):23326-23332. DOI: 10.1074/jbc.M801706200.
- [5] Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(18):1909-1918. DOI: 10.1056/NEJ-Moa074306.
- [6] Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features[J]. *Blood*, 2007, 109(3):874-885. DOI: 10.1182/blood-2006-07-012252.
- [7] Glasow A, Barrett A, Petrie K, et al. DNA methylation-indepen-

- dent loss of RARA gene expression in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2008, 111(4):2374-2377. DOI: 10.1182/blood-2007-05-088344.
- [8] Glasow A, Prodromou N, Xu K, et al. Retinoids and myelomonocytic growth factors cooperatively activate RARA and induce human myeloid leukemia cell differentiation via MAP kinase pathways [J]. Blood, 2005, 105(1):341-349. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1074.
- [9] Schlenk RF, Fröhling S, Hartmann F, et al. Phase III study of all-trans retinoic acid in previously untreated patients 61 years or older with acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2004, 18(11):1798-1803. DOI: 10.1038/sj.leu.2403528.
- [10] Estey EH, Thall PF, Pierce S, et al. Randomized phase II study of fludarabine + cytosine arabinoside + idarubicin +/- all-trans retinoic acid +/- granulocyte colony-stimulating factor in poor prognosis newly diagnosed acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. Blood, 1999, 93(8):2478-2484.
- [11] Milligan DW, Wheatley K, Littlewood T, et al. Fludarabine and cytosine are less effective than standard ADE chemotherapy in high-risk acute myeloid leukemia, and addition of G-CSF and ATRA are not beneficial: results of the MRC AML-HR randomized trial [J]. Blood, 2006, 107(12):4614-4622. DOI: 10.1182/blood-2005-10-4202.
- [12] Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment [J]. Cancer, 2007, 109(6):1114-1124. DOI: 10.1002/cncr.22496.
- [13] Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, et al. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B [J]. Haematologica, 2009, 94(1):54-60. DOI: 10.3324/haematol.13378.
- [14] Burnett AK, Hills RK, Green C, et al. The impact on outcome of the addition of all-trans retinoic acid to intensive chemotherapy in younger patients with nonacute promyelocytic acute myeloid leukemia: overall results and results in genotypic subgroups defined by mutations in NPM1, FLT3, and CEBPA [J]. Blood, 2010, 115(5):948-956. DOI: 10.1182/blood-2009-08-236588.
- [15] Nazha A, Bueso-Ramos C, Estey E, et al. The Addition of All-Trans Retinoic Acid to Chemotherapy May Not Improve the Outcome of Patient with NPM1 Mutated Acute Myeloid Leukemia [J]. Front Oncol, 2013, 3:218. DOI: 10.3389/fonc.2013.00218.
- [16] Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells [J]. Blood, 2015, 125(22):3455-3465. DOI: 10.1182/blood-2014-11-611459.
- [17] EI Haji H, Dassouki Z, Berthier C, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1, resulting in apoptosis of AML cells [J]. Blood, 2015, 125(22):3447-3454. DOI: 10.1182/blood-2014-11-612416.
- [18] Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet [J]. Blood, 2009, 113(9):1875-1891. DOI: 10.1182/blood-2008-04-150250.

(收稿日期:2017-01-29)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

## 作者投稿须知

1. 按本刊要求写作:登录《中华血液学杂志》网站(<http://www.hematoline.com>),参见首页作者中心栏中的“投稿须知”及“写作指导”栏目。

2. 作者注册:请打开本刊网站首页点击“在线投稿”即进入中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)。在网站首页注册并申请为杂志作者(用户名和密码为您在中华医学会统一的登录信息,请牢记!忘记密码可通过电子信箱索取)。

3. 投稿:注册成功后进入“业务中心”。点击【远程稿件管理系统】,相应的功能即显示在下方。点击“作者投稿”,按要求填写内容,摘要在字数允许范围内尽可能详细,并上传原稿(点击“暂存”稿件进入【我的草稿】模块)。选择《中华血液学杂志》,并点击“投稿”。

4. 邮寄纸稿及介绍信:请在投稿平台上下载论文投送介绍信及授权书,签字盖章后连同原稿打印件(注明稿件编号)一并寄至本刊编辑部。

本刊编辑部