

BRD4 拮抗剂 GSK525762A 抗普通型急性 B 淋巴细胞白血病的体外研究

马莎 陈翀 朱俊峰 李玉平 王雪 宋旭光 曹江 徐开林

【摘要】 目的 探讨 4 型含 Bromo 结构域蛋白(BRD4)拮抗剂对普通型急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)患者原代白血病细胞的作用及可能机制。方法 采用流式细胞术分选 14 例普通型 B-ALL 患者(Ph⁺ B-ALL 4 例, Ph⁻ B-ALL 10 例)白血病细胞,在模拟骨髓微环境条件下进行短期培养;给予 BRD4 拮抗剂 GSK525762A 处理后,采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率,用 Annexin V/7-AAD 法检测细胞凋亡率,荧光定量 PCR 法检测 c-MYC、CDK6、Bcl-2 mRNA 表达水平,Western blot 法检测 c-MYC、CDK6、Bcl-2 蛋白的表达。结果 GSK525762A 对 14 例普通型 B-ALL 患者原代白血病细胞均有抑制增殖作用,且呈剂量依赖性,其中位 IC₅₀ 值为 256.25 (90.64~1 378.39) nmol/L。500、1 000、2 500 nmol/L GSK525762A 作用后中位细胞凋亡率分别为 45.17% (9.38%~70.91%)、66.02% (24.36%~96.34%)、89.29% (39.29%~99.37%)。GSK525762A 对 Ph⁺ 与 Ph⁻ B-ALL 细胞具有类似的作用,但对 Ph⁺ B-ALL 细胞抑制增殖和诱导凋亡作用均弱于 Ph⁻ B-ALL 细胞。1 000 nmol/L GSK525762A 处理白血病细胞 24、48 h 后, c-MYC、CDK6 和 Bcl-2 mRNA 表达水平下降,其中对 Ph⁺ 和 Ph⁻ B-ALL 细胞 c-MYC、CDK6 mRNA 的下调作用差异无统计学意义,而对 Ph⁺ B-ALL 细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平的下调弱于对 Ph⁻ B-ALL 细胞;GSK525762A 处理后白血病细胞 c-MYC、CDK6、Bcl-2 蛋白表达水平均下调。结论 GSK525762A 可抑制普通型 B-ALL 原代细胞的增殖,并促进其凋亡,且对 Ph⁺ ALL 细胞在体外具有一定作用。该作用可能通过下调 c-MYC、CDK6 和 Bcl-2 而实现。

【关键词】 4 型含 Bromo 结构域蛋白质; BRD4 拮抗剂; 白血病, B 细胞; 细胞凋亡; 原代细胞培养

In vitro study of BRD4 inhibitor GSK525762A against primary adult common B-cell acute lymphoblastic leukemia cells in vitro Ma Sha^{*}, Chen Chong, Zhu Junfeng, Li Yuping, Wang Xue, Song Xuguang, Cao Jiang, Xu Kailin^{*}. *Department of Hematology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China*

Corresponding author: Xu Kailin, Email: lihmd@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) inhibitor GSK525762A on the proliferation and apoptosis of primary common B-cell acute lymphoblastic leukemia (common B-ALL) cells from adult patients, then to further explore the possible mechanisms. **Methods** Purified leukemia cells from 14 common B-ALL adult patients (4 Ph⁺ and 10 Ph⁻ cases) were obtained by flow cytometry sorting, and maintained in a mimic bone marrow microenvironment culture system for short-term culture. Leukemia cells were treated with various concentrations of GSK525762A. The inhibitory effects of BRD4 inhibitor on common B-ALL leukemia cells were measured by CCK-8 assay and the apoptosis of those cells was determined by Annexin V/7-AAD staining using flow cytometry. The transcripts of c-MYC, CDK6 and Bcl-2 were detected by quantitative RT-PCR, and the expression of c-MYC, CDK6 and Bcl-2 proteins were detected via Western blot. **Results** GSK525762A could inhibit the proliferation of leukemia cells from all 14 common B-ALL patients in a dose-dependent manner, the median value of IC₅₀ was 256.25 (90.64–1 378.39) nmol/L. GSK525762A could promote cells apoptosis of

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.007

基金项目:国家自然科学基金(81000210、81471580、81300399、81270637);江苏省自然科学基金(BK20141138);江苏省临床医学科技专项(BL2013010)

作者单位:221002 徐州医学院附属医院血液科(马莎、陈翀、李玉平、王雪、宋旭光、曹江、徐开林);蚌埠医学院第一附属医院血液科(朱俊峰)

通信作者:徐开林,Email:lihmd@163.com

B-ALL leukemia cells in a dose-dependent manner, the median apoptosis rates respectively were 45.17% (9.38%–70.91%), 66.02% (24.36%–96.34%) and 89.29% (39.29%–99.37%) after treated by 500, 1 000 and 2 500 nmol/L GSK525762A. GSK525762A has a similar effect on Ph⁺ ALL and Ph⁻ B-ALL, but the effect of proliferation inhibition and apoptosis enhancement on Ph⁺ B-ALL is weaker than that on Ph⁻ B-ALL. Compared with vehicle control group, the levels of c-MYC, Bcl-2 and CDK6 transcripts in leukemic cells were reduced after treatment for 24 h and 48 h by 1 000 nmol/L GSK525762A, and there are no significant differences in the downregulation of c-MYC and CDK6 mRNA between Ph⁺ and Ph⁻ B-ALL; however, the inhibitory effect on Bcl-2 transcription was weaker in Ph⁺ B-ALL cells than that in Ph⁻ B-ALL cells. Moreover, c-MYC, Bcl-2 and CDK6 protein levels decreased in GSK525762A treated group. **Conclusion** GSK525762A could strongly inhibit the proliferation of common B-ALL and trigger apoptosis; meanwhile it has certain effects against Ph⁺ ALL in vitro. The effect may be achieved by down-regulation of c-MYC, CDK6 and Bcl-2 expression.

【Key words】 Bromodomain- containing protein 4; BRD4 antagonists; Leukemia, B- cell; Apoptosis; Primary cell culture

急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL) 是起源于前体 B 细胞的恶性克隆性疾病。尽管随着联合化疗、造血干细胞移植和靶向治疗的应用,成人 B-ALL 的预后已有改善,但疗效仍远不能令人满意^[1]。多数成人 B-ALL 免疫表型为普通型,其中 Ph⁺ ALL 等预后不良亚型比例高,易早期复发,对供者淋巴细胞输注反应差,长期生存率甚低^[2],迫切需要寻找新的治疗靶点和策略。

2011 年 Zuber 等^[3]发现 4 型含 Bromo 结构域蛋白(Bromodomain-containing protein 4, BRD4)对维持 MLL 重排阳性 AML 细胞的存活和干细胞特性起重要作用,沉默 BRD4 表达对绝大多数 AML 细胞具有增殖抑制作用。BRD4 拮抗剂 I-BET151 或 JQ1 对多种 AML 细胞株和原代细胞具有强大的杀灭作用^[4]。本实验室王曼等^[5]报道新型 BRD4 拮抗剂 GSK525762A 对 MLL 重排阳性的 B-ALL 细胞株

RS4;11 具有与 AML 细胞类似的作用。在此基础上,我们检测了 14 例普通型 B-ALL 患者原代白血病细胞在体外短期培养条件下对 GSK525762A 的敏感性,为 BRD4 拮抗剂靶向 B-ALL 提供临床前研究资料。

病例和方法

1. 病例资料:选择 2008 年 1 月至 2013 年 10 月在徐州医学院附属医院血液科住院治疗的普通型 B-ALL 患者 13 例及蚌埠医学院附属医院血液科住院治疗的普通型 B-ALL 患者 1 例,诊断和分型均符合文献^[6]标准。其中初诊患者 8 例(男 4 例、女 4 例),复发患者 6 例(男 4 例、女 2 例),中位年龄 46 (13~81)岁,Ph⁺ B-ALL 患者 4 例,Ph⁻ B-ALL 患者 10 例,具体资料见表 1。标本为抽取的患者新鲜骨髓或外周血,患者标本均于化疗前采集,4 名正常对照

表 1 14 例普通型急性 B 淋巴细胞白血病患者资料

例号	年龄(岁)	性别	疾病状态	染色体核型	融合基因
1	54	男	复发	46,XY[15]	-
2	51	男	初诊	46,XY[16]	-
3	43	男	初诊	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[12]	BCR-ABL
4	13	女	初诊	46,XX,?7q-[5]	-
5	39	男	初诊	46,XY[20]	-
6	39	女	复发	46,XX,t(9;22)(q34;q11)idic(9)(q11)[20]	BCR-ABL
7	51	女	初诊	未见分裂象	TEL-AML1
8	46	男	复发	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]	BCR-ABL
9	27	男	复发	46,XY[4]	-
10	34	女	复发	未见分裂象	-
11	81	男	初诊	46,XY[10]	-
12	74	女	初诊	46,XX,add(19)(p13)[3]/46,XX[1]	-
13	64	女	初诊	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[8]	BCR-ABL
14	46	男	复发	未见分裂象	MLL-AF4

注: -: 阴性

均为健康志愿者。本研究获徐州医学院、蚌埠医学院附属医院伦理委员会批准,患者及志愿者均知情同意并签署知情同意书。

2. 主要试剂和仪器: GSK525762A 购自德国 Merck 公司; IMDM 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; 细胞因子购自美国 R&D 公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所; Annexin V-APC/7-AAD 试剂盒为美国 eBioscience 公司产品。M-MLV 和 TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 荧光定量 PCR 仪 (LightCycler480) 和试剂购自德国罗氏诊断公司。Influx 和 Calibur 流式细胞仪均为美国 BD 公司产品。β-actin、BRD4、c-MYC、Bcl-2、CDK6 抗体为美国 Cell Signaling Technology 公司产品。

3. 原代 B-ALL 细胞的纯化及短期培养: 采集普通型 B-ALL 患者治疗前骨髓或外周血 5 ml, 用淋巴细胞分离液密度梯度离心 (800×g, 20 min) 分离单个核细胞, Influx 流式细胞仪分离出 CD19⁺CD10⁺CD34⁺ 原始淋巴细胞。将原始细胞常规培养于含 20% FBS、5 ng/ml 基质细胞衍生因子 (SDF-1)、10 ng/ml IL-7 的 IMDM 培养基, 接种于使用 VCAM-1 包被的 96 孔板中, 置于培养箱内常规培养。

4. CCK-8 法检测 GSK525762A 对 B-ALL 原代细胞增殖的影响: 取纯化的 B-ALL 原代细胞按每孔 3×10⁴ 细胞接种于 VCAM-1 包被的 96 孔板, 实验组分别加入终浓度为 12.5、25、50、100、250、500、1 000 和 2 500 nmol/L GSK525762A, 溶剂对照组加入和实验组等量的 DMSO 溶液, 每组设 3 个复孔。接种后细胞置于培养箱培养 96 h 后每孔加入 CCK-8 试剂, 继续孵育 4 h 后用酶标仪检测波长 450 nm 处吸光度 (A) 值。按下列公式计算增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100\%$$

5. 流式细胞术检测 GSK525762A 对 B-ALL 原

代细胞凋亡的影响: 取对数生长期 B-ALL 原代细胞, 以 4×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板, 每孔 2 ml。实验组加入终浓度 500、1 000 和 2 500 nmol/L GSK525762A, 溶剂对照组加入等量 DMSO 溶液处理; 每组设 3 个复孔, 置于培养箱内培养 72 h, 收集细胞用 Annexin V-APC/7-AAD 试剂盒, 按说明标记细胞后上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

6. 实时荧光定量 RT-PCR 检测 c-MYC、Bcl-2、CDK6、BAD、BAK、BAX mRNA 表达: 取对数生长期 B-ALL 原代细胞, 以 5×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板。实验组加入 1 000 nmol/L GSK525762A, 溶剂对照组加入等量 DMSO 溶液; 每组设 3 个复孔, 置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱培养 24 或 48 h 后收集细胞, TRIzol 提取总 RNA 后用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA。采用 LightCycle480 SYBR Green I Master 试剂检测细胞 c-MYC、Bcl-2、CDK6、BAD、BAK、BAX 基因的表达。PCR 引物见表 2。用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因相对表达量, ΔCt=目的基因 Ct 值-GAPDH 的 Ct 值。实验独立重复 3 次。

7. Western blot 法检测 B-ALL 原代细胞 BRD4、c-MYC、Bcl-2、CDK6 蛋白表达: 分别收集未处理 B-ALL 原代细胞及正常人骨髓细胞检测 BRD4 表达, 收集 DMSO 处理组及 1 000 nmol/L GSK525762A 作用 24、48 和 72 h 后白血病细胞, 提取总蛋白并测定蛋白含量, 经变性、电泳、湿转 NC 膜、封闭后, 加入一抗、二抗孵育, X 线底片曝光显影。以 β-actin 蛋白为内参照以保持蛋白上样量的一致性。

8. 统计学处理: 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析和 HSD post-hoc 检验; 非正态分布计量资料采用 Mann-Whitney 非参数检验; 相关性分析采用 Pearson 线性相关分析法; IC₅₀ 计算使用直线回归法; *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

表 2 本研究中 PCR 引物序列

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	扩增片段长度 (bp)
c-MYC	TACAACACCCGAGCAAGGAC	AGGCTGCTGGTTTTCCACTAC	161
Bcl-2	ACGACTTCTCCCGCCGCTA	ACCCACCCGAAGTCAAAGAAG	163
CDK6	GTGACCAGCAGCGACAAAT	GTACCACAGCGTGACGACCA	99
BAD	GGAGGATGAGTGACGAGTTTGTG	CCAAGTTCCGATCCACCAG	135
BAK	ACTGCACCAAGATTGCCACCAG	GCCATGCTGGTAGAGTGTAGG	110
BAX	TTCTGACGGCAACTTCAACTG	CCCGGAGGAAGTCCAATGTC	137
GAPDH	CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	CAAAGGTGGAGGAGTGGGTG	116

结 果

1. BRD4在B-ALL原代细胞的表达:收集14例患者的白血病细胞及4名正常人骨髓细胞,Western blot法检测BRD4的表达。结果显示14例患者白血病细胞中均存在BRD4表达,与4名正常人BRD4表达无明显差异,没有发现表达缺失现象(图1)。

2. BRD4拮抗剂 GSK525762A对B-ALL原代细胞增殖的影响:14例患者原代白血病细胞用不同浓度的GSK525762A处理96h,结果显示GSK525762A对其均具有不同程度的抑制作用,并在一定范围内呈现剂量依赖性(图2)。其中位IC₅₀值为256.25(90.64~1 378.39)nmol/L。未发现GSK525762A对原代B-ALL细胞的IC₅₀值与患者年龄存在明显的相关性($r=0.030, P=0.920$),且中位IC₅₀值在初诊和复发患者间的差异无统计学意义(分别为263.81和299.13nmol/L, $P=0.216$)。

3. GSK525762A对B-ALL原代细胞凋亡的影响:不同浓度GSK525762A作用于原代白血病细胞72h后,采用Annexin V/7-AAD法检测凋亡。结果显示,GSK525762A对B-ALL原代细胞均具有明显的诱导凋亡作用,其中2 500nmol/L组最强,500nmol/L组最弱,组间差异均有统计学意义(图3,单因素方差分析和HSD post-hoc分析)。

4. GSK525762A对Ph⁺ ALL原代细胞的杀伤作用:本组14例患者中Ph⁺ ALL 4例。鉴于Ph⁺ ALL独特的临床意义,我们比较了GSK525762A对Ph⁺ B-ALL和Ph⁻ B-ALL原代细胞增殖和凋亡的影响,结果显示GSK525762A对Ph⁺ ALL细胞增殖有抑制作用,但敏感性有所下降,其中位IC₅₀值为790.23(271.50~1 378.39)nmol/L,而对Ph⁻ ALL细胞的中位IC₅₀值为223.28(90.64~498.45)nmol/L。GSK525762A能有效地诱导Ph⁺和Ph⁻ B-ALL细胞凋亡,但GSK525762A诱导Ph⁺ ALL细胞凋亡能力弱于对Ph⁻ B-ALL细胞的作用(表3)。

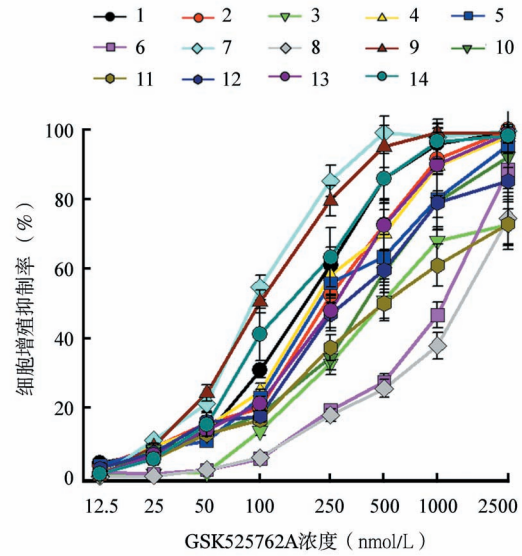


图2 采用CCK-8法检测GSK525762A对14例普通型急性B淋巴细胞白血病细胞白血病细胞的体外增殖抑制作用

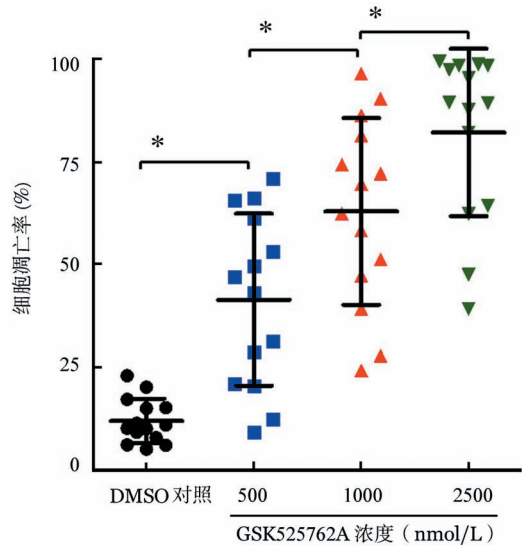
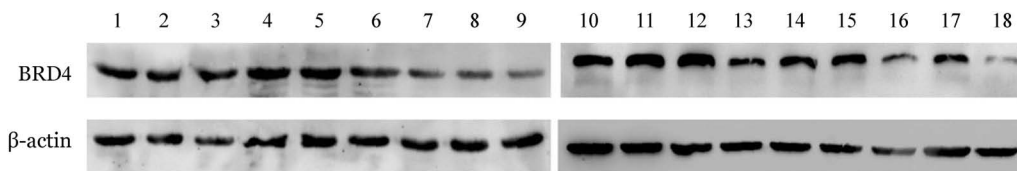


图3 采用Annexin V/7-AAD法检测不同浓度GSK525762A对14例普通型急性B淋巴细胞白血病细胞白血病细胞凋亡的影响(* $P<0.05$)

5. GSK525762A对CDK6和c-MYC表达的影响:经GSK525762A处理24h后,原代白血病



1~14:B-ALL患者;15~18:4名正常对照者

图1 Western blot法检测14例普通型急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)患者白血病细胞及正常人骨髓细胞中BRD4表达水平

表 3 不同浓度 GSK525762A 对 Ph⁺ 和 Ph⁻ B-ALL 患者白血病细胞的诱导凋亡作用比较

GSK525762A 浓度 (nmol/L)	细胞凋亡率 [% , M(范围)]	
	Ph ⁺ B-ALL (4 例)	Ph ⁻ B-ALL (10 例)
500	16.86(9.38~47.13)	51.47(20.61~70.91) ^a
1 000	37.64(24.36~74.31)	70.86(39.34~96.34) ^a
2 500	55.04(39.29~95.31)	93.32(64.33~99.37) ^a

注: B-ALL: 急性 B 淋巴细胞白血病。与 Ph⁺ B-ALL 组比较, ^aP<0.05

细胞中促增殖基因 CDK6 和 c-MYC mRNA 水平较对照组明显下降; 而处理后 48 h CDK6 和 c-MYC mRNA 水平较 24 h 时进一步下降(图 4A)。Western blot 检测结果显示原代白血病细胞用 1 000 nmol/L GSK525762A 处理 24、48、72 h 后, 与对照组相比, c-MYC、CDK6 蛋白表达水平下调(图 4B)。我们进一步分析了 GSK525762A 处理对 Ph⁺ 和 Ph⁻ B-ALL 原代细胞 CDK6 和 c-MYC mRNA 表达水平的影响, 结果显示处理 24 和 48 h 后, Ph⁺ 和 Ph⁻ B-ALL 组 CDK6 和 c-MYC mRNA 表达水平差异无统计学意义(P>0.05)(表 4)。

6. GSK525762A 对 Bcl-2 表达的影响: 经 GSK525762A 处理 24 或 48 h 后, PCR 结果显示 Bcl-2 mRNA 水平在原代白血病细胞中较对照组显著下调, 且 48 h 时下调较 24 h 更显著; 而其他 Bcl-2 家族基因如 BAX、BAD 和 BAK mRNA 水平变化不明显(图 5)。Western blot 检测结果显示原代白血病细胞用 1 000 nmol/L GSK525762A 处理 24、48、72 h 后, 与对照组相比, Bcl-2 蛋白表达水平下调(图 6); 进一步分析显示, 在 GSK525762A 处理后 Ph⁺ B-ALL 组下调程度不及 Ph⁻ 组(P<0.05, 表 4)。

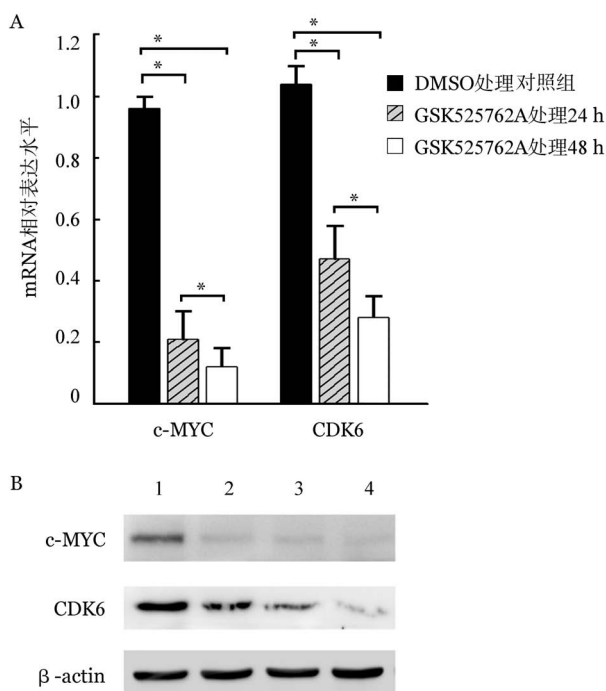
讨 论

尽管多数成人 ALL 经联合化疗可获血液学缓解, 但多数患者很快复发, 长期生存率甚低。因此探索成人 ALL 治疗的新策略和新靶点是当前亟待探索的课题。BRD4 在多种类型的组织和细胞中存

表 4 GSK525762A 对 Ph⁺ 和 Ph⁻ 急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)患者白血病细胞 c-MYC、CDK6 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	c-MYC		CDK6		Bcl-2	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Ph ⁺ B-ALL	4	0.216±0.012	0.172±0.011	0.422±0.032	0.265±0.018	0.546±0.142	0.288±0.098
Ph ⁻ B-ALL	10	0.205±0.008	0.165±0.017	0.478±0.024	0.236±0.022	0.312±0.117 ^a	0.112±0.071 ^a

注: 与 Ph⁺ B-ALL 组比较, ^aP<0.05



1: DMSO 处理对照组; 2~4 分别为 GSK525762A 处理 24、48、72 h 组
图 4 GSK525762A 对 14 例普通型急性 B 淋巴细胞白血病患者白血病细胞 c-MYC 和 CDK6 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 (*P<0.05)

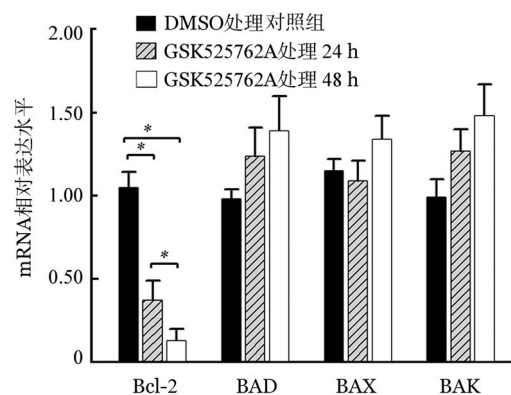
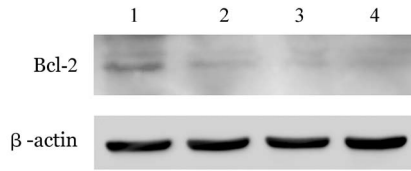


图 5 GSK525762A 对 14 例普通型急性 B 淋巴细胞白血病患者原代细胞 Bcl-2 家族基因的调控作用 (*P<0.05)

在广泛的表达^[7], 可通过 Bromo 结构域识别乙酰化的赖氨酸残基, 从而参与将包括 MLL 在内的多种蛋



1: DMSO处理对照组; 2~4分别为GSK525762A作用24、48、72 h组
图6 GSK525762A对普通型急性B淋巴细胞白血病原代细胞Bcl-2蛋白的调控作用

白复合体招募至乙酰化的H3和H4组蛋白。沉默或抑制BRD4可有效抑制AML细胞增殖并促进其凋亡^[8],其主要机制是下调c-MYC、CDK6和Bcl-2表达。GSK525762A与Bromo结构域有高度亲和力,在较低浓度下即可抑制BRD4的生物学效应。我们在以往研究的基础上进一步探索了GSK525762A对普通型B-ALL原代细胞的作用。结果显示GSK525762A对14例普通型B-ALL患者的原代白血病细胞均有抑制作用,并能促进其凋亡,其作用机制与在AML中类似。既往资料表明Bromo结构域拮抗剂在常规剂量下没有明显的骨髓抑制作用和主要脏器毒性^[9],结合我们的研究结果,提示Bromo结构域拮抗剂有望成为高效低毒的B-ALL治疗新药。

白血病干细胞在很大程度上是白血病难以治愈的根本原因^[10]。目前,常规的化疗手段对白血病干细胞作用不佳。c-MYC是干细胞生物学行为的重要调控因子,敲除c-MYC基因可致多种干细胞功能受损^[11]。本研究证实BRD4拮抗剂GSK525762A能下调B-ALL细胞c-MYC表达,提示GSK525762A可能在一定程度上通过削弱白血病干细胞功能发挥抗白血病作用,但需要进一步研究证实。

Ph⁺ ALL是预后最差的白血病类型之一,虽然酪氨酸激酶抑制剂(TKI)联合小剂量化疗显著提高了Ph⁺ ALL的缓解率,但是否从根本上改善Ph⁺ ALL的预后仍有争议^[12]。T315I等高度耐TKI突变的存在也严重影响TKI治疗Ph⁺ ALL的长期疗效。本研究中,我们首次报道GSK525762A对Ph⁺ ALL细胞具有较强的体外杀伤作用,可为开发Ph⁺ ALL新疗法提供参考。考虑到GSK525762A与TKI的抗白血病机制不同,我们推测GSK525762A对T315I突变Ph⁺ ALL细胞可能也具有较强的作用。本课题组目前正进行相关研究。但是,我们的研究结果也提示Ph⁺ ALL细胞对GSK525762A相对不敏感,这可能与该类细胞Bcl-2不易被下调有关。联合使用Bcl-2

抑制剂可能提高该类细胞的敏感性。

与B-ALL细胞株不同,B-ALL原代细胞的存活依赖恰当的骨髓微环境。通常,体外培养的B-ALL原代细胞会在数日内凋亡殆尽,极大地增加了B-ALL原代细胞培养的难度。维持原代B-ALL存活的骨髓微环境包括VCAM-1等黏附分子和SDF-1、IL-7等细胞因子。在本研究中,我们使用VCAM-1包被培养板并添加SDF-1和IL-7模拟骨髓微环境,可成功实现B-ALL原代细胞的体外短期培养。该方法可为研究B-ALL提供有力工具。

综上,BRD4拮抗剂GSK525762A能有效杀伤普通型B-ALL白血病细胞,抑制肿瘤细胞增殖。同时,它能够通过调节凋亡因子的表达而诱导白血病细胞凋亡。本研究为BRD4作为B-ALL治疗新靶点和以GSK525762A为母核开发新型抗B-ALL药物提供初步的临床前研究支持。

参考文献

- [1] Lech-Maranda E, Mlynarski W. Novel and emerging drugs for acute lymphoblastic leukemia [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(5):505-521.
- [2] Ribera JM. Optimal approach to treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: how to best use all the available tools [J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54(1):21-27.
- [3] Zuber J, Shi J, Wang E, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 478(7370):524-528.
- [4] Herrmann H, Blatt K, Shi J, et al. Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic stem and progenitor cells in acute myeloid leukemia AML [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(12):1588-1599.
- [5] 王曼, 陈翀, 徐杰, 等. 溴结构域蛋白4抑制剂GSK525762A对急性B淋巴细胞白血病细胞增殖和凋亡的影响及可能机制 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(6): 528-532.
- [6] 张之南, 沈悌. *血液病诊断及疗效标准* [M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007: 116-121.
- [7] Paillisson A, Levasseur A, Gouret P, et al. Bromodomain testis-specific protein is expressed in mouse oocyte and evolves faster than its ubiquitously expressed paralogs BRD2, -3, and -4 [J]. *Genomics*, 2007, 89(2):215-223.
- [8] Zhang Y, Chen A, Yan XM, et al. Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2012, 96(4):428-437.
- [9] Dawson MA, Prinjha RK, Dittmann A, et al. Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 529-533.
- [10] Gluzman DF, Nadgornaya VA, Sklyarenko LM, et al. Study of morphocytochemical and immunophenotypic features of acute

leukemia stem cells[J]. *Exp Oncol*, 2008, 30(2):102-105.

[11] Li L, Osdal T, Ho Y, et al. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(4):431-446.

[12] Bernt KM, Hunger SP. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia [J]. *Front Oncol*, 2014, 4:54.

(收稿日期:2014-11-28)

(本文编辑:王叶青)

·病例报告·

儿童急性淋巴细胞白血病 21 号染色体内 AML1 基因扩增伴 TEL 基因缺失一例

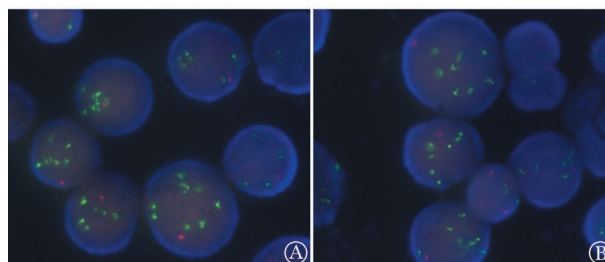
杨文萍 熊枫 黄慧 吴艳 林媛媛 范小菊
刘志强 张小珍 徐红艳 曾华 曾松涛

A case report of childhood acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of AML1 gene in chromosome 21 and TEL deletion Yang Wenping, Xiong Feng, Huang Hui, Wu Yan, Lin Yuanyuan, Fan Xiaojie, Liu Zhiqiang, Zhang Xiaozhen, Xu Hongyan, Zeng Hua, Zeng Songtao

Corresponding author: Yang Wenping, Department of Pathology, Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006, China. Email: ywp07912000@163.com

患儿,女,9岁。因发热、面色苍白于2013年1月入院。查体:面色苍白,无皮肤、黏膜出血点,颈部、腋下可触及多个肿大淋巴结,最大1 cm×2 cm,活动度可,心、肺未见异常,肝脾无肿大。血常规:WBC 19.91×10⁹/L, HGB 79.2 g/L, PLT 70×10⁹/L。骨髓象:幼稚淋巴细胞占0.670,诊断为急性淋巴细胞白血病(ALL)。流式细胞术免疫分型:普通型B-ALL。染色体核型:60,XXX,+1,+4,+4,+5,+6,+8,+8,+9,+10,+11,+14,+21,+21[13]。FISH检测TEL-AML1融合基因,显示1红5~10个绿色信号(图1),提示TEL-AML1融合基因阴性,AML1基因扩增伴TEL基因缺失。予以VDLP(长春新碱、柔红霉素、左旋门冬酰胺酶、泼尼松)方案诱导治疗,化疗第8天外周血幼稚淋巴细胞未见,第15天骨髓幼稚淋巴细胞占0.240,第33天骨髓增生低下,未见幼稚淋巴细胞。诱导治疗后获完全缓解,后续给予2个疗程CAM(环磷酰胺、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤)方案巩固治疗,再次复查骨髓,未见幼稚淋巴细胞,按标准方案治疗后患儿进入维持治疗阶段。2014年7月患儿因发热39.5℃,无寒战、咳嗽、呕吐、发绀、呼

吸困难等表现,无鼻出血、便血、齿龈出血等症状,后给予“头孢他啶”等治疗后,发热高峰下降,但体温仍有反复。查血常规示白细胞和血小板偏低,再次入住我院。查体:体温36.1℃,脉率95次/min,呼吸20次/min,体重35 kg,血压:85/50 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。皮肤、黏膜色泽正常,无皮疹,全身可见散在出血点,无水肿,浅表淋巴结不肿大。巩膜无黄染,口唇红,心肺未见异常,肝脾无肿大。实验室检查:WBC 1.48×10⁹/L,中性粒细胞占0.298,淋巴细胞占0.379,单核细胞占0.324,RBC 2.56×10¹²/L,HGB 93 g/L,PLT 35×10⁹/L。肝功能:总蛋白64.8 g/L,白蛋白39.0 g/L,球蛋白25.8 g/L,总胆红素8.1 μmol/L,直接胆红素2.5 μmol/L,间接胆红素5.6 μmol/L,ALT 21 U/L,AST 32 U/L,ALP 1 032 U/L,GGT 29 U/L,LDH 375 U/L,尿素氮4.10 nmol/L,血肌酐43.3 μmol/L,C-反应蛋白86.1 mg/L。骨髓检查示ALL复发骨髓象。脑脊液:未见幼稚细胞。流式细胞术免疫分型:普通型B-ALL。RT-PCR检测融合基因:TEL-AML1、BCR-ABL、TCF3-PBX1、AF4 MLL阴性;FISH检测TEL-AML1融合基因:显示1红5~10个绿色信号(图2),提示TEL-AML1融合基因阴性,AML1基因扩增伴TEL基因缺失。进行化疗后病情再次获得缓解,目前正在随访中。



A: 治疗前; B: 复发后

图1 FISH检测TEL-AML1融合基因显示AML1扩增伴TEL缺失(×1 000)

(收稿日期:2014-12-04)

(本文编辑:王叶青)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.008

基金项目:江西省科技计划项目(20122BBG70103)

作者单位:330006 南昌,江西省儿童医院

通信作者:杨文萍,Email:ywp07912000@163.com