p18^{INK4C}缺失通过激活LMO2加快Notch-1诱导的急性T淋巴细胞白血病进展

董芳¹, 拜海涛¹, 王晓芳¹, 张森¹, 张珊珊¹, 马士卉¹, Hideo Ema¹, 程涛^{1,2,3}, 郝莎^{1*}

1. 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;

2. 中国医学科学院干细胞医学中心, 天津 300020;

3. 北京协和医学院干细胞与再生医学系, 天津 300020

* 联系人, E-mail: haosha@ihcams.ac.cn

收稿日期: 2017-10-02; 接受日期: 2017-11-03; 网络发表日期: 2017-12-14

国家自然科学基金(批准号: 81500085, 81670106, 81470279, 81670105, 81421002, 81730006)和中国医学科学院&北京协和医学院协和青年科研基金项目(批准号: 3332015127)资助

摘要 p18^{INK4C} (CDKN2C)属于细胞周期蛋白激酶抑制剂家族成员, 通过阻断细胞周期蛋白激酶4/6使细胞周期处于G₁早期. 研究提示, p18缺失影响T细胞的正常发育并可能参与急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)的发生, 但p18缺失导致T-ALL发生和进展的机制并不清楚. 本文利用Notch-1胞内段(ICN-1)过表达诱导的T-ALL模型来研究p18影响T-ALL的发生和进展的可能机制. 结果发现, p18^{-/-}骨髓细胞过表达ICN-1可诱发T-ALL, 白血病细胞表型为更加原始的CD4/CD8双阴性细胞, 且这些细胞主要阻滞在DN3阶段; T-ALL细胞连续移植结果显示, p18缺失能够显著加速T-ALL的进展, 且p18^{-/-} T-ALL细胞更多地处于细胞周期的G₀期, 即静息状态; 基因表达结果发现, 与T-ALL发生直接相关的原癌基因*Lmo2*及共结合分子如*Sfp1*, *Nfe2*及*Ldb1*等以及*N-myc*的表达水平在p18^{-/-}组显著高于对照组. 以上结果提示, p18缺失后可能通过激活*Lmo2*及*N-myc*等的表达从而加速T-ALL的进展. 本研究对p18缺失如何加速T-ALL的发展进行了阐释, 对临床伴随有p18缺失或者LMO2异常激活型突变T-ALL病人的预后提供了理论依据, 具有一定的临床指导价值.

关键词 细胞周期蛋白激酶抑制剂, p18^{INK4C}, 急性T淋巴细胞白血病, LMO2

作为细胞周期蛋白抑制剂家族成员之一, p18^{INK4C} (p18, CDKN2C)主要通过和细胞周期蛋白激酶4或者6 (CDK4/6)竞争性结合CyclinD, 阻断RB蛋白的磷酸化, 从而将细胞周期停滞在G₁早期^[1]. p18缺失虽然不影响T细胞在胸腺中的早期发育, 但是会加快T细胞增殖分裂导致小鼠(*Mus musculus*)随周龄增大出现脾脏、胸腺体积增大及细胞数量增加. 同时, p18缺失也会上调

Tbx21, *GATA3*及*Foxp3*等基因的表达从而促进T细胞功能的活化^[2]. 本课题组前期研究表明, p18是造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)自我更新的抑制因子, 利用特异性靶向p18的小分子化合物体外处理可用于小鼠及脐带血来源的HSC的扩增^[3,4]. 但是由p18缺失HSC重建的受体小鼠在长期连续移植(18~24个月)后会自发急性T淋巴细胞白血病(T-cell acute lympho-

引用格式: 董芳, 拜海涛, 王晓芳, 等. p18^{INK4C}缺失通过激活LMO2加快Notch-1诱导的急性T淋巴细胞白血病进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1386–1396
Dong F, Bai H T, Wang X F, et al. Loss of CDKN2C accelerates progression of Notch-1 induced T lymphoblastic leukemia via activation of LMO2 (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1386–1396, doi: 10.1360/N052017-00277

blastic leukemia, T-ALL), 而HSC并不是导致T-ALL的直接靶细胞^[5]. Notch信号通路对T细胞的发育和分化发挥关键调控作用, 而且Notch-1胞内段(intercellular domain of Notch, ICN-1)的过表达可在小鼠诱导T-ALL的发生^[6]. 但是*p18*缺失如何调控T细胞发生恶性转化及在T-ALL疾病进展中的作用还未可知. 因此, 本研究利用*p18*系统性缺失的小鼠和ICN-1过表达诱导的T-ALL小鼠模型来研究*p18*在T-ALL发生发展中的作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究主要利用以下3种小鼠: 野生型C57BL/6 (WT, CD45.2)小鼠, 野生型B6.SJL (*p18*^{+/+}, CD45.1)和*p18*基因敲除(*p18*^{-/-}, CD45.1)小鼠. 小鼠均饲养于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)无特定病原(specific pathogen free, SPF)级动物房, 置于正压空气清洁房间无菌鼠笼内, 垫料、饲料及饮水均经高温高压灭菌处理, 垫料每周更换一次, 饲料与饮水不予限制. 基因敲除小鼠于出生后3周左右进行基因型鉴定, 分别选取8~10周龄的*p18*^{+/+}和*p18*^{-/-}小鼠进行实验. 所有涉及小鼠的实验均得到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)动物伦理委员会的管理与批准.

1.2 逆转录病毒的包装并感染骨髓造血干祖细胞

利用逆转录病毒包装体系p-Kat, pCMV-VSVG, MSCV-ICN-1-IRES-GFP用脂质体LP2000 (Invitrogen, 美国)法转染293T细胞系, 48和72 h后收集上清, 用0.22 μ m针头过滤器过滤直接用于实验, 剩余部分储存于-80℃冰箱备用. 用美天旎(德国)公司小鼠CD117 (c-Kit)磁珠(130-090-858)富集*p18*^{+/+}和*p18*^{-/-}小鼠骨髓c-Kit⁺细胞后流式分选富集的HSC (Lineage negative, c-Kit positive和Sca-1 positive, LSK)细胞, 用SFEM (serum-free expansion medium)+50 ng/mL干细胞因子(stem cell factor, SCF)+50 ng/mL血小板生成素(thrombopoietin, TPO)+青霉素/链霉素(P/S) (SCF和TPO均购自美国PeproTech)预刺激16~20 h, 使细胞进入周期有利于逆转录病毒的感染; 按照病毒上清与培养基1:1体积比加入病毒上清, 再加入Polybrene (Sigma-Aldrich, 美国)并

混匀; 病毒感染8~12 h后换液. 培养48 h后, 收集感染过的细胞(如果贴在壁上的细胞很多, 就用细胞分离液消化3~5 min), 流式分选GFP⁺细胞进行骨髓移植实验.

1.3 T-ALL白血病的构建及鉴定

流式分选经病毒感染后的GFP⁺细胞(1.25×10^4), 经尾静脉移植给4.75Gy照射的受体野生型C57BL/6小鼠, 密切观察小鼠状态. 移植后大约50天左右, 受体小鼠逐渐出现弓背、少动、毛发无光泽、体重下降等濒死现象. 于小鼠死亡前取骨髓(bone marrow, BM)来源的GFP⁺细胞(此细胞记为Passage 0, P0)制成单细胞悬液, 流式细胞术分选GFP⁺白血病细胞, 取同等数量的*p18*^{+/+}和*p18*^{-/-}组白血病细胞经尾静脉移植给4.75Gy照射的受体动物, 移植后密切观察动物状态和白血病发生情况(此发病细胞记为Passage 1, P1), 记录生存时间. P1代小鼠死亡前采集小鼠外周血(peripheral blood, PB)进行流式细胞术分析, 同时进行外周血细胞和骨髓细胞涂片的吉姆萨染色(Giemsa staining)观察血细胞形态辅助诊断白血病. 同时处死小鼠, 留取BM、肝脏(liver)、脾脏(spleen, SP)、胸腺(thymus, Thy)和淋巴结(lymph node, LN)进行组织学染色(HE)辅助诊断白血病.

1.4 T-ALL白血病细胞的连续骨髓移植

获得P1代白血病细胞后分选同样数量的GFP⁺细胞, 经尾静脉移植给4.75Gy照射的受体野生型C57BL/6小鼠进行连续骨髓移植, 依次记录发病小鼠的生存情况, 分别记为Passage 2(P2)和Passage 3(P3)代细胞.

1.5 T-ALL细胞免疫表型的流式细胞术检测

取P1代疑似发病小鼠后肢骨(股骨、胫骨和髌骨)、SP和Thy组织. 用PBE缓冲液(磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)+2%胎牛血清(fetal calf serum, FBS)+2 mmol/L EDTA)冲取BM细胞, SP和Thy分别用200目筛网进行研磨. 将获得的各脏器细胞悬液用尼龙膜过滤去除组织块, 取少量细胞进行计数, 剩余细胞用ACK红细胞裂解液(ACK lysis buffer) (10 mmol/L KHCO₃, 150 mmol/L NH₄Cl, 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0)裂解红细胞后用一定量的PBE重悬制备成单细胞悬液, 置冰上待用.

本实验所用抗体: Biotin或者PE-Cy7 Lineage cocktail 包含CD3 (145-2C11), CD4 (GK1.5或RM4-5), CD8 (53-6.7), Gr-1 (RB6-8C5), Mac-1 (M1/70), Ter119 (Ter119)和B220 (RA3-6B2), CD3: PE-Cy7, PE; CD4: PE-Cy7, 生物素; CD8: PE-Cy7, 生物素, APC, APC-Cy7; CD25 (PC61.5): PE; CD44 (IM7): APC; B220: Percpcy5.5; Mac-1: APC, APC-efluoro780; c-Kit (2B8): APC; Sca-1 (D7): PE, PE-Cy7; 均购自BD (美国)或eBioscience (美国). 取 $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ 的BM或Thy细胞, 加入anti CD3-PE, 的流式抗体, 冰上避光孵育30 min, PBE清洗, 用300 μL PBE重悬后上机检测(BD LSR II, 美国). 取 $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ 的BM或Thy细胞, 加入antiCD25-PE和anti CD44-APC抗体检测双阴性(double negative, DN)细胞1~4各阶段的T细胞; 加入anti-CD3-PE, CD4-PE-Cy7和CD8-APC的抗体用来检测双阳性(double positive, DP) T细胞亚群, 标记方法同上.

1.6 T-ALL白血病细胞的凋亡和增殖(BrdU)检测

细胞凋亡检测: 获得P3 T-ALL白血病细胞单细胞悬液后, 利用BD细胞凋亡检测试剂盒进行操作检测细胞凋亡, 即取 $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ 细胞用试剂盒中配备的Binding buffer 50 μL 重悬, 加入PE-Annexin V 5 μL 和7-AAD 5 μL , 混匀后室温避光孵育15 min. 之后再加入200~400 μL Binding buffer重悬, 过膜, 1 h之内上机检测.

细胞增殖检测(BrdU法): 取P3代白血病发病濒死小鼠于处死前2 h腹腔注射BrdU, 1 mg BrdU/6g体重. 2 h后处死小鼠获得BM和Thy细胞, 利用BD BrdU检测试剂盒进行操作检测细胞增殖, 即取 $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ 细胞经过固定、破膜、再固定和DNase消化后, 加入5 μL APC-BrdU抗体, 室温孵育20~30 min, 加入1 mL Wash buffer洗一遍, 离心后再加入PBE溶液1 mL清洗后200 $\times$ g离心8 min, 弃上清, 重悬至300 μL , 上机前加入Hoechst33342至终浓度10~20 $\mu\text{g/mL}$.

1.7 Real time PCR检测相关基因的表达

流式分选P3代 10^6 个白血病细胞, 用Qiagen RNeasy Mini Kit (德国)进行RNA提取和纯化, 按照操作手册进行操作. 取1 μg RNA, 按照逆转录试剂盒(Promega, 美国)操作手册进行逆转录. 获得cDNA后, 采用SYBR染料法, 参考Fast Start Universal SYBR

Green Master说明书操作进行荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR), 在ABI Step-One plus PCR仪上进行. 反应步骤1: 50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 步骤2: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 步骤3: 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 重复40个循环, 收集信号. 反应体系: cDNA 1 μL (逆转录后产物按照1:5稀释), 引物(上下游引物混合, 10 nmol/mL) 1 μL , 水3 μL , 2 $\times$ SYBR Green 5 μL , 每个反应设置3个重复孔, 最后结果取平均值用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析相对表达量. 所用引物详细名称和序列见表1.

2 结果

2.1 $p18^{-/-}$ -LSK细胞过表达ICN-1可诱发小鼠T-ALL

鉴于Notch信号通路活化在T细胞发育成熟中的关键调控作用, 利用逆转录病毒感染体系过表达Notch1基因的ICN-1已经被广泛用于构建小鼠T-ALL模型^[6]. 本课题组同样利用这一模型来构建小鼠原代T-ALL, 构建策略及流程见图1A. 首先流式分选 $p18^{+/+}$ 和 $p18^{-/-}$ 小鼠BM来源LSK细胞体外培养, 细胞因子预刺激使细胞进入周期利于逆转录病毒的感染. 病毒感染48 h后流式分选成功感染的GFP⁺细胞, 并尾静脉移植给4.75Gy照射的受体小鼠. 移植后密切关注小鼠状态, 每2周取小鼠PB行流式细胞术分析. 移植后约45天小鼠开始出现弓背、活动减少、体重下降及精神萎靡等症状, 并于60天内全部死亡, $p18^{+/+}$ 组和 $p18^{-/-}$ 组在小鼠的生存并无差异(图1B, $n=6$), 此发病小鼠记为P0代. 取P0代发病小鼠的BM细胞进行二次移植, 待小鼠出现上述濒死现象后(P1代小鼠)取BM, SP, Liver, Thy和LN进行组织学HE染色可见大量原始细胞浸润(图1C), 同时发病小鼠PB和BM细胞吉姆萨染色结果也可发现大量原始幼稚细胞浸润(图1D). P1代发病小鼠BM细胞免疫表型分析发现 $p18^{+/+}$ 组GFP⁺细胞主要为CD3⁺, CD4⁺和CD8⁺的T细胞, 不表达B细胞(B220)和髓系细胞(Mac-1)表面标记, 而 $p18^{-/-}$ 组GFP主要为CD3⁺, CD4⁺和CD8⁺的T细胞, 不表达B细胞(B220)和髓系细胞(Mac-1)表面标记(图1E), 符合T-ALL的免疫表型. 综合上述表型结果提示, $p18^{+/+}$ 和 $p18^{-/-}$ 骨髓细胞过表达ICN-1均可诱导T-ALL, 但是 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞表型为比对照组更加原始的CD4/CD8 DN细胞.

表 1 引物详细名称和序列

基因名称	上游引物5'→3'	下游引物5'→3'
<i>Gapdh</i>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
<i>Lmo2</i>	TAGCGGTCCCTATGTTCTG	ATCGAAAGGAAGAGCCTGGA
<i>Sfp1</i>	AGCGATGGAGAAAGCCATAG	TGCAGCTCTGTGAAGTGGTT
<i>Nfe2</i>	CCAGCCTCTCAGGGACACTA	CAGGTCTCCACAAGCACAAA
<i>Ldb1</i>	CTTAGTCCTCACCCCTTGCCA	GCTTGAATGACTTTAGGAACA
<i>N-myc</i>	TCTCTACGGTGACCACATCG	AGCACCTCCGAGAGGATA
<i>Hes1</i>	AAAGCCTATCATGGAGAAGAGGCG	GGAATGCCGGGAGCTATCTTCTT
<i>Notch-1</i>	TCTTACACGGTGTGCTGAGG	GAATGGAGGTAGGTGCGAAG
<i>Lyl1</i>	GAGCCACCTTCTGGGGTT	GACCTTCAGCATCTTCCCT
<i>Hhex</i>	ACCCTGCTCACAGGAAGTGT	TCAGAATCGCCGAGCTAAAT
<i>Lmo1</i>	GGTACCGTCTTGATCTTG	GAGATGATGGTGCTGGACAA

2.2 连续移植结果显示 $p18^{-/-}$ 组白血病小鼠生存期显著缩短

为了检测 $p18^{-/-}$ 白血病细胞的生物学特征和功能的差异, 本课题组对两组P0白血病细胞进行了连续移植. 将同等数量的 $p18^{+/+}$ 和 $p18^{-/-}$ 白血病细胞移植给半致死剂量照射的小鼠以观察生存期. 结果显示, 在连续移植的P1, P2和P3代小鼠中, $p18^{-/-}$ 组小鼠的生存期均比 $p18^{+/+}$ 显著缩短(图2A). $p18^{+/+}$ 和 $p18^{-/-}$ 组小鼠的中位生存期分别为19天vs. 14天(Passage 1, $P=0.01$, $n=4\sim 7$), 26天vs. 16天(Passage 2, $P=0.0007$, $n=5\sim 6$), 16天vs. 13.5天(Passage 3, $P=0.0003$, $n=7\sim 8$), 这些结果提示, $p18^{-/-}$ 组白血病细胞具有更强的致病能力. 取P3白血病细胞进行免疫表型检测显示(图2B左), $p18^{+/+}$ 组白血病细胞主要为CD4/CD8 DP细胞, 而 $p18^{-/-}$ 组则主要为DN细胞和CD4单阳(single positive, SP)细胞. 利用CD25和CD44可将DN细胞分为DN1, DN2, DN3和DN4这4个阶段. 结果显示, $p18^{+/+}$ 组白血病细胞处于DN4阶段, 而 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞则主要处于DN3阶段(图2B右). 统计结果显示, $p18^{-/-}$ 组DN3阶段细胞比例显著高于对照组(70.05 ± 3.75 vs. 12.38 ± 4.6 , $P<0.001$), 而DN4阶段细胞比例则比对照组显著下降(87.03 ± 4.5 vs. 25.3 ± 3.3 , $P<0.001$), 这提示 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞为更加原始和幼稚的白血病细胞(图2C). 同时, 对同等数量的Passage 3白血病细胞移植后受体小鼠PB白血病细胞比例监测结果显示, 在移植后早期和中期即第7天和第10天, $p18^{+/+}$ 和 $p18^{-/-}$ 受体小鼠PB中GFP⁺白血病细胞比例

在两组之间并无显著差异, 在移植后期即第14天, $p18^{-/-}$ 组GFP⁺白血病细胞比例比对照组显著增高(85.7 ± 0.26 vs. 62.3 ± 3.9 , $P<0.01$), 这提示 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞可能主要在病程后期浸润增加从而加速疾病进展.

2.3 $p18^{-/-}$ T-ALL细胞更多处于细胞周期静息状态

$p18$ 主要影响细胞周期进程, 可将细胞周期阻断在G₁早期. 本课题组利用BrdU掺入实验和Annexin V染色法分别对两组细胞的细胞增殖和细胞凋亡进行了检测和分析. 结果如图3A (BM)和C (Thy)所示, BrdU阳性主要为处于增殖期的G₁期细胞, 而BrdU阴性又可根据Hoechst染色分为阴性的G₀和阳性的S/G₂/M. 统计结果提示, BM中 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞G₀期的细胞比例显著高于对照组(82.8 ± 0.3 vs. 45.5 ± 4.5 , $P<0.01$), 而G₁期比例则比对照组显著下降(9.9 ± 2.2 vs. 34.3 ± 5.8 , $P<0.05$)(图3B). Thy中细胞周期情况与BM类似(图3D), $p18^{-/-}$ 组白血病细胞G₀期的细胞比例也显著高于对照组(80.1 ± 1.5 vs. 42.9 ± 7.7 , $P<0.01$). 细胞凋亡检测结果显示, $p18^{-/-}$ 组白血病细胞凋亡情况与对照组相比并无显著差异(图3E和F). 综合上述结果, $p18^{-/-}$ 组白血病细胞增殖能力与对照组相比并无显著增强, 细胞更多地处于静息状态.

2.4 $p18^{-/-}$ T-ALL细胞高表达与白血病细胞自我更新相关的基因

根据上述实验结果发现, 与对照相比, $p18^{-/-}$ 组白

图1 *p18*缺失T-ALL的构建及鉴定

A: 分选野生型($p18^{+/+}$)及 $p18$ 缺失($p18^{-/-}$)小鼠骨髓LSK细胞进行体外培养, 过夜预刺激后分别感染MSCV-ICN1-GFP逆转录病毒, 感染后48 h分选GFP⁺细胞分别移植给受4.75Gy照射的受体动物, 观察小鼠存活; B: $p18^{+/+}$ 组及 $p18^{-/-}$ 组受体小鼠(Passage 0)移植后的生存曲线, 两组小鼠生存无差异; C: Passage 1代 $p18^{+/+}$ 及 $p18^{-/-}$ 组受体小鼠骨髓、肝脏、脾脏、胸腺及淋巴结病理组织HE染色, 两组各个器官均可见大量原始细胞浸润; D: Passage 1代 $p18^{+/+}$ 及 $p18^{-/-}$ 组受体小鼠PB及BM细胞涂片的Giemsa染色, 两组PB及BM中均可见大量原始细胞浸润; E: Passage 1代 $p18^{+/+}$ 及 $p18^{-/-}$ 组受体小鼠骨髓细胞流式细胞术检测显示两组均可见>90% GFP⁺ CD3⁺细胞, 这些细胞表达T细胞表面标记CD4和CD8, 但是不表达髓系细胞标记Mac-1及B细胞标记B220。其中 $p18^{+/+}$ 组白血病细胞约70%为CD4/CD8 DP, 而 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞仅6%为CD4/CD8 DP, 主要为CD4/CD8 DN细胞

血病细胞为更加幼稚的原始细胞, 更多地处于细胞周期的静息, 但是却显著加速疾病进展, 于是下一步对这些细胞与T-ALL的基因表达进行了分析。由于本T-ALL模型是由ICN-1过表达所诱发的, 所以首先针对Notch信号通路分子进行了检测。结果显示, *Notch1*及其下游*Hes1*和*N-myc*基因在 $p18^{+/+}$ 和 $p18^{-/-}$ 白血病细胞上的表达均显著高于相应的BM来源的CD3⁺T细胞, 但是*Notch1*和*Hes1*在 $p18^{+/+}$ 和 $p18^{-/-}$ 白血病细胞上的表达则无显著差异, 而*N-myc*的表达在 $p18^{-/-}$ 白血病细胞则比对照组有所升高($P<0.05$)(图4A)。与T-ALL尤其是早

期T系祖细胞(early T cell precursor, ETP)来源的T-ALL相关的转录因子检测发现, 转录因子*Lmo2*在 $p18^{-/-}$ 白血病细胞上的表达显著高于 $p18^{+/+}$ 组($P<0.001$), 虽然在相应的BM来源的CD3⁺T细胞上的表达并无显著区别, 但是*Lmo2*下游基因*Hhex*, *Lyl1*等的表达则在两组白血病细胞上无显著差异。这提示*Lmo2*和*N-myc*的高表达有可能是导致 $p18^{-/-}$ 白血病细胞进展加速的原因之一。

接着, 对转录因子*Lmo2*相关的共结合分子进行了基因表达检测。已有研究报道*Sfp1*, *Nfe2*, *Ldb1*等均可

图 2 *p18* 缺失 T-ALL 疾病进展迅速伴随有白血病细胞分化阶段的阻滞

A: 同等数量 *p18*^{+/+} 及 *p18*^{-/-} 组 Passage 0 T-ALL 细胞连续移植实验结果显示, *p18*^{-/-} 组 T-ALL 组受体小鼠生存期比对照组显著缩短 (Passage 1, $P=0.01$, Passage 2, $P=0.0007$, Passage 3, $P=0.0003$); B: 取 Passage 3 发病小鼠的白血病细胞进行流式细胞术分析显示, *p18*^{+/+} 组主要由 CD4/CD8 DP 细胞组成, 而 *p18*^{-/-} 组则主要为 CD4⁺ 及 CD4/CD8 DN 细胞组成; 利用 CD25 和 CD44 对两组白血病细胞进行分析显示, *p18*^{+/+} 组细胞主要处于 DN4 阶段, 而 *p18*^{-/-} 组则主要处于 DN3 阶段; C: 统计结果显示, *p18*^{-/-} 组处于 DN3 阶段的细胞比例显著高于对照组 ($P<0.001$), 而处于 DN4 阶段的细胞比例显著低于对照组 ($P<0.001$); D: 移植受体小鼠 PB 白血病细胞比例检测显示在移植后 7 天和 10 天, 两组细胞在受体小鼠 PB 的比例并无显著差异, 在移植后 14 天 *p18*^{-/-} 组白血病细胞比例则比对照组有所升高 ($P<0.01$)

通过不同的方式激活 *Lmo2* 的转录^[7-9]。结果发现, *Lmo2* 的共结合分子如 *Sfp1*, *Nfe2*, *Ldb1* 的表达在 *p18*^{-/-} 组白血病细胞上的表达也显著高于对照组 (图 4B)。WB 结果也进一步证实了 *LMO2* 蛋白在 *p18*^{-/-} 组白血病细胞上的高表达 (图 4C)。

Lmo2 基因在小鼠造血系统不同细胞群体的表达见图 4D (数据来源 HemaExplorer 网站, <http://servers.binf.ku.dk/hemaexplorer>), 其主要高表达在 HSC 和红细胞发育的 Erythrocyte A (Ery A) 和 Erythrocyte B (Ery B) 阶段, 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞上的表达很低, 这也与

图 4A 的结果一致。不同白血病类型细胞 *Lmo2* 基因表达结果显示 (图 4D, 数据来源 HemaExplorer 网站) 其在 T-ALL 上的表达也很低。但是, 本课题组的结果显示其在 *p18*^{-/-} 组白血病细胞上的表达则显著增高, 这提示 *Lmo2* 的激活有可能是 *p18* 缺失基础上诱发 T-ALL 所特异性激活的。

3 讨论

p18 作为细胞周期蛋白激酶抑制剂家族成员, 在造

图3 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞更多处于静息状态

A和B: 利用体内BrdU实验发现, $p18^{-/-}$ 组BM的白血病细胞 G_0 期细胞比例显著高于对照组($P<0.01$), 而 G_1 期细胞比例则低于对照组($P<0.05$); C和D: 利用体内BrdU实验发现, $p18^{-/-}$ 组Thy的白血病细胞也比对照组更多地处于细胞周期的 G_0 期($P<0.01$), 而 G_1 期细胞比例与对照无显著差异; E: 细胞凋亡实验结果显示, $p18^{+/+}$ 及 $p18^{-/-}$ 组白血病细胞凋亡率无显著差异

血系统的研究较多, 而p18调控T细胞的发育和成熟并参与T细胞恶性转化的机制并不明确。本研究利用p18缺失小鼠构建ICN-1过表达诱发的T-ALL模型, 发现

p18缺失的白血病细胞表达更多原始T细胞表面标记, 白血病细胞更多地处于细胞周期的 G_0 期即静息状态。p18 $^{-/-}$ 组白血病细胞除了Notch信号通路激活外, 也表

图4 *p18*^{-/-}组白血病细胞高表达原癌基因*Lmo2*及其共结合分子

A: 原癌基因*Lmo2*和*N-myc*在*p18*^{-/-}组白血病细胞的表达显著高于对照组($P<0.001$, $P<0.05$), Notch信号通路分子的表达在两组无显著差异; B: 原癌基因*Lmo2*的共结合分子*Nfe2*, *Ldb1*在*p18*^{-/-}组白血病细胞的表达显著高于对照组($P<0.001$); C: WB结果显示, *p18*^{-/-}组白血病细胞比对照组高表达LMO2蛋白(灰度值为1385:1840); D: 利用HemaExplorer网站查询*Lmo2*在小鼠造血系统各个细胞群体的表达显示*Lmo2*主要在HSC及MEP以及红系发育前体细胞Erythrocyte A和Erythrocyte B高表达; E: 利用HemaExplorer网站查询*Lmo2*在人不同类型白血病细胞上的表达显示*Lmo2*在T-ALL表达处于较低水平

达更高水平的与白血病自我更新相关的转录因子, 如 *Lmo2* 及其共结合分子 *Spil1*, *Nfe2*, *Ldb1* 等, 从而激活 *Lmo2* 的表达, 后者进一步活化 *N-myc* 的表达, 这可能是 *p18* 缺失加速 T-ALL 疾病进展的原因之一。

白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)或者白血病起始细胞(leukemia initiating cell, LIC)是与白血病的起始、进展、治疗效果及复发等多个环节都息息相关的一类肿瘤干细胞, 在急性髓系白血病中研究比较透彻并且受到广泛关注^[10,11]。在 T-ALL 中也有针对 LSC 的研究并将免疫表型为 DN3 阶段的白血病细胞定义为 T-ALL 的 LSC^[12], 并且认为 ICN-1 表达可以诱发 LIC 的恶性转化^[13]。本研究发现, 与对照组相比, *p18* 缺失的细胞过表达 ICN-1 所诱发的 T-ALL 白血病细胞的分化主要阻滞在 DN3 阶段的细胞, 即以具有 LSC 免疫表型的细胞为主。细胞增殖结果也显示这些细胞主要处于细胞周期的 G₀ 也就是静息状态, 这也符合 LSC 增殖缓慢和自我更新的生物学特性。这是 *p18* 缺失诱发的 T-ALL 的一个特征。

在白血病细胞连续移植过程中发现 P1, P2 及 P3 代受体小鼠的生存存在两组之间均存在显著差异, 即 *p18* 缺失组的小鼠生存期显著缩短(图 2A), 但是原代受体小鼠(P0)的生存却并无差异(图 1B)。可能的原因为: 原代白血病在发生过程中涉及逆转录病毒在被感染细胞中拷贝数的差异以及恶性转化过程等多方面因素, 实际反映的是被检测细胞是否具有起始白血病发生的能力。虽然在构建两组(*p18*^{+/+}和*p18*^{-/-}) P0 代白血病小鼠时分选了同样数量的 GFP⁺ 细胞进行移植, 但是这些 GFP⁺ 细胞并非是完全发生了恶性转化的白血病细胞, 用 P0 代白血病小鼠的生存来反映两组白血病的进展并不准确。所以后续通过移植同等数量的完全发生恶性转化的白血病细胞(GFP⁺)来进行连续移植实验观察白血病的进展, 通过比较连续移植后受体小鼠的生存

来准确反映两组白血病的进展。

作为共结合分子, *Lmo2* 最早于 1990 年在 T-ALL 病例中高发的染色体重排导致的 TCR 位点异位而被发现, 被认为是与 T-ALL 发病直接相关的原癌基因^[14,15]。之后研究显示, *LMO2* 作为重要的转录因子参与造血发生和血管重塑。从机制上讲, *Lmo2* 主要与 *Tal1*, *E47* 和 *Ldb1* 等形成转录起始复合物从而调控下游基因的表达^[16]。*Lmo2* 转基因小鼠也会出现 CD4/CD8 DN 的 T 细胞的增多^[17], 尤其是 T 系祖细胞出现类似干细胞样的增殖优势并伴有分化阻滞, 这些转录谱特征与 ETP-ALL 的 T 系祖细胞的自我更新特征极为相似^[18,19]。过表达 *Lmo2* 及其共结合分子 *Tal1* 可在小鼠诱导 T-ALL 的发生^[12]。在临床 T-ALL 病例中有 45% 以上可发现非染色体异位导致的 *Lmo2* 基因的异常高表达^[20]。本研究发现, *p18* 缺失组的白血病细胞高表达 *Lmo2* 基因及其共结合分子 *Sfp11*, *Nfe2*, *Ldb1*, 活化的 *Lmo2* 下游基因 *Hhex*, *Lyl1* 的表达虽然并无显著差异, 但是另一靶基因 *N-myc* 在 *p18* 缺失组白血病细胞高表达, 这可能是导致 *p18* 缺失 T-ALL 疾病进展加速的重要原因, 因为已有文章也报道 *Lmo2* 可通过 *Hhex*, *N-myc* 和 *Notch* 通路及靶基因两条不同的信号通路来诱导 T-ALL 的发生^[21]。虽然在正常 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞中 *Lmo2* 的表达很低, 在临床 T-ALL 病例中相比其他类型的白血病表达水平也不高, 这可能是伴有 *p18* 缺失的 T-ALL 病人的独特特征。

本研究结果提示, *p18* 缺失可通过某种机制激活 *Lmo2* 的表达从而一方面使细胞阻滞在更加原始的 DN3 祖细胞阶段, 阻断细胞分化, 另一方面白血病细胞具有更强的类似正常干细胞的自我更新潜能, 从而加速疾病的进展。干扰 *Lmo2* 的表达能否逆转 *p18* 缺失 T-ALL 疾病进展加速的表型以及如何增强此类白血病对治疗的反应还需后续进一步研究。

参考文献

- 1 Tesio M, Trumpp A. Breaking the cell cycle of HSCs by p57 and friends. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 187-192
- 2 郝莎, 董芳, 王娅婕, 等. *p18*^{INK4C} 调控小鼠 T 细胞的发育及功能. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 879-888
- 3 Gao Y, Yang P, Shen H, et al. Small-molecule inhibitors targeting INK4 protein *p18*^{INK4C} enhance *ex vivo* expansion of haematopoietic stem cells. *Nat Commun*, 2015, 6: 6328
- 4 Xie X Q, Yang P, Zhang Y, et al. Discovery of novel INK4C small-molecule inhibitors to promote human and murine hematopoietic stem cell *ex vivo* expansion. *Sci Rep*, 2015, 5: 18115

- 5 Yuan Y, Yu H, Boyer M J, et al. Hematopoietic stem cells are not the direct target of spontaneous leukemic transformation in $p18^{DNK4C}$ -null reconstituted mice. [Cancer Res](#), 2006, 66: 343–351
- 6 Hu X, Shen H, Tian C, et al. Kinetics of normal hematopoietic stem and progenitor cells in a Notch1-induced leukemia model. [Blood](#), 2009, 114: 3783–3792
- 7 Landry J R, Bonadies N, Kinston S, et al. Expression of the leukemia oncogene *Lmo2* is controlled by an array of tissue-specific elements dispersed over 100 kb and bound by Tal1/Lmo2, Ets, and Gata factors. [Blood](#), 2009, 113: 5783–5792
- 8 McCormack M P, Hall M A, Schoenwaelder S M, et al. A critical role for the transcription factor Scl in platelet production during stress thrombopoiesis. [Blood](#), 2006, 108: 2248–2256
- 9 Layer J H, Alford C E, McDonald W H, et al. LMO2 oncoprotein stability in T-cell leukemia requires direct LDB1 binding. [Mol Cell Biol](#), 2015, 36: 488–506
- 10 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
- 11 Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. [Blood](#), 2017, 129: 1577–1585
- 12 Tatarek J, Cullion K, Ashworth T, et al. Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL. [Blood](#), 2011, 118: 1579–1590
- 13 Li X, Gounari F, Protopopov A, et al. Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. [J Exp Med](#), 2008, 205: 2851–2861
- 14 Boehm T, Foroni L, Kaneko Y, et al. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1991, 88: 4367–4371
- 15 Royer-Pokora B, Loos U, Ludwig W D. *TTG-2*, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). [Oncogene](#), 1991, 6: 1887–1893
- 16 Larson R C, Osada H, Larson T A, et al. The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. [Oncogene](#), 1995, 11: 853–862
- 17 Neale G A, Rehg J E, Goorha R M. Ectopic expression of rhombotin-2 causes selective expansion of CD4⁺CD8⁺ lymphocytes in the thymus and T-cell tumors in transgenic mice. [Blood](#), 1995, 86: 3060–3071
- 18 Cleveland S M, Smith S, Tripathi R, et al. *Lmo2* induces hematopoietic stem cell-like features in T-cell progenitor cells prior to leukemia. [Stem Cells](#), 2013, 31: 882–894
- 19 McCormack M P, Young L F, Vasudevan S, et al. The *Lmo2* oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. [Science](#), 2010, 327: 879–883
- 20 Ferrando A A, Neuberg D S, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. [Cancer Cell](#), 2002, 1: 75–87
- 21 Smith S, Tripathi R, Goodings C, et al. *LIM domain only-2 (LMO2)* induces T-cell leukemia by two distinct pathways. [PLoS ONE](#), 2014, 9: e85883

Loss of CDKN2C accelerates progression of Notch-1 induced T lymphoblastic leukemia via activation of LMO2

DONG Fang^{1,2}, BAI HaiTao^{1,2}, WANG XiaoFang^{1,2}, ZHANG Sen^{1,2}, ZHANG ShanShan^{1,2},
MA ShiHui^{1,2}, EMA Hideo^{1,2,3}, CHENG Tao^{1,2,3} & HAO Sha^{1,2}

¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;

²Center for Stem Cell Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China;

³Department of Stem Cell & Regenerative Medicine, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

The cyclin-dependent kinases inhibitor CDKN2C (p18^{INK4C}, p18) is a member of the INK4 family that specifically blocks the activity of CDK4/6 in the G₁ phase of cell cycle. In the hematopoietic system, deletion of *p18* is associated with T cell malignancies in mice and B cell malignancies in humans. The mice reconstituted with *p18* knockout (ko) bone marrow (BM) cells spontaneously developed acute T lymphoblastic leukemia (T-ALL) in serial transplantation (2 years after transplantation) originating from a CD3^{low} cell population. However, how *p18* is involved in the development of T-ALL leukemia is largely unknown. In this study, Intracellular domain of Notch1 (ICN-1) induced T-ALL model was used to explore the role of *p18* deficiency in the development of T-ALL leukemia. Both hematopoietic stem and progenitor LSK (Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺) cells transduced with ICN1-GFP retrovirus from *p18*^{+/+} or *p18*^{-/-} mice initiated the T-ALL. The majority of CD3⁺ cells were CD4/8 double positive in *p18*^{+/+} group while that of CD3⁺ cells were CD4/8 double negative in *p18*^{-/-} group. The serial transplantation of T-ALL cells showed accelerated progression of leukemia in *p18*^{-/-} group compared with the *p18*^{+/+} group in first, secondary and tertiary transplantation ($P=0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$ respectively). The BrdU assay suggested an increased proportion of G₀ phase cells and decreased proportion of G₁ phase in *p18*^{-/-} group compared with *p18*^{+/+} group. The gene expression analysis also showed higher expression of *Lmo2* and *N-myc* in the leukemia cells of *p18*^{-/-} group compared with *p18*^{+/+} group. Deletion of *p18* activates the expression of *Lmo2* and *N-myc* although a mechanism is yet to be further defined. Taken together, our current study provides evidence and mechanism insights for the role of *p18* deficiency during progression of T-ALL.

cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs), p18^{INK4C}, T cell acute lymphoblastic leukemia, LMO2

doi: [10.1360/N052017-00277](https://doi.org/10.1360/N052017-00277)