

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0216-07

永生化小鼠髓系细胞系的制备方法

薛宇佳,杜江龙,许强,曹欣,杨学财,万雪梅,蔡葵蒸*

西北民族大学生命科学与工程学院,兰州 730030

摘要:为了改进髓系细胞系的制备方法,采用 Tet-On 诱导型逆转录病毒载体,通过添加 Doxycycline 以诱导 MLL-AF9 融合基因在成年骨髓的血液祖细胞/干细胞中表达,获得髓系细胞系。本研究发现永生化小鼠髓系细胞系的制备方法,通过条件性表达 MLL-AF9 获得的永生化的髓系细胞系和成年小鼠骨髓中的原代髓系细胞相比,具有相似的表面标志物,即 CD11b⁺,但永生化的髓系细胞系极易扩增,获得大量均一的细胞群体。

关键词:髓系细胞系;病毒;制备方法;Doxycycline

中图分类号:S852.4

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.034

Preparation Method of Immortalized Mouse Myeloid Cell Line

XUE Yu-jia, DU Jiang-long, XU Qiang, CAO Xin, YANG Xue-cai, Wan Xue-mei, CAI Kui-zheng*

College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, 730010, China

Abstract: In this study, an immortalized mouse myeloid cell line was prepared. The Tet-On inducible retrovirus vector was used to induce the expression of MLL-AF9 fusion gene in hematopoietic progenitor cells/stem cells of adult bone marrow by adding Doxycycline to obtain a myeloid cell line. This study found that immortalized mouse myeloid cell line preparation methods, through the conditional expression of MLL-AF9 obtained immortalized myeloid cell lines compared with the primary myeloid cells in adult mouse bone marrow, have a similar surface marker, ie, CD11b⁺, but immortalized myeloid cell line is easily amplified, obtaining a large number of uniform cell populations.

Key words: Myeloid cell line; virus; Preparation; Doxycycline

白血病的起源细胞是造血干细胞(HSC)或淋巴样髓样祖细胞^[1]。由于 HSC 具有固有的自我更新能力,可能需要用于白血病发生的其他基因改变会累积在该细胞类型及其子代中^[2-5]。因此,双潜力的淋巴样骨髓祖细胞(其在小鼠胎血细胞生成中有活性)也可能是婴儿白血病中的起源细胞。重要的是,永生化和白血病细胞仍然依赖于 MLL 融合蛋白表明 MLL 融合本身,或它调节的基因,是潜在的治疗靶的持续表达^[6]。在白血病的染色体易位(MLL)上的染色体基因中发现急性骨髓性白血病(AML)和急性淋巴性白血病(ALL)的情况为 10% 和 7%。它们在治疗相关的 AML 以及婴儿中占比高达 80%,而其中 50% 是髓系急性白血病^[7]。一种永生

化小鼠髓系细胞系的制备方法,其特征在于,是采用 Tet-On 诱导型逆转录病毒载体,通过添加 Doxycycline 以诱导 MLL-AF9 融合基因在成年骨髓的血液祖细胞/干细胞中表达,获得髓系细胞系。MLL-AF9 融合基因在婴儿与髓系和淋巴系侵袭性白血病都有相关性,而在成体,这种易位主要与急性髓系白血病相关^[8-10]。这些结果暗示在胚胎和成体组织白血病发展的细胞来源方面存在差异。我们猜测细胞来源的内在特性在决定白血病的谱系方面扮演了重要角色。

事实上,新生儿 CD34⁺ 细胞表达 MLL-AF9 可永生化为髓系或淋巴系细胞,而成体骨髓 CD34⁺ 细胞的永生化更难以实现,且具有强烈的髓系偏好性^[11]。为获得具有永生化能力的小鼠血液髓系细胞,我们在来源于成年骨髓的血液祖细胞/干细胞中表达 MLL-AF9 融合基因^[12]。这种策略产生了克隆化的并依赖于细胞因子的髓系细胞系。由于正常的髓系细胞本身并不表达 MLL-AF9,在血液细胞中异位表达 MLL-AF9 可能会改变这些细胞,改变原代髓系细胞的某些生物学特性^[13-15]。为克服这一缺陷,

收稿日期:2018-07-09 接受日期:2018-09-04

基金项目:西北民族大学研究生科研(实践)创新项目(Yxm2018136);甘肃省青年科技基金计划(17JR5RA277);国家自然科学基金(31700763),国家自然科学基金(81760287);青海省基础研究计划项目(2016-ZJ-712);中国科学院“西部之光”人才项目(2018-3-7)资助

*通信作者 Tel:86-013893223143;E-mail:ckz000@126.com

我们拟采用 Tet-On 诱导型逆转录病毒载体,通过添加 Doxycycline 来诱导 MLL-AF9 基因在成年骨髓的血液祖细胞/干细胞中表达,获得髓系细胞系;而在这些永生化的髓系细胞用于生物学功能实验前,撤掉 Doxycycline,终止 MLL-AF9 基因的表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10~12周龄的C57BL/6小鼠由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。

1.2 实验材料

TtRMPVIR 质粒来自于美国 Addgene; 细胞系 GP + E-86 来自于 ATCC(美国); BamHI 酶和 XhoI 酶购自 NEB 公司(美国); Doxycycline 购自 Sigma 公司(美国); 转染试剂 Lipofectamine 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司(美国); 5-氟尿嘧啶按 150 mg/kg 购自 Sigma 公司(美国); TER-119 购自 Sigma 公司(美国); anti-CD11b 购自 Sigma 公司(美国); 和 anti-Gr-1 购自 Sigma 公司(美国); IMDM 培养基液胎牛血清购自 Gibco 公司(美国); 0.15 mM 的 MTC 购自 Sigma 公司(美国); 100 ng/mL 的 SF 购自 Sigma 公司(美国); 10 ng/mL 的 anti-IL-6 和 1% 体积的 anti-IL-3、4 μg/mL Polybrene 来自 Biolegend 公司(美国); CD3ε 购自 Sigma 公司(美国); B220 购自 Sigma 公司(美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 构建质粒

用 BamHI/XhoI 双酶切从 TtRMPVIR 质粒上切下 dsRed 基因片段，并将带 BamHI/XhoI 黏性末端的 MLL-AF9 cDNA 连接入逆转录病毒载体 TtRMPVIR 质粒，成功构建的质粒命名为 VIR-MLL-AF9；dsRed 基因的表达受四环素调节元件 TREtight 严格调控，载体组成型表达反式作用因子 rtTA3，在 Doxycycline 的作用下发生构象变化，激活四环素调节元

ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGCAATTCCGCCAACATCGCGCACAGCTGTCGGTGGCGCTTCCCCGC
CCGACCCGGGACCACCGGGGGCGGCCGGCGGGGGGGCGCCGGGCTAGGGGGCGCCCCCGGCCAACGGCTC
CCGGCCCTGCTGCTTCCCCCGGCCGGCGGTGGCGGTGGCGGCCGGGCCCTCCCCCGGCTGTC
CGGGCCGGCGGCCGGCGGAAGCAGGGGCTGGGTTCCAGGGGAGCGGCCGCCCTCAGCAGCCT
CCTCGTCGTCGCCCTCGTCTCGTCTCGTCATCGTCCTCAGGCCCTTCAGGGCCGCCCTGCTCCGGTGGGGCC
GGGCTTCGACGCCGGCTGCAGGTCTGGCCCATCGGCACCAACCTGGCCGGTCCGGCCGTGTTGGGA
GAGCGGGGGGAGGCGGAGCGGAGAGGATGAGCAATTCTTAGGTTGGCTCAGATGAAGAAGTCAGAG
TGCAGACTCCCACAAGGTCTCCTTCAGT-
TAAAACTAGTCCTCGAAAACCTCGTGGGAGACCTAGAAGTGGCTCTGAC

件 TREtight, 启动下游基因的表达; 撤销 Doxycycline, 则下游基因的表达终止。

1.3.2 融合基因逆转录病毒的获得

将 VIR-MLL-AF9 质粒转染逆转录病毒包装细胞系 GP + E-86, 获得条件性表达 MLL-AF9 融合基因的逆转录病毒; 所述细胞系 GP + E-86 包含莫罗尼氏鼠白血病病毒 Mo-MuLV 的 gag, pol 和 env 区域。

1.3.3 小鼠骨髓处理

将 10~12 周龄的 C57BL/6 小鼠在获取骨髓 3 天前用 5-氟尿嘧啶按 150 mg/kg 处理, 获取骨髓后在 IMDM 培养基中培养 48 小时, 培养基中添加 10% 胎牛血清, 0.15 mM 的 MTG, 100 ng/mL 的 SCF, 10 ng/mL 的 IL-6 和 10 ng/mL 的 IL-3。

1.3.4 获得永生化小鼠髓系细胞

用含有 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene 的逆转录病毒上清液转导步骤 3) 所述骨髓细胞, 室温, 转速 2 000rpm 离心 90 分钟, 将细胞转移至培养箱孵育 6 小时后, 弃去含 Polybrene 的的逆转录病毒上清液, 更换为步骤 3) 所述的添加有各种成分的 IMDM 培养基, 培养 48 小时, 用流式细胞仪分析 Venus + 的 Lineage-Scal-1 + c-kit + 细胞, Lineage 包含 CD3 ε , B220, TER-119, CD11b, 和 Gr-1; 分选出的细胞培养于步骤 3) 所述的添加有各种成分的 IMDM 培养基, 并添加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Doxycycline; 最后存活的细胞即为永生化的小鼠髓系细胞。

2 实验结果

2.1 MLL-AF9 基因的核苷酸序列

是采用 Tet-On 诱导型逆转录病毒载体,通过添加 Doxycycline 以诱导 MLL-AF9 基因在成年骨髓的血液祖细胞/干细胞中表达,获得髓系细胞系;MLL-AF9 基因的核苷酸序列如序列表中序列 SEQ No. 1 所示。

CGAAATTCAAGCTATCCTCTCAGATC-
CATCTGTGTTCCCTCTAAATAATCAGAGACCAAATCTGGAGATAAGATCAAGAAG
AAAGATTCTAAAAGTAT-
AGAAAAAGAAGAGAGGAAGACCTCCCACCTCCCTGGAGTAAAATCAAATAACACATGG
AAAGGACATTCAGAGTTACCAAAGG-
GAAACAAAGAAGATAGCCTGAAAAAAATTAAAAGGACACCTTCTGCTACGT
TTCAGCAAGCCACAAAGATTAAAAAATTA-
AGAGCAGGTAAACTCTCTCTCAAGTCTAAGTTAACAGACAGGGAA
TTCAAATAGGAAGGAAGGGGTACAAATT-
GTACGACGGAGAGGAAGGCCTCCATCAACAGAAAGGATAAGACCCCC
TTCGGGTCTCCTCATTAATTCTGAACCTGGAAAAGCCCCAGAAAGTCCGGAAAGACAAGGAAGAACACCTC
CACITACAAAAGAAGATAAGACAGTTGTCAAGACAAAGCCCTCGAAGGATTAAGCCAGTTAGGATTATTCCCTTC
TTCAAAAAGGACAGATGCAACCATTGCTAACGAACTCTACAGAGGGAAAAAGGGGCTAAAAGAAA
ATTGAAAAAGAACCGAGCTCAGCTGCAGGGAAAGAAAGGTGAAGACACAGGTAAAAATATTGACAGTTCA
TCATGCCCTGTTGTCAGTGCTATCTCCCGGATCATTAAGACCCCTGGGGTTATACAGGATGAGGAT
TATGACCCCTCCAATTAAAATTGCCCCATTAGACTCTACACCGAATAGTAGATTCACTGCCCCGTCCTGTG
GATCTCTGAAAAATCAACTGCACTGCACTCTCAGCACTCCCTCAAATGTCTCAGACTCCTCTCGATCTAGT
AGCCCCAGTGTGATAACCTCCACAGACTCTCAGGCTTCTGAGGAGATTCACTGAGGAGCGG
AGCGATAACCCCTGAAGTTCATCCTCCACTGCCATTCCAGTCCCCAGAAAATGAGAGTAATGATAGG
GAAGCAGAAGGTATTCACTGTCGGAGAGAAGTTGGATCTAGAACGACGAAAAATTATCAACTCTAC
AAAGTCCCCCCCAGCAGCAGACCTCTCGTCCACCTCCACCTCTGCTGACTCCACCGCCACCACTG
CAGCCAGCCTCCAGTATCTTGACCAACACACCTGGTTATGCCTCCAACAATCCCCTAGCATCACC
ATTTTGCCCTGCTTCACTGCTCTATGCAAGGGAAAGCGAAAATCTATTTCGCGAGAACCGACATTAGG
TGGACTTCTTAAAGCATTCTAGGTCAAGAGCCACAATACTTTCCCTCAGCAAAGTATGCCAAAGAAGGTC
TTATTCGCAAACCAATATTGATAATTCCGACCCCCCTCCACTAACCTCCGGAGCTGGCTTGCATC
TGGTTTTCTGCATCTGGTACCGCTGCTTCAGCCCGATTGTTTCGCCACTCCATTCTGGAACAAGGTT
GATATGCACAAAAGGAGCCCTTCTGAGAGCTCCAAGATTTACTCCAAGTGAGGCTCACTCTAGAAT
ATTTGAGTCTGTAACCTGCCCTAGTAATCGAACATTCTGCTGGAACATCTTCTCAGGAGTATCCAATAG
AAAAAGAAAAGAAAAGTGTITAGCCTATTCGATCTGAACCAAGATCTCCCTCTCACTCCATGAGGA
CAAGAAGTGGAAAGGCTTAGTAGTTCTGAGCTCTCACCTCTCACCCCCCGTCTCTCTCCT
GTTAACGCATTCTGTTAGCCTCTGCCACTAGTCCTAAACCCAACTTTACTTTCCCTCTCATT
CCCTGACTCACTCTGGGAATCTGCAGAGAAAATCAGAGACCAAGGAAGCAGACTAGTGCTCC
GGCAGAGCCATTTCATCAAGTAGTCCTACTCCCTCTTGGTTACCCAGGCTCTCAGAC
TGAAAGAGGGAGAAATAAGACAAGGCCCCGAGGAGCTGCAAAGATCGAGATGCTGACAA
GACCGTGGAGAAGGACAAGAGTAGAGAGAGAGACCGGGAGAGAGAAAAGGAGAATAAGCGGG
AGTCAAGGAAAGAGAAAAGGAAAAGGATCAGAAATTCACTGAGTAGTTCTGCTTGTATCCTGTG
GGTAGGGTTCCAAAGAGAAGGTTGGTGAAGATGTTGCCACTTCATCTGCCAAAAAAGC
AACAGGGCGGAAGAAGTCTCATCACATGATTCTGGACTGATATTACTCTGTGACTCTGGGG
ATACAAACAGCTGTCAAAACAAATACTTATAAGAAAGGAGAGGAAATCTGGAAAAACCAA
CTTGGACCTCGGCCAACTGCCCATCCCTGGAGAAGGAGAAAACCTCTGCCCTTCCACTCC
TTCATCTAGCACTGTTAACATTCCACTTCCTCCATAGGCTCCATGTTGGCTCAGGAGACAAGC
TTCCAATGACTGACAAGAGGGTTGCCAGCCTCTAAAAAGGCCAAAGCTCAGCTCTGCAAGAT
TGAGAAGAGTAAGAGTCTTAAACAAACCGACCAGCCAAAGCAGCAGGGTCAAGAAAGTACTC

ATCAGAGACCTCTGTGCGAGGACCCGGATTAAACATGTCTGCAGAAGAGCAGCTGTCGCC
 TGGCGAAAAGAGCTGTGTTCCATGGGAATGATGACAAGTCATCAATTGCTGGCTAGAACAGAT
 ACGAGAAAAGATTGTCTCCATGGGAATGATGACAAGTCATCAATTGCTGGCTAGAACAGAT
 GCTAACCTCTGCTCCACCCATCAAACCAATTAAACCTGTCACTAGAACAGCAGCTGCC
 GGAACCTCCAGTAAAGAAAGGACGTCGATCGAGGCGGTGAGCTGGCAGTGTCCCCTGCC
 GGTGCCTGAGGACTGTGGTTGTACTAATTGCTTAGATAAGCCAAGTTGGTGGCTGCA
 ATATAAAGAACAGTGTGCAAGATGAGAAAATGTCAGAATCTACAATGGATGCCCTCAA
 AGCCTACCTGAGAACAGCTAAAGCTGAAAAAGAACAGAACAGCTAACAGCAG
 TGAAAAGAACAGCACCAAAGAGAGCAGTGTGAAGAACGCTGGACTCTAGTCAGAA
 ACCTACCCCCATCAGCAAGAGAGGATCCTGCCCAAAGAACAGCAGTAGTGAGCCTCTC
 CACGAAAGCCCCGAGGAAAAGACTGAAGAACGGAAATGTCTCGGCCCTGGCCTGAA
 TCCAAACAGGCCACCACTCCAGCTCCAGGAAGTCAAGCAAGCAGGTCTCCAGCCAGC
 ACTGGTCATCCCGCCTCAGCCACCTACTACAGGACGCCAAGAACAGTTCCAAA
 CCACTCCTAGTGAGGCCAAGAACAGCAGCCTCCACCAGAACATCAGGCTCAGAGCA
 GAGCAAACAGAAAAAGTGGCTCCCCGCCAAGTATCCCTGTAAAACAAAAACCAAAA
 GAAAAGGAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAACATGCAGCCACTTGAAACATCCT
 CAGCACTCTCCAATGCCAATAGTCTAACGAAAAAAATTCCAGCAGATGGTCCCGAA
 GTATACACACGTGTCTGAAGTGAAGAAACTCCAATAAGCAAAGCAAATCAGATAAGCAA
 ATAAAGAATGGTAATGTGACAAGGCATACCTAGATGAACTGGTAGAGCTTCACAGAA
 GTTAATGACATTGAGAGAACACATTCTGCAGCAGATCGTAACCTTATAGAAG
 AAACTGGACACTTCATATCACAAACACAACATTGATTTGATTTGCTCGCTGGA
 CAAAACCACAGTCCGTAAACTACAGAGTTACCTGGAAACATCTGGAACATCCTGA

2.2 逆转录病毒载体 TtRMPVIR 质粒的模式图

逆转录病毒载体 TtRMPVIR 质粒的模式图如图 1 所示。dsRed 基因的表达受四环素调节元件 TREtight 严格调控。该载体组成型表达反式作用因子 rtTA3，在 Doxycycline 的作用下可发生构象变化，激活四环素调节元件 TREtight，启动下游基因的表达；撤销 Doxycycline，则下游基因的表达终止。用 BamHI/XhoI 双酶切从 TtRMPVIR 质粒上切下 dsRed 基因片段，并将带 BamHI/XhoI 黏性末端的 MLL-AF9 cDNA 连接入该逆转录病毒载体，成功构建的质粒命名为 VIR-MLL-AF9。将 VIR-MLL-AF9 质粒转染逆转录病毒包装细胞系 GP + E-86(该细胞系包含莫罗尼氏鼠白血病病毒 Mo-MuLV 的 gag, pol 和 env 区域)，可获得条件性表达 MLL-AF9 基因的逆转录病毒。

将 10~12 周龄的 C57BL/6 小鼠在获取骨髓 3 天前用 5-氟尿嘧啶(5-FU)按 150mg/kg 处理。获取骨髓后在 Iscoves modified Dulbecco medium (IMDM) 培养基中培养 48 小时，培养基中添加 10% 胎牛血清 (FCS), 0.15 mM monothioglycerol (MTG), 100 ng/mL Steel factor (SF), 10 ng/mL interleukin-6

(IL-6) 和 10 ng/mL interleukin-3 (IL-3)。用含有 4 μg/mL Polybrene 的逆转录病毒上清液转导上述骨髓细胞，室温 2 000 rpm 离心 90 分钟。将细胞转移至培养箱孵育 6 小时后，弃去含 Polybrene 的的逆转录病毒上清液，更换为上述添加各种成分的 IMDM 培养基。培养 48 小时，用流式细胞仪分析 Venus⁺ 的 Lineage⁻Sca-1⁺c-kit⁺ (LSK) 细胞，Lineage 包含 CD3ε (145-2C11), B220 (RA3-6B2), TER-119, CD11b (M1/70), and Gr-1 (RB6-8C5)。分选出的细胞培养于上述添加各种成分的 IMDM 培养基，并添加 1 μg/mL 的 Doxycycline。最后存活的细胞即为永生化的小鼠髓系细胞。

2.3 流式细胞术检测 CD11b

将转化 MLL-AF9 的骨髓细胞在髓系细胞生长因子 cocktail 中培养 5 天后，经流式细胞术检测，如图 2 所示，永生化的髓系细胞系可表达髓系细胞表面标志物 CD11b，还有部分细胞表达粒细胞表面标志物 Gr-1，部分细胞表达树突状细胞表面标志物 CD11c，部分细胞表达巨噬细胞表面标志物 F4/80，说明我们构建的髓系细胞系具备分化为髓系细胞各个亚群的能力。通过条件性表达 MLL-AF9 获得的

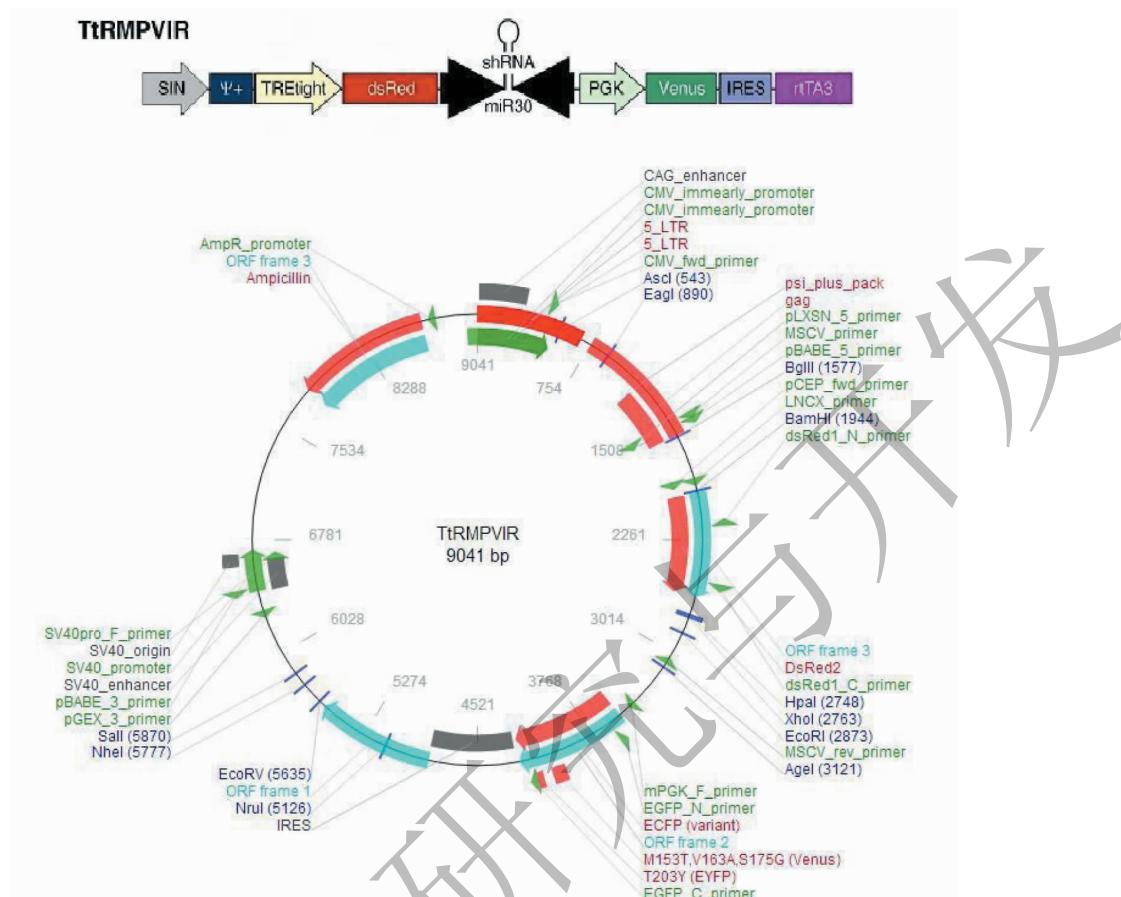


图 1 逆转录病毒载体 TtRMPVIR 质粒的图谱

Fig. 1 Retroviral vector TtRMPVIR plasmid

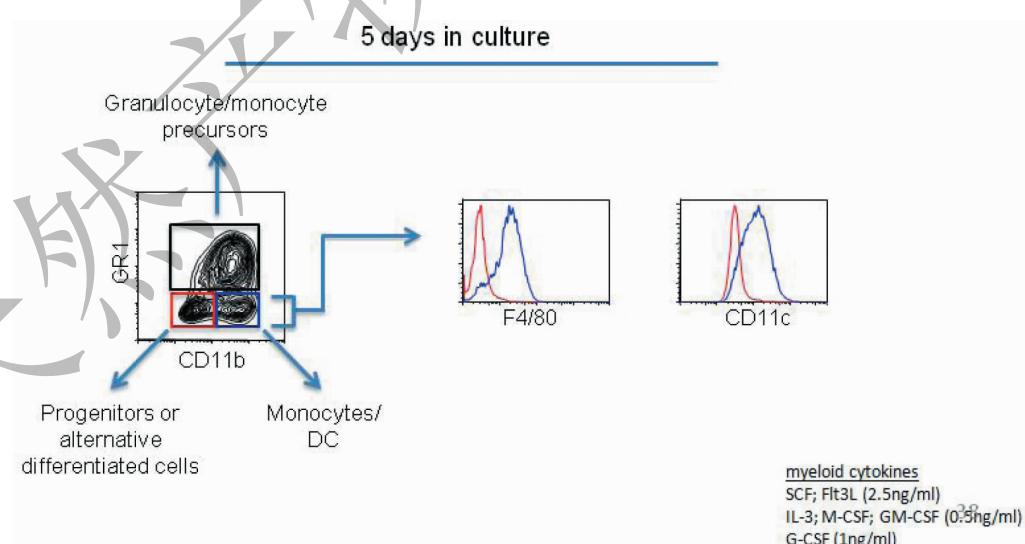


图 2 永生化的髓系细胞系在髓系细胞生长因子作用下的分化情况

Fig. 2 The differentiation of immortalized myeloid cell lines under the action of myeloid cell growth factors

永生化的髓系细胞系（图 2 右侧）和成年小鼠骨髓中的原代髓系细胞（图 2 左侧）相比，具有相似的表

面标志物，即 CD11b⁺，但永生化的髓系细胞系极易扩增，获得大量均一的细胞群体。

2.4 永生化的髓系细胞系形态

如图 3 所示,经 Giemsa 染色后镜下观察,我们

构建的永生化的髓系细胞系具有环状核或分叶核,与髓系细胞核的特点相符。

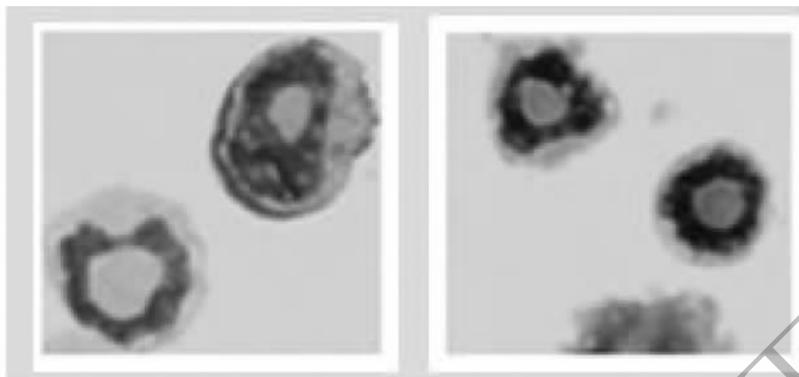


图 3 永生化的髓系细胞系在 Giemsa 染色后镜下观察细胞核的特点

Fig. 3 The characteristics of the immortalized myeloid cell line after Giemsa staining.

2.5 永生化的髓系细胞系的克隆形成

如图 4 所示,永生化的髓系细胞系在添加髓系细胞生长因子的 methylcellulose 培养基中培养,具有形成髓系细胞克隆集落的能力。

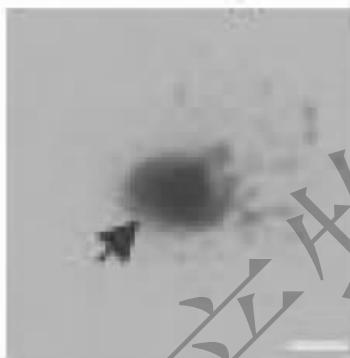


图 4 永生化的髓系细胞系在添加髓系细胞生长因子的 methylcellulose 培养基中培养,形成克隆集落的能力

Fig. 4 The ability of an immortalized myeloid cell line to be cultured in a methylcellulose medium supplemented with myeloid cell growth factor to form clonal colonies

3 结论

研究表明,在成体细胞中可以观察到,MLL-AF9 转导髓系偏好性造血干细胞会使其永生化向髓系谱系倾斜。MLL-AF9 也许不能激活成人骨髓细胞中淋巴谱系永生化所需的基因组合。在 MLL-AF9 表达时,在新生和成人细胞中改变的基因包括 HOXA5, HOXA9, HOXA10, MEIS1 和 PBX3。HOXA9 和 MEIS1 在 MLL 融合体白血病的诱导和维持中有明确的作用^[16]。这些基因在 MLL-AF9 转导

的新生儿和成人细胞中表达的水平相似,这意味着它们可能是必需的,但不足以像 MLL-AF9 那样介导长期的自我更新。从我们的研究结果中得出,制备这种永生化小鼠髓系细胞系的方法,通过条件性表达 MLL-AF9 获得的永生化的髓系细胞系与成年小鼠骨髓中的原代髓系细胞相比,具有相似的表面标志物,即 CD11b+,但永生化的髓系细胞系极易扩增,容易获得大量均一的细胞群体。

参考文献

- 1 Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia [J]. *Annu Rev Pathol*, 2012, 7:283.
- 2 Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region [J]. *Lancet*, 2002, 359:1909-1915.
- 3 Eguchi M, Eguchiishimae M, Greaves M. The role of the MLL gene in infant leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2003, 78:390-401.
- 4 Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11) (q21;q23): a collaborative study of 40 cases. [J]. *Blood*, 1991, 77:440-447.
- 5 Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, et al. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 3029-3035.
- 6 So CW, Karsunky H, Passegue E, et al. MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3: 161-171.

(下转第 246 页)