

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.05.002

· 研究快报 ·

## *IL-34* 对人急性单核细胞白血病细胞恶性生物学行为的影响

胡雨婷, 王丽娜, 王荣, 杨斐斐, 王昊, 刘晓礼, 任倩, 郑国光(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)

**[摘要]** **目的:** 探讨过表达 *IL-34* 对急性单核细胞白血病 (acute monocytic leukemia, AMoL) 细胞恶性生物学行为的影响。 **方法:** 构建 *IL-34* 过表达载体, 制备慢病毒载体 pCDH-GFP, 感染 AMoL 细胞系 THP1 和 MOLM-13, 通过细胞增殖实验、集落形成实验、PI 染色检测细胞周期法和 Annexin-V/PI 法检测 *IL-34* 对 AMoL 细胞的增殖、集落形成、细胞周期和凋亡的影响, 通过流式细胞术分析过表达 *IL-34* 对细胞分化表型的影响, 通过裸鼠皮下成瘤模型观察肿瘤大小、质量差异和巨噬细胞募集情况。 **结果:** 实验组 THP1 和 MOLM-13 细胞 *IL-34* mRNA 表达水平分别比对照组提高近 4 000 倍和近 3 000 倍 (均  $P < 0.01$ ), 表明已成功构建稳定过表达 *IL-34* 的 AMoL 细胞系。体外细胞实验结果显示, 过表达 *IL-34* 提高 THP1 和 MOLM-13 细胞的增殖 [72 h: (0.738±0.003) vs (0.646±0.008), (0.290±0.004) vs (0.247±0.004); 均  $P < 0.01$ ] 和集落形成能力 [(127.00±3.37) vs (86.00±4.08) 个, (160.70±4.70) vs (116.70±3.93) 个; 均  $P < 0.01$ ], 对细胞的凋亡没有显著影响 (均  $P > 0.05$ ); 单核-巨噬细胞分化标志物 CD11b 和 CD14 表达水平升高, 未成熟细胞标志物 CD71 表达水平减低, 表明 *IL-34* 促进了 AMoL 细胞向单核-巨噬细胞方向分化 (均  $P < 0.05$ )。裸鼠体内荷瘤实验可见, 过表达 *IL-34* 促进瘤组织内巨噬细胞募集 ( $P < 0.01$ )。 **结论:** 过表达 *IL-34* 提高 AMoL 细胞的增殖和集落形成能力, 促进细胞向单核-巨噬细胞分化, 并促进肿瘤内巨噬细胞的募集。

**[关键词]** 白介素-34 基因; 急性单核细胞白血病; 细胞增殖; 细胞分化; 巨噬细胞

**[中图分类号]** R737.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)05-0447-08

## Effect of *IL-34* on malignant biological behavior of human acute monocytic leukemia cells

HU Yuting, WANG Lina, WANG Rong, YANG Feifei, WANG Hao, LIU Xiaoli, REN Qian, ZHENG Guoguang (State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

**[Abstract] Objective:** To study the effects of *IL-34* over-expression on malignant biological behavior of acute monocytic leukemia (AMoL) cells. **Methods:** The lentiviral vector pCDH-GFP for over-expressing *IL-34* was constructed and infected into AMoL cell lines (THP1 and MOLM-13). Then its effects on proliferation, colony forming and cell cycle as well as apoptosis were tested by the MTS, colony formation assay and Annexin-V/PI staining, respectively. The cell differentiation phenotypes were assessed by flow cytometry. Nude mice xenograft model was established to observe the tumor size and mass as well as the macrophages recruitment. **Results:** qPCR analysis showed that the expression of *IL-34* mRNA in THP1-*IL-34* and MOLM-13-*IL-34* cells was nearly 4 000 and 3 000 folds higher than their respective control cells (all  $P < 0.01$ ), indicating that AMoL cell lines over-expressing *IL-34* were successfully established. *In vitro* study showed that over-expression of *IL-34* in AMoL cell lines promoted their proliferation potential (72 h: [0.738±0.003] vs [0.646±0.008]; [0.290±0.004] vs [0.247±0.004]; all  $P < 0.01$ ) and colony formation ([127.00±3.37] vs [86.00±4.08]; [160.70±4.70] vs [116.70±3.93]; all  $P < 0.01$ ), whereas had little effect on apoptosis (all  $P > 0.05$ ). Over-expression of *IL-34* promoted AMoL cell differentiation towards monocyte-macrophage lineage as the expressions of the monocyte-macrophage markers, CD11b and CD14, were increased whereas the expression of immature marker, CD71, was decreased in AMoL cell lines over-expressing *IL-34* (all  $P < 0.05$ ). Nude

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81570153, No. 81770183); 天津市自然科学基金重点项目 (No. 17JCZDJC35000); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (No. 2016-12M-2-006)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81570153, No. 81770183), the Tianjin Natural Science Foundation (No. 17JCZDJC35000), and the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (No. 2016-12M-2-006)

**[作者简介]** 胡雨婷 (1993-), 女, 硕士生, 主要从事白血病发生发展调控机制研究, E-mail: 18004028278@163.com

**[通信作者]** 郑国光 (ZHENG Guoguang, corresponding author), 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事白血病微环境、异常细胞间通讯在白血病发生发展中的作用机制研究, E-mail: zhenggtjchn@aliyun.com

mice xenograft model showed that *IL-34* over-expression stimulated macrophage recruitment in tumor tissues ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Over-expression of *IL-34* in human AMoL cell lines promotes their proliferation, colony forming potential and differentiation towards monocyte-macrophage lineage. Furthermore, *IL-34* participates in the process of macrophages recruitment *in vivo*.

**[Key words]** *IL-34*; acute monocytic leukemia; proliferation; differentiation; macrophage

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(5): 447-454. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.002]

*IL-34* 是 2008 年发现的一种新型白细胞介素<sup>[1]</sup>, 属胞外分泌蛋白, 与巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF; 也称 colony-stimulating factor 1, CSF1) 作用于同一受体, 即作用于 CSF1R<sup>[2]</sup>。*IL-34* 表达广泛, 不仅在脾脏高表达, 而且也可见于心、脑、肝、肾、淋巴结、小肠等器官中。生理条件下, *IL-34* 具有促进血液系统中单核祖细胞存活和单核细胞增殖、分化的能力<sup>[3-4]</sup>, 维持巨噬细胞功能, 并参与脑、皮肤和骨基质等多种组织的发育过程<sup>[5-8]</sup>。大量研究<sup>[9-12]</sup>表明, *IL-34* 表达升高参与了各类炎症疾病的促炎过程。虽然有研究<sup>[13-14]</sup>发现, *IL-34* 可能与肺癌和肝细胞癌的转移以及骨肉瘤血管新生和巨噬细胞募集相关, 但其在白血病的发生发展过程中的作用尚未阐明。M-CSF 在急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 患者尤其是急性单核细胞白血病 (acute monocytic leukemia, AMoL) 的患者中高表达, 不仅作用于白血病细胞, 还可募集并异常活化白血病微环境中的巨噬细胞<sup>[15-16]</sup>。分析 GEO 中 AML 数据库 GSE30825<sup>[17]</sup> 发现, *IL-34* 在 AMoL 尤其伴有 *MLL* 融合基因的亚型中显著高表达, 那么 *IL-34* 在 AMoL 的异常高表达对白血病细胞的生物学行为又会有何影响尚未明了。本课题通过构建过表达 *IL-34* 的慢病毒并感染 AMoL 细胞系, 观察其对 AMoL 细胞恶性生物学行为的影响, 为阐明 AMoL 发病机制提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系、动物及主要试剂

人源 AMoL 细胞系 THP1 和 MOLM-13 及人胚肾细胞系 HEK 293T 均来自中国医学科学院北京协和医学院实验血液学国家重点实验室细胞库。雌性、18~22 g、6~7 周龄、SFP 级的裸鼠 [合格证书号: SYXK (津) 2015-0001] 购于中国医学科学院医学实验动物研究所。过表达慢病毒载体 pCDH-GFP、包装质粒 psPAX2 和 PMD2.G 均购于 SBI 公司, 胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素/链霉素双抗、OPTI-MEM 均购于 Gibco 公司, SYBRgreen PCR Kit、*Eco* RI、*Xba* I 限制性内切酶和相关缓冲试剂均购自日本 TaKaRa 公司, DMEM、RPMI 1640 均购于 Neuronbc 公司, H4434 购自 Stem Cell 公司, 流式抗体 CD11b-APC、CD14-APC、CD71-PE、F4/80-APC 和 Annexin-V/碘化丙啶

(PI) 试剂盒均购于 BioLegend 公司。实时荧光定量 PCR (qPCR) 引物由华大基因公司合成。

### 1.2 细胞培养

将 THP1 和 MOLM-13 细胞置于用含 10% 胎牛血清、2% 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱中培养, 取对数生长期细胞用于后续实验。

### 1.3 过表达载体的设计与构建

根据人 *IL-34* 基因 CDS 区序列设计 PCR 引物, 引物序列: F 为 5'-CTAGTCTAGAGCCACCATGCCCGGGGCTTCACCTG-3', R 为 5'-CCGGAATTCTCAGGGCAAGAGGCCCTCGC-3'。以 NB4 细胞 cDNA 为模板, PCR 扩增目的片段, 经琼脂糖电泳鉴定后回收 PCR 产物, 以 *Eco* RI 和 *Xba* I 双酶切 PCR 回收产物和 pCDH-GFP 载体构建过表达 *IL-34* 的慢病毒载体 pCDH1-*IL-34*-GFP, 同时 pCDH-GFP 载体作为空白对照。

### 1.4 重组病毒的制备与感染 AMoL 细胞

将目的质粒和包装质粒通过脂质体转染试剂共转染至 HEK293T 细胞中, 分别于 48、72 h 收集包装的病毒液上清并浓缩, 同时以相同的方法制备空载体病毒为对照组。有限稀释法测定病毒滴度, 并保存于 -80 °C 冰箱中以备用。

用包装好的 *IL-34* 过表达重组病毒 (pCDH1-*IL-34*-GFP) 感染 THP1 和 MOLM-13 细胞, 同时以空载体病毒 (pCDH1-GFP) 感染细胞设置为对照组。感染 48 h 后, 流式细胞分选仪检测感染效率并分选出 GFP<sup>+</sup> 细胞, 建立亚细胞系实验组为 THP1-*IL-34*、MOLM-13-*IL-34*, 对照组为 THP1-Vector、MOLM-13-Vector。

### 1.5 qPCR 检测 AMoL 细胞中 *IL-34* mRNA 的表达

收集  $1 \times 10^6$  细胞, 用 TRIzol 法提取 RNA, 测定 RNA 浓度并反转录合成 cDNA, 以 *GAPDH* 作为内参 (引物序列详见表 1), qPCR 法测定 *IL-34* 过表达组与对照组 *IL-34* 的表达量。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s 后, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 35 s, 循环 40 次终止反应。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算均值作为 *IL-34* mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次。

### 1.6 MTS 法检测 *IL-34* 对 AMoL 细胞增殖的影响

将实验组和对照组的 THP1 细胞以  $1 \times 10^5$ /孔的密度、MOLM-13 细胞以  $2 \times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板

中,设置3个复孔,分别于0、24、48及72 h时加入MTS,并于37 °C孵育2 h后,于波长在490 nm处测量光密度(*D*)值。实验重复3次。

表1 qPCR引物序列  
Tab. 1 Sequence of qPCR primers

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>IL-34</i>	F GCCGACTTCAGTACATGAAACACT
	R CCCTCGTAAGGCACACTGATC
<i>GAPDH</i>	F GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	R GAAGATGGTGATGGGATTC
<i>CSF1R</i>	F TTGGGCTGATCCTCTTCTTC
	R AAAGCGTGAGAGCACGAAGT

### 1.7 集落形成实验检测 *IL-34* 对 AMoL 细胞集落形成能力的影响

将实验组和对照组的细胞以 $2 \times 10^3/\text{ml}$ 的密度,接种于24孔板( $1 \times 10^3/\text{孔}$ )中,并设置3个复孔,培养7~10 d,大于50个细胞的细胞丛确认为1个集落,在光学显微镜和荧光显微镜下( $\times 40$ 和 $\times 100$ )观察对比形成的细胞集落数和集落大小的差异,利用NIS Elements显微图像分析软件分析图像数据。实验重复3次。

### 1.8 PI染色流式细胞术检测 *IL-34* 对 AMoL 细胞周期的影响

取实验组和对照组各 $1 \times 10^6$ 细胞,用预冷的70%乙醇重悬,4 °C固定24 h后,离心( $900 \times g$ )弃上清,PBS重悬、加入RNase A、室温孵育1 h后加入PI,避光室温孵育15 min后,流式细胞仪检测细胞周期细胞比例变化情况。实验重复3次。

### 1.9 Annexin-V/PI染色流式细胞术检测 *IL-34* 对 AMoL 细胞凋亡的影响

收集每组各 $1 \times 10^6$ 细胞用Annexin-V-结合缓冲液重悬后加入抗体Annexin-V-APC,室温避光孵育15 min后加入PI,流式细胞仪检测细胞凋亡比例的变化情况,采用FlowJo 10软件(Tree Star, Ashland, OR)分析实验数据。实验重复3次。

### 1.10 流式抗体标记法检测 *IL-34* 对 AMoL 细胞分化表型的影响

每组各取 $1 \times 10^6$ 细胞,加入流式抗体1  $\mu\text{l}$ 冰上避光孵育30 min后,用PBS洗去未结合的抗体后重悬,流式细胞仪检测各组细胞表面分子表达水平的变化(即荧光强度的变化),并设置阴性组,采用FlowJo 10软件(Tree Star, Ashland, OR)分析实验数据。实验重复3次。

### 1.11 裸鼠皮下 AMoL 成瘤模型的建立及其观察

收集实验组和对照组细胞,以 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 细胞悬液

200  $\mu\text{l}$ /只接种于裸鼠右肩部皮下(每组5只),记录30 d内肿瘤生长情况;30 d时处死动物,测量肿瘤大小和质量;组织常规石蜡包埋、切片、H-E染色,光镜下( $\times 40$ 和 $\times 100$ )观察肿瘤组织内病理结构变化,流式细胞仪检测肿瘤内巨噬细胞浸润程度。实验重复5次。

### 1.11 统计学处理

应用SPSS 22软件分析数据,正态计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 $t$ 检验;非正态分布计量资料以中位数(全距)表示,两组间比较采用两独立样本比较的秩和检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建过表达 *IL-34* 的 AMoL 细胞系

将*IL-34*过表达组和对照组慢病毒浓缩液感染THP1和MOLM-13细胞,流式细胞术检测其感染效率:THP1-*IL-34*为19.2%,THP1-Vector为75.4%,MOLM-13-*IL-34*为22.9%,MOLM-13-Vector为30.7%(图1A)。流式分选继续培养成株后阳性率均大于90%(图1B)。qPCR检测结果(图1C)显示,实验组THP1细胞*IL-34* mRNA表达水平较对照组升高约4 000倍( $t=23.25, P < 0.001$ ),MOLM-13细胞*IL-34* mRNA表达水平较对照组升高近3 000倍( $t=17.52, P < 0.01$ ),*CSF1R* mRNA表达水平与对照组比较差异无统计学意义(THP1: $t=0.6292$ ,MOLM-13: $t=1.792$ ,均 $P > 0.05$ )。结果表明,本实验成功构建的THP1和MOLM-13细胞过表达*IL-34*,且过表达*IL-34*不会影响其受体*CSF1R*在细胞中的表达水平。

### 2.2 过表达 *IL-34* 促进 AMoL 细胞增殖和集落形成能力但并不影响细胞凋亡

MTS法检测结果(图2A)表明,过表达*IL-34*后,THP1-*IL-34*及MOLM-13-*IL-34*组细胞增殖能力明显高于对照组(THP1: $P < 0.001$ ;MOLM-13: $P < 0.01$ )。

集落形成实验结果(图2B)发现,过表达*IL-34*后,THP1和MOLM-13两种细胞形成的集落数目显著高于对照组(THP1: $t=7.748, P < 0.001$ ;MOLM-13: $t=7.18, P < 0.01$ ),且光学显微镜和荧光显微镜下观察并统计多个低倍视野下的集落直径显示,过表达*IL-34*组形成的集落明显大于对照组(THP1: $t=10.39$ ,MOLM-13: $t=9.732$ ;均 $P < 0.001$ )。

PI法检测结果(图2C)显示,过表达*IL-34*后THP1-*IL-34*组处于G0/G1期的细胞比例显著低于对照组( $t=12.15, P < 0.001$ ),处于S期及G2/M期周期中细胞比例均高于对照组(S期: $t=6.826, P < 0.001$ ;G2/M期: $t=7.023, P < 0.01$ ),而MOLM-13-*IL-34*组较对照组相比,虽然S期比例差异无统计学意义( $t=2.301, P$

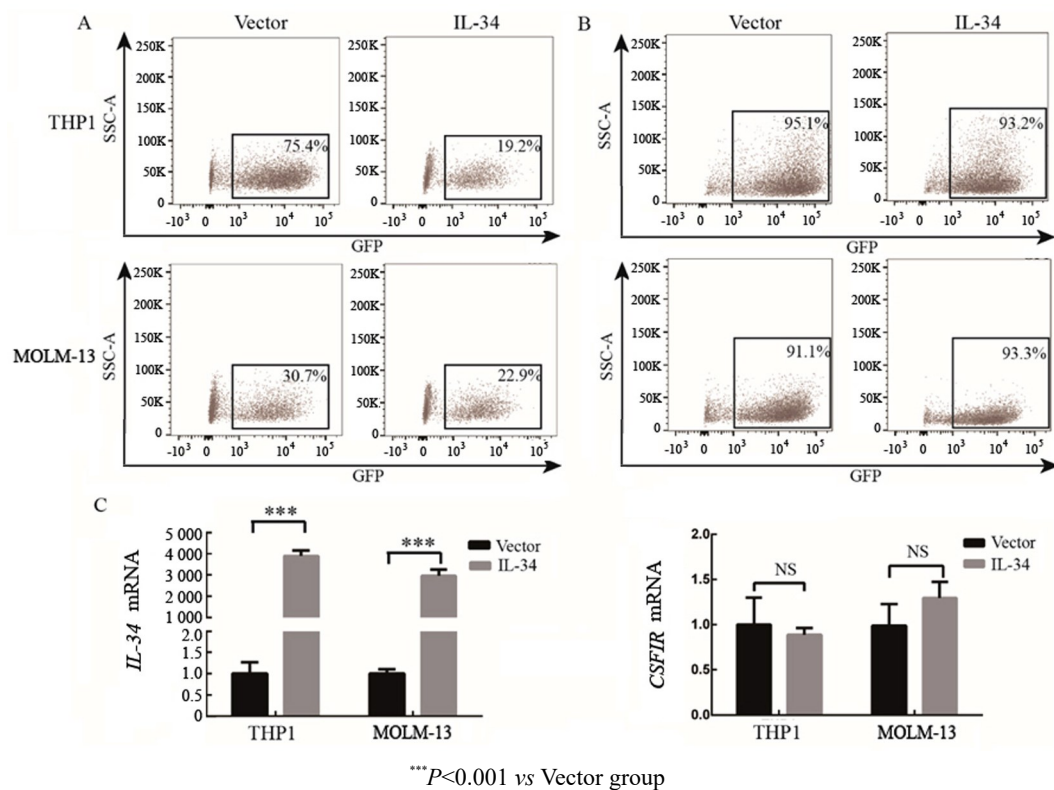


>0.05), 但 G0/G1 期细胞比例减少 ( $t=16.06, P<0.001$ ), 更多的细胞处于 G2/M 期 ( $t=8.543, P<0.001$ )。

Annexin-V/PI 法检测结果(图 2D)发现, 过表达 *IL-34* 后, 对细胞的凋亡无显著影响 (THP1:  $t=2.29$ ;

MOLM-13:  $t=1.444$ ; 均  $P>0.05$ )。

以上结果表明, 过表达 *IL-34* 显著促进 AMoL 细胞的增殖和集落形成能力, 但不影响细胞的凋亡水平。



A: Infection efficiency of GFP<sup>+</sup>vectors in THP1 and MOLM-13 cells; B: GFP<sup>+</sup> rate of each group cultured after FACS sorting;

C: Relative expression of *IL-34* mRNA and *CSF1R* mRNA in THP1-IL-34 and MOLM-13-IL-34 groups

图1 构建的 AMoL 细胞中 *IL-34* 的表达情况

Fig. 1 Relative expression of *IL-34* in AMoL cell models

### 2.3 过表达 *IL-34* 使 AMoL 细胞向单核-巨噬细胞方向分化

通过抗体标记流式细胞分析仪检测 *IL-34* 过表达组与对照组的粒-单核细胞系分化细胞表面标志物 CD11b、单核-巨噬细胞的 LPS 结合位点 CD14<sup>[18]</sup> 以及未成熟细胞表面标志物 CD71<sup>[19]</sup> 的表达水平变化, 并统计每组细胞的平均荧光强度 (MFI)。结果如图 3 所示, THP1-IL-34 组细胞 CD11b 和 CD14 的 MFI 显著高于对照组 (CD11b:  $t=5.693, P<0.001$ ; CD14:  $t=4.005, P<0.01$ ), CD71 的 MFI 明显低于对照组 ( $t=6.505, P<0.001$ ); 在 MOLM-13 细胞中过表达 *IL-34* 也得到类似结果 (CD11b:  $t=3.6, P<0.05$ ; CD14:  $t=3.571, P<0.05$ ; CD71:  $t=4.831, P<0.01$ )。结果表明, 过表达 *IL-34* 后可使两种细胞均向单核-巨噬细胞方向分化, 细胞成熟水平升高。

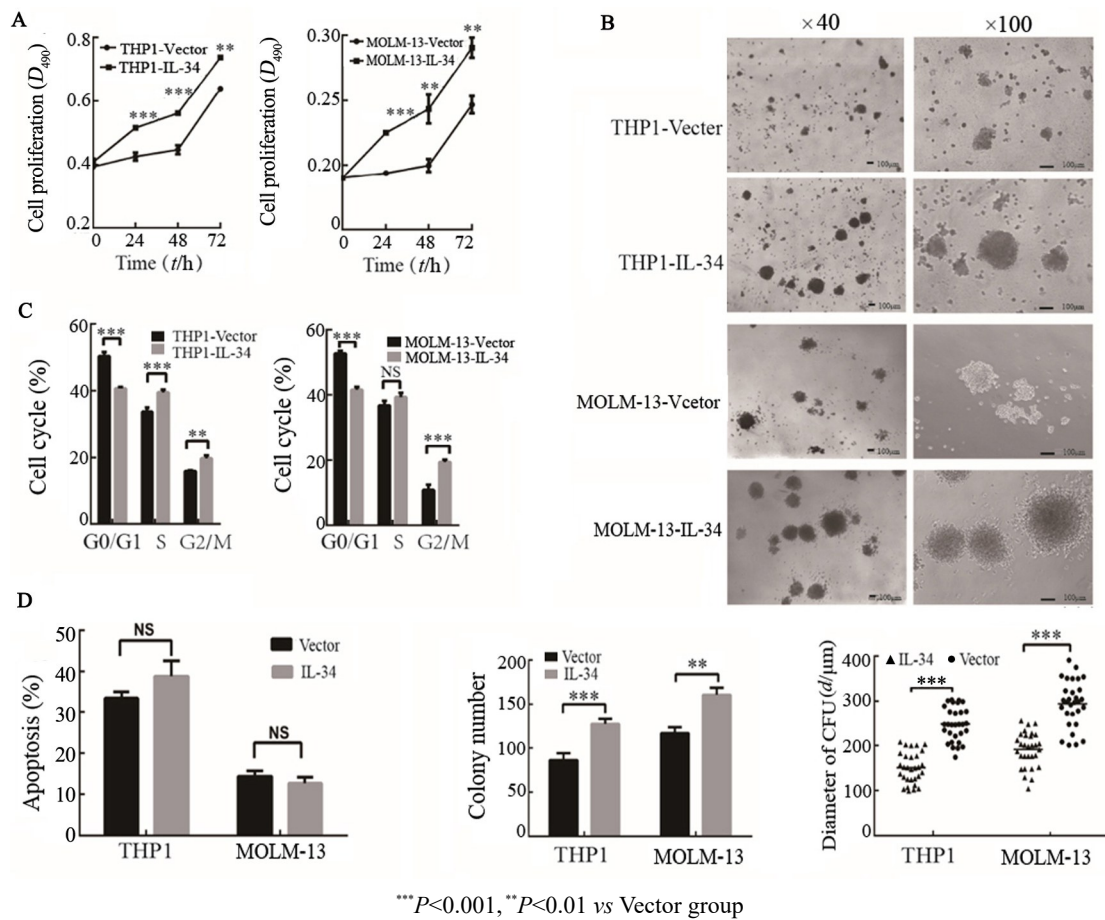
### 2.4 过表达 *IL-34* 显著减少瘤体内 AMoL 细胞的坏死并促进巨噬细胞募集

裸鼠皮下成瘤实验结果发现, THP1-IL-34 过表

达组裸鼠肿瘤大小和质量与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ; 图 4A); 从 H-E 染色的切片 (图 4B) 中可以明显看到, *IL-34* 过表达组未见组织细胞坏死, 而对照组内有大面积的组织细胞坏死; 流式细胞术检测结果 (图 4C) 发现, 实验组 F4/80<sup>+</sup> 细胞比例显著高于对照组 ( $t=6.517, P<0.01$ )。实验结果表明, 过表达 *IL-34* 可显著减少肿瘤内 AMoL 细胞坏死并促进微环境中巨噬细胞的募集。

## 3 讨论

AML 是一类临床和遗传上均具有极强异质性的造血干细胞相关疾病, 其不仅分型复杂, 且在白血病中发病比例较高, 在基础研究和临床治疗中受到重点关注。但除少数分型发病机制被揭示外, 其他分型的 AML 发病机制仍处在深入探索阶段, 临床上治疗手段有限<sup>[20]</sup>。因此, 阐明 AML 相关发病机制, 寻找新的治疗靶点是当前研究 AML 的一个热点。



A: The proliferation of viable cells was detected by MTS assay; B: Cells were cultured in H4434 for 7-10 d to detect the colony forming ability (Scale bar:100μm); C: The effect on cell cycle was performed by PI staining; D: The apoptosis was measured by Annexin-V/PI staining

图2 过表达 *IL-34* 对 THP1 和 MOLM-13 细胞增殖、集落形成、周期和凋亡的影响 (n=3)  
Fig. 2 Effect of *IL-34* over-expression on the proliferation, colony formation, cell cycle and apoptosis of THP1 and MOLM-13 cells (n=3)

*IL-34* 的正常生理功能及在炎症疾病中的作用报道较多<sup>[3-8]</sup>,其高表达可募集组织内的单核细胞并促进单核-巨噬细胞分化,加速疾病进程,但在肿瘤及白血病中却鲜有报道。本研究构建了 *IL-34* 过表达载体,感染人 AMoL 细胞系,探究 *IL-34* 过表达对 AMoL 细胞生物学特性及裸鼠皮下成瘤的影响。实验结果表明, *IL-34* 可显著促进白血病细胞的增殖和集落形成能力,但对其细胞凋亡无显著影响。同时, *IL-34* 可显著提高 AMoL 细胞粒-单核和单核-巨噬细胞标志物 CD11b 和 CD14 的表达水平并显著降低未成熟细胞标志物 CD71 的水平,表明 *IL-34* 的高表达促进了 AMoL 细胞向单核-巨噬细胞方向的分化。裸鼠皮下成瘤实验发现,虽然 30 d 内肿瘤的大小和质量均没有差异,但经切片 H-E 染色观察到过表达 *IL-34* 瘤体内 AMoL 组织细胞坏死减少并显著增强巨噬细胞募集。最新的研究<sup>[16,21-25]</sup>表明,白血病微环境中的巨噬细胞、NK 细胞等免疫细胞的数量、表型都发生改变,并参与白血病进展过程,因此,在体内高表达 *IL-34* 可

通过促进微环境中巨噬细胞的募集过程参与 AMoL 的发病进程。

本研究观察到 *IL-34* 促进 AMoL 细胞增殖的同时也促进它们向单核-巨噬细胞方向的分化,然而这种分化是有限的,并未达到终末分化,细胞不仅获得较强体外增殖潜能,而且在裸鼠中依旧保持较强的致瘤性。实际上,增殖和分化能力是细胞两个重要的生物学特征,两者分别受不同的基因调控,本课题组正进行 RNA-seq 测序和分析,以期阐明 *IL-34* 对 AMoL 细胞基因调控的影响,并阐明调控 AMoL 细胞增殖、分化的分子机制。

总之,本研究首次发现过表达 *IL-34* 对人 AMoL 细胞系体外及裸鼠体内成瘤的影响。基于现有的研究结果,本实验室还将探究 *IL-34* 对 AMoL 细胞系生物学特性影响的相关机制。已有报道<sup>[26-28]</sup>指出, *IL-34* 可通过影响巨噬细胞极化和 Treg、记忆 T 细胞活性,参与多种疾病的免疫逃逸及免疫耐受。当前免疫逃逸已成为肿瘤治疗的一个研究热点<sup>[29-30]</sup>,那么 *IL-34* 在

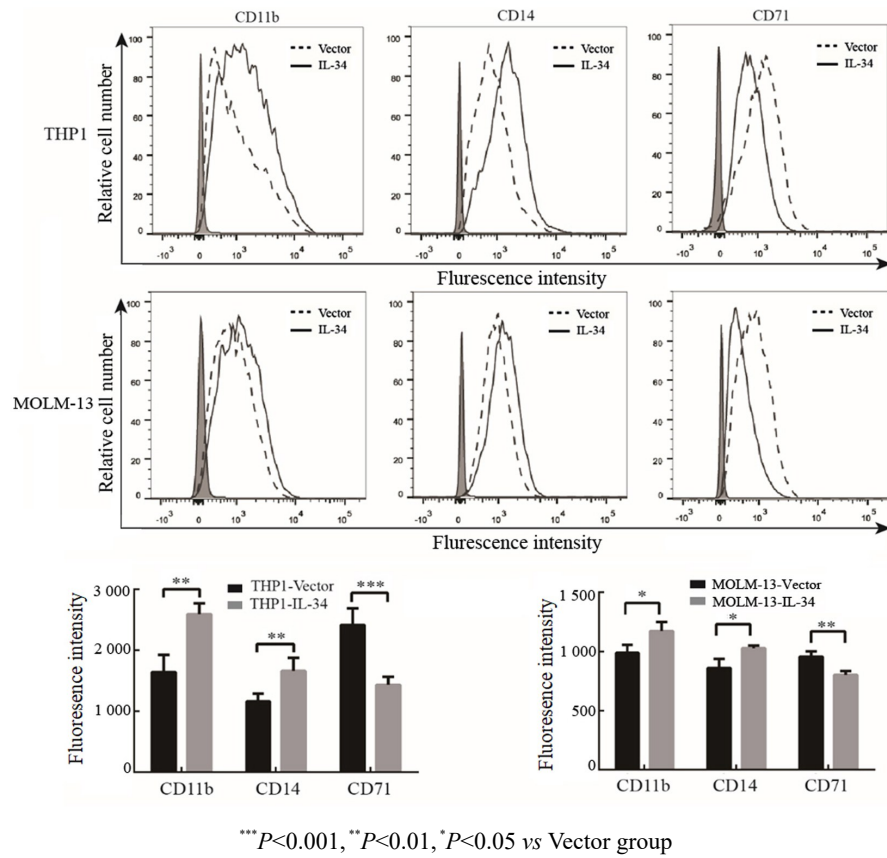
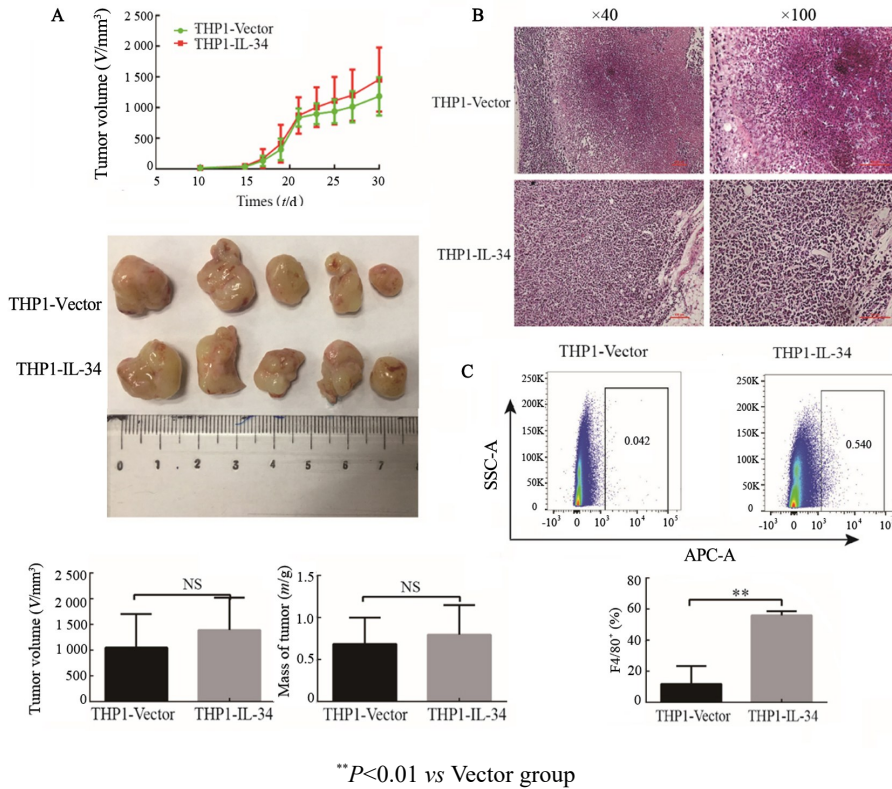


图3 过表达IL-34对THP1和MOLM-13细胞分化的影响

Fig. 3 Effect of IL-34 over-expression on differentiation of THP1 and MOLM-13 cells



A: The mass and volume of implanted tumors in 30 d were measured and analyzed; B: Typical H-E staining sections of tumor tissues (Scale bar:100  $\mu$ m); C: The percentage of macrophages infiltrated into tumor tissues was detected by FACS

图4 过表达IL-34对体内THP1细胞成瘤能力的影响 (n=5)

Fig. 4 Effect of IL-34 over-expression on the oncogenesis of THP1 *in vivo* (n=5)



白血病微环境中又有怎样的作用?在临床跟踪调查<sup>[1]</sup>发现,各种慢性、恶性疾病(如心血管病、骨肉瘤)中 *IL-34* 可作为预后不良的指标,那么在 AML 患者中高表达 *IL-34* 是否也与患者的生存期和疗效相关?基于以上猜想,本实验室将构建过表达 *IL-34* 的 AMoL 小鼠模型,探究其对疾病进程的影响,尤其是对白血病细胞生物学特性和对微环境中单核-巨噬细胞功能的影响,同时结合临床跟踪调查,为阐明白血病发病机制提供可能的新线索。

## [参考文献]

- [1] LIN H, LEE E, HESTIR K, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome[J]. *Science*, 2008, 320(5877): 807-811. DOI: 10.1126/science.1154370.
- [2] EDA H, ZHANG J, KEITH R H, et al. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood[J]. *Cytokine*, 2010, 52(3): 215-220. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.08.005.
- [3] BARVE R A, ZACK M D, WEISS D, et al. Transcriptional profiling and pathway analysis of CFS-1 and IL-34 effects on human monocyte differentiation[J]. *Cytokine*, 2013, 63(1): 10-17. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.04.019.
- [4] JIN S, SONOBE Y, KAWANOKUCHI J, et al. Interleukin-34 restores blood-brain barrier integrity by upregulating tight junction proteins in endothelial cells[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115981[2018-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275171/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0115981.
- [5] BAUD'HUIN M, RENAULT R, CHARRIER C, et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumors of bone and plays a key role in rankl-induced osteoclastogenesis[J]. *J Pathol*, 2010, 221(1): 77-86. DOI: 10.1002/path.2684.
- [6] CHEN Z, BUKI K, VAARANIEMI J, et al. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18689[2018-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3072988/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0018689.
- [7] WANG Y, COLONNA M. Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and langerhans cells[J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(6): 1575-1581. DOI: 10.1002/eji.201344365.
- [8] BOSTRÖM E A, LUNDBERG P. The newly discovered cytokine IL-34 is expressed in gingival fibroblasts, shows enhanced expression by pro-inflammatory cytokines, and stimulates osteoclast differentiation[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81665[2018-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858262/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0081665.
- [9] ZHOU R P, WU X S, XIE Y Y, et al. Functions of interleukin-34 and its emerging association with rheumatoid arthritis[J]. *Immunology*, 2016, 149(4): 362-373. DOI: 10.1111/imm.12660.
- [10] WANG B, MA Z, WANG M, et al. IL-34 upregulated th17 production through increased IL-6 expression by rheumatoid fibroblast-like synoviocytes[J / OL]. *Mediators Inflammation*, 2017, 2017: 1567120[2018-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5474253/>. DOI: 10.1155/2017/1567120.
- [11] TAO R, FAN Q, ZHANG H, et al. Prognostic significance of interleukin-34 (IL-34) in patients with chronic heart failure with or without renal insufficiency[J/OL]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(4): pii: e004911[2018-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5533008/>. DOI: 10.1161/JAHA.116.004911.
- [12] FAN Q, YAN X, ZHANG H, et al. IL-34 is associated with the presence and severity of renal dysfunction and coronary artery disease in patients with heart failure[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39324[2018-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5159784/>. DOI: 10.1038/srep39324.
- [13] SEGALINY A I, MOHAMADI A, DIZIER B, et al. Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(1): 73-85. DOI: 10.1002/ijc.29376.
- [14] ZHOU S L, HU Z Q, ZHOU Z J, et al. miR-28-5p-IL-34-macrophage feedback loop modulates hepatocellular carcinoma metastasis[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2016, 63(5): 1560-1575. DOI: 10.1002/hep.28445.
- [15] LIAO J, FENG W, WANG R, et al. Diverse in vivo effects of soluble and membrane-bound M-CSF on tumor-associated macrophages in lymphoma xenograft model[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 1354-1366. DOI: 10.18632/oncotarget.6362.
- [16] WANG R, FENG W, YANG F, et al. Heterogeneous effects of M-CSF isoforms on the progression of MLL-AF9 leukemia[J]. *Immunol Cell Biol*, 2018, 96(2): 190-203. DOI 10.1111/imcb.1029.
- [17] LI Z, HUANG H, LI Y, et al. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML[J]. *Blood*, 2012, 119(10): 2314-2324. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386235.
- [18] SCHMIDT F I, LATZ E. Cd14-new tricks of an old acquaintance[J]. *Immunity*, 2017, 47(4): 606-608. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.10.003.
- [19] NAKAHATA T, OKUMURA N. Cell surface antigen expression in human erythroid progenitors: erythroid and megakaryocytic markers[J]. *Leuk Lymph*, 1994, 13(5/6): 401-409.
- [20] STONE R M. Which new agents will be incorporated into frontline therapy in acute myeloid leukemia?[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2017, 30(4): 312-316. DOI: 10.1016/j.beha.2017.09.006.
- [21] YANG X, FENG W L, WANG R, et al. Repolarizing heterogeneous leukemia-associated macrophages with more M1 characteristics eliminates their pro-leukemic effects[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 7(4): e1412910[2018-03-08]. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/2162402X.2017.1412910>. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1412910.
- [22] YANG F, WANG R, FENG W, et al. Characteristics of NK cells from leukemic microenvironment in MLL-AF9 induced acute myeloid leukemia[J/OL]. *Mol Immunol*, 2018, 93: 68-78[2018-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.11.003>. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.11.003.
- [23] YANG X, FENG W, WANG R, et al. Hepatic leukemia-associated macrophages exhibit a pro-inflammatory phenotype in Notch1-induced acute T cell leukemia[J]. *Immunobiology*, 2018, 223(1): 73-80. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.009.
- [24] CHEN S, YANG X, FENG W, et al. Characterization of peritoneal leukemia-associated macrophages in Notch1-induced mouse T cell

- acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Mol Immunol*, 2017, 81: 35-41 [2018-03-08]. <http://sciencedirect.com/science/journal/01615890>. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.11.014.
- [25] CHEN S, YANG X, FENG W, et al. Organ specific microenvironment modifies diverse functional and phenotypic characteristics of leukemia-associated macrophage in mouse T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Immunol*, 2015, 194(6): 2919-2929. DOI: 10.4049/jimmunol.1400451.
- [26] GUILLONNEAU C, BEZIE S, ANEGON I. Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(14): 2569-2586. DOI: 10.1007/s00018-017-2482-4.
- [27] FOUCHER E D, BLANCHARD S, PREISSER L, et al. IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory t cells into Th17 cells via membrane IL-1 alpha[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(4): 1092-1102. DOI: 10.1002/eji.201444606.
- [28] BAGHDADI M, WADA H, NAKANISHI S, et al. Chemotherapy-induced IL-34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(20): 6030-6042. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [29] 陈祥, 钱程, 曹雪涛. 肝细胞癌的免疫逃逸和免疫治疗研究热点与发展趋势[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(1): 73-82. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.015.
- [30] 冀帅飞, 姚舜, 张拔渤, 等. 针对免疫检查点的乳腺癌治疗研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(12): 1443-1448. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.018.
- [31] BAGHDADI M, ENDO H, TANAKA Y, et al. Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications[J/OL]. *Cytokine*, 2017, 99: 139-147 [2018-03-08]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/10434666>. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.08.020.

[收稿日期] 2018-03-08

[修回日期] 2018-03-28

[本文编辑] 党瑞山