



MDS 发生。识别这些关键的介质有助于揭示 MDS 发病机制,并且为根本性治疗提供新思路。

缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF1A)是一个重要的转录因子,与缺氧反应、血管生成、调节正常 HSC 以及癌症的发生、发展密切相关<sup>[6-7]</sup>。此外,HIF1A 也是激活先天性免疫和适应性免疫非常重要的因子<sup>[8]</sup>。有研究发现 MDS 患者 HSC 以及造血祖细胞(HSPCs)具有异常的自我更新和分化能力,并且发现全身炎症和免疫激活对 MDS 的发病具有重要作用<sup>[9]</sup>。因此我们以 HIF1A 为切入点,研究其在 MDS 发生中的重要机制。

## 2 研究概况

### 2.1 MDS 患者 HIF1A 表达研究

HIF1A 主要是在翻译和蛋白水平受到调控。因此,通过分析 HIF1A 下游特征基因表达谱能够较准确的反映 HIF1A 表达水平。

首先,我们在已经发表的数据库中分析比较健康供者( $n=17$ )和 MDS 患者( $n=183$ )骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞 HIF1A 调控基因表达情况。这组 MDS 患者涵盖了 MDS 多个亚型,包括难治性贫血(RA,  $n=55$ )、难治性贫血伴有环形铁粒幼红细胞增多(RARS,  $n=48$ )、难治性贫血伴原始细胞增多 1 型(RAEB1,  $n=37$ )以及 2 型(RAEB2,  $n=43$ )。由于 HIF1A 是一个重要的转录因子,有大量的基因受 HIF1A 直接或间接调控。为了获得更可靠的数据分析结果,我们以持续表达 HIF1A 的人脐带血 CD34<sup>+</sup> 细胞和空白对照的基因表达谱作为参照,在已知的 HIF1A 可能调控基因中,筛选基因表达增加 3 倍以上的基因,进一步确定为 HIF1A 诱导基因。通过基因集富集分析(GSEA),发现与健康供者相比,MDS 患者骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞 HIF1A 诱导基因表达明显增多,一些典型的 HIF1A 诱导基因,如 *BNIP3*、*HK1*、*CTSD* 等都明显增高。

其次,我们应用免疫组织化学的方法在 38 例 MDS 患者骨髓病理标本中检测 HIF1A 蛋白表达,结果显示无论是在低危 MDS 还是高危 MDS 患者中,HIF1A 蛋白表达阳性细胞均明显增多,与正常对照相比差异显著,且 HIF1A 阳性细胞比例与患者基因突变类型无关。此外,通过定量 PCR 检测骨髓单个核细胞中 HIF1AmRNA 表达,MDS 与正常对照组之间没有差异。以上研究结果提示在 MDS 患者中(无论是低危组还是高危组)HIF1A 信号通路存在着明显的活化。

第三,我们检测了携带 MDS 不同基因突变小鼠骨髓细胞 HIF1A 表达,包括 *Dnmt3a* $\Delta/\Delta$ 、*Tet2* $\Delta/\Delta$ 、*Runx1* $\Delta/\Delta$ 、*Asxl1* $\Delta/\Delta$  和 *MLL*<sup>PTD</sup> $^{WT}$  转基因小鼠。这些小鼠无贫血或其他 MDS 典型表现,但是骨髓 c-KIT<sup>+</sup> 造血干细胞内 HIF1A 蛋白的表达水平均较野生小鼠显著升高,提示 MDS 相关突变

都能够激活 HIF1A 信号。

### 2.2 构建 HIF1A 可诱导表达小鼠,评价 MDS 发生

为了进一步明确 HIF1A 活化是否能够诱导 MDS 的发生,我们构建了可诱导、持续稳定表达 HIF1A 的转基因小鼠。该小鼠以血细胞特异表达载体 *Vav1-Cre/Rosa26-loxP-Stop-loxP* (LSL) reverse-tetracycline-controlled transactivator(rtTA) 为启动子(*Rosa26-LSL-rtTA*),同时携带 3 个位点突变的 *HIF1A* 基因(P402A、P564A、N803A; triple-point-mutant, TMP)和野生型 *ARNT* 基因(*HIF1B* 基因),以强力霉素(Doxycycline, DOX)作为基因表达开关,诱导 HIF1A 的表达。当给予 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠 DOX 处理后,在小鼠骨髓 c-KIT<sup>+</sup> 细胞中,我们不仅发现 HIF1A 蛋白表达明显增多,而且通过 RNA-seq 通路富集分析同样发现 HIF1A 相关基因表达明显上调,证实 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠具有可诱导、持续稳定表达 HIF1A 的能力,小鼠构建成功。

随后,我们观察到在 DOX 诱导 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠表达 HIF1A 之后,小鼠很快出现血小板减少,并且在 2~8 个月逐渐出现白细胞减少、大细胞性贫血以及脾脏肿大等表现;骨髓形态学分析显示多系发育异常,特别是在巨核细胞系可以见到小巨核细胞以及过分叶巨核细胞等;骨髓病理检查见到不同程度网状纤维形成,以上这些改变与人类 MDS 临床表现极为相似。我们应用流式细胞术进一步分析了 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠骨髓细胞成分,结果发现 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠骨髓 HSPCs 比例增加,髓系祖细胞中主要是以巨核系-红系祖细胞增多为主。此外,体外连续集落培养(CFU)以及体内竞争性骨髓移植(1:1)实验均证实,与对照小鼠相比,*Vav1-Cre/TPM* 小鼠 HSPCs 具有连续培养以及可移植能力。

贫血是 MDS 患者的主要临床表现,*Vav1-Cre/TPM* 小鼠经 DOX 诱导后也出现了大细胞性贫血。应用小鼠红系特异性抗体 CD71 和 Ter117 标记 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠骨髓细胞后,发现小鼠早幼红细胞和中幼红细胞比例明显减低,体现了红系无效造血。以往的研究提出巨噬细胞在支持红系造血过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。因此,我们同时检测了 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠骨髓巨噬细胞表达,结果发现代表支持红系造血的 F4/80<sup>+</sup> Ter119<sup>+</sup> 骨髓红系造血岛的比例和绝对值均明显减低,而炎症性巨噬细胞(CD80<sup>+</sup> CD206<sup>-</sup>)比例明显增多。

以上的研究提示应用 *Vav1-Cre* 在小鼠全血细胞中激活 HIF1A 能够使小鼠发生 MDS,但在特定的造血系别中 HIF1A 的激活具有什么样的作用呢? 为了回答这一问题,我们应用了组织特异性 Cre,包括 *EPOR-Cre*(红系)、*PF4-Cre*(巨核系)以

及 *LysM*-Cre(单核细胞),分别构建了 *EPOR*-Cre/TPM、*PF4*-Cre/TPM 和 *LysM*-Cre/TPM 小鼠。在红系中持续激活 HIF1A 后,*EPOR*-Cre/TPM 小鼠并没有出现贫血,并且骨髓中各发育阶段幼红细胞比例、绝对值以及红系造血岛都没有显著变化;在巨核细胞中持续表达 HIF1A 后,*PF4*-Cre/TPM 小鼠很快出现血小板减少和小巨核细胞,但是并没有出现贫血;而在单核细胞中持续表达 HIF1A 后,*LysM*-Cre/TPM 小鼠逐渐出现了骨髓红系造血岛数量的减少,并最终发生贫血,但是与 *Vav1*-Cre/TPM 小鼠相比,其发生贫血的时间明显延长,提示在贫血发生过程中需要多个细胞类型 HIF1A 的激活以及多因素参与。通过上述小鼠实验结果提示,HIF1A 的激活能够通过细胞内在以及外在机制导致 MDS 的发生,并且 HIF1A 的激活有可能成为阐释 MDS 异质性的关键因素。

### 2.3 HIF1A 信号的活化在 *MLL*-PTD 介导的克隆优势中的作用研究

*MLL*-PTD 主要见于 MDS 和急性髓系白血病患者中,在其他恶性血液疾病中尚无报道。我们以往的研究证实,*Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠骨髓 HSPCs 出现类似 MDS 干细胞的相应表现,包括具有增强的自我更新能力,凋亡增加,髓系祖细胞扩增以及无效造血等,但单独存在 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 不足以导致小鼠出现血细胞减少等 MDS 典型临床表现<sup>[11]</sup>。因此,结合上述 MDS 患者以及小鼠模型中 HIF1A 的活化是一个关键因素,我们以 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠为研究对象,进一步探讨 HIF1A 的作用机制。

*MLL* 蛋白是表观遗传学调控因子,其 C 末端具有 SET 结构域,针对 H3K4 位点具有甲基转移酶活性。*MLL*-PTD 突变保留了 SET 结构域,所以仍具有甲基转移酶活性<sup>[12]</sup>。由于 H3K4 三甲基化(H3K4me3)与基因转录活性有关,因此分选了野生型小鼠和 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠骨髓 Lin<sup>-</sup>SCA<sup>+</sup>c-KIT<sup>+</sup>(LSK)细胞进行 H3K4me3 染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq),试图找到 *MLL*-PTD 的调节靶基因。结果显示 *Hif1a*/*Arnt* 异二聚体 DNA 结合基序明显富集,并且通过 KEGG 通路分析发现一些炎症/免疫反应相关的通路被富集,主要包括系统性红斑狼疮通路、趋化因子信号通路、细胞因子-细胞因子受体通路以及糖酵解/糖异生通路等,其中糖酵解/糖异生通路是已知的 HIF1A 调控通路。因此,我们将 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 H3K4me3 ChIP-seq 的结果与人 CD34<sup>+</sup> 细胞 EDCODE binding 数据进行比较,随后对重叠的 H3K4me3 峰进行 KEGG 通路分析,结果仍然是一些炎症通路以及 HIF 信号通路明显上调,进一步证实 *MLL*-PTD 能够活化 HIF1A 信号。

我们以往的研究发现,在压力造血的情况下,

*MLL*-PTD 克隆存在增殖优势,主要体现在具有体外连续集落培养能力(通常 >3 次)以及竞争性移植实验(1:1)中具有更强的植入能力。为了研究 HIF1A 活化在 *MLL*-PTD 克隆造血中的作用,我们构建了 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Hif1a*<sup>flox/flox</sup>/*Mxl*-Cre 小鼠。当 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠敲除 *Hif1a* 基因后,其原有的体外连续集落培养生长能力明显降低,与野生型小鼠无显著差别;而在 1:1 竞争移植中,敲除了 *Hif1a* 的 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 骨髓细胞植入能力与 WT 骨髓细胞基本一致。因此,这些结果表明,与 *Vav1*-Cre/TPM 小鼠相似,*MLL*-PTD 介导的 HIF1A 活化信号能够调控 HSC 的克隆扩增与适应。

### 2.4 *MLL*-PTD 介导的 HIF1A 表达机制研究

在氧含量正常时,泛素化是调节 HIF1A 蛋白降解的重要机制。其中 VHL 和 MDM2 分别是氧依赖 HIF1A 降解和非氧依赖 HIF1A 蛋白降解的关键分子<sup>[13-14]</sup>。我们在 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 c-KIT<sup>+</sup> 细胞检测了 *Vhl* 和 *Mdm2* 基因 mRNA 表达水平,结果与对照组相比这 2 个基因表达无显著性差异,提示 *MLL*-PTD 可能通过其他途径稳定 HIF1A 蛋白。

脯氨酸羟化酶(PHD)是一类  $\alpha$  酮戊二酸( $\alpha$ -KG)依赖性加双氧酶,在 O<sub>2</sub>、Fe<sup>2+</sup> 以及  $\alpha$ -KG 存在的情况下能够催化 HIF1A 的脯氨酸残基羟基化,引起 HIF1A 的降解。值得注意的是, $\alpha$ -KG 是线粒体三羧酸循环的中间代谢产物,如果其代谢产物如琥珀酸、延胡索酸及苹果酸在细胞内蓄积,在常氧状态下就可以抑制 PHD 活性,影响 HIF1A 的降解,导致假性低氧发生。以往的研究也已经发现当线粒体功能异常或者出现 Warburg 效应时都可以导致 TCA 中间代谢产物蓄积,活化 HIF1A 信号。因此,我们首先在 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 c-KIT<sup>+</sup> 细胞中检测线粒体功能,结果发现其基础呼吸、ATP 产量以及最大呼吸都明显低于正常对照组,线粒体复合物 I、II、III 的活性也明显减低,提示 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 HSPCs 存在线粒体功能障碍。

为了进一步阐明线粒体功能障碍的发生机制,一方面我们测定了 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 c-KIT<sup>+</sup> 细胞中线粒体基因拷贝数,与正常对照相比二者无明显差异,提示二者的线粒体质量相似;另一方面,以往有研究发现在一些肿瘤患者中,由于线粒体电子传递链复合物 II(琥珀酸脱氢酶,SDH)活性降低,从而导致 TCA 循环阻滞,影响呼吸链功能<sup>[15-16]</sup>。因此,我们同时检测了 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 SDH 不同亚基和 TCA 循环中其他重要的催化酶表达,结果发现无论是在 mRNA 水平还是蛋白表达水平,*Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 HSPCs 中 *Sdha*、*Sdhb* 和 *Sdhd* 亚基的表达都明显减低,提示线粒体复合物 II 功能缺陷是 *MLL*-PTD 线粒体功能障碍导致假性缺氧发生

的主要原因。

除了 PHD 外, TETs 以及组蛋白去甲基化酶同样也是  $\alpha$ -KG 依赖性加双氧酶, 是调节 DNA 和组蛋白甲基化的重要分子, 而异常的甲基化状态是 MDS 患者的显著特征。因此我们测定了 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 c-KIT<sup>+</sup> 细胞基因组 DNA 中 5mC 和 5hmC 的水平, 结果表明与对照组相比, *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠出现 5mC 增高以及 5hmC 减低, 提示其 DNA 存在高甲基化。而组蛋白三甲基化测定提示 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠同样存在着组蛋白高甲基化状态。综合以上的研究数据表明, *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 HSPCs 除了具有异常高甲基化(DNA、组蛋白)之外, 还由于 Warburg 效应以及代谢重组引起的 TCA 循环中间代谢产物蓄积, 从而导致假性缺氧介导的 HIF1A 信号激活。

## 2.5 MLL-PTD 和 RUNX1 突变协同作用诱发 MDS

我们以前的研究证实尽管 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠 HSPCs 具有人 MDS 干细胞的一些特征, 但单独存在的 MLL-PTD 不足以诱导小鼠发生 MDS 及 AML, 提示需要协同其他基因异常从而促进 MDS 发生。在临床上我们发现 AML 患者中(包括原发性和继发性), MLL-PTD 常常与 RUNX1 突变同时存在。因此, 我们通过逆转录病毒载体系统将 MDS 患者常见的 RUNX1 突变 (*RUNX1-S291fsX300*) 转染至 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠骨髓细胞中, 分别通过体外(连续集落培养)和体内(骨髓移植小鼠)实验对其功能进行研究。结果发现与空载体对照细胞相比, *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*RX1-S291fs* 骨髓细胞具有多次连续培养的能力; 并且 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*RX1-S291fs* 移植小鼠逐渐出现白细胞减少、大细胞性贫血、血小板减少以及骨髓形态学发育异常等 MDS 临床表现。骨髓细胞成分分析显示早幼红细胞、中幼红细胞以及骨髓红系造血岛都明显减低; 大部分移植鼠合并骨髓纤维化, 并且因贫血或感染等合并症死亡。我们进一步分析 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*RX1-S291fs* 移植小鼠 HSPCs HIF1A 蛋白表达水平, 结果发现与空白对照相比, *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*RX1-S291fs* 移植小鼠 HIF1A 蛋白表达明显增多, 接近 *Vav1-Cre/TPM* 小鼠骨髓细胞表达水平; 而其 Mdm2 和 p53 蛋白的表达都明显减低, 这一发现与临床上伴有 RUNX1 突变的 MDS 患者结果相一致。我们的研究结果提示 RUNX1 突变与 MLL-PTD 协同作用, 在降低 SDH 亚基表达的基础上, 通过下调 Mdm2 和 p53 表达, 进一步抑制 HIF1A 的降解, 促进 HIF1A 蛋白的积累, 从而诱导小鼠出现典型 MDS 表现。

## 2.6 HIF1A 活化在 MDS 发生中的重要作用

单独存在 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 或者是单纯敲除 *Runx1* 等位基因的小鼠, 尽管都表现出 HIF1A 蛋白表达增多以及 HSPCs 克隆增殖优势, 但小鼠并没有发生

典型 MDS 临床表现; 而在 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*RUNX1-mutant* 小鼠中, 由于 HIF1A 蛋白的进一步积累, 则小鼠出现典型 MDS 表现, 再次说明 HIF1A 的累加作用达到一定阈值以后对 MDS 的发生具有重要作用。

我们通过敲除 *Runx1* 等位基因的方法来模拟临床上 RUNX1 功能失活性突变, 从而构建 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>flx/flx</sup>/*Mx1-Cre* 小鼠作为 MDS 疾病模型。在此基础上我们进一步敲除 *Hif1a*, 以阐明 HIF1A 在 MDS 发生中的重要作用。与 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*RUNX1-mutant* 小鼠相似, *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup> 小鼠 c-KIT<sup>+</sup> 细胞 HIF1A 表达增强, HSPCs 具有体外连续集落培养能力, 并且出现形态发育异常; 接受 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup> 小鼠骨髓细胞移植的受体鼠发生典型 MDS 临床病理表现。而 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup> 小鼠敲除 *Hif1a* 等位基因以后, 上述 MDS 样改变都获得了逆转, *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup>/*Hif1a*<sup>Δ/Δ</sup> 移植鼠除了发生血小板减少之外(与 *Runx1* 调控巨核细胞有关), 无贫血和白细胞减少, 生存期也明显延长。这些结果表明异常稳定的 HIF1A 蛋白和活化的 HIF1A 信号通路在 MDS 重要表型(无效造血、血小板减少、形态发育异常等)发生中发挥关键作用。

我们分别提取 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup> 以及 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup>/*Hif1a*<sup>Δ/Δ</sup> 小鼠 c-KIT<sup>+</sup> 细胞进行 RNA-seq 分析, 并与已经发表的小鼠造血细胞 HIF1A CHIP-seq 以及 HIF1A 结合位点、DNA 保守序列等数据进行比较, 结果表明随着 *Hif1a* 敲除, 一些已知的 HIF1A 靶基因表达下调, 比如 *Gata2*, *Ndr1*, *Pgam1*, *Ak4*, *Zeb2*, *Egln3*, *Ddit4* 等; 而另一些与红系和巨核系细胞分化相关的基因出现表达上调, 如 *Klf1*, *Gfi1b*, *Gata1*, *Pbx1* 和 *Tal1*, 其中 *Klf1* 和 *Tal1* 是 HIF1A 已知的靶基因。除此之外, 我们还发现敲除 *Hif1a* 后, 并没有影响假性缺氧相关的糖酵解/氧化磷酸化基因表达, 因此表明 HIF1A 信号的活化是假性缺氧的下游事件。

在 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup> 小鼠体外集落培养的细胞中, 我们发现仅有 CD11b<sup>-</sup> Gr1<sup>-</sup> 细胞群具有集落形成能力, 提示该细胞群中包含有 CFU 起始细胞。Echinomycin 是一种 HIF1A 抑制剂, 在小鼠骨髓细胞体外集落培养体系中加入低浓度的 Echinomycin, 就可以明显抑制 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup> 小鼠骨髓细胞集落形成, 特别是降低 CFU 起始细胞并诱导其向成熟粒系分化; 为了进一步评价 Echinomycin 的体内安全性和疗效, 我们在 WT 小鼠中给予 Echinomycin 和安慰剂处理, 结果表明治疗剂量的 Echinomycin 对 WT 小鼠造血干细胞以及外周血均没有显著影响, 安全性良好。随后, 我们用 Echinomycin 处理 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>/*RX1-S291fs* 移植小鼠, 结果显示 Echinomycin 治疗组小鼠生存期明显

延长;此外,我们以 NSGS 小鼠为受者鼠,用 MDS 患者来源的 MDSL 细胞进行异种移植,然后给予 Echinomycin 治疗评价疗效。与对照组相比,Echinomycin 治疗组骨髓和脾脏 MDSL 细胞比例明显减低,并且治疗组小鼠的生存期显著优于对照组。我们的研究证实,无论是采取基因敲除 *Hif1a* 或者是应用化学药物抑制 HIF1A 信号通路,都能为 MDS 的治疗提供新的策略。

### 3 研究意义

我们通过构建多个基因小鼠模型,结合 MDS 患者数据信息以及客观的评价方法,明确了非低氧依赖性 HIF1A 信号的活化在 MDS 发生中具有重要作用。

HIF1A 蛋白的稳定和转录活性是 HIF1A 信号活化的基础。我们研究发现,尽管携带单个 MDS 相关基因异常的小鼠(如 *Mll*<sup>PTD/WT</sup>、*Tet2*<sup>Δ/Δ</sup>、*Runx1*<sup>Δ/Δ</sup>等)能够引起 HIF1A 蛋白增多,但是不足以诱发小鼠出现 MDS 表型,这提示需要 HIF1A 蛋白累加效应以及同时获得转录活性,才能导致 MDS 发生。因此,当我们在血细胞中持续诱导 HIF1A 表达后(*Vav1*-Cre/TPM 小鼠),小鼠出现 MDS 的特征表现。

在 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 小鼠模型中,我们发现 MLL-PTD 除了具有异常高甲基化(DNA、组蛋白)之外,还通过 Warburg 效应以及代谢重组引起的 TCA 循环中间代谢产物蓄积,从而引起假性缺氧介导的 HIF1A 信号激活。而突变的 RUNX1 蛋白激活 HIF1A 主要与下调 MDM2 E3 泛素连接酶和 p53 蛋白有关。因此,我们推测 *RUNX1* 突变协同 *Mll*<sup>PTD/WT</sup> 进一步激活 HIF1A 导致 MDS 发生,可能是通过干扰 RUNX1-p53-MDM2 轴的功能得以实现。尽管目前还不明确其他 MDS 相关基因(*TET2*、*ASXL1*、*DNMT3A*)上调 HIF1A 的确切机制,但是以 HIF1A 作为不同突变的共同作用靶点,可以使大部分 MDS 患者受益。

有研究报道在稳态造血的情况下敲除 *Hif1a* 对造血影响不大<sup>[7]</sup>。但我们的结果显示,在 MDS 疾病小鼠模型中敲除 *Hif1a*,不仅能够消除由 MDS 相关突变所带来的克隆增殖优势,同时能够逆转 MDS 临床表型,纠正贫血和血小板减少,并且能够明显延长小鼠的生存期。通过 RNA-seq 分析,我们发现清除 HIF1A 主要能够减轻红系和巨核系分化的阻滞,下调 *Gata2* 基因表达,上调 *Gata1* 基因以及一些关键的红系/巨核系分化基因,包括 *Klf1*、*Gfi1b*、*Gata1*、*Pbx1* 和 *Tal1* 等。除此之外,清除 HIF1A 还能够影响巨噬细胞的功能,特别是上调 *Irf4* 表达(促进造血支持性巨噬细胞功能)和下调 *Zeb2* (参与调节巨噬细胞、树突细胞、细胞毒 T 细

胞),在改善贫血中发挥作用。

总之,我们的研究为 MDS 发病机制研究提供了新的思路,在众多独立基因研究中找到影响疾病发生的关键共性因素,并以此为契机,寻求更有效的靶向治疗方案,为 MDS 患者的治疗提供新策略。

### 参考文献

- [1] Corey SJ, Minden MD, Barber DL, et al. Myelodysplastic syndromes; the complexity of stem-cell diseases [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 118-129.
- [2] Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361: 1872-1885.
- [3] Zhou T, Kinney MC, Scott LM, et al. Revisiting the case of genetically engineered mouse models in human myelodysplastic syndrome research [J]. *Blood*, 2015, 126: 1057-1068.
- [4] Nimer SD. Myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2008, 111: 4841-4851.
- [5] Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 849-859.
- [6] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 721-732.
- [7] Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1α level is essential for hematopoietic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 391-402.
- [8] Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity [J]. *Immunity*, 2014, 41: 518-528.
- [9] Ganan-Gomez I, Wei Y, Starczynowski DT, et al. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2015, 29: 1458-1469.
- [10] Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis [J]. *Blood*, 2008, 112: 470-478.
- [11] Zhang Y, Yan X, Sashida G, et al. Stress hematopoiesis reveals abnormal control of self-renewal, lineage bias, and myeloid differentiation in *Mll* partial tandem duplication (*Mll*-PTD) hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Blood*, 2012, 120: 1118-1129.
- [12] Zhang Y, Chen A, Yan XM, et al. Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2012, 96: 428-437.
- [13] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [J]. *Nature*, 1999, 399: 271-275.
- [14] Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1α [J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 34-44.
- [15] van Nederveen FH, Korpershoek E, Lenders JW, et al. Somatic SDHB mutation in an extraadrenal pheochromocytoma [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357: 306-308.
- [16] Jafri M, Wake NC, Ascher DB, et al. Germline mutations in the CDKN2B tumor suppressor gene predispose to renal cell carcinoma [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5: 723-729.

(收稿日期: 2019-08-27)