

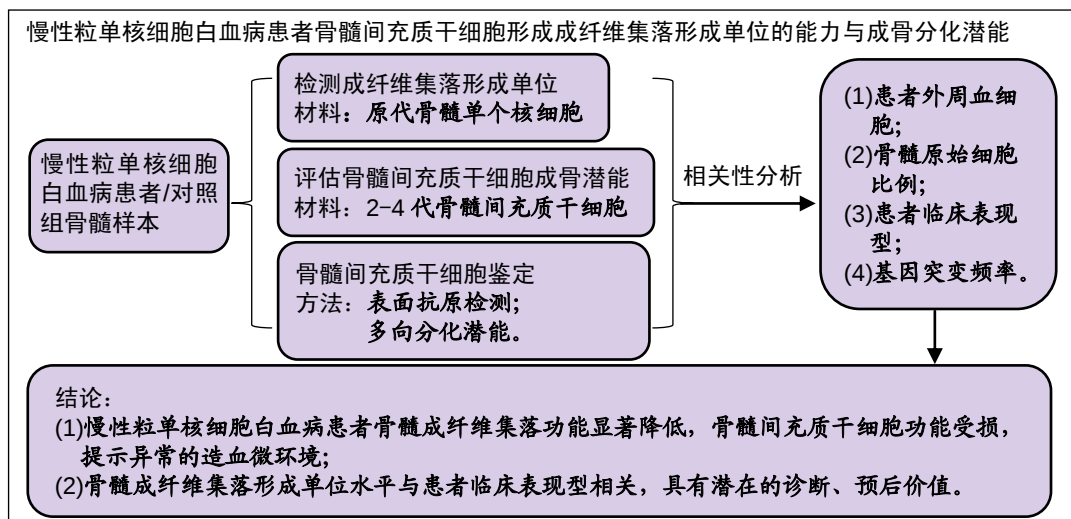
## 慢性粒单核细胞白血病患者骨髓成纤维集落形成单位功能及意义

徐若豪<sup>1,2</sup>, 李超<sup>1,2</sup>, 吴萍<sup>2</sup>, 李敏明<sup>2</sup>, 邓程新<sup>2</sup>, 耿素霞<sup>2</sup>, 赖沛龙<sup>2</sup>, 陆泽生<sup>2</sup>, 翁建宇<sup>1,2</sup>, 杜欣<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006; <sup>2</sup>广东省人民医院血液科, 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1725

ORCID: 0000-0001-9961-2549(徐若豪)

文章快速阅读:



徐若豪, 男, 1992 年生, 河南省新乡市人, 汉族, 华南理工大学医学院在读硕士研究生, 主要从事血液恶性疾病的微环境研究。

通讯作者: 杜欣, 博士, 主任医师, 华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006; 广东省人民医院血液科, 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080

文献标识码:B

稿件接受: 2019-02-20



文题释义:

成纤维集落形成单位(CFU-F): 代表了一组具有多向分化潜能的间充质干细胞, 具有成骨、成脂、成软骨等多向分化的潜力。骨髓细胞形成 CFU-F 的数量与状态反映了骨髓基质微环境对造血、成骨、成脂分化的支持水平, 可作为评估骨髓基质微环境的简易指标。

慢性粒单核细胞白血病(chronic myelomonocytic leukemia, CMML): 是一种髓系恶性肿瘤, 兼有骨髓发育异常与肿瘤细胞克隆性增殖的表现。其发病机制仍不明确, 异常的骨髓微环境可能参与到慢性粒单核细胞白血病的发病中。

摘要

背景: 研究表明, 异常的骨髓微环境可能参与慢性粒单核细胞白血病的发生, 成纤维集落形成单位(colony forming unit-fibroblast, CFU-F)代表了一组具有多系分化潜能的间充质干细胞, 其功能、数量状态具有评价骨髓基质微环境状态的意义。

目的: 评估慢性粒单核细胞白血病患者骨髓间充质干细胞形成 CFU-F 的能力与成骨分化潜能, 探讨 CFU-F 指标与患者外周血细胞计数、疾病表现型等指标的相关性。

方法: ①收集广东省人民医院血液科收治、资料齐全的慢性粒单核细胞白血病患者 15 例与对照组志愿者 10 例, 比较两组间骨髓形成 CFU-F 的功能与分化潜能; ②分析慢性粒单核细胞白血病患者骨髓 CFU-F 数量与初诊时外周血细胞计数、临床表现型、骨髓原始细胞及患者基因突变的相关性。实验方案得到广东省人民医院(广东省医学科学院)伦理委员会批准, 批件号: [2018]002 号。

结果与结论: ①15 例慢性粒单核细胞白血病患者 CFU-F 数量低于对照组( $P=0.04$ ), 其中 67%(10/15)的慢性粒单核细胞白血病患者骨髓 CFU-F 数量显著降低( $P=0.00$ ), 33%(5/15)患者 CFU-F 水平接近对照组( $P=0.14$ ); ②全组慢性粒单核细胞白血病患者骨髓间充质干细胞成骨转录因子 Osterix 及 RUNX2 的表达量显著降低( $P<0.05$ ), 成骨分化潜能显著下降( $P=0.00$ ); ③慢性粒单核细胞白血病患者 CFU-F 数量与初诊时外周血白细胞、中性粒细胞以及单核细胞计数呈负相关, 与外周血小板计数呈正相关; ④在 CFU-F 数量显著降低的 10 例患者中, 90%(9/10)外周血白细胞计数均升高( $\geq 13 \times 10^9 L^{-1}$ ,  $P=0.01$ ), 50%(5/10)患者携带有 NRAS/KRAS 基因位点突变。⑤结果表明: 慢性粒单核细胞白血病患者骨髓间充质干细胞功能受损, 形成的 CFU-F 数量降低, CFU-F 数量与外周血细胞计数以及患者临床特征具有相关性, 提示了 CFU-F 指标具有潜在的临床价值。

关键词:

成纤维集落形成单位; 骨髓; 间充质干细胞; 慢性粒单核细胞白血病; KRAS 基因; NRAS 基因; 成骨分化; 外周血细胞计数; MPN-CMML 型; MDS-CMML 型; 骨髓微环境

中图分类号: R457

基金资助:

广东省科技重大专项(2017B020230004), 项目负责人: 杜欣

缩略语:

成纤维集落形成单位: colony forming unit-fibroblast, CFU-F

Xu Ruohao, Master candidate, Medical School of South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Corresponding author: Du Xin, MD, Chief physician, Medical School of South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

## Bone marrow colony forming units-fibroblast in patients with chronic myelomonocytic leukemia: functions and clinical significance

Xu Ruohao<sup>1,2</sup>, Li Chao<sup>1,2</sup>, Wu Ping<sup>2</sup>, Li Minming<sup>2</sup>, Deng Chengxin<sup>2</sup>, Geng Suxia<sup>2</sup>, Lai Peilong<sup>2</sup>, Lu Zesheng<sup>2</sup>, Weng Jianyu<sup>1,2</sup>, Du Xin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Medical School of South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that abnormal bone marrow microenvironment is involved in the development of chronic myelomonocytic leukemia. Colony forming unit-fibroblast represents a group of multipotent mesenchymal stromal cells that can reflect the bone marrow stromal microenvironment in terms of cell function and number.

**OBJECTIVE:** To investigate the abilities of bone marrow mesenchymal stromal cells to form colony forming units-fibroblast and to differentiate towards osteoblasts in patients with chronic myelomonocytic leukemia and to study the relationship between colony forming unit-fibroblast counts and clinic characteristics (peripheral blood cell count and clinical phenotype).

**METHODS:** (1) Fifteen newly diagnosed chronic myelomonocytic leukemia patients admitted to the Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, and 10 volunteers (control) were enrolled. Functions and osteogenic potential of colony forming units-fibroblast were compared between two groups. (2) There was a correlation analysis between colony forming unit-fibroblast counts and clinical characteristics (peripheral blood cell count, clinical phenotype, percentage of bone marrow blasts and gene mutations). The study protocol was approved by the ethics committee of Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences) with the approval No. [2018]002.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The number of colony forming units-fibroblast formed in the patients with chronic myelomonocytic leukemia decreased as compared with the control group ( $P=0.04$ ). The 10 of 15 (67%) patients showed remarkable reduction in the colony forming unit-fibroblast counts ( $P=0.00$ ), while the rest 5 (33%) patients exhibited normal colony forming unit-fibroblast levels ( $P=0.14$ ). (2) Expression levels of Osterix and Runx2 in the bone marrow mesenchymal stem cells of patients with chronic myelomonocytic leukemia were significantly lower than those in the control group. There was a limited osteogenic potential in the bone marrow mesenchymal stem cells of patients with chronic myelomonocytic leukemia ( $P=0.00$ ). (3) Colony forming unit-fibroblast counts of patients with chronic myelomonocytic leukemia were negatively related to peripheral white blood cells, neutrocytes and monocytes counts, and were positively related to peripheral platelet counts. (4) Nine out of 10 (90%) patients with reduced colony forming unit-fibroblast counts exhibited a higher white blood cell level ( $\geq 13 \times 10^9/L$ ) ( $P=0.01$ ), and 5 out of 10 (50%) patients carried NRAS/KRAS mutations. Findings from this study show limited function of colony forming unit-fibroblast formation and osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells of patients with chronic myelomonocytic leukemia. Moreover, the number of colony forming units-fibroblast seems to be correlated to peripheral blood cell counts and clinical features, indicating underlying significances in the diagnosis and prognosis of chronic myelomonocytic leukemia.

**Key words:** colony forming unit-fibroblast; bone marrow; mesenchymal stem cells; chronic myelomonocytic leukemia; KRAS gene; NRAS gene; osteogenic differentiation; peripheral blood cell count; MPN-CMML type; MDS-CMML type; bone marrow microenvironment

**Funding:** the Major Science and Technology Project of Guangdong Province, No. 2017B020230004 (to DX)

## 0 引言 Introduction

慢性粒单核细胞白血病(chronic myelomonocytic leukemia, CMML)属于一种髓系恶性肿瘤,其发病机制仍不明确,异常的造血微环境与造血细胞间相互作用可能参与疾病的发生<sup>[1-2]</sup>。骨髓基质细胞通过直接接触和/或分泌因子对维持造血细胞的稳定存在、正常分化进行着精密的调控<sup>[3]</sup>。成纤维集落形成单位(colony forming unit-fibroblast, CFU-F)代表了一组有多向分化潜能的间充质干细胞<sup>[4]</sup>,其功能、数量状态反映了骨髓基质微环境对正常造血、成骨、成脂分化的支持水平<sup>[3-5]</sup>。此次研究拟利用CFU-F Assays等技术检测骨髓间充质干细胞功能及成纤维集落形成能力,分析CFU-F数量与慢性粒单核细胞白血病患者临床特征的相关性,初步探讨CFU-F指标的临床价值。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 细胞学体外观察实验与临床分析。

1.2 时间及地点 实验于2016年12月至2018年3月在华南理工大学医学院完成。

### 1.3 材料

1.3.1 骨髓全血 采集自广东省人民医院血液科2016年12月至2018年1月收治的15例初诊慢性粒单核细胞白血病患者(CMML-1型9例,CMML-2型5例,CMML-0型1例),及10例对照组志愿者(骨髓移植供者8例,营养性贫血2例);

两组中位年龄、性别比例差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**诊断标准:** 所有慢性粒单核细胞白血病患者均根据2016年WHO血液肿瘤诊断标准诊断<sup>[2]</sup>。

**纳入标准:** ①符合以上诊断标准的初诊慢性粒单核细胞白血病患者;②患者年龄18-80周岁;③患者骨髓穿刺取样时尚未经化疗、去甲基化药物或其他手段治疗;④签署参与研究知情同意书并能完成随访。

**排除标准:** ①患有重大心、肺及造血系统疾病者;②患者伴发其他血液系统肿瘤如淋巴瘤、急性髓系白血病(AML)等疾病;③患者非初诊,或在入院前接受过化疗、去甲基化药物治疗;④患者凝血功能障碍,无法接受骨髓穿刺手术。具有以上任何一项均不能入选。

所有纳入患者及志愿者在提取标本前均签署知情同意书,实验方案得到广东省人民医院(广东省医学科学院)伦理委员会批准,批件号:[2018]002号,批复日期:2018-02-06。

1.3.2 实验试剂和仪器 人类骨髓间充质干细胞培养基(美国Cyagen Biosciences公司);姬姆萨染色液(北京Leagene公司);成人骨髓间充质干细胞成骨、成脂诱导分化试剂盒(美国Cyagen Biosciences公司);TRIzol RNA提取试剂盒(美国ThermoFisher公司);HiScript II Q RT SuperMix及ChamQ<sup>TM</sup>Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺为赞公司);淋巴细胞分离液(美国StemCell公

司); 小鼠抗人CD90-FITC单抗、小鼠抗人CD45-FITC单抗、小鼠抗人CD34-FITC单抗、小鼠抗人CD73-PE单抗及小鼠抗人CD105-PE单抗(美国BD公司); CFX-Connect™ Q-PCR仪(美国Bio-Rad公司); 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司); 分光光度计(美国BioTek Instruments公司)。

1.4 方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的培养与鉴定 骨髓穿刺取髂后上嵴骨髓液约5 mL, 加入密度为1.077 g/mL淋巴分细胞离液, 离心机升、降速均调为“0”, 室温900×g离心20 min后获得骨髓单个核细胞并计数, 接种于含有人骨髓间充质干细胞培养基的10 cm盘中, 使用2-4代细胞进行成骨、成脂分化功能鉴定。

|                 |                                                                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 人骨髓间充质干细胞的培养及鉴定 |                                                                                                        |
| 细胞来源:           | 慢性粒单核细胞白血病患者/对照组志愿者骨髓来源                                                                                |
| 培养基介绍:          | 成人骨髓间充质干细胞完全培养基(Cyagen Biosciences 公司), 货号: HUXMA-90011                                                |
| 添加材料:           | ①成人骨髓间充质干细胞基础培养基(440 mL); ②成人骨髓间充质干细胞专用胎牛血清(50 mL); ③双抗(5 mL); ④谷氨酰胺(5 mL)                             |
| 培养时间:           | 将骨髓单个核细胞接种于 10 cm 盘中, 24 h 后全换液+PBS 清洗, 之后每 2 d 使用间充质干细胞培养基行半换液, 待细胞融合度达 70%-80%后使用 0.25%胰酶消化细胞, 并进行传代 |
| 细胞传代:           | 研究所使用骨髓间充质干细胞为 2-4 代                                                                                   |
| 细胞鉴定:           | ①使用流式细胞术对 2-4 代骨髓间充质干细胞进行表面 Marker 鉴定(5 例慢性粒单核细胞白血病患者及 4 名对照组志愿者); ②用 2-4 代骨髓间充质干细胞进行分化潜能鉴定            |
| 伦理学批准:          | 经广东省人民医院(广东省医学科学院)伦理委员会审核批准, 批件号: [2018]002 号                                                          |

1.4.2 CFU-F Assays 将分离的骨髓单个核细胞以10<sup>6</sup>细胞/孔的密度接种于含间充质干细胞培养基的六孔板中培养, 于第7天半换液, 10-15 d视集落生长情况行姬姆萨染色。低倍镜下以至少50个成纤维细胞成簇聚集判定为CFU-F集落, 镜下记录CFU-F集落数量(取3复孔平均值)。参考既往文献<sup>[3, 5]</sup>, 以10单位CFU-F数为界将慢性粒单核细胞白血病患者划分为“CFU-F降低组”(CFU-F<10)与“CFU-F正常组”(CFU-F≥10)进行统计分析。

1.4.3 成骨分化实验 以2×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>的密度将扩增的2-4代骨髓间充质干细胞接种于12孔板中, 待细胞融合度达70%-80%, 将培养基更换为成骨分化培养基继续培养, 按说明书诱导成骨分化2-4周后使用茜素红染色细胞, 使用分光光度计检测560 nm波长红光吸收率以定量成骨分化程度<sup>[6]</sup>。

1.4.4 实时荧光定量PCR(qPCR)检测成骨相关基因表达水平 收集培养的2-4代间充质干细胞约1×10<sup>6</sup>个, 按TRIzol试剂说明书提取总RNA并测浓度。将总RNA反转录为cDNA并以此为模板进行PCR扩增, 产物用于目的基因的qPCR检测(表1)。反应条件: 预变性95 ℃ 30 s; PCR反应95 ℃ 5 s, 60 ℃ 34 s, 40循环; 熔解曲线95 ℃ 15 s, 在81 ℃各设定一次检测荧光。目的基因mRNA表达的相对量通过比较Ct值的方法计算获得, 通过相对于GAPDH基因表达的标准化, 目的基因的表达量计算为2<sup>-ΔΔCt</sup>。

|                                                    |                                                                  |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 表 1 应用于实时定量 PCR 的引物序列                              |                                                                  |
| Table 1 Primers used in real-time quantitative PCR |                                                                  |
| 基因                                                 | 前向引物序列 (5'至 3')<br>后向引物序列 (5'至 3')                               |
| Osterix                                            | TCT CCA TCT GCC TGG<br>CTC CTT<br>CTG CAC GCT GCC GTC<br>AGC ATG |
| RUNX2                                              | TCT TCA GCA CAG TGA CAC<br>CAT<br>CTG TTG CGC AGC CAC<br>CAC CG  |
| ALP                                                | CAA CCC TGG GGA GGA<br>GAC<br>GCA TTG GTG TTG TAC GTC<br>TTG     |
| GAPDH                                              | AGC CAC ATC GCT CAG<br>ACA CC<br>CGG CCA TCA CGC CAC AG          |

1.4.5 CFU-F数量与患者临床资料相关性分析 采用查阅电子病历及电话回访方式进行随访, 随访截止日期为2018-11-01。应用Pearson直线相关系数分析CFU-F数量与外周血细胞计数、疾病表现型、骨髓原始细胞比例及突变基因的相关性。

1.5 主要观察指标 ①形态学及流式鉴定骨髓间充质干细胞; ②间充质干细胞形态, CFU-F数量, 茜素红染色成骨细胞吸光度A<sub>560</sub>, 以及成骨相关转录因子Osterix、RUNX2和ALP的表达水平; ③CFU-F数量与外周血细胞计数、疾病表现型及突变基因的相关性。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0统计学软件包进行分析; 非正态分布资料以中位数和四分位间距表示; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两组独立样本数据进行方差齐性检验(Levene检验)后采用t检验或U检验比较; 相关性分析采用计算Pearson直线相关系数; 计数资料采用四格表卡方对比。统计学指标均以P<0.05界定为统计学显著差异。

2 结果 Results

2.1 纳入患者一般信息 见表2。

2.2 骨髓间充质干细胞功能与纯度鉴定结果 见图1。图中可见典型间充质干细胞形态, 具有成脂、成骨分化能力。对5例慢性粒单核细胞白血病患者及4例对照组志愿者体外培养的间充质干细胞进行流式表面抗原检测: CD90阳性率为(96.2±1.9)%, CD73阳性率为(95.7±1.7)%, CD105阳性率为(96.0±2.1)%, CD45阴性率为(98.0±1.2)%, CD34阴性率(99.5±0.9)%。

2.3 慢性粒单核细胞白血病患者CFU-F与成骨分化功能受损 见图2。大体观察, 慢性粒单核细胞白血病患者形成的CFU-F密度降低, 数量减少(图2A, D)。低倍镜下间充质干细胞失去了特征性的梭形外观, 细胞间距增大, 伴有较多有核细胞吸附, CFU-F集落数量显著减少(图2B, 表2)。慢性粒单核细胞白血病患者骨髓间充质干细胞经成骨诱导后茜素红染色降低(图2C), A<sub>560</sub>降低(图2E, P=0.00), 提示钙盐沉积减少, 成骨分化能力受损。

2.4 慢性粒单核细胞白血病患者骨髓间充质干细胞成骨相关基因表达水平 见图3。qPCR结果显示, 与对照组比较, 慢性粒单核细胞白血病患者骨髓间充质干细胞中成骨分化关键基因Osterix和RUNX2的表达水平降低(Osterix ΔΔCt值: 3.85±0.57 vs. 5.12±1.11, P=0.01; RUNX2 ΔΔCt

值:  $2.33 \pm 0.57$  vs.  $3.15 \pm 1.22$ ,  $P=0.00$ ), 而早期成骨分化指标ALP的表达量无明显改变( $\Delta\Delta Ct$ 值:  $3.21 \pm 1.02$  vs.  $3.67 \pm 0.66$ ,  $P=0.21$ )。

## 2.5 CFU-F数量与患者外周血细胞计数相关性 见图4。

10例CFU-F降低组患者中, 9例(90%)外周血白细胞计数 $\geq 13 \times 10^9 L^{-1}$ , 其余5例CFU-F正常患者(100%)的外周血白细胞计数均 $< 13 \times 10^9 L^{-1}$ ( $P=0.01$ ); 慢性粒单核细胞白血病患者CFU-F数量与外周血白细胞、中性粒细胞计数显著负相关; 与外周血小板计数显著正相关; 与外周血单核细胞具有负相关趋势; CFU-F数量与外周血红蛋白水平以及骨髓原始细胞比例无明显相关性。

2.6 CFU-F数量与基因突变 见表3。10例CFU-F降低组患者中, 5例(50%)伴有NRAS/KRAS位点突变, 5例CFU-F正常组患者中, 仅1例(20%)伴有NRAS/KRAS位点突变

( $P=0.58$ )。CFU-F降低组患者中70%(7/10)与CFU-F正常组患者中40%(2/5)携带有 $\geq 3$ 个基因位点的突变( $P=0.33$ )。

## 3 讨论 Discussion

研究表明, 异常的造血微环境影响了造血干细胞的定植、细胞周期以及分化效能, 改变了骨髓微环境的免疫状态<sup>[7-9]</sup>。文献报道, 低危骨髓增生异常综合征(MDS)患者骨髓细胞形成CFU-F能力受损<sup>[10]</sup>。关于慢性粒单核细胞白血病患者骨髓CFU-F的研究尚未见文献报道。此次研究发现慢性粒单核细胞白血病患者骨髓形成CFU-F的数量也显著下降, 骨髓间充质干细胞失去了典型形态学外观, 细胞间距增大、生长速度下降。在体外培养条件下, 细胞成骨功能受损, 成骨相关基因Osterix、RUNX2表达下降。受损的间充质干细胞、成骨细胞可能潜在地削弱了骨髓微环境对

表2 慢性粒单核细胞白血病(CMML)患者组及对照组信息

Table 2 Characteristics of patients with chronic myelomonocytic leukemia and controls

| 编号 | 诊断     | 疾病特征 | 年龄(岁) | 性别 | CFU-F 数量 | 染色体核型  | 基因突变                                                 |
|----|--------|------|-------|----|----------|--------|------------------------------------------------------|
| 1  | CMML-1 | MPN- | 62    | M  | 0.67     | 正常     | WT1                                                  |
| 2  | CMML-1 | MPN- | 62    | M  | 0.33     | +8     | NRAS、ETV6S、ETBP1、ASXL1、PTPN11、CSF3R、LYST、GATA3、SH2B3 |
| 3  | CMML-1 | MPN- | 76    | M  | 1.25     | 正常     | SF3S1、TET2、RBBP6、NOTCH、DNMT3A                        |
| 4  | CMML-1 | MPN- | 40    | M  | 2.67     | 7q-    | SETBP1                                               |
| 5  | CMML-2 | MPN- | 23    | F  | 9        | 正常     | NRAS、WT1、KRAS、PDS5B、FAT1                             |
| 6  | CMML-2 | MPN- | 41    | M  | 7.5      | XY(-Y) | FLT3、NRAS、KRAS、TET2、ASXL1                            |
| 7  | CMML-2 | MPN- | 66    | M  | 0        | 正常     | NPM1、KRAS、TET2、DNMT3A、CUX1、PLCG1                     |
| 8  | CMML-1 | MPN- | 54    | M  | 1.25     | 正常     | CEBPA、TET2、CBL、TET2                                  |
| 9  | CMML-1 | MPN- | 64    | F  | 2.33     | 正常     | KRAS、RUNX1、TET2、ASXL1                                |
| 10 | CMML-1 | MDS- | 66    | F  | 24.3     | 正常     | FANCC、DIS3、PIK3CA                                    |
| 11 | CMML-1 | MDS- | 59    | M  | 16.5     | 正常     | -                                                    |
| 12 | CMML-2 | MDS- | 49    | F  | 16.67    | 正常     | NPM1、NRAS、DNMT3A、MPL/IDH1                            |
| 13 | CMML-1 | MDS- | 67    | F  | 3.33     | 正常     | WT1                                                  |
| 14 | CMML-0 | MDS- | 54    | M  | 20       | 正常     | SRSF2                                                |
| 15 | CMML-2 | MDS- | 64    | M  | 15.67    | 正常     | -                                                    |
| 16 | 供者     |      | 25    | M  | 20       | -      | -                                                    |
| 17 | 供者     |      | 60    | M  | 17       | -      | -                                                    |
| 18 | 供者     |      | 50    | M  | 10.67    | -      | -                                                    |
| 19 | 供者     |      | 48    | M  | 14.67    | -      | -                                                    |
| 20 | 供者     |      | 52    | F  | 10       | -      | -                                                    |
| 21 | 供者     |      | 18    | M  | 38.67    | -      | -                                                    |
| 22 | 供者     |      | 52    | F  | 16       | -      | -                                                    |
| 23 | 营养性贫血  |      | 71    | M  | 11       | -      | -                                                    |
| 24 | 营养性贫血  |      | 66    | M  | 15       | -      | -                                                    |
| 25 | 供者     |      | 56    | F  | 11       | -      | -                                                    |

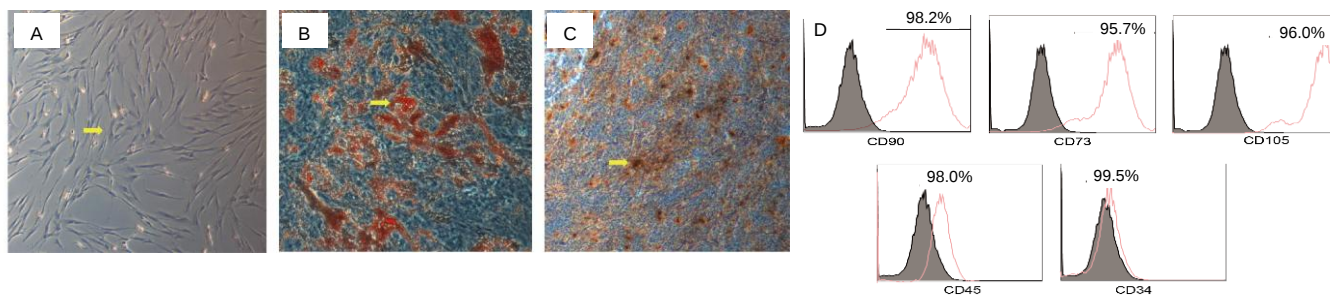
表注: MPN-CMML: 以克隆性增殖、外周白细胞升高为特征的 CMML 类型; MDS-CMML: 以骨髓病态造血、外周血细胞减少为特征的 CMML 类型; M: 男性; F: 女性; CFU-F: 成纤维集落形成单位。

表3 慢性粒单核细胞白血病(CMML)患者成纤维集落形成单位(CFU-F)数量与其临床特征

Table 3 Clinical characteristics and colony forming unit-fibroblast counting in patients with chronic myelomonocytic leukemia

| 组别        | n  | CFU-F 数量[M(范围)]               | 白细胞计数[M(范围)]                       | 外周血白细胞[n(%)]                 |                           | 病理特征[n(%)]          |          | NRAS/KRAS 突变 |
|-----------|----|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------|----------|--------------|
|           |    |                               |                                    | $\geq 13 \times 10^9 L^{-1}$ | $< 13 \times 10^9 L^{-1}$ | MPN-CMML            | MDS-CMML |              |
| 总体 CMML   | 15 | 3.33(1.25-16.50) <sup>a</sup> | 16.69(5.80-54.39) <sup>a</sup>     | 9(60%)                       | 6(40%)                    | 9(60%)              | 6(40%)   | 6/15(40%)    |
| CFU-F 降低组 | 10 | 1.79(0.59-4.37) <sup>a</sup>  | 31.42(15.09-61.54) <sup>a, b</sup> | 9(90%) <sup>b</sup>          | 1(10%)                    | 9(90%) <sup>b</sup> | 1(10%)   | 5/10(50%)    |
| CFU-F 正常组 | 5  | 16.67(16.09-22.17)            | 3.85(2.67-9.36)                    | 0                            | 5(100%)                   | 0                   | 5(100%)  | 1/5(20%)     |
| 对照组       | 10 | 14.84(10.00-38.67)            | 4.19(4.11-6.21)                    | 0                            | 10(100%)                  | -                   | -        | 0            |

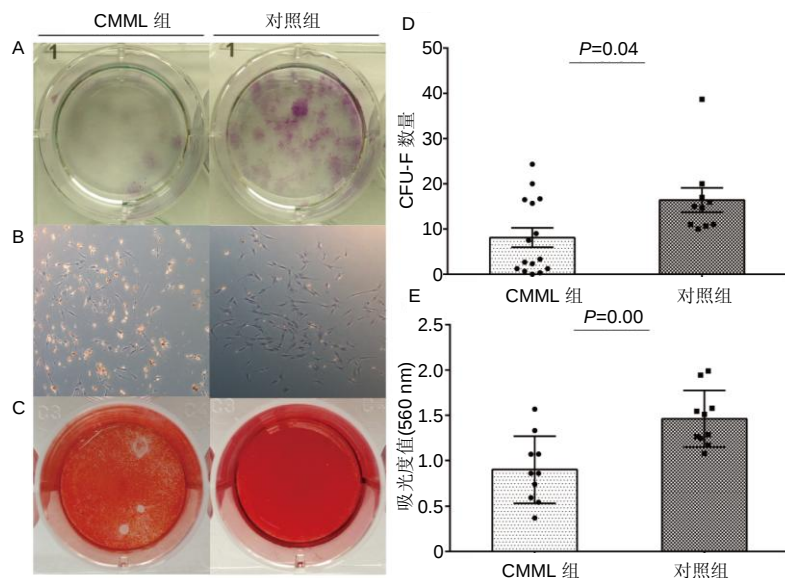
表注: MPN-CMML: 表现为骨髓增殖型亚型的慢性粒单核细胞白血病亚型; MDS-CMML: 表现为骨髓衰竭型的慢性粒单核细胞白血病亚型。CFU-F 降低组: CFU-F 数量 $< 10$ ; CFU-F 正常组: CFU-F 数量 $\geq 10$ 。与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CFU-F 正常组对比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。



图注: 图 A 为体外培养第 2 代骨髓间充质干细胞, 具有典型间充质干细胞形态( $\times 5$ ); 图 B 为成脂诱导 18 d 油红染色镜下图像, 箭头指向典型脂肪小泡( $\times 40$ ); 图 C 为成骨诱导 22 d 茜素红染色镜下图像, 箭头指向典型钙盐结节( $\times 40$ ); 图 D 为流式表面抗原检测结果, 高表达 CD90, CD73 及 CD105, 低表达或不表达 CD45 及 CD34。

图 1 骨髓间充质干细胞的鉴定

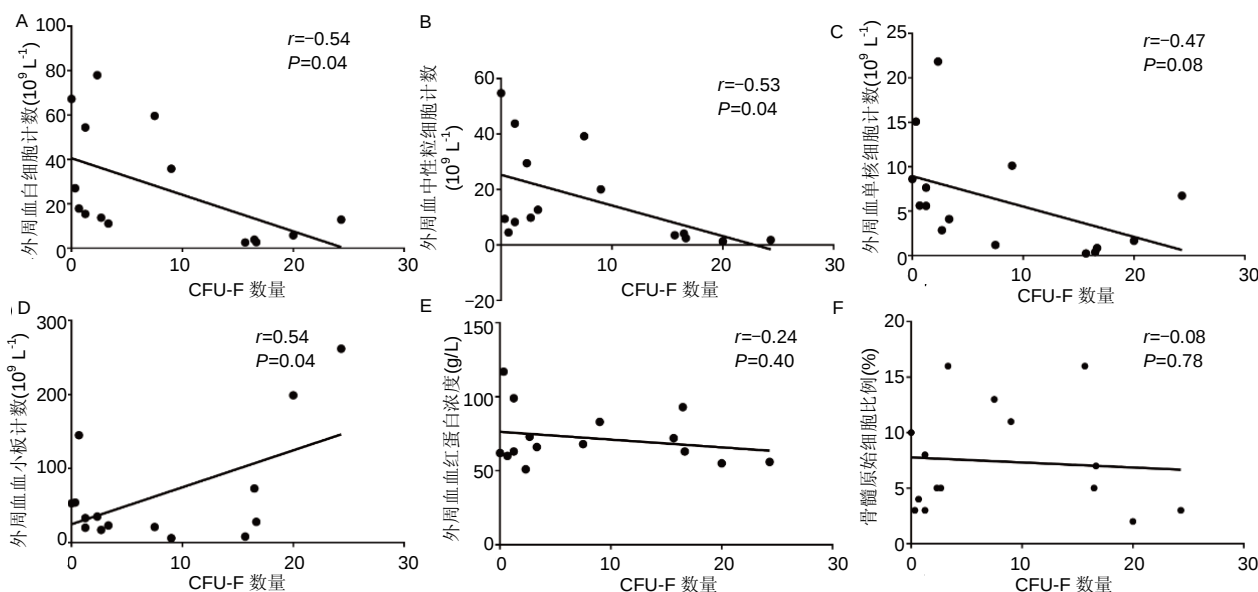
Figure 1 Identification of bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 图 A 示 CMML 患者 CFU-F 集落密度下降, 姬姆萨染色颗粒吸附下降; 图 B 示在患者 CFU-F 集落中, 骨髓间充质干细胞失去特征性的梭形外观, 细胞间距增大, 伴有较多有核细胞黏附( $\times 5$ ); 图 C 示 CMML 患者来源骨髓间充质干细胞成骨诱导后茜素红染色水平较低; 图 D, E 示 CMML 患者 CFU-F 数量显著降低( $P=0.04$ ), 成骨细胞 560 nm 吸光度降低( $P=0.00$ )。CFU-F: 成纤维集落形成单位; CMML: 慢性粒单核细胞白血病。

图 2 CMML 患者成 CFU-F 与成骨分化功能受损

Figure 2 Limited potential of colony forming unit-fibroblast formation and osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells of patients with chronic myelomonocytic leukemia



图注: 图 A-C 示患者 CFU-F 数量与外周血白细胞( $r=-0.54$ ,  $P=0.04$ )、外周血中性粒细胞( $r=-0.53$ ,  $P=0.04$ )及外周血单核细胞( $r=-0.47$ ,  $P=0.08$ )呈负相关; 图 D 示患者 CFU-F 数量与外周血血小板计数正相关( $r=0.54$ ,  $P=0.04$ ); 图 E, F 示 CFU-F 数量与外周血血红蛋白水平以及骨髓原始细胞比例无明显相关。

图 4 慢性粒单核细胞白血病患者成纤维集落形成单位(CFU-F)数量与外周血细胞的相关性

Figure 4 Correlation between colony forming unit-fibroblast counts and peripheral blood cells in patients with chronic myelomonocytic leukemia

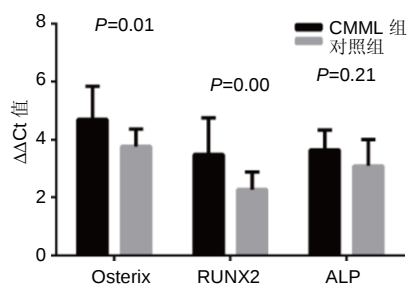


图3 慢性粒单核细胞白血病(CMML)患者骨髓间充质干细胞成骨相关转录子表达水平下降

Figure 3 Limited expression of osteogenic differentiation related genes in bone marrow mesenchymal stem cells of patients with chronic myelomonocytic leukemia

正常造血的支持作用。为验证这一设想,作者进一步探索了慢性粒单核细胞白血病患者骨髓CFU-F数量与相关外周血指标的关联性。结果发现,慢性粒单核细胞白血病骨髓形成的CFU-F数量与外周血白细胞、中性粒细胞具单核细胞呈负相关,与外周血小板数量显著正相关。因此,作者推测由CFU-F反映出的MSC功能,在慢性粒单核细胞白血病正常、异常造血进程中参与了重要调节作用。

增殖型(MPN-CMML)与MDS型(MDS-CMML)是慢性粒单核细胞白血病患者两种不同的表现型<sup>[2, 11]</sup>。最新研究显示,MPN-CMML型患者具有更差的预后以及显著异常的细胞因子特征<sup>[12-13]</sup>。在分子生物学水平,RAS/MAPK通路相关突变是MPN-CMML最常见的突变,常以KRAS、NRAS及HRAS基因的功能性突变导致激活<sup>[14-15]</sup>,NRAS、KRAS基因位点的突变也是慢性粒单核细胞白血病患者预后的独立风险因素<sup>[11]</sup>。此次研究发现,较低的CFU-F功能与慢性粒单核细胞白血病患者MPN-CMML亚型存在关联。在10例CFU-F降低组的患者中,9例患者(9/10, 90%)外周血白细胞显著升高,呈增殖型表型。在CFU-F正常组患者骨髓中病态造血表型易见(MDS-CMML),且外周血白细胞均低于 $13 \times 10^9 L^{-1}$ 。CFU-F数量降低的患者同样表现出类似MPN-CMML的分子生物学特征,5/10例CFU-F降低组患者(50%)携带有NRAS/KRAS突变,仅1/5例CFU-F正常组患者(20%)携带有NRAS位点突变,7/10例CFU-F降低组患者(70%)携带有 $\geq 3$ 个基因位点的突变。作者推测,衰减的间充质干细胞功能可能导致慢性粒单核细胞白血病骨髓微环境趋向于支持恶性克隆增殖,从而产生MPN-CMML的表型,然而其发挥作用的具体机制仍不明确。

综上所述,慢性粒单核细胞白血病患者骨髓形成的CFU-F数量显著降低,骨髓间充质干细胞功能受损,提示了慢性粒单核细胞白血病患者骨髓中存在异常的造血微环境。结合患者临床数据,骨髓CFU-F变化与慢性粒单核细胞白血病疾病表型相关(MPN-和MDS-),具有潜在的诊断、预后价值,但其相互作用机制仍不明确,值得扩大病例数进一步研究。

**作者贡献:** 课题设计为徐若豪;资料收集为李超、李敏明、邓程新、耿素霞;评估为赖沛龙、陆泽生;翁建宇审校,杜欣对文章负责。

**经费支持:** 该文章接受了“广东省科技重大专项(2017B020230004)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计

分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该临床研究的实施符合《赫尔辛基宣言》和广东省人民医院(广东省医学科学院)伦理委员会对研究的相关伦理要求(批件号:[2018]002号,批复日期:2018-02-06)。

**知情同意问题:** 研究所获取患者样本均取得患者书面签署的知情同意文件。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 该统计学方法已经华南理工大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(19):1872-1885.
- [2] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
- [3] Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol*. 1997;97(3):561-570.
- [4] Nifontova I, Svinareva D, Petrova T, et al. Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases. *Acta Haematol*. 2008;119(2):98-103.
- [5] Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641-650.
- [6] Balaian E, Wobus M, Weidner H, et al. Erythropoietin inhibits osteoblast function in myelodysplastic syndromes via the canonical Wnt pathway. *Haematologica*. 2018;103(1):61-68.
- [7] Tauro S, Hepburn MD, Bowen DT, et al. Assessment of stromal function, and its potential contribution to deregulation of hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2001;86:1038-1045.
- [8] Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2:141-150.
- [9] Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, et al. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia*. 2013;27:1841-1851.
- [10] Chen S, Zambetti NA, Bindels EM, et al. Massive parallel RNA sequencing of highly purified mesenchymal elements in low-risk MDS reveals tissue-context-dependent activation of inflammatory programs. *Leukemia*. 2016;30:1938-1942.
- [11] Ricci C, Fermo E, Corti S, et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2246-2256.
- [12] Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2018;93(6):824-840.
- [13] Niyongere S, Lucas N, Zhou JM, et al. Heterogeneous expression of cytokines accounts for clinical diversity and refines prognostication in CMML. *Leukemia*. 2019;33(1):205-216.
- [14] Fedders H, Alsadeq A, Schmah J, et al. The role of constitutive activation of FMS-related tyrosine kinase-3 and NRAS/KRAS mutational status in infants with KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2017;102:e438-e442.
- [15] Liang DC, Chen SH. Mutational status of NRAS, KRAS, and PTPN11 genes is associated with genetic/cytogenetic features in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(2). doi: 10.1002/mbc.26786.