

研究论文

*GPR183*慢病毒载体的构建及对Cutll1细胞凋亡的影响

张航 舒逸 吕文琼 张佳 张虹洋 唐诗 邹琳*

(重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

摘要 该文旨在构建过表达人*GPR183*的慢病毒载体, 研究*GPR183*对急性T淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphocytic leukemia, T-ALL)细胞Cutll1凋亡的影响。通过PCR法扩增人*GPR183*序列片段, 并连接到慢病毒表达载体质粒pEZ-Lv201上, 构建过表达*GPR183*慢病毒质粒, 包装病毒, 感染T-ALL Cutll1细胞, q-PCR及Western blot检测细胞*GPR183*表达水平; 检测*GPR183*对Cutll1细胞生长、周期及凋亡影响。质粒PCR及测序结果显示, 成功构建*GPR183*过表达慢病毒载体。感染Cutll1细胞后荧光显微镜下观察到绿色荧光, 过表达组*GPR183* mRNA及蛋白表达水平较对照组明显上升($P<0.01$), 成功构建过表达*GPR183*的Cutll1细胞株, 过表达*GPR183*的Cutll1细胞生长明显受到抑制($P<0.001$), 凋亡水平较对照组显著升高($P<0.01$), 但不影响细胞周期。初步显示, *GPR183*能明显抑制T-ALL Cutll1细胞增长, 促进细胞凋亡, 为后续研究奠定基础。

关键词 *GPR183*; T-ALL; 细胞凋亡

Construction of the Over-Expressing *GPR183* Lentiviral Vector and the Effect on Apoptosis of Cutll1 Cells

Zhang Hang, Shu Yi, Lü Wenqiong, Zhang Jia, Zhang Hongyang, Tang Shi, Zou Lin*

(Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

Abstract To construct the human *GPR183* over-expressing lentiviral vector and investigate the effect of *GPR183* on apoptosis of human T-ALL cell line Cutll1 cells, the human *GPR183* cDNA sequence was amplified by PCR and linked to the lentivirus vector pEZ-Lv201 and the *GPR183*-overexpressing lentivirus plasmid was constructed then lentivirus was packaged by using 293T cells. The Cutll1 cells were infected with lentivirus and the *GPR183* expression level was detected by q-PCR and Western blot. The CCK-8, PI and Annexin V staining were used to study the growth, cell cycle and apoptosis of the Cutll1 cell with (Cutll1-*GPR183*) or without (negative control) *GPR183* overexpression. The plasmid confirmation PCR and sequencing data indicate the human *GPR183*-overexpressing lentivirus plasmid was constructed. The GFP⁺ Cutll1 cells were detected after lentivirus infection. Consistently, the q-PCR and Western blot results showed the expression of *GPR183* was elevated in Cutll1-

收稿时间: 2018-11-08

接受时间: 2019-01-07

国家自然科学基金(批准号: 81570142、81870126)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63622128, E-mail: zoulin74@126.com

Received: November 8, 2018

Accepted: January 7, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81570142, 81870126)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63622128, E-mail: zoulin74@126.com

网络出版时间: 2019-04-01 11:38:19

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1138.012.html>

GPR183 cells ($P<0.01$). The CCK-8 and Annexin V staining data showed the proliferation of Cutl1-*GPR183* was inhibited ($P<0.001$) and the apoptosis of Cutl1-*GPR183* was significant increase ($P<0.01$), while the cell cycle of two groups had no difference. Overall, our results indicated that *GPR183* could inhibit the growth and promote the apoptosis of T-ALL Cutl1 cells and laid the foundation for the follow-up study of mechanisms.

Keywords *GPR183*; T-ALL; apoptosis

急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)在儿童白血病中最为常见,其中急性T淋巴细胞白血病恶性程度高,病情发展快且易复发,其五年无病生存率(event-free survival, EFS)为60%~75%,尽管近年来已有一些发病机制阐释,但难治性急性T淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphocytic leukemia, T-ALL)尚不能完全缓解,且药物反应差^[1],寻找新的发病机制及治疗靶点成为研究者们关注的焦点。G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是人体最大的膜受体家族,在多种生理功能及肿瘤的生长和迁移中起重要作用^[2]。

GPR183(又名*EBI2*)属于GPCR中A类视紫红质家族,在正常造血细胞发育中能抑制Notch1信号从而促进内皮细胞向造血细胞的转换^[3];在慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)中,*GPR183*高表达,驱动B细胞向滤泡外区域迁移、减少生发中心依赖的免疫反应,降低其分泌IgM与IgG的水平,上调*c-MYC*癌基因表达,促进细胞增殖^[4]。但*GPR183*对T-ALL细胞的生物学特性是否具有重要作用还未见报道。因此,本研究通过构建稳定过表达*GPR183*的T-ALL Cutl1细胞模型,为进一步探索*GPR183*对T-ALL细胞生物学特性的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人胚肾细胞系(HEK293T细胞)、人T-ALL细胞系Cutl1细胞均购自中国科学院细胞库;VSV-G表达质粒、PAX2包装质粒为本实验室保存。实验材料包括:人*GPR183*基因cDNA克隆质粒(北京义翘神州科技有限公司),载体质粒PEZ-LV201(GeneCopoeia公司),KOD FX(TOYOBIO公司),*Xmn* I和*Xho* I限制性内切酶、T4 DNA连接酶(NEB公司),DH5 α 感受态细胞(天根生化科技有限公司),DNA transfection reagent(Neofect公司)、聚凝胺(Sigma公司),DMEM培养基、1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,

FBS)(Gibco公司),逆转录试剂盒、SYBR Green II、EX Taq酶(TaKaRa公司),RIPA细胞裂解液及Trizol RNA提取液(百泰克生物技术有限公司),BCA蛋白质定量检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司),兔源单克隆抗体*GPR183*、*GAPDH*(proteintech公司),兔源多克隆抗体MYC(Santa Cruz公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(中杉金桥生物技术有限公司),ECL发光试剂盒(凯基生物技术股份有限公司),CCK-8(东仁化学科技有限公司),PI/RNase Staining Buffer(BD公司),Annexin V-APC/7-AAD双染细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物技术股份有限公司),其他试剂均为国产分析纯。实验仪器包括:美国BD公司FACSCanto流式细胞仪、Bio-Rad公司的凝胶电泳仪、电泳转移仪和凝胶成像仪和OLYMPUS公司荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与*GPR183*基因片段获取 从GenBank资料库中获取*GPR183*的mRNA序列(NM-004951.4),设计扩增引物*GPR183* F: (5'→3')TAA GAA GGA GTT CGA ACC ATG GAT ATA CAA ATG GCA AAC, *GPR183*, R: (5'→3')ATT CTC GAG CTA CTT TCC ATT TGA AGA CTT GGA A,其中,在上游和下游的5'端分别加入了*Xmn* I和*Xho* I酶切位点。以人*GPR183*基因cDNA克隆质粒为模板,配制反应体系如下:0.6 μ L KOD、20 μ L 2 $\times$ 缓冲液、8 μ L dNTPs、上下游引物各0.8 μ L、1.6 μ L模板、2 μ L DMSO、6 μ L ddH₂O,混匀后短暂离心,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min;然后95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s,循环18次,72 $^{\circ}$ C 7 min后置于4 $^{\circ}$ C。

1.2.2 重组慢病毒载体的构建与鉴定 取纯化后的pEZ-Lv201质粒3 μ L, 10 μ L缓冲液、3 μ L *Xmn* I内切酶、84 μ L ddH₂O, 37 $^{\circ}$ C水浴30 min,然后进行乙醇沉淀:水浴后体系内加乙酸铵75 μ L、1 mL无水乙醇、5 μ L糖原后上下颠倒混匀置于-20 $^{\circ}$ C静置10 min, 12 000 r/min离心15 min,弃上清,70%乙醇洗1次后弃去上清开盖室温挥发尽乙醇。*Xho* I内切

表1 q-PCR引物信息
Table 1 Sequences of the q-PCR primers

基因名	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>GPR183</i>	TGG GCT CGT GGG AAA CTT AC	GGT GCA CCA CAG CAA TGA AG
<i>MYC</i>	CGC TGC TAT GGG CAA AGT	CGT CCT GGG AAG GGA GAT
<i>GAPDH</i>	CAG CGA CAC CCA CTC CTC CAC CTT	CAT GAG GTC CAC CAC CCT GTT GCT

酶进行第二次酶切,方法同上,加水溶解得到线性化的pEZ-Lv201载体。连接体系:1 μ L T4 DNA ligase、1.5 μ L T4 DNA 连接酶缓冲液、1 μ L线性化的pEZ-Lv201载体DNA、10 μ L纯化后的*GPR183*基因片段、1.5 μ L ddH₂O,室温连接5 h,将连接产物转化DH5 α ,接种到含有氨苄青霉素的LB固体培养板中37 $^{\circ}$ C孵育过夜,挑取平板中的转化子进行菌落PCR鉴定。引物F: (5'→3')GCG GTA GGC GTG TAC GGT, R: (5'→3')AAT GAC GAC CAA GGC TAG。阳性转化子摇菌扩大化培养,提取质粒后进行PCR鉴定,鉴定正确后送出测序,测序引物F: (5'→3')GCG GTA GGC GTG TAC GGT, R: (5'→3')CTG GAA TAG CTC AGA GGC,成功构建过表达*GPR183*慢病毒载体, pEZ-Lv201质粒作为阴性对照。

1.2.3 *GPR183*重组慢病毒包装及滴度测定 取对数生长期的293T细胞胰酶消化后铺于10 cm细胞培养瓶中,37 $^{\circ}$ C和5% CO₂细胞培养箱培养24 h,待细胞密度为60%~70%时进行共转染实验。转染条件:8 μ g重组过表达及阴性对照质粒、8 μ g PAX2包装质粒、2 μ g vsv-g表达质粒、18 μ L转染试剂Neofect,转染过程严格按照试剂说明书操作。收集36 h、48 h、72 h及96 h含病毒颗粒的上清,4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min离心5 min,0.45 μ m滤器过滤上清液,滤液经浓缩后分装至-80 $^{\circ}$ C保存,通过倍比稀释法感染293T细胞,结合荧光显微镜计算病毒滴度,成功包装*GPR183*重组慢病毒及阴性对照病毒。

1.2.4 过表达*GPR183*的Cut11细胞系的建立 取对数生长期的Cut11细胞,在聚凝胺polybrene(6 μ g/mL)的辅助下感染病毒液,正常条件下培养,每6 h换病毒液,连续感染24 h。72 h后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达,并用流式分选GFP阳性细胞,成功构建过表达Cut11-*GPR183*细胞及阴性对照组细胞。

1.2.5 荧光定量PCR检测*GPR183* mRNA表达水平 Trizol法提取总RNA,按照逆转录试剂盒说明书逆转

录为cDNA,RT-PCR反应体系:10 μ L SYBR Green RT-PCR Master Mix、上下游引物各0.5 μ L(表1)、2 μ L模板、ddH₂O补齐至20 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,每个循环结束检测荧光,以*GAPDH*作为内参,2^{- $\Delta\Delta$ CT}计算基因相对表达量。

1.2.6 Western blot检测*GPR183*蛋白质水平 RIPA裂解液提取细胞蛋白,取1 $\times$ 10⁷细胞加入1 mL RIPA,超声破碎细胞,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心20 min,吸取上清,BCA法检测蛋白浓度,加入5 $\times$ 上样缓冲液混匀后100 $^{\circ}$ C煮沸10 min,取20 μ g蛋白经10% SDS-PAGE电泳, PVDF膜转膜,室温封闭1 h,一抗(*GPR183* 1:600; *MYC* 1:200; *GAPDH* 1:20 000)于4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗膜,二抗1:5 000)室温孵育1 h, ECL发光检测结果。

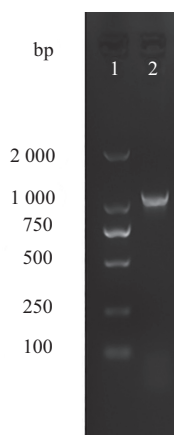
1.2.7 CCK8实验检测细胞生长 将过表达组和对照组细胞以3 000个/孔密度接种到96孔板中,每组做3个副孔,每孔体积200 μ L。分别在培养0、1、2、3天时每孔加入10 μ L CCK8溶液,3 h后以酶标仪检测450 nm处吸光度值。

1.2.8 PI染色检测细胞周期 收集1 $\times$ 10⁶细胞, PBS洗涤细胞沉淀2次,加入70%预冷乙醇4 $^{\circ}$ C固定过夜,离心后PBS重悬细胞,严格按照说明书加入RNase A和PI,室温避光染色30 min后流式检测。

1.2.9 Annexin V检测细胞凋亡 收集5 $\times$ 10⁵细胞,2 000 r/min离心5 min,预冷PBS 2 000 r/min离心5 min洗涤细胞2次,加入500 μ L 结合缓冲液,悬浮细胞,加入5 μ L Annexin V-APC混匀后再加入5 μ L 7-AAD染液,混匀,室温避光反应15 min,1 h内进行流式检测。

1.3 统计学分析

数据分析采用SPSS 13.0软件包进行统计分析,并以均数 $\pm$ 标准差mean $\pm$ S.D.表示,两组数据间比较采用两独立样本的*t*检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。



1: DNA marker 2000; 2: PCR产物(1 080 bp)。

1: DNA marker 2000; 2: PCR product (1 080 bp).

图1 PCR产物电泳图

Fig.1 The result of PCR product



1: DNA marker 2000; 2~11: 1~10号转化子(293 bp)。

1: DNA marker 2000; 2-11: the positive plasmids of No.1-10 (293 bp).

图2 GPR183-pEZ-Lv201重组质粒PCR鉴定

Fig.2 Plasmid of GPR183-pEZ-Lv201 was identified by PCR

2 结果

2.1 PCR扩增 *GPR183* 基因片段与重组质粒 *GPR183-pEZ-Lv201* 的鉴定

模板经上述引物扩增后得到*GPR183*基因序列,经琼脂糖凝胶电泳后得到大小约为1 080 bp的片段,与基因库中的*GPR183*全基因序列大小相符,表明成功获得*GPR183*基因(图1)。挑选10个阳性转化子进行PCR鉴定,其中7个产物经琼脂糖凝胶电泳后在293 bp处有一条明亮单一条带,大小符合预期(图2)。

将PCR鉴定成功的重组质粒测序,结果与设计序列一致。这表明,成功构建GPR183-pEZ-Lv-201重组质粒。

2.2 T-ALL Cut111细胞慢病毒感染效率检测

倍比稀释法检测*GPR183*过表达组与阴性对照组病毒滴度分别为 1.1×10^8 TU/mL、 1.4×10^8 TU/mL。Cut111细胞加入病毒感染,72 h后荧光显微镜下观察,

*GPR183*过表达组及阴性对照组均有GFP表达(图3)。

2.3 Cut111细胞*GPR183*过表达检测

进一步用q-PCR及Western blot检测感染慢病毒后Cut111细胞*GPR183*表达情况,结果显示,过表达组*GPR183* mRNA及蛋白水平较对照组均有明显升高(图4A和图4B),差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 Cut111细胞过表达*GPR183*后凋亡增加

CCK-8结果显示,过表达组细胞生长较对照组明显受到抑制,差异具有统计学意义($P < 0.001$)(图5A)。细胞周期结果显示,两组细胞周期无明显差异($P > 0.05$)(图5B和图5C)。采用流式细胞仪测Annexin V表达检测各组凋亡情况,结果显示,与阴性对照组相比,过表达组凋亡水平有明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$),证实过表达*GPR183*能够诱导Cut111细胞凋亡(图5D和图5E)。

2.5 Cutl1细胞过表达*GPR183*后抑制*MYC*基因表达

我们进一步检测Notch1信号通路靶基因*MYC*表达变化情况^[5], q-PCR及Western blot结果显示, 在Cutl1细胞中过表达*GPR183*后*MYC*基因表达明显受到抑制, 差异具有统计学意义($P<0.01$)(图6A和图6B)。

3 讨论

GPCRs作为人体最大的膜受体家族, 参与生理或病理状态下的多种生命活动过程, 在细胞增殖、凋亡、迁移等多种生物功能中起重要作用^[2], 在不同亚型的白血病发生发展中起着重要作用。在急性粒细胞白血病中, *GPR56*是白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)新型且稳定的标志物, 高表达*GPR56*

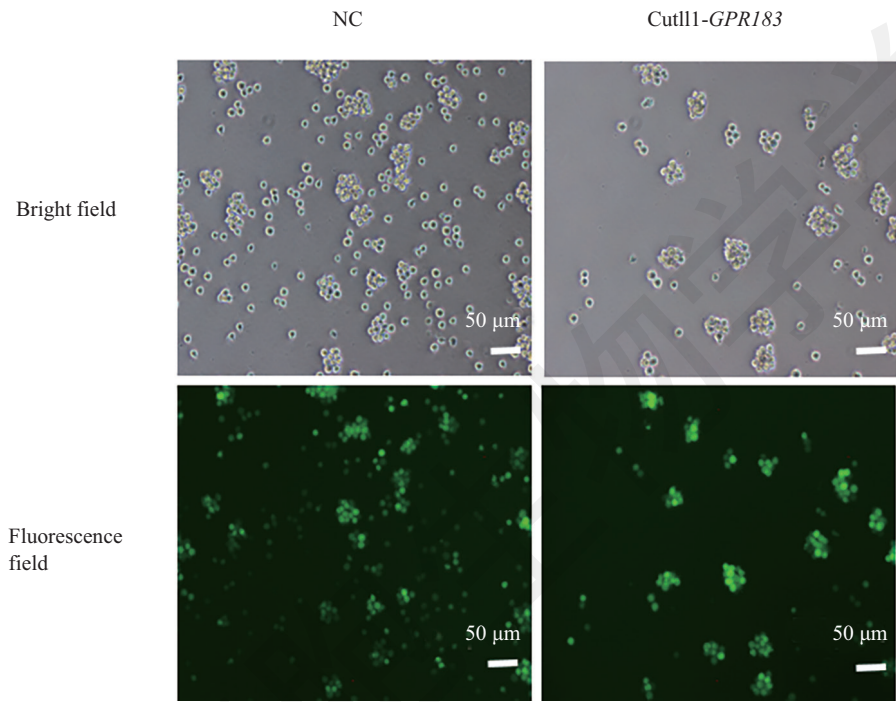
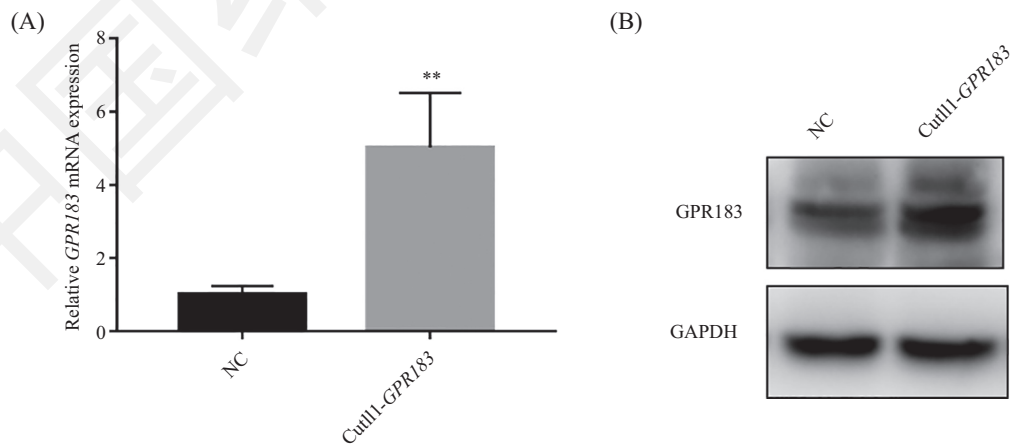
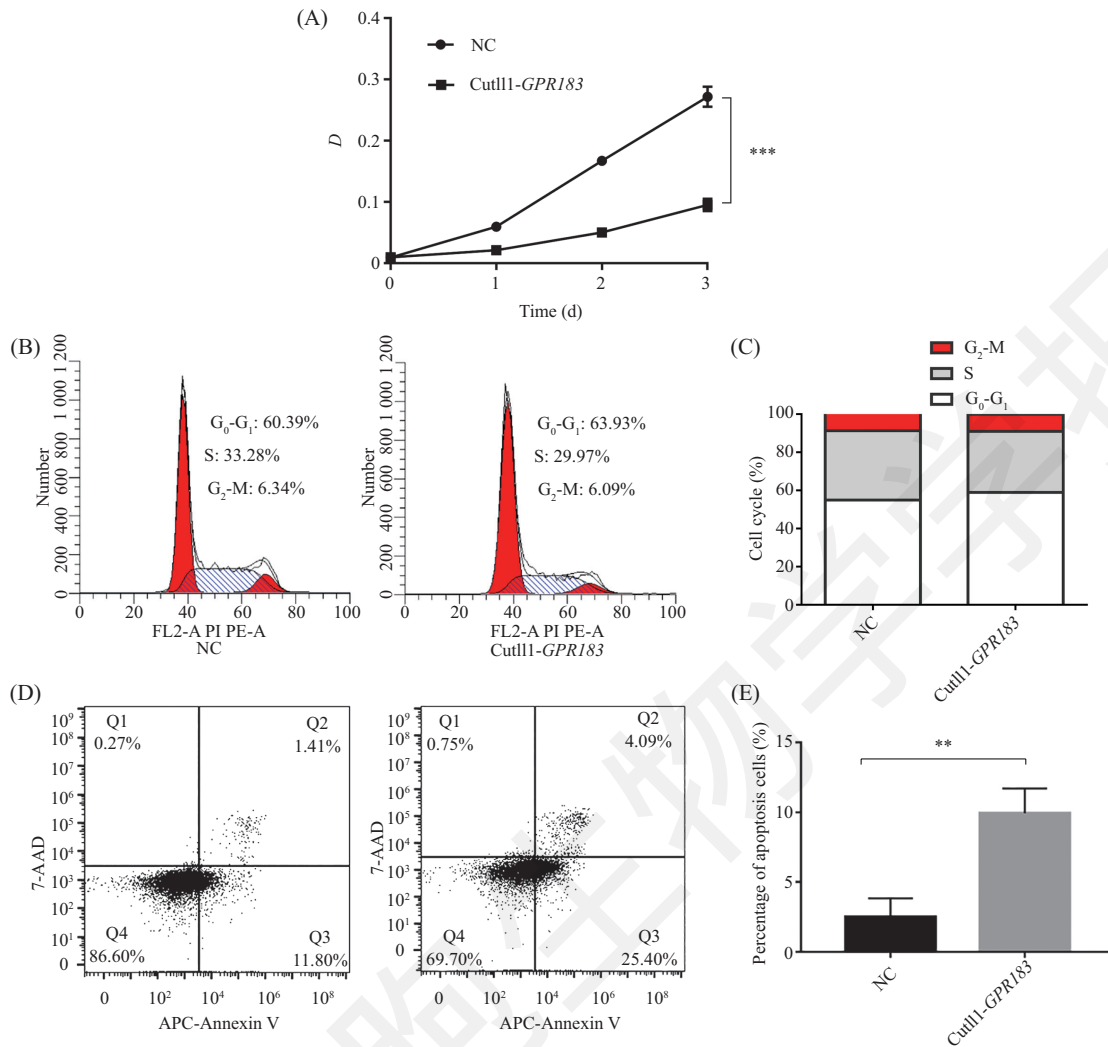


图3 荧光显微镜下Cutl1细胞感染*GPR183*过表达慢病毒
Fig.3 Cutl1 cells were infected by lentivirus overexpression *GPR183* gene



A: q-PCR检测*GPR183* mRNA表达水平, ** $P<0.01$, 与NC组比较; B: Western blot检测*GPR183*蛋白表达水平。
A: the mRNA level of *GPR183* was detected by q-PCR, ** $P<0.01$ vs NC group; B: the protein level was detected by Western blot.

图4 Cutl1细胞中*GPR183* mRNA和蛋白表达水平
Fig.4 The mRNA and protein levels of *GPR183* in Cutl1 cells



A: CCK-8实验结果; B: PI染色检测细胞周期; C: 细胞周期结果统计分析; D: Annexin V检测对照组和过表达组细胞凋亡; E: 凋亡结果统计分析。
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the results of CCK-8 assay; B: cell cycle was detected by PI staining; C: statistical analysis of cell cycle; D: the apoptosis level of NC and Cutl1-GPR183 was detected by Annexin V; E: statistical analysis of apoptosis. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

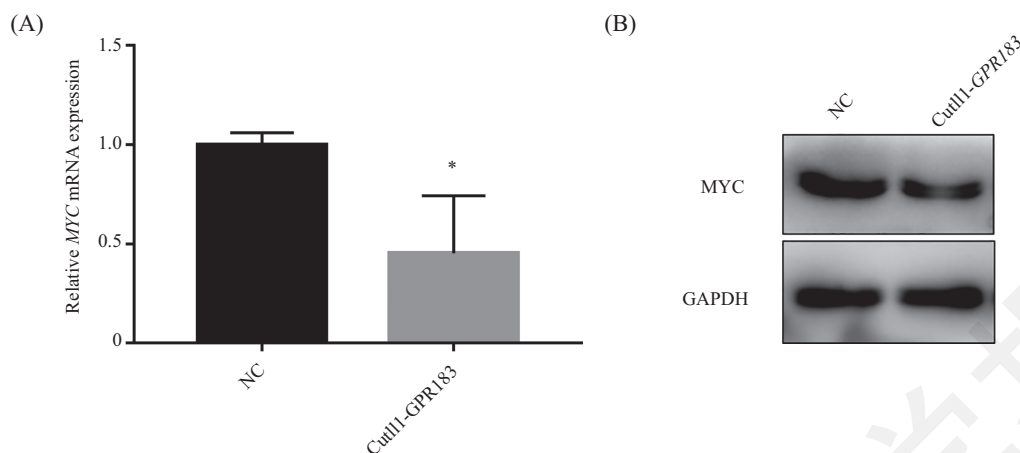
图5 过表达GPR183对Cutl1细胞凋亡的影响

Fig.5 Effect of GPR183 overexpression on the apoptosis of Cutl1 cell

提示AML高危亚型及预后差^[6]; 在NPM1和FLT3突变的AML中, GPR56还可促进HOXA9相关的AML形成^[7]; 而在一些预后差的AML亚型中, EVI1促进GPR56表达, 上调RhoA信号, 抑制细胞凋亡, 其抑制剂可致LSC重构能力降低^[8]。在T-ALL中, CXCR4抑制剂促进细胞凋亡与抑制转移, 可作为T-ALL治疗新靶点^[9]; F类GPCR受体SMO可激活Hedgehog通路, 促进细胞增殖与小鼠体内T-ALL进展^[10]。

慢病毒是逆转录病毒的一种, 是以人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)作为基础而发展的基因转染载体, 能将大片段的外源基因稳定的整合到细胞基因组中并长期表达, 且具有感

染分裂与非分裂细胞的能力, 是目前转染效率最高的转染技术之一^[11-14], 已广泛应用于造血干细胞、原代细胞等的基因传递^[15]。本研究通过构建GPR183过表达慢病毒载体, 包装病毒滴度达 1.1×10^8 TU/mL, 感染Cutl1细胞后荧光显微镜下观察到绿色荧光, 靶基因mRNA水平和蛋白水平较阴性对照组明显升高($P < 0.01$), 成功建立了过表达GPR183的慢病毒载体, 并感染急性T淋巴细胞白血病Cutl1细胞, 流式分选出稳定细胞株。随后分别通过CCK-8实验、PI染色和Annexin V染色检测细胞的生长、周期和凋亡情况, 发现相比阴性对照细胞, 过表达GPR183后细胞生长明显受到抑制($P < 0.001$), 凋亡显著增加($P < 0.01$), 但



A: q-PCR检测MYC mRNA表达水平, $*P < 0.05$, 与NC组比较; B: Western blot检测MYC蛋白表达水平。

A: the mRNA level of MYC was detected by q-PCR, $*P < 0.05$ vs NC group; B: the MYC protein level was detected by Western blot.

图6 过表达*GPR183*抑制Cutl1细胞MYC基因表达

Fig.6 The effect of overexpression *GPR183* on expression of MYC in Cutl1 cells

对细胞周期无明显影响($P > 0.05$), 表明*GPR183*表达增高能抑制T-ALL Cutl1细胞增长, 促进细胞凋亡。

*GPR183*属于GPCRs最大的视紫红质家族, 在正常造血发育过程中, *GPR183*可募集 β -Arrestin1和E3泛素化连接酶Nedd4, 从而促进造血内皮中Notch1降解, 促进内皮细胞转换到造血细胞^[3]而在T-ALL的发生发展中, Notch1扮演着重要角色。在正常造血阶段, 胸腺内缺乏Notch1就不能发育成T细胞, 但Notch1过度激活则会发展为T-ALL^[16-17]。Notch1在65%的T-ALL患者中异常激活, 并调控白血病细胞的增殖和侵袭, 是重要的治疗靶点^[18]。我们随后发现, 在T-ALL Cutl1细胞中过表达*GPR183*能抑制Notch1信号通路基因MYC的表达, 提示*GPR183*可能通过抑制Notch1信号通路从而抑制Cutl1细胞生长促进细胞凋亡。

综上所述, 本研究成功构建了过表达*GPR183*的慢病毒载体, 并建立了过表达*GPR183*的稳定细胞系, 证明过表达*GPR183*后T-ALL Cutl1细胞凋亡增加, 生长受到抑制, 为后续进行*GPR183*调控白血病细胞机制研究与白血病的治疗提供了实验工具和理论基础。

参考文献 (References)

- Linabery AM, Johnson KJ, Ross JA. Childhood cancer incidence trends in association with US folic acid fortification (1986-2008). *Pediatrics* 2012; 129(6): 1125-33.
- Lappano R, Maggolini M. GPCRs and cancer. *Acta Pharmacologica Sinica* 2012; 33(3): 351-62.
- Zhang P, He Q, Chen D, Liu W, Wang L, Zhang C, *et al.* G protein-coupled receptor 183 facilitates endothelial-to-hematopoietic transition via Notch1 inhibition. *Cell Res* 2015; 25(10): 1093.
- Niss AK, Barington L, Benned-Jensen T, Kubale V, Kovalchuk AL, Daugvilaite V, *et al.* EBI2 overexpression in mice leads to B1 B-cell expansion and chronic lymphocytic leukemia-like B-cell malignancies. *Blood* 2017; 129(7): 866-78.
- Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, *et al.* c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 2006; 20(15): 2096-109.
- Pabst C, Bergeron A, Lavallée VP, Yeh J, Gendron P, Norddahl GL, *et al.* GPR56 identifies primary human acute myeloid leukemia cells with high repopulating potential *in vivo*. *Blood* 2016; 127(16): 2018-27.
- Daria D, Kirsten N, Muranyi A, Mulaw M, Ihme S, Kechter A, *et al.* GPR56 contributes to the development of acute myeloid leukemia in mice. *Leukemia* 2016; 30(8): 1734-41.
- Saito Y, Kaneda K, Suekane A, *et al.* Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. *Leukemia* 2013; 27(8): 1637-49.
- Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, *et al.* CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 2015; 27(6): 769-79.
- Dagklis A, Demeyer S, De Bie J, Radaelli E, Pauwels D, Degryse S, *et al.* Hedgehog pathway activation in T-cell acute lymphoblastic leukemia predicts response to SMO and GLI1 inhibitors. *Blood* 2016; 128(23): 2642-54.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 2002; 295(5556): 868-72.
- Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian FM. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. *Cytotechnol* 2014; 66(6): 1031-8.
- Semple-Rowland SL, Berry J. Use of lentiviral vectors to deliver and express bicistronic transgenes in developing chicken em-

- bryos. *Methods* 2014; 66(3): 466-73.
- 14 Benskey MJ, Manfredsson FP. Lentivirus production and purification. *Methods Mol Biol* 2016; 1382: 107-14.
- 15 张怡堃, 王华, 肖凤君, 张晓艳, 刘佩林, 时全星, 等. 过表达 MEG3 慢病毒载体构建及其对骨髓瘤细胞系 XG-7 凋亡的影响. *中国实验血液学杂志* (Zhang Yizhen, Wang Hua, Xiao Fengjun, Zhang Xiaoyan, Liu Peilin, Shi Quanxing, *et al.* Construction of overexpressing MEG3 lentiviral vector and its effect on apoptosis of myeloma cell line XG-7. *Journal of Experimental Hematology*) 2016; 24(6): 1793-800.
- 16 Cortegano I, Melgar-Rojas P, Luna-Zurita L, Siguero-Álvarez M, Marcos MA, Gaspar ML, *et al.* Notch1 regulates progenitor cell proliferation and differentiation during mouse yolk sac hematopoiesis. *Cell Death Differ* 2014; 21(7): 1081-94.
- 17 Gerhardt DM, Pajcini KV, D'altri T, Tu L, Jain R, Xu L, *et al.* The Notch1 transcriptional activation domain is required for development and reveals a novel role for Notch1 signaling in fetal hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 2014; 28(6): 576-93.
- 18 Sanchez-Martin M, Ferrando A. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017; 129(9): 1124-33.