

# 全反式维甲酸诱导经典型霍奇金淋巴瘤 B 细胞表型

杜 静<sup>1</sup>, 官凯凯<sup>1</sup>, 杨丽娟<sup>1</sup>, 陈微微<sup>1</sup>, 罗丽卿<sup>2</sup>

(1. 滨州医学院附属医院, 肿瘤研究中心, 山东 滨州 256600; 2. 滨州医学院附属医院, 血液科, 山东 滨州 256600)

**【摘要】 目的** 探讨全反式维甲酸(ATRA)对经典型霍奇金淋巴瘤 B 细胞表型的诱导作用。**方法** 构建含有 G418 抗性的 B 细胞特异性启动子(CD19, CD79a 和 CD79b)表达载体, 转染霍奇金淋巴瘤细胞并筛选稳定克隆。PCR 扩增启动子和荧光素酶序列验证其稳定整合, 敲除 ABF1 后检测外源 B 细胞启动子活性的改变以验证其功能。检测不同浓度的 ATRA 在不同时间点对外源 B 细胞启动子活性的诱导作用, 通过实时定量 PCR 进一步证实 ATRA 对 B 细胞特异性基因转录水平的影响; 检测 ATRA 与去甲基化药物 5-Aza 联合处理对 B 细胞标记物表达的影响; 通过流式细胞染色技术检测 ATRA 对霍奇金淋巴瘤细胞表面标记物 CD30 表达的影响。**结果** ATRA 能够诱导经典型霍奇金淋巴瘤 B 细胞特异性标记物 CD19、CD20、CD79a 和 CD79b 的表达, 与 5-Aza 具有协同诱导作用, 并下调细胞表面霍奇金特异性抗原 CD30 的表达。**结论** ATRA 能够诱导 B 细胞表型缺失的经典型霍奇金淋巴瘤向 B 细胞型淋巴瘤转化。

**【关键词】** 霍奇金淋巴瘤; ATRA; B 细胞表型; CD19; 5-Aza

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0046-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2018. 02. 008

## Restoration of the lost B-cell phenotype in classical Hodgkin lymphoma cells by all trans-retinoic acid treatment

DU Jing<sup>1</sup>, GONG Kaikai<sup>1</sup>, YANG Lijuan<sup>1</sup>, CHEN Weiwei<sup>1</sup>, LUO Liqing<sup>2</sup>

(1. Cancer Research Institute; 2. Department of Hematology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the induction of B-cell specific phenotype in classical Hodgkin lymphoma (cHL) upon all-trans retinoic acid (ATRA) incubation. **Methods** To construct B-cell specific promoter (CD19, CD79a, CD79b) driven reporter plasmid with NEO cassette to realize stable transfection and selection of cHL reporter cells. To verify the intact integration by amplification of the promoter and luciferase sequences, and to functionally validate the B-cell specific promoter by ABF1 interference and luciferase assay. Reporter cells were incubated with various doses of ATRA and luciferase activity was detected at 24, 48 and 72 hours. Reporter cells were treated alone or in combination with 5-Aza and ATRA followed by luciferase assay. Endogenous B-cell specific genes (CD19, CD20, CD79a and CD79b) transcription and expression levels were detected by real-time PCR and immunoblot, respectively. The expression level of CD30 antigen on Hodgkin lymphoma cell membrane upon ATRA was assessed by flow cytometry. **Results** ATRA treatment stimulated B-cell specific signature in cHL cells including CD19, CD79a and CD79b while down-regulated their CD30 expression. **Conclusions** ATRA induces B-cell phenotype deficient cHL cells to regain their B-cell transcriptional program while abolishes their Hodgkin-specific machinery.

**【Key words】** classical Hodgkin lymphoma; all-trans retinoic acid, ATRA; B-cell phenotype; CD19; 5-Aza

经典型霍奇金淋巴瘤 (classical Hodgkin Lymphoma, cHL) 以无痛性、进行性淋巴结肿大为主要临床表现,病理诊断可见特征性的 HRS (Hodgkin's and Reed-Sternberg cells) 瘤细胞<sup>[1]</sup>。尽管目前约 85% 的病人预后较好,仍有部分病人因原发或继发耐药死亡<sup>[2]</sup>。虽然 cHL 细胞具有 B 细胞特征性的免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 基因重排且起源于 B 细胞,却缺失了 B 细胞特异性标记物如 CD19, CD20 等基因的转录和表达<sup>[3-4]</sup>,同时细胞表面异常高表达 B 细胞非特异性抗原如 CD30<sup>[5]</sup>。B 细胞表型的缺失是造成霍奇金淋巴瘤细胞逃避免疫监视和恶性转化的关键因素<sup>[6-7]</sup>,因此诱导霍奇金淋巴瘤 B 细胞表型转化将有助于临床治疗。

全反式维甲酸 (all trans-retinoic acid, ATRA) 是维生素 A 的代谢产物,具有诱导细胞分化的作用,临床上用于急性早幼粒白血病的治疗。有研究证明,ATRA 能够在体内外诱导淋巴母细胞向 B 细胞分化<sup>[8]</sup>。本研究构建荧光素酶标记的 B 细胞特异性启动子 cHL 报告细胞,检测 ATRA 对 B 细胞外源启动子活性及相关基因表达的诱导作用,通过与去甲基化药物 5-Aza 联合用药,进一步探讨 ATRA 重新激活 cHL 细胞 B 细胞表型的潜在作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞及主要试剂

霍奇金淋巴瘤细胞系 (KMH2、L1236 和 L428) 为本实验室冻存。携带 CD19 启动子载体由 Kupperschmitt 教授惠赠,携带 CD79a (mb1)、CD79b (B29) 和 ICSBP 的质粒由 Sigvardsson 教授惠赠<sup>[9-11]</sup>。

5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza)、ATRA 和钙黄绿素 (Calcein AM, CAM) 购自 Sigma 公司;Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase 和 ONE-Glo<sup>™</sup> Luciferase 检测试剂盒购自 Promega;胎牛血清、1640 培养基、胰酶购自美国 Gibco 公司;质粒构建所需内切酶和连接酶购自 NEB 公司;RNA 提取及逆转录试剂购于 Invitrogen;长片段基因扩增所用 Dream Taq Green 酶购自 Fermentas;质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;蛋白免疫印迹所用抗体购自 Acris Antibodies;流式细胞染色所需 CD30 抗体购自 BD 生物有限公司。流式细胞仪购自 BD 生物有限公司;电转仪及相关缓冲试剂购自 Lonza。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养及用药

人的 cHL 细胞系悬浮培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 1640 培养基,在含有 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 37℃ 常规培养,根据细胞状态每 2~3 d 传代。以 DMSO 处理样本为阴性对照,常规 ATRA 和 5-Aza 用药浓度为 10 μmol/L (除非特殊标注)。

#### 1.2.2 质粒构建

通过 XhoI/Sal I 双酶切 PL452 质粒并电泳胶回收得到 2038 bp PGK-NEO 片段,将插入片段与 Sal I 单酶切的 B 细胞启动子 pGL3 荧光素酶报告载体连接,DH5α 转化后挑单克隆并小提,通过 Sal I/Bgl II 双酶切鉴定阳性克隆。

#### 1.2.3 细胞转染及稳定克隆筛选

提取质粒并去除内毒素,收集细胞,根据 Nucleofector 电转仪说明选择相应的缓冲液和转染程序进行细胞转染。KMH2 和 L1236 细胞采用 T 缓冲液和 T-001 程序转染,L428 细胞采用 L 缓冲液和 X-001 程序进行转染。

#### 1.2.4 稳定转染细胞筛选

瞬时转染 48 h 后离心换液,以转染 eGFP 的相应细胞为平行对照进行 G418 筛选,药物浓度在 KMH2、L1236 和 L428 细胞分别为 200、400 和 400 μg/mL,筛选 2 周后对照细胞全部死亡,改为 G418 半量维持培养。

#### 1.2.5 稳定转染细胞的目的片段整合鉴定

提取筛选后 cHL 细胞基因组并进行 PCR,所用引物序列如下:pGL3 For:5'-GGAAGACGCCAAAA ACATAAAG-3',pGL3 Rev:5'-CATCGGTCGACGGA TCCTTATC-3'

#### 1.2.6 shRNA 干扰实验

采用 pSUPER-puro 系统 (Invitrogen) 进行 ABF1 瞬时和稳定敲除,所需引物如下:ABF1 301 For:5'-GATCCCCGCCGCAGAGTCAAGCAGTTTCAAGAGA ACTGCTTGCACTCTGCGGCTTTTTGGAAA,ABF1 301 Rev:3'-GGGCGGCGTCTCACGTTTCGTCAAAGTTCTC TTGACGAACGTGAGACGCCGAAAAACCTTTTTCGA;所用对照无义序列如下:Scramble For:5'-GATCCCCCGTACGCGGAATACTTCGATTCAAGAGA TCGAAGTATTCCGCGTACGTTTTTGGAAA,Scramble Rev:3'-GGGGCATGCGCCTTATGAA GCTAAGTTCT CTAGCTTCATAAGGCGCATGCAAAAACCTTTTTCGA

### 1.2.7 荧光素酶活性检测

在 96 孔板每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液和 10  $\mu\text{mol/L}$  钙黄绿素 CAM, 室温避光孵育 10 min 后检测荧光强度。同时,另取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入 100  $\mu\text{L}$  One-Glo reagent, 室温避光孵育 15 min, 细胞充分裂解后于 560 nm 检测化学发光信号强度。

### 1.2.8 免疫印迹

提取细胞总蛋白并通过 Bradford 法测量浓度, 加入上样缓冲液后于 95 $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白并转到 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的 PVDF 膜上, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, 辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h 后通过 ECL 法显色。

### 1.2.9 实时荧光定量 PCR

使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA 并通过 Superscript II Reverse 逆转录酶合成互补 cDNA。以琥珀酸脱氢酶复合物亚单位 A (SDHA) 做内参, 使用 TaqMan 进行实时荧光定量 PCR 检测目的基因表达水平。所有反应均设三个复孔, 基因的相对表达量比较采用  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法。

### 1.2.10 流式细胞技术

取  $5 \times 10^5$  细胞于 1200 r/min 离心 5 min, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 抗体 1:2 稀释后避光孵育 30 min, PBS 洗涤后用含有 1% FBS 的 PBS 悬浮细胞, 采用 FL-1 通道上机检测 FITC 标记的抗体, 以同型 IgG 抗体做阴性对照。采用 Flowjo 软件分析结果。

## 1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5 软件对结果进行统计分析, 实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析 ANOVA, 以  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 携带 G418 抗性的 B 细胞特异性启动子报告载体的构建

对 PL452 质粒进行 XhoI/Sal I 双酶切得到将 PGK-NEO 片段, 插入由 Sal I 单酶切线性化的 B 细胞启动子 pGL3 载体内, 构建可用于 G418 稳定筛选的 CD19/CD79a/CD79b/ICSBP -pGL3-PGK-NEO 质粒 (见图 1 A)。通过 Sal I/Bgl II 双酶切鉴定阳性克隆, CD19-pGL3-PGK-NEO 正确克隆琼脂糖电泳应显示 2 kb 和 7 kb 片段, CD79a/CD79b/ICSBP-pGL3-PGK-NEO 质粒正确克隆显示 2 kb 和 5 kb 片段, Afe I 单酶切后分别产生 9 kb 和 7 kb 片段。

### 2.2 稳定转染克隆的筛选及其 B 细胞特异性启动子的基因扩增和功能鉴定

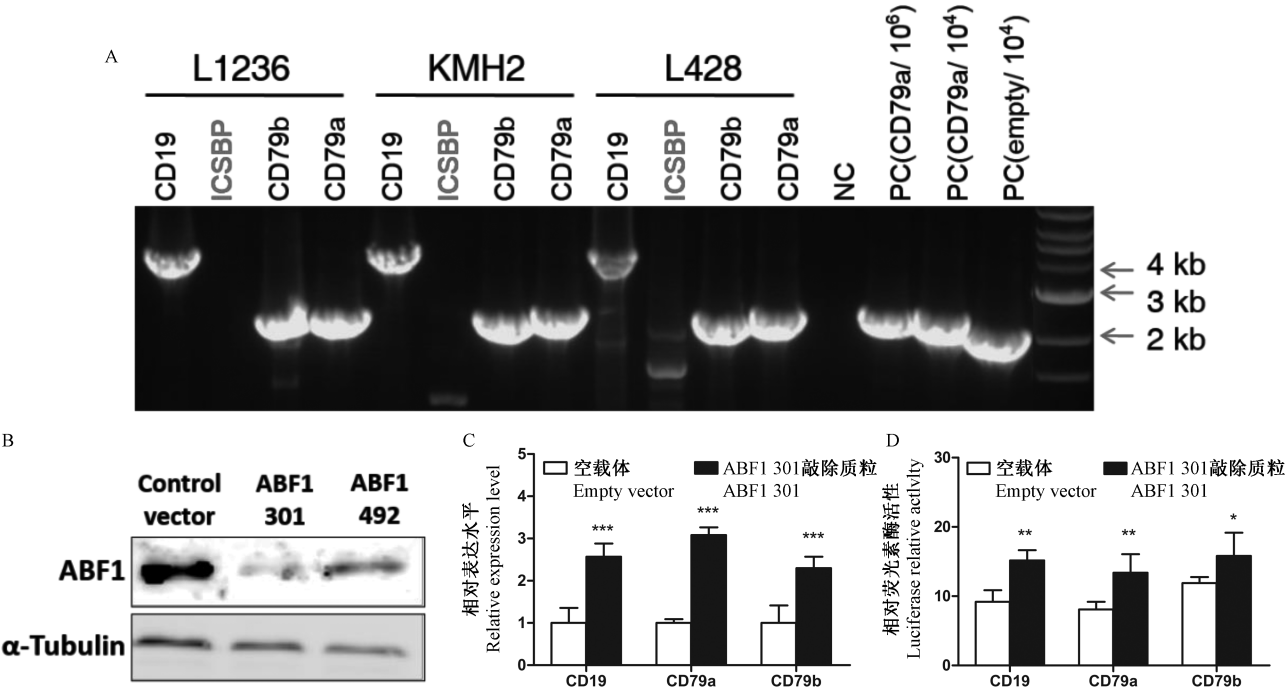
采用 Lonza 核电转染系统, 以 eGFP 为阳性对照摸索出针对不同细胞系的最佳转染条件 (程序和缓冲液等详见方法部分)。经 G418 筛选稳定转染细胞后提取基因组, 扩增外源启动子和荧光素酶片段以鉴定其整合, CD79a/CD79b/ICSBP-Luc 序列扩增后应为 2.2 kb, CD19-Luc 序列扩增后应为 4 kb, 以  $10^4$  倍稀释后的 CD79a-pGL3 质粒和 pGL3 空载体为阳性对照, 以未转染细胞基因组为阴性对照可见, CD79a/CD79b/CD19-Luc 序列稳定整合到 KMH2, L1236 和 L428 细胞中 (见图 1 A)。据报道, 活化的 B 细胞因子 1 (Activated B-cell Factor, ABF1) 在 cHL 细胞内异常高表达且与早期 B 细胞发育分化的关键转录因子 E2A 结合并抑制其功能<sup>[12]</sup>。为进一步检验整合后的启动子是否具有功能, 我们通过 RNA 干扰技术敲除 ABF1 表达, 并在瞬时和稳定敲除 ABF1 的 L428 荧光素酶报道细胞中检测其对 B 细胞特异性启动子活性的影响。结果证实, ABF1 表达沉默能够显著增加 CD19、CD79a 和 CD79b 启动子的转录活性 (见图 1 B-D)。

### 2.3 ATRA 激活 cHL 细胞中外源 B 细胞特异性启动子的转录活性

我们首先采用 1 和 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 孵育 CD19-Luc 整合的 L428 细胞后, 分别在 24、48 h 和 72 h 检测荧光素酶强度, 以钙黄绿素 (calcein AM, CAM) 对活细胞进行荧光标记以排除细胞死亡造成的假阴性。结果显示, 10  $\mu\text{M}$  ATRA 在 48 h 对细胞 CD19 启动子具有最大诱导活性 (见图 2 A)。

以往研究证实, CD19 和免疫球蛋白重链基因的启动子区域在霍奇金淋巴瘤细胞内存在甲基化<sup>[13-14]</sup>, 因此我们进一步采用 5-Aza 和 ATRA 单独和/或联合孵育报告细胞后进行荧光素酶活性检测, 发现两种药物能够在 3 种 cHL 细胞系中激活 CD19 启动子活性, 且二者联合用药时具有协同效应 (见图 2 C)。此外, 在 KMH2 和 L428 细胞中 ATRA 能够显著诱导 CD79a 和 CD79b 启动子活性, 尽管 5-Aza 单独作用时对 CD79a 无显著作用且对 CD79b 作用轻微, 但是能够增加 ATRA 对两个 B 细胞基因的诱导作用 (见图 2 D 和 E)。

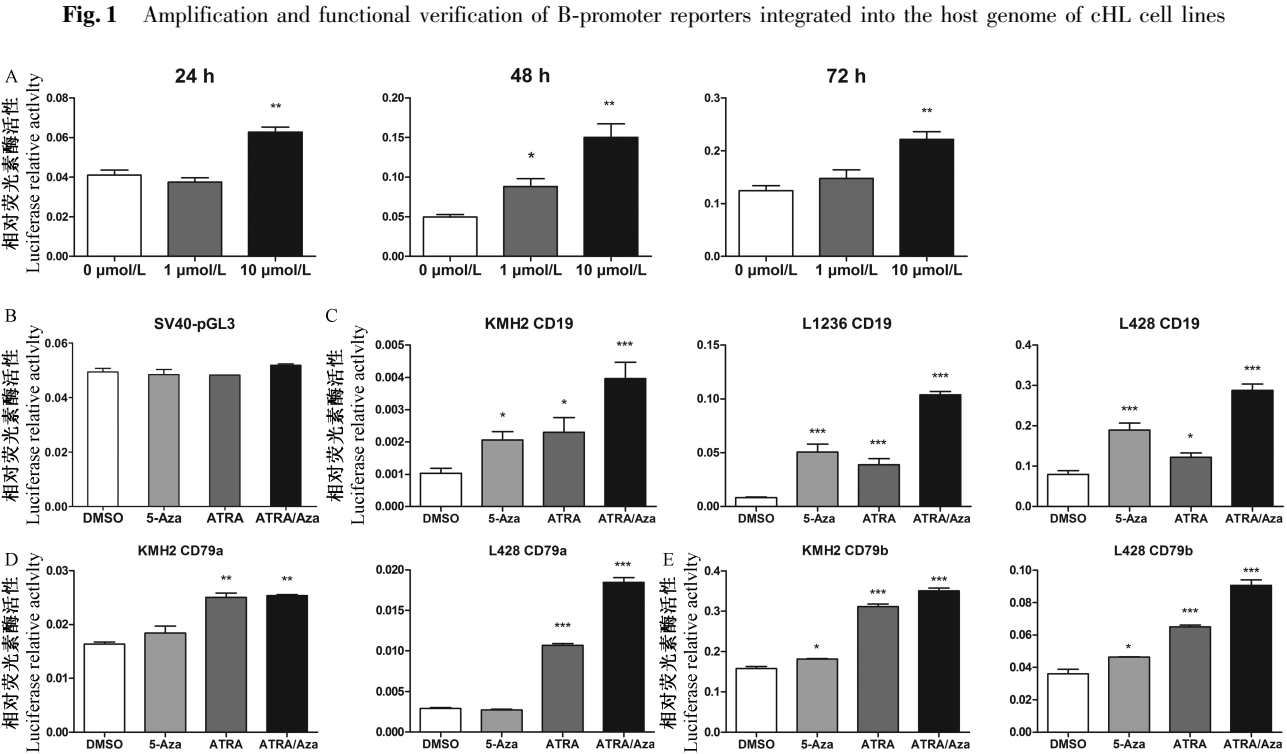
由于许多化合物可与荧光素酶本身结合并影响其活性, 为排除 5-Aza 和 ATRA 直接作用于荧光素酶而非 B 细胞启动子, 我们以 SV40-pGL3-PGK-



注:与空载体组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

**图 1** 稳定转染克隆 B 细胞启动子的基因扩增和功能鉴定

Note. Compared with the empty vector group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

**图 2** ATRA 和 5-Aza 单独和联合用药时对 CD19、CD79a 和 CD79b 外源启动子活性的影响

Note. Compared with the DMSO treated group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

**Fig. 2** Effect of single or double treatment of ATRA and 5-Aza on the activity of B-specific promoters

NEO 稳定转染细胞为对照,以同样条件加入 5-Aza 和/或 ATRA 孵育发现两种药物对 SV40 启动子无作用(见图 2B),证实 5-Aza 和 ATRA 可以特异性诱导 B 细胞启动子的转录活性。

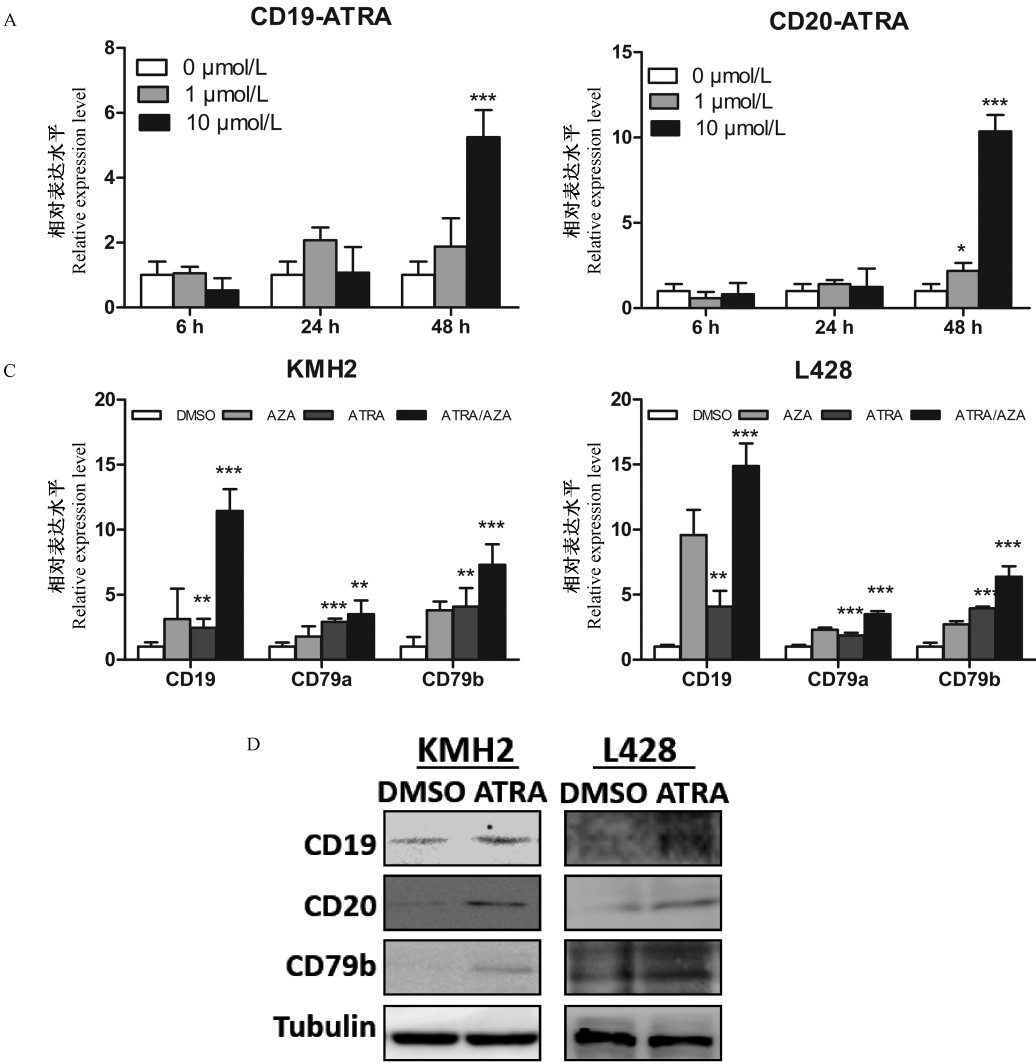
2.4 ATRA 激活 cHL 细胞中内源 B 细胞特异性基因转录和表达

采用 1 和 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 孵育 L428 细胞,在 6、24 和 48 h 提取 RNA 并反转录,通过 RQ-PCR 检测 CD19 和 CD20 基因转录水平的改变。如图 3 A 和 B 所示,ATRA 呈剂量和时间依赖性的诱导 L428 细胞内源 CD19 和 CD20 基因转录。用 5-Aza(图中简称为 AZA)和/或 ATRA 孵育 KMH2 和 L428 细胞

48 h 后,检测内源 B 细胞特异性标记物 CD19、CD79a 和 CD79b 转录水平发现,5-Aza 和 ATRA 单独用药时能够诱导内源 cHL 细胞中 CD19、CD79a 和 CD79b 转录,且二者具有协同效应(见图 3C)。用 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 孵育 KMH2 和 L428 细胞后提取蛋白进行免疫印迹,结果显示 ATRA 能够诱导 CD19、CD20 和 CD79b 基因在 KMH2 和 L428 细胞重新表达(见图 3D)。

2.5 ATRA 下调 cHL 细胞表面特异性 CD30 抗原表达水平

为揭示 ATRA 对 cHL 细胞霍奇金特异性细胞表型的影响,我们进一步检测了 ATRA 处理对



注:(C)图中图例 DMSO、AZA、ATRA 和 ATRA/AZA 分别代表细胞进行 DMSO(对照)、5-Aza、ATRA 和联合用药。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 3 5-Aza 和 ATRA 单独和联合用药时对 CD19、CD79a 和 CD79b 内源基因表达水平的影响  
Note. Legends in (C) represent cell treated with DMSO, 5-Aza, ATRA and combination of ATRA and 5-AZA. Compared with the DMSO treated group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Fig. 3 Effect of single or double treatment of ATRA and 5-Aza on the expression of B-specific promoters

KMH2 和 L428 细胞表面 CD30 抗原表达水平的作用。流式细胞染色显示,与 DMSO 处理的对照细胞相比较,ATRA 下调 KMh2 和 L428 细胞表面 cHL 特异性标记物 CD30 表达水平(见图 4)。以上结果均提示 ATRA 能够诱导 B 细胞表型缺失的 cHL 细胞重新或得 B 细胞表型。

### 3 讨论

cHL 约占 B 细胞淋巴瘤发病率的 10%,瘤细胞携带 B 细胞特征性的免疫球蛋白重链 IgH 基因重组,却不具有 B 细胞特异性基因表达谱,包括 CD19、CD20、B 细胞表面受体复合物 CD79a 和 CD79b 等<sup>[15-16]</sup>,同时异常高表达 B 细胞非特异性基因如 CD30、NOTCH1、ABF1 和 ID2 等<sup>[12, 17-18]</sup>。瘤细胞表型的转变对其恶性转化及免疫逃逸有重要作用,因此寻找霍奇金淋巴瘤 B 细胞表型的诱导剂具有潜在的临床治疗价值。

表观遗传修饰如启动子甲基化是肿瘤发生和表型转变的重要因素<sup>[14, 19-20]</sup>。以往研究发现,cHL 原代 HRS 细胞和商品化的细胞系中 CD19 和 CD79b 基因启动子区域及组蛋白 H3 存在甲基化<sup>[13-14]</sup>,提示 B 细胞表型缺失与 B 细胞特异性基因的异常甲基化修饰有关。然而,Hummel<sup>[21]</sup>和我们以往研究表明,去甲基化药物 5-Aza 处理 cHL 细胞并未显著诱导其 B 细胞特异性基因的表达<sup>[22]</sup>,提示尚有其它因素阻遏 cHL 细胞内 B 细胞基因的转录和翻译。

以 CD19 为标记,Chen 等<sup>[8]</sup>发现 ATRA 能够诱导小鼠和人的淋巴母细胞向 B 细胞分化。为进一

步探索 ATRA 对 B 细胞表型缺失的霍奇金淋巴瘤重新向 B 细胞分化的诱导作用,本研究首先建立了 B 细胞特异性启动子(CD19、CD79a 和 CD79b)驱动荧光素酶稳定整合的 cHL 报告细胞系。其中 CD19 启动子包含了 B 细胞特异性增强子 E $\mu$ 、B 细胞特异性转录因子 PAX5 和 EBF 的结合位点和甲基化修饰位点<sup>[9]</sup>,其稳定整合能够更好的模拟和反映内源 CD19 启动子活性状态。同时,为验证外源启动子功能的完整性,我们敲除了在 cHL 中异常高表达的转录因子 ABF1,发现 ABF1 沉默可以显著提高 CD19、CD79a 和 CD79b 启动子驱动的荧光素酶活性,证明外源启动子能够忠实的反应相应内源基因启动子的转录活性。

以 B 细胞启动子报告细胞和亲本 cHL 细胞为模型,我们发现 ATRA 能够诱导 CD19、CD20、CD79a 和 CD79b 的转录与表达,同时降低细胞表面霍奇金细胞特异性 CD30 抗原表达水平,提示 ATRA 能够激活 cHL 内 B 细胞特异性转录程序并诱导其重新向 B 细胞转化。去甲基化药物 5-Aza 联合应用能够进一步提高 B 细胞特异性基因的表达水平。临床上,抗 CD20 的单克隆抗体治疗在具有 B 细胞表型的非霍奇金淋巴瘤病人上取得了显著疗效,此外有大量靶向 CD19 的抗体在淋巴瘤治疗的相关研究<sup>[23-25]</sup>。由于表型缺失,CD20 单抗在 cHL 病人治疗中的疗效受到了限制,ATRA 对 cHL 细胞中 CD19 和 CD20 表达的诱导或可促进单克隆抗体对复发或耐药 cHL 病例中的应用。

综上所述,我们建立了稳定整合 B 细胞特异性

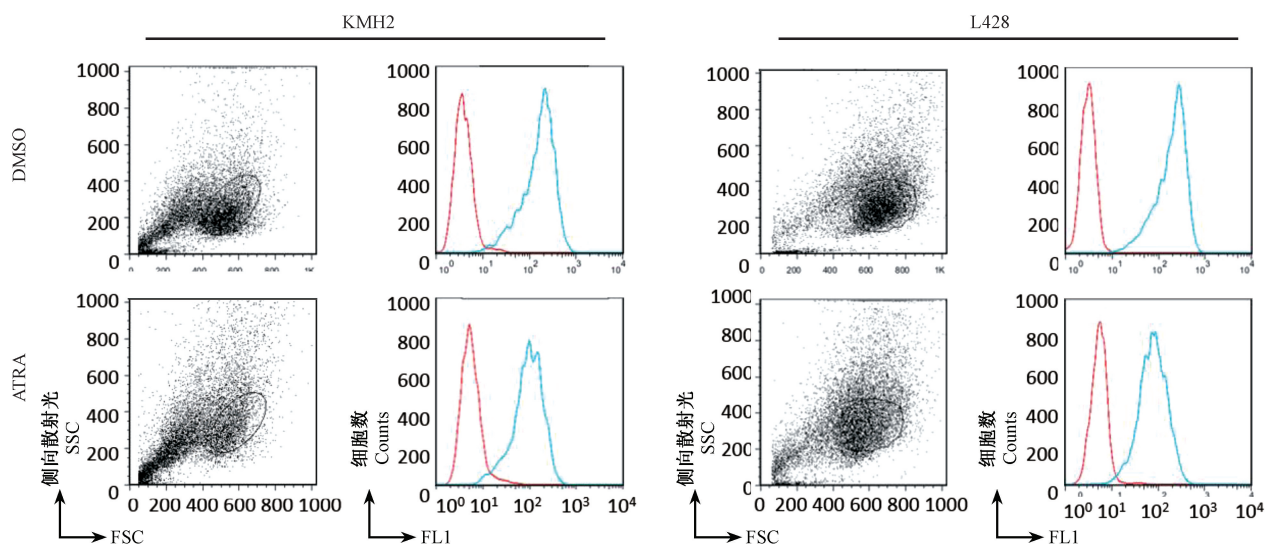


图 4 ATRA 对 cHL 细胞霍奇金细胞特异性标记物 CD30 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of ATRA on Hodgkin lymphoma cells regarding Hodgkin-cell specific gene CD30 expression

启动子驱动荧光素酶的 cHL 细胞系,该报告细胞可用于后续 B 细胞表型诱导药物的筛选。本研究发现 ATRA 能有诱导去分化的 cHL 细胞重获 B 细胞表型,具有增敏 cHL 对靶向 B 细胞表型单抗治疗的潜在作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, et al. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(8): 1853–1861.
- [ 2 ] Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults [J]. *Lancet*, 2012, 380(9844): 836–847.
- [ 3 ] Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease; Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(23): 10962–10966.
- [ 4 ] Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription [J]. *Blood*, 2000, 95(4): 1443–1450.
- [ 5 ] Slovak ML, Bedell V, Hsu YH, et al. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory Hodgkin lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(10): 3443–3454.
- [ 6 ] 刘晓健, 龙志国, 乔忠杰. 经典型霍奇金淋巴瘤表观遗传学异常及其对免疫逃逸的影响 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2017, 31(1): 73–77.
- [ 7 ] Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: Increasing evidence of the importance of the microenvironment [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(14): 1812–1826.
- [ 8 ] Chen X, Esplin BL, Garrett KP, et al. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation [J]. *J Immunol*, 2008, 180(1): 138–145.
- [ 9 ] Sirven A, Ravet E, Charneau P, et al. Enhanced transgene expression in cord blood cd34(+) -derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors [J]. *Mol Ther*, 2001, 3(4): 438–448.
- [ 10 ] Sigvardsson M, Clark DR, Fitzsimmons D, et al. Early B-cell factor, e2a, and pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(24): 8539–8551.
- [ 11 ] Akerblad P, Rosberg M, Leanderson T, et al. The b29 (immunoglobulin beta-chain) gene is a genetic target for early B-cell factor [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(1): 392–401.
- [ 12 ] Mathas S, Janz M, Hummel F, et al. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(2): 207–215.
- [ 13 ] Ushmorov A, Leithäuser F, Sakk O, et al. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2006, 107(6): 2493–2500.
- [ 14 ] Ushmorov A, Ritz O, Hummel M, et al. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression [J]. *Blood*, 2004, 104(10): 3326–3334.
- [ 15 ] Mathas S. The pathogenesis of classical Hodgkin's lymphoma: A model for B-cell plasticity [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007, 21(5): 787–804.
- [ 16 ] 李银珍, 王芳, 邵琼, 等. Igh 基因单克隆重排检测及其在 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(11): 1994–1998.
- [ 17 ] Jundt F, Acikgöz O, Kwon SH, et al. Aberrant expression of notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma [J]. *Leukemia*, 2008, 22(8): 1587–1594.
- [ 18 ] Renné C1, Martin-Subero JI, Eickernjäger M, et al. Aberrant expression of Id2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(2): 655–664.
- [ 19 ] Losman JA. Cancer therapy: The leukaemia epigenome targeted [J]. *Nature*, 2017, 543(7647): 634–635.
- [ 20 ] 张玲, 盛树力, 秦川. 表观遗传学药物的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(3): 297–303.
- [ 21 ] Ehlers A, Oker E, Bentink S, et al. Histone acetylation and DNA demethylation of B cells result in a Hodgkin-like phenotype [J]. *Leukemia*, 2008, 22(4): 835–841.
- [ 22 ] Du J, Neuenschwander M, Yu Y, et al. Pharmacological restoration and therapeutic targeting of the B-cell phenotype in classical Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2017, 129(1): 71–81.
- [ 23 ] Viardot A, Goebeler ME, Hess G, et al. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (bite) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2016, 127(11): 1410–1416.
- [ 24 ] Pérez-Callejo D, González-Rincón J, Sánchez A, et al. Action and resistance of monoclonal CD20 antibodies therapy in B-cell Non-Hodgkin lymphomas [J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(8): 680–689.
- [ 25 ] Bander NH, Czuczman MS, Younes A. Antibody-drug conjugate technology development for hematologic disorders [J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2012, 10(8 Suppl 10): 1–16.

[收稿日期] 2017–09–20