

# 利用ES细胞建立可诱导的白血病模型

刘 灵<sup>1</sup> 刘延风<sup>1</sup> 程 辉<sup>1</sup> 金 晖<sup>1</sup> 张权娥<sup>1</sup> 王征宇<sup>1</sup> 袁卫平<sup>1</sup>  
高绍荣<sup>2</sup> 许 静<sup>1</sup> 程 涛<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国医学科学院, 北京协和医学院, 血液学研究所血液病医院, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020;  
<sup>2</sup>北京生命科学研究所, 北京 102206)

**摘要** 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是从囊胚的内细胞团分离出来的多潜能干细胞, 具有多向分化的能力。将外源基因导入ES细胞建立转基因动物, 对于研究外源基因的功能和调控具有一定的价值。载有外源性基因的病毒在感染ES细胞后, 可通过囊胚注射获得具有胚系遗传的该转基因动物, 并且这一外源基因可以稳定遗传和表达。该研究主要是利用携带*hPML-RAR $\alpha$* 基因的慢病毒感染小鼠ES细胞系(R1), 获得携带该基因的ES细胞, 感染后的ES细胞核型正常。在此基础上, 将感染后的ES细胞经囊胚注射, 获得了携带有*hPML-RAR $\alpha$* 基因的3只嵌合小鼠, 其中, 有1只具有遗传特性。对嵌合体小鼠与C57杂交的后代给予强力霉素(doxycycline)处理, 3天以后骨髓细胞*hPML-RAR $\alpha$* 基因开始表达, 这证明了在小鼠体内该外源基因表达的可诱导性。以上证实, 已经成功利用ES细胞建立了可诱导的白血病转基因小鼠模型。

**关键词** 胚胎干细胞; *PML-RAR $\alpha$* 基因; 强力霉素诱导; 嵌合体

白血病是一种骨髓和血液的恶性疾病, 以不可控制的血液细胞积累为特性。白血病类型主要有4种: 急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、急性淋系白血病(acute lymphatic leukemia, ALL)、慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)和慢性淋系白血病(chronic lymphatic leukemia, CLL)。但是, 对于白血病致病因素的分子机制目前仍未完全了解。

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓系白血病(AML)的一种亚型, 发病率约占急性髓系白血病的10%。约60%~70%的APL患者携带典型的t(15;17)染色体易位, 并形成早幼粒细胞白血病/维甲酸受体融合基因, 即*PML-RAR $\alpha$* 融合基因<sup>[1-2]</sup>。*PML-RAR $\alpha$* 融合蛋白影响了*RAR $\alpha$* 的功能, 通过阻碍粒细胞的正常分化而使得粒细胞异常增多。尽管染色体易位对*RAR $\alpha$* 的影响被认为是起始因素, 但是白血病的发生仍需要其它的诱导因素。

维甲酸(RA)信号通路被核受体的两个家族控制, 维甲酸受体(RAR)和维甲酸X受体(RXR)。二者形成异二聚体, 其配体为RA。当RA缺乏时, *RAR $\alpha$* /*RXR*异二聚体与共抑制物COR结合, 核小体组蛋白去乙酰化而保持染色体的致密卷曲结构来抑制转录, 使中性粒细胞的分化阻滞在早幼粒阶段; 当

与RA结合后, 共激活物CoA取代COR并激活转录。APL患者体内融合蛋白能干扰*RAR $\alpha$* /*RXR*信号传导, 还可以与SMRT、N-CoR等转录抑制因子结合, 并与野生型*PML*、*PLZF*及*RAR $\alpha$* 识别相同的靶DNA序列。高水平的*PML-RAR $\alpha$* 融合基因可“扣押”*PML*, 从而改变*PML*正常核定位, 使其丧失抑制细胞生长和诱导凋亡的功能。

RA在具有*rara*基因(*rara*<sup>+/+</sup>)的小鼠中具有促进粒系分化的功能, 但在粒系祖细胞中*RAR $\alpha$* 的表达阻碍了粒系的分化<sup>[3]</sup>。在完全缺失*rara*基因的小鼠(*rara*<sup>-/-</sup>)体内正常的粒细胞仍然存在<sup>[4]</sup>, 因此, *RAR $\alpha$* 对于粒细胞生成不是必需的。所以, 揭示APL中分化受阻的分子机制, 对于疾病研究及发展新的治疗策略有重要意义, 同时对其他的髓系白血病也有一定的提示。本研究的主要目的是通过慢病毒携带转基因感染ES细胞来建立一种APL的小鼠模型来模拟研究白血病的形成。

收稿日期: 2012-01-17 接受日期: 2012-03-07

科技部重大基础研究计划(No.2012CB966601, No.2011CB964801, No.2010CB945204, No.2009CB521803)、科技部重大国际合作(No.2010DFB30270)、国家重大医药专项(No.2011ZX09102-010-04)和实验血液学国家重点实验室开放课题基金(No.ZK08-01, No.ZK08-02, No.ZK11-04)资助项目

\*通讯作者。Tel: 022-23909166, E-mail: chengtao@ihcams.ac.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 小鼠胚胎干细胞系R1(北京生命科学研究所高绍荣教授提供); 293T细胞(本实验室保存); 携带*hPML-RAR $\alpha$* 基因的目的质粒(含有GFP标记基因)、慢病毒包装质粒SPAX2和MD2G(本实验保存)。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基(ES细胞专用高糖)、青/链霉素(100 $\times$ )、L-谷氨酰胺(100 $\times$ )、非必需氨基酸(NEAA, 100 $\times$ )、核苷(100 $\times$ )、 $\beta$ -巯基乙醇(100 $\times$ )、小鼠白血病抑制因子(mLIF, ESGRO<sup>®</sup>)、1%明胶均购于Milipore公司; 胎牛血清FBS购自Hyclone公司; 丝裂霉素C、Polybrene、秋水仙素均购自Sigma-Aldrich公司; 0.05%胰酶-EDTA或0.25%胰酶购自Gibco公司; Lipofectamine 2000、OPTI-MEM均购自Invitrogen公司; 强力霉素(Dox)购自Sigma公司; RNA提取试剂盒购自QIAGEN公司(RNeasy Mini kit (50) Cat.No.74104 QIAGEN); 反转录试剂盒购自Promega公司(ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase Catalog#A3802 Promega)。

1.1.3 实验动物 ICR小鼠、C57BL/6小鼠均购自北京维通利华公司。

1.1.4 引物 基因组PCR、RT-PCR所用引物序列相同。*hPML-RAR $\alpha$* 基因上游引物序列: 5'-GAG GGC TGC AAG GGC TTC TTC CGC CGC AGC-3'; 下游引物序列: 5'-GGC GTC AGC GTG TAG CTC TCA GAG CAC TCG-3'。小鼠内参引物GAPDH上游引物序列: 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'; 下游引物序列: 5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'。

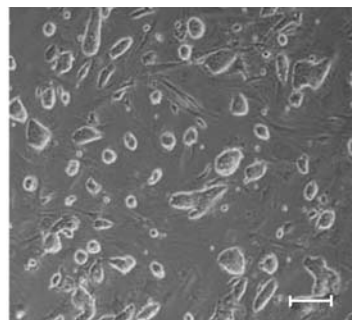
### 1.2 方法

1.2.1 包装病毒 按常规方法复苏冻存293T细胞。复苏的293T细胞培养在含有10% FBS的高糖DMEM中<sup>[5]</sup>, 细胞长满后, 按常规方法传代, 细胞传代两次后, 进行病毒包装。简略如下: 病毒包装前一天, 细胞消化传代, 按 $8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 接种于10 cm皿中, 接种17~19 h后, 细胞汇合度达到90%以上进行病毒包装, 步骤按Lipofectamine 2000的说明书进行。加入包装载体和目的载体6~8 h后换新鲜培养基。分别在包装48 h及72 h后, 收集病毒上清, 用0.45  $\mu$ m滤器过滤, 放于4  $^{\circ}$ C用于后续实验。

1.2.2 ES细胞的培养与感染 将经丝裂霉素C (10  $\mu$ g/mL)处理后的胚胎成纤维细胞(MEF)<sup>[6]</sup>, 即feeder细胞, 用含10% FBS的高糖DMEM(Gibico

C11960)复苏于预先包被有0.1%明胶的培养皿中。复苏feeder细胞至少6 h, 用含15% FBS、1% NEAA、1% NU、1%  $\beta$ -巯基乙醇、1%谷氨酰胺、1%青链霉素、 $10^2$  U/mL LIF的DMEM(ESM)复苏小鼠ES细胞R1, 等细胞长满并且呈未分化状态时(图1), 用0.25%的胰酶-EDTA消化, 按1:3或1:5传代。复苏的小鼠ES细胞传代两次, 细胞状态稳定、克隆较好时, 将ES细胞常规传代。消化离心, 加入小鼠ESM重悬后, 接种于预先包被明胶的培养皿中<sup>[7]</sup>, 放入培养箱1 h以去除feeder。吸取上清, 计数后按 $5 \times 10^4$ /孔的密度接种于24孔板中。接种3 h后, 将收集的48 h病毒、小鼠ESM以及polybrene共同加入细胞中(病毒与培养基的比例为4:1), 每孔培养体系为2 mL, 1 800 r/min, 37  $^{\circ}$ C离心90 min。感染8~12 h后换入小鼠ESM。次日进行二次感染, 方法同上。将二次感染12 h后的ES细胞, 传到预先铺有feeder的培养皿中, 细胞长满后, 按常规消化, 经流式分选出GFP<sup>+</sup>细胞。

1.2.3 细胞核型分析 向感染后的ESM中加入0.2~0.25 g/mL秋水仙素, 作用3.5 h之后, 常规消化离心收集细胞。用低渗液重悬混匀细胞(0.4%枸橼酸钠:0.4% KCl=1:1), 37  $^{\circ}$ C处理6 min, 加入新鲜配制的固定液(冰醋酸:甲醇=3:1)进行预固定后, 离心去上清, 加入新鲜固定液, 固定40 min, 离心去上清, 再加入固定液, 进行第二次固定, 时间为20 min, 离心去上清。加入固定液重悬, 即可进行滴片。玻片晾干后用Giemsa染液(1份Giemsa原液+9份磷酸缓冲液)进行染色, 染色时间为室温10 min, 然后用流水轻轻清洗, 室温晾干后进行核型分析。我们随机选择若干含有20个以上的细胞中期分裂相的玻片进行观察并进行核型正确率的统计。



小鼠ES细胞保持未分化状态。标尺=100  $\mu$ m。

Mouse ES cells maintain the undifferentiated state. Bar=100  $\mu$ m.

图1 小鼠ES细胞形态

Fig.1 Morphology of mouse ES cells

1.2.4 RT-PCR体外鉴定 *hPML-RAR $\alpha$*  基因的表达 复苏转染后的GFP<sup>+</sup> ES细胞, 培养基中加入Dox(500 ng/mL), 分别作用24, 48, 72, 96 h后按常规传代消化收集细胞。将收集的细胞用RNeasy Mini kit说明书提取RNA, 测定浓度, 按Promega逆转录试剂盒将提取的RNA反转成cDNA, 并进行PCR检测不同时间点细胞中*hPML-RAR $\alpha$* 基因的表达。反应条件: 95 °C变性5 min; 94 °C变性30 s, 62 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。取反应产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并拍照保存。

1.2.5 嵌合体小鼠的形成和鉴定 感染后的ES细胞核型鉴定正确后, 选择细胞状态最好时, 消化贴壁离心, 去除feeder后制成单细胞。用少量DMEM重悬, 置于冰上备用。将10~15个感染后的ES细胞注射到扩张后的囊胚, 体外恢复5 min后, 放入37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养2~3 h, 移植到假孕见栓2.5 d的小鼠(ICR)子宫内<sup>[7]</sup>, 每侧子宫移植15个左右的胚胎<sup>[8]</sup>。在移植后的第19.5 d时, 假孕小鼠会生下嵌合体小鼠。将所生的嵌合小鼠与C57BL/6雌性小鼠交配, 对产生的后代进行基因组的鉴定。剪取小鼠鼠尾, 用鼠尾裂解液和蛋白酶K(20  $\mu$ g/mL) 55 °C过夜, 饱和氯化钠法提取基因组DNA, 用PCR方法进行转

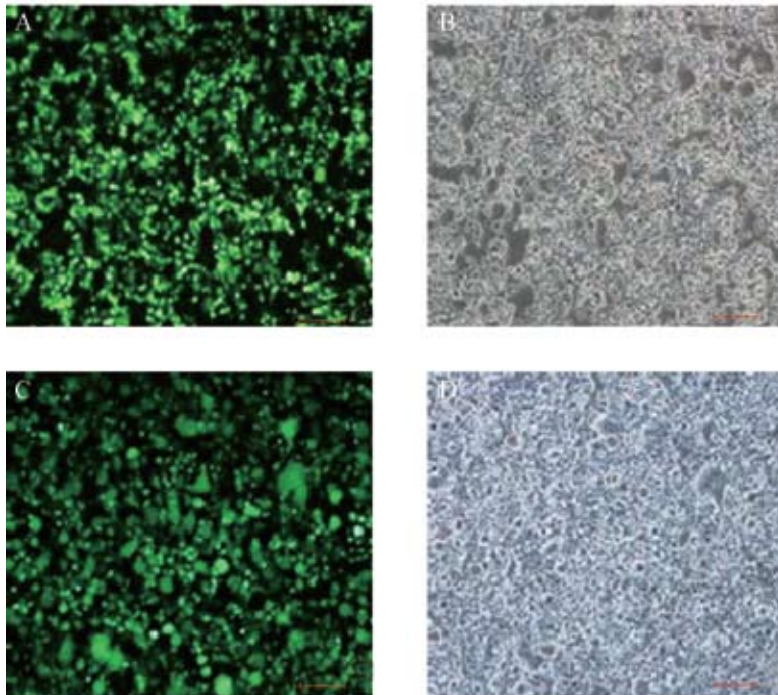
基因小鼠整合检测。反应条件及琼脂糖凝胶电泳同RT-PCR方法。

1.2.6 体内诱导 *hPML-RAR $\alpha$*  表达 取基因组表型确定的6~8周小鼠, 给予10 mg/mL的Dox。分别取给药3, 7, 10 d的小鼠以及对照小鼠(具有表型但不给药)检测体内骨髓细胞中*hPML-RAR $\alpha$* 基因的表达。用颈椎脱臼法处死小鼠, 然后取出小鼠的髌骨、股骨、胫骨, 并冲取骨髓细胞, 根据RNeasy Mini kit试剂盒提取RNA, 测浓度, 根据Promega反转录试剂盒将提取的RNA定量反转录成cDNA, 利用PCR检测*hPML-RAR $\alpha$* 的表达。反应条件与基因组DNA PCR的条件相同。

## 2 结果

### 2.1 GFP<sup>+</sup> ES细胞的获得及鉴定

2.1.1 GFP<sup>+</sup> ES细胞的获得 慢病毒包装48, 72 h后, 可在荧光显微镜下观察到293T细胞表达绿色荧光蛋白(图2)。小鼠的ES细胞感染48 h后荧光显微镜下可见少量GFP<sup>+</sup>细胞, ES细胞传代后可见大量GFP<sup>+</sup>细胞(图3), 表明我们成功地将*hPML-RAR $\alpha$* 基因转入小鼠的ES细胞。传代后的ES细胞进行消化、离心、重悬、过膜成单细胞后, 经流式分选出GFP<sup>+</sup>细胞(图3), 接种于铺有feeder的培养皿中继续培养。



A, B: 病毒包装48 h; C, D: 病毒包装72 h。标尺=100  $\mu$ m。

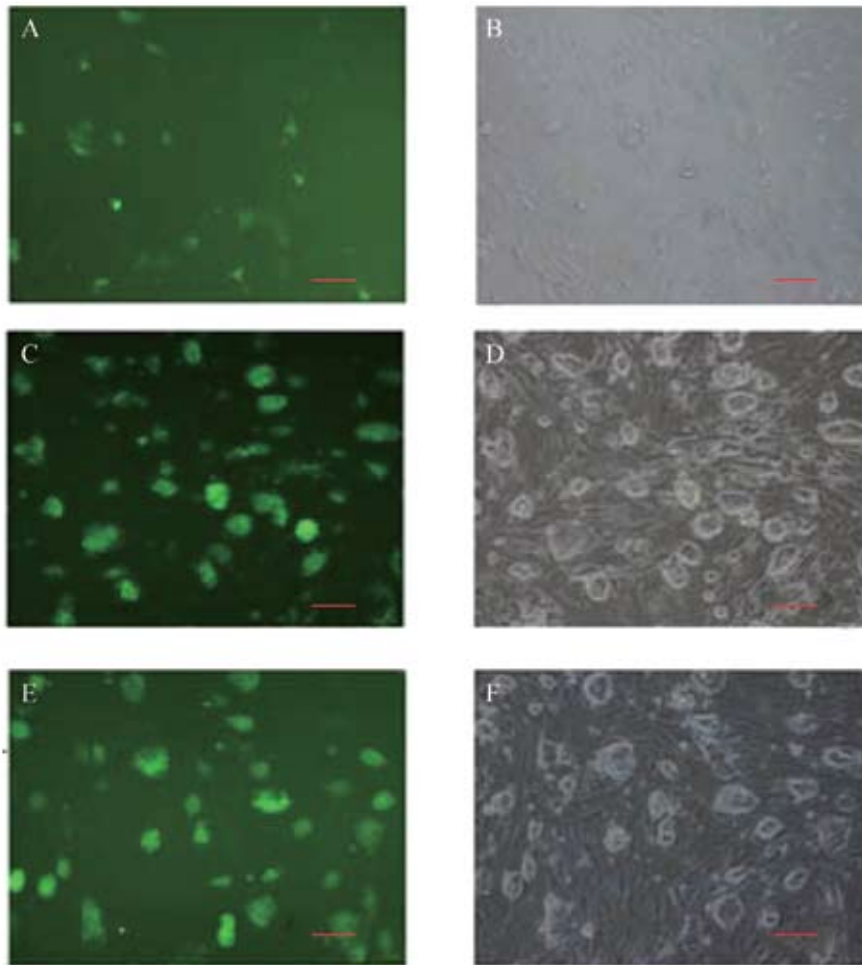
A, B: lentiviral packaging at 48 h; C, D: lentiviral packaging at 72 h. Bar=100  $\mu$ m.

图2 荧光显微镜观察病毒包装48 h及72 h时293T细胞的状态

Fig.2 Representative images of 293T cells at 48 h and 72 h of lentiviral packaging

2.1.2 感染后的ES细胞核型鉴定 将获得的稳定表达GFP<sup>+</sup>的细胞进行核型分析后,发现视野中大于70%的细胞具有与正常小鼠ES细胞相同的核型(40, XY), 因此我们认为基因感染小鼠ES细胞后对小鼠的染色体未产生影响(图4)。

2.1.3 体外鉴定 *hPML-RAR $\alpha$*  基因表达 分选的GFP<sup>+</sup> ES细胞在体外培养, 培养基中加入Dox, 分别作用24, 48, 72, 96 h后, RT-PCR结果显示(图5), Dox作用24~96 h后, 细胞中均出现*hPML-RAR $\alpha$* 基因表达, 同样作用后, R1细胞中没有出现*hPML-RAR $\alpha$* 基因表达, 故



A, B: 病毒感染ES细胞48 h; C, D: 感染的ES细胞经扩增后的图片; E, F: 流式分选GFP阳性细胞后培养的图片。标尺=100  $\mu$ m。

A, B: lentiviral transduction of ES cells at 48 h; C, D: proliferation of lentiviral transduced ES cells; E, F: proliferation of flow sorted GFP<sup>+</sup> ES cells. Bar=100  $\mu$ m.

图3 ES细胞经病毒感染的图片

Fig.3 Representative image of transfected ES cells

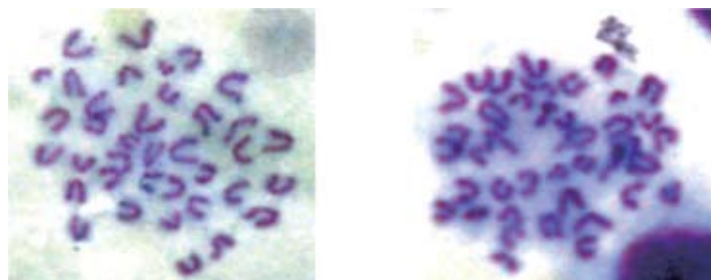
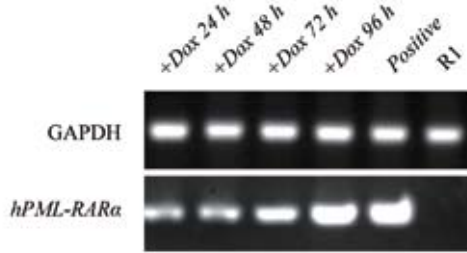


图4 感染后的ES细胞核型

Fig.4 Representative images of karyotype of transfected ES cells



Dox体外调控作用是有效的。



GFP<sup>+</sup> ES细胞经Dox体外诱导24, 48, 72, 96 h后hPML-RAR $\alpha$ 基因的表达。携带hPML-RAR $\alpha$ 基因的载体为阳性对照; R1细胞作为阴性对照。hPML-RAR $\alpha$  gene expression in GFP<sup>+</sup> ES cells at 24, 48, 72, 96 h after DOX induction *in vitro*. Vectors carrying hPML-RAR $\alpha$  gene were positive control; R1 cells were negative control.

图5 体外检测hPML-RAR $\alpha$ 基因的表达

Fig.5 The expression of hPML-RAR $\alpha$  after Dox induction *in vitro*

## 2.2 利用GFP<sup>+</sup> ES细胞获得嵌合体小鼠

通过囊胚注射的方法获得了3只嵌合体小鼠(图6), 由于构建嵌合体所用的ES细胞源于近交系129小鼠, 毛色表型为灰色, 而受体胚胎来自于ICR小鼠, 毛色为全身白色。根据出生的后代是否具有ES细胞来源的毛色显性判定嵌合是否成功。嵌合的小鼠身体不同部位具有不规则的色斑, 呈现出ES细胞来源的小鼠毛色(灰色)的嵌合, 经基因组DNA PCR鉴定后发现, 均表达hPML-RAR $\alpha$ 基因, 说明嵌合的小鼠携带hPML-RAR $\alpha$ 基因。将这3只嵌合体小鼠分别与C57BL/6雌性小鼠进行交配后, 证实只有1只具有传代能力, 我们定为G0代。G0代小鼠与正常C57BL/6

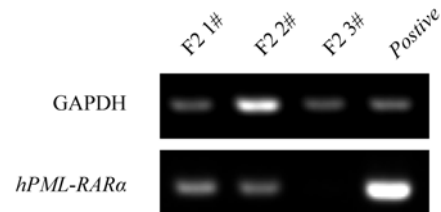


灰色来源于小鼠ES细胞, 白色来源于受体小鼠。Gray color is derived from mouse ES cells, while the white from recipient mice.

图6 利用囊胚注射生出的嵌合小鼠

Fig.6 Chimeric mouse deriving from blastocyst injection

雌性小鼠进行交配, 对所产生的后代, 用PCR进行基因组表型鉴定(图7)。后代中近1/2的新生小鼠表达hPML-RAR $\alpha$ 融合基因。通过简单的杂交方法, 可将此融合基因在后代小鼠中传递下去, 得到稳定的转基因小鼠。



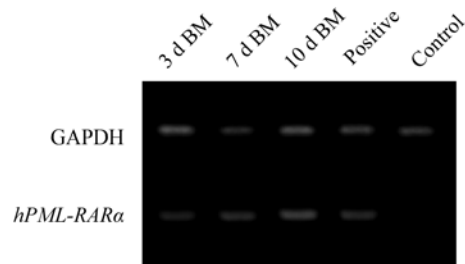
F1代为G0与C57BL/6小鼠交配后代。F2代为F1代与C57BL/6小鼠交配后代。携带hPML-RAR $\alpha$ 基因的载体为阳性对照。The offspring of G0 and C57BL/6 were F1. The offspring of F1 and C57BL/6 were F2. Vectors carrying hPML-RAR $\alpha$  gene were positive control.

图7 PCR鉴定传代后的小鼠表型

Fig.7 Phenotype identification of offspring by PCR

## 2.3 Dox诱导小鼠骨髓细胞中hPML-RAR $\alpha$ 基因表达

具有hPML-RAR $\alpha$ 表型的小鼠在给予Dox 3, 7, 10 d时, 取出骨髓细胞, 提取RNA, 进行RT-PCR。结果显示: RNA水平上, 喂药3 d时, 小鼠骨髓细胞中即出现hPML-RAR $\alpha$ 基因的表达(图8); 而不具有hPML-RAR $\alpha$ 融合基因的小鼠经同样的处理, 在第10 d时未发现hPML-RAR $\alpha$ 基因的表达。以上证实, 在体内经Dox诱导, hPML-RAR $\alpha$ 基因即可表达, 因此, 我们成功利用ES细胞建立了可诱导表达hPML-RAR $\alpha$ 基因的嵌合体小鼠模型。



Dox诱导3, 7, 10 d时, 小鼠骨髓细胞中hPML-RAR $\alpha$ 基因的表达。携带hPML-RAR $\alpha$ 基因的载体为阳性对照。对照组小鼠未经Dox诱导。hPML-RAR $\alpha$  gene expression in mouse bone marrow (BM) cells at 3, 7, 10 d after Dox induction. Vectors carrying hPML-RAR $\alpha$  gene were positive control. The mouse without Dox induction were control.

图8 Dox诱导不同时间骨髓细胞中hPML-RAR $\alpha$ 基因表达  
Fig.8 hPML-RAR $\alpha$  expression in bone marrow cells after Dox induction at various time points

### 3 讨论

1981年, Evans<sup>[9]</sup>以及Martin<sup>[10]</sup>分别用不同的方法首次报道了从正常小鼠胚胎中分离建立了胚胎多能干细胞系, 简称ES细胞系, 并进行了大量嵌合小鼠的实验。将获得外源基因的ES细胞注入到受体胚胎的囊胚腔中, 经恢复培养并发育为嵌合体。经过嵌合体的途径, 转化的ES细胞在嵌合体中能分化发育为生殖细胞, 然后通过简单的杂交繁育即可得到具有目的基因的转基因动物。这对于在动物体内研究基因的功能和调控是十分有价值的。

逆转录病毒作为载体可能会造成转基因表达沉默, 因此, 慢病毒载体在转染小鼠ES细胞方面具有显著的优势, 同时, 慢病毒来源的载体能有效地携带外源基因导入小鼠的ES细胞中, 并在ES细胞中稳定表达<sup>[11-12]</sup>。目前, 我们仍在分析此方法获得的转基因小鼠同代和不同代之间嵌合率的差异, 并将和其他方法进行比较, 确定此方法的效率是否优于其他方法。慢病毒转染的ES细胞通过囊胚注射形成嵌合体小鼠, 揭示了转基因在多个组织中表达。嵌合体小鼠杂交后代的胚胎表达转基因, 表明具有有效的胚系传递特性<sup>[13-14]</sup>。

APL是在临床上第一个用全反式维甲酸(ATRA)诱导分化治疗血液恶性肿瘤获得成功的典范, 且伴有t(15;17)的APL对ATRA敏感而伴有t(11;17)的APL对ATRA不敏感。因此, 建立一个良好的模型, 对研究APL的发病机制具有一定的实用价值。Early等<sup>[15]</sup>通过利用CD11b启动子驱动PML-RAR $\alpha$ 表达产生转基因小鼠, 经过两年的观察这些转基因小鼠的表型是正常的, 并没导致白血病的发生。He等<sup>[16]</sup>和Grisolano等<sup>[17]</sup>用hCG的启动子驱动PML-RAR $\alpha$ 融合基因表达产生的转基因小鼠, 经过一年的潜伏期后产生了类似人类的APL。Brown等<sup>[18]</sup>用hMRP8启动子驱动PML-RAR $\alpha$ 融合基因表达的转基因小鼠也能诱发类似人类的APL。因此, PML-RAR $\alpha$ 在髓系发育的早期阶段表达对产生类似人类的APL表型是关键的。

本研究通过慢病毒载体转染小鼠的ES细胞建立转基因小鼠模型, 并采用Dox调控hPML-RAR $\alpha$ 基因的表达。该模型的优势在于可诱导性, 我们通过体内外实验均得到了验证。在体外实验中感染的ES细胞, 培养过程加入Dox后, hPML-RAR $\alpha$ 基因出现表达。在体内实验中具有hPML-RAR $\alpha$ 基因的小鼠, 在给予Dox 3 d时小鼠的骨髓细胞hPML-RAR $\alpha$ 基因即

可表达。因此验证了该模型的可诱导性是有效的。但由于本模型仅给药5个月, 因此并未出现类似APL的表型(数据未显示)。本研究中我们没有对外源基因在染色体上的整合情况进行研究, 如果在后续实验中发现转基因小鼠表型有明显差异或其它异常, 可以进行全基因组测序, 分析外源基因是单拷贝还是多拷贝以及插入位置对小鼠表型的影响。

PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白虽然可以诱发伴有t(15;17)的APL, 但并不是唯一因素, 体内还存在别的因素诱发APL。因此二次打击可以加速白血病的发生, 我们现正在利用这一特性进行进一步APL发生机制的研究。总之, 本研究利用ES细胞初步建立了可诱导的白血病模型, 一方面为从体内整体水平上进一步证实PML-RAR $\alpha$ 融合蛋白在APL中的作用创建了良好的模型; 另一方面, 为今后相关疾病的进一步研究奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: From highly fatal to highly curable. *Blood* 2008; 111(5): 2505-15.
- 2 Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Baqq A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003; 102(3): 972-80.
- 3 Du C, Redner RL, Cooke MP, Lavau C. Overexpression of wild-type retinoic acid receptor alpha (RARalpha) recapitulates retinoic acid-sensitive transformation of primary myeloid progenitors by acute promyelocytic leukemia RARalpha-fusion genes. *Blood* 1999; 94(2): 793-802.
- 4 Kastner P, Chan S. Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. *Oncogene* 2001; 20(49): 7178-85.
- 5 Pfeifer A, Kessler T, Silletti S, Cheresh DA, Verma IM. Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(22): 12227-32.
- 6 高舒平, 时伟红, 秦 英, 董婉维, 王太一. 用于胚胎干细胞分离培养的饲养层制作. *中国实验动物学杂志* 2000; 10(2): 78-81.
- 7 Stevens LC, Varnum DS, Eieher EM. Viable chimaeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos. *Biol Reprod* 1977; 269(5628): 515-7.
- 8 Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 1996; 274(5295): 2082-6.
- 9 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(9): 154-6.
- 10 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
- 11 Kosaka Y, Kobayashi N, Fukazawa T, Totsuqawa T, Maruyama M, Yong C, et al. Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells. *Artif Organs* 2004; 28(3): 271-7.
- 12 Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, et al. Generation of transgenic cattle by lentivi-

- ral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 2004; 71(2): 405-9.
- 13 Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 1986; 323(6087): 445-8.
- 14 Stewart CL, Ruther U, Garber C, Vanek M, Wagner EF. The expression of retroviral vectors in murine stem cells and transgenic mice. *J Embryol Exp Morphol* 1986; 97 Suppl: 263-75.
- 15 Early E, Moore MA, Kakizuka A, Nason-Burchenal K, Martin P, Evans RM, *et al.* Transgenic expression of PML/RAR $\alpha$  impairs myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15): 7900-4.
- 16 He LZ, Tribioli C, Rivi R, Peruzzi D, Pelicci PG, Soares V, *et al.* Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RAR $\alpha$  transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(10): 5302-7.
- 17 Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR $\alpha$  under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 1997; 89(2): 376-87.
- 18 Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, *et al.* A PML-RAR $\alpha$  transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2551-6.

## Establishing A Leukemia-inducible Model with ES Cells

Liu Ling<sup>1</sup>, Liu Yanfeng<sup>1</sup>, Cheng Hui<sup>1</sup>, Jin Hui<sup>1</sup>, Zhang Quan'e<sup>1</sup>, Wang Zhengyu<sup>1</sup>,  
Yuan Weiping<sup>1</sup>, Gao Shaorong<sup>2</sup>, Xu Jing<sup>1</sup>, Cheng Tao<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; <sup>2</sup>National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

**Abstract** Embryonic stem cells are pluripotent cell lines isolated from the inner cell mass of blastocyst that have the potential for multi-lineage differentiation. Transgenic animals are generated by introducing exogenous gene into ES cells. This approach has been used successfully for the analysis of gene function and regulation. Transfer of ES cells that contain virus-transduced transgene into blastocysts can also generate transgenic animals with germ-line transmission that stably express the transgene in mouse tissues. In this study, we confirmed that lentiviruses containing our construct can efficiently deliver *hPML-RAR $\alpha$*  to murine ES cells with normal karyotypes. The infected ES cells were injected into blastocysts and then transplanted into pseudo-pregnant mice. Three chimeric mice carrying *hPML-RAR $\alpha$*  were obtained with one confirmed as germ-line transmission competent. We then fed mice bearing the transgene with doxycycline *in vivo* and observed the expression of *hPML-RAR $\alpha$*  in bone marrow cells after 3 days of Dox administration. It showed that the exogenous gene expression could be induced *in vivo*. Our results demonstrate that we have successfully established a leukemia-inducible transgenic mouse model with ES cells.

**Key words** embryonic stem cells; *PML-RAR $\alpha$* ; doxycycline-inducible; chimera

Received: January 17, 2012 Accepted: March 7, 2012

This work was supported by the Grants of the Major Basic Research Project of the Ministry of Science and Technology (No.2012CB966601, No.2011CB964801, No.2010CB945204, No.2009CB521803), the Major International Cooperation Projects of Ministry of Science and Technology (No.2010DF30270), the Major National Pharmaceutical Projects (No.2011ZX09102-010-04) and the State Key Laboratory of Experimental Hematology Pilot Research Projects (No.ZK08-01, No.ZK08-02, No.ZK11-04)

\*Corresponding author. Tel: 86-22-23909166, E-mail: chengtao@ihcams.ac.cn