【基础研究】

地西他滨治疗亲嗜性病毒整合位点 1 高表达的慢性髓细胞性白血病分子机制研究

何 薇，李 威，李福兴*，谢晓恬
（同济大学附属同济医院儿科，上海 200065）

摘要：目的 探索亲嗜性病毒整合位点 1（ecotropic viral integration site 1，*EVI1*）高表达对 K562 细胞的影响，及 DNA 甲基转移酶抑制剂地西他滨治疗 *EVI1* 高表达的慢性髓细胞性白血病（chronic myelogenous leukemia，CML）的分子机制。**方法** 使用逆转录病毒载体转染 K562 细胞，检测空载体组和 *EVI1* 组微小 RNA（micro RNA，miR）-9 表达水平、miR-9 启动子序列甲基化程度及细胞克隆数。使用地西他滨和溶媒处理 *EVI1* 高表达的 K562 细胞，检测 miR-9 表达水平、miR-9 启动子序列甲基化程度、细胞克隆数及细胞周期。**结果** 与空载体组相比，*EVI1* 组 miR-9 相对表达量显著降低［（0.002 1±0.000 3）比（0.003 4±0.000 3），$P<0.01$］，miR-9 启动子序列甲基化程度显著增加，细胞增殖能力增强［（232.67±6.81）比（124.67±5.03），$P<0.01$］。地西他滨组较溶媒组 miR-9 表达水平显著升高［（0.002 3±0.000 3）比（0.000 7±0.000 1），$P<0.01$］，miR-9 启动子甲基化程度显著降低［（44.67±6.57）% 比（90.22±4.29）%，$P<0.01$］，细胞增殖能力减弱［（173.67±12.06）比（219.33±10.26），$P<0.01$］，G_0/G_1 细胞比例增高［（59.25±1.20）% 比（50.45±1.06）%，$P<0.05$］。**结论** *EVI1* 通过增加 miR-9 启动子甲基化程度，下调 miR-9 表达，可能是 *EVI1* 参与 CML 的机制之一。地西他滨可逆转 *EVI1* 高表达所致的 miR-9 甲基化程度，肿瘤细胞克隆增殖能力得以遏制，为其用于 *EVI1* 高表达的 CML 治疗提供理论依据。

关键词： 地西他滨；亲嗜性病毒整合位点 1；慢性髓细胞性白血病；分子机制；微小 RNA-9
中图分类号： R725.5；R733.72 **文献标志码：** A **文章编号：** 1672-9188（2023）02-0134-08
DOI：10.13683/j.wph.2023.02.006

Molecular mechanism of decitabine in the treatment of chronic myelogenous leukemia with overexpression of ecotropic viral integration site 1

HE Wei, LI Wei, LI Fuxing*, XIE Xiaotian
（*Department of Pediatrics, Tongji Hospital of Tongi University, Shanghai 200065, China*）

Abstract: ***Objective*** To explore the effects of ecotropic viral integration site 1（*EVI1*）overexpression on K562 cells, and the molecular mechanism of DNA methyltransferase inhibitor decitabine in the treatment of chronic myelogenous leukemia（CML）with high expression of *EVI1*. ***Methods*** Retrovirus vectors were used to transfect K562 cells, and the expression level of micro RNA（miR）-9, the methylation degree of miR-9 promoter sequence and the number of cell clones in empty vector group and *EVI1* group were detected. K562 cells with high *EVI1* expression were treated with decitabine and solvent to detect the expression level of miR-9, methylation degree of miR-9 promoter sequence, number of cell clones and cell cycle. ***Results*** Compared with the empty vector group and *EVI1* group, the relative expression level of miR-9 was significantly decreased［（0.002 1±0.000 3）*vs*（0.003 4±0.000 3），$P<0.01$］, and the methylation degree of miR-9 promoter sequence was significantly increased, cell proliferation was enhanced［（232.67±6.81）*vs*（124.67±5.03），

收稿日期：2022-08-28；**修回日期：**2022-12-12
作者简介：何薇，主治医师，研究方向：小儿血液肿瘤疾病、性早熟、反复呼吸道感染等。
通信作者：李福兴，副主任医师，研究方向：小儿血液肿瘤疾病、性早熟、反复呼吸道感染等。
基金项目：上海市同济医院国家自然科学基金培育项目（GJPY1710）；上海申康医院发展中心课题（SHDC12020618）

$P<0.01$]. Compared with the solvent group, the expression level of miR-9 in decitabine group was significantly increased [(0.002 3±0.000 3) *vs* (0.000 7±0.000 1), $P<0.01$], and the methylation degree of miR-9 promoter was significantly decreased[(44.67±6.57)% *vs* (90.22±4.29)%, $P<0.01$], the cell proliferation ability was decreased[(173.67±12.06) *vs* (219.33±10.26), $P<0.01$], and the proportion of G0/G1 cells was increased[(59.25±1.20)% *vs* (50.45±1.06)%, $P<0.05$]. ***Conclusion*** *EVI1* down-regulates the expression of miR- 9 by increasing the methylation degree of miR-9 promoter, which may be one of the mechanisms of *EVI1* participates in CML. Decitabine can reverse the methylation degree of miR-9 caused by *EVI1* overexpression, and inhibit the cloning and proliferation ability of tumor cells, providing a theoretical basis for its use in the treatment of CML with *EVI1* overexpression.

Key words: decitabine; ecotropic viral integration site 1; chronic myelogenous leukemia; molecular mechanism; micro RNA-9

慢性髓细胞性白血病（chronic myelogenous leukemia，CML）是一种由造血功能紊乱引起的恶性肿瘤，全球成人年发病率为 1/10 万～ 2/10 万 [1]。目前，CML 疗法包括化疗和骨髓移植（bone marrow transplantation，BMT），但 BMT 后死亡和复发风险较高，且较难获得匹配供体，临床应用受到限制 [2]。因此，了解 CML 的发病机制并寻找新的疗法至关重要。

约 10% 的 CML 患者亲嗜性病毒整合位点 1（ecotropic viral integration site 1，*EVI1*）呈高表达 [3]。*EVI1* 在干细胞维持和染色质重塑的转录调控网络中发挥重要作用 [4]。*EVI1* 是最具致癌性的亚型，在白血病中被广泛研究 [5—6]。*EVI1* 高表达与 CML 临床分期和预后有关，且 CML 中 *EVI1* 的激活与 p53 改变的淋巴细胞增强结合因子 1/β- 连环蛋白相关，这可能是 CML 的一种疗法 [7]。

2006 年，地西他滨（decitabine）被美国 FDA 批准应用于骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndrome，MDS）转化的急性髓细胞性白血病（acute myelogenous leukemia，AML）及 AML 老年患者的治疗 [8]。有学者将地西他滨用于 AML 治疗，效果良好 [9—10]。此外，地西他滨与其他药物联用亦可治疗 CML[11—12]。但地西他滨单独干预对 CML 的具体作用机制尚不明确。

本研究拟以 CML 患者的 K562 细胞为研究对象，通过地西他滨干预探讨 *EVI1* 高表达对微小 RNA（micro RNA，miR）-9 的调控及细胞增殖能力的影响，发现 *EVI1* 参与 CML 发生发展新机制，并为地西他滨用于 *EVI1* 高表达 CML 的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

地西他滨购自美国 Sigma Aldric 公司；K562 细胞、HEK293T 细胞均由伊利诺伊大学芝加哥校区血液肿瘤实验室液氮保存；胎牛血清购自美国 Gibco 公司；RPMI-1640 培养基购自美国 Sigma 公司，内含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 μg/ml 链霉素；高糖型 DMEM 培养液、磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffered saline，PBS）均购自美国 OriGENE 公司；Mega Tran1.0 转染试剂购自美国 OriGENE 公司；Methylcellulose 半固体培养基购自美国 MethoCult 公司；TRIzol 购自美国 Ambion 公司；重亚硫酸盐转化试剂 Epi JET Bisulfite Conversion Kit 购自美国 Thermo Scientific 公司；puregene Blood Core Kit B 购自美国 Qiagen 公司；miR-9 检测试剂盒、TaqMan® miR Reverse Transcription Kit 试剂盒、ViiA™ 7 Real-Time 聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪均购自美国 Applied Biosystems 公司；RIPA Buffer 细胞裂解液、鼠抗 -β-Tubulin 抗体、人 EVI1 抗体、辣根过氧化物标记羊抗兔免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）G、辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgG 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司；湿式转模仪、凝胶成像仪、流式细胞仪均购自美国 Bio-Rad 公司；荧光显微仪购自美国奥林巴斯公司；

倒置荧光显微仪购自美国蔡司公司。

1.2 实验方法

采用逆转录病毒包装质粒转染K562细胞，筛选稳定表达*EVI1*的细胞，检测空载体组和*EVI1*组miR-9表达水平、miR-9启动子序列甲基化程度及细胞克隆数，分析*EVI1*高表达对K562细胞的影响；后取筛选好的稳定高表达*EVI1*的K562细胞，分别使用0.1 μmol/L地西他滨和等体积二甲基亚砜（dimethylsulfoxide，DMSO，溶媒）处理72 h，检测miR-9表达水平、miR-9启动子区甲基化程度、细胞克隆数及细胞周期。

1.2.1 细胞复苏和培养

将液氮保存的细胞迅速转移到37 ℃水浴中，将急速融化后的细胞悬液加入5 ml培养基中混匀，离心力250 *g*，离心3 min去上清，在细胞沉淀中加入5 ml培养基，再250 *g*离心3 min，弃上清，用1 ml培养基混匀细胞沉淀，备用。取75 cm^2方瓶，加入10.0 ml培养基，将肿瘤细胞悬液加入此方瓶中，于37 ℃、5%二氧化碳孵育箱中培养。隔天换新鲜培养基，1周后，取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 逆转录病毒感染K562及G418筛选

将10 μg包装质粒＋鼠干细胞病毒（murine stem cell virus，MSCV）-*EVI1*或MSCV-vector加在10 cm板中转染工具细胞H293T细胞，培养24和48 h后，分别收集病毒上清1次。取2 ml病毒上清、（0.5～1）×10^6 K562细胞和8 μl聚凝胺，加入24孔板中，在32 ℃、45 *g*离心2 h后，弃上清，换新鲜培养基继续培养（37 ℃、5%二氧化碳），24 h后再次重复上述离心、弃上清、换培养液，继续培养24 h，让MSCV-*EVI1*充分表达后，用G418（1 mg/ml）筛选7 d，隔日换液，每次换液时，2 *g*离心10 min，筛选稳转细胞系用于进一步实验。

1.2.3 *EVI1*高表达的免疫印迹分析

取感染*EVI1*并经过G418筛选后的K562细胞，使用RIPA Buffer提取细胞中的蛋白成分，蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度后，进行蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，后进行转膜（恒压15 V过夜），后取出聚偏二氟乙烯膜，作好标记，5%脱脂奶粉震荡封闭1 h，然后用5%牛血清白蛋白溶液稀释一抗，室温孵育1 h后用0.1% TBST缓冲液洗膜15 min/次，共4次。同样继续孵育二抗后在杂交后印迹膜上滴上显影剂，暗室中使胶片暴光15 s、30 s、1 min和5 min。

1.2.4 RNA提取及实时定量PCR实验

按照试剂盒说明书提取总RNA及逆转录反应，将反应体系充分混匀，100 *g*离心3 min，置于定量PCR仪中反应，实验重复3次，且每个待检测样品设3个复孔。MiR-9引物由TaqMan配套提供。

1.2.5 重亚硫酸盐测序法检测miR-9启动子甲基化

按照试剂盒说明书进行基因组DNA重亚硫酸盐化，用甲基化特异性引物（miR-9-3 promoter forward：5'-GTTTGTTTATTTTTTTGGTTTTT-3'，miR-9-3 promoter reverse：5'-AACCTCCCTTAACCAATACC-3'）扩增修饰。将提纯后的PCR产物克隆到pGEM® T Easy Vector（Promega）载体系统，蓝白克隆筛选阳性克隆，扩增提取质粒后送测序。通过序列比对确定各CpG岛甲基化状态。

1.2.6 流式细胞仪测定细胞周期

收集需测定的各组细胞，弃去上清，保留细胞沉淀，向其中各加入1 ml PBS，混匀，45 *g*离心5 min，再用PBS洗1次，弃去上清，保留细胞沉淀，BD Cytofix/Cytoperm Buffer固定后DAPI染色，用Cyan流式细胞仪检测细胞周期，使用FlowJo10.0 software（TreeStar）分析数据。

1.2.7 克隆形成实验

取筛选好的稳定感染*EVI1*或空载体的K562细胞，接种于24孔板，每孔500个细胞（0.5 ml甲基纤维素培养基），重复3孔，内含有10 ng/ml人白介素-6、25 ng/ml人FMS样酪氨酸激酶3配体。置于饱和湿度培养箱中培养7 d（37 ℃、5%二氧化碳）。＞40个细胞的集落为1个白血病细胞集落，记录细胞集落数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析，计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，两样本均数比较采用 t 检验，计数资料用 % 表示，采用 χ^2 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

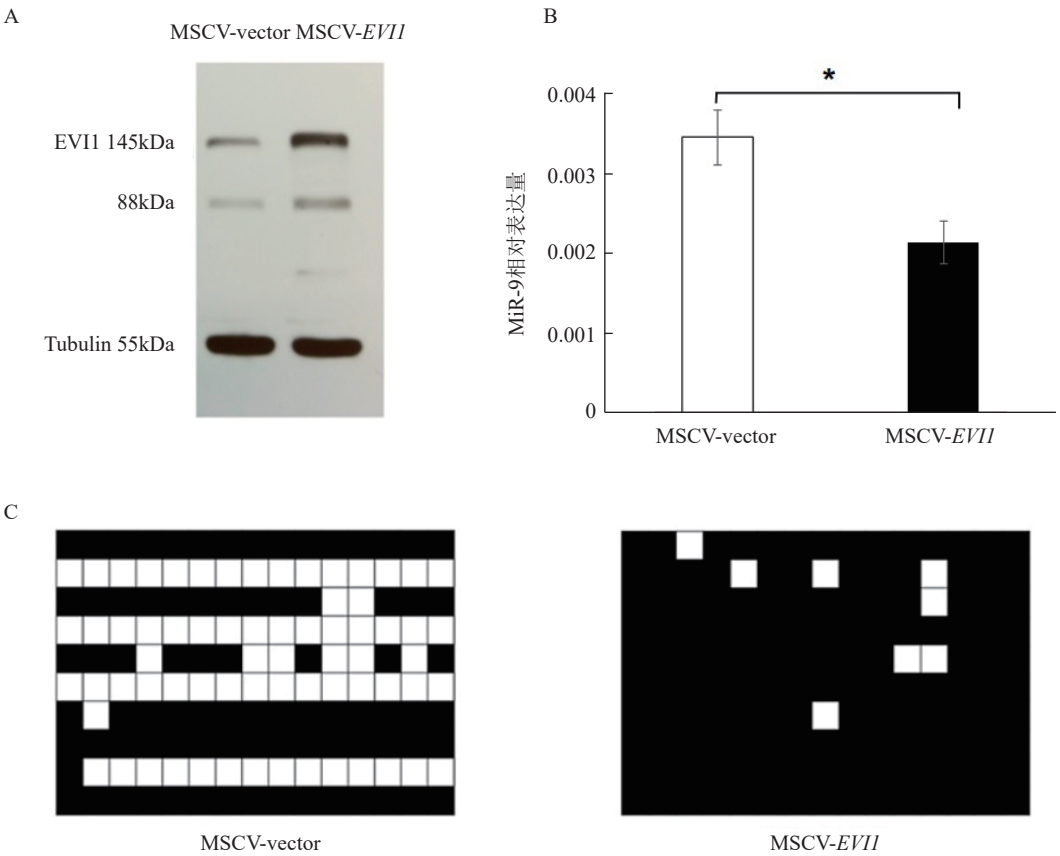
2.1 *EVI1* 高表达对 K562 细胞的影响

2.1.1 *EVI1* 高表达负向调控 miR-9 水平

K562 空载体组的 *EVI1* 低表达，经稳定转染 MSCV-*EVI1* 高表达后，蛋白水平显著升高（图 1A）。使用 TRIzol 法提取 RNA 后，通过定量反转录 PCR（quantitative reverse transcriptase-mediated PCR，qRT-PCR）检测 miR-9 的表达水平，结果显示，空载体组 miR-9 相对表达量为（0.003 4±0.000 3），*EVI1* 组相对表达量为（0.002 1±0.000 3），*EVI1* 组显著低于对照组（$t=5.32$，$P<0.01$，图 1B）。提示在细胞系 K562 中，当 *EVI1* 高表达时，miR-9 表达显著下降，即 *EVI1* 可负向调控 miR-9。

2.1.2 *EVI1* 高表达诱导 miR-9 启动子过度甲基化

重亚硫酸盐甲基化测序结果显示，*EVI1* 高表达后 miR-9 启动子 DNA 序列出现过度甲基化现象。空载体组 miR-9 启动子甲基化率为 54.67%（82/150），而 EVI1 组甲基化率为 94.67%（142/150），提示 *EVI1* 高表达后 miR-9 启动子区 DNA 甲基化程度明显升高（图 1C）。猜测 *EVI1* 可通过诱导 miR-9 启动子过度甲基化，从而抑制 miR-9 表达。



注：A：EVI1 蛋白表达量显著增加（145 kDa）；B：通过 qRT-PCR 检测 miR-9 相对表达量，*$P<0.01$；C：检测 miR-9 启动子甲基化。

Note: A: the expression of EVI1 protein was significantly increased (145 kDa);

B: detect the relative expression of miR-9 by qRT-PCR, *$P<0.01$; C: detect the methylation of miR-9 promoter.

图 1 *EVI1* 高表达对 miR-9 及其启动子甲基化的影响

Figure 1 Effects of overexpression of *EVI1* on miR-9 and miR-9 promoter methylation

2.1.3 *EVI1* 高表达对 K562 细胞克隆形成的影响

500 个细胞接种于半固体培养基，7 d 后计数克隆，结果显示，空载体组克隆数为（124.67±5.03），K562 *EVI1* 组克隆数为（232.67±6.81，t = −22.10，P < 0.01）。提示高表达 *EVI1* 后，K562 细胞系克隆形成能力增强，增殖能力增强。

2.2 地西他滨干预结果

通过地西他滨处理可逆转 *EVI1* 高表达所致的 miR-9 启动子的过度甲基化，恢复 miR-9 表达，抑制 *EVI1* 高表达髓系白血病细胞增殖，导致细胞周期 G_0/G_1 期阻滞，K562 细胞无序增殖得以遏制。

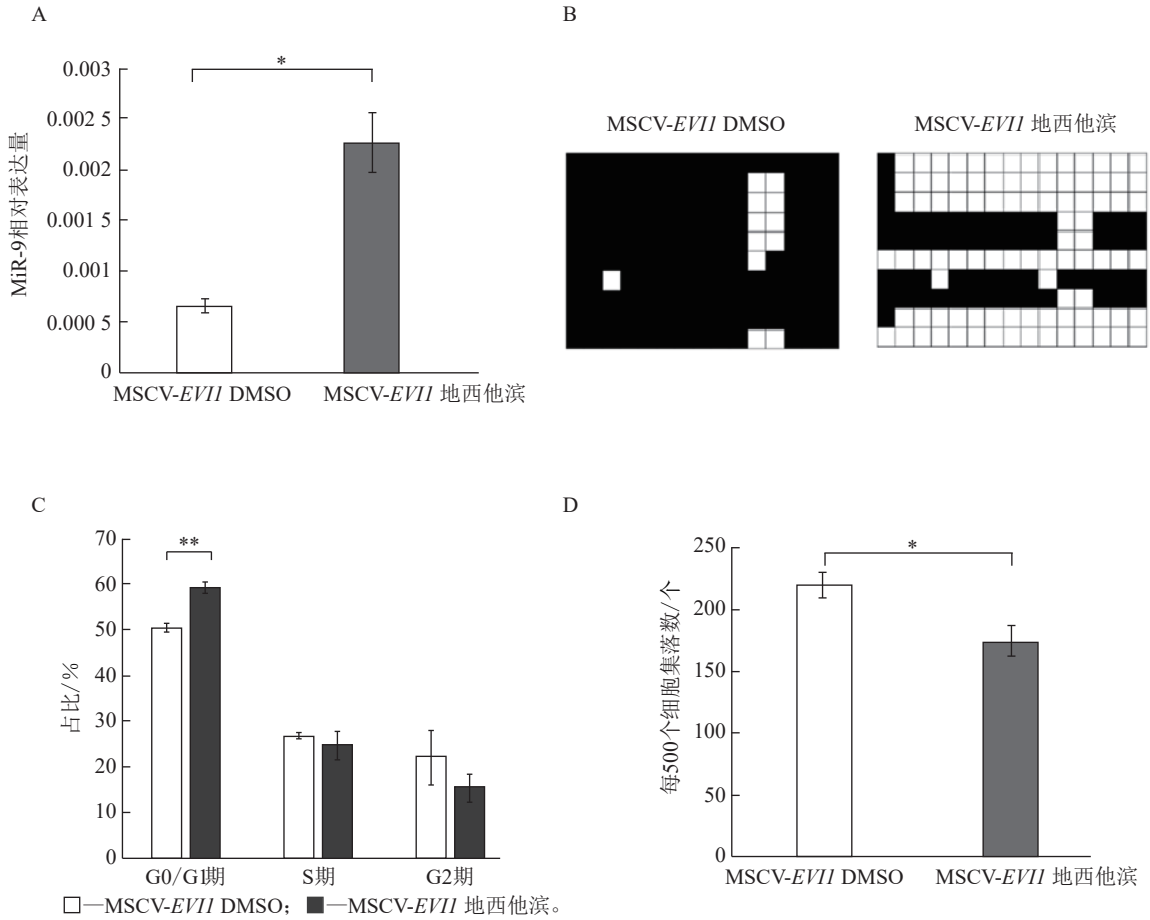
筛选稳定表达 *EVI1* 的 K562 细胞，经同体积 DMSO 或 0.1 μmol/L 地西他滨处理后，溶媒组和地西他滨组 miR-9 的表达水平分别为（0.000 7±0.000 1）和（0.002 3±0.000 3，t = −7.72，P < 0.01，图 2A）；且 miR-9 启动子甲基化率分别为（90.22±4.29）% 和（44.67±6.57）%（χ^2 = 70.08，P < 0.01，图 2B）。猜测地西他滨可通过降低 miR-9 启动子甲基化水平，逆转 *EVI1* 高表达对 miR-9 的表达抑制。

高表达 *EVI1* 的 K562 细胞周期结果显示，G_0/G_1 细胞比例在溶媒组为（50.45±1.06）%，0.1 μmol/L 地西他滨组为（59.25±1.20）%，地西他滨组显著高于溶媒组（t = −7.76，P < 0.05）；而 S 期细胞在溶媒组为（26.70±0.57）%，0.1 μmol/L 地西他滨组为（24.60±3.11）%（t = −0.94，P > 0.05），G2 期细胞在溶媒组为（21.95±6.01）%，0.1 μmol/L 地西他滨组为（15.40±2.97）%（t = −1.38，P > 0.05），两组差异无统计学意义（图 2C）。提示地西他滨可引起 *EVI1* 高表达 K562 细胞 G_0/G_1 期阻滞。500 个 *EVI1* 高表达 K562 细胞在溶媒组或 0.1 μmol/L 地西他滨组的半固体培养基培养 7 d，溶媒组细胞集落数为（219.33±10.26）个，而地西他滨组仅为（173.67±12.06）个，地西他滨组克隆数量显著少于溶媒组（t = −5.00，P < 0.01，图 2D），提示地西他滨可特异性抑制 *EVI1* 高表达 K562 细胞增殖。综上，地西他滨可通过使细胞 G_0/G_1 期阻滞，特异性抑制 *EVI1* 高表达 K562 细胞增殖。

3 讨论

CML 是一种起源于骨髓造血干细胞的的恶性骨髓增殖性疾病，15 岁以下儿童发病率为 0.09 / 10 万，占儿童白血病的 2%[13—14]，其特征性细胞遗传学标志为费城染色体［t(9；22)(q34；q11)］，形成 *BCR-ABL* 融合基因，此融合基因可编码的蛋白 P210，使酪氨酸激酶活性增加，影响细胞内多个信号通路，从而使造血干细胞增殖失控，发生 CML[15]。*BCR-ABL* 融合基因及发病机制使得 CML 治疗取得突破性进展，酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitor，TKI）靶向作用于酪氨酸激酶，可使部分 CML 患者获得细胞遗传学缓解，但仍有部分患儿存在 TKI 耐药，且停药后易复发[16]。综上，研究在 *BCR-ABL* 致病机制中与其相互作用的基因，提高 CML 治疗有效率，减少复发，具有十分重要的意义。

现有研究表明，*EVI1* 过表达参与 AML、MDS 和 CML 的发病机制[17-19]，而 *EVI1* 具体机制有待阐明。大量证据表明，*EVI1* 可能通过表观遗传机制调节甲基转移酶和乙酰转移酶修饰潜在基因表达的能力[20]。*EVI1* 还可招募染色质修饰酶以调节下游基因转录。Yoshimi 等[21] 证明，EVI1 通过 EVI1 锌指 1 结构域与组蛋白甲基转移酶 EZH2 结合，EVI1/EZH2 蛋白复合物被证明是通过 H3K79 的甲基化沉默 *PTEN* 基因所必需的。通过 EVI1/DNMT 蛋白复合物，不恰当的 *EVI1* 表达亦与不恰当的 DNA 甲基化及恶性肿瘤的发生有关[22]。Lugthart 等[20] 通过免疫沉淀实验发现，*EVI1* 可能与 DNA 甲基转移酶 3A（monoclonal antibody to DNA methyltransferase 3A，*DNMT3A*）和 *DNMT3B* 相互作用，分析为 *DNMT3A* 与 *EVI1* 共定位提供直接证据。课题组前期研究显示，*EVI1* 招募 *DNMT3B* 导致小鼠造血祖细胞中 miR-9 启动子的高甲基化。本研究中，笔者进一步发现 *EVI1* 通过诱导人 CML 细胞中 miR-9 启动子的高甲基化以下调 miR-9 表达。此外，作为一种去甲基化药物，地西他滨可逆转 *EVI1* 诱导的 miR-9 启动子的高甲基化，恢



注：A：通过 qRT-PCR 检测 miR-9 相对表达量，*$P < 0.01$；B：miR-9 启动子甲基化测序；C：细胞周期检测，**$P < 0.05$；D：细胞集落能力，*$P < 0.01$。

Note: A: detect the releative expression of miR-9 by qRT-PCR，*$P < 0.01$; B: miR-9 promoter methylation sequencing; C: the detection of cell cycle, **$P < 0.05$; D: the colony ability of cells, *$P < 0.01$.

图 2 DMSO 和 0.1 μmol/L 地西他滨处理后的比较

Figure 2 The comparision of treatment of DMSO and 0.1 μmol/L decitabine

复 miR-9 表达。综上，本研究结果揭示了 *EVI1* 介导 miR-9 表达的表观遗传调控机制。

MiR 在人类恶性肿瘤中作为致癌基因或肿瘤抑制因子，取决于其靶向的基因[23]。MiR-9 的异常表达已在多种癌症和血液恶性肿瘤中被报道。在宫颈癌和肺鳞状细胞癌中，miR-9 下调与不良预后相关，表明其是作为一种肿瘤抑制基因；在霍奇金淋巴瘤中，miR-9 作为一种致癌基因被认为是预后不良的标记物[24]。MiR-9 在淋巴母细胞白血病和髓系白血病中是一种肿瘤抑制基因，其作用尚不明确。MiR-9 在耐药 K562 细胞中过表达，逆转癌细胞对多种化疗药物的体外耐药，并在体内使肿瘤对化疗敏感[25]。MiR-9 的高表达与良好的预后相关，而 miR-9 的低表达与 60 岁以下 AML 成年患者的低生存率相关[26]。在本研究中，当 miR-9 被 *EVI1* 下调时，CML 细胞的增殖能力增强。此外，去甲基化药物地西他滨在 *EVI1* 高表达 CML 细胞中恢复 miR-9 表达，通过诱导体外 G_0/G_1 细胞周期阻滞来抑制肿瘤细胞增殖，进而抑制 CML 发生。

启动子高甲基化对肿瘤抑制基因的沉默是白血病发展过程中的一个关键事件[27]。因此，识别高甲基化基因及其相关机制可拓宽对白血病发生发展的

认识，并为通过调控这些靶向基因的表达来开发特异性、高效的治疗药物提供证据。虽然去甲基化药物尚未被用作髓系白血病患者的一线化疗药物，但本研究结果表明，*EVI1* 高表达 CML 细胞对去甲基化药物敏感，提示其应用于 *EVI1* 高表达患者的可能性。

4 结论

综上，在 CML 细胞中，miR-9 是 *EVI1* 的一个重要下游靶点，提示 *EVI1* 诱导的 miR-9 通过表观遗传机制下调可能参与了 *EVI1* 高表达 CML 的发生，进一步表明地西他滨有可能精确治疗 *EVI1* 高表达 CML。因此，化疗联合去甲基化药物的疗效值得在未来进一步开展研究。

参考文献：

[1] Flis S, Chojnacki T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 825-843.

[2] Gupta A, Khattry N. Current status of hematopoietic stem cell transplant in chronic myeloid leukemia[J]. Indian J Med Paediatr Oncol, 2014, 35(3): 207-210.

[3] Hinai AA, Valk PJ. Review: aberrant *EVI1* expression in acute myeloid leukaemia[J]. Br J Haematol, 2016, 172(6): 870-878.

[4] Lawce H, Szabo E, Torimaru Y, *et al*. MECOM(*EVI1*) rearrangements: a review and case report of two MDS patients with complex 3q inversion/deletions[J]. J Assoc Genet Technol, 2017, 43(1): 9-14.

[5] Kiehlmeier S, Rafiee MR, Bakr A, *et al*. Identification of therapeutic targets of the hijacked super-enhancer complex in *EVI1*-rearranged leukemia[J]. Leukemia, 2021, 35(11): 3127-3138.

[6] Tanaka M, Shibahara J, Ishikawa S, *et al*. *EVI1* expression is associated with aggressive behavior in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Virchows Arch, 2019, 474(1): 39-46.

[7] Manachai N, Saito Y, Nakahata S, *et al*. Activation of *EVI1* transcription by the LEF1/β-catenin complex with p53-alteration in myeloid blast crisis of chronic myeloid leukemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(4): 994-1000.

[8] Oki Y, Kondo Y, Yamamoto K, *et al*. Phase Ⅰ/Ⅱ study of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome: a multi-center study in Japan[J]. Cancer Sci, 2012, 103(10): 1839-1847.

[9] Gupta N, Miller A, Gandhi S, *et al*. Comparison of epigenetic versus standard induction chemotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia patients ≥60 years old[J]. Am J Hematol, 2015, 90(7): 639-646

[10] Phillips CL, Davies SM, Mcmasters R, *et al*. Low dose decitabine in very high risk relapsed or refractory acute myeloid leukaemia in children and young adults[J]. Br J Haematol, 2013, 161(3): 406-410.

[11] Abaza Y, Kantarjian H, Alwash Y, *et al*. Phase Ⅰ/Ⅱ study of dasatinib in combination with decitabine in patients with accelerated or blast phase chronic myeloid leukemia[J]. Am J Hematol, 2020, 95(11): 1288-1295.

[12] Jiang LC, Luo JM. Role and mechanism of decitabine combined with tyrosine kinase inhibitors in advanced chronic myeloid leukemia cells[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2): 1295-1302.

[13] Steliarova-Foucher E, Fidler MM, Colombet M, *et al*. Changing geographical patterns and trends in cancer incidence in children and adolescents in Europe, 1991–2010 (Automated Childhood Cancer Information System): a population-based study[J]. Lancet Oncol, 2018, 19(9): 1159-1169.

[14] Hijiya N, Schultz KR, Metzler M, *et al*. Pediatric chronic myeloid leukemia is a unique disease that requires a different approach[J]. Blood, 2015, 127(4): 392-399.

[15] Kalmanti L, Saussele S, Lauseker M, *et al*. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study Ⅳ[J]. Leukemia, 2015, 29(5): 1123-1132.

[16] 中华医学会血液学分会. 慢性髓性白血病中国诊断与治疗指南(2020年版)[J].中华血液学杂志, 2020, 41(5): 353-364.

[17] Haas K, Kundi M, Sperr WR, *et al*. Expression and prognostic significance of different mRNA 5'-end variants of the oncogene *EVI1* in 266 patients with de novo AML: *EVI1* and *MDS1*/*EVI1* overexpression both predict short remission duration[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2008, 47(4): 288-298.

[18] Abedin S, Platanias LC. Implications of high *EVI1* expression in high-risk myelodysplastic syndromes[J]. Leuk Lymphoma, 2018, 59(12): 2765-2766.

[19] Halder A, Nayak KB, Chakraborty S. Ecotopic viral integration site 1(*EVI1*) transcriptionally targets talin1(*TLN1*) and upregulates its expression in chronic myeloid leukemia[J].

Leuk Lymphoma, 2018, 59(8): 2008-2010.

[20] Lugthart S, Figueroa ME, Bindels E, *et al*. Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by *EVI1*[J]. Blood, 2011, 117(1): 234-241.

[21] Yoshimi A, Goyama S, Watanabe-Okochi N, *et al*. *EVI1* represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins[J]. Blood, 2011, 117(13): 3617-3628.

[22] Glass C, Wilson M, Gonzalez R, *et al*. The role of *EVI1* in myeloid malignancies[J]. Blood Cells Mol Dis, 2014, 53(1-2): 67-76.

[23] Farooqi AA, Fuentes-Mattei E, Fayyaz S, *et al*. Interplay between epigenetic abnormalities and deregulated expression of microRNAs in cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 58: 47-55.

[24] Nie K, Gomez M, Landgraf P, *et al*. MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas[J]. Am J Pathol, 2008, 173(1): 242-252.

[25] Li Y, Zhao L, Li N, *et al*. MiR-9 regulates the multidrug resistance of chronic myelogenous leukemia by targeting *ABCB1*[J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 2193-2200.

[26] Nowek K, Sun SM, Dijkstra MK, *et al*. Expression of a passenger miR-9* predicts favorable outcome in adults with acute myeloid leukemia less than 60 years of age[J]. Leukemia, 2016, 30(2): 303-309.

[27] Li H, Wang Y, Xu W, *et al*. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores *TMS1* gene expression in K562 cells[J]. Acta Haematol, 2015, 133(1): 18-25.

（编辑：虞　瑛）