

# *NPM1*突变基因通过MMPs参与调控白血病细胞体外侵袭

邵会媛 苗宗玉 覃凤娴 陈先春 谭 诗 张慧娟 张 伶\*

(重庆医科大学医学检验系, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 核仁磷蛋白基因(nucleophosmin, *NPM1*)突变是目前急性髓系白血病(AML)中突变率最高的基因改变, 在白血病的发生发展过程中发挥重要的调控作用。为探讨*NPM1*突变参与调控白血病髓外浸润的分子机制, 将表达质粒pEGFPC1-*NPM1*-mA转染THP-1细胞系, 筛选稳定表达*NPM1*突变蛋白的白血病细胞株(THP-1-mA)。利用RT-PCR及Western blot分析了THP-1-mA细胞与亲代细胞间MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2表达水平的差异。结果显示, 具有体外高侵袭能力的THP-1-mA组细胞MMP-2的mRNA水平和蛋白水平均明显高于两对照组, 而MMP-9 mRNA表达水平虽有所增高, 但蛋白表达水平却明显降低。同时, 与空载体转染组和未处理组细胞相比, THP-1-mA组细胞TIMP-2的mRNA水平和蛋白水平表达显著降低, 差异具有统计学意义; TIMP-1表达水平无明显改变。提示MMP-2及其抑制剂TIMP-2在*NPM1*突变参与调控的白血病细胞髓外浸润中可能发挥重要作用。

**关键词** 白血病; 核仁磷蛋白; 基因突变; 细胞侵袭; MMPs; TIMP

核仁磷蛋白基因(nucleophosmin, *NPM1*)位于染色体5q35, 编码含有12个外显子的核仁磷蛋白。*NPM1*突变是目前急性髓系白血病细胞中突变率最高的一类基因改变。目前, 已发现的*NPM1*突变的变异体有50余种, 大多数是在外显子12的不同位置上插入不同的核苷酸造成的, 其中最常见的是mutation A(占75%~80%), 即在野生型*NPM1*基因的核苷酸序列上第956~959位上插入一个TCTG而形成串联重复序列。*NPM1*突变后将导致*NPM1*移位形成胞质*NPM1*(cytoplasmic *NPM1*, *NPMc*<sup>+</sup>)<sup>[1]</sup>。临床资料显示, *NPM1*突变容易累及具有临床高浸润特性的粒细胞、单核细胞分化的AML患者<sup>[2]</sup>, 且*NPM1*突变的白血病患者常伴有外周血白细胞和血小板计数高、骨髓原始细胞比例高等白血病髓外浸润特征<sup>[3]</sup>, 提示*NPM1*突变可能参与了白血病细胞髓外浸润过程, 但其具体调控机制目前还不清楚。已知基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在肿瘤细胞的浸润转移过程中发挥重要作用, 其中MMP-2和MMP-9在急性髓系白血病<sup>[4]</sup>和急性淋巴细胞白血病<sup>[5]</sup>中的高表达能够增强白血病细胞髓外浸润转移的能力。为此, 本研究观察MMP-2和MMP-9及其抑制剂

在*NPM1*突变转染的白血病细胞中的改变, 借以探讨MMPs在*NPM1*突变促进白血病细胞体外浸润转移中的重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

质粒提取试剂盒购于Omega公司, xfect<sup>TM</sup>转染试剂、RNA提取试剂、RT-PCR试剂均购于日本TaKaRa公司, 小鼠抗人*NPM1*、MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2单克隆抗体购于美国Santa Cruz公司, 羊抗小鼠IgG等组化试剂购于北京中杉金桥公司, 引物合成购于Invitrogen公司, 胎牛血清、RPMI 1640培养液、G418购于美国Gibco公司。

### 1.2 质粒和细胞系

空载体(pEGFPC1)、含人*NPM1*-mA的表达质粒(pEGFPC1-*NPM1*-mA)由意大利Falini教授惠赠。THP-1细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

收稿日期: 2010-11-02 接受日期: 2011-01-17

国家自然科学基金(No.30872418)和重庆市科委自然科学基金计划(No.2010BB5363)资助项目

\*通讯作者。Tel: 023-68485223, E-mail: cqumszh1@sina.com

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养及筛选稳定转染NPM1-mA的细胞株** (1) 细胞转染及筛选: THP-1细胞用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 U/ml)的RPMI 1640培养液, 于37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养。采用xfect™转染试剂将pEGFPC1-NPM1-mA转染THP-1细胞, 设立pEGFPC1-NPM1-mA转染组(THP-1-mA组)、pEGFPC1转染组及未处理组。转染48 h后以G418(终浓度为400 µg/ml)筛选阳性克隆7 d, 采用有限稀释法筛选获得稳定转染的单克隆细胞, 扩大培养。(2) RT-PCR检测NPM1-mA的mRNA水平: 提取细胞总RNA, 逆转录合成cDNA, 进行PCR检测。NPM1-mA引物序列: 上游引物5'-TGG AGG TGG TAG CAA GGT TC-3'; 下游引物5'-CTT CCT CCA CTG CCA GAC AGA-3', 扩增片段为446 bp。内参β-actin引物序列: 上游引物5'-GCT GTC CCT GTA TGC CTC T-3'; 下游引物5'-GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3', 片段大小为220 bp。PCR扩增条件为94 °C预变性5 min后, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 70 °C 50 s, 循环35次后, 72 °C延伸10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。(3) Western blot检测NPM1-mA的蛋

白水平: 取50 µg细胞蛋白提取液, 用10%的分离胶分离蛋白质, 电转转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉4 °C封闭过夜, 先后与鼠抗人NPM1单克隆抗体(1:200稀释)和羊抗鼠抗体(1:2 000稀释)孵育2 h, 洗涤后用化学发光进行显色。(4) 免疫组化法检测NPM1-mA蛋白的亚细胞定位: 收集THP-1-mA及各对照组细胞, 离心涂片。4%多聚甲醛固定30 min, 0.3% Triton X-100渗透30 min, 山羊血清封闭15 min, 用鼠抗人NPM1单克隆抗体(1:100稀释)4 °C湿盒中孵育过夜, 生物素化二抗工作液37 °C孵育15 min, 滴加S-P/AP室温孵育30 min, ABC显色30 min, 苏木素复染10 s后冲洗晾干, 正置显微镜下观察, 胞浆为红色即为NPM1-mA阳性细胞。

**1.3.2 RT-PCR** 收集对数生长期细胞, 按Trizol说明书操作提取细胞总RNA, 以每组2 µg用于扩增cDNA, 进行RT-PCR反应。PCR扩增条件为: 94 °C预变性5 min后, 94 °C 30 s, 65 °C 30 s (MMP-2)、54 °C 30 s (MMP-9)、50 °C 30 s (TIMP-2)、53 °C 30 s (TIMP-1), 70 °C 50 s, 循环35次后, 72 °C延伸10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。引物扩增序列见表1。

**1.3.3 Western blot** 取50 µg细胞蛋白提取液, 用

表1 扩增基因引物序列

Table1 The sequence of PCR primers for each gene

| 基因      | 上游引物(5'-3')                       | 下游引物(5'-3')                   | 产物长度                   |
|---------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Genes   | Forward primer (5'-3')            | Reverse primer (5'-3')        | Amplified fragment(bp) |
| MMP-2   | AGA TCT TCT TCT TCA AGG ACC GGT T | GGC TGG TCA GTG GCT TGG GGT A | 225                    |
| MMP-9   | CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC        | GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG    | 263                    |
| TIMP-1  | TCA TCA GGG CCA AGT TCG TG        | GAA ACT CCT CGC TGC GGT TGT   | 198                    |
| TIMP-2  | AAG CGG TCA GTG AGA AGG AA        | TCT CAG GCC CTT TGA ACA TC    | 108                    |
| β-actin | GGG AAA TCG TGC GTG ACA           | TCA GGA GGA GCA ATG ATC       | 385                    |

12%的分离胶分离蛋白质, 电转转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2.5 h, 鼠抗人MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2单克隆抗体(1:200稀释)4 °C孵育过夜, 羊抗鼠抗体(1:2 000稀释)37 °C孵育2 h, 洗涤后用化学发光进行显色。采用Quantity One软件对Western blot图像进行分析。计算每一泳道中蛋白质印迹条带的光密度值, 利用公式: 目的蛋白相对含量=目的蛋白条带光密度值/内参蛋白β-actin条带的光密度值, 计算MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白在各组细胞中表达的相对含量。

### 1.4 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 13.0统计软件进行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 携NPM1-mA白血病细胞株的建立

为鉴定目的基因NPM1-mA是否稳定转染于THP-1白血病细胞系, RT-PCR实验结果显示, THP-1-mA组细胞的扩增产物电泳可查见NPM1-mA条带, 与预期产物大小(446 bp)一致, 未处理组及空载体对

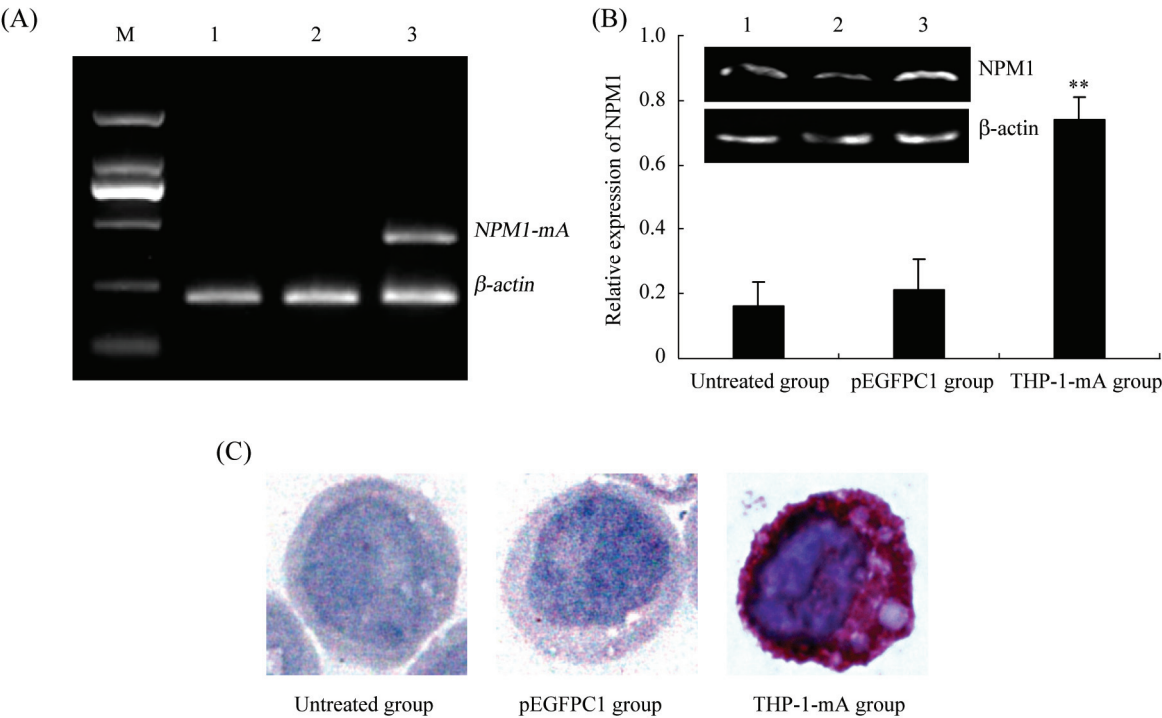


图1 稳定表达NPM1-mA的细胞株鉴定

A: RT-PCR检测白血病细胞*NPM1-mA* mRNA表达。M: DNA marker DL2 000; 1: 未处理组细胞; 2: 空载体转染组细胞; 3: THP-1-mA组细胞; B: Western blot检测白血病细胞NPM1蛋白表达。1: 未处理组细胞; 2: 空载体转染组细胞; 3: THP-1-mA组细胞; \*\* $P<0.01$ , 与pEGFPC1组和未处理组细胞相比; C: 细胞免疫化学检测白血病细胞中NPM1-mA蛋白的胞质定位(APAAP $\times 1\ 000$ )。

Fig.1 Establishing the THP-1-mA cells with stably expressed NPM1-mA protein

A: the expression of *NPM1-mA* mRNA in THP-1 cells. M: DNA marker DL2 000; 1: the untreated group; 2: the pEGFPC1 group; 3: the THP-1-mA group; B: the expression of NPM1 protein in THP-1 cells. 1: the untreated group; 2: the pEGFPC1 group; 3: the THP-1-mA group. \*\* $P<0.01$ , compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group; C: the cytoplasmic localization of NPM1-mA protein in THP-1 cells detected by immunocytochemistry (APAAP $\times 1\ 000$ ).

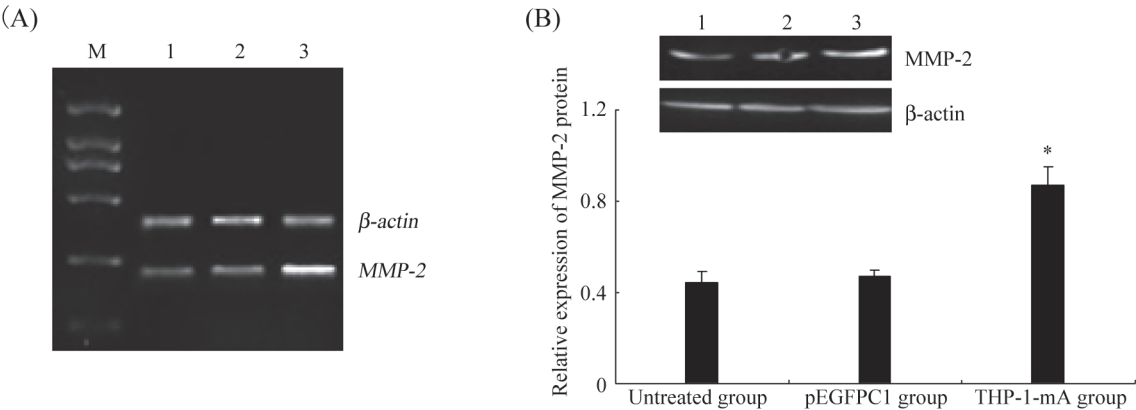


图2 *NPM1-mA*转染后白血病细胞MMP-2的表达

A: *NPM1-mA*转染后白血病细胞MMP-2 mRNA表达; B: *NPM1-mA*转染后白血病细胞MMP-2 蛋白表达。1: 未处理组细胞; 2: 空载体转染组细胞; 3: THP-1-mA组细胞。\* $P<0.05$ , 与pEGFPC1组和未处理组细胞相比。

Fig.2 The expression of MMP-2 in THP-1 cells after *NPM1-mA* transfection

A: the expression of MMP-2 mRNA in THP-1 cells; B: the expression of MMP-2 protein in THP-1 cells. 1: the untreated group; 2: the pEGFPC1 group; 3: the THP-1-mA group. \* $P<0.05$ , compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

照组均未查见该条带(图1A)。Western blot实验结果显示, 采用针对人野生型NPM1蛋白的单抗从各组细胞中均检出NPM1蛋白, 大小约为38 kDa, 与预期蛋白分子量大小相符。与未处理组和空载体对照组相比, THP-1-mA组细胞NPM1蛋白表达量明显增高, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ , 图2B)。同时, 利用细胞免疫化学方法检测NPM1-mA蛋白的亚细胞定位, 结果显示THP-1-mA组细胞表达NPM1突变蛋白, 其阳性结果显示胞浆红色沉淀, 而未处理组和空载体对照组则无胞浆红染现象(图1C)。

## 2.2 NPM1-mA转染对白血病细胞MMP-2表达水平的影响

RT-PCR结果显示, THP-1-mA细胞MMP-2 mRNA表达水平明显高于两对照组, 差异具有统计学意义

( $P<0.01$ , 图2A)。同时, Western blot检测发现THP-1-mA细胞高表达MMP-2蛋白, 与对照组MMP-2蛋白表达的差异具有统计学意义( $P<0.05$ , 图2B)。

## 2.3 NPM1-mA转染对白血病细胞MMP-9表达水平的影响

RT-PCR结果显示, THP-1-mA细胞MMP-9 mRNA表达水平明显高于两对照组, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ , 图3A)。Western blot结果表明, THP-1-mA组细胞MMP-9蛋白表达水平明显低于空载体转染组和未处理组( $P<0.05$ , 图3B)。

## 2.4 NPM1-mA转染对白血病细胞TIMP-1、TIMP-2 mRNA表达水平的影响

利用RT-PCR及Western blot检测TIMP-1、TIMP-2表达水平, 结果发现THP-1-mA组细胞TIMP-1 mRNA

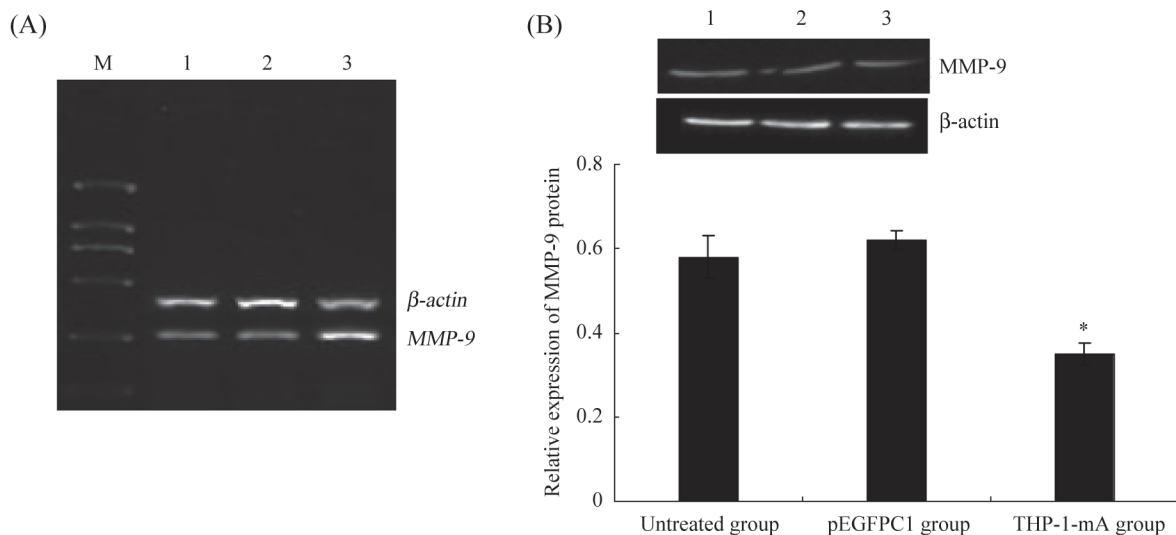


图3 NPM1-mA转染后白血病细胞MMP-9的表达

A: NPM1-mA转染后白血病细胞MMP-9 mRNA表达; B: NPM1-mA转染后白血病细胞MMP-9 蛋白表达。1: 未处理组细胞; 2: 空载体转染组细胞; 3: THP-1-mA组细胞。\* $P<0.05$ , 与pEGFPC1组和未处理组细胞相比。

Fig.3 The expression of MMP-9 in THP-1 cells after NPM1-mA transfection

A: the expression of MMP-9 mRNA in THP-1 cells; B: the expression of MMP-9 protein in THP-1 cells. 1: the untreated group; 2: the pEGFPC1 group; 3: the THP-1-mA group. \* $P<0.05$ , compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

及蛋白表达水平较两对照组无显著性差异( $P>0.05$ , 图4A和图4B)。然而, THP-1-mA组细胞TIMP-2 mRNA及蛋白表达水平较两对照组细胞显著降低, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ , 图4C和图4D)。

## 3 讨论

NPM1突变是目前AML中突变率最高的基因改变, 在AML的发生发展中发挥着重要的调控作用。

本课题组前期研究发现NPM1突变可增强THP-1细胞体外侵袭能力<sup>[6]</sup>, 提示NPM1突变参与调控了白血病细胞的髓外浸润过程, 但其具体作用机制还有待于进一步探讨。肿瘤细胞对细胞外基质的降解是浸润及转移过程中的关键环节, MMPs在此过程中发挥重要作用。因此, 本课题以THP-1细胞作为靶细胞, 初步探讨了MMPs在NPM1突变调控的白血病浸润转移中的作用。

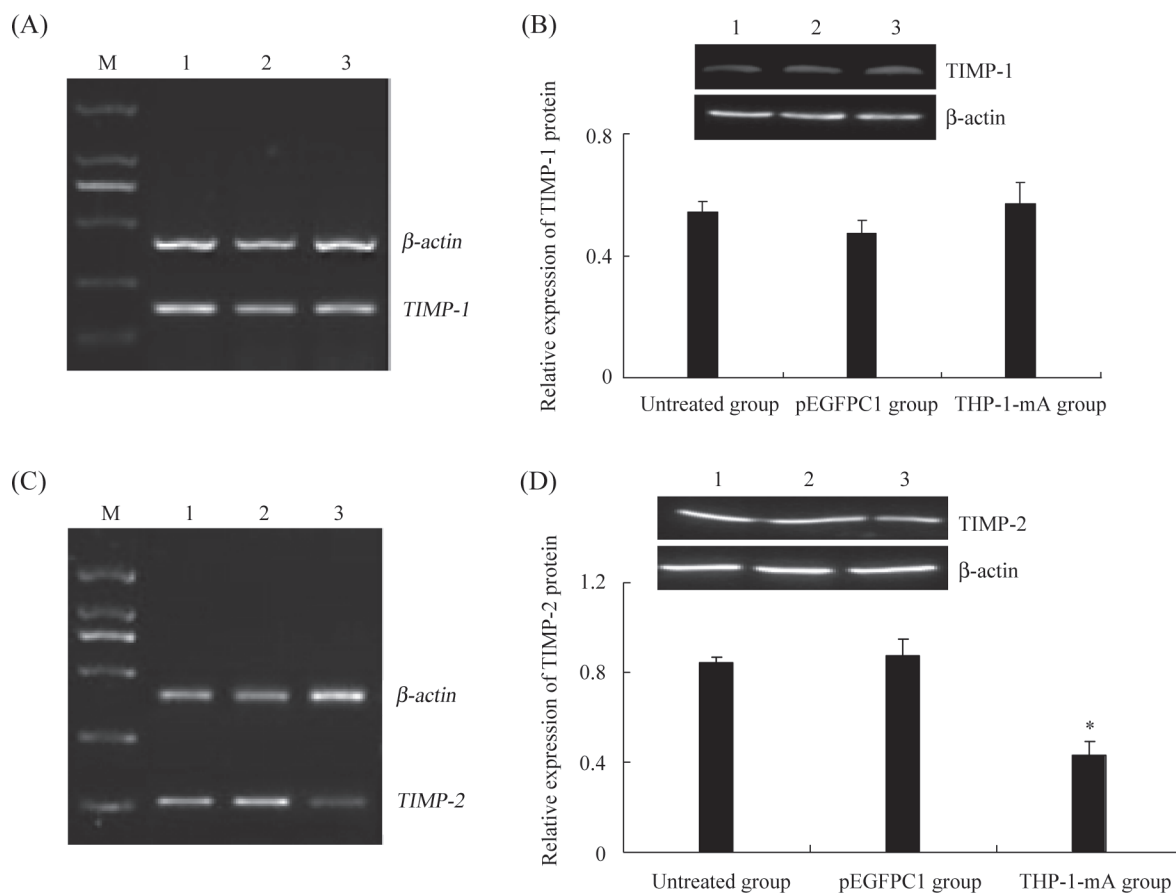


图4 *NPM1-mA*转染后白血病细胞TIMP-1和TIMP-2的表达

A: *NPM1-mA*转染后白血病细胞TIMP-1 mRNA表达; B: *NPM1-mA*转染后白血病细胞TIMP-1蛋白表达水平; C: *NPM1-mA*转染后白血病细胞TIMP-2 mRNA表达; D: *NPM1-mA*转染后白血病细胞TIMP-2蛋白表达水平。1: 未处理组细胞; 2: 空载体转染组细胞; 3: THP-1-mA组细胞。  
\* $P < 0.05$ , 与pEGFPC1组和未处理组细胞相比。

Fig.4 The levels of TIMP-1 and TIMP-2 in THP-1 cells after *NPM1-mA* transfection

A: the expression of TIMP-1 mRNA in THP-1 cells; B: the expression of TIMP-1 protein in THP-1 cells; C: the expression of TIMP-2 mRNA in THP-1 cells; D: the expression of TIMP-2 protein in THP-1 cells. 1: the untreated group; 2: the pEGFPC1 group; 3: the THP-1-mA group. \* $P < 0.05$ , compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

实验中通过基因转染成功构建了稳定表达 *NPM1-mA* 的人白血病细胞株(THP-1-mA)。利用实时荧光定量PCR和Western blot分析了THP-1-mA细胞与亲代细胞之间MMPs表达的差异, 结果显示THP-1-mA组细胞MMP-2表达水平明显高于空载体处理组和未处理组。基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)是一组能特异性抑制MMPs酶活性的内源性低分子量蛋白质, 在肿瘤细胞的浸润转移中同样发挥着重要的调控作用。已知TIMP-2是MMP-2的特异性抑制剂。实验中发现稳定表达 *NPM1-mA* 蛋白的THP-1-mA组细胞中TIMP-2 mRNA及蛋白表达水平明显降低, 提示在 *NPM1* 突变调控白血病细胞体外侵袭的过程中, TIMP-2的

表达下降将解除对MMP2特异性的抑制作用, 导致MMP-2表达的相对增高, 从而增强了THP-1细胞降解细胞外基质的能力。提示MMP-2及其抑制剂TIMP-2在 *NPM1* 突变参与调控的白血病细胞髓外浸润过程中发挥重要的作用。这与Sawicki等<sup>[7]</sup>提出的MMP-2的表达在白血病细胞的体外浸润过程中发挥重要作用的结论相一致。此外, 实验中发现MMP-9 mRNA表达水平有所增高, 但蛋白表达水平反而低于两对照组。而其特异性蛋白抑制剂TIMP-1的mRNA及蛋白表达水平未见明显改变, 提示 *NPM1* 突变基因对MMP-9蛋白的下调作用可能并不是由TIMP-1来介导的。因此, *NPM1* 突变基因转染后MMP-9基因和蛋白水平表达的不一致现象的可能原因以及低水平的

MMP-9在*NPM1*突变参与调控的白血病的髓外浸润过程中的作用还有待进一步的研究。

本课题明确了MMP-2及其抑制剂TIMP-2在*NPM1*突变基因参与调控的白血病浸润转移中发挥重要作用。然而, *NPM1*突变基因调控MMPs、TIMPs表达的具体机制还有待于深入的研究探讨。此外, 体外实验结果还需在临床白血病患者样本中进一步验证, 从而为MMPs及其抑制剂TIMPs在*NPM1*突变的白血病患者的髓外浸润转移中的作用提供更充分的理论依据。

### 参考文献(References)

- 1 Falini B, Sportoletti P, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: Diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. *Curr Opin Oncol* 2009; 21(6): 573-81.
- 2 Meani N, Alcalay M. Role of nucleophosmin in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9(9): 1283-94.
- 3 Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, *et al.* Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358(18): 1909-18.
- 4 Song JH, Kim SH, Cho D, Lee IK, Kim HJ, Kim TS. Enhanced invasiveness of drug-resistant acute myeloid leukemia cells through increased expression of matrix metalloproteinase-2. *Int J Cancer* 2009; 125(5): 1074-81.
- 5 Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50(2): 87-100.
- 6 邵会媛, 苗宗玉, 覃凤娟, 陈先春, 谭诗, 高玉洁, 等. *NPM1*基因突变对急性白血病细胞系体外侵袭能力的影响. *中国细胞生物学学报* 2010; 32(5): 720-5.
- 7 Sawicki G, Matsuzaki A, Janowska-Wieczorek A. Expression of the active form of MMP-2 on the surface of leukemic cells accounts for their *in vitro* invasion. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124(5): 245-52.

## Nucleophosmin Gene Mutations Involved in Leukemic Cell Invasion through MMPs

Hui-Yuan Shao, Zong-Yu Miao, Feng-Xian Qin, Xian-Chun Chen, Shi Tan, Hui-Juan Zhang, Ling Zhang\*

(Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Nucleophosmin (*NPM1*) mutations have been recently identified as the most frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and played an important role in leukemogenesis. To explore the possible molecular mechanisms of *NPM1* mutations in leukemic cell invasion *in vitro*, the pEGFPC1-NPM1-mA plasmid vector with *NPM1* mutation A (NPM1-mA) was transfected into THP-1 cells, and the leukemic cells with stably expressed NPM1-mA protein (THP-1-mA) were established. The expression of *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1* and *TIMP-2* was assayed by RT-PCR and Western blot. Compared with the control groups, there was a higher expression of *MMP-2* in THP-1-mA group, but a lower expression of *MMP-9*. At the same time, in THP-1-mA group, the levels of *TIMP-2* mRNA and protein were significantly decreased, while the expression of *TIMP-1* mRNA and protein was similar to the cells in the control groups. So our findings suggest that *MMP-2* and its inhibitor *TIMP-2* may play a key role in extramedullary infiltration of leukemic cells with *NPM1* mutations.

**Key words** leukemia; nucleophosmin; mutations; cell invasion; MMPs; TIMPs

Received: November 2, 2010 Accepted: January 17, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872418) and the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (No.2010BB5363)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68485223, E-mail: cqumshl@sina.com