

核仁磷酸蛋白基因突变对K562白血病细胞分化的影响

谭诗 张慧娟 王娟 陈莎娜 覃凤娴 陈先春 张伶*

(重庆医科大学检验医学院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 核仁磷酸蛋白基因(nucleophosmin, *NPM1*)突变在急性髓系白血病的发生发展中发挥着重要作用, 而与白血病分化阻滞的关系尚未完全阐明。为探讨*NPM1*基因突变对白血病细胞体外分化的影响, 将携带*NPM1* A型突变(*NPM1-mA*)的表达质粒载体pEGFPC1-*NPM1-mA*转染白血病K562细胞系, 构建稳定表达*NPM1-mA*蛋白的细胞株(K562 mA), 同时设立野生型*NPM1*转染组(K562 wt)、空载体转染组(K562 C1)和未处理组(K562)为对照。利用豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)诱导各组细胞分化, 瑞氏-吉姆萨染色观察细胞分化的形态改变, 计算诱导分化率; 相差显微镜计数贴壁细胞数量; 流式细胞术分析细胞表面分化抗原CD41的表达。结果显示, PMA作用72 h后, 与对照组相比, K562 mA组细胞的诱导分化率及贴壁细胞数明显降低($P<0.05$); 同时, CD41的表达受到显著抑制($P<0.01$)。提示*NPM1*基因突变能够阻滞白血病细胞系K562的体外分化。

关键词 白血病; *NPM1*突变; 细胞分化; K562细胞系

白血病是造血系统恶性克隆性疾病, 骨髓造血细胞分化成熟障碍、正常造血功能减退是其重要特征。近年来发现, 核仁磷酸蛋白基因(nucleophosmin, *NPM1*)突变为急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)发生的起始事件之一^[1], 可通过多种途径参与调控白血病细胞的恶性增殖、凋亡及体外侵袭等^[2-5]。然而, *NPM1*突变与白血病细胞的分化阻滞鲜有报道。目前认为, 五十余种*NPM1*基因突变异构体中以A型突变(*NPM1-mA*)最为常见(约占75%)。*NPM1-mA*是在野生型*NPM1*核苷酸序列的第956-959位插入TCTG四个核苷酸而形成串联重复序列, 从而在*NPM1*突变蛋白的C端形成一个额外的核输出信号, 导致主要定位于核仁中的*NPM1*蛋白移位, 形成胞质*NPM1*(cytoplasmic *NPM1*, *NPMc*⁺), *NPMc*⁺是AML患者重要的病理特征^[6]。深入研究发现, *NPMc*⁺白血病细胞具有独特的细胞分子生物学特征, 主要包括CD34低表达、调控胚胎发育及细胞分化的同源盒基因家族(HOX)高表达等^[7-9], 提示*NPM1*突变可能参与了调控白血病细胞的分化阻滞。因此, 本研究拟通过构建稳定表达*NPM1* A型突变体(*NPM1-mA*)的白血病细胞株(K562 mA), 观察*NPM1*突变对白血病细胞髓系分化的影响, 以期阐明*NPM1*突变在白血病发生发展中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

Lipofectamine™ 2000转染试剂、Opti-MEM培养基购于美国Invitrogen公司, 引物由美国Invitrogen公司合成, RNA提取试剂TRIzol、RT-PCR试剂盒购于日本TaKaRa公司, RPMI 1640培养液、G418购于美国Gibco公司, 小鼠抗人*NPM1*单克隆抗体购于美国Santa Cruz公司, 兔抗人H2A.X购于美国Cell Signaling公司, 兔抗人 β -actin、山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG、SP免疫组化检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 胎牛血清购于上海依科赛生物制品有限公司, 藻红蛋白PE标记的鼠抗人CD41抗体及同型对照购于北京四正柏生物科技有限公司, 豆蔻酰佛波醇乙酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、胞浆核蛋白提取试剂盒购于Beyotime公司, 瑞氏-吉姆萨(Wright-Giemsa)染液购于南京凯基生物科技发展有限公司, Pro-light HRP化学发光检测试剂盒购于美国Millipore公司。

1.2 质粒及细胞系

空载体(pEGFP-C1)、人*NPM1* A型突变重组质

收稿日期: 2012-05-04 接受日期: 2012-05-31

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: lingzhang@cqmu.edu.cn

粒(pEGFPC1-*NPM1-mA*)及人NPM1野生型重组质粒(pEGFPC1-*NPM1-wt*)均由意大利Perugia大学Falini教授惠赠。人慢性粒细胞白血病细胞系K562购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,由本室常规保存。

1.3 实验方法

1.3.1 构建稳定表达NPM1-mA的K562细胞株 K562细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液培养于含5% CO₂、37 °C恒温培养箱中,取对数生长期的细胞用于后续实验。将K562细胞接种于12孔板中,每孔4×10⁵个,1 000 r/min离心,采用Lipofectamine™ 2000转染试剂将质粒转染入K562细胞,设立pEGFPC1-*NPM1-mA*转染组(K562 mA)、pEGFPC1-*NPM1-wt*转染组(K562 wt)、空载体pEGFP-*C1*转染组(K562 C1)及未处理组(K562)。转染48 h后以G418(终浓度为600 mg/L)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。

1.3.2 RT-PCR 收集各组细胞,TRIzol抽提细

胞总RNA,反转录合成cDNA,进行PCR检测。以人β-actin为内参,RT-PCR法分别检测各组细胞中突变*NPM1(NPM1-mA)*的表达。根据GenBank上发布的*NPM1-mA*基因序列(No.AY740634)设计特异性扩增引物(表1),*NPM1-mA*突变位点在引物序列中的位置以下划线表示。PCR反应条件均为:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸50 s,循环35次;72 °C充分延伸10 min。PCR扩增产物进行凝胶电泳检测,采用凝胶图像分析系统进行分析。

1.3.3 Western blot 收集对数生长期细胞,按说明书操作,分别提取细胞胞浆及胞核蛋白,Bradford法测蛋白质浓度。取50 μg细胞蛋白提取液,用12%的分离胶分离蛋白质,通过半干转膜仪将蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭5 h,与鼠抗人NPM1单克隆抗体(1:200稀释)4 °C孵育过夜后,与二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG,1:1 000稀释)室温孵育1.5 h,TBST洗涤后用化学发光法进行显色。以β-actin及H2A.X分别作为胞浆与细胞核蛋白内参。

表1 扩增基因引物序列
Table 1 The sequence of PCR primers for each gene

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	PCR产物长度(bp)
Genes	Forward primers(5'-3')	Reverse primers(5'-3')	Amplified fragments(bp)
<i>NPM1-mA</i>	TGG AGG TGG TAG CAA GGT TC	CTT CCT CCA CTG C <u>CA GAC</u> AGA	446
<i>β-actin</i>	TAG TTG CGT TAC ACC CTT TCT TG	TGC TGT CAC CTT CAC CGT TC	156

采用Quantity One软件对Western blot条带进行分析。

1.3.4 NPM1-mA蛋白的亚细胞定位 (1)细胞免疫化学法:收集各组细胞,0.01 mol/L PBS洗涤3次,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,苏木素对比染色10 s后冲洗晾干,显微镜下观察,胞浆中出现红色颗粒者即为NPM1-mA阳性细胞;(2)荧光显微镜观察K562 mA组和K562 wt组细胞中绿色荧光蛋白GFP的定位情况。

1.3.5 Wright-Giemsa染色观察细胞的分化形态 收集经50 nmol/L PMA处理72 h前后的各组细胞,0.01 mol/L PBS洗涤2次,涂片并自然干燥,Wright-Giemsa染色5 min,双蒸水漂洗,乙醇分色,晾干后光学显微镜下观察细胞形态。每张涂片计数200个细胞,细胞形态

发生改变、核分叶或胞浆出现空泡者确定为分化细胞,计算诱导分化率,公式为:诱导分化率(%)=(已分化细胞数/200)×100%,比较各组细胞诱导分化率的改变。

1.3.6 倒置相差显微镜观察细胞贴壁情况 倒置相差显微镜观察各组细胞在50 nmol/L PMA处理72 h前后的贴壁情况。小心倒掉上清,去除悬浮或贴壁不牢的细胞,胰酶消化2 min,离心收集细胞,计数各组中贴壁的细胞数。

1.3.7 流式细胞仪检测CD41的表达 收集50 nmol/L PMA处理72 h前后的各组细胞,制成(1×10⁶~2×10⁶)/mL单细胞悬液,预冷的0.01 mol/L PBS(含0.2%的牛血清白蛋白BSA)洗涤2次,1 000 r/min、离心5 min,与PE标记的鼠抗人CD41抗体4 °C暗盒孵育30 min,0.01 mol/L PBS洗涤2次后经流式细胞仪进行检测。

1.4 统计学处理

应用SPSS 13.0统计学软件进行结果分析。实

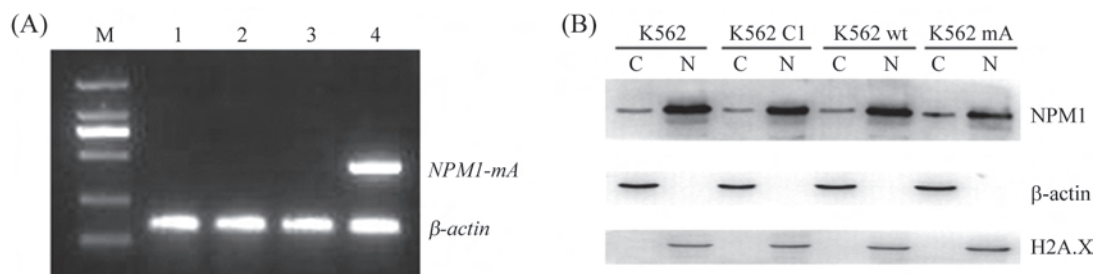
验结果的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据之间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达NPM1-mA白血病细胞株(K562 mA)的构建

2.1.1 稳定表达NPM1-mA基因及蛋白 RT-PCR

扩增各组细胞中的NPM1-mA基因,在K562 mA组中可见NPM1-mA条带,大小约446 bp,与预期产物大小一致。未处理组、空载体转染组及野生型NPM1转染对照组均未出现该条带(图1A)。Western blot结果显示,与对照组相比, K562 mA组细胞中胞浆NPM1蛋白表达量明显增加,同时伴有细胞核NPM1蛋白的下降,差异具有统计学意义($P<0.05$,图1B)。

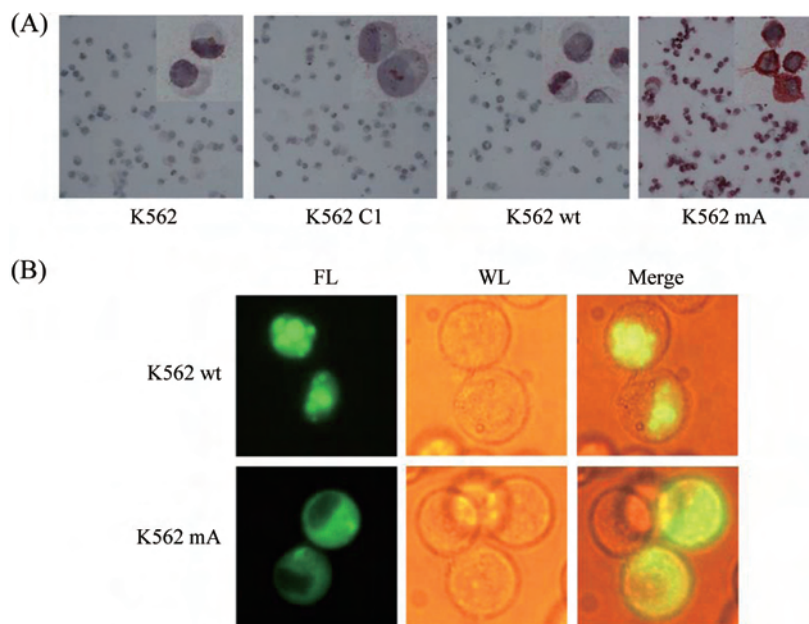


A: RT-PCR检测各组细胞NPM1-mA mRNA的表达情况; M: DNA marker DL2 000; 1: 未处理组细胞(K562); 2: 空载体转染组细胞(K562 C1); 3: NPM1野生组细胞(K562 wt); 4: NPM1突变组细胞(K562 mA); B: Western blot检测各组细胞胞浆及胞核中NPM1蛋白的表达, β -actin及H2A.X分别为胞浆、胞核蛋白的上样内参; C: 胞浆; N: 胞核。

A: the expression of NPM1-mA mRNA was detected by RT-PCR; M: DNA marker DL2 000; 1: K562; 2: K562 C1; 3: K562 wt; 4: K562 mA; B: the expression of NPM1-mA protein in the cytoplasm of K562 mA. Expression levels of β -actin and H2A.X served as the loading controls for the cytosolic and nuclear extracts, respectively; C: cytosolic; N: nuclear.

图1 各组K562细胞中NPM1-mA基因和蛋白的表达

Fig.1 The mRNA and protein expression of NPM1-mA in different groups of K562 cells



A: 细胞免疫化学检测各组细胞中NPM1-mA蛋白的细胞质定位(100 $\times$); B: 荧光显微镜观察NPM1-wt蛋白及NPM1-mA蛋白的亚细胞定位情况(400 $\times$); FL: 荧光; WL: 白光。

A: the cytoplasmic localization of NPM1-mA protein was detected by immunocytochemistry(100 $\times$); B: the sub-cellular localization of NPM1-wt and NPM1-mA proteins was observed by fluorescence microscopy(400 $\times$); FL: fluorescent light; WL: white light.

图2 各组K562细胞中NPM1-mA蛋白的亚细胞定位

Fig.2 The sub-cellular localization of NPM1-mA protein in different groups of K562 cells

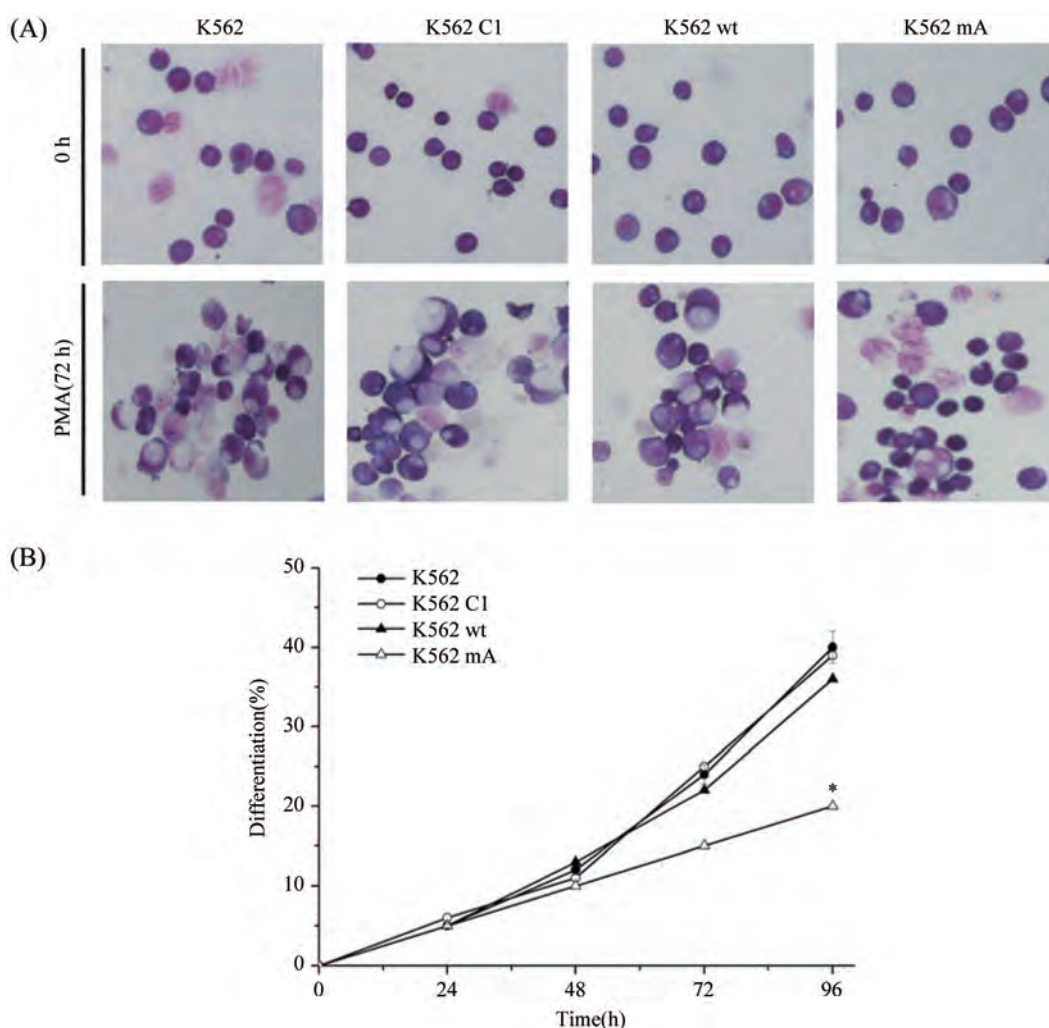
2.1.2 NPM1-mA蛋白的亚细胞定位 细胞免疫化学检测NPM1-mA蛋白的亚细胞定位, 结果显示, K562 mA组细胞胞浆中存在大量红色颗粒, 而三个对照组细胞中均无胞浆红染现象(图2A)。进一步通过荧光显微镜对比NPM1突变型蛋白(NPM1-mA)及NPM1野生型蛋白(NPM1-wt)在细胞中的定位情况, 发现NPM1野生型蛋白主要定位于细胞核, 而NPM1-mA蛋白移位到胞浆中(图2B)。

2.2 NPM1-mA对白血病细胞体外分化的影响

2.2.1 NPM1-mA对K562细胞形态的影响 Wright-Giemsa染色观察PMA诱导前后各组细胞形态的改变, 结果发现, 经50 nmol/L PMA诱导72 h后, 各组细胞出

现不同程度的巨核细胞分化特征, 表现为细胞体积增大、核分叶、胞浆中出现空泡等。其中, K562 mA组细胞分化特征的改变明显不如各对照组(图3A)。此外, 与对照组相比, K562 mA组的诱导分化率明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图3B)。

2.2.2 NPM1-mA对K562细胞贴壁率的影响 经50 nmol/L PMA诱导72 h后, 各组细胞贴壁率均增多, 细胞开始变形(呈梭形、多边形)、伸出伪足, 而K562 mA组贴壁细胞形态改变明显不如对照组(图4A)。计算贴壁率发现, K562 mA组细胞为21%, 明显低于其他三个对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图4B)。

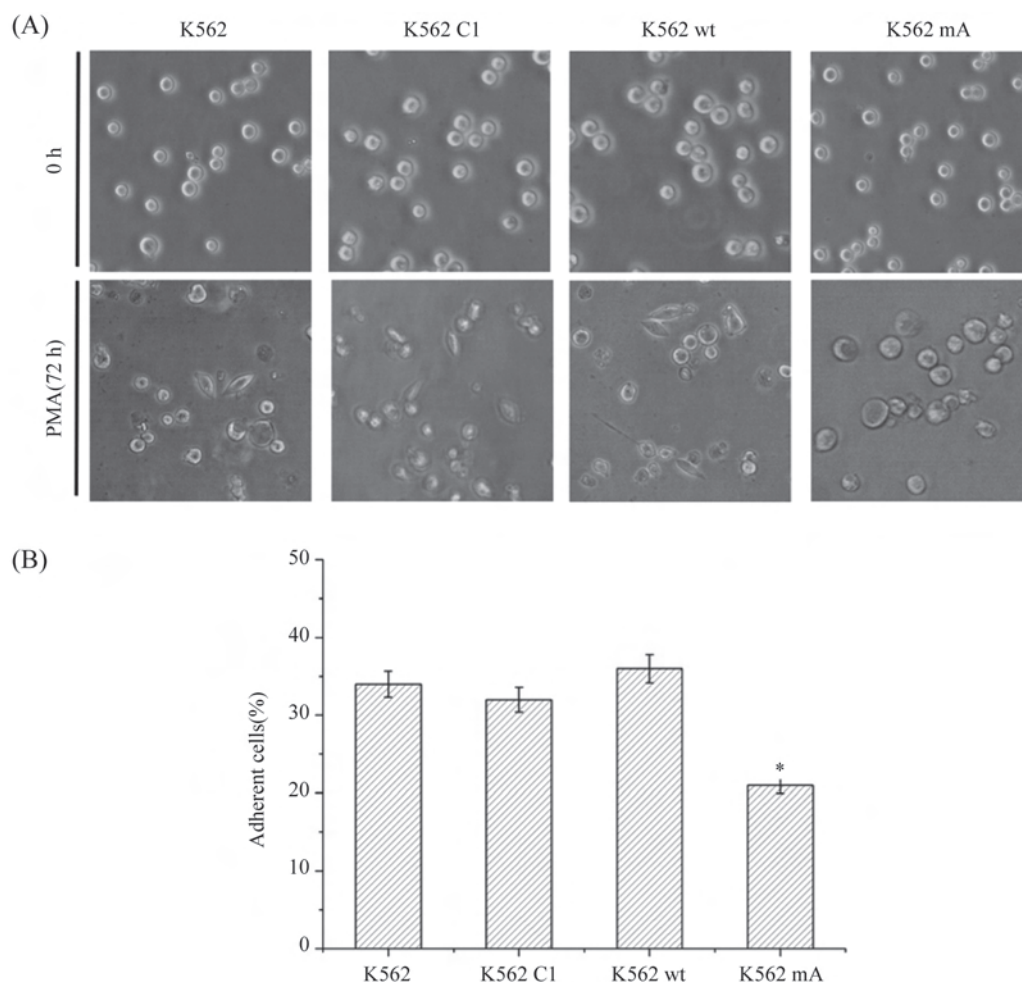


A: Wright-Giemsa染色检测PMA诱导72 h前后各组细胞的形态改变; B: PMA作用后各组细胞诱导分化率的改变; * $P<0.05$, 与其他三组比较。

A: PMA-induced megakaryocytic differentiation was detected by Wright-Giemsa staining for cytological changes; B: the changes in the percentage of differentiated cells after PMA treatment; * $P<0.05$ compared with other three groups.

图3 NPM1-mA阻滞PMA诱导的K562细胞分化改变

Fig.3 NPM1-mA suppresses the cytological changes of K562 cells induced by PMA treatment



A: 倒置相差显微镜观察50 nmol/L PMA作用72 h前后各组中贴壁细胞的形态改变; B: PMA诱导72 h后各组细胞的贴壁率; * $P < 0.05$, 与其他三组比较。

A: the morphological changes of adherent cells were examined by phase contrast microscopy after 50 nmol/L PMA treatment for 72 h; B: the percentage of adherent cells after PMA treatment; * $P < 0.05$ compared with other three groups.

图4 NPM1-mA阻滞PMA诱导的K562细胞贴壁

Fig.4 NPM1-mA inhibites the PMA-induced adhesion of K562 cells

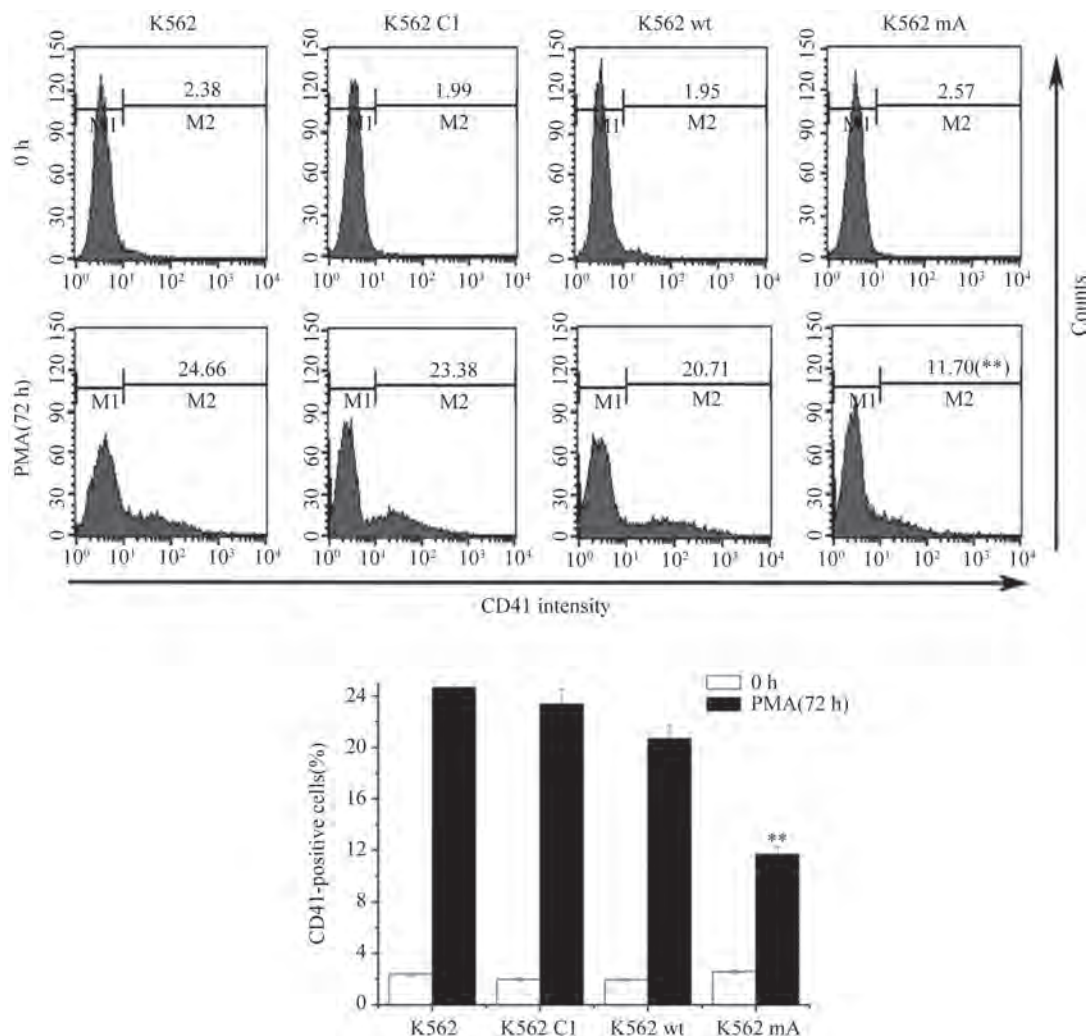
2.2.3 NPM1-mA对K562细胞分化抗原CD41表达的影响 流式细胞仪检测PMA诱导前后各组细胞中CD41的表达情况, 结果显示, 经50 nmol/L PMA诱导72 h后, K562 mA组表面分化抗原CD41阳性细胞的百分比为11.70%, 明显低于其他三组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 图5)。

3 讨论

NPM1基因突变可累及1/3的成人AML患者^[10], 是目前AML中发生频率最高的基因异常改变, 对白血病细胞的恶性转化具有重要的调控作用。本课题组前期研究发现, NPM1突变可抑制白血病细胞的凋亡, 促进其增殖及体外侵袭^[5]。然而, NPM1突变在

白血病细胞分化阻滞中的作用尚未完全阐明。因此, 本研究在前期基础上进一步探讨了NPM1突变对白血病细胞体外分化能力的影响。

近年来发现, NPM1突变主要累及早期的白血病细胞, 作为一个重要的起始因素参与调控白血病的发生发展。本研究选择较早期且具有多向诱导分化能力的CML(chronic myelocytic leukemia)急变期细胞系K562作为研究模型, 初步探讨突变NPM1对白血病细胞体外分化的阻滞作用。构建了稳定表达NPM1-mA的白血病细胞株, 同时设立野生型NPM1转染组(K562 wt)为对照, 从而针对性探讨胞浆突变型NPM1对白血病分化的影响。由于目前市场上没有针对NPM1突变蛋白的单克隆抗体销售, 故实验



PMA诱导前后各组细胞CD41的表达情况。** $P < 0.01$, 与其他三组相比。

The expression of specific surface marker CD41 was detected by flow cytometry after PMA treatment. ** $P < 0.01$ compared with other three groups.

图5 NPM1-mA抑制K562细胞CD41的表达

Fig.5 NPM1-mA inhibits the expression of CD41 on K562 cells

中利用针对NPM1 N端的通用型抗体, 分别检测胞浆及胞核提取物中NPM1蛋白的表达。Western blot结果发现, K562 mA组胞浆中NPM1(即突变的NPM1)蛋白表达明显增多, 提示NPM1-mA成功转染并移位表达于胞浆中。由于NPM1蛋白为穿梭蛋白, 可穿梭于核仁、核质、细胞质中^[11], 因此, 在三个对照组胞浆中也存在少量的NPM1蛋白表达。此外, 我们在实验中发现, 与三个对照组相比, K562 mA细胞中细胞核NPM1蛋白的表达量有所降低, 这可能是由于突变的NPM1蛋白能与野生型NPM1形成异二聚体, 从而将野生型NPM1带出细胞核, 使其定位于胞浆^[12], 此现象进一步提示, K562 mA细胞表达NPM1突变蛋白。进一步通过免疫组化证实NPM1-mA的异常胞

浆定位。此外, 由于实验所用的表达载体pEGFPC1-NPM1-mA及pEGFPC1-NPM1-wt可融合表达EGFP-NPM1-mA及EGFP-NPM1-wt蛋白^[10], 故可以直接通过观察绿色荧光的位置来比较突变NPM1蛋白与野生型NPM1蛋白不同的亚细胞定位情况, 结果发现, NPM1-wt主要定位于细胞核, 而NPM1-mA移位到胞浆中。

已知PMA可诱导K562细胞向巨核细胞系分化, 形态学上表现为细胞体积增大、伸出伪足、出现分叶核、胞浆空泡化以及获得黏附特性等; 除此之外, 巨核细胞系特异性分化标志物CD41的表达增高^[13]。我们的实验结果显示, 以PMA作为诱导分化剂处理24 h后, 各组细胞开始贴壁生长, 细胞中出现少量的

空泡, 继续处理至72 h, 发现K562 mA组细胞分化的形态学变化不如对照组显著, 诱导分化率及贴壁率的增加程度与对照组相比也明显降低。同时, 流式检测细胞表面抗原CD41发现, PMA处理前各组细胞不表达CD41; PMA作用72 h后, 各组细胞均开始表达CD41, 而K562 mA组中CD41阳性细胞所占百分比与对照组相比明显减少, 即CD41的表达受到显著抑制。以上结果均表明PMA在K562 mA组细胞中的诱导分化效应受到抑制, 提示NPM1突变能够明显抑制PMA诱导的K562细胞分化, 其潜在的分子机制可能与NPM1突变后增强调控造血细胞分化的HOX基因家族如HOXA9、HOXA10及髓系亲嗜性白血病病毒整合位点(myeloid ecotropic leukemia integration site-1, Meis1)的表达有关^[14]。Leong等^[15]提出突变的胞浆NPM1蛋白能直接与活化的caspase-6/8结合, 特异地抑制caspase-6/8的活性, 进而阻止急性髓系白血病细胞株HL60的髓系分化。随后, Balusu等^[16]研究发现, 干扰NPM1的表达能促使OCI/AML3(携带NPM1突变的白血病细胞株)向粒系分化。因此, 结合本研究结果, NPM1突变在白血病细胞的体外分化受阻中发挥了重要的调控作用, 当然, 这还有待于在临床患者标本及更多的白血病细胞系中加以验证, 而且其中的分子机制也有待于进一步阐明。

综上所述, 本研究证实了NPM1突变能够阻滞白血病细胞的体外分化, 为NPM1突变促进白血病的发生提供了潜在的理论依据, 下一步工作将深入探讨胞浆NPM1突变蛋白调控白血病细胞分化阻滞的具体分子机制。此外, 针对NPM1突变的靶向诱导分化治疗也是今后值得进一步研究的方向。

参考文献 (References)

- Vassiliou GS, Cooper JL, Rad R, Li J, Rice S, Uren A, *et al.* Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. *Nat Genet* 2011; 43(5): 470-5.
- Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J Cell Biol* 2008; 182(1): 19-26.
- Cheng K, Sportoletti P, Ito K, Clohessy JG, Teruya-Feldstein J, Kutok JL, *et al.* The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model. *Blood* 2010; 115(16): 3341-5.
- Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, Majid S, Bernardi R, Sportoletti P, *et al.* The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence. *Oncogene* 2007; 26(53): 7391-400.
- 邵会媛, 苗宗玉, 覃凤娟, 陈先春, 谭诗, 张慧娟, 等. NPM1突变基因通过MMPs参与调控白血病细胞体外侵袭. *中国细胞生物学学报*(Shao Huiyuan, Miao Zongyu, Qin Fengxian, Chen Xianchun, Tan Shi, Zhang Huijuan, *et al.* Nucleophosmin gene mutations involved in leukemic cell invasion through MMPs. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2011; 33(6): 645-50.
- Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, *et al.* Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: Molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 2009; 23(10): 1731-43.
- Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, *et al.* Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 2005; 106(3): 899-902.
- Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, *et al.* Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* 2010; 115(10): 1976-84.
- Nomdedeu J, Bussaglia E, Villamor N, Martinez C, Esteve J, Tormo M, *et al.* Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: Prognostic impact of the leukemic compartment size. *Leuk Res* 2011; 35(2): 163-8.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352(3): 254-66.
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 1989; 56(3): 379-90.
- den Besten W, Kuo ML, Williams RT, Sherr CJ. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle* 2005; 4(11): 1593-8.
- Chang YI, Hua WK, Yao CL, Hwang SM, Hung YC, Kuan CJ, *et al.* Protein-arginine methyltransferase 1 suppresses megakaryocytic differentiation via modulation of the p38 MAPK pathway in K562 cells. *J Biol Chem* 2010; 285(27): 20595-606.
- Fujino T, Yamazaki Y, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Hirokawa K, *et al.* Inhibition of myeloid differentiation by Hoxa9, Hoxb8, and Meis homeobox genes. *Exp Hematol* 2001; 29(7): 856-63.
- Leong SM, Tan BX, Bte Ahmad B, Yan T, Chee LY, Ang ST, *et al.* Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition. *Blood* 2010; 116(17): 3286-96.
- Balusu R, Fiskus W, Rao R, Chong DG, Nalluri S, Mudunuru U, *et al.* Targeting levels or oligomerization of nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1. *Blood* 2011; 118(11): 3096-106.

Effect of Nucleophosmin (*NPM1*) Mutations on the Differentiation of K562 Leukemic Cells

Tan Shi, Zhang Huijuan, Wang Juan, Chen Shana, Qin Fengxian, Chen Xianchun, Zhang Ling*

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

Abstract Nucleophosmin (*NPM1*) mutations play important roles in the leukemogenesis, whereas the relationship between *NPM1* mutations and the differentiation block of leukemic cells have not yet been elucidated. To explore the effect of *NPM1* mutations on the *in vitro* differentiation of leukemic cells, the plasmid pEGFPC1-*NPM1-mA* carrying *NPM1* mutation A (*NPM1-mA*) was transfected into K562 cells, and the leukemic cells with stably expressed *NPM1-mA* protein (K562 mA) were established. The K562 cells transfected with pEGFPC1-*NPM1-wt* (K562 wt), pEGFP-*C1* (K562 C1) and the untreated cells (K562) were used as control. After induction with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), the morphological changes of cells were observed under light microscope following Wright-Giemsa staining and the differentiation rate was estimated. Adherent cells were examined by phase contrast light microscopy. The expressions of surface marker CD41 were analyzed by flow cytometry. Compared with the control groups, the differentiation rates and the percentage of adherent cells in K562 mA group decreased obviously after PMA treatment for 72 h ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression of CD41 was inhibited significantly in K562 mA group ($P < 0.01$). Our data indicate that *NPM1* mutations block differentiation of K562 leukemic cells *in vitro*.

Key words leukemia; *NPM1* mutations; cell differentiation; K562 cell line

Received: May 4, 2012 Accepted: May 31, 2012

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

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485223, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn