

NPM1 基因突变对急性白血病细胞系体外侵袭能力的影响

邵会媛 苗宗玉 覃凤娴 陈先春 谭诗 高玉洁 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 核仁磷酸蛋白基因(nucleophosmin, *NPM1*)突变是目前急性髓系白血病发生突变率最高的基因改变, 与白血病的发生发展密切相关。为探讨*NPM1*突变对白血病细胞体外侵袭能力的影响, 将载体pEGFPC1-NPM1-mA转染THP-1白血病细胞系, 筛选稳定表达NPM A型突变蛋白(NPM1-mA)的白血病细胞株(THP-1-mA)。通过transwell迁移实验、Matrigel侵袭实验以及细胞粘附实验来观察THP-1-mA细胞体外浸润转移能力的改变。结果发现, THP-1-mA细胞的体外迁移能力和侵袭能力明显高于亲代THP-1细胞; 此外, THP-1-mA细胞对纤维连接蛋白的粘附能力也显著高于THP-1细胞。因此, 我们的研究结果提示, *NPM1*突变可增强白血病细胞的体外侵袭能力, 这有利于进一步明确*NPM1*突变基因在白血病细胞恶性转化中的调控作用。

关键词 白血病; 核仁磷酸蛋白; 基因突变; 细胞侵袭

核仁磷酸蛋白基因(nucleophosmin, *NPM1*)突变由意大利学者 Falini^[1]最先在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者中发现, 是目前 AML 细胞中发生突变频率最高的基因改变^[2]。*NPM1*突变后将导致 NPM 蛋白 C 端形成一个新的核输出信号, 使定位于核内的 NPM 蛋白移位形成胞质 NPM (cytoplasmic NPM, NPMc⁺)^[3]。NPMc⁺ AML 细胞具有独特的细胞分子生物学特征^[4], 2008 年版髓系肿瘤 WHO 分型把 NPMc⁺ AML 亚群作为一种新的 provisional entity 收录^[5]。已有研究表明, *NPM1*突变可通过减弱抑癌蛋白 ARF 活性^[6]、增强癌蛋白 c-myc 的稳定性^[7]、与癌基因 *EIA* 协同作用^[8]等多种方式抑制细胞凋亡, 促进细胞恶性增殖, 参与调控白血病的发生。已知白血病细胞恶性克隆增殖后可突破髓血屏障释放入血, 导致髓外各种组织器官的播散和浸润转移。那么, *NPM1*基因突变除了促进细胞恶性增殖之外, 是否还参与了白血病细胞的髓外浸润这一病理过程? 临床统计资料显示, 尽管 *NPM1*突变可累及 AML 的各 FAB 亚型, 但是具有临床高浸润特性的粒、单核分化的髓系白血病患者中 *NPM1*突变的发生尤其显著^[9], 提示 *NPM1*突变与白血病细胞的髓外浸润特性可能有着潜在的相关性。

目前 *NPM1*突变的变异体有 50 余种, 其中最常见的是 mutation A (NPM1-mA)^[10]。因此, 本研究拟通过稳定转染 *NPM1-mA*, 观察 *NPM1*突变对急性单核细胞

白血病 THP-1 细胞系体外侵袭能力的影响, 初步探讨 *NPM1*突变在白血病细胞浸润转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

限制性内切酶 *Bsp*EI、*Eco*RI, *xfect*TM 转染试剂、RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒、引物合成均购于日本 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒购于 Omega 公司; 胎牛血清、RPMI 1640 培养液、G418 购于美国 Gibco 公司; 小鼠抗人 NPM 单抗购于美国 Santa Cruz 公司; 羊抗小鼠 IgG 等组化试剂购于北京中杉金桥公司; MTT、二甲基亚砜、人纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、BSA 购于 Sigma 公司; transwell 小室购于 Millpore 公司; Matrigel 胶购于 R&D 公司。

1.2 质粒和细胞系

空载体(pEGFPC1)、含人 *NPM1-mA* 的重组质粒(pEGFPC1-NPM1-mA)由意大利 Falini 教授惠赠, THP-1 细胞购自上海生命科学院细胞库。

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

收稿日期: 2010-07-14 接受日期: 2010-08-17

国家自然科学基金 (No.30872418)资助项目

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

株 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℃, 5% CO₂ 培养箱中进行培养。采用 xfectTM 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。

1.3.2 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 引物序列为: 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℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 70℃ 50 s, 循环 35 次后, 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 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, 湿转转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 先后与鼠抗人 NPM 单克隆抗体(1: 200 稀释)和羊抗鼠抗体(1: 2 000 稀释)孵育 2 h, 洗涤后用化学发光法进行显色。

1.3.4 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 NPM 单克隆抗体(1:100 稀释)4℃ 湿盒中孵育过夜, 生物素化二抗工作液 37℃ 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。

1.3.5 细胞生长曲线 收集对数生长期细胞, 以每孔 1×10³/200 μl 接种 96 孔板, 每组设 5 个复孔, 5% CO₂, 37℃ 孵育, 培养第 0、1、2、3、4、5 d 时计数各培养孔细胞总数。实验重复 3 次, 以时间为横坐标, 每组细胞总数均值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.3.6 细胞体外迁移实验 收集对数生长期细胞, 用无血清 RPMI 1640 培养液重悬细胞, 将 transwell 小室放入 24 孔培养板, 上室加入 5×10⁴/200 μl 细胞悬液, 下室加入 500 μl 含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养

液, 每组设 3 个复孔。置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 计数迁移到下室中的细胞数量。实验重复 3 次。

1.3.7 细胞体外侵袭实验 用无血清 RPMI 1640 培养液适当稀释 Matrigel, 取 30 μl Matrigel 稀释液均匀包被 transwell 小室, 4℃ 过夜。收集对数生长期细胞, 用无血清 RPMI 1640 培养液重悬细胞, 将 transwell 小室放入 24 孔培养板, 上室加入 5×10⁴/200 μl 细胞悬液, 下室加入 500 μl 含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 每组设 3 个复孔。置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 计数侵袭到下室中的细胞数量。实验重复 3 次。

1.3.8 细胞体外粘附实验 用无血清 RPMI 1640 培养液适当稀释 FN, 终浓度为 30 μg/ml, 取 50 μl FN 稀释液均匀包被 96 孔细胞培养板, 4℃ 过夜。弃培养板中剩余液体, 每孔加入 50 μl 2% BSA, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。收集对数生长期细胞, 用含 1% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液重悬细胞, 每孔加入 5×10⁴/100 ml 细胞悬液。另设空白对照孔, 只加等量的培养液不加细胞。每组设 5 个复孔, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 1 h, 弃培养液, PBS 洗 3 次, 除去未粘附细胞, 加 MTT 液(5 mg/ml)20 μl, 继续培养 4 h, 弃培养液, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜, 振荡 10 min, 在酶联免疫检测仪 D490nm 处测量各孔的吸光度值(A 值)。间接计数粘附细胞数。按以下公式计算细胞粘附率: 细胞粘附率 = [(实验组 A 值 - 空白对照组 A 值)/(未处理组 A 值 - 空白对照组 A 值)] × 100%。实验重复 3 次。

1.4 统计学分析

计量资料用表示, 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(THP-1-mA)的建立

2.1.1 THP-1-mA 细胞稳定表达 NPM1-mA 基因和蛋白 为鉴定目的基因 NPM1-mA 是否稳定转染于白血病细胞, RT-PCR 实验结果显示, THP-1-mA 组细胞的扩增产物电泳可见 NPM1-mA 条带, 与预期产物大小(446 bp)一致, pEGFPC1 转染组及未处理组均未见该条带。内参 β-actin 的条带(220 bp)位置正确(图 1A)。Western blot 实验结果显示, 采用针对人野生型 NPM 蛋白的单抗从各组细胞中均检出 NPM 蛋白,

大小约为 38 kDa, 与预期蛋白分子量大小相符。与 pEGFPC1 转染组及未处理组相比, THP-1-mA 组细胞 NPM 蛋白表达量明显增高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 而两对照组间 NPM 表达量无明显差别 ($P>0.05$)(图 1B)。

2.1.2 THP-1-mA 细胞中 NPM1-mA 蛋白的亚细胞定位

细胞免疫化学结果显示, THP-1-mA 组细胞表达 NPM 突变蛋白, 其阳性结果显示胞浆红色沉淀, 而 pEGFPC1 转染组及未处理组则无胞浆红染现象。

2.1.3 NPM1-mA 转染对白血病细胞体外生长的影响

pEGFPC1-NPM1-mA 转染后将 THP-1 细胞体外培养 5 d, 细胞生长速度自第 2 d 起明显增快, 培养至第 3 d 后各时间点细胞总数约为对照组的 2 倍, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); pEGFPC1 转染组与未处理组相比细胞生长速度无明显差别 ($P>0.05$)。

2.2 NPM1-mA 转染对白血病细胞体外迁移能力的影响

为观察转染前后白血病细胞体外迁移能力的改变, 各组细胞加入 transwell 上室生长, 结果发现, 与 pEGFPC1 转染组及未处理组细胞相比, THP-1-mA 组

中迁移到下室的白血病细胞数显著增加 ($P<0.01$), 而两对照组中 transwell 下室细胞数无统计学差异。体外培养 24 h, THP-1-mA 组细胞迁移率可高达 10 倍, 显著高于两对照细胞的体外迁移率 ($P<0.01$)。提示 THP-1-mA 组细胞体外迁移能力明显增强。

2.3 NPM1-mA 转染对白血病细胞体外侵袭能力的影响

为观察转染前后白血病细胞体外侵袭能力的改变, 各组细胞加入包被 Matrigel 胶的 transwell 上室生长, 结果发现, THP-1-mA 组中侵袭到下室的白血病细胞数约为两对照组的 4 倍, 具有显著性差异 ($P<0.01$)。而 pEGFPC1 组和未处理组细胞的体外侵袭能力无明显差别 ($P>0.05$)。

2.4 NPM1-mA 转染对白血病细胞体外粘附能力的影响

为观察转染前后白血病细胞体外粘附能力的改变, 各组细胞于 FN 包被的培养板上生长, 结果发现与 pEGFPC1 转染组及未处理组细胞相比, THP-1-mA 组细胞的相对粘附率明显提高, 约为两对照组的 3.5 倍, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); pEGFPC1 转染组

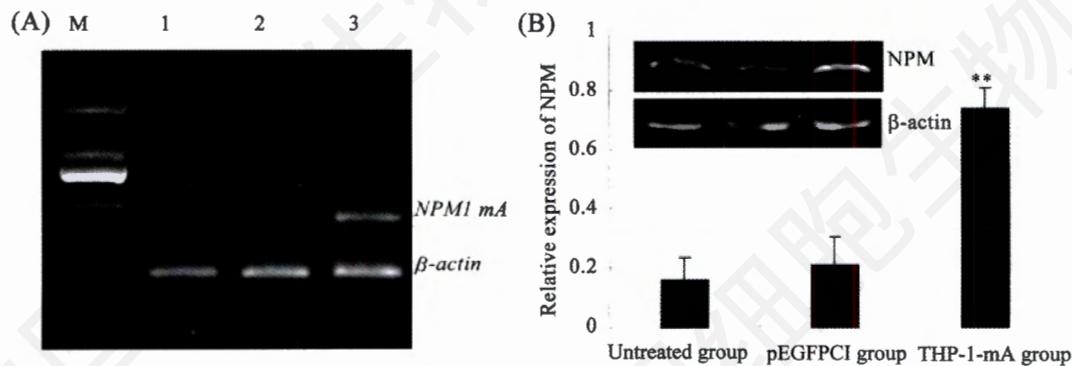


Fig.1 The expression of NPM1-mA in THP-1-mA cells

A: the expression of NPM1-mA mRNA in THP-1-mA cells. M: DNA marker DL2 000; 1: the untreated group; 2: the pEGFPC1 group; 3: the THP-1-mA group; B: the expression of NPM protein in THP-1-mA cells. ** $P<0.01$, compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

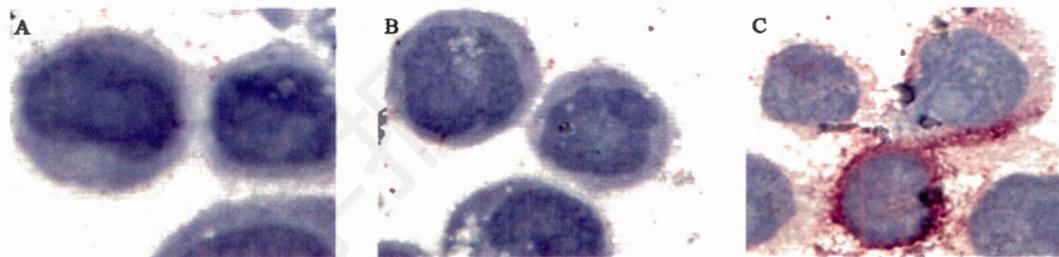


Fig.2 The cytoplasmic localization of NPM1-mA protein in THP-1-mA cells detected by immunocytochemistry (APAAP $\times 1000$)
A: the untreated group; B: the pEGFPC1 group; C: the THP-1-mA group.

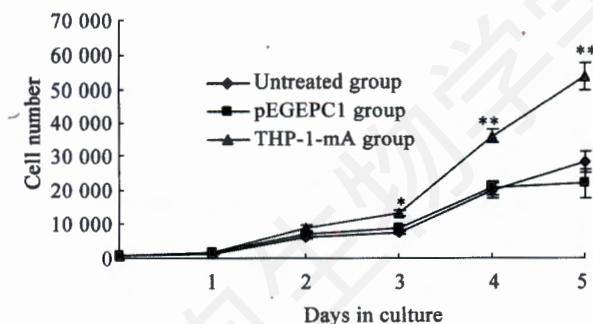


Fig.3 *NPM1-mA* enhances the proliferative potential of THP-1-mA cells *in vitro*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

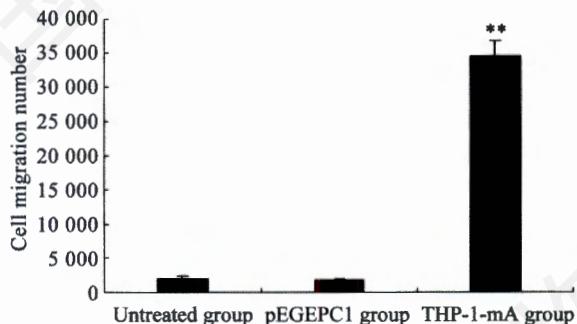


Fig.4 *NPM1-mA* enhances the migration potential of THP-1-mA cells *in vitro*

** $P<0.01$, compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

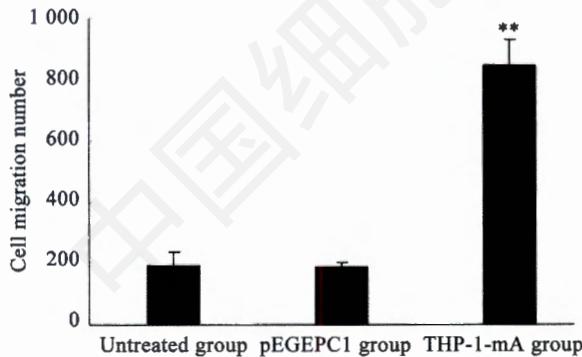


Fig.5 *NPM1-mA* enhances the invasion potential of THP-1-mA cells *in vitro*

** $P<0.01$, compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

与未处理组相比细胞粘附率无明显差别($P>0.05$)。

3 讨论

NPM1 突变是目前 AML 中突变率最高的基因改

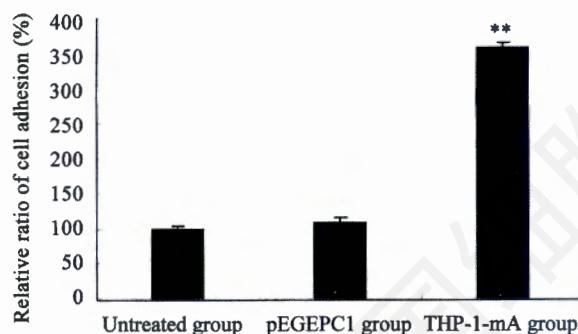


Fig.6 *NPM1-mA* enhances the adhesion potential of THP-1-mA cells *in vitro*

** $P<0.01$, compared with cells in pEGFPC1 group and untreated group.

变, 且与白血病的发生发展密切相关。然而, *NPM1* 突变参与调控白血病的作用机制尚未阐明。为此, 我们在前期观察了 *NPM1* 突变基因对细胞增殖和凋亡影响的基础上^[11], 进一步探讨 *NPM1* 突变对白血病细胞体外侵袭能力的影响, 借以明确 *NPM1* 突变在细胞恶性转化中的作用。

实验中我们选择最常见的 *NPM1-mA* 突变类型, 以急性单核白血病 THP-1 细胞系作为靶细胞, 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 transwell 小室结合 Matrigel 胶观察白血病细胞的浸润转移能力, 结果表明, THP-1-mA 细胞的体外迁移能力及侵袭能力明显增强, 表明稳定表达 *NPM1* 突变蛋白的白血病细胞具有较强的降解细胞外基质的作用, 从而有利于白血病细胞浸润到其他组织器官。同时, 细胞体外粘附实验表明, THP-1-mA 细胞对纤维连接蛋白的粘附能力也明显增强。已知白血病细胞通过其表面的受体特异地粘附到基质成分之上, 是白血病浸润转移的前提条件。因此 THP-1-mA 细胞体外粘附能力的增强为白血病的浸润转移提供了更多的机会。已有研究表明, 白血病浸润转移是涉及白血病细胞的粘附、迁移、降解细胞外基质等多种变化的复杂过程, 因此以上体外粘附、迁移、侵袭结果均提示 *NPM1* 突变可能在白血病细胞的髓外浸润转移过程中发挥重要的调控作用。此外, 临床资料显示, *NPM1* 突变在具有高浸润特性的粒、单核分化的髓系白血病患者中发生率最高^[9], 且 *NPM1*⁺ AML 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以及血清中 LDH 水平高等白血病髓外浸润特征^[12]。最近有文献^[13]报道, *NPM1* 突变的 AML 原代细胞中有促血管生成相

关因子(Ang-1 和 CXCL8)的高表达,首次提出 *NPM1* 突变可能通过促进血管生成而参与白血病的浸润转移。因此,结合本研究结果, *NPM1* 突变可能通过增强白血病细胞粘附性、降解细胞外基质以及促进肿瘤微环境中血管新生等多种途径来调控白血病的髓外浸润。

总之,本课题明确了 *NPM1* 突变基因能够促进 THP-1 细胞的体外侵袭能力。已知多种信号传导途径可参与肿瘤细胞的浸润转移,如 PI3K/Akt^[14]、Raf/MEK/MAPK^[15]以及 NF- κ B^[14]等,下一步的研究工作将深入探讨 *NPM1* 突变调控白血病髓外浸润的分子机制。此外,体外实验结果还需通过建立动物模型,在小鼠体内观察 *NPM1* 突变对白血病细胞浸润转移能力的影响。

参考文献(References)

- 1 Falini B, Mecucci C, Tacci 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.
- 2 Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukemia with mutated *NPM1*: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 2009; 23(10): 1731-43.
- 3 Falini B, Bolli N, Shan J, Martelli MP, Liso A, Pucciarini A, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc⁺ AML. *Blood* 2006; 107(11): 4514-23.
- 4 Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc⁺ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109(3): 874-85.
- 5 Facchetti F, Pileri SA, Agostinelli C, Martelli MP, Paulli M, Venditti A, et al. Cytoplasmic nucleophosmin is not detected in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica* 2009; 94(2): 285-8.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 Meani N, Alcalay M. Role of nucleophosmin in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9(9): 1283-94.
- 10 Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 2009; 27(4): 171-81.
- 11 邵会媛, 杨再林, 高玉洁, 苗宗玉, 覃凤娴, 陈先春, 等. 核仁磷酸蛋白突变基因表达对 NIH3T3 细胞增殖和凋亡的影响. 第三军医大学学报 2010; 32(8): 783-86.
- 12 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.
- 13 Hatfield KJ, Hovland R, Øyan AM, Kalland KH, Ryningen A, Gjertsen BT, et al. Release of angiopoietin-1 by primary human acute myelogenous leukemia cells is associated with mutations of nucleophosmin, increased by bone marrow stromal cells and possibly antagonized by high systemic angiopoietin-2 levels. *Leukemia* 2008; 22(2): 287-93.
- 14 Wang Z, Li Y, Banerjee S, Kong D, Ahmad A, Nogueira V, et al. Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF- κ B signaling pathways. *J Cell Biochem* 2010; 109(4): 726-36.
- 15 Ho ML, Chen PN, Chu SC, Kuo DY, Kuo WH, Chen JY, et al. Peonidin 3-glucoside inhibits lung cancer metastasis by downregulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Nutr Cancer* 2010; 62(4): 505-16.

Effect of *NPM1* Mutations on the Invasion Potential of Leukemic Cells *in vitro*

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

(Key Laboratory of Laboratory 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 are relationship with leukemiogenesis. To explore the role of *NPM1* mutations in the invasion of leukemia, 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. Transwell migration assay, Matrigel invasion assay and cell adhesion assay were performed. These results showed that both invasion and migratory capacities of THP-1-mA cells were much higher compared with parent THP-1 cells. In addition, THP-1-mA cells displayed higher adhesion to fibronectin compared with THP-1 cells. Therefore, our findings indicate that *NPM1* mutations enhance the invasion potential of leukemic cells *in vitro*, which makes a further understanding of *NPM1* mutations in the malignant transformation of leukemic cells.

Key words leukemia; nucleophosmin; mutations; cell invasion

Received: July 14, 2010 Accepted: August 17, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No.30872418)

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