

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000294

干扰核仁磷酸蛋白对人白血病 OCI/AML3 细胞凋亡的影响及其机制

王娟, 陈莎娜, 全静, 贺金刚, 张帅帅, 鲜敬荣, 张伶

(重庆医科大学检验医学院血液教研室、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】目的:探讨抑制核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)1 基因对人白血病细胞凋亡的影响及相关机制。**方法:**将空载慢病毒 pGIPZ 和 NPM 干扰慢病毒 shNPM 分别感染携带 NPM1 突变的 OCI/AML3 白血病细胞株以及对照白血病细胞株 HL60。采用 qRT-PCR、Western blot 和免疫细胞化学法检测白血病细胞的 shNPM 组以及 Mock 和 pGIPZ 组细胞及 NPM1 A 型突变(NPM1-mA)基因和蛋白的表达,流式细胞仪和瑞氏染色法观察 OCI/AML3 的 shNPM 组以及 Mock 和 pGIPZ 组细胞凋亡情况,qRT-PCR 和 Western blot 检测 OCI/AML3 的 shNPM 组以及 Mock 和 pGIPZ 组凋亡相关蛋白(Bax/Bcl-2)和 p-ERK 信号分子表达;流式细胞仪检测丝裂原活化蛋白激酶/胞外信号调节激酶信号通路抑制剂(PD98059)处理后 OCI/AML3 的 shNPM 组以及 Mock 和 pGIPZ 组细胞凋亡率的变化。**结果:**干扰 NPM1 明显抑制 OCI/AML3 细胞株 NPM1-mA 的 mRNA 水平($F=20.078$; $P=0.000$, $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.001$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.003$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.333$)和蛋白水平,伴有胞质 NPM 突变蛋白表达明显减弱;干扰 NPM1 能明显上调 OCI/AML3 细胞凋亡率($F=25.236$, $P=0.000$, $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.001$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.001$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.729$),同时光镜下观察到干扰组细胞出现凋亡小体等凋亡形态学特征。此外,干扰 NPM1 可上调 OCI/AML3 细胞中促凋亡分子 Bax 的蛋白和 mRNA 表达($F=7.649$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.015$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.015$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.984$),下调抗凋亡分子 Bcl-2 的蛋白和 mRNA 表达($F=5.190$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.034$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.029$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.909$);干扰 NPM1 能明显下调 p-ERK 的表达,PD98059 抑制剂阻断 MAPK 通路可促进 OCI/AML3 细胞凋亡($F=25.643$, $P=0.007$)。**结论:**NPM1 突变基因在白血病细胞抗凋亡特性中发挥重要作用,潜在的分子机制可能与 ERK 信号分子及 Bax/Bcl-2 表达有关。

【关键词】白血病;核仁磷酸蛋白;基因突变;OCI/AML3 细胞;凋亡**【中图分类号】**R733.71**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-02-20

Effect of nucleophosmin(NPM) 1 knockdown on the apoptosis of OCI/AML3 leukemic cell with mutant NPM1 and its mechanisms

Wang Juan, Chen Shana, Quan Jing, He Jingang, Zhang Shuaishuai, Xian Jingrong, Zhang Ling

(Department of Blood, College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics

Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of nucleophosmin 1(NPM1) on the apoptosis in leukemic cells and the relevant molecular mechanisms. **Methods:** OCI/AML3 cell lines(NPM1 mutant type) and HL60 cell lines(NPM1 wild type) were served as experimental group and negative control group. Mock group, pGIPZ group, shNPM group were established in the meantime. Expressions of the NPM1 mutant A(NPM1-mA) gene and protein were detected by qRT-PCR, Western blot and immune cytochemistry. Apoptosis analysis was determined by flow cytometry and Wright-Giemsa staining. The gene and protein expression of apoptosis related molecular (Bax/Bcl-2) was detected by qRT-PCR and Western blot and the activity of p-ERK was also assessed by Western blot. The percentage of apoptotic cells was detected after treatment with MAPK/ERK pathway inhibitor(PD98059) by flow cytometry. **Results:** The results showed significant down-regulation of NPM1-mA mRNA levels($F=20.078$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.001$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.003$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.333$) and protein levels after NPM1 silencing, accompanying by reduce of cytoplasm NPM mutant protein of OCI/AML3 cells. In OCI/AML3 cells, down-regulation of NPM1-mA resulted in increase of cell apoptotic rate($F=25.236$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.001$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.001$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.729$) and morphological changes including apoptosis bodies under light microscopy. NPM1 gene si-

作者介绍:王娟, Email: 526210953@qq.com,

研究方向:血液系统肿瘤基础与临床。

通信作者:张伶, Email: lingzhang@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81271913);重庆市留学人员科技活动择优资助项目(编号:市级渝留助 2013009)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000294.html>lencing led to increase of pro-apoptotic protein Bax expression($F=7.649$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.015$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.015$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.984$) and decrease of anti-apoptotic protein Bcl-2 expression at mRNA and protein levels($F=5.190$, $P=0.000$, $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.034$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.029$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.909$). NPM1 gene silencing can also down-regulate the expression of p-ERK. Furthermore,

PD98059 promoted OCI/AML3 leukemic cell apoptosis ($F=25.643, P=0.007$). **Conclusion:** NPM1-mA plays an important role in leukemic cell anti-apoptosis, which involving MAPK signal pathway and Bax/Bcl-2 expression.

【Key words】leukemia; nucleophosmin 1 (NPM1); gene mutations; OCI/AML3 cells; apoptosis

核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)1 基因突变是成人急性髓系细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)中检出率最高的一种分子遗传学异常,发生率约占 30%^[1]。NPM1 突变导致定位于核仁颗粒区的 NPM1 蛋白移位至胞质(cytoplasmic NPM, NPM c+)^[2]。Vassiliou 等^[3]通过构建 NPM c+小鼠模型,发现过表达人源细胞质 NPM1 突变可赋予小鼠髓系增殖优势。已有报道胞质中的 NPM1 突变蛋白可降低抑癌蛋白生长素应答因子的活性、增强原癌蛋白 c-Myc 的稳定性,从而发挥促进细胞恶性增殖和抗凋亡作用^[4-5]。2013 年度最新的白血病危险度分层指南中强调了 NPM c+在 AML 中的重要性^[6]。然而, NPM1 突变在人 AML 中细胞的恶性转化中所起的重要作用尚未阐明。本研究拟探讨 NPM1 突变蛋白对白血病抗凋亡特性的影响及其潜在的分子调控机制。在众多白血病细胞株中证实携带 NPM1 突变的只有 OCI/AML3^[7]和 IMS-M2^[8]这 2 株细胞,其中 OCI/AML3 细胞发现最早、在 NPM1 突变相关研究中应用最为广泛。为此,本课题拟采用 RNA 干扰技术将靶向 NPM1 基因的重组慢病毒感染 OCI/AML3 细胞,构建稳定干扰 NPM1 突变蛋白的白血病细胞株,观察 NPM1 突变蛋白对白血病细胞凋亡的影响,并初步探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

携 NPM1 基因的慢病毒干扰载体 Hs-shRNA-NPM (shNPM) 和骨架载体 Hs-pGIPZ 均购自美国 Addgene 公司。慢病毒辅助质粒 pEnvelope 和 pHelper 以及人白血病 OCI/AML3 细胞株由美国安德森癌症研究中心惠赠。人急性髓系白血病细胞株 HL60 和人胚肾细胞株 HEK293T 购自中国科学院上海细胞库。胎牛血清(FBS)、RPMI1640、opti-MEM 购自美国 Gibco 公司。Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司。RNA 提取试剂 TRIzol、逆转录试剂盒和定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司。兔抗人 NPM1-mA 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;鼠抗人 NPM1 单克隆抗体(抗体非特异性针对 NPM1 野生型蛋白,亦可检测到 NPM1 突变型蛋白)购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 H2A.X 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司。兔抗人 Bax 单克隆抗体、兔抗人 Bcl-2 单克隆抗体、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、山羊抗兔 IgG、山羊

抗鼠 IgG 均购自北京中杉金桥公司;兔抗人 ERK、兔抗人 p-ERK 多克隆抗体购自美国 Bioworld 公司。Pro-light HRP 化学发光检测试剂盒购自美国 Millipore 公司。增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自北京天根公司。MAPK/ERK 通路抑制剂(PD98059)购自碧云天生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK293T 细胞用 DMEM 完全培养基(10% FBS), HL60、OCI/AML3 细胞用 RPMI1640 完全培养基(10% FBS)。全部细胞置于 5%CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养,每次实验取对数生长期的细胞使用。

1.2.2 筛选 shNPM 稳定转染的白血病细胞株 已知 NPM1 基因是杂合性突变, OCI/AML3 细胞中同时存在 NPM A 型突变体(NPM1-mA)和野生型 NPM1 蛋白,其中 NPM1-mA 蛋白主要存在于胞质中。为了观察 shNPM 载体对 OCI/AML3 细胞 NPM1 突变蛋白的干扰效果,本实验设立仅有野生型 NPM1 蛋白的 HL60 细胞作为 NPM1 突变阴性细胞对照组。首先采用磷酸钙转染法转染,将空载和干扰载体连同 pEnvelope 及 pHelper 辅助载体按照 2:1:1 的质量比共转染 HEK293T 细胞。培养 8 h 后更换完全培养基,于 24、48 h 收集培养上清液,经 0.45 μ m 滤器过滤收获病毒液冻存于-80 °C 冰箱中备用。将白血病细胞接种于 12 孔板,加入上述制备的病毒液,同时加入终浓度为 8 mg/ml 的聚凝胺(一种基因转染增强剂),48 h 后加嘌呤霉素(2 μ g/ml)来筛选细胞,4~6 d 后收获稳定转染的细胞株。实验同时设立未转染的空白对照组(Mock)、空载转染对照组(Hs-pGIPZ)、干扰组(shNPM)。

1.2.3 qRT-PCR 检测各组细胞中 mRNA 的相对表达水平 收集各组白血病细胞,经 Trizol 提取总 RNA,检测浓度和纯度后反转录合成 cDNA。相对定量内参以 β -actin 为准,用于 qRT-PCR 反应引物见表 1。扩增反应条件:94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 50 s, 循环 39 次;72 °C 10 min。每组设 3 个重复。相对定量值结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	上引序列(5'→3')	下引序列(5'→3')
NPM1	GTACAGCCAACGGTTTC- CCTTG	TTCACATCCTCCTC- CTCTTCATCTT
NPM1-mA	TGGAGGTGGTAGCAAG- GTTTC	CTCCTCCACTGCCA GACAGA
Bax	GGATGCGTCCACCAA- GAA	GCACTCCCGCCA- CAAAGA
Bcl-2	TTGTGGC- CTTCTTTGAGTTTCG	CACCTACCCAGC- CTCCGTTAT
β -actin	TAGTTGCGT TACACCCCTT TCTTG	TGCTGTACACCTTCAC- CGTTC

1.2.4 检测稳定株细胞 NPM1 蛋白的表达和亚细胞定位

1.2.4.1 Western blot 检测 NPM1 蛋白的表达 收集各组白血病细胞,分别提取胞浆及胞核蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。取每孔 50 μ g 蛋白 SDS-PAGE(12%),将蛋白湿转到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加一抗(鼠抗人 NPM1 单克隆抗体或兔抗人 NPM1-mA 多克隆抗体,1:1 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,加二抗(山羊抗鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG,1:1 000 稀释)室温孵育 1 h,再次洗膜后用 Pro-light HRP 化学发光试剂显色。实验设 β -actin 为胞浆内参,H2A.X 为胞核内参,结果采用 Quantity One 软件进行分析。

1.2.4.2 免疫细胞化学检测 NPM1 蛋白的亚细胞定位 收集各组白血病细胞,0.01 mol/L PBS 洗涤后离心涂片。4%多聚甲醛固定 30 min,0.3% Triton X-100 透膜 30 min,3% H_2O_2 室温处理 15 min,10%山羊血清封闭 15 min,4 $^{\circ}$ C 湿盒中一抗(1:100 稀释)孵育过夜,37 $^{\circ}$ C 二抗(1:100 稀释)孵育 30 min,HRP-DAB 底物显色 30 min,苏木素复染 10 s。正置显微镜下观察 NPM1 蛋白和 NPM1-mA 蛋白的表达及亚细胞定位,胞质或者胞核出现棕色颗粒为 NPM1 阳性,其中胞浆中出现棕色颗粒者为 NPM1 c+阳性细胞。实验重复 3 次。

1.2.5 检测干扰 NPM1 对白血病细胞凋亡的影响

1.2.5.1 Annexin V-PE/7-AAD 双染法检测细胞凋亡率 收集各组 HL60 和 OCI/AML3 细胞($1\sim5\times10^5$ 个),PBS 洗涤 2 次后重悬于 500 μ l 的反应缓冲液中,加入 1 μ l Annexin V-PE 后混匀。室温下避光静置 5~15 min,加入 5 μ l 7-AAD 染液,混匀,室温避光 5~15 min 后立即上流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.5.2 Wright-Giemsa 染色观察细胞凋亡 收集各组细胞,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,涂片并使其自然干燥,Wright-Giemsa 染色 1 min,再加等体积的 0.01 mol/L PBS 染 5~10 min,双蒸水漂洗,晾干后于正置光学显微镜下观察细胞形态和凋亡小体。

1.2.6 qRT-PCR、Western blot 检测白血病细胞中 Bax/Bcl-2 的表达 收集各组 OCI/AML3 细胞,分别提取总 RNA、总蛋白,检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的 mRNA 及蛋白水平改变。qRT-PCR 反应条件同前,引物序列见表 1。Western blot 中兔抗人 Bax 和 Bcl-2 抗体均为 1:500 稀释,其他操作流程不变,实验结果设 β -actin 为对照内参。

1.2.7 检测丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)/胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号通路在 OCI/AML3 细胞凋亡中的作用 采用兔抗人 p-ERK1/2 和 ERK1/2 抗体按 1:800 稀释,Western blot 检测各组 OCI/AML3 细胞中 p-ERK1/2、总 ERK 蛋白表达,设 β -actin 作对照。将 MAPK/ERK 信号通路抑制剂 PD98059 (20 μ mol/L) 处理各组 OCI/AML3 细胞 24 h,设 DMSO 处理作对照,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.3 统计学处理

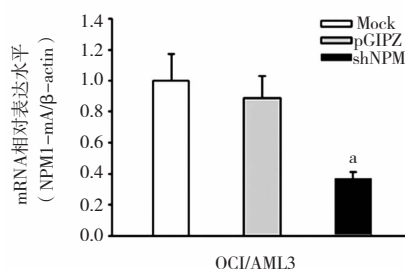
实验结果应用 SPSS 17.0 统计学软件进行进行处理。定

量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,其中多组资料两两比较采用 LSD-*t* 多重检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

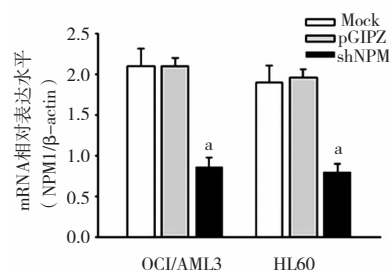
2 结果

2.1 干扰 NPM 抑制 OCI/AML3 白血病细胞中 NPM1 的表达

qRT-PCR 结果显示,与 Mock 组和 pGIPZ 组比较,OCI/AML3 细胞 shNPM 组突变型 NPM1 (NPM1-mA) 和野生型 NPM1 的 mRNA 水平表达均明显下降,差异具有统计学意义(其中 NPM1-mA: $F=20.078$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.001$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.003$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.333$; NPM1: $F=65.833$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.000$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.000$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.969$) (图 1A、B)。此外,在 NPM1 突变阴性的对照细胞 HL60 中,野生型 NPM1 的 mRNA 表达明显下降($F=58.912$, $P=0.000$; $P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.000$, $P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.000$, $P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.633$) (图 1B)。证实了靶向 NPM1 的干扰载体能够抑制 OCI/AML3 细胞中突变和野生 NPM1 的 mRNA 表达。



A. qRT-PCR 检测 NPM1-mA mRNA 的相对表达



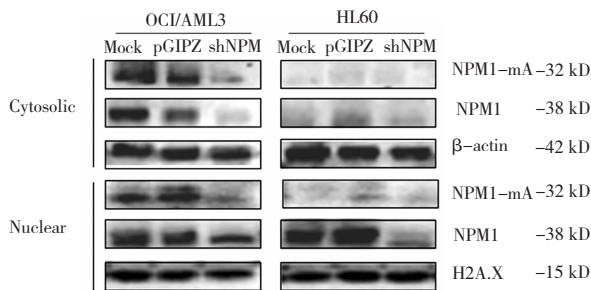
B. qRT-PCR 检测野生型 NPM1 mRNA 的相对表达

$\bar{x} \pm s$, $n=3$; a, Mock 组与 pGIPZ 组相比, $P<0.05$

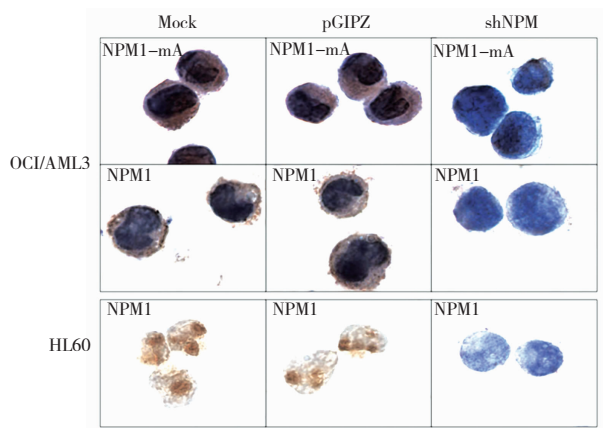
图 1 干扰 NPM1 抑制 OCI/AML3 白血病细胞 NPM1 mRNA 表达
Fig.1 Knockdown of NPM1 affecting the NPM1 mRNA levels in OCI/AML3 cells

Western blot 检测 OCI/AML3 白血病细胞中 NPM1 蛋白的表达水平,结果发现 NPM1 突变蛋白主要存在于胞质部分,shNPM 干扰后 NPM1-mA 蛋白表达水平较 Mock 组和 pGIPZ 组明显下降,胞核 NPM1 蛋白表达也受到抑制(图 2A)。免疫细胞化学染色结果显示,OCI/AML3 细胞中 NPM1-mA 蛋白主要出现在胞质中,shNPM 干扰后 NPM1 c+蛋白水平明显下降;在对照细胞 HL60 中,shNPM 干扰后胞核 NPM1 蛋

白表达明显下降(图 2B)。证实了靶向 NPM1 的干扰载体能够抑制 OCI/AML3 细胞中突变 NPM1 蛋白的表达。



A. Western blot 检测 NPM1 蛋白和 NPM1-mA 蛋白



B. 细胞免疫化学检测 NPM1 蛋白和 NPM1-mA 的亚细胞定位(1 000 ×)

图 2 干扰 NPM1 抑制白血病细胞 NPM1 蛋白的表达

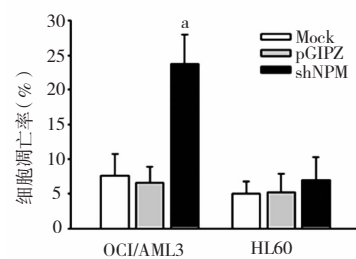
Fig.2 Knockdown of NPM1 affecting the NPM1 protein levels in AML cells

2.2 干扰 NPM1 促进 OCI/AML3 白血病细胞的凋亡

2.2.1 干扰 NPM1 对白血病细胞凋亡率和凋亡形态学特征的影响 为了探讨干扰 NPM1 对白血病细胞凋亡的影响,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化,结果显示 OCI/AML3 shNPM 的细胞凋亡率为 $(23.76 \pm 4.23)\%$,明显高于 Mock 组 $(7.59 \pm 3.12)\%$ 和 pGIPZ 组 $(6.60 \pm 2.33)\%$,差异有统计学意义 ($F=25.236, P=0.000; P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.001, P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.001, P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.729$) (图 3A)。同时光镜观察发现干扰 NPM1 后的 OCI/AML3 细胞中出现胞浆空泡,细胞核染色质粗糙、固缩、碎裂,易查见凋亡小体,而 HL60 shNPM 组细胞凋亡率和凋亡形态学特征并无明显改变 ($F=0.506, P>0.05$) (图 3B)。

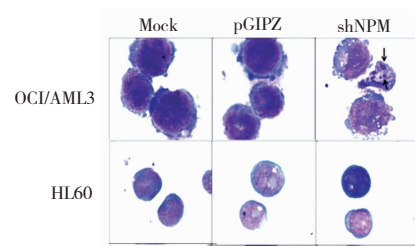
2.2.2 干扰 NPM1 对 OCI/AML3 白血病细胞凋亡相关蛋白表达的影响 检测 OCI/AML3 干扰组细胞中促凋亡分子 Bax 和抗凋亡分子 Bcl-2 的改变。结果显示,在含 NPM1-mA 的 OCI/AML3 细胞中,shNPM 组 Bax 基因的 mRNA 水平和蛋白表达水平明显上调,Bcl-2 基因的 mRNA 和蛋白表达水平下调,与 Mock 组和 pGIPZ 组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$,

其中 Bax mRNA: $F=7.649; P=0.000, P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.015, P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.015, P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.984$ 。Bcl-2 mRNA: $F=5.190, P=0.000; P_{\text{Mock vs. shNPM}}=0.034, P_{\text{pGIPZ vs. shNPM}}=0.029, P_{\text{Mock vs. pGIPZ}}=0.909$) (图 4)。



$\bar{x} \pm s, n=3; a, \text{Mock 组与 pGIPZ 组比较}, P<0.05$

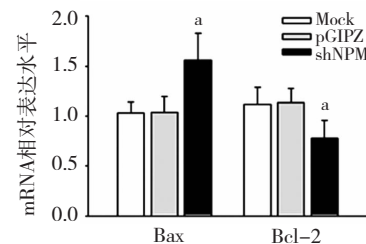
A. 干扰 NPM1 对白血病细胞凋亡率的影响



B. 瑞氏染色观察白血病细胞凋亡形态学特征(1 000 ×)

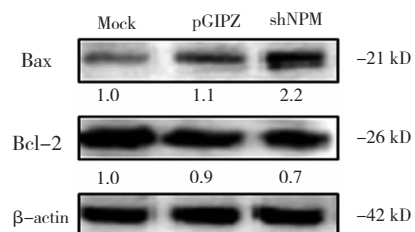
图 3 干扰 NPM1 对白血病细胞凋亡的影响

Fig.3 Knockdown of NPM1 affecting the apoptosis of AML cells



$\bar{x} \pm s, n=3; a, \text{Mock 组与 pGIPZ 组比较}, P<0.05$

A. qRT-PCR 检测 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达



B. Western blot 检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达

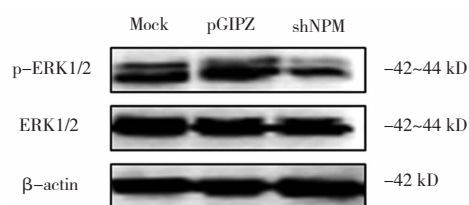
图 4 干扰 NPM1 对 OCI/AML3 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.4 Knockdown of NPM1 affecting expression of Bax and Bcl-2 of OCI/AML3 cells

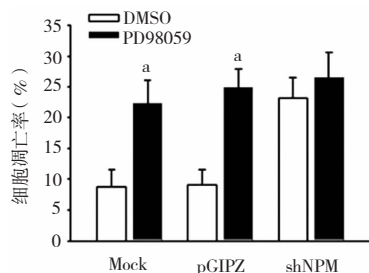
2.3 ERK 信号分子参与 NPM1 突变蛋白调控 OCI/AML3 白血病细胞的凋亡

为探讨 NPM1 突变蛋白调控 OCI/AML3 白血病细胞凋亡过程中信号通路分子的变化,Western blot 检测结果表明,

与对照组比较,干扰 NPM1 能够明显下调白血病细胞 ERK 的磷酸化水平(p-ERK1/2),总 ERK1/2 无统计学差异(图 5A)。进一步将 MAPK/ERK 通路抑制剂(PD98059)处理 OCI/AML3 细胞,结果发现 PD98059 处理细胞 24 h 可导致细胞凋亡率由 $(8.82 \pm 2.78)\%$ 升高到 $(22.29 \pm 3.68)\%$,差异有统计学意义 ($F=25.643, P=0.007$);若用 PD98059 处理 shNPM 组细胞,则细胞凋亡率未见明显改变 ($F=1.158, P=0.343$) (图 5B)。提示 ERK 信号分子可能参与 NPM1 突变蛋白介导的白血病细胞抗凋亡特性。



A. 干扰 NPM1 抑制 ERK 磷酸化活性



B. MAPK/ERK 通路抑制剂(PD98059)处理 24 h,检测细胞凋亡率
 $\bar{x} \pm s, n=3$; a, Mock 组与 pGIPZ 组比较, $P<0.05$

图 5 ERK 信号分子参与 NPM1 突变蛋白调控 OCI/AML3 细胞的凋亡

Fig.5 NPM1-mA affecting the apoptosis of OCI/AML3 cells by ERK signal molecule

3 讨论

白血病是一组涉及多种分子遗传学异常的造血干细胞恶性克隆性疾病。NPM1 作为 AML 患者常见的突变基因对白血病发病、治疗和预后有重要影响,但具体如何参与维持白血病细胞的恶性表型仍不清楚^[9-10]。本研究采用 RNA 干扰技术构建稳定干扰 NPM1 的白血病细胞株,探讨 NPM1 突变蛋白对白血病细胞凋亡的影响及其分子机制。

OCI/AML3 是第一个被证实天然携带 NPM1 突变的白血病细胞株,作为 NPM1 突变阳性细胞被广泛用于 NPM1 突变蛋白分子结构功能分析和相关抗体的研发,以及 NPM c+AML 化疗敏感性研究等多个领域^[11-13]。因此 OCI/AML3 是采用 RNA 干扰策略探讨 NPM 突变蛋白调控白血病发生的理想细胞

模型。已知 NPM1 基因突变有 50 余种类型,其中在第 956~959 位核苷酸序列插入 TCTG 4 个碱基的 A 型突变(NPM1-mA)最常见,约占 NPM1 突变的 80%^[14]。因此,研究 NPM1 基因改变对白血病细胞生物学特性的影响,皆以突变频率最高的 NPM1-mA 为靶基因进行研究^[15]。若通过下调 NPM1-mA 蛋白来观察细胞特性的改变,目前大多采用化学合成 siRNA 处理来同时抑制野生型和突变型 NPM1 蛋白,但由于成本过高,不适用于长时间的研究;而通过病毒感染携带 NPM 干扰载体来建立稳定的干扰细胞株,能够克服化学合成 siRNA 法的不足,有利于干扰靶基因之后动物实验等后续一系列实验的开展。无论采用何种干扰手段,都需设立仅表达 NPM1 野生型而无突变型的白血病细胞(例如 HL60)作为对照^[13]。为此本研究采用靶向 NPM 的干扰载体来感染白血病细胞并稳定筛选。结果表明 shNPM 干扰载体能够明显抑制 OCI/AML3 细胞株中野生和突变 NPM1 的 mRNA 水平和蛋白表达,同时胞质 NPM1 突变蛋白(NPM c+)的表达量也明显减少,提示通过干扰 NPM1 能够抑制白血病细胞 NPM1-mA 的表达,成功获得了 NPM1-mA 下调的稳定细胞株,这为下一步实验研究奠定了基础。

本研究进一步观察了抑制 NPM1 对白血病细胞凋亡的影响,结果表明 OCI/AML3 干扰组细胞凋亡率较对照组明显增加,细胞出现核染色质固缩、碎裂等凋亡形态学特征的改变,易见凋亡小体,提示抑制 NPM1 能够促进 NPM1-mA 阳性的 OCI/AML3 白血病细胞发生凋亡。来自临床样本的研究报道 NPM c+AML 原代细胞高表达 micro-10a,体外实验证实下调 micro-10a 表达可以诱导 OCI/AML3 白血病细胞发生凋亡,提示 NPM1-mA 调控白血病细胞抗凋亡可能与 micro-10a 的异常表达有关^[16]。实验中发现干扰 NPM1 表达后 HL60 细胞未见凋亡形态学的改变,同时细胞凋亡率也未见明显的增加。Lin 等^[17]在探讨野生型 NPM 在白血病细胞药物耐受中的作用时发现,抑制 NPM 表达增加 HL-60 早期凋亡率,且 HL-60 耐药细胞株较亲本细胞更易发生凋亡。这种 HL60 凋亡结果的差异可能与采用不同的 shNPM 干扰载体有关。本文的研究目的是探讨下调 NPM1 突变蛋白后对 OCI/AML3 白血病细胞株凋亡的影响,设立携带野生型 NPM1 蛋白的 HL60 细胞主要是为了观察 shNPM 的干扰效果。野生型 NPM 对白血病细胞凋亡的调控作用还有待于今后的研究。

细胞凋亡保守的信号转导途径中,促凋亡蛋白

Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的相对比例(Bax/Bcl-2)决定了细胞对凋亡的易感性,当二者比值增高时促进细胞凋亡,比值降低则抑制凋亡。2010 年 Del Poeta 等^[18]在临床样本中发现,白血病细胞高 Bax/Bcl-2 比值与 NPM1 突变阳性而 FLT3-ITD 突变阴性存在一定的相关性。为此本课题检测干扰 NPM1 对 OCI/AML3 细胞中 Bax 和 Bcl-2 分子表达的影响,结果发现 shNPM 组细胞 Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高,Bcl-2 的表达水平下降,Bax/Bcl-2 比值明显上升,提示白血病细胞 NPM 突变蛋白可能通过调控 Bax 和 Bcl-2 水平来发挥抗凋亡作用。

白血病细胞 NPM1 基因突变可导致 NPM 蛋白异位于胞质中,NPM c+蛋白可能直接或间接影响细胞信号通路。ERK1/2 属于 MAPK 家族,是 RAS/RAF/MEK/ERK 信号转导通路中的下游分子。白血病细胞常发现 ERK 信号分子组成性激活,且 ERK 的活化与 Bcl-2 家族介导的抗凋亡密切相关^[19]。本课题检测发现抑制 NPM1 突变蛋白后 p-ERK 活性明显下降,进一步选用 MAPK/ERK 通路抑制剂(PD98059)处理细胞,结果发现 PD98059 抑制剂处理 OCI/AML3 细胞 24 h 后可促进细胞凋亡,而 PD98059 处理 shNPM 组细胞则对其凋亡率影响并不显著。上述结果提示 NPM1 突变蛋白调控白血病抗凋亡特性可能与 MAPK/ERK 信号通路活性以及 Bax 和 Bcl-2 分子的表达水平有关。

总之,本研究采用 RNA 干扰技术成功抑制了人 OCI/AML3 细胞株 NPM1 突变蛋白,证实 NPM1 突变蛋白表达下调能够促进白血病细胞的凋亡,信号分子 ERK 活性的改变及其下游的凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 比例失衡可能参与此调控过程。进一步的研究将探讨胞质 NPM1 突变蛋白是如何通过调控 MAPK/ERK 信号通路来调控白血病的凋亡,这有助于阐明 NPM1 突变白血病的发病机理,并为 NPM c+ AML 患者的临床治疗研究奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(12): 1079–1089.
- [2] Woolthuis CM, Mulder AB, Verkaik-Schakel RN, et al. A single center analysis of nucleophosmin in acute myeloid leukemia; value of combining immunohistochemistry with molecular mutation analysis[J]. *Haematologica*, 2013, 98(10): 1532–1538.
- [3] Vassiliou GS, Cooper JL, Rad R, et al. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(5): 470–475.
- [4] Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, et al. The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions; Arf in-activation and induction of cellular senescence[J]. *Oncogene*, 2007, 26(53): 7391–7400.
- [5] Bonetti P, Davoli T, Sironi C, et al. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma[J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(1): 19–26.
- [6] Estey EH. Acute myeloid leukemia; 2013 update on risk-stratification and management[J]. *Am J Hematol*, 2013, 88(4): 318–327.
- [7] Duncavage EJ, Abel HJ, Szankasi P, et al. Targeted next generation sequencing of clinically significant gene mutations and translocations in leukemia[J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(6): 795–804.
- [8] Chi HT, Vu HA, Iwasaki R, et al. Detection of exon 12 type A mutation of NPM1 gene in IMS-M2 cell line[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(2): 261–262.
- [9] Sportoletti P, Varasano E, Rossi R, et al. The human NPM1 mutation A perturbs megakaryopoiesis in a conditional mouse model[J]. *Blood*, 2013, 121(17): 3447–3458.
- [10] Mallardo M, Caronno A, Pruneri G, et al. NPM c+ and FLT3-ITD mutations cooperate in inducing acute leukaemia in a novel mouse model[J]. *Leukemia*, 2013, 27(11): 2248–2251.
- [11] Huang M, Thomas D, Li MX, et al. Role of cysteine 288 in nucleophosmin cytoplasmic mutations; sensitization to toxicity induced by arsenitrioxide and bortezomib[J]. *Leukemia*, 2013, 27(10): 1970–1980.
- [12] Gruszka AM, Lavorgna S, Consalvo MI, et al. A monoclonal antibody against mutated nucleophosmin 1 for the molecular diagnosis of acute myeloid leukemias[J]. *Blood*, 2010, 116(12): 2096–2102.
- [13] Balusu R, Fiskus W, Rao R, et al. Targeting levels or oligomerization of nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1[J]. *Blood*, 2011, 118(11): 3096–3106.
- [14] Falini B, Bolli N, Liso A, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1; molecular basis and clinical implications[J]. *Leukemia*, 2009, 3(10): 1731–1743.
- [15] Noguera NI, Song MS, Divona M, et al. Nucleophosmin/B26 regulates PTEN through interaction with HAUSP in acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2013, 27(5): 1037–1043.
- [16] Bryant A, Palma CA, Jayaswal V, et al. miR-10a is aberrantly over-expressed in Nucleophosmin1 mutated acute myeloid leukaemia and its uppression induces cell death[J]. *Mol Cancer*, 2012(11): 8.
- [17] Lin M, Hu J, Liu T, et al. Knockdown of nucleophosmin by RNA interference reverses multidrug resistance in resistant leukemic HL-60 cells[J]. *Immunobiology*, 2013, 218(9): 1147–1154.
- [18] Del Poeta G, Ammatuna E, Lavorgna S, et al. The genotype nucleophosmin mutated and FLT3-ITD negative is characterized by high bax/bcl-2 ratio and favourable outcome in acute myeloid leukemia[J]. *Br J Haematol*, 2010, 149(3): 383–387.
- [19] Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death; mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence[J]. *FEBS J*, 2010, 277(1): 2–21.

(责任编辑:冉明会)