

# NPM1 基因表达对急性髓系白血病细胞系的影响及其机制探讨

邱少伟 万玉玲 王敏 王建祥

**【摘要】** 目的 探讨NPM1基因表达对急性髓系白血病(AML)细胞系的影响及其机制。方法 选取AML细胞系U937和HL-60细胞,转染NPM1质粒至细胞系构建稳定克隆,采用Western blot法鉴定高表达NPM1蛋白的单克隆细胞。MTT法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞周期分布和细胞凋亡率,显微镜下计数检测集落形成能力,Western blot法检测细胞周期相关信号通路蛋白表达,实时荧光定量PCR(RQ-PCR)法检测初诊AML患者骨髓单个核细胞NPM1基因表达水平。**结果** ①U937和HL-60细胞中NPM1高表达组相对细胞增殖率与对照组相比,差异无统计学意义( $4.68\pm 1.28$ 对 $3.89\pm 0.81$ , $3.34\pm 0.37$ 对 $2.68\pm 0.29$ , $P$ 值均 $> 0.05$ )。②U937和HL-60细胞中NPM1高表达组S期细胞比例均明显高于对照组[( $50.22\pm 3.42$ )%对( $39.78\pm 3.80$ )%,( $59.01\pm 3.27$ )%对( $43.94\pm 2.08$ )%, $P$ 值均 $< 0.05$ ]。③U937细胞NPM1高表达组和对照组相比具有更强的抗凋亡能力[( $48.67\pm 3.22$ )%和( $68.77\pm 10.21$ )%, $P < 0.05$ ]和集落形成能力( $772.7\pm 24.0$ 和 $652.3\pm 16.5$ , $P < 0.05$ ),而HL-60细胞相应的两组细胞上述能力均相似。④NPM1高表达组细胞中CDK4、Cyclin D1、Cyclin D2及Cyclin E表达明显高于对照组,而Cyclin D3表达明显低于对照组。⑤细胞遗传学预后良好组AML患者NPM1定量水平低于预后中等组。**结论** NPM1蛋白能够促进更多的细胞进入S期,增强抗凋亡和细胞集落形成能力。NPM1定量水平可能预示细胞遗传学的危险度。

**【关键词】** 基因,NPM1; 白血病,髓样,急性

**基金项目:**天津市应用基础与前沿技术研究计划(16JCQNJC12200);天津市血液病临床医学研究中心建设(15ZXLSY00010);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-001、2016-I2M-3-004)

**Effects of NPM1 gene expression on acute myeloid leukemia cell lines and its mechanism** Qiu Shaowei, Wan Yuling, Wang Min, Wang Jianxiang. Institute of Hematology & Blood Disease Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Wang Jianxiang, Email: wangjx@ihcams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the impact and mechanism of NPM1 gene expression on acute myeloid leukemia (AML) cell lines. **Methods** Human AML cell line U937 and HL-60 cells were transfected with NPM1 plasmid to establish stable clones, and the high NPM1 protein expression (NPM1<sup>hi</sup>) clones were screened by Western blot. The cell proliferation was assayed by methylthiazolyl tetrazolium bromide (MTT), cell cycle and cell apoptosis by flow cytometric, cell colony formation by microscope count, the molecular pathways related to cell cycle by Western blot. The expression of NPM1 gene in primary AML bone marrow mononuclear cells (BMNC) was investigated by RQ-PCR. **Results** ①The proliferation of NPM1<sup>hi</sup> U937 and HL-60 cells was similar with that of control cells ( $4.68\pm 1.28$  vs  $3.89\pm 0.81$ ,  $3.34\pm 0.37$  vs  $2.68\pm 0.29$ ,  $P > 0.05$ ). ②The percentage of S phase in NPM1<sup>hi</sup> U937 and HL-60 cells was higher than that in control cells [( $50.22\pm 3.42$ )% vs ( $39.78\pm 3.80$ )%, ( $59.01\pm 3.27$ )% vs ( $43.94\pm 2.08$ )%,  $P < 0.05$ ]. ③The anti-apoptosis capacity and colony formation abilities of NPM1<sup>hi</sup> U937 cells increased than that of control cells [( $68.8\pm 10.2$ )% vs ( $48.7\pm 3.22$ )%, and ( $772.7\pm 24.0$ ) vs ( $652.3\pm 16.5$ )],  $P < 0.05$ ], but the above abilities of NPM1<sup>hi</sup> HL60 cells were similar with that of control cells. ④ The expressions of CDK4, Cyclin D1, Cyclin D2 and Cyclin E in NPM1<sup>hi</sup> leukemia cells were higher than that

of control cells, but the expression of Cyclin D3 was lower. ⑤ The NPM1 expression levels in AML patients with favorable cytogenetic prognosis were lower than that of patients with intermediate prognosis.

**Conclusions** NPM1 protein could promote more cells to enter S phase, enhance the ability of anti-apoptosis and colony formation in AML cell lines. The quantitative level of NPM1 may predict the cytogenetic risk of AML patients.

**【Key words】** Gene, NPM1; Leukemia, myeloid, acute

**Fund program:** Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (16JCQNJC12200); Tianjin hematology clinical medicine research center construction (15ZXLC-SY00010); CAMS Initiative for innovative Medicine(2016-I2M-1-001, 2016-I2M-3-004)

核仁磷酸蛋白(NPM1),又称为B23,主要定位于细胞核仁中,在胞质和胞核中穿梭,主要参与细胞核糖体合成、中心体复制、DNA修复等过程,另外还与P53、ARF等蛋白共同调控细胞凋亡<sup>[1-5]</sup>。目前发现NPM1蛋白在多种恶性肿瘤细胞中高表达,如胃癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌<sup>[6-10]</sup>。

NPM1基因与急性白血病关系的研究主要集中于携带NPM1突变的急性髓系白血病(AML),该类型白血病预后良好,对化疗敏感,其中NPM1突变水平可作为微小残留病(MRD)监测的重要指标<sup>[11-12]</sup>。此外,NPM1可与其他基因形成融合蛋白,如NPM-RAR $\alpha$ 、NPM-MLF1<sup>[13-14]</sup>。但是野生型NPM1基因的异常表达在急性白血病中的作用尚未得到充分关注,因此本研究通过构建野生型NPM1载体,转染常见人类白血病细胞系U937和HL-60细胞,探讨NPM1基因高表达对白血病细胞的影响。同时定量检测不同类型初诊急性白血病患者的NPM1 mRNA定量负荷,评价NPM1表达水平对危险度的影响。

### 材料与方法

1. 细胞培养:人类白血病细胞系U937和HL-60细胞由本实验室保存,于含10%灭活胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。

2. 质粒构建、转染及单克隆细胞系建立: NPM1质粒由原代患者骨髓细胞中通过PCR扩增得来,通过酶切位点克隆进入pcDNA3.1-myc质粒中。将pcDNA3.1空载体、NPM1质粒通过lipofectamine2000转染至U937和HL-60细胞,通过极限稀释法、Western blot鉴定,挑选高表达NPM1蛋白的细胞系作为实验组,而转染空载体的细胞系作为对照组。

3. 细胞周期测定:将细胞离心后用PBS洗涤,以75%乙醇固定至少24 h,3 ml RNA酶和150 ml 碘化丙啶(PI)室温孵育10~15 min,通过FACS

LSR II 流式细胞仪(美国BD Bioscience公司产品)测定细胞周期。

4. 细胞增殖活性测定:将对数生长期细胞以 $1 \times 10^4$ /孔接种于96孔板,检测时间点加入10 ml MTT,4 h后加入10% SDS 100 ml 孵育12~16 h,通过酶标仪(美国BioTekInstruments公司产品)检测546 nm波长处吸光度(A)值,计算细胞增殖活性。

5. 细胞凋亡测定:将对数生长期细胞与化疗药物孵育48 h后,收集细胞离心,PBS洗涤后重悬于50 ml 结合缓冲液中,分别加入2 ml Annexin-V和3.5 ml PI,混匀后避光孵育15 min,最后加入100~150 ml 结合缓冲液,通过FACS LSR II 流式细胞仪检测细胞凋亡比例。

6. 细胞集落形成检测:收集对数生长期细胞,将细胞吹散成单个细胞悬于含有2% FBS的IMDM培养液中,制成 $1 \times 10^5$ /ml的细胞悬液,将细胞悬液与甲基纤维素培养基按1:10比例吹打混合均匀,将混合体系转移接种于96孔板中,每孔100 ml,每组设3个平行孔;置于37℃、5% CO<sub>2</sub>、湿度 $\geq 95\%$ 孵箱培养7 d,计数集落,Nikon Eclipse TS100显微镜照相(日本Nikon公司产品)。

7. 实时荧光定量PCR(RQ-PCR)检测NPM1 mRNA水平:NPM1基因正向引物:5'-TGTGAAC-TAAAGGCCGACAA-3',反向引物:5'-TATTTCAAAGCCCCAAGG-3',产物大小为234 bp,内参对照为GAPDH。反应体系(10  $\mu$ l):2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu$ l,Rox Dye II 0.4  $\mu$ l,正向引物0.4  $\mu$ l,反向引物0.4  $\mu$ l,cDNA 2  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ l。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃延伸34 s,重复40个周期。样本NPM1 mRNA相对表达量(RQ)用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

8. 原代骨髓标本采集:收集中国医学科学院血液病医院2009年9月至2010年9月间5例原发免疫性血小板减少症(ITP)患者(对照组)和42例初诊急性白血病患者骨髓标本,其中急性B淋巴细胞白

血病(B-ALL)5例,AML37例(M<sub>2a</sub>7例,M<sub>2b</sub>9例,M<sub>3</sub>6例,M<sub>4</sub>/M<sub>5</sub>11例,M<sub>6</sub>4例)。采用淋巴细胞分离液提取骨髓单个核细胞。

9. 统计学处理:采用SPSS17.0软件进行统计学分析。两组细胞生物学实验数据比较采用独立样本 *t* 检验,多组细胞生物学实验数据比较采用方差分析,每组实验至少重复3次。各组NPM1定量水平比较采用非参数检测(两组间采用Mann-Whitney *U* 检验;多组间采用Kruskal-Wallis *H* 检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

一、NPM1基因表达对白血病细胞生物学特性的影响

1. 细胞增殖:U937对照组和实验组细胞培养72 h,细胞相对增殖率(与培养0 h时的比值)分别为 $3.89 \pm 0.81$ 和 $4.68 \pm 1.28$ ,差异无统计学意义( $t = 1.661, P > 0.05$ );HL-60细胞两组相对增殖率分别为 $2.68 \pm 0.29$ 和 $3.34 \pm 0.37$ ,差异亦无统计学意义( $t = 1.220, P > 0.05$ )。

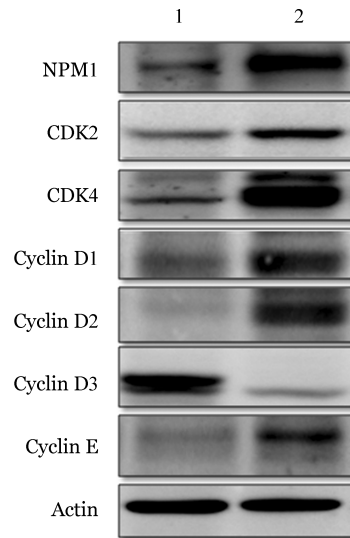
2. 细胞周期:U937对照组和实验组细胞经48 h孵育,S期细胞比例分别为 $(39.78 \pm 3.80)\%$ 和 $(50.22 \pm 3.42)\%$ ,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例分别为 $(50.61 \pm 4.77)\%$ 和 $(36.42 \pm 3.16)\%$ 。HL-60细胞两组S期细胞的比例分别为 $(43.94 \pm 2.08)\%$ 和 $(59.01 \pm 3.27)\%$ ,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例分别为 $(39.46 \pm 0.74)\%$ 和 $(27.82 \pm 1.13)\%$ 。U937和HL-60细胞实验组S期比例均明显高于对照组( $t = 10.46, P < 0.001; t = 12.02, P < 0.001$ ),而G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例明显低于对照组( $t = 7.706, P < 0.001; t = 15.56, P < 0.001$ )。

3. 细胞凋亡:U937对照组和实验组细胞经1 mg/ml依托泊苷处理48 h,早期凋亡细胞比例分别为 $(68.77 \pm 10.21)\%$ 和 $(48.67 \pm 3.22)\%$ ,差异有统计学意义( $t = 3.81, P < 0.05$ );HL-60对照组和实验组细胞经0.1 mg/ml依托泊苷处理48 h,早期凋亡细胞比例分别为 $(44.59 \pm 11.16)\%$ 和 $(39.37 \pm 0.75)\%$ ,差异无统计学意义( $t = 1.465, P > 0.05$ )。

4. 细胞集落形成能力:U937对照组和实验组细胞在半固体培养基中培养7 d,集落数分别为 $652.3 \pm 16.5$ 和 $772.7 \pm 24.0$ ,差异有统计学意义( $t = 7.864, P < 0.001$ );HL-60两组细胞集落数分别为 $186.0 \pm 19.8$ 和 $239.0 \pm 4.2$ ,差异无统计学意义( $t = 2.828, P > 0.05$ )。

二、NPM1基因表达对细胞周期相关信号通路蛋白表达的影响

如图1所示,实验组U937细胞中CDK4、Cyclin D1、Cyclin D2和Cyclin E的表达明显强于对照组,而Cyclin D3几乎不表达,提示高表达NPM1蛋白,能够增加细胞中CDK4/Cylin D1、CDK4/Cyclin D2及CDK2/Cyclin E复合物的表达,而CDK6/Cyclin D3复合物的表达受到抑制。



1:转染空载体组;2:转染NPM1基因组

图1 Western blot法检测NPM1基因表达对U937细胞的细胞周期蛋白表达的影响

三、初诊急性白血病患者中NPM1 mRNA定量检测

我们通过RQ-PCR方法检测初诊急性白血病患者骨髓单个核细胞NPM1 mRNA的水平,并分析NPM1表达与患者预后的关系。如表1、图2所示,NPM1定量水平与NPM1突变( $P = 0.794$ )、FLT-ITD突变( $P = 0.164$ )、诱导化疗疗效( $P = 0.755$ )、FAB分型( $P = 0.081$ )及WBC( $P = 0.506$ )分组无明显相关,但与细胞遗传学分组相关( $P = 0.043$ ),其中预后良好组NPM1 mRNA表达水平明显低于预后中等组( $P = 0.018$ )。

## 讨 论

NPM1蛋白的表达在细胞中发挥重要作用,其在多数肿瘤细胞过表达,发挥原癌蛋白的作用,包括胃癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌,但其目前在AML中的作用和意义尚不明确,更多的热点集中在



表1 42例初诊急性白血病患者临床特征和NPM1表达水平的关系

临床特征	例数	中位NPM1 表达水平	统计量	P值
WBC			137.5	0.506
<50×10 <sup>9</sup> /L	32	0.953		
≥50×10 <sup>9</sup> /L	10	1.154		
FAB分型			5.0	0.081
B-ALL	5	1.020		
M <sub>2b</sub> /M <sub>3</sub>	15	0.659		
M <sub>2a</sub> /M <sub>4</sub> /M <sub>5</sub> /M <sub>6</sub>	22	1.454		
NPM1突变			32.0	0.794
阴性	36	1.018		
阳性	2	4.817		
FLT3-ITD突变			43.5	0.164
阴性	38	1.042		
阳性	4	0.301		
诱导化疗疗效			140.0	0.755
CR	30	1.179		
NR	10	0.927		
细胞遗传学分组			6.3	0.043
良好	15	0.659		
中等	25	1.577	102.5	0.018 <sup>a</sup>
不良	2	0.777		

注: B-ALL: 急性B淋巴细胞白血病; CR: 完全缓解; NR: 未缓解; <sup>a</sup> 与良好组比较的P值

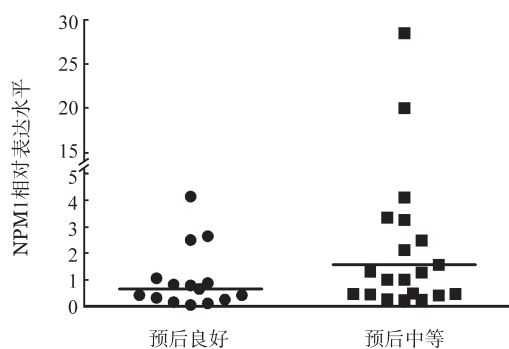


图2 急性白血病患者不同细胞遗传学预后组骨髓单个核细胞NPM1表达水平比较

NPM1 突变和平衡易位。本研究通过在 U937 和 HL-60 细胞系中高表达 NPM1 蛋白, 研究高表达的 NPM1 蛋白在白血病细胞中的作用。研究结果显示, NPM1 蛋白未对细胞增殖产生显著的影响, 但能促进更多细胞进入 S 期, 该作用可能与促进 CDK4/Cylin D1、CDK4/Cyclin D2 及 CDK2/Cyclin E 复合物的表达, 抑制 CDK6/Cyclin D3 复合物的表达相关。同时 NPM1 蛋白可增强细胞抵抗化疗药物诱导的细胞凋亡的能力, 增强细胞集落形成能力。通过

RQ-PCR 检测急性白血病患者中 NPM1 的表达水平, 发现细胞遗传学预后良好组 NPM1 表达水平低于预后中等组。

目前 NPM1 蛋白在恶性肿瘤中的作用机制主要通过 P53 相互作用实现。有研究报道结肠癌中 NPM1 蛋白对细胞周期的作用可通过调控 P53 下游蛋白 p21 和 Cyclin D3 实现<sup>[15]</sup>。本研究结果也同样显示 NPM1 高表达后, Cyclin D3 表达量明显降低, 提示其在 AML 中同样发挥作用。目前 NPM1 与 Cyclin/CDK 间相互作用研究较少, 仍需要进一步研究。近年来, 有研究在细胞系或小鼠中敲除 NPM1 基因, 但结果显示敲除后会通过 ARF 途径导致细胞增殖受到抑制, NPM1 表达的缺失也能导致肿瘤的发生, 被认为可能是抑癌基因<sup>[16-17]</sup>。因此, NPM1 基因的表达在肿瘤细胞尤其是急性白血病细胞的作用仍需要更多的研究予以探索和确认。

本研究中高表达 NPM1 的 HL-60 细胞与对照组细胞在细胞增殖能力、抗凋亡能力方面差异无统计学意义。可能的原因是, NPM1 蛋白主要通过 P53 发挥作用, 而 HL-60 细胞系中 P53 为缺失型, 故 NPM1 蛋白在 HL-60 细胞系中的作用受到一定的限制。目前尚需要通过动物实验及 RNA 干扰技术, 对 NPM1 在急性白血病中的功能进行进一步验证。此外本研究结果提示 NPM1 定量水平与 NPM1 突变无明显相关性, 但由于 42 份原代细胞标本中仅有 2 例存在 NPM1 突变, 故仍需通过扩大样本量进一步确认 NPM1 蛋白的表达量是否受 NPM1 突变的影响。

本项研究初步探讨了 NPM1 基因表达在急性白血病中的作用, 体外实验提示 NPM1 基因可能发挥原癌基因的作用, 主要通过促进细胞进入 S 期、抵抗凋亡和增强细胞集落形成能力实现, 而原代白血病细胞 NPM1 的定量水平与细胞遗传学分组相关, 为以后 NPM1 蛋白是否能够作为白血病监测和治疗的靶标提供了新的思路和研究方向。

#### 参考文献

- [1] Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein [J]. J Biochem, 2008, 143(4):441-448. DOI: 10.1093/jb/mvm222.
- [2] Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al. Nucleophosmin and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(7):493-505. DOI: 10.1038/nrc1885.
- [3] Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, et al. Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies [J]. Cancer Sci, 2006, 97 (10):963- 969. DOI: 10.1111/j.1349-

- 7006.2006.00270.x.
- [4] Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, et al. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(17):7534-7545. DOI: 10.1128/MCB.25.17.7534-7545.2005.
- [5] Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication[J]. *Oncogene*, 2002, 21(40):6170-6174. DOI:10.1038/sj.onc.1205708.
- [6] Tanaka M, Sasaki H, Kino I, et al. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(12):3372-3377.
- [7] Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, et al. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa[J]. *J Pathol*, 1996, 178(1):48-52. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199601)178:1 <48::AID-PATH432 > 3.0.CO;2-Y.
- [8] Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, et al. Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23[J]. *Prostate*, 1999, 39(4):298-304.
- [9] Tsui KH, Cheng AJ, Chang Pe, et al. Association of nucleophosmin/B23 mRNA expression with clinical outcome in patients with bladder carcinoma[J]. *Urology*, 2004, 64(4):839-844. DOI: 10.1016/j.urology.2004.05.020.
- [10] Shields LB, Gerçel-Taylor C, Yashar CM, et al. Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity[J]. *J Soc Gynecol Investig*, 1997, 4(6):298-304.
- [11] Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(18):1909-1918. DOI: 10.1056/NEJMoa074306.
- [12] Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features[J]. *Blood*, 2007, 109(3):874-885. DOI:10.1182/blood-2006-07-012252.
- [13] Redner RL. Variations on a theme: the alternate translocations in APL[J]. *Leukemia*, 2002, 16(10):1927-1932. DOI: 10.1038/sj.leu.2402720.
- [14] Berger R, Busson M, Baranger L, et al. Loss of the NPM1 gene in myeloid disorders with chromosome 5 rearrangements[J]. *Leukemia*, 2006, 20(2):319-321. DOI: 10.1038/sj.leu.2404063.
- [15] Wong JC, Hasan MR, Rahman M, et al. Nucleophosmin 1, upregulated in adenomas and cancers of the colon, inhibits p53-mediated cellular senescence[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(7):1567-1577. DOI: 10.1002/ijc.28180.
- [16] Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis[J]. *Nature*, 2005, 437(7055):147-153. DOI:10.1038/nature03915.
- [17] Colombo E, Bonetti P, Lazzerini Denchi E, et al. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(20):8874-8886. DOI:10.1128/MCB.25.20.8874-8886.2005.

(收稿日期:2017-03-07)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

## 本刊对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MESH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对于没有通用译名的名词术语,在文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。冠以外国人名人的体征、病名、试验、综合征等,人名可以用中译文,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“'s”。

文中应尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。

本刊编辑部