论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0938-04

RNAi 重组体抑制白血病 K562 细胞系中 NPM1 基因的表达

何 鹏,骆展鹏,张 伶,杨 松,钟晓明,高玉洁 (重庆医科大学医学检验系临床血液学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 构建核仁磷酸蛋白1(nucleophosmin1,NPM1)特异性的RNAi真核表达载体,观察对白血病K562细胞系NPM1表达的抑制作用。**方法** 采用RT-PCR检测白血病细胞系(THP1和K562)和急性髓系白血病(AML)细胞NPM1 mRNA水平。设计合成2条针对NPM1基因并具有小发夹结构的DNA序列,经退火形成互补双链,再克隆至载体pGenSil-1中构建含NPM1的RNAi重组体,经酶切及测序鉴定后通过脂质体转染K562细胞,同时设立pGenSil-1转染组和pGenSil-1/neg转染组。采用RT-PCR检测各组转染细胞中NPM1的mRNA水平。**结果** 白血病细胞系和AML细胞均高表达NPM1 mRNA。针对人NPM1基因的RNAi重组体构建成功,并能够稳定转染K562细胞,导致白血病细胞NPM1 mRNA相对表达量下降64%,而pGenSil-1转染组和pGenSil-1/neg转染组未能下调NPM1表达。**结论** 白血病细胞高表达NPM1基因,其mRNA表达水平能够被靶向NPM1的RNAi重组体特异性地下调。

关键词: 核仁磷酸蛋白1;RNA干扰;白血病;K562细胞

中图法分类号: R394.3;R73-362;R733.7 **文献标识码:** A

RNA interference silencing nucleophosmin 1 inhibits NPM1 gene expression in K562 cells

HE Peng, LUO Zhan-peng, ZHANG Ling, YANG Song, ZHONG Xiao-ming, GAO Yu-jie (Department of Clinical Hematology, Faculty of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Medical Diagnostics of Education Ministry, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression vector of RNAi specific to nucleophosmin1 (NPM1) and investigate the effect of recombinant plasmid on NPM1 expression in K562 cells. **Methods** The expression level of NPM1 mRNA was detected by RT-PCR in leukemia cell lines (THP1 and K562), bone marrow or blood samples from 5 patients with acute myelogenous leukemia (AML) and from 5 healthy subjects. A short hairpin RNA targeting NPM1 was synthesized and inserted into the plasmid pGenSil-1. After the recombinant plasmid was identified, the correct plasmid was transfected into K562 cells, then the expression level of NPM1 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** NPM1 mRNA levels were higher in two leukemia cell lines and all AML samples than those in normal cells. The RNAi recombinant plasmid was constructed successfully. The NPM1 mRNA levels decreased by 64% in K562 cells after the recombinant plasmid transfection, but those were not inhibited in K562 cells transfected with empty plasmid and untransfected K562 cells. **Conclusion** NPM1 mRNA is overexpressed in leukemia cells. The RNAi recombinant targeting NPM1 suppresses the expression of NPM1 mRNA.

Key words: nucleophosmin 1; RNA interference; leukemia; K562 cells

核仁是细胞核内高度紧密的结构,是核糖体合成的部位,与细胞生长调节有密切的关系。核仁磷酸蛋白1(nucleophosmin1,NPM1)是组成核仁的主要分子之一,它在肿瘤细胞和增生细胞的含量明显高于正常静止期细胞,具有促进细胞增生和致癌基因的特性[1]。最近研究表明约30%的成人急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia,AML)患者NPM1基因存在移码突变。NPM1突变与AML的发生、发展密切相关,其中主要机制包括突变型NPM1蛋白与野生型NPM1蛋白形成异源二聚体,通过影响野生型NPM1

基金项目:重庆市教委科学技术研究基金(KJ050309)
Supported by the Sci & Tech Research Project of Scientific Committee of Chongqing (KJ050309)

作者简介:何 鹏,男,四川省南充市人,硕士研究生,技师,主要从事白血病干细胞基础与临床方面的研究。电话:(023)68485725

通信作者:张 伶,电话:(023)68485725,E-mail: cqumszhl@sina.com

收稿日期:2007-10-19;修回日期:2007-12-04

蛋白活性而参与白血病的发生[2,3]。虽然早先发现白血病患者骨髓细胞野生型 NPM1 蛋白含量比正常健康者高出 2 ~ 8 倍,但 NPM1 基因高表达在白血病细胞中的作用研究甚少。为此本研究首先检测白血病细胞 NPM1 基因的表达水平,然后构建针对人 NPM1 野生型基因的 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)载体并观察对 K562 白血病细胞靶基因的抑制效应,为进一步探讨 NPM1 基因失调在白血病细胞恶性转化中的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　细胞系

慢粒急变 K562 白血病细胞系、急性单核细胞白血病 THP1 细胞系购自中科院上海细胞生物研究所细胞库,由本室常规保存。

1.2　标本来源

5 例 AML 患者骨髓或外周血标本均来自重庆医科大学附属第一医院住院或门诊确诊病例。其中男性 3 例,女性 2 例,中位年龄 38(22 ~ 47)岁。参照 FAB 分型标准诊断,其中 M_1 1 例,M_2 3 例,M_5 1 例。5 例健康人为正常对照。

1.3　试剂

质粒载体 pGenSil-1 (武汉晶赛),大肠杆菌 DH5α (本室保存)。Lipofectamine™ 2000、RPMI1640 培养基、硫酸卡那霉素、G418 (Gibco),Ficoll 淋巴细胞分离液(上海生工),Trizol、质粒 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Omega),Reverse Transcriptase XL、PrimeSTAR DNA Ploymerase、DL 2000 DNA 标准、T_4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶 (大连宝生物)。引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.4　RT-PCR 检测白血病细胞 NPM1 基因

提取白血病细胞总 RNA,检测其完整性后逆转录(RT)合成 cDNA。PCR 引物设计参照文献[2],上游引物:5′-GGTTGTTCTCTGGAGCAGCGTTC-3′,下游引物:5′-CCTGGACAACATTTATCA AACACGGTA-3′,产物大小为 1 088 bp。内参照 β-actin 上游引物:5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′,下游引物:5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′,产物大小为 285 bp。反应条件:94 ℃ 预变性 1 min 后,98 ℃ 30 s, 53 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,循环 35 次后,72 ℃延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,读取产物条带光密度值(D),NPM1 mRNA 相对表达量以 $D_{NPM1}/D_{\beta\text{-actin}}$ 表示。同时检测 5 例正常人外周血单个细胞(PBMC)样本。

1.5　NPM1 基因 shRNA 序列设计

根据 RNAi 设计原则及 BLAST 软件同源性比对结果,同时参考文献[4],最后选定从 NPM1 基因(GenBank 录入号:NM_002520)第 393 个核苷酸开始的 19 个核苷酸“AATGTCTGTACAGCCAACG”作为 RNA 干扰的靶位点。按以下结构:*Bam*H Ⅰ + 正义链 + Loop + 反义链 + 终止信号 + *Sal* Ⅰ + *Hind* Ⅲ,设计 NPM1 基因短发夹 RNA(short hairpin RNA,shRNA)互补双链,正义链和反义链分别为:5′-GATCCAATGTCTGTACAGCCAACGTTCAAGACGCGTTGGCTGTACAGACATTTTTTTGTCGACA-3′,5′-AGCTTGTCGACAAAAAAATGTCTGTACAGCCAACGCGTCTTGAACGTTGGCTGTACAGACATTG-3′。

同时设计与人类基因无同源性的阴性对照 shRNA 双链,其靶向序列为:5′-GCTTCATAAGGCGCATAGCTTC-3′。

1.6　重组质粒的构建

取等量已用退火缓冲液溶解的互补 DNA 单链,常规退火得到双链 DNA。将质粒 pGenSil-1 用 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳后回收大片段。将退火产物与线性化的质粒载体用 T_4 DNA 连接酶连接,16 ℃过夜。取 5 μl 连接产物转化感受态细菌 DH5α,涂布于含硫酸卡那霉素(终浓度为 20 μg/ml) 的 LB 平板上,37 ℃培养过夜。各挑取 3 个单菌落接种到含硫酸卡那霉素(终浓度为 20 μg/ml)的 LB 培养液中扩大培养,收集菌液小量提取质粒 DNA 备用。

1.7　重组质粒的鉴定

将重组质粒分别用 *Pst* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 进行酶切鉴定,反应体系为 20 μl,包括质粒 DNA 8 μl、10 × Buffer 1 μl、*Pst* Ⅰ/*Sal* Ⅰ 1 μl,37 ℃水浴 4 h。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将酶切正确的质粒送上海 Invitrogen 公司进行 DNA 测序。经测序鉴定正确的 NPM1 干扰质粒命名为 pGenSil-1/NPM1,阴性对照命名为 pGenSil-1/neg。

1.8　重组质粒转染

取 4×10^5 个对数生长期的 K562 细胞接种于 24 孔培养板,培养液体积为 500 μl。按脂质体试剂说明书,将 pGenSil-1/NPM1 转染至 K562 细胞为 pGenSil-1/NPM1 转染组,同时以 pGenSil-1/neg 转染组为阴性对照、pGenSil-1 转染组为空白对照。转染后细胞在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中常规培养 48 h 后,用含 G418(终浓度为 800 μg/ml)的选择培养基筛选 1 周,在倒置荧光显微镜下观察转染效率。

1.9　RNAi 对白血病细胞 NPM1 基因表达的抑制

分别提取转染前后各组 K562 细胞的总 RNA,采用 1.4 中建立的 RT-PCR 方法,检测各白血病 K562 细胞中 NPM1 mRNA 的表达水平,实验重复 3 次。

1.10　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,组间两两比较采用 t 检验。

2　结果

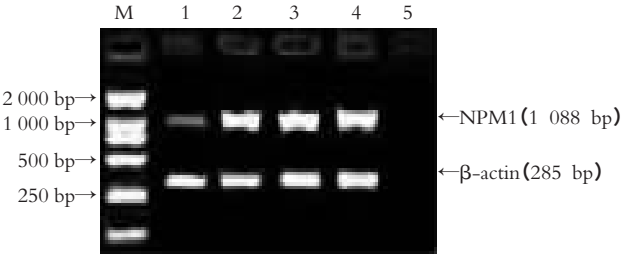
2.1　白血病细胞高表达 NPM1 基因

RT-PCR 结果显示,正常外周血单个核细胞(PBMC)中仅检测到微弱的 NPM1 基因产物条带,与预期产物大小(1 088 bp)一致。同样,2 种白血病细胞系及 AML 骨髓细胞检出 NPM1 基因,其 PCR 产物条带亮度明显强于 PBMC 样本。内参照 β-actin 在相应位置(285 bp)出现明亮的扩增条带,见图 1。

2.2　重组质粒的鉴定

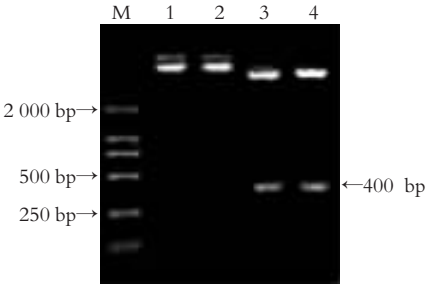
由于目的基因片段的插入,重组质粒中 *Pst* Ⅰ 酶切位点被引入的 *Sal* Ⅰ 位点取代,与载体自带的 *Sal* Ⅰ 位点形成酶切双位

点。酶切鉴定结果显示,重组质粒 pGenSil-1/NPM1、pGenSil-1/neg 均不能被 *Pst* Ⅰ酶切,但均能被 *Sal* Ⅰ酶切出 1 条 400 bp 的 DNA 小带,与理论结果相符,表明各重组质粒中目的 DNA 片段连接正确(图 2)。



M: DNA 标准(DL 2000); 1: PBMC; 2: K562; 3: THP1; 4: AML; 5: 试剂空白

图 1 白血病细胞 NPM1 mRNA 表达水平



M: DNA 标准(DL 2000); 1: pGenSil-1/NPM1; 2: pGenSil-1/neg; 3: pGenSil-1/NPM1; 4: pGenSil-1/neg

图 2 重组质粒经 *Sal* Ⅰ酶切鉴定结果

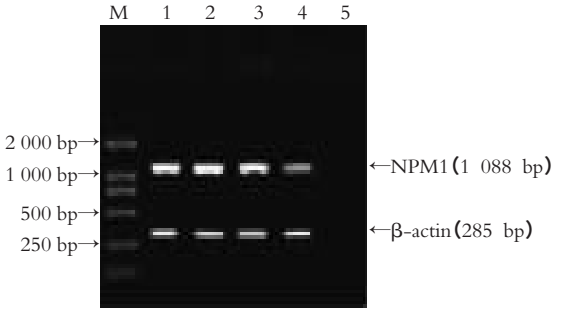
进一步将重组质粒进行 DNA 测序验证,结果证实插入的 DNA 片段序列与设计的 shRNA 序列完全一致,碱基无突变,表明 pGenSil-1/NPM1、pGenSil-1/neg 质粒构建成功。

2.3 重组质粒转染

重组质粒 pGenSil-1/NPM1、pGenSil-1/neg 及空质粒 pGenSil-1 转染 K562 细胞 48 h 后,倒置显微镜观察发现转染前后细胞形态无明显改变。经 G418 筛选阳性克隆 1 周,荧光显微镜下可见带有绿色荧光的白血病细胞,见图 3。

2.4 RNAi 对白血病细胞 NPM1 基因表达的抑制

与未转染组 K562 细胞相比,实验组 K562 细胞 NPM1 基因的 RT-PCR 扩增产物条带亮度明显减弱(图 4),NPM1 mRNA 相对表达量由(1.694 ± 0.049)减少为(0.606 ± 0.041),下降了 64%($P < 0.01$)。pGenSil-1 转染组(1.660 ± 0.068)和pGenSil-1/neg 转染组(1.714 ± 0.035)分别与未转染组比较,转染细胞 NPM1 mRNA 表达未见明显差异($P > 0.05$)。



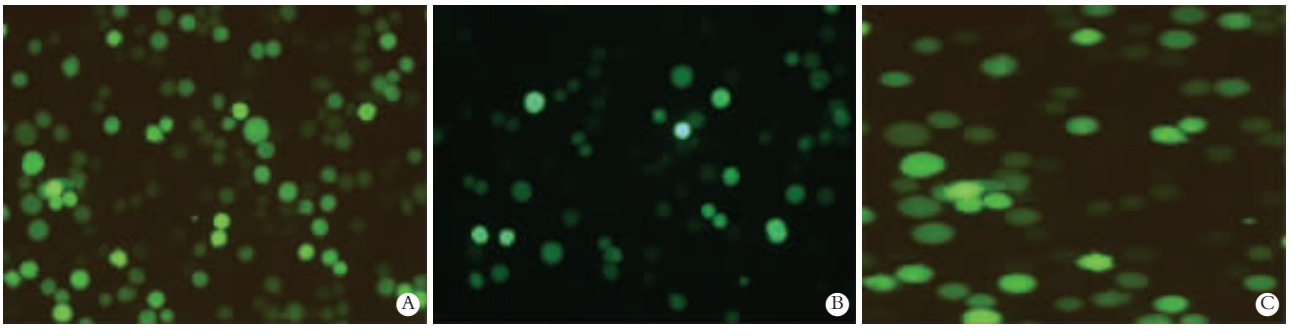
M: DNA 标准(DL 2000); 1: 未转染细胞; 2: pGenSil-1 转染细胞; 3: pGenSil-1/neg 转染细胞; 4: pGenSil-1/NPM1 转染细胞; 5: 试剂空白

图 4 转染前后 K562 细胞 NPM1 mRNA 的表达

3 讨论

NPM1 蛋白是一种具有多种生物学功能的穿梭蛋白,参与核糖体的合成和中心体的复制,在胚胎正常发育和维持基因组的稳定中起重要作用[5]。此外,NPM1 蛋白还具有调节可变阅读框(alternative reading frame, ARF)和 p53 等肿瘤抑制蛋白活性的功能[6]。研究表明肿瘤细胞 NPM1 基因往往发生异常改变,肝癌等实体肿瘤细胞 NPM1 基因呈高表达,这与瘤细胞需要合成大量的蛋白质以满足其高增殖的特性有关[7]。在淋巴瘤和部分 AML 患者中,累及 NPM1 基因的染色体易位和 12 外显子突变是导致 NPM1 基因功能失调的原因之一[8,9],而具有高增殖潜能的白血病细胞是否存在 NPM1 基因表达量的改变,以及 NPM1 基因高表达在白血病发生中的作用等问题尚未完全阐明。

本实验中,我们首先采用 RT-PCR 检测了白血病细胞 NPM1 mRNA 表达水平, 发现 5 例白血病骨髓标



A: pGenSil-1/NPM1 转染组; B: pGenSil-1/neg 转染组; C: pGenSil-1 转染组

图 3 绿色荧光蛋白在 K562 白血病细胞中的表达 (倒置荧光显微镜 ×200)

本和 2 种白血病细胞系 NPM1 mRNA 水平均高于正常外周血单个核细胞。Kondo 等[10]采用 Northern blot 检测不同来源的白血病细胞 NPM1 mRNA 水平,结果显示 75%(6/8)的白血病骨髓细胞和髓系来源的 K562 白血病细胞系皆高表达 NPM1 基因。进一步研究表明,过量表达的 NPM1 蛋白除了能够通过参与核糖体的合成促进产生大量的蛋白质外,还可与干扰调节因子-1(interferon regulatory factor 1,IRF-1)结合,通过抑制其转录活性而发挥促癌作用。因此 NPM1 基因可能成为白血病基因治疗的新靶点。

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)具有特异高效沉默目的基因的特点,已成为研究基因功能的有力工具。Korgaonkar 等[11]利用针对 NPM1 基因的 RNAi 质粒载体有效地抑制了骨肉瘤 U2OS 细胞系 NPM1 蛋白的表达,而 Li 等[4]构建针对 NPM1 基因的 RNAi 逆转录病毒载体,感染人 UoC-M1 白血病细胞系后成功地下调 NPM1 蛋白表达,说明利用 RNAi 抑制白血病细胞 NPM1 基因的表达是有效的。实验中我们构建针对 NPM1 基因的干扰质粒载体 pGenSil-1/NPM1,将其稳定导入 NPM1 基因高表达的 K562 细胞中,结果显示白血病细胞中 NPM1 mRNA 的表达明显受抑,其相对表达量均值下降 64%,而在 pGenSil-1/neg 转染和 pGenSil-1 转染细胞中未见 NPM1 基因表达的明显下调,提示 pGenSil-1/NPM1 能够在白血病细胞中发挥干扰 NPM1 基因表达的作用,下一步实验尚需在蛋白质水平上证实 RNAi 对白血病细胞 NPM1 表达的抑制作用。

最近发现 NPM1 基因突变是 AML 发生频率最高的一种分子遗传学改变,可出现在 AML 的 FAB 各亚型(M3 除外)中,主要累及染色体核型正常的患者,并与疾病的发生、发展密切相关[12]。NPM1 基因突变导致核定位信号的丢失,使 NPM1 蛋白异常移位至细胞质,一方面直接影响了 ARF 蛋白的定位和活性,另一方面可与野生型 NPM1 蛋白形成异源二聚体而干扰野生型 NPM1 蛋白功能的发挥[13]。因此,野生型 NPM1 蛋白在 AML 细胞中的功能值得深入研究。在成功构建针对 NPM1 的 RNAi 载体的基础上,尚需进一步探讨 NPM1 基因沉默后对白血病细胞增殖、分化和凋亡等生物学特性的影响。

本研究证实了白血病细胞中 NPM1 基因呈高表达,并成功构建靶向 NPM1 基因的 RNAi 载体,能有效抑制 K562 细胞靶基因的表达,为进一步探讨 NPM1 基因在白血病发生中的作用奠定基础,同时也给以 NPM1 基因为靶点的白血病基因治疗提供了新的思路和方法。

参考文献:

[1] Li J, Sejas D P, Rani R, *et al*. Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281(24): 16536 – 16545.

[2] Falini B, Mecucci C, Tiacci E, *et al*. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype [J]. N Engl J Med, 2005, 352(3): 254 – 266.

[3] Grisendi S, Pandolfi P P. NPM mutations in acute myelogenous leukemia[J]. N Engl J Med, 2005, 352(3): 291 – 292.

[4] Li J, Zhang X, Sejas D P, *et al*. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells[J]. Leuk Res, 2005, 29(12): 1415 – 1423.

[5] Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, *et al*. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis [J]. Nature, 2005, 437(7055): 147 – 153.

[6] 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.

[7] Yun J P, Miao J, Chen G G, *et al*. Increased expression of nucleophosmin/B23 in hepatocellular carcinoma and correlation with clinicopathological parameters[J]. Br J Cancer, 2007, 96(3): 477 – 484.

[8] Gu T L, Tothova Z, Scheijen B, *et al*. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a[J]. Blood, 2004, 103(12): 4622 – 4629.

[9] Thiede C, Koch S, Creutzig E, *et al*. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) [J]. Blood, 2006, 107(10): 4011 – 4020.

[10] Kondo T, Minamino N, Nagamura-Inoue T, *et al*. Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity [J]. Oncogene, 1997, 15(11): 1275 – 1281.

[11] Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, *et al*. Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(4): 1258 – 1271.

[12] Falini B, Bolli N, Shan J, *et al*. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc + AML[J]. Blood, 2006, 107(11): 4514 – 4523.

[13] Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, *et al*. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3044 – 3050.

(编辑　王　红)