文章编号:1000-5404(2010)08-0783-04

论著

核仁磷酸蛋白突变基因表达对NIH3T3细胞增殖和凋亡的影响

邵会媛[1],杨再林[2],高玉洁[1],苗宗玉[1],覃凤娴[1],陈先春[1],蔡晓钟[1],张 伶[1] (400016 重庆,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[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院血液病中心[2])

[摘要] **目的** 探讨核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)突变基因对小鼠NIH3T3成纤维细胞系体外增殖和凋亡的影响以及其分子机制。**方法** 通过脂质体介导将真核表达载体pEGFP-C1-NPMc$^+$转染NIH3T3细胞,G418筛选稳定表达NPM突变蛋白细胞株,RT-PCR和Western blot检测NPM突变基因和蛋白的表达。MTT、克隆形成实验检测细胞体外增殖能力;FCM检测细胞周期分布及凋亡水平的改变,并通过对周期调控因子p21及凋亡相关分子Caspase-3活性检测,初步探讨NPM突变参与细胞恶性增殖的分子机制。**结果** 建立了稳定表达NPM突变基因的NIH3T3细胞株。NPM-mA实验组细胞较对照组细胞增殖能力及平板克隆形成率明显增高($P<0.05$);甲基纤维素集落形成实验显示各组细胞在甲基纤维素上均不能形成集落;与对照组比较,NPM-mA实验组细胞中G_1期细胞比例(42.27±0.86)%显著减低($P<0.01$),S期细胞比例(43.08±0.74)%显著增加($P<0.01$),同时伴有p21 mRNA水平下降,稳定表达NPM突变基因的NIH3T3细胞凋亡率(1.00±0.13)%明显降低($P<0.01$),Caspase-3活性(0.784±0.080)下降($P<0.01$)。**结论** NPM突变基因可促进NIH3T3细胞体外增殖,抑制细胞凋亡发生。

[关键词] 核仁磷酸蛋白,突变;细胞增殖;细胞凋亡;NIH3T3细胞
[中图法分类号] R394.2;R73-354;R730.23 **[文献标志码]** A

Nucleophosmin mutation promotes cell proliferation and suppresses apoptosis in NIH3T3 cells

Shao Huiyuan[1], Yang Zailin[2], Gao Yujie[1], Miao Zongyu[1], Qin Fengxian[1], Chen Xianchun[1], Cai Xiaozhong[1], Zhang Ling[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Centrer of Hematologic Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects and molecule mechanisms of nucleophosmin (NPM) mutation gene on cell proliferation and apoptosis in mouse fibroblast NIH/3T3 cells. **Methods** Eukaryotic expression vector pEGFP-C1-NPMc$^+$ was transfected into NIH3T3 cells by Lipofectamine, and the positive clones were screened by G418. Then the expression of NPM mutation gene and protein were analyzed by PCR and Western blot analysis respectively. To observe the effect of NPM mutation on cell proliferation *in vitro*, MTT and colony formation assays were used. To evaluate the mechanisms of cell proliferation induced by NPM mutations, the cell cycle and apoptosis were detected by FCM, meanwhile, the cycle regulatory factor p21 was analyzed by RT-PCR and the activity of Caspase-3 was detected. **Results** NIH3T3 cells stably expressing NPM mutation were established. The growth ability and the rate of plate colony formation of cells in experimental group were significantly higher than the control groups ($P<0.05$). Methylcellulose colony formation assay showed that cells of all groups could not form a colony in the cell culture media. Compared with control groups, the percentage of cells in the phase of G_2 was decreased remarkably ($P<0.01$) and that in the phase of S was increased significantly ($P<0.01$), and the expression of p21 mRNA was reduced notably ($P<0.05$). The rate of apoptosis and the activity of Caspase-3 were decrease remarkably ($P<0.01$) in experimental group. **Conclusion** NPM mutation gene in NIH3T3 cells can induce cell proliferation and inhibit apoptosis.

[Key words] nucleophosmin; mutations; cell proliferation; cell cycle; apoptosis; NIH3T3 cells

Supported by the National Natural Science Foundation (30872418). Corresponding author: Zhang Ling, 86-23-68485223, E-mail: cqumszhl@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30872418)
[通信作者] 张 伶,电话:(023)68485223,E-mail:cqumszhl@sina.com

核仁磷酸蛋白(nucleophosmin,NPM)是一种重要的核磷蛋白,位于核仁颗粒区,可穿梭于核仁、核质和胞质之间,在多种细胞生物过程中发挥作用。自2005年Falini等[1]在急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)中首次发现NPM突变以来,陆续证实NPM突变主要累及核型正常的AML患者,此外还可累及骨髓增生异常综合征[2]、慢性髓细胞白血病(chronic myelocytic leukemia,CML)急变期[3]等血液肿瘤。研究发现NPM突变与患者病程密切相关,顽固性AML及AML复发患者NPM突变基因水平较缓解期患者明显增高[4];而CML患者一旦出现NPM突变,提示疾病可在短期内迅速发展成为AML,导致患者预后较差[5]。因此NPM突变在临床上与白血病发生、发展密切相关。现已证实NPM突变可通过抑制ARF[6]等抑癌基因活性、增加c-myc癌蛋白稳定性[7]等多种方式参与调控AML的发生。然而,NPM突变基因在肿瘤细胞恶性转化中的作用并未完全阐明。因此,本实验通过稳定转染NPM突变基因,观察其对小鼠NIH3T3成纤维细胞增殖和凋亡的影响,初步探讨NPM突变在NIH3T3细胞恶性转化中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

脂质体Lipofectamine™ 2000购于美国Invitrogen公司,OPTI-MEMI培养基、G418购于美国Gibco公司,RNA提取试剂、RT-PCR试剂盒、引物合成、限制性内切酶*Bsp*EⅠ、*Eco*RⅠ均购于日本TaKaRa公司,小鼠抗人NPM单抗购于美国Neomaker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、甲基纤维素购于Sigma公司,Annexin V-PE凋亡检测试剂及Caspase-3活性检测试剂盒购于BioVision公司,7-AAD染色液购于BioLegend公司。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选稳定转染NPM-mA的细胞株 空载体(pEGFPC1)、含人NPM A型突变(NPM-mA)的重组质粒(pEGFPC1-NPM-mA)由意大利佩鲁贾大学血液病研究所Falini教授惠赠。NIH3T3成纤维细胞由本室保存,按常规方法培养。设立pEGFPC1-NPM-mA转染组(NPM-mA实验组)、pEGFPC1转染组(空载对照组)、Lipofectamine™2000转染组(Lipofectamine™ 2000对照组)。采用脂质体将各组质粒转染NIH3T3细胞。转染48 h后以G418(终浓度为450 μg/ml)筛选阳性克隆,采用有限稀释法筛选获得稳定转染的单克隆细胞,确定靶细胞有目的基因的高效转染之后扩大培养用于后续实验。

1.2.2 RT-PCR检测目的基因mRNA水平 提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA,进行PCR检测。NPM-mA引物序列:上游引物5′-TGGAGGTGGTAGCAAGGTTC-3′,下游引物5′-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3′,扩增片段为446 bp。内参β-actin引物序列:上游引物5′-GCTGTCCCTGTATGCCTCT-3′,下游引物5′-GATGTCACGCACGATTTCC-3′,片段为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。

1.2.3 Western blot检测目的基因蛋白水平 取15 μl(蛋白含量为50 μg)细胞裂解液用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∶100稀释)和羊抗鼠抗体(1∶2 000稀释)孵育2 h,洗涤后用化学发光进行显色。

1.2.4 细胞体外增殖能力实验

1.2.4.1 MTT实验 收集对数生长期细胞,以每孔1×10^3/150 μl接种96孔板,每组设5个复孔,5% CO_2,37 ℃孵育,培养第0、1、2、3、4天时每孔加入MTT溶液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490 nm处测量各孔的光密度值[D(490)]。以时间为横坐标,每组D(490)均值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.4.2 细胞平板克隆形成实验 收集对数生长期细胞,以每孔300个细胞接种6孔板,每组设5个复孔,5% CO_2、37 ℃培养14 d,出现肉眼可见的克隆时弃去培养液,0.4%多聚甲醛固定30 min,苏木精染色30 min。显微镜下计数各组克隆数(大于50个细胞为1个克隆),并按照公式:克隆形成率=(克隆数/300)×100%。

1.2.4.3 甲基纤维素集落形成实验 收集对数生长期细胞,接种于直径为35 mm的细胞培养皿,每组设5个复孔。细胞培养体系包括:0.9%甲基纤维素,20%小牛血清,1×10^3个细胞。5% CO_2、37 ℃培养14 d,观察各组集落形成情况。

1.2.5 FCM检测细胞周期分布及凋亡 收集对数生长期细胞,调整各组细胞数≥1×10^6个,每组设3个复管,70%预冷乙醇固定过夜,PI室温染色30 min,流式细胞仪(FCM)检测细胞周期分布。同样方法收集细胞,每组设3个复管,0.01 mol/L PBS重悬,Annexin V-PE和7-AAD双染色后FCM检测各组细胞凋亡率。

1.2.6 RT-PCR检测p21 mRNA表达 提取细胞总RNA逆转录合成cDNA,进行PCR检测。p21引物序列为:上游引物5′-AGTAGTCCGTCGTCTGTTCG-3′;下游引物5′-GAGTGCAAGACAGCGACAAG-3′,扩增片段为310 bp。以β-actin为内参,片段大小为220 bp。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 Caspase-3活性检测 收集处理组(NPM-mA实验组、空载对照组、Lipofectamine™ 2000对照组)及阴性对照组(未处理NIH3T3)对数生长期细胞,调整细胞数≥1×10^6,PBS洗2次,每组设3个复管,加入50 μl Lysis Buffer和0.5 μl DTT,置冰上作用40 min,离心收集上清液,加入50 μl 2×Reaction Buffer和0.5 μl DTT,再分别加入5 μl Caspase-3底物,37 ℃避光孵育4 h,用酶标仪测定405 nm处的光密度值[D(405)],通过计算$D(405)_{处理组}/D(405)_{阴性对照组}$的比值来确定各组细胞Caspase-3活性。

1.3 统计学分析

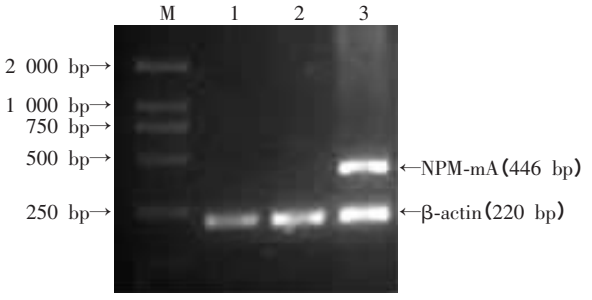
计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,SPSS 13.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 转染细胞对NPM突变基因和蛋白表达的影响

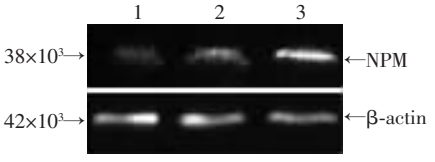
为鉴定目的基因NPM-mA是否稳定转染细胞,RT-PCR实验结果显示,实验组细胞的扩增产物电泳可查见NPM-mA条带与预期产物大小(446 bp)一致,Lipofectamine™ 2000对照组及

空载对照组均未查见该条带。内参 β-actin 的条带(220 bp)位置正确,见图 1。Western blot 检测靶蛋白表达,实验中采用针对人野生型 NPM 蛋白的单抗,结果显示各组细胞均表达 NPM 蛋白(38×10^3),其相对分子质量大小与预期相符。NPM-mA 实验组细胞高表达 NPM 蛋白,其目的蛋白条带灰度与内参灰度的比值明显高于 Lipofectamine™ 2000 对照组及空载对照组($P<0.01$)。见图 2。



M:DNA 标准(DL 2000);1:Lipofectamine™ 2000 对照组;2:空载对照组;3:NPM-mA 实验组

图 1　RT-PCR 检测各组细胞 NPM-mA mRNA 的表达

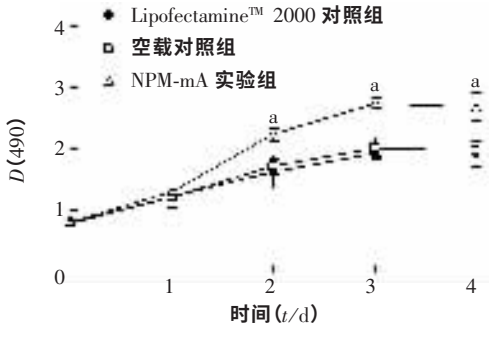


1:Lipofectamine™ 2000 对照组 ;2:空载对照组;3:NPM-mA 实验组

图 2　Western blot 检测各组细胞 NPM 突变蛋白的表达

2.2　NPM-mA 转染对 NIH3T3 细胞体外增殖的影响

2.2.1　MTT 实验检测细胞增殖能力　　观察转染后 4 d 细胞的生长情况,结果显示 NPM-mA 转染 1 d 后细胞生长速度明显加快,到 3 d 时达高峰,随后细胞生长减慢进入平台期。除 1 d 之外,各时间点 NPM-mA 实验组细胞光密度值显著高于 2 个对照组细胞($P<0.05$);而 Lipofectamine™ 2000 对照组与空载对照组之间细胞生长差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。



a:$P<0.01$,与 Lipofectamine™ 2000 及空载对照组比较

图 3　各组细胞生长曲线

2.2.2　体外克隆形成实验　　为了检测单个细胞的体外克隆形成能力,平板克隆形成实验显示 6 孔板中细胞培养 14 d 后呈单个散在的克隆性生长,NPM-mA 实验组细胞克隆形成率为(60.50 ± 8.07)%,Lipofectamine™ 2000 对照组和空载对照组分别为(37.00 ± 2.70)%和(37.40 ± 3.30)%,NPM-mA 实验组细胞克隆形成率明显多于对照组($P<0.05$)。

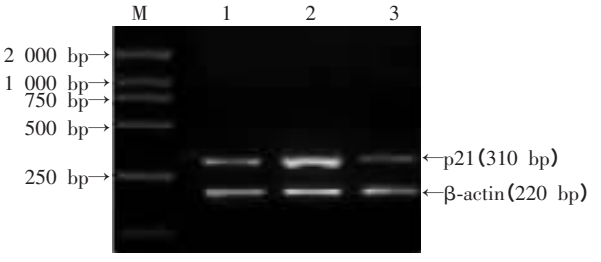
为了进一步检测细胞的恶性转化能力,半固体集落形成实验显示各组细胞在甲基纤维素上培养 2 周均未见集落形成,NPM-mA 实验组细胞在半固体培养基上生存(14.3 ± 1.6)d 后死亡,空载对照组细胞培养(7.0 ± 0.8)d 死亡。NPM-mA 转染使实验组细胞在体外半固体培养基中存活时间延长为对照组细胞的 2 倍。

2.3　NPM-mA 转染对 NIH3T3 细胞周期进程的影响

FCM 分析结果显示,NPM-mA 实验组细胞 G_1 期细胞比例为(42.27 ± 0.86)%,较 Lipofectamine™ 2000 对照组(54.03 ± 0.90)%和空载对照组(51.34 ± 0.41)%显著性降低($P<0.01$)。同时,NPM-mA 实验组 S 期细胞比例(43.08 ± 0.74)%明显高于 Lipofectamine™ 2000 对照组(27.14 ± 0.40)%和空载对照组(34.01 ± 1.13)%($P<0.01$)。各组之间 G_2 期细胞比例未见统计学差异($P>0.05$)。

2.4　RT-PCR 检测周期调控因子 p21 mRNA 的表达

结果显示,NPM-mA 实验组细胞 p21 表达水平下降,其与内参灰度比值较 Lipofectamine™ 2000 对照组和空载对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。



M:DNA 标准(DL 2000);1:Lipofectamine™ 2000 对照组;2:空载对照组;3:NPM-mA 实验组

图 4　RT-PCR 检测各组细胞 p21 mRNA 的表达

2.5　NPM-mA 转染对 NIH3T3 细胞凋亡的影响

AnnexinV/7-AAD 双标记染色后流式细胞仪检测,结果显示,NPM-mA 实验组细胞的凋亡率(1.00 ± 0.13)%,与空载对照组(2.15 ± 0.13)%、Lipofectamine™ 2000 对照组(1.77 ± 0.20)%比较凋亡率明显下降($P<0.01$)。

同时检测各组细胞 Caspase-3 活性,结果显示,NPM-mA 实验组细胞 Caspase-3 活性为(0.784 ± 0.080)较空载对照组(1.000 ± 0.083)、Lipofectamine™ 2000 对照组(1.033 ± 0.067)明显下降($P<0.01$)。

3　讨论

NPM 是一种重要的核磷蛋白质,在调节蛋白质合成、细胞生长增殖等方面发挥作用。NPM 突变是 AML 患者中发生频率最高的一类基因改变。目前证实 NPM 基因变异体有 55 种,其中最常见的是 mutation A(约占 70%),即在野生型 NPM 基因的外显子 12 核苷酸序列上第 956 ~ 959 位上插入 TCTG,其他多数 NPM 基因突变也是在外显子 12 的不同位置上插入不同的核苷酸[8]。有研究显示,NPM 突变与白血病的发生、发展密切相关,NPM 突变水平增高往往提示患者复发

难治,可作为检测微量残留白血病的一种新分子标志物[9,10]。NPM 突变基因改变了其核输出信号,导致 NPM 蛋白移位至细胞质,是 NPM 突变致病的分子基础[11]。NPMc$^+$形成的过程中将促使核仁内的抑癌蛋白 Arf 一并发生细胞质移位,导致 Arf 蛋白的稳定性降低,从而促进细胞过度增殖[6]。我们在前期观察 NPM 突变对白血病细胞生长影响的基础上[12],进一步探讨 NPM 突变基因表达对 NIH3T3 细胞增殖和凋亡的影响,借以明确 NPM 突变在细胞恶性转化中的作用。

本实验成功建立了稳定表达人 NPM 突变蛋白的 NIH3T3 细胞株,并通过设立 Lipofectamine^{TM}2000 对照组,拟消除实验中由于脂质体可能诱发的脱靶效应,从而提高实验结果的准确性和可靠性。MTT 实验和平板克隆形成实验证实 NPM-mA 转染可促进 NIH3T3 细胞的增殖能力和增强单个细胞的克隆形成能力,提示 NPM 突变能够促进 NIH3T3 细胞的体外生长。这与 2007 年 Cheng 等[13]在研究小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)时,发现 NPM 突变基因联合腺病毒 E1A 基因转染可促进 MEFs 体外恶性增殖的结论一致。同时发现 NPM-mA 转染可促进细胞周期从 G_1期向 S 期进展,细胞周期调控因子 p21 mRNA 表达水平下降。p21 是具有广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白,具有阻止细胞通过 G_1/S 期的作用。因此,NPM-mA 转染后 p21 下调可能解除了细胞从 G_1期向 S 期进展的阻力,促进细胞周期进程。此外,NPM 基因突变抑制 NIH3T3 细胞凋亡,伴有 Caspase-3 活性显著下降。Caspase-3 是一种半胱氨酸、天冬氨酸特异蛋白酶,参与细胞凋亡的执行过程,它的活化在细胞凋亡的线粒体途径和死亡受体/Fas 途径中均起着关键性作用。提示 NPM-mA 转染抑制细胞凋亡与 Caspase-3 活性下降有关,但 NPM-mA 通过何种途径发挥抗凋亡作用还有待于进一步研究。此外,本实验结果显示,NPM-mA 转染并不能促使贴壁生长的 NIH3T3 细胞在半固体上自发地形成集落。半固体集落形成的多少可反映肿瘤细胞锚着不依赖性的特性,且与其恶性程度呈正相关。因此 NPM-mA 转染还不能诱导 NIH3T3 细胞具有锚着不依赖性的恶性表型,提示单一的 NPM 基因突变还不足以使体外培养的 NIH3T3 细胞发生恶性转化。最近 Shing 等[14]在转基因小鼠体内研究 NPM 突变的致瘤作用,结果发现单一 NPM 突变并不能促进小鼠白血病的发生,NPM 突变使 p53 失活的同时还需与过度表达的转录因子 sPRDM16 协同才可诱导小鼠 AML 的发生,这也支持了本研究得出的单一 NPM 基因突变尚不足以致细胞恶性转化的结论。

总之,本研究明确了 NPM 突变基因能够促进 NIH3T3 细胞体外增殖和抑制细胞凋亡,尚不能促使细胞锚着不依赖性生长。NPM 基因突变除了参与调控细胞体外增殖之外,其对细胞趋化能力等恶性表型的影响以及在动物体内促瘤作用等问题还有待于进一步的探讨。此外,移位到细胞质中的 NPM 突变蛋白如何通过影响野生型 NPM 蛋白或是调控其他胞浆蛋白功能来参与肿瘤发生,也是值得深入研究的方向。

参考文献:

[1] 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.

[2] Zhang Y, Zhang M, Yang L, *et al*. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype[J]. Leuk Res, 2007, 31(1): 109-111.

[3] Piccaluga P P, Sabattini E, Bacci F, *et al*. Cytoplasmic mutated nucleophosmin (NPM1) in blast crisis of chronic myeloid leukaemia[J]. Leukemia, 2009, 23(7): 1370-1371.

[4] Schnittger S, Kern W, Tschulik C, *et al*. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML[J]. Blood, 2009, 114(11): 2220-2231.

[5] Caudill J S, Sternberg A J, Li C Y, *et al*. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders[J]. Br J Haematol, 2006, 133(6): 638-641.

[6] den-Besten W, Kuo M L, Williams R T, *et al*. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein[J]. Cell Cycle, 2005, 4(11): 1593-1598.

[7] 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.

[8] Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity[J]. Hematol Oncol, 2009, 27(4): 171-181.

[9] Bacher U, Badbaran A, Fehse B, *et al*. Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation[J]. Exp Hematol, 2009, 37(1): 135-142.

[10] 何鹏, 骆展鹏, 张伶, 等. RNAi 重组体抑制白血病 K562 细胞系中 NPM1 基因的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 938-941.

[11] 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.

[12] 骆展鹏, 何鹏, 张伶, 等. 核磷蛋白 A 型突变体对髓性白血病细胞系增殖的影响[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(1): 20-23.

[13] Cheng K, Grisendi S, Clohessy J G, *et al*. The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence[J]. Oncogene, 2007, 26(53): 7391-7400.

[14] Shing D C, Trubia M, Marchesi F, *et al*. Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice[J]. J Clin Invest, 2007, 117(12): 3696-3707.

(**收稿**:2009-10-23;**修回**:2009-11-15)

(编辑 吴培红)