

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.001

外源性 NPM 突变蛋白对 AKT 细胞定位的影响及其对白血病增殖的意义*

全 静¹, 王 春², 李宝林¹, 刘靳波¹

(1. 西南医科大学附属医院检验科, 四川泸州 646000; 2. 四川省泸州市中医医院检验科 646000)

[摘要] **目的** 探讨外源性核仁磷酸蛋白 A 型突变体(NPM mA)对蛋白激酶 B(AKT)的亚细胞定位的影响及其对白血病细胞增殖的意义。**方法** 免疫共沉淀实验检测 NPM mA 与 AKT 的相互作用;免疫荧光实验观察 NPM mA 与 AKT 的亚细胞定位, CCK-8 法检测细胞增殖能力。**结果** K562 细胞中, NPM mA 能够与 AKT 结合。免疫荧光显示, NPM mA 主要分布于细胞质, 当共同转染 NPM mA 和 AKT 到 HEK293T 细胞后, AKT 由弥散分布转移至细胞胞质。另外, K562 mA 组(突变组)细胞在 72 h 时较 K562 c1 组(空载体转染对照组)和 K562 wt 组(野生组)体外增殖能力明显增强($P < 0.01$)。AKT 抑制剂(AKT inhibitor IV, AKT IV)处理 48 h 后, K562 wt 组和 K562 c1 组增殖被明显抑制, K562 mA 组仍能维持生长($P < 0.01$)。**结论** 外源性 NPM mA 能够改变 AKT 的亚细胞定位, 且调控白血病细胞的体外恶性增殖。

[关键词] 白血病; 蛋白激酶类; 核仁磷酸蛋白; 细胞定位**[中图分类号]** R733.71**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)02-0145-04

Effect of exogenous NPM mutant protein on AKT cellular localization and its significance in leukemia proliferation*

QUAN Jing¹, WANG Chun², LI Baolin¹, LIU Jinbo¹

(1. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Luzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of exogenous NPM mA to the subcellular localization of AKT and its significance in the proliferation in leukemia cells. **Methods** The co-immunoprecipitation assay was used to detect the interaction between NPM mA and AKT. The subcellular localization of NPM mA and AKT was observe by using the immunofluorescence experiment. The cells proliferation potential was assessed by CCK-8 assay. **Results** NPM mA could be combined with AKT in K562 cells. The immunofluorescence showed that NPM mA was mainly distributed in the cytoplasm. After co-transfecting NPM mA and AKT into HEK293T cells, AKT was transformed from the dispersive distribution to cytoplasm. Additionally, the in vitro proliferation ability at 72 h in the K562 group was significantly enhanced compared with the K562 c1 and K562 mA groups($P < 0.01$). After treating with AKT inhibitor(AKT inhibitor IV, AKT IV) for 48 h, the proliferation in the K562 c1 and K562 wt groups was remarkably inhibited, but which in the K562 mA group could still maintain growth($P < 0.01$). **Conclusion** Exogenous NPM mA can change the subcellular localization of AKT, moreover regulates the in vitro malignant proliferation of leukemic cells.

[Key words] leukemia; protein kinases; nucleophosmin; cell localization

核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)主要定位于细胞的核仁颗粒区,属核质穿梭蛋白,它广泛存在于各种组织细胞中,结构高度保守,是一种重要的伴侣分子^[1]。A型突变(NPM mutant A, NPM mA)是NPM最为常见的突变类型,占75%~80%^[2]。白血病是一组造血干细胞的恶性克隆增殖性疾病,在治疗上具有明显的异质性, NPM突变在临床上与白血病发生发展密切相关^[3]。研究表明,突变后的NPM蛋白可携带抑癌蛋白p19ARF^[4]、NF-kappa B^[5]、c-myc^[6]等核内蛋白发生胞质移位,通过影响其稳定性从而促进白血病细胞的恶性增殖。白血病发生、发展中存在蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路的过度激活,与白血病细胞存活、转化和黏附等生物学功能密切相关^[7]。本研究旨在探讨外源性NPM mA与AKT

的相互关系,以及NPM mA对AKT的亚细胞定位的影响,并进一步观察NPM mA与AKT对白血病细胞增殖的意义,从而深入认识NPM突变蛋白在白血病发生、发展中的机制。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞 MSCV-IRES-GFP、MSCV-Flag-NPM wt和MSCV-Flag-NPM mA质粒由美国圣犹大儿童研究医院惠赠, HA-AKT、pEnvelope和pHelp质粒由美国安德森癌症研究中心惠赠,人慢性粒细胞白血病细胞株K562和人胚肾HEK293T细胞株购于中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂 胎牛血清(FBS, 上海普飞生物技术有限公司); RPMI 1640、DMEM培养基(Gibco-BRL公司); Lipofectamine™2000(Invitrogen公司); 兔抗人NPM mA单克隆抗

* 基金项目:西南医科大学附属医院项目(2015-QS-008);四川省泸州市科技局(15193);四川大学与泸州市人民政府战略合作项目(2013CDLZ-S15)。 作者简介:全静(1988-),检验技师,硕士,主要从事血液肿瘤研究。

体(Abcam 公司);小鼠抗人 NPM 单克隆抗体、Protein A/G beads(Santa Cruz 公司);小鼠抗 Flag 标签抗体、小鼠抗 HA 标签抗体、兔抗人 AKT 单克隆抗体(Cell Signal Technology 公司);小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG、Alexa Fluor[®] 594 山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥公司);苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂(德国 Roche 公司);AKT 抑制剂(AKT inhibitor IV, AKT IV; Calbiochem 公司);CCK8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HEK293T 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, K562 细胞用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 培养于 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.3.2 细胞转染 已知 NPM1 基因是杂合性突变, 人 K562 和 HEK293T 细胞株均存在野生型 NPM 蛋白, 不存在 NPM mA。本研究中 K562 细胞设立空载体转染对照组(K562 c1)、野生组(K562 wt)和突变组(K562 mA)。采用 LipofectamineTM2000 转染试剂将空载体 MSCV-IRES-GFP(vector)和实验质粒 MSCV-Flag-NPM wt (Flag-NPM wt)、MSCV-Flag-NPM mA(Flag-NPM mA)连同 pEnvelope 及 pHelper 辅助载体分别共转染 HEK293T 细胞。培养 6 h 后更换含有 10% FBS 的 DMEM 培养基, 于 24、48 h 收集上清液, 经 0.45 μ m 滤器过滤收获病毒液。将 K562 细胞接种于 6 孔板, 加入制备好的病毒液, 同时加入终浓度为 8 mg/mL 的聚凝胺, 扩大培养进行后续实验。

1.3.3 Western blot 收集细胞, 用含 100 mmol/L PMSF 的细胞裂解液[10 mmol/L Tris 盐酸(pH 7.4), 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 150 mmol/L NaCl, 1% 曲拉通 X-100(Triton X-100), 250 mmol/L 原钒酸盐, 20 mmol/L b-甘油磷酸]充分裂解提取细胞总蛋白。取 60 μ g 蛋白用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 通过湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h 后加一抗(1:2 000 稀释)4 °C 孵育过夜, Tris 盐酸吐温缓冲液(TBST)洗涤 10 min \times 2 次, Tris 盐酸缓冲液(TBS)洗涤 10 min, 加二抗(1:1 000 稀释)室温孵育 1 h, 洗涤后用化学发光显色试剂进行显色。实验设 β -肌动蛋白(β -actin)为内参, 结果采用 Quantity One 软件进行分析。

1.3.4 免疫共沉淀(Co-IP) 收集细胞, 提取总蛋白, 将细胞裂解液用 E1A 试剂[0.1% NP-40, 50 mmol/L HEPES(pH 7.5), 250 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA]定至 1 mL 体积, 加入 1 μ g 抗 AKT 的单克隆抗体, 4 °C 缓慢旋转孵育过夜。次日加入 50 μ L Protein A/G 磁珠(beads), 4 °C 缓慢旋转孵育 4 h, 3 000 r/min 离心 2 min, 将 beads 离心至管底后弃上清。用 E1A 试剂反复清洗 beads, 3 000 r/min 离心 2 min 去除上清液, 再用 30 μ L 2 倍浓度的上样缓冲液重悬, 95 °C 煮沸 5 min 使蛋白复合物变性, 13 000 r/min 离心 2 min 取上清进行 SDS-PAGE。

1.3.5 免疫荧光 取转染后的 HEK293T 细胞制备成 1×10^6 的单细胞悬液, 取 100 μ L 接种于 12 孔板中的灭菌盖玻片上,

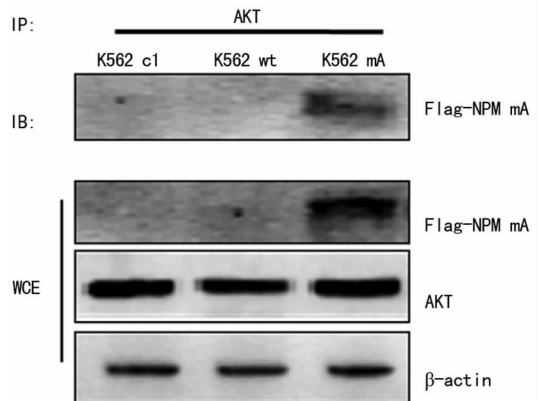
于 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后弃去培养液, 用 PBS 轻轻洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次。0.1% Triton X-100 透膜 10 min, 用 10% 山羊血清室温封闭 30 min, 加封闭液稀释的单克隆一抗(1:100)置 4 °C 冰箱过夜。PBS 洗 3 次, 加入荧光标记的二抗(1:200), 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次后 4'-6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)避光染色 5 min, 最后用甘油封片。荧光显微镜下观察荧光信号的分布情况。

1.3.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力 收集转染后的各组 K562 细胞, 分别用低剂量 AKT IV 或者等剂量二甲基亚砜(DMSO)处理白血病细胞, 制成细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中, 每组设 3 个复孔, 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱孵育, 培养 0、12、24、36、48、60、72 h 每孔加入 10 μ L CCK-8(5 mg/mL)溶液, 继续培养 1 h, 在 A450 nm 波长处测量各孔的光密度(OD)值。以 OD 值为纵坐标, 时间为横坐标用 Sigma-Plot12.0 软件绘制生长曲线。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用配对样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 K562 细胞中 NPM mA 与 AKT 的相互关系 分别转染 vector、Flag-NPM wt、Flag-NPM mA 于 K562 细胞中, 采用 Co-IP 检测 NPM mA 与 AKT 的结合作用。用抗 AKT 的单克隆抗体沉淀蛋白复合物后电泳转膜, 用 Flag 抗体进行免疫印迹分析。Western blot 结果表明, K562 mA 组在相对分子量 32×10^3 附近检测到 NPM mA 蛋白, 见图 1。上述结果提示 K562 细胞中 NPM mA 蛋白能与 AKT 结合。



Western blot 检测 Co-IP 蛋白复合物中的 flag-NPM mA 蛋白, WCE:全细胞裂解液

图 1 外源性 NPM、NPM mA 与 AKT 的相互作用

2.2 外源性 NPM mA 对 AKT 亚细胞定位的影响 在 HEK293T 细胞中分别转染 HA-AKT 和 Flag-NPM mA, 荧光染色后观察目标蛋白在细胞中的分布情况。结果显示, 转染 HA-AKT 的 293T 细胞, 细胞核和细胞浆可见很强的 HA-AKT 特异性荧光, 转染 Flag-NPM mA 的 293T 细胞在细胞核和细胞浆均可见荧光信号, 而荧光信号主要集中于细胞胞质区域, 见图 2A。此外, 共同转染 Flag-NPM mA 和 HA-AKT 到 HEK293T 细胞, 发现带红色荧光的 NPM mA 主要分布于细胞胞质区域, 而带绿色荧光的 AKT 蛋白也在细胞的胞质区域

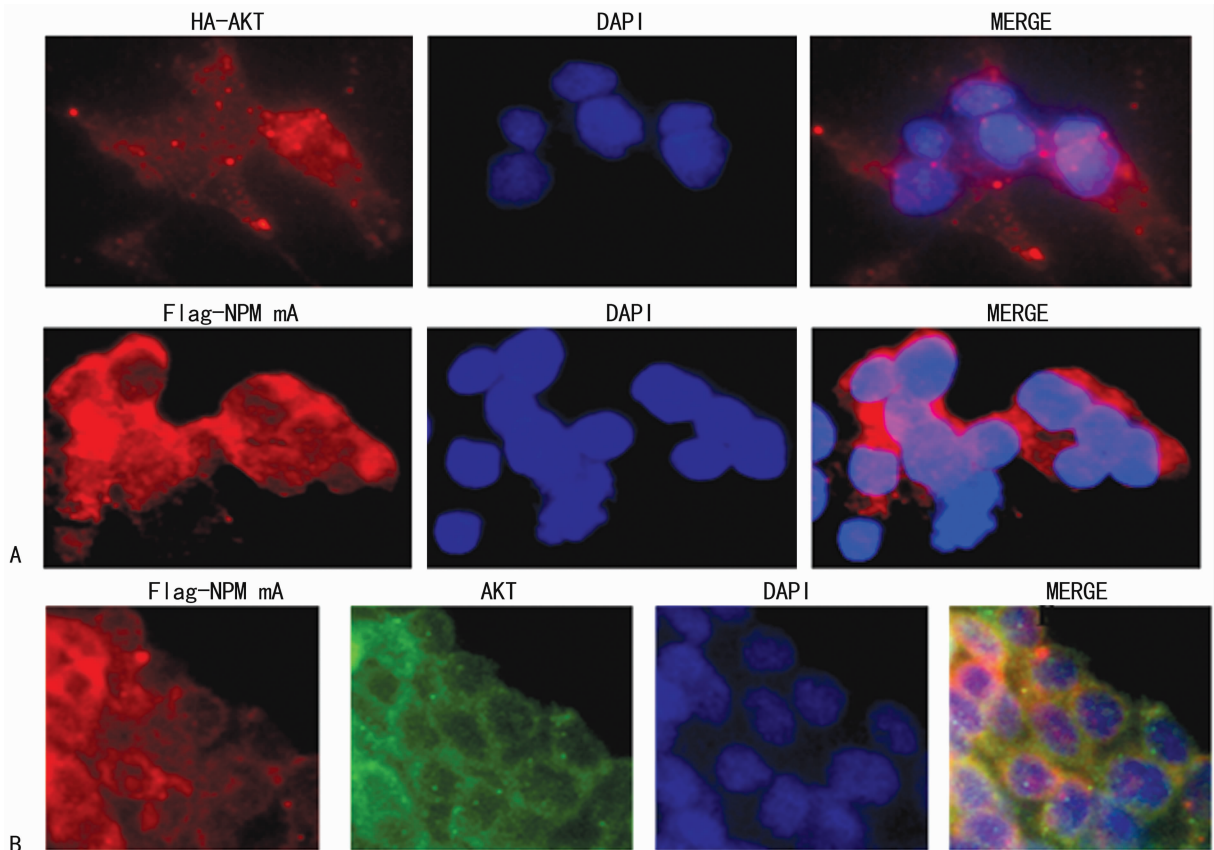
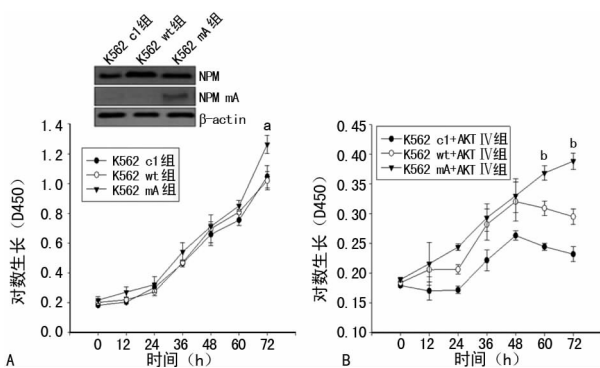


图 2 外源性 NPM mA 与 AKT 的亚细胞定位 (×400)

A: HEK293T 细胞中 Flag-NPM mA 和 HA-AKT 蛋白的亚细胞定位; B: 共同转染后 Flag-NPM mA 和 AKT 蛋白的亚细胞定位; HA-AKT、Flag-NPM mA 呈红色荧光, AKT 呈绿色荧光, 细胞核 DAPI 染色呈蓝色荧光, MERGE 为融合图像

累积, 提示移位到胞质的 NPM 突变蛋白可能与 AKT 蛋白共同定位于胞质中, 见图 2B。



A: CCK-8 法检测转染后各组 K562 细胞的体外增殖能力, Western blot 图为转染后 K562 细胞中 NPM 和 NPM mA 的表达情况; a: $P < 0.01$, 与 K562 c1 组和 K562 wt 组比较; B: CCK-8 法检测 AKT IV 处理后各组 K562 细胞的体外增殖能力; b: $P < 0.01$, 与 K562 c1 + AKT IV 组和 K562 wt + AKT IV 组比较

图 3 过表达 NPM mA 联合 AKT IV 对 K562 细胞体外增殖的影响

2.3 外源性 NPM mA 与 AKT 对白血病细胞增殖的意义

图 3A 中结果显示, K562 mA 组和 K562 wt 组与 K562 c1 组相比 NPM 表达量上升, 仅 K562 mA 组表达 NPM mA。CCK-8 法检测转染后 K562 细胞不同时间的生长曲线变化情况。结果显示, 72 h 后 K562 mA 组相对于 K562 c1 组和 K562 wt 组细胞体外增殖能力明显增强 ($P < 0.01$), 见图 3A。观察 AKT

IV 处理后各组细胞的体外增殖能力, 结果发现, 48 h 后 K562 wt 组和 K562 c1 组体外增殖能力明显被抑制, K562 mA 组细胞仍能维持生长, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3B。

3 讨论

NPM 基因突变对白血病细胞的恶性转化具有重要调控作用^[8]。NAKAGAWA 等^[9]提出, NPM C 末端色氨酸对 NPM 的核仁定位起主要作用, 突变的 NPM C 末端存在额外的 NES 核输出序列, 可导致 NPM 移位到细胞胞质。NPM 突变并胞质移位后, ARF/p53 的稳定性降低, 癌蛋白 c-myc 活性增强从而导致细胞恶性增殖^[10-11]。目前的机制研究多集中于 NPM 突变后对核仁蛋白活性的改变, 聚积在胞质中的 NPM 对胞质蛋白的影响少有报道。AKT 是调节造血的中央枢纽, 可以通过多种途径影响白血病细胞的增殖与凋亡。既往研究发现, OCI/AML3 细胞中天然携带的 NPM mA 能够与 AKT 相互结合, 并可能参与调控细胞的增殖^[12]。本研究进一步探讨外源性的 NPM mA 与 AKT 的相互作用, 观察外源性 NPM mA 对 AKT 的亚细胞定位的影响, 进一步检测外源性 NPM mA 与 AKT 对白血病细胞增殖的意义。

采用 Co-IP 检测 NPM mA 与 AKT 的结合作用, 结果显示, K562 mA 组在相对分子质量 32×10^3 附近检测到了 NPM mA 的蛋白条带, 说明 NPM mA 能与 AKT 结合。FALINI 等^[13]将突变的 NPM 转染到 NIH3T3 细胞发现, 突变的 NPM 蛋白主要聚集在胞质中。本研究荧光染色结果显示, NPM mA 主要集中分布于胞质, 此结果与 FALINI 等^[13]研究一致。

而 AKT 弥散分布于细胞中,当共同转染 NPM mA 和 AKT 到 HEK293T 细胞后,AKT 的定位发生改变,由弥散分布转移至细胞胞质。此结果说明,NPM 发生突变后,突变的 NPM 蛋白可能携带 AKT 发生了转移并最终改变了 AKT 的亚细胞定位。

为了观察外源性 NPM mA 与 AKT 对白血病细胞生物学效应的影响,本研究选择不携带 NPM 突变基因的 K562 细胞作为研究载体,通过慢病毒转染使 K562 细胞表达 NPM mA 蛋白。CCK-8 法检测转染后 K562 细胞的体外增殖能力,结果发现 K562 mA 组细胞相对于 K562 c1 组和 K562 wt 组细胞体外增殖能力明显增强,此结果在本课题组以往的研究中亦有阐述^[14]。AKT IV 可抑制 AKT 的磷酸化激活。本研究中,采用低剂量 AKT IV 处理 48 h 后,K562 wt 组和 K562 c1 组体外增殖能力被明显抑制,K562 mA 组细胞仍能维持生长,提示 NPM mA 能通过 AKT 调控 K562 细胞的体外恶性增殖。

综上所述,本研究证实外源性的 NPM mA 能够与 AKT 结合并改变 AKT 的亚细胞定位,且 NPM mA 能通过 AKT 调控 K562 细胞的体外恶性增殖。进一步研究将继续探讨胞质 NPM mA 对 AKT 活性的调控方式及对 AKT 下游信号分子的影响,而 NPM mA 对胞质中其他蛋白活性的影响亦是值得研究的方向。深入探讨 NPM 突变蛋白在白血病发生、发展中的机制,将为阐明白血病的致病机制提供新的理论依据。

参考文献

- [1] 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, 23(10): 1731-1743.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] CILLONI D, MESSA F, ROSSO V, et al. Increase sensitivity to chemotherapeutic agents and cytoplasmic interaction between NPM leukemic mutant and NF-kappaB in AML carrying NPM1 mutations[J]. *Leukemia*, 2008, 22(6): 1234-1240.
- [6] LI Z L, BOONE D, HANN S R. Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(48): 18794-18799.
- [7] PANDURANGAN A K. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(4): 2201-2205.
- [8] 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.
- [9] NAKAGAWA M, KAMEOKA Y, SUZUKI R. Nucleophosmin in acute myelogenous leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(17): 1819-1820.
- [10] DEN B 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.
- [11] BONETTI P, DAVOLI T, SIRONI C, et al. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma/La[J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(1): 19-26.
- [12] 全静, 张帅帅, 鲜敬荣, 等. 胞质 NPM1 突变蛋白与 AKT 的相互作用及其对急性髓系白血病细胞增殖的调控[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(22): 2267-2271.
- [13] 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.
- [14] 覃凤娴, 邵会媛, 张伶, 等. 过表达突变的 NPM1 基因对 THP-1 白血病细胞增殖和凋亡的影响[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(3): 251-256.

(收稿日期: 2017-06-18 修回日期: 2017-08-26)