论著

文章编号:1000-5404(2006)15-1560-03

γ射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中SHP-2 mRNA及蛋白表达的变化

黄定德[1],陈 杞[2],韩 玲[2],蔡建明[2] ([1]第三军医大学西南医院核医学科,重庆 400038;[2]第二军医大学海军医学系放射医学教研室,上海 200433)

提 要:目的 探讨蛋白酪氨酸磷酸酶2(Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2, SHP-2)mRNA表达、蛋白表达及其功能在γ射线体外诱发的白血病小鼠骨髓细胞中的变化情况,为进一步从细胞信号转导途径入手,研究辐射致癌的分子机制奠定一定的基础。**方法** 实验分为白血病组、辐射未癌变组及对照组,应用荧光定量PCR法、Western blot法及生物化学方法分别检测各组骨髓有核细胞中SHP-2 mRNA、蛋白表达量及其酶活性的变化情况。**结果** 白血病组、辐射未癌变组及对照组SHP-2 mRNA含量分别为(5.08±2.87)、(4.59±2.36)、(3.54±1.02);SHP-2的蛋白表达水平(以密度定量的光密度表示)分别为(0.956±0.125)、(0.892±0.236)、(0.712±0.368);SHP-2的酶催化活性(以吸光度表示)分别为(0.156±0.069)、(0.118±0.065)及(0.098±0.048)。各组间差异无显著性。**结论** 在γ射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中,SHP-2 mRNA含量、蛋白表达量及其功能无明显变化。

关键词: 辐射致癌;信号转导;SHP-2;BALB/c小鼠;白血病

中图法分类号: R394.2; R733.7; R818.02 **文献标识码:** A

Changes of SHP-2 mRNA and protein of bone marrow cells of mice with leukemia induced by γ-ray irradiation

HUANG Ding-de[1], CHEN Qi[2], HAN Ling[2], CAI Jian-ming[2] ([1]Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Radiological Medicine, College of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate alteration of SHP-2 mRNA and protein of bone marrow cells of leukemia mice after γ-ray exposure. **Methods** A total of 318 BALB/c mice were exposed to ^{60}Co γ-ray once a week for 4 weeks, and the total dose of γ-ray received by mice was 7.00 Gy. By pathological examination, 39 mice developed thymic lymphoma, 14 acute lymphoblastic leukemia, 21 T-lymphoblast leukemia/lymphoma, 1 spiroma, 4 malignant yolk sac tumors. Exposed to γ-ray, the mice that developed leukemia or were free of canceration were used in our study ($n=10$ in each group), and another 10 mice free from irradiation served as control. SHP-2 mRNA and protein in femoral bone marrow cells were detected by real time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and Western blotting respectively. **Results** SHP-2 mRNA was (5.08±2.87) in leukemia mice, (4.59±2.36) in mice free of canceration and (3.54±1.02) in controls. SHP-2 protein was (0.956±0.125) in leukemia mice, (0.892±0.236) in mice free of canceration and (0.712±0.368) in controls. The enzyme catalytic activity of SHP-2 was (0.156±0.069), (0.118±0.065), (0.098±0.048). No significant difference in mRNA, protein or enzyme catalytic activity of SHP-2 was found in leukemia mice, mice free from canceration and control mice. **Conclusion** SHP-2 mRNA and protein was significantly increased in bone marrow cells of leukemia mice induced by γ-ray irradiation.

Key words: radiation carcinogenesis; signal transduction; SHP-2; BALB/c mouse; leukaemia

辐射致癌是电离辐射远后效应的重要表现形式之一,可能涉及癌基因的激活与抑癌基因失活、细胞周期调控基因改变及信号转导失控等复杂的机制,但尚不完全清楚[1],对其机制的阐明,将有助于人们更深层次地认识肿瘤,为肿瘤的预防和治疗奠定理论基础。本研究成功地复制了γ射线体外诱发BALB/c小鼠白

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170282)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170282)

作者简介: 黄定德(1970-),男,湖南省耒阳市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤分子核医学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752320

收稿日期: 2005-09-13;**修回日期:** 2006-01-17

血病模型[2],结果显示在γ射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中,含 SH2 域的酪氨酸磷酸酶 2(Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2, SHP-2)的 mRNA 翻译异常,表现为翻译增强现象,且其蛋白的表达及功能均明显增强[3,4]。本研究进一步探讨了在γ射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中 SHP-2 mRNA 的表达、蛋白表达及功能的变化情况。

1　材料与方法

1.1　辐射致癌动物模型的复制、分组

参照文献[2]方法进行,BALB/c 小鼠,清洁级,雌雄各半,6~8 周龄,体质量约 20 g,购自上海实验动物中心。^{60}Co γ射线分次全身照射,每周 1 次,共 4 次,每次吸收剂量 1.75 Gy,吸收剂量率 0.88 Gy/min,累积剂量 7.00 Gy。经病理学证实肿瘤类型有胸腺淋巴瘤(39 只)、急性淋巴细胞型白血病(14 只)、前 T 细胞淋巴母细胞白血病/淋巴瘤(21 只)、汗腺瘤(1 只),恶性卵黄瘤(4 只)。其中发生白血病者为白血病组、未发生癌变者为辐射未癌变组,另设未经γ射线照射的对照组,每组小鼠 10 只。

1.2　骨髓细胞的获取

常规方法获取小鼠双侧股骨骨髓有核细胞,将之分成 3 份,1 份涂片行病理学检查,1 份用于提取总 RNA,1 份用于提取总蛋白质。

1.3　实时荧光定量 PCR 法检测 SHP-2 mRNA 含量

1.3.1　骨髓细胞总 RNA 的提取　　用 Trizol 一步法试剂盒(购自上海华舜生物公司)提取骨髓细胞总 RNA,-70 ℃保存备用。

1.3.2　mRNA 的逆转录　　参照 MMuLV RT-PCR 试剂盒(上海申能博彩生物公司)说明书进行,得 cDNA。

1.3.3　PCR 引物设计　　Taqman 荧光探针根据仪器要求选择 FAM 作为荧光报告基团,MGB 作为淬灭基团。小鼠 SHP-2 基因的上游引物 5′-AACGACGGCAAGTCCAAAGT-3′,下游引物 5′-TGCTCCACCAGGTCTGTCAG-3′,退火温度 58.4 ℃,产物长 107 bp;SHP-2 基因的 Taqman 探针序列为 FAM- CCACGTCATGATCCG-MGB。小鼠 β-actin 基因的上游引物 5′-AGGCCAACCGTGAAAAGATG-3′,下游引物 5′-GCCTGGATGGCTACGTACATG-3′,退火温度 60 ℃,产物长 75 bp;β-actin 基因的 Taqman 探针序列为 FAM-CCCAGATCATGTTTGAGAC-MGB。引物及探针的设计、合成、标记由上海 Genecore 公司进行。

1.3.4　荧光定量 PCR 反应　　参照文献[3]方法进行,对 mRNA 进行定量分析。

1.4　Western blot 法检测骨髓细胞 SHP-2 蛋白表达

细胞总蛋白的提取参照文献[5]方法进行,一抗为抗 SHP-2 的单克隆抗体(Santa Cruz 公司,1∶800),二抗为抗鼠 IgG-HRP(Santa Cruz 公司,1∶600),ECL 发光试剂盒购自上海普飞生物技术公司。以 β-actin 为内参照,结果经 SmartView 2001 生物电泳图像分析软件(上海复日科技有限公司)进行半定量分析。

1.5　SHP-2 酶催化活性的测定[6]

1.5.1　总蛋白质的提取　　基本步骤同文献[5],只是细胞裂解液中不含叠氮钠。

1.5.2　SHP-2 蛋白质的免疫沉淀　　取总蛋白 280 μg,用 NET-明胶缓冲液[150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4), 0.1% NP-40(Fluka), 1 mmol/L EDTA(Sigma), 0.25% NaN_3, 0.25% 明胶]补充体积至 500 μl,加入 SHP-2 抗体(Santa Cruz 公司)2 μl,4 ℃孵育 1 h 后加入 Protein G agrose (Santa Cruz 公司)20 μl,4 ℃过夜。1 000×g 离心 8 min,弃上清,沉淀用 PBS 洗 3 次后测酶催化活性。

往上述免疫沉淀物中加入 80 μl 酶催化活性缓冲液(50 mmol/L Hepes, pH 5.5, 60 mmol/L NaCl, 60 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L PMSF, 1 μmol/L 胃蛋白酶抵制剂 A, 5 μg/ml 抑肽素 A, 1 μg/ml 亮肽素, 1 mg/ml BSA, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L DTT),充分混匀。

加入磷酸对硝基苯(终浓度为 10 nmol/L),30 ℃温度下反应 30 min,以 0.9 ml 1 mol/L 的 NaOH 终止。

1.5.3　SHP-2 酶催化活性　　紫外分光光度计测吸光度,波长为 410 nm,以 OD 值来反应酶催化活性。

1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

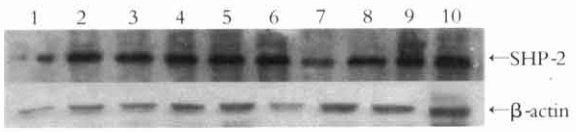
2　结果

2.1　白血病小鼠骨髓细胞中 SHP-2 mRNA 含量的变化

以标准品浓度的对数为横坐标,Ct 值为纵坐标作图,二者的相关系数达到了 0.99,即 Ct 值与 mRNA 含量的相关性非常好,说明用此定量结果可靠,回归方程为 Ct = 43.07 - 3.261 lg(mRNA 含量)。以此方程为基础,对各组骨髓细胞 SHP-2 mRNA 定量,结果经内参照 β-actin 校正,白血病组(n = 10)、辐射未癌变组(n = 10)及对照组(n = 10)分别为(5.08 ± 2.87)、(4.59 ± 2.36)、(3.54 ± 1.02),白血病组略高于辐射未癌变组及对照组,但差异无显著性(P > 0.05)。

2.2　白血病小鼠骨髓细胞中 SHP-2 蛋白表达量的变化

结果见图 1。经 Western blotting 分析,发现白血病组、辐射未癌变组及对照组骨髓细胞中 SHP-2 的蛋白表达水平(以密度定量的光密度表示)分别为(0.956 ± 0.125)、(0.892 ± 0.236)、(0.712 ± 0.368),各组间差异无显著性(P > 0.05)。



1-5: 白血病组; 6-8: 对照组; 9, 10: 辐射未癌变组

图 1　SHP-2 蛋白在γ射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中的表达

2.3 SHP-2 蛋白的酶催化活性在白血病小鼠骨髓细胞中的变化

白血病组、辐射未癌变组、对照组 SHP-2 的酶催化活性(以吸光度表示)分别为(0.156 ± 0.069)、(0.118 ± 0.065)及(0.098 ± 0.048),三者间差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

酪氨酸磷酸酶的去磷酸化作用与酪氨酸激酶的磷酸化作用共同调节细胞内蛋白质的酪氨酸磷酸化水平,与细胞生长、分化、信号转导、细胞周期调控等有密切的联系。SHP-2 是一种含有 SH2 域的酪氨酸磷酸酶,表达于各种组织和细胞的细胞质中,目前对其在信号转导中的功能尚不完全清楚。多数学者认为:作为一种适配分子(adaptor molecule),激活的 SHP-2 连接生长因子受体结合蛋白 2(growth factor receptor bound protein 2, Grb2)于酪氨酸磷酸化的细胞因子受体,通过 RAS-RAF-MAPK,JAK-STAT 以及 PI3K 通路把外来信号传入胞内,SHP-2 在此信号转导过程中主要起正向调节作用[7],与肿瘤的生长呈正相关,但也有报道 SHP-2 对干扰素 IFN-α 所启动的 JAK-STAT 信号转导通路起负性调控作用,抑制 IFN-α 的细胞毒作用[8]。

在 γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中存在 SHP-2 mRNA 的翻译异常;且其蛋白的表达及功能均明显增强,提示 SHP-2 与 γ 射线诱发的肿瘤关系密切,可能呈正相关[3,4]。但本研究显示,在白血病组骨髓细胞中,SHP-2 的变化规律与胸腺细胞不一致,白血病组骨髓细胞中 SHP-2 mRNA 含量、蛋白质表达水平及功能与对照组与辐射未癌变组比无明显差异,即 SHP-2 可能与 γ 射线诱发的骨髓细胞癌变无明显相关,为什么在 γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞与骨髓细胞间,SHP-2 的表达与功能会出现如此差异,尚有待进一步研究。

SHP-1 与肿瘤的发生呈负相关,抑制肿瘤的发生发展,SHP-1 的负向调节和 SHP-2 的正向调节作用间可能存在拮抗,保持动态平衡,此平衡的改变将影响细胞的增殖分化及信号转导。我们既往的研究提示在 γ 射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中,SHP-1 的 mRNA 及蛋白表达明显增强,而本研究提示 SHP-2 的 mRNA 含量、蛋白表达及功能却无明显变化,与 γ 射线诱发的小鼠白血病的发生无明显相关。是否预示在此过程中 SHP-1 与 SHP-2 间的动态平衡被打破,从而导致了肿瘤的发生等问题还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 李 刚, 吴德昌. 肿瘤相关基因突变是辐射致癌的主要分子事件[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1998, 18(3): 214-216.

[2] 韩 玲,蔡建明,李百龙,等. ^{60}Co γ 射线照射诱发小鼠恶性肿瘤[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7): 745-748.

[3] 黄定德, 陈 杞, 韩 玲, 等. γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞 SHP-2 mRNA 变化的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(20): 1809-1811.

[4] 黄定德, 陈 杞, 韩 玲, 等. γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中 SHP-2 表达及功能的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(14): 1258-1260.

[5] SHARLOW E R, PACIFICI R, CROUSE J, *et al*. Hematopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin-induced hemoglobinization in erythroleukemic SKT6 cells[J]. Blood, 1997, 90(6): 2175-2187.

[6] PAZDRAK K, ADACHI T, ALAM R. Src homology 2 protein tyrosine phosphatase (SHPTP2)/Src homology 2 phosphatase 2 (SHP2) tyrosine phosphatase is a positive regulator of the interleukin 5 receptor signal transduction pathways leading to the prolongation of eosinophil survival[J]. J Exp Med, 1997, 186(4): 561-568.

[7] SHI Z Q, LU W, FENG G S. The SHP-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases[J]. J Biol Chem, 1998, 273(9): 4904-4908.

[8] YOU M, YU D H, FENG G S. SHP-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(3): 2416-2424.

(编辑 陈聪连)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:名-名-姓,"名"可以有1个,2个或3个,但"姓"只有1个。因此,从书籍或期刊中的姓名转录到文献时,要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的;"名"可以缩写,用第一个字母大写,不用缩写点。数据库在著录作者姓名时,已经调整为姓-名-名,可照录。

例如:John Quincy Public 写为 Public J Q

本刊编辑部