DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.007
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1809-03

论著

γ线诱发的白血病小鼠胸腺细胞SHP-2 mRNA变化的研究

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SHP-2 mRNA在γ射线体外诱发的白血病小鼠胸腺细胞中的变化情况,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 实验分为癌变组、未癌变组及对照组,应用PCR-SSCP、DNA测序、荧光定量PCR法分别检测各组胸腺细胞SHP-2 mRNA的突变及含量变化情况。结果 ①PCR-SSCP示9/14例癌变组胸腺细胞SHP-2 mRNA的第700~1 096 bp间可能发生突变,但DNA测序结果不支持;②癌变组胸腺细胞SHP-2 mRNA的含量与对照组及未癌变组比无明显变化。结论 在γ射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中存在SHP-2的翻译异常,表现为翻译增强现象。

关键词:辐射致癌;信号转导;SHP-2;小鼠;白血病
中图法分类号:R322.53;R363.121;R733.7 文献标识码:A

Changes of SHP-2 mRNA of thymus cells of mice with γ ray-induced leukemia

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 Nuclear Medicine, College of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate the alterations of SHP-2 mRNA of thymus cells of mice with γ ray-induced leukemia. Methods BALB/c mice were randomly divided into canceration group, non-canceration group, and control group. The gene mutation and content of SHP-2 mRNA in thymus cells were detected by PCR-SSCP, DNA sequencing, and real time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). Results PCR-SSCP showed there was gene mutation within 700~1 096 bp of SHP-2 mRNA in thymus cells of mice in the canceration group, which was not supported by DNA sequencing. No significant difference in change of SHP-2 mRNA content was found in thymus cells in canceration, non-canceration, and control groups. Conclusion There is translational abnormality of SHP-2 mRNA in thymus cells of mice with γ ray-induced leukemia, which is presented as translational enhancement.

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

辐射致癌的机制为当今研究的热点,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途径的失控等复杂的机制[1],其具有肿瘤发生的某些共性,但也有其特殊性。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。本课题组成功地建立了γ射线体外诱发BALB/c小鼠白血病模型[2],并表明: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)蛋白的表达及其功能均明显增强,SHP-2可能与γ射线诱发小鼠白血病的发生呈正相关[3],本研究进一步探讨了SHP-2 mRNA突变及含量的变化情况。

1 材料与方法

1.1 辐射致癌动物模型的建立、分组及细胞的获取

参见文献[2,4],共分为癌变组、非癌变组及对照组,每组动物均为10只。

1.2 PCR-SSCP法筛选SHP-2基因的突变

1.2.1 mRNA的逆转录 参照MmuLV RT-PCR试剂盒说明书进行,得cDNA。

1.2.2 小鼠SHP-2 cDNA的PCR-SSCP引物的设计 针对小鼠SHP-2的酪氨酸磷酸酶(PTPase)催化区域中最易发生基因突变的区域设计2对引物:①上游引物5′-GCC CCT CAA CAC AAC TCG TAT CAA-3′,下游引物为5′-GAA CAC CAT CCG CCA GAA GTC AT-3′,退火温度56 ℃,产物全长为397 bp,位于SHP-2 mRNA的第700~1 096 bp。②上游引物5′-TGG GAT TGG CCG

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,主要从事肿瘤的分子核医学方面的研究,发表论文6篇。电话(023)68752320
收稿日期:2003-09-27;修回日期:2004-08-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GAC AGG AAC-3′，下游引物为5′-GCA GGG TGG CAG GGG ACT CT-3′，退火温度58 ℃，产物全长为307 bp，位于SHP-2 mRNA的1 453～1 759 bp。

1.2.3 目的片段的PCR扩增 按常规方法进行，94 ℃变性2 min后进入循环(94 ℃变性30 s，相应的退火温度退火30 s，72 ℃延伸60 s，共进行35个循环)，72 ℃延伸5 min。

1.2.4 PCR扩增后目的片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳(在测序电泳槽中进行) 按常规方法进行，银染后找出泳动位置发生变化的DNA条带。

1.3 DNA测序

将上述泳动位置发生变化的样品送上海生工生物公司测序。测序仪器为ABI PRISM 377-96，试剂为BigDye terminator v2.0。

1.4 实时荧光定量PCR法检测SHP-2 mRNA含量

1.4.1 mRNA的逆转录 同上。

1.4.2 PCR引物设计 小鼠SHP-2和小鼠β-actin基因引物设计根据实时荧光定量PCR引物原则设计，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′-AAC GAC GGC AAG TCC AAA GT-3′，下游引物5′-TGC TCC ACC AGG TCT GTC AG-3′，退火温度58.4 ℃，产物长107 bp；SHP-2基因的Taqman探针序列为FAM- CCA CGT CAT GAT CCG-MGB。小鼠β-actin基因的上游引物5′-AGG CCA ACC GTG AAA AGA TG-3′，下游引物5′-GCC TGG ATG GCT ACG TAC ATG-3′，退火温度60 ℃，产物长75 bp；β-actin基因的Taqman探针序列为FAM-CCC AGA TCA TGT TTG AGA C-MGB。引物及探针的设计、合成、标记由上海genecore公司进行。

1.4.3 荧光定量PCR反应 反应体积为25 μl：2× GC PCR buffer 12.5 μl，10 mmol/L的dNTP混合物0.5 μl，Mg^{2+} 3.0 mmol/L，相应的上、下游引物终浓度各0.9 μmol/L，相应的Taqman探针终浓度0.25 μmol/L，*Taq*酶0.5 μl，模板1 μl。每个反应作3个复孔，扩增条件为92 ℃变性2 min后进入循环(92 ℃变性15 s，60 ℃退火并延伸60 s，共40个循环)，最后40 ℃延伸5 s。首先以小鼠β-actin的质粒拷贝数(依次为107、106、105、104、103、102)的对数为横坐标，Ct值(Threshold cycle)为纵坐标制作标准曲线；然后对样品的mRNA进行定量：每一样品分为2份，1份在反应体系中加入SHP-2基因的上、下游引物及Taqman探针依据标准曲线进行定量，另1份在反应体系中分别加入β-actin的上、下游引物及Taqman探针作为内参照。SHP-2 mRNA含量用β-actin mRNA含量作为内参照进行校正，以消除取样误差对SHP-2 mRNA含量的影响。荧光定量PCR仪为Roche公司的Lightcycler。

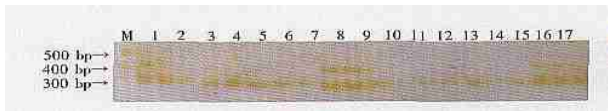
1.5 统计学处理

结果以$\bar{x}\pm s$表示，SPSS10.0统计软件行秩和检验(kruskal-wallis H)。

2 结果

2.1 白血病小鼠胸腺细胞SHP-2的PTPase催化区基因突变的检测

第1对PCR引物扩增所得产物经PCR-SSCP可知(图1)：与对照组(10，11，12号样品)比较，癌变组中5，6，8，13号样品的泳动位置与对照组基本一致，而1～4，7，14～17号样品泳动位置发生变化。即以PCR-SSCP方法检测了14个癌变组样品，共有9个样品的SHP-2 mRNA的第700～1 096 bp间可能发生了突变。为进一步确认突变的类型及位置，对其进行了测序分析，但结果显示无突变的发生，与PCR-SSCP提示的结果不一致。



M：Marker；1—9，13—17：Canceration group；10—12：Control

图1 癌变胸腺细胞SHP-2 mRNA的700～1 096 bp间(位于PTPase催化区)突变分析

Fig 1 Mutation of 700—1 096 bp (PTPase catalytic domain) of SHP-2 mRNA of thymus cells in canceration group

第2对PCR引物扩增所得产物经PCR-SSCP结果示(图2)：共检测了14个癌变组样品，其泳动位置均与正常样品(10～12号样品)的泳动位置基本一致，说明SHP-2 mRNA的第1 453～1 759 bp间未发生突变。



M：Marker；1—9，13—17：Canceration group；10—12：Control

图2 癌变组胸腺细胞SHP-2 mRNA的1 453～1 759 bp间(位于PTPase催化区)突变分析(PCR-SSCP)

Fig 2 Mutation of 1 453～1 759 bp (PTPase catalytic domain) of SHP-2 mRNA of thymus cells of canceration group (PCR-SSCP)

2.2 SHP-2的mRNA含量在白血病小鼠胸腺细胞中的变化

标准曲线的相关系数为0.99，即Ct值(纵坐标)与mRNA含量(横坐标)的相关性非常好，其回归方程为Ct=43.07—3.261lg[mRNA含量]。以此方程为基础，对胸腺细胞SHP-2 mRNA定量，结果见表1。经内参照校正后，白血病小鼠胸腺细胞SHP-2的mRNA含量略高于未癌变组及对照组，未癌变组略高于对照组，但差别均无显著性($P>0.05$)。

表1 γ射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中SHP-2的mRNA含量的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of contents of SHP-2 mRNA in thymus cells of mice with γ ray-induced leukaemia ($\bar{x}\pm s$)

Group	SHP-2 mRNA contents corrected by β-actin
Canceration group ($n=10$)	1.48±1.26
Non-canceration group ($n=10$)	0.88±0.58
Control ($n=10$)	0.56±0.25

$\chi^2=2.273$，$P=0.321$

3 讨论

SHP-2在信号转导中的功能尚不清楚，多数学者认为，激活细胞内磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和促分裂

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

原活性蛋白激酶(MAPK), 从而通过磷脂酰肌醇途径和 Ras 途径把外来信号传入胞内, SHP-2 在此信号转导过程中可能起正向调节作用, 增强外来信号(外来信号可能刺激细胞增殖, 也可能抑制细胞增殖)对细胞的作用[5,6]。但 SHP-2 与肿瘤的关系尚不十分清楚, 与辐射致癌的关系更少见报道。

本课题组此前已证实: γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中, SHP-2 蛋白的表达及其功能均明显增强, SHP-2 可能与 γ 射线诱发小鼠白血病的发生呈正相关。但 SHP-2 mRNA 如何变化? 是否与其蛋白及功能变化一致等问题尚不清楚[3]。

聚合酶链反应-单链构象多态(PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)是一种 DNA 单链凝胶电泳技术, 可探测到单个碱基的变化, 适用于大样本基因变异情况的筛查。可用于检测单个碱基置换、数个碱基插入或缺失等基因变异。小鼠 SHP-2 mRNA 全长 2 229 bp, 编码 597 个氨基酸, 其蛋白共分为 3 个功能域, 其中第 246～527 位氨基酸为酪氨酸磷酸酶域(PTPase 域), 本实验针对该催化域中最易发生基因突变的部位设计了 2 对引物, 以 PCR-SSCP 法检测到了癌变组胸腺细胞 SHP-2 的 PTPase 域中第 700～1 096 bp(对应的氨基酸位于 214～346 位)发生了突变, 突变率为 9/14, 但进一步 DNA 测序却未发现突变, 二者提示的结果不一致, 其原因尚有待进一步深入研究。

原位杂交、Northern blot 等半定量方法不能精确地描述基因的表达水平, 本研究应用实时荧光定量 PCR 法进一步分析白血病小鼠胸腺细胞 SHP-2 mRNA 的含量变化情况, 发现癌变组胸腺细胞中 SHP-2 mRNA 含量(以β-actin 内参照校正后)与对照组及未癌变组比无明显变化, 而此前已证实其 SHP-2 蛋白的表达及功能明显增强, 明显高于对照组及未癌变组, SHP-2 mRNA 含量的变化与其蛋白及功能的变化不一致。即在 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, 表现为翻译增强现象。即 γ 射线可能通过调控 SHP-2 mRNA 的翻译水平来调控 SHP-2 蛋白的表达及功能, 从而对辐射致癌起一定的促进作用, 但此现象的具体机制有待进一步研究。

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 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 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.

[4] 黄定德, 陈　杞, 韩　玲, 等. γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞蛋白酪氨酸磷酸化水平的变化[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7): 742－744.

[5] Ali S, Ali S. Recruitment of the protein-tyrosine phosphatase SHP-2 to the C-terminal tyrosine of the prolactin receptor and to the adaptor protein Gab2[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39073－39080.

[6] Hadari Y R, Kouhara H, Lax I, *et al*. Binding of Shp-2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(7): 3966－3973.

(编辑　陈聪连)

(上接 1808 页)

术者检查光行有无能量释放, 定位及固定满意后, 即打开激光。在治疗过程中可看到淡淡烟雾冒出针管及焦味。穿刺时随时注意观察病人有无突然发生或加重的疼痛以及突然的肌肉收缩, 这时应立即提醒术者改变进针的角度和方向, 以避免损伤血管和神经。病人胀痛明显可用注射器经三通管抽取气体, 以减低椎间盘内压力。手术结束后, 撤出光纤和穿刺针, 包扎伤口。本组 80 例均成功, 有两例复发, 再次行 PLDD 后缓解。无严重并发症发生。

2.2　术后护理

术后严密观察病人生命体征及下肢感觉和运动情况, 注意穿刺部位有无渗血。静脉给止血药常规应用抗菌素 3 d, 术后患者应睡硬板床 1～2 周, 并进行直腿抬高训练, 1 周后可在腰围保护下逐渐下地活动。3～6 个月后复查 CT 或 MRI。

3　讨论

通过 82 例手术观察分析, 本手术是安全可靠的, 并且具有损伤小、恢复快、费用低的优点, 但是要进一步提高手术成功率, 降低并发症, 则手术中及手术后的护理配合及观察非常重要; 我们初步体会到, 只有手术各操作步骤准确无误, 医护配合默契熟练, 激光能量释放合适, 术中观察细致, 才可能顺利的完成手术操作, 保证手术的成功。

关键词: 激光; 椎间盘; 护理

中图法分类号: R454.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Harada J, Dohi M, Fukuda K, *et al*. CT-guided percutaneous laser disk decompression (PLDD) for cervical disk hernia[J]. Radiat Med, 2001, 19(5): 263－266.

[2] 杜　凡, 郑叶槟, 李惠民, 等. 激光椎间盘减压术治疗腰椎间盘突出症疗效分析[J]. 实用放射学杂志, 2002, 18(2): 106－108.

[3] 倪文飞. 经皮激光治疗椎间盘突出症的应用进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 8(3): 281－283.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net