DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.013
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
1258 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)14-1258-03

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

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的表达及其功能在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基础。方法 BALB/c小鼠336只分为癌变组、未癌变组及对照组,应用Western blot、免疫沉淀法及生物化学方法检测各组SHP-2蛋白质的表达、酪氨酸磷酸化水平及酶活性。结果 癌变组SHP-2蛋白的表达、酪氨酸磷酸化水平及酶催化活性间存在明显相关性,均明显高于对照组及未癌变组($P<0.01$)。结论 在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,可能与γ射线诱发小鼠白血病的发生密切相关。

关键词:辐射致癌;信号转导;蛋白酪氨酸磷酸酶;小鼠;白血病
中图法分类号:R394.2;R730.231;R733.7 文献标识码:A

Expression and function of SHP-2 of thymocytes in γ-ray irradiation induced leukemia in mice

HUANG Ding-de[1], CHEN Qi[2], HAN Lin[2], CAI Jian-ming ([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 expression and function of SH2 domain containing protein-tyrosine-phosphatase SHP-2 of thymocytes in γ-ray irradiation induced leukemia in mice. Methods BALB/c mice were divided into canceration group, non-canceration group, and control group. The expression, level of tyrosine phosphorylation, and enzyme catalytic activity of SHP-2 in thymocytes were detected by Western blotting, immunoprecipitation, and biochemical method. Results There was obvious correlation among the expression, level of tyrosine phosphorylation, and enzyme catalytic activity of SHP-2, which were significantly higher in the canceration group than those in the non-canceration group and the control group ($P<0.01$). Conclusion Enhanced expression and function of SHP-2 protein of thymocytes are found in γ-ray irradiation induced leukemia in mice, which might be positively correlated with the occurrence of γ-ray irradiation induced leukemia in mice.

Key words: radiation carcinogenesis; signal transduction; protein-tyrosine-phosphatase; BALB/c mouse; leukemia

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。SHP-2为含SH2(src homology-2)域的酪氨酸磷酸酶(PTPase),它与细胞的增殖分化密切相关[2],而增殖分化障碍正是肿瘤细胞的特征之一,但其与肿瘤的关系尚不非常明确,与辐射致癌的关系国内外少见相关报道。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[3],本研究以此模型的胸腺细胞为研究对象,探讨SHP-2蛋白表达及功能(磷酸化水平及其酶活性)在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。

1 材料与方法

1.1 辐射致癌动物模型的建立及细胞的获取

参见文献[3]介绍的方法,BALB/c小鼠336只(雌雄各半,6~8周龄,体质量约20 g,均购自上海实验动物中心)分为照射

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:2003-08-18;修回日期:2004-03-12

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

组(236 只)及对照组(100 只), 照射组行 $^{60}Co\gamma$ 线全身分次照射, 诱发白血病者为癌变组, 未诱发白血病者为未癌变组, 对照组同步喂养。取癌变组、未癌变组及对照组的胸腺细胞进行以下实验。

1.2　细胞总蛋白的提取

参照文献[4]方法进行。

1.3　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-1 抗体(Santa Cruz 公司) 2 μl, 4 ℃孵育 1 h 后加入 Protein G agrose (Sant Cruz 公司) 20 μl, 4 ℃过夜。1 000× g 离心 8 min, 弃上清, 沉淀用 PBS 洗 3 次后行 Western blot 分析磷酸化水平, 或测酶催化活性。

1.4　Western blot

总蛋白或免疫沉淀物经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 该膜经含 15% 脱脂奶粉的 TBST (50 mmol/L pH 7.5, 含 0.1% Tween-20)封闭后, 与抗 SHP-2 或抗酪氨酸磷酸化的单克隆抗体(Santa Cruz 公司, 1∶800)在 4 ℃下孵育过夜, 再与 anti-mouse IgG-HRP(辣根过氧化物酶标记的二抗)室温下孵育 90 min, 最后经 ECL 发光试剂盒显影, X 线胶片记录结果。以β-actin 为内参照。

1.5　图像分析

结果经 SmartView2001 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。

1.6　SHP-2 酶催化活性的测定[5]

1.6.1　总蛋白质的提取　　基本步骤见前, 只是细胞裂解液中不含叠氮钠。

1.6.2　SHP-2 蛋白质的免疫沉淀　　基本步骤见前。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 pepstatin A, 5 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 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 mmol/L), 30 ℃温度下反应 30 min。以 0.9 ml 1 mol/L 的 NaOH 终止。紫外分光光度计测吸光度, 波长为 410 nm。

1.7　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示行单因素方差分析及相关分析。

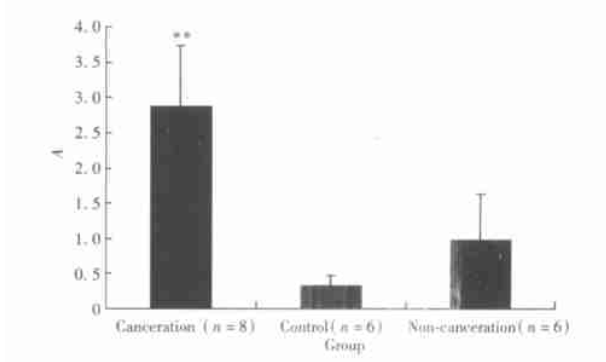
2　结果

2.1　SHP-2 蛋白表达水平在 γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中的表达

图 1 显示癌变组胸腺细胞中 SHP-2 的蛋白表达水平明显高于对照组及非癌变组($P<0.01$)。

2.2　SHP-2 蛋白的功能在 γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中的变化

2.2.1　SHP-2 蛋白酪氨酸磷酸化水平在 γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中的变化(图 2)　　首先用抗 SHP-2 抗体从总蛋白中沉淀纯化 SHP-2 蛋白, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 再用抗磷酸化酪氨酸抗体进行 Western blot, 进一步检测 SHP-2 蛋白的酪氨酸磷酸化水平, 结果提示: SHP-2 的酪氨酸磷酸化水平变化趋势基本与其蛋白表达水平的变化趋势一致, 即: 总体上呈现出癌变组(光密度定量为 5.412±1.452)明显高于对照组(1.287±0.748)及非癌变组(3.670±2.160, $P<0.01$), 非癌变组略高于对照组的趋势($P>0.05$)。



**: $P<0.01$, *vs* control and non-canceration group

图 1　SHP-2 蛋白在 γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中的表达

Fig 1　Expression of SHP-2 protein in thymocytes in γ-ray irradiation induced leukemia in mice



T: Canceration group; C: Control group; R: Non-canceration group;

图 2　γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中 SHP-2 蛋白酪氨酸磷酸化水平的变化

Fig 2　Expression of tyrosine phosphorylation of SHP-2 protein of thymocytes in γ-ray irradiation induced leukemia in mice

2.2.2　SHP-2 蛋白的酶催化活性在白血病小鼠胸腺细胞中的变化　　癌变组 SHP-2 的酶催化活性(以吸光度值表示)为 0.351±0.066, 明显高于对照组 0.212±0.070 及未癌变组 SHP-2 的酶催化活性(0.290±0.085, $P<0.01$), 未癌变组略高于对照组($P>0.05$)。进一步分析 SHP-2 蛋白的磷酸化水平(以密度定量的光密度表示)与其酶催化活性(以吸光度表示)间的相关性, 相关系数为 0.879 ($P<0.01$), 即 SHP-2 酶催化活性与其磷酸化水平存在明显相关性, 变化趋势基本一致。

3　讨论

SHP-2 在细胞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 Grb2 (growth factor receptor bound protein 2)于酪氨酸磷酸化的细胞因子受体, 激活细胞内磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)和促分裂原活性蛋白激酶(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[6,7]。细胞信

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

号转导途径中某些信号分子表达的失调可能诱导了肿瘤的发生、发展。SHP-2 是细胞信号转导的酪氨酸激酶途径中的信号分子，当前国内外对其正常生理作用的研究较多，但其异常与疾病的关系报道较少。

本研究表明在 γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中，SHP-2 蛋白质的表达明显高于对照组及未癌变组；大家公认：只有酪氨酸残基发生磷酸化后，SHP-2 才具有生物学活性，所以我们进一步检测了 SHP-2 的酪氨酸磷酸化水平及催化活性，发现三者变化趋势一致，存在明显相关性，表明在 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，可能与 γ 射线诱发小鼠白血病的发生呈正相关，促进肿瘤的发生发展，但其究竟如何起作用还有待进一步研究。

酪氨酸磷酸酶 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胸腺细胞中，酪氨酸磷酸酶 SHP-1 的蛋白表达明显高于对照组及非癌变组，而其酪氨酸磷酸化水平及酶活性却无明显变化，出现蛋白表达与生物效应分离现象，即 SHP-1 可能存在功能缺陷。而本研究提示 SHP-2 的蛋白表达及功能与 γ 射线诱发的小鼠白血病的发生呈正相关，但在此过程中，SHP-1 与 SHP-2 间是否存在协同或拮抗还有待进一步研究。

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] Guillemot L，Levy A，Zhao Z J，*et al*. The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 is required during angiotensin Ⅱ-mediated activation of cyclin D1 promoter in CHO-AT1A cells[J]. J Biol Chem，2000，275(34)：26349－26358.
[3] 韩 玲，蔡建明，李百龙，等. ^{60}Coγ 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.
[4] 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.
[5] 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 3 receptor signal transduction pathways leading to the prolongation of eosinophil survival[J]. J Exp Med，1997，186(4)：561－568.
[6] 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.
[7] Hadari Y R，Kouhara H，Lax I，*et al*. Binding of SHP-2 tyrosine phosphatase to FRSZ is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation[J]. Mol Cell Biol，1998，18(7)：3966－3973.

（编辑 刘洪娥）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)14-1260-01

冰袋护脑佐治小儿病毒性脑炎的疗效观察

Observation of curative effect of using ice bag on head as an accessory treatment for infantile viral encephalitis

王 旭[1]，刘开军[2]，魏 敏[2] （[1] 中国人民解放军第 47 医院儿科，成都 610500；[2] 第三军医大学成都军医学院军事预防医学教研室，成都 610083）

小儿病毒性脑炎的治疗是一个综合治疗的过程，包括强有力的抗感染、脱水、激素、保证水电解质的平衡和后期的营养脑细胞和高压氧等，这些治疗方法的疗效在临床上完全得到肯定。本研究是探讨用冰袋护脑能否减轻小儿病毒性脑炎的后遗症[1]。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以解放军第 47 医院和成都军区总医院儿科 1993－2003 年收治的 395 例小儿病毒性脑炎(轻中度)患儿为研究对象。

1.2 方法

将 395 例病毒性脑炎的患儿分成 2 组，试验组 141 名患儿接受冰袋护脑(所谓冰袋护脑是指在额骨、颞骨、顶骨、面部四周放置一层毛巾，但需露出眼、鼻、口腔，再在上面及四周放置冰块，放置毛巾的目的是为了防止皮肤及皮下组织的冻伤；局部温度控制在 35 ℃以下)，对照组 254 名患儿不接受冰袋护脑。试验组和对照组其它临床处理一样。观察治疗后按留下后遗症的轻重：无任何后遗症或治疗后不爱说话、少动判断为“无后遗症或轻微后遗症”；经抢救死亡或智力明显下降、偏瘫、失语、大小便失禁等判断为“严重后遗症”。分析比较实验组和对照

作者简介：王 旭(1971－)，男，四川省达州县人，主治医师，主要从事儿科学临床方面的研究和教学方面的研究，发表论文 8 篇，电话：(028)89270301

收稿日期：2004-01-01；修回日期：2004-03-23

（下转 1264 页）

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