

WIP1 对小鼠 B 细胞及 T 细胞发育的影响

陈陟阳, 张俊伶, 马小茗, 易微微, 陈显达, 石桂英, 鞠振宇

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 研究 WIP1 基因对小鼠骨髓 B 细胞发育及胸腺 T 细胞发育的影响。方法 流式细胞术测定小鼠骨髓 B 细胞及胸腺 T 细胞发育中各阶段的细胞比例。结果 虽然 WIP1 缺失小鼠骨髓 B 细胞发育各阶段比例正常, 但骨髓总体 B 细胞比例下降; WIP1 基因敲除小鼠胸腺发育障碍, CD8/CD4 双阴性细胞比例增高, CD8/CD4 双阳性细胞比例降低。结论 WIP1 基因在小鼠骨髓 B 细胞及胸腺 T 细胞的发育过程中起重要作用。

【关键词】 WIP1; 基因敲除小鼠; B 细胞; T 细胞

【中图分类号】 R349.15; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0052-08

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.012

The Role of WIP1 in Mouse B cell and T cell Development

CHEN Zhi-yang, ZHANG Jun-ling, MA Xiao-ming, YI Wei-wei,

CHEN Xian-da, SHI Gui-ying, JU Zhen-yu

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of

Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union

Medical College, Human Disease Animal Models Level-3

Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the role of WIP1 gene in mouse B cell and T cell development. **Methods** The proportion of the B cell in bone marrow and T cell in the thymus were determined by the flow cytometry. **Results** Although the proportion of different subsets in B cell development was normal, the total number of B cell in bone number was decreased. WIP1 gene knockout mice had defect in thymus development, the proportion of CD8/CD4 double negative cells was increased, but the CD8/CD4 double positive cells was decreased. **Conclusion** WIP1 gene plays an important role in the development of B cell and T cell.

【Key words】 WIP1; Knockout mice; B cell; T cell

WIP1 (wild-type p53-induced phosphatase) 是一种核蛋白, 为丝氨酸/苏氨酸特异蛋白磷酸酶 2C 型家族 (serine/threonine specific protein phosphatase type 2C, PP2C) 中的一员, 由 PPM1D (protein phosphatase magnesium-dependent 1 delta) 基因编码,

介导众多 DNA 损伤应急信号通路^[1]。WIP1 表达非常广泛, 通过 RT-PCR 证实小鼠胚胎和成体几乎各个脏器组织均有 WIP1 mRNA 的表达, 包括乳腺、子宫、卵巢、肾上腺、皮肤、肝脏和睾丸等组织均检测到该基因的表达, 特别在睾丸中表达量明显增

[基金项目] 实验血液学国家重点实验室开放课题 [ZK 10-05]。

[作者简介] 陈陟阳 (1985 -), 男, 硕士生, 研究方向: 衰老与再生。

[通讯作者] 鞠振宇, 男, 研究员, 研究方向: 衰老与再生, E-mail: zhenyuj@hotmai.com。

高。缺失 WIP1 的小鼠能够正常生产,但是却显示出一系列的产后缺陷,主要体现在雄性小鼠发育不全,生殖器官萎缩,WIP1^{-/-}雄性小鼠的睾丸发育不全,生育力下降及生命期限缩短。缺失 WIP1 小鼠表现出对病原体易感性增强^[2]。WIP1 基因在许多人类癌症,特别是乳腺癌中过表达,而敲除 PPM1D 基因的小鼠能够抵抗乳腺癌的发生,暗示 WIP1 可能是一个致癌基因^[3,4]。在 APC^{min} 肠癌小鼠模型中,WIP1 基因缺失通过促进小肠干细胞的凋亡,调控小肠干细胞稳态,有效抑制肿瘤生成^[5]。在小鼠胸腺发育中,由于 WIP1 基因缺失导致 P53 的持续激活,致使 T 细胞发育障碍^[6]。在神经系统中,WIP1 通过 P53 依赖途径调控神经干祖细胞的自我更新^[7]。此外在对衰老的研究中 WIP1 基因同样引起关注,伴随着衰老的进行 WIP1 基因的表达降低,导致胰岛 β 细胞自我更新及增值能力下降^[8]。综合前期结果提示,WIP1 基因参与细胞增殖、凋亡等众多信号通路,对 DNA 损伤修复^[9]、癌症的发生、细胞稳态的调控^[10] 及抗衰老起重要的作用。然而,目前还没有研究报道过 WIP1 基因对骨髓 B 细胞发育的影响。为了研究 WIP1 基因是否直接参与调控成年小鼠 B 细胞及 T 细胞的发育,我们利用基因敲除小鼠及流式细胞术为工具研究 WIP1 基因对成年小鼠 B 细胞及 T 细胞发育的影响。

1 材料和方法

1.1 PCR 方法鉴定 WIP1^{-/-}小鼠基因型

小鼠在出生 10 d 用剪趾法标记,收集剪下的组织,裂解组织提取基因组 DNA,PCR 鉴定基因型,反应条件:94℃ 预变性 3 min;变性 94℃ 30 s,退火 61℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s 40 个循环;72℃ 延伸 10 min。鉴定引物为 Wip1 WT primer1: 5'-GACAGT-CCTGTGCCAAAATGCT-3'; Wip1 WT primer2: 5'-G-GTGACTTGATTGGTGGTGTAGA-3'; Wip1 KO primer A: 5'-GCAGGGCTGTTTGTGGTGTCT-3'; Wip1 KO primer B: 5'-GCATGCTCCAGACTGCCTT-3', WIP1^{-/-}产物长度 176 bp,WT 产物长度 236 bp,PCR 试剂购自上海生工生物技术有限公司,中国(图 1)。

1.2 流式细胞术分析

1.2.1 骨髓单细胞悬液制备:实验使用成年 3 月龄 129 小鼠,颈椎脱臼牺牲小鼠,取双腿胫骨、股骨用预冷的 PBS 冲出骨髓腔的骨髓细胞,吹打成单细胞悬液,过滤、计数,调整浓度至 1×10^8 cell/mL。本实

验使用小鼠均来自北京协和医学院比较医学中心,动物生产许可证号:SCXK(京)2009-0007,动物使用许可证号:SYXK(京)2005-0001。

1.2.2 骨髓 B 细胞及粒细胞染色方案 取 10 μ L 全骨髓细胞悬液置于 96 孔板一孔中,加入 B220/PE-cy7 (Biolegend)、CD11b/APC-cy7 (Biolegend) 抗体,冰上避光孵育 30 min,加入 200 μ L staining medium (PBS + 1% BSA),400 g/min,离心 5 min,弃上清后用 200 μ L staining medium 重新悬浮细胞,200 目滤网过滤至流式管中准备流式分析,每只小鼠收集 1×10^5 细胞,计算 B220/PE-cy7 阳性细胞及 CD11b-APC-cy7 阳性细胞所占的比例。

1.2.3 骨髓 B 细胞发育染色方案 取 10 μ L 全骨髓细胞悬液至于 96 孔板一孔中,加入 IgD/FITC (Biolegend)、CD43/Percp-cy5.5 (Biolegend)、B220/PE-cy7 (Biolegend)、IgM/APC (Biolegend) 抗体,冰上避光孵育 30 min,加入 200 μ L staining medium (PBS + 1% BSA),400 g/min 离心 5 min,弃上清后用 200 μ L staining medium 重新悬浮细胞,200 目滤网过滤至流式管中准备流式分析,每只小鼠收集 1×10^5 细胞,计算 B220⁺CD43⁻IgM⁻IgD⁻(Pre-B); B220⁺CD43⁻IgM⁺IgD⁻(immature-B); B220⁺CD43⁻IgM⁺IgD⁺(mature-B) 细胞所占的比例。

1.2.4 胸腺单细胞悬液制备 颈椎脱臼牺牲小鼠,完整摘取胸腺,使用两片载玻片研磨,200 目滤网过滤置离心管中,计数、调整浓度至 1×10^8 cell/mL。取 10 μ L 细胞悬液置于 96 孔板一孔中,加入 CD8/FITC、CD45/Percp-cy5.5、CD4/APC-cy7 抗体,冰上避光孵育 30 min,加入 200 μ L staining medium (PBS + 1% BSA),400 g/min 离心 5 min,弃上清后用 200 μ L staining medium 重新悬浮细胞,200 目滤网过滤至流式管中准备流式分析,每只小鼠收集 1×10^5 细胞,计算 CD45 阳性细胞、CD8 单阳性细胞、CD4/CD8 双阳细胞、CD4/CD8 双阴性细胞及 CD4 单阳性细胞所占的比例。

1.3 统计学分析

数据结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料比较采用 Student t 检验。

2 结果

2.1 PCR 鉴定结果及 WIP1 基因缺失小鼠形态差异

基因型鉴定结果如图 1A 所示。WIP1 基因在

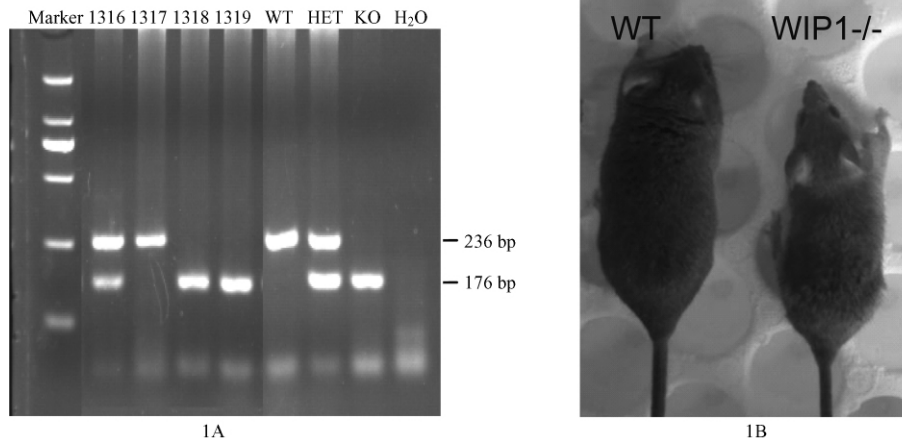


图 1 PCR 鉴定 WIP1 基因敲除小鼠的凝胶电泳分析及 WIP1 缺失小鼠形态差异图 1A:Marker 为 DL2000 marker, H2O 为空白对照, WT 为野生型对照, KO 为基因敲除对照, HET 为杂合对照; 1316/1317/1318/1319 为样品; 1B 为 3 月龄 WIP1 缺失雄性小鼠与同窝野生型对照体型对比

Fig. 1 PCR genotyping of the WIP1 $-/-$ mice and the Morphological alterations in Wip1 null males

1A: The marker is the DNA molecular weight marker; H2O indicates the negative control; WT: wild-type control;

KO: WIP1 gene knockout control; HET: heterozygosity control; Lane 1316—1319: stands for DNA samples of

WIP1 mice; 1B: The smaller animal on the right is WIP1 $-/-$ male littermate along with a wild-type male littermate at 3 months of age

小鼠全身众多脏器组织中表达,由于 WIP1 基因在睾丸中表达最为明显,因此该基因缺失致使雄性小鼠发育不全,生育力下降,雄性缺失小鼠在 3 月龄时体型较同窝野生型对照小鼠明显变小(如图 1B)。有研究报道 WIP1 缺失的雄性小鼠生命期限明显缩短,而 WIP1 $+/-$ 雄性小鼠及 WIP1 $-/-$ 雌性小鼠生命期限较野生型差异不明显。

2.2 骨髓中 B 细胞比例流式分析

为研究 WIP1 基因缺失对成年小鼠骨髓 B 细胞发育的影响,我们分析了 3 月龄 WIP1 $-/-$ 小鼠和野生型对照小鼠的骨髓 B 细胞和 M 细胞的比例。(如图 2A 2B)。结果显示 WIP1 缺失的小鼠骨髓 B 细胞比例下降(如图 2C)。而 M 细胞比例无明显差异。为了进一步研究 B 细胞在发育过程中哪一阶段出现问题,我们依据骨髓 B 细胞发育过程中特异性表面标记的表达顺序进行了染色(如图 2D 2E 2F 2G),结果显示 WIP1 基因缺失的骨髓 B 细胞各发育阶段比较野生对照均为正常,提示骨髓 B 细胞比例下降可能是由于 Pre-B 之前更前体的祖细胞发育障碍导致。

2.3 胸腺中 T 细胞比例流式分析

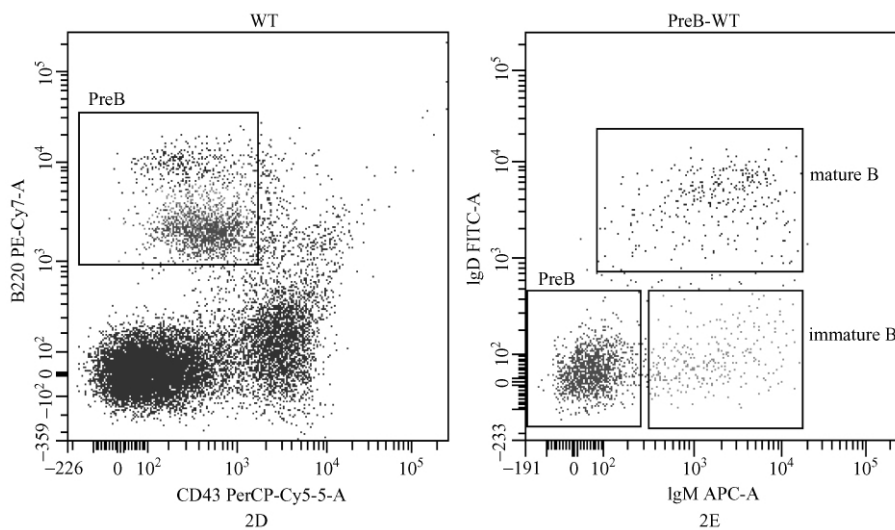
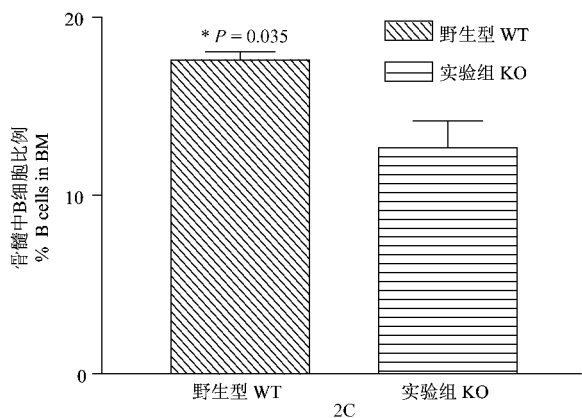
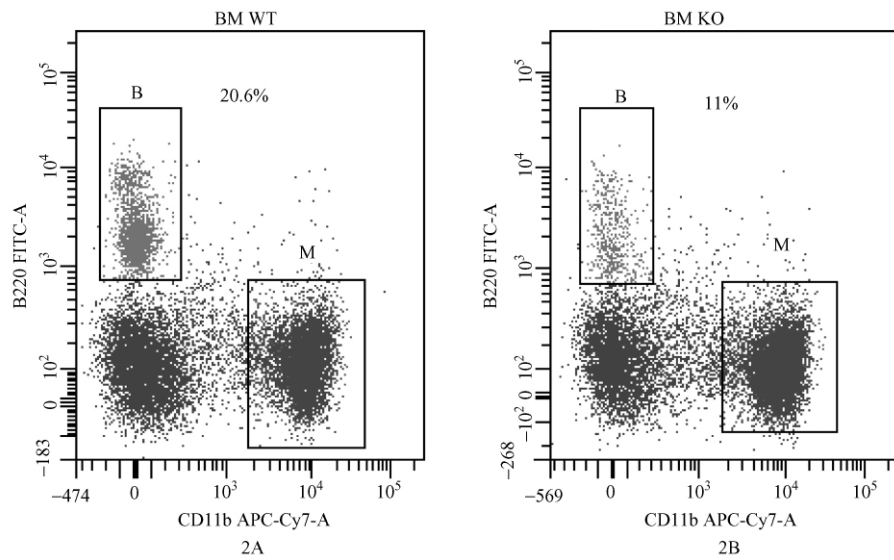
为研究 WIP1 基因对成年小鼠胸腺发育的影响,我们分析了三月龄 WIP1 $-/-$ 及野生型对照小鼠的胸

腺形态差异(如图 3D),发现 WIP1 缺失小鼠的胸腺明显较野生型对照小,进一步对胸腺白细胞表面标记 CD45 染色发现, WIP1 缺失小鼠胸腺白细胞比例明显较野生型低(如图 3A、3B 及 3C)。

为进一步明确胸腺 T 细胞在发育阶段哪一步出现问题,我们对胸腺细胞进行 CD8 及 CD4 染色。结果显示, WIP1 缺失小鼠胸腺 CD8/CD4 双阴性细胞比例明显升高,而 CD8/CD4 双阳性比例降低,由 CD8/CD4 双阳性细胞进一步分化的 CD8 单阳性细胞比例升高,而 CD4 单阳性细胞变化不大。

3 讨论

已有的研究表明 WIP1 蛋白作为一种磷酸酶,参与众多细胞信号通路调控,对 DNA 损伤修复、癌症的发生、细胞稳态的调控及抗衰老起重要的作用。而鲜有研究 WIP1 在 B 细胞 T 细胞发育过程中是否起到重要作用。我们对 WIP1 缺失小鼠的骨髓 B 细胞及胸腺 T 细胞进行流式细胞术分析,发现 WIP1 缺失导致骨髓 B 细胞比例降低,在胸腺中 T 细胞发育障碍。骨髓和胸腺分别是 B 细胞和 T 细胞分化发育成熟的场所。在成熟小鼠的骨髓中, B 细胞所占比例为 20 ~ 30% 左右,而 WIP1 缺失小鼠的骨髓 B 细胞仅为 10% 左右,为了弄清楚 B 细胞在



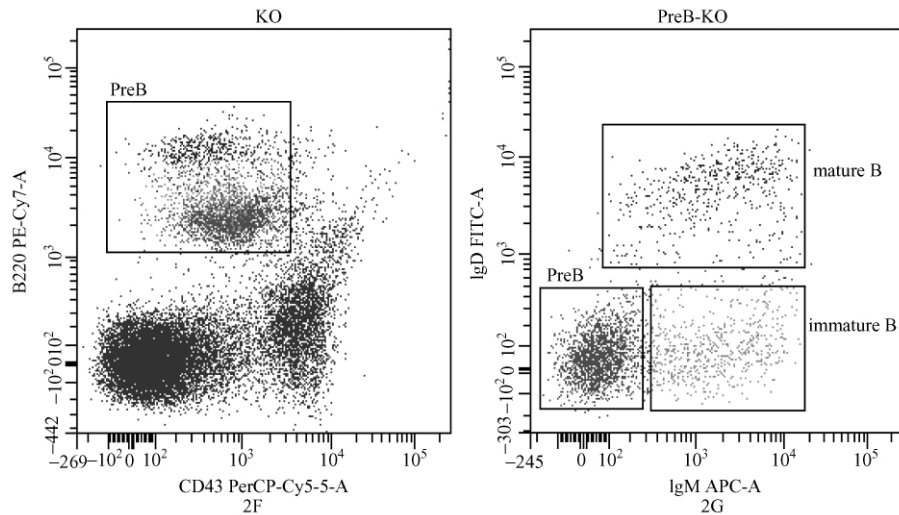


图 2 骨髓 B 细胞比例流式分析

2A:野生型小鼠骨髓中 B 细胞、M 细胞比例;2B:WIP1 敲除小鼠骨髓中 B 细胞、M 细胞比例;2C:WIP1 缺失骨髓 B 细胞比例与野生型对照比较明显降低;2D-2E:野生型骨髓 B 细胞发育流式图;2F-2G:WIP1 缺失小鼠骨髓 B 细胞发育流式图

Fig. 2 Flow cytometric analysis of the proportion of B cell in bone marrow

2A: The ratio of B cells and M cells in wild-type mice bone marrow;

2B: The ratio of B cells and M cells in WIP1 - / - mice bone marrow;

2C: Histogram showing the lower percentage of B cells in WIP1 - / - mice than WT mice; 2D-2E: FACS plots show the development of B cell in WT bone marrow;

2F-2G: FACS plots show the development of B cell in WIP1 - / - bone marrow

发育过程的哪一阶段遇到障碍,我们进而依据 B 细胞发育阶段所表达的特异性表面标记进行染色,流式分析发现,在 Pre-B 之后的 B 细胞发育各阶段细胞比例均正常,从而猜想骨髓中 B 细胞比例整体降低可能是由于更前体的祖细胞发育障碍。WIP1 缺失小鼠的胸腺中 T 细胞数目整体降低,在 WIP1 敲除小鼠模型中,CD8/CD4 双阴性 T 细胞比例高于野生型对照小鼠,而 CD8/CD4 双阳性细胞比例低于对照组(差异不显著,但具有统计学差异),与已有报道一致,而 CD8 单阳性 T 细胞比例升高,不同于已有报道的 CD8 单阳 T 细胞比例降低,此外 CD4 单阳 T 细胞比例变化不明显而非已有报道的 CD4 单阳 T 细胞比例降低。

已有的报道发现衰老小鼠会产生淋系发育障碍,同时伴随着髓系细胞过度增殖^[11],这与人类衰老时免疫能力下降及髓系白血病发病率升高相吻合。我们的研究表明 WIP1 基因参与调控 B 细胞及 T 细胞的发育,WIP1 基因缺失导致骨髓 B 细胞及胸

腺 T 细胞比例下降,影响小鼠免疫系统正常发育,暗示 WIP1 基因可能直接参与调控个体衰老。作为重要的衰老相关调控基因,P53、P38 等在衰老过程中发生明显变化,端粒缩短导致的复制性衰老直接引起 P53 的高表达;在小鼠胰岛 β 细胞中随着衰老的进行,WIP1 表达逐渐下降,同时 P38 表达升高^[8]。而 WIP1 做为 P38/P53 信号通路的负反馈调节基因^[11],WIP1 的缺失直接导致 p38/p53 的升高,尤其在放射线照射、衰老等应激条件下,p38/p53 持续的高表达使受损伤的细胞在修复之后无法正常的返回细胞周期,从而走向衰老或凋亡。可见 WIP1 对抗衰老尤其是调节免疫衰老具有重要的应用前景,然而 WIP1 的过表达极易导致癌症的发生,因此如何调控 WIP1 在衰老进程中的表达仍是限制其临床应用的重要障碍,对 WIP1 调控 B 细胞 T 细胞的具体分子机制及调控免疫衰老的机制仍须进一步研究。

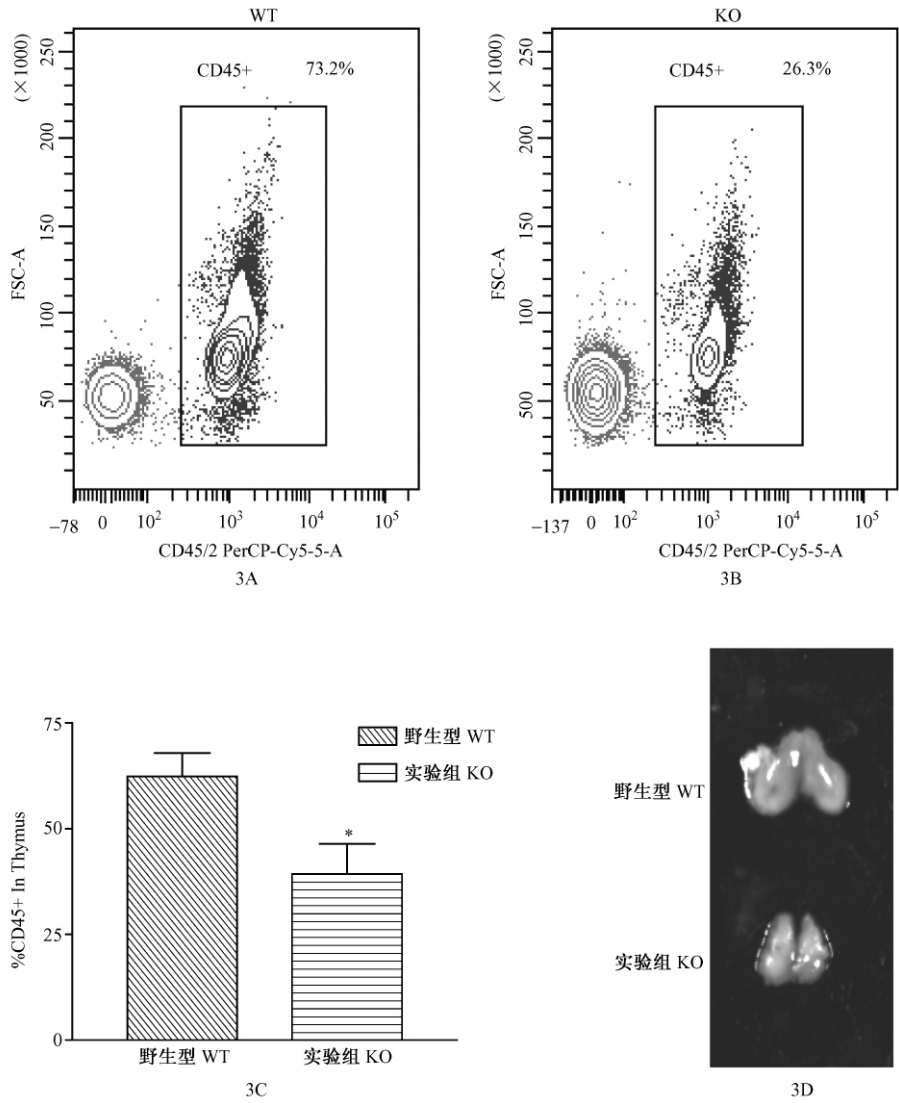


图3 胸腺形态学分析

注:3A: 野生型小鼠胸腺白细胞比例;3B: WIP1 缺失小鼠胸腺白细胞比例;3C: WIP1 缺失小鼠胸腺白细胞比例较野生型对照组明显低;3D: 野生型小鼠胸腺与 WIP1 缺失小鼠胸腺形态比较

Fig. 3 Morphological alteration about thymus in WIP1 - / - null mice

Note: 3A: The ratio of white blood cells in 3 months old wild-type mice thymus; 3B: The ratio of white blood cells in 3 months old WIP1 deletion mice thymus; 3C: Histogram showing the lower percentage of white blood cells in WIP1 - / - mice compare with WT mice; 3D: The size of WIP1 - / - mice thymus is much smaller than WT

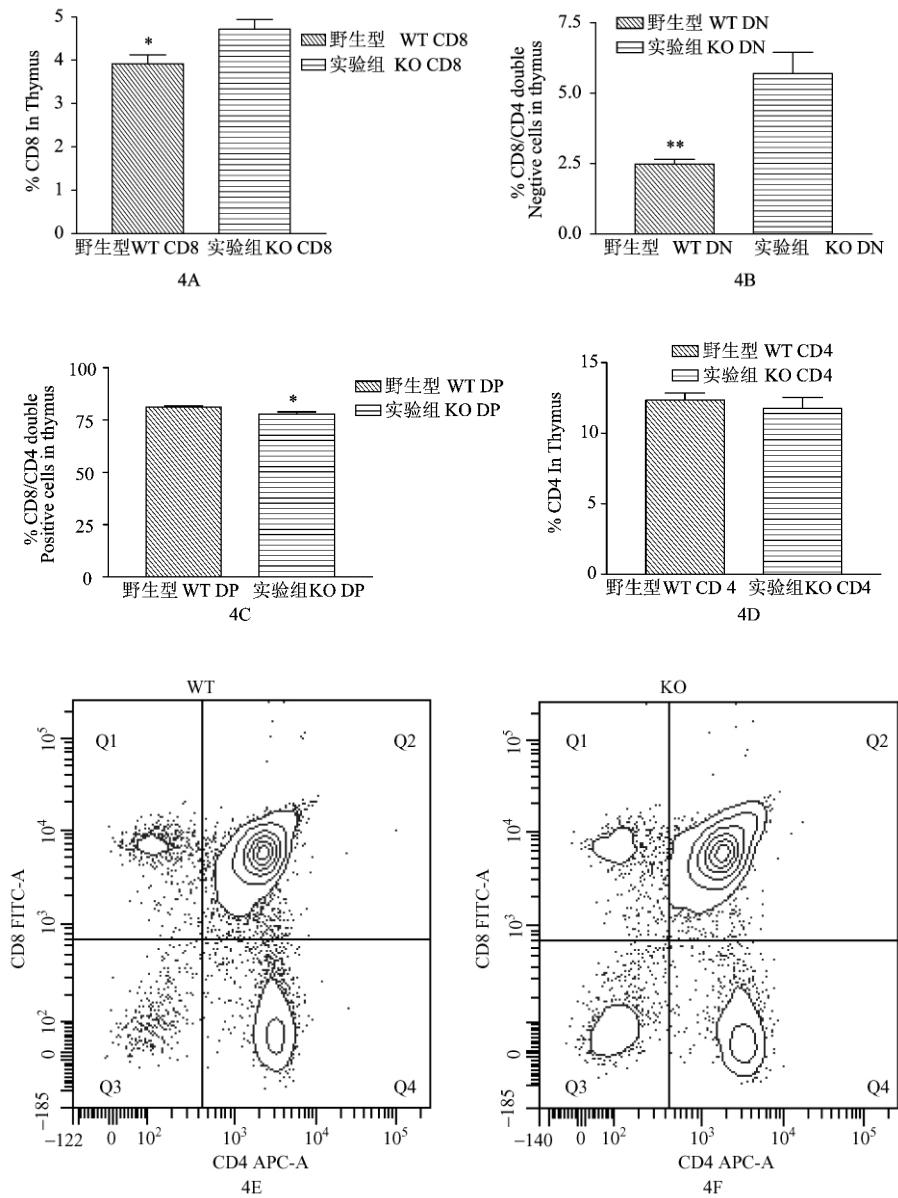


图 4 胸腺 T 细胞流式分析

4A: WIP1 缺失小鼠胸腺 CD8 单阳性 T 细胞比例较野生型高;4B: WIP1 缺失小鼠胸腺 CD8/CD4 双阴性 T 细胞比例较野生型明显高;4C: WIP1 缺失小鼠胸腺 CD8/CD4 双阳性 T 细胞比例较野生型低;4D: WIP1 缺失小鼠胸腺 CD4 单阳性 T 细胞比例与野生型相比无明显差异; 4E: 野生型小鼠胸腺 T 细胞各亚群比例; 4F: WIP1 缺失小鼠胸腺 T 细胞亚群比例

Fig. 4 Flow cytometric analysis of the proportion of T cell in thymus

4A: The ratio of CD8 single positive cells in WIP1 deletion mice is higher than WT; 4B: The ratio of CD8/CD4 double negative cells in WIP1 deletion mice is significantly higher than WT; 4C: The ratio of CD8/CD4 double positive cells in WIP1 deletion mice is lower than WT; 4D: The ratio of CD4 single positive cells do not have different between WIP - / - and WT; 4E-4F: FACS plots of different subsets T cells from WT and WIP1 - / - mice thymus

参考文献:

- [1] Lu X , Nguyen TA , Moon SH , et al. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways[J]. *Cancer Metastasis Rev* 2008 , 27 (2):123 - 135.
- [2] Choi J , Nannenga B , Demidov ON , et al. Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs , immune function , and cell cycle control [J]. *Mol Cell Biol* 2002 , 22(4) :1094 - 1105.
- [3] Yu E , Ahn YS , Jang SJ , et al. Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers[J]. *Breast Cancer Res Treat* 2007 , 101(3) :269 - 278.
- [4] Harrison M , Li J , Degenhardt Y , et al. Wip1-deficient mice are resistant to common cancer genes[J]. *Trends Mol Med* 2004 , 10 (8):359 - 361.
- [5] Demidov ON , Timofeev O , Lwin HN , et al. Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine [J]. *Cell Stem Cell* 2007 , 1 (2):180 - 190.
- [6] Schito ML , Demidov ON , Saito S , et al. Wip1 phosphatase-deficient mice exhibit defective T cell maturation due to sustained p53 activation [J]. *J Immunol* 2006 , 176(8) :4818 - 4825.
- [7] Zhu YH , Zhang CW , Lu L , et al. Wip1 regulates the generation of new neural cells in the adult olfactory bulb through p53-dependent cell cycle control[J]. *Stem Cells* 2009 , 27(6) :1433 - 1442.
- [8] Le Guezennec X , Bulavin DV , et al. WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging[J]. *Trends Biochem Sci* 2010 , 35 (2):109 - 114.
- [9] Cha H , Lowe JM , Li H , et al. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response [J]. *Cancer Res* 2010 , 70(10) :4112 - 4122.
- [10] Moon SH , Nguyen TA , Darlington Y , et al. Dephosphorylation of gammaH2AX by WIP1: An important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control[J]. *Cell Cycle* 2010 , 9(11) .
- [11] Ju Z , Jiang H , Jaworski M , et al. Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment[J]. *Nat Med* 2007 , 13(6) :742 - 747.

(修回日期)2011-02-14

(下接第 66 页)

- [5] Marc Baud H , Romain R , C'eline C et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. *J Pathol* 2010 , 221: 77 - 86
- [6] Bischof R , Zafiroopoulos D , Hamilton J , et al. Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation [J]. *Clin. Exp. Immunol.* 2000 , 119: 361 - 367.
- [7] Lenda D , Kikawada E , Stanley E , et al. Reduced macrophage recruitment , proliferation , and activation in colony-stimulating factor-1-deficient mice results in decreased tubular apoptosis during renal inflammation[J]. *J Immunol.* 2003 , 170: 3254 - 3262 .
- [8] Le Meur , Y. et al. Macrophage accumulation at a site of renal inflammation is dependent on the M-CSF/c-Fms pathway[J]. *J. Leukocyte Biol.* 2002 , 72: 530 - 537 .
- [9] Baran C. et al. Important roles for macrophage colony-stimulating factor , CC chemokine ligand 2 , and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis[J]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007 , 176: 78 - 89.
- [10] Isabelle B , Seraya M , Hervé D , et al. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implication in atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis.* 2011 , 214(2) : 316 - 24.
- [11] Niida S , Kaku M , Amano H , et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption[J]. *J Exp Med* 1999 ; 190: 293 - 298.
- [12] Suwen W , Sayan N , Violeta C , et al. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells[J]. *J Leukoc Biol.* 2010 , 88(3) : 495 - 505.
- [13] Eda H , Zhang J , Keith RH , et al. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood[J]. *Cytokine.* 2010 , 52(3) : 215 - 20.

(修回日期)2011-02-28