

SHP-2 酪氨酸磷酸酶激活突变促进 组织白细胞浸润和器官损伤

胡中倩¹ 汪心怡¹ 储著朗¹ 郑贤芳¹ 陈吉¹ 余科科¹ 李菲菲¹ 瞿成奎² 汪思应¹

(1. 安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032; 2. 美国凯斯西储大学, 克里夫兰 44106)

【摘要】 目的 观察 SHP-2^{D61G/+} 酪氨酸磷酸酶激活突变对组织白细胞浸润、细胞因子分泌及多器官损伤的影响。方法 分别以 SHP-2^{D61G/+} 激活突变敲入的模型小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠为研究对象, ELISA 法检测小鼠血清和白细胞培养上清液中 IL-2 及 TNF- α 浓度; 采用常规组织切片和 HE 染色观察心、肺、脾等组织病理学改变; 放射免疫法检测血清中丙氨酸转氨酶和心肌肌钙蛋白 I 的水平。结果 SHP-2^{D61G/+} 激活突变小鼠脾、肺组织中白细胞浸润较野生型对照小鼠明显增加, 心肌肥大, 出现明显炎症损伤型组织学变化; 与野生型对照相比, 突变小鼠血清及白细胞培养上清液中 IL-2 和 TNF- α 浓度均显著增加 ($P < 0.01$), 血清丙氨酸转氨酶及心肌肌钙蛋白 I 水平亦显著增高 ($P < 0.01$)。结论 SHP-2^{D61G/+} 激活突变增强白细胞分泌炎症因子的能力, 促进组织白细胞严重浸润和脾、肺、心等多器官损伤, 进而导致多器官功能障碍。

【关键词】 SHP-2 酪氨酸磷酸酶; 激活突变; 细胞因子分泌; 白细胞浸润; 多器官损伤

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)12-0010-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.012.003

Gain-of-Function Mutations in SHP-2 Tyrosine Phosphatase (SHP-2^{D61G/+}) Induce Leukocyte Infiltration and Multi-Organ Impairment

HU Zhong-qian¹, WANG Xin-yi¹, CHU Zhu-lang¹, ZHENG Xian-fang¹, CHEN Ji¹,
YU Ke-ke¹, LI Fei-fei¹, QU Cheng-kui², WANG Si-ying¹

(1. Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Case Western Reserve University, Cleveland 44106, USA)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of SHP-2^{D61G/+} mutations on leukocyte infiltration, cytokines secretion and multi-organ impairment. **Methods** The SHP-2^{D61G/+} gain-of-function mutant gene knock-in model mice and wild-type 57BL/6 mice (WT) were used in this study. Serum level of IL-2 and TNF- α and the cytokines concentration in the supernatant of cultured WBC were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Leukocyte infiltration in the lung, spleen and heart tissues was observed by histopathology, and serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and cardiac troponin I (cTnI) were studied by radioimmunoassay. **Results** Compared with the WT control, leukocyte infiltration in the lung and spleen tissues were significantly increased and myocardial hypertrophy was observed in the SHP-2^{D61G/+} mutant mice. The serum levels of IL-2 and TNF- α were significantly increased in SHP-2^{D61G/+} mutant mice ($P < 0.01$, compared with the WT control), and so were the cytokines concentrations in the supernatant of cultured WBC ($P <$

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:30873046, 309734246); 安徽省留学回国人员科研项目(编号:2009-2011); 安徽省学科学术带头人基金。

【作者简介】 胡中倩(1983-), 女, 硕士生。E-mail: hzq920@126.com。

【通讯作者】 汪思应, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: sywang@ahmu.edu.cn。

0.01, compared with the WT control). The serum levels of ALT and cTnI were significantly higher in the SHP-2^{D61G/+} mutant mice than that of the WT controls ($P < 0.01$). **Conclusions** Gain-of-function mutations in SHP-2 tyrosine phosphatase (SHP-2^{D61G/+}) greatly induce leukocyte infiltration in tissues, IL-2 and TNF- α secretion and multi-organ impairment, which may lead to multiple organ failure.

【Key words】 SHP-2 tyrosine phosphatase; gain-of-function mutation; cytokines secretion; leukocyte infiltration; multi-organ impairment

SHP-2 属于蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTPase) 家族成员之一, 作为细胞因子、生长因子及其他胞外刺激因子的下游信号分子, 表达于机体的各种组织和细胞中, 与许多重要的细胞生命活动 (如细胞增殖、分化、移动、死亡的调控) 密切相关^[1-2]。近年来, SHP-2 突变在白血病、实体瘤和努南综合征中陆续被发现^[3], 是最早被定义为癌基因的酪氨酸磷酸酶。SHP-2 突变位点主要位于 N 端 SH2 结构域, 其中最常见的是 E76K 和 D61G/Y 突变, 这些激活突变使得 N-SH2 与 PTP 结构域的自身结合部分或完全解离, 导致 SHP-2 酪氨酸磷酸酶的活性不同程度增强, 故称激活突变 (gain-of-function mutation)。SHP-2 激活突变可能与肿瘤尤其是白血病细胞的恶性生物学行为, 如高增殖敏感性、耐药、易侵袭转移等密切相关。临床也发现部分青少年粒细胞性白血病 (JMML) 患儿 (35% 患者体内存在 SHP-2 激活突变) 发病早、进展快, 多数患者因白细胞包括白血病细胞大量浸润导致多器官衰竭而早期死亡^[4]。

前期研究^[5-7] 从细胞和分子水平证实, SHP-2^{D61G/+} 激活突变可能通过增强的 NF- κ B 信号途径促进白细胞黏附、侵袭。本研究以 SHP-2^{D61G/+} 激活突变敲入的模型小鼠为研究对象, 进一步从整体水平观察 SHP-2 激活突变对组织白细胞浸润、细胞因子分泌和多器官损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 公司产品, 新生牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司; 放射免疫试剂盒由中国原子能科学研究院提供, 仪器为 FJ-2008 型 γ 免疫计数器; 光学显微镜照相系统购于日本 Olympus 公司。

1.2 实验动物

SHP-2^{D61G/+} 激活突变小鼠由美国 Case Western Reserve 大学瞿成奎教授提供, 模型小鼠表达生理水平的 SHP-2^{D61G} 蛋白, 但磷酸酶活性却升高 2~5 倍。

野生型小鼠采用 C57BL/6 小鼠, 雌雄各半, 16 周龄, 体重 25 ± 0.2 g, SPF 级, 由安徽医科大学实验动物中心提供 [SCXK(皖) 2009-0001]。

1.3 小鼠白细胞的分离与培养

无菌采取小鼠血 1 mL, 严格按照白细胞分离液说明书操作。细胞培养用含 10% 灭活新生牛血清的 RPMI-1640 培养液 (含 10^5 U/L 青霉素, 10^5 U/L 链霉素), 在 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中维持培养。

1.4 ELISA 检测细胞因子 IL-2 和 TNF- α

设空白孔、标准孔和待测样品孔 (每孔加样 100 μ L), 加入 detection antibody 工作液 50 μ L, 室温孵育 2 h 后用 wash buffer 反复洗涤 5 次; 然后加入 streptavidin-HRP 工作液 100 μ L, 室温反应 30 min 后充分洗涤; 依次加入 color reagent A 和 color reagent B 各 50 μ L, 室温避光显色 30 min, 之后加入 stop solution 50 μ L 终止反应; 用酶联仪在 450 nm 波长下测量 A 值。根据样品的 A_{450} 值由标准曲线计算出相应的浓度, 再乘以稀释倍数即可得到样品中待检物质的实际浓度。

1.5 血清中丙氨酸转氨酶 (ALT) 和 cTnI 水平的检测

16 周龄小鼠, 取内眦静脉血, 分离血清, 按试剂盒说明采用放射免疫法检测血清中的丙氨酸转氨酶和肌钙蛋白 I。

1.6 心、肺、脾组织的病理观察

常规石蜡切片 (厚度 6~7 μ m), 采用 HE 染色, 依次进行脱蜡 (二甲苯 I 10 min, 二甲苯 II 5 min)、水化 (100% 酒精 I 5 min, 100% 酒精 II 5 min, 95% 酒精 I 5 min, 95% 酒精 II 5 min, 85% 酒精 3 min, 75% 酒精 2 min, 蒸馏水冲洗 1 min)、染色 (苏木精染色 5 min, 自来水洗, 盐酸酒精分化 15 s, 自来水洗 15 min, 蒸馏水洗 2 min, 75% 酒精 2 min, 85% 酒精 2 min, 0.5% 伊红染色 1 min, 95% 酒精 I 5 min, 95% 酒精 II 5 min, 100% 酒精 I 5 min, 100% 酒精 II 5 min, 二甲苯 I 5 min, 二甲苯 II 5 min)。中性树胶封片后, 光镜下观察组织病理变化。

1.7 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各实验指标均重复检测至少 3 次,SPSS 13.0 统计软件对数据进行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对小鼠组织器官白细胞浸润的影响

与 SHP-2^{+/+} 野生型小鼠相比,SH-2^{D61G/+} 激活突变小鼠肺、脾组织中可见大量白细胞浸润,组织损伤并有淤血、出血表现;心肌组织主要表现为肥大,但光镜下没有发现明显白细胞浸润及损伤表现(图 1 见彩插 3)。

2.2 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对小鼠白细胞分泌炎症因子的影响

白细胞浸润组织后可以分泌细胞因子包括炎症因子、趋化因子等,本研究首先观察体外白细胞培养上清液中炎症因子的水平。与野生型对照组相比,SH-2^{D61G/+} 激活突变小鼠白细胞培养上清中 IL-2 及 TNF- α 浓度均显著增加($P < 0.01$),说明 SHP-2 激活突变使白细胞分泌炎症因子水平明显提高(表 1)。

表 1 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对白细胞分泌炎症因子的影响(n = 8)

Tab. 1 Effect of SHP-2^{D61G/+} mutations on leukocyte secretion of inflammatory factors in the mice (n = 8)

| 组别 Groups | IL-2(ng/mL) | TNF- α (ng/mL) |
|---|---------------------|------------------------|
| SHP-2 ^{D61G/+} 激活突变小鼠 SHP-2 ^{D61G/+} mutant mice | 11.33 \pm 2.40 ** | 7.98 \pm 1.93 ** |
| SHP-2 ^{+/+} 野生型小鼠 SHP-2 ^{+/+} WT mice | 4.49 \pm 0.76 | 2.28 \pm 0.92 |

注: ** $P < 0.01$,与野生型对照组比较

Note: ** $P < 0.01$ compared with the WT control group

2.3 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对小鼠血清炎症因子水平的影响

本研究进一步在体观察了血清中上述炎症因子的水平。与野生型小鼠相比,SH-2^{D61G/+} 激活突变小鼠血清中 IL-2 和 TNF- α 浓度均显著增高($P < 0.01$)(表 2)。

表 2 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对血清炎症因子水平的影响(n = 8)

Tab. 2 Effect of SHP-2^{D61G/+} mutations on serum levels of inflammatory factors in the mice (n = 8)

| 组别 Groups | IL-2(ng/mL) | TNF- α (ng/mL) |
|---|----------------------|------------------------|
| SHP-2 ^{D61G/+} 激活突变小鼠 SHP-2 ^{D61G/+} mutant mice | 87.42 \pm 15.57 ** | 72.15 \pm 23.70 ** |
| SHP-2 ^{+/+} 野生型小鼠 SHP-2 ^{+/+} WT mice | 35.15 \pm 5.96 | 26.12 \pm 4.44 |

** $P < 0.01$,与野生型对照组比较

** $P < 0.01$ compared with the WT control group

2.4 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对小鼠血清 ALT 及 cTnI 水平的影响

血清 ALT 及 cTnI 水平分别是反应肝脏和心脏组织损伤的指标,本实验采用放射免疫法检测野生型和 SHP-2^{D61G/+} 激活突变小鼠血清中 ALT 及 cTnI 水平。SHP-2 突变小鼠血清中丙氨酸转氨酶明显高于对照组(图 2)。尽管组织学检测在光镜下没有发现心肌明显损伤,但反应心肌损伤敏感指标之一的肌钙蛋白 I 水平在突变小鼠血清中明显升高(图 3),提示心肌亦有损伤。事实上 SHP-2 激活突变导致奴南氏综合征患者也出现心脏肥大和心肌损伤。

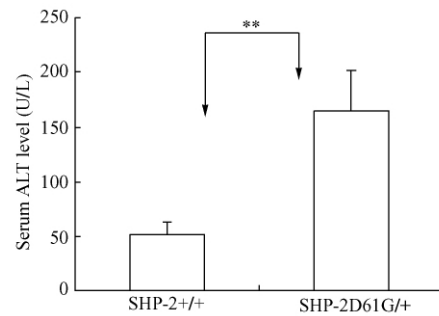


图 2 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对小鼠血清 ALT 水平的影响(n = 12)

Fig. 2 Effect of SHP-2^{D61G/+} mutations on serum ALT levels in the mice (n = 12)

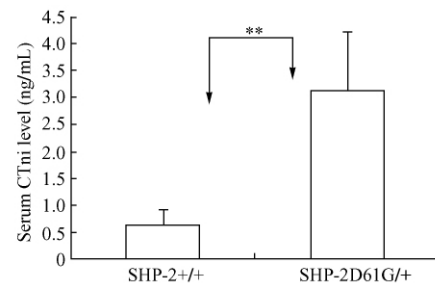


图 3 SHP-2^{D61G/+} 激活突变对小鼠血清 cTnI 水平的影响(n = 12)

Fig. 3 Effect of SHP-2^{D61G/+} mutations on serum cTnI level in the mice (n = 12)

3 讨论

SHP-2 是非受体依赖的酪氨酸磷酸酶,其 N 端 SH-2 结构域是一个含有 100 个氨基酸残基的基团,与激酶结构域结合,通过分子内的相互抑制,使磷酸酶维持在钝化状态而抑制了 SHP-2 磷酸酶的活

性。当 SHP-2 通过 SH-2 功能域结合到具有磷酸化的酪氨酸残基的蛋白质,使 PTP 酶激活,从而作为下游信号分子参与信号转导^[8,9]。Neel 等^[10]制备了 SHP-2^{D61G/+} 突变基因敲入小鼠模型,研究显示该小鼠经 DNA 损伤性药物处理后,其白血病发病明显高于正常鼠,说明 SHP-2^{D61G/+} 激活突变可促进白血病发病。本研究采用已经建立的 SHP-2^{D61G/+} 基因敲入小鼠为研究对象,证实 SHP-2^{D61G/+} 激活突变促进组织白细胞严重浸润和心、肝、脾、肺等多器官损伤。

细胞因子和炎症介质的失控性释放是导致多器官功能障碍综合征(MODS)的重要原因。前期研究从细胞和分子水平证实,SH-2^{D61G/+} 激活突变促进白细胞粘附及侵袭能力。本研究不仅在离体实验中证实 SHP-2^{D61G/+} 激活突变使白细胞分泌炎症因子明显增加,而且体内实验也证实小鼠血清中 IL-2 和 TNF- α 水平均显著升高;这些炎症因子的增加会进一步促进炎症细胞浸润,导致器官损伤。

小鼠血清 cTnI 和 ALT 水平在 SHP-2^{D61G/+} 突变小鼠中明显高于野生型小鼠。cTnI 是近年来发展起来的一种高特异、高灵敏反映心肌损伤的血清标志物,cTnI 以两种形式存在于心肌细胞中,即小部分游离于细胞质内,为可溶性;大部分以结构蛋白形式固定于肌原纤维上,为不溶性。当胞膜的完整性因缺血、缺氧受到破坏时,游离的 cTnI 可迅速透过细胞膜进入血流;而结合的 cTnI 则逐渐分解出来,成为游离的 cTnI。因此,外周血中 cTnI 浓度增加,必然是心肌细胞损伤的结果。当肝细胞发生炎症、坏死、中毒时,造成肝细胞破坏,ALT 便会释放到血液里,使血清 ALT 升高。通过检测血液中 ALT 可以反映肝细胞有无受损^[11]。

本实验对突变小鼠器官进行病理切片、HE 染色镜检,结果显示 SHP-2^{D61G/+} 突变小鼠脾、肺组织可见大量淋巴细胞及浆细胞浸润、血管内皮细胞肿胀、血管内淤血和组织损伤,心肌细胞出现肥大。当炎症细胞过度活化,细胞因子网络相互作用通过瀑布式级联效应,炎症反应泛滥、失控;而抗炎介质过度表达和释放可引起免疫功能的抑制,导致机体失衡,最终导致全身组织器官的损伤而发展为多器官功能障碍综合征和衰竭^[12]。研究进一步对此改

变做了初步的分子机制探讨,结果显示 SHP-2 异常增高的磷酸酶活性是发生多脏器衰竭的主要原因。上述结果为临床部分白血病患者易出现多器官功能衰竭的机制研究提供了一定的线索。这是否是 SHP-2 激活突变小鼠病情恶化的原因,具体机制还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Qu CK. The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions [J]. Cell Res, 2000, 10 (4): 279-288.
- [2] Qu CK, Nguyen S, Chen J, et al. Requirement of Shp-2 tyrosine phosphatase in lymphoid and hematopoietic cell development [J]. Blood, 2001, 97: 911-914.
- [3] Wang S, Yu WM, Zhang W, et al. Noonan syndrome/leukemia-associated gain-of-function mutations in SHP-2 phosphatase (PTPN11) enhance cell migration and angiogenesis [J]. J Biol Chem, 2009, 284(2): 913-920.
- [4] Grossmann KS. The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer [J]. Adv Cancer Res, 2010, 106: 53-89.
- [5] 张凤英,余科科,李菲菲,等. SHP-2 酪氨酸磷酸酶激活突变促进白细胞黏附和迁移的观察 [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(4): 487-490.
- [6] Wagner S. Ubiquitin binding mediates the NF- κ B inhibitory potential of ABIN proteins [J]. Oncogene, 2008, 27(26): 3739-3745.
- [7] Courtois, G. Tumor suppressor CYLD: negative regulation of NF- κ B signaling and more [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(7-8): 1123-1132.
- [8] Mohi MG, Williams IR, Dearolf CR, et al. Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations [J]. Cancer Cell, 2005, 7(2): 179-191.
- [9] Gordon C. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(2): 179-192.
- [10] Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-2 containing tyrosine phosphatases in cell signaling [J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(6): 284-293.
- [11] Remick DG, Call DR, Ebong SJ, et al. Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decreases sepsis mortality [J]. Crit Care Med, 2001, 29(3): 473-481.
- [12] 肖献忠,涂自智. 病理生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社. 2004: 124-141.

(修回日期)2011-08-20

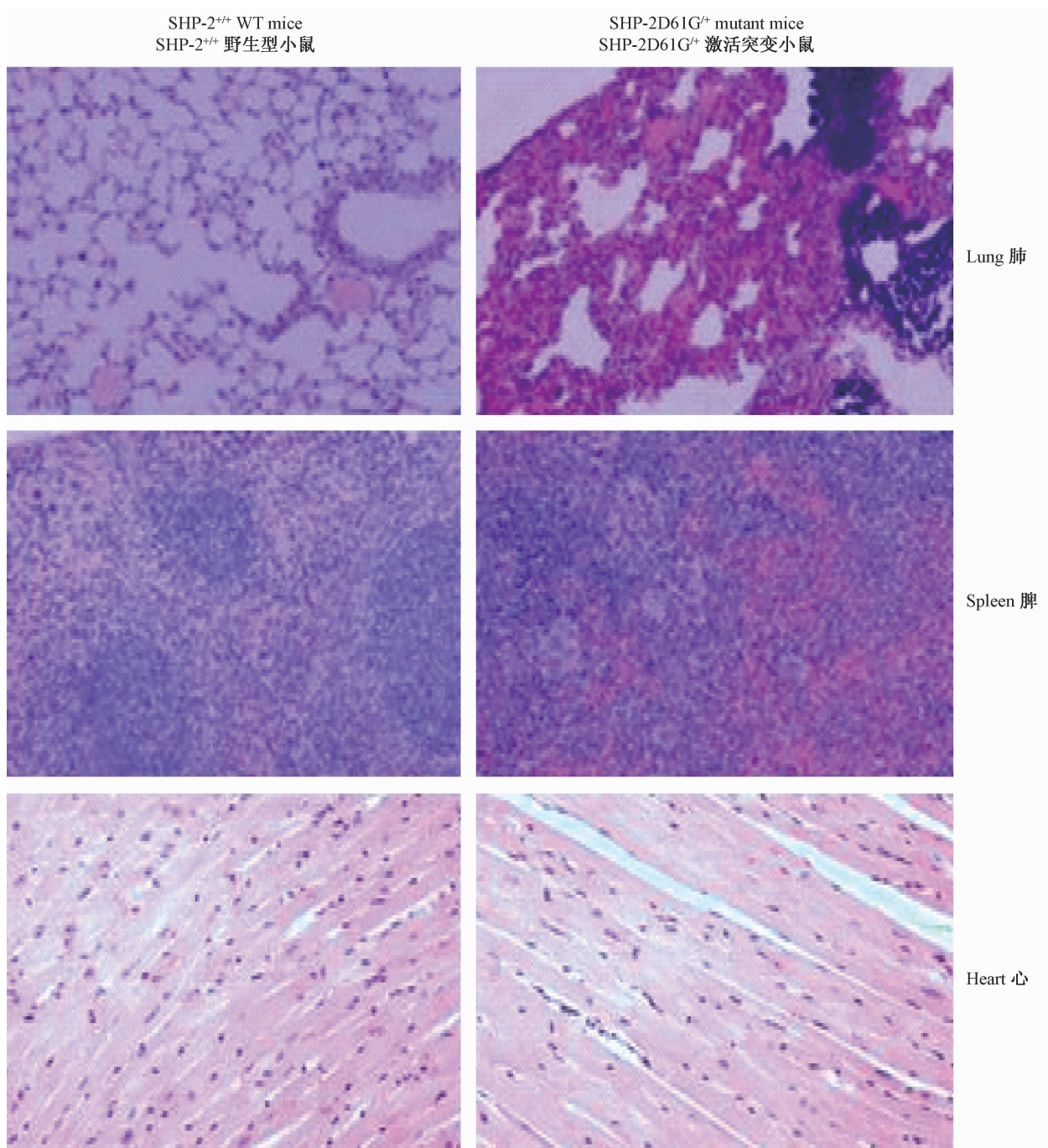


图 1 小鼠(16周)肺、脾、心组织病理变化(HE 染色)

Fig. 1 Pathological changes of the lung, spleen and heart tissues in the mice (HE staining)