

网络出版时间:2023-10-08 15:17:42 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230929.1231.019

激活突变引发 SHP2 蛋白相分离 对小鼠间充质干细胞增殖能力的影响及其机制

刘 嘉,戴媛娟,汪思应

摘要 目的 构建 SHP2^{E76K}突变的小鼠模型,利用其间充质干细胞(MSC)研究激活突变引发的 SHP2 蛋白相分离对其细胞增殖能力的影响及其机制。方法 将 Ptpn11^{E76K-neo/+} 的 C57BL/6J 小鼠与 Mx1-cre 工具鼠杂交,得到所需要的 Mx1-cre;Ptpn11^{+/+} 和 Mx1-cre;Ptpn11^{E76K/+} 小鼠,并对后者注射 pI-pC 以诱导 Cre 酶的表达,使 Ptpn11 在骨髓 MSC 中突变。从 Mx1-cre;Ptpn11^{+/+} 和 Mx1-cre;Ptpn11^{E76K/+} 小鼠体内分离培养 MSC,通过细胞免疫荧光染色确定所分离的细胞为 MSC。以 Ptpn11^{+/+} 的 MSC 为对照组,Ptpn11^{E76K/+} 的 MSC 为实验组,通过加药将两种细胞分成 6 组:Ptpn11^{+/+} 组;Ptpn11^{+/+} + SHP099 组;Ptpn11^{+/+} + ET070 组;Ptpn11^{E76K/+} 组;Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 组;Ptpn11^{E76K/+} + ET070 组。免疫荧光染色法观察 6 组细胞内 SHP2 蛋白相分离的差异,Western blot 法检测 6 组 MSC 中 SHP2 蛋白表达水平的差异。CCK-8 检测相分离被影响之后细胞增殖能力的改变。提取实验组与对照组细胞总蛋白通过 Western blot 法检测 ERK/p-ERK、AMPK/p-AMPK、mTOR /p-mTOR 等蛋白的表达水平。结果 小鼠基因型鉴定证实得到 Mx1-cre;Ptpn11^{E76K/+} 和 Mx1-cre;Ptpn11^{+/+} 小鼠并分离出原代 Ptpn11^{+/+} 和 Ptpn11^{E76K/+} 骨髓 MSC。与 Ptpn11^{+/+} 组相比,Ptpn11^{E76K/+} 组的 SHP2 蛋白产生更多的相分离冷凝物;与 Ptpn11^{E76K/+} 组相比,Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 组和 Ptpn11^{E76K/+} + ET070 组 SHP2 蛋白凝聚成的冷凝物在均明显减少;Western blot 检测各组 SHP2 蛋白表达水平差异无统计学意义;与 Ptpn11^{+/+} 组相比,Ptpn11^{+/+} + SHP099 组和 Ptpn11^{+/+} + ET070 组 MSC 的增殖能力下降,细胞内 p-ERK 和 p-mTOR 蛋白表达减少,p-AMPK 蛋白表达增加;与 Ptpn11^{E76K/+} 组相比,Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 组和 Ptpn11^{E76K/+} + ET070 组 MSC 的增殖能力下降,细胞内 p-ERK 和 p-mTOR 蛋白表达减少,p-AMPK 蛋白表达增加。结论 SHP2 的相分离通过刺激 AMPK-mTOR 信号通路的表达参与了 SHP2^{E76K} 激活突变的 MSC 的增殖能力改变。

关键词 间充质干细胞;相分离;SHP2 蛋白;激活突变;增殖

2023-06-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272258)

作者单位:安徽医科大学基础医学院病理生理学教研室,合肥 230032

作者简介:刘 嘉,女,硕士研究生;

汪思应,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

中图分类号 R 363.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)11-1921-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.020

SHP2 是由 PTPN11 基因编码的非受体酪氨酸磷酸酶,PTPN11 的激活突变与多种肿瘤的发生密切相关,除了非小细胞性肺癌^[1]、乳腺癌^[2]、血液系统肿瘤^[3] 等常见肿瘤外,在人类的横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma,RMS)中也发现了 PTPN11 的激活突变^[4]。肉瘤是一种复杂的间叶肿瘤,其发生的潜在分子机制仍未完全明了,其中大部分原因是对其细胞起源缺乏共识,但现在越来越多的证据表明它们来源间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[5]。与此同时,相分离作为一种与肿瘤发生相关的机制被越来越多地提及,它是指生物体内的大分子物质之间由于多价相互作用而聚集在一起,形成生物分子冷凝物的现象^[6]。有研究^[7]提示激活突变的 SHP2 蛋白会在细胞内形成大量的生物分子冷凝物,然而激活突变 SHP2 蛋白的相分离与人类横纹肌肉瘤的发生之间的联系还有待探究。该研究构建 SHP2^{E76K}突变的小鼠模型,探究激活突变引发的 SHP2 蛋白相分离对小鼠 MSC 增殖能力的影响及其机制,以期对肉瘤的诊断和治疗寻找新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究所用 Ptpn11^{E76K-neo/+} 小鼠(C57BL/6J 品系),由美国埃默里大学血液/肿瘤系的瞿成奎教授赠予,Mx1-cre(C57BL/6J 品系)小鼠购自上海南方模式生物研究中心,于安徽医科大学基础医学院动物实验中心 SPF 级环境中饲养。本研究对照组小鼠为 Mx1-cre;Ptpn11^{+/+}(C57BL/6J 品系),实验组小鼠为 Mx1-cre;Ptpn11^{E76K/+}(C57BL/6J 品系)。该研究的动物实验均经安徽医科大学动物伦理委员会批准(批准号:LLSC20210807)。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖粉末购自北京兰杰柯科技有限公司;鼠尾鉴定聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒购自成都福际生物技术有限公司;胎牛血清购自美国普诺赛公司;高糖 DMEM 细胞培养基、低糖 DMEM 细胞培养基均购自美国 Gibco 公司;细胞培养皿、细胞计数板均购自美国康宁公司;SHP2 抗体、p-ERK 抗体、ERK 抗体、p-AMPK 抗体、AMPK 抗体、p-mTOR 抗体、m-TOR 抗体均购自美国 CST 公司; β -actin 抗体购自美国 Proteintech 公司;SHP099 购自美国 Selleck 公司;ET070 由中国科学院上海有机化学研究所提供;预染蛋白分子量 Marker 购自美国赛默飞公司;细胞总蛋白裂解液、CKK-8 试剂盒、二甲亚砜、PBS 粉末均购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(德国 Eppendorf 公司,型号:Galaxy170S);正置显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:TMT2-21);倒置显微镜(日本尼康公司,型号:ECLIPSE TS100);细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司,型号:JIMBIO CL);普通 PCR 仪(德国 Biometra 公司,型号:2506261);多功能酶标仪(型号:Varioskan)、低温冷冻离心机(型号:Heraeus Megafuge 16)(美国赛默飞公司);生物安全柜(美国 Labconco 公司,型号:Type A2);化学发光凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:Chemidoc MP);电泳仪(德国 Eppendorf 公司,型号:Powerpac Basic Power Supply)

1.2 方法

1.2.1 小鼠尾部组织基因组 DNA 的提取 子鼠 1 周龄时,将小鼠尾部组织剪取长约 0.2 cm 的小段于 1.5 ml EP 管中,在 EP 管中加入 50 μ l Buffer MP, 2 μ l Foregene Protease Plus, 65 $^{\circ}$ C 金属浴 30 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 8 000 r/min 离心 5 min。

1.2.2 PCR 扩增反应及琼脂糖凝胶电泳进行的基因型鉴定 小鼠基因型鉴定引物序列: E76KNeo Forward, 5'-TGGAAGACAATAGCAGGCA-3'; E76KNeo Reverse, 5'-CCCACTCACCTTGTCATGTA-3'; Mx1-cre Forward, 5'-GACCAGGTTCTTCACTC-3'; Mx1-cre Reverse, 5'-TAGCGCCGTAAATCAAT-3'。PCR 反应体系: 2 $\times$ PCR 反应缓冲液 10 μ l, 前引物 0.5 μ l, 后引物 0.5 μ l, 超纯水 5 μ l, DNA 模板 4 μ l, 总体积 20 μ l。PCR 反应程序: E76K 扩增反应程序为: ① 94 $^{\circ}$ C, 3 min; ② 94 $^{\circ}$ C, 30 s; ③ 55 $^{\circ}$ C, 30 s; ④ 72 $^{\circ}$ C, 30 s; ⑤ 72 $^{\circ}$ C, 5 min; ⑥ 4 $^{\circ}$ C 保持。②~④为循环反应, 循环数为 32。Mx1-cre 扩增反应程序为:

① 94 $^{\circ}$ C, 3 min; ② 94 $^{\circ}$ C, 30 s; ③ 58 $^{\circ}$ C, 30 s; ④ 72 $^{\circ}$ C, 60 s; ⑤ 72 $^{\circ}$ C, 5 min; ⑥ 4 $^{\circ}$ C 保持。②~④为循环反应, 循环数为 28。琼脂糖凝胶电泳: 琼脂糖 1.5 g, 5 $\times$ TAE 缓冲液 2 ml, 双蒸水 98 ml, 溴化乙啶(EB) 5 μ l, DNA 样本 10 μ l, 电泳电压 90 V, 时间 40 min, 凝胶成像仪成像。

1.2.3 Mx1-cre; Ptpn11^{E76K/+} 小鼠的获得 取经 PCR 鉴定的基因型 Mx1-cre; Ptpn11^{E76K/+} 的小鼠, 待其长至 4 周龄时按照 20 μ g/只的剂量腹腔注射 pI-pC, 每隔 1 d 注射 1 次, 共 3 次, 注射完成后 30 d 左右即可用于实验。

1.2.4 原代骨髓 MSC 的分离 取基因型为 Mx1-cre; Ptpn11^{+/+} 和 Mx1-cre; Ptpn11^{E76K/+} 的雄性小鼠, 脱颈处死后放入 75% 的乙醇中消毒 10 min, 在生物安全柜内, 按照无菌操作原则分离其股骨和胫骨, 用 PBS 清洗, 剪去两侧干骺端, 用 1 ml 注射器吸取 PBS 反复冲洗骨髓腔直至骨髓腔发白为止, 收集骨髓冲洗液置于 15 ml 离心管中; 1 000 r/min 离心 5 min 后去上清液, 用含 10% FBS 的低糖 DMEM 完全培养基吹打沉淀, 制成单细胞悬液, 以 1 $\times$ 10⁵ 个/ml 为密度将细胞接种在大皿中, 放入细胞培养箱中培养; 2 d 后半换液, 5 d 后全换液, 之后每 2~3 d 换 1 次液, 当细胞长至 80% 进行传代, 传至第 3 代用于实验。

1.2.5 MSC 的鉴定 在 24 孔板中放入细胞爬片, 取正在培养的第 3 代 Ptpn11^{E76K/+} 和 Ptpn11^{+/+} MSC 消化后制成单细胞悬液并计数, 保持每孔液体体系为 0.5 ml, 每孔种入 2 $\times$ 10⁴ 个细胞, 每组 3 个复孔, 共两组, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 浓度条件下培养 48 h, 之后吸弃各孔培养基, 加入 4% 的多聚甲醛固定 0.5 h, 室温下用 10% 的山羊血清封闭 1 h, 用含有 1% BSA 和 0.25% Triton X-100 的 PBS 以 200:1 的比例稀释一抗(Sca-1), 每孔加入 200 μ l, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(超过 12 h), 用上述试剂以 1 000:1 稀释二抗, 每孔加入 200 μ l, 避光条件下在常温孵育 1.5 h, 用 DAPI 室温避光染细胞核 5 min, 滴加抗荧光淬灭剂封片, 风干并拍照计数。

1.2.6 细胞免疫荧光实验 在 24 孔板中放入细胞爬片, 取正在培养的第 3 代 Ptpn11^{E76K/+} 和 Ptpn11^{+/+} MSC 消化后制成单细胞悬液并计数, 每孔种入 2 $\times$ 10⁴ 个细胞, 每组 3 个复孔, 共 6 组; 4~6 h 后, 对照组和实验组分别换上完全培养基和加了相应浓度的分子变构抑制剂(SHP099 和 ET070 的浓度均为 20 μ mol/L)的培养基, 在细胞培养箱中培养

48 h,期间每 24 h 更换相应的培养基;48 h 后,吸弃各孔培养基,后续操作参照 1.2.5 项进行。

1.2.7 Western blot 实验 消化离心的细胞沉淀用 RIPA 重悬,置于冰上 30 min,每 4~5 min 振荡 3~5 s,在 4℃ 条件下以 12 000 r/min 离心 20 min,吸出上清液转移至新 1.5 ml EP 管;用 BCA 方法测蛋白浓度并绘制标准曲线;按照 5× 上样缓冲液体积:蛋白体积为 1:4,加入上样缓冲液,99℃ 水浴加热蛋白 10 min;制备 SDS-PAGE 凝胶,根据 BCA 结果上样后进行电泳和 PVDF 膜转膜,用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h 以上,分别将膜置于稀释好的一抗中,4℃ 条件下孵育过夜,TBST 洗膜,室温孵育二抗 1 h,洗膜后显影。

1.2.8 CCK-8 实验 取状态良好的细胞进行离心消化并计数,将细胞悬液调制浓度为 1×10^4 /ml,96 孔板每孔加入 200 μ l 细胞悬液,每组 5 个复孔,每板 6 组,需要 4 个 96 孔板(0、24、48、72 h);铺板后 4~6 h 后实验组和对照组分别换成加变构抑制剂的完全培养基和普通完全培养基,培养至相应时间点后取出检测(0 h 的无需继续培养),期间每 24 h 更换每个孔相应的培养基;当达到相应时间时,取出孔板,在各孔中加入 20 μ l CCK-8 溶液,培养箱中继续孵育 2~4 h;孵育结束后,用酶标仪检测其在 480 nm 处吸光度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 *t* 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果 将工具鼠 Mx1-cre 与 Ptpn11^{E76K-neo/+} 的 C57BL/6 小鼠杂交,得到的小鼠通过基因型鉴定确定得到 Mx1-cre;Ptpn11^{+/+} (2、10、15、18、19、21、24、25、26 号)和 Mx1-cre;Ptpn11^{E76K/+} (3、4、7、9、10 号)小鼠。见图 1。

2.2 MSC 细胞形态及鉴定 分离 Mx1-cre;Ptpn11^{+/+} 和 Mx1-cre;Ptpn11^{E76K/+} 两种基因型小鼠的 MSC 并进行体外传代培养,在培养过程中观察到 MSC 呈集落式贴壁生长,细胞呈梭形,放射状排列,并伸出长短不一粗细不均的突起并且伴随传代数增加,细胞形态趋于统一。见图 2A。细胞免疫荧光检测显示,第 3 代细胞的表面抗原蛋白均表达干细胞

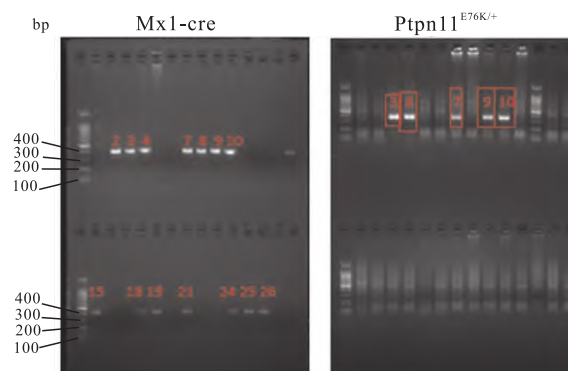


图 1 小鼠基因型鉴定结果

表面抗原 Sca-1 (图 2B、C),由此可确定分离所得细胞为 MSC。

2.3 细胞免疫荧光实验观察变构抑制剂 SHP099 和 ET070 对 Ptpn11^{E76K/+} 激活突变的 MSC 内的 SHP2 的相分离现象的影响 细胞免疫荧光染色结果显示,与 Ptpn11^{+/+} 组相比,Ptpn11^{E76K/+} 组 MSC 在显微镜下可观察到更多的 SHP2 蛋白由相分离而产生的生物分子冷凝物,且两组 MSC 细胞内形成的冷凝物的数量差异有统计学意义(图 3A, $t = 21.62$, $P < 0.0001$);与 Ptpn11^{E76K/+} 组相比较,Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 组和 Ptpn11^{E76K/+} + ET070 组的 MSC 在显微镜下可见的 SHP2 蛋白由相分离而产生的生物分子冷凝物明显减少,差异有统计学意义(图 3B, $t_{\text{SHP099}} = 20.54$, $t_{\text{ET070}} = 23.88$, $P < 0.0001$)。Western blot 实验表明,野生型和突变型 MSC 以及添加变构抑制剂 SHP099 和 ET070 作用之后,细胞内 SHP2 蛋白本身的表达水平几乎没有差异(图 3C)。

2.4 MSC 中 E76K 突变的 SHP2 蛋白的相分离被抑制后干细胞的增殖能力的变化 用 CCK-8 试剂盒检测 6 个组细胞药物作用后第 0、24、48、72 h 4 个时间段细胞生长密度及各组各个时间点吸光度值并进行统计分析,如图 4 所示,实验结果显示,与 SHP2^{E76K} 突变组相比,SHP2^{WT} 组 ($t = 10.36$, $P < 0.01$)、SHP2^{E76K} + SHP099 组 ($t = 42.31$, $P < 0.001$)、SHP2^{E76K} + ET070 组 ($t = 32.02$, $P < 0.0001$) 细胞的吸光度值均下降,差异有统计学意义。结果提示 MSC 增殖能力较差。

2.5 抑制 Ptpn11^{E76K/+} 突变的 MSC 中 SHP2 的相分离之后 MSC ERK 及 AMPK-mTOR 信号通路部分相关蛋白活化的改变 提取药物处理了 48 h 的野生型和突变型的 MSC 的总蛋白,通过 Western blot

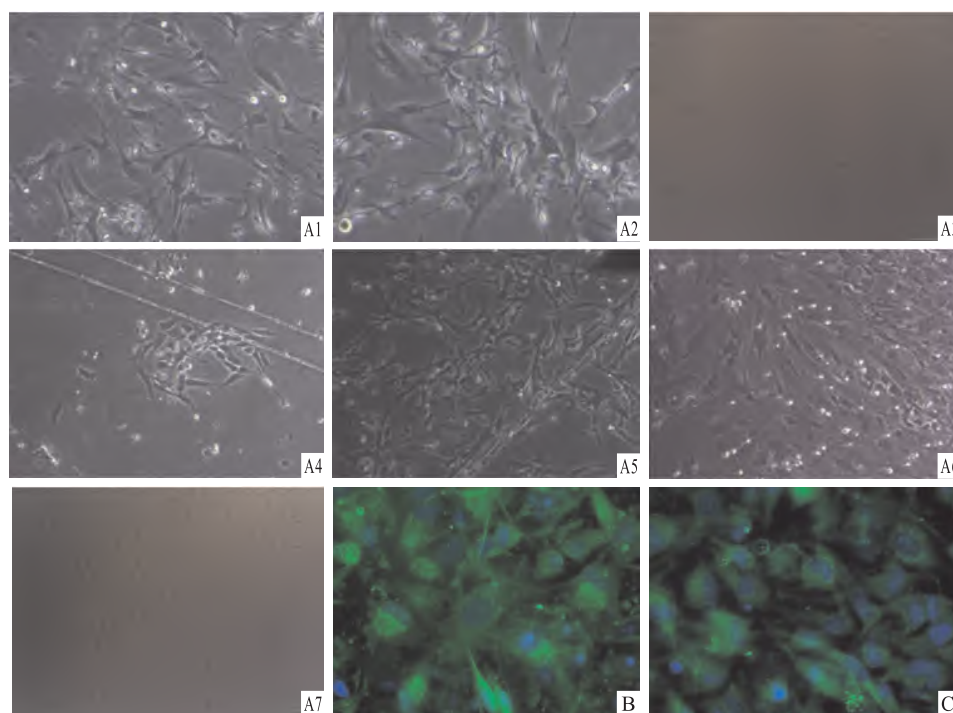


图2 成功分离并培养 $Ptpn11^{+/+}$ 和 $Ptpn11^{E76K/+}$ MSC

A1-3: 依次是第2、4、9代野生型 $Ptpn11^{+/+}$ 小鼠 MSC 细胞形态图 $\times 100$; A4-7: 依次是第0、2、5、15代突变型 $Ptpn11^{E76K/+}$ 小鼠 MSC 细胞形态图 $\times 100$; B、C: 免疫荧光染色鉴定 $Ptpn11^{+/+}$ 、 $Ptpn11^{E76K/+}$ MSC 表面抗原 $\times 400$

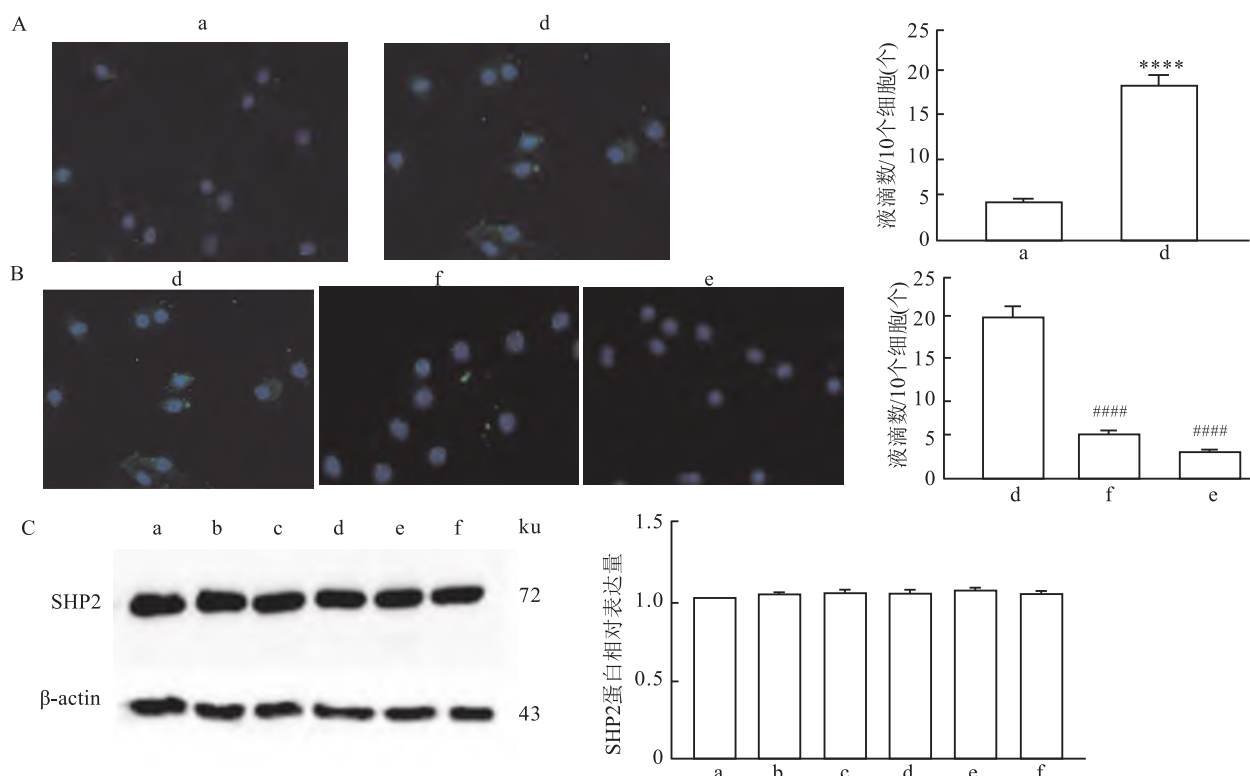


图3 免疫荧光检测实验组和对照组 SHP2 蛋白由于相分离产生的冷凝物液滴数量并且通过 Western blot 实验检测实验组和对照组 SHP2 蛋白的表达差异

A: 免疫荧光实验对野生型和突变型 MSC 内的 SHP2 蛋白染色结果及两种细胞内 SHP2 蛋白产生冷凝物液滴数量的统计 $\times 100$; B: 免疫荧光实验对突变型和加药组 MSC 内 SHP2 蛋白染色结果及相应蛋白冷凝物产生液滴数量的统计 $\times 100$; C: Western blot 检测 SHP2 蛋白表达结果图及差异统计; a: $Ptpn11^{+/+}$ 组; b: $Ptpn11^{+/+}$ + SHP099 组; c: $Ptpn11^{+/+}$ + ET070 组; d: $Ptpn11^{E76K/+}$ 组; e: $Ptpn11^{E76K/+}$ + SHP099 组; f: $Ptpn11^{E76K/+}$ + ET070 组; 与 $Ptpn11^{+/+}$ 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 $Ptpn11^{E76K/+}$ 组比较: #### $P < 0.0001$

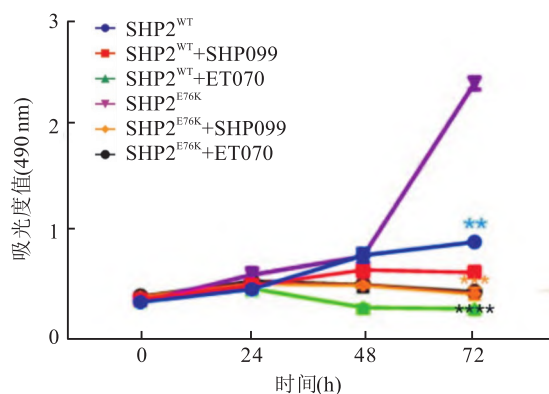


图4 MSC的SHP2发生E76K突变以及相分离被抑制之后细胞增殖能力的变化

与SHP2^{E76K}组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

实验检测与细胞增殖和代谢相关的蛋白的表达水平,结果显示:与Ptpn11^{+/+}组相比,Ptpn11^{+/+} + SHP099组($t = 22.2, P < 0.0001$)、Ptpn11^{+/+} + ET070组($t = 55.8, P < 0.0001$)p-ERK蛋白表达减少;与Ptpn11^{E76K/+}组相比,Ptpn11^{E76K/+} + SHP099组($t = 96.87, P < 0.0001$)、Ptpn11^{E76K/+} + ET070组($t = 41.14, P < 0.0001$)p-ERK蛋白表达减少(图5B、C)。此结果提示SHP2相分离被抑制后Ptpn11^{E76K/+}MSC ERK蛋白活化程度降低(图5A)。AMPK-mTOR信号通路相关蛋白表达检测显示:mTOR蛋白、AMPK蛋白的相对表达量在实验组和对照组之间差异无统计学意义(图5E、F)。而p-AMPK蛋白的相对表达统计结果显示:与Ptpn11^{+/+}组相比较,Ptpn11^{+/+} + SHP099组($t = 4.573, P < 0.05$)、Ptpn11^{+/+} + ET070组($t = 10.25, P < 0.001$)蛋白表达增加;与Ptpn11^{E76K/+}组相比较,Ptpn11^{E76K/+} + SHP099组($t = 174.3, P < 0.0001$)、Ptpn11^{E76K/+} + ET070组($t = 74.82, P < 0.0001$)蛋白表达增加(图5G)。p-mTOR蛋白的相对表达统计结果显示:与Ptpn11^{+/+}组相比,Ptpn11^{+/+} + SHP099组($t = 46.98, P < 0.0001$)、Ptpn11^{+/+} + ET070组($t = 38.27, P < 0.0001$)蛋白表达减少;与Ptpn11^{E76K/+}组相比,Ptpn11^{E76K/+} + SHP099组($t = 37.39, P < 0.0001$)、Ptpn11^{E76K/+} + ET070组($t = 113.3, P < 0.0001$)蛋白表达减少(图5H);p70s6k蛋白的相对表达统计结果显示:与Ptpn11^{+/+}组相比,Ptpn11^{+/+} + SHP099组($t = 47.00, P <$

0.0001)、Ptpn11^{+/+} + ET070组($t = 19.38, P < 0.0001$)蛋白表达减少;与Ptpn11^{E76K/+}组相比,Ptpn11^{E76K/+} + SHP099组($t = 43.29, P < 0.0001$)、Ptpn11^{E76K/+} + ET070组($t = 49.63, P < 0.0001$)蛋白表达减少(图5I)。此结果提示,SHP2相分离被抑制后,Ptpn11^{E76K/+}MSC AMPK蛋白被活化,并且mTOR的磷酸化被抑制,导致下游蛋白p70s6k表达减少(图5D)。

3 讨论

据相关报道^[4],在横纹肌肉瘤中发现了Ptpn11的激活突变,但其机制尚不清楚。Ptpn11是一种原癌基因,它编码的SHP2蛋白是非受体蛋白酪氨酸磷酸酶家族的一员。SHP2蛋白的构象在生理状态下自我抑制,几乎没有催化活性,当Ptpn11发生突变导致SHP2蛋白活性异常时,蛋白的蛋白酪氨酸磷酸酶结构域暴露,从而使酪氨酸磷酸酶活性的作用发挥出来^[8]。研究^[7,9-10]表明在SHP2异常突变中,E76K突变为第76位的谷氨酸突变为赖氨酸,其SHP2的磷酸酶催化活性相较于其他突变较高,是目前Ptpn11突变中最活跃的激活突变之一。而肉瘤的发生与MSC的恶性转化之间有密切联系,MSC的转化主要通过敲除抑癌基因、过表达癌基因和给药影响信号通路等方法实现^[5,11]。近年来,大量研究表明癌症的发生与原致癌蛋白相分离有关^[12-14],但是肉瘤的发生发展与蛋白相分离是否有关,目前还没有相关研究报道。

课题组既往的实验^[3]表明,SHP2^{E76K}突变细胞增殖能力远远高于野生型细胞,而细胞的恶性转化总是伴随恶性增殖。本研究利用了Ptpn11^{E76K/+}激活突变类型小鼠,分离与肉瘤发生密切相关的MSC作为实验工具,通过使用两种分子构象抑制剂(SHP099和ET070)抑制SHP2^{E76K}激活突变蛋白的相分离,检测相分离被抑制之后突变细胞增殖能力的变化及相应蛋白表达的改变。实验结果显示SHP2^{E76K}激活突变后蛋白在细胞内产生了更多相分离,并且由此刺激了ERK及AMPK-mTOR信号通路活化,促进了MSC增殖。由于细胞的恶性转化总是伴随着细胞增殖能力异常增强,可以以此为切入点,深入探究SHP2激活突变的蛋白产生的相分离与MSC恶性转化之间关系,并可以进一步研究肉瘤治疗新的靶点,为其临床治疗提供新的依据。

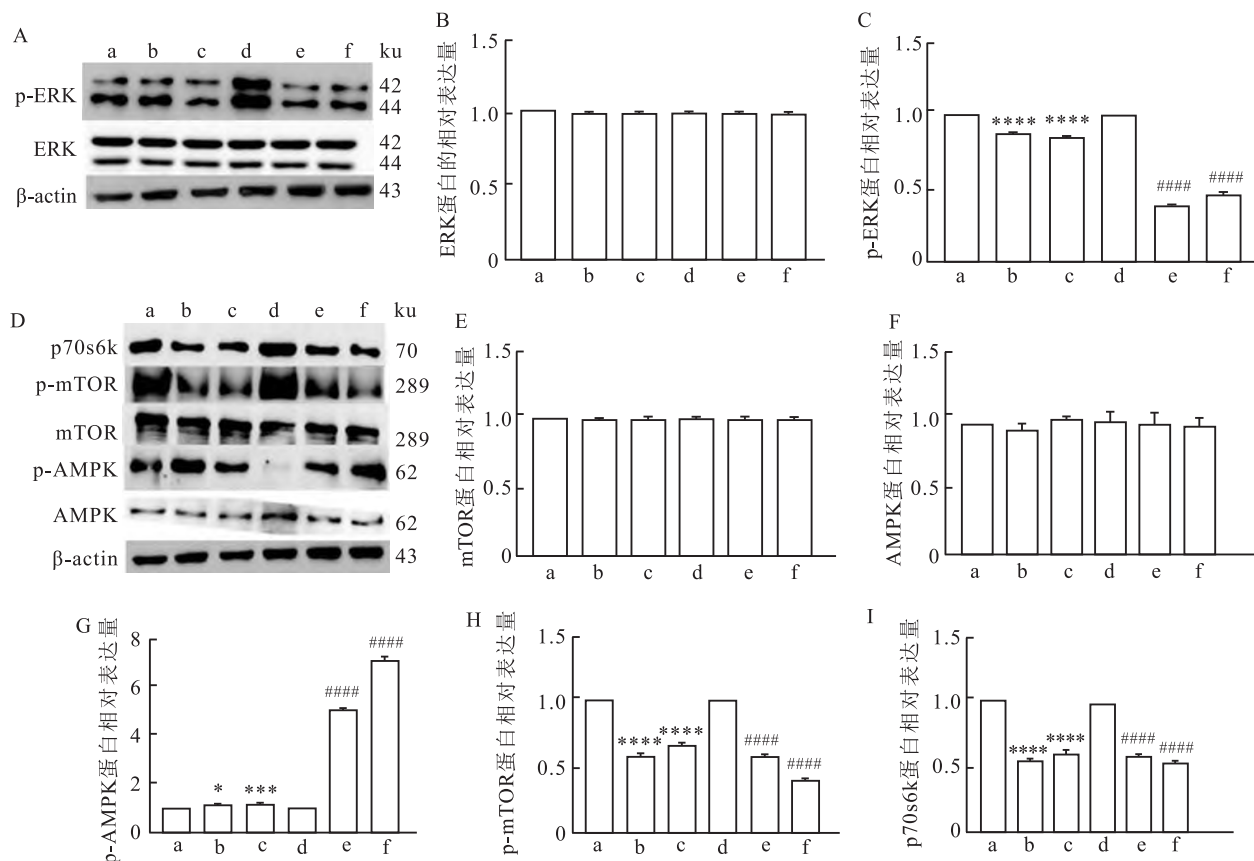


图5 Western blot 检测各组 MSC 细胞总蛋白中 ERK 通路、AMPK-mTOR 通路部分蛋白的表达情况及统计图

A: Western blot 检测 6 组 MSC 内参蛋白、ERK、p-ERK 蛋白表达显影结果;B、C:ERK、p-ERK 蛋白表达统计学分析图;D:Western blot 检测 6 组 MSC 内参蛋白、mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK、p70s6k 蛋白表达显影结果;E、F:mTOR 蛋白、AMPK 蛋白的相对表达量在实验组和对照组之间差异的统计学分析;G:p-AMPK 蛋白表达差异的统计学分析;H:p-mTOR 蛋白表达差异的统计学分析;I:p70s6k 蛋白表达差异的统计学分析;a:Ptpn11^{+/+} 组;b:Ptpn11^{+/+} + SHP099 组;c:Ptpn11^{+/+} + ET070 组;d:Ptpn11^{E76K/+} 组;e:Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 组;f:Ptpn11^{E76K/+} + ET070 组;与 Ptpn11^{+/+} 组比较;* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$;与 Ptpn11^{E76K/+} 组比较;#### $P < 0.0001$

参考文献

- [1] Mainardi S, Mulero-Sanchez A, Prahallad A, et al. SHP2 is required for growth of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer *in vivo* [J]. Nat Med, 2018, 24(7): 961–7.
- [2] Zhao H, Martin E, Matalkah F, et al. Conditional knockout of SHP2 in ErbB2 transgenic mice or inhibition in HER2-amplified breast cancer cell lines blocks oncogene expression and tumorigenesis [J]. Oncogene, 2019, 38(13): 2275–90.
- [3] 马牧天, 谭振亚, 周园琴, 等. 谷氨酰胺转运蛋白 ASCT2 介导激活突变 Ptpn11 (SHP2) 促进骨髓增殖性肿瘤的发生 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(12): 1815–21.
- [4] Shukla N, Ameur N, Yilmaz I, et al. Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(3): 748–57.
- [5] Xiao W, Mohseny A B, Hogendoorn P C, et al. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis [J]. Clin Sarcoma Res, 2013, 3(1): 10.
- [6] Alberti S, Gladfelter A, Mittag T, et al. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates [J]. Cell, 2019, 176(3): 419–34.
- [7] Zhu G, Xie J, Kong W, et al. Phase separation of disease-associated SHP2 mutants underlies MAPK hyperactivation [J]. Cell, 2020, 183(2): 490–502, e18.
- [8] Shen D, Chen W, Zhu J, et al. Therapeutic potential of targeting SHP2 in human developmental disorders and cancers [J]. Eur J Med Chem, 2020, 190: 112117.
- [9] Chen Y N, LaMarche M J, Chan H M, et al. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases [J]. Nature, 2016, 535(7610): 148–52.
- [10] Zhang J, Zhang F, Niu R, et al. Functions of Shp2 in cancer [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(9): 2075–83.
- [11] Tsumura H, Yoshida T, Saito H, et al. Cooperation of oncogenic K-ras and p53 deficiency in pleomorphic rhabdomyosarcoma development in adult mice [J]. Oncogene, 2006, 25(59): 7673–9.
- [12] Cloer E W, Siesser P F, Cousins E M, et al. p62-dependent phase

- separation of patient-derived KEAP1 mutations and NRF2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2018, 38(22):e00644-17.
- [13] Bouchard J J, Otero J H, Scott D C, et al. Cancer mutations of the tumor suppressor SPOP disrupt the formation of active, phase-separated compartments[J]. *Mol Cell*, 2018, 72(1):19-36, e8.
- [14] Tani H, Kurita S, Miyamoto R, et al. Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p. Glu76Gln or p. Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099[J]. *Vet Comp Oncol*, 2020, 18(2):161-8.

Effect and mechanism of SHP2 protein phase isolation induced by activated mutation on proliferation of mouse mesenchymal stem cells

Liu Jia, Dai Yuanjuan, Wang Siying

(Dept of Pathophysiology, School of Basic Medicine Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of SHP2 protein phase separation induced by activation mutation on cell proliferation and its mechanism through construct a mouse model of SHP2^{E76K} mutation. **Methods** Hybrid PT-PN11^{E76K-NEO/+} C57BL/6J mouse were hybridized with Mx1-cre tool mice to obtain the required Mx1-cre; Ptpn11^{+/+} and Mx1-cre; Ptpn11^{E76K/+}. The later genotype mice were injected with pI-pC to induce the expression of Cre enzyme and mutate Ptpn11E76K in bone marrow mesenchymal stem cells (MSC). The Mx1-cre; Ptpn11^{+/+} and Mx1-cre; Ptpn11^{E76K/+} genotype mice's cells were isolated and cultured *in vitro* and identified as MSCs by immunofluorescence staining. With Ptpn11^{+/+} MSC as the control group and Ptpn11^{E76K/+} MSC as the experimental group, the two kinds of cells were divided into 6 groups by adding drugs: Ptpn11^{+/+} group; Ptpn11^{+/+} + SHP099 group; Ptpn11^{+/+} + ET070 group; Ptpn11^{E76K/+} group; Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 group; Ptpn11^{E76K/+} + ET070 group. The differences of SHP2 protein phase separation in the six groups were observed by immunofluorescence staining, and the differences of SHP2 protein expression were detected by Western blot. CCK-8 was used to observe the changes of cell proliferation after phase separation was affected. Western blot was used to detect the expression levels of ERK/p-ERK, AMPK/p-AMPK, mTOR/p-mTOR and other molecules between the six groups. **Results** Genotypes Mx1-cre; Ptpn11^{E76K/+} and Mx1-cre; Ptpn11^{+/+} mice were obtained by genotyping, and the primary MSCs were isolated. Compared with Ptpn11^{+/+} group, SHP2 proteins in the Ptpn11^{E76K/+} group produced more phase separation condensates, and compared with Ptpn11^{E76K/+} group, the SHP2 proteins in the Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 and Ptpn11^{E76K/+} + ET070 groups produced less phase separation condensates. No difference in SHP2 protein expression levels between groups was detected by Western blot. Compared with Ptpn11^{+/+} group, the proliferation ability of MSC in Ptpn11^{+/+} + SHP099 and Ptpn11^{+/+} + ET070 groups decreased, the expression of p-ERK and p-mTOR decreased, and the expression of p-AMPK protein increased. Compared with Ptpn11^{E76K/+} group, the proliferation ability of MSC in Ptpn11^{E76K/+} + SHP099 and Ptpn11^{E76K/+} + ET070 groups decreased, the expression of p-ERK and p-mTOR decreased, and the expression of p-AMPK protein increased. **Conclusion** SHP2 phase isolation is involved in the alteration of proliferative capacity of SHP2^{E76K}-activated MSCs by stimulating the expression of AMPK-mTOR signaling pathway.

Key words mesenchymal stem cells; phase separation; SHP2 protein; activating mutations; proliferation