

· 临床研究 ·

急性淋巴细胞白血病患儿的 WAVE1 和 p22phox 的表达及 WAVE1 与氧化应激的关系

贺钰磊¹, 曹励之¹, 杨静², 杨明华¹, 许望琼¹, 谢岷¹, 石壮¹

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008; 2. 广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510180)

[摘要] **目的** 研究儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)患者外周血单个核细胞(PBMCs)中 WASP 家族富含脯氨酸同源蛋白 1(WAVE1)及 NADPH 氧化酶亚基 p22phox 的表达并探讨 WAVE1 表达与白血病病程及氧化应激的关系。**方法** 实时定量 PCR 法测定 41 例 ALL 儿童及 10 例正常对照儿童 PBMCs 中 WAVE1 和 p22phox 的表达水平。黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)和二硫代二硝基苯甲酸法(DTNB 法)分别测定外周血血浆总超氧化物歧化酶(SOD)活性和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。**结果** ①儿童 ALL 活动期组(初治+复发)PBMCs 中 WAVE1, p22phox 的表达水平与正常对照组和完全缓解组相比均显著增高($P < 0.01$); ALL 完全缓解组中, WAVE1, p22phox 表达高于正常对照组($P < 0.05$); ②正常对照组、活动期组和缓解组血浆 SOD 活力分别为 166.35 ± 27.93 , 22.62 ± 7.39 , 107.11 ± 28.57 U/mL; GSH-Px 活力分别为 490.94 ± 39.38 , 91.73 ± 28.88 , 267.56 ± 82.64 $\mu\text{mol/L}$ 。ALL 活动期组外周血血浆总 SOD, GSH-Px 活性较完全缓解和正常儿童明显降低($P < 0.01$); ③随着 WAVE1 和 p22phox 的高表达, 血浆中 SOD, GSH-Px 活性呈现下降趋势。WAVE1 的表达水平与 p22phox 表达水平呈正相关($r = 0.34$, $P < 0.05$), 与血浆 SOD, GSH-Px 活性呈负相关(r 分别为 -0.336 和 -0.408 , $P < 0.05$)。**结论** 与正常对照组相比, WAVE1 和 p22phox 在儿童 ALL PBMCs 中表达增高, 而且其变化与 ALL 病程相关。ALL 患儿氧化应激可能参与了 WAVE1 表达的调控。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(2): 88-92]

[关键词] WAVE1; p22phox; 氧化应激; 急性淋巴细胞白血病; 儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)02-0088-05

Expression of WAVE1 and p22phox in children with acute lymphocytic leukemia and the relationship of WAVE1 with oxidative stress

HE Yu-Lei, CAO Li-Zhi, YANG Jing, YANG Ming-Hua, XU Wang-Qiong, XIE Min, SHI Zhuang. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (Cao L-Z, Email: caolizhi318@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the expression of WAVE1 and p22phox in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in children with acute lymphocytic leukemia (ALL) and the relationship of WAVE1 with oxidative stress. **Methods** Real-time PCR was used for detecting WAVE1 and p22phox expression in PBMCs in 41 children with ALL and 10 normal controls. Plasma activity of superoxide dismutase (SOD) was measured by the xanthine oxidase method. Plasma activity of GSH-Px was measured by the DTNB reaction test. **Results** The expression of WAVE1 and p22phox was significantly higher in the active ALL groups (newly diagnosed and relapse ALL) than that in the normal control and the complete remission (CR) ALL groups ($P < 0.01$). The CR ALL group showed increased WAVE1 and p22phox expression than those in the normal control group ($P < 0.05$). Plasma activities of SOD (22.62 ± 7.39 U/mL) and GSH-Px (91.73 ± 28.88 $\mu\text{mol/L}$) in the active ALL group were significantly lower than those in the normal control (166.35 ± 27.93 U/mL and 490.94 ± 39.38 $\mu\text{mol/L}$, respectively) and the CR ALL groups (107.11 ± 28.57 U/mL and 267.56 ± 82.64 $\mu\text{mol/L}$, respectively) ($P < 0.01$). WAVE1 expression was positively correlated with p22phox expression ($r = 0.34$, $P < 0.05$) but negatively correlated with plasma activities of SOD and GSH-Px ($r = -0.336$ and -0.408 , respectively; $P < 0.05$). **Conclusions** WAVE1 and p22phox expression in PBMCs increased and was associated with the disease course in children with ALL. Oxidative stress may be involved in the regulation of WAVE1 expression in ALL children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(2): 88-92]

Key words: WAVE1; p22phox; Oxidative stress; Acute lymphocytic leukemia; Child

[收稿日期] 2008-06-30; [修回日期] 2008-07-24
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571982); 国家自然科学基金项目(30772353); 教育部博士点基金(20070533042)。
[作者简介] 贺钰磊, 男, 博士研究生。主攻方向: 儿童血液病。
[通讯作者] 曹励之, 女, 教授, 中南大学湘雅医院儿科, 邮编: 410008。

WASP 家族富含脯氨酸同源蛋白 1 (WASP-family verprolin homologous protein 1, WAVE1) 为近年来发现的参与细胞信号传递和微丝骨架运动的中介蛋白,主要功能是参与肌动蛋白聚合,从而参与细胞骨架重排,影响细胞基本功能^[1,2]。研究发现 WAVE1 可能参与了白血病的发病过程,并且参与了白血病细胞多药耐药的发生,其机制与调控 *mdr1* 及 *Bcl-2* 的表达相关^[3,4]。但是 WAVE1 在白血病中调控的机制目前尚不清楚,我们前期利用氧化应激诱导细胞凋亡制备经典的实验室凋亡研究模型,发现以时间依赖性方式诱导了 K562 和 Jurkat 细胞凋亡发生并伴有 WAVE1 表达的改变,提示氧化应激可能参与 WAVE1 的调控。本实验利用超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性反应氧化应激状态,同时检测 WAVE1 和 NADPH 氧化酶亚基 p22phox 的表达,探讨 WAVE1 的表达与氧化应激水平间的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

研究对象为 2007 年 9 月至 2008 年 1 月在中南大学湘雅医院儿科确诊为急性淋巴细胞性白血病(ALL)的患者 41 例。正常对照组 10 例,为在生长发育门诊选取的儿童。所有标本收取均在家长知情同意后进行。共分为 3 组:①活动期组(初治组 + 复发组):初治组包括初治 ALL 患者 16 例,男 9 例,女 7 例,中位年龄 6 岁(3 个月至 12 岁);复发组为经过化疗后曾达到完全缓解,但之后又复发的 ALL 患者 5 例,男 3 例,女 2 例,中位年龄 5 岁(6 个月至 9 岁);②缓解组(CR):完全缓解期 ALL 患者 20 例,男 14 例,女 6 例,中位年龄 5 岁(3 个月至 12 岁);③正常对照组:为正常健康儿童,共 10 例,男 5 例,女 5 例,中位年龄为 6 岁(7 个月~14 岁)。

1.2 主要试剂

SOD 试剂盒及 GSH-Px 试剂盒(南京建成生物研究所);Trizol 试剂(北京鼎国生物有限公司);人淋巴细胞分离液(中国灏洋生物公司);ReverTra Ace 逆转录试剂盒、Real-time PCR MasterMix (TOYOBO 东洋纺上海生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMCs)分离 取静脉血 5 mL,抗凝管保存,标本用低温低速离心机在 4℃下 3 500 r/min,离心 10 min,分离血浆于 -70℃冰箱中保存待测。分离血浆后的剩余部分用生理盐

水 1:1 稀释,然后用淋巴细胞分离液分离单个核细胞(按淋巴细胞分离液说明书操作)。

1.3.2 RNA 提取及 cDNA 链合成 $(5 \sim 10) \times 10^6$ 细胞加 Trizol 试剂 1 mL。采用 Trizol 试剂一步法提取总 RNA,紫外分光光度仪测定吸光度 A260/A280 比值在 1.8~2.1 之间,计算含量。按逆转录试剂盒操作步骤进行,逆转录合成 cDNA,储存于 -20℃冰箱备用。

1.3.3 引物设计及合成 根据实时定量 PCR 引物设计原则,并利用 Primer Express 5.0 设计软件设计引物。引物如下: GAPDH 上游 5'-GAGAGAC-CCTCACTGCTG-3',下游 5'-GATGGTACATGACAAG-GTGC-3',扩增目的片段长度 134 bp; WAVE1 上游 5'-TTTCTGCCTTGCCATTTAG-3',下游 5'-ACAGGT-GGGTATCGGTTTT-3',目的片段长度 141 bp; p22phox 上游 5'-CTTTGGTGCCTACTCCATTGTG-3',下游 5'-GGTGGAGCCCTTCTTCCTCT-3',目的片段长度 82 bp。引物由上海生工合成。

1.3.4 实时定量 PCR 检测基因表达 利用 SYBR Green I 染料在 LightCycler System 3.0 荧光 PCR 仪上检测基因的表达。反应在密闭的 Roche 毛细硅管中进行。反应体系:上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,cDNA 2 μ L, H₂O 6 μ L, SYBR Green Real-time PCR Master 10 μ L,总反应体系 20 μ L。反应条件:95℃ 预变性 30 s 后 95℃ 4 s, 55℃ 15 s, 72℃ 20 s,共 50 个循环后 40℃ 10 s。设定在每个循环的变性期结束后,程序自动记录上一个循环最后 10% 时间的平均荧光值,以表示上一个循环结束时的 PCR 产物的量。反应完成后,得到所有标本的扩增曲线。软件将自动进行数据分析,调整基线,计算出 Threshold cycle (Ct 值)。扩增完成后进行解离曲线分析。每一份标本均行一复管检测,取其均值计算其表达水平。扩增曲线:所有基因在循环数内达到平台期,说明扩增良好;融解曲线:单峰说明产物特异性好。基因表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对定量法分别分析患儿和正常儿童表达水平的差异^[5]。利用 Ct 值,计算患儿和正常儿童 WAVE1 和 p22phox 的相对量。相对定量利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。将正常患儿表达量定为 1。计算患儿和正常儿童表达差异时, $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{GAPDH})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{患儿}) - \Delta Ct(\text{正常对照})$ 。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 即基因相对表达量。

1.3.5 血浆 SOD, GSH-Px 测定 按照南京建成生物研究所试剂盒说明书,采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法),二硫代二硝基苯甲酸法(DTNB 法)检测 SOD, GSH-Px 酶活性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 14.0 软件包进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间的均值比较采用单因素方差分析 LSD 法。指标间相关性分析采用 Pearson 法。

2 结果

2.1 实时定量 PCR 扩增曲线及溶解曲线

大多数标本在循环数内达到平台期,说明扩增良好;融解曲线:为单峰说明产物扩增特异性好,没有非特异扩增。

2.2 WAVE1 和 p22phox 的表达

将正常对照组表达定为 1,则活动期组与缓解组 WAVE1mRNA 的相对表达量分别为 49.86 ± 1.12 和 3.39 ± 1.11 ;活动期组与缓解组 p22phox 的表达量分别为 15.67 ± 1.08 和 2.73 ± 1.10 。与正常对照组比较,活动期组和缓解组 WAVE1 和 p22phox mRNA 的表达均增高,其中活动期组明显高于正常对照组($P < 0.01$),缓解组 WAVE1 和 p22phox mRNA 的表达高于正常对照组($P < 0.05$);活动期组 WAVE1 和 p22phox mRNA 的表达高于缓解组($P < 0.05$),见图 1。

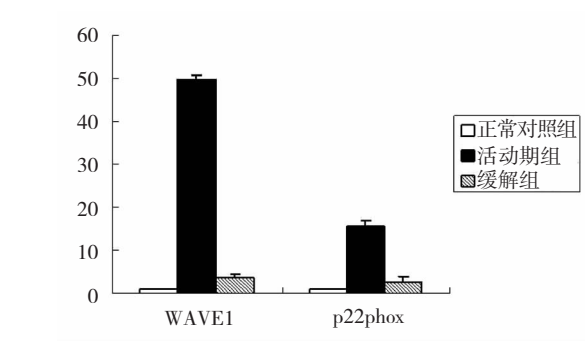


图1 各组 WAVE1 与 p22phox 表达水平

2.3 血浆总 SOD 和 GSH-Px 活力测定

正常对照组、活动期组和缓解组 SOD 活力分别为 166.35 ± 27.93 , 22.62 ± 7.39 , 107.11 ± 28.57 U/mL;正常对照组、活动期组和缓解组 GSH-Px 活力分别为 490.94 ± 39.38 , 91.73 ± 28.88 , 267.56 ± 82.64 $\mu\text{mol/L}$ (图 2)。ALL 活动期组外周血血浆总 SOD 和 GSH-Px 活性较完全缓解和正常儿童明显降低($P < 0.01$);完全缓解组总 SOD 和 GSH-Px 活性低于正常对照组水平($P < 0.01$),但较活动期组有所恢复。即与正常儿童相比白血病病程不同

阶段氧化应激水平不同,表现为初治、复发组氧化应激水平升高,缓解后降低。

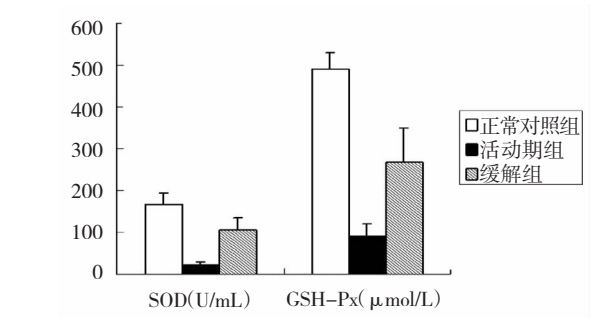


图2 各组 SOD 与 GSH-Px 活性

2.4 相关性分析

将各组指标带入统计软件行 Pearson 相关性分析,结果显示:WAVE1 的表达与 NADPH 氧化酶亚基 p22phox 呈正相关, $r = 0.34$, $P < 0.05$ (图 3);与 SOD、GSH-Px 水平呈负相关, r 分别为 -0.336 和 -0.408 , $P < 0.05$ (图 4,图 5)。

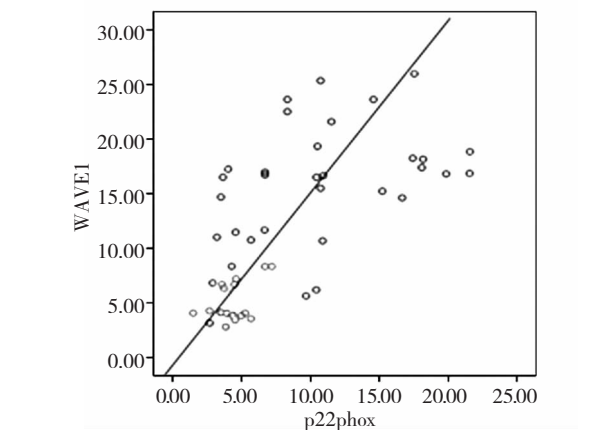


图3 WAVE1 与 p22phox 直线相关散点图

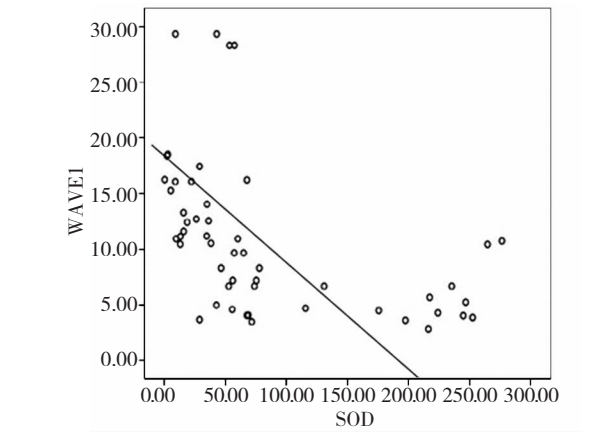


图4 WAVE1 与 SOD 直线相关散点图

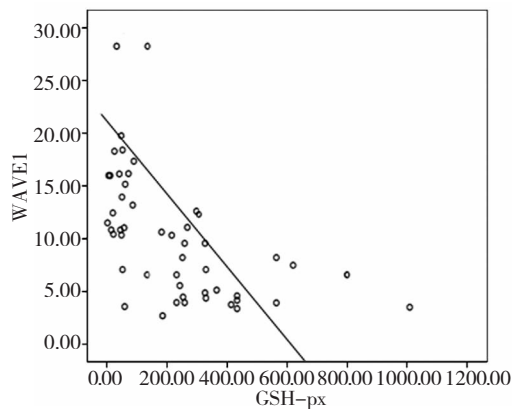


图5 WAVE1 与 GSH-Px 直线相关散点图

3 讨论

WAVE1 是一种新发现的肌动蛋白调节蛋白,属于 WASP 家族,广泛参与细胞信号传导、调节肌动蛋白聚合及细胞骨架重排,在细胞迁移、膜运输、细胞粘附、轴突延长和棘形成等生命活动中起到重要作用^[6]。WAVE1 主要负责将细胞信号从酪氨酸激酶受体和 Rac 传递至细胞骨架,从而发挥其调节肌动蛋白聚合及细胞骨架重排的作用并最终形成片状伪足,与肿瘤的侵袭和转移相关^[7]。

ALL 发病与多种因素有关,自由基的产生和清除失衡所致 ALL 氧化应激损伤已得到证实^[8,9]。NADPH 氧化酶是细胞膜上一类特殊的电子传递链复合物,与氧自由基(ROS)的产生密切相关,是参与 ROS 产生的主要酶系,由 5 个主要的亚单位组成,包括催化亚基 gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox 和 p40phox,其中 p22phox 是该氧化酶的重要组成部分,是 NADPH 氧化酶生成氧自由基的关键部位^[10]。p22phox 在 NADPH 氧化酶参与的一系列生理病理反应过程中起到重要作用,包括细胞活化与凋亡^[11,12]。目前为止, p22phox 在白血病细胞中的表达和诱导凋亡的作用报道尚少。McKallip 等^[13]报道大麻二酚(cannabidiol, CBD)的诱导可增加白血病细胞 NADPH 氧化酶亚基 p22phox 的表达,并揭示 NADPH 氧化酶和 ROS 的反应产物可能在诱导白血病细胞凋亡中起到调节作用。有研究表明, NADPH 氧化酶通过与骨架调节蛋白 WAVE1 和 TRAF4 相互作用,靶向性作用于片状伪足和膜皱褶,是使 ROS 集中性生成的机制之一^[14]。内皮细胞通过 H₂O₂ 过表达 Rac1 进而促进了细胞骨架的重塑和细胞迁移^[15,16]。在创伤诱导的细胞迁移中,内源性的 H₂O₂在细胞皱褶的聚集促进了 Rac 的活化,进而促

进了细胞迁移^[17]。Rac 可以促进 WAVE1 从细胞浆向细胞膜移位,而 WAVE1 作为 Rac 的下游分子,正是介导 Rac、Cdc42 等信号分子激活 Arp2/3 复合物促进肌动蛋白聚合,进而促进丝状伪足的形成的关键分子^[1,18]。以上研究均提示 WAVE1 与 NADPH 及氧自由基有关,氧自由基可能通过 Rac 激活 WAVE1 进而促进细胞骨架重塑和细胞迁移。在前期实验中我们用 H₂O₂ 刺激 K562 白血病细胞发现 WAVE1 的表达明显上调,提示氧化应激水平可能影响了白血病细胞 WAVE1 的表达调控。为了证实这一假设,我们从临床标本中观察了 WAVE1 的表达水平与氧化应激的关系。

本实验发现 p22phox 在 ALL 患儿 PBMCs 中的表达与 WAVE1 的表达趋势是一致的, ALL 活动期组患儿 p22phox 表达明显高于完全缓解组和正常对照组儿童;完全缓解组 p22phox 表达稍高于正常对照组,两者间差异有显著性。同时,抗氧化酶总 SOD 和 GSH-Px 的活性在 ALL 活动期组中明显低于完全缓解组和正常儿童水平;完全缓解组总 SOD 和 GSH-Px 的活性较正常儿童低。ALL 患儿 PBMCs 中 WAVE1 表达与 p22phox 表达呈正相关;与 SOD、GSH-Px 水平呈负相关。提示 WAVE1 的高表达与氧化应激损伤程度呈正比, ALL 患儿 WAVE1 的表达与体内氧化应激水平相关。氧化应激可能参与了 WAVE1 的表达调控。p22phox 可能通过自身高表达提高 NADPH 氧化酶活性,增强氧化应激对细胞凋亡的影响,进而影响 WAVE1 的表达。实验中 WAVE1 与 p22phox 及 SOD、GSH-Px 相关系数并不是特别高,原因考虑以下两方面:一方面说明 p22phox 对 WAVE1 表达的影响可能只是氧化应激参与 WAVE1 表达调控的一部分,另一方面除氧化应激外可能还存在其他机制参与 WAVE1 的表达调控。

综上所述,本研究发现 WAVE1 和 p22phox 在 ALL 患儿外周血单个核细胞中高表达,在正常对照组外周血单个核细胞中低表达或检测不到,且与 ALL 病程相关,因此, WAVE1 和 p22phox 均可能成为动态监测儿童 ALL 活动情况的新指标; ALL 患儿 WAVE1 表达与 p22phox 呈正相关,与 SOD、GSH-Px 活性呈负相关,表明 WAVE1 表达与 ALL 患儿氧化应激程度呈相关,氧化应激可能参与了 ALL 患儿 WAVE1 表达水平的调控。

[参 考 文 献]

[1] Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. WAVE, a novel WASP-family

protein involved in actin reorganization induced by Rac [J]. EMBO J, 1998, 17(23) :6932-6941.

[2] Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck [J]. Nature, 2002, 418(6899) :790-793.

[3] 康睿, 曹励之, 俞燕, 杨明华, 张朝霞, 郭碧赞, 等. 中国儿童急性淋巴细胞性白血染色体 6q16. 3-21 区后选肿瘤抑制基因的定位与鉴定 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(1) : 65-71.

[4] 康睿, 曹励之, 俞燕, 胡婷, 王卓, 许望琼, 等. WAVE1 基因在 K562/A02 白血病细胞多药耐药中的作用 [J]. 中华血液杂志, 2007, 28(6) :379-382.

[5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method [J]. Methods, 2001, 25(4) : 402-408.

[6] Innocenti M, Gerboth S, Rottner K, Lai FP, Hertzog M, Stradal TE, et al. Abil regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes [J]. Nat Cell Biol, 2005, 7(10) : 969-976.

[7] Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP [J]. Nature, 1998, 391(6662) :92-96.

[8] Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias [J]. Clin Chim Acta, 2000, 293(12) :53-62.

[9] Devi GS, Prasad MH, Reddy PP, Rao DN. Leukocyte glucose 6 phosphate dehydrogenase as prognostic indicator in ANLL and CML [J]. Indian J Exp Biol, 1997, 35(2) :155-158.

[10] Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(33) :34643-34654.

[11] Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(24) :10703-10717.

[12] Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared with other NADPH oxidases [J]. Cell Signal, 2006, 18(1) :69-82.

[13] McKallip RJ, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(3) :897-908.

[14] Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS [J]. Sci STKE, 2006, 349(22) : 22-28.

[15] van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP, et al. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2002, 115(9) :1837-1846.

[16] Moldovan L, Irani K, Moldovan NI, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. The actin cytoskeleton reorganization induced by Rac1 requires the production of superoxide [J]. Antioxid Redox Signal, 1999, 1(1) :29-43.

[17] Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, Schwartz MA, Slaugh S, Hahn KM. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells [J]. Science, 2000, 290(5490) :333-337.

[18] Takenawa T, Miki H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement [J]. J Cell Sci, 2001, 114(10) :1801-1809.

(本文编辑: 吉耕中)

· 消息 ·

《中国当代儿科杂志》进入北京大学图书馆中文核心期刊

在新的一年开始之际,《中国当代儿科杂志》成功地进入了北京大学图书馆中文核心期刊。核心期刊的入选有着严格的标准,他的评价系统包括了杂志的被索量、被摘量、被引量、他引量、影响因子、被摘率、获奖、被重要检索数据收录等指标。核心期刊是评价学术研究成果的工具,核心期刊揭示了学科文章质量和学术水准的分布规律,核心期刊比一般期刊拥有更多的读者,因而在核心期刊发表的论文能产生更大的学术影响力,同时对期刊的进一步发展及学术地位的提高有着极大的促进作用。我刊能被核心期刊收录是多年来奉行严谨的科学态度、严格的审稿发稿制度的结果,也是我刊一个极大的荣誉。值此,对本刊作出积极贡献的学术委员、编委、广大作者、读者表示衷心的感谢并致以崇高的敬意!

中国当代儿科杂志编辑部