

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.35.001

霍奇金淋巴瘤细胞 SHP1 表达与 CD99 表达的关系*

雷翔慧¹, 汤 瑶², 吴自勍², 赵 彤^{1△}

(1. 南方医科大学基础医学院病理学系, 广州 510515; 2. 南方医科大学中西医结合医院病理科, 广州 510515)

摘要:目的 探究霍奇金淋巴瘤(HL)细胞 SH2 结构域酪氨酸磷酸化酶(SHP1)表达与 CD99 表达的关系。方法 荧光定量 PCR(RT-PCR)、Western blot 检测 HL 淋巴瘤细胞株 L428 细胞、B 淋巴瘤细胞株 IM9 细胞、浆母细胞株 KM3 细胞及上调 CD99 的稳定细胞株 L428-CD99 细胞中 CD99 和 SHP1 mRNA、蛋白水平的表达; 荧光共聚焦观测 L428 细胞中 CD99 与 SHP1 的表达及其共定位; IM9 细胞瞬时干扰 CD99 在基因和蛋白水平检测 SHP1 的表达。结果 L428 和 KM3 细胞 CD99 和 SHP1 mRNA 呈现低表达, L428-CD99 细胞 SHP1 基因和蛋白水平较 L428 细胞表达增高, 其蛋白表达与基因转录水平表达趋势相一致; 随着 CD99 的上调, SHP1 基因和蛋白水平表达升高; CD99 为细胞膜表达, SHP1 为细胞质表达; 瞬时干扰 CD99 后, SHP1 在基因和蛋白水平表达均降低。结论 SHP1 在 HL 中低表达可能与其 CD99 缺失有关, 其机制仍有待于研究。

关键词: SHP1; CD99; 霍奇金淋巴瘤

中图分类号: R363

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)35-4705-03

The relationship between the expression of SHP1 and CD99 in Hodgkin lymphoma cell*

Lei Xianghui¹, Tang Yao², Wu Ziqing², Zhao Tong^{1△}

(1. Department of Pathology, Basic Medical College of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China;

2. Department of Pathology, Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southern Medical

University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between SHP1 and CD99 expression in Hodgkin lymphoma (HL). Methods RT-PCR and Western blot to detect the expression of CD99 and SHP1 mRNA and protein expression in IM9, KM3, L428, L428-CD99 cells; fluorescence confocal to observe the expression and co-localization of CD99 and SHP1; transiently interference CD99 in IM9 cells and then detect the expressing of SHP1 mRNA and protein levels. Results SHP1 mRNA was low expressed in L428, KM3 and high expressed in IM9; gene and protein expression were consistent trend; in L428-CD99 cell SHP1 mRNA expression and protein levels were higher than L428 cell; CD99 expressed in membrane and SHP1 expressed in cell plasma; transient interference CD99, SHP1 decreased in mRNA expression and protein levels. Conclusion In HL cells, SHP1 expression related to the missing expression of CD99, and its mechanism remains to be studied.

Key words: SHP1; CD99; Hodgkin lymphoma

SH2 结构域酪氨酸磷酸化酶(SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase, SHP-1), 主要表达于造血细胞的细胞质, 是白血病、淋巴瘤细胞的抑癌基因, 其异常表达与淋巴瘤的增殖、分化、凋亡有密切关系, 表达缺失会导致淋巴瘤的发生^[1-3]。霍奇金淋巴瘤(hodgkin lymphoma, HL)是淋巴造血系统的一类肿瘤, SHP1 表达在 HL 情况, 尚未见文献报道, 国外和本课题组之前研究发现 HL 的发生与 CD99 蛋白表达缺失密切相关, CD99 表达缺失是 HL 形成的一个重要分子事件^[4-5], 但 SHP1 表达与 CD99 表达的关系如何, 非常值得探讨, 为此本文在以往研究基础上, 检测 SHP1 在 HL 中的表达及其与 CD99 的作用关系, 探讨 SHP1 表达在 HL 中的作用及意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞与细菌 B 淋巴瘤细胞株 IM9 细胞、浆母细胞株 KM3 细胞、HL 细胞株 L428 细胞和 L428-CD99(上调 CD99 的 L428 细胞)细胞, 由南方医科大学病理学系保存。采用澳洲进口胎牛血清(无需额外灭活), RPMI-1640 培养基配制含 10%

胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 37 ℃ 恒温, 5% CO₂ 培养箱中孵育。

1.1.2 试剂与材料 RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自南美洲 Gibco 公司; 蛋白裂解液 RIPA、蛋白酶抑制剂 PMSF 和 BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒购自凯基公司; β-actin 抗体、二抗购自北京中衫金桥生物技术有限公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒购自碧云天公司, 试剂盒组成: 30% AcroBis, 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)、10% SDS、过硫酸铵、TEMED、1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、蛋白预染 Marker、PVDF 膜、脱脂奶粉购自广州斯佳公司; BeyoECL Plus 发光试剂盒购自凯基公司。人 SHP1 抗体购于美国 CST 公司, CD99 抗体购于 Eptomic 公司。

1.2 方 法

1.2.1 荧光定量 PCR(RT-PCR) Trizol, RT-PCR 提纯试剂盒、逆转录试剂盒(日本 Takara 公司), 7500 Software v2.0.1, 引物构建于 Invitrogen 公司, GAPDH 上游引物: 5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT-3', 下游引物: 5'-GAC AAG CTT

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071659)。 作者简介: 雷翔慧(1987-), 硕士, 主要从事淋巴造血系统肿瘤方面的研究工作。

△ 通讯作者, Tel: 13622769913; E-mail: zhaotongketizu@126.com。

CCC GTT CTC AG-3'; CD99 上游引物: 5'-GCC CAG CAA CAA GCA AAG CAC AT-3', 下游引物: 5'-CCC AAC CAC CCT AGT TCC TCC G-3' 92 °C 2 min 30 s, 72 °C 40 s, 55 °C 退 32 s 40 s; SHP1 上游引物: 5'-ATC TGA GGC TTA GTC CCT GAG C-3', 下游引物 5'-CTG AGG TCT CGG TGA AAC CAC-3', 92 °C 2 min 30 s, 72 °C 40 s, 55 °C 32 s 40 s。20 μL 体系。

1.2.2 Western blot 检测 Western blot 培养的细胞收集各样本蛋白(蛋白裂解液购自碧云天), SDS-PAGE 电泳: 配置 10% 浓度的分离胶, 5% 的积层胶; 取 50 μg 蛋白质与 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合上样量, 积层胶 80 V 30 min, 分离胶 100 V 120 min; 冰浴下转膜 100 mA 120 min。5% TBST 封闭 1.5~2.0 h; SHP1 兔抗人单抗(1:2000 稀释), CD99 兔抗人单抗(1:5000 稀释), 4 °C 孵育过夜, 二抗(1:5000 稀释)室温孵育 1 h, 荧光成像仪内曝光。

1.2.3 荧光共聚焦实验 6 孔板培养 L428 细胞 48 h, 再用无血清培养 24 h, 收取对数生长期的细胞, 细胞悬液密度为 1×10⁶ 个/mL, 1000 r/min, 离心 5 min, 细胞沉淀 0.01 mol/L, PBS 洗涤 2~3 次; 1000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清液; 95% 乙醇固定 15 min, Triton X-100 破膜 10 min。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 5 min, 3% H₂O₂ 8 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 5 min, 血清封闭 5 min, 甩去血清, 分别用鼠抗人 CD99、SHP1 抗体孵育, 4 °C 过夜; 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次滴加相应的二抗, 37 °C 避光孵育 30 min; PBS 冲洗; DAPI 复染, 观察拍照。

1.2.4 Si-RNA 片段瞬时干扰 6 孔板细胞培养, 细胞密度为 1×10⁶ 个/mL, 实验组加入 10 μL 干扰片段+240 μL OPTI-MEN, 静置 20 min, 240 μL OPTI-MEN+10 μL Lip2000, 混合后静置 20 min, 加入细胞中; 对照组加入 500 μL 培养基; 37 °C 孵育, 分别于 48、72 h 进行细胞相关检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析; 采用两个独立样本的非参数检验进行组间比较。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 L428、IM9、KM3 淋巴瘤细胞 SHP1 和 CD99 mRNA 表达 IM9 中 SHP1 mRNA 高表达, 而 KM3、L428 细胞中 SHP1 mRNA 表达较低; 且与 CD99 的表达趋势相一致, 差异有统计学意义(P<0.01)。见图 1。

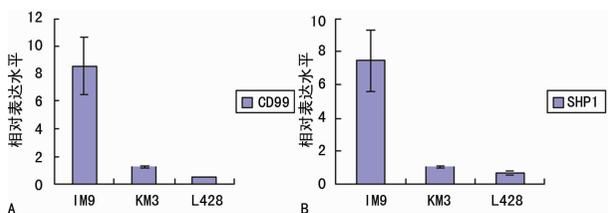
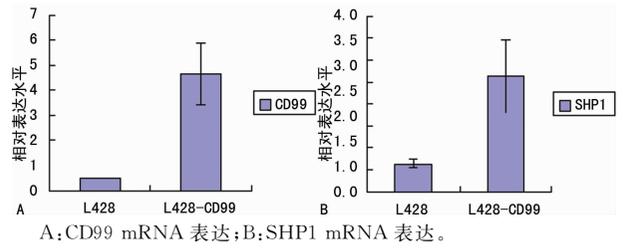


图 1 RT-PCR 检测 IM9、KM3、L428 细胞中 SHP1 和 CD99 mRNA 表达

2.2 L428 细胞和 L428-CD99 细胞 SHP1 mRNA 表达 L428-CD99 细胞较 L428 细胞 SHP1 mRNA 表达要高, 且与 CD99 的表达趋势相一致, 且差异有统计学意义(P<0.01)。见图 2。

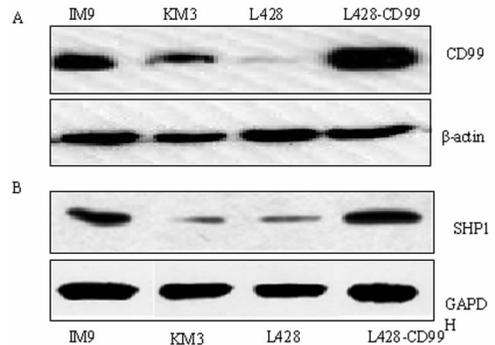
2.3 L428、L428-CD99、IM9、KM3 淋巴瘤细胞 SHP1 和 CD99 蛋白表达 Western blot 结果与 mRNA 基因表达水平相一致, IM9、KM3、L428-CD99 细胞中 SHP1 表达较 L428 细胞中

高, 且与 CD99 的表达趋势相一致。见图 3。



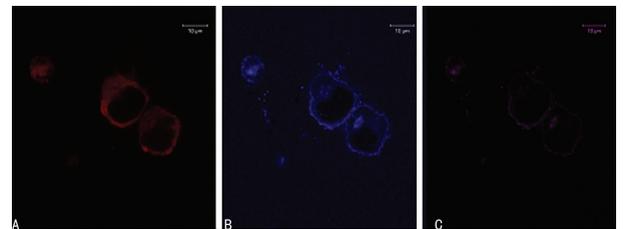
A: CD99 mRNA 表达; B: SHP1 mRNA 表达。

图 2 RT-PCR 检测 L428-CD99(L99) 与 L428 细胞株中 SHP1 与 CD99 mRNA 的表达



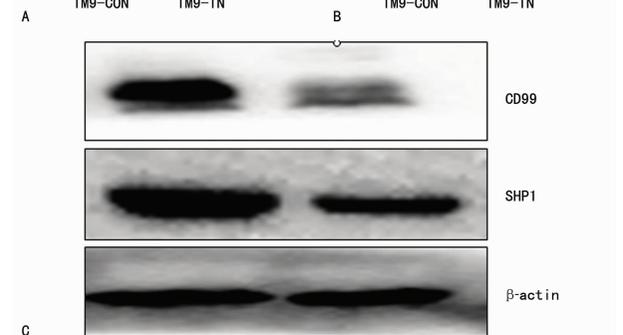
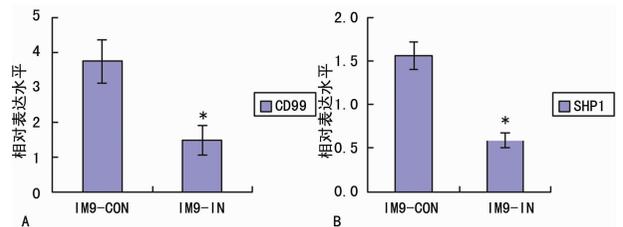
A: CD99 蛋白水平表达; B: SHP1 蛋白水平表达。

图 3 Western blot 检测 IM9、KM3、L428、L428-CD99 中 SHP1 与 CD99 的蛋白水平表达



A: SHP1; B: CD99; C: merge。

图 4 在 L428 细胞中荧光共聚焦检测 CD99 与 SHP1 的表达



A: CD99 mRNA 表达; B: SHP1 mRNA 表达; C: IM9 细胞瞬时干扰 CD99 后, Western blot 检测 SHP1 蛋白水平的表达。* : P<0.05, 与细胞瞬时干扰 CD99 前比较。

图 5 瞬时干扰 CD99 后 SHP1 在基因和蛋白水平的表达

2.4 L428 细胞 CD99 与 SHP1 的表达及其共定位 采用荧光共聚焦实验在 L428 细胞中检测 CD99 与 SHP1 的表达部位,同时对其进行共定位,结果显示 CD99 主要表达于细胞膜,SHP1 主要表达于细胞质,紫色为共定位部分。见图 4。

2.5 瞬时干扰 CD99 后 SHP1 在基因和蛋白水平的表达 在 IM9 细胞中 Si-RNA 瞬时干扰 CD99 后,用 RT-PCR 及 Western blot 检测 SHP1 在基因和蛋白水平的表达。结果发现下调 CD99 后,SHP1 mRNA 表达降低(图 5A、B),且差异有统计学意义($P < 0.01$);蛋白水平表达趋势与基因水平相一致(图 5C)。

3 讨 论

SHP1 主要表达于造血细胞的细胞质,是调节细胞内磷酸化水平的关键调控因子,在多数淋巴瘤和白血病细胞系(如 NK-YS2、IWA3、MT1、EDS、ATLIK 等)中低表达,其启动子高甲基化状态导致的基因沉默是淋巴瘤、白血病发生、发展的重要机制之一^[6-7]。相反,SHP1 蛋白在正常细胞中可以表现为正常表达或过度表达。SHP1 调节机能障碍可导致细胞的过度增长,从而导致肿瘤的发生^[8-9]。HL 是一种淋巴造血系统的恶性肿瘤,1832 年由英国的 Thomas Hodgkin 最早描述,该疾病的典型形态特点是在大量的炎性反应背景细胞中浸润少数的肿瘤性 H/RS(hodgkin/reed-stern-berg)细胞^[5-10]。人 CD99(Mic2)是一种相对分子质量为 32×10^3 的跨膜糖蛋白,是 HL 的潜在致瘤基因,参与造血细胞的分化等。研究报道 H/RS 细胞的形态特征及免疫表型的变化与 CD99 蛋白表达缺失有关,CD99 是 HL 形成的一个重要机制^[11]。本研究荧光共聚焦检测也发现 SHP1 为细胞质表达,CD99 为细胞膜表达,且二者有共定位部分。

Oka 等^[12]通过表达谱芯片及组织微阵列技术证实 SHP1 基因在恶性淋巴瘤中表达明显下降。本研究在转录和翻译水平检测 3 株 B 系淋巴细胞 IM9、KM3、L428 中 SHP1 的表达,结果显示 SHP1 在 HL 细胞株 L428 中表达最低;与 CD99 的基因和蛋白水平表达趋势有一致性。

JAK/STAT 信号转导途径参与细胞增殖、分化、凋亡生物学作用的相关调控。研究发现,该途径异常激活是 HL 形成的一个重要分子机制,但其异常激活的具体机制尚未完全明确^[13-14]。SHP1 基因为存在于细胞质中的一种酪氨酸磷酸酶,是 JAK/STAT 信号转导途径负性调控因子之一。SHP1 基因沉默可以导致 JAK/STAT 信号转导分子活性增强,从而促进肿瘤发生、发展。本研究在课题组前期构建的上调 CD99 稳定细胞株 L428-CD99 中同样在转录和翻译水平检测 SHP1 基因和蛋白水平的表达,发现 SHP1 随着 CD99 的上调而基因和蛋白水平表达升高。证实 SHP1 在 HL 中低表达可能与其 CD99 缺失有关,荧光共聚焦实验以及在 IM9 细胞株中瞬时干扰 CD99 时,均发现 CD99 与 SHP1 有相互关系。而 CD99 与 SHP1 的相互关系是否与 SHP1 基因表达下调从而导致 JAK/STAT 信号转导途径失调有关,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Zhang J, Somani AK, Siminovich KA. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signaling[J]. *Semin Immunol*, 2002, 12(4): 361-378.

[2] Samuel W, Douglas JH. Inhibitors of cytokine signal transduction[J]. *J Bio Chem*, 2004, 279(2): 821-833.

[3] Coggeshall KM, Nakamura K, Phee H. How do inhibitory phosphatases work[J]. *Mol Immunol*, 2002, 39(9): 521-531.

[4] Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, et al. Latent membrane protein-1 of Epstein-Ban virus mimics a constitutively active receptor molecule[J]. *EMBO*, 1997, 16: 6131-6140.

[5] Kim SH, Shin YK, Lee IS, et al. Viral latent membrane protein 1 (LMP-1) induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Stenberg phenotype [J]. *Blood*, 2000, 95(1): 294-300.

[6] Oka T, Ouchida M, Kovama M, et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP-1 gene by aberrant methylation in leukemia/lymphomas[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6390-6398.

[7] Lin Y. Effect of As₂O₃ on demethylation of SHP-1 gene in human lymphoma cell line T2[J]. *CJC*, 2009, 28(3): 249-254.

[8] Koyama M, Oka T, Ouchida M, et al. Activated proliferation of B-cell lymphomas/leukemia with the SHP-1 gene silencing by aberrant CpG methylation [J]. *Lab Invest*, 2003, 83(12): 1849-1858.

[9] Wu C, Guan Q, Wang Y, et al. SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(5): 1026-1037.

[10] Suh YH, Kiln MK, Shin YI, et al. Mutations of the immunoglobulin heavy chain variable region gene in CD99-deficient BJAB cells line[J]. *Mol Cells*, 2002, 13: 237-244.

[11] Kim SH, Choi EY, Shin YK, et al. Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Stern-berg phenotype through down regulation of CD99 (Mic2) [J]. *Blood*, 1998, 92: 4287-4295.

[12] Oka T, Yoshino T, Hayashi K, et al. Reduction of hematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemia combination analysis with cDNA expression array and tissue micro-array[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(4): 1495-1505.

[13] Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction; regulators and implication in hematological malignancies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(6): 713-721

[14] Dworzak MN, Frosc MG, Printz D, et al. CD99 expression in T-lineage ALL; Implications for flow cytometric detection of minimal residual disease[J]. *Leukemia*, 2004, 18: 703-709.