

过表达CD99后霍奇金淋巴瘤细胞株L428细胞蛋白表达变化的蛋白质组学分析及验证

林香伶 孙清灿 陆茵 韩西群 赵彤 周新华

南方医科大学病理学系,广东省分子肿瘤病理学重点实验室,广州 510515

通信作者:周新华,Email:balbc@smu.edu.cn

【摘要】 目的 探索稳定过表达CD99前后霍奇金淋巴瘤细胞株L428细胞中差异表达的蛋白,并分析验证差异蛋白的功能。方法 采用荧光差异凝胶双向电泳和质谱分析技术检测L428细胞稳定过表达CD99前后蛋白表达的差异,采用GOfact开放软件对差异蛋白进行聚类分析,筛选在细胞转化过程中起重要作用的蛋白,并分析验证其功能。结果 筛选鉴定得到38个差异蛋白,其中在稳定过表达CD99的霍奇金淋巴瘤细胞株L428(L428-CD99细胞)中与CD99表达呈正相关的蛋白21个,呈负相关的蛋白17个,所得的38个差异蛋白中有32个蛋白参与了细胞的生物过程,35个蛋白参与了细胞的组成和构建,28个参与了抗氧化、蛋白结合、催化活性、酶调节、信号转导、结构分子、翻译调节和离子转运等多个方面。结论 筛选得到38个差异蛋白,其中关于细胞骨架、细胞分化、信号通路、调节基因表达等蛋白的改变与H/RS细胞和B淋巴瘤细胞转化相关。

【关键词】 CD99基因; 霍奇金淋巴瘤; L428细胞; 质谱分析; H/RS细胞

基金项目:广东省自然科学基金(2018A0303130325)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.008

Proteomic analysis and verification of protein expression after upregulation of human CD99 in Hodgkin lymphoma cell line L428

Lin Xiangling, Sun Qingcan, Lu Yin, Han Xiqun, Zhao Tong, Zhou Xinhua

Department of Pathology, Southern Medical University, Guangdong Province Key Laboratory of Molecular Tumor Pathology, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: Zhou Xinhua, Email: balbc@smu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the proteins expression difference after upregulation of human CD99 in Hodgkin Lymphoma cell line, L428 cell, and verify the function of differential proteins. **Methods** The differential proteins were detected by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry analysis, cluster analysis was done by GOfact. **Results** There were 38 proteins screened out, of which 21 proteins were positively associated with CD99, while 17 proteins were negative. Among the 38 proteins, 32 proteins participated in biological process, and 35 proteins were involved in the composition and construction. And 28 proteins participated in multifaceted biological activities including antioxidation, protein binding, catalytic activity, regulation of enzyme, signal transduction, molecular structure, regulation of translation and ion transport. **Conclusions** The changes of the differential proteins, correlated with cytoskeleton, cell differentiation, signal pathway and regulating gene expression, are closely relevant to the translation between Hodgkin/Reed-Sternberg and B lymphocyte cell.

【Key words】 CD99; Hodgkin Lymphoma; L428 cell; Mass spectrometry analysis; Hodgkin/Reed-Sternberg cell

Fund program: Guangdong Province Natural Science Foundation of China(2018A0303130325)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.008

霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL)是一种B细胞来源的恶性肿瘤^[1],为青年人中常见的恶性肿瘤之一,占有恶性淋巴瘤的15%~20%^[2],其特征性肿瘤细胞为H/RS(Hodgkin/Reed-Sternberg)细胞,起源于淋巴器官生发中心(germinal center, GC)的前凋亡B细胞^[3]。人CD99是一个糖基化跨膜蛋白,其不仅参与调节细胞分化和肿瘤细胞的黏附及迁移,而且在不同类型的细胞中起着双重作用^[4]。研究发现,人H/RS细胞的发生与CD99基因表达缺失有关,CD99的下调与该细胞的形成有关^[5-7]。本研究组前期构建了稳定过表达CD99的HL细胞株L428-CD99细胞,并证实L428-CD99细胞复现B细胞表型,CD99可促进HL细胞向B细胞分化^[5,8]。为揭示CD99调控H/RS细胞与B淋巴瘤细胞转化的机制,深入探究H/RS细胞形态转化的分子机制,本研究在构建稳定过表达人CD99基因的L428亚系的基础上,利用荧光差异凝胶双向电泳和质谱分析技术分别比较处理前后细胞株的蛋白表达差异,分离与鉴定与人CD99相互作用的靶蛋白,通过生物信息学分析所得数据,筛选在细胞转化过程中起重要作用的蛋白,并分析验证其功能。

材料与方法

1. 细胞株及培养:人HL细胞株L428及小鼠B淋巴瘤细胞系A20(美国内布拉斯加州医学中心Chan教授赠送),本实验室冻存;可稳定过表达CD99的人HL细胞株L428-CD99细胞及其对应的转染空载体的L428-CTR细胞、干扰mCD99L2基因的LV-mCD99L2-A20细胞及其对应的转染空载体的LV-Gus-A20细胞均由本课题组前期构建,本实验室冻存。所用细胞株在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,于5%CO₂、37℃的培养箱内传代培养,取生长状态良好、处于对数生长期的细胞进行实验。

2. 主要试剂:RPMI 1640培养基购于美国Gibco公司;胎牛血清购于德国Capricorn Scientific公司;PrimeScript™ RT Reagent Kit (DRRP37S)、RNAiso Reagent (D9108A)、荧光定量PCR试剂盒、Primix Taq PCR试剂盒(D331A)均购于日本TaKaRa公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、发光试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司;β-actin鼠抗人单克隆抗体、抗鼠二抗和抗兔二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司;CD99兔抗人单克隆抗体购于美国

Abcam公司。Ettan™ IPGphor™ 3等电聚焦系统和Ettan DALTsix电泳系统及DeCyder 2D 6.5差异分析软件均为美国GE Healthcare公司产品;Ettan™ 2-D Clean-up Kit、DIGE荧光染料(Cy2™, Cy3™, Cy5™)、二甲基酰胺(DMF)、赖氨酸、24 cm pH-7 IPG胶条、考马斯亮蓝R-350均购于美国GE Healthcare公司;FLA-5100荧光、化学发光及放射性核素影像分析仪购自冷泉港生物科技有限公司。

3. 实时荧光定量PCR(RQ-PCR)检测CD99基因及其高度同源的鼠源性基因mCD99L2的表达水平:收集细胞,提取总RNA,用RNAiso Reagent试剂盒进行逆转录反应合成cDNA。以GAPDH为内对照,反应条件为95℃ 30 s, 1个周期;95℃ 30 s, 55℃ 34 s, 40个周期;95℃ 15 s, 60℃ 1 s, 95℃ 30 s, 1个周期,反应体系为20 μl。根据得到的Ct值计算CD99基因的相对表达水平。引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

表1 实时荧光定量PCR检测CD99基因及其高度同源的鼠源性基因mCD99L2的引物序列

基因名称	引物序列
GAPDH	上游引物:5'-GCTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3'
	下游引物:5'-GTTACACCCATCACAAACAT-3'
CD99	上游引物:5'-GCCCAGCAACAAGCAAAGCACAT-3'
	下游引物:5'-CCCAACCACCTAGTCTCCTCCG-3'
mCD99L2	上游引物:5'-TTGGAAGATGCCTTGGAT-3'
	下游引物:5'-CTTCTGCTGGTAGGAGATGTA-3'

4. Western blot法检测L428细胞株中CD99和A20细胞株中mCD99L2的表达情况并验证差异蛋白Septin-2的变化:收集细胞,提取蛋白质,采用BCA法测定待测蛋白质浓度,进行SDS-PAGE电泳分离,电转移法将凝胶中的蛋白质转至PVDF膜,于50 g/L脱脂奶粉(PBST溶解)中室温振荡封闭1 h;分别滴加CD99兔抗人单克隆抗体和β-actin鼠抗人单克隆抗体,4℃孵育过夜,室温复温30 min, PBST洗膜3次,每次8 min;于50 g/L脱脂奶粉(PBST溶解)中以1:5 000的比例加入山羊抗兔和山羊抗鼠二抗,室温振荡孵育1 h, PBST洗膜3次,每次8 min,采用化学发光法检测。

5. 建立稳定过表达CD99前后L428细胞的2-D DIGE蛋白表达图谱:配制样品裂解液、样品缓冲液、荧光染料储存液,制备蛋白样品,荧光标记蛋白,双向凝胶电泳,FLA 5100扫描仪进行图像采集

与分析,制备胶考马斯亮蓝染色与胶内酶切,点样后送入ABI公司 Voyager DE STRMALDI-TOF 质谱仪进行MALDI-TOF-MS分析,使用蛋白质数据库MSDB提供的检索程序进行检索。

6. 生物信息学分析:应用GOfact开放软件进行在线聚类分析,对筛选得到的差异蛋白质参与的生物过程、涉及的细胞内组件及发挥的分子功能进行注释。

7. 统计学处理:采用SPSS22.0软件进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较按照最小显著性差异进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

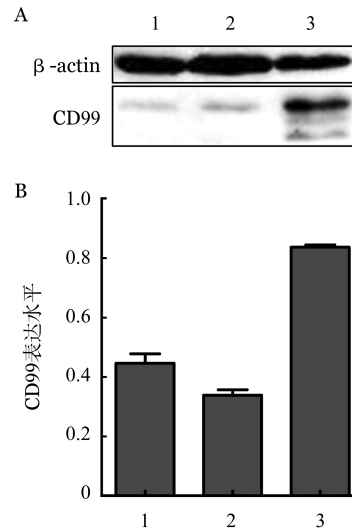
1. 鉴定L428-CD99细胞株中CD99的表达:RQ-PCR结果显示,L428-CTR(空载体组)、L428-CD99细胞(过表达组)的CD99 mRNA水平分别为1.000、 29.414 ± 6.927 ,L428-CD99细胞中CD99的相对表达水平约为空载体组L428-CTR的29.4倍,过表达前后CD99的mRNA水平差异有统计学意义($t = 7.105, P < 0.005$)。

Western blot结果显示,在L428-CD99细胞中CD99蛋白的表达水平显著高于L428和L428-CTR细胞,差异均有统计学意义(t 值分别为11.82和25.82, P 值均 < 0.001),表明CD99稳定过表达细胞株中CD99的表达稳定(图1)。

2. 2-D DIGE 蛋白表达图谱分析获取差异表达蛋白点:在相同条件下,对L428-CTR细胞和L428-CD99细胞的蛋白质进行DIGE染料标记,分别用473 nm (Cy2)、532 nm (Cy3)和635 nm (Cy5)三种不同波长激光扫描,共得到对应的蓝色、绿色和红色扫描图谱和一张图谱的重叠图。结合手工筛选和软件分析,与制备胶匹配后,挖取了60个清晰的差异蛋白质点,其中表达下调27个,表达上调33个。

3. 差异表达蛋白的PMF鉴定和数据库分析:从60个清晰的差异蛋白点中选取38个挖取,通过胶内胰酶消化抽提得到肽段后,用Applied Biosystems (ABI)4800 MALDI TOF/TOF Analyzer 质谱仪分析,将分析所得的肽指纹图谱用Data Explorer软件进行处理,再通过Mascot搜索引擎进行数据库搜索,利用蛋白质的代码和简称,通过网络检索(<http://www.uniprot.org/uniprot>),得到蛋白具体信息。分

析结果显示,38个差异蛋白中与CD99表达呈正相关的蛋白有21个(表2),负相关的蛋白有17个(表3)。



A: Western blot 检测结果; B: Western blot 检测结果灰度值分析
1: L428 细胞; 2: L428-CTR 细胞; 3: L428-CD99 细胞

图1 Western blot法检测过表达CD99前后L428细胞中CD99的表达情况

表2 L428-CTR细胞与L428-CD99细胞比较的21个与CD99表达呈正相关差异表达蛋白质具体信息

编号	收录号	基因名称	蛋白名称
A1	P52566	ARHGDIB	Rho GDP解离抑制因子2
A5	P09211	GSTP1	谷胱甘肽硫转移酶P
A14	P09211	GSTP1	谷胱甘肽硫转移酶P
A9	Q9H819	DNAJC18	DnaJ同源C亚家族成员18
A11	Q9NY93	DDX56	ATP依赖性RNA解旋酶DDX56
A17	P05091	ALDH2	乙醛脱氢酶, 线粒体
A18	P05091	ALDH2	乙醛脱氢酶, 线粒体
A20	P14317	HCLS1	造血系细胞特异蛋白
A23	P11142	HSPA8	热休克同源物71 kDa蛋白
A33	P04792	HSPB1	热休克蛋白β1
A25	P07951	TPM2	原肌球蛋白β链
A26	P08865	RPSA	40S核糖体蛋白
A27	O43396	TXNL1	硫氧还蛋白1
A28	P15374	UCHL3	末端水解酶同工酶L3
A29	Q7Z7A1	CEP110	中心体蛋白110
A30	P33316	DUT	脱氧尿苷三磷酸酶
A31	Q9P107	GMIP	GEM相互作用蛋白
A34	P35232	PHB	抑制素蛋白
A37	Q53H82	LACTB2	β内酰胺酶样蛋白2
A40	P04035	HMGCR	羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶
A44	Q9NR99	MXRA5	基质重塑关联蛋白5

4. CD99调控L428细胞转化的差异蛋白的生物信息学分析:为了解差异蛋白的功能,为后续生物信息学及转化机制研究奠定基础,我们采用GOfact软件进行聚类分析,对38种蛋白所参与构成的细胞组件进行了注释(表4),它们在细胞内定位于胞质、细胞核、细胞膜、细胞器、细胞骨架、蛋白复合物等部位。同时我们对38种蛋白所参与的生物过程进行了注释(表5),它们分别涉及细胞周期、细胞死亡、细胞增殖、细胞代谢、细胞通信、骨架蛋白重构、形态改变、应激反应、大分子代谢等过程。我们还

表3 L428-CTR细胞与L428-CD99细胞比较的17个与CD99表达呈负相关差异表达蛋白质具体信息

编号	收录号	基因名称	蛋白名称
B1	Q06323	PSME1	蛋白酶体活化亚基1
B2	Q9UL46	PSME2	蛋白酶体活化亚基2
B9	P09104	ENO2	神经细胞特异性烯醇酶
B12	P43246	MSH2	DNA错配修复蛋白Msh2
B15	Q15019	SEPT2	胞裂蛋白2
B16	O95816	BAG2	BAG家族分子伴侣调节因子2
B17	P78417	GSTO1	谷胱甘肽S-转移酶omega-1
B18	P42126	DCI	三羟酰辅酶A脱氢酶
B19	P67936	TPM4	原肌球蛋白α4
B20	P61981	YWHAG	14-3-3γ蛋白
B23	P30626	SRI	可溶性耐药相关钙结合蛋白基因
B24	Q15185	PTGES3	前列腺素E合成酶3
B27	P18669	PGAM1	磷酸甘油酸变位酶1
B29	Q8WUM4	PDCD6IP	细胞程序性死亡6相互作用蛋白
B31	Q9Y5Z4	HEBP2	Heme结合蛋白2
B32	P07741	APRT	腺嘌呤磷酸核糖转移酶
B33	P29692	EEF1D	真核生物翻译延长因子1δ

表4 蛋白质参与构成的细胞组件注释

编号	细胞组件	百分比(%)
GO:0005737	细胞质	57.10
GO:0005739	线粒体	17.10
GO:0005829	胞质溶胶	22.90
GO:0016023	胞质结合囊泡	8.60
GO:0005856	细胞骨架	11.40

表5 蛋白质参与的生物过程注释

编号	生物过程	百分比(%)
GO:0009790	胚胎发育	6.30
GO:0009628	应激反应	9.40
GO:0006259	DNA代谢过程	12.50

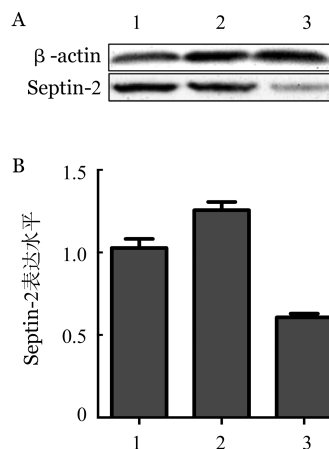
对38种蛋白质所介导的分子功能进行注释(表6),它们分别发挥离子结合、核酸结合、蛋白结合、催化活性、酶调节活性、结构分子激活、转运蛋白活性等生物学作用。

5. Western blot验证过表达CD99前后L428细胞中Septin-2蛋白的表达:结果显示Septin-2蛋白在L428-CD99细胞表达明显弱于L428和L428-CTR细胞(图2),差异均有统计学意义(*t*值分别为7.135和11.830, *P*值均<0.005),表明Septin-2蛋白在CD99调控H/RS细胞转化过程中存在差异表达,和CD99表达呈负相关关系,符合2-D DIGE蛋白表达图谱分析结果。

6. RQ-PCR鉴定LV-mCD99L2-A20细胞中mCD99L2的表达:mCD99L2为与人CD99高度同源的小鼠基因,并且其高表达于鼠B细胞淋巴瘤细胞A20中,因此选取A20细胞进行干扰部分的实验。结果显示,空载体组LV-Gus-A20细胞、干扰组LV-mCD99L2-A20细胞的mCD99L2 mRNA水平分别为1.000、0.483±0.128,干扰组mCD99L2的相对

表6 蛋白质介导的分子功能注释

编号	分子功能	百分比(%)
GO:0016791	磷酸酶活性	3.60
GO:0017111	核苷三磷酸酶活性	10.70
GO:0000166	核苷结合	17.90
GO:0003723	RNA结合	3.60
GO:0008135	转录因子活性,核酸结合	3.60
GO:0005102	受体结合	7.10
GO:0030234	酶调节活性	10.70

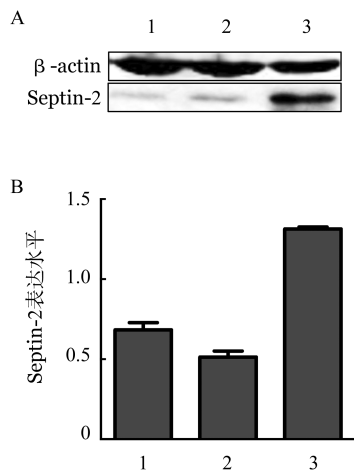


A: Western blot 检测结果; B: Western blot 检测结果灰度值分析 1: L428细胞; 2: L428-CTR细胞; 3: L428-CD99细胞

图2 Western blot检测过表达CD99前后L428细胞中Septin-2的表达情况

表达水平为空载组的0.483倍,干扰前后mCD99L2的mRNA水平差异有统计学意义($t=6.996, P<0.005$)。

7. Western blot 验证干扰mCD99L2前后A20细胞中Septin-2的表达:结果显示,Septin-2在LV-mCD99L2-A20细胞的表达水平明显高于A20和LV-Gus-A20细胞(图3)(t 值分别为13.55和20.47, P 值均 <0.001),表明Septin-2蛋白和mCD99L2的表达呈负相关,与CD99和Septin-2的相关关系一致。



A: Western blot 检测结果; B: Western blot 检测结果灰度值分析
1: A20细胞; 2: LV-Gus-A20细胞; 3: LV-mCD99L2-A20xb

图3 Western blot 检测干扰mCD99L2前后A20细胞中Septin-2的表达情况

讨 论

人CD99是一个细胞表面分子,其基因位于X和Y染色体短臂假染色体区。CD99不仅参与细胞黏附、细胞凋亡等过程,还参与肿瘤细胞的侵袭迁移,在肿瘤的发生发展过程中起重要的作用。CD99在不同类型肿瘤中存在异常表达,如HL、Ewing肉瘤、胃癌、乳腺癌、宫颈癌等。研究发现,LMP-1通过NF- κ B途径下调CD99的表达,从而显示出与H/RS细胞相似的表型^[7]。CD99在HL的发生中起重要作用,其表达缺失在H/RS细胞的形成中扮演关键角色^[9]。

2D-DIGE作为蛋白质组学研究的主要手段不断地发展进步,具有敏感性高、重复性好、高通量及高分辨率等优点,能同时分离和定量上万种蛋白,是近年常用来分离大量蛋白质并对蛋白质进行定量分析的一种重要手段。作为一种基于双向电泳的技术,2D-DIGE虽然不可避免地继承了传统双向

电泳的不足,不利于疏水蛋白质和低丰度蛋白质的分析鉴定^[10]。但该技术的一个关键优势是凝胶可以在电泳后成像而无需拆卸低荧光玻璃板,从而确保了凝胶在成像期间不会变形或损坏,并且还最小化污染的可能性^[11]。2D-DIGE用三种不同波长的激发光激发不同荧光素标记的样品后,可以显示不同的颜色,因此,与传统的2D凝胶相比,2D-DIGE极大地改善了蛋白质变化的定量分析^[12]。其主要用于上皮来源的肿瘤,国内用于淋巴瘤研究的相对较少^[13-14]。在实验过程中我们发现,淋巴瘤细胞体积较大,核质比大,且核所占比例也要大得多,其核酸的含量较上皮细胞高,因此在提取蛋白的时候核酸较黏稠,为了减少核酸黏稠对蛋白提取的干扰,增加通过凝胶电泳得到的蛋白点,我们利用超声法打断核酸链,让蛋白尽可能释放出来,丰富得到的蛋白点。

本研究采用双向凝胶电泳的方法对L428-CTR细胞和L428-CD99细胞的蛋白质进行分离,并采用肽质量指纹图谱蛋白质鉴定法进行筛选,共获得38个与CD99作用相关的高质量蛋白点,其中17个蛋白与CD99的表达呈负相关,21个蛋白与之呈正相关。通过GOfact方法进行分析,所得的38个与CD99作用相关的蛋白中,有28个参与了蛋白结合、抗氧化、酶调节、离子转运、信号转导、结构分子、催化活性以及翻译调节等蛋白功能的多个方面,有32个蛋白参与了细胞的生物过程,有35个蛋白参与了细胞的组成和构建。其中,与细胞骨架、细胞分化、信号通路、调节基因表达等有关蛋白的改变被认为可能是H/RS细胞和B淋巴瘤细胞转化的重要调节蛋白。其中的DNA错配修复蛋白Msh2(DNA mismatch repair protein Msh2, hMSH2)、Rho GDP解离抑制因子2(Rho GDP-dissociation inhibitor 2)、Septin-2、造血系细胞特异蛋白(Hematopoietic lineage cell-specific protein, HCLS1或HS1)等蛋白参与细胞的多项功能作用,与细胞骨架、细胞分化、信号通路、调节基因表达等相关,可能与CD99调控H/RS细胞向B细胞转化密切相关。

HCLS1或HS1是造血系细胞特异蛋白,基因名称为HCLS1,在L428-CD99细胞中高表达,是一种抗原受体的氨基酸激酶底物。HS1参与了细胞转化、信号转导、调节基因表达、转录调节激活、转录因子激活等过程^[15-16]。有研究表明,HS1是中性粒细胞外渗的重要调节因子^[17],可以促进细胞迁移所需的肌动蛋白聚合和细胞骨架重排^[18]。HS1是一种

重要的B淋巴细胞受体(BCR)介导的信号转导分子,可以调节B淋巴细胞发育过程^[19]。

hMSH2是DNA错配修复蛋白,在维护基因组稳定的细胞内通路中发挥着重要作用,基因名称为MSH2。其为目前研究较多的抑癌基因之一,其异常表达与遗传性非息肉性大肠癌关系密切^[21],和乳腺癌、肺癌、食管癌等肿瘤的发生发展也有一定关系^[21-22]。在血液系统方面,经典型HL中H/RS细胞的恶性表型与MSH2的表达有关^[23],有研究发现,MSH2的缺失是促进弥漫大B细胞淋巴瘤发展的潜在因素之一^[14],MSH2可以调节B细胞抗原PAX-5,在B细胞淋巴瘤发生中起到缓解C-myc的致癌作用^[25-26]。

Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (RhoGDI2, Ly-GDI, Rho-GDI beta)在L428细胞过表达CD99后高表达。RhoGDI2蛋白基因名称为ARHGDI2、GDIA2、GDID4或RAP1GN1。RhoGDI2是Rho GTP酶的关键调节因子,而Rho GTP酶在细胞骨架重组等方面起着重要作用^[27]。研究表明,RhoGDI2在细胞凋亡以及肿瘤的侵袭转移都起着重要作用^[28]。在血液系统方面,RhoGDI2调节Rho蛋白的激活周期,在淋巴细胞迁移和发育中发挥作用^[29],其还广泛表达于经典型HL中^[30]。

Septin-2在L428过表达CD99后低表达,其属于Septin基因家族中的一员,属于GTP结合的骨架蛋白,是构成微管的重要成分,与GTP激酶的激活状态的形式改变密切相关^[31]。有研究表明,Septin-2还与血管重塑相关,可以作为血管损伤的潜在治疗靶点^[32]。本课题组前期研究发现,干扰Septin-2可以促进H/RS细胞向B细胞方向分化^[33]。

通过荧光差异凝胶双向电泳技术,对过表达CD99前后L428细胞中得到的差异蛋白进行分析,并通过Western blot对筛选出来的蛋白进行了验证,我们得知该差异蛋白广泛涉及了细胞组件、细胞功能及生物学过程,而且当中有一部分蛋白还参与了信号转导通路、细胞分化、细胞骨架、调节基因表达等相关的一系列过程,而RhoGDI2、Septin-2等蛋白和GTP激酶有关,hMSH2、HS1等蛋白与B淋巴细胞的发育和分化、HL的发生发展相关,因此这些蛋白可能是参与CD99调控H/RS细胞与B淋巴细胞转化的重要蛋白,为分析研究CD99作用的靶点和其涉及的信号通路奠定了基础,为进一步研究细胞转化机制提供了理论依据和新的线索。

参考文献

- [1] Ansell SM. Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment [J]. *Mayo Clin Proc*, 2015, 90 (11):1574- 1583. DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.07.005.
- [2] 王飞, 范磊, 徐卫, 等. 第56届美国血液学会研究热点报道: 霍奇金淋巴瘤[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(3):262-264. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.022.
- [3] Asano N. The molecular pathology of classical Hodgkin lymphoma [J]. *Rinsho Ketsueki*, 2015, 56 (10):2024- 2031. DOI: 10.11406/rinketsu.56.2024.
- [4] Manara MC, Pasello M, Scotlandi K. CD99: a cell surface protein with an oncojanus role in tumors[J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(3). pii: E159. DOI: 10.3390/genes9030159.
- [5] Huang X, Zhou X, Wang Z, et al. CD99 triggers upregulation of miR-9-modulated PRDM1/BLIMP1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and induces redifferentiation [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131 (4):E382-E394. DOI: 10.1002/ijc.26503.
- [6] Liu F, Zhang Y, Tang H, et al. CXC chemokine ligand 16, inversely correlated with CD99 expression in Hodgkin Reed-Sternberg cells, is widely expressed in diverse types of lymphomas [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30 (2):783- 792. DOI: 10.3892/or.2013.2522.
- [7] Lee IS, Shin YK, Chung DH, et al. LMP1-induced downregulation of CD99 molecules in Hodgkin and Reed-Sternberg cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42 (4):587- 594. DOI:10.3109/10428190109099318.
- [8] 周新华, 黄学平, 黄作平, 等. CD99调控经典霍奇金淋巴瘤细胞株L428向B细胞方向分化[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33 (2):235-238. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2013.02.16.
- [9] Lee I, Kim MK, Choi EY, et al. CD99 expression is positively regulated by Sp1 and is negatively regulated by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor-kappaB [J]. *Blood*, 2001, 97(11):3596-3604.
- [10] 曾华书, 周海涛, 侯红斌, 等. 2D-DIGE蛋白质组技术的探讨及其在微生物研究中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22 (2):281-284.
- [11] Aquino A, Guest PC, Martins-de-Souza D. Simultaneous two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis of two distinct proteomes [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1546: 205-212. DOI: 10.1007/978-1-4939-6730-8_17.
- [12] Meleady P. Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1664:3-14. DOI: 10.1007/978-1-4939-7268-5_1.
- [13] Lim LC, Looi ML, Zakaria SZ, et al. Identification of differentially expressed proteins in the serum of colorectal cancer patients using 2D-DIGE proteomics analysis [J]. *Pathol Oncol Res*, 2016, 22(1):169-177. DOI: 10.1007/s12253-015-9991-y.
- [14] Xiao H, Zhang L, Zhou H, et al. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(2):M111.012112. DOI: 10.1074/mcp.

- M111.012112.
- [15] Butrym A, Majewski M, Dziatczek J, et al. High expression of hematopoietic cell specific Lyn substrate-1 (HS1) predicts poor survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients [J]. *Leuk Res*, 2012, 36 (7): 876- 880. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.01.017.
- [16] Huang Y, Biswas C, Klos Dehring DA, et al. The actin regulatory protein HS1 is required for antigen uptake and presentation by dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2011, 187 (11):5952- 5963. DOI: 10.4049/jimmunol.1100870.
- [17] Latasiewicz J, Artz A, Jing D, et al. HS1 deficiency impairs neutrophil recruitment in vivo and activation of the small GTPases Rac1 and Rap1 [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 101(5):1133- 1142. DOI: 10.1189/jlb.1A0416-195R.
- [18] Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. SDF1 α -induced interaction of the adapter proteins Nck and HS1 facilitates actin polymerization and migration in T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45 (2): 551-561. DOI: 10.1002/eji.201444473.
- [19] Muzio M, Scielzo C, Frenquelli M, et al. HS1 complexes with cytoskeleton adapters in normal and malignant chronic lymphocytic leukemia B cells [J]. *Leukemia*, 2007, 21 (9):2067-2070. DOI: 10.1038/sj.leu.2404744.
- [20] Chan TL, Yuen ST, Kong CK, et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer [J]. *Nat Genet*, 2006, 38 (10):1178- 1183. DOI: 10.1038/ng1866.
- [21] Li T, Suo Q, He D, et al. Esophageal cancer risk is associated with polymorphisms of DNA repair genes MSH2 and WRN in Chinese population [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7 (2):448- 452. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31823c487a.
- [22] Levallet G, Dubois F, Fouret P, et al. MSH2/BRCA1 expression as a DNA-repair signature predicting survival in early-stage lung cancer patients from the IFCT-0002 Phase 3 Trial [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 4313-4329. DOI: 10.18632/oncotarget.14025.
- [23] Re D, Benenson L, Wickenhauser C, et al. Proficient mismatch repair protein expression in Hodgkin and Reed Sternberg cells [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(2):205-210.
- [24] Gu X, Booth CJ, Liu Z, et al. AID-associated DNA repair pathways regulate malignant transformation in a murine model of BCL6-driven diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2016, 127(1):102-112. DOI: 10.1182/blood-2015-02-628164.
- [25] Best A, Matheson E, Minto L, et al. Mismatch repair and the downstream target genes, PAX5 and Ikaros, in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(8):1098-1102. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.02.017.
- [26] Nepal RM, Tong L, Kolaj B, et al. Msh2-dependent DNA repair mitigates a unique susceptibility of B cell progenitors to c-Myc-induced lymphomas [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (44):18698-18703. DOI: 10.1073/pnas.0905965106.
- [27] Fan L, Mellor H. The small Rho GTPase Rif and actin cytoskeletal remodelling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(1):268-272. DOI: 10.1042/BST20110625.
- [28] Cho HJ, Baek KE, Yoo J. RhoGDI2 as a therapeutic target in cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(1):67-75. DOI: 10.1517/14728220903449251.
- [29] Ishizaki H, Togawa A, Tanaka-Okamoto M, et al. Defective chemokine-directed lymphocyte migration and development in the absence of Rho guanosine diphosphate-dissociation inhibitors alpha and beta [J]. *J Immunol*, 2006, 177(12):8512- 8521.
- [30] Ma L, Xu G, Sotnikova A, et al. Loss of expression of LyGDI (ARHGDI2), a rho GDP-dissociation inhibitor, in Hodgkin lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2007, 139 (2):217- 223. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06782.x.
- [31] Bowen JR, Hwang D, Bai X, et al. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia [J]. *J Cell Biol*, 2011, 194 (2):187- 197. DOI: 10.1083/jcb.201102076.
- [32] Guo SJ, Zhang P, Wu LY, et al. Adenovirus-mediated overexpression of septin 2 attenuates α -smooth muscle actin expression and adventitial myofibroblast migration induced by angiotensin II [J]. *J Vasc Res*, 2016, 53 (5- 6):309- 316. DOI: 10.1159/000452413.
- [33] 孙清灿, 钟琳, 丘波, 等. Septin2在霍奇金淋巴瘤细胞株L428细胞中的表达及其在促进细胞再分化中的作用 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38 (2):134- 139. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.02.010.

(收稿日期:2018-08-15)

(本文编辑:王叶青)