

## CD72 几种新的剪切形式的发现及它们在 红斑狼疮模型鼠中的差异表达\*

朱洁滢<sup>1)</sup> 唐捷\*\*

(<sup>1)</sup>兰州大学生命科学院, 兰州 730000; <sup>2)</sup>中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** CD72 是一个重要的 B 细胞特异性受体, 它以多种选择性剪切形式存在. 在小鼠脾细胞中发现并鉴定了 8 种新的 CD72 选择性剪切形式, 这些剪切形式中包含有 2 种独特的插入片段, 一种选择性剪切保留了一个内含子(intron1), 而这个内含子被翻译成氨基酸序列后并没有改变前后外显子的读码框, 另一种使用了一个位于内含子之内的 3' 剪切位点, 从而产生移码, 提前终止了蛋白质的开放读码框, 称为 3' AS (3' alternative splicing site). 比较了 CD72 所有剪切形式在 BALB/C 小鼠和 NZB/W 小鼠中的差异表达, 发现: a. 含有 3' AS 的剪切形式的表达都很少; b. WT, +In1, +In1-Ex3 和 -Ex3 的表达在 BLAB/C 小鼠中比在 NZB/W 小鼠中高; c. 没有 ITIM2 的 -Ex2-Ex3 剪切形式在 NZB/W 小鼠中有特异性高表达. 这些结果提示, CD72 的多种选择性剪切形式在调控 B 细胞受体信号转导过程中可能发挥着不同的作用, 并与系统性红斑狼疮的发病密切相关.

**关键词** 选择性剪切, CD72, B 细胞受体, 红斑狼疮, NZB/W 小鼠

**学科分类号** Q3, Q7, R3

作为一个 BCR 信号系统的共受体, CD72 是一个 C 型凝集素家族的 II 型穿膜蛋白, 以同型二聚体的形式表达在除浆细胞以外的所有 B 细胞类型中<sup>[1]</sup>. 在 CD72 的细胞质端靠近 N 端的一端有一个 ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) 结构域(ITIM1)和一个 ITIM 类似序列(ITIM2)<sup>[2]</sup>.

在 BCR 信号系统中 CD72 是一个两性分子. 当 BCR 遇到抗原, BCR 信号促使 CD72 的构象发生改变, 磷酸化, 并募集 SHP-1. CD72 的 ITIM1 和 ITIM2 可以与 SHP-1 的 C-SH2 和 N-SH2 结合, 激活 PTP 酶. 这样活化的 SHP-1 就定位在质膜上并负调控 BCR 信号. 另一方面, CD72 的 ITIM2 可以与重要的接头蛋白 Grb2 结合以激活 Ras 通路<sup>[3]</sup>. CD72 还可通过去磷酸化从而与 SHP-1 分离来传递正信号. 旗语家族(semaphoring family)的成员 CD100 已证实是 CD72 的天然配体<sup>[4,5]</sup>, 它与 CD72 结合可使其去磷酸化并与 SHP-1 分离<sup>[6]</sup>. 因此 CD72 在 BCR 信号系统中是一个在非激活条件下起抑制作用, 而在激活条件下传递正信号的独特受体.

在小鼠中 CD72 有 4 种等位基因形式, CD72<sup>a</sup>、

CD72<sup>b</sup>、CD72<sup>c</sup> 和 CD72<sup>d</sup>. 其中在 CD72<sup>b</sup> 类型中已发现并鉴定了 4 种选择性剪切形式<sup>[7]</sup>.

自身免疫性疾病系统性红斑狼疮(SLE)的特性是产生多种自身抗体和免疫复合物导致炎症和多器官损害, 与 B 细胞的活化及调节相关的基因, 如 CD22、SHP-1、BCMA 和 BlyS/BAFF 等, 被认为与 SLE 的发病有很大的相关性<sup>[8-11]</sup>. NZB/W 小鼠是一种 SLE 模型鼠, 可自然产生多种包括核酸抗体在内的自身抗体, 并在 6 月龄时开始患类似于狼疮肾炎的免疫复合体型肾小球肾炎<sup>[12,13]</sup>.

我们的工作主要关注 CD72<sup>b</sup> 胞内区, 从 BALB/C 小鼠脾的总 RNA 中分离鉴定了 8 种新的选择性剪切形式. 其中有 2 个从未被报道过的插入片段: 一个是 intron1, 长 96 bp, 它的插入并没有改变整个蛋白质的读码框; 另一个是 3' AS, 含有

\* 国家自然科学基金资助项目(30470364).

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-64888447, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2007-03-17, 接受日期: 2007-04-09

39 bp 的 intron3, 提前终止读码框.在这 8 种剪切形式中还有 2 个不含有 exon2, 这意味着它们没有 ITIM2, 不能募集 Grb2. 我们进一步应用 RT-PCR 的方法, 比较了 BALB/C 小鼠和 NZB/W 小鼠的所有这些剪切形式的表达, 有证据显示它们在 2 种小鼠中的表达比例有很大不同, 说明这些剪切形式在 BCR 信号通路中扮演着不同的角色.

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和材料

NZB/W 小鼠购自南京大学实验动物中心. BALB/C 小鼠购自中国科学院遗传与发育生物学研究所. pGEM-T Easy Vector Systems 和 M-MLV RTase kits 购自 Promega 公司. DH5 $\alpha$  感受态细胞购自 Fastgen 公司. Trizol、DEPC、丙烯酰胺及甲叉丙烯酰胺购自 Invitrogen 公司. SYBR 染料购自晶美公司.其他化合物购自北京化学品公司.

### 1.2 引物

小鼠 CD72, upper1: ATGGCTGACGCTATC-ACGTATG, lower5: CAAATCCTGGTCCCCTC-CTG, lower4: GAGAAGGCCAAGCAAGAAGTATT; 小鼠  $\beta$ -actin, upper primer: GGCTACAGCTT-CACCACCAC, lower primer: TAGGAGCCAGAGCAGTAATC.

### 1.3 新的选择性剪切形式的鉴定

BALB/C 小鼠脱颈处死后解剖剥离出脾脏, 分离脾细胞以 100 mg/L 与 Trizol 混匀, 加入 200  $\mu$ l 氯仿混匀, 0 $^{\circ}$ C 14 000  $g$  离心 15 min, 吸去上清入新管, 加入 500  $\mu$ l 异丙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 20 min, 0 $^{\circ}$ C 14 000  $g$  离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次, 溶于适量 DEPC 水中.紫外分光光度计检测总 RNA 浓度, 取 2  $\mu$ g 用 M-MLV RTase 试剂盒反转录为 cDNA. 以此 cDNA 为模板, Upper 1 为上游引物, lower 4 和 lower 5 为下游引物做聚合酶链式反应(PCR). 反应条件如下: 每 50  $\mu$ l 体系中含 80~160 ng 总 RNA 反转得到的 cDNA, 上、下游引物各 25 pmol. 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 30 min (PTC-200 PCR amplifier, MJ Research Inc, Waltham, MA).

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 用 OMEGA gel extraction kit 切胶回收, 连入 pGEM-T Easy

Vector, 转化入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 并由 Invitrogen (Bioaisa) 公司进行测序分析.

### 1.4 各种选择性剪切形式的表达分析

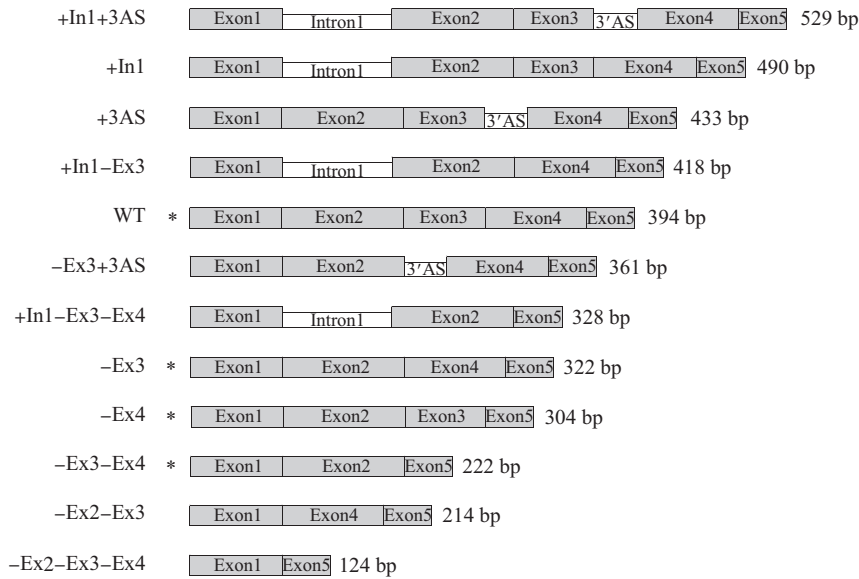
BALB/C 小鼠和 NZB/W 小鼠的脾细胞总 RNA 的提取以及 RT 反应方法同前. 以小鼠  $\beta$ -actin 的上下游引物, 倍比稀释的 cDNA 为模板做 PCR 反应, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s 共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 30 min. 产物经 1.5% 溴乙锭染色的琼脂糖凝胶电泳进行半定量, 以确定各个样品的相对量. 以  $\beta$ -actin RT-PCR 反应模板量的 100 倍的 cDNA 为模板, upper 1 为上游引物, lower 4 和 lower 5 为下游引物, 与  $\beta$ -actin RT-PCR 反应的条件相同做 RT-PCR. 产物 7.5% 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以 1 $\times$ 10000 SYBR Gold 染色, 在紫外光下拍照, 并用 Quantity One 分析软件分析各个条带的比例, Origin 软件作图.

## 2 实验结果

### 2.1 新的选择性剪切形式的发现

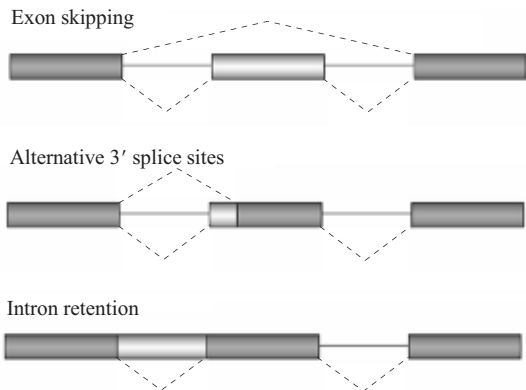
分别用 exon1 的上游引物 upper 1 和在 exon 4 (编码跨膜区) 及 exon5 (编码胞外区) 的下游引物 lower 4 和 lower 5, 以 BALB/C 小鼠脾细胞的 cDNA 为 PCR 模板, 我们克隆并鉴定了 8 个新的小鼠 CD72 选择性剪切形式. 我们用 upper 1 和 lower 4 得到了 5 个克隆, 用 upper 1 和 lower 5 得到了 10 个, 根据它们的测序结果对照小鼠基因组 DNA 序列, 我们认为 BALB/C 小鼠 CD72 存在 12 个选择性剪切形式, 根据它们的长度把它们列在图 1 中. 其中主要 PCR 产物是 WT (被认为是 CD72 的主要功能形式<sup>[1]</sup>), 而 WT、-Ex3、-Ex4 和 -Ex3-Ex4 为已知剪切形式<sup>[1]</sup>, 其余的 8 个为新发现的.

这些选择性剪切形式使用了 3 种基本的剪切方式: 外显子跳过(exon skipping)、3'端选择性剪切(alternative 3' splice sites) 和内含子保留(intron retention)(图 2 和图 3). 其中一个特定的剪切形式可以采用 2 种以上的剪切方式, 如: +In1+3AS 采用了 3'端选择性剪切和内含子保留; -Ex3+3AS 采用了外显子跳过和 3'端选择性剪切; +In1-Ex3 和 +In1-Ex3-Ex4 采用了外显子跳过和内含子保留. 而 +In1-Ex3-Ex4、-Ex3-Ex4、-Ex2-Ex3 和 -Ex2-Ex3-Ex4 跳过了不止一个外显子.



**Fig. 1 All the alternative splicing forms found in CD72 of BALB/C mice**

+In1, +3AS, WT, -Ex3+3AS and -Ex2-Ex3 were amplified with upper1 and lower4 primers. +In1+3AS, +In1, +3AS, +In1-Ex3, WT, +In1-Ex3-Ex4, -Ex3, -Ex4, -Ex3-Ex4 and -Ex2-Ex3-Ex4 were amplified with upper1 and lower5 primers. The four published forms are marked with “\*”. The length of each PCR product is listed on the right side.



**Fig. 2 The alternative splicing patterns found in CD72 of BALB/C mice**

Intron1: ggt aag tcc tgc ttg etc ccc cca ccc ccc att ata ttc cac ccc cac  
 G K S C L L P P P P I I F H P H  
 tcc aca gaa etc att cca gac tcc gac ttt gga get ttt tcc ttt cca  
 S T E L I P D S D F G A F S F P  
 3' AS: get tcc agg agc tga ctg cct atc atc ect gtc ecc taa  
 A S R S \* L P I I P V P \*

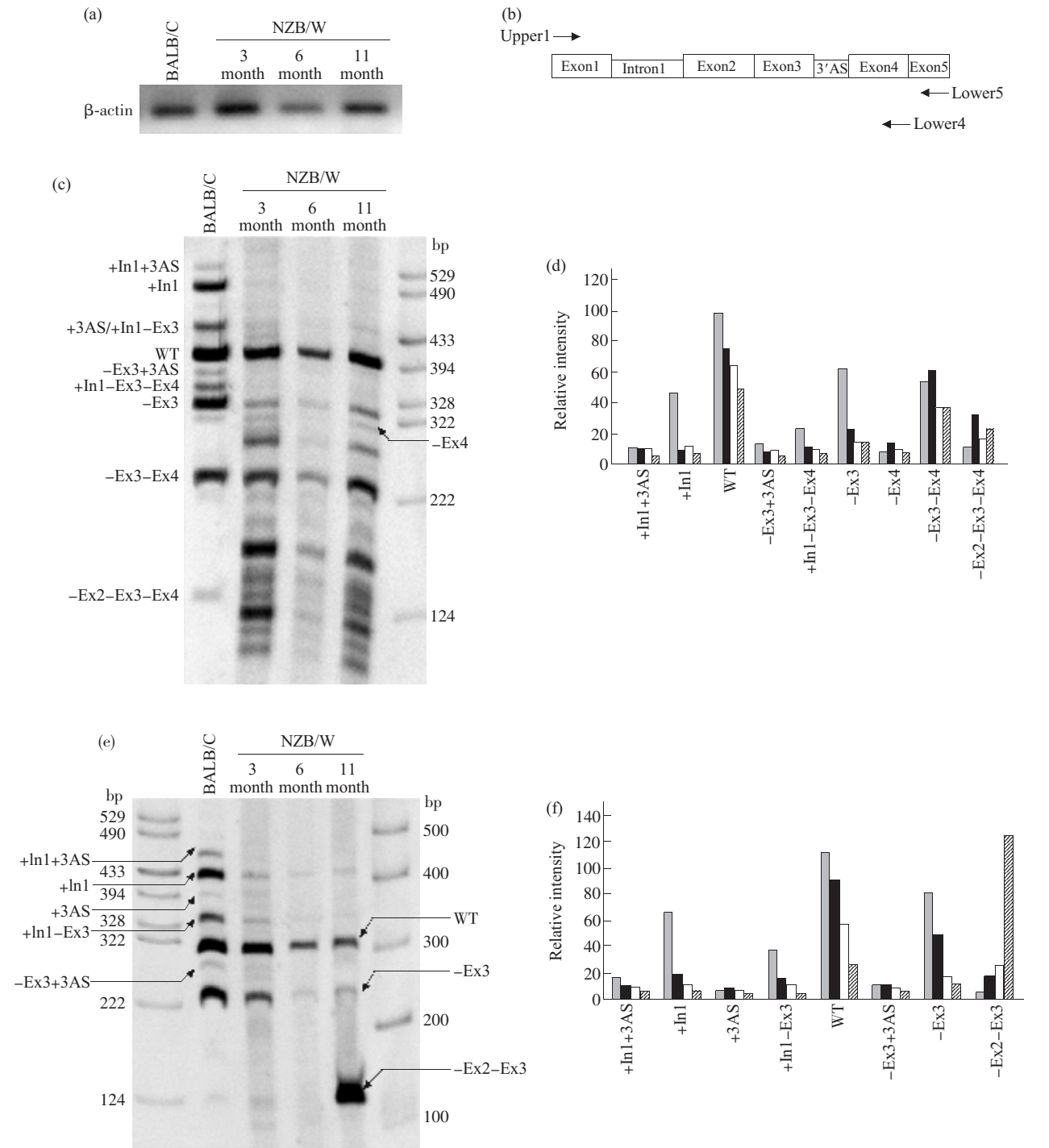
**Fig. 3 DNA sequences of CD72 intron insertions and the translated protein sequences**

Intron 1 is 96 bp long and can be translated into 32 aa. No apparent function domain can be found in the sequence. 3' AS is 39 bp long and contains two stop codons (shown as “\*”).

**2.2 各个剪切形式在 BALB/C 小鼠和 NZB/W 小鼠中的表达差异**

我们分别以 BALB/C 小鼠, 3 月龄(未发病)、6 月龄(刚开始发病)及 11 月龄(病重濒死)的 NZB/W 小鼠脾细胞 cDNA 为模板(用 β-actin 半定量模板), 在 exon1 上的 upper1 为上游引物, exon4 和 exon5 上的 lower4 和 lower5 为下游引物, 做 RT-PCR 分析各个剪切形式的表达差异(图 4)。发现: a.含有

3' AS domain 的剪切形式(+In1 +3AS、+3AS 和 -Ex3+ 3AS)无论是在 BALB/C 小鼠还是在 NZB/W 小鼠中都明显比其他剪切形式要少; b. 剪切形式 +In1、WT、+In1-Ex3 和 -Ex3 在 BALB/C 小鼠中明显比在 NZB/W 小鼠中多; c. 在 11 月龄的 NZB/W 小鼠中剪切形式+In1+3AS1 有非常明显的增多。



**Fig. 4 Using RT-PCR to analyze the relative abundance of CD72 alternative splicing forms in BALB/C and NZB/W mice**  
 (a) RT-PCR of total mRNA separated from spleen cells of BALB/C mouse and NZB/W mice of 3, 6 and 11 month old with  $\beta$ -actin specific primers. The PCR product was separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel and stained with Ethidium Bromide. (b) Primers used in CD72 RT-PCR. (c) RT-PCR amplifies CD72 mRNA with primers upper1 and lower4 as illustrated in (b). The PCR products were separated by electrophoresis on 7.5% polyacrylamide gel and stained with SYBR Gold. (d) Relative abundance of each alternative splicing forms was measured by dividing electrophoresis band density of each CD72 RT-PCR products on (c) with the band density of corresponding  $\beta$ -actin RT-PCR products on (a).  $\square$ : BALB/C;  $\blacksquare$ : NZB/W 3 month;  $\square$ : NZB/W 6 month;  $\boxtimes$ : NZB/W 11 month. (e) RT-PCR amplify CD72 mRNA with primers upper1 and lower5 as illustrated in (b). (f) Relative abundance of each alternative splicing forms was measured by dividing electrophoresis band density of each CD72 RT-PCR products on (e) with the band density of corresponding  $\beta$ -actin RT-PCR products on (a).  $\square$ : BALB/C;  $\blacksquare$ : NZB/W 3 month;  $\square$ : NZB/W 6 month;  $\boxtimes$ : NZB/W 11 month.

### 3 讨 论

我们在 BALB/C 小鼠中发现并鉴定了 8 种新的 CD72 的选择性剪切形式, 加上已报道的 4 种, 就有 12 种之多(图 5). 我们新发现的 8 种剪切形式中, 最令人惊奇的是内含子 1 的保留. 一般情况下, 内含子由于不被翻译成蛋白质, 其序列中常有多个终止码, 而 CD72 的内含子 1 不但没有终止码, 其保留也没有改变整个蛋白质的读码框. 这一现象暗示了进化选择压力的存在, 即内含子 1 的保留具有一定的生物学意义. 内含子 1 编码的 32 个氨基酸把 ITIM1 和 ITIM2 分开了, 而 ITIM1 和 ITIM2 分别和 SHP1 和 Grb2 结合. 我们推断这种插入对 CD72 的功能具有调控作用.

在这些剪切形式中, 有 3 种剪切形式(+In1+3AS、+3AS 和 -Ex3+3AS)在胞外区和穿膜区前就被终止了, 一旦表达, 它们的定位就会被局限于细胞内. 它们都含有 ITIM1 和 ITIM2, 但是其拷贝数无论是在 BALB/C 小鼠中还是在 NZB/W 小鼠中都很少, 因此不太可能通过与正常受体竞争下游的信号转导蛋白起调控作用.

与上面 3 种剪切形式类似, 还存在有 4 种剪切形式(+In1-Ex3-Ex4、-Ex4、-Ex3-Ex4 和 -Ex2-Ex3-Ex4)含有胞外区但却没有穿膜区, 一旦表达, 它们的定位也将是在胞内. 由于这些分子带有 ITIM, 如果被磷酸化将与膜上的受体竞争结合

SHP-1 或 / 和 Grb2. 但由于定位的错误, 它们也可能处于去磷酸化状态.

还有 5 种剪切形式既有胞外区又有穿膜区(+In1、+In1-Ex3、WT、-Ex3 和 -Ex2-Ex3), 其中 WT 是 CD72 的主要功能形式, 当它与 SHP-1 结合可传递负信号, 与 Grb2 和 / 或 CD19 结合即可传递正信号. 有趣的是多含有一个 intron1 的 2 个剪切形式+In1 和+In1-Ex3, 以及胞内区特别短(没有 exon3)的 -Ex3 在 BALB/C 小鼠中的拷贝数高于在 NZB/W 中的拷贝数. 而没有 ITIM2 的 -Ex2-Ex3 在 NZB/W 中的拷贝数远高于在 BALB/C, 并与 NZB/W 小鼠的月龄正相关.

根据 BALB/C 小鼠和 NZB/W 小鼠的免疫学特性, 我们认为: a. 对于+In1, 因为有了多出来的 intron1, ITIM1 和 ITIM2 之间的距离拉长, 因此 Grb2 与 ITIM2 的结合无法抑制 SHP-1 与 ITIM1 结合, SHP-1 仍然发挥负调控功能(免疫抑制); b. 对于 -Ex3, 因为没有 exon3, ITIM2 离膜太近, 它与 Grb2 的结合受到抑制, 而 SHP-1 的结合不受影响; c. +In1-Ex3 没有 exon3, Grb2 的结合受抑制, 多一个 intron1, SHP-1 可以更顺利地与 ITIM1 结合而发挥作用; d. 没有 exon3 和 exon2 的 -Ex2-Ex3, 可以与 SHP-1 结合, 但结合位置离细胞膜很近, 很有可能阻碍了 PTP 酶的活化以及 SHP-1 与下游分子的结合, 竞争性地抑制 SHP-1 的负调控活性(免疫增强).

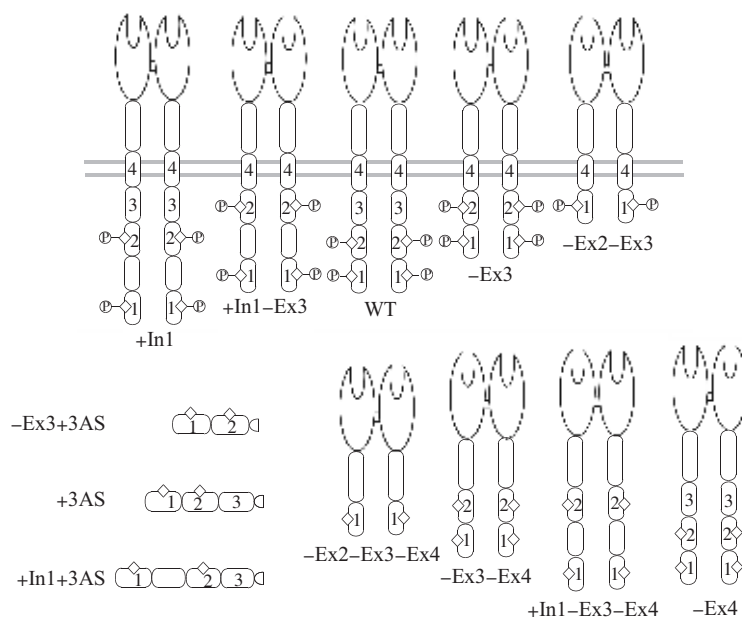


Fig. 5 Structural models and possible cellular localization of the 12 alternative splicing forms of CD72

## 4 结 论

人类基因组测序发现人类基因数目远少于细胞中蛋白质的数目, 说明基因表达的复杂性远超过人们的想象, 而 mRNA 的选择性剪接是产生如此众多蛋白质的主要机制之一, 并与人类疾病的发生有着密切的关系, 了解选择性剪接的机制有助于我们更深入地了解基因组和基因表达的方式及蛋白质的功能和疾病发生的机制.

免疫系统的发展和功能是被精确地调节, 以保证对感染产生保护性免疫反应同时避免产生诸如自身免疫应答和过敏症这样有害的免疫反应. 作为免疫系统的一个重要成员, B 细胞的激活是必须被严格调节的, B 细胞共受体通过增加或减弱来自 BCR 的信号帮助精确调节 B 细胞应答. CD72 作为一个 B 细胞的共受体, 在不同阶段具有增加和减弱 BCR 信号的 2 种功能的特性, 无疑是非常有趣的一个现象. 在我们的工作中发现 CD72 有着数目很多的选择性剪切形式, 结构各异预示着它们在功能上也存在很大的不同, 同时又发现在 SLE 模型鼠特别是发病后的小鼠中, CD72 各种剪切形式的拷贝数与正常小鼠相比存在着很大差异, 据此我们认为, CD72 的各种剪切形式可能分别起着增强和减弱 BCR 信号的功能, 并且在 SLE 的发病中起着不同的作用. 由于我们用脾细胞作为 mRNA 的来源, 而脾中表达 CD72 的细胞不止一种, 因此我们不知道这些剪切方式有多少种在同一细胞中同时存在, 在不同的 B 细胞中 CD72 的剪切方式有什么不同. 进一步研究这些剪切形式的功能及产生方式, 对研究 CD72 的功能、SLE 的发病以及功能基因组学都有着非常重大的意义.

### 参 考 文 献

1 Nakayama E, von Hoegen I, Parnes J R. Sequence of the Lyb-2 B cell

- differentiation antigen defines a gene superfamily of receptors with inverted membrane orientation. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, **86** (4):1352~1356
- 2 Cambier J C. Inhibitory receptors abound?. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (12): 5993~5995
- 3 Wu Y, Nadler M J, Brennan L A, *et al.* The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an *in vivo* substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. Curr Biol, 1998, **8** (18): 1009~1017
- 4 Kumanogoh A, Watanabe C, Lee I, *et al.* Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. Immunity, 2000, **13** (15): 621~631
- 5 Shi W, Kumanogoh A, Watanabe C, *et al.* The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. Immunity. 2000, **13** (5): 633~642
- 6 Wu H J, Venkataraman C, Estus S, *et al.* Positive signaling through CD72 induces mitogen-activated protein kinase activation and synergizes with B cell receptor signals to induce X-linked immunodeficiency B cell proliferation. J Immunol, 2001, **167** (3): 1263~1273
- 7 Ying H, Nakayama E, Robinson W H, *et al.* Structure of the mouse CD72 (Lyb-2) gene and its alternatively spliced transcripts. J Immunol, 1995, **154** (6): 2743~2752
- 8 Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, *et al.* Identification of the gene variations in human CD22. Immunogenetics, 1999, **49** (4): 280~286
- 9 Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, *et al.* New variations of human SHP-1. Immunogenetics, 1999, **49** (6): 577~579
- 10 Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, *et al.* Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: lack of association with systemic upus erythematosus and rheumatoid arthritis. Genes Immun, 2001, **2** (5): 276~279
- 11 Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, *et al.* Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Genes Immun, 2002, **3** (7): 424~429
- 12 Theofilopoulos A N, Dixon F J. Murine models of systemic lupus erythematosus. Adv Immunol, 1985, **37**: 269~390
- 13 Ida A, Hirose S, Hamano Y, *et al.* Multigenic control of lupus-associated antiphospholipid syndrome in a model of (NZWxBXSB) F1 mice. Eur J Immunol, 1998, **28** (9): 2694~2703

## Identification of Eight Novel Alternative Splicing Forms of CD72 and Their Differential Expression in a Mouse Model of SLE\*

ZHU Jie-Ying, TANG Jie\*\*

<sup>(1)</sup>College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 30000, China;

<sup>(2)</sup>National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China.)

**Abstract** CD72 is a B cell specific receptor that exists in multiple alternative splicing forms. Eight novel alternative splicing forms of CD72 were identified from the spleenocytes of BALB/C mice. Two very unique intron sequences were found in those alternative splicing forms. One kind of splicing variants retained the intron1 in the mRNA. This intron can be translated into 32 amino acid residues without changing the reading frame of the whole proteins. Another kind of splicing variants used an alternative 3' splice site in intron 3(3'AS) which led to premature termination of its encoded protein. The differential expression of the CD72 splicing variants were compared in BALB/C and NZB/W mice that were at different stage of systematic lupus erythematosis (SLE) disease development. It was found that 1) splicing forms containing 3'AS was rare in all samples examined; 2) splicing forms containing two ITIM domains and transmembrane domains were more abundant in BALB/C mice than in NZB/W mice, even in some cases the two ITIM domains were separated by the intron 1; 3) a shorter splicing form with both exon2 and exon3 missing was expressed highly in terminally diseased NZB/W mice. These results suggested an important role of CD72 alternative splicing forms in B cell receptor signaling and in SLE.

**Key words** alternative splicing, CD72, B cell receptor, systematic lupus erythematosis(SLE), NZB/W mice

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30470364).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-10-64888447, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

Received: March 12, 2007 Accepted: April 9, 2007