

血源细胞系中 CD39 的表达和功能分析

聂 坤, 郑国光, 张秀军, 林永敏, 宋玉华, 吴克复

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要: 细胞外 ATP 通过激活细胞膜上核苷酸受体介导细胞间通讯。CD39 是一个钙、镁离子依赖的 ATP 双磷酸酶, 其对 ATP 信号的调节机制尚未完全阐明。采用半定量 RT-PCR、ABC 免疫酶标和流式细胞术以及荧光素/荧光素酶法, 研究了七个血源细胞系中 CD39 的表达和功能。结果表明, 不同细胞中 CD39 的表达水平差异显著: 在 J6-1 和 LCL-H 中高水平表达, 在 HL60 中低水平表达, 而在 Namalva、Jurkat、U937 细胞中极低水平表达。CD39 的表达与这些细胞膜上 ATP 酶活性、胞外 ATP 的基础水平结果一致, 提示 CD39 是这些细胞膜上 ATP 酶活性的主要来源, 可能在调节 P2 受体介导的细胞间通讯中起重要作用。

关键词: CD39; ATP 酶; 血源细胞系; P2 受体

中图分类号: Q71

1 引 言

近年的研究阐明, 核苷酸类分子是介导细胞间通讯的载体分子, 通过结合细胞膜上 P2 受体行使功能; ATP 分子不仅为细胞提供能量, 还可在细胞间传递信号, 调节细胞的生存和功能, 然而配体水平的调节机制尚未完全阐明。

CD39 是一个钙、镁离子依赖的 ATP 双磷酸酶^[1]。CD39 与 ATP 和 ADP 有几乎相同的亲和力, 它能把 ATP 和 ADP 分解为 AMP 和游离的磷酸。CD39 最早发现于 EBV (Epstein-Barr virus) 感染的 B 淋巴细胞, 在成熟的免疫细胞以及血管内皮细胞中均有表达, 是这些细胞表面 ATP 酶活性的最主要来源^[2-4]。近年来的研究发现, 通过降解细胞外的 ATP、ADP, CD39 调节一系列细胞生理功能, 包括信号分子的分泌、心血管系统功能的调节、抗凝血以及抗凋亡^[5]。虽然 CD39 有血液细胞特异性表达的特点, 但 CD39 在血源细胞系中的表达规律, 对 ATP 介导细胞间通讯的调节作用, 以及在肿瘤、白血病发病中的意义尚未阐明。因此, 研究 CD39 在血源细胞系中的表达和作用, 有助于揭示 ATP 介导的细胞间通讯在血液细胞中的调节机制。本文从 mRNA 和蛋白水平测定了七个血源细胞系 CD39 的表达, 并检测了细胞外 ATP 基础水平及细胞表面 ATP 酶的活性。

2 材料和方法

2.1 材料

血源细胞系: KG-1a, HL-60, U937, J6-1,

LCL-H, Namalva, Jurkat 细胞均为我室保存。细胞用含 10% 的胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的 RPMI 1640 培养液, 在 37℃、5% 二氧化碳孵箱中培养; 取对数生长期细胞进行实验。

试剂: CD39 单克隆抗体 (monoclonal antibody, MAb) (小鼠 IgM, 克隆号 HIM80)、FITC 标记的兔抗小鼠二抗均购自协和和基因工程公司; 小鼠 IgM 同型对照抗体购自晶美生物工程有限公司; Ex Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品; Trizol RNA 提取试剂、MML-V 逆转录试剂盒为 Invitrogen 公司产品; ATP 检测试剂盒 (ENLITEN) 购自 Promega 公司; $\beta\gamma$ MeATP、ATP 为 Sigma 公司产品。

2.2 方法

2.2.1 半定量 RT-PCR 检测 CD39mRNA 的表达。

CD39 特异的 PCR 引物序列^[7]如下: 正义链 5'-TAGCTTCTTGTGCTATG-3', 反义链 5'-AAG-GCTGAGCACAGAAC-3'; PCR 产物为 428 bp 的片段, 位于 CD39 mRNA 编码区的下游。

取 5×10^6 细胞, 按照试剂盒说明提取细胞总 RNA, 紫外分光光度仪分别在 260 和 280 nm 波长下分析 RNA 的光密度值, 测定 RNA 的纯度并定量。取 4 μ g 细胞总 RNA、oligo(dT)₁₅ 以及 400 单位的 MMLV 逆转录酶完成逆转录。取 4 μ l 逆转录产物到包含 20 pmol CD39 特异引物、10 mmol

收稿日期: 2004-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30100072)

通讯作者: 郑国光, 电话: (022)27307940-3053,

E-mail: zhenggtj@sohu.com

dNTP混合物以及 0.5 单位的 Ex Taq DNA 聚合酶的 50 μ l 的 PCR 反应体系中。PCR 反应参数：94 $^{\circ}$ C 预解链 2 min 后，进行 35 个循环，每循环 94 $^{\circ}$ C 解链 30 s，56 $^{\circ}$ C 退火 40 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 结束。以甘油醛三磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参照，其引物序列为：上游引物 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGG-3'，下游引物 5'-CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3'，采用相同反应体系，进行 30 个循环，产物长为 983 bp。阴性对照以水代替 cDNA。PCR 产物在含溴乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳。特异条带和 GAPDH 的条带用 KODAK 数码相机拍照，相应软件分析对应的光密度。相对表达指数 (relative index, RI) 采用如下公式计算：

$$RI = \text{CD39 条带光密度} / \text{GAPDH 条带光密度}.$$

RI 值小于 0.15、介于 0.15~0.45 和 0.45~0.75 之间以及大于 0.75 的细胞，其相对阳性强度 (positive intensity) 分别定义为“-”、“+ (1+)”、“++ (2+)”、“+++ (3+)”。

2.2.2 ABC 免疫酶标

采用 VECTOR 公司 VECTASTAIN 试剂盒进行 ABC 免疫酶标。固定后的细胞涂片用 2% 的马血清室温封闭 20 min，然后，依次与一抗、生物素标记的二抗和 ABC 复合物分别作用 60、20 和 20 min，DAB (diaminobenzadine) 显色 10 min，苏木素复染 2 min。去一抗的标本作为阴性对照。光镜下观察，阳性反应按常规方法分为“-”到“3+”四级，标本阳性指数 (PI) 按照如下公式计算：

$$PI = \sum \text{“N+” 细胞百分比} \times N \times 100$$

2.2.3 流式细胞仪分析 CD39 的表达

1 $\times 10^6$ 经封闭液 (0.1 mol/L 的 phosphate buffered saline (PBS)，10% 的人 AB 血清，0.01% 叠氮钠) 封闭的细胞，悬于 50 μ l 一抗染色缓冲液 (0.1 mol/L PBS，1% 的人 AB 血清，0.01% 叠氮钠，含 1 μ g CD39 单克隆抗体或小鼠 IgM 同型对照) 中，4 $^{\circ}$ C 标记 60 min，然后悬于 50 μ l FITC 标记的兔抗鼠二抗染色缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 标记 30 min，再以 1% 的多聚甲醛固定 15 min，最后悬浮在 500 μ l 染色缓冲液中，在激发光波长为

488 nm、发射光波长为 530 nm 的条件下，用流式细胞仪 (Becton Deckinson) 测定荧光强度并作图，以 CD39 标本与同型对照标本的差为 CD39 表达阳性率，阳性率大于 6% 的标本为阳性标本。两步骤间用染色缓冲液充分洗涤两次。

2.2.4 细胞外 ATP 浓度的分析

用 ENLITEN rLuciferase/Luciferin 试剂盒测定细胞外 ATP 水平。1 $\times 10^6$ /ml 细胞悬于 Hanks 液中，按 1 ml/孔接于 24 孔板并静置 2 h，小心取 100 μ l 上清，2 000 r/min 离心 5 min，取上清，100 $^{\circ}$ C 水浴 1 min。取 50 μ l 样品于测试管中，另外加入 50 μ l 荧光素 / 荧光素酶混合液，立即用生物发光检测仪 (LB-9507, Berthold 公司) 测定其相对光强度 (relative light units, RLU)。以试剂盒提供的标准 ATP 完成标准曲线，计算样品的实际 ATP 浓度。

2.2.5 ATP 酶活性分析。

采用荧光素 / 荧光素酶法测定细胞膜 ATP 酶相对活性。细胞悬于 Hanks 平衡盐溶液液中，以 1 $\times 10^6$ 细胞 / 孔接入 24 孔板并静置 40 min，加入 60 nmol/L 标准 ATP，每隔一定时间取样检测细胞外 ATP 的水平，计算 5 min 内 ATP 的降解百分率，作为 ATP 酶活性的指标。

3 结 果

3.1 血源细胞系中 CD39 mRNA 的表达

七个细胞系均表达 P2X7 受体^[9]。CD39 特异引物扩增出的条带与理论值相符合。阳性细胞系 LCL-H 的 PCR 产物直接送到 TaKaRa 公司测序，结果显示，特异扩增片段长度为 428 bp，且与 GenBank 上公布的 CD39cDNA 序列 (GenBank accession No. NM 001776) 100% 同源。RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，结果如图 1 所示，7 个细胞系均存在特异扩增条带；对表达水平进行半定量分析，J6-1 和 LCL-H 表达高水平的 CD39 mRNA，RI 值分别为 1.0 和 0.96；U937、Jurkat 几乎不表达，RI 值分别为 0.14 和 0.05；HL60、Namalva、KG1a 表达低水平的 CD39 mRNA，RI 值均不超过 0.30 (表 1)。

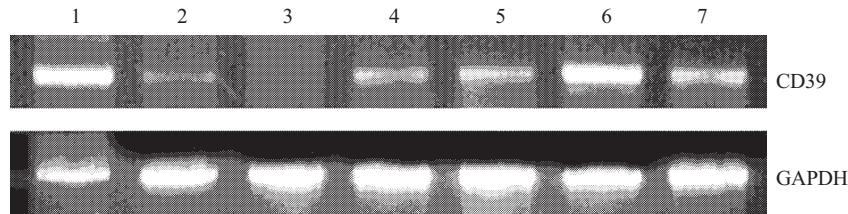


Fig.1 Expression of CD39 mRNA in seven hematopoietic cell lines. The expression of CD39 mRNA in different cell lines was studied by semi-quantitative RT-PCR detailed in Materials and Methods. Lane 1: J6-1; Lane 2: Namalva; Lane 3: Jurkat; Lane 4: U937; Lane 5: HL-60; Lane 6: LCL-H; lane 7: KG1a

Table 1 Expression of CD39 in human hematopoietic cell lines

Cell lines	CD39 Protein (FACS)		CD39 Protein (ABC)		CD39 mRNA	
	Positive rate (%)	Positive intensity	Positive rate (%)	Positive index	RI value	Relative intensity
HL60	16.7	76.1	4	9	0.26	+
U937	—	—	1	2	0.14	-
Jurkat	—	—	1	1	0.05	-
KG1a	86.6	205.8	75	204	0.24	+
LCL-H	50.2	106.5	53	112	0.96	+++
J6-1	92.8	126.4	66	117	1.0	+++
Namalva	—	—	1	1	0.30	+

3.2 血源细胞系 CD39 蛋白水平的表达

在蛋白水平采用两种方法分析了 CD39 的表达。ABC 免疫酶标显示，阳性反应在细胞膜上，其阳性强度及阳性率见表 1；同时，我们还用流式细胞仪检测 CD39 的表达（图 2），阳性参数见表 1。两种方法得到完全一致的结果，即 J6-1、LCL-H 表达很高水平的 CD39；HL60 表达的 CD39 较低；U937、Jurkat、Namalva 为 CD39 阴性；尽管 KG1a 表达的 CD39 mRNA 水平很低，但是 KG1a 中 CD39 的阳性强度却是这 7 个细胞系中最高的。

3.3 血源细胞系 ATP 的基础水平

许多细胞存在 ATP 的基础释放，释放和水解达到平衡，使胞外 ATP 稳定在 nmol/L 水平。胞外 ATP 的基础水平间接反映细胞膜上的 ATP 酶活性。我们首先检测了 7 个细胞系的 ATP 的基础水平，结果见表 2。LCL-H 和 J6-1 的 ATP 基础水平分别为 0.16 和 0.18 nmol/L，约为 Jurkat、HL60 和 KG1a 的十分之一，远低于 U937、Namalva 细胞系。如此超低的 ATP 基础水平，提示 LCL-H 和 J6-1 有高水平的 ATP 酶活性。

$\beta\gamma$ MeATP 是一种代谢稳定型 ATP 类似物，

300 μ mol/L $\beta\gamma$ MeATP 能有效抑制细胞膜上的 ATP 酶活性^[7,8]。用 300 μ mol/L $\beta\gamma$ MeATP 预处理后，再次检测细胞的 ATP 基础水平，结果如表 2，其他 5 个细胞系的 ATP 的基础水平显著改变，升高超过十倍，表明 300 μ mol/L $\beta\gamma$ MeATP 有效抑制其细胞膜上的 ATP 酶活性，同时也暗示 ATP 的基础水平与 ATP 酶活性相关；而 LCL-H 和 J6-1 的 ATP 的基础水平只有轻微的升高，分别为 0.35 和 0.19 nmol/L，进一步肯定了 LCL-H 和 J6-1 有高水平的 ATP 酶活性。

3.4 血源细胞系的 ATP 酶活性

如图 3A 所示，加入 60 nmol/L 的标准 ATP 后，所有细胞培养液中的 ATP 浓度都呈随时间增加而下降趋势，但下降的速度明显不同，LCL-H 和 J6-1 的胞外 ATP 浓度下降最快。以 5 min 时 ATP 被降解的百分比为参数衡量各细胞间的 ATP 酶活性高低：LCL-H 和 J6-1 细胞中 ATP 的降解百分率分别高达 80.5% 和 91.5%，而 HL60 为 38.7%，其余细胞均不超过 25%，Namalva 细胞最低只有 1.6%（图 3B）。这些结果表明，7 个血源细胞系的 ATP 酶活性差异很大，LCL-H 和 J6-1 细胞 ATP 酶活性最高。

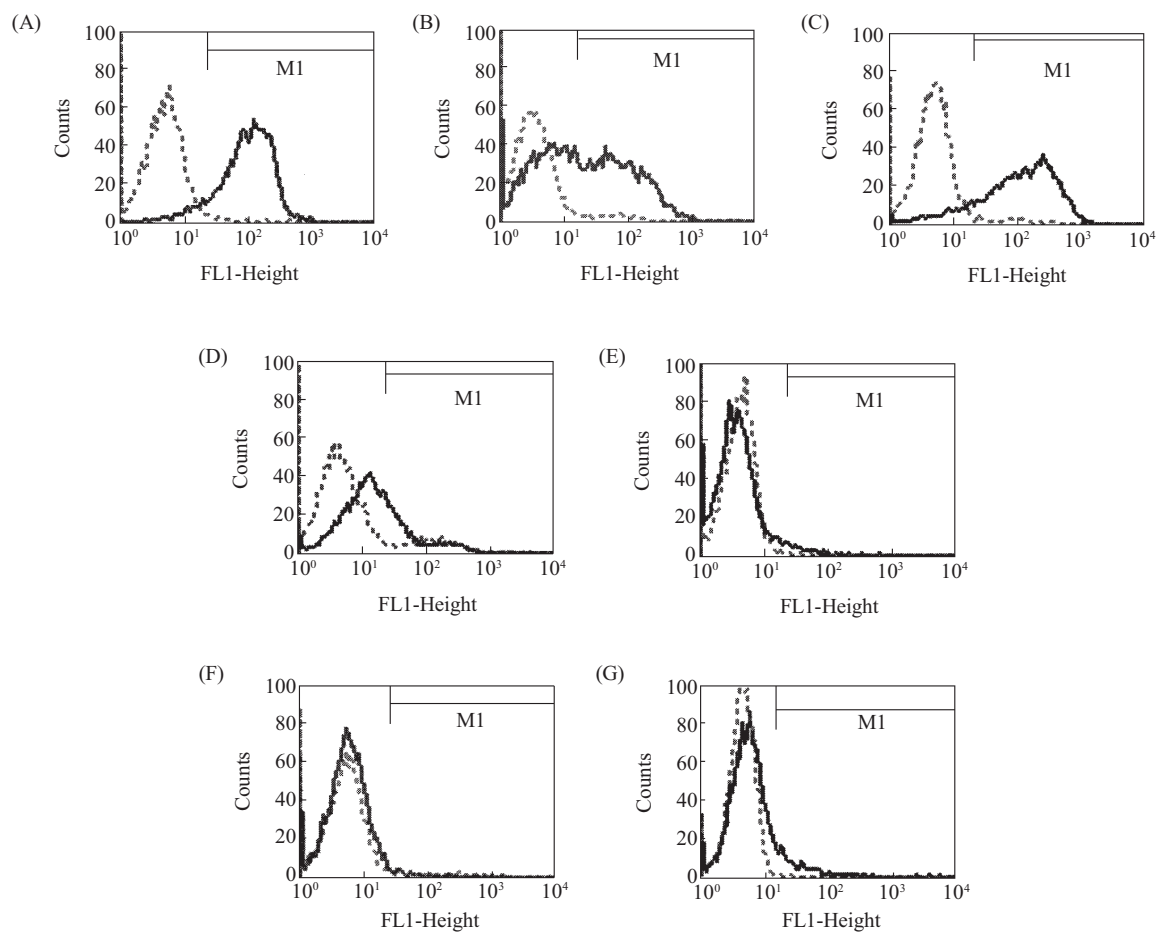


Fig.2 Expression of CD39 protein in seven hematopoietic cell lines. Cells were first labeled with CD39 monoclonal antibody (real line) or mouse IgM isotype control antibody (dashed line), and then labeled with FITC-labeled rabbit anti-mouse antibodies. The expression of CD39 protein was studied by flow cytometry. (A) J6-1; (B) LCL-H; (C) KG1a; (D) HL-60; (E) Jurkat; (F) Namalva; (G) U937

Table 2 The constitutive levels of extracellular ATP in human hematopoietic cell lines

Cell lines	U937	J6-1	Namalva	Jurkat	KG1a	LCL-H	HL60
Control (nmol/L)	6.3	0.18	2.5	1.6	1.3	0.16	1.8
$\beta\gamma$ MeATP (nmol/L)	63	0.19	33	32	13	0.35	21

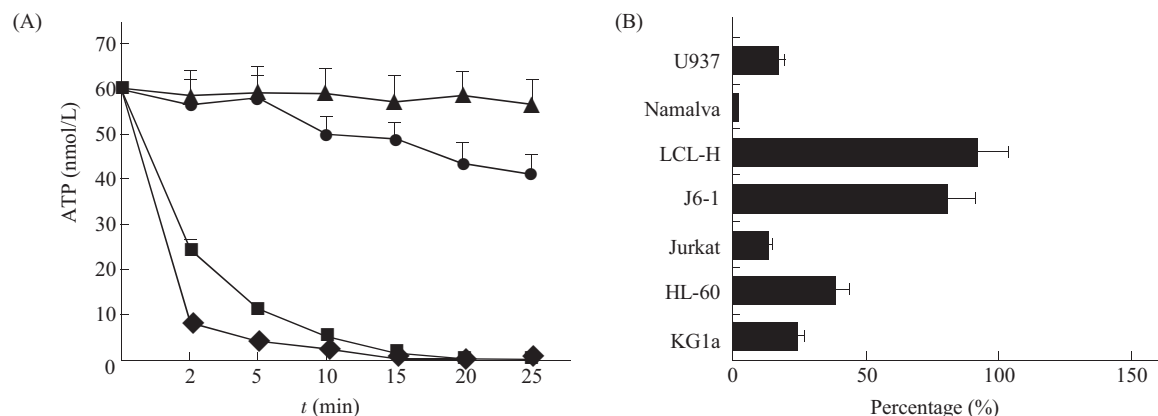


Fig.3 ATPase activity in human hematopoietic cell lines. (A) A pulse of 60 nmol/L exogenous ATP was added to the medium. ATP levels were measured at 2 min as well as every 5 min within 25 min. (B) The relative ATPase activity was defined as the degradation ratio of ATP at the time point of 5 min after the pulse of exogenous ATP. The results indicate the $\bar{x} \pm s$ from three experiments. —■—: J6-1; —◆—: LCL-H; —●—: U937; —▲—: Namalva

4 讨 论

细胞间通讯是维持细胞生存和行使细胞功能所必需的。核苷酸类分子是新近阐明的细胞间通讯载体,它们结合细胞膜上 P2 家族受体,激活多条细胞信号途径,调节细胞的增殖、分化、凋亡和功能^[9]。ATP 是绝大多数 P2 受体的天然配体,细胞在受到刺激的情况下可以向细胞外释放 ATP,调节自身及相邻细胞的功能,然而配体水平的调节机制尚未完全阐明。

细胞膜上的 ATP 酶对调节胞外 ATP 水平起重要作用,主要包括 E 型 NTPDase 家族(或称 CD39 家族)成员,该家族主要包括 NTPDase 1 和 NTPDase 2^[10]。后者亦称为 CD39L1,主要表达在神经细胞^[11];前者即 CD39,主要表达在免疫细胞和血管内皮细胞^[12,13],是它们细胞膜上 ATP 酶活性的主要来源。进一步的研究发现 CD39 表达于血管内皮细胞^[14]及成熟的免疫细胞,如活化的 T 细胞、NK 细胞、单核细胞、树突状细胞等^[15,16],以及神经细胞,而在其它组织鲜有表达。

CD39 最早从 EB 病毒转化的 B 淋巴细胞中鉴定,最初确定为粘附分子,介导同源细胞间的粘附过程^[17]。CD39 分子克隆于 1994 年,为两次跨膜蛋白,由 510 个氨基酸组成,N 端和 C 端均在胞内,其分子内部发现了五个 ATP 酶保守区(ACRs)^[18,19],深入的研究证实它还是一个主要的 E 型 ATP 酶,将胞外 ATP、ADP 降解为 ADP 和 AMP^[1]。近年来多项研究发现 CD39 调节 P2 受体的功能:在 HL60 细胞中,其表达的增加伴随着 P2X7 受体离子通道功能的消失^[20];在血管内皮细胞中,调节 P2X7 受体介导的 IL-1 β 的分泌^[21],降低 P2X7 受体介导的细胞毒作用并同时抑制 P2Y 受体的活化^[22,23]。CD39 表达与肿瘤的关系也有报道:黑色素瘤细胞高表达 CD39,而且随肿瘤的进展其表达下调^[24];HL60 细胞诱导分化后,CD39 的表达升高^[20]。因此,研究 CD39 在血源细胞系中的表达,有助于更深入地阐明 CD39 的表达与 P2 受体的功能的关系,并为探索 CD39 异常表达与疾病的关系提供有益的线索。

目前,对 CD39 在肿瘤细胞中表达的研究较少,我们首次从 mRNA 和蛋白水平研究了一组血源细胞系中 CD39 的表达。结果表明,不同细胞系 CD39 的表达水平存在显著差异,除 KG1a 细胞外,

RT-PCR 方法所得到的 mRNA 水平的结果和流式细胞术及免疫组织化学所得到的蛋白水平结果一致,证明了结果的准确性,并提示 CD39 表达的调控可能主要发生在转录水平。KG1a 细胞蛋白水平与 mRNA 水平和 ATP 酶活性水平不一致,提示可能存在异常剪接体,其机制有待进一步阐明。

进一步的 ATP 酶活性研究结果表明,CD39 的表达水平与其胞外 ATP 酶活性一致:高表达 CD39 的 LCL-H 和 J6-1 细胞系有高水平 ATP 酶活性,其胞外 ATP 的降解水平显著高于其它细胞系,因此其胞外基础 ATP 水平比其它细胞系低一个数量级,而且其活性不能被 300 $\mu\text{mol/L}$ $\beta\gamma\text{MeATP}$ 完全抑制;HL-60 低水平表达 CD39,U937、Namalva、Jurkat 细胞 CD39 的表达更低,而其胞外基础 ATP 水平较高,300 $\mu\text{mol/L}$ $\beta\gamma\text{MeATP}$ 可有效抑制其活性。以上结果提示这些细胞系的 ATP 酶主要源于 CD39。LCL-H 和 J6-1 细胞高表达 CD39 与我们观察到这两个细胞系 P2X7 功能异常一致^[6],进一步肯定了 CD39 在调节核苷酸类信号分子介导的细胞间通讯及 P2 受体功能中的作用。

参考文献:

- [1] Wang TF, Guidotti G. CD39 is an Ecto-apyrase. *J Biol Chem*, 1996,271:9898-9901
- [2] Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol*, 1991, 146:2235-2244
- [3] Koziak E, Sevigny J, Robson SC, Siegel JB, Kaczmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost*, 1999,82:1538-1544
- [4] Berchtold S, Ogilvie AL, Bogdan C, Muhl-Zurbes P, Ogilvie A, Schuler G, Steinkasserer A. Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett*, 1999,458:424-428
- [5] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003,305:9-16
- [6] Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, Yang YH, Li G, Rao Q, Nie K, Wu KF. Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leukemia Res*, 2004,28: 1313-1322
- [7] Joseph SM, Buchakjian MR, Dubyak GR. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem*, 2003,278:

- 23331~23342
- [8] Joseph SM, Pifer MA, Przybylski RJ, Dubyak GR. Methylene ATP analogs as modulators of extracellular ATP metabolism and accumulation. *Br J Pharmacology*, 2004,142:1002~1014
- [9] Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem*, 2004,4:793~803
- [10] Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2000, 362:299~309
- [11] Zimmermann H, Braun N. Ecto-nucleotidases-molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res*, 1999,120:371~385
- [12] Birk AV, Broekman MJ, Gladek EM, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, Szeto HH. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Lab Clin Med*, 2002,140:166~175
- [13] Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigny J, Matsue H, Enjyoji K, Takashima A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med*, 2002,8: 358~365
- [14] Imai M, Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Goepfert C, Guckelberger O, Csizmadia E, Schulte Am Esch J 2nd, Robson SC. Suppression of ATP diphosphohydrolase/CD39 in human vascular endothelial cells. *Biochemistry*, 1999,38: 13473~13479
- [15] Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol*, 1994,153:3574~3583
- [16] Filippini A, Taffs RE, Agui T, Sitkovsky MV. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J Biol Chem*, 1990,265: 334~340
- [17] Ling NR, Hardie D, Lowe L, Jonson GD, Khan M, MacLennan IC. A phenotypic study of cell from Burkitt lymphoma and EBV-B-lymphoblastoid lines and their relation to cells in normal lymphoid tissues. *Int J Cancer*, 1989,43:112~118
- [18] Kukulski F, Komoszynski M. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur J Biochem*, 2003,270:3447~3454
- [19] Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol*, 1994,153:3574~3583
- [20] Adrian K, Bernhard MK, Breiting HG, Ogilvie A. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000,1492:127~138
- [21] Imai M, Goepfert C, Kaczmarek E, Robson SC. CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000,270:272~278
- [22] Robson SC, Enjyoji K, Goepfert C, Imai M, Kaczmarek E, Lin Y, Sévigny J, Warny M. Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. *Drug Dev Res*, 2001,53:193~207
- [23] Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med*, 2000,6:591~603
- [24] Dzhandzhugazyan KN, Kirkin AF, Straten P, Zeuthen J. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett*, 1998,430:227~230

ANALYSIS ON EXPRESSION AND FUNCTION OF CD39 IN HEMATOPOIETIC CELL LINES

NIE Kun, ZHENG Guo-guang, ZHANG Xiu-jun, LIN Yong-min, SONG Yu-hua, WU Ke-fu

(Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, State Key Laboratory for Experimental Hematology, Tianjin 300020, China)

Abstract: Extracellular ATP mediates intercellular communication through activation of P2 receptors. CD39 is an Ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase, which hydrolyzes ATP and ADP. However, how the CD39 modulates ATP-mediated signal? The mechanism remains largely unknown. In this study, semi-quantitative RT-PCR, ABC immunohistochemistry assay, flow cytometry analysis and luciferase/luciferin assay were used to study the expression and function of CD39 in seven hematopoietic cell lines. The results showed that the expression of CD39 varied among these cell lines; CD39 was expressed in both J6-1 and LCL-H at high levels, in HL60 cells at low level, while in Namalva, Jurkat and U937 cells at very low levels. Furthermore, the expression pattern of CD39 was consistent with the results of cell surface ATPase activity and constitutive levels of extracellular ATP of these cells. Our results indicated that CD39 contributed to the ATPase activity on the surface of these hematopoietic cells, and suggested that CD39 might play an important role in the modulation of intercellular communication through P2 receptors.

Key Words: CD39; ATPase; Hematopoietic cell line; P2 receptor