

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0353-05

卵巢癌差异表达基因2氨基端PID结构域相互作用蛋白的筛选

刘淑娟¹, 辛晓燕¹, 吴元明², 杨力军³(第四军医大学 1. 西京医院妇产科; 2. 基础医学部病理生理学教研室; 3. 西京医院 泌尿外科, 西安 710032)

[摘要] **目的:** 筛选人卵巢癌差异表达基因2(differentially expressed in ovarian cancer 2, *DOC-2*)氨基端磷酸酪氨酸作用结构域PID(nDOC-2)的相互作用蛋白质,为研究*DOC-2*作用的信号通路提供线索。**方法:**将含有人*DOC-2*氨基端PID结构域cDNA的片段插入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒,转化酵母菌AH109并在其内表达,然后转化人胎脑cDNA文库,在营养缺陷培养基和X- α -半乳糖苷酶(X- α -gal)上进行双重筛选阳性克隆,PCR扩增出目的片段并测序,进行生物学分析,寻找与*DOC-2*氨基端PID结构域蛋白相互作用的蛋白质。**结果:**经过扩增和筛选胎脑cDNA文库,排除假阳性克隆,得到21个候选阳性克隆,其中3个克隆进行了序列分析,它们是: Amyloid beta(A β) precursor-like protein 1(APLP1)、TGF β III型受体的部分mRNA和protocadherin gamma subfamily C 3(PCDHGC3)。**结论:**获得的3个基因编码的蛋白可能参与了*DOC-2*的信号转导通路,为研究*DOC-2*在卵巢癌基因治疗中的作用提供了新的思路。

[关键词] 人卵巢癌差异表达基因2;磷酸酪氨酸作用结构域;酵母双杂交

[中图分类号] Q78 **[文献标识码]** A

Screening of binding proteins interact with phosphotyrosine-interacting domain of *DOC-2* by yeast two hybrid system

LIU Shu-juan¹, XIN Xiao-yan¹, WU Yuan-ming², YANG Li-jun³(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital; 2. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Science; 3. Department of Urology, Xijing Hospital, the Forth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective:** To screen for proteins which can interact with phosphotyrosine-interacting domain (PID) of differentially expressed gene in human ovarian cancer cell line *DOC-2* by yeast-two hybrid technique, so as to provide evidence for the signal pathway of *DOC-2*. **Methods:** The cDNA sequence of human *DOC-2* gene was amplified and its PID domain (nDOC-2) was subcloned into the bait vector pGBKT7 of yeast two-hybrid system; the product was then used to screen an embryo brain cDNA library and the proteins interacting with nDOC-2 were identified. Quadruple dropout (QDO) medium and X- α -gal were used for selecting the positive clones. PCA was used to analyze the amplified sequence. After elimination of the false positive clones, the positive clones were sequenced and analyzed by bioinformatic methods. **Results:** Twenty-one candidate positive clones were obtained and 3 of them were plasmids encoding Homo sapiens partial mRNA for betaglycan (TBR III gene), Homo sapiens protocadherin gamma subfamily C 3 (PCDHGC3), and APLP1 (amyloid beta precursor-like protein 1). **Conclusion:** The proteins obtained in this study may play important roles in the signal pathway of *DOC-2*, which provides a new orientation for *DOC-2* gene therapy of ovarian cancers

[Key words] human differentially expressed in ovarian cancer 2 gene (*DOC-2*); phosphotyrosine interacting domain (PID); yeast two-hybrid system

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(5): 353-357]

人卵巢癌差异表达基因2(differentially expressed in ovarian cancer 2, *DOC-2*)属于Disabled(Dab)基因家族,故又称为DAB2(Disabled 2)。人类*DOC-2*位于染色体5p13,长约35 kb,含有15个外显子和14个内含子。其cDNA共3 268 bp,编码长度为770个氨基酸的

蛋白质,相对分子质量约为825 000^[1]。*DOC-2*广泛存

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30500538)

[作者简介] 刘淑娟(1973-),女,河北望都县人,汉族,主治医师,讲师,主要从事妇科肿瘤防治方面的研究

[通讯作者] 刘淑娟, E-mail: hanliu@fmmu.edu.cn

在于正常组织中,但在许多肿瘤组织和细胞系中低表达或无表达。研究表明它能抑制多种肿瘤细胞的生长,包括卵巢癌、绒癌、前列腺癌、乳腺癌等,所以 *DOC-2* 被认为是一种肿瘤抑制基因^[2,3],但其作用机制尚不清楚。*DOC-2* 的主要结构提示,*DOC-2* 是一种可能的信号分子^[4,5],通过蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白磷酸化两种机制发挥作用。*DOC-2* 蛋白在氨基端有一个 135 个氨基酸的高度保守序列^[7],这段序列被认为是一个磷酸酪氨酸作用结构域(phosphotyrosine interacting domain, PID/PTB domain),可能是 *DOC-2* 发挥其功能的重要组成部分。

研究发现,*DOC-2* 具有对卵巢癌细胞生长的抑制作用^[6]。为进一步研究 *DOC-2* 发挥功能的信号转导通路,寻找与 *DOC-2* 基因及其蛋白 PID 结构域相互作用的分子或新的配体,本研究应用酵母双杂交技术筛选了胎脑 cDNA 文库,得到了 21 个与 *DOC-2* 基因 PID 结构域相互作用的候选基因,为 *DOC-2* 基因的进一步研究作了前期的基础性工作。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pUC19 及 DH5 α 菌种由本室保存;诱饵载体 pGBKT7-Trp、Ura、His、Leu 等各种营养缺陷的 SD 培养基、AH109 酵母菌种、对照质粒(pCL1, pGBKT7-53, pGADT7-T, pGBKT7-Lam 等)均购于 Clontech 公司;鲱鱼精 DNA 为 Gibco 进口分装;大提质粒试剂盒购自 Qiagen 公司;LiAc、PEG4000、DMSO 及酸处理的玻璃珠购自 Sigma 公司;Pyrobest DNA 聚合酶购自大连宝生物技术公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、IPTG、dNTP,及 DL2000 DNA Marker 购自 Takara 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自华舜生物技术公司;测序引物:5'TACCACTACAATGGATG 3'由赛百盛生物技术公司合成;PCR 引物合成及测序由博亚生物技术公司完成;含 *DOC-2* cDNA 的质粒 p93 由美国 Dr Xu Xiangxi 惠赠。

1.2 pGBKT7-nDOC2 的构建

对 p93 质粒进行测序鉴定,证实正确后以其为模板,设计上游含有 *NdeI* 酶切位点的引物序列:5'-GC-CATATGGCCATGTCTAACGAAGTAGAAAC-3';下游设计含有终止码和 *Sal I* 酶切位点的引物序列:5'-GCGTCTGACTTAGGCAAAGGATTTCCAA-3',进行 PCR,以得到两端含有相应酶切位点的 *DOC-2* cDNA。经 PCR、PCR 产物的回收纯化,与 pGBKT7 载体进行酶切连接反应,并鉴定得到重组载体 pGBKT7-DOC2。通过 *EcoR I* 和 *Sal I* 双酶切,切除 *DOC-2* 的 cDNA 第 766 位

EcoR I 位点和 pGBKT7 多克隆位点中 *Sal I* 位点间片段,再通过胶回收、补平、连接等方法得到 pGBKT7-nDOC2 的重组体,并经 *NdeI*、*PstI* 双酶切鉴定。

1.3 酵母感受态的制备

参照 Clontech 公司提供的酵母双杂交系统说明书,进行小量转化和大规模文库转化。

1.4 构建于 DNA-BD 的 Bait 载体的自激活检测

pGBKT7-nDOC2 醋酸锂法转化 AH-109 感受态,同时转化有 pCL1 阳性对照质粒、pGBKT7-53 + pGADT7-T 阳性对照质粒和 pGBKT7-Lam + pGADT7-T 阴性对照质粒的 AH-109 菌株。转化后铺板于 SD/-Trp 营养缺陷平板,待长出克隆后挑菌落分别划线于 SD/-Ura、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-His 营养缺陷板上培养排除其自激活作用。同时采用 β -半乳糖苷酶印膜法检测 *LacZ* 报告基因的表达。用无菌牙签随机挑取酵母单个克隆,点样于硝酸纤维素滤膜上。将带有酵母克隆的滤膜在液氮中迅速冷冻 5 s 后,置于室温裂菌。将点有菌体的滤膜面朝上,放在另一张同样大小浸有 Z buffer/X-gal 的 Whatman 1#滤纸上,赶尽气泡,于 30 °C 孵育 8 h,观察颜色变化。

1.5 人胎脑 cDNA 文库的扩增

参照 Clontech 公司说明书,应用美国 Qiagen 公司大提质粒试剂盒提取文库质粒。

1.6 以 pGBKT7-nDOC2 为诱饵筛选胎脑 cDNA 文库

每次铺平板 50 个,并测定转化效率和转化克隆数,以确保筛选文库的规模。将转化子铺 SD(-Leu/-Trp/-His/-Ade/ + X- α -gal)平板 30 °C 培养 5 d 后,选取变蓝的克隆并划线至新的 SD(-Leu/-Trp/ + X- α -gal)平板,30 °C 培养 5 d 后再选取变蓝的克隆划线。反复 3 次后再划线至 SD(-Leu/-Trp/-His/-Ade/ + X- α -gal)平板,选取仍能变蓝的克隆进行下一步实验。同时对挑选克隆进行 β -半乳糖苷酶滤纸显色法检测 *lacZ* 报告基因活性,进一步确认阳性克隆。

1.7 文库质粒的回收及分析

按 Clontech 公司的说明书回收酵母中的文库质粒,并电转化 *EcoI* DH5 α 感受态。按常规方法从细菌中提取文库质粒,经过 *EcoR I* 和 *Xho I* 酶切,选用酶切不同插段的克隆,用 AD 载体上插入位点两侧的通用引物扩增酵母质粒,得到 PCR 产物。将 PCR 产物测序,将所得序列信息在 NCBI 网站做 BLAST 分析。

2 结果

2.1 重组载体 pGBKT7-nDOC2 的鉴定

分别建立 *Nde I*、*Sal I* 双酶切和 *Pst I* 单酶切体系,将得到的 pGBKT7-DOC2 的重组体通过琼脂糖凝胶电

泳证实双酶切切出分子量约 2.2 kb 的片段,单酶切切出分子量约为 1 kb 的片段,与插入片段分子量相符,说明目的基因插入正确,成功构建成重组载体 pGBKT7-DOC2(图 1)。

分别建立 *Nde* I、*Pst* I 双酶切体系,将得到的 pGBKT7-nDOC2 的重组体通过琼脂糖凝胶电泳证实双酶切得到相对分子质量约 700 bp 的片段,与插入片段相对分子质量相符,说明成功地构建成重组载体 pGBKT7-nDOC2(图 2)。

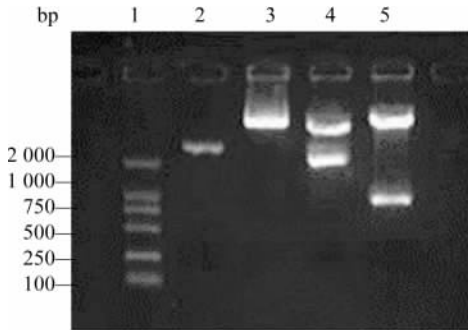


图 1 pGBKT7-DOC2 重组体的酶切鉴定图

Fig.1 Endonucleases digestion analysis of pGBKT7-DOC2 vector

1:DL-2000 marker; 2:PCR product; 3: pGBKT7-DOC2 recombinant vector; 4: pGBKT7-DOC2 digested by *Nde* I and *Sal* I ; 5: pGBKT7-DOC2 digested by *Pst* I

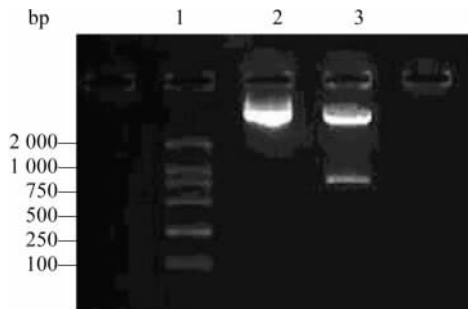


图 2 pGBKT7-nDOC2 重组体的酶切鉴定图

Fig.2 Endonucleases digestion analysis of pGBKT7-nDOC2 vector

1: DL-2000 marker; 2: pGBKT7-nDOC2 recombinant vector; 3: pGBKT7-nDOC2 digested by *Nde*I and *Pst*I

2.2 建于 DNA-BD 的 Bait 载体的自激活

pGBKT7-nDOC2 阳性质粒转化现制备的酵母感受态细胞,转化后铺板结果可见酵母划线菌在 SD/-Ura、SD/-Trp 营养缺陷板上生长,而在 SD/-Leu、SD/-His 缺陷营养板不能生长。 β -半乳糖苷酶检测可见转化有 pCL1 阳性对照质粒、pGBKT7-53 + pGADT7-T 阳性对

照质粒的酵母菌在 8 h 内变成蓝色,而转化有 pGBKT7-Lam + pGADT7-T 阴性对照质粒和 pGBKT7-nDOC2 质粒的酵母菌未呈现蓝色,可见 *lacZ* 报告基因没有被 nDOC-2 蛋白激活。

2.3 文库转化及转化子的筛选

通过营养筛选首先得到了 90 个阳性克隆,然后经过多次挑菌划线于 SD/-Trp-Leu-Ade-His X⁻-a-ga 平板,同时结合半乳糖苷酶检测分析,最后筛选出阳性克隆 21 个(图 3)。由于文库质粒的营养筛选为 *Leu* 基因,将营养筛选及 β -半乳糖苷酶印膜法检测均显蓝色的克隆接种于 SD/-Leu 液体培养基,去除 DNA-BD bait 载体,提酵母质粒后电转化 DH5a 大肠杆菌感受态细胞,然后涂板于 LB Amp + 平板,只有含 AD-文库质粒的转化菌才能生长,常规挑取单克隆、摇菌提质粒以扩增阳性转化菌。另外,文库的构建选用了 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点。所以用这两个内切酶酶切提取的大肠杆菌质粒,可见 AD 载体阳性克隆上有大小不同的插入片段(图 4),选用插入片段不同的阳性克隆递交测序,进行序列分析。

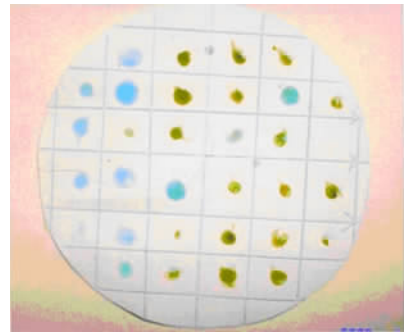


图 3 β -半乳糖酶检测

Fig.3 Detection of β -galactase

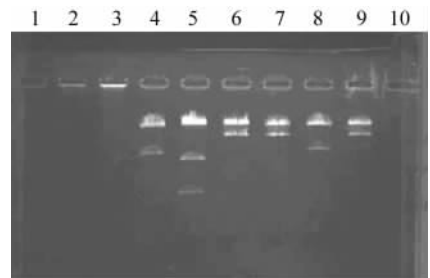


图 4 部分阳性克隆的双酶切结果

Fig.4 Endonuclease digestion of some positive clones

1~10: Random No. of some positive clones

2.4 阳性质粒的测序和分析

对阳性文库质粒测序并做 BLAST 分析结果表明,筛选得到与 DOC-2 氨基端 PID 结构域相互作用蛋白质

的 3 个编码基因有: Amyloid beta (A4) precursor-like protein 1 (APLP1)、TGF β III 型受体的部分 mRNA 和 Protocadherin gamma subfamily C 3 (PCDHGC3)。

3 讨 论

DOC-2 是作为一种具有肿瘤抑制功能的分子被发现的,然而越来越多的研究发现它还是细胞生长分化过程中的信号分子,可能参与多个信号通路的调节。其氨基端的磷酸酪氨酸作用结构域在其发挥信号转导功能中可能起着重要的作用。为了研究可能与其 PID 结构域相互作用的作用蛋白,采用了酵母双杂交技术进行检测,结果得到了 3 个与 nDOC2 相互作用蛋白的基因序列: APLP1、TGF β III 型受体的部分 mRNA 和 Protocadherin gamma subfamily C 3 (PCDHGC3)。

APLP1^[7]是家族性 Alzheimer 病基因产物 β 淀粉前体蛋白(APP)家族成员之一,称为 β 淀粉前体样蛋白。APP、APLP1 和 APLP2 是具有相同蛋白结构域的高度同源蛋白,所有的 APP 家族蛋白均被发现积聚于 Alzheimer 病病损区。研究表明其碳端含有 NPXY 基序,该基序的酪氨酸磷酸化蛋白可特异性地与含 PID 结构域的胞质蛋白结合,如 APBB 和 APBB 家族成员, MAPK8IP 和 Dab1。在正常人大脑中^[8], APP、APLP1 和 APLP2 参与了记忆功能中重要的突触传递过程, APLP1 可能突触后功能方面发挥一定作用。Homayouni^[9]利用酵母双杂交技术在研究其功能的过程中发现, Dab1 可与 APLP1 相互结合作用, APLP1 与 Dab1 的结合促进了 Dab1 的丝氨酸磷酸化。Dab1 的缺失可导致发育过程中异常的神经元迁移和皮层结构紊乱。它被认为是信号传导过程中的接头蛋白。这个结果提示在大脑中 Dab1 的作用至少部分是通过与 APLP1 相关而发挥作用的。DOC-2 是在组织中广泛存在的 Dab1 的同源体,研究发现,许多参与了神经发育的 DOC-2 相关基因[包括果蝇 *disable* (dDab)及其鼠同源体 mDab1]编码的蛋白以及 DOC-2 蛋白在氨基端均有一个 135 个氨基酸的高度保守序列,在这一区域中, DOC-2 与 p96/mDab2 有 98% 的同源性,与 mDab1 和 dDab 分别有 66% 和 50% 的同源性,这段序列被认为是一个磷酸酪氨酸作用结构域(PID/PTB)。这个结构域在人和鼠 Shc 蛋白和果蝇 *Numb* 基因中也存在,这段序列可能是 DOC-2 发挥其功能的重要组成部分。本研究以 DOC2 的磷酸酪氨酸作用结构域为诱饵钓取其相互作用分子得到了 APLP1,与 Homayouni 的结果不谋而合,这也证实了该段磷酸酪氨酸作用结构域正是 Dab1 与 APLP1 相互结合的部位,但尚不能肯定 APLP1 可与 DOC2 发生作用。

Hocevar 等^[10]发现 DOC-2 是连接 TGF β 受体与 Smad 家族蛋白的重要接头分子。TGF β 的刺激激发了 DOC-2 与 Smad2 和 Smad3 间的瞬时连接,这种连接是通过 DOC-2/DAB2 氨基端的磷酸酪氨酸作用结构域直接与 Smad2 的 MH2 区间的反应发生的。在体外 DOC-2/DAB2 能与 TGF β I 型受体及 II 型受体连接。本实验中发现 TGF β III 型受体的部分 mRNA 序列能与 DOC2 磷酸酪氨酸作用结构域发生相互作用。这个结果也进一步证实 DOC-2/DAB2 是 TGF β 信号通路中的重要成分,帮助 TGF β 信号从 TGF β 受体传到 Smad 家族转录因子上。

对于 PCDHGC3 的功能目前尚无报道。但 Homayouni^[11]在研究 DAB1 的作用通路的过程中,利用酵母双杂交技术发现 DAB1 的磷酸酪氨酸结合结构域(PTB)可与一个新的 protocadherin 蛋白(人 protocadherin18 的同源体)相互作用。小鼠的 Pcdh18 (mPcdh18)位于第 3 号染色体,含有 4 个与其他 protocadherin 家族成员类似的外显子。推测的氨基酸序列包括 6 个细胞膜外 cadherin 区、一个跨膜区和一个大的胞内区。Dab1 的结合部位位于 mPcdh18 碳端 243 位氨基酸。表达分析表明, mPcdh18 在胚胎许多组织有表达,但在成年鼠主要表达在肺和肾脏。胚胎期的脑组织中 mPcdh18 的表达是受时间、空间调节的。Homayouni^[9]认为 mPcdh18 参与了含 PTB 结构域蛋白介入的信号转导途径,可能在大脑发育中起一定作用。本实验结果至少证实 protocadherin 蛋白家族成员能与含 PTB 结构域蛋白发生相互作用。

本实验结果发现 DOC-2 可能通过其氨基端 PID 结构域与上述分子发生相互作用。虽然 DOC-2 的发现是基于卵巢癌的研究,但许多研究和本实验的结果均提示它可能在多种组织中与多种分子在不同层面相互作用,进而起到不同的作用。本实验得到的 3 个基因序列为研究 DOC-2 的信号传导通路提供了线索,但是其在体内与上述蛋白的具体作用机制仍需进一步证实。

[参 考 文 献]

- [1] Sheng Z, He J, Tuppen JA, *et al.* Structure, sequence and promoter analysis of human disabled-2 gene (DAB2) [J]. *Genomics*, 2000, 70(3):381-386.
- [2] Wang Z, Tseng CP, Pong RC, *et al.* The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer: Characterization of a novel GTPase-activating protein associated with N-terminal domain of DOC-2/DAB2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(15): 12622-12631.
- [3] Kleeff J, Huang Y, Mok SC, *et al.* Down-regulation of DOC-2 in colorectal cancer points to its role as a tumor suppressor in this

- malignancy[J]. *Dis Colon Rectum*, 2002, 45(9): 1242-1248.
- [4] He J, Xu J, Xu XX, *et al.* Cell cycle-dependent phosphorylation of disabled-2 by cdc2[J]. *Oncogene*, 2003, 22(29): 4524-4530.
- [5] Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, *et al.* Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein(hDAB2IP) gene in lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(1): 59-66.
- [6] 刘淑娟, 韩军涛, 辛晓燕等. DOC-2 在卵巢癌细胞系中的表达及其功能的初步研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(5): 375 .
- [7] Bayer TA, Cappai R, Masters CL, *et al.* It all sticks together-the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease[J]. *Mol Psychiatry*, 1999, 4(6): 524-528.
- [8] Neumann S, Schobel S, Jager S, *et al.* Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(11): 7583-7594.
- [9] Homayouni R, Rice DS, Sheldon M, *et al.* Disabled-1 binds to the cytoplasmic domain of amyloid precursor-like protein 1[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(17): 7507-7515.
- [10] Hocevar BA, Smine A, Xu XX, *et al.* The adaptor molecule disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the smad pathway[J]. *EMBO J*, 2001, 20(11): 2789-2801.
- [11] Homayouni R, Rice DS, Curran T. Disabled-1 interacts with a novel developmentally regulated protocadherin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(2): 539-547.
- [收稿日期] 2006 - 06 - 15 [修回日期] 2006 - 09 - 10
- [本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

浆细胞样树突状细胞能提呈同种抗原并介导血管性移植物的耐受

对于血管性移植物,同种抗原并不是局限于某个部位而是弥散地分布于多个淋巴器官,因此需要诱导系统性免疫耐受。论文报告通过静脉回输供者脾脏细胞以及抗 CD40L 的单抗,成功建立了同种血管性心脏移植达 10 周的耐受动物模型,并首次发现小鼠浆细胞样树突状细胞(pDC)具有吞噬功能,其在针对血管性心脏移植物的耐受中起着至关重要的作用。

Yae 单克隆抗体能识别受者 I-Ab 提呈的供者来源的 I-Ed 肽,用此抗体标记耐受小鼠移植物,发现 Yae⁺ 细胞表达 CD11c、B220、Gr-1、PDCA-1,但不表达 CD19 和 CD11b,进一步用 FITC 标记的乳胶微粒吞噬实验证实 Yae⁺ 细胞主要为具有吞噬能力的 pDCs。还发现耐受受者小鼠的 Yae⁺ 细胞主要存在于血液而非输出管淋巴液中,主要分布于全身淋巴结而非脾脏。与经典 DCs 的抗原提呈及归巢功能相类似,推测 pDCs 可能参与摄取、处理和提呈同种抗原,诱导自身成熟后循血液循环途径从移植物迁移至淋巴结完成其抗原提呈的使命。用 May-Grunwald Giemsa 染色观察到血液循环分离的 Yae⁺ PDCA-1⁺ 细胞与髓系成熟 DCs 具有相似的细胞形态:不规则的星形细胞和分叶状细胞核,此外它低表达 CD80、CD86,但高表达 MHC II 分子和吞噬受体 CD206,高表达 IFN- α 、TLR3、7.9 mRNA,高表达黏附分子 LFA-1、ICAM-1、VLA-4、CD62L 以及淋巴结归巢趋化因子受体 CCR7、ChemR23 和 CCR2。同时耐受模型鼠的高内皮静脉(HEV)上调表达 CCR2 和 CCR7 的配体 CCL2、CCL7、CCL21 及 CD62L 的配体如 MAdCAM1 等,这些分子的相互作用有利于 HEV 结合并排出 pDCs。以上都为 pDC 循血液循环入淋巴结提供了直接证据。

Yae⁺ PDCA-1⁺ 细胞进入淋巴结之后是否又类似于经典 DCs 启动 T 细胞应答? 免疫组化结果提示,耐受小鼠淋巴结中 Yae⁺ PDCA-1⁺ 细胞高表达 CCL17,主要位于淋巴滤泡和生发中心之外的 HEVs 周围和 T 细胞聚集区。为了进一步证明此群细胞能与 T 细胞相互作用,作者分离出了耐受小鼠淋巴结的 CD4⁺ T 细胞进行流式细胞仪检测及 PCR 分析,发现有一群 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 高表达 CCR4,但在脾脏中未见这群表达 CCR4 的 T 细胞,提示在耐受小鼠脾脏中 CCL17⁺ Yae⁺ pDC 和 CCR4⁺ CD4⁺ T 细胞相互作用可能影响 Treg 的生成。利用体内外诱导的实验体系证明了淋巴结中提呈自身抗原的 pDCs 在 Treg 的诱导生成中确实具有重要作用,并且此过程需要 CCR4 和 TGF- β 的参与。为证明 Yae⁺ PDCA-1⁺ 细胞诱导 Treg 产生是血管性心脏移植耐受的原因,在已经建立耐受的小鼠中输入 pDCs 的特异性抗体 120G8,它能引起外周 pDCs 的缺失并导致耐受终止。若给未处理的受者小鼠回输耐受小鼠淋巴结来源的 Yae⁺ PDCA-1⁺ 细胞,移植物存活期可延长至 24 d。以上说明血管性同种抗原的耐受至少部分依赖于 pDCs 这一特殊细胞亚群,它能获取并处理移植物 MHC II 来源的同种抗原肽,通过上调表达一系列的整合素、选择素和趋化因子受体,循 HEVs 途径迁移至外周淋巴结,诱导外周 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 的生成,从而导致了同种血管性心脏移植耐受。这一发现还为药理学治疗提供新的靶点,包括 pDCs 抗原摄取和提呈、pDCs 的迁移和 Treg 发育等环节。

[张 婷 摘译, 刘书逊 审阅. Ochando JC, Homma C, Yang Y, *et al.* *Nature Immunology*, 2006, 7(6): 652-662.]