

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0371-05

吲哚胺 2,3 双加氧酶基因修饰的 DCs 对同种异基因 T 细胞增殖反应的抑制

张文颖¹, 楼国良¹, 史平¹, 周俊平¹, 王梁华², 焦炳华², 解俊³(1. 第二军医大学附属长海医院特需诊疗科, 上海 200433; 2. 第二军医大学基础医学部生化与分子生物学教研室, 上海 200433, 3. 达拉特旗人民医院心电图室, 内蒙古鄂尔多斯 014300)

[摘 要] **目的:** 探讨吲哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3 dioxygenase, *IDO*)基因修饰的树突状细胞(dendritic cells, DCs)在体外对造血干细胞移植中异基因 T 细胞增殖反应的抑制作用。**方法:** 用携带 *IDO* 基因的重组腺病毒转染 BALB/c 小鼠(受体)骨髓来源的 DCs ,用 RT-PCR 法检测 DCs 表面 *IDO* 的表达,用流式细胞术分析 *IDO* 基因修饰前后 DC 表型的变化,并把 *IDO*-DC 与 C57BL/6 小鼠(供体)脾脏来源的 T 淋巴细胞共培养,通过混合淋巴细胞培养等方法检测异基因 T 细胞的特异性反应性和诱导 T 细胞凋亡的情况。**结果:** 用腺病毒载体携带的 *IDO* 基因转染 DCs 后,DCs 可有效表达 *IDO*,且没有影响 DC 的表型;*IDO* 基因修饰的 DCs 可抑制异基因 T 细胞的增殖反应,同时可诱导异基因反应性 T 淋巴细胞的凋亡。**结论:** 在体外,*IDO* 基因修饰的 DCs 可抑制移植中异基因 T 淋巴细胞的增殖反应。移植用该方法处理过的骨髓,可能会预防移植抗宿主病(GVHD)的发生。

[关键词] 吲哚胺 2,3 双加氧酶; 树突状细胞; 移植抗宿主病

[中图分类号] R730 [文献标识码] A

Inhibition of allogeneic T-cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-modified dendritic cells

ZHANG Wen-ying¹, LOU Guo-liang¹, SHI Ping¹, ZHOU Jun-ping¹, WANG Liang-hua², JIAO Bing-hua², XIE Jun³(1. Department of Special Clinic, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Electrocardiographic Room, People's Hospital of Dalate Qi, Erduosi, Inner Mongolia, 014300, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the inhibitory effect of indoleamine 2,3-dioxygenase(*IDC*)-modified dendritic cells on proliferation responses of allogeneic T-cell in transplantation of the hematopoietic stem cells *in vitro*. **Methods:** BALB/c mice bone marrow-derived dendritic cells were transfected with recombinant adenovirus harboring *AdIDO* gene. *IDO* mRNA was detected by RT-PCR in DCs transfected with *AdmIDO* and the changes of DCs phenotype were analyzed by FACS. Naive T lymphocytes from the spleen of C57BL/6 mice were co-cultured with BALB/c mouse-derived *IDO*-DC and Mixed lymphocyte reaction were performed to evaluate the alloantigen-specific hyporesponsiveness and T cell apoptosis. **Results:** DCs effectively expressed *IDO* after transfection, without influencing the phenotype of DCs. *IDO*-transfected DCs were found to inhibit alloreactive T cells proliferation and induce T cell apoptosis. **Conclusion:** DCs transfected with *IDO* gene may prevent graft-versus-host disease through inhibiting alloreactive T cells proliferation in haematopoietic stem cell grafts.

[**Key words**] indoleamine 2,3 dioxygenase (*IDO*); Dendritic cells; graft versus host disease (GVHD)

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(5): 371-375]

造血干细胞移植是治疗恶性血液系统疾病的有效方法之一,但移植抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)仍然是其主要的并发症,其发病率和病死率较高,严重限制了异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, alloHSCT)在临床的应用和发展。因此,抑制移植抗宿主病成为人们

在造血干细胞移植中亟待解决的问题。

树突状细胞(dendritic cells ,DCs)是功能最强大

[作者简介] 张文颖(1975-),内蒙古鄂尔多斯市人,硕士研究生,主要从事恶性血液系统疾病的研究

[通讯作者] 楼国良 Email:GLlou@hotmail.com

的专职抗原提呈细胞,在免疫反应中起着关键的引导和调节作用,它在启动初次免疫应答时既可以激活也可以耐受的方式提呈抗原给 T 细胞。而 GVHD 的发生主要是由供者移植物中的 T 淋巴细胞识别宿主主要和次要组织相容性抗原引起的免疫反应。这些抗原由受者来源的抗原提呈细胞(APCs)提呈后,通过 MHC-I、II 分子结合于供者 T 细胞,使 T 细胞活化并增殖分化成效应 T 细胞,从而攻击受者的靶器官。

吡啶胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3 dioxygenase, IDO)是色氨酸代谢的限速酶,色氨酸是 T 细胞尤其是抗原活化的 T 细胞增殖所必需的氨基酸。研究^[1-2]发现,胎儿免遭母体 T 细胞攻击主要是由于胎盘细胞绒毛中 IFN- γ 作用后的 DC 能够合成 IDO,后者通过降解母胎界面的色氨酸从而抑制 T 细胞的增殖。因此,DC 可能通过 IDO 作用的色氨酸代谢途径来调节 T 细胞的作用。

本研究通过扩增骨髓来源的 DC,用重组腺病毒携带的 IDO 基因体外转染 DC,转染后的 DC 与供体的淋巴细胞共培养,观察对异基因反应性 T 细胞增殖的影响,以期体内预防 GVHD 反应的发生提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

BALB/c(H-2d)、C57BL/6(H-2b)和 C3H(H-2k)小鼠均为雄性,6~8 周龄,购自上海中科院实验动物中心。本实验中 BALB/c 小鼠作为骨髓移植的受体,C57BL/6 小鼠作为供体,C3H 小鼠作为无关第三者。

1.2 主要试剂

携带鼠 IDO 基因的重组腺病毒 AdIDO 由王全兴教授馈赠,携带 LacZ 基因的重组腺病毒 AdLacZ 由本课题组构建。^{[3}H]-TdR 为 Amersham 公司产品;IL-4, GM-CSF 为 R&D 公司产品,Annexin V-FITC/PI 购于 BD 公司,1-甲基色氨酸购于 Sigma 公司,FITC 标记的抗小鼠 CD80、CD86、MHC II 单抗及同型对照为 Chemicon 公司产品,细胞总 RNA 抽提试剂 Trizol 购于 Gibco 公司,RT-PCR 一步法试剂盒购于 TaKaRa 公司;引物合成由 Sangon 公司合成。

1.3 骨髓 DC 的培养及基因修饰

DC 培养参考 Inaba^[3]的方法略作修改,详见文献^[4],收集培养至第 7 天的 DCs,少量无血清培养液悬浮,按重复感染率(MOI)100 加入 AdIDO 或 AdLacZ,孵育 1 h 后再补足 RPMI 1640 和血清,24 h 后收集。转染后的 DC 分别记作 IDO-DC 和 LacZ-DC(用作对照)。培养至第 7 天未转染的 DC 记作 Day-7-DC。

1.4 利用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检

测 AdIDO 在 DC 的表达

引物序列:上游 5'GTA CAT CAC CAT GGC GTA TG-3',下游 5'GCT TTC GTC AAG TCT TCA TTG-3',两引物之间的碱基对为 740 bp。

细胞 RNA 的提取:用 Trizol 抽提试剂裂解细胞,氯仿抽提,乙醇沉淀提取总 RNA,利用一步反应法完成 RT-PCR,建立 50 μ l 反应体系,向 PCR 管中依次加入以下试剂:10 \times 缓冲液 5 μ l, 25 mmon/L 的 MgCl₂ 10 μ l, 10 mmol/L 的 dNTP 5 μ l, RNA 酶抑制剂(40 U/ μ l) 1 μ l, AMV 逆转录酶(5 U/ μ l) 1 μ l, DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 1 μ l, 上游引物和下游引物各 1 μ l, RNA 1 μ l, 无 RNA 酶蒸馏水 24 μ l, 置于 PCR 仪中,50 $^{\circ}$ C 30 min RT 反应,94 $^{\circ}$ C 2 min 逆转录酶失活,随后 94 $^{\circ}$ C \times 0.5 min、60 $^{\circ}$ C \times 0.5 min、72 $^{\circ}$ C \times 1.5 min 共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 7 min 延伸,得扩增产物。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 IDO 的表达产物。

1.5 分析 IDO 基因转染后 DC 表型的变化

分别用 FITC 标记的抗-小鼠 CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、MHC II 单抗,以及同型对照单抗,标记基因转染后 30 h 的 DC 及未转染的 DC,标记后 PBS 洗 2 遍,进行 FACS 分析。

1.6 混合淋巴细胞反应

制备 C57BL/6 小鼠脾 T 淋巴细胞悬液(体外实验代替作为骨髓移植物),以 10:1 与 BALB/c 小鼠来源的 IDO-DC、LacZ-DC(对照)、Day-7-DC(对照)共培养 5 d,用抗 Ia(B21-2)抗体加低毒补体溶去 DC 后,分别收获存活的 T 细胞,在完全培养液中静息 2 d,用作反应细胞。BALB/c(H-2d)和 C3H(H-2k,无关第三者)小鼠来源的 DC 细胞,用丝裂霉素 C(最终质量浓度为 50 μ g/ml)处理用作刺激细胞,与反应细胞以适当比例在 96 圆底细胞培养板共培养 5 d,另设一组 IDO-DC 与 T 细胞的培养液中加入 IDO 抑制剂 1-甲基色氨酸(1-MT)1 000 μ g/ml,结束前 18 h 加入 ³H-TdR(3.7×10^4 Bq/孔)。

1.7 Annexin V/PI 双检法测 T 细胞的凋亡

C57BL/6 小鼠的 T 细胞与 IDO-DC、LacZ-DC、Day-7-DC 共培养 5 d 后,取各组细胞 5×10^5 /ml,用 Annexin V 缓冲液悬浮细胞,加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI,轻轻摇匀,避光室温反应 15 min 后,流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理

采用方差分析检验各组均数间的差异显著性, $P < 0.05$ 为差异显著。采用 q 检验进一步分析组间差异。

2 结果

2.1 AdIDO 基因转染 DC 后 IDO mRNA 的表达

为验证 *IDO* 是否可以通过腺病毒载体有效地转入树突状细胞, 取培养至 7 d 具有典型 DC 特征的细胞, 在无血清的培养液中以 MOI 100 进行 Ad*IDO* 基因及对照组 Ad*LacZ* 病毒的转染, 24 h 收集细胞后, 用 RT-PCR 法检测 DC、*IDO*-DC、*LacZ*-DC 3 种细胞 *IDO* mRNA 的表达, 如图 1 所示, 经过 Ad*IDO* 转染的 DC 有明显的 *IDO* mRNA 的表达。

2.2 Ad*IDO* 转染 DC 后膜表面分子的表达

为验证基因转染有没有影响 DC 表型, 本实验通过检测其主要表面分子 CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、MHC II 等表达情况, 发现没有明显改变 (图 2)。说明 Ad*IDO* 转染 DC 后并没有影响 DC 原有的活性和基本功能。

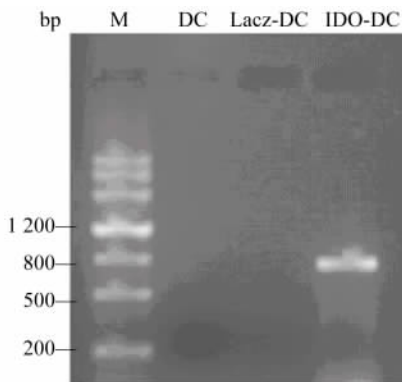


图 1 DC、*LacZ*-DC、*IDO*-DC 细胞中 *IDO* mRNA 的表达

Fig.1 *IDO* mRNA expression on DC, *LacZ*-DC, *IDO* gene modified DC

(供体) 来源的 T 细胞做混合淋巴细胞培养, 3 d 后收集存活的淋巴细胞用作反应细胞, 与丝裂霉素处理的 BALB/c、C3H 来源的 DC 共培养 72 h, [³H]-TDR 掺入法检测淋巴细胞的增殖情况。结果表明与 Day-7-DC、*LacZ*-DC 组相比, 经过 *IDO*-DC 预处理的 T 细胞表现出明显低的反应性, 显著抑制了 T 淋巴细胞的增殖 ($P < 0.05$), 但与无关第三者 (C3H) 细胞共培养时, 仍显示出较强的增殖能力。为进一步证实是否是 *IDO* 在此抑制中发挥作用, 本研究在另外一组 BALB/c 小鼠来源的 *IDO*-DC 与同种 C57BL/6 小鼠来源的 T 细胞反应体系中加入 *IDO* 的抑制剂 1-甲基色氨酸 (1-MT), 结果发现 BALB/c 小鼠来源的 *IDO*-DC 对 C57BL/6 小鼠 T 细胞的增殖抑制作用得到了恢复。实验结果说明 Ad*IDO* 基因修饰的 DC 抑制同种异基因 T 细胞的增殖反应是同种抗原特异性。

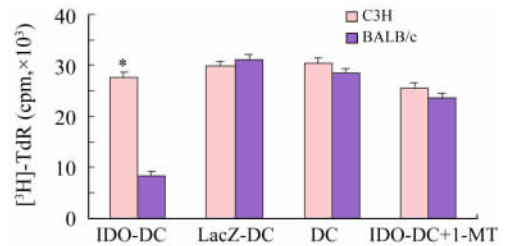


图 3 *IDO*-DC 对同种异基因 T 细胞增殖的抑制

Fig.3 Alloreactive T cells proliferation was inhibited by *IDO*-DC

* $P < 0.05$ vs BALB/c in *IDO*-DC

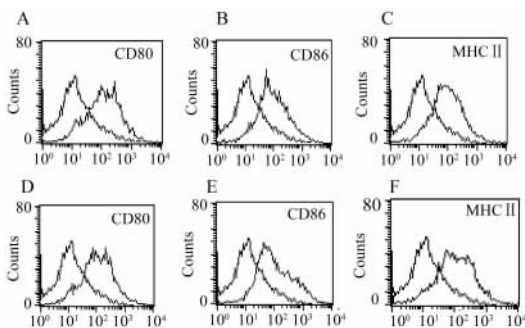


图 2 *IDO* 转染 DC 前后 DC 的表型检测

Fig.2 Phenotypical characteristics of before and after *IDO* gene transfection

A, B, C: Before transfection; D, E, F: After transfection

2.3 Ad*IDO* 转染 DC 后对同种异基因 T 淋巴细胞的影响

为了分析 *IDO* 基因修饰的 DC 对同种异基因 T 细胞增殖反应的影响, 将 BALB/c 小鼠 (受体) 来源的 Day-7-DC、*LacZ*-DC、*IDO*-DC 与异基因 C57BL/6 小鼠脾

2.4 Ad*IDO* 转染的 DC 诱导异基因 T 淋巴细胞凋亡

正常细胞膜磷脂的分布是不对称的, 膜内含有带负电的磷脂, 如磷脂酰丝氨酸, 而膜外表面含有占绝大多数的中性磷脂, 在细胞凋亡早期, 细胞表面发生变化, 其细胞膜内表面的磷脂酰丝氨酸外翻, 与 Annexin V-FITC 结合表现绿色荧光, 凋亡晚期继发性坏死细胞可同时受 Annexin V-FITC 和 PI 标记。进一步采用 Annexin V/PI 双标记法, 检测 *IDO*-DC 与异基因反应性 T 细胞作用后 T 细胞的凋亡情况。结果显示 *IDO*-DC 可明显诱导 T 细胞的凋亡, 而用 *LacZ*-DC、Day-7-DC 处理的对照组未发现明显凋亡 (图 4)。

3 讨论

DC 可由不同的细胞亚群组成。CD8 α^+ DC 被认为是具有免疫耐受原性, 近来人们发现 CD8 α^+ DC 可表达 *IDO* mRNA, 同时 CD8 α^+ DC 可抑制肿瘤生长和 T 细胞的低反应性, 而这种调节功能是依靠 CD8 α^+ DC 产生 *IDO* 来发挥作用的^[2,5]。进一步对具有耐受原性的

CD8 α^+ DC 研究发现,其具有功能性的 IDO 活性:使色氨酸浓度降低,这说明 IDO 在免疫反应中起着重要的调节作用。

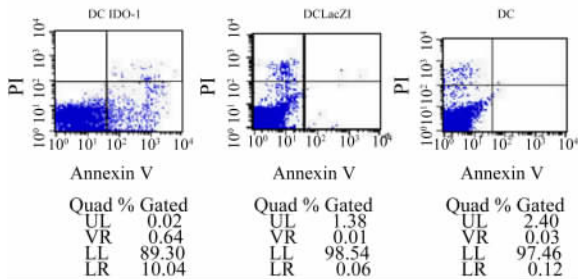


图 4 IDO-DC 诱导 T 细胞的凋亡

Fig. 4 Apoptosis of T cells co-cultured with IDO-transfected DC

把外源性基因转入 DC 的方法包括腺病毒转导、逆转录病毒转导、电击穿孔法以及化学方法等。在目前可供选择的方案中,复制缺陷的腺病毒载体对 DC 来说是一种高效的基因转移方法,其优势是可以同时向 DC 转入目的基因的多个拷贝^[6];利用腺病毒作为载体基因转染效率较高达 90% 以上,既能转染分裂期细胞也能转染非分裂期的组织和细胞;腺病毒载体的细胞毒性作用也是很低的,有报道说重复感染率 (MOI) 达到极高的 1:5 000 时还没有出现显著的细胞毒性^[7]。本实验结果发现,携带无效的对照 *LacZ* 基因、实验组 *IDO* 基因的腺病毒载体在 MOI 为 100 时对 DC 的表型及功能影响微乎其微(图 2),这说明 *IDO* 基因转染 DC 这种应用方式是可行的。进一步通过 RT-PCR 法检测 IDO 在 DCs 的表达发现,对培养至第 7d 的 DC 进行体外 *IDO* 基因转染能够获得有效的靶基因表达(图 1)。

近年来对 IDO 的生物学特性进行了大量的研究发现,表达 IDO 的细胞主要分布在胸腺髓质和次级淋巴管的 T 细胞区,并散见于一些免疫耐受或免疫特赦 (immune privilege site) 组织中,如胸腺、胃肠道黏膜、附睾、胎盘及眼前房等,而且特异性地表达在巨噬细胞和 DCs 上。通过对小鼠和人 DCs 细胞表面表达 IDO 的大量研究发现,DCs 表达 IDO 可能参与了机体的免疫耐受^[8-9]。IDO 参与肿瘤免疫耐受可能与抑制 T 淋巴细胞的增殖反应有关^[10]。近期在小鼠中的研究结果也表明在肿瘤浸润部位的抗原提呈细胞 (APC) 如巨噬细胞、DC 等,均可以通过分泌 IDO 来诱导 T 细胞对肿瘤抗原刺激的免疫耐受,进而间接抑制由 T 细胞介导的抗肿瘤免疫效应,这种抑制作用是可逆的,用 IDO 抑制剂 1-MT 可使 T 细胞增殖抑制得到恢复^[11]。

最近的研究表明,调节性 T 细胞 (Tregs) 可能通过提高自身分泌 IDO 的活性直接参与了 DC 诱导的免疫耐受^[12]。Tregs 细胞表面持续表达 CTLA4,而 CTLA4 能与 DC 细胞表面的 B7 结合,并且这种亲和力明显高于 CD28 与 B7 的结合。DC 提呈抗原至 Tregs 细胞时,如果它是通过 CTLA4(而不是 CD28)与 B7 结合,Tregs 表现为无应答或抑制免疫功能^[13]。大量研究发现,可溶性 CTLA4 可诱导 DC 表达 IDO,可溶性 CTLA4 和 CTLA4⁺ Tregs 细胞均可上调 B220⁺ DC 表达 IDO,通过耗竭色氨酸来抑制 CD8⁺ T 细胞增殖。如果给予 IDO 抑制剂或增殖色氨酸含量,T 细胞增殖抑制作用可以得到恢复^[14-15]。

近年来,有国外研究者将同种反应性供者 T 细胞经注射过继传输给 *IDO* 转基因受者小鼠后,导致小鼠体内供者 T 细胞数量明显减少^[16]。本实验进一步证实 *IDO* 修饰的 DCs 可抑制同种异基因 T 淋巴细胞的增殖反应,并且这种抑制是可逆的,给予 IDO 的抑制剂 1-MT 后又可恢复 T 细胞的增殖作用。

本实验为正在进行的相关体内研究奠定了实验基础,为预防和治疗异基因造血干细胞移植的严重并发症 GVHD 提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism [J]. *Science*, 1998, 281 (5380): 1191-1193.
- [2] Hwu P, Du MX, Lapointe R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation [J]. *J Immunol*, 2000, 164(7): 3596-3599.
- [3] Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6): 1693-1702.
- [4] 楼国良, 王全兴, 陈国友, 等. 可溶性 TNF 受体基因修饰的树突状细胞诱导抗原特异性肿瘤免疫耐受机理 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(2): 88-92.
- [5] Du MX, Sotero-Esteva WD, Taylor MW. Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(2): 133-142.
- [6] Thomson A, Lu L. Dendritic cells as regulators of immune reactivity: Implications for transplantation [J]. *Transplantation*, 1999, 68(1): 1-8.
- [7] Coates PT, Krishnan R, Kireta S, et al. Human myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral interleukin-10 gene construct inhibit human skin graft rejection in humanized NOD-scid chimeric mice [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(16): 1224-1233.
- [8] Fallarino F, Vacca C, Orabona C, et al. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic

cells[J]. Int Immunol, 2002, 14(1): 65-68.

[9] Munn DH, Sharma MD, Lee JR, *et al.* Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. Science, 2002, 297(5588): 1867-1870.

[10] 张文颖, 楼国良. 吡啶胺 2,3 双加氧酶与肿瘤免疫耐受[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(3): 227-229.

[11] Uytendhoeve C, Pilotte L, Theate I, *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. Nat Med, 2003, 9(10): 1269-1274.

[12] Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*[J]. Nat Immunol, 2002, 3(11): 1097-10101.

[13] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4[J].

J Exp Med, 2000, 192(2): 303-310.

[14] Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, *et al.* Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells[J]. Blood, 2005, 105(4): 1574-1581.

[15] Mellor AL, Chandler P, Baban B, *et al.* Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase[J]. Int Immunol, 2004, 16(10): 1391-1401.

[16] Mellor AL, Keskin DB, Johnson T *et al.* Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses[J]. J Immunol, 2002 168(8): 3771-3376.

[收稿日期] 2006 - 06 - 15 [修回日期] 2006 - 09 - 10
[本文编辑] 韩 丹

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0375-01

· 研究简报 ·

DOC-2 在卵巢癌细胞系中的表达及其生物学功能

Effect of DOC-2 (differentially expressed in ovarian cancer 2) on human ovarian cancer cell line

刘淑娟¹, 韩军涛², 辛晓燕¹, 陈必良¹(1. 第四军医大学西京医院妇产科; 2. 第四军医大学西京医院烧伤科, 西安 710032)

人类 DOC-2(differentially expressed in ovarian cancer 2) 位于染色体 5p13, 长约 35 kb, 含有 15 个外显子和 14 个内含子。cDNA 共 3 268 bp, 编码长度为 770 个氨基酸、相对分子质量约为 82 500 的蛋白质。研究表明, DOC-2 属于 Disabled (Dab) 基因家族, 故又称为 DAB2(Disabled 2)。DOC-2 是一个信号转导分子, 不仅参与细胞的生长分化, 而且还具有肿瘤抑制功能, 但其具体作用机制尚不完全清楚。

本实验首先构建了含 p93 cDNA 基因片段的真核表达载体, 进而将其用脂质体介导法转入人卵巢癌细胞系 HO-8910 中。在阳性克隆进行筛选及鉴定的基础上, 对 DOC-2 的功能进行了初步研究。首先通过比较 3 种细胞 8910-P93、8910-pcDNA3.1 和 HO-8910 的生长曲线, 发现转染空载体对细胞的生长增殖无明显影响, 而转染 DOC-2 的细胞在生长增殖方面受到明显抑制, 在生长曲线中表现为到达平台期时间明显滞后。其次采用了³H-TdR 掺入实验比较了这 3 种细胞的 DNA 合成情况, 结果同样证实 8910-P93 的 DNA 合成率明显低于 8910-pcDNA3.1 和 HO-8910(*P* < 0. 01)。实验结果说明, DOC-2 可能通过抑制细胞的 DNA 合成从而明显抑制细胞的生长。

既往研究发现, DOC-2 在正常组织中广泛存在, 尤其在卵巢及乳腺中其表达水平很高。Mok 等研究发现, DOC-2 在肿瘤细胞系中的表达均下调。对正常卵巢、良性、交界性及浸润性卵巢肿瘤的研究表明, DOC-2/DAB2 的表达在恶性卵巢肿瘤组织中出现下调。Zhou 等在对 DOC-2/DAB2 与前列

腺癌的研究中发现:(1) DOC-2/DAB2 与前列腺基底部有关; (2) DOC-2/DAB2 参与了前列腺上皮的生长与分化; (3) DOC-2/DAB2 能抑制前列腺癌细胞的增殖。Tseng 等将 DOC-2/DAB2 转染前列腺癌细胞, 发现细胞增殖率下降, G₁ 期细胞比例上升, 细胞在软琼脂中的克隆形成能力下降。He 等将 DOC-2/DAB2 转染乳腺癌细胞系 MCF-7 和 SK-Br-3, 结果肿瘤细胞的生长密度明显降低, 在软琼脂中的克隆形成能力也下降, 且 *c-Fos* 的表达也明显受抑制。因此 DOC-2 被认为是一个肿瘤抑制基因。

DOC-2/DAB2 的主要结构提示, DOC-2/DAB2 是一种可能的信号分子, 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。今后的研究将就 DOC-2 基因对卵巢癌细胞影响的分子机制做进一步的探讨, 以期在卵巢癌的发病机制及基因治疗方面开辟新的思路。

[关键词] DOC-2; 卵巢癌; 基因治疗

[中图分类号] R735 . 2 [文献标识码] D

[收稿日期] 2006 - 08 - 15 [修回日期] 2006 - 9 - 28

[本文编辑] 韩 丹

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(No. 2003C2023)

[作者简介] 刘淑娟(1973-), 女, 河北石家庄人, 主治医师, 讲师, 主要从事妇科肿瘤方面的研究

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