

## ICOS通过 survivin 维持 T 细胞分裂及存活 \*

杨晓亚 白云\*\* 王艳艳 许雪青 陈雪丹

(第三军医大学基础部医学遗传教研室, 重庆 400038)

**摘要** 有关 T 细胞共刺激分子信号转导方面的研究远落后于其功能研究, 为探讨 T 细胞活化后诱导表达的共刺激分子 ICOS (inducible costimulate) 维持 T 细胞存活、抑制活化后 T 细胞凋亡的作用是否与 survivin 相关, 利用 survivin 重组腺病毒感染活化但不提供共刺激信号的 T 淋巴细胞, 或者在活化后提供 ICOS 信号条件下人工给予优势抑制 survivin 突变基因, CCK-8 及 TUNEL 法分别检测活化晚期上述 T 细胞存活及凋亡情况. 结果显示, T 细胞活化后 2~6 天, ICOS 抗体刺激可以明显增强 survivin 表达, survivin 可维持无 ICOS 信号的 T 细胞存活减少其凋亡, 突变型 survivin 在 ICOS 信号存在下抑制 T 细胞存活使其凋亡增加. 结果提示, 活化后表达的共刺激分子 ICOS 通过 survivin 维持 T 细胞分裂和存活.

**关键词** ICOS, survivin, T 淋巴细胞

**学科分类号** R392

T 细胞活化至少需要两种信号<sup>[1]</sup>, 第一信号来自 T 细胞受体(TCR)与 MHC 分子-抗原肽复合物的特异性结合, 第二信号来自 T 细胞共刺激受体与抗原递呈细胞(APCs)上配体的相互作用. CD28/B7 是最早深入研究的共刺激途径之一, 来自该途径的共刺激信号协助 TCR 启动细胞周期进程, 对 T 细胞的活化和耐受发挥着重要调节作用<sup>[2]</sup>. 但众多证据表明, CD28 并不是唯一的共刺激分子<sup>[3~5]</sup>, 免疫应答后期, 活化后表达的 ICOS (inducible costimulate)等共刺激分子在维持 T 细胞存活、促进 T 细胞功能方面发挥主要作用<sup>[6~8]</sup>.

survivin 是一个分子质量约 16 ku 的凋亡抑制蛋白(IAP)<sup>[9]</sup>. T 细胞内 survivin 的表达水平在活化后 2~4 天达到高峰, 第 6 天下降, 这一时相特点同 OX40、ICOS 等共刺激分子相似. survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子, 另外在细胞周期中也有明确的作用. Survivin 的表达特点及其抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双重功能提示, OX40、ICOS 等迟相作用共刺激分子很可能通过 survivin 维持 IR 晚期 T 细胞分裂及存活. 已有研究表明, OX40 共刺激信号可通过上调 survivin 的表达来调控 T 细胞的寿命<sup>[10]</sup>, ICOS 与 OX40 同样都是活化诱导表达并在 IR (immune response)晚期发挥功能, 那么 ICOS 是否同样通过 survivin 来调节 T 细胞活化和

存活, 迄今为止, 国内外均未见相关文献报道, 本课题研究的目的在于弄清 survivin 与 ICOS 功能上的关联.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康献血员外周血购自西南医院血库; 淋巴细胞分离液购自天津市 TBD 生物技术发展中心; 尼龙棉(聚酰胺纤维)购自上海化纤九厂; 刀豆蛋白(ConA)购自 Sigma 公司; 腺病毒细菌内同源重组系统由美国 Howard Hughes 医学研究所 Bert Vogelstein 教授惠赠; 含野生型及突变型 survivin 基因的真核表达载体由本校宋建勋教授惠赠; 限制性内切酶 *Pme* I 和 *Pac* I 购自 NEB 公司; *Xho* I, *Bgl* II 购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  及 293T 细胞由本实验室保存; 转染试剂 DOTAP、细胞凋亡检测试剂盒购自 Roche 公司; 活细胞计数试剂盒(CCK8 试剂)购自同仁化学研究所; 抗人 survivin 多抗, 仓鼠抗人 CD3、ICOS 单抗, CD25 单抗(FITC 标记)、小鼠抗人 CD69、CD28、OX40、

\*国家自然科学基金资助项目(30200253, 30300170)

\*\* 通讯联系人.

Tel: 023-68753670, E-mail: geneby@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2006-06-06, 接受日期: 2006-10-31

ICOS单抗、PE 标记的抗小鼠 IgG 购自 EB 公司;小鼠抗人 CD40L 单抗购自 BD 公司;生物素标记羊抗仓鼠 IgG、PE 标记的链亲和素购自北京中山生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1** 原代 T 细胞的分离纯化. 取新鲜正常人外周血采用密度梯度离心法, 利用淋巴细胞分离液得单个核细胞悬液, 而后采用玻璃器黏附法去除其中的单核细胞. T 细胞纯化采用尼龙毛柱过滤法<sup>[11]</sup>.

**1.2.2** T 细胞的培养及刺激活化. 用 DMEM 完全培养基调整 T 淋巴细胞至  $1 \times 10^6$  /ml, 50 mg/L 丝裂原 ConA 刺激. 分别在刺激 24 h、48 h 后 FACS 检测活化标志分子 CD69、CD25 的表达以反映 T 细胞的活化状态. 刺激 48 h 的 T 细胞 FACS 检测共刺激分子 ICOS, OX40, CD40L 的表达.

**1.2.3** 提供 ICOS、OX40 信号, 免疫印迹法分析 survivin 蛋白的表达. 分别用 ICOS、OX40 抗体包被酶标板, 以期表达共刺激分子的 T 细胞加入其中后能够交联相应的共刺激分子, 活化相应的共刺激通路, 另设包被有同型抗体的培养孔做对照. 在 2、4、6 天时分别收集 T 细胞, 蛋白质印迹检测 survivin 蛋白表达情况.

**1.2.4** 构建 AD-survivin 及 AD-T34A-survivin 重组腺病毒载体. 设计引物加入新的克隆位点, 用 PCR 的方法由 pEGFP-C1 载体扩增所需目的片段, 然后将该片段插入腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV, 在大肠杆菌 BJ5183 中与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 进行同源重组, 阳性重组子在脂质体介导下转染病毒包装细胞 293T. 当显微镜下观察到 90%以上细胞出现病变后, 收集沉淀的细胞在  $-80^{\circ}\text{C}$  和  $37^{\circ}\text{C}$  反复冻融 4 次, 每次 2 h, 最大转速离心收集上清. 将阳性的重组腺病毒大量扩增, 收集培养液和反复冻融的细胞离心液. 取 1 ml 反复冻融裂解液于  $37^{\circ}\text{C}$  浸染 293T 细胞 2 h, 弃浸染液, 换成含 10%小牛血清 DMEM 继续培养以扩增病毒. 如此连续浸染扩增几代后, 收集细胞, 反复冻融后取上清即为病毒原液, 利用 GFP 阳性细胞计数法测病毒滴度. AD-survivin 及 AD-T34A-survivin 感染 3T3 细胞, RT-PCR 及蛋白质印迹检测细胞中 survivin 表达, 反应腺病毒对真核细胞的感染能力.

**1.2.5** 腺病毒感染 T 细胞. 制备的 AD-survivin 或 AD-T34A-survivin 腺病毒带有 2 个独立的 CMV 启动子表达盒, 一个表达目的基因, 一个表达 EGFP.

感染 24 h 后在荧光显微镜下观察到 T 淋巴细胞中 EGFP 荧光, 可间接反映目的基因的表达. T 细胞活化后 24 h, 加入感染复数(MOI)为 30、50、100 的 AD-survivin 或 AD-T34A-survivin 腺病毒, 感染 2 h 后加入完全 DMEM 培养液. 对照组应用 AD-GFP 病毒. 24 h 及 48 h 后 FACS 检测转染后 EGFP 的表达, 反映目的基因的表达情况.

**1.2.6** CCK-8 试剂检测 T 细胞增殖. 收集各种处理因素的 T 细胞, 调整细胞数为  $1 \times 10^6$  /ml, 96 孔酶标板每孔加入 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液. 每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK8 试剂,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 检测 450 nm 吸光度, 吸光度反映每孔中活细胞的数量, 每孔中最初注入的细胞数相同, 比较经过处理后存活细胞数即可反应细胞的存活情况.

**1.2.7** TUNEL 法检测细胞凋亡<sup>[12]</sup>. 收集各种处理因素的 T 细胞, 参照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书, 进行凋亡检测. TUNEL 反应混合物作用后 DAB 显色. 最后用一滴 PBS 重悬细胞沉淀, 滴至载玻片上, 显微镜下分别计数总细胞数及凋亡细胞数. 每种处理因素分别计数 3 个不同视野, 每视野中总共计数 200 个细胞.

**1.2.8** 统计学分析. 列出实验数据, 均值用  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用 SPSS12.0 软件进行方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有显著性意义,  $P < 0.01$  表示差异具有非常显著性意义.

## 2 结 果

### 2.1 T 细胞活化后表面共刺激分子的检测

ConA 刺激 24 h 后, 38.87%的 T 淋巴细胞上有高水平的 CD69 表达(图 1a), ConA 刺激 48 h 后, 42.59%的 T 淋巴细胞上有高水平的 CD25 表达(图 1b), 表明 T 淋巴细胞充分活化. ConA 刺激 48 h 后, 流式细胞仪检测淋巴细胞表面 ICOS 及其他共刺激分子的表达情况, 与不加一抗的阴性对照相比, ICOS 的阳性率为 80.20%, 其他共刺激分子 CD40L、OX40 均有不同程度的表达(图 1c).

### 2.2 ICOS 对 survivin 表达的影响

为确定 T 细胞中 survivin 的表达是否受 ICOS 信号的调节, 我们用蛋白质印迹分析活化 T 细胞中 survivin 的表达情况. T 细胞活化后, 用激动型共刺激分子 (ICOS, OX40) 抗体提供共刺激信号, 在活化后第 2、4、6 天检测 survivin 的表达情况, 其表达明显高于对照组(图 2).

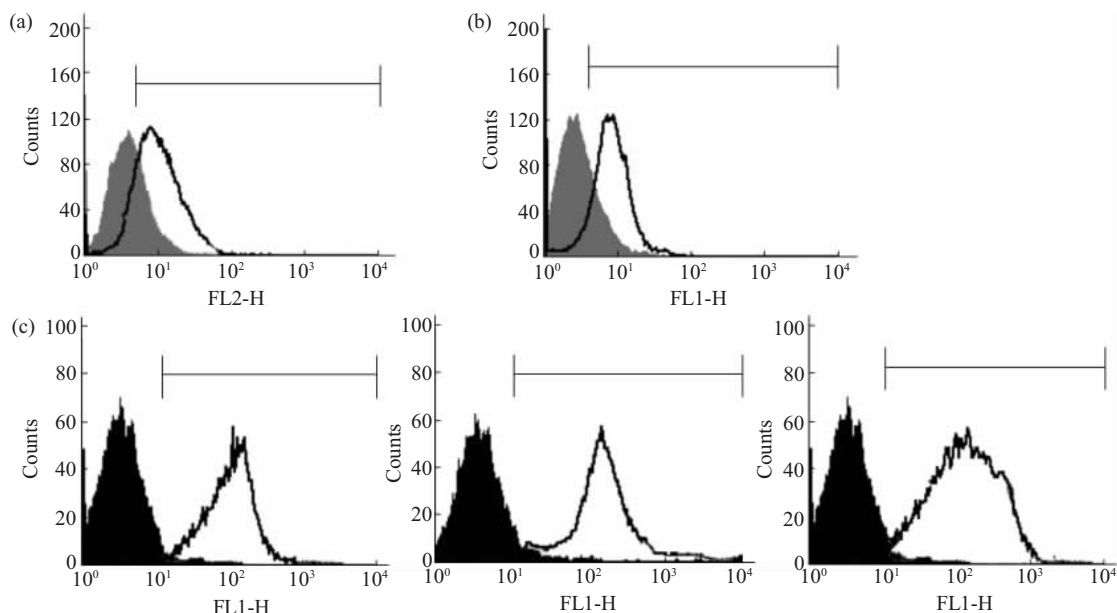


**Fig. 1 Co-stimulatory molecules measured by flow cytometry after T cell activation**

(a) CD69 expression 24 h after stimulation, the percentage of CD69<sup>+</sup> T lymphocytes is about 38.87%. (b) CD25 expression 48 h after stimulation, the percentage of CD25<sup>+</sup> T lymphocytes is about 42.59%. (c) CD40L, OX40 and ICOS cell surface expression in activated T lymphocytes.

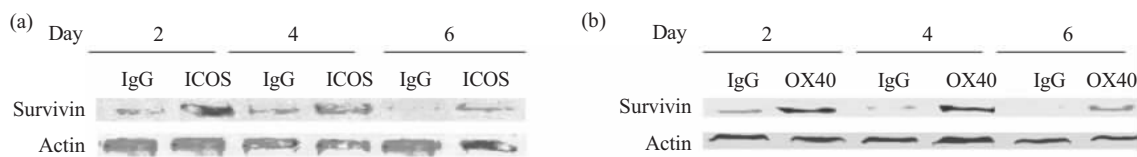


**Fig. 2 Influence of ICOS, OX40 signals on the expression of survivin protein in activated T cells detected by Western blot**

(a) Up-regulation of survivin after stimulation with ICOS. (b) Up-regulation of survivin after stimulation with OX40.

### 2.3 Survivin 腺病毒的构建和在 T 细胞中的表达

构建野生型(AD-survivin)和 Thr34→Ala 突变型(AD-T34A-survivin)腺病毒, 取第 3 代腺病毒感染 3T3 细胞, 培养 48 h 后, RNA 及蛋白质水平分别检测 survivin 的表达, 感染后的细胞 RT-PCR 扩增出 450 bp 的特异片段, 未感染的对照细胞未扩增出相应条带(图 3a). 蛋白质印迹显示感染后的细胞较未感染的细胞 survivin 表达大量增加(图 3b), 表明重组腺病毒 AD-survivin 或 AD-T34A-survivin 可在真核细胞中高效表达. 腺病毒感染细胞后, EGFP 的表达可间接反映目的基因的表达情况. 用 MOI 为 100 的腺病毒感染 T 细胞, 24 h 和 48 h 后流式细胞仪检测到不同程度的 EGFP 表达(图 3c).

### 2.4 Survivin 基因在 ICOS 信号缺陷的 T 细胞表达, 维持细胞正常分化存活

ConA 刺激后 24 h 用 AD-survivin 或对照 AD-GFP 腺病毒分别感染 T 淋巴细胞, 置于包被有 ICOS、OX40、CD28、CD40L 抗体或同型对照抗体的 96 孔酶标板中. 活化后第 6 天用 CCK-8 试剂检测, 比较 T 细胞的存活情况. 无共刺激信号的幼稚 T 细胞在感染 survivin 病毒的情况下与 ICOS、OX40 共刺激信号活化的对照组相比, 吸光度无明显变化, 但是对比 CD28、CD40L 共刺激信号活化的对照组吸光度明显增加(图 4a). TUNEL 法检测 T 细胞凋亡, 显微镜下计数细胞总数及凋亡细胞数, 红色箭头所示为凋亡细胞, 胞核深染, 黑色箭头所

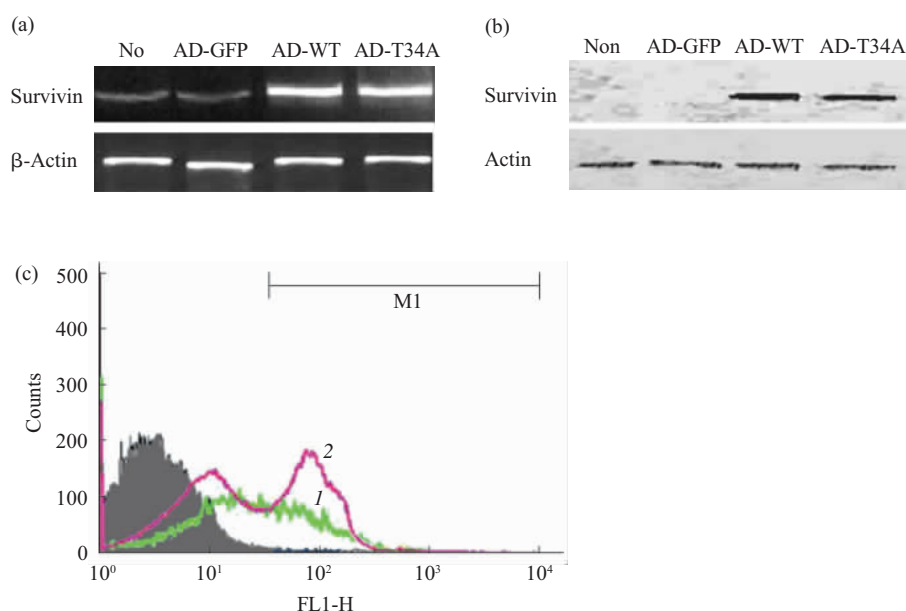


**Fig. 3** Construction and expression of AD-survivin and AD-T34A-survivin adenovirus

(a) RT-PCR analysis of survivin expression in the transfected 3T3 cells. (b) Western blot analysis of survivin expression in the transfected 3T3 cells. (c) FACS analysis of GFP expression in the transfected T cells. 1: EGFP expression 24 h after transfection; 2: EGFP expression 48 h after transfection.

示为正常细胞, 不被染色 (图 5). T 细胞活化后腺病毒转染 survivin 基因, 在无共刺激信号存在的情况下, 第 6 天 200 个 T 细胞中凋亡细胞数为 40, 相较于提供 ICOS、OX40 信号但不转染 survivin 基因的对照组凋亡 T 细胞数 (ICOS: 44; OX40: 31) 无显著差异, 但是比只活化 CD28 或 CD40L 信号的对照组凋亡细胞数 (CD28: 75; CD40L: 69) 明显减少 (图 4b).

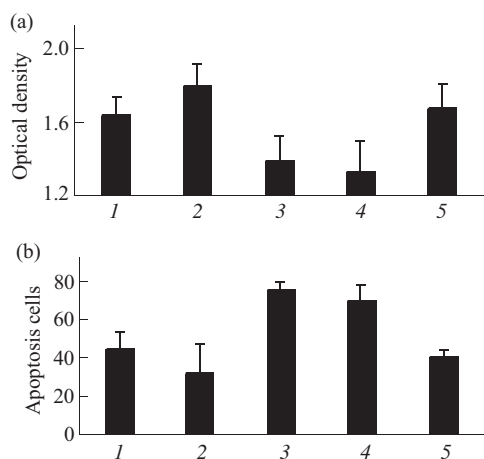


**Fig. 4** Survivin sustains co-stimulatory deficient T cells survival

(a) Without co-stimulatory signals, survivin sustains T cells survival. (b) Without co-stimulatory signals, survivin inhibits T cells apoptosis. 1: ICOS+AD-GFP; 2: OX40+AD-GFP; 3: CD28+AD-GFP; 4: CD40L+AD-GFP; 5: Control IgG+AD-survivin.

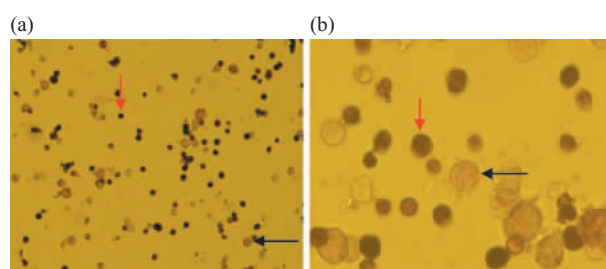


**Fig. 5** Apoptosis analysis of T lymphocyte by TUNEL

(a) 100 $\times$ ; (b) 400 $\times$ .  $\blackleftarrow$ : Normal T lymphocyte;  $\color{red}\blackleftarrow$ : Apoptosis T lymphocyte.

## 2.5 ICOS 信号存在的条件下, survivin 突变基因可抑制 T 细胞的正常分裂及存活

在活化 ICOS 或其他共刺激通路的情况下用 AD-T34A-survivin 或对照 AD-GFP 腺病毒分别感染活化的 T 淋巴细胞, 活化后第 6 天用 CCK-8 试剂检测, 比较 T 细胞的存活情况. 对 ICOS、OX40 对比组而言, 感染突变型 survivin 病毒的 T 细胞与感染不含目的基因病毒的 T 细胞比较, 吸光度降低, 而 CD28、CD40L 对比组差异不明显 (图 6a). 活化后第 6 天 TUNEL 法检测凋亡, 转染突变型 survivin 后, T 细胞凋亡较之对照组显著增高 (图 6b), 其中 ICOS、OX40 突变型 survivin 转染组与对照组凋亡细胞数差异明显, 而 CD28、CD40L 突

变型 survivin 转染组与对照组凋亡细胞数差异不明显.

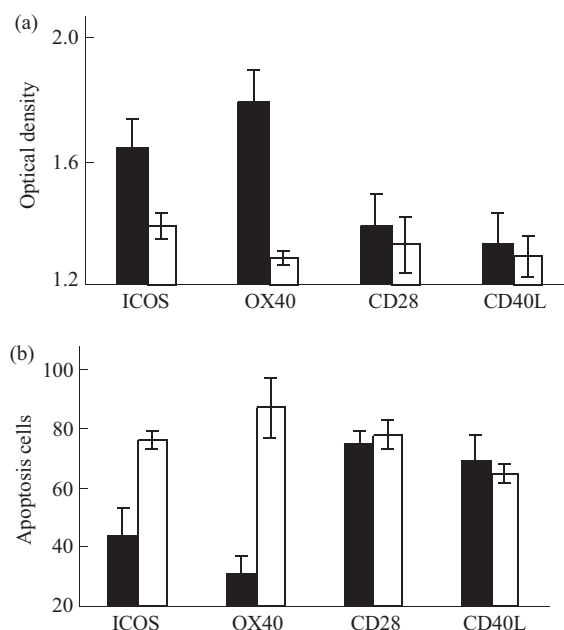


**Fig. 6 Mutant survivin inhibit late-acting co-stimulatory signal positive T cells survival**

(a) Mutant survivin inhibit late-acting co-stimulatory signal positive T cells survival. (b) Mutational survivin promote late-acting co-stimulatory signal positive T-cell apoptosis. □: AD-T34A-survivin; ■: AD-GFP.

### 3 讨 论

T 淋巴细胞的共刺激分子种类繁多, 不同的共刺激信号发挥功能有不同的时相特点, 其中, CD28、CD40L 是在 T 细胞活化早期发挥作用的共刺激分子, 主要功能是协助 TCR-MHC/ 抗原肽启动细胞增殖和细胞因子分泌. 但是如果在 1~2 天内接受不到后续刺激, 大多数 T 细胞将会凋亡<sup>[13]</sup>. ICOS、OX40 等分子 T 细胞活化后才被诱导表达, 作用于免疫应答的效应和记忆阶段, 在免疫应答晚期, 维持 T 细胞的功能及存活主要依赖这些分子. 有关共刺激分子信号传导方面的研究远远落后于其功能的研究, 虽然有研究表明 CD28、OX40 均能增强抗凋亡分子 Bcl-xL 及 Bcl-2 的表达以抑制凋亡, 维持 T 细胞存活, 但 Bcl-xL 及 Bcl-2 在静息状态的 T 细胞上也有表达, 而且 Bcl-2 基因敲除小鼠的 T 细胞功能未见异常, 说明 Bcl-2 并非 T 细胞发育所必需<sup>[14]</sup>, 只有早期的 CD28 信号, T 细胞难免凋亡的命运, 推测一定存在受 OX40、ICOS 控

制且不受 CD28 影响的下游分子发挥晚期维持 T 细胞存活的作用. 寻找 OX40、ICOS 等迟相作用的共刺激分子维持 T 细胞分裂、抑制活化后凋亡的蛋白质, 对于阐明它们的信号传导及临床应用具有重要意义. 体外研究发现, 活化后的 T 细胞 survivin 表达上调<sup>[15]</sup>, 其表达水平在培养的 2~4 天达到高峰, 第 6 天下降, 这一时相特点同 OX40、ICOS 等迟相作用共刺激分子的表达趋势相同. survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子, 另外它在细胞周期中也有明确的作用, survivin 的表达特点及其抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双重功能正符合我们所要寻找的分子的特点. 并且, 有研究已经证实, OX40 信号的确通过上调 survivin 表达来抑制 T 细胞凋亡, 控制细胞周期, 同为 TNFR 蛋白超家族以及 Ig 超家族的 ICOS 与 OX40 表达方式相似, 在维持 T 细胞长期存活方面作用相同, 推测, ICOS 也是通过诱导 survivin 的表达来调节 T 细胞分裂, 抑制 T 细胞凋亡的.

我们观察到, 无共刺激信号的幼稚 T 细胞在感染 survivin 病毒的情况下与 ICOS、OX40 共刺激信号活化的对照组比较, 活化后期的存活细胞数无明显变化. 同时也检测到在无共刺激信号存在的情况下, 活化后第 6 天转染 survivin 基因的 T 细胞凋亡细胞数与提供 ICOS、OX40 信号但不转染 survivin 基因的对照组 T 细胞无显著差异, 上述两方面的结果表明, 在活化晚期维持 T 细胞存活和抑制凋亡方面 survivin 与 ICOS、OX40 共刺激信号效果一致. CD28、CD40L 信号活化组则得出不同结果: 感染 survivin 病毒的 T 细胞对比活化 CD28、CD40L 共刺激信号的 T 细胞表现出了更强的存活优势. CD28、CD40L 都是在 T 细胞活化早期发挥作用的共刺激分子, 功能主要在于启动细胞分裂, 对维持 T 细胞的长期存活来说, 这两种信号是完全不够的, 已经有研究表明, T 细胞活化后, CD28 分子的表达水平随着时间的推移逐渐下降<sup>[16]</sup>, 人工给予 survivin 信号的 T 细胞表达出更强的生存优势, 这也从另一方面证明了 CD28 和晚期发挥功能的共刺激分子信号转导方面的差异, 很显然, survivin 信号与 CD28 信号之间无甚关联.

既然对 T 细胞的存活来说, survivin 蛋白的表达能够达到同提供 ICOS、OX40 共刺激信号同样的效果, 那么, survivin 与这些共刺激分子维持 T 细胞存活的机制有没有必然联系呢? 换句话说, survivin 是否是我们所寻找的 ICOS、OX40 共刺激

信号所调节的效应蛋白呢? 我们的研究发现, 在给予 ICOS、OX40 信号刺激的基础上, 感染突变型 survivin 病毒的 T 细胞与感染不含目的基因病毒的 T 细胞比较, 活化后第 6 天活细胞数减少, 凋亡细胞数显著增高. 这说明, 利用突变型的 survivin 腺病毒影响 survivin 正常功能的同时, ICOS 等共刺激通路的作用也被阻断了, 所以 T 细胞存活受到影响, 这就证实了我们的推论: ICOS 与 OX40 一样都以 survivin 为下游分子, 这些活化后表达、迟相发挥作用的共刺激分子通过 survivin 来发挥维持 T 细胞存活的作用. CD28 和 CD40L 是协助第一信号启动 T 细胞活化的分子, 我们观察到, 只活化 CD28 或 CD40L 共刺激通路的 T 细胞在活化后第 6 天, 凋亡率要比 ICOS 等组高的多, 说明仅有早期的共刺激信号不足以维持 T 细胞存活, 并且, 突变型 survivin 并没有使其凋亡率进一步增加, 再次证明了只是活化后表达, 活化晚期发挥作用的这些共刺激分子才是通过 survivin 蛋白来维持 T 细胞生命的.

survivin 在维持 T 细胞长期存活中是一个关键的枢纽分子, 活化后表达的共刺激分子正是通过 survivin 来维持 T 细胞的分裂和存活. 随着研究的深入, 人们意识到, 通过共刺激途径调节 T 细胞的活化远比最初提出双信号学说时所料想的复杂. 众多共刺激分子尽管有一些功能上的重复, 但似乎每一个共刺激分子都有其不同于其他成员的独特功能, 各个共刺激分子产生的信号在 T 细胞内进行信号整合, 最终产生最适免疫应答. 阐明共刺激分子在协调免疫应答中是如何作用的, 将是一个重大的课题, 我们的结论给这方面的研究提供了一些线索, 阐明共刺激分子发挥作用的机制, 还有很多工作要做.

### 参 考 文 献

- Chambers C A, Allison J P. Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol*, 1997, **9** (3): 396~404
- Lenschow D J, Walunas T L, Bluestone J A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 1996, **14**: 233~258
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee K P, *et al.* Differential T cell costimulatory requirements in CD28 deficient mice. *Science*, 1993, **261** (5121): 609~612
- Bugeon L, Dallman M J. Costimulation of T cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, **162** (4): 164~168
- Frauwirth K A, Thompson C B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest*, 2002, **109** (3): 295~299
- Rogers P R, Song J, Gramaglia I, *et al.* OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity*, 2001, **15** (3): 445~455
- Cannons J L, Lau P, Ghumman B, *et al.* 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol*, 2001, **167** (3): 1313~1324
- Watanabe M, Hara Y, Tanabe K, *et al.* A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4 and CD8 T cell subsets. *Int Immunol*, 2005, **17** (3): 269~278
- Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 1997, **3** (8): 917~921
- Song J, So T, Cheng M, *et al.* Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity*, 2005, **22** (5): 621~631
- Schwartz R H, Jackson L, Paul W E. T lymphocyte enriched murine peritoneal exudate cells. I. A reliable assay for antigen induced T lymphocyte proliferation. *J Immunol*, 1975, **115** (5): 1330~1338
- Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, *et al.* Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother*, 1998, **52** (6): 252~258
- Gramaglia L, Jember A, Pippig S D, *et al.* The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol*, 2000, **165** (6): 3043~3050
- Veis D J, Sorenson C M, Shutter J R, *et al.* Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 1993, **75** (2): 229~240
- Kornacker M, Verneris M R, Kornacker B, *et al.* Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells. *Immunol Lett*, 2001, **76** (3): 169~173
- Raff M C. Social controls on cell survival and death. *Nature*, 1992, **356** (6368): 397~400

## ICOS Regulate Survivin Expression and Sustain T Cell Survival\*

YANG Xiao-Ya, BAI Yun\*\*, WANG Yan-Yan, XU Xue-Qing, CHEN Xue-Dan

(Department of Medical Genetics, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract** To study whether the late-acting co-stimulatory molecules ICOS can suppress the apoptosis and sustain the survival and proliferation of T cells through the survivin pathway, ICOS signals deficient T-cells were infected with adenovirus carried survivin gene, other T-cells were given ICOS co-stimulatory signals, then infected with adenovirus carried dominant-negative mutant survivin gene. Apoptosis and proliferation were determined by TUNEL and CCK-8 respectively. The results show that engagement of ICOS signal increased the expression level of survivin significantly. Survivin can sustain co-stimulatory deficient T cells survival and suppress the apoptosis. Mutant survivin inhibits ICOS signal positive T cells survival and increase its apoptosis. Late-acting co-stimulatory molecules ICOS can suppress the apoptosis and sustain the survival of T cells through the survivin pathway.

**Key words** ICOS, survivin, T lymphocytes

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30200253, 30300170).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-23-68753670, E-mail: geneby@mail.tmmu.com.cn

Received: June 6, 2006 Accepted: October 31, 2006