

人 EB13 蛋白及其突变体的表达及定位研究

邢雪梅¹, 耿慧武¹, 潘林鑫¹, 刘泽宇¹, 姚亮², 邓欢欢², 刘晓颖¹, 范礼斌¹

摘要 目的 研究人 EB 病毒诱导的基因 3 (EBI3) 及其突变体在哺乳动物细胞中的表达及定位差异及其原因。方法 基于 NCBI 数据库中人 EBI3 氨基酸的序列分析, 利用分子克隆技术构建人 EBI3 真核表达质粒 pcDNA3.1-EBI3-FLAG、单独包含氨基端或羧基端 III 型纤连蛋白 (FN3) 结构域的缺失突变体的表达质粒 pcDNA3.1-EBI3 (1 ~ 135)-FLAG 和 pcDNA3.1-EBI3 (125 ~ 230)-FLAG 以及第 210 位天冬氨酸 (Asp) 点突变体 Asp210 的表达质粒 pcDNA3.1-EBI3-D210A-FLAG; Western blot 方法检测 EBI3 及其突变体在 HEK 293T 细胞中的表达; 免疫荧光实验观察人 EBI3 及各突变体在 COS7 细胞中的定位。结果 成功构建了下游携带 FLAG 标签的人 EBI3 及其突变体的真核表达质粒; Western blot 结果显示重组蛋白均能在 HEK 293T 细胞中稳定表达; 经激光共聚焦显微镜观察, EBI3 及其缺失突变体在 COS7 细胞的表达位置发生明显变化。结论 人 EBI3 及其突变体真核表达质粒均能在 HEK 293T、COS7 细胞中成功表达; 人 EBI3 缺失突变体在 COS7 细胞中的定位发生明显变化, 氨基端结构域可能在 EBI3 蛋白的正确定位中发挥重要作用; EBI3 蛋白的第 210 位 Asp 的突变影响了其在细胞内的定位。

关键词 EBI3; 质粒构建; Western blot; 免疫荧光

中图分类号 Q 28; R 392.6

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2016) 11 - 1573 - 06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2016.11.005

EB 病毒诱导的基因 3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3, EBI3) 是从 EB 病毒感染的 B 淋巴细胞中发现并命名, 定位于染色体的 19p13.2/3 区域, 全长 1 161 bp, 编码的成熟 EBI3 蛋白是一种 34 ku 的可溶分泌性糖蛋白^[1]。人体内, EBI3 主要表达于淋巴器官如扁桃体、脾, 提示 EBI3 是重要的免疫因子, 参与免疫系统的调节。EBI3 蛋白也在胎盘中大量表达, 且随着妊娠时间的延续而增加。EBI3 与

p19、p28、p35 及 p40 同属于 IL-12 家族, 与 p40 在结构上有 27% 的同源性^[2]。EBI3 可分别与 p28、p35 结合, 形成细胞因子 IL-27 (p28/EBI3) 和 IL-35 (p35/EBI3)^[3-4]。氨基酸序列分析显示, EBI3 蛋白包括两个串联的经过修饰的 III 型纤连蛋白结构域 FN3, 该结构域通常包含两对半胱氨酸残基形成的二硫键, 以及一个典型的 Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) 的基序^[5-6]。该研究通过运用分子克隆技术结合蛋白质数据库中已知人 EBI3 蛋白的信息, 构建了单独包含氨基端或羧基端 FN3 结构域的 EBI3 的缺失突变体, 分别转染入真核细胞 HEK 293T 和 COS7 细胞, 对突变体的表达及定位进行比较。针对 IL-27 结构的研究^[6]表明, EBI3 蛋白的第 210 位的天冬氨酸 Asp 参与形成带负电荷的蛋白质表面结构, 是影响 EBI3 与 IL-27p28 的对应正电荷区域结合的关键残基。设想 Asp210 可能也参与 EBI3 与其他蛋白的结合, 因此构建了 EBI3Asp210 点突变体的真核重组质粒, 了解其表达和定位的改变。该研究旨在通过探讨结构域及关键氨基酸残基的改变对 EBI3 蛋白在真核细胞中的蛋白表达及细胞定位的影响, 进一步揭示 EBI3 蛋白在人类免疫系统中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、细胞株、质粒和引物 真核表达载体 pcDNA3.1 (+)、*E. coli* DH5 α 感受态细菌、COS7 及 HEK 293T 细胞株、含人 EBI3 全长 cDNA 序列的质粒均为本生物实验室保存; 实验使用引物由上海生工生物有限公司合成。

1.1.2 主要工具酶和试剂 Pfu PCR MasterMix (北京康为世纪生物科技有限公司); PrimeSTAR Max DNA Polymerase (日本 TaKaRa 公司); T4 DNA Ligase、DNA 限制性内切酶 (加拿大 Fermentas 公司); DNA 胶回收试剂盒 (美国 Axygen 公司); 质粒提取试剂盒 (美国 OMEGA 公司); DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (美国 CLARK 公司); LipofectamineTM 2000、Opti-MEM Reduced Serum Medium (美国 Invitrogen 公司); Western blot 相关

2016 - 07 - 07 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院¹ 生物学系、² 生物科学, 合肥 230032

作者简介: 邢雪梅, 女, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

试剂(上海碧云天生物技术研究); Monoclonal anti-FLAG M2(美国 Sigma 公司); TRITC/FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司); 荧光封片胶(丹麦 DAKO 公司); PVDF 膜(加拿大 BioBasic 公司); SuperSignal West Pico 显色试剂盒(美国 Pierce 公司)。

1.1.3 主要仪器 紫外-可见分光光度计(美国 Nano-Drop 公司); Leica TCS SP5 共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); 超声破碎仪(VC750 型,美国 Sonic 公司); 电泳仪(BIO RAD 041BR 型,美国 Bio-Rad 公司); 垂直电泳槽和转移电泳槽(北京六一仪器厂); Bioshine ChemiQ 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 EBI3 突变体设计 分析美国国立生物技术信息中心 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中人 EBI3 序列的结构域信息,EBI3 蛋白的氨基酸结构包括两个串联的保守性区域,即经过修饰的纤连蛋白 III 型结构域 FN3,分别包含第 47~115、129~224 位氨基酸。本实验设计构建了 EBI3 野生型以及分别包含氨基端、羧基端 FN3 结构域的三种突变体,同时构建了将 EBI3 第 210 位天冬氨酸突变为丙氨酸的 Asp210 点突变体,见图 1。

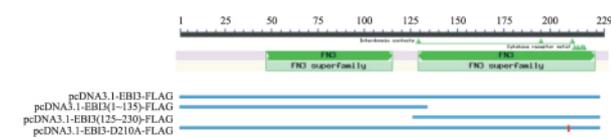


图 1 EBI3 蛋白结构及突变体质粒构建示意图 (红线为 210 位天冬氨酸突变为丙氨酸)

1.2.2 野生型人 EBI3 及缺失突变体构建 运用软件 Primer Premier 5 设计出下游带 FLAG 标签的 EBI3 全长及其突变体的引物(表 1,下划线部分为 FLAG 标签序列),设计的特定基因目的片段均构建

于真核表达载体 pcDNA3.1(+)上,特异性引物均由上海生工生物工程有限公司合成。以含人 EBI3 全长 cDNA 序列的质粒为模板,采用 25 μl PCR 体系,使用厂商推荐的 PCR 反应程序,分别用 Pfu MasterMix 扩增出 EBI3-FLAG、用 PrimeSTAR Max 扩增出 EBI3(1~135)-FLAG 和 EBI3(125~230)-FLAG 目的片段,DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。分别将真核表达载体 pcDNA3.1(+)和回收的 PCR 产物双酶切后进行凝胶电泳,并用 DNA 胶回收试剂盒再次回收,将回收产物用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接 16 h,连接产物转化入 DH5α 感受态细菌,37 °C 培养箱内倒置培养约 16 h,挑取单克隆在含有氨苄青抗性的 LB 培养基中,37 °C 恒温震荡培养约 12 h;碱裂解法提取质粒后做双酶切鉴定,酶切鉴定正确的质粒送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 点突变体构建 构建了点突变体 Asp210 的真核表达重组质粒 pcDNA3.1-EBI3-D210A-FLAG-EBI3 引物设计见表 1。配制突变 PCR 反应液体系,在 1.5 ml 离心管中加 PrimeSTAR Max Premix(2 ×) 12.5 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μl,测序正确的 pcDNA3.1-EBI3-FLAG 质粒模板 30 ng,加双蒸水至 25 μl。反应条件:98 °C 2 min,98 °C 10 s,56 °C 30 s,72 °C 6 min,共 32 个循环,72 °C 10 min,PCR 反应结束后产物 4 °C 保存,先取 5 μl PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小正确后,再将装有余下 PCR 产物的离心管迅速放入冰浴 5 min,之后加入 2 μl Dpn I 酶,37 °C 水浴 2 h 消化模板,随后将离心管内溶液全部转化入 DH5α 感受态细菌中进行培养,提取质粒,酶切鉴定正确的克隆送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 细胞培养 将 HEK 293T 细胞和 COS7 细胞以适当浓度分别接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液(含青霉素和链霉素各 100 U/ml)中,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养,待细胞融合至 80%~

表 1 质粒名称及引物序列

质粒名称	引物序列(5'-3')	酶切位点
pcDNA3.1-EBI3-FLAG	F: CCGGAATTCGGGCCACCATGACCCCGCAGCTT R: CCGCTCGAGCGGCTACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCCTTGCCCAGGCTCAT	EcoR I Xho I
pcDNA3.1-EBI3(1~135)-FLAG	F: CCGGAATTCGGGCCACCATGACCCCGCAGCTT R: CCGCTCGAGCGGCTACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCCACGCCCTTCTGGAGG	EcoR I Xho I
pcDNA3.1-EBI3(125~230)-FLAG	F: CCGGAATTCGGGCCACCATGCACATCATCAAGCCCGA R: CCGCTCGAGCGGCTACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCCTTGCCCAGGCTCAT	EcoR I Xho I
pcDNA3.1-EBI3-D210A-FLAG	F: ACCTCACAGCCTACGGGGAAGTGAAGTACTGGA R: TCCAGTCACTCAGTCCCCGTAGGCTGTGAGGT	EcoR I Xho I

序 结果运用 BLAST 软件比对点突变测序序列 ,确
认点突变重组质粒序列正确 ,见图 3C。

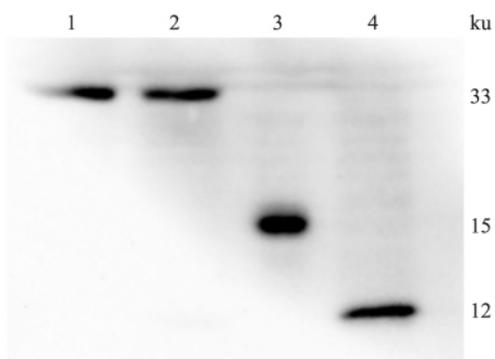


图4 Western blot 检测 EB13 及缺失
突变体在 HEK 293T 细胞中的表达

1: 转染 pcDNA3.1-EB13-FLAG 的细胞裂解液; 2: 转染 pcD-
NA3.1-EB13-D210A-FLAG 的细胞裂解液; 3: 转染 pcDNA3.1-EB13(1
~ 135) -FLAG 的细胞裂解液; 4: 转染 pcDNA3.1-EB13(125 ~ 230) -
FLAG 的细胞裂解液

2.3 EB13 及其突变体在 HEK 293T 细胞中的表达

转染 48 h 后 ,收集细胞 ,Western blot 检测到 HEK

293T 细胞裂解液中野生型和突变体蛋白 ,其分子量
与预期分子量一致 ,即 EB13-FLAG、EB13-D210A-
FLAG 的分子量均为 33 ku ,EB13(1 ~ 135) -FLAG、
EB13(125 ~ 230) -FLAG 的分子量分别为 15 ku 和
12 ku。见图 4。

2.4 EB13 及其突变体在 COS7 细胞中的定位

转染 24 h 后经激光共聚焦显微镜观察: 野生型 EB13
在胞质中大量表达且存在斑块状分布 ,细胞核中有
极少量表达; 缺失突变体 EB13(1 ~ 135) -FLAG 在胞
质中表达大幅减少 ,在核膜处和细胞核内表达增多;
EB13(125 ~ 230) -FLAG 表达主要集中于核膜和核
内 ,细胞质中少量表达; Asp210 点突变体的表达蛋
白 EB13-D210A-FLAG 在胞质、核膜与核内均有表
达。见图 5。

3 讨论

固有免疫系统是机体防止外来病原体侵袭的天
然防线 ,EB13 蛋白通过构成不同的细胞因子 ,在机
体免疫系统中发挥着免疫防御和免疫调节的作用。
一方面可以诱导产生 IFN γ ,促进 Th1 细胞的分化和

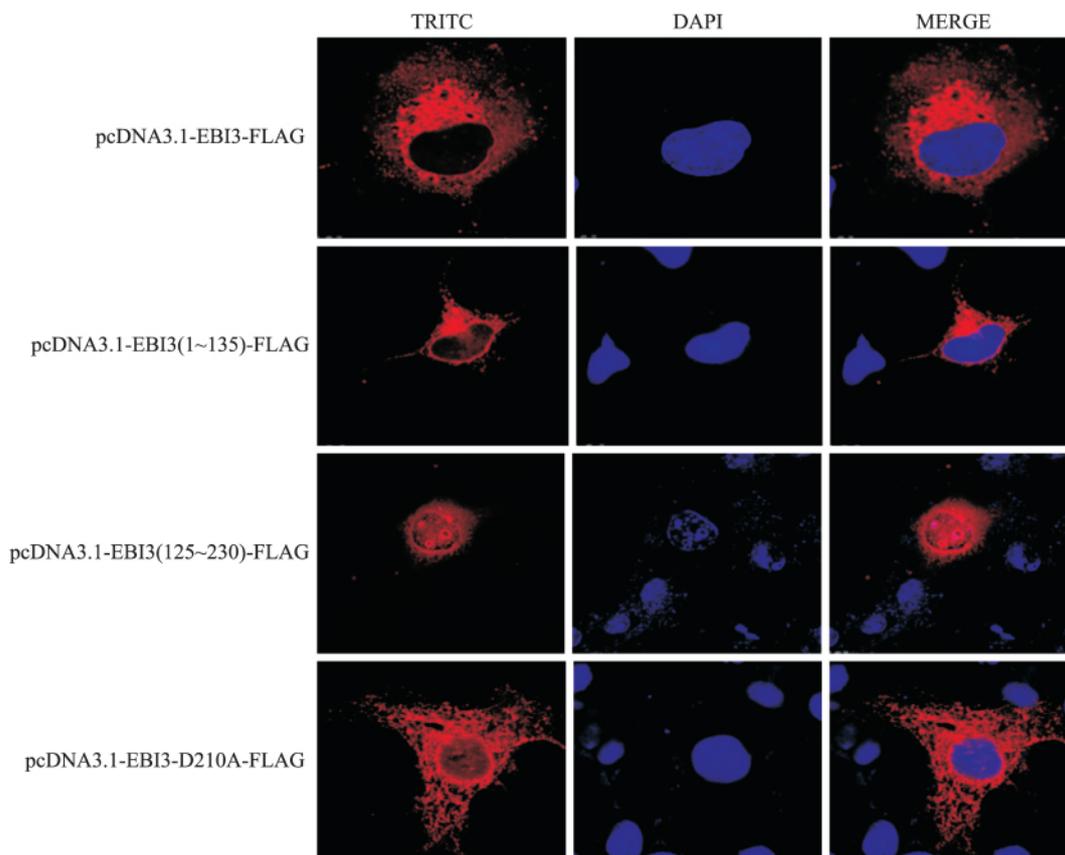


图5 EB13 及其突变体在 COS7 细胞中的表达及定位 ×1 500
TRITC: 含 FLAG 标签的蛋白; DAPI: 细胞核; MERGE: 叠加图

增殖;另一方面通过抑制 T 细胞增殖等防止过度的炎症反应的发生^[7-8]。机体中的 EBI3 蛋白与 IL-12、IL-23 共同由单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞以及 B 细胞等合成,通过病原体特异性抗体识别模式被激活而快速发挥非特异性抗感染等作用^[9-11],另外作为 IL-35 的重要亚基,EBI3 也可以由 Foxp3 + 调节性 T 细胞分泌,亦发现在外周 $\gamma\delta$ T 细胞、CD8 + T 细胞和胎盘滋养层细胞中,EBI3 可与 p35 共同表达^[8,12]。在机体中,EBI3 的分泌量远大于其参与构成 IL-27、IL-35 的需要量,因而 Collison et al^[7]认为多分泌的 EBI3 可能以单体或者同二聚体的形式拮抗 IL-27 或 IL-35 的作用。机体中 EBI3 表达的异常与多种疾病的发病机制密切相关,如炎症性肠炎克罗恩病、严重的肿瘤性疾病霍奇金病、鼻咽癌等,在宫颈癌组织中亦发现 EBI3 表达量显著提高^[13-14]。

本研究成功构建了野生型 EBI3 及分别包含氨基端、羧基端结构域的缺失突变体的真核表达质粒,并且构建了将 210 位天冬氨酸突变为丙氨酸的定点突变真核表达质粒,转染至真核细胞 HEK 293T、COS7 细胞系中均能成功表达。免疫荧光定位显示野生型 EBI3 主要在 COS7 细胞胞质中呈斑块状分布,且位于胞核的一侧,疑似分布在内质网上,Devergne et al^[11]也认为 EBI3 蛋白分子倾向于以非成熟的形式与分子伴侣 calnexin 结合积聚于内质网上,但仍需进一步通过对内质网进行荧光标记加以确认。EBI3(1~135)-FLAG 融合蛋白中包含了氨基端及一个 FN3 结构域,与野生型相比,EBI3(1~135)-FLAG 在胞质中的分布减少,但在胞质内仍可见斑块状集中分布,EBI3(125~230)-FLAG 融合蛋白中包含了另一个位于羧基端的 FN3 结构域,该突变体蛋白分子较集中分布在核膜,在胞质中表达量极低。比较免疫荧光的定位差异,可以推测 EBI3 蛋白分子中的氨基端存在重要的结构帮助其定位于胞质,该结构对于 EBI3 蛋白的分泌亦发挥重要作用;EBI3 蛋白分子中的两个 FN3 结构域则可能参与了 EBI3 蛋白与其他蛋白分子的结合过程。Asp210 突变体的表达蛋白 EBI3-D210A-FLAG 在胞质内形成的斑块较为均匀,其在核膜处的分布也较集中,推测 EBI3 蛋白的第 210 位的 Asp 既是影响该蛋白分子与 p28 结合的关键残基,也可能影响其在胞内定位。

本课题组在前期的酵母双杂交文库筛选工作中发现 EBI3 蛋白可与多个蛋白相互作用,但是作用的具体结构位置尚不明确。本实验通过研究含有

EBI3 不同结构域突变体及 Asp210 点突变体的蛋白表达和定位差异,为后续进一步揭示 EBI3 蛋白的功能提供重要的细胞学基础。

参考文献

- [1] Devergne O, Hummel M, Koeppen H, et al. A novel interleukin-12 p40 related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes [J]. *J Virol*, 1996, 70(2): 1143-53.
- [2] Devergne O, Coulomb-L'Hermine A, Capel F, et al. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, through-out human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(5): 1763-76.
- [3] Kastelein, R A, Hunter C A, Cua D J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 221-42.
- [4] Goriely S, Neurath M F, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(1): 81-6.
- [5] Bazan J F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(18): 6934-8.
- [6] Rousseau F, Basset L, Froger J, et al. IL-27 structural analysis demonstrates similarities with ciliary neurotrophic factor (CNTF) and leads to the identification of antagonistic variants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(45): 19420-5.
- [7] Collison L W, Vignali D A. Interleukin-35: odd one out or part of the family? [J]. *Immunol Rev*, 2008, 226: 248-62.
- [8] Collison L W, Workman C J, Kuo T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function [J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 566-9.
- [9] Ma X, Chow J M, Gri G, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(1): 147-57.
- [10] Pflanz S, Timans J C, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4 + T cells [J]. *Immunity*, 2002, 16(6): 779-90.
- [11] Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, et al. IL-27 and IFN- α signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12R β 2 in naive T cells [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2003, 23(9): 513-22.
- [12] Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(22): 12041-6.
- [13] Hou Y M, Dong J, Liu M Y, et al. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 in cervical cancer: Association with clinicopathological parameters and prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 330-4.
- [14] Schmidt C, Giese T, Ludwig B, et al. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(1): 16-23.

Expression and localization of human protein EB13 and its mutants

Xing Xuemei, Geng Huiwu, Pan Linxin, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To analyze expression and the reason of different localization among wild-type EB13(Epstein-Barr virus-induced gene 3) and its mutants in mammalian cell lines. **Methods** Based on the analysis of amino acid sequence from NCBI database, the human EB13 eukaryotic expression plasmids pcDNA3.1-EB13-FLAG was constructed, its mutants pcDNA3.1-EB13(1-135)-FLAG and pcDNA3.1-EB13(125-230)-FLAG which contained single FN3 domain in amino terminal or carboxy terminal and EB13 Asp210 point mutant pcDNA3.1-EB13-D210A-FLAG were also constructed; Western blot analysis was applied to detect the expression of the recombinant eukaryotic expression plasmids in mammalian HEK 293T cells and immunofluorescence technique was used to detect the cellular localization in COS7 cell lines. **Results** The recombinant eukaryotic expression plasmids with downstream FLAG-tag of human wild-type EB13 and its mutants were successfully constructed; Western blot showed that the recombinant proteins could stably express in HEK293T cells; confocal fluorescence microscopy results indicated the significant changes in localization of the mutants of EB13. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmids of human wild-type EB13 and its mutants can successfully express in HEK 293T and COS7 cells. The localization of its deletion mutants in COS7 cells change significantly, indicating domain structure in amino terminal may play an important role in EB13 protein correct location; the Asp210 of EB13 also affects the localization of EB13 within the cell.

Key words EB13; plasmid construction; Western blot; immunofluorescence

(上接第 1572 页)

- [8] DeLeve L D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1740-6.
- [9] Ge X, Nowak G, Ericzon B G. Liver sinusoidal endothelial cell function in rejected and spontaneously accepted rat liver allografts [J]. *Transpl Int* 2008, 21(1): 49-56.
- [10] Matignon M, Aissat A, Canoui-Poitrine F, et al. Th-17 alloimmune responses in renal allograft biopsies from recipients of kidney transplants using extended criteria donors during acute T cell-mediated rejection [J]. *Am J Transplant* 2015, 15(10): 2718-25.
- [11] Denney H A, Whittle R J, Lai J, et al. Regulatory T cells in chronic Graft-Versus-Host disease after extracorporeal photopheresis: correlation with skin and global organ responses, and ability to taper steroids [J]. *Transplantation*, 2016 [Epub ahead of print].
- [12] Li B, Tian L, Diao Y. Exogenous IL-10 induces corneal transplantation immune tolerance by a mechanism associated with the altered Th1/Th2 cytokine ratio and the increased expression of TGF- β [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2245-50.
- [13] Ingelsten M, Gustafsson K, Olausson M, et al. Rapid increase of interleukin-10 plasma levels after combined auxiliary liver-kidney transplantation in presensitized patients [J]. *Transplantation*, 2014, 98(2): 208-15.
- [14] Shouval D S, Biswas A, Goettel J A, et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function [J]. *Immunity*, 2014, 40(5): 706-19.
- [15] Obremski K. Changes in Th1 and Th2 cytokine concentrations in ileal Peyer's patches in gilts exposed to zearalenone [J]. *Pol J Vet Sci*, 2014, 17(1): 53-9.
- [16] Hu A, Li Q, Shi H, et al. Donor-derived bone marrow transfusion produces mixed chimerism and promotes a Th2 shift in Th1/Th2 balance in rat heterotopic small bowel transplantation [J]. *Dig Liver Dis*, 2012, 44(12): 988-94.

T cell immune tolerance induced by LSEC

Jing Yaqing¹, Liu Yi¹, Han Fei², et al

(¹Dept of Genetics, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070;

²Dept of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211)

Abstract Objective To explore the role of LSEC on T cell tolerance. **Methods** T cell apoptosis, cytokine(IL-2, IL-4 and IL-10) expression and secretion of human T cells activated by CD3/CD28 alone and mixed-cultured with human LSEC were detected. **Results** The ratio of cell apoptosis was higher in mixed-cultured T cells than T cells alone. The gene expressions of IL-4 and IL-10 were higher in mixed-cultured T cells than T cells alone, while gene expression of IL-2 had no significant difference in mixed-cultured T cells than T cells alone. The cytokine secretion of IL-2, IL-4 and IL-10 was consistent with gene expression. **Conclusion** LSEC could induce T cell tolerance by decreasing T cell number and altering cytokine secretion.

Key words LSEC; T cell tolerance; mixed culture; apoptosis detection; cytokine