

# 核仁复合孔相关蛋白 4 在活化 T 细胞中的功能探索

尹家军<sup>1,2</sup>, 郭洁<sup>1</sup>, 张建华<sup>1\*</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 山东第一医科大学 基础医学院, 山东 济南 250000

尹家军, 郭洁, 张建华. 核仁复合孔相关蛋白 4 在活化 T 细胞中的功能探索[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4057-4070.  
YIN Jiajun, GUO Jie, ZHANG Jianhua. Functions of nucleolar complex associated 4 homolog in activated T cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4057-4070.

**摘要:** 核仁复合孔相关蛋白 4 (nucleolar complex associated 4 homolog, NOC4L) 是一种重要的核糖体生物发生因子。为从翻译调控方面初步探究其在活化后 T 细胞中的作用, 本研究首先利用构建好的 *Noc4l<sup>mCherry</sup>* 转基因报告小鼠, 通过流式细胞术检测 NOC4L 在不同状态下的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中的表达水平; 之后进一步检测在 Th1 和 Th17 细胞极化条件下, NOC4L 随细胞增殖的表达情况; 最后通过一系列体外实验检测在 Th1 和 Th17 细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白质, 探究 NOC4L 发挥作用的可能机制。结果显示, NOC4L 在活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中表达水平增加, 并且 NOC4L 的表达与活化后 T 细胞的增殖水平及分裂特性密切相关; 体外实验发现, 在 T 细胞活化过程中, NOC4L 与核糖体组装及增殖代谢相关蛋白之间存在相互作用。本研究为进一步探究辅助性 T 细胞的转录后调控奠定了基础, 对深入理解 T 细胞的活化和调控机制具有重要意义。

**关键词:** 核仁复合孔相关蛋白 4; 活化 T 细胞; 翻译调控; 细胞增殖

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2502300, 2021YFC2300503, 2022YFC2304705)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2502300, 2021YFC2300503, 2022YFC2304705).

\*Corresponding author. E-mail: zhangjh@im.ac.cn

Received: 2024-04-16; Accepted: 2024-06-24; Published online: 2024-06-25

# Functions of nucleolar complex associated 4 homolog in activated T cells

YIN Jiajun<sup>1,2</sup>, GUO Jie<sup>1</sup>, ZHANG Jianhua<sup>1\*</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microorganisms and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 School of Basic Medical Sciences, Shandong First Medical University, Jinan 250000, Shandong, China

**Abstract:** Nucleolar complex associated 4 homolog (NOC4L) is a key factor in ribosome biogenesis, and this study aims to investigate its roles in activated T cells from the perspective of translation regulation. Firstly, flow cytometry was employed to determine the expression levels of NOC4L in the CD4<sup>+</sup> T cells under different conditions in the transgenic reporter mice expressing *Noc4l*<sup>mCherry</sup>. Subsequently, the expression of NOC4L along with cell proliferation was examined under Th1 and Th17 polarization conditions. Finally, *in vitro* experiments were conducted to identify the proteins interacting with NOC4L during the activation of Th1 and Th17 cells, on the basis of which the potential mechanisms of NOC4L were explored. The results showed that the expression level of NOC4L increased in activated CD4<sup>+</sup> T cells, and the expression of NOC4L was closely associated with the proliferation and division of activated T cells. The *in vitro* experiments revealed interactions between NOC4L and proteins involved in ribosome assembly and cell proliferation during T cell activation. These findings lay a foundation for probing into the post-transcriptional regulation in helper T cells and hold profound significance for understanding the activation and regulatory mechanisms of T cells.

**Keywords:** nucleolar complex associated 4 homolog (NOC4L); helper T cells; translational regulation; cell proliferation

核糖体是一种高度复杂的蛋白质翻译机器, 主要由核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 和核糖体蛋白质(ribosomal proteins, RPs)组成。rRNA 与 RPs 被排列成两个大小不同的亚基, 核糖体的大小亚基相互配合, 以 mRNA 为模板, 将 tRNA 运送而来的 RNA 翻译为蛋白质。长时间以来, 核糖体被认为都是均一保守的, 但随着研究的深入, 人们发现核糖体也具有调控功能<sup>[1-3]</sup>。在哺乳动物中, 核糖体本身由许多成分组成, 其中任何一种成分的改变以及翻译修饰都会导致核糖体的异质性<sup>[4]</sup>。此外, 每种核糖体均会有其关键性的核糖体蛋白质, 这些特异性最终可从时间和空间层面对蛋白质的翻译

过程进行调控<sup>[5-6]</sup>。

核仁复合孔相关蛋白 4 (nucleolar complex associated 4 homolog, NOC4L)也被称为 NOC4, 主要位于核仁和胞质中, 是酵母菌 *Noc4p* 的同源物<sup>[7]</sup>。*Noc4p* 和 *Nop14p* 形成复合物, 主要参与酵母菌核糖体小亚基 40S 的成熟及核仁向胞质的输出过程<sup>[8]</sup>。从公共数据库中检索到的正常组织 RNA-Seq 数据显示, NOC4L 在人类免疫器官如胸腺、脾脏和淋巴结等以及生殖细胞如睾丸、卵母细胞中高表达<sup>[7]</sup>, 缺乏 NOC4L 的卵母细胞在早期胚胎发育阶段死亡。实验室之前的研究发现 NOC4L 可通过调控核糖体的生物发生过程来特异性调控调节性 T 细胞(regulatory T

cells, Tregs)和常规 T 细胞(conventional T cells, Tconvs)的激活过程,主要是在 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)启动早期发挥作用<sup>[9]</sup>,但对于 NOC4L 在活化后 T 细胞中的作用仍不清楚。

处于静息状态的初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞在接收到抗原提呈细胞如巨噬细胞、树突状细胞等提呈的抗原刺激后活化,并在相应细胞因子的诱导下向不同的辅助性 T 细胞方向分化<sup>[10-12]</sup>。在 IL-12、IFN- $\gamma$  的诱导下分化为 Th1 细胞<sup>[13-14]</sup>,在抵抗病毒和细胞内病原体的细胞免疫中发挥重要作用,但 Th1 的过度激活会造成组织炎症和自身免疫性疾病<sup>[15]</sup>;在 IL-6、TGF- $\beta$  的诱导下分化为 Th17 细胞,在维持黏膜免疫及自身免疫性疾病的发生发展中具有重要作用<sup>[16-18]</sup>。此外,有研究表明活化后 T 细胞的分裂是不对称的<sup>[19]</sup>,初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞在接受抗原刺激时,细胞与抗原提呈细胞之间的接触并不是均匀的,而是分为近端和远端。其中与抗原提呈细胞紧密接触的细胞一端通常会接收到更强的 TCR 和共刺激信号以及相应细胞因子的诱导信号,细胞分裂时,一些细胞代谢及增殖所需的遗传物质会更多地进入接收到强刺激信号一端的子细胞。一直以来,研究人员都试图通过调控辅助性 T 细胞的活化增殖水平来减缓自身免疫性疾病的发展,但目前的研究方向大多集中在转录水平,对转录后水平即核糖体调控的研究还十分欠缺。

本研究利用实验室前期构建好的 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 转基因报告小鼠,通过 mCherry 追踪小鼠体内活化后 T 细胞中 NOC4L 的表达以及 NOC4L 随活化后 T 细胞增殖的变化,然后通过质谱检测在 T 细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白,从而探究 NOC4L 对活化后的辅助性 T 细胞的重要性,并探讨其发挥作用的可能机制。研究结果为从翻译层面探究调控活化 T 细胞功能的机制奠定了基础,对以后更加清楚地阐述

特化核糖体在免疫系统稳态维持中的作用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

实验小鼠 C57BL/6 (6-8 周龄)雌性 or 雄性小鼠购自北京华阜康实验动物技术有限公司。*Noc4l*<sup>mCherry</sup> 转基因报告小鼠由本实验室构建并保存。小鼠均饲养在中国科学院微生物研究所无特定病原体(specific pathogen free, SPF)环境中。所有动物实验均经过中国科学院微生物研究所伦理委员会批准(许可证号:SQIMCAS2021104)。

### 1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBSFBS)、GlutaMax、MEM non-essential amino acid、EDTA 购自 Gibco 公司;蛋白酶 K、BSA 购自 Ameresco 公司;rhIL-2、TGF- $\beta$ 1、mIL-6、mIL-12 以及 anti-IFN- $\gamma$  (XMG1.2)购自 Peprotech 公司;DNA Marker I 购自天根生化科技有限公司;BioMag Goat Anti-Mouse IgG 购自 Qiagen 公司;快速银染试剂盒购自碧云天公司;PMA、Ionomycin、Anti-FLAG<sup>®</sup> M2 磁珠、monoclonal Anti-FLAG<sup>®</sup> M2 antibody、羊抗小鼠 IgG 购自 Sigma 公司;CellTrace Violet Cell Proliferation Kit、FITC anti-mouse ICOS 购自 Invitrogen;实验所用引物的合成均由生工生物公司完成;Anti-CD3 (2C11)、Anti-CD28 (37.51) 购自 BioXCell 公司;流式抗体 PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD4、APC anti-mouse CD44、PE-Cy7 anti-mouse B220、PE anti-mouse IL-17A、APC-Cy7 anti-mouse CD62L 购自 eBioscience 公司;Monesin、FITC anti-mouse ICOS、APC anti-mouse IFN- $\gamma$  以及 PE anti-mouse CD8 $\alpha$  购自 Biolegend 公司;其他试剂包括:5 $\times$ Loading Buffer (TaKaRa)、Gel-red (Biotium)、琼脂糖

(Biowest); 50×TAE 溶液、1×PBS、1×FACS、1×红细胞裂解液、1×Perm 以及 4% PFA 等均由本实验室配制。其他生化试剂购自北京现代东方精细化学用品有限公司或者北京化工, 实验中涉及的化学试剂均为分析纯。

### 1.3 流式细胞术鉴定小鼠基因型

小鼠出生后 4 周左右, 从尾静脉取血 5–6 滴至 1 mL 含有 0.5 mol/L EDTA 二钠 (pH 8.0) 的 1×PBS 溶液中; 4 °C、2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液; 加入 1 mL 红细胞裂解液(1×), 室温裂解 2 min, 4 °C、2 000 r/min 离心 2 min 后弃去上清; 加入 1 mL FACS (1×)重悬细胞, 洗去残余裂解液; 配制相应比例的 anti-CD4 抗体稀释液, 加入 20 μL 抗体稀释液重悬细胞, 4 °C避光染色 30 min; 加入 FACS 终止染色, 2 000 r/min 离心 2 min 后弃上清; 加入 200 μL 1×FACS 重悬细胞沉淀, 200 目滤膜过滤至流式小管中, 使用流式细胞仪检测荧光。

### 1.4 小鼠脾脏和外周淋巴结淋巴细胞的分离

使用颈椎脱臼法迅速处死小鼠, 向小鼠体表喷洒 75%酒精使小鼠处于全身湿润状态, 固定小鼠, 剪开表皮和腹膜, 分别取出小鼠外周淋巴结和脾脏, 放置在含有 2% FBS 的 DMEM 新鲜培养基中。使用玻璃片磨砂面分别研磨脾脏和淋巴结, 制成单细胞悬液并转移至 15 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 2 min, 弃上清。脾脏细胞加入 2 mL 1×红细胞裂解液, 室温裂解 2 min, 加入 1 mL 2% FBS DMEM 溶液重悬细胞终止裂解, 2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。分别向含有脾脏和淋巴结细胞沉淀的离心管中加入 800 μL 2% FBS DMEM 溶液重悬细胞并过滤至 1.5 mL EP 管中, 放置在冰上备用。

### 1.5 细胞表面免疫荧光染色

对从小鼠脾脏或外周淋巴结获取的淋巴细胞进行计数, 取  $2 \times 10^6$  个细胞至 1.5 mL EP 管

中, 加入 800 μL 1×FACS 溶液重悬洗涤细胞, 2 000 r/min 离心 2 min 后弃上清。用 1×FACS 溶液配制相应的抗体稀释液, 其中 PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD4 (2.5 μg/mL)、PE anti-mouse CD8α (2.5 μg/mL)、PE-Cy7 anti-mouse B220 (2 μg/mL)、APC anti-mouse CD44 (5 μg/mL)、APC-Cy7 anti-mouse CD62L (5 μg/mL)、FITC anti-mouse ICOS (5 μg/mL), 每管加入 20 μL 抗体稀释液, 4 °C避光染色 30 min。染色结束后加入 800 μL 1×FACS 溶液重悬细胞以终止染色, 2 000 r/min 离心 2 min 后弃上清。每管加入 200 μL FACS 溶液重悬细胞, 200 目尼龙膜过滤去除死细胞以及细胞碎片, 用流式细胞仪分析检测。

### 1.6 细胞因子染色

按照 1.4 中的方法获取脾脏或淋巴结的淋巴细胞后, 取少量细胞进行计数后吸取  $3 \times 10^6$  个细胞至 1.5 mL EP 管中, 加入 800 μL FACS 溶液重悬洗涤细胞, 4 °C、2 000 r/min 离心 2 min 后弃去上清。使用新鲜 RPMI 1640 完全培养基配制含有 10 ng/mL 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、1 μmol/L 离子霉素(ionomycin)以及 1 μmol/L 莫能霉素(monensin)的细胞因子刺激液。每管加入 500 μL 重悬混匀细胞, 放至 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 3–4 h。

收取细胞于 1.5 mL EP 管中, 按照 1.5 中的方法进行表面染色, 每管加入 400 μL 4% PFA 溶液快速重悬细胞, 室温避光固定 8–10 min。加入 800 μL FACS 溶液终止固定, 4 °C、2 000 r/min 离心 2 min 去除上清。加入 800 μL 含有破膜剂 Saponin 的 Perm 液洗涤细胞, 2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。使用 Perm 溶液配制相应的抗体稀释液 PE anti-mouse IL-17A (10 μg/mL)、APC anti-mouse IFN-γ (10 μg/mL), 每管加入 20 μL 重悬细胞, 4 °C避光染色 30 min。加入

800  $\mu\text{L}$  FACS 溶液终止染色, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。加入 200  $\mu\text{L}$  FACS 溶液重悬细胞, 200 目尼龙膜过滤除去死细胞和细胞碎片, 使用流式细胞仪检测细胞荧光。

### 1.7 CD4<sup>+</sup> T 细胞的富集

按照 1.4 中的方法获取小鼠脾脏和外周淋巴结的淋巴细胞后, 分别加入 1 mL 2% FBS DMEM 新鲜培养基, 200 目尼龙膜过滤至 15 mL 离心管中, 取少量细胞计数, 加入培养基调整细胞浓度至  $3 \times 10^7/\text{mL}$ 。每  $3 \times 10^7/\text{mL}$  个细胞加入 2  $\mu\text{g}$  anti-CD19 抗体, 1  $\mu\text{g}$  anti-CD28 (克隆号 2.43) 抗体分别结合 B 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光旋转孵育 30 min。提前准备磁珠, 根据细胞量吸取 Goat-Anti-Rat 磁珠, 通常  $1 \times 10^8$  个淋巴细胞需要 2 mL 磁珠, 加入等体积 Qiagen beads wash buffer 重悬磁珠, 用磁铁(stem cell)吸附磁珠, 弃去上清液, 洗涤 2–3 次, 最后一次加入 2 mL wash buffer 重悬磁珠, 放在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱待用。细胞与抗体孵育结束后, 加入大体积含 2% FBS 的 DMEM 培养基或 1 $\times$ PBS 上下颠倒混匀细胞以终止染色。4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。加入 2 mL Qiagen beads wash buffer 重悬细胞, 200 目滤膜过滤至洗涤好的磁珠中, 上下颠倒混匀后, 4  $^{\circ}\text{C}$  旋转孵育 30 min。孵育结束使用磁铁吸附磁珠, 吸取上清, 200 目滤膜过滤至 15 mL 离心管中。4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。加入 1 mL 2% FBS DMEM 培养基重悬细胞, 获得单细胞悬液, 置于冰上。其中富集淋巴细胞的整个过程均需在无菌超净台进行, 并且实验过程中使用的器械均需要提前高温高压灭菌。

### 1.8 体外 CD4<sup>+</sup> T 细胞的分化

提前 1 d 包被 24 孔板, 用 1 $\times$ PBS 稀释抗体 anti-CD3 至 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , anti-CD28 至 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔加入 300  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜或者 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育

2 h。从 6–8 周龄的小鼠外周淋巴器官中富集得到 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 加入 5 mL 1 $\times$ PBS 重悬细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 3 min, 弃上清。加入 1 mL RPMI 1640 完全培养基重悬细胞, 计数后将细胞浓度调整至  $1 \times 10^8/\text{mL}$ 。

分别配制 Th0、Th1、Th17 型细胞分化条件下的培养基。Th0 型细胞培养液: RPMI 1640 完全培养基中加入 200 U/mL rhIL-2; Th1 型细胞培养液: 加入 5 ng/mL IL-12 和 200 U/mL rhIL-2; Th17 型细胞培养液: RPMI 1640 完全培养基加入 20 ng/mL mIL-6、0.5 ng/mL TGF- $\beta$  和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-IFN- $\gamma$ 。去除包被 24 孔板中的 PBS 溶液, 每孔加入 1 mL 相应的不同分化条件下的 RPMI 1640 培养基以及 20  $\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6$ ) 制备好的细胞, 轻柔晃动培养板使其混合均匀。放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养, 其间每天观察细胞, 细胞充满整个视野后分孔, 并补加新鲜的相应细胞培养液。5–6 d 后收集细胞, 取少部分细胞进行流式染色, 按照上述 1.5、1.6 中的染色方法, 先染表面 CD4 分子, 再染细胞因子 IL-17A 和 IFN- $\gamma$ 。之后利用流式细胞仪分别检测不同培养条件下细胞因子 IL-17A 和 IFN- $\gamma$  的分泌情况。将剩下的全部细胞裂解, 获取蛋白上清后进行免疫共沉淀。

### 1.9 免疫共沉淀

收集富集或培养的细胞于 15 mL 管中, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。加入 10 mL PBS 溶液, 上下颠倒混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清, 重复 3–4 次。细胞计数后取  $7 \times 10^7$  个细胞于 1.5 mL EP 管中, 2 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清, 加入 1 mL 细胞裂解液重悬细胞, 冰上裂解 45 min。4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 吸取蛋白上清至 1.5 mL EP 管中。

轻柔彻底混匀 Anti-Flag M2 Affinity Gel, 吸取 40  $\mu\text{L}$  至冰浴 EP 管中, 并加入 1 mL TBS

平衡洗涤亲和凝胶 Beads, 充分振荡混匀后, 4 °C、8 500 r/min 离心 1 min, 弃去上清, 重复 3-4 次。加入提取的蛋白上清, 短暂振荡轻柔混匀, 4 °C 孵育过夜。4 °C、8 500 r/min 离心 1 min, 弃去上清, 再加入 1 mL TBS 溶液, 短暂振荡轻柔混匀, 4 °C、8 500 r/min 离心 1 min, 弃去上清, 重复 3-4 次。加入 40  $\mu$ L 1 $\times$ SDS 上样缓冲液, 充分混匀, 95 °C 水浴煮沸 7 min, 短暂振荡混匀, -80 °C 保存。

### 1.10 Western blotting 检测

将 1.8 中获取的蛋白混合物加入到 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离, 转印于 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入鼠源性一抗 monoclonal Anti-FLAG<sup>®</sup> M2 antibody (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 加入 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入含有辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗小鼠 IgG (1:2 000) 室温孵育 1 h, 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次后, 加入显色液, 放入化学发光成像仪中显色拍照。

### 1.11 银染

电泳结束后的 SDS-PAGE 凝胶放入 50 mL 固定液中, 放置在摇床上, 室温摇动 30 min 或放入 4 °C 冰箱摇动过夜; 弃掉固定液, 加入 50 mL 30% 乙醇, 室温摇动 20 min 洗去固定液; 弃去 30% 乙醇, 加入 100 mL ddH<sub>2</sub>O 洗去残留乙醇, 室温摇动 30 min; 弃去 ddH<sub>2</sub>O, 加入 50 mL 银染增敏液(1 $\times$ ), 室温摇动 2 min; 弃去增敏液, 加入 100 mL ddH<sub>2</sub>O, 室温摇动 1 min, 重复洗涤 1 次以去除残留增敏液; 弃去 ddH<sub>2</sub>O, 加入 50 mL 银染液(1 $\times$ ), 室温摇动 10 min; 弃去银染液, 加入 50 mL ddH<sub>2</sub>O, 室温摇动 1.0-1.5 min (不要超过 1.5 min); 弃去 ddH<sub>2</sub>O, 加入 50 mL 银染显色液, 室温摇动 3-10 min, 直至出现比较理想的预期蛋白条带; 弃去显色液, 加入 50 mL 银染终止液(1 $\times$ ), 室温摇动 10 min; 弃去银染终

止液, 加入 50 mL ddH<sub>2</sub>O, 室温摇动 2-5 min; 银染后的凝胶可放在 ddH<sub>2</sub>O 中短期保存。

### 1.12 数据分析

流式数据分析均使用 Flowjo 10.4 软件完成, 数据统计均使用 GraphPad Prism 9.3.1 软件完成, 数据显著性差异使用 multiple *t* tests 多重 *t* 检验进行分析。实验均进行 3-6 次重复。其中 \*代表  $P \leq 0.05$ , 差异显著; \*\*代表  $P \leq 0.01$ , 差异非常显著; \*\*\*代表  $P \leq 0.001$ , 差异极显著; \*\*\*\*代表  $P \leq 0.0001$ , 差异极其显著。蛋白质谱结果分析使用质谱分析软件 Mascot 或 MaxQuant, 将得到的质谱数据与数据库中的理论质谱数据进行匹配, 以识别样本中的蛋白质。基于数据库搜索结果的肽段匹配信息, 计算混合蛋白中各个蛋白的相对丰度(emPAI)。根据 score 值(score $\geq 2$ ), unique 肽段 $>2$ , 以及肽段的 expect 值 $\leq 0.01$  来确定蛋白是否存在。之后通过与对照组比较, 剔除掉粘连在 beads 上的干扰蛋白, 确定在活化细胞中可能与 Noc4L 存在相互作用的蛋白, 最后计算各蛋白在不同活化细胞中的相对表达量, 结果用热图表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 NOC4L 在 CD4<sup>+</sup> T 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中有较高的表达水平

有研究表明 NOC4L 在免疫器官如胸腺、脾脏和淋巴结等表达量较高<sup>[7]</sup>, 因此本研究首先检测了 NOC4L 在不同淋巴细胞亚群中的表达水平。实验室前期构建了 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> BAC 转基因报告小鼠, 在该小鼠中通过 mCherry 荧光蛋白可以间接反映 NOC4L 的表达<sup>[9]</sup>。选取 6-8 周的同窝 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 小鼠, 获取小鼠脾脏和淋巴结, 使用流式细胞术分别检测脾脏和淋巴结中 B 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞以及 CD8<sup>+</sup> T 细胞 mCherry 的平均荧光强度。结果发现与 B 细胞相比,

mCherry 在  $CD8^+$  T 和  $CD4^+$  T 细胞中的表达水平较高(图 1)。说明 NOC4L 在不同淋巴细胞亚群中的表达水平不同, 在  $CD8^+$  T 和  $CD4^+$  T 细胞中有着较高的表达水平。

## 2.2 NOC4L 在活化的 $CD4^+$ T 细胞中表达水平增高

$CD4^+$  T 细胞作为免疫系统的主要调节者, 在机体免疫应答过程中具有重要作用。并且  $CD4^+$  T 细胞的效应功能与活化状态有关, 因此接下来本研究分别检测了 NOC4L 在静息和活化的  $CD4^+$  T 细胞中的表达水平。从 6-8 周龄的 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 小鼠体内获取外周淋巴结, 荧光表面抗体染色完成后, 利用流式细胞仪检测淋巴细胞中  $CD44^{\text{hi}}CD62L^{\text{lo}}CD4^+$  T 细胞和  $CD44^{\text{lo}}CD62L^{\text{hi}}CD4^+$  T 细胞中 mCherry 的平均荧光强度。结果发现, 与处于相对静息状态的

$CD44^{\text{lo}}CD62L^{\text{hi}}CD4^+$  T 细胞相比, mCherry 在活化的  $CD44^{\text{hi}}CD62L^{\text{lo}}CD4^+$  T 细胞表达水平增高(图 2A)。此外, 还通过流式检测了 mCherry 在外周淋巴结  $ICOS^+CD4^+$  T 细胞和  $ICOS^-CD4^+$  T 细胞中的平均荧光强度, 发现 mCherry 也是在活化水平较高的  $ICOS^+CD4^+$  T 细胞中表达增强(图 2B)。以上结果说明 NOC4L 在活化的  $CD4^+$  T 细胞中表达水平增高, NOC4L 对于活化的细胞可能更为重要。

## 2.3 NOC4L 表达与活化后 T 细胞的增殖状态相关

$CD4^+$  T 细胞表面的 TCR 在接收到抗原提呈细胞提呈的抗原刺激后活化, 并会在相应细胞因子的诱导下向不同的辅助性 T 细胞方向分化, 从而能够快速有效地针对不同抗原产生免疫应答。此外, 在 T 细胞活化过程中, T 细胞

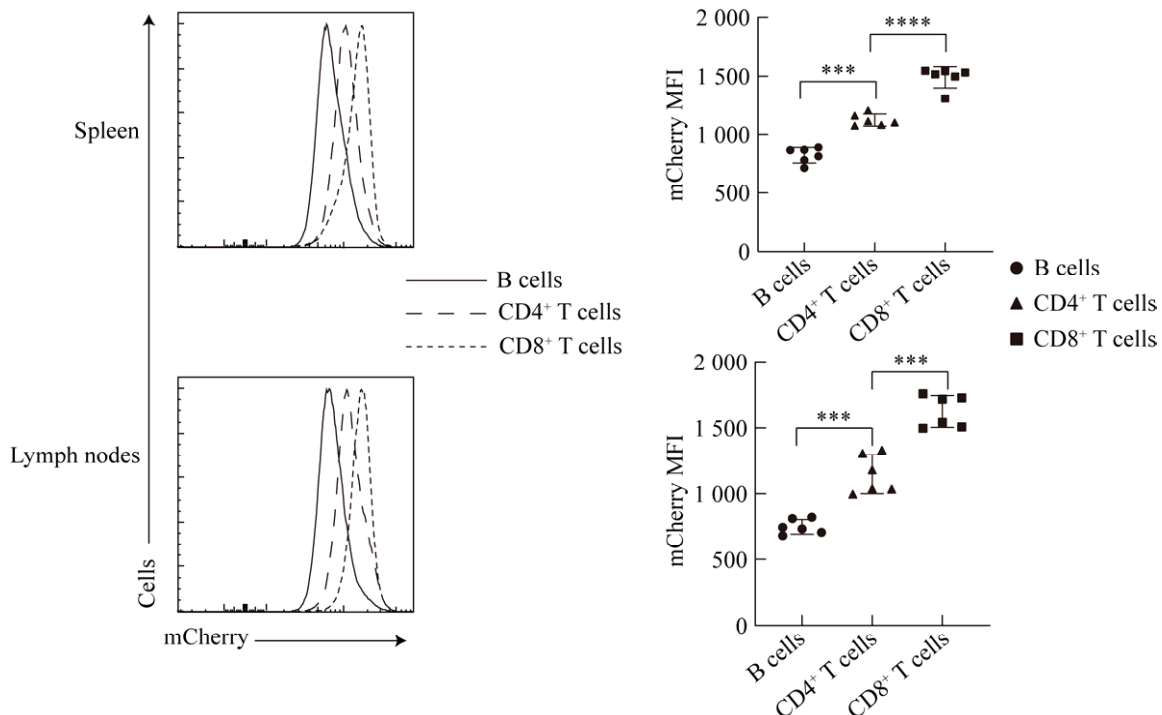


图 1 检测 NOC4L 在不同淋巴细胞亚群中的表达水平

Figure 1 Detection of NOC4L expression levels in different lymphocyte subpopulations. Mean fluorescence intensity of mCherry in  $CD4^+$  T cells,  $CD8^+$  T cells, and B cells from spleens and lymph nodes (LN) of *Noc4l*<sup>mCherry</sup> mice at 6-8 weeks were detected by flow cytometry and make statistical analysis.

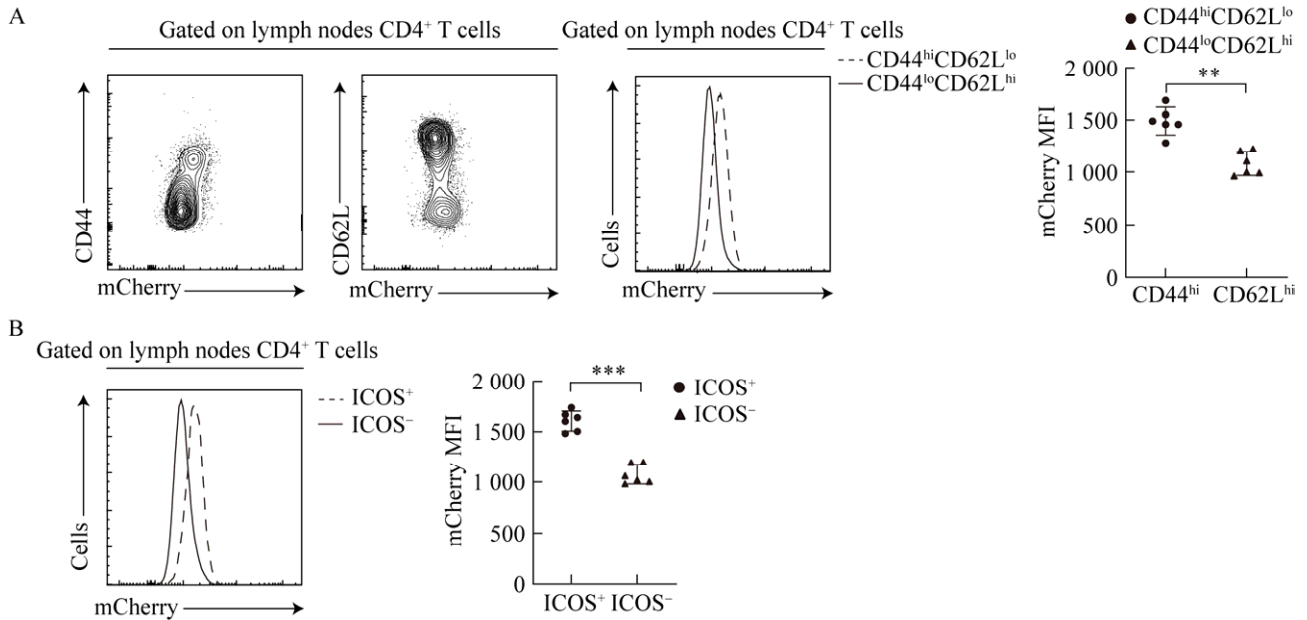


图 2 NOC4L 在活化的淋巴细胞中表达水平增高

Figure 2 Expression level of NOC4L is increased in activated CD4<sup>+</sup> T cells. A: Mean fluorescence intensity of mCherry in CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> T cells respectively from lymph nodes of *Noc4l*<sup>mCherry</sup> mice at 6–8 weeks were detected by flow cytometry and make statistics on the data. B: Mean fluorescence intensity of mCherry in ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and ICOS<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from lymph nodes of *Noc4l*<sup>mCherry</sup> mice were detected by flow cytometry and make statistics on the data.

的不对称分裂对于决定细胞分化命运也是至关重要的，一些决定 T 细胞命运的关键分子在细胞受到抗原刺激分裂时，其中一些 T 细胞由于更加靠近抗原提呈细胞，会比另一些 T 细胞接受到更多关键分子，获得更强的 TCR 和协同刺激信号以及细胞因子介导的信号，这种非平均分配的现象有助于 T 细胞更好地发挥适应性免疫功能。因此，为了进一步检测 NOC4L 在 T 细胞活化过程中的表达特征，从 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 小鼠脾脏和外周淋巴结中富集得到 CD4<sup>+</sup> T 细胞，流式检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞富集效率以及其中初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞所占的比例。结果发现富集得到的 CD4<sup>+</sup> T 细胞约占总淋巴细胞的 80%，其中初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞约占总 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 85%。将富集得到的淋巴细胞分别在 Th0、Th1 及 Th17 细胞分化条件下培养，之后利用流式分别检测在 Th0、Th1 和 Th17 细

胞条件下培养 0、12、24、48、72、96、120 h 后 mCherry 平均荧光强度随细胞增殖的变化趋势，发现在培养的 0–72 h，存在 mCherry<sup>hi</sup> 和 mCherry<sup>lo</sup> 两群细胞，这可能是由于细胞的不对称分裂引起的，在增殖早期，NOC4L 在分裂的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中不对称分配，导致获得 NOC4L 高表达的辅助性 T 细胞快速增殖。72 h 之后，Th0 和 Th1 细胞中 NOC4L 的表达开始减弱，可能是由于此时绝大部分细胞进入缓慢增殖阶段，对于 NOC4L 的需求减少，而 Th17 细胞中 NOC4L 的表达依然持续增加，可能是由于前期 Th17 细胞增殖缓慢，72 h 后大部分细胞依然处于较高的增殖水平，对于 NOC4L 的需求随之增加(图 3)。这些结果表明 NOC4L 对于活化后 T 细胞的增殖较为关键，并且 NOC4L 的表达水平与活化后 T 细胞的分裂特性以及增殖状态相关。



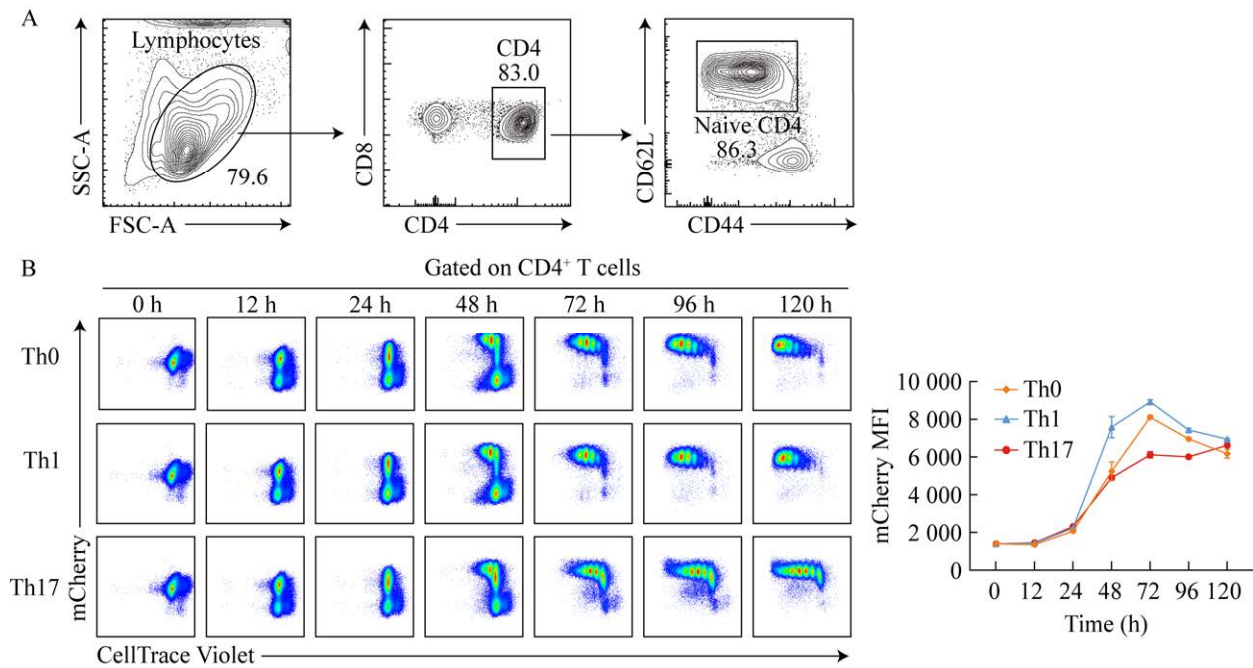


图3 NOC4L 表达与活化后 T 细胞的增殖状态相关

Figure 3 Expression of NOC4L was correlated with the proliferative status of helper T cells. A: Naive  $CD4^+$  T cells were enriched from spleens and lymph nodes of *Noc4l*<sup>mCherry</sup> mice at 6–8 weeks,  $CD4^+$  T cell enrichment efficiency and proportion of naive  $CD4^+$  T cells were detected by flow cytometry, the arrow represents the loop-door strategy. B: Counting of lymphocytes obtained by enrichment, and cultured in Th0, Th1, and Th17 cell conditions, respectively, and the change in the mean fluorescence intensity of mCherry was detected by flow-cytometer at 0, 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h of culture, respectively.

## 2.4 银染检测 T 细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白

NOC4L 作为核糖体生物发生因子，可通过特异性调控蛋白的表达来发挥功能。因此，本研究进一步探究了 NOC4L 在 T 细胞活化过程中会与哪些蛋白之间存在相互作用。首先将从 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 小鼠淋巴结中富集的 naive  $CD4^+$  T 细胞分别在 Th1 或 Th17 条件下培养，5 d 后利用流式检测细胞分化效率，结果显示 Th1 细胞的分化效率约为 45%，Th17 细胞的分化效率约为 30% (图 4A)，表明细胞分化成功。之后裂解  $7 \times 10^7$  个分化产生的 Th1 或 Th17 细胞获取蛋白上清。由于在 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 小鼠体内，mCherry-P2A-3×FLAG 的 cDNA 序列是通过同源重组的方式插入在

*Noc4l* 启动基因的 ATG 前面，并且 *Noc4l* 与 3×flag 融合表达，因此使用 Anti-FLAG M2 亲和凝胶与蛋白上清孵育，通过免疫共沉淀间接获得了在 Th1 和 Th17 细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白质。之后利用 Western blotting 检测 FLAG 蛋白，从而验证通过免疫共沉淀系统可以获取 NOC4L 蛋白，并发现与静息的  $CD4^+$  T 细胞相比，NOC4L 在活化的 Th1 和 Th17 细胞中的表达量显著增加(图 4B)，这与前面通过流式细胞术检测到 NOC4L 在活化的  $CD4^+$  T 细胞中表达水平增加的结果是一致的。接下来通过银染检测在 Th1 和 Th17 细胞极化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白，结果发现由于在免疫共沉淀过程中通过洗涤无法完全去

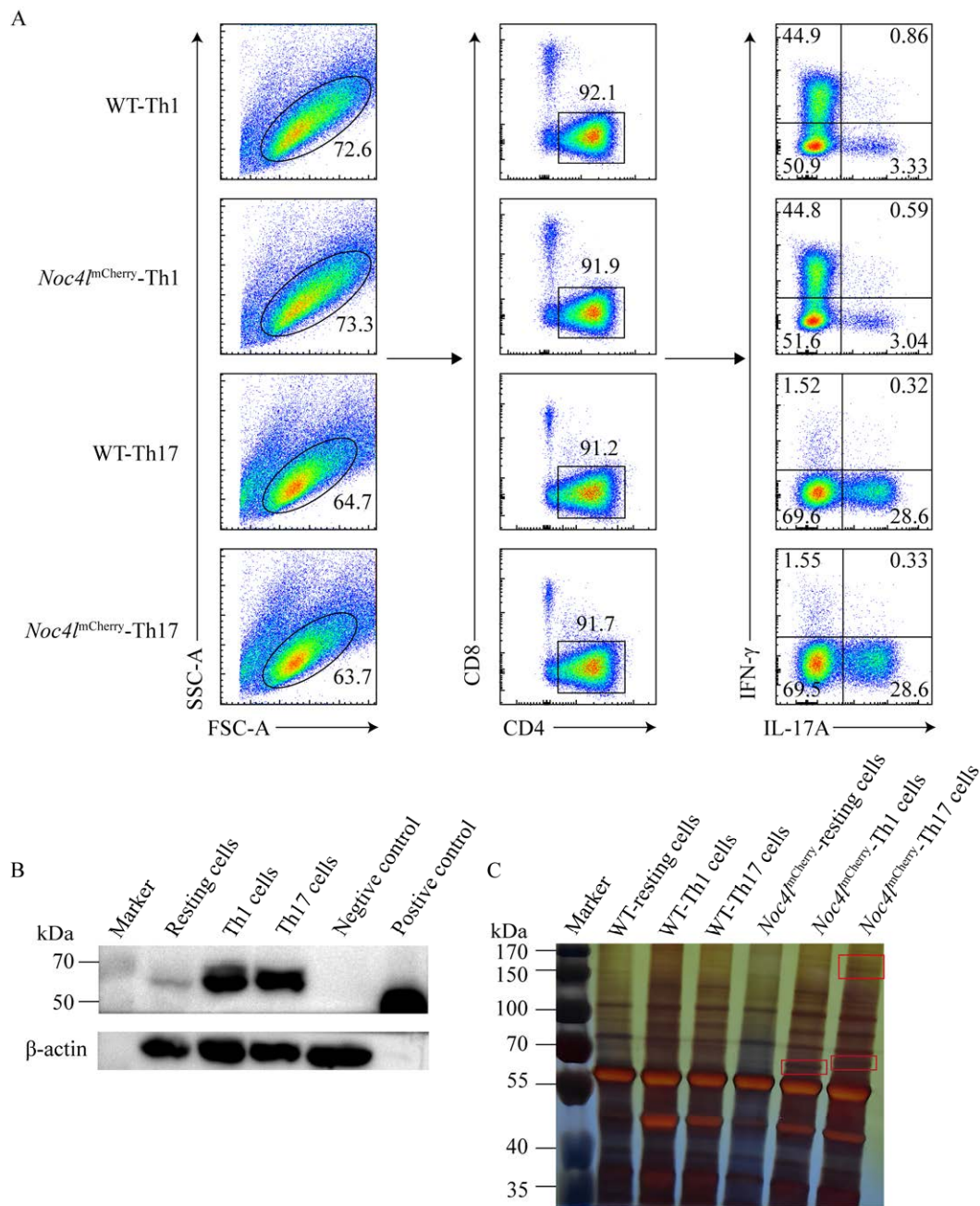


图 4 银染检测 T 细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白

Figure 4 Detection of proteins interacting with NOC4L by silver staining during T cell activation. A: Proportion of Th1 and Th17 cells produced by polarization after 5 days of culture by flow cytometry. B: Detection of FLAG protein expression in immunoprecipitation products of resting  $CD4^+$  T cells, Th1 and Th17 cells. Non-Tg mouse lymphocytes were used as a negative control, and Plate-E cells transfected with the  $3\times flag$  plasmid were used as a positive control. C: Detection of proteins interacting with NOC4L in immunoprecipitation products of resting  $CD4^+$  T cells, polarized Th1 and Th17 cells from *Noc4<sup>flmCherry</sup>* mice by silver-stained. Corresponding cell immunoprecipitation products of non-transgenic mice were used as control. The red boxes represent the differentially expressed bands that can be observed by the naked eye.

除粘连在亲和凝胶表面的蛋白, 导致在 WT 对照组中也会存在较多的非特异蛋白条带, 但与对照组相比, 在 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 小鼠极化的 Th1 和 Th17 细胞中存在特异性结合的条带以及表达量增多的条带。提示 NOC4L 可能通过与某些蛋白之间的相互作用来特异性调控活化后 T 细胞的功能(图 4C)。

### 2.5 NOC4L 与核糖体组装及增殖代谢相关蛋白之间存在相互作用

为了进一步确定在 T 细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白, 将银染后的凝胶分别切取下来并将样品送检, 使用高分辨液质联用快速鉴定质谱系统(Orbitrap Exploris 240)进行检测, 剔除掉 WT 对照组中非特异性结合的干扰蛋白后, 对剩余的蛋白进行聚类分析。发现在 Th1 和 Th17 细胞极化过程中 NOC4L 主要是与核糖体大亚基(如 RL7、RL13、RL18 等)以及

细胞增殖、代谢相关分子(如 ATPG、LCK、6PGD 等)之间存在相互作用(图 5), 表明 NOC4L 可通过影响核糖体组装、增殖及代谢相关蛋白的表达来发挥调控作用。

## 3 讨论与结论

翻译控制是决定细胞中蛋白质水平的一个重要因素, 核糖体是这一过程关键的参与者。对于细胞而言, 核糖体介导的翻译过程以及核糖体的生物发生过程是基本且不可或缺的。传统观点一直认为核糖体是均一的蛋白质翻译机器, 然而近年来, 研究人员发现 mRNA 水平不能完全代表细胞中蛋白质丰度, 转录后调控逐渐成为人们关注的焦点<sup>[20]</sup>。越来越多的研究表明, 核糖体的组成成分及转录后修饰都会造成核糖体的异质性, 不同组织中存在不同类型的核糖体, 并且这些核糖体可以优先翻译不同的

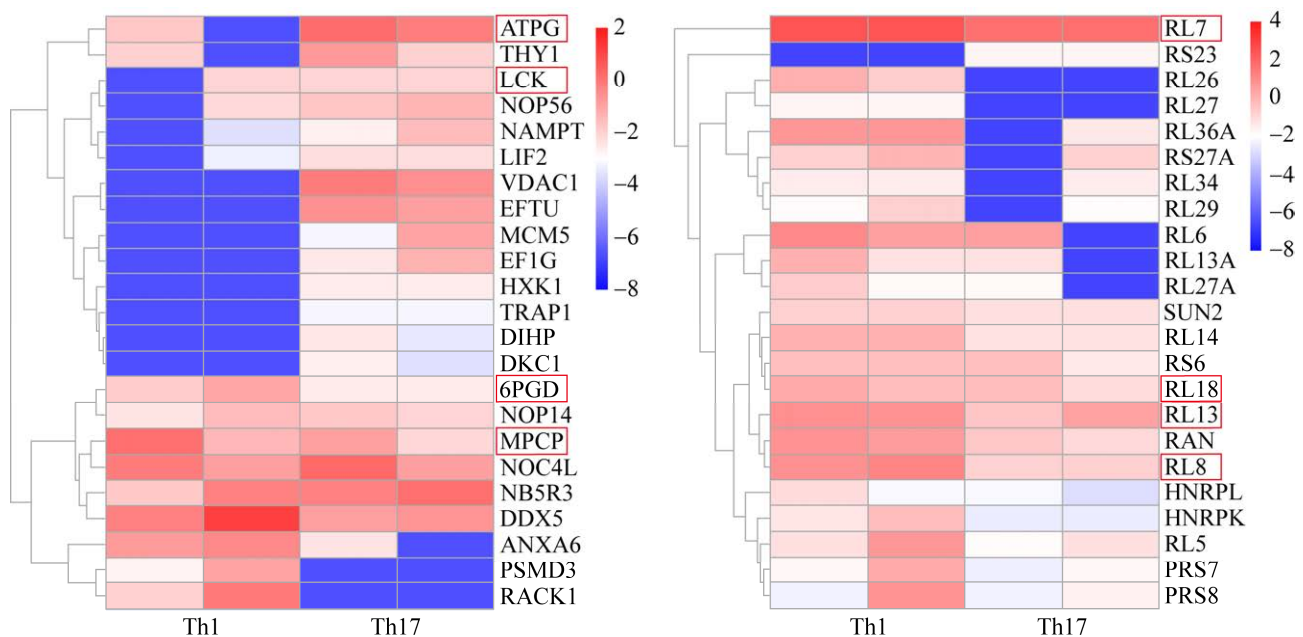


图 5 NOC4L 在 T 细胞活化过程中与增殖代谢相关蛋白之间存在相互作用

Figure 5 NOC4L interacts with proliferation and metabolism-related proteins during T cell activation. The proteins interacting with NOC4L were detected by using a high-resolution liquid-mass spectrometry system for rapid identification mass spectrometry (Orbitrap Exploris 240). Red boxes represent signature genes.

mRNA 亚群。大量文献表明,核糖体大小亚基的正确组装以及发挥功能使得细胞周期正常运转,维持细胞的正常存活和增殖<sup>[21-23]</sup>。因此在某些细胞中,异质核糖体可能是其分化、发育的关键调节者。

NOC4L 主要位于核仁和胞质中,在核糖体的生物合成中长期发挥着重要作用。2002年,Scherl等<sup>[24]</sup>通过 Hela 细胞核仁的功能蛋白质组学分析发现,目前关于 NOC4L 的功能研究还很少,而且主要是在生殖细胞中。研究发现,NOC4L 缺陷的卵母细胞早期胚胎致死<sup>[7]</sup>,与其他参与核糖体 RNA 合成或加工的关键蛋白质类似,如 RBM19 和 Fad24 蛋白的缺乏也会导致胚胎致死<sup>[25-26]</sup>。2019年,Zhu等<sup>[9]</sup>发现 Noc4L 能够从转录后层面调控 Treg 和 Tconv 细胞的激活,但在活化后细胞中的表达及作用并未具体阐述。

本研究利用 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 报告小鼠,通过流式检测 mCherry 的平均荧光强度来反映细胞中 NOC4L 的动态变化,发现 NOC4L 在活化后的辅助性 T 细胞中表达水平增高,并且由于细胞的不对称分裂,最初的前体细胞会产生 2 个不同命运的子细胞,其中继承了免疫突触的子细胞会接收到更强的 TCR 和协同刺激信号以及细胞因子介导的信号,NOC4L 可能也会更多地分配到该类子细胞中,为其快速增殖提供能量。因此在活化早期,NOC4L 在活化 T 细胞中表达持续增加。随着后续处于高增殖水平的细胞减少,NOC4L 的表达也开始减弱。除此之外,NOC4L 在 Th17 细胞中的表达是缓慢持续增强的,这可能与 Th17 细胞的增殖变化相关。这提示 NOC4L 对活化后的 T 细胞依然十分重要,但具体如何发挥作用还有待探究。

静息状态下的 naive CD4<sup>+</sup> T 细胞代谢活性较低,此时蛋白质及 mRNA 合成缓慢,但当静

息 T 细胞接触 TCR 信号刺激后便会迅速启动基因转录和蛋白质合成,从而促进细胞生长和增殖。活化的辅助性 T 细胞在免疫应答期间会快速增殖并产生大量的细胞因子,这一过程往往需要耗费巨大能量。此外,一些辅助性 T 细胞并不能稳定存在,如 Th17 细胞具有高度的可塑性和异质性,在相应诱导条件下,已经分化产生 IL-17A 的 Th17 细胞会逐渐丢失 IL-17A 的表达,向其他辅助性 T 细胞方向转变<sup>[27-28]</sup>,对于细胞而言,从能量代谢相对惰性的状态迅速转换到代谢活跃状态或从一种辅助性 T 细胞亚群转分化为其他类型的辅助性 T 细胞亚群,这种转变需要大量核糖体的参与来合成多种蛋白质,并且为了保证细胞能够迅速有效地完成状态转变,核糖体除了介导整体蛋白质合成外,还会优先翻译一些特定的 mRNA。

在 *Noc4l*<sup>mCherry</sup> 小鼠中,3×flag 与 *Noc4l* 是融合表达的,本研究使用 Anti-FLAG M2 亲和凝胶,在 Th1 和 Th17 细胞分化 5 d 后,通过免疫共沉淀获取与 NOC4L 相互作用的蛋白,质谱检测发现在 T 细胞活化过程中存在较多与 NOC4L 相互作用的蛋白质,它们大多与核糖体组装及细胞增殖代谢相关。但由于细胞量以及目前检测技术的原因,无法对细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白进行实时监测,只检测了极化 5 d 后与 NOC4L 相互作用的蛋白,这可能导致一些特定时间作用的蛋白无法被检测到,或者检测到的某些蛋白不具有代表性。而且由于在免疫共沉淀实验中,亲和凝胶上会粘连一些无关蛋白,这些都可能对结果分析造成干扰,未来更加精密智能的仪器以及高灵敏度的生物化学实验将有助于解决这一问题。另一方面,通过免疫共沉淀与质谱检测到的蛋白,是在 CD4<sup>+</sup> T 细胞活化过程中可能与 *Noc4l* 存在相互作用的蛋白,但目前没有足够

的实验证据来证明其互作情况。之后会针对感兴趣的蛋白进行深入探究,包括使用目标蛋白抗体,通过免疫共沉淀以及 Western blotting 确定目标蛋白与 Noc4L 之间是否存在相互作用。此外,根据目前检测到的蛋白,可以通过设计分别靶向这些蛋白对应基因的 sgRNA 文库,使用 CRISPR-Cas9 技术在活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中分别敲除这些基因,之后根据敲除后 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化受到影响的程度,进一步确定在 CD4<sup>+</sup> T 细胞活化过程中与 Noc4L 相互作用的蛋白。

综上所述,本研究利用 *Noc4L*<sup>mCherry</sup> 报告小鼠,通过流式检测 NOC4L 在活化 T 细胞中的表达以及 NOC4L 随活化 T 细胞增殖的表达变化,进一步通过质谱比较了在 T 细胞活化过程中与 NOC4L 相互作用的蛋白,为之后探究 NOC4L 在辅助性 T 细胞中的功能奠定了良好的实验基础。

## REFERENCES

- [1] XUE SF, TIAN SQ, FUJII K, KLADWANG W, DAS R, BARNA M. RNA regulons in *Hox* 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation[J]. *Nature*, 2015, 517: 33-38.
- [2] GENUTH NR, BARNA M. The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life[J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(3): 364-374.
- [3] LI HL, HUO YG, HE X, YAO LP, ZHANG H, CUI YQ, XIAO HJ, XIE WX, ZHANG DJ, WANG Y, ZHANG S, TU HX, CHENG YW, GUO YS, CAO XT, ZHU YF, JIANG T, GUO XJ, QIN Y, SHA JH. A male germ-cell-specific ribosome controls male fertility[J]. *Nature*, 2022, 612: 725-731.
- [4] GUO HL. Specialized ribosomes and the control of translation[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(4): 855-869.
- [5] SHI Z, FUJII K, KOVARY KM, GENUTH NR, RÖST HL, TERUEL MN, BARNA M. Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide[J]. *Molecular Cell*, 2017, 67(1): 71-83.e7.
- [6] SIMSEK D, TIU GC, FLYNN RA, BYEON GW, LEPPEK K, XU AF, CHANG HY, BARNA M. The mammalian ribo-interactome reveals ribosome functional diversity and heterogeneity[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 1051-1065.e18.
- [7] QIN YL, LI HF, JIA LN, YAN JH, GAO GF, LI XD. Targeted disruption of *Noc4l* leads to preimplantation embryonic lethality in mice[J]. *Protein & Cell*, 2017, 8(3): 230-235.
- [8] TSCHOCHNER H, HURT E. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm[J]. *Trends in Cell Biology*, 2003, 13(5): 255-263.
- [9] ZHU XP, ZHANG W, GUO J, ZHANG XJ, LI LP, WANG T, YAN JH, ZHANG FP, HOU BD, GAO N, GAO GF, ZHOU XY. Noc4L-mediated ribosome biogenesis controls activation of regulatory and conventional T cells[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(4): 1205-1220.e4.
- [10] ZHU JF, YAMANE H, PAUL WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations[J]. *Annual Review of Immunology*, 2010, 28: 445-489.
- [11] JENKINS MK, KHORUTS A, INGULLI E, MUELLER DL, McSORLEY SJ, REINHARDT RL, ITANO A, PAPE KA. *In vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells[J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19: 23-45.
- [12] LUCKHEERAM RV, ZHOU R, VERMA AD, XIA B. CD4<sup>+</sup> T cells: differentiation and functions[J]. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 2012: 925135.
- [13] LAZAREVIC V, GLIMCHER LH, LORD GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13: 777-789.
- [14] TRINCHIERI G, PFLANZ S, KASTELEIN RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses[J]. *Immunity*, 2003, 19(5): 641-644.
- [15] LIBLAU RS, SINGER SM, McDEVITT HO. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases[J]. *Immunology Today*, 1995, 16(1): 34-38.
- [16] VELDHOEN M, HOCKING RJ, ATKINS CJ, LOCKSLEY RM, STOCKINGER B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells[J]. *Immunity*, 2006, 24(2): 179-189.
- [17] YANG XO, PAPPU BP, NURIEVA R, AKIMZHANOV A, KANG HS, CHUNG Y, MA L, SHAH B, PANOPOULOS AD, SCHLUNS KS,

- WATOWICH SS, TIAN Q, JETTEN AM, DONG C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ [J]. *Immunity*, 2008, 28(1): 29-39.
- [18] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK. IL-17 and Th17 cells[J]. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 485-517.
- [19] CHANG JT, PALANIVEL VR, KINJYO I, SCHAMBACH F, INTLEKOFER AM, BANERJEE A, LONGWORTH SA, VINUP KE, MRASS P, OLIARO J, KILLEEN N, ORANGE JS, RUSSELL SM, WENINGER W, REINER SL. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1687-1691.
- [20] FERREIRA-CERCA S, HURT E. Cell biology: arrest by ribosome[J]. *Nature*, 2009, 459(7243): 46-47.
- [21] KANG J, BRAJANOVSKI N, CHAN KT, XUAN JC, PEARSON RB, SANIJ E. Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6:323.
- [22] HERNANDEZ-VERDUN D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle[J]. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 2011, 2:189-194.
- [23] de la CRUZ J, KARBSTEIN K, WOOLFORD JL Jr. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes *in vivo*[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84: 93-129.
- [24] SCHERL A, COUTÉ Y, DÉON C, CALLÉ A, KINDBEITER K, SANCHEZ JC, GRECO A, HOCHSTRASSER D, DIAZ JJ. Functional proteomic analysis of human nucleolus[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 13(11): 4100-4109.
- [25] ZHANG J, TOMASINI AJ, MAYER AN. RBM19 is essential for preimplantation development in the mouse[J]. *BMC Developmental Biology*, 2008, 8: 115.
- [26] OCHIAI N, NISHIZUKA M, MIYAMOTO T, MIYOSHI I, IKAWA M, OSADA S, IMAGAWA M. Targeted disruption of fad24, a regulator of adipogenesis, causes pre-implantation embryonic lethality due to the growth defect at the blastocyst stage[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 438(2): 301-305.
- [27] GUÉRY L, HUGUES S. Th17 cell plasticity and functions in cancer immunity[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 314620.
- [28] HIROTA K, DUARTE JH, VELDHONEN M, HORNSBY E, LI Y, CUA DJ, AHLFORS H, WILHELM C, TOLAINI M, MENZEL U, GAREFALAKI A, POTOČNIK AJ, STOCKINGER B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses[J]. *Nature Immunology*, 2011, 12: 255-263.

(本文责编 郝丽芳)