

人外周血 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞激活后 IL-2 和 IFN- γ 表达的特点

陈礼文, 朱安友, 李柏青

[摘要] 目的: 探讨人外周血 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞在不同刺激剂激活后产生 Th1 型细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的不同特点。方法: 健康成人外周血单个核细胞(PBMC) 用佛波醇酯(PMA)、离子霉素(ionomycin) 和抗 CD28 单抗(mAb) 以不同组合刺激 6~8 h 后; 用流式细胞术胞内细胞因子检测法测定 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞和 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞 IL-2 和 IFN- γ 的表达; 或用结核杆菌抗原(Mtb-Ag) 刺激 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞加 IL-2 扩增 3~8 天后检测 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞 IL-2 的表达。结果: PBMC 经 PMA+ionomycin 刺激后, 与 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞中产生 IL-2 细胞(14.0%) 相比, $\gamma\delta\text{T}$ 细胞中极少数细胞(1.1%) 表达 IL-2; 但分泌 IFN- γ 细胞在 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞中(56.1%) 明显多于 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞(8.5%)。如加抗 CD28 mAb 联合刺激后, IL-2 产生细胞在 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞中明显增加, 但在 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞中未见增加; 而 IFN- γ 表达细胞在两类细胞中均有明显增加; PBMC 用 Mtb-Ag 激活后扩增 3 天后在 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞中开始检测到 IL-2 表达, 第 5~6 天时达高峰, 第 8 天时逐渐下降。结论: 多克隆短时刺激对 PBMC 中 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞表达 IFN- γ 能力强于 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞, 但产生 IL-2 很少; Mtb-Ag 能诱导 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞表达 IL-2, 但过程较慢。

[关键词] $\gamma\delta\text{T}$ 细胞; 细胞因子; 白细胞介素 2; γ 干扰素; 分枝结核杆菌抗原

[中国图书资料分类法分类号] R 392.12 **[文献标识码]** A

Expression patterns of IL-2 and IFN- γ of activated $\gamma\delta\text{T}$ cells from human peripheral blood

CHEN Li-wen, ZHU An-you, LI Bai-qing

(Department of Immunology, Bengbu Medical College, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity at Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the characteristics of expression of Th1 cytokines interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ) of human peripheral $\gamma\delta\text{T}$ cells stimulated with different stimuli. **Methods:** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin, combined with or without anti-CD28 mAb for 6 to 8 h; or stimulated with Mtb-Ag and cultured in IL-2 containing medium for 3 to 8 days, the intracellular cytokines IL-2 and IFN- γ in $\gamma\delta$ and $\alpha\beta\text{T}$ cells were detected by flow cytometry. **Results:** The percentages of IL-2 secreting cells of $\gamma\delta\text{T}$ cells among PBMCs stimulated with PMA+ionomycin were very low (1.1%); compared with that of $\alpha\beta\text{T}$ cells (14.0%). The percentages of IFN- γ -secreting cells of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta\text{T}$ cells among PBMCs stimulated with stimuli as above were 56.1%, and 8.5%, respectively. Upon the stimulation of PBMCs with PMA+ionomycin combined with anti-CD28mAb, the percentages of IL-2 secreting $\alpha\beta\text{T}$ cells increase to 31%, but IL-2 secreting $\gamma\delta\text{T}$ cells were not significantly increased. Meanwhile the percentages of IFN- γ -secreting $\gamma\delta$ and $\alpha\beta\text{T}$ cells increase to 77.4% and 15.4%, respectively. After PBMCs stimulated with Mtb-Ag and cultured in IL-2 containing medium, the percentage of IL-2 producing cells $\gamma\delta\text{T}$ cells were detected only on day 3 and later, increased markedly to a peak on day 6, and thereafter declining to a lower level. **Conclusions:** Stimulated with PMA+ionomycin combined with or without anti-CD28mAb, the human $\gamma\delta\text{T}$ cells among PBMCs default produced of IFN- γ while $\alpha\beta\text{T}$ cells default produced of IL-2. Activated with Mtb-Ag and cultured in presence of IL-2 from 3 to 6 days, $\gamma\delta\text{T}$ cells were also able to produce IL-2.

[Key words] $\gamma\delta\text{T}$ cells; cytokines; interleukin-2; interferon- γ ; *Mycobacterium tuberculosis* antigen

本室近年来的研究表明, 结核杆菌低分子量多肽抗原 (Mtb-Ag) 能够优势活化扩增外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 中

的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞^[1], 由 CD28 分子提供的协同刺激信号在 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞活化中也起着重要作用^[2,3], 而且也证实 PI-3K 途径和 Ras/MEK/Erk 通路均参与 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的活化信号转导过程^[3,4]。但与 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞相比, 活化信号的转导过程可能有些差别, 如 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞在 Mtb-Ag 激活后的 ZAP-70 分子活化较缓慢^[5]。许多研究表明, $\gamma\delta\text{T}$ 细胞也可产生多种细胞因子, 特别是可优势产生 Th1 型细胞因子, 参与免疫应答。但 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞功能和细胞因子表达的研究相对较少, 本研究通过运用流式细胞仪胞内细胞因子染色和多色分析技术^[6,7] 研究多克隆刺激以及 Mtb-Ag 刺激条件下 $\gamma\delta$ 和 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 特点, 以发

[收稿日期] 2005-05-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30070721); 安徽省高等学校省级重点实验室重点科研项目(2004sys008)

[作者单位] 蚌埠医学院 免疫学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室(蚌埠医学院), 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 陈礼文(1973-), 男, 安徽怀宁县人, 硕士, 主要从事细胞免疫学研究(现工作于安徽省高等医学专科学校, 安徽合肥 230000)。

[通讯作者] 李柏青, 教授, 硕士生导师, E-mail: bb_bqli@yahoo.com

现二者在 Th1 型细胞因子分泌方面的差异,为 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞功能方面的研究提供进一步资料。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 本实验所用的人外周血细胞均来自本校健康教职工和学生共 5 名,其中男 3 名,女 2 名;年龄 24~50 岁。

1.2 主要试剂 RPMI1640, GIBCO 公司产品;新生牛血清(NBS),杭州四季青生物公司产品;重组人白细胞介素 2(rhIL-2),长春长生基因药业股份有限公司产品。佛波醇酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)和离子霉素(ionomycin)为 Sigma 公司产品;抗人 CD28mAb (stimulating)、抗人 CD3-PE、抗人 IL-2-FITC 和抗人 IFN- γ -FITC 均购自 Ancell 公司,抗人 TCR $\gamma\delta$ -PE 购自 BD 公司。多聚甲醛(PFA)、皂角素(saponin)和 Brefeldin A (BFA) 购自 Sigma 公司。结核杆菌低分子量多肽抗原(Mtb-Ag), 本室根据文献^[8]自制。

1.3 外周血 T 细胞激活和培养 常规分离健康人 PBMC, 用含 5%NBS、5%人自体血清的 RPMI 1640 培养液配制细胞悬液($1\sim 2$) $\times 10^6$ /ml, 放入 24 孔培养板, 每孔 1 ml。根据实验设计要求, 多克隆刺激实验中, 分 3 个刺激组: PMA + ionomycin 组、PMA + 抗 CD28 mAb 组和 PMA + ionomycin + 抗 CD28 mAb 联合组; 同时设不刺激阴性对照组。PMA、ionomycin 和抗 CD28 mAb 的终浓度分别为 50 ng/ml、500 ng/ml 和 5 μ g/ml。加用抗 CD28mAb 时, 先加抗 CD28mAb 作用 2h 后再加 PMA + ionomycin 刺激 6h。BFA(10 μ g/ml) 均在收集细胞前 2h 加入以阻断蛋白转运。在 Mtb-Ag 诱导 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞实验时, 加入 Mtb-Ag(5 g/ml) 和 rhIL-2(50 u/ml), 每隔 3~4 天补加 rhIL-2, 并根据细胞增殖情况分孔扩增, 收集细胞前 8h 加入 PMA + ionomycin(终浓度分别为 25 ng/ml 和 250 ng/ml) 对细胞进行再刺激, 4h 后加入 BFA 10 μ g/ml。上述细胞均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

1.4 流式细胞术检测 T 细胞胞内细胞因子 收集待测细胞, 用冰冷染色缓冲液(含 5%NBS、0.1% NaN_3 的 PBS) 洗一次, 将细胞重悬在染色缓冲液中($0.8\sim 1.0$) $\times 10^7$ /ml, 流式染色管先加荧光标记的检测表型单克隆抗体, 再加细胞悬液每管 50 μ l, 冰浴 30 min 后用染色缓冲液洗两次。加 2%PFA 冰浴固定 30 min 以上; 用染色缓冲液洗一次后加透膜缓冲液(0.1% Saponin 染色缓冲液) 每管 400 μ l, 冰浴 15 min 后离心, 去上清, 加入荧光标记抗细胞因子单抗, 冰浴 30 min, 透膜缓冲液洗两次, 染色缓冲液

洗两次, 1%PFA 固定后上机检测。待测样品在流式细胞仪 FACSCalibur (美国 BD 公司) 上用 Cellquest 软件进行检测, 利用细胞表面染色对照设置 PMT 电压和补偿, 确定阴阳性界限。数据文件用 Cellquest 或 WinMDI 2.8 软件对不同的细胞群体进行分析, 分别计算出分泌 IL-2 或 IFN- γ 细胞在 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞和 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞中的百分率。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 q 检验及 t 检验。

2 结果

2.1 多克隆刺激剂刺激人 PBMC 后 $\gamma\delta$ 和 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞分泌 Th1 型细胞因子的特点 用流式细胞仪检测胞内细胞因子的方法发现, PBMC 经 PMA + ionomycin 和 PMA + 抗-CD28 单抗刺激后, $\gamma\delta\text{T}$ 细胞中 IL-2 分泌细胞极少(约 1%), PMA + ionomycin 联合抗-CD28 单抗刺激组分泌 IL-2 的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞有所增加, 但差异无显著性($P > 0.05$); 但在上述三种刺激条件下, 分泌 IL-2 细胞在 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞中分别为 14.0%、5.1% 和 31% 左右, 差异均有显著性($P < 0.05$)。在上述同样三种刺激条件下, $\gamma\delta\text{T}$ 细胞中 IFN- γ 产生细胞的比例分别为 56.1%、40.3% 和 77.4% 左右; 而在 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞中则分别为 8.5%、3.5% 和 15.4% 左右, 差异均有显著性($P < 0.01$)。将三组作两两比较, 发现 PMA + ionomycin + 抗 CD28 mAb 联合组刺激效应最强。分析证明, 在多克隆刺激条件下 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞分泌 IL-2 能力强于 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞($P < 0.01$), 而 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞分泌 IFN- γ 能力最强($P < 0.001$) (见图 1、表 1)。

2.2 Mtb-Ag 诱导 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞 IL-2 分泌 为了探讨 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞能否分泌 IL-2, 本实验用 Mtb-Ag 刺激 PBMC 后加 IL-2 扩增 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞, 收集细胞前 8h 加入 PMA + ionomycin 再刺激。从 24h 起检测 IL-2 分泌, 发现从第 3 天开始才能检测到 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞分泌 IL-2。图 2 中分泌 IL-2 的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞比率达到 57.2%(5 天时结果)。图 3 反映了 Mtb-Ag 诱导 3 个健康个体 PBMC 后第 3~8 天分泌 IL-2 的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞比率的变化趋势, 3 例标本分别在第 5、6、7 天达到分泌高峰后开始下降。

3 讨论

接受特异性抗原刺激后, 在各种因素参与下, CD4^+ Th0 细胞可分化为 Th1 和 Th2 两个亚型。两型 Th 细胞各自分泌相应的细胞因子发挥免疫效应和免疫调节作用: Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 等, 介导细胞免疫; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 等, 辅助 B 细胞介导体液免疫。但是,

关于 $\gamma\delta$ 细胞在细胞因子的分泌及与此相关细胞分型的文献报道较少。

表 1 多克隆刺激剂刺激 PBMC 后两类 T 细胞中 IL-2 和 IFN- γ 分泌细胞百分率 ($n_i=5; \bar{x}\pm s$)

组别	$\alpha\beta$ T cells (%)		$\gamma\delta$ T cells (%)							
	IL-2 ⁺ cells	IFN- γ ⁺ cells	IL-2 ⁺ cells	$\bar{d}\pm s_d$	<i>t</i>	<i>P</i>	IFN- γ ⁺ cells	$\bar{d}\pm s_d$	<i>t</i>	<i>P</i>
未刺激组	1.7 \pm 1.1	0.6 \pm 0.2	0.9 \pm 0.7	-0.8 \pm 0.3	5.96	<0.001	1.2 \pm 1.0	0.6 \pm 0.5	2.68	<0.05
PMA+ionomycin	14.0 \pm 4.2**	8.5 \pm 2.1**	1.1 \pm 0.2	-12.9 \pm 2.1	13.74	<0.001	56.1 \pm 6.2**	43.1 \pm 4.0	24.09	<0.001
PMA+CD28	5.1 \pm 1.7	3.5 \pm 1.5*	0.8 \pm 0.6	-4.3 \pm 1.2	8.01	<0.001	40.3 \pm 5.5**	36.8 \pm 5.5	14.96	<0.001
PMA+ionomycin+CD28	31.0 \pm 5.6**	15.4 \pm 3.7**	1.1 \pm 0.4	-29.9 \pm 2.8	23.88	<0.001	77.4 \pm 5.8**	62.0 \pm 4.6	30.14	<0.001
<i>F</i>	51.74	32.96	0.34	—	—	—	160.38	—	—	—
<i>P</i>	<0.01	<0.01	>0.05	—	—	—	<0.01	—	—	—
<i>MS</i> 组内	13.275	5.098	0.263	—	—	—	25.833	—	—	—

q 检验: 与未刺激组比较: **P*<0.05; ***P*<0.01

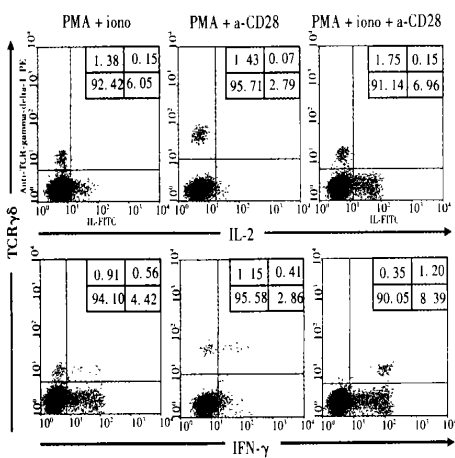


图 1 PMA + ionomycin + anti-CD28 mAb 刺激人 PBMC 后 IL-2 和 IFN- γ 分泌

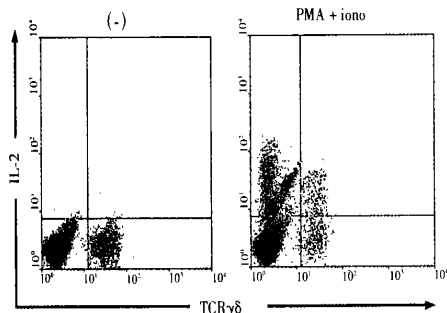


图 2 PBMC 经 Mtb-Ag 刺激培养第 5 天时 $\gamma\delta$ T 细胞中 IL-2 产生细胞

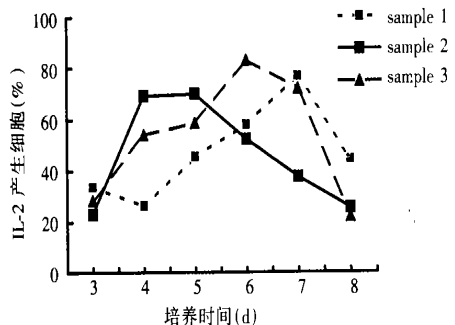


图 3 Mtb-Ag 刺激 $\gamma\delta$ T 细胞后培养不同时间产生 IL-2 趋势图 ($n=3$)

细胞因子表达特点,发现 PMA + ionomycin 和 PMA + anti-CD28 mAb 刺激组 $\alpha\beta$ T 细胞分泌 IL-2 能力强于 $\gamma\delta$ T 细胞 ($P<0.01$), $\gamma\delta$ T 细胞分泌 IFN- γ 能力强于 $\alpha\beta$ T 细胞 ($P<0.01$)。PMA + ionomycin + anti-CD28 mAb 联合刺激组分泌 IFN- γ 的 $\gamma\delta$ 和 $\alpha\beta$ T 细胞以及分泌 IL-2 的 $\alpha\beta$ T 细胞均较前两组增加 ($P<0.05$), 并且 IL-2 和 IFN- γ 分泌的这种细胞倾向性仍很明显 (见表 1), 表明在上述多克隆刺激条件下, $\gamma\delta$ T 细胞分泌 IFN- γ 能力强于 $\alpha\beta$ T 细胞, 而后者分泌 IL-2 能力强于前者。IFN- γ 诱导单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、皮肤成纤维细胞、血管内皮细胞等 MHCII 类分子的表达,使其参与抗原提呈和特异性免疫的识别过程;促进巨噬细胞的活化和 Fc γ R 表达。 $\gamma\delta$ T 细胞产生 IFN- γ 能力较强,说明在感染的早期阶段, $\gamma\delta$ T 细胞除了自身能直接杀伤入侵的病原微生物,还能分泌 IFN- γ 活化巨噬细胞,促进抗原提呈细胞 MHCII 类分子的表达和抗原提呈,从而作为桥梁启动特异性免疫应答,在抗感染免疫中起着非常重要的作用。

本实验也提示,CD28 分子提供的协同刺激信号能促进 $\gamma\delta$ 和 $\alpha\beta$ T 细胞表达 IFN- γ , 也能促进 $\alpha\beta$ T 细胞表达 IL-2, 但对 $\gamma\delta$ T 细胞 IL-2 表达亦无显著作用。Lafont 等曾用流式细胞仪分析 IPP 诱导扩增的 $\gamma\delta$ T 细胞,发现 90% 细胞 CD28 分子阴性,他们还发现 $\gamma\delta$ T 细胞分泌 TNF- γ 无需 CD28 分子参与^[9]。因此 CD28 分子在 $\gamma\delta$ T 细胞内的作用还有待于进一步研究。

从多克隆短时刺激实验看, $\gamma\delta$ T 产生 IL-2 能力很低。为探讨 $\gamma\delta$ 细胞能不能以及什么情况下产生 IL-2, 本实验用 Mtb-Ag 诱导活化 $\gamma\delta$ T 细胞,并从 24 h 起监测其 IL-2 分泌,发现在刺激培养 3 天后才开始有 IL-2 产生,图 2 是诱导至第 5 天时典型的标本流式细胞分析图,其分泌 IL-2 的阳性 $\gamma\delta$ T 细胞达到 60% 左右,说明 $\gamma\delta$ T 细胞也能产生 IL-2。IL-2 又

本研究运用多色荧光抗体胞内染色技术和流式细胞术分析不同刺激条件下 $\gamma\delta$ 和 $\alpha\beta$ T 细胞 Th1 型

[文章编号] 1000-2200(2005)05-0380-03

·基础医学·

Nogo-66 蛋白氨基酸肽的克隆及在原核细胞的表达

陈昌杰, 章 尧

[摘要] 目的: 克隆编码 Nogo-66 氨基酸多肽基因, 构建原核重组表达载体, 并诱导其在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中表达。方法: 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法扩增出编码 Nogo 蛋白环外-66 氨基酸多肽基因, 将其克隆于 T 载体 PMD18-T, 酶切鉴定后再亚克隆于原核表达载体 pET-42a(+), 酶切及测序证实序列正确后, 转化大肠埃希菌 BL21(DE3), 经异丙基硫代- β -D 半乳糖苷(IPTG)诱导表达融合蛋白-Nogo-66。结果: 克隆了编码 Nogo 蛋白环外-66 氨基酸多肽基因, 构建了融合蛋白的重组表达质粒, 融合蛋白的表达随着时间延长增加。结论: 获得了编码 Nogo 蛋白环外-66 氨基酸多肽基因及其原核表达产物, 对研究 Nogo 蛋白的生物学功能及其 mAb 的制备奠定基础。

[关键词] Nogo 蛋白; 克隆; 原核细胞

[中国图书资料分类法分类号] Q 593.2; R 394.3 [文献标识码] A

Cloning and expression of nogo-66 protein in prokaryotic cells

CHEN Chang-Jie, ZHANG Yao

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective** To clone Nogo-66 gene, construct the recombinant prokaryotic expressive vector and express its products in *E. coli*. **Methods** Nogo-66 gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and then cloned into PMD18-T vector. After identified by the enzyme digestion, the gene was subcloned into prokaryotic expressive vector pET-42a(+), which was identified by the enzyme digestion and sequencing. Nogo-66 fusion protein was expressed in *E. coli* BL21(DE3) by IPTG. **Results** The Nogo-66 gene and recombinant prokaryotic expression vector were obtained and the Nogo-66 protein was expressed and increased with prolong of time. **Conclusions** The Nogo-66 expression vector and its prokaryotic expression product were obtained. It maybe has a great significance for study the biologic function of Nogo-66 protein and the preparation of monoclonal antibody against Nogo-66 protein.

[Key words] Nogo-66 protein; cloning; molecular; prokaryotic cells

[收稿日期] 2005-03-16

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2001kj169)

[作者单位] 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 陈昌杰(1968—), 男, 安徽灵璧县人, 博士, 副教授。

2000 年国外三个实验室同时克隆了抑制受损神经再生的 Nogo 基因, 该基因编码的蛋白分子有三种异构体, 分别命名为 A、B、C^[1-3], 即 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C, 长度分别为 1 163、360 和 199 个

称为 T 细胞生长因子, 作用于包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞以及巨噬细胞在内的很多免疫细胞, 促进它们的增殖、分化和效应的发生。但 $\gamma\delta$ 细胞产生 IL-2 比 $\alpha\beta$ T 细胞慢, 我们认为有以下两种可能: (1) 两类细胞在信号转导方面差异, $\gamma\delta$ 细胞充分活化的“门槛”较 $\alpha\beta$ T 细胞高或者时间比 $\alpha\beta$ T 细胞长, 因为 IL-2 的表达是 T 细胞完全活化的一个标志; (2) 导致 IL-2 和 IFN- γ 两类细胞因子表达的信号要求也不一样。具体的细节尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 胡建国, 侯彦强, 陈 勇, 等. MtbAK 细胞与 CD3AK、LAK 细胞体外增殖和杀瘤活性比较[J]. 蚌埠医学院学报, 2001, 26(5): 377~379.
- [2] 吴俊英, 李柏青, 张学光. APC 在结核杆菌低分子多肽抗原体外激活人外周血 $\gamma\delta$ 细胞中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(5): 492~494.
- [3] 吴俊英, 李柏青, 侯彦强, 等. PI3K 在 TCR 和 CD28 协同激发

的 $\gamma\delta$ 细胞活化信号转导中的作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(2): 123~126.

- [4] 侯彦强, 李柏青, 胡建国, 等. 结核杆菌抗原特异性激发人 $\gamma\delta$ 细胞活化信号涉及 Ras/Erk 途径[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(8): 530~533.
- [5] 吕合作, 陈 勇, 吴俊英, 等. 结核杆菌抗原活化的 $\gamma\delta$ 细胞中 ZAP-70 的酪氨酸磷酸化特点[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(11): 874~877.
- [6] Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, et al. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8(2): 303~313.
- [7] 侯彦强, 吴俊英, 胡建国, 等. 流式细胞术检测 $\gamma\delta$ 细胞内细胞因子的方法学探讨[J]. 蚌埠医学院学报, 2002, 27(5): 380~383.
- [8] Boom WH, Balaji KN, Nayak R, et al. Characterization of a 10 to 14 kilodalton protease-sensitive *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra antigen that stimulates human $\gamma\delta$ T cells[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(12): 5 511~5 518.
- [9] Lafont V, Liautard J, Gross A, et al. Tumor necrosis factor- α production is differently regulated in $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ human T lymphocytes[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(25): 19 282~19 287.