

· 论 著 ·

# ESAT-6 上调 TLR-4 通路增强人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞产生淋巴因子的实验研究\*

代光明<sup>1</sup>, 汪洪<sup>1</sup>, 郑权<sup>1</sup>, 杜先智<sup>2△</sup>

(1. 四川省遂宁市第一人民医院呼吸内科, 四川遂宁 629000;

2. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科, 重庆 400010)

**摘要:**目的 观察结核分枝杆菌早期分泌靶抗原(ESAT-6)对  $\gamma\delta$ T 细胞产生淋巴因子的影响, 并对其信号转导机制进行初步探讨。方法 使用 Ficoll 密度梯度离心法分离健康人外周血单个核细胞(PBMC), 用流式细胞术分选纯化  $\gamma\delta$ T 细胞; Toll 样受体-4(TLR-4)特异性抑制剂 E5564 处理  $\gamma\delta$ T 细胞以抑制 TLR-4 的功能, 并用蛋白质免疫印迹法(Western blot)及逆转录-PCR(RT-PCR)法检测  $\gamma\delta$ T 细胞 TLR-4 蛋白及 mRNA 的表达, 以不加任何刺激因子的  $\gamma\delta$ T 细胞作空白对照, 用(ESAT-6)刺激  $\gamma\delta$ T 细胞, 并在第 0、1、3、6、9 和 12 d 取细胞上清液, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测 IL-17、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )的分泌水平。结果 Western blot 及 PCR 结果显示 ESAT-6 能显著提高  $\gamma\delta$ T 细胞 TLR-4 基因的转录与蛋白的表达( $P < 0.01$ ); ESAT-6 能显著提高  $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的表达( $P < 0.01$ ), 而 TLR-4 特异性抑制剂 E5564 能显著的抑制 ESAT-6 所致的  $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  淋巴因子的增加( $P < 0.01$ )。结论 ESAT-6 能显著上调  $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17、TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  的表达, 其增强  $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17、TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  表达的信号转导机制可能与 TLR-4 信号通路有关。

**关键词:**  $\gamma\delta$ T 细胞; ESAT-6; TLR-4; 细胞免疫

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)13-1537-03

## ESAT-6 enhances the expression of immune substances of $\gamma\delta$ T cells through upregulating the expression of TLR-4\*

Dai Guangming<sup>1</sup>, Wang Hong<sup>1</sup>, Zhen Quan<sup>1</sup>, Du Xianzhi<sup>2△</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine, the Suining First People's Hospital, Suining, Sichuan, 629000, China;

2. Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract:** Objective To observe the expression of immune substances secreted by peripheral blood  $\gamma\delta$ T cells after stimulated by early secreted antigenic target-6(ESAT-6), and explore its mechanism of signaling pathway. Methods Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were collected from health human blood with the ficoll density gradient centrifugation method, and the  $\gamma\delta$ T cells were separated from the PBMC with flow cytometry; the inhibitor of TLR-4 signaling pathway(E5564) was used to cocultured with  $\gamma\delta$ T cells to inhibit the function of TLR-4, and the change of TLR-4 was analyzed by the methods of PCR and Western blot. ESAT-6 were used to stimulate the  $\gamma\delta$ T cells, and the control group without any stimulating factor was established, then the expression levels of IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  were determined by ELISA method after 0, 1, 3, 6, 9 and 12 days. Results The results of PCR and Western blot showed that ESAT-6 could increase the expression of TLR-4( $P < 0.01$ ); The results of ELISA showed that ESAT-6 could enhance the expression of IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ( $P < 0.01$ ), and the inhibitor of TLR-4(E5564) could decrease the expression of IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ( $P < 0.01$ ). Conclusion ESAT-6 can induce  $\gamma\delta$ T cells to produce more IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and the mechanism of which maybe concerned with TLR-4 signaling pathway.

**Key words:** ESAT-6; TLR-4;  $\gamma\delta$ T cells; cellular immunity

近年来大量研究显示,  $\gamma\delta$ T 细胞在机体抗结核免疫中起重要作用, 除可以直接杀死结核杆菌外, 还可通过分泌多种淋巴因子直接或间接参与抗结核的免疫应答, 以及促进巨噬细胞等其他免疫细胞的抗结核免疫反应<sup>[1]</sup>,  $\gamma\delta$ T 细胞产生淋巴因子受多种刺激因素的影响。结核分枝杆菌早期分泌靶抗原(early secreted antigenic target-6, ESAT-6)是由结核分枝杆菌在早期感染阶段产生的分泌蛋白, 具有极强的特异性, 存在于致病性结核分枝杆菌中, ESAT-6 具有 T 细胞抗原决定簇, 有较强的免疫原性及免疫反应性, 有极强的抗原特异性, 能激活  $\gamma\delta$ T 细胞的功能<sup>[2-3]</sup>。为了研究 ESAT-6 对  $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )淋巴因子表达的影响, 本研究采用 ESAT-6 刺激  $\gamma\delta$ T 细胞, 并通过探讨 Toll 样受体-4(TLR-4)通路对 ESAT-6 刺激  $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$

的表达的影响, 从细胞内信号的角度更深入的解析 ESAT-6 刺激  $\gamma\delta$ T 细胞产生淋巴因子的作用机制。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** ESAT-6 抗原、TLR-4 受体特异性抑制剂 E5564 购自美国 Sigma 公司, Trizol RNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker DL1000 等 PCR 试剂及 TLR-4 引物购自大连宝生物 Takara 公司, 蛋白免疫印迹法(Western blot)配胶试剂盒购自碧云天生物技术研究所, 蛋白裂解液购自南京凯基生物科技发展有限公司, 淋巴细胞分离液购自中国科学院生物工程研究所, IL-2 购自 Peprotech 公司, 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人  $\gamma\delta$ T TCR 受抗、FITC 标记的鼠抗 IgG1 K 同性空白对照受体购自美国 eBioscience 公司, TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自美国 Sig-

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30872261)。 作者简介: 代光明(1981—), 主治医师, 硕士, 主要从事结核病与免疫的研究。 △

ma 公司, TLR-4 抗体购自美国 Abcam 公司,  $\beta$ -actin 内参购自北京四正柏生物有限公司, RPMI1640 干粉、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 流式细胞仪 (FCM) 购自美国 Beckman Coulter 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 外周血单个核细胞的制备** 抽取健康志愿者血液 40 mL (肝素抗凝), 与 Hank's 液 40 mL 混匀后, 取消毒灭菌的 50 mL 离心管 2 只, 加入 20 mL 淋巴细胞分离液, 将混匀的血液缓慢加入淋巴细胞分离液上面, 注意保持分界面清晰。以 2 000 r/min 离心 15 min, 吸取第二层环状乳白色淋巴细胞层, 将吸取细胞加入 5 mL 无血清 RPMI1640 培养基中, 以 800 r/min, 离心洗涤 10 min, 然后加入 5 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS), 以 800 r/min 离心洗涤, 每次 10 min, 所得白色细胞沉淀即为外周血单个核细胞, 将所得的单个核淋巴细胞转入 6 孔板中, 加入 2 mL 含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 双抗的 RPMI1640 培养液, 放置于 5%、37 °C 恒温培养箱中培养。

**1.2.2  $\gamma\delta$ T 细胞分离纯化及培养** 将所得的 PBMC 培养 3 d 后, 用 PBS 调整细胞浓度至  $1 \times 10^8$  /mL, 加入 Anti-human gamma delta TCR-FITC 荧光抗体, 以 Mouse IgG1 K Isotype Control FITC 荧光抗体为同型阴性对照, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育 1 h, 用 FCM 分离纯化  $\gamma\delta$ T 细胞, 并用 RPMI1640 完全培养基调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  /mL, 备用。

**1.2.3 实验分组** 将分离纯化的  $\gamma\delta$ T 细胞培养于 6 孔板中, 每孔中加入 1 mL 培养液, 分为不加任何刺激因子的空白对照组、ESAT-6 (10  $\mu$ g/mL) 处理组、E5564 (10  $\mu$ mol/mL) 处理组、ESAT-6 (10  $\mu$ g/mL) + E5564 (10  $\mu$ mol/mL) 处理组, 实验药物浓度参考文献 [4], 每次设置 3 个复孔, 重复 3 次。用 RPMI1640 完全培养基调整每孔的培养液至每孔 2 mL, 并在每孔中加入 IL-2 (200 U/mL) 及唑来膦酸 (300  $\mu$ g/mL) 刺激培养  $\gamma\delta$ T 细胞, 将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中, 每 2 天换 1 次液, 并继续用同等浓度的刺激因子刺激培养, 分别在第 1、3、6、9、12 天用 ELISA 法检测上清培养液中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的含量, 并在第 12 天后用逆转录-PCR (RT-PCR) 法检测 TLR-4 基因转录水平, 用 Western blot 法检测各实验组 TLR-4 蛋白的表达变化。

**1.2.4 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的含量** 加入各刺激因子后, 分别在第 1、3、6、9、12 天使用 ELISA 法检测各实验组上清液中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的含量。取需要检测的实验组培养液及各浓度标准液 100  $\mu$ L 包被 96 孔酶标板, 空白对照组加入 100  $\mu$ L 蒸馏水, 在各孔中加入 50  $\mu$ L 的酶标记溶液 (不含空白对照孔), 37 °C 孵育反应 1 h, 然后加入显色剂 A、B 液各 100  $\mu$ L, 25 °C 下避光反应 15 min, 再加入 50  $\mu$ L 的终止液终止显色, 并于酶标仪 450 nm 处测量各孔的吸光度值, 根据标准曲线查找出相应浓度, 并计算出实际的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 浓度值。

**1.2.5 RT-PCR 检测 TLR-4 基因转录** 将各处理组的  $\gamma\delta$ T 细胞用 Trizol 法提取总 RNA, 参照 Takara 逆转录说明书获得 cDNA, 以两步法进行 RT-PCR 扩增, 按照 PCR 说明书配制反应液。设置 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 (内参 59 °C 退火) 30 s, 72 °C 延伸 30 s (内参延伸 50 s), 35 个循环 (内参 30 个循环); 72 °C 延伸 5 min, 即得 PCR 扩增产物, 以 3% 的琼脂糖电泳, 用凝胶成像仪扫描成像。PCR 引物如下, TLR-4 正向引物: 5'-ATC TCA GCA AAA TCC CTC AT-3', 反向引物: 5'-AAT CCA GCA AAA TCC CTC AT-3',  $\beta$ -actin 正向引物: 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA A-3', 反向引

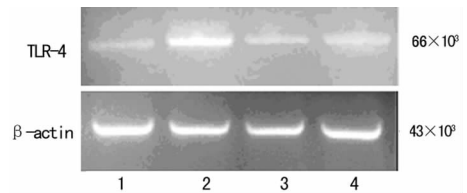
物: 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3'。

**1.2.6 Western blot 检测 TLR-4 蛋白** 将需要检测处理的  $\gamma\delta$ T 细胞提取总蛋白后, 用 BCA 法检测蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 用蛋白裂解液调整各实验组蛋白浓度至 5  $\mu$ g/ $\mu$ L, 并在沸水中加热 10 min。配制 8% 的分离胶及浓缩胶, 每孔加入 40  $\mu$ g 蛋白样品, 然后电泳、切胶, 并用 PVDF 膜转膜, 用 PBST 配制的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 再用 5% 脱脂奶粉按照 1:1 000 ( $\beta$ -actin 内参 1:3 000) 稀释兔抗人 TLR-4 一抗 4 °C 过夜封闭, 次日用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用 5% 脱脂奶粉按照 1:5 000 稀释加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 再用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后用 ECL 作为发光试剂显影成像并拍照。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 样本均数的两两比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

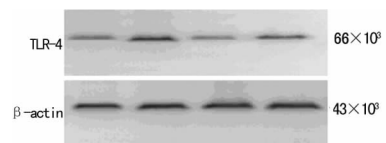
**2.1 PCR 检测  $\gamma\delta$ T 细胞 TLR-4 mRNA 的转录** 经加入不同的刺激因子处理  $\gamma\delta$ T 细胞, 12 d 后用 PCR 法检测  $\gamma\delta$ T 细胞 TLR-4 的基因转录, PCR 结果显示, ESAT-6 组 TLR-4 的基因转录较空白对照组显著增强 ( $P < 0.01$ ); E5564 处理组 TLR-4 的基因转录水平较空白对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与 ESAT-6 组相比, TLR-4 基因转录水平显著下调 ( $P < 0.01$ ); ESAT-6 + E5564 组, TLR-4 基因的转录水平较空白对照组增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 较 ESAT-6 组 TLR-4 基因的转录水平显著下调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 1。



1: 空白对照组; 2: ESAT-6 组; 3: E5564 组; 4: ESAT-6 + E5564 组。

图 1 PCR 检测 TLR-4 蛋白基因的表达

**2.2 Western blot 检测  $\gamma\delta$ T 细胞 TLR-4 蛋白表达** 经不同处理后, 各组  $\gamma\delta$ T 细胞培养 12 d 后, 用 Western blot 法检测  $\gamma\delta$ T 细胞 TLR-4 蛋白的变化, ESAT-6 组 TLR-4 蛋白的表达较其余各组明显增强 ( $P < 0.01$ ); ESAT-6 + E5564 组 TLR-4 蛋白的表达较空白对照组增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); E5564 组较空白对照组 TLR-4 蛋白的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。



1: 空白对照组; 2: ESAT-6 组; 3: E5564 组; 4: ESAT-6 + E5564 组。

图 2 Western blot 检测 TLR-4 蛋白的表达

**2.3 各实验组淋巴因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的检测** 各实验组经不同的处理培养后, 分别在第 0、1、3、6、9、12 天用 ELISA 法检测各组培养液中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的含量。

**2.3.1 TNF- $\alpha$  的浓度检测** ELISA 结果显示, ESAT-6 组 TNF- $\alpha$  的含量在前 6 d 随着培养时间呈上升趋势, 且各时间点较其余各组显著增加 ( $P < 0.01$ ), 但在培养第 6 天后 TNF- $\alpha$  的表达呈下降趋势; ESAT-6 + E5564 组 TNF- $\alpha$  含量较 ESAT-6 组显著下降 ( $P < 0.01$ ), 但是仍较空白对照组增加, 差异有统

计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在第 9 天后  $TNF-\alpha$  的表达上升不明显 ( $P > 0.05$ ), 见图 3。

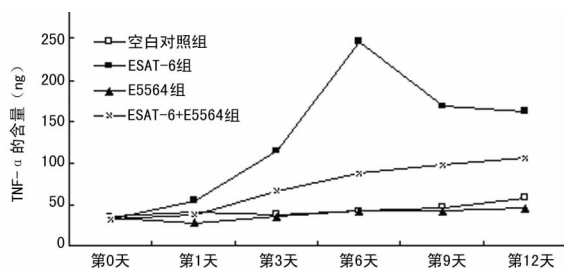


图 3  $TNF-\alpha$  在不同时间点的含量变化

**2.3.2 IFN- $\gamma$  的表达检测** ELISA 结果显示, ESAT-6 组 IFN- $\gamma$  在各时间点的含量较其余各组显著增强 ( $P < 0.01$ ), ESAT-6+E5564 组 IFN- $\gamma$  表达较 ESAT-6 组显著下降 ( $P < 0.01$ ), 较空白对照组增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

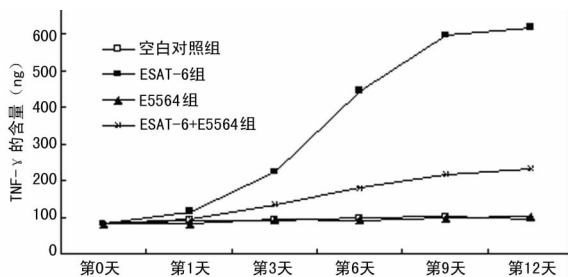


图 4 IFN- $\gamma$  在不同时间点的含量变化

**2.3.3 IL-17 的浓度的检测** ELISA 结果显示, ESAT-6 组 IL-17 各时间点的表达较其余各组显著增强 ( $P < 0.01$ ), ESAT-6+E5564 组 IL-17 表达较 ESAT-6 组显著下降 ( $P < 0.01$ ), 较空白对照组增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

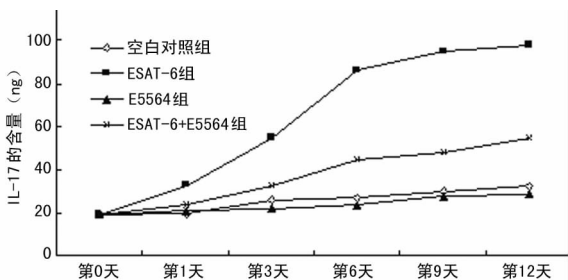


图 5 IL-17 在不同时间点的含量表达

### 3 讨 论

$\gamma\delta T$  细胞是  $CD4^+$ 、 $CD8^+$  双阴性细胞, 其抗原的处理和提呈不受组织相容性复合体限制, 作用介于固有免疫和适应性免疫之间<sup>[5]</sup>, 在机体抗结核、抗感染、自身免疫性疾病以及抗肿瘤中发挥着重要的作用。ESAT-6 是由结核分枝杆菌在早期感染阶段产生的分泌蛋白, 具有极强的特异性, 存在于致病性结核分枝杆菌中, 不存在于卡介苗及非致病性结核杆菌中, ESAT-6 具有 T 细胞抗原决定簇, 与培养滤液蛋白 10 (culture filtrate protein 10, CFP-10) 在体内以 1 : 1 二聚体的形式发挥作用<sup>[2,6-7]</sup>, 有极强的免疫原性及抗原特异性, 能特异性的激活  $\gamma\delta T$  细胞的功能。

IL-17、IFN- $\gamma$ 、 $TNF-\alpha$  具有多种生物学效应, 与机体防御、自身免疫性疾病、肿瘤有着密切的联系, 在保持细胞免疫及免疫记忆中具有重要作用。IL-17 不仅在机体病变部位将中性

粒细胞诱导至炎症部位而发挥生物学效应<sup>[8-9]</sup>, 还能促进中性粒细胞增殖及分泌炎症因子; 本实验通过 ESAT-6 刺激  $\gamma\delta T$  细胞, 可发现 ESAT-6 能显著提高  $\gamma\delta T$  细胞 IL-17 的表达, 这也从一方面解释了结核患者血液中 IL-17 较正常人明显增高的原因<sup>[4,10]</sup>, 而在用结核分枝杆菌感染小鼠的模型中,  $\gamma\delta T$  细胞是产生 IL-17 的主要细胞, 并不是  $CD4^+$  T 淋巴细胞<sup>[11]</sup>。IFN- $\gamma$  能显著活化巨噬细胞, 增强巨噬细胞对结核杆菌的抑制及杀伤作用<sup>[12]</sup>,  $\gamma\delta T$  细胞属于在感染早期提供 IFN- $\gamma$  来源的免疫细胞<sup>[13]</sup>, 本研究显示  $\gamma\delta T$  细胞经 ESAT-6 刺激后能迅速产生大量的 IFN- $\gamma$ 。在结核病的发病过程中,  $TNF-\alpha$  在诱导炎症细胞因子的保护性免疫反应中发挥重要作用, 对机体的抗感染起到一定的保护作用; 本研究在实验早期观察到 ESAT-6 能刺激  $\gamma\delta T$  细胞迅速产生  $TNF-\alpha$ , 同时也观察到  $TNF-\alpha$  在第 9 天后  $TNF-\alpha$  的含量呈下降趋势, 可能的原因是  $TNF-\alpha$  达到一定的浓度时,  $\gamma\delta T$  细胞可通过分泌其他的负性免疫调节因子控制免疫水平, 避免机体对结核等产生过激的免疫反应。

TLR-4 是介导内毒素及脂多糖的重要受体, 主要表达于单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等细胞表面, 能识别结核分枝杆菌的相关成分, 激活免疫系统, 导致炎症介质的释放<sup>[14-15]</sup>。本研究使用 ESAT-6 刺激  $\gamma\delta T$  细胞后,  $\gamma\delta T$  细胞 TLR-4 在基因转录及蛋白表达上显著上调, 同时也观察到细胞培养液中  $TNF-\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的含量也显著增加; 而 E5564 + ESAT-6 组尽管  $TNF-\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 在上清液中的含量较 ESAT-6 组明显下降, 但是仍然较空白对照组及只加入 TLR-4 特异性抑制剂 E5564 组  $TNF-\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 的含量增加, 差异有统计学意义, 这也提示 ESAT-6 刺激  $\gamma\delta T$  细胞产生  $TNF-\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 与 TLR-4 信号通路密切相关, 并且可推测 ESAT-6 还可以通过其他的途径刺激  $\gamma\delta T$  细胞产生  $TNF-\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17。

本研究结果显示, ESAT-6 能诱导  $\gamma\delta T$  细胞产生大量的  $TNF-\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 等淋巴因子, 可能与 TLR-4 信号通路有关, 也分析了炎症反应与信号通路及免疫细胞之间的相互关系, 不仅从一方面解释了结核患者早期血清中  $TNF-\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 含量明显增高的原因, 也为外周药物诱导  $\gamma\delta T$  细胞产生保护性的免疫物质提供了一定的理论基础。

### 参考文献:

- [1] Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, et al. Interferon-gamma production and host protective response against Mycobacterium tuberculosis in mice lacking both IL-12p40 and IL-18[J]. Microbes Infect, 2004, 6(4): 339-349.
- [2] Yuan W, Dong N, Zhang L, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine expressing a fusion protein of Ag85B-Esat6-HspX in mice[J]. Vaccine, 2012, 30(14): 2490-2497.
- [3] 何愉胜, 杜先智. 卡介苗与 ESAT-6 激活的  $\gamma\delta T$  细胞表达抗原提呈细胞表型和功能的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(3): 204-208.
- [4] Wang X, Barnes PF, Huang F, et al. Early secreted antigenic target of 6-kDa protein of Mycobacterium tuberculosis primes dendritic cells to stimulate Th17 and inhibit Th1 immune responses[J]. J Immunol, 2012, 189(6): 3092-3103.
- [5] Holtmeier W, Kabelitz D. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses[J]. Chem Immunol Allergy, 2005, 86: 151-183.

## 参考文献:

- [1] Rybicka M, Krysiak R, Okopień B. Venous occlusive disease of the liver[J]. *Wiad Lek*, 2009, 62(1):42-51.
- [2] Carreras E, Díaz-Beyá M, Rosinol L, et al. The incidence of veno-occlusive disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has diminished and the outcome improved over the last decade[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(11):1713-1720.
- [3] Helal I, Byzun A, Rerolle JP, et al. Acute renal failure following allogeneic hematopoietic cell transplantation: incidence, outcome and risk factors[J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2011, 22(3):437-443.
- [4] Jevtic D, Zecevic Z, Veljkovic D, et al. Venous occlusive disease in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation: relevance of activated coagulation and fibrinolysis markers and natural anticoagulants[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2011, 33(3):227-234.
- [5] Iguchi A, Kobayashi R, Kaneda M, et al. Plasma protein C is a useful clinical marker for hepatic veno-occlusive disease (VOD) in stem cell transplantation[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2010, 54(3):437-443.
- [6] Coppell JA, Richardson PG, Soiffer R, et al. Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: incidence, clinical course, and outcome[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(2):157-168.
- [7] Song JS, Seo JJ, Moon HN, et al. Prophylactic low-dose heparin or prostaglandin E1 may prevent severe veno-occlusive disease of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Korean children[J]. *J Korean Med Sci*, 2006, 21(5):897-903.
- [8] Cesaro S, Pillon M, Talenti E, et al. A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Haematologica*, 2005, 90(10):1396-1404.
- [9] 冯四洲, 韩明哲, 张莉, 等. 供、受者感染乙型肝炎病毒对造血干细胞移植的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2000, 21(8):21-23.
- [10] Coppell JA, Brown SA, Perry DJ. Venous occlusive disease: cytokines, genetics, and haemostasis[J]. *Blood Rev*, 2003, 17(2):63-70.
- [11] Kalayoglu-Besisik S, Yenerel MN, Caliskan Y, et al. Time-related changes in the incidence, severity, and clinical outcome of hepatic veno-occlusive disease in hematopoietic stem cell transplantation patients during the past 10 years[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(5):2285-2289.
- [12] Tsakiris DA. Prophylaxis and treatment of hepatic veno-occlusive disease after pediatric stem cell transplantation [J]. *Haematologica*, 2006, 91(6):726B.
- [13] Inukai T, Sugita K, Goi K, et al. Prevention of hepatic veno-occlusive disease by a combination of heparin and prostaglandin E1 in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2004, 45(4):297-303.
- [14] 白庆威, 陈协群, 张永清, 等. 异基因造血干细胞移植治疗白血病 76 例临床观察[J]. *中国实用内科杂志*, 2007, 27(20):1616-1618.
- (收稿日期:2013-12-12 修回日期:2014-03-07)
- (上接第 1539 页)
- [6] Grover A, Izzo AA. BAT3 regulates Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6-mediated apoptosis of macrophages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e40836.
- [7] Hemmati M, Seghatolislam A, Rasti M, et al. Expression and purification of recombinant mycobacterium tuberculosis (TB) antigens, ESAT-6, CFP-10 and ESAT-6/CFP-10 and their diagnosis potential for detection of TB patients[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2011, 13(8):556-563.
- [8] Lee JW, Wang P, Kattah MG, et al. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2008, 181(9):6536-6545.
- [9] Li J, Mo HY, Xiong G, et al. Tumor microenvironment macrophage inhibitory factor directs the accumulation of interleukin-17-producing tumor-infiltrating lymphocytes and predicts favorable survival in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(42):35484-35495.
- [10] Li Q, Li J, Tian J, et al. IL-17 and IFN- $\gamma$  production in peripheral blood following BCG vaccination and Mycobacterium tuberculosis infection in human[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16(14):2029-2036.
- [11] Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by  $\gamma$ delta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection[J]. *J Immunol*, 2006, 177(7):4662-4669.
- [12] Pitt JM, Stavropoulos E, Redford PS, et al. Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guérin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- $\gamma$  and IL-17 responses and increases protection to Mycobacterium tuberculosis infection [J]. *J Immunol*, 2012, 189(8):4079-4087.
- [13] Veenstra H, Crous I, Brahmabhatt S, et al. Changes in the kinetics of intracellular IFN- $\gamma$  production in TB patients during treatment[J]. *Clin Immunol*, 2007, 124(3):336-344.
- [14] Byun EH, Kim WS, Kim JS, et al. Mycobacterium paratuberculosis CobT activates dendritic cells via engagement of Toll-like receptor 4 resulting in Th1 cell expansion[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(46):38609-38624.
- [15] Lan L, Tao J, Chen A, et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1):75-80.
- (收稿日期:2013-12-28 修回日期:2014-03-25)