

结核分枝杆菌抗原 Ag85B 优势诱导活动性结核患者 Th1 型细胞免疫反应研究

王洁玲 唐余燕 张毅 汤正好 臧国庆 余永胜

摘要 **目的** 观察 Ag85B 抗原在诱导活动性结核患者细胞免疫应答中的作用。**方法** 选取 60 例活动性结核患者,分离其外周血单个核淋巴细胞(PBMC),加 Ag85B 抗原刺激培养 72h,ELISA 法检测上清液中的 IFN- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 细胞因子浓度,流式细胞术(FCM)检测 CD4⁺T 淋巴细胞内的细胞因子 IFN- γ 水平,定量 PCR 及 Western blot 法检测 PBMC 细胞转录因子 T-bet、GATA-3 的表达。**结果** 检测活动性结核患者外周血单个核淋巴细胞(PBMC)培养上清液,Ag85B 蛋白实验组 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2 浓度明显高于结核菌素(PPD)组($P < 0.05$),而 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 水平与 PPD 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),以上两组细胞因子水平均明显高于空白对照组($P < 0.05$)。流式细胞法检测 CD4⁺T 胞内细胞因子 IFN- γ 水平,Ag85B 蛋白实验组高于 PPD 组及空白对照组($P < 0.05$)。定量 PCR 及 Western blot 法检测,T-bet 水平 Ag85B 组高于 PPD 组($P < 0.05$),而 GATA-3 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 结核杆菌抗原 Ag85B 可以通过上调 Th1 型转录因子 T-bet 诱导优势 Th1 型免疫反应,为结核病的预防及治疗提供理论基础。

关键词 活动性结核 Ag85B 抗原 Th1 型细胞免疫

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.021

Enhancement of Th1 Type Cellular Immune Response in Active TB Patients Induced by Ag85B Mycobacterium Tuberculosis Antigens.

Wang Jieling, Tang Yuyan, Zhang Yi, et al. The Sixth People's Hospital Affiliate to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Abstract **Objective** To observe whether the Ag85B antigen could enhance Th1-type cellular immune response in active TB patients and study the mechanism. **Methods** In 60 patients with active TB, peripheral blood PBMC cell were Separated, and they were stimulated with the antigen Ag85B, purified protein derivative(PPD) and Phosphate Buffered Saline(PBS), respectively. The levels of Th1/Th2 type cytokines(IFN- γ , IL-2 and IL-4, IL-10) secreted by PBMC cells were analyzed by ELISA. Flow cytometry(FCM) was used to detecte the CD4⁺T cell cytokines IFN- γ . The expression of PBMC cells specific T-bet and GATA-3 were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot analysis. **Results** Antigen Ag85B significantly increased the Th1-type cytokine(IFN- γ , IL-2) in active TB patients compared with PPD ($P < 0.05$), while Th2 cytokines IL-4, IL-10 level compared with PPD group, had no statistically significant difference ($P > 0.05$). By applying the method of flow cytometry, We detected intracellular cytokines IFN- γ levels of CD4⁺T lymphocyte number which was higher than PPD group and normal control group ($P < 0.05$). The expression of T-bet was significantly up-regulated in the Ag85B group compared with the control groups ($P < 0.05$). Moreover, the expression of GATA-3 had no significant difference between Ag85B group and PPD group ($P > 0.05$). **Conclusion** Ag85B mycobacterium tuberculosis antigens by raising Th1 type transcription factor induced advantage T-bet Th1 immune response.

Key words Active TB; Ag85B antigens; Th1 cellular immune

近年来,艾滋患者合并结核感染的高发(合并感染率达 30%)、结核杆菌耐药菌株的流行,结核病是严重的公共卫生问题,据 2014 年世界卫生组织(WHO)评估目前全球每年新发患者高达 900 万,死亡 150 万/年^[1]。另一方面,传统卡介苗不完全有效。

已证实 BCG 疫苗仅可预防婴幼儿肺外器官结核的发生,对于预防成人或者婴幼儿肺结核效果不肯定^[2]。近 1/3 的世界人口潜在感染了结核分枝杆菌,而仅 5%~10% 的感染者发展为活动性结核病,是否发病及发病后的转归主要取决于结核分枝杆菌毒力和机体自身免疫两个方面^[3]。清除结核杆菌的保护性免疫应答主要依赖于细胞免疫,其中 CD4⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 可活化巨噬细胞的杀菌功能,CD8⁺CTL 可

基金项目:上海市教育委员会科研创新项目(1522013)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院感染科

通讯作者:余永胜,电子邮箱:yuyongsheng@medmail.com.cn

有效杀伤感染结核杆菌细胞^[4]。

结核病程发展中 Th1 型细胞免疫发挥重要作用, Th1 型细胞免疫反应低下或 Th1/Th2 免疫失衡是活动性结核患者的免疫特征^[5]。机体在清除结核分枝杆菌感染中, CD4⁺ Th1 分泌的细胞因子 IL-2 与 IFN- γ 起重要作用, 尤其是 IFN- γ 。研究表明缺失 IFN- γ 受体的个体感染结核分枝杆菌更易发病, 效应性细胞因子 IFN- γ 可刺激活性氮介质 (RNI) 的产生而激活巨噬细胞清除结核杆菌的感染; 而 Th2 型细胞因子如 IL-4 能抑制巨噬细胞的活化, 与结核感染的慢性化和复发相关^[6]。抗原 85 (Ag85) 复合物是结核分枝杆菌的主要分泌蛋白, 可占分泌蛋白总量的 30%~40%, 包括 Ag85A、Ag85B 和 Ag85C 3 个组分, 其中 Ag85B 抗原性最强且在分泌蛋白中含量最高^[7]。本实验拟用 Ag85B 蛋白作为抗原刺激活动性结核患者的外周血单个核淋巴细胞 (PBMC) 并进行培养, 检测 Ag85B 诱导细胞 Th1/Th2 型免疫应答情况, 并进一步探讨其机制。

材料与方 法

1. 研究对象: 选取活动性结核患者 60 例, 男性 34 例, 女性 26 例, 患者年龄 25~52 岁, 平均年龄 36 \pm 10 岁, 以上病例均来自上海交通大学附属第六人民医院感染科, 根据病史, 临床症状、X 线检查、病理学、痰涂片和细菌培养以及体外酶联斑点实验 (T-SPOT) 等辅助诊断, 且后继抗结核治疗有效, 排除其他病原体感染, 排除肿瘤等免疫相关性或免疫性疾病, 4 个月内未用过激素及免疫抑制剂, 均在抗结核治疗前采血。

2. 主要仪器与试剂: Ag85B (38kda Antigen, Ag85b) 购自美国 Alpha Diagnostic International 公司; PPD (purified protein derivative) 购自中国药品生物制品检定所 (1 毫克/支); RPMI1640 及胎牛血清购自美国 Gibco 公司。人淋巴细胞分离液购自达科为生物工程技术有限公司。ELISA 试剂盒 (IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-4) 均购自美国 RayBiotech 公司。荧光素 FITC 标记抗人 CD4 抗体, PE 标记抗人 IFN- γ 及同型对照均购自 eBioscience 公司。反转录试剂盒 (RR037A) 及 Real time PCR 试剂盒 (RR420A) 均购自 TaKaRa 公司。兔单克隆抗体 T-bet 和 GATA-3 购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

3. 方法: (1) 外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 分离及培养 无菌采集静脉血 20ml, 肝素抗凝, 采用 Ficoll 密度离心法分离外周血

中的单个核细胞, 得到 PBMC 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 调成 1×10^6 /ml 浓度, 然后接种于 6 孔培养板上, 每孔 2ml, 平均分为 3 组, 分别按 1 μ g/ml 加入 Ag85B 蛋白, 1 μ g/ml 加入 PPD 蛋白, 空白组加入 PBS, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育, 培养 72h 后检测各项指标 (酶联免疫吸附法检测、流式检测、定量 PCR、Western blot 法)。(2) PBMC 细胞培养上清液中细胞因子水平的检测: 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测。5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 72h 后, 收集 PBMC 细胞上清液; 严格按 ELISA 试剂盒的说明书进行操作。以 A 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线。通过曲线根据 A 值计算出 IFN- γ 、IL-2、IL-10 和 IL-4 的浓度, 检测结果以皮克/毫升 (pg/ml) 表示。(3) CD4⁺ T 细胞内细胞因子检测: 采用流式细胞仪 (美国 Beckman 公司) 检测, 收集培养 72h 的 PBMC 细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后收集, 加入 5 μ l APC-CD4 抗体常温暗处孵育 20min 后; 加 2~3ml PBS 洗液, 500g 离心 5min, 弃上清, 洗涤 2 次, 使用 100 μ l 固定剂固定 15min, PBS 洗涤后加破膜剂 100 μ l 作用 10min, 破膜剂作用后直接加 PE-IFN- γ 抗体 5 μ l, 室温暗处孵育 30min; 加 2~3ml PBS 洗液, 500g 离心 5min, 弃上清, 洗涤 2 次, 用 PBS 重悬至 500 μ l, 上机检测细胞荧光强度。(4) 定量 PCR 检测 PBMC 内 T-bet、GATA-3 表达水平: 细胞总 RNA 抽提和反转录, real-time PCR 检测两组患者外周淋巴细胞 T-bet、GATA-3 表达, 引物序列为 T-bet 上游引物: 5'-GTGCTCCAGTCCCTCCATA-3', 下游引物: 5'-GTAGGCAGTCACGGCAATG-3'; 引物序列 GATA-3 上游引物: 5'-GCTAAACGACCCCTC-CAAG-3', 下游引物: 5'-GGAAGCAAAGGTGAG-CAAA-3'; 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上游引物: 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTGCG-3', 下游引物: 5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30s, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环; 每次在延伸阶段读取吸光值。各组细胞表达的 T-bet、GATA-3 水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示。(5) Western blot 法检测 PBMC 内 T-bet、GATA-3 蛋白水平: 制备培养细胞蛋白样品, SDS-PAGE 电泳后转膜至硝酸纤维素 NC 膜上, 取出漂洗过的印迹膜, 放入 5% 脱脂牛奶中封闭 1h, 向封闭后的印迹膜加入稀释后的一抗 T-bet、GATA-3 (1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天洗涤缓冲液洗膜后, 封 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:5000), 4 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 洗膜后 ECL 化学发光法检测, 将膜置于

暗匣中,在暗室内形成明显的肉眼可见的化学发光带,利用胶片感光,将结果记录下来,后用 Gel-Pro Analyzer 软件定量分析结果。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行统计分析,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,样本均数间的比较采用两独立样本的 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PBMC 细胞培养上清液中细胞因子水平的检测:为了解 Ag85B 抗原刺激对活动性结核患者外周血单个核细胞 Th1 和 Th2 型细胞因子分泌水平的影响,收集 PBMC 细胞培养上清液,采用 ELISA 法进行检测(图 1)。结果提示和空白对照组相比,Ag85B 组及 PPD 组上清液中 IFN- γ 和 IL-2 浓度均显著升高($P < 0.05$);Ag85B 组 IFN- γ 和 IL-2 浓度($1719.36 \pm 99.41, 371.15 \pm 33.86$)较 PPD 组($1221.88 \pm 90.05, 223.07 \pm 21.86$)明显升高($P < 0.01$);Ag85B 组及 PPD 组上清液 IL-10 和 IL-4 浓度和空白对照组相比均有升高,且差异具有统计学意义($P < 0.05$);IL-4 和 IL-10 浓度 Ag85B 组和 PPD 组相比差异无统计学意义($176.54 \pm 14.55, 95.84 \pm 14.63; 163.03 \pm 15.92, 90.95 \pm 11.06; P > 0.05$),提示 Ag85B 抗原优势诱导活动性结核患者 Th1 型细胞免

疫反应。

2. CD4⁺T 细胞内细胞因子分析:本试验采用流式细胞仪对细胞进行 CD4 和 IFN- γ 双标检测,测定 Ag85B 抗原刺激对 CD4⁺T 细胞中 IFN- γ 分泌量的影响,发现 Ag85B 组外周淋巴细胞中 IFN- γ ⁺CD4⁺T 细胞比例($2.20\% \pm 0.65\%$),较 PPD 组($1.50\% \pm 0.46\%$)和空白对照组($1.00\% \pm 0.57\%$)显著增加($P < 0.05$),提示 Ag85B 抗原刺激可增强活动性结核患者 IFN- γ ⁺CD4⁺T 细胞比例(图 2)。

3. RT-PCR 检测经不同处理的活动性结核患者 PBMC 中 T-bet mRNA、GATA-3 mRNA 的表达水平:为探讨 Ag85B 抗原刺激活动性结核患者外周 Th1/Th2 细胞反应的机制,本实验通过定量 PCR 法检测外周 PBMC T-bet mRNA、GATA-3 mRNA 表达水平,结果显示 Ag85B 组 PBMC 中 T-bet mRNA 的表达为 2.36 ± 0.57 , 较 PPD 组(1.43 ± 0.21)和空白对照组(0.86 ± 0.12)显著增加,且差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 3)。Ag85B 组(1.56 ± 0.12)和 PPD 组(1.31 ± 0.16)中 GATA-3 mRNA 的表达为较空白对照组(0.86 ± 0.11)显著增加,且差异有统计学意义($P < 0.05$);而 Ag85B 组和 PPD 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,图 3)。

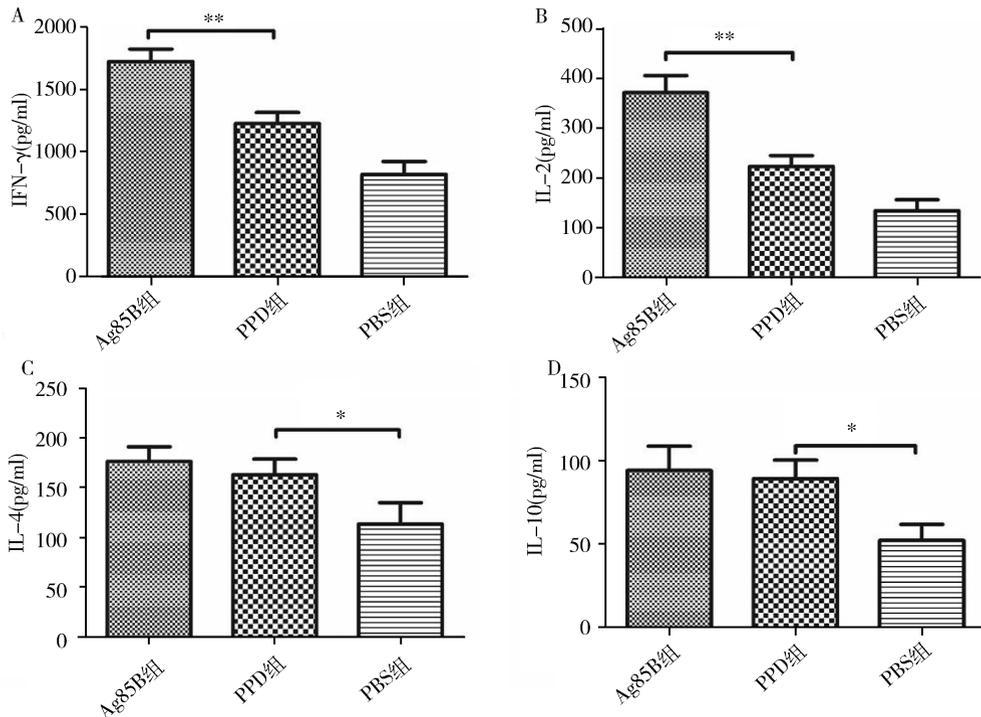


图 1 PBMC 培养上清液中的细胞因子水平

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

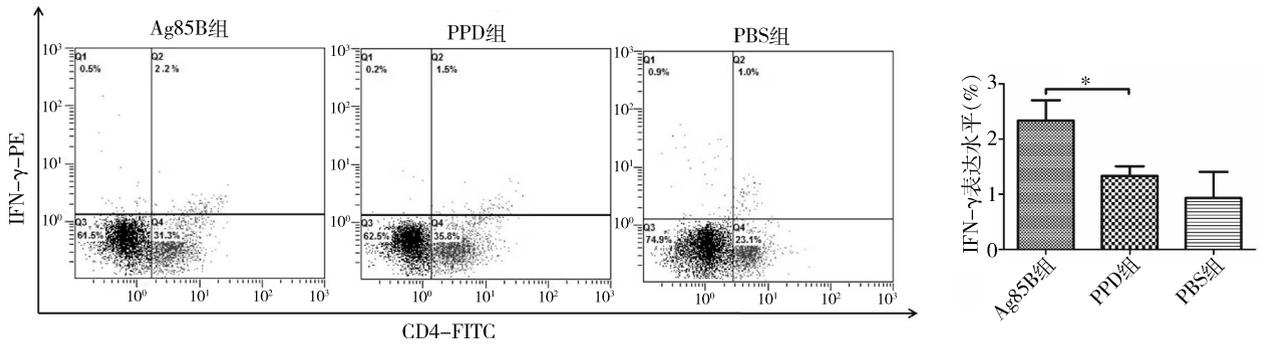


图2 CD4⁺ T 细胞内 IFN-γ 表达水平

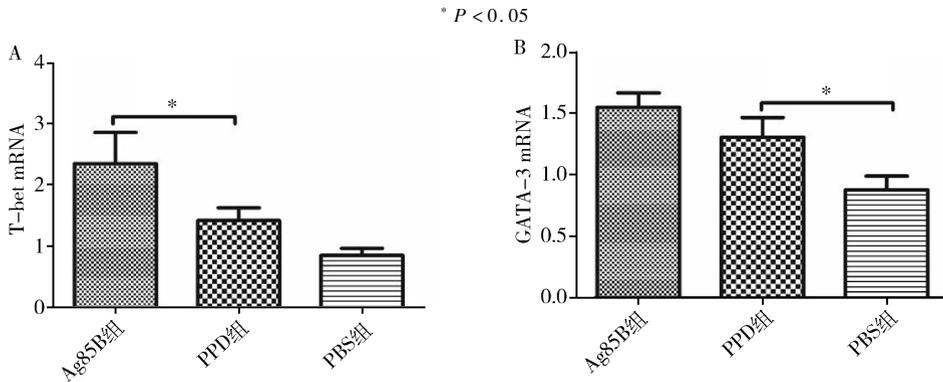


图3 T-bet mRNA、GATA-3 mRNA 的表达水平

4. Western blot 法检测 T-bet、GATA-3 表达水平:为探讨 Ag85B 抗原刺激活动性结核患者外周 Th1/Th2 细胞反应的机制,本实验通过 Western blot 法检测外周 PBMC T-bet、GATA-3 表达水平,结果显示 Ag85B 组 PBMC 中 T-bet 的表达较 PPD 组和空白对照组显著增加,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Ag85B 组和 PPD 组 PBMC 中 GATA-3 的表达较空白对照组显著增加,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4);而 Ag85B 组与 PPD 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与上述结果相一致。

讨 论

据世界卫生组织评估,目前我国结核年发病人数约为 130 万,占全球发病人数的 14%,居全球第 2 位^[1]。近 1/3 的世界人口潜在感染了结核分枝杆菌,而仅 5%~10% 的感染者发展为活动性结核病,特异性细胞免疫应答是机体抵抗结核分枝杆菌的最重要的保护性免疫因素^[3]。MTB 耐药菌株的流行、HIV 和 MTB 合并感染以及化疗药物对细胞内滞留菌杀灭作用降低而致疗程较长,使得结核病免疫治疗的研究日益受到重视^[1]。

结核分枝杆菌感染可引起机体产生免疫应答,依

据分泌的细胞因子谱可将 Th 细胞分为 Th1、Th2 两个亚群;Th1 细胞分泌 IL-2、IFN-γ 和 IFN-α 等,激活巨噬细胞和细胞毒性 T 细胞 (CTL),Th2 细胞分泌 IL-4、IL-10 等,参与抗体形成^[8]。虽然机体感染结合分枝杆菌后,可产生特异性抗体,但其对机体的免疫保护作用机制尚不明确。CD4⁺ T 细胞和 CTL 等淋巴细胞及 IFN-γ、IL-2 等 Th1 型细胞因子是抗结核杆菌感染保护性免疫应答的重要组成部分^[4]。Hutchinson 等^[9] 研究显示 CD4 基因缺陷小鼠对结核分枝杆菌感染早期抵抗力显著降低,表明 CD4⁺ T 细胞免疫在抗结核免疫中的关键作用,以 CD4⁺ T 数量减少及功能异常为特征的艾滋患者对结核杆菌高度易感也证明了这点。Th1 型细胞因子 IFN-γ 能够促进巨噬细胞对抗原的递呈及自身活化,并通过诱导如一氧化氮 (NO) 等增强其杀菌能力而加强细胞免疫应答,同时 IFN-γ 还可抑制富含 Th2 和嗜酸粒细胞的炎症反应^[6]。另有研究表明缺失 IFN-γ 受体的个体容易罹患严重的结核分枝杆菌感染,若给该受体基因缺陷的幼儿接种卡介苗甚至可引起致死性感染^[10]。而 Th2 型细胞因子如 IL-4 能抑制巨噬细胞的活化,降低结核患者的细胞免疫力,促进了感染的慢性化及

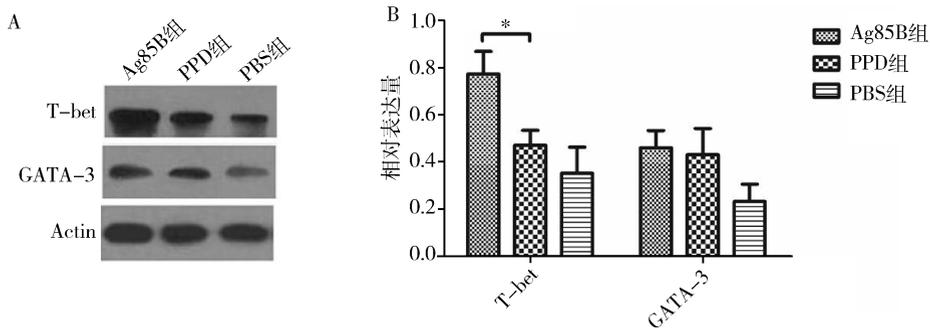


图4 T-bet、GATA-3蛋白的表达水平

* $P < 0.05$

复发,其水平与结核杆菌感染的转归呈负相关^[11]。

研究发现,活动性结核病患者体内保护性免疫应答水平降低,表现为免疫应答倾向于Th2水平,Th1型细胞免疫反应低下或Th1/Th2免疫失衡,IFN- γ 产生减少,IL-4产生增加,Th1/Th2型免疫应答在结核病的发生、发展和控制方面起着非常重要的作用,从某种意义上可以认为结核病是机体感染MTB后产生的免疫紊乱性疾病^[12]。因此,若能纠正机体免疫偏差,激发抗结核分枝杆菌的保护性免疫应答则有利于机体清除病原菌达到治疗目的。

结核分枝杆菌的蛋白可分为3种:分泌蛋白、细胞壁蛋白和细菌裂解释放出的细胞质蛋白。抗原85复合物的Ag85A、Ag85B和Ag85C3个组分虽然由3种同源的蛋白质组成,但是由不同基因、不同启动子、不同转录单位表达出不同功能的3种蛋白抗原。Ag85B蛋白是结核杆菌主要分泌蛋白Ag85复合物中的组分之一,Commandeur等^[13]发现Ag85B能被T细胞表位识别,并能诱导产生特异性免疫保护。Ag85B在MTB细胞壁合成的晚期起决定作用,细胞壁不但对于结核分枝杆菌的形态、染色性、抵抗力代谢活性等生物学特性具有重要影响,更是决定了结核分枝杆菌的抗原性^[7]。蛋白Ag85B在结核分枝杆菌分泌蛋白中含量最高且抗原性最强,本研究旨在观察Ag85B抗原诱导增强活动性结核患者Th1型细胞免疫及并探讨其机制。

笔者用抗原Ag85B、PPD刺激活动性结核患者外周血单个核细胞(PBMC),酶联免疫吸附法检测PBMC培养上清液,结果显示Ag85B蛋白实验组Th1型细胞因子IFN- γ 、IL-2浓度明显高于结核菌素(PPD)组($P < 0.05$),而Th2型细胞因子IL-4、IL-10水平与PPD组相比,差异不具有统计学意义($P > 0.05$),以上两组细胞因子水平均明显高于空白对照组($P < 0.05$)。上述结果提示Ag85B蛋白实验组和

PPD组均可增强活动性结核患者的Th1及Th2型细胞免疫功能,相比较来说,实验组Ag85B蛋白更能优势诱导增强Th1型细胞免疫反应。同时笔者利用流式细胞仪检测各组分泌细胞因子IFN- γ 的CD4⁺T细胞,结果提示Ag85B实验组外周淋巴细胞分泌IFN- γ 的CD4⁺T比例高于PPD对照组及正常对照组($P < 0.05$),说明相较于PPD组,Ag85B抗原诱导活动性结核患者Th1型细胞免疫能力更强。以上提示Ag85B能诱导产生特异性免疫保护,与Husain等^[14]研究结果相一致,他们也认为一般的抗原(如BCG、热休克蛋白65(HSP65)等)相比,Ag85B蛋白更能增强膀胱癌患者的细胞免疫功能,抑制膀胱肿瘤细胞生长。

不同的转录因子诱导不同类型细胞的转录及相关细胞因子的分泌,T-bet是调控Th1型细胞极化的特征性转录因子,它可激活IFN- γ 基因,促进染色质重排;可促进Th0细胞向Th1细胞方向极化,还可以诱导已经分化的Th2细胞向Th1细胞方向转化^[15]。GATA-3是锌指蛋白GATA家族成员,几乎所有的Th2型细胞因子的启动子区均存在GATA-3的结合位点,说明GATA-3在Th2型细胞分化中的主导作用^[16]。为了进一步探讨Ag85B抗原诱导增强特异性Th1型细胞免疫反应的机制,笔者采用定量PCR及Western blot法检测外周PBMC内T-bet、GATA-3表达水平,结果显示Ag85B实验组T-bet水平高于PPD组及正常对照组,而外周PBMC GATA-3水平实验组和PPD组相比较差异没有统计学意义($P > 0.05$)。进一步说明结核分枝杆菌抗原Ag85B相较于PPD能够通过上调Th1型转录因子T-bet而优势诱导活动性结核患者PBMC的Th1型细胞免疫,这为纠正结核病患者免疫偏差的免疫治疗提供了一定的思路及理论依据。

参考文献

1 Bisson GP, Zetola N, Collman RG. Persistent high mortality in ad-

- vanced HIV/TB despite appropriate antiretroviral and antitubercular therapy: an emerging challenge[J]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2015, 12(1): 107-116
- 2 Abebe F, Bjune G. The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccines: is there a link[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 145(3): 389-397
 - 3 Pantoja A, Kik SV, Denkinger CM. Costs of novel tuberculosis diagnostics - will countries be able to afford it [J]. *J Infect Dis*, 2015, 211: S67-S77
 - 4 Urdahl KB. Understanding and overcoming the barriers to T cell-mediated immunity against tuberculosis[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(6): 578-587
 - 5 Beirand E, Abediankenari S, Rezaei MS, *et al.* Increased expression of forkhead box protein 3 gene of regulatory T cells in patients with active tuberculosis[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2014, 13(5): 330-334
 - 6 Guo S, Zhao J. Immunotherapy for tuberculosis: what's the better choice[J]. *Front Biosci*, 2012, 17: 2684-2690
 - 7 Huygen K. The Immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis* [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 321
 - 8 Huber M, Lohoff M. Change of paradigm: CD8⁺ T cells as important helper for CD4⁺ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis [J]. *Allergo J Int*, 2015, 24(1): 8-15
 - 9 Hutchinson P, Barkham TM, Tang W, *et al.* Measurement of phenotype and absolute number of circulating heparin-binding hemagglutinin, ESAT-6 and CFP-10, and purified protein derivative antigen-specific CD4 T cells can discriminate active from latent tuberculosis infection[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22(2): 200-212
 - 10 Quispel WT, Stegehuis-Kamp JA, Santos SJ, *et al.* Intact IFN-gamma R1 expression and function distinguishes Langerhans cell histiocytosis from mendelian susceptibility to mycobacterial disease [J]. *J Clin Immunol*, 2014, 34(1): 84-93
 - 11 Ashenafi S, Aderaye G, Bekele A, *et al.* Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3[J]. *Clin Immunol*, 2014, 151(2): 84-99
 - 12 Ma H, Wu K, Liu F, *et al.* Dose of incorporated immunodominant antigen in recombinant BCG impacts modestly on Th1 immune response and protective efficiency against *Mycobacterium tuberculosis* in mice[J]. *J Immunol Res*, 2014, 196: 124
 - 13 Commandeur S, Van Den Eeden SJ, Dijkman K, *et al.* The in vivo expressed *Mycobacterium tuberculosis* (IVE-TB) antigen Rv2034 induces CD4⁺ T-cells that protect against pulmonary infection in HLA-DR transgenic mice and guinea pigs[J]. *Vaccine*, 2014, 32(29): 3580-3588
 - 14 Husain AA, Warke SR, Kalorey DR, *et al.* Comparative evaluation of booster efficacies of BCG, Ag85B, and Ag85B peptides based vaccines to boost BCG induced immunity in BALB/c mice: a pilot study [J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2015, 4(1): 83-87
 - 15 Gao F, Wei D, Bian T, *et al.* Genistein attenuated allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet, GATA-3 and STAT-6 in a murine model of asthma [J]. *Pharmacology*, 2012, 89(3-4): 229-236
 - 16 Baraut J, Farge D, Jean-Louis F, *et al.* Transforming growth factor-β increases interleukin-13 synthesis via GATA-3 transcription factor in T-lymphocytes from patients with systemic sclerosis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17:196
(收稿日期:2015-09-01)
(修回日期:2015-09-21)
-
- (上接第 76 页)
- 2 Chamoun D, Udoff L, Scott L, *et al.* A seasonal effect on pregnancy rates in an in vitro fertilization program [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12(9): 585-589
 - 3 Weigert M, Feichtinger W, Kulin S, *et al.* Seasonal influences on in vitro fertilization and embryo transfer [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2001, 18(11): 598-602
 - 4 Braga DP, Setti A, Figueira Rde C, *et al.* Seasonal variability in the fertilization rate of women undergoing assisted reproduction treatments [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(7): 549-552
 - 5 Rojansky N, Benschushan A, Meirsdorf S, *et al.* Seasonal variability in fertilization and embryo quality rates in women undergoing IVF [J]. *Fertil Steril*, 2000, 74(3): 476-481
 - 6 Revelli A, La Sala GB, Gennarelli G, *et al.* Seasonality and human in vitro fertilization outcome [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2005, 21(1): 12-17
 - 7 Wunder DM, Limoni C, Birkhäuser MH, *et al.* Lack of seasonal variations in fertilization, pregnancy and implantation rates in women undergoing IVF [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(11): 3122-3129
 - 8 Tomic J, Tomic V. Influence of seasonal variations on in-vitro fertilization success [J]. *Coll Antropol*, 2011, 35(2): 543-546
 - 9 Wood S, Quinn A, Troupe S, *et al.* Seasonal variation in assisted conception cycles and the influence of photoperiodism on outcome in in vitro fertilization cycles [J]. *Hum Fertil: Camb*, 2006, 9(4): 223-229
 - 10 朱春芳, 葛红山, 陈华, 等. 两种不同胚胎培养模式对体外胚胎发育和妊娠结局的影响[J]. *生殖与避孕*, 2015, 35(1): 57-61
(收稿日期:2015-08-18)
(修回日期:2015-09-10)
 - 11 Sauerbrun-Cutler MT, Vega M, Keltz M, *et al.* In vitro maturation and its role in clinical assisted reproductive technology [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2015, 70(1): 45-57
 - 12 Danilenko KV, Sergeeva OY. Immediate effect of blue-enhanced light on reproductive hormones in women [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2015, 36(1): 84-90
 - 13 Dragojevic Dikic S, Jovanovic AM, Dikic S, *et al.* Melatonin: a "Higgs boson" in human reproduction [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(2): 92-101
 - 14 Chojnacki C, Walecka-Kapica E, Lokiec K, *et al.* Influence of melatonin on symptoms of irritable bowel syndrome in postmenopausal women [J]. *Endokrynol Pol*, 2013, 64(2): 114-120
 - 15 Rudick B, Ingles S, Chung K, *et al.* Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(11): 3321-3327
 - 16 Candiani S, Augello A, Oliveri D, *et al.* Immunocytochemical localization of serotonin in embryos, larvae and adults of the lancelet, *Branchiostoma floridae* [J]. *Histochem J*, 2001, 33(7): 413-420
 - 17 Martinez MC, Ruiz FJ, Garcia-Velasco JA, *et al.* GnRH-agonist triggering to avoid ovarian hyperstimulation syndrome: a review of the evidence [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(8): 843-849
 - 18 Harbach H, Antrecht K, Boedeker RH, *et al.* Response of proopiomelanocortin and gonado- or lactotroph systems to in-vitro fertilisation procedures stress [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 141(2): 137-142