

Tim-3 在 IgA 肾病患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义

孟 博¹, 谢而付^{2*}, 周春刚³

(¹南京中医药大学附属无锡中医院检验科, 江苏 无锡 214071; ²南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏 南京 210029; ³南京中医药大学附属无锡中医院中心实验室, 江苏 无锡 214071)

[摘要] 目的:探究免疫球蛋白黏蛋白 3(T cell immunoglobulin and mucin 3, Tim-3)在 IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)发病过程中的作用及其临床意义。方法:real-time qPCR 检测 41 例 IgAN 患者及同期 21 例健康对照者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中 Tim-3 mRNA 表达水平。流式细胞术检测 IgAN 患者和健康对照者 PBMC 中 Tim-3 阳性细胞比例。记录肾组织活检前 24 h 尿蛋白定量、尿常规、尿沉渣、镜下红细胞数及血肌酐等临床相关指标。结果:Tim-3 mRNA 在 IgAN 患者 PBMC 中表达明显升高(0.64 ± 0.27 vs. 0.18 ± 0.09 , $P < 0.01$),且随疾病严重程度逐渐增高, Lee 氏 III、IV、V 级患者 Tim-3 mRNA 水平明显高于 I 和 II 级患者, 差异有统计学意义($P < 0.05$); IgAN 患者组 PBMC 中 Tim-3 阳性细胞比例显著高于对照组[(1.94 ± 0.77)% vs. (0.59 ± 0.24)%, $P < 0.01$],且随疾病严重程度存在上升趋势, Lee 氏 IV、V 级患者 Tim-3 阳性细胞比例高于 I、II、III 级患者, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Tim-3 mRNA 和 Tim-3 阳性细胞比例与尿蛋白定量及血肌酐呈显著正相关。结论:Tim-3 在 IgAN 患者中表达显著上调, 并与 24 h 尿蛋白定量及血肌酐等临床指标相关, 提示 Tim-3 可能参与 IgAN 的发生发展过程, 并可能成为 IgAN 的潜在预后标志物。

[关键词] IgA 肾病; 免疫球蛋白黏蛋白 3; mRNA

[中图分类号] R692.3+1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)09-1225-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150908

Expression of human Tim-3 in PBMC from IgA nephropathy patients and its clinical significance

Meng Bo¹, Xie Erfu^{2*}, Zhou Chungang³

(¹Department of Clinical Laboratory, Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214071; ²Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Central Laboratory, Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214071, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to investigate the expression of Tim-3 in pathogenesis of IgA nephropathy (IgAN) and its clinical significance. **Methods:** Real time qPCR was performed to detect Tim-3 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 41 IgAN patients and 21 normal subjects. The proportion of Tim-3⁺ cells was assayed by flow cytometry. **Results:** 24-hour proteinuria, serum creatinine, routine urine test, urine sediment examination and red blood cell count at high magnification were recorded before renal biopsy. **Results:** Tim-3 mRNA expression was increased significantly in IgAN patients compared with that in healthy controls (0.64 ± 0.27 vs. 0.18 ± 0.09 , $P < 0.01$), and there was a nearly positive correlation between pathological grade and expression degree of Tim-3 mRNA. Levels of Tim-3 mRNA expression in patients with grade III, IV and V were higher than those in patients with grade I and II ($P < 0.05$). Also, we found that the proportion of Tim-3⁺ cells in PBMCs from IgAN patients was higher than that from normal controls[(1.94 ± 0.77)% vs. (0.59 ± 0.24)%, $P < 0.01$]. The proportion of Tim-3⁺ cells in patients with grade IV and V was higher than that in patients with grade I, II and III ($P < 0.05$). Moreover, the expression of Tim-3 mRNA and the proportion of Tim-3⁺ cells were significantly positively related to 24-hour proteinuria and serum creatinine. **Conclusion:** Up-regulation of Tim-3 in IgAN patients was positively correlated with some clinical indexes including 24-hour proteinuria and serum creatinine.

[基金项目] 国家自然科学基金(81101322)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 13861720546@126.com

Tim-3 may be involved in the pathogenesis of IgAN, and can be a reliable biomarker for evaluating disease severity and prognosis of IgAN.

[Key words] immunoglobulin A nephropathy; T cell immunoglobulin and mucin 3; mRNA

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(09): 1225-1229]

IgA 肾病(immunoglobulin A nephropathy, IgAN)是全球范围内最常见的原发性肾小球疾病,且其预后较差,约 40%的患者会进展为终末期肾脏疾病^[1-3]。然而,其病因学和发病机制尚不清楚。目前研究表明 IgAN 是一种涉及多因素的复杂自身免疫性疾病,遗传和免疫因素在其致病机制中扮演核心角色^[4]。其中 T 细胞功能紊乱及 1 型辅助性 T 细胞(type 1 T helper, Th1)/2 型辅助性 T 细胞(type 2 T helper, Th2)平衡破坏对于 IgAN 发生发展的作用已得到证实^[5]。免疫球蛋白黏蛋白 3(T cell immunoglobulin and mucin 3, Tim-3)是 TIM 家族成员之一,其通过与配体 Galectin-9 的结合在体液免疫和细胞免疫各个阶段中发挥调控功能^[6], Tim-3 主要在 Th1 细胞表面表达,因此可能在 Th1 相关自身免疫性疾病发病及进展过程中发挥关键作用^[7]。此外, Tim-3 还表达于辅助性 T 细胞 17(type 17 T helper, Th17)、活化的 CD8⁺T 细胞、NK 细胞及单核细胞表面。先前大量研究表明 Tim-3 在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)及炎症性肠病等炎症性疾病中表达异常。Guo 等^[8]证实 SLE 患者肾脏组织中 Tim-3 阳性率显著高于对照组,且 Tim-3 表达强度与疾病病理分级及活动度显著相关。以上研究结果提示 Tim-3 可能参与了 IgAN 的发病机制,但目前尚未见报道。因此,本研究通过检测 IgAN 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 Tim-3 的表达水平,并与 24 h 尿蛋白定量、尿常规、尿沉渣、镜下红细胞数及血肌酐等 IgAN 临床指标进行比较,试图阐明 Tim-3 在 IgAN 发病中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

筛选 2012 年 5 月—2014 年 3 月于南京中医药大学附属无锡中医院肾内科就诊并经肾组织活检确诊的 IgAN 患者 41 例,平均年龄(31.05 ± 11.28)岁,男 18 例,女 23 例,病理组织学诊断均符合 IgAN 诊断标准^[9],同时排除狼疮肾炎、紫癜肾炎、乙肝病毒相关肾炎及强直性脊柱炎等诱发的继发性肾脏

疾病,且所有纳入患者均未接受任何系统治疗。同时选取同期 21 例健康体检者作为对照组,平均年龄(32.55 ± 12.68)岁,男 9 例,女 12 例,对照组和 IgAN 组间一般资料差异无统计学意义($P < 0.05$),具有可比性。按照 Lee 氏分级法将 IgAN 组患者分为 I ~ V 5 个等级,其中 I 级 6 例,II 级 9 例,III 级 11 例,IV 级 10 例,V 级 5 例。

抗人 Tim-3-PE 抗体(R&D 公司,美国),抗人 CD45-PC7 抗体(Beckman 公司,美国);淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂公司),RNA 提取试剂盒 E. Z.N.A. Total RNA Kit II (Omega 公司,美国);PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR@ Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa 公司,日本);FC500 流式细胞仪(Beckman 公司,美国),StepOne[™] 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司,美国)。引物由上海华大基因公司合成(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 样本收集、常规检查及 PBMC 分离

所有受试者入院次日或体检当日清晨空腹抽取静脉血 10 mL,分装 2 管,EDTA 抗凝。其中一管与等体积 PBS 混匀,缓缓加入 Ficoll 淋巴细胞分离液,2 000 r/min 密度梯度离心 30 min,收集中间层细胞即为 PBMC。另一管用于流式细胞术实验。记录所有患者肾组织活检前的 24 h 尿蛋白定量、尿常规、尿沉渣、高倍镜下红细胞数及血肌酐等实验室指标。

1.2.2 PBMC 总 RNA 提取及 real-time qPCR 检测 Tim-3 mRNA 水平

E.Z.N.A. Total RNA Kit II 提取 PBMC RNA, PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 合成 cDNA, SYBR@ Premix Ex Taq[™] II 用于 real time qPCR 反应,以上实验严格按照说明书操作。real-time qPCR 扩增标准程序:预变性 95℃ 30 s;变性 95℃ 5 s,退火 60℃ 30 s,循环数为 40。选取 β -actin 为参比基因。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算靶基因 mRNA 的相对含量。

1.2.3 流式细胞术检测 Tim-3 阳性细胞比例

取收集的外周血标本 50 μ L 于流式检测管底,加 6 μ L 抗人 Tim-3-PE 抗体和 6 μ L 抗人 CD45-PC7 抗体,室温避光孵育 20 min;加 500 μ L 红细胞裂

表 1 Real-time qPCR 引物序列及产物大小
Table 1 Real-time qPCR primer sequences and predicated sizes of products

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物大小(bp)
β-actin	GAGACCTTCAACACCCCGAGC	ATGTCACGCACGATTTCCTCC	263
Tim-3	ACTCTACCTACATCTGGGACT	GTAGTCCCATGGTCATCCAG	207

解液,室温避光孵育 10 min,1 200 r/min 离心 5 min 去上清;加 2 mL PBS,1 200 r/min 离心 5 min 去上清,洗涤 2 遍;加 500 μL PBS,流式细胞仪检测。数据收集及分析采用 CXP Cytometer 处理。

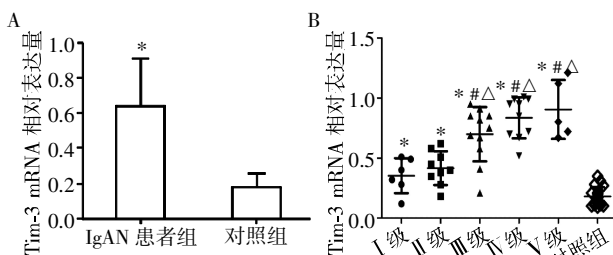
1.3 统计学方法

所有实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS19.0 统计学软件分析。组间差异采用 *t* 检验或单因素方差分析,非正态分布数据采用中位数表示,组间比较采用非参数 Mann-Whitney 秩和检验,两组间相关性进行 Pearson 相关分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IgAN 患者 PBMC 中 Tim-3 mRNA 水平显著高于对照组

与健康对照者相比,IgAN 患者组 PBMC 中 Tim-3 mRNA 相对含量显著增高 (0.64 ± 0.27 vs. 0.18 ± 0.09 , $P < 0.01$)。其中在 Lee 氏分级各组患者中, Tim-3 mRNA 相对含量随着疾病严重程度增加,在 Lee 氏 I ~ V 级中逐渐增高,且 Lee 氏 III、IV、V 级患者 Tim-3 mRNA 水平明显高于 Lee 氏 I 和 II 级患者,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。



A: IgAN 患者与对照组 Tim-3 mRNA 相对表达水平; B: Lee 氏 I ~ V 级患者 Tim-3 mRNA 相对表达水平。与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 I 级比较, # $P < 0.05$; 与 II 级比较, $\Delta P < 0.05$ 。

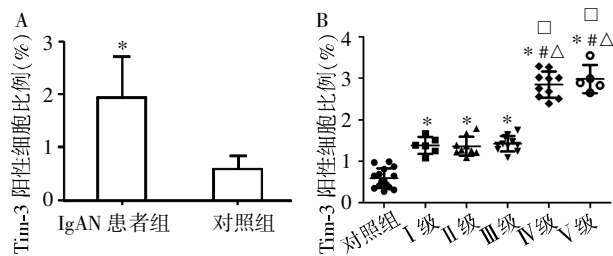
图 1 Tim-3 mRNA 相对表达水平

Figure 1 The relative expression levels of Tim-3 mRNA

2.2 IgAN 患者 Tim-3 阳性细胞比例较对照组显著增高

IgAN 患者组 PBMC 中 Tim-3 阳性细胞比例显著高于对照组 [$(1.94 \pm 0.77)\%$ vs. $(0.59 \pm 0.24)\%$, $P < 0.01$]。Tim-3 阳性细胞比例随疾病严重程度在

Lee 氏 I ~ V 级中存在上升趋势,且 Lee 氏 IV、V 级患者 Tim-3 阳性细胞比例显著高于 I、II、III 级患者,差异有统计学意义($P < 0.05$), I、II、III 级间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。



A: IgAN 患者与对照组 Tim-3 阳性细胞比例比较; B: Lee 氏 I ~ IV 级 Tim 阳性细胞比例。与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 I 级比较, # $P < 0.05$; 与 II 级比较, $\Delta P < 0.05$; 与 III 级比较, $\square P < 0.05$ 。

图 2 Tim-3 阳性细胞比例

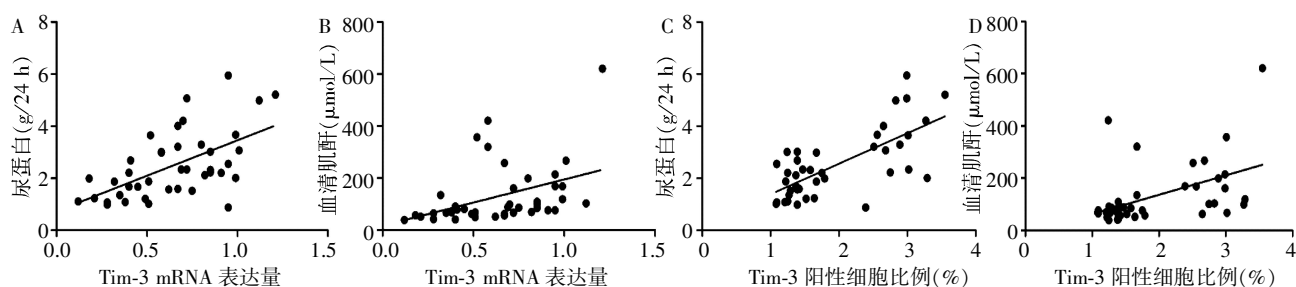
Figure 2 The percentages of Tim-3⁺ cells

2.3 Tim-3 mRNA 和 Tim-3 阳性细胞比例与 IgAN 相关临床指标间的相关性

Tim-3 mRNA 相对含量与 IgAN 患者尿蛋白及血肌酐均呈显著正相关 ($r_{\text{尿蛋白}}=0.580$, $P < 0.001$; $r_{\text{血肌酐}}=0.406$, $P < 0.001$), 且均与高倍镜下红细胞数量无显著相关。此外, Tim-3 阳性细胞比例与 IgAN 患者尿蛋白及血肌酐亦均呈显著正相关 ($r_{\text{尿蛋白}}=0.707$, $P < 0.001$; $r_{\text{血肌酐}}=0.479$, $P < 0.001$), 与高倍镜下红细胞数量无相关性(图 3)。

3 讨论

Tim 基因家族是通过定位克隆技术发现的一个基因家族^[10]。Tim-3 作为与 T 细胞免疫应答密切相关的 Tim 家族成员之一,其最初发现在成熟 Th1 细胞上表达,可作为 Th1 和 Th2 细胞区别的分子标志物^[11]。现已明确 Tim-3 可负性调控 Th1/Th17 细胞介导的免疫反应,通过与其配体结合抑制 Th1/Th17 介导的过度免疫,继而减轻炎症,维持机体免疫平衡^[12]。Tim-3 在体内调节 Th1/Th2 平衡的重要作用也得以证实^[13]。此外,新近研究证实 Tim-3 亦可表达于树状细胞、单核巨噬细胞及 NK 细胞表面,参与天然免疫过程,且在不同细胞中通过不同机制发挥不同效应^[14]。大量研究表明 Tim-3 信号通路在这些免疫细胞中表达异常参与多种自身免疫性疾病的发



A: Tim-3 mRNA 表达量与尿蛋白间的相关性; B: Tim-3 mRNA 表达量与血清肌酐间的相关性; C: Tim-3 阳性细胞比例与尿蛋白间的相关性; D: Tim-3 阳性细胞比例与血清肌酐间的相关性。

图 3 Tim-3 mRNA 和 Tim-3 阳性细胞比例与尿蛋白和血清肌酐间的相关性

Figure 3 Correlation between Tim-3 mRNA or proportions of Tim-3⁺ cells and 24-hour proteinuria or serum creatinine

生发展^[15-17]。Tim-3 作为免疫调节因子,在不同疾病、相同疾病不同阶段以及不同表达水平可通过不同方式影响疾病发生发展过程。当前 IgAN 发病机制尚不清楚,但免疫功能紊乱在其致病机制中的作用得到证实。一些研究已经证实 Th1/Th2 细胞平衡决定 IgAN 临床病理的严重程度,因而可能是 IgAN 的主要致病机制^[18-19]。此外,新近研究揭示 IgAN 与 Th17、调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)及巨噬细胞等免疫细胞也存在关联^[20-21]。而 Tim-3 被发现在这些细胞表面表达并在上述细胞免疫应答过程中发挥调控功能。据此本文推测 Tim-3 可能参与了 IgAN 发生发展,但目前尚不可知。因此,本研究通过对临床确诊的 IgAN 患者及同期健康对照者 PBMC Tim-3 mRNA 表达量及 Tim-3 阳性细胞比例展开对比研究,结果发现 IgAN 患者组 PBMC 中 Tim-3 mRNA 相对表达量与 Tim-3 阳性细胞比例均显著高于对照组。提示在 IgAN 发生发展过程中, Tim-3 转录水平及在外周血各型单个核细胞中的表达水平均存在一定程度异常。进一步对 IgAN 患者病理进行分级,探讨 Tim-3 水平与疾病严重程度间的关联,发现 Lee 氏分级各组患者中, Tim-3 mRNA 相对量随着疾病严重程度在 Lee 氏 I ~ V 级中逐渐增高,且 Lee 氏 III、IV、V 级患者明显高于 Lee 氏 I 和 II 级患者,差异有统计学意义;而 Tim-3 阳性细胞比例在 Lee 氏 I ~ V 级中存在上升趋势,且 Lee 氏 IV、V 级患者 Tim-3 阳性细胞比例显著高于 I、II、III 级患者,差异有统计学意义($P < 0.05$), I、II、III 级间并无显著差异(图 1, 2)。以上结果提示 Tim-3 水平与疾病严重程度存在显著正相关性。其中 III 级患者 Tim-3 阳性细胞比例并不类似于 Tim-3 mRNA 相对量显著高于 I 和 II 级,这可能是因为转录水平并不直接代表蛋白水平, IgAN 患者中 Tim-3 基因表达调控紊乱,首先在 mRNA 水平发生一定变化,随着疾

病不断进展(III 级以后) Tim-3 蛋白表达才发生显著变化。表明伴随 IgAN 进展,机体免疫系统代偿性上调炎症抑制因子 Tim-3 等来减轻炎症程度,这与在哮喘^[22]、乙型肝炎^[23]及 RA^[24]等炎症性疾病中的研究结果类似。本研究还发现 IgAN 患者 PBMC 中 Tim-3 mRNA 表达量和 Tim-3 阳性细胞比例与临床相关指标 24 h 尿蛋白及血清肌酐间均存在显著相关性,这也提示 Tim-3 可能成为 IgAN 预后标志物。但 Tim-3 在 IgAN 致病机制中通过何种免疫细胞发挥免疫调控作用还不清楚,在后续工作中将进一步研究 IgAN 患者 Tim-3 阳性细胞的主要亚群, IgAN 患者治疗前后 Tim-3 水平差异以及治疗前后 Tim-3 阳性细胞亚群的变化,进而阐明 Tim-3 在 IgAN 发生发展中的具体作用机制。

总之,本研究首次证实 Tim-3 在 IgAN 患者中表达显著上调,与 IgAN 病理分级及疾病相关临床指标密切相关,表明 Tim-3 可能参与 IgAN 的发生发展过程,并可能成为 IgAN 预后的潜在标志物。

[参考文献]

- [1] D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome[J]. *Semin Nephrol*, 2004, 24(3): 179-196
- [2] Imai H, Miura N. A treatment dilemma in adult immunoglobulin A nephropathy: what is the appropriate target, preservation of kidney function or induction of clinical remission[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2012, 16(2): 195-201
- [3] 韦莉, 王敏, 施瑞华, 等. 24 h 尿 NAG 与尿 NAG/肌酐比值在 IgA 肾病早期肾损害检测中的临床意义[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(3): 396-397
- [4] Peng Z, Tian J, Cui X, et al. Increased number of Th22 cells and correlation with Th17 cells in peripheral blood of patients with IgA nephropathy[J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(12): 1586-1591
- [5] Takechi H, Oda T, Hotta O, et al. Clinical and immuno-

- logical implications of increase in CD208+ dendritic cells in tonsils of patients with immunoglobulin A nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2013, 28(12):3004-3013
- [6] Kuchroo VK, Dardalhon V, Xiao S, et al. New roles for TIM family members in immune regulation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(8):577-580
- [7] Shan N, Hu Y, Hou M, et al. Decreased Tim-3 and its correlation with Th1 cells in patients with immune thrombocytopenia[J]. *Thromb Res*, 2014, 133(1):52-56
- [8] Guo L, Yang X, Xia Q, et al. Expression of human T cell immunoglobulin domain and mucin-3(TIM-3) on kidney tissue from systemic lupus erythematosus(SLE) patients [J]. *Clin Exp Med*, 2014, 14(4):383-388
- [9] Berger J, Hinglais N. Intercapillary deposits of IgA-IgG [J]. *J Urol Nephrol*, 1968, 74(9):694
- [10] Li Z, Ju Z, Frieri M. The T-cell immunoglobulin and mucin domain(Tim) gene family in asthma, allergy, and autoimmunity[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2013, 34(1):21-26
- [11] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease[J]. *Nature*, 2002, 415(6871):536-541
- [12] Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(9):2492-2501
- [13] Zhang XM, Shan NN. The role of T cell immunoglobulin and mucin domain-3 in immune thrombocytopenia [J]. *Scandinavian J Immunol*, 2014, 79(4):231-236
- [14] Han G, Chen G, Shen B, et al. Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells[J]. *Front Immunol*, 2013, 4(449):1-7
- [15] Li S, Peng D, He Y, et al. Expression of TIM-3 on CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis[J]. *APMIS*, 2014, 122(10):899-904
- [16] Saresella M, Piancone F, Marventano I, et al. A role for the TIM-3/GAL-9/BAT3 pathway in determining the clinical phenotype of multiple sclerosis[J]. *FASEB J*, 2014, 28(11):5000-5009
- [17] 张小梅, 单宁宁, 扈煜, 等. 原发免疫性血小板减少症患者脾脏单个核细胞 TIM-1 及 TIM-3 的表达及其在 Th1 极化中的作用[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(7):614-617
- [18] Lim CS, Zheng S, Kim YS, et al. Th1/Th2 predominance and proinflammatory cytokines determine the clinicopathological severity of IgA nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2001, 16(2):269-275
- [19] He L, Peng Y, Liu H, et al. Th1/Th2 polarization in tonsillar lymphocyte form patients with IgA nephropathy[J]. *Renal Failure*, 2013, 36(3):407-412
- [20] Lin FJ, Jiang GR, Shan JP, et al. Imbalance of regulatory T cells to Th17 cells in IgA nephropathy[J]. *Scandinavian J Clin Lab Invest*, 2012, 72(3):221-229
- [21] Silva GEB, Costa RS, Ravinal RC, et al. Renal macrophage infiltration is associated with a poor outcome in IgA nephropathy[J]. *Clinics*, 2012, 67(7):697-703
- [22] 陆小霞. 哮喘儿童外周血单个核细胞 Tim-3 mRNA 的表达及其与 CD4+ CD25+ 调节性 T 细胞的关系[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2011, 40(1):60-63
- [23] Wu W, Shi Y, Li J, et al. Tim-3 expression on peripheral T cell subsets correlates with disease progression in hepatitis B infection[J]. *Virol J*, 2011, 8(1):113
- [24] Liu Y, Shu Q, Gao L, et al. Increased Tim-3 expression on peripheral lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis negatively correlates with disease activity [J]. *Clin Immunol*, 2010, 137(2):288-295

[收稿日期] 2015-03-25