

4 种固定破膜试剂盒检测人调节性 T 淋巴细胞的结果比较^{*}

王方芳¹, 黄巧容², 张传芬³, 朱国念³, 孟文彤^{2△} (四川大学华西医院: 1. 血液学研究室; 2. 干细胞生物学研究室; 3. 科研基地管理科, 成都 610041)

【摘要】 目的 比较 4 种固定破膜试剂盒检测人调节性 T 淋巴细胞的效果。**方法** 选择 CD4、CD25 和叉状头转录因子 3(Foxp3) 3 种抗体建立流式调节性 T 淋巴细胞检测方案。采集 10 例健康人的新鲜外周血分离单个核细胞, 先标记膜表面抗体 CD4 与 CD25, 再分别用 BD Pharmingen、eBioscience、Invitrogen 及 Beckman Coulter 4 种的固定破膜试剂盒对细胞固定破膜, 最后标记 Foxp3 抗体上机检测。**结果** 与未固定破膜的相应样品比较, 4 种试剂盒均对细胞的形态有较明显的影响, 但对膜表面抗体 CD4 和 CD25 的表达没有明显影响。采用 eBioscience 固定破膜试剂检测调节性 T 淋巴细胞(CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) 的比例为 (8.22 ± 2.75)%; Beckman Coulter 为 (0.54 ± 0.48)%; BD Pharmingen 为 (0.69 ± 0.33)%; Invitrogen 为 (0.41 ± 0.24)%。**结论** 4 种试剂盒的固定效果相近, eBioscience 固定破膜试剂盒对胞内 Foxp3 具有较好的检测效果, 更适合用于检测调节性 T 淋巴细胞。

【关键词】 调节性 T 淋巴细胞; 叉状头转录因子 3; 固定破膜

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0160-03

Results comparison of four kinds of fixation permeabilization reagent kit for detecting regulatory T lymphocytes^{*}

WANG Fang-fang¹, HUANG Qiao-rong², ZHANG Chuan-fen³, ZHU Guo-nian³, MENG Wen-tong^{2△} (1. Hematology Research Laboratory; 2. Laboratory of Stem Cell Biology; 3. Department of Scientific Research Base Management, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

【Abstract】 Objective To compare the effects of four kinds of fixation permeabilization reagent kit for detecting regulatory T(Treg) lymphocytes. **Methods** Three kinds of antibody of CD4, CD25 and Foxp3 were selected to establish the flow Treg lymphocytes detection scheme. The fresh peripheral blood samples from 10 healthy individuals were collected for separating mononuclear cells. The membrane surface antibodies CD4 and CD25 were firstly labeled. Then the four kinds of fixation permeabilization reagent kit, BD Pharmingen, eBioscience, Invitrogen and Beckman Coulter, were used for performing the fixation and permeabilization on cells. Finally Foxp3 antibody was labelled and detected on machine. **Results** Compared with the unfixation permeabilization corresponding samples, the four kinds of reagent kit had a obvious impact on the morphology of the cells, but no obvious effect on the expression of CD4 and CD25. The detected proportions (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) were (8.22 ± 2.75)% for the eBioscience fixation permeabilization reagent kit, (0.54 ± 0.48)% for the Beckman Coulter reagent kit, (0.69 ± 0.33)% for the BD Pharmingen reagent kit and (0.41 ± 0.24)% for the Invitrogen reagent kit. **Conclusion** The four kinds of reagent kit have similar fixation effect. The eBioscience fixation permeabilization reagent kit has better detection effect and is more suitable for detecting Treg lymphocytes.

【Key words】 regulatory T lymphocytes; Foxp3; fixation permeabilization

调节性 T 淋巴细胞是一类控制体内免疫反应性的 T 淋巴细胞亚群, 对多种自身免疫性疾病的发生和发展都具有重要的意义^[1]。研究发现调节性 T 淋巴细胞与 I 型糖尿病^[2]、系统性红斑狼疮^[3]、再生障碍性贫血^[4]、自身免疫性溶血性贫血^[5]及多种肾脏疾病^[6]的发生及发展有着密切的关系, 对其进行深入研究将有助于更全面地了解疾病的发病机制, 对疾病的预后判断及治疗有着重要的意义。

CD4⁺ 调节性 T 淋巴细胞分为自然生成的调节性 T 淋巴细胞(nTreg)和诱导产生的适应性调节性 T 淋巴细胞, nTreg 连续性表达 CD25(IL-2 受体 α 链)^[7] 和 CD152^[8]。调节性 T 淋巴细胞除表达这些分子外, 还高表达叉状头转录因子 3(Foxp3)^[9]。Foxp3 是 forkhead 家族转录因子的成员, 表达在细胞质中, 不仅能作为调节性 T 淋巴细胞的标志分子, 还是决定调节性 T 淋巴细胞功能的关键蛋白, 因此 Foxp3 常用于检

测调节性 T 淋巴细胞的流式分析。标记 Foxp3 需要固定破膜^[10], 但目前采用的固定破膜试剂盒很多, 实验效果不稳定, 妨碍调节性 T 淋巴细胞的检测应用^[11]。本研究选择了 4 种常用的固定破膜试剂盒进行比较, 以优化调节性 T 淋巴细胞的检测。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2014 年 12 月至 2015 年 2 月在四川大学华西医院随机选择 10 例健康人的新鲜外周血作为实验样品。其中男 4 例, 女 6 例, 年龄 24~37 岁。

1.2 仪器与试剂 使用流式细胞仪(美国 Beckman Coulter, Navios), 4 种固定破膜试剂盒为 BD Pharmingen(554722)、eBioscience(00-5523)、Invitrogen(HH-GAS003)和 Beckman Coulter(A07803); 抗人单克隆抗体: CD4、CD25 和 Foxp3 3 种抗体均购于 eBioscience 公司, 配色方案如下, CD4-FITC(异硫

^{*} 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(JH2014067)。

作者简介: 王方芳, 女, 本科, 助理实验师, 主要研究方向为血液恶性疾病。 △ 通讯作者, Email: mwentong@sina.com。

氰酸, 克隆号 RPA-T4), CD25-APC (别藻蓝蛋白, 克隆号 BC90) 和 Foxp3-PE (藻红蛋白, 克隆号 PCH101)。

1.3 方法

1.3.1 获取样品 采集肝素抗凝外周血 2 mL, 24 h 内将全血用人淋巴分离液 (TBD 天津灏洋) 分离单个核细胞, 血: 磷酸盐缓冲液 (PBS)=1:1 混合, 将混合液缓慢加入到淋巴分离液面上, 400×g 离心 20 min, 吸出单个核细胞, 加入 5 mL PBS 混匀, 500×g 离心 10 min, 弃上清液, 重复洗 1 次, 细胞沉淀用适量 PBS 重悬, 调节成约每毫升 1×10^7 个细胞备用。

1.3.2 抗体 CD4CD25 Cocktail 根据其操作手册推荐的使用浓度做滴定测试, 确定每种抗体对应的最佳使用浓度。100 μ L 的细胞悬液加入 CD4CD25 Cocktail 5 μ L, Foxp3 抗体加入 5 μ L。

1.3.3 补偿调节 取 3 份各 10 μ L 细胞悬液, 分别为空白组、CD4-FITC 单染组和 CD4-FITC/CD25-APC 双染组, 以确定电压和荧光补偿。

1.3.4 样品实验组染色 膜表面抗体染色: 各样品中取出 4 份 100 μ L 细胞悬液, 每管加入 CD4CD25 Cocktail 5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。每管加入 2 mL PBS, 500×g 离心 5 min, 弃上清液。固定破膜后染 Foxp3: (1) BD Pharmingen: 加入固定破膜剂 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 3 mL 1×Wash Buffer 洗涤, 500×g 离心 7 min, 弃上清液。加入 Foxp3 抗体 5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 3 mL 1×Wash Buffer, 500×g 离心 7 min, 弃上清液, 重复洗 1 次。用 300 μ L PBS 重悬细胞, 上机检测。(2) eBioscience: 加 1 mL 现配制固定破膜混合剂, 混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。加入 3 mL 1×Permeabilization Buffer 洗涤, 500×g 离心 7 min, 弃上清液。加入 Foxp3 抗体 5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 3 mL 1×Permeabilization Buffer, 500×g 离心 7 min, 弃上清液, 重复洗 1 次。用 300 μ L PBS 重悬细胞, 上机检测。(3) Invitrogen: 加 100 μ L A 液 (固定剂), 室温避光静置 15 min。加 2 mL PBS, 500×g 离心 7 min, 弃上清液。再加 100 μ L B 液 (破膜剂) 后, 立即加 5 μ L Foxp3, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 3 mL PBS, 500×g 离心 7 min, 弃上清液, 重复洗 1 次。用 300 μ L PBS 重悬细胞, 上机检测。(4) Beckman Coulter: 加 100 μ L 1 液 (固定剂), 室温避光放置 15 min。加 2 mL PBS, 500×g 离心 7 min, 弃上清液。再加 100 μ L 2 液 (破膜剂), 5 min 后加 5 μ L Foxp3, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 3 mL PBS, 500×g 离心 7 min, 弃上清液, 重复洗 1 次。用 300 μ L PBS 重悬细胞, 上机检测。

1.3.5 设立同型对照组 样品中取 50 μ L, 先加入 IgG1-FITC、IgG1-APC 各 2 μ L, 固定破膜后再加 IgG2a-PE 5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。

1.3.6 上机检测 上机收集 1×10^5 个细胞量进行结果分析。分析策略, 见图 1。在 FSC/SSC 中, 圈出有核细胞 (H 门) 和淋巴细胞 (B 门), 再设定淋巴细胞中 CD4⁺T 淋巴细胞 (C 门), 在 CD4⁺T 淋巴细胞中分析 CD25/Foxp3 (D 门), 将 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞确定为调节性 T 淋巴细胞。调节性 T 淋巴细胞比例 (%) = $\frac{\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ \text{细胞}}{\text{CD4}^+ \text{T 淋巴细胞}} \times 100\%$ 。

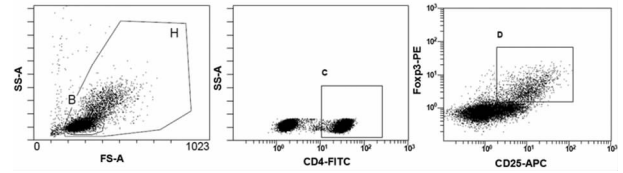


图 1 分析策略

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理和分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光补偿结果 利用空白组样品确定淋巴细胞群落, 并调节好需要检测通道的电压; 单染组和双染组确定了合适的荧光补偿。

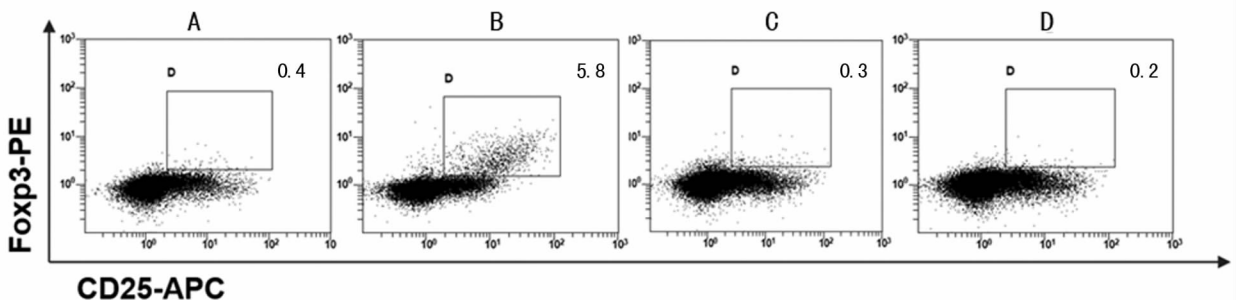
2.2 同型对照组结果 每个样品实验组均对应各自的同型对照, 未发现同型对照有明显的阳性, 比例均在 0.5% 以下。

2.3 4 种试剂盒检测结果比较

2.3.1 对细胞形态影响 与未固定破膜的空白组相比, 整个实验过程中, 每个步骤完成后取少量的细胞在显微镜下观察, 绝大部分细胞一直保持很好的完整性。4 种试剂盒对细胞形态有明显的影响, 特别是对单核细胞和未完全分离出去的粒细胞, 细胞体积变小, 颗粒度降低; 而对淋巴细胞的大小和颗粒度没有明显影响, 淋巴细胞设门后的比例变化也不明显。

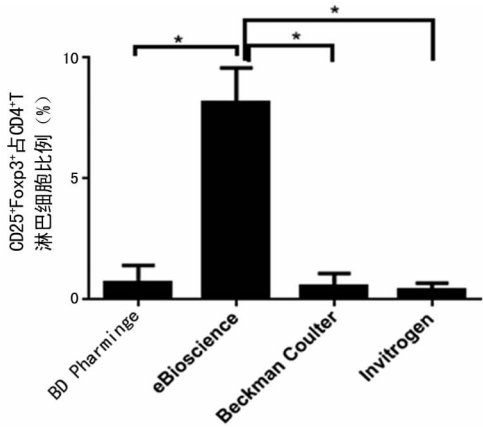
2.3.2 对膜表面染色影响 eBioscience 组的 Foxp3⁺ 细胞大部分是 CD4⁺T 淋巴细胞。4 组中 CD25⁺ 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 种试剂盒对膜表面抗体 CD4 和 CD25 的表达也无明显影响。

2.3.3 对 Foxp3 胞内染色影响 10 例标本膜表面染色后, 分别使用 4 种试剂盒固定破膜, 再进行 Foxp3 胞内染色, 发现 eBioscience 组的 CD25⁺Foxp3⁺ 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞 (T4 细胞) 的比例是 $(8.22 \pm 2.75)\%$, 且 CD25⁺Foxp3⁺ 细胞分群明显, Foxp3⁺ 细胞集中于 CD25⁺, CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞, 特异性表达 Foxp3; Beckman Coulter 组的比例为 $(0.54 \pm 0.48)\%$; BD Pharminge 组为 $(0.69 \pm 0.33)\%$; Invitrogen 组为 $(0.41 \pm 0.24)\%$, 见图 2~3。



注: A 为 BD Pharminge; B 为 eBioscience; C 为 Beckman Coulter; D 为 Invitrogen。

图 2 CD25⁺Foxp3⁺ 占 CD4⁺T 淋巴细胞比例



注：* $P=0.000$ 。

图 3 使用 4 种固定破膜试剂盒后的调节性 T 淋巴细胞在 CD4⁺T 淋巴细胞中的比例比较

3 讨 论

为优化调节性 T 淋巴细胞检测方案,本研究比较了 4 种常用固定破膜试剂盒 BD Pharmingen、eBioscience、Beckman Coulter 和 Invitrogen 对调节性 T 淋巴细胞的特异性标记 Foxp3 的检测效果。结果表明 4 种试剂盒的固定效果相近,完整地固定了淋巴细胞的表面分子。细胞经过破膜后,细胞大小和颗粒度均变小,尤其是单核细胞和粒细胞,所以在单核细胞和粒细胞的胞内分析时,应考虑到细胞形态变化带来的影响。试剂盒均未对淋巴细胞 CD4 和 CD25 的检测产生影响。还发现 eBioscience 相比其他 3 种试剂盒对胞内 Foxp3 具有较好的检测效果,测出的调节性 T 淋巴细胞的细胞量为 5.78%~10.97%,与其他研究报道的健康人参考值 5%~10% 比较吻合^[12],BD Pharmingen、Beckman Coulter 和 Invitrogen 的效果均较弱,仅能检测出很少的目的细胞,且细胞分群不明显。eBioscience 固定破膜试剂盒更适合在检测调节性 T 淋巴细胞 Foxp3 流式染色方案中使用。

已有研究证实调节性 T 淋巴细胞是特异性表达 Foxp3 的 CD4⁺CD25⁺ T 淋巴细胞^[13],Law 等^[14]比较了不同克隆号 Foxp3 抗体的结合能力,并再次证明了克隆号 PCH101 的 Foxp3 流式抗体检测效果和特异性都较好,而被广泛使用^[14-16]。在本研究中,根据 Foxp3 的表达量,确定其连接荧光素为 PE,PE 是强亮度的荧光染料,可增加检测的灵敏度,从而充分比较固定破膜试剂盒对其检测效果。同时 Law 等^[14]也比较了多种试剂盒对 Foxp3 检测效果,其中包括 eBioscience 和 BD Pharmingen 等试剂盒,发现 PCH101 用于 eBioscience 试剂盒的 CD25⁺Foxp3⁺细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞比例仅为 2.8%;而染色效果最好的是 BD Pharmingen 的 259D/C7 抗体搭配 eBioscience 试剂盒使用,其表达量为 4.4%;但此 CD25⁺Foxp3⁺细胞设门的依据是 CD4⁺T 淋巴细胞下 CD127⁺CD25⁻的非调节性 T 淋巴细胞;当把设门依据改为 IgG2a-PE 同型对照时,表达量变为 6.23%;与本实验结果的 8.22%(平均值)相比,水平稍低,分析其原因有可能与样本供者有关,本实验供者均是青年(年龄 24~37 岁),而上述研究的供者信息不清楚。另外,不同的 CD4 抗体也会导致 CD4⁺T 淋巴细胞占淋巴细胞的水平不一样。

综上所述,eBioscience 固定破膜试剂盒对胞内 Foxp3 具有

较好的检测效果,更适合用于检测调节性 T 淋巴细胞。

参考文献

[1] Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells[J]. Cur Opin Pharmacol, 2004, 4(4): 408-414.

[2] Balandina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁺ CD25⁺ T-cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis[J]. Blood, 2005, 105(2): 735-741.

[3] Crispin JC, Martines A, Alcocer VJ, et al. Quantification of regulatory T-cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Autoimmun, 2003, 21(3): 273-276.

[4] Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, et al. Deficient CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells in acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2007, 110(5): 1603-1606.

[5] Mqadmi A, Zheng XY, Yazdanbakhsh K. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cells control induction of autoimmune hemolytic anemia[J]. Blood, 2005, 105(9): 3746-3748.

[6] Mahajan D, Wang Y, Qin X, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(10): 2731-2741.

[7] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25) breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.

[8] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4[J]. J Exp Med, 2000, 192(2): 303-310.

[9] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD41CD251 regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-336.

[10] Roncador G, Brown PJ, Maestre L, et al. Analysis of Foxp3 protein expression in human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(6): 1681-1691.

[11] O'Garra A, Vieira P. Twenty-first century Foxp3[J]. Nat Immunol, 2003, 21(4): 304-306.

[12] Joshua DE, Brown RD, Ho PJ, et al. Regulatory T cells and multiple myeloma[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2008, 8(5): 283-286.

[13] Liu W, Putnam AL, Xu YZ, et al. CD127 expression inversely correlates with Foxp3 and suppressive function of human CD41 Treg cells[J]. J Exp Med, 2006, 203(7): 1701-1711.

[14] Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, et al. The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. Cytometry Part A, 2009, 75(12): 1040-1050.

前 4 种蛋白,这 4 种蛋白分别由 BCKDHA(19q13.1~13.2)、BCKDHB(6q14)、DBT(1p31)及 DLD 基因(7q31~32)编码,其中有 34% 在 BCKDHA(E1 α 基因)上,29% 在 BCKDHB(E1 β 基因)上,24% 在 E2 基因上,13% 在 E3 基因上^[8],而在 BCKD 磷酸酶基因(4q22.1)的突变仅有 1 例报道,未见 BCKD 激酶基因(16p11.2)突变的报道^[9]。部分 MSUD 患者未能检出突变位点。国内上海新华医院报道了 16 例 MSUD 患者的基因检测结果,4 例为 BCKDHA 基因突变,8 例为 BCKDHB 基因突变,3 例为 DBT 基因突变,1 例未检测到明确致病位点突变^[7]。

在临床表现上,目前的研究倾向认为 BCKDHA、BCKDHB 基因突变患者多表现为经典型,DBT 基因变异患者临床表现较轻,多为硫胺素有效型。经典型 MSUD 的 BCKDH 活性小于 3%,是最为严重的类型,表现为生后 12~24 h 出现枫糖浆体味;48~72 h 出现酮症、易激惹及喂养困难;4~5 d 出现嗜睡、间歇性呼吸困难、角弓反张及刻板动作等脑病症状并逐步加重;7~10 d 可出现昏迷、中枢性呼吸衰竭等,强调诊断后立即干预,改善预后。其他表型包括中间型、硫胺素有效型和间歇型的严重程度取决于残余酶活性。

若 MSUD 患儿血中亮氨酸显著升高(>1 000 $\mu\text{mol/L}$)即可确诊^[10],故本例患者 MSUD 诊断明确,本次检测范围内未检测到已报道的致病突变,仅检测出 1 个暂未明确其致病性的新发突变位点 c.586C>T(p. His196Tyr)。进一步家系分析显示,此位点在患儿父母中均为野生型,故该位点为患儿自身的新发突变。由于该突变位点处于氨基酸序列高度保守区域,同时患儿临床表型为经典型,提示该突变位点可能为有害突变,即对酶活性影响较大。本次检测对 BCKDHA、BCKDHB 基因全外显子 100% 覆盖,均未发现另外一个致病位点,暂不排除在本检测范围外(如内含子)可能存在罕见致病突变位点或者特殊突变类型(如大片段插入、缺失等)。此外,本次检测鉴于既往 MSUD 病例报道中均未对 BCKD 磷酸酶基因进行检测,故对该基因未行检测,不排除 BCKD 磷酸酶基因存在致病突变位点的可能。

由于 MSUD 涉及的基因数较多,突变频率高及突变位置无固定规律的特点,传统的测序技术对其进行测序时,耗时长,成本高。本研究中作者应用 Ion Torrent 半导体测序技术针对患儿的 5 个基因进行全外显子测序,目的区域覆盖度接近 100%,快速、经济、有效地完成了对该例患儿的基因诊断。

从 DNA 序列的角度分析,遗传病的基因改变可以视为单核苷酸的取代和 DNA 片段的插入或缺失。本研究使用的是 Life technologies 公司发布的 Ion AmpliSeqTM 平台,利用 Ion AmpliSeq 技术使得成千上万个目标基因的选择性扩增能在单管多重 PCR 反应内完成。通过目的基因 PCR 扩增、文库构建、乳液 PCR 和测序流程,得到检测结果仅需 2 d。从本研究的检测结果来看,Ion Torrent 测序技术在 5 个基因中检测到 1 个杂合突变,与 Sanger 直接测序结果完全一致。

综上所述,采用 Ion Torrent 半导体测序技术快速、经济、准确地对该例 MSUD 患者进行了分子检测,为将来新一代 Ion Torrent 测序平台在复杂单基因遗传病的分子诊断及临床治疗方面提供了应用依据。

参考文献

- [1] Menkes JH, Hurst PL, Craig JM, et al. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance [J]. *Pediatrics*, 1954, 14(5): 462-467.
- [2] Peinemann F, Danner DJ. Maple syrup urine disease 1954 to 1993 [J]. *J Inherit Metab Dis*, 1994, 17(1): 3-15.
- [3] Zinnanti WJ, Lazovic J. Interrupting the mechanisms of brain injury in a model of maple syrup urine disease encephalopathy [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2012, 35(1): 71-79.
- [4] Nellis MM, Kasinski A, Carlson M, et al. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression [J]. *Mol GeneT Metab*, 2003, 80(1): 189-195.
- [5] 杨楠, 张立琴, 韩连书, 等. 枫糖尿病患者家系基因突变分析及产前诊断 [J]. *中华围产医学杂志*, 2012, 15(8): 494-499.
- [6] 惠秦, 谷为岳, 侯新琳, 等. 新生儿枫糖尿症 1 例 [J]. *中国循证儿科杂志*, 2014, 9(1): 64-67.
- [7] Yang N, Han L, Gu X, et al. Analysis of gene mutations in Chinese patients with maple syrup urine disease [J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 106(4): 412-418.
- [8] Georgiou T, Chuang JL, Wynn RM, et al. Maple syrup urine disease in Cypriot families: identification of three novel mutations and biochemical characterization of the p. Thr211Met mutation in the Elalpha subunit [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2009, 13(5): 657-664.
- [9] Oyarzabal A, Martinez PM, Merinero B, et al. A novel regulatory defect in the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex due to a mutation in the PPMIK gene causes a mild variant phenotype of maple syrup urine disease [J]. *Hum Mutat*, 2012, 34(2): 355-362.
- [10] Sowell J, Pollard L, Wood T. Quantification of branched-chain amino acids in blood spots and plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the diagnosis of maple syrup urine disease [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(6): 631-639.

(收稿日期: 2015-05-07 修回日期: 2015-08-29)

(上接第 162 页)

- [15] Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25 (hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients [J]. *Blood*, 2006, 107(6): 2409-2414.
- [16] Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of Foxp3 expression in naive human CD4⁺ Foxp3 T cells by T cell

receptor stimulation is TGF-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype [J]. *Blood*, 2007, 110(8): 2983-2990.

(收稿日期: 2015-07-24 修回日期: 2015-09-15)