

细胞免疫应答评价方法的研究进展

陆战豪, 罗瑞, 王涛, 钟代浪, 仇华吉*, 孙元*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069

陆战豪, 罗瑞, 王涛, 钟代浪, 仇华吉, 孙元. 细胞免疫应答评价方法的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4759-4772.
LU Zhanhao, LUO Rui, WANG Tao, ZHONG Dailang, QIU Hua-Ji, SUN Yuan. Advances in methodologies for evaluating cell-mediated immune responses[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4759-4772.

摘要: 细胞免疫应答是机体维持稳态的重要组成部分。天然免疫选择性激活适应性免疫后, 细胞免疫发挥杀伤清除功能。因此, 对细胞免疫应答水平的评估在癌症诊断与治疗、组织器官移植后免疫状态监测、病毒性疾病诊断与预防以及疫苗免疫效果评价等方面意义重大。从最初仅能对体内免疫效果的总体评估, 到如今对多种免疫细胞数量和功能的精准检测, 细胞免疫应答的评价方法得到了极大发展。然而, 细胞免疫应答在机体中涉及多个水平, 并且检测方法繁多, 难以选择。本文将细胞免疫应答评价方法按照机体、组织器官、免疫细胞和免疫分子 4 个水平进行系统地整理和比较分析, 以期对相关技术的应用提供参考。

关键词: 细胞免疫应答; 检测水平; 评价方法

Advances in methodologies for evaluating cell-mediated immune responses

LU Zhanhao, LUO Rui, WANG Tao, ZHONG Dailang, QIU Hua-Ji*, SUN Yuan*

State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

Abstract: Cell-mediated immune response is an important part of machinery in maintaining the body's homeostasis. After the innate immune system selectively activates the adaptive immune system, the cell-mediated immunity exerts its killing and clearance functions. Therefore, evaluating the level of cell-mediated immune response is crucial in the diagnosis and treatment of cancer, monitoring the immune status after organ transplantation, diagnosing and preventing viral diseases, and evaluating the effectiveness of vaccines and other areas. From the initial

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1801403)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801403).

*Corresponding authors. QIU Hua-Ji, E-mail: qiuhuaaji@caas.cn; SUN Yuan, Tel/Fax: +86-451-51051709, E-mail: sunyuan@caas.cn

Received: 2023-04-11; Accepted: 2023-08-22

overall assessment of the immune effects *in vivo* to the precise detection of the number and function of multiple immune cells, the evaluation methods of cell-mediated immune response have greatly advanced. However, cell-mediated immune response involves multiple levels in the body, and it's difficult to choose the numerous detection methods available. The article systematically compares the evaluation methods of cell-mediated immune response at four different levels: the organism, the tissue and organ, the immune cells and the immune molecules, with the aim to facilitate the applications of related technologies.

Keywords: cell-mediated immune response; detection level; evaluation methods

细胞免疫(cell-mediated immunity)是指 T 细胞被活化后, 增殖分化为抗原特异性效应 T 细胞发挥免疫功能。细胞免疫应答过程主要依赖于 CD4⁺ T 细胞辅助 CD8⁺ T 细胞激活为细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL), 以及 CTL 直接杀伤靶细胞和分泌细胞因子发挥作用。其中, 对于某些特定抗原的 T 细胞可分化为少量记忆 T 细胞在体内长期存在或终生维持^[1]。目前, 商品化疫苗大多集中于诱导体液免疫, 产生的抗体能够结合病原体并阻断其侵入。然而, 当病原体进入细胞或抗原来源于细胞内突变时, 其难以被特异性抗体识别和清除, 需要通过 CD8⁺ T 细胞介导的细胞免疫清除。基于细胞免疫在防御和监测细胞内病原体或抗原方面的重要作用, 利用细胞免疫治疗癌症、抵抗病毒感染和调控组织器官移植排斥反应已成为热点研究领域^[2-4]。

为了探究在癌症治疗、疫苗接种和组织器官移植调控过程中细胞免疫是否发挥相应作用, 需要在不同应用领域中针对不同试验选择最适的细胞免疫应答检测方法。免疫组织化学切片分析和单细胞测序技术在癌症中病变组织和免疫细胞检测方面的应用不断增加; 酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospot assay, ELISpot)和细胞因子流式细胞术(cytokine flow cytometry, CFC)对于疫苗接种后免疫细胞功能的检测应用广泛; ImmuKnow 和 AlloMap 检测

法在组织器官移植时通过对免疫细胞功能和关键信号分子的检测对细胞免疫程度进行判定。细胞免疫的应用领域众多, 多种检测方法也随之发展。因此, 需对繁杂的细胞免疫应答检测方法进行整理分类。本文将细胞免疫应答评价方法按照机体、组织器官、免疫细胞和免疫分子 4 个水平进行系统的整理和比较分析, 以期对相关技术的应用提供参考。

1 细胞免疫应答的检测技术

细胞免疫水平的检测, 对于机体免疫功能的全面了解、病原体的变异性监测和病原微生物致病机制的理解等具有重要意义^[5]。在刘新生等^[6]的总结中, 2011 年以前的细胞免疫检测技术主要分为体内功能检测、体外表型检测和体外功能检测 3 个方面。随着科学技术的不断发展, 一些新技术方法被应用。本文将细胞免疫应答评价方法按照机体、组织器官、免疫细胞和免疫分子 4 个水平进行系统性的比较分析, 并对之前综述未涉及、介绍不全面以及近年来新发展的检测技术进行系统归纳(图 1)。

1.1 机体整体水平

迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)是机体抵御病原体的主要免疫应答模式, 反应结果可指示机体整体的免疫状况^[8], 因此, DTH 成为细胞免疫功能检测的常用指标。通过皮内注射病原体抗原后 48-72 h, 观察是否出现

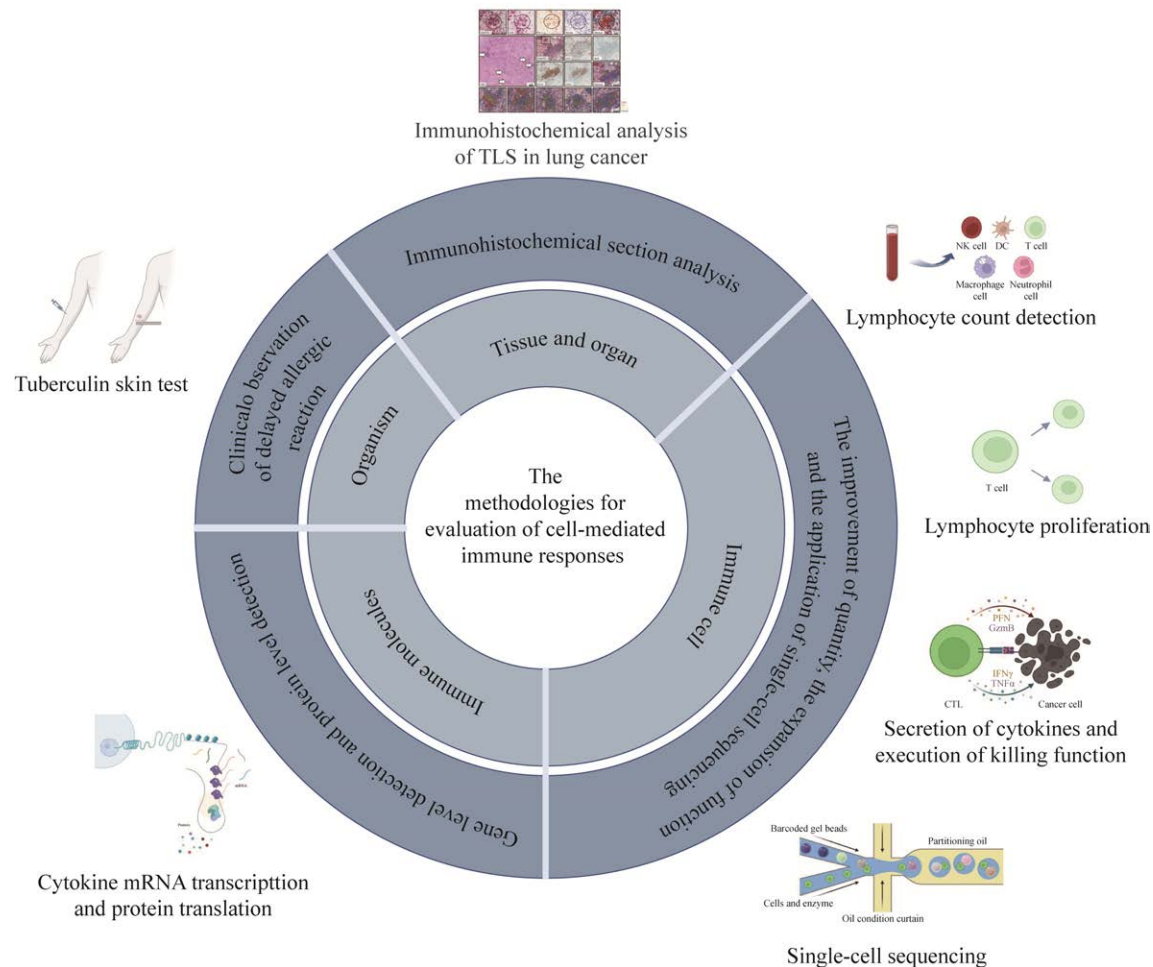


图1 细胞免疫应答评价方法(改编自 Thommen 等^[7]) 根据检测水平,细胞免疫应答评价方法可分为机体、组织器官、免疫细胞和免疫分子4个水平.并且,免疫细胞水平是评价细胞免疫应答的主要水平.机体水平依据迟发型过敏反应的临床观察.组织器官水平常见于免疫组化切片分析.免疫细胞水平主要为“量”的提升、“功能”的拓展和单细胞测序的应用.免疫分子水平包括基因水平检测和蛋白水平检测

Figure 1 The methodologies for evaluation of cell-mediated immune responses (adapted from Thommen et al.^[7]). The methodologies for evaluation of cell-mediated immune responses can be divided into four levels: Organism, tissue and organ, immune cells and immune molecules according to the detection level. Furthermore, the level of immune cells has been the main level to evaluate cell-mediated immune response. Clinical observation of body level based on delayed allergic reaction. Immunohistochemical section analysis is common at the tissue and organ level. The level of immune cells is mainly the improvement of quantity, the expansion of function and the application of single-cell sequencing. The immune molecular level includes gene level detection and protein level detection.

红斑、硬块和局部炎症反应来判定机体是否曾被感染,该方法现常用于检测结核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和布鲁氏杆菌(*Brucella abortus*)感染^[9].在DTH小鼠模型的

足垫处用钥孔血蓝蛋白、旧结核菌素或卵蛋白等抗原诱导DTH^[10],一直是药效评价和细胞免疫功能检测的常规方法^[11].目前,T细胞的功能主要通过体外试验进行评价.但是,这些

技术的评价结果并不能代表机体整体状态下的细胞免疫状况,因此,人们需要一种更为简便和直观的检测方法。以迟发型变态反应为代表的体内试验被用来估计机体整体的细胞免疫功能时,具有操作性强、检测结果真实的特点^[12]。然而,在 DTH 临床观察中可能由于现象不明显、人为评价误差等原因造成检测结果假阴性和假阳性,并且该方法也无法对细胞免疫功能进行定量分析,因此,需要研发更为特异和客观的检测技术。

1.2 组织器官水平

免疫组织化学技术(immunohistochemistry, IHC)是一种通过组织病理学角度观察组织形态和原位蛋白表达的诊断技术。在非小细胞肺癌的检测中,通过 IHC 检测 PD-1 在 CD8⁺ T 细胞表面的表达对 PD-1 阻断治疗进行诊断和预测^[7]。肿瘤组织中的标记物可以单独预测,也可以联合预测。然而,传统的 IHC 方法使用单一标记物无法满足反映复杂免疫微环境全部情况的要求。为了满足对技术改进的需求,许多高度多元化的组织成像技术不断发展,能够对细胞组成、功能状态和细胞与细胞之间相互作用进行全面研究,极大地提高了组织样品的利用率。其中,基于酪胺信号放大技术的多重免疫组织化学(multiple immunohistochemistry, mIHC)能够提供多个标记物的分布情况和组织组成的整体视图,很好地解决了 IHC 样品利用率低的问题,有望更清晰地解析疾病的发病机制,从而更深刻地理解癌症的发展^[13]。相较于 DTH 临床观察的整体性评估, IHC 的优势在于能够在组织切片上原位定位和定性某种物质的存在及分布状态,甚至可以相对定量地显示其含量。尽管 IHC 能够分析组织内细胞免疫,具有剪感性强、剪异性高和定位准确等优点,但在实际应用中,其操作过程复杂,且多个步骤易出现问

题,如组织固定时间短、脱水浸蜡不充分、切片过厚或有褶皱、封闭和洗涤过强等,这些问题都会导致结果无法判断。因此,人们需要寻求一种同时具有免疫组化技术优点且操作过程更加简便的检测技术。

1.3 免疫细胞水平

正常生理情况下,机体中免疫细胞保持动态稳定。但是,当机体受到刺激后,各类免疫细胞的数量、比例和功能等发生变化。因此,通过对 T 淋巴细胞及其亚群和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)等数量、比例和功能的检测,可以对机体的细胞免疫状态进行评估。

1.3.1 “量”的提升

从相对定量到绝对定量,从单个分子到多个参数,从常规检测到高通量检测,T细胞的“定量”检测技术在不断发展(表 1)。

(1) E 玫瑰花环(erythrocyte rosettes, E-R)。通过观察 T 细胞表面 E 受体与其他种类红细胞结合形成的玫瑰花环,评估机体细胞免疫水平和变化。该试验以玫瑰花环形成率表示 T 细胞百分比,根据不同成熟程度 T 细胞的比例反映机体免疫状态^[14]。

(2) 四聚体技术(MHC tetramer technology)。将 4 个 MHC 分子形成四聚体,与抗原特异性 T 细胞表面多个 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)结合来定量分析 T 细胞数量。该技术在组织器官移植、癌症免疫治疗和疫苗免疫效果监测等方面应用广泛^[15,39-40]。虽然 MHC 四聚体技术检测速度快、剪剪度高、剪剪性强,但它也存在着一定的缺陷,通过该方法检测的剪剪性 T 细胞包含不具有效应功能的 CD8⁺ T 细胞,这意味着并不是所有检测出阳性的 T 细胞都能直接执行杀伤靶细胞的功能^[5]。

(3) 流式细胞术(flow cytometry, FCM)。FCM 发展迅速,现如今可以在不损伤细胞的情

表 1 免疫细胞水平检测技术分析比较

Table 1 Comparison of various techniques for detection of immune cells

Purpose	Techniques	Advantages	Limitations	References
Cell numbers	E-R	Relatively quantitative	Strong subjectivity, low accuracy	[14]
	MHC tetramer technology	Rapid sensitivity, strong specificity, absolute quantification	Low accuracy	[5,15]
	FCM	Multi-parameter analysis, absolute quantification, high accuracy, rapid specificity	High cost, strict operation	[16]
	Cim-Chip	High throughput, simple operation, low cost, wide range of use, high sample utilization.	Low automation	[17-18]
Proliferating function	Morphological observation	Simple operation, low cost	Strong subjectivity	[19]
	³ H-TdR	Stable, sensitive, specific	Radioactive	[20]
	MTT	Accurate and rapid, simple operation, good repeatability.	Difficult dissolution of dyes	[21-23]
	Fluorescent labeling method	Live labeling, safe and stable		[24]
	ImmuKnow	Simple operation, short detection time, accurate result, standardized evaluation	High cost	[25-26]
Killing function	Limiting dilution assay	Stable result	Poor accuracy	[27-28]
	51 Cr release assay	Good accuracy and high repeatability	Radioactive	[29]
	LDH release assay	Rapid and high repeatability	Minor error	[30]
Cytokines production	ELISpot	Qualitative and quantitative, accurate and sensitive, high detection efficiency	Contingency	[31-33]
	CFC	Accurate quantification and accurate typing	Low sample utilization rate	[34-36]
All of the above	Single-cell sequencing	Real single-cell level, comprehensive information, simple and rapid	Cell activity is required	[37-38]

况下,同时检测 30 种参数并分选出高纯度的目标细胞,主要用于淋巴细胞及其亚群的检测^[41]。北京协和医院于 1999 年建立了国内首个 T 淋巴细胞亚群的 FCM 检测平台后,将其应用于获得性免疫缺陷综合征、严重急性呼吸综合征和病毒性肝炎等病毒性疾病的诊断和预防^[42]。在慢性淋巴细胞白血病的研究中,FCM 可同时对 CD3-BV510、CD4-PE、CD8-ECD 等多种抗体标记的不同种类 T 细胞进行多参数分选以测定记忆 T 细胞的分化状态^[16]。随着 FCM 技术的不断发展,其在对 T 淋巴细胞胞内细胞因子和结合荧光染料标记测定淋巴细胞杀伤和增殖功能等方面的应用不断增加。

(4) 细胞免疫芯片 (cell immune-chip, CIM-Chip)。利用细胞表面抗原与抗体特异性反应的免疫学原理和微型化操作方法,在载体上偶联高密度抗原或抗体来捕获细胞。该技术能够高通量地检测多种细胞的多种表面抗原,获取大量样品信息。不同类型白血病中白细胞的抗原表达情况差异较大,利用高密度的抗体微阵列对 48 种分化抗原进行验证,检测结果的准确性和稳定性与流式细胞仪基本一致,而同一时期的流式细胞术仅能同时测定 3 种抗原^[17]。在微阵列上微孔组成材料和特异性抗体或细胞黏附因子不断优化的同时,还利用激光捕获显微切割技术对捕获细胞内的基因和蛋白质组进

行分析,从而完成细胞分选^[18]。除了在细胞分选、新药物开发等实验室应用外,CIM-Chip在检测时对样品处理要求低,适用范围广,可根据检测目的灵活地增加或减少检测内容,检测结果使用普通显微镜即可读取,有着极大的临床应用潜力。然而,细胞的非特异性结合、特异性标志物的选择、对细胞内信息的读取和操作的自动化等是该技术亟待解决的问题,也是CIM-Chip技术未来发展的趋势。

1.3.2 “功能”的拓展

免疫细胞是机体发挥免疫功能的重要执行者。因此,与数量检测相比,免疫细胞功能的检测与机体细胞免疫应答状态具有更高的相关性。目前,对细胞免疫功能的检测主要以细胞增殖、细胞杀伤作用和细胞因子释放能力为主。

淋巴细胞受到特定抗原或非特定分裂原刺激后,营养代谢和细胞形态发生变化,核酸、蛋白质及聚合酶等相关酶类合成增加,细胞开始增殖。现有的淋巴细胞增殖反应的检测方法如下。

(1) 形态学观察(morphological observation)。T淋巴细胞转化为淋巴母细胞的过程中,细胞体积、胞质内容物和核染色质等方面发生巨大变化。形态学观察操作简单、成本低,但受到个人主观性的影响,并且不同种类淋巴细胞的变化不尽相同,即使是同一种细胞,在不同刺激条件下的变化也会有所差异^[19]。

(2) 放射性同位素法。经典的³H胸腺嘧啶核苷(³H-thymidine, ³H-TdR)掺入法是在淋巴细胞与有丝分裂原共同孵育后,检测细胞增殖合成DNA时摄取的³H-TdR放射性核素量,判断淋巴细胞增殖功能^[20]。该方法是检测抗原特异性细胞增殖最敏感的方法,但由于放射性同位素具有一定的危险性,实际应用较为有限。

(3) 四甲基偶氮噻唑蓝(methyl thiazolyl

tetrazolium, MTT)比色法。利用活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能还原噻唑蓝为蓝紫色结晶甲臞的特性对增殖的淋巴细胞进行检测。与放射性核苷酸掺入法相比,该方法能较为准确地反映淋巴细胞体外状态^[21]。基于MTT法,使用噻唑蓝衍生物2,3-二-(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四氮唑-5-甲酰苯胺[2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, XTT]优化的XTT法不但具有MTT法检测迅速、操作简单、灵敏度高的优点,还克服了MTT法中甲臞结晶不易溶解的缺点^[22]。进一步优化开发的WST-8法相比于前面两种方法,对细胞的毒性更小,试验的重复性更好^[23]。

(4) 荧光标记法(fluorescent labeling method, FLM)。羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(carboxylfluorescein diacetate succinimide ester, CFDA-SE)与细胞内蛋白质共价结合,被水解后发出绿色荧光。当淋巴细胞发生增殖时,胞内的荧光强度在2个子代细胞中平均分配。根据这一特征,将其结合FCM检测淋巴细胞增殖。这种方法最大的优势是可以进行活体标记,对细胞生理活动基本没有影响,安全性高,并且荧光在体内能够持续数周,稳定性强^[24]。

(5) ImmuKnow法。传统的淋巴细胞体外功能检测在标准化和有效性方面存在不足。三磷酸腺苷生物发光法基于淋巴细胞发生增殖时,ATP合成酶的增加优先于大多数细胞因子的原理,以ATP为标记物,结合免疫磁珠和生物荧光等技术,荧光素酶利用ATP催化荧光素氧化发光,且在该过程中ATP浓度与光的强度成正比。因此,可依据光的强度来快速测定CD4⁺T淋巴细胞活化早期的增殖反应^[25]。利用ATP的这种反应特性,Cylex公司开发了细胞免疫标准化检测技术ImmuKnow,临床上用于组织器官移植后排斥反应的监测^[26]。相较于前几种方法,

该方法操作更加便捷,在标准化和有效性方面更进一步,但高昂的检测费用限制了其广泛应用。

CTL 经特定抗原刺激后,可通过诱导细胞凋亡和细胞裂解两种途径杀伤靶细胞。基于这种机制,开发了一些对 CTL 有杀伤作用的检测方法。

(1) 有限稀释法。提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)并进行稀释,体外增殖 7–18 d 后加入对应靶细胞,通过 CTL 极限稀释倍数来评估组织器官移植时的组织相容性。在培养过程中添加白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)还可以对 CD4⁺ T 细胞的功能进行检测^[27]。然而,由于体外扩增潜力、溶解靶细胞能力和其在外周血中的比例等影响 CTL 体外检测的因素较多,有限稀释法不能检测出所有特异性细胞,其得出的试验结果与体内实际情况差距较大^[28]。

(2) 51Cr 释放法(51Cr release assay)。使用 51Cr 标记靶细胞,CTL 的杀伤作用破坏靶细胞的膜的完整性,根据样品中的放射性强度判定 CTL 的杀伤功能。该方法结果准确性好、重复性高,是检测抗原特异性 CTL 功能的金标准。并且,该方法也可以应用在 NK 细胞的细胞毒反应评价^[29]。但通过这种方法仅是对 CTL 的杀伤作用进行了定性分析,而且,由于提取的 CTL 数量较少,检测前需要对效应细胞进行多次体外刺激,这可能会导致 T 细胞的组成和状态与体内相比有差异。

(3) 乳酸脱氢酶释放法(lactate dehydrogenase release method, LDH release assay)。LDH 是活细胞浆内的一种酶,无法穿过细胞膜。当效应细胞攻击靶细胞后,LDH 释放到上清中。LDH 活性与靶细胞的死亡数目呈正相关。因此,通过对 LDH 活性检测来判断效应细胞的细胞毒作用。与前者相比,这种方法不需要对靶细胞进行标记,避免了放射性影响,还能满足大量

样本的快速检测^[30]。然而,尽管试验中对照组可以排除非细胞毒性的影响,但效应细胞杀伤靶细胞后自身损伤所释放的 LDH 仍可能对试验结果造成影响。

淋巴细胞在活化后通过产生特定的细胞因子来发挥功能。为了检测淋巴细胞产生细胞因子的能力,通常需要对待检细胞进行体外培养,并给予特定的刺激使细胞活化。然后,在给予阻断剂的情况下检测细胞因子的分泌。目前常用的检测方法主要有以下两种。

(1) ELISpot 检测法。ELISpot 是一种高度敏感的检测方法,能够在单细胞水平检测多种细胞因子或细胞毒性物质。其中,干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)在细胞中产量较大,很容易被检测出来,也因此成为分析 T 淋巴细胞和 NK 细胞功能最常用的细胞因子^[43]。ELISpot 具有两个明显的优势:除了对功能的定性检测外,还能作为一种定量方法,准确监测治疗效果^[31];在灵敏度方面,ELISpot 高于酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 10–200 倍,所以能够对低水平的细胞因子进行检测^[32]。然而,检测时淋巴细胞必须产生和分泌特定的细胞因子才能被检测到^[44],此外,淋巴细胞中一些细胞亚群会产生同种细胞因子。因此,该方法还需要与细胞表型测定相结合进行分析。目前,为了解决检测时 PBMC 提取量少的问题而开发出的 RecycleSpot,能够最大限度地利用靶细胞进行检测,使用少于 10 mL 的血液样本,即可重复评估针对 5 种不同病毒上 400 多种不同 CTL 表位的抗病毒免疫^[45]。经过一系列处理和试验后,每次试验材料仅能检测一种细胞因子,使实验重复性和检测效率低下,这极大地刺激了多色 ELISpot 检测技术的发展^[33]。近几年开发的四色 T 细胞 FluoroSpot 技术通过对 IFN- γ 、IL-10、IL-17A 和 IL-22 这 4 种细胞因

子同时检测,表明带状疱疹病毒感染在儿童时期会引发记忆 T 细胞分泌 IL-10 的强烈反应^[46]。

(2) CFC 检测法。CFC 利用特定荧光抗体对目标细胞因子染色并进行 FCM 分析。相比于其他检测方法, CFC 能够避免无法区分不同细胞分泌同种细胞因子的问题,并且可以对淋巴细胞群中不同种细胞进行功能和表型的定量分析,以及对同种细胞中多种细胞因子分泌情况的综合分析^[34-35]。CFC 是研究 T 细胞应答的一种独特方法,可以同时机体的 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞应答进行检测^[36]。但是,由于淋巴细胞群中不同种细胞所需的活化时间不同, CFC 不能准确测定抗原特异性细胞产生细胞因子的功能。

1.3.3 新技术的应用

在免疫细胞数量检测中,尽管可以对细胞亚群进行绝对定量,但亚群中每个细胞是否都发挥相应功能还未知;在免疫细胞功能检测中,大多数技术检测结果反映出的只是细胞亚群中发挥相应功能的整体水平,很多低丰度的信息不能被表征。因此,在细胞水平检测时,免疫细胞间的异质性是一个值得思考的问题。

近年来,迅速发展的单细胞测序技术开始了从宏观表征到微观个体的跨越,将样品中每个免疫细胞的功能更清晰、更全面地展示出来。通过对肿瘤组织及周围组织中 T 细胞进行单细胞转录组测序,发现了由功能衰竭的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞发育而来的多种潜在的肿瘤反应性 T 细胞,并揭示了在癌症中两条普遍存在的 T 细胞衰竭途径,对于未来癌症免疫疗法的开发有重大意义^[37]。这种在癌症中通过单细胞转录组测序生成的大量免疫图谱,能够准确分辨 T 细胞、树突状细胞和巨噬细胞等免疫细胞的细胞亚型,以及这些免疫细胞在疾病发生发展过程中的相互作用,有利于在基础研究中发现新的治疗靶点及作用网络,发掘新的诊断和预

后标志物;在临床应用上,有利于结合其他分子标志物建立综合预测模型,对患者进行更加精准的个体化治疗。现如今,单细胞测序技术已经建立了多个高通量检测平台,其中以 10×Genomics 应用最为广泛,并且能够进行基因组、转录组和免疫组库等多组学分析。目前,将单细胞转录组测序和时空组学整合,分析免疫细胞在肿瘤组织中的组成和功能是该技术的发展方向之一^[38]。

1.4 免疫分子水平

免疫分子是淋巴细胞发挥功能的重要执行者,反映着淋巴细胞的活化程度。因此,监测细胞因子的谱系变化是判断机体免疫状态的常用方法之一^[47]。

1.4.1 基因水平检测

通过 PCR、RT-PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 等方法,能够对细胞因子的 DNA 或 RNA 进行检测,这种基于基因水平上的检测结果具有较高的准确度。

(1) mRNA 定量法。早期有研究人员通过实时荧光定量 RT-PCR 方法对冻存血液中细胞因子的 mRNA 进行分析^[48]。在动物实验中,不需要体外刺激和处死动物, mRNA 定量法也可以通过少量样品快速准确地检测出 PBMC 中细胞因子变化^[49]。

(2) AlloMap 检测法。通过 20 种特异性免疫分子的基因表达情况,即可判定组织器官移植时排斥反应的严重程度。检测结果在 0-40 内得分越高,表明排斥反应的风险越高。这种相关性与心内膜心肌活检结果及临床应用结果相吻合,该方法因此成为了监测心脏排斥反应的重要商业化方法^[50]。AlloMap 避免了心脏移植时昂贵、具创伤性且结果不稳定的活体检测法,仅通过 PBMC 中相关免疫分子基因表达的差异,即可对中度、重度排斥反应的缺失及心脏

移植排斥反应的发生做出有效诊断^[51]。

1.4.2 蛋白水平检测

尽管细胞因子基因水平的检测方法具有灵敏和迅速等优点,但是体外检测到的 mRNA 水平与实际的蛋白质水平并不总是稳定吻合^[52]。因此,细胞因子蛋白水平的直接检测逐渐受到人们的重视。

(1) ELISA 检测法。ELISA 可以对细胞因子直接定量检测,操作简单、检测迅速。但是,ELISA 每次仅能检测一种细胞因子,并且检测的结果是样品中全部数量细胞因子的情况,而不是单个细胞产生细胞因子的情况。因此,利用 ELISA 无法通过对细胞因子的检测判定淋巴细胞的数量或单个细胞产生细胞因子的能力^[53]。

(2) 液相芯片技术。液相芯片技术是基于多分析物分析(multi-analyte profiling, xMAP)技术的新型生物芯片技术平台。不同于 ELISA 中抗原抗体在固液界面的二维反应模式,液相芯片技术采用的液相环境能使生物分子在三维空间中自由运动并发生结合,克服了固相芯片高通量检测技术的缺陷。液相环境中的主要基质是以红色和橙色各 10 种不同的荧光染料共同标记的、大小约为 5.6 μm 的微球,种类最多可达 100 种,并且每个微球能够共价交联 100 000 个捕获抗体。这些特点使该技术具有能够最大程度捕获样本中待检分子的高灵敏度、兼具同时检测 100 种分子的高通量和经济性以及自主编辑微球交联抗体的高灵活性。目标分子与捕获抗体结合后被荧光报告分子所标记,经流式技术对单个微球上的信息进行分析,微球上的分类荧光对不同反应进行定性,报告分子的报告荧光对目的分子进行定量。这一技术在细胞因子的检测和定量方面具有广泛应用前景,每种微球取 100 个进行检测,最后以荧光强度中值为检测结果。相较于双复孔或三复孔、依靠酶

放大作用间接检测的 ELISA,相当于 100 次重复、对检测结果直接读取的液相芯片具有更好的重复性和更高的准确性。García-Torre 等使用 Luminex xMap 技术测量 9 种促炎细胞因子和抗炎细胞因子的血清浓度,发现巨细胞病毒感染与慢性心力衰竭患者的高水平炎症状态直接相关^[54]。Focke-Tejkl 等通过检测 PBMC 中 10 种 T 细胞增殖和促炎细胞因子释放量对草花粉过敏疫苗的效力进行评估^[55]。目前,国外有多家公司已经推出商品化细胞因子液相芯片检测试剂盒,如 BioSource 公司的 Antibody Bead Kit 和 Bio-Rad 公司的 Bio-Plex 系列试剂盒等。它们的检测准确性、稳定性、灵敏性和 Luminex 公司的 xMap 没有较大差异,但并未获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准,仅用于试验研究。若未找到特定细胞因子的液相芯片检测试剂,可以考虑如 de Jager 等自行制备抗体交联微球进行检测^[56]。液相芯片技术以其快速、特异、灵敏、准确、高通量、多重检测和实时定性定量等显著优势,几乎可用于任何分子之间的相互作用。除了细胞因子检测外,该技术还在病原体检测分型、疫苗效力评价和基因表达的分析等众多领域展现出广泛的应用前景^[57]。然而,在免疫检测中,液相芯片技术的加样自动化是研究人员一直期待解决的问题。

2 总结与展望

对于细胞免疫应答的评价,在不同水平上有着各自的优缺点(表 2)。机体整体反应水平结果明显,但在特异性和定量分析等方面有待进一步提高;组织器官水平虽然弥补了整体检测水平上的部分不足,但其操作复杂且结果易受多种因素影响,因此应用范围小;免疫分子水平能够反映机体的免疫状态,但易受细胞因子

表 2 不同检测水平比较分析

Table 2 Comparative analysis of different detection levels

Detection level	Advantages	Limitations	References
Organism	<i>In vivo</i> reaction, real, obvious	Unable to quantitatively analyze	[12]
Tissue and organ	Specific sensitivity, accurate positioning, quantitative analysis	The detection process has many affecting factors	[7]
Immune cells	Qualitative and quantitative, specific sensitive, detection of multiple functions, reduction in heterogeneity	Lack of accuracy	[14,16,26,28] [32,35,37-38]
Immune molecules	Simple operation, quantitative detection	The result judgment cannot be standardized and the correlation is not strong	[49-50,53]

调控网络的影响而波动较大,同时也没有固定的标准可以确定细胞因子水平与某些疾病的相关性。目前,对免疫细胞的免疫启动因子和转录因子的研究可能更具意义。免疫细胞水平的检测方法继承其他检测方法的优点,能够对免疫细胞数量、增殖功能、杀伤功能和产生细胞因子潜力等进行评价。其中,淋巴细胞增殖功能检测技术在不断发展,从观察法的主观性到核酸掺入的放射性,到胞内染料的优化,体内蛋白荧光和细胞活化前的 ATP 检测,最后发展到真正的单细胞测序技术。淋巴细胞产生细胞因子功能的检测方法不断完善,为解决提取 PBMC 少和检测效率低的问题而开发出了 RecycleSpot 和四色 T 细胞 FluoroSpot 等技术。因此,免疫细胞水平成为评价细胞免疫应答的主要水平。

现在,细胞免疫评价方法越来越注重特异性和重复性。传统的试验方法正逐渐被细胞水平的方法如 FCM、ELISpot 和 CFC 等取代。新的细胞免疫应答评价方法将会提供更多的免疫反应信息,同时增加敏感性和可重复性。尽管许多方法在实验室的效果良好,但由于其本身存在一些局限,能够广泛应用于临床的却很少。因此,临床上通常会结合不同水平或同一水平不同功能的多种检测方法进行细胞免疫应答评价^[58-60]。联合使用多种细胞免疫评价方法可以

克服单个方法的不足,同时使多个试验结果相互印证,准确性更高,说服力更强。随着检测技术的不断发展和进步,相信具有多功能的细胞免疫评价方法将在临床上得到广泛应用。

REFERENCES

- [1] SOERENS AG, KÜN ZLI M, QUARNSTROM CF, SCOTT MC, SWANSON L, LOCQUIAO J, GHONEIM HE, ZEHN D, YOUNGBLOOD B, VEZYS V, MASOPUST D. Functional T cells are capable of supernumerary cell division and longevity[J]. *Nature*, 2023, 614(7949): 762-766.
- [2] RUAN HT, BU LL, HU QY, CHENG H, LU WY, GU Z. Strategies of combination drug delivery for immune checkpoint blockades[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(4): e1801099.
- [3] NEEVE SC, ROBINSON BW, FEAR VS. The role and therapeutic implications of T cells in cancer of the lung[J]. *Clinical & Translational Immunology*, 2019, 8(8): e1076.
- [4] MONTANO-LOZA AJ, RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ ML, PAGEAUX GP, SANCHEZ-FUEYO A, FENG S. Liver transplantation immunology: immunosuppression, rejection, and immunomodulation[J]. *Journal of Hepatology*, 2023, 78(6): 1199-1215.
- [5] 秦卫松, 刘志红. 细胞免疫功能监测的方法[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2009, 18(1): 53-55. QIN WS, LIU ZH. Methods of monitoring cellular immune function[J]. *Chinese Journal of Nephrology Dialysis & Transplantation*, 2009, 18(1): 53-55 (in Chinese).
- [6] 刘新生, 王永录. 细胞免疫检测方法研究进展[J].

- 江苏农业科学, 2011, 39(1): 246-250.
- LIU XS, WANG YL. Development of detection methods of cellular immunity[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(1): 246-250 (in Chinese).
- [7] KOBAYASHI K, KANEDA K, KASAMA T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity[J]. Microscopy Research and Technique, 2001, 53(4): 241-245.
- [8] JAIN M, SINGH AK, SINGH M, GUPTA S, KUMAR A, ASERI GK, POLAVARAPU R, SHARMA D, SOHAL JS. Comparative evaluation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) recombinant secretory proteins as DTH marker for paratuberculosis[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 175: 105987.
- [9] 裘毅刚, 陈月, 张丽芸, 陈政良. C3 在迟发型超敏反应中的作用[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(11): 83-87.
- QIU YG, CHEN Y, ZHANG LY, CHEN ZL. Role of complement C3 in delayed-type hypersensitivity[J]. Journal of First Military Medical University, 2005, 25(11): 83-87 (in Chinese).
- [10] WONG SC, TAN AHM, LAM KP. Functional hierarchy and relative contribution of the CD28/B7 and ICOS/B7-H2 costimulatory pathways to T cell-mediated delayed-type hypersensitivity[J]. Cellular Immunology, 2009, 256(1/2): 64-71.
- [11] TRAVERS JB, HAMID QA, NORRIS DA, KUHN C, GIORNO RC, SCHLIEVERT PM, FARMER ER, LEUNG DY. Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1999, 104(9): 1181-1189.
- [12] THOMMEN DS, KOELZER VH, HERZIG P, ROLLER A, TREFNY M, DIMELOE S, KIALAINEN A, HANHART J, SCHILL C, HESS C, SAVIC PRINCE S, WIESE M, LARDINOIS D, HO PC, KLEIN C, KARANIKAS V, MERTZ KD, SCHUMACHER TN, ZIPPELIUS A. A transcriptionally and functionally distinct PD-1⁺ CD8⁺ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade[J]. Nature Medicine, 2018, 24(7): 994-1004.
- [13] YAMAMOTO Y, KASASHIMA H, FUKUI Y, TSUJIO G, YASHIRO M, MAEDA K. The heterogeneity of cancer-associated fibroblast subpopulations: their origins, biomarkers, and roles in the tumor microenvironment[J]. Cancer Science, 2023, 114(1): 16-24.
- [14] KARTHICK RAJA NAMASIVAYAM S, NISHANTH AN, R S AB, NIVEDH K, SYED NH, ROSARIO SAMUEL R. Hepatitis B-surface antigen (HBsAg) vaccine fabricated chitosan-polyethylene glycol nanocomposite (HBsAg-CS-PEG-NC) preparation, immunogenicity, controlled release pattern, biocompatibility or non-target toxicity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 144: 978-994.
- [15] ZOU DW, DAI YL, ZHANG XL, WANG GH, XIAO X, JIA PL, LI XC, GUO ZY, CHEN WH. T cell exhaustion is associated with antigen abundance and promotes transplant acceptance[J]. American Journal of Transplantation, 2020, 20(9): 2540-2550.
- [16] PAN YG, AIAMKITSUMRIT B, BARTOLO L, WANG YF, LAVERY C, MARC A, HOLEC PV, RAPPAZZO CG, EILOLA T, GIMOTTY PA, HENSLEY SE, ANTIA R, ZARNITSYNA VI, BIRNBAUM ME, SU LF. Vaccination reshapes the virus-specific T cell repertoire in unexposed adults[J]. Immunity, 2021, 54(6): 1245-1256.
- [17] CHENG Y, GUNASEGARAN B, SINGH HD, DUTERTRE CA, LOH CY, LIM JQ, CRAWFORD JC, LEE HK, ZHANG XM, LEE B, BECHT E, LIM WJ, YEONG J, CHAN CY, CHUNG A, GOH BKP, CHOW PKH, CHAN JKY, GINHOUX F, TAI D, et al. Non-terminally exhausted tumor-resident memory HBV-specific T cell responses correlate with relapse-free survival in hepatocellular carcinoma[J]. Immunity, 2021, 54(8): 1825-1840.
- [18] RAILEAN V, BUSZEWSKI B. Flow cytometry-sophisticated tool for basic research or/and routine diagnosis; impact of the complementarity in both pre-as well as clinical studies[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2022: 1-23.
- [19] 李文娟, 李太生. T 细胞免疫功能检测平台的建立及在感染性疾病中的应用[J]. 协和医学杂志, 2010, 1(1): 49-52.
- LI WJ, LI TS. Establishment of T cell immune function detection platform and its application in infectious diseases[J]. Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital, 2010, 1(1): 49-52 (in Chinese).
- [20] LIU L, CHENG XF, YANG H, LIAN SL, JIANG YG, LIANG JH, CHEN X, MO S, SHI Y, ZHAO SS, LI JY, JIANG RQ, YANG DH, WU YJ. BCL-2 expression promotes immunosuppression in chronic lymphocytic leukemia by enhancing regulatory T cell differentiation

- and cytotoxic T cell exhaustion[J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 59.
- [21] BELOV L, de la VEGA O, dos REMEDIOS CG, MULLIGAN SP, CHRISTOPHERSON RI. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(11): 4483-4489.
- [22] REVZIN A, SEKINE K, SIN A, TOMPKINS RG, TONER M. Development of a microfabricated cytometry platform for characterization and sorting of individual leukocytes[J]. *Lab on a Chip*, 2005, 5(1): 30-37.
- [23] VOM WERTH KL, WÖRMANN T, KEMPER B, KÜMPERS P, KAMPMEIER S, MELLMANN A. Investigating morphological changes of T-lymphocytes after exposure with bacterial determinants for early detection of septic conditions[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 391.
- [24] YE X, LI ZC, XUE GL, WEI ZG. Experimental study on the induction of cytotoxic T lymphocyte killing effects and dendritic-cell-based tumor vaccine prepared by high-intensity focused ultrasound[J]. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2022, 18(5): 1292-1298.
- [25] KANTHECHA DN, BHATT BS, PATEL MN, VAIDYA FU, PATHAK C. DNA interaction, anticancer, cytotoxicity and genotoxicity studies with potential pyrazine-bipyrazole dinuclear μ -oxo bridged Au(III) complexes[J]. *Molecular Diversity*, 2022, 26(4): 2085-2101.
- [26] ADU SA, TWIGG MS, NAUGHTON PJ, MARCHANT R, BANAT IM. Characterisation of cytotoxicity and immunomodulatory effects of glycolipid biosurfactants on human keratinocytes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(1): 137-152.
- [27] BATOOL SA, AHMAD K, IRFAN M, UR REHMAN MA. Zn-Mn-doped mesoporous bioactive glass nanoparticle-loaded zein coatings for bioactive and antibacterial orthopedic implants[J]. *Journal of Functional Biomaterials*, 2022, 13(3): 97.
- [28] WUTTISARNWATTANA P, EID S, WILSON DL, COOKE KR. Author correction: assessment of the therapeutic role of mesenchymal stromal cells in a mouse model of graft-versus-host disease using cryo-imaging[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 3031.
- [29] NARASIMHAN M, MAHIMAINATHAN L, CLARK AE, USMANI A, CAO J, ARAJ E, TORRES F, SARODE R, KAZA V, LACELLE C, MUTHUKUMAR A. Serological response in lung transplant recipients after two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccines[J]. *Vaccines*, 2021, 9(7): 708.
- [30] ROSSANO JW, DENFIELD SW, KIM JJ, PRICE JF, JEFFERIES JL, DECKER JA, SMITH EO, CLUNIE SK, TOWBIN JA, DREYER WJ. Assessment of the cylex Immuknow cell function assay in pediatric heart transplant patients[J]. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2009, 28(1): 26-31.
- [31] PETERSEN SL, SIDOROV IA, RUSSELL CA, DICKMEISS E, VINDELØV LL. Limiting dilution analysis of interleukin-2 producing helper T-cell frequencies as a tool in allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Transplantation*, 2005, 80(5): 573-581.
- [32] BLANCHARD-ROHNER G, GALLI G, CLUTTERBUCK EA, POLLARD AJ. Comparison of a limiting dilution assay and ELISpot for detection of memory B-cells before and after immunisation with a protein-polysaccharide conjugate vaccine in children[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2010, 358(1/2): 46-55.
- [33] SCHMOHL JU, GLEASON MK, DOUGHERTY PR, MILLER JS, VALLERA DA. Heterodimeric bispecific single chain variable fragments (scFv) killer engagers (BiKEs) enhance NK-cell activity against CD133⁺ colorectal cancer cells[J]. *Targeted Oncology*, 2016, 11(3): 353-361.
- [34] AISALEH A, SHAHID M, FARID E, BINDAYNA K. The effect of ascorbic acid and nicotinamide on panton-valentine leukocidin cytotoxicity: an *ex vivo* study[J]. *Toxins*, 2023, 15(1): 38.
- [35] CZERKINSKY C, ANDERSSON G, EKRE HP, NILSSON LÅ, KLARESKOG L, OUCHTERLONY Ö. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1988, 110(1): 29-36.
- [36] MATHIAS A, PANTAZOU V, PERRIOT S, CANALES M, JONES S, OBERHOLSTER L, MOULIN M, FENWICK C, BERNARD-VALNET R, THÉAUDIN M, POT C, du PASQUIER RA. Ocrelizumab impairs the phenotype and function of memory CD8⁺ T cells[J]. *Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation*, 2023, 10(2): e200084.
- [37] TANGUAY S, KILLION JJ. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells[J]. *Lymphokine and*

- Cytokine Research, 1994, 13(4): 259-263.
- [38] GOODELL V, dela ROSA C, SLOTA M, MacLEOD B, DISIS ML. Sensitivity and specificity of tritiated thymidine incorporation and ELISPOT assays in identifying antigen specific T cell immune responses[J]. BMC Immunology, 2007, 8(1): 1-8.
- [39] BIHL FK, LOGGI E, CHISHOLM JV 3rd, HEWITT HS, HENRY LM, LINDE C, SUSCOVICH TJ, WONG JT, FRAHM N, ANDREONE P, BRANDER C. Simultaneous assessment of cytotoxic T lymphocyte responses against multiple viral infections by combined usage of optimal epitope matrices, anti-CD3 MAb T-cell expansion and RecycleSpot[J]. Journal of Translational Medicine, 2005, 3(1): 20.
- [40] KARULIN AY, MEGYESI Z, CASPELL R, HANSON J, LEHMANN PV. Multiplexing T- and B-cell FLUOROSPOT assays: experimental validation of the multi-color ImmunoSpot® software based on center of mass distance algorithm[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1808: 95-113.
- [41] NILSSON A, HÖBINGER A, JAHNMATZ P, TISELIUS E, LAESTADIUS Å, MELÉN E, BJÖRKANDER S, SAGHAFIAN-HEDEGREN S. Four-parameter FluoroSpot assay reveals that the varicella zoster virus elicits a robust memory T cell IL-10 response throughout childhood[J]. Journal of Virology, 2022, 96(22): e0131022.
- [42] TORMO N, GIMÉNEZ E, MARTÍNEZ-NAVARRO M, ALBERT E, NAVALPOTRO D, TORRES I, GIMENO C, NAVARRO D. Performance comparison of a flow cytometry immunoassay for intracellular cytokine staining and the QuantiFERON® SARS-CoV-2 test for detection and quantification of SARS-CoV-2-spike-reactive-IFN- γ -producing T cells after COVID-19 vaccination[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2022, 41(4): 657-662.
- [43] STEPHENSON KE, le GARS M, SADOFF J, de GROOT AM, HEERWEGH D, TRUYERS C, ATYEO C, LOOS C, CHANDRASHEKAR A, McMAHAN K, TOSTANOSKI LH, YU JY, GEBRE MS, JACOB-DOLAN C, LI ZF, PATEL S, PETER L, LIU JY, BORDUCCHI EN, NKOLOLA JP, et al. Immunogenicity of the Ad26.COV2.S vaccine for COVID-19[J]. JAMA, 2021, 325(15): 1535-1544.
- [44] ZAVAGLIO F, RIVELA F, CASSANITI I, ARENA F, GABANTI E, ASTI AL, LILLERI D, RAMPINO T, BALDANTI F, GREGORINI M. ELISPOT assays with pp65 peptides or whole HCMV antigen are reliable predictors of immune control of HCMV infection in seropositive kidney transplant recipients[J]. Journal of Medical Virology, 2023, 95(2): e28507.
- [45] ZHENG LT, QIN SS, SI W, WANG AQ, XING BC, GAO RR, REN XW, WANG L, WU XJ, ZHANG J, WU N, ZHANG N, ZHENG H, OUYANG HQ, CHEN KY, BU ZD, HU XD, JI JF, ZHANG ZM. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells[J]. Science, 2021, 374(6574): abc6474.
- [46] LONGO SK, GUO MG, JI AL, KHAVARI PA. Integrating single-cell and spatial transcriptomics to elucidate intercellular tissue dynamics[J]. Nature Reviews Genetics, 2021, 22(10): 627-644.
- [47] SHI DM, ZHANG CY, LI XY, YUAN J. An electrochemical paper-based hydrogel immunosensor to monitor serum cytokine for predicting the severity of COVID-19 patients[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2023, 220: 114898.
- [48] MACIEJEWSKI JP, O'KEEFE C, GONDEK L, TIU R. Immune-mediated bone marrow failure syndromes of progenitor and stem cells: molecular analysis of cytotoxic T cell clones[J]. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2007, 45(1): 5-14.
- [49] PEREZ-PENCO M, WEIS-BANKE SE, SCHINA A, SIERSBÆK M, HÜBBE ML, JØRGENSEN MA, LECOQ I, LARA de la TORRE L, BENDTSEN SK, MARTINENAITE E, HOLMSTRÖM MO, MADSEN DH, DONIA M, ØDUM N, GRØNTVED L, ANDERSEN MH. TGF β -derived immune modulatory vaccine: targeting the immunosuppressive and fibrotic tumor microenvironment in a murine model of pancreatic cancer[J]. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2022, 10(12): e005491.
- [50] KAMATH M, SHEKHTMAN G, GROGAN T, HICKEY MJ, SILACHEVA I, SHAH KS, SHAH KS, HAIRAPETIAN A, GONZALEZ D, GODOY G, REED EF, ELASHOFF D, BONDAR G, DENG MC. Variability in donor-derived cell-free DNA scores to predict mortality in heart transplant recipients-A proof-of-concept study[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 825108.
- [51] JAMIL AK, TECSON KM, GANZ TT, BLANKENSHIP S, FELIUS J, CAREY SA, HALL SA. Heart transplant recipients' perspectives on invasive versus non-invasive graft failure surveillance methods[J]. Heart & Lung, 2023, 57: 41-44.

- [52] BUCCITELLI C, SELBACH M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21(10): 630-644.
- [53] OKAMOTO Y, ABE T, NIWA T, MIZUHASHI S, NISHIDA M. Development of a dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1- and T helper type 2-cells[J]. *Immunopharmacology*, 1998, 39(2): 107-116.
- [54] GARCÍA-TORRE A, BUENO-GARCÍA E, LÓPEZ-MARTÍNEZ R, RIOSERAS B, DÍAZ-MOLINA B, LAMBERT JL, QUIRÓS C, ALONSO-ÁLVAREZ S, ALONSO-ARIAS R, MORO-GARCÍA MA. CMV infection is directly related to the inflammatory status in chronic heart failure patients[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 687582.
- [55] FOCKE-TEJKL M, WEBER M, NIESPODZIANA K, NEUBAUER A, HUBER H, HENNING R, STEGFELLNER G, MADEREGGER B, HAUER M, STOLZ F, NIEDERBERGER V, MARTH K, ECKL-DORNA J, WEISS R, THALHAMER J, BLATT K, VALENT P, VALENTA R. Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 135(5): 1207-1217.
- [56] de JAGER W, PRAKKEN BJ, BIJLSMA JW, KUIS W, RIJKERS GT. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2005, 300(1/2): 124-135.
- [57] 陈玮. 液相芯片技术的原理与应用进展[J]. *成都医学院学报*, 2008, 3(3): 225-231.
- CHEN W. The principle and application advance of suspension array technology[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2008, 3(3): 225-231 (in Chinese).
- [58] 孙婧. 聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子对小细胞肺癌免疫状态的影响[D]. 北京: 北京协和医学院博士学位论文, 2020.
- SUN J. The effects of pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on small cell lung cancer immune status[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Peking Union Medical College, 2020 (in Chinese).
- [59] 丁筱. 肺癌患者免疫状态的综合评估及细胞免疫治疗与化疗联合治疗肺癌的临床疗效分析[D]. 吉林: 吉林大学博士学位论文, 2016.
- DING X. Evaluation of the immune status of patients and the clinical efficacy of cellular immunotherapy combined with chemotherapy in lung cancer[D]. Jilin: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2016 (in Chinese).
- [60] ZHAO W, CHEN W, LI J, CHEN M, LI Q, LV M, ZHOU S, BAI S, WANG Y, ZHANG L, ZHANG P, WANG J, ZHENG Q, WU J. Status of humoral and cellular immune responses within 12 months following CoronaVac vaccination against COVID-19[J]. *mBio*, 2022, 13(3): e0018122.

(本文责编 郝丽芳)