epitope of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV I)[J]. Biomed Pept Proteins Nucleic Acids, 1995, 1(2): 83—92.

[10] Deck B, Elofsson M, Kihlberg J, *et al*. Specificity of glycopeptide specific T cells[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1 074—1 078.

[11] Deck M B, Sjolin P, Unanue E R, *et al*. MHC restricted, glycopeptide specific T cells show specificity for both carbohydrate and peptide residues[J]. J Immunol, 1999, 162(8): 4 740—4 744.

[12] Doe B, Steimer K S, Walker C M. Induction of HIV 1 envelope (gp120) specific cytotoxic T lymphocyte responses in mice by recombinant CHO cell derived gp120 is enhanced by enzymatic removal of N linked glycans[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(10): 2 369—2 376.

[13] Hiltbold E M, Alter M D, Ciborowski P, *et al*. Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells[J]. Cell Immunol, 1999, 194(2): 143—149.

[14] Haurum J S, Hoier I B, Arsequell G, *et al*. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules *in vivo*[J]. J Exp Med, 1999, 190(1): 145—150.

[15] Brumeanu T D, Casares S, Harris P E, *et al*. Immunopotency of a viral peptide asssembled on the carbohydrate moieties of self immunoglobulins[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(6): 722—725.

[16] Haurum J S, Hoier I B, Arsequell G, *et al*. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules *in vivo*[J]. J Exp Med, 1999, 190(1): 145—150.

[17] Hampl J, Schild H, Litzenberger C, *et al*. The specificity of a weak gamma delta TCR interaction can be modulated by the glycosylation of the ligand[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 288—294.

[18] Malissen B. Dancing the immunological two-step[J]. Science, 1999, 285: 207—208.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2000)10-1003-05

综述

CTL活性检测与监测

Methods for detecting and monitoring the activity of cytotoxic T lymphocyte

石统东，吴玉章 （第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所，重庆 400038）

在肿瘤及病毒性疾病的研究、治疗中，体液免疫并不能彻底消除肿瘤细胞及细胞内感染病毒，只有细胞介导的免疫反应，特别是细胞毒性T淋巴细胞（Cytotoxic T lymphocyte, CTL）介导的细胞免疫反应才能发挥最根本的作用。发展上述疾病的特异性疗法和诱发针对病毒感染细胞与肿瘤细胞表面特异性抗原的细胞免疫应答，特别是CTL介导的细胞毒作用，是克服目前病毒性疾病的常规治疗方法不能消除宿主细胞内病毒感染，以至使感染迁延、慢性化甚至向肿瘤恶性分化发展，以及肿瘤治疗缺乏特异性、损伤大、毒副作用大、疗效不够满意等问题的关键。而检测和监测病毒性疾病和肿瘤的抗原特异性CTL的活性及其介导的免疫应答的发展与转归，是评价特异性免疫疗法的基础。

目前我们已能直接定量某些特异性$CD8^+$ T细胞应答，同时，某些特异性$CD4^+$ T细胞应答的成熟的直接定量方法亦已面世。可以预计：在不久的将来我们对细胞介导的免疫反应的认识将会加深，有些理念可能要有所改变。目前国内外测定CTL活性的方法，大致可分为两类：一类是应用同位素的方法，一类是单个细胞水平的方法。各方法的原理、材料要求、具体操作、灵敏度、适用范围等也不尽相同。

1 应用同位素的CTL活性测定方法

1.1 ^{51}Cr释放法

自Brunnner等介绍以^{51}Cr标记靶细胞的同位素释放法测定CTL的细胞毒活性以来，^{51}Cr释放法已成为测定CTL杀伤活性的常规方法。因其易操作、重复性好，国外多采用此方法。^{51}Cr能透入细胞质，为细胞质内标记，在细胞破损之后即被释放出来。所需标记时间较短，一般1～2 h。研究发现一个效应CTL细胞（Effector CTL, eCTL）可在4 h内连续杀伤5个靶细胞，所以效应细胞和靶细胞的共孵育时间亦较短，一般只需4 h。

典型操作如下：选择一种对CTL介导的细胞毒作用高度敏感的靶细胞，以10^4/孔的数量转移至U型或V型底的微孔细胞培养板中，每组做3个复孔。效应CTL细胞以至少1∶5、最多

基金项目：国家高技术计划生物技术领域青年科学基金资助项目
作者简介：石统东（1970—），男，山东省蒙阴县人，博士研究生，主要从事蛋白质及多肽的分子设计与功能方面的研究，发表论文7篇。电话：(023)68752236
收稿日期：2000-08-04；修回日期：2000-09-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

100∶1 的比例加入同一孔中，混合后离心（300～500 r/min，5 min）沉淀，置 37 ℃、5%CO_2 孵箱中共孵育 4 h。效应 CTL 细胞中所含特异性 eCTL 至少应为 1/1 000；对人外周血淋巴细胞（PBMC）而言，如果 PBMC 直接来自病人，由于 $CD8^+$PBMC 约占总 PBMC 的 10%～20%，所以抗原特异性 eCTL 至少应为 $CD8^+$PBMC 的 1/100～1/200。但是，由于此方法检测人 PBMC 中 MHC-Ⅰ类分子限制性 CTL 肽段的特异性 CTL 的敏感性较低，所以人 PBMC 取出后，可在体外继续培养，并以特异性抗原刺激 2～3 次，以扩大特异性 eCTL 的数量。共孵育 4 h 后，将细胞培养板离心，取上清，用γ-计数仪测定每孔 cpm 值，取均值为每组的γ-计数值。

其主要缺点：（1）^{51}Cr 标记细胞的自发释放率较高，每小时 1%～2%，不适用于较长时间的细胞毒试验。且用 ^{51}Cr 标记时，要求细胞浓度应较大（由于标记时间短，不会导致细胞因营养耗竭或废物堆积而加速死亡）。（2）对某一 CTL 肽段的特异性 eCTL 的评价仅在定性、至多半定量的层面。

由于国产 ^{51}Cr 比活性低，自发释放率高，不能采用，现已经未见生产；而国外产品价格昂贵，所以国内少见应用此方法的报道。国外产品如 Amersham 公司、NEN 公司等的 $Na^{51}Cr$、$Na_2{}^{51}CrO_3$ 等质量很好，均可用于标记。

^{51}Cr 释放试验的计算公式为：

$$\text{特异性细胞溶破率}(\%)=\frac{\text{样本 cpm 值}-\text{自发释放 cpm 值}}{\text{最大释放 cpm 值}-\text{自发释放 cpm 值}}\times 100\%$$

1.2 ^{125}Ⅰ-UdR 释放试验

最早 ^{125}Ⅰ-UdR 标记靶细胞的同位素释放试验，是被用于测定人类的抗肿瘤细胞免疫应答，所用靶细胞多为贴壁培养的细胞。后来逐渐用于标记悬浮培养的细胞。只是贴壁细胞和悬浮细胞的标记条件差别较大，细胞毒活性测定的具体方法也有所不同，对贴壁细胞来说，可用细胞培养板培养细胞，待细胞贴壁后，再进行同位素标记；对悬浮细胞而言，用一般细胞培养管即可，不必等细胞贴壁再行标记。具体操作是：将（1～5）×10^4 细胞加入细胞培养板中，待其贴壁后（悬浮细胞不必），加入 0.5～1 μCi ^{125}I-UdR 和 10～6 mol/L FUdR，标记 18 h；充分洗涤后，根据效靶比与效应细胞一起加入培养板中，晃动培养 48 h，加入胰酶培养 30 min 后，分别取原上清、加胰酶后的上清和细胞，共 3 组，计数 cpm 值。计算公式为：

$$\text{总 cpm 值}=\text{原上清 cpm 值}+\text{加胰酶后的上清 cpm 值}+\text{细胞 cpm 值}$$

$$\text{特异性杀伤率}(\%)=\frac{\text{细胞 cpm 值}}{\text{总 cpm 值}}\times 100\%$$

$$\text{胰酶溶破率}(\%)=\frac{\text{加胰酶后的上清 cpm 值}}{\text{加胰酶后的上清 cpm 值}+\text{细胞 cpm 值}}\times 100\%$$

此方法的优点在于：^{125}Ⅰ-UdR 掺入靶细胞的核内 DNA，标记细胞无明显的自发释放，同位素的释放率直接反映靶细胞的破损情况。由于是核内标记，所以在短时间内（4～6 h）不能释放，故不适用于做短时间培育的细胞毒试验，而适用于较长时间（24～48 h）的细胞毒试验，以测定杀伤作用较弱的效应细胞的细胞毒作用，如 NK 细胞及巨噬细胞的杀伤活性及抗肿瘤作用的细胞免疫。

对于 NK 细胞活性、抗肿瘤细胞免疫应答等较弱的细胞毒效应，效靶细胞共孵育结束后，靶细胞应用胰酶及 DNA 酶进行处理，才可测得效应细胞的杀伤作用。而在测定 CTL 的细胞毒作用时，胰酶和 DNA 酶处理与否并不能改变试验结果，也不会使无杀伤活性的试验转为有杀伤效应，这可能与 CTL 细胞对靶细胞的杀伤力大于 NK 细胞等的杀伤力有关。尽管国产 ^{125}Ⅰ-UdR 仍存在一些问题，各批质量不同会直接影响标记效果，但如果靶细胞生长良好，处于对数生长期，存活率达到 98%左右，则各批产品仍可使用。

1.3 ^{3}H-TdR 释放法

现用 ^{51}Cr 法标记细胞自发释放率较高，半衰期短（27.7 d），价格昂贵，为实际应用带来许多困难。^{125}Ⅰ-UdR 释放试验方法虽优，但价格贵，国产每批质量也不同。^{3}H 半衰期长，国产质量稳定，价格不贵，亦无外照射损伤，应是较为理想的细胞毒释放试验的同位素。但是 ^{3}H 标记样品的制备、中间操作过程和结果测量较为麻烦，效靶细胞共孵育时间相对 ^{51}Cr 释放法要长一些，由于 ^{3}H-TdR 的标记是细胞核内标记，所以靶细胞被杀伤死亡后，^{3}H 并不能立刻被释放出并游离于上清中，故需再用适当浓度的胰酶和 DNA 酶进行消化处理，结果的测定要用液闪测量仪进行。由于 ^{3}H-TdR 为核内标记，所以人们担心的问题主要有两个：自发释放率和释放出的同位素能否再为靶细胞所利用。但研究发现：由于靶细胞死亡时不仅释放出 ^{3}H-TdR，同时也释放出更多的非活性 TdR。故 ^{3}H-TdR 的再吸收利用因素可忽略不计[1]。目前国内已较多地应用 ^{3}H-TdR 释放法测定特异性/非特异性 CTL 作用。更有改良的研究方案[1] 将测上清液放射量改为测细胞残留放射量，使方法更快、更简单。具体操作是：（1～2）×10^6/ml 靶细胞加入 10 μCi ^{3}H-TdR，置 37 ℃水浴孵育 2 h，经充分洗涤后，在 96-孔细胞培养板中每孔加入 10^4 细胞。根据适当效靶比加入效应细胞，混合培养 4～18 h 后，去上清，加胰酶和 DNA 酶溶液，继续温育 30 min。用多头样品收集器将细胞收集在玻璃纤维滤纸上，放入液闪杯中测量 cpm 值。计算公式：

$$\text{对照组 cpm 自然释放率}(\%)=\left(1-\frac{\text{对照组 cpm}}{\text{总 cpm}}\right)\times 100\%$$

$$\text{特异性细胞杀伤率}(\%)=\left(1-\frac{\text{样品组 cpm}}{\text{对照组 cpm}}\right)\times 100\%$$

2 单个细胞水平测定 CTL 活性的方法

目前，在单个细胞水平测定 CTL 反应活性，一般常用下列几种方法：产生细胞因子的细胞记数法、基于 PCR 的特异性 TcR 追踪法、有限稀释分析法（LDA）、MHC-Ⅰ类分子-抗原肽（MHC-Ⅰ^{pep}）四聚体法。

2.1 细胞因子分泌细胞的计数法

活化的 T 淋巴细胞可分泌一些功能性的细胞因子，如 IL-2、IFN-γ、TNF-α 等。所以可通过下列方法检测单细胞水平上的细胞因子产生、分泌情况：（1）原位杂交技术检测编码细胞因子的 mRNA；（2）免疫组化法和免疫荧光法检测细胞因子；（3）细胞因子分泌细胞的胞内染色，然后再用流式细胞仪进行检测；（4）改良的酶联免疫吸附试验，以确定单个细胞因子的分泌细胞。

2.1.1 染色细胞内的细胞因子 体外培养、刺激、活化细

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞, 用 Brefeldin A 封闭细胞因子分泌途径, 使细胞因子在细胞内累积。然后, 用荧光或生物素标记的 CD4 或 CD8 的单克隆抗体对细胞进行 CD4 或 CD8 表面标志物染色, 再经去污剂固定并增高细胞通透性, 使抗细胞因子荧光抗体结合到细胞内[2,3]。最近已经建立了 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的抗原特异性细胞因子分泌细胞的细胞内染色方法。此方法应用细胞内累积细胞因子的染色和多种颜色参数的 FACS 法, 是检测人循环淋巴细胞中抗原特异性 T 淋巴细胞的可行方法。

2.1.2　ELISpot 法　　该方法原理是: 活化的 T 淋巴细胞周围分泌有高浓度的细胞因子, 可进行酶联免疫检测和记数单个细胞因子分泌细胞。具体操作是: 将硝酸纤维素膜用细胞因子特异性单克隆抗体预包被, 经洗脱去掉过量的抗体后, 再用牛血清白蛋白封闭游离位点, 然后衬底于细胞培养板的微孔底部, 将 T 细胞和抗原提呈细胞(APC)加入此孔内, 用特异性抗原刺激, 以活化细胞并分泌细胞因子。然后加入碱性磷酸酶(ALP)或辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗细胞因子抗体, 以检测细胞因子的分泌状况, 经再次洗脱, 去掉多余抗体后, 用立体显微镜观察分泌斑的情况。一般来说, 每个小斑都反映了一个细胞因子分泌细胞的情况, 见图 1。

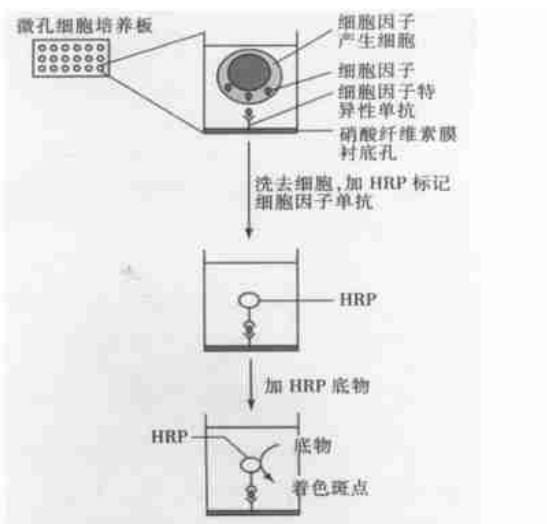


图 1　检测单个细胞因子分泌性 T 细胞在外周血淋巴细胞中的存在频率 (ELISpot 法)

该方法比 ^{51}Cr 释放法更加有效、快速, 敏感度要高 30 ~ 100 倍, 且不需体外的细胞增殖过程。现在国外已有该系统的商业化试剂盒, 国内也有销售。基于 IFN-γ 或 TNF-γ 分泌性 $CD8^+$ T 细胞的 ELISpot 法已用于检测几种 MHC-Ⅰ 类分子限制性黑色素瘤抗原, 如 MAGE、gp100、Mart-1、酪氨酸酶等的检测[4,5]。缺点是大数量的斑点, 或者斑点的形状变异较大均会使人工分析变得很困难。但是应用计算机辅助立体成像检测技术已可解决此问题, 并且能够确定分泌斑的面积, 分析 T 淋巴细胞对特异性抗原的反应能力。

2.2　基于 PCR 的特异 TcR 跟踪法

同一 MHC-抗原肽复合物存在多个不同的 CTL 识别克隆。不论是对 TcR 基因的分子克隆研究, 还是对 TcR 高变区的第三补体结合位点(CDR3)的研究, 都证实同一个体中, TcR 文库存在多种特异性。对某一抗原而言, TcR 库是有限制性的, 即一些密切相关的 TcR 被那些相应的抗原特异性 T 细胞所利用。因此, 应用 RT-PCR 技术和克隆型 TcR 特异性引物, 能够检测淋巴细胞群体中抗原特异性 T 淋巴细胞克隆的存在。

分析 TcR 文库的其它方法还有 Cβ、Vβ 两个区域的引物之间的 cDNA 顺序的扩增、Vβ、Jβ 两区域的引物间基因组 DNA 的扩增, 然后再用 SSCP 凝胶来分析标记的 PCR 产物; 还有一种更加灵活并可定量的方法, 即最初的 PCR 反应用未标记的 Vβ 和 Cβ 或 Jβ 特异性引物, 然后加入荧光标记探针, 使产物再经过一"run-off"反应, 终产物得以延长过 CDR3 区, 然后可用测序凝胶分离[6], 见图 2。此方法最大的限制在于不能确定单克隆扩增的 TcR 的抗原配体, 而且到目前为止, 尚无法确定某一特定抗原的 TcR 文库是多样性的还是限制性的, 因此也还不能将此方法用于实践。

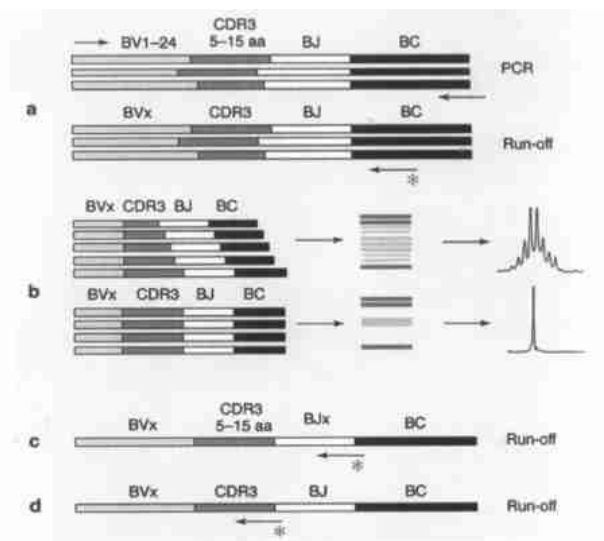


图 2　基于 **PCR** 的特异性 **TcR-CD3** 追踪法示意图

2.3　有限稀释分析法(Limiting dilution analysis, LDA)

长期以来, 无法直接、定量分析特异 $CD8^+$ T 淋巴细胞, 是一直限制人们对 $CD8^+$ T 细胞介导的免疫反应进行深入研究的关键。常规的 ^{51}Cr 释放法测定的是一个细胞群体的特性, 至多是一种半定量分析方法。亲和力结合实验亦不能提供更深入全面的信息, 因为此类方法依赖于细胞间相互作用, 而任何依赖独特型αβTcR 与其同源 MHC-Ⅰ 类分子-肽(MHC-Ⅰ pep)的亲和性的细胞间相互作用可被在所有活化 T 细胞上表达上调的粘附分子谱所掩盖, 目前尚不能应用某一特定 TcRαβ 识别某一特异性 MHC-Ⅰ pep, 且大多数 CTL 反应是多克隆应答。所以它们至多为半定量检测法, 而且检测的是一个细胞亚群的活性,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

不能定量检测某一特定类型细胞(如 $CD8^+$、$CD4^+$ T 细胞)的活性[7]。一种迄今应用较广泛的定量分析系统是有限稀释分析法。这是一种使用细胞培养板进行细胞的体外培养的微克隆法,在测定细胞培养板某一孔的淋巴细胞的 CTL 活性之前,需要将 CTL 前体细胞(CTL precursor, pCTL)在体外培养 6~7 d,在这段时间内,pCTL 要进行 10~11 次循环的增殖。LDA 法使我们能够详细了解免疫反应动力学和记忆 CTL(Memory CTL, mCTL)细胞亚群的细胞周期[8,9]。同时,此方法还可用来研究 pCTL 和 mCTL 亚群中各种活化标志物的分布情况。但此方法也存在缺点,主要是:(1)在 LDA 条件下,深入刺激会使效应 CTL(eCTL)细胞加快凋亡[10],使 CTL 活性测定值变动较大,对 eCTL 细胞数量不能测定或测定值偏低。(2)是实验较繁琐,因为在实验之前,首先需要将淋巴细胞表面表达的 CD 分子,如 CD44 或 CD62L 进行染色,再用 FACS 法分类筛选,然后在 LDA 条件下培养 6 d;这样就会造成 T 细胞数量损失,特别是在活化状态进行筛选和分离时。即使如此,LDA 法仍是能够使我们定义宿主免疫反应的动力学,研究 mCTL 细胞亚群的持续时间,并且可对 pCTL 和 mCTL 亚群细胞表面的激活标志物进行研究的良好方法。

2.4 MHC-Ⅰ类分子-抗原肽(MHC-Ⅰ^{pep})四聚体/八聚体法

对 T 细胞介导的细胞免疫应答研究的不懈努力,使人们在 MHC-Ⅰ类分子与小分子多肽的共价结合复合物(MHC-Ⅰ^{pep})的制备、及其与 TcRαβ 的识别与结合的研究中取得了长足的进步,从而出现了一种崭新的技术:MHC-Ⅰ类分子-抗原肽(MHC-Ⅰ^{pep})四聚体法。

该方法的基本原理是基于抗原提呈细胞(APC)所提呈的小分子肽与 T 细胞上抗原表位特异性 TcR 的精细识别。其基本操作是:将可溶性的小分子抗原肽与 MHC-Ⅰ类分子的连接复合物以荧光标记,MHC-Ⅰ类分子重链(HLA-A2 或 HLA-B8)基因或β_2 微球蛋白基因经基因重组技术处理后,可以表达一种可溶性分子,该分子的 C-末端将含一特异的生物素化位点。将此种可溶性配体(HLA-A2 或 HLA-B8 复合物)纯化,然后在含重链蛋白、β_2 微球蛋白和小分子多肽的环境中进行体外折叠。经层析纯化后,MHC-Ⅰ-抗原肽复合物再进行位点特异性生物素标记,最后,生物素化的 MHC-Ⅰ—抗原肽复合物与荧光标记的亲合素(中间连接体)混合,可生成四聚体;如果表位特异性生物素化的球蛋白先形成二聚体,然后再与荧光标记的亲合素混合,则可形成八聚体。抗原—配体寡聚物形成能提高与 TcR 结合的亲合力,因而可直接染色抗原特异性 T 细胞,而抗原肽与 MHC 分子的共价结合可显著提高 TcR 的稳定性,所以这些四聚体、八聚体均具有高度亲和力,可稳定地结合到同源 TcRαβ 的不同区域。细胞经上述生物素、荧光素染色后,其染色信号比背景染色高 10 倍以上,可在流式细胞仪下直接、定量检测抗原特异性 CTL 细胞的状况[11~14]。由于每个四/八聚体连接的都是特异的 MHC-Ⅰ类分子和表位多肽,所以具有高度特异性;同时,它又具高度敏感性,即使体内 mCTL 水平低于 1%,用常规方法几乎检测不到,用 MHC-Ⅰ^{pep}四聚体法仍可得到直接、准确的测定值,比 LDA 法敏感度要高 5~10 倍[7,15],见图 3。

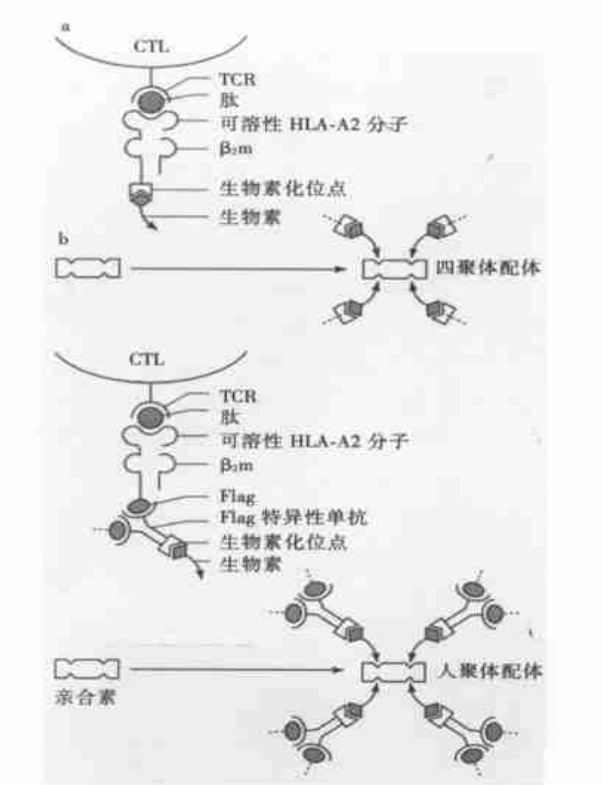


图3 抗原肽-MHC-Ⅰ类分子(MHC-Ⅰ^{pep})四聚体法原理示意图

a:生物素化的 MHC-Ⅰ-抗原肽复合物与荧光标记的亲合素混合,形成四聚体;b:表位特异性生物素化抗体先形成二聚体,再与荧光标记的亲合素混合,形成八聚体

在此之前,有学者用二聚体免疫球蛋白做连接体,与荧光标记的亲合素混合,则可形成八聚体。但后来这方面的研究工作较少报道;尽管如此,仍不失为一个具创新性的好方法,目前已有应用 MHC-Ⅱ类分子($I\text{-}E^k$)的成熟方法。

由于该方法能够直接、定量检测抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞,因而极大地简化了对细胞免疫反应的研究。例如确定 TcR 表型,以前应用 FACS 对小鼠流感模型和一系列杂交瘤细胞系的研究结果,现在可轻松地通过 $H\text{-}2D^b$+ NP366~374 的四聚体方法直接染色 NP366~374 表位肽特异性 $CD8^+$ T 细胞而得以确证。这说明现在完全能够通过 FACS 法分析、测定 $CD8^+$ NPP^+ $V\beta8.3^+$T 细胞亚群从原发免疫应答到发展为长期的记忆性 $CD8^+$ T 细胞的过程中各种参数的变化情况。应用该技术结合 TcR 谱测定,完全可以确定某种抗原特异性 T 细胞克隆的生命周期。

MHC-Ⅰ^{pep}四聚体法的优势即在于快速、直接、灵敏、特异。而且对以前的研究结果可进行确证,使细胞免疫应答和免疫记

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

忆中许多令人困惑的问题得以解决。如以往认为，如果缺乏抗原持续刺激，$CD8^+$ T 细胞记忆的寿命将较为短暂，而新近四聚体法研究结果却发现并非如此，在无抗原刺激的情况下，有一定数量的 mCTL 可长期存在。但同时也揭示了 $CD8^+$ T 细胞记忆的固有限制性，认为淋巴组织中的抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞对特异抗原的刺激再反应需要时间，然后还要将它们从淋巴组织向非淋巴组织集中。

在急性感染的小鼠脾脏中，已发现超过 50% 的淋巴细胞溶解性绒毛膜脑膜炎病毒（LCMV）特异性 pCTL 和 eCTL 存在，而同时有超过 10% 的 mCTL 细胞亚群长期存在。最近应用四聚体法对 LCMV 特异性 $CD8^+$ T 细胞的数量的研究结果与以前 IFN-γ-ELISpot 法所得到结果相吻合，并且可在有蛋白分泌抑制剂存在的情况下被同源肽经短期刺激而重现。另有研究应用高剂量的 LCMV 病毒模型，发现效应 CTL 针对病毒而长期存在，说明许多四聚体阳性细胞是无功能的，不能产生 IFN-γ。这一现象可用于对那些存在于肿瘤实体中却不能控制肿瘤恶性分化的 $CD8^+$ T 细胞的研究。

在研究宿主体内细胞免疫应答的过程中，如何确定抗原特异性 pCTL 和 mCTL 细胞的增殖程度，一直是困扰我们的难题。以前常用的方法是，以对周期细胞有细胞毒性的药物免疫小鼠，然后再检测其残存效应 CTL 的功能，有时效应 CTL 还要进行体外再刺激。如果用 BrdU 直接注射小鼠，然后用 LDA 法进行检测，对于急性相的 CMI 可得到较好的结果，但 BrdU 有毒性，且很难知道在试验中是否达到了较好的动态平衡。现在这一难题已迎刃而解，应用抗原肽-MHC-Ⅰ类分子四聚体分析系统可准确、直接、快速地了解在原发和继发免疫应答过程中抗原特异性 pCTL 和 mCTL 细胞的复制情况。

应用 MHC-Ⅰ^{pep}四聚体分析系统检测 HIV 病者血中病毒特异性 $CD8^+$ T 细胞的数量变化，可监测 HIV 病人病情发展状况，研究病毒 RNA 水平和 eCTL 细胞在患者免疫应答中的作用[15]。此方法还可用于筛选病毒抗原特异性 CTL 免疫优势表位[12]等。应用免疫球蛋白连接的 MHC-Ⅰ^{pep}四聚体法已经阐明人类 HTL 病毒特异性 $CD8^+$ T 细胞的数量。

迄今为止，MHC-Ⅰ^{pep}四聚体法已被用于研究病毒性感染及肿瘤等疾病，如 HIV、EBV、HTLV、白血病等的研究。此方法的出现可以说是对细胞免疫研究的里程碑，存在的问题主要是：每个四聚体均需针对特定的 MHC-Ⅰ类分子而设计，而且以免疫球蛋白为连接物的方法亦有极大应用潜力，但目前研究中应用并不广泛。目前，在美国 NIH 已经有专门的研究开发小组对此方法的各方面进行进一步发展，以期方法和试剂能够适用于该领域的各种情况。

随着知识和技术的飞速进步，用于检测宿主体内、外细胞介导的抗原特异性免疫应答的方法也得到了迅速的发展。MHC-Ⅰ^{pep}四聚体法的出现解决了长期困扰免疫学界的许多难题，使抗原特异性 CTL 活性的检测达到了特异、高效和直接定量的程度，同时也可能促使我们对 CTL 的定义有更新的认识。

关键词：CTL；活性；检测；监测

中图法分类号：R446.6 文献标识码：A

参考文献：

[1] 吴厚生，谢 琪，姜小铃，等. 用^{3}H-TdR 释放法测量细胞介导的细胞毒功能[J]. 上海免疫学杂志，1987，7(4)：230—233.

[2] Jung T. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry[J]. J Immunol Methods，1993，159(1-2)：197—207.

[3] Prussin C，Metcalfe D D. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies[J]. J Immunol Methods，1995，188(1)：117—128.

[4] Herr W. Detection and quantification of blood-derived $CD8^+$ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2 1-binding melanoma and viral peptide antigens[J]. J Immunol Methods，1996，191(2)：131—142.

[5] Scheibenbogen C. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN γ-ELISPOT assay[J]. Int J Cancer，1997，71(6)：932—936.

[6] Pannetier C，Even J，Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples[J]. Immunol Today，1995，16(4)，176—181.

[7] Doherty P C，Tophan D J，Tripp R A. Establishment and persistence of virus-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell memory[J]. Immunol Rev，1996，150：23—44.

[8] Lau L L，Jamieson B D，Somasundaram T，*et al*. Cytotoxic T-cell memory without antigen[J]. Nature，1994，369(6 482)：648—652.

[9] Hou S，Hyland L，Ryan K W，*et al*. Virus-specific $CD8^+$ T-cell memory determined by clonal burst size[J]. Nature，1994，369(6 482)：652—665.

[10] Green D R，Scott D W. Activation-induced apoptosis in lymphocytes[J]. Curr Opin Immunol，1994，6(3)：476—487.

[11] McMichael A J，O' Callaghan C A. A new look at T cells[J]. J Exp Med，1998，187(9)：1 367—1 371.

[12] Callan M F C，Tan L，Annels N，*et al*. Direct visualization of antigen-specific $CD8^+$ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *in vivo*[J]. J Exp Med，1998，187(9)：1 395—1 402.

[13] Busch D H，Pilip I M，Vijh S，*et al*. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection[J]. Immunity，1998，8(3)：353—362.

[14] Ogg G S，Jin X，Bonhoeffer S，*et al*. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA[J]. Science，1998，279(5 359)：2 103—2 106.

[15] Butz E A，Bevan M J. Massive expansion of antigen-specific $CD8^+$ T cells during an acute virus infection[J]. Immunity，1998，8(2)：167—175.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net