

熊果酸对荷骨肉瘤大鼠免疫功能的影响

陈伟 刘海生 魏萌 王丽红 师艳艳

【摘要】 目的 研究熊果酸对荷骨肉瘤大鼠免疫功能的影响及其机制。**方法** 通过于 Wistar 大鼠股骨远端骨髓腔中注射接种骨肉瘤 UMR106 细胞的方法建立荷骨肉瘤大鼠模型并腹腔注射给予不同剂量的熊果酸 100、50、25 mg/(kg·d) 和顺铂 2.5 mg/(kg·d) 进行干预治疗, 疗程 5 天。观察大鼠生存状态和肿瘤生长状况; 称量瘤体质量并计算抑瘤率, HE 染色法观察肿瘤组织形态结构改变, MTT 法测定脾淋巴细胞转化率; ELISA 法测定血清中白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 含量; 流式细胞术检测血液中 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ 百分率并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。**结果** 经熊果酸干预治疗 5 天荷骨肉瘤大鼠饮食状况好转, 瘤体缩小、瘤体质量减轻且硬度较差, 呈现肿瘤细胞皱缩、组织片状坏死等变化; 抑瘤率显著升高, 脾淋巴细胞转化率显著升高, 血清中 IL-2、TNF- α 含量显著降低, 血液中 CD4⁺ 显著升高、CD8⁺ 百分率显著降低, CD4⁺/CD8⁺ 比值显著升高, 且均具有一定的剂量依赖性。**结论** 熊果酸具有提高荷骨肉瘤大鼠免疫功能的作用, 其机制可能与熊果酸能够有效提高脾淋巴细胞转化率, 降低 IL-2、TNF- α 含量以及提高 CD4⁺ 百分率、降低 CD8⁺ 百分率而提高 CD4⁺/CD8⁺ 比值有关。

【关键词】 熊果酸; 骨肉瘤; 免疫功能; 机制

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.03.006

Effects of ursolic acid on immune function of osteosarcoma rats CHEN Wei, LIU Haisheng, WEI Meng, et al. Handan Central Hospital, Handan 056001, China
Corresponding author: CHEN Wei, E-mail: hdsyyzhrf@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanism of ursolic acid (UA) on immune function of osteosarcoma cancer rats. **Methods** The osteosarcoma cancer rat models were conducted by

作者单位: 056001 邯郸市中心医院骨三科(陈伟、魏萌、王丽红、师艳艳); 邯郸市人民医院外一科(刘海生)

作者简介: 陈伟(1976-), 硕士, 主治医师。研究方向: 骨科疾病。E-mail: hdsyyzhrf@163.com

injecting osteosarcoma cancer cell line UMR106 and were treated with UA 100, 50, 25 mg/(kg·d) and Cisplatin 2.5 mg/(kg·d) by intraperitoneal injection for 5 d. The rats' general states and tumor growth conditions were observed, the histopathological changes of tumor tissue were observed by HE staining; the tumor weight was detected and inhibition rate was calculated, the spleen lymphocyte transformation rate was detected by MTT, the content of IL-2 and TNF- α in serum were detected, the percentage of CD4⁺, CD8⁺ in blood were detected and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ was calculated. **Results** The diet situation of the rats in UA treated groups were improved, tumor were reduced and hardness were less, tumor cell showed shrinkage, tissue necrosis, etc; the tumor inhibition rate were increased; the spleen lymphocyte transformation rate were significantly increased; the content of IL-2 and TNF- α in serum were significantly decreased; the CD4⁺ percentage in blood were significantly increased, the CD8⁺ percentage was significantly decreased, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in UA treated groups were significantly increased. The effect of the above mentioned effects of UA has a certain dose dependence. **Conclusion** UA can effectively improve the immune function of osteosarcoma cancer rat; which perhaps related to its effects of increasing the spleen lymphocyte transformation rate, reducing the content of IL-2 and TNF- α , increasing CD4⁺ percentages, decreasing CD8⁺ percentages and raising the ratio of CD4⁺/CD8⁺.

【Key words】 Ursolic Acid; Osteosarcoma cancer; Immune function; Mechanism

骨肉瘤发病率居原发恶性骨肿瘤之首^[1-2], 每年新发患者约 5/100 万^[3], 多发于青少年且死亡率高, 是临床上亟待解决的一个难题。近年来, 病理生理学研究发现肿瘤疾病患者多处于免疫系统抑制、免疫活性细胞功能低下状态, 从而使肿瘤细胞易于生长和转移^[4-5], 因此以改善患者免疫功能为切入点或许是研发高效、低毒新型抗肿瘤药物的新思路。熊果酸 (ursolic Acid, UA) 是一种具有抗氧化、抗炎、抗纤维化等多种生物学活性的五环三萜类化合物^[6-10], 现代药理学研究发现熊果酸对肺癌、肝癌、舌癌等生长均具有一定的抑制作用^[11-13]。本实验通过股骨远端骨髓腔注射接种骨肉瘤 UMR106 细胞的方法建立荷骨肉瘤大鼠模型, 研究熊果酸对荷骨肉瘤大鼠免疫功能的影响并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

清洁级 Wistar 大鼠 (雄性, 7 周龄, 体质量 220 ~ 240 g) 购自河北省实验动物中心, 许可证号: SCXK (冀) 2013-1-003; 大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞株购自中科院上海生化与细胞生物学研究。

1.2 药物与试剂

熊果酸 (陕西慧科植物开发有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 顺铂 (江苏豪森药业股份有限公司, 规格: 30 mg, 6 mL); DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (美国 HyClone 公司); MTT、DMSO (美国 Sigma 公司); 白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、肿

瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); HE 试剂盒 (北京博奥森生物工程有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型的制备与分组 取实验用骨肉瘤 UMR106 细胞, 经解冻复苏后, 植入 DMEM 高糖培养基进行培养并取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 5×10^6 /mL, 无菌条件下注射接种 (0.2 mL) 于实验用 Wistar 大鼠股骨远端骨髓腔中以制备荷骨肉瘤大鼠模型, 2 周后接种部位出现包块、直径 ≥ 5 mm 即可认定造模成功^[14-15]。取 100 只模型大鼠按随机数字表法随机分为模型组、熊果酸高、中、低 [100、50、25 mg/(kg·d)] 和顺铂 2.5 mg/(kg·d) 组, 各 20 只; 并另取 20 只同龄清洁级雄性 Wistar 大鼠设为正常对照组。药物的配制: 准确称量熊果酸并用含 5 mg/mL 羧甲基纤维素钠的 PBS 溶液 (pH 7.4) 溶解并依此稀释分别配制成含熊果酸 50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL 的混悬液^[16]; 并用含 5 mg/mL 羧甲基纤维素钠的 PBS 溶液 (pH 7.4) 溶解配制成含顺铂 1.25 mg/mL 的混悬液。熊果酸各治疗组和顺铂组均腹腔注射给药 (2 mL/kg) 进行治疗, 模型组和正常对照组同步给予等体积 (2 mL/kg) 含 5 mg/mL 羧甲基纤维素钠的 PBS 溶液, 1 次/天, 疗程 5 天。

1.3.2 测定瘤体质量、计算抑瘤率、观察肿瘤组织形态结构改变 麻醉后取肿瘤组织并称重, 抑瘤率计算公式: 抑瘤率 (%) = (模型组瘤体质量 - 治疗组瘤体质量) / 模型组瘤体质量 $\times 100\%$; 取称量后肿瘤

组织,经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片后,行常规脱蜡水化处理,参照 HE 试剂盒方法步骤行常规 HE 染色和复染,然后通过显微镜观察肿瘤组织形态结构改变。

1.3.3 测定脾淋巴细胞转化率 参照李晓冰等^[17]报道的实验方法测定脾淋巴细胞转化率:取脾脏组织行研磨匀浆后制备单细胞悬液,加入 10 mL NH₄Cl(10%)经 37℃ 水浴 10 分钟,转移至 96 孔培养板后每孔滴加 100 μL PHA 液(植物血球凝集素,实验孔),设对照孔并滴加 100 μL 培养液,于 37℃、5% CO₂培养箱内培养 48 小时后滴加 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),培养 4 小时后去上清,加入 DMSO 200 μL,反应 10 分钟后通过酶标仪测定波长 490 nm 处吸光度(OD)值,以刺激指数(SI)反映脾淋巴细胞转化率(SI):SI=PHA 刺激孔 OD/对照孔 OD。

1.3.4 测定血清中 IL-2、TNF-α 水平 经腹主动脉取血并离心(1500 rpm,10 分钟)取血清,参照试剂盒说明通过酶标仪采用比色法测定血清中 IL-2、TNF-α 水平。

1.3.5 测定血液中 CD4⁺、CD8⁺ 百分率并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值 经腹主动脉取血并离心(10000 rpm,5 分钟)后弃上清,参照关硕等^[18]报道的方法,通过流式细胞仪分析检测 CD4⁺、CD8⁺ 百分率并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

1.4 统计学处理

运用软件 SPSS 17.0 进行统计分析,计量资料组间均数比较采用 one-way ANOVA 分析,两两比较采用 LSD-t 检验;计数资料采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠肿瘤组织病变的影响

肿瘤组织切片经 HE 染色后通过显微镜观察,结果如图 1 所示:模型组荷骨肉瘤大鼠肿瘤组织细胞胞质饱满、胞核呈两个或多个、核仁深染,未见异常;熊果酸各剂量组和顺铂组肿瘤组织细胞呈现皱缩、数量

减少、核染色质边集以及片状坏死区等病理性改变,熊果酸诱导肿瘤组织病变的作用呈一定剂量依赖性。

2.3 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠瘤体重量及抑瘤率的影响

熊果酸能够有效减轻荷骨肉瘤大鼠瘤重并提高抑瘤率,并呈一定剂量依赖性;熊果酸高剂量组瘤体质量和抑瘤率与顺铂组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果如表 1 所示。

2.4 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠脾淋巴细胞转化率的影响

结果如表 2 所示:与正常对照组比较发现,模型组荷骨肉瘤大鼠脾淋巴细胞转化率显著升高;熊果酸治疗 5 天能够有效降低荷骨肉瘤大鼠脾淋巴细胞转化率,并呈一定剂量依赖性;熊果酸高剂量组脾淋巴细胞转化率显著低于顺铂组。

表 1 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠瘤体质量及抑瘤率的影响($\bar{x}\pm s$)

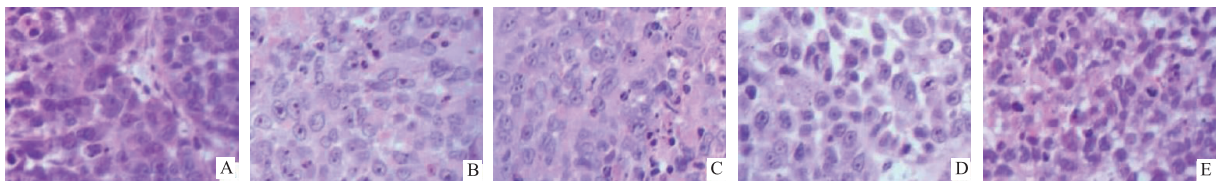
组别	n	瘤体质量(g)	抑瘤率(%)
正常对照组	20	—	—
模型组	20	0.81±0.19	0.0±0.0
顺铂组	20	0.44±0.12 ^b	43.0±3.7 ^b
熊果酸高剂量组	20	0.47±0.13 ^b	41.1±4.8 ^b
熊果酸中剂量组	20	0.59±0.17 ^a	32.6±3.5 ^b
熊果酸低剂量组	20	0.70±0.21	25.3±2.8 ^b

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

表 2 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠脾淋巴细胞转化率的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	脾淋巴细胞转化率(%)
正常对照组	20	1.01±0.04
模型组	20	1.42±0.07 ^a
顺铂组	20	1.15±0.06 ^b
熊果酸高剂量组	20	1.04±0.06 ^{bc}
熊果酸中剂量组	20	1.22±0.08 ^b
熊果酸低剂量组	20	1.29±0.09

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$,与模型组比较,^b $P<0.05$,与顺铂组比较,^c $P<0.05$ 。



注:A 模型组;B 顺铂组;C 熊果酸高剂量组;D 熊果酸中剂量组;E 熊果酸低剂量组

图 1 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠肿瘤组织病变的影响(HE×400)

2.5 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠血清中 IL-2、TNF- α 含量的影响

结果如表 3 所示:与正常对照组比较发现,模型组荷骨肉瘤大鼠血清中 IL-2、TNF- α 含量均显著升高;经熊果酸或顺铂治疗 5 天能够有效降低荷骨肉瘤大鼠血清中 IL-2、TNF- α 含量,且呈一定剂量依赖性;熊果酸高剂量组 IL-2 含量较顺铂组显著降低,而 TNF- α 含量两组间无显著性差异($P>0.05$)。

表 3 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠血清中炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别(group)	n	白细胞介素-2 (pg/mL)	肿瘤坏死因子- α (pg/mL)
正常对照组	20	60.8 \pm 9.6	103.5 \pm 17.2
模型组	20	115.2 \pm 18.3 ^a	229.5 \pm 27.6 ^a
顺铂组	20	84.8 \pm 11.5 ^b	126.8 \pm 21.9 ^b
熊果酸高剂量组	20	62.7 \pm 9.8 ^{bc}	133.1 \pm 24.0 ^b
熊果酸中剂量组	20	85.9 \pm 13.4 ^b	168.5 \pm 27.8 ^b
熊果酸低剂量组	20	98.2 \pm 21.7	206.9 \pm 32.4

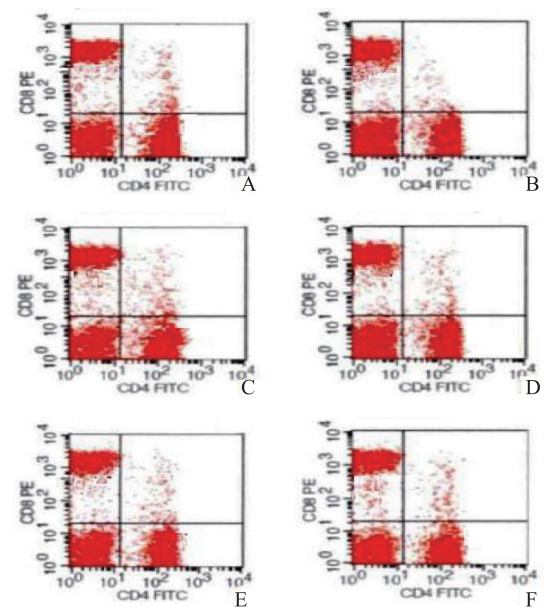
注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$,与顺铂组比较,^c $P<0.05$ 。

2.6 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠血液中 CD4⁺、CD8⁺ 百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值的影响

结果如图 2 和表 4 所示:与正常对照组比较发现,模型组荷骨肉瘤大鼠血液中 CD4⁺ 百分率显著降低、CD8⁺ 百分率显著升高,而 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著降低;经熊果酸或顺铂治疗 5 天能够有效提高荷骨肉瘤大鼠血液中 CD4⁺ 百分率,降低血液中 CD8⁺ 百分率,提高血液中 CD4⁺/CD8⁺ 比值;熊果酸高剂量组 CD4⁺、CD8⁺ 百分率、CD4⁺/CD8⁺ 比值与顺铂组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

目前临床上对于骨肉瘤的治疗主要采取手术



注:A 正常对照组;B 模型组;C 顺铂组;D 熊果酸高剂量组;E 熊果酸中剂量组;F 熊果酸低剂量组

图 2 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠血液中 CD4⁺、CD8⁺ 百分率

辅以放化疗的方案,但 80% 的患者因确诊时体内已经出现转移病灶而致使手术治疗效果不佳^[19],5 年生存率仅 30% 左右。因此,以提高荷骨肉瘤患者免疫功能、抑制肿瘤生长和转移为切入点研究高效、低毒的新型抗肿瘤药物是临床上亟待解决的问题。

脾淋巴细胞转化百分率是反映机体细胞免疫的基本指标^[20],也是研究药物对 T 淋巴细胞影响的常用方法。IL-2 是体内非常重要的免疫调节因子,其在恶性肿瘤的免疫应答中起着非常关键的调节作用^[21],Wang Z 等^[22]研究发现 IL-2 具有抗肿瘤免疫耐受的生物学作用,该作用与 IL-2 的浓度及作用时间等因素密切相关。Anquetil F 等^[23]研究发现当机体荷肿瘤时体内 TNF- α 合成及分泌增加,过量的 TNF- α 不但能够抑制 IgG 和 IgM 产生,也能导致 T 淋巴细胞不能对肿瘤细胞产生正常的免疫反应。

表 4 熊果酸对荷骨肉瘤大鼠血液中 CD4⁺、CD8⁺ 百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常对照组	20	31.5 \pm 2.9	16.0 \pm 2.7	1.97 \pm 0.42
模型组	20	19.6 \pm 4.7 ^a	23.8 \pm 5.9 ^a	0.82 \pm 0.27 ^a
顺铂组	20	26.8 \pm 5.9 ^b	14.6 \pm 4.2 ^b	1.84 \pm 0.46 ^b
熊果酸高剂量组	20	25.4 \pm 6.6 ^b	16.9 \pm 5.0 ^b	1.50 \pm 0.43 ^b
熊果酸中剂量组	20	22.8 \pm 6.1	19.3 \pm 6.5 ^b	1.18 \pm 0.35 ^b
熊果酸低剂量组	20	21.9 \pm 5.8	21.8 \pm 7.7	1.00 \pm 0.30

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$,与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

T 淋巴细胞 CD4⁺ 分子和 CD8⁺ 分子共同介导细胞免疫应答反应^[24-25], CD4⁺/CD8⁺ 比值在机体免疫调节中具有重要作用, 其比值变化能够准确反映出机体免疫状态。

熊果酸是一种具有多种生物学活性的五环三萜类化合物^[1-5], 近年来熊果酸抗肿瘤活性逐渐得到医药科研工作者的关注。本实验通过建立荷骨肉瘤大鼠模型并给予熊果酸进行干预治疗, 研究发现经熊果酸治疗能够改善荷骨肉瘤大鼠一般生存状态, 呈剂量依赖性地诱导细胞坏死、降低瘤体质量、提高抑瘤率; 与模型组比较, 发现经熊果酸治疗能够有效提高荷骨肉瘤大鼠脾淋巴细胞转化率, 降低血清中炎症细胞因子 IL-2 和 TNF- α 水平, 提高血液中 CD4⁺ 百分率、降低 CD8⁺ 百分率, 提高 CD4⁺/CD8⁺ 比值, 其中熊果酸 100 mg/(kg·d) 组脾淋巴细胞转化率显著高于顺铂组 ($P < 0.05$)、IL-2 含量水平显著低于顺铂组 ($P < 0.05$), 提示熊果酸能够改善荷骨肉瘤大鼠免疫功能, 而表现出对移植瘤组织生长的抑制作用。

参 考 文 献

- [1] Van DE, Luijtgarden AC, Kapusta L, et al. High prevalence of late adverse events in malignant bone tumour survivors diagnosed at adult age [J]. *Neth J Med*, 2014, 72(10): 516-522.
- [2] Pu F, Chen F, Chen S, et al. Association between GSTP1 polymorphisms and prognosis of osteosarcoma in patients treated with chemotherapy: a meta-analysis [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 23(8): 1835-1842.
- [3] Whelan J, McTiernan A, Cooper N, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007 [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(4): 508-517.
- [4] Karachaliou N, Pilotto S, Bria E, et al. Platelets and their role in cancer evolution and immune system [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(6): 713-720.
- [5] Codony-Servat J, Rosell R. Cancer stem cells and immunoresistance: clinical implications and solutions [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(6): 689-703.
- [6] 郝冉冉, 王晨静, 仲伟珍, 等. 熊果酸对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(4): 29-32.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗动脉粥样硬化作用 [J]. *上海医药*, 2014, 35(23): 73-79.
- [8] 王翔, 阎昭, 王旭, 等. 熊果酸纳米脂质体的镇痛作用和抗炎活性 [J]. *山东医药*, 2013, 53(29): 31-35.
- [9] 刘双, 毛汉文, 刘佩文, 等. 熊果酸对高血压大鼠心肌纤维化及 p38 活化的影响 [J]. *内科急危重症杂志*, 2016, 22(1): 64-67.
- [10] 方学辉, 吴倩, 韩雪梅, 等. 熊果酸抗小鼠 H22 肝癌移植瘤及对免疫功能的影响 [J]. *肿瘤学杂志*, 2013, 19(3): 199-201.
- [11] 付伦, 朱敏, 李招云, 等. 熊果酸对肺癌细胞株 A549 及 SPCA1 细胞周期的抑制作用 [J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(5): 68-73.
- [12] 崔兵兵, 程丽芳, 侯立静, 等. 熊果酸抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞生长及凋亡的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 181-184.
- [13] 李爱霞, 赵玉林, 张军辉, 等. 熊果酸诱导人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞凋亡的作用 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2010, 17(9): 491-492.
- [14] 王忠良, 李旭良, 张德文, 等. Ezrin 在 UMR106 骨肉瘤细胞株移植瘤成瘤及肺转移中的作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(2): 156-159.
- [15] 于哲, 范清宇, 张婷. 大鼠骨肉瘤模型的建立 [J]. *动物医学进展*, 2005, 26(2): 58-60.
- [16] 张杰, 吴淑艳, 王琳, 等. 熊果酸对高脂饮食诱导胰岛素抵抗大鼠脂质代谢的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(5): 975-978.
- [17] 孙志杰, 黄静, 唐蔚琳, 等. 枸杞多糖联合氟尿嘧啶对荷瘤小鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. *中南药学*, 2013, 11(7): 517-520.
- [18] 关硕, 杨伟, 胡俊霞, 等. 西黄丸氯仿提取物对荷瘤大鼠免疫清除功能的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(2): 144-148.
- [19] Moore DD, Luu HH. Osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2014, 162: 65-92.
- [20] 官佳懿, 张永红, 崔德凤, 等. 绿原酸对小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖和分泌功能的影响 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(29): 27-31.
- [21] 吴慧丽, 李慧. 白芍总苷对溃疡性结肠炎大鼠细胞因子影响的研究 [J]. *中南药学*, 2010, 8(2): 128-131.
- [22] Wang Z, Wang G, Zhu X, et al. Interleukin-2 is upregulated in patients with a prolapsed lumbar intervertebral disc and modulates cell proliferation, apoptosis and extracellular matrix metabolism of human nucleus pulposus cells [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(6): 2437-2443.
- [23] Anquetil F, Clavel C, Offer G, et al. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies [J]. *J Immunol*, 2015, 194(8): 3664-3674.
- [24] Xie J, Qiu ZF, Han Y, et al. The correlation between HLA-DR or CD38 expression in CD8(+) T cells and CD4(+) T cells count in treatment-naive HIV/AIDS patients [J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2016, 55(1): 36-39.
- [25] Liu YL, Wu YB, Zhai K, et al. Determination of Interleukin 27-producing CD4 and CD8 T Cells for The Differentiation Between Tuberculous and Malignant Pleural Effusions [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19424-19428.

(收稿日期: 2016-10-22)

(本文编辑: 董历华)