

文章编号:1003-2754(2022)03-0260-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2022.0066

# 转录因子 Sox5 在多发硬化患者中表达的研究

傅增辉, 林再红, 金艳, 姜岩, 刘晶, 于绘丽, 张广萍

**摘要:** 目的 探讨转录因子 Sox5 在多发硬化(MS)患者血清及辅助性 T 细胞 17(Th17)中的表达及其意义。方法 收集急性发作期的复发-缓解型 MS 患者 20 例为 MS 组,健康志愿者 20 例为健康对照组。ELISA 法检测血清 Sox5 表达水平;流式细胞术分离外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞,体外培养并给予白细胞介素 6(IL-6)(25 ng/ml)刺激 7 d 诱导 Th17 细胞,ELISA 法检测培养基 Sox5 和 IL-17A 水平,流式细胞术检测并分离 Th17 细胞,RT-PCR 检测辅助性 T 细胞 17(Th17)Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达。结果 急性期 MS 患者血清中 Sox5 水平高于治疗后,且高于健康对照组,差异显著( $P < 0.05$ );健康对照者 CD4<sup>+</sup>T 细胞培养基给予 IL-6 刺激并不能增加 Sox5、IL-17A 和 Th17 细胞水平(均  $P > 0.05$ ),而在急性期 MS 患者中 Sox5、IL-17A 和 Th17 细胞水平显著增加(均  $P < 0.05$ );健康对照者 CD4<sup>+</sup>T 细胞培养基给予 IL-6 刺激并不能增加 Th17 细胞 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达(均  $P > 0.05$ ),而在急性期 MS 患者中 Th17 细胞 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达显著增加(均  $P < 0.05$ )。结论 转录因子 Sox5 在 MS 患者发病中具有重要作用,并与转录因子 ROR $\gamma$ t 和 Th17 细胞分化作用相关。

**关键词:** Sox5; 多发硬化; 辅助性 T 细胞 17; 白细胞介素 17A; 维甲酸相关核孤儿受体  $\gamma$ t

中图分类号:R744.5<sup>+</sup>1 文献标识码:A

**Expression of SOX5 in patients with multiple sclerosis** FU Zenghui, LIN Zaihong, JIN Yan, et al. (Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161002, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and significance of Sox5 in serum and helper T cell 17 (Th17) of patients with multiple sclerosis (MS). **Methods** 20 acute exacerbation MS patients were collected as MS group and 20 healthy volunteers as health control group. The expression of Sox5 in serum was detected by ELISA, the peripheral blood CD4<sup>+</sup>T cells were isolated by flow cytometry, the Th17 cells were cultured in vitro and stimulated by IL-6 (25 ng/ml) for 7 days, the Sox5 and IL-17A levels in medium were detected by ELISA, the Th17 cells were detected and isolated by flow cytometry, and the Sox5 and ROR $\gamma$ t mRNA expressions of Th17 were detected by RT-PCR. **Results** The level of Sox5 in serum of MS patients was higher than that of healthy controls, the difference was significant ( $P < 0.05$ ). The level of Sox5, IL-17A and Th17 cells in the CD4<sup>+</sup>T cell culture medium of the healthy control group did not increase ( $P > 0.05$ ), but the level of Sox5, IL-17A and Th17 cells in the MS patients significantly increased ( $P < 0.05$ ); the level of Sox5 and ROR $\gamma$ t in the CD4<sup>+</sup>T cell culture medium of the healthy control group did not increase ( $P < 0.05$ ). The expression of Sox5 and ROR $\gamma$ t mRNA in Th17 cells increased significantly in MS patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sox5 plays an important role in the pathogenesis of MS patients and is related to the differentiation of ROR $\gamma$ t and Th17 cells.

**Key words:** Sox5; Multiple sclerosis; Interleukin 17; Interleukin-17A; Retinoic acid-related orphanreceptoryt

多发硬化(multiple sclerosis, MS)是一种炎性脱髓鞘性神经疾病(inflammatory demyelinating diseases, IDD)。辅助性 T 细胞 17(helper T 17, Th17)产生白细胞介素 17A(interleukin-17A, IL-17A)并在 MS 等多种自身免疫性疾病中发挥致病作用<sup>[1,2]</sup>。活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞需要 IL-6 等细胞因子刺激发育成 Th17 细胞<sup>[3,4]</sup>。由于维甲酸相关核孤儿受体  $\gamma$ t(retinoic acid-related orphanreceptoryt, ROR $\gamma$ t)的过度表达诱导 Th17 细胞分化,而 ROR $\gamma$ t 缺陷型小鼠缺乏 Th17 细胞分化,ROR $\gamma$ t 被认为是 Th17 细胞的谱系特异性转录因子<sup>[5]</sup>。Th17 细胞中诱导 ROR $\gamma$ t 的潜在机制,已证明 IL-6 介导的 Stat3 激活起着核心作用<sup>[6]</sup>。Shigeru 等<sup>[7]</sup>报道,Sox5 通过作为 Stat3 下游靶标的 ROR $\gamma$ t 的诱导协同诱导 Th17 细胞分化。本研究组在前期的研究中发现,复发缓解型 MS 患者的急性加重期外周血 Th17 细胞 ROR $\gamma$ t 表达水

平高于缓解期,且缓解期高于健康对照者<sup>[8]</sup>。Hiramatsu 等对 IL-6 刺激的 CD4<sup>+</sup>T 细胞进行 DNA 芯片分析报道中,证实 IL-6-Stat3 途径的下游靶点的转录因子参与 Th17 细胞分化<sup>[9]</sup>。Sox5 在系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等自身免疫性疾病的发生中扮演重要角色,Riveros 等<sup>[10]</sup>报道,Sox5 是 MS 患者全血中最显著上调的转录因子之一。本研究拟探讨 MS 患者外周血 Sox5 表达水平,分离并培养外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞,采用 IL-6 刺激 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化为 Th17 细

收稿日期:2021-11-05;修订日期:2022-02-10

基金项目:齐齐哈尔医学科学院基金项目(QMSI2019M-24)

作者单位:(齐齐哈尔医学院附属第三医院神经内科,黑龙江 齐齐哈尔 161002)

通讯作者:傅增辉,E-mail:fzh92@foxmail.com

胞,检测 Sox5 和 ROR $\gamma$ t 等因子水平,现报道如下。

## 1 资料和方法

1.1 研究对象 收集齐齐哈尔医学院附属第三医院神经内科门诊和病房 2015 年 1 月至 2018 年 12 月确诊的急性发作期的复发-缓解型 MS 汉族患者 20 例作为研究对象。纳入要求:符合《多发性硬化诊断和治疗中国专家共识》<sup>[11]</sup> 诊断标准和 McDonald 诊断标准<sup>[12]</sup>。需排除项目:①肝炎病毒感染;②滥用酒精;③合并其他免疫相关疾病,如系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、肿瘤等患者。所有 MS 患者进行扩展残疾状况评分量表(expanded disability status scale, EDSS)评分。选取本院体检中心、实习学生等与病例组在性别、年龄相匹配的人为健康对照者。整个研究经医院伦理委员会的批准通过,均符合赫尔辛基宣言<sup>[13]</sup>要求,并得到所有研究对象知情同意。

1.2 标本采集 急性发作期 MS 入院后均给予甲泼尼龙 1000 mg/d, 3 d 后减至 500 mg, 每 3 d 减一半减至 40 mg 时改为口服,每周减 4 mg 至结束,及营养神经(如甲钴胺等)等治疗。采集 MS 患者治疗前、治疗 4 w 后及组健康对照者清晨空腹采肘静脉血 10 ml, 各 5 ml 分别加入无抗凝剂干燥管和 EDTA-K2 抗凝管,用于后续检测用。

1.3 血清 Sox5 水平测定 ELISA 检测试剂盒购于 BD 公司,检测 IL-17 水平,严格说明书操作,每个样本和标准品均设 3 个复孔。

1.4 外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞分离培养及培养基 IL-17A 检测 所有研究对象血样进行单核细胞的分离,以密度梯度离心法进行。流式细胞术分选研究对象外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群,重悬于细胞培养基并计数,按照合适比例接种于 96 孔板内,按照如下分组体外刺激培养 7 d:组 1 为健康人 CD4<sup>+</sup>T 细胞不给予刺激的空白组,除培养基外不增加任何其他成分;组 2 为健康人 CD4<sup>+</sup>T 细胞给予 IL-6 刺激组,培养基加入前炎症因子 IL-6(25 ng/ml);组 3 为 MS 患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞不给予刺激的空白组,除培养基外不增加任何其他成分;组 4 为 MS 患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞给予 IL-6 刺激组,培养基加入前炎症因子 IL-6(25 ng/ml)。ELISA 试剂盒购于 BD 公司,检测孔中细胞培养上清中 Sox5 和 IL-17A 水平,具体操作方法按照试剂盒说明书进行操作,每个样本和标准品均设 3 个复孔。

1.5 培养 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Th17 细胞水平测定及分离 根据 Th17 的表面标记进行染色,完成 PE-标记 CD4 抗体和 FITC-标记 IL-17A 抗体胞内染色,4 °C 孵育 30 min, PBS 重悬,300 r/min 离心 5 min 后去上清,再次加入 50  $\mu$ l PBS 重悬,转移入流式管

内,行流式细胞分析。

1.6 Th17 细胞 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达水平测定 按 TRIzol 试剂说明书分别提取总 RNA,采用 RNA 纯化试剂盒纯化总 RNA。进一步使用 Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计对总 RNA 进行定量和质量分析。反转录试剂盒将 RNA 行逆转录反应为 cDNA,取 2  $\mu$ l RNA 进行 PCR 扩增。 $\beta$ -actin 内参引物序列:Upstream:5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'; Downstream:5'-AGGGACTTCCTGTAA-CAATGCA-3'; Sox5 引物序列:Upstream:5'-CAGC-CAGAGTTAGCACAATAGG-3'; Downstream:5'-CTGTTGTTCCCGTCCGAGTT-3'; ROR $\gamma$ t 引物序列:Upstream:5'-GGCTCCCTGGATGAATAGAATG-3'; Downstream:5'-AGGCAGAGCCAGAAAATGTAAAG-3'。扩增条件:95 °C 预变性 2 min, 1 个循环;95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环;72 °C 总延伸 6 min。所有样品做 3 个复孔,分析待测标本的扩增溶解曲线,均为单峰,无非特异性扩增。根据待测标本的 Ct 值,引物序按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  相对定量计算公式计算各样品的目的基因相对定量结果,分析目的基因 mRNA 转录水平差异。

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件进行分析数据,计数资料采用  $\chi^2$  检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用单因素方差分析,指标间的相关性分析采用 Pearson 相关分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组一般资料比较 健康对照 20 例(男 6 例,女 14 例),平均年龄(38.20  $\pm$  11.47)岁;MS 组 20 例(男 6 例,女 14 例),平均年龄为(38.20  $\pm$  11.47)岁。对照组和 MS 组的年龄和性别相比差异均无统计学意义(见表 1)。

2.2 Sox5 在 MS 患者血清中的表达水平及与临床相关性分析 ELISA 结果显示,20 例 MS 患者急性期[(14.32  $\pm$  1.56) ng/ml]外周血血清中 Sox5 水平高于治疗后[(9.37  $\pm$  2.10) ng/ml, ( $t = 3.519$ ,  $P < 0.001$ )],且高于 20 例健康对照组[(3.02  $\pm$  0.75) ng/ml, ( $t = 8.343$ ,  $P < 0.001$ )],差异有统计学意义。Pearson 相关系数分析显示,MS 患者急性期 Sox5 与 EDSS( $r = 0.203$ ,  $P = 0.185$ )、年龄( $r = 0.130$ ,  $P = 0.602$ )评分之间不存在相关性。

2.3 CD4<sup>+</sup>T 细胞培养 Sox5、IL-17A 和 Th17 细胞水平 对培养基中 Sox5 和 IL-17A 进行 ELISA 检测、Th17 细胞比例行流式细胞术检测,活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞需要用 IL-6 刺激发育成 Th17 细胞,结果显示,健康对照者 CD4<sup>+</sup>T 细胞培养基给予 IL-6 刺激

并不能增加 Sox5、IL-17A 和 Th17 细胞比例水平;急性期 MS 患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养基给予 IL-6 刺激可以显著增加 Sox5、IL-17A 和 Th17 细胞比例水平(见图 1、表 2)。

2.4 Th17 细胞 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达水平 流式细胞术分选培养基中 Th17 细胞,后 RT-PCR 法测定 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达水平,结果显示,健康对照者 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养基给予 IL-6 刺激并不能增加 Th17 细胞 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达水平,而急性期 MS 患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养基给予 IL-6 刺激能够增加 Th17 细胞 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达水平(见表 3)。

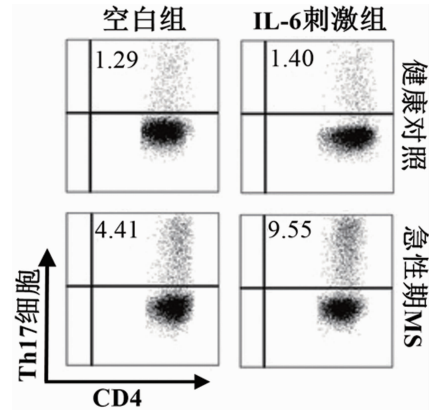


图1 CD4 细胞中 Th17 细胞流式细胞图

表 1 两组一般资料比较

组别	n	年龄(岁)	男性	女性	治疗前 EDSS 评分	治疗后 EDSS 评分	发病年龄(岁)
健康对照组	20	36.37 ± 7.63	6(30%)	14(70%)	-	-	-
MS 组	20	35.85 ± 6.77	6(30%)	14(70%)	3.95 ± 1.28	2.27 ± 0.89	30.46 ± 8.05
检验值		2.456 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>			
P 值		0.8342	1	1			

a:t 值,b:χ<sup>2</sup> 值

表 2 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养 Sox5、IL-17A 和 Th17 细胞水平

项目	健康对照组				急性期 MS 组			
	空白组	IL-6 刺激组	t 值	P 值	空白组	IL-6 刺激组	t 值	P 值
Sox5 (ng/ml)	1.76 ± 0.34	1.82 ± 0.32	1.021	0.934	8.61 ± 0.93	21.61 ± 3.19	7.015	<0.001
IL-17A (ng/ml)	50.17 ± 8.71	52.06 ± 7.15	1.281	0.910	85.77 ± 10.46	145.50 ± 17.25	7.241	<0.001
Th17 细胞 (%)	1.29 ± 0.25	1.40 ± 0.20	2.175	0.873	4.41 ± 0.73	9.55 ± 0.82	6.943	<0.001

表 3 体外培养 Th17 细胞 Sox5 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达水平

项目	健康对照组				急性期 MS 组			
	空白组	IL-6 刺激组	t 值	P 值	空白组	IL-6 刺激组	t 值	P 值
Sox5	0.87 ± 0.14	0.90 ± 0.16	2.316	0.530	1.541 ± 0.28	3.10 ± 0.41	5.505	<0.001
ROR $\gamma$ t	0.71 ± 0.15	0.76 ± 0.14	1.817	0.173	1.20 ± 0.21	2.08 ± 0.30	4.633	0.001

### 3 讨论

Sox5 是转录因子 SOX 家族成员,属于 SoxD 组,由 Sox5、Sox6 和 Sox13 组成<sup>[14]</sup>。Sox5 具有三个功能域,一个 HMG 盒 DNA 结合域和两个卷曲螺旋域,第一个卷曲螺旋域介导 SoxD 蛋白的同型和异型二聚化。SoxD 蛋白本身不具有反式结构域,因此其活性可能会受到与其相互作用的其他分子的影响。缺乏 Sox5 的小鼠出生后通常存活困难死于神经发育异常<sup>[15]</sup>,Sox5 在精子细胞、神经元和少突胶质细胞等呈现高表达。尽管许多研究表明 Sox 家族蛋白在发

育过程中的作用<sup>[14]</sup>,但只有少数 Sox 家族蛋白在 T 细胞发育和分化中的发挥作用。Shigeru 等<sup>[7]</sup>报道,Sox5 在 Th17 细胞中表达,并与 c-Maf 一起在 Th17 细胞分化过程中诱导 ROR $\gamma$ t 表达。关于 Sox5 与自身免疫性疾病之间的关系,Riveros 等<sup>[10]</sup>报道,Sox5 是多发性硬化症患者全血中最显著上调的转录因子之一。此外,对 IL-6 刺激的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 DNA 芯片分析表明,在 IL-6 刺激后,Sox5 是 CD4<sup>+</sup> T 细胞中诱导最显著的转录因子。Lefebvre 等<sup>[14]</sup>报道,在 CD4<sup>+</sup> T 细胞中诱导 IL-17A 产生需要 Sox5 的一个卷

曲螺旋结构域,该卷曲螺旋结构域显示出介导 Sox 蛋白的同二聚化和异二聚化。Melichar 等<sup>[16]</sup>关于 SoxD 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的结合伴侣的研究报道中,部分 SoxD 家族成员 Sox13 和 Sox6 在 mRNA 水平未在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中高表达, Sox5 是 CD4<sup>+</sup> 细胞表达的 SoxD 家族中唯一的参与 T 细胞分化的因子,并通过诱导 ROR $\gamma$ t 表达参与 Th17 细胞分化。

Durant 等<sup>[17]</sup>在 EAE 小鼠模型的研究报道中, Sox5 对于 Th17 分化过程中 ROR $\gamma$ t 的表达至关重要。Lazarevic 等<sup>[18]</sup>在体外细胞学研究报道中, Sox5 的高表达均可诱导 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th17 细胞分化;在敲除 ROR $\gamma$ t 基因的 CD4<sup>+</sup>T 细胞中, Sox5 的高表达不能诱导 Th17 细胞分化;并且, Sox5 的高表达诱导 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 ROR $\gamma$ t 的表达可能通过结合其调控元件发挥作用。Sox5 作为 Th17 细胞分化过程中 Stat3 信号的下游效应子和 ROR $\gamma$ t 表达的上游激活物之一参与 IL-17A 的产生,并独立于其他 Th17 细胞相关分子<sup>[19,20]</sup>。在本研究中,对 MS 患者外周血清 Sox5 蛋白水平进行检测,发现其在 MS 患者表达水平增高,那么, Sox5 是否在 Th17 细胞介导的多发性硬化的免疫应答的发展中起关键作用,并且 Sox5 可能通过诱导 ROR $\gamma$ t 表达在 Th17 细胞分化中扮演重要角色。本研究对健康者 PBMC 中的 CD4<sup>+</sup>T 细胞进行培养,给予 IL-6 刺激并未发现 Th17 细胞水平、IL-17A、Sox5 和 ROR $\gamma$ t 表达的变化;但在 MS 患者 PBMC 中的 CD4<sup>+</sup>T 细胞进行培养,活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞需要用 IL-6 刺激发育成 Th17 细胞,给予 IL-6 刺激组的 MS 患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞后,其 Th17 细胞水平、IL-17A、Sox5 和 ROR $\gamma$ t 表达增高, Sox5 与 MS 发病相关,推测高表达的 Sox5 可能通过介导 ROR $\gamma$ t 干预 Th17 细胞分化影响 IL-17A 表达,促进 MS 免疫反应。但 Sox5 的具体作用机制尚需进一步分子生物学研究,进一步研究 Sox5 在 MS 发病的作用可能为其临床治疗提供新的靶点,并为临床的早期诊断提供可能的外周血标志物。

#### [参考文献]

- [1] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(5):337-348.
- [2] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6):845-858.
- [3] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. *Nature*, 2006, 441(7090):235-238.
- [4] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage[J]. *Nature*, 2006, 441(7090):231-234.
- [5] Ciofani M, Madar A, Galan C, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification[J]. *Cell*, 2012, 151(2):289-303.
- [6] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation[J]. *Immunity*, 2007, 26(3):371-381.
- [7] Shigeru T, Akira S, Taro I, et al. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR $\gamma$ t induction as downstream targets of Stat3[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(9):1857-1874.
- [8] 傅增辉, 姜岩, 刘晶, 等. 多发性硬化患者 Th17 转录因子及相关细胞因子表达的研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2018, 44(4):226-229.
- [9] Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D, et al. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4<sup>+</sup>T cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(4):703-712.
- [10] Riveros C, Mellor D, Gandhi KS, et al. A transcription factor map as revealed by a genome-wide gene expression analysis of whole-blood mRNA transcriptome in multiple sclerosis[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e14176.
- [11] 中华医学会神经病学分会神经免疫学组, 中国免疫学会神经免疫分会. 多发性硬化诊断和治疗中国专家共识(2014版)[J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(5):362-367.
- [12] Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0141214.
- [13] World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects[J]. *JAMA*, 2013, 310(20):2191-2194.
- [14] Lefebvre V. The SoxD transcription factors-Sox5, Sox6, and Sox13-are key cell fate modulators[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(3):429-432.
- [15] Smits P, Li P, Mandel J, et al. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation[J]. *Dev Cell*, 2001, 1(2):277-290.
- [16] Melichar HJ, Narayan K, Der SD, et al. Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13[J]. *Science*, 2007, 315(5809):230-233.
- [17] Durant L, Watford WT, Ramos HL, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis[J]. *Immunity*, 2010, 32(5):605-615.
- [18] Lazarevic V, Chen X, Shim JH, et al. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$ t[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(1):96-104.
- [19] Zhu H, Yang J, Murphy TL, et al. Unexpected characteristics of the IFN-gamma reporters in nontransformed T cells[J]. *J Immunol*, 2001, 167(2):855-865.
- [20] Wichner K, Stauss D, Kampfrath B, et al. Dysregulated development of IL-17- and IL-21-expressing follicular helper T cells and increased germinal center formation in the absence of ROR $\gamma$ t[J]. *FASEB J*, 2016, 30(2):761-774.