

# 小鼠 T-bet 逆转录病毒载体的构建与功能验证

张雪洁<sup>1,2</sup>, 张建华<sup>1</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 郭洁<sup>1</sup>, 周旭宇<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039

张雪洁, 张建华, 张伟, 等. 小鼠 T-bet 逆转录病毒载体的构建与功能验证. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1586–1593.

Zhang XJ, Zhang JH, Zhang W, et al. Construction and characterization of a novel recombinant retroviral vector expressing mouse T-bet. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1586–1593.

**摘要:** 为在小鼠细胞中表达并研究 T-bet 功能, 首先构建了含有报告基因 *Thy1.1* 的小鼠 T-bet 逆转录病毒载体, 并将构建的载体质粒转染病毒包装细胞系包装成重组病毒, 再利用重组病毒分别感染 NIH-3T3 和 D9 细胞系检测其感染能力。之后, 使用该重组病毒感染 T-bet 敲除小鼠的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞, 流式细胞术检测 T-bet 及其下游靶基因 *Ifng* 的表达情况。经验证, 重组的逆转录病毒感染 T-bet 敲除小鼠 T 淋巴细胞后可以在细胞中表达 T-bet, 并进一步引起下游靶基因 *Ifng* 的表达上调, 证明本研究中外源表达的转录因子 T-bet 具有正常功能。综上所述, 本实验成功构建了含有报告基因的小鼠 T-bet 重组逆转录病毒载体, 为进一步在小鼠细胞中研究 T-bet 功能奠定了基础。

**关键词:** T-bet, 逆转录病毒,  $\gamma$  干扰素

## Construction and characterization of a novel recombinant retroviral vector expressing mouse T-bet

Xuejie Zhang<sup>1,2</sup>, Jianhua Zhang<sup>1</sup>, Wei Zhang<sup>1</sup>, Jie Guo<sup>1</sup>, and Xuyu Zhou<sup>1</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

**Abstract:** In order to study T-bet function in mouse cells, a novel retroviral vector expressing mouse T-bet and reporter

**Received:** December 18, 2013; **Accepted:** February 26, 2014

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB917102).

**Corresponding author:** Xuyu Zhou. Tel: +86-10-64806108; E-mail: zhoxuy@im.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB917102) 资助。

网络出版时间: 2014-03-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130644.html>

gene *Thy1.1* was constructed. Retrovirus particles were then produced by transfection of the recombinant retroviral plasmid into a packaging cell line Platinum-E. The recombinant retrovirus played considerable infection ability. T-bet expression was then identified by FACS after infection of CD4<sup>+</sup> primary T cells from T-bet knockout mouse with recombinant retrovirus. To determine if exogenous expressing T-bet has normal function, we checked the expression level of T-bet target gene, *Ifn $\gamma$* . IFN- $\gamma$  expression was upregulated in the T-bet knockout T cells infected with recombinant retrovirus. In conclusion, we successfully constructed an effective mouse T-bet recombinant retroviral vector.

**Keywords:** T-bet, recombinant retrovirus, IFN- $\gamma$

T-bet 是 T-box 基因家族的转录因子, 于 2000 年被研究者发现, 早期被认为只表达于 T 细胞内<sup>[1]</sup>。近年的研究发现, T-bet 还广泛表达于天然免疫系统及适应性免疫系统中的多种细胞之中。T-bet 含 530 个氨基酸, 包括一个由 189 个氨基酸组成的能与 T 盒 DNA 结合的结构域, 其功能十分广泛而复杂。在适应性免疫应答中, T-bet 对 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群的分化以及 CD8<sup>+</sup> T 细胞的功能维持均起重要作用。T-bet 发挥功能的分子机制至今仍待进一步研究。

为研究 T-bet 的功能及其分子机制, 本实验构建了含有小鼠 T-bet 基因 *Tbx21* 的逆转录病毒载体。该载体上含有 *Thy1.1* 报告基因, 可与 T-bet 共同转录表达。Thy1.1 表达于细胞表面, 因此可以通过检测 Thy1.1 的表达方便地鉴定出表达 T-bet 的细胞。此外, 本实验还进一步证明了包装的病毒可以感染小鼠 T 细胞, 并且外源表达 T-bet 后, 可进一步激活 T-bet 的靶基因 *Ifn $\gamma$* <sup>[2]</sup>, 从而引起  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 的表达。该方法可证明构建的载体具有表达功能正常的小鼠 T-bet 的能力。通过构建该载体, 为在小鼠来源的细胞中进一步研究 T-bet 的功能与作用机制奠定了良好基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物、细胞株、载体及测序

实验所用 *Tbx21* 基因敲除小鼠购于 Taconic

公司; Platinum-E 逆转录病毒包装细胞株为本实验室保存; T-bet 表达载体为本实验室保存; pGEM-T 载体购于 Promega 公司; pMSCV-IRES-Thy1.1 载体购于 Addgene; 感受态 DH5 $\alpha$  为本实验室自制; 测序工作由 Invitrogen 公司完成。

### 1.2 试剂与仪器

内切酶、连接酶及 PCR 相关酶购于 TaKaRa 公司; Eugene 6 转染试剂为 Promega 公司产品; Anti-CD8 $\alpha$ 、Anti-CD3、Anti-CD28 为 BioLegend 公司产品; 流式抗体 Anti-CD4-APC、Anti-CD8 $\alpha$ -PerCP、Anti-Thy1.1-FITC、Anti-IFN- $\gamma$ -PE 为 eBioscience 公司产品; 使用仪器主要为流式细胞仪 BD FACSCalibur, 购于 BD 公司。

### 1.3 含有酶切位点的 T-bet 基因的克隆和连接

以 T-bet-GFP 表达质粒为模板, 从 *Tbx21* cDNA 上游设计上游引物, 引物 5'端加入 *Sal* I 内切酶酶切位点, 从 *Tbx21* 基因下游设计下游引物, 3'端加入 *Bgl* II 内切酶酶切位点, 扩增出带有酶切位点及 Kozak 序列的 *Tbx21* 基因。胶回收后与 pGEM-T 载体连接, 连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$ , 用蓝白斑筛选的方法初步筛选重组子。初步筛选阳性的重组子使用 PCR 及 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶切两种方法进行鉴定, 对两种方法鉴定均为阳性的重组子进行测序。

#### 1.4 pMSCV 逆转录病毒载体的构建

将上一步得到的经测序带有 *Tbx21* 基因的 T 载体使用 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶切, 胶回收 1.6 kb 片段。同时, pMSCV-IRES-Thy1.1 载体亦使用 *Sal* I 和 *Bgl* II 进行酶切, 酶切后同样进行胶回收。*Sal* I 和 *Bgl* II 酶切位点均位于载体启动子后及 IRES 序列之前, 可使插入序列与报告基因同时表达。将酶切回收后的 *Tbx21* 片段与载体连接, 连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$ 。抗性筛选阳性克隆同样使用 PCR 与 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶切两种方法进行鉴定。

#### 1.5 质粒的转染和逆转录病毒的包装

提取所构建的 pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 质粒以及 pMSCV-IRES-Thy1.1 质粒, 使用转染试剂 Fugene 6 转染 Platinum-E 逆转录病毒包装细胞系, 转染后孵育 48 h 收集上清液, 即为病毒悬液。使用 Thy1.1 荧光抗体对细胞进行染色, 流式细胞术检测质粒转染效率。

#### 1.6 逆转录病毒感染细胞系

使用上述病毒悬液分别感染贴壁细胞系 NIH-3T3 和悬浮小鼠杂交瘤细胞系 D9, 48 h 后使用 Thy1.1 荧光抗体染色, 流式细胞术检测感染效率。

#### 1.7 逆转录病毒感染活化 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞

磁珠负选出 CD4 细胞, 置于提前用 CD3、CD28 抗体包被好的 24 孔板中, 加入 200 U/mL 的重组人 IL-2, 培养 48 h 后可供感染。

病毒悬液中加入终浓度为 8  $\mu$ g/mL 的聚凝胺, 使用该病毒混合液重悬 T 细胞后室温条件下 1 800 r/min 离心 45 min 进行感染, 而后置于培养箱孵育 4 h, 将病毒液更换为加有重组人 IL-2 的培养基, 培养 48 h。

#### 1.8 逆转录病毒感染 T 细胞后 T-bet 表达检测和鉴定

感染 48 h 后, T 细胞先进行表面染色, 固定后加入破膜剂破膜, 然后使用 T-bet 和 IFN- $\gamma$  荧光抗体进行胞内染色, 染色完成后使用流式细胞术检测感染效率以及 T-bet 和 IFN- $\gamma$  的表达情况。

## 2 结果

### 2.1 pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 载体的构建

#### 2.1.1 pGEM-T-Tbet 载体的鉴定

将蓝白斑筛选出再经 PCR 鉴定正确的重组基因克隆, 使用 *Sal* I 和 *Bgl* II 进行酶切鉴定, 其图谱与原设计相同, 包含 1.6 kb 的目的基因条带及 3 kb 的载体条带。对重组基因进行序列测定, 使用 M13 与 T7 引物分别从插入位点两端进行测序, 并设计引物从 *Tbx21* 基因 700 kb 处进行测序, 测序结果进行拼接后, 与小鼠 Tbet 基因吻合, 结果正确 (图 1A)。

#### 2.1.2 pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 载体的鉴定

将 PCR 鉴定正确的克隆经 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定, 与原设计图谱相同, 包含 1.6 kb 的目的基因条带及 6 kb 的载体条带 (图 1B、C)。

### 2.2 逆转录病毒的包装

使用构建的 pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 逆转录病毒载体转染逆转录病毒包装细胞系 Platinum-E, 并对细胞进行报告基因 Thy1.1 的荧光抗体染色, 从而利用流式细胞术检测转染效率。结果显示报告基因 Thy1.1 表达率超过 80% (图为 84.4%), 表明所构建载体可以高效转染包装细胞, 并可同时转录表达目的基因及其报告基因, 从而进行高效的重组逆转录病毒的包装 (图 2)。

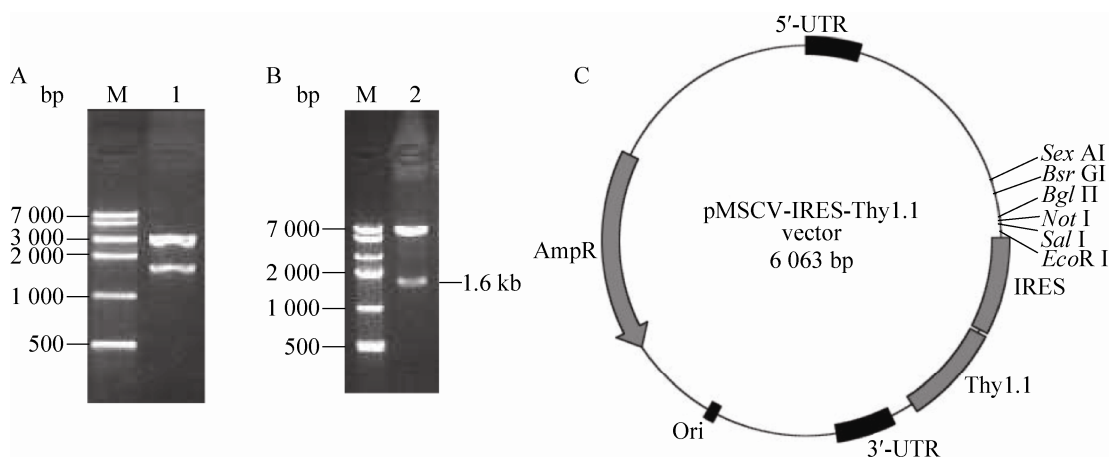


图 1 pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 逆转录病毒载体的鉴定

Fig. 1 Identification of pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 retroviral vector. (A) M: Tiangen<sup>TM</sup> DNA marker IV; 1: pGEM-T-Tbet digested with *Sal* I and *Bgl* II. (B) M: Tiangen<sup>TM</sup> DNA marker IV; 2: pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 digested with *Sal* I and *Bgl* II. (C) Map of pMSCV-IRES-Thy1.1 vector.

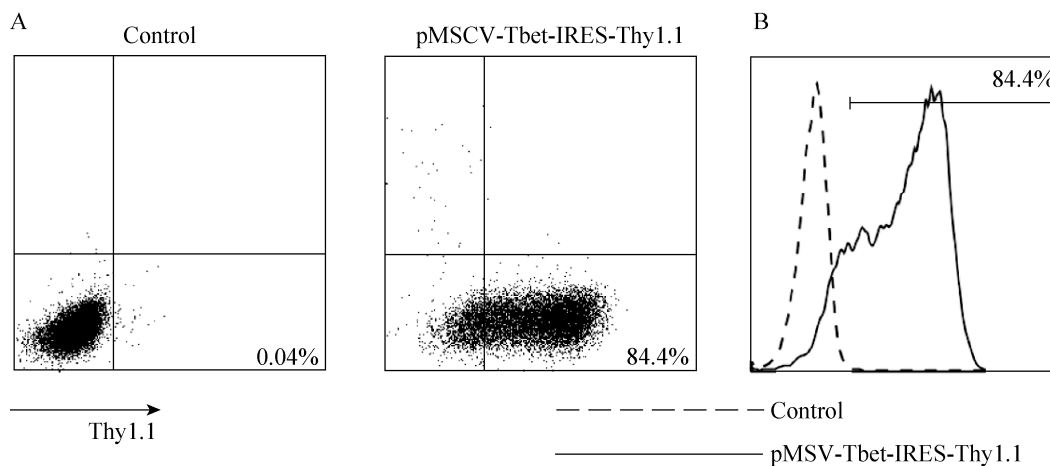


图 2 pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 转染包装细胞系 Platinum-E 的效率

Fig. 2 Transfection efficiency of pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 transfected into Platinum-E. (A) Flow cytometry of untransfected Platinum-E cells (left) and cells transfected with pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 recombinant retroviral vector (right). (B) Histogram overlay of untransfected Platinum-E cells (dotted line) and cells transfected with pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 recombinant retroviral vector (solid line).

### 2.3 逆转录病毒感染细胞系

使用重组病毒感染 NIH-3T3 及悬浮杂交瘤细胞 D9, 以检测重组逆转录病毒的感染能力, 对感染后细胞进行报告基因 Thy1.1 的荧光抗体

染色, 并利用流式细胞术检测转染效率。结果显示所包装的重组病毒可以成功感染贴壁细胞系及悬浮细胞系, 并具有较好的感染效率。两种细胞系的感染效率分别为 57.2% 和 58.3%

(图 3A、B)。

## 2.4 逆转录病毒感染活化的 $CD4^+$ T 细胞及其 T-bet 表达情况检测

使用包装的 T-bet 重组逆转录病毒及空重组病毒分别感染活化的 T-bet 敲除的  $CD4^+$  T 细胞，

对 T 细胞进行报告基因 Thy1.1 和 T-bet 的荧光抗体染色并使用流式细胞术检测。结果发现，T-bet 重组逆转录病毒感染的细胞，Thy1.1 阳性细胞中的 T-bet 表达明显上升，证明包装载体能够有效地转录及表达目的基因和报告基因 (图 4)。

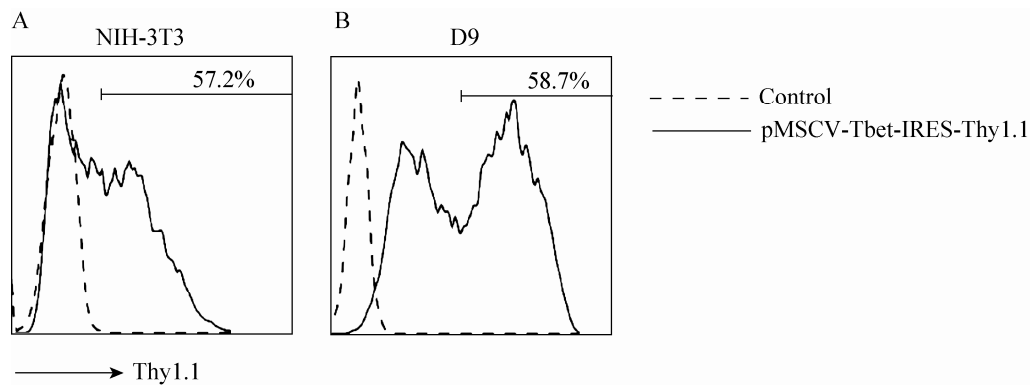


图 3 重组逆转录病毒感染 NIH-3T3 及 D9 细胞系的效率检测

Fig. 3 Infection efficiency of NIH-3T3 and D9 cell lines with recombinant retrovirus. (A) Flow cytometry histogram overlay of uninfected NIH-3T3 cells (dotted line) and NIH-3T3 cells infected with pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 recombinant retrovirus (solid line). (B) Flow cytometry histogram overlay of uninfected D9 cells (dotted line) and D9 cells infected with pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 recombinant retrovirus (solid line).

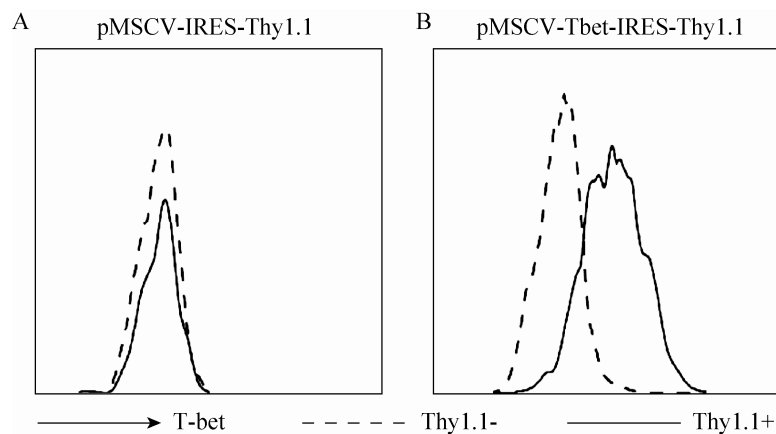


图 4 被重组逆转录病毒感染的 T-bet 敲除  $CD4^+$  T 细胞可表达 T-bet

Fig. 4 Expression of T-bet in T-bet knock out  $CD4^+$  T cells after infection of recombinant retrovirus. Flow cytometry histogram overlay of Thy1.1 negative T cells (dotted line) and Thy1.1 positive T cells (solid line). (A): T-bet knock out  $CD4^+$  T cell infected with pMSCV-IRES-Thy1.1 recombinant retrovirus. (B): T-bet knock out  $CD4^+$  T cell infected with pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 recombinant retrovirus.

## 2.5 逆转录病毒载体所表达 T-bet 的功能鉴定

对感染后的 T-bet 敲除的  $CD4^+$  T 细胞进行胞内 IFN- $\gamma$  荧光抗体染色, 使用流式细胞术检测。结果显示, 被 T-bet 重组病毒感染后的细胞, Thy1.1 阳性细胞 IFN- $\gamma$  的表达水平增强, 高于未被感染的 Thy1.1 阴性细胞和被不含 T-bet 的空重组病毒感染的细胞, 表明所构建的逆转录病毒表达的 T-bet 可在小鼠细胞内发挥自身转录因子功能, 从而调控其下游靶基因的表达 (图 5A、B)。

## 3 讨论

T-bet 作为免疫系统中重要的转录因子, 其功能多样。早期研究发现 T-bet 在 naive T 细胞向 Th1 方向分化时具有重要的作用<sup>[1,3]</sup>。Th1 细胞又称为炎症性 T 细胞, 主要分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等细胞因子, 在抗胞内病原体 (病毒、细菌) 的感染中发挥重要作用, 并与细胞毒和局

部炎症有关的免疫应答相关。随着对 T-bet 研究的不断深入, 研究人员发现 T-bet 亦广泛的在其他一些 T 细胞亚群中, 以复杂的机制发挥着多种调控功能<sup>[4-5]</sup>, 并对  $CD4^+$  T 细胞亚群的分化<sup>[6]</sup>以及  $CD8^+$  T 细胞的功能维持<sup>[7]</sup>均起重要作用。如 T-bet 可以促进 naive T 细胞向 Th1 细胞分化<sup>[8]</sup>, 并抑制其向 Th2<sup>[9]</sup>、Th17<sup>[10]</sup>等其他亚群的分化过程; 同时, 也可以通过与转录因子 Bcl-6 的相互作用<sup>[11]</sup>而抑制 naive T 向 Tfh 细胞的分化过程<sup>[12]</sup>。T-bet 同样也可在调节性 T 细胞中表达, 并对免疫反应产生相应的调节作用<sup>[13]</sup>。此外, T-bet 对  $CD8^+$  T 细胞发挥免疫效应也起着重要作用<sup>[14]</sup>。近年的研究还发现, T-bet 还表达于天然免疫系统及适应性免疫系统中的多种细胞之中, 如 T-bet 在自然杀伤性细胞<sup>[15-17]</sup>以及天然淋巴样细胞(ILCs)的形成中起着决定性作用<sup>[18-22]</sup>。因此, 作为天然免疫与适应性免疫的纽带<sup>[23]</sup>, T-bet 再次成为研究的热点。

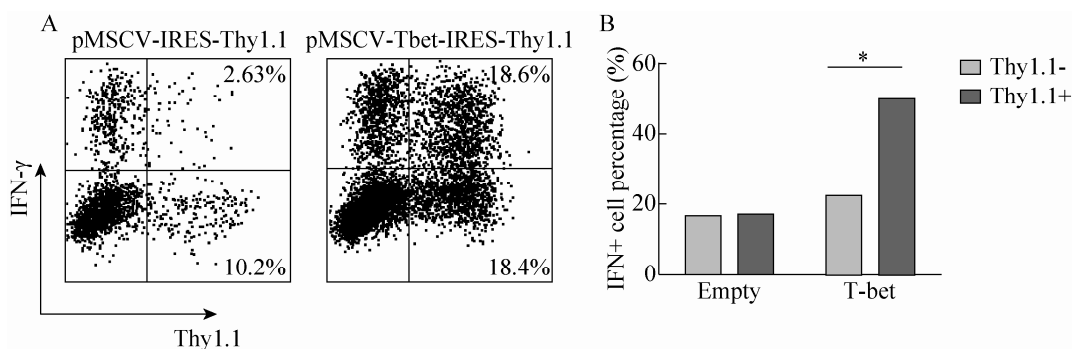


图 5 被重组逆转录病毒感染后, T-bet 敲除  $CD4^+$  T 细胞的 IFN- $\gamma$  表达量显著上调

Fig. 5 Upregulation of IFN- $\gamma$  expression in T-bet knockout  $CD4^+$  T cell after infection of recombinant retrovirus. (A) Flow cytometry of T-bet knock out  $CD4^+$  T cells infected with empty recombinant retrovirus (left) and pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 recombinant retrovirus (right), respectively. (B) Proportion of IFN- $\gamma$  positive cells among  $CD4^+$  T cells. Empty: T-bet knock out  $CD4^+$  T cells infected with empty recombinant retrovirus; T-bet: T-bet knock out  $CD4^+$  T cells infected with pMSCV-Tbet-IRES-Thy1.1 recombinant retrovirus; \* $P=0.0338$  compared with Thy1.1 negative group.

在临床研究中,对 T-bet 的研究同样受到重视。目前, T-bet 已被证明与病原体导致的炎症反应、哮喘、I 型糖尿病、克罗恩氏病以及其他一些自身免疫性疾病等均有重要联系<sup>[24]</sup>。对 T-bet 功能及其分子机制的研究可为相关研究提供理论指导,具有重要的意义。

在以往对 T-bet 的研究中,国内研究者先后构建了 T-bet 的真核表达载体<sup>[25]</sup>以及腺病毒载体<sup>[26]</sup>,但真核表达载体无法直接转染动物细胞,腺病毒载体包装体系较为复杂且重组效率较低,因此,构建比较简单的逆转录病毒表达载体不失为良好的解决办法。

本研究通过构建 T-bet 逆转录病毒载体,可以在各种可增殖细胞中表达 T-bet,解决了原代细胞或其他一些特殊细胞系不易转染的问题。同时,由于 T-bet 的流式染色效果并不十分理想,而我们构建的载体目的基因后含有 IRES-Thy1.1 序列,可以在表达 T-bet 的同时表达报告基因 Thy1.1,通过检测细胞表面的 Thy1.1 表达情况即可方便地鉴定出外源性 T-bet 表达阳性的细胞。

此外,载体构建通常都会使用免疫印迹技术或者流式细胞术直接检测目的蛋白的方法在细胞系中进行表达验证,但这种方法有一定的缺陷。首先,载体蛋白表达可能受到细胞种类的限制。其次,抗体结合是基于所表达蛋白的特定结构域,这种验证方法只能证明表达蛋白具有可被抗体结合结构域,并无法鉴定其功能是否正常。尤其是在涉及到突变体载体构建时,可能会出现突变体只影响抗体结合结构域而并不影响特定功能的情况,反之,也可能存在突变体影响了蛋白功能但并不影响抗体结合结构域的情况。因此,在可以体现表达蛋白功能的

原代细胞中对其相关功能进行检测,能更好地判断目的蛋白的表达与功能情况。本研究中,我们采用了一种新方法对构建载体表达 T-bet 的功能进行了鉴定,可准确显示表达的目的基因 T-bet 是否具有正常功能。采用本实验方法与免疫印迹法或者流式细胞术直接检测目的蛋白的方法共同验证载体,可以更好地对载体的蛋白表达情况进行确认。

综上,本实验构建了带有报告基因的 T-bet 重组逆转录病毒载体,并使用两种方法验证了所构建的载体的目的基因表达情况。该载体可以方便地在各种细胞中表达小鼠 T-bet,为进一步研究 T-bet 发挥功能的分子机制奠定了良好的实验基础。

## REFERENCES

- [1] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 2000, 100(6): 655–669.
- [2] Lee DU, Avni O, Chen L, et al. A distal enhancer in the interferon- $\gamma$  locus revealed by genome sequence comparison. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 4802–4810.
- [3] Oestreich KJ, Weinmann AS. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(2): 191–195.
- [4] Miller SA, Weinmann AS. Molecular mechanisms by which T-bet regulates T-helper cell commitment. *Immunol Rev*, 2010, 238: 233–246.
- [5] Lewis MD, Miller SA, Miazgowiec MM, et al. T-bet's ability to regulate individual target genes requires the conserved T-box domain to recruit histone methyltransferase activity and a separate family member-specific transactivation domain. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(24): 8510–8521.
- [6] Oestreich KJ, Weinmann AS. T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress

- transcription. *Trends Immunol*, 2012, 33(2): 78–83.
- [7] Kao C, Oestreich KJ, Paley MA, et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol*, 2011, 12(7): 663–671.
- [8] Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, 2002, 295(5553): 338–342.
- [9] Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, et al. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, 2005, 307(5708): 430–433.
- [10] Lazarevic V, Chen X, Shim JH, et al. Transcription factor T-bet represses Th17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the ROR $\gamma$ t gene. *Nat Immunol*, 2011, 12(1): 96–104.
- [11] Oestreich KJ, Huang AC, Weinmann AS. The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med*, 2011, 208(5): 1001–1013.
- [12] Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, 2009, 325(5943): 1006–1010.
- [13] Koch MA, Gladys Tucker-Heard, Perdue NR, et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 2009, 10(6): 595–602.
- [14] Sullivan BM, Juedes A, Szabo SJ, et al. Antigen-driven effector CD8<sup>+</sup> T cell function regulated by T-bet. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15818–15823.
- [15] Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and V $\alpha$ 14i NKT cells. *Immunity*, 2004, 20(4): 477–494.
- [16] Daussy C, Faure F, Mayo K, et al. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med*, 2014, [Epub ahead of print].
- [17] Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, et al. The transcription factors T-bet and eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity*, 2012, 36(1): 55–67.
- [18] Sciumé G, Hirahara K, Takahashi H, et al. Distinct requirements for T-bet in gut innate lymphoid cells. *J Exp Med*, 2012, 209(13): 2331–2338.
- [19] Powell N, Walker AW, Stolarczyk E, et al. The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Immunity*, 2012, 37(4): 674–684.
- [20] Maloy KJ, Uhlig HH. ILC1 populations join the border patrol. *Immunity*, 2013, 38(4): 630–632.
- [21] Rankin LC, Groom JR, Chopin M. The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46<sup>+</sup> innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat Immunol*, 2013, 14(4): 389–395.
- [22] Hoyler T, Connor CA, Kiss EA. T-bet and Gata3 in controlling type 1 and type 2 immunity mediated by innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(2): 139–147.
- [23] Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(11): 777–789.
- [24] Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol*, 2011, 12(7): 597–606.
- [25] Tan WP, Mai YG, Huang JL, et al. Construction of murine T-bet cDNA eukaryotic expression vectors. *Guangdong Med J*, 2005, 26(10): 1332–1335 (in Chinese).  
檀卫平, 麦友刚, 黄嘉凌, 等. 小鼠 T-bet 基因真核表达载体的构建. *广东医学*, 2005, 26(10): 1332–1335.
- [26] Tan WP, Huang JL, Liu RY, et al. Construction of murine T-bet cDNA recombinant Adenovirus vectors and its identification. *J SUN Yet-san Univ: Med Sci*, 2004, 25(6): 546–548 (in Chinese).  
檀卫平, 黄嘉凌, 刘然义, 等. 小鼠 T-bet 基因重组腺病毒载体的构建. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(6): 546–548.

(本文责编 郝丽芳)