

刺五加多糖对免疫性肝损伤 BALB/c 小鼠 IL-2、IL-4、INF- γ 细胞因子及 mRNA 表达的影响

张 娜, 毛 迪, 安柏松, 刘树民*

黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 探讨刺五加多糖(ASP)对刀豆蛋白 A(Con A)造成的免疫性肝损伤模型的保护作用。**方法** 将 BALB/c 小鼠随机分成 7 组, 对照组, 模型组, ASPs 低、中、高剂量(36.25、72.50、145.00 mg/kg)组, 联苯双酯滴丸(阳性药, 200 mg/kg)组, 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC, NF- κ B 抑制剂/抗氧化剂, 200 mg/kg)组。ASPs、联苯双酯滴丸组每天 ig 给药 1 次, 连续 7 d; 对照组、模型组和 PDTC 组以 0.1 mL/10 g 生理盐水 ig 给药。于末次 ig 后, PDTC 组 ip PDTC, 再于 0.5 h 后, 除对照组外均尾 iv 20 mg/kg Con A 诱导肝损伤。8 h 后处死动物取材, 试剂盒法检测血清中天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT), 血清、脾脏组织中白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)、干扰素- γ (INF- γ)的蛋白含量; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测脾脏组织中 IL-2、IL-4、INF- γ mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, ASPs 显著降低血清中 AST、ALT, IL-2、IL-4、INF- γ 血清、脾脏组织中的蛋白含量及脾脏组织中 mRNA 的表达($P < 0.05$ 、 0.01), 且均呈剂量相关性。**结论** ASPs 降低转氨酶活性、减少炎症细胞因子的分泌和表达, 对免疫性肝损伤有一定的保护作用。

关键词: 刺五加多糖; 刀豆蛋白 A; 免疫性肝损伤; IL-2; IL-4; INF- γ ; 细胞因子; AST; ALT

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)04-0557-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.04.010

Modulation of *Acanthopanax senticosus* polysaccharides on expression of IL-2, IL-4, INF- γ cytokines, and mRNA in BALB/c immunological liver-injured mice

ZHANG Na, MAO Di, AN Baisong, LIU Shumin

Drug Safety Evaluation Center, Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **objective** To discuss the protective effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharides (ASPs) by using of Con A causing immunological liver injury model. **Method** Seventy mice were randomly divided into seven groups, named as control group, model group (Con A), low-, medium-, and high- dose (36.25, 72.5, and 145 mg/kg) groups of ASPs, Bifendate (20 mg/kg, positive drug) group and PDTC (NF- κ B inhibitor / anti-oxidant, 200 mg/kg) group. The treatment group and positive control group were ig given ASPs and bifendate once daily for 7 d. Control group, model group and PDTC group were ig given normal saline once daily for 7 d. And at the last time, the PDTC group were ip injected PDTC (200 mg/kg). After 0.5 h, immunological liver injury was induced by Con A (20 mg/kg) by injecting via the tail vein in mice. Control group injected the same dose of normal saline. The mice were killed in 8 h later as well as taken tissues and blood using for detecting indexes. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were detected by kits. The contents of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), and interferon gamma (INF- γ) in serum and spleen tissues were detected. Real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect IL-2, IL-4, and INF- γ expression in spleen tissues. **Results** Compared with model group, ASPs not only could reduce the activity of ALT and AST, but also decrease the content of IL-2, IL-4, INF- γ , and RNA expression significantly ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** Results showed that ASPs not only can decrease transaminases activity, but also reduce the secretion and RNA

收稿日期: 2017-11-27

基金项目: 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z16196); 黑龙江省应用技术与开发计划项目(2013G1031)

第一作者: 张 娜(1987-), 女, 助理研究员, 中药学博士, 黑龙江中医药大学中医博士(在站人员), 研究方向为毒理学及中药药性理论研究。Tel: 15104535880 E-mail: zhang101na@126.com

*通信作者: 刘树民 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药临床药效物质基础研究及中药药性理论研究。Email: keji-liu@163.com
expression of inflammatory cytokines. Consequently, ASPs has a protective effect on immunological liver injury.

Key words: *Acanthopanax senticosus* polysaccharides; Con A; immunological liver injury; IL-2; IL-4; INF- γ ; cytokines; AST; ALT

近年来, 肝脏损伤的疾病发病率较高, 而免疫介导的肝损伤是导致急性肝衰竭、病毒性肝炎与肝纤维化的重要因素之一, 免疫机制决定了疾病的转归、发生和发展。探索有效的防治肝损伤药物具有重要意义^[1-2], 刺五加多糖 *Acanthopanax senticosus* polysaccharides (ASP) 是五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* Harms 的主要活性成分之一, 具有抗氧化、免疫调节、诱生干扰素作用^[3]。刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) 是一种植物凝集素, 是 T 细胞分裂原, 具有强大的免疫兴奋和炎症刺激作用, Con A 制备肝损伤模型的病理改变和肝细胞损伤机制都与病毒性肝炎后肝纤维化的形成机制、病理生理过程类似^[4-6]。因此, 本实验采用 Con A 建立小鼠免疫性肝损伤模型, 探讨 ASPs 对免疫性肝损伤的保护作用及机制。

1 材料

1.1 仪器

电子天平 AB265-S 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 6010 可见-紫外分光光度计 (美国安捷伦上海分析仪器厂); Infinite M200 pro 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); KDC-160HR 高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司); SIM-F124 制冰机 (日本三洋公司); Applied Biosystems step one plus 定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 超净工作台 (中国上海精密仪器仪表公司); 高压灭菌器 (德国 BMT 有限公司)。

1.2 药品及主要试剂

ASP, 西安小草植物科技有限责任公司, 批号 XC20130515, 质量分数 > 80%。Con A, 批号 80M7680v; 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC), 批号 5108-96-3, 均购自 sigma 公司; 联苯双酯滴丸, 浙江万邦药业股份有限公司, 批号 H33021305; 天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-4 (IL-4)、干扰素- γ (IFN- γ) 试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所, 批号 20130106。

1.3 动物

BALB/c 小鼠, 体质量 16~22 g, 由黑龙江中

医药大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (黑) 2014-004。

2 方法

2.1 动物分组给药及模型的建立

将实验动物随机分成 7 组: 对照组, 模型组, ASPs 低、中、高剂量 (36.25、72.50、145.00 mg/kg) 组, 联苯双酯滴丸 (阳性药, 200 mg/kg) 组, PDTC (抑制剂, 200 mg/kg) 组, 每组 10 只, 雌雄各半。ASPs、联苯双酯滴丸组每天 ig 给药 1 次, 连续 7 d; 对照组、模型组以 0.1 mL/10 g 生理盐水 ig 给药; PDTC 组每天 ig 等量的生理盐水, 在造模前 0.5 h, ip 200 mg/kg PDTC。

采用 Con A 诱导小鼠免疫性肝损伤^[7-10], 小鼠末次 ig 后 0.5 h, 除对照组外, 尾 iv 20 mg/kg Con A 以诱导肝损伤, 对照组注射同等剂量生理盐水, 8 h 后处死动物取材, 检测各项指标。

2.2 实验取材

造模结束后小鼠禁食 8 h 左右, 称质量后眼眶取血, 3 500 r/min 离心 10 min, 制备血清, 贮存于 -20 °C 冰箱次日检测。小鼠脱椎处死, 取脾脏用 4 °C 生理盐水冲洗浮血, 用甲醇配成 10% 脾组织匀浆液^[10], 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, -80 °C 冻存, 以备检测。剩余脾脏组织迅速浸于液氮中冻存, 留作实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测。

2.3 检测指标

2.3.1 血清学指标 ALT、AST、IL-2、IL-4、IFN- γ 水平检测 按试剂说明书操作, 比色分析法测定血清中 ALT、AST 水平; 采用 ELISA 法测定血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 水平。

2.3.2 脾组织匀浆中 IL-2、IL-4、IFN- γ 水平检测 按试剂说明书操作, 采用 ELISA 法测定脾组织匀浆中 IL-2、IL-4、IFN- γ 水平。

2.3.3 采用 qRT-PCR 法测定脾组织匀浆中 IL-2、IL-4、IFN- γ mRNA 水平 应用引物设计软件 Perkin Elmer ABI 7700 Sequence Detection System 设计引物序列, 中国上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

取脾脏组织加 RNAiso Plus 后匀浆, 脱壁后清洗, 孵育, 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 加入氯

仿、异丙醇离心得到总 RNA, 加 DEPC 水溶解沉淀 RNA, 各取 5 μL 分别进行电泳鉴定。在波长 260~

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

	引物	引物序列	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	片段长度/bp
IL-2	正向引物	GACCTCTGCGGCATGTTCTG	58	148
	反向引物	GCTGACTCATCATCGAATTGGC		
IL-4	正向引物	AGTTGTCATCCTGCTCTTCTTC	58	178
	反向引物	CTCACTCTCTGTGGTGTCTTCGT		
INF- γ	正向引物	CTGAGACAATGAACGCTACACACT	58	149
	反向引物	CTTTTCTTCCACATCTATGCCACTT		
β -actin	正向引物	TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC	58	149
	反向引物	GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC		

280 nm 处用紫外可见分光光度计测吸光度 (A) 值, 进行定量。进行电泳观察, 呈现 28 s、18 s、5 s 亚基, 在 PCR 仪上进行逆转录, 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min, 之后 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min, 冰上冷却。95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 退火 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 40 个循环后, 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法表示。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件处理, 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据进行正态性及方差齐性检验后, 采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 ASPs 对血清中 ALT、AST、IL-2、IL-4 和 IFN- γ 水平的影响

模型组与对照组比较, ALT、AST、IL-2、IL-4 和 IFN- γ 分泌水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 说明免疫性肝损伤造模成功; 联苯双酯滴丸组、PDTC 组、ASPs 高剂量组与模型组比较, ALT、AST、IL-2、IL-4、IFN- γ 水平明显降低, 且有显著性差异 ($P <$

0.05、0.01), ASPs 中、低剂量组与模型组比较虽不具有显著性差异, 但也在一定程度上降低。提示 ASPs 具有降酶保肝的作用。见表 2、3。

表 2 ASPs 对免疫性肝损伤模型血清转氨酶的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect on serum transaminase in immunological liver-injured treated by ASPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ALT/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	31.73 $\pm$ 2.82	130.17 $\pm$ 14.74
模型	—	103.27 $\pm$ 25.90 ^{##}	274.10 $\pm$ 84.16 [#]
联苯双酯滴丸	200	37.23 $\pm$ 5.73 [*]	135.83 $\pm$ 4.61 [*]
PDTC	200	51.17 $\pm$ 5.04 [*]	137.00 $\pm$ 2.76 [*]
ASPs	145.00	52.40 $\pm$ 6.68 [*]	138.77 $\pm$ 4.65 [*]
	72.50	65.97 $\pm$ 29.37	167.33 $\pm$ 67.55
	36.25	73.27 $\pm$ 19.12	188.40 $\pm$ 26.56

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

表 3 ASPs 对免疫性肝损伤模型血清 IL-2、IL-4、IFN- γ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect on serum IL-2, IL-4, and INF- γ cytokines in immunological liver-injured treated by ASPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	IL-2/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-4/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IFN- γ /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	316.56 $\pm$ 35.71	20.29 $\pm$ 3.54	147.70 $\pm$ 20.30
模型	—	412.69 $\pm$ 20.12 ^{##}	27.40 $\pm$ 3.05 ^{##}	221.68 $\pm$ 20.42 ^{##}
联苯双酯滴丸	200	324.00 $\pm$ 11.94 [*]	21.05 $\pm$ 2.46 [*]	152.84 $\pm$ 4.32 ^{**}
PDTC	200	330.67 $\pm$ 9.74 ^{**}	22.63 $\pm$ 2.73 [*]	160.30 $\pm$ 3.25 [*]
ASPs	145.00	329.69 $\pm$ 17.21 ^{**}	22.70 $\pm$ 2.93 [*]	155.33 $\pm$ 2.57 ^{**}
	72.50	365.79 $\pm$ 25.44 [*]	25.35 $\pm$ 0.44	178.08 $\pm$ 12.66
	36.25	391.31 $\pm$ 27.70	26.87 $\pm$ 2.93	202.76 $\pm$ 21.48

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.2 Elisa 法测定 ASPs 对脾组织中 IL-2、IL-4、IFN- γ 水平的影响

模型组与对照组比较, 脾组织匀浆中的 IL-2、IL-4、IFN- γ 水平显著升高 ($P<0.01$); 联苯双酯滴丸组、PDTC 组、ASPs 高剂量组与模型组比较, IL-2、IL-4、IFN- γ 水平均显著性回调 ($P<0.05$ 、 0.01); ASPs 中剂量组与模型组比较, 除 IL-2 有显著性差异 ($P<0.05$) 外, IL-4、IFN- γ 数值也都有降低趋势。见表 4。

3.3 qRT-PCR 法测定 ASPs 对脾组织匀浆中 IL-2、IL-4、IFN- γ mRNA 表达水平的影响

模型组与对照组比较, IL-2、IL-4、IFN- γ mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$); 联苯双酯滴丸组、PDTC 组、ASPs 高、中剂量组与模型组比较, IL-2、IL-4、IFN- γ mRNA 水平显著降低 ($P<0.01$), ASPs 低剂量组与模型组比较不具有显著性差异, 但也呈降低趋势, 结果见表 5。

表 4 Elisa 法测定 ASPs 对免疫性肝损伤模型小鼠脾组织中的 IL-2、IL-4 及 IFN- γ 影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect on spleen tissue IL-2, IL-4, and IFN- γ cytokines in immunological liver-injured treated by ASPs ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	290.54±6.01	15.40±2.93	109.57±24.68
模型	—	344.28±15.02 ^{##}	24.84±2.39 ^{##}	159.98±8.88 ^{##}
联苯双酯滴丸	200	297.62±2.74 [*]	15.70±0.44 [*]	113.05±10.91 ^{**}
PDTC	200	300.41±23.46 ^{**}	16.52±0.53 [*]	119.03±16.92 [*]
ASPs	145.00	303.23±9.21 ^{**}	16.63±0.55 [*]	118.37±30.44 ^{**}
	72.50	317.08±6.61 [*]	18.48±1.67	129.03±2.93
	36.25	339.31±17.27	20.25±3.66	143.71±7.51

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

表 5 qRT-PCR 法测定 ASPs 对免疫性肝损伤模型小鼠脾组织中的 IL-2、IL-4、IFN- γ mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect on spleen tissue IL-2, IL-4, and IFN- γ mRNA in immunological liver-injured treated by ASPs ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-2/ β -actin	IL-4/ β -actin	IFN- γ / β -actin
对照	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	3.28±0.91 ^{##}	2.92±0.24 ^{##}	3.21±0.24 ^{##}
联苯双酯滴丸	200	1.24±0.13 ^{**}	1.33±0.11 ^{**}	1.24±0.09 ^{**}
PDTC	200	1.66±0.06 ^{**}	1.50±0.07 ^{**}	1.43±0.06 ^{**}
ASPs	145.00	1.43±0.18 ^{**}	1.46±0.18 ^{**}	1.53±0.12 ^{**}
	72.50	2.09±0.62 [*]	2.27±0.18 [*]	2.60±0.12 [*]
	36.25	3.04±0.71	2.32±0.19	2.94±0.19

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

4 讨论

免疫性肝损伤的病理过程是通过激活 T 细胞和诱导特定病理特征的肝损伤。本实验选择了 Con A 建立模拟免疫性肝损伤实验动物模型, 由于 Con A 是一种植物凝集素, 不仅与肝窦有高度的亲和性, 而且还能够活化 T 淋巴细胞, 促使 T 淋巴细胞大量增殖, 并且释放细胞因子 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 。IL-2、IFN- γ 被认为是 Th1 反应因子, 不但可以调高单核细胞的吞噬作用, 增强杀伤细胞的细胞毒作用, 还可以刺激细胞释放氧化因子和 TNF- α , 杀灭肿瘤细

胞或受病毒感染的靶细胞, 其中 IFN- γ 被认为和 TNF- α 一样, 是导致肝损伤的另外一个重要因子。IL-4 是 Th2 细胞产生的细胞因子, 有活化细胞毒性 T 细胞的作用, 能抑制炎症细胞因子的释放和细胞的杀菌活性, Th1/Th2 平衡是体内影响免疫功能重要因素^[1]。

脾脏是机体内循环系统中最大的免疫器官, 而肝脏内又含有大量的免疫细胞, 二者通过肝门静脉相连, 关系非常紧密, 在肝损伤中必然会互相影响。本实验显示, 模型组肝损伤的敏感指标 AST 和 ALT

活性增高,提示肝细胞受损,造模成功。另外检测了外周血清和脾脏组织中的 IL-2、IL-4、INF- γ 分泌和 mRNA 的表达。实验发现,在血清和脾组织中,模型组的 IL-2、IL-4、INF- γ 含量和 mRNA 表达与对照组比较,都显著性增高;在联苯双酯滴丸组和 PDTTC 组 IL-2、IL-4、INF- γ 含量得到回调,ASP 给药组不但降低了 AST 和 ALT 活性,也不同程度降低了 IL-2、IL-4、INF- γ 含量,这种趋势与剂量呈相关性,高剂量组有显著性意义。分析 ASPs 对保护免疫性肝损伤的作用机制可能是作用 T 淋巴细胞调节 Th1、Th2 细胞因子,间接影响肝脏中炎性细胞因子的表达,从而使机体内维持 Th1/Th2 平衡。

本研究从免疫性肝损伤动物模型出发,阐明 ASPs 不仅降低转氨酶活性,而且减少炎性细胞因子的分泌和表达,对免疫性肝损伤有一定的保护作用,为研究肝炎的发病机理和寻找积极有效的预防和治疗措施提供参考。

参考文献

- [1] Ollerios M L, Vesin D, Fotio A L, et al. Soluble TNF, but not membrane TNF, is critical in LPS-induced hepatitis [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(6): 1059-1068.
- [2] Mahi H, Gores G J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1641-1654.
- [3] 刘树民, 张 娜. 刺五加多糖的现代研究进展 [J]. *中医药信息*, 2014, 31(2): 116-119.
- [4] Wang H X, Liu M, Weng S Y, et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(2): 119-125.
- [5] Tu C T, Han B, Yao Q Y, et al. Curcumin attenuates Concanavalin A induced liver injury in mice by inhibition of Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4 and TLR9 expression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(1): 151-157.
- [6] Tan Y W, Wu J C. Establishment of rats model with acute hepatic injury induced by injection of concanavalin A [J]. *Jiangsu Med J*, 2009, 35(6): 702-704.
- [7] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(1): 196-203.
- [8] 曲建慧, 张修礼. ConA 性小鼠肝损伤模型的研究及应用 [J]. *肝脏*, 2001, 6(3): 180-181.
- [9] 刘悦晖, 范学工, 李 宁, 等. 刀豆球蛋白 A 所致实验性肝损伤模型的构建 [J]. *中国感染控制杂志*, 2008, 7(5): 297-301.
- [10] Wang Y Z, Hu S S. A novel nitric oxide biosensor based on electropolymerization poly (toluidine blue) film electrode and its application to nitric oxide released in liver homogenate [J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22: 10-17.
- [11] Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets; doubt no more [J]. *Immunol Today*, 1991, 12(8): 256-257.