

• 综 述 •

CD3 分子高表达 T 细胞的生物学特性与应用研究进展

金方方 综述, 娄金丽[△] 审核

(首都医科大学附属北京佑安医院临检中心, 北京 100069)

摘 要:根据 T 细胞表面 CD3 分子的表达水平, 可将 T 细胞分为 CD3 分子常规表达和 CD3 分子高表达两类, CD3 分子高表达 T 细胞(CD3bright T 细胞)在外周血、肺、皮肤、肝脏、脾、淋巴结及女性生殖系统中广泛分布, 主要为 CD4⁻CD8⁻ 双阴性的 $\gamma\delta$ T 细胞, 具有产生白细胞介素-17 的 $\gamma\delta$ T 细胞相关表型, 是白细胞介素-17 的重要来源, 在感染性疾病中发挥免疫保护作用, 在肿瘤进展中具有促肿瘤作用。本文对以往 CD3bright T 细胞主要相关文献进行总结, 以期对其生物学特性及其功能进行初步总结, 为后续研究提供思路。

关键词:CD3 分子高表达 T 细胞; 生物学特性; 白细胞介素-17; 感染; 肿瘤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.024

中图法分类号:R-1; Q-2

文章编号:1673-4130(2019)05-0601-04

文献标识码:A

A review on biological characteristics and application of CD3bright T cells

JIN Fangfang, LOU Jinli[△]

(Clinical Laboratory Center, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: According to the expression level of CD3 molecules on the surface of T cells, T cells in peripheral blood can be divided into CD3 molecular convention expression and CD3 molecule high expression (CD3bright). CD3 molecule high expression T cells (CD3bright T cells) are widely distribute in lung, skin, liver, spleen, lymph nodes and female reproductive system. CD3bright T cells are mainly CD4⁻CD8⁻ double-negative $\gamma\delta$ T cells, which have a phenotype associated with interleukin-17 producing $\gamma\delta$ T cells and are an important source of interleukin-17. It plays an immunoprotective role in infectious diseases and has a tumor-promoting effect in tumor progression. In this review, we will summarize the main related biological characteristics and functions of CD3bright T cells in order to provide ideas for subsequent research.

Key words: CD3bright T cells; biological characteristics; IL-17; infectious; tumor

CD3 分子为 T 淋巴细胞的分化抗原, 胸腺内的 CD3 分子的表达与胸腺细胞的成熟阶段相关, CD3 分子的出现是在个体发育期间逐渐发生, 为 T 淋巴细胞亚群成熟分化的标志。通过 CD3/CD4/CD8T 细胞常规流式检测, LAMBERT 等^[1]在感染、肿瘤患者和健康人的外周血中观察到一类具有 CD3 高表达现象的 $\gamma\delta$ T 细胞, 并且在患者中表达水平升高。本文章中描述的 CD3 分子高表达 T 细胞(CD3bright T 细胞), 均为外周成熟 T 细胞中 CD3 分子表达水平更高的一类细胞。通过 T 细胞表面 CD3 分子的表达水平, 区分出一个有意义的细胞亚群, 在感染和肿瘤的进展中发挥重要作用。关于 CD3bright T 细胞的相关文献较少, 本文就近年来 CD3bright T 细胞的相关报道作一综述。

1 CD3bright T 细胞的生物学特性

1.1 CD3bright T 细胞的概述

CD3 分子由 γ 、 δ 、 ϵ 、

ζ 和 η 5 种多肽链组成, 以 $\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ 的形式存在, 每条 γ 、 δ 和 ϵ 链各含有 1 个免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM), 每条 ζ 链则包含有 3 个 ITAM, 即 1 个 CD3 分子含有 10 个 ITAM。CD3 分子与 TCR 紧密结合形成 TCR-CD3 多亚基复合物, 并通过位于胞质区的 ITAM 磷酸化, 放大 T 细胞信号, 激活下游信号传导途径及引发 T 细胞效应反应^[2]。CD3 分子是参与细胞的信号转导、分化增殖、发挥效应功能的主要物质基础, 在 T 淋巴细胞与其他免疫细胞和免疫分子的相互识别、免疫调节与免疫应答过程中扮演重要角色。

通过常规 T 细胞检测, 外周 T 细胞中可观察到一类具有 CD3 高表达现象的 T 细胞^[1]。CD3 分子高表达是否由于细胞制备过程中特定亚群活化造成的? 根据 PAGET 等^[3]的研究, 在无细胞因子条件下培养外周单个核细胞, 根据 T 细胞表面 CD3 分子的表达

[△] 通信作者, E-mail: 13718641405@163.com。

本文引用格式: 金方方, 娄金丽. CD3 分子高表达 T 细胞的生物学特性与应用研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5): 601-604.

水平仍然可以区分出 CD3 分子常规表达和 CD3 分子高表达两类细胞,表明 CD3^{bright} T 细胞并不是由于细胞制备过程中特定细胞群的活化造成的。CD3^{bright} T 细胞在健康人群普遍存在,84% 的健康人均可检测到该细胞群,外周血中 CD3^{bright} T 细胞约占 T 淋巴细胞的 $(3.15 \pm 2.60)\%$,且在免疫功能不全的获得性免疫缺陷综合征和肾移植患者中表达升高^[1]。CD3^{bright} T 细胞表面不表达 CD4 分子,少部分表达 CD8 分子,主要为 CD4⁻CD8⁻ 双阴性 T 细胞,另外部分细胞表面表达 CD8 分子的 CD3^{bright} T 细胞与常规的 $\alpha\beta$ T 细胞相比,其 CD8 分子水平也较低^[1]。因此,CD3^{bright} T 细胞可能为 $\gamma\delta$ T 细胞中具有 CD3 高表达现象的细胞亚群。对纯化的 CD3^{bright}T 细胞进行表型分析,证实 CD3^{bright} T 细胞的 TCR 是由 γ 和 δ 两条链组成^[4],属于非特异性免疫细胞,在早期抵御病原体中可能发挥重要作用。对 20 例因脾外伤破裂患者的新鲜脾脏提取脾淋巴细胞,进行流式细胞仪检测分析发现,16 例患者的脾脏中 $\gamma\delta$ T 细胞呈现 CD3^{bright} T 细胞的分群现象,缺乏 CD4、CD8、CD5 的表达^[5],在 TCR $\delta^{-/-}$ 小鼠中观察不到 CD3 高表达的分群现象,亦证明该群细胞为 $\gamma\delta$ T 细胞^[3]。相关研究表明,CD3^{bright} T 细胞与 $\gamma\delta$ T 细胞的水平具有一定的相关性,外周血 CD3^{bright} T 细胞数较高的人同时伴随着 $\gamma\delta$ T 细胞升高,CD3^{bright} T 细胞可间接反映出 $\gamma\delta$ T 细胞的水平^[1,4-7], $\gamma\delta$ T 细胞作为先天性与适应性免疫反应的桥梁,广泛参与感染、过敏、自身免疫性疾病及肿瘤等的发生发展。T 细胞检测在临床应用多年,而提供给临床的信息多局限于 T 细胞亚群的分群检测,CD3^{bright} T 细胞的发现提示,常规的检测或许能够提供给临床更多的信息。对 γ 链与 δ 链进一步分析发现,小鼠外周中 CD3^{bright} T 细胞均表达为 V γ 6⁺V δ 1⁺TCR^[3,8-9],可将 CD3 高表达作为 V γ 6⁺V δ 1⁺ T 细胞的生物标记。结核性胸膜炎和肺癌患者胸腔积液及外周血中检测到 CD3^{bright} T 细胞^[10-11],可能为 V γ 9⁺V δ 2⁺ T 细胞中具有 CD3 分子高表达的亚群。V γ 9⁺V δ 2⁺ T 细胞约占外周血 CD3⁺ T 细胞的 5%,是外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的主要代表^[12]。在结核感染患者胸腔积液中亦检测到 CD3^{bright} T 细胞,可能从外周血中迁移到炎症部位,表明其可能具有较强的迁移能力。

PAGET 等^[3]利用小鼠模型发现了 CD3^{bright} T 细胞与常规 $\gamma\delta$ T 细胞相比所表达的表面标记存在一定的差别,CD3^{bright} T 细胞缺乏常规 $\gamma\delta$ T 细胞表面标记物 CD27 和 NK1.1,并且充分表达产生白细胞介素(IL-17)的辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)相关细胞

因子的受体(IL-1R1⁺IL-23R⁺IL-18R⁺)。CD27 分子被认为是 $\gamma\delta$ T 细胞不同功能的标记,CD27⁺ $\gamma\delta$ T 细胞偏向于产生 γ 干扰素(IFN- γ),而缺乏 CD27 的 $\gamma\delta$ T 细胞则产生 IL-17^[13]。与常规 $\gamma\delta$ T 细胞相比,CD3^{bright} T 细胞上与细胞存活有关的 CD127(IL-7R)和 CD25(IL-2R)表达水平更高,表明其可能具有更长的生存期,此外,IL-7R 最近也被证明是 $\gamma\delta$ T17 细胞调节与增殖的关键细胞受体^[14]。YOKOBORI 等^[15]分离纯化了结核性胸膜炎患者胸腔积液中的 CD3^{bright} T 细胞,发现细胞表面分化抗原趋化因子受体 3(CXCR3)和趋化因子受体 7(CCR7)表达增高,认为该类细胞具有较强的迁移到微生物感染部位和反应性淋巴结中的能力。另外,肺小细胞肺癌患者外周血中 CD3^{bright} T 细胞的 CD27 和 CD28 表达减少,可能与细胞的活化与增殖能力降低有关^[11]。与 $\gamma\delta$ T17 细胞类似,CD3^{bright} T 细胞还表达 ROR γ t(维甲酸孤儿核受体 γ t),它是 IL-17 产生的关键转录因子^[14],以及表达 $\gamma\delta$ T 细胞介导细胞毒性的常见标志物 NKG2D^[3,8]。以上表型特点也提示,CD3^{bright} T 细胞在产生 IL-17 上可能发挥重要作用。

1.2 CD3^{bright} T 细胞的功能 CD3^{bright} T 细胞具有丰富的表型,与常规 $\gamma\delta$ T 细胞相同,均具有产生细胞因子的功能,但是产生细胞因子的能力有所不同。研究发现^[3,8,16],分布在小鼠肺、腹膜腔、子宫、肝脏、关节、淋巴组织的 CD3^{bright} T 细胞均具有产生 IL-17 的能力,较常规的 $\gamma\delta$ T17 细胞产生 IL-17 的能力更强,且 CD3^{bright} T 细胞具有活化(CD69⁺)和效应记忆表型(CD62L-高 CD44),分泌细胞因子的过程快速高效。在一些肿瘤如卵巢癌^[17]、乳腺癌^[18]中,CD3^{bright} T 细胞更是 IL-17 的早期和主要来源。ROR γ t 属于维甲酸孤儿核受体的家族成员之一,是调控 Th17 细胞产生 IL-17 的主要转录因子,受 STAT3 的调节^[19]。进一步研究发现^[3],CD3^{bright} T 细胞主要通过 IL-1 β 和 IL-23 促进 STAT3 的磷酸化水平,上调 ROR γ t 转录因子的表达,从而诱导 IL-17A 的产生,同样在细菌感染模型中证实了上述 IL-23/IL-17 免疫轴的存在^[20]。另外,在小鼠卵巢癌腹膜转移模型中^[21],大部分晚期肿瘤微环境中浸润的 CD3^{bright} T 细胞也被检测出具有产生 IFN- γ 的能力,表明该群细胞具有一定的可塑性,但在大多数情况下不产生 IFN- γ ,这种可塑性行为受到严格的调控。在体外 PMA(佛波酯)/离子霉素的刺激下,结核感染患者外周中 CD3^{bright} T 细胞和常规 $\gamma\delta$ T 细胞都具有产生 IFN- γ 的能力,而 IL-17 的产生仅局限于常规 $\gamma\delta$ T 细胞^[10,15],人外周 CD3^{bright} T 细胞是否具有产生 IL-17 的能力,需进一步探究。

2 CD3bright T 细胞的应用研究

2.1 CD3bright T 细胞与感染 CD3bright T 细胞优先分布在皮肤与肺,作为固有免疫细胞的一部分,提示其可能在黏膜相关免疫反应中起重要作用。小鼠银屑病模型中^[3],咪喹莫特(IMQ)可诱导皮肤银屑病样炎症,炎症皮肤中 CD3bright T 细胞明显升高,其可能在银屑病的炎症免疫反应中扮演重要角色。分布在肺主部的 CD3bright T 细胞要在肺的间质,站在宿主防御微生物的前线,小鼠肺部感染期间该类细胞水平明显升高,并且是 IL-17 的早期以及主要来源,中性粒细胞和肺泡巨噬细胞是刺激活化 CD3bright T 细胞的重要组分^[20]。IL-17 被广泛认为是对抗黏膜部位病原体的保护性细胞因子,CD3bright T 细胞在皮肤炎症和呼吸道病原体保护性免疫反应中发挥重要作用。COULTER 等^[10]的研究中,与活动性结核病患者相比,潜伏感染者外周血中具有产生 IFN- γ 能力的 CD3bright T 细胞水平明显较高。YOKOBORI 等^[15]则观察到,在结核性胸膜炎患者中 CD3bright T 细胞比例增多,占外周血及胸腔积液中 $\gamma\delta$ T 细胞的主导地位。提示 CD3bright T 细胞可能直接参与了结核感染后机体的免疫反应,并可能通过产生 IFN- γ 起免疫保护作用。在慢性乙型肝炎患者中,CD3bright T 细胞阳性的患者对聚乙二醇化干扰素- α (peg-IFN- α)治疗表现出相对较差的反应^[22]。CD3bright T 细胞表达显著高水平的抑制性分子 NKG2A 以及低水平的 CD8,使用 peg-IFN- α 处理后,可迅速增加 CD3bright T 细胞上抑制性 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(TIM-3)的表达,而 TIM-3 与 IFN- γ 产生呈负相关并可能导致其功能障碍。CD3bright T 细胞为评估 peg-IFN- α 治疗慢性乙型肝炎患者的疗效提供了一种新的临床辅助指标。

2.2 CD3bright T 细胞与肿瘤 CD3bright T 细胞作为 $V\gamma 9^+ V\delta 2^+$ T 细胞的一部分,在肿瘤细胞的免疫监视中发挥重要作用。一方面,CD3bright T 细胞可通过穿孔素-颗粒酶途径裂解肿瘤细胞、清除 Fas⁺ 和 TRAIL-R⁺ 的肿瘤细胞、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC 作用)、提供早期炎性细胞因子如 IFN- γ 等途径发挥直接的抗肿瘤作用^[23]。在张通通等^[4]的研究中,胃癌患者外周血中的 CD3bright T 细胞占 T 细胞百分比健康对照组显著降低,且胃癌 IV 期的患者 CD3bright T 细胞有低于 I ~ III 期的趋势。在非小细胞肺癌患者中^[11],外周血中的 CD3bright T 细胞占 $\gamma\delta$ T 细胞的比例也显著低于健康对照人群,在胸腔积液中进一步降低,患者 CD3bright T 细胞上 CD27 和 CD28 的表达降低,表明其活化与增殖的能力减低,CD3bright T 细胞可能直接参与了癌症的进

展过程。另一方面,越来越多的证据表明,CD3bright T 细胞可通过产生 IL-17,促进免疫抑制细胞的浸润和迁移及促进肿瘤部位血管的生成等进一步促进肿瘤的进展。在乳腺癌小鼠模型中^[24],与野生型小鼠比较,IL-17A 基因敲除的小鼠肿瘤生长明显缓慢。在产生 IL-17A 的细胞中,CD3bright T 细胞占主要地位,该产生过程可被 I 型干扰素抑制进而抑制肿瘤的生长。CD3 bright T 细胞/I 型干扰素轴在促进乳腺癌生长和转移中发挥关键作用。小鼠卵巢癌腹腔转移模型中^[25],腹腔中聚集浸润的 CD3bright T 细胞可通过产生 IL-17,诱导小腹腔巨噬细胞浸润到肿瘤微环境中,小腹腔巨噬细胞高表达 il17ra、tie2 和 cd163,可促进肿瘤血管的生长及肿瘤细胞的增殖,进而促进肿瘤的进展。另外,CD3bright T 细胞的升高还与肿瘤患者的预后相关。蕈样真菌病(MF)和 Sézary 综合征(SS)是常见的原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤,通常表现为惰性病程,但也可进展为侵袭性淋巴瘤,在 MF/SS 患者外周血中出现 CD3bright T 细胞的患者预后较差^[26],CD3bright T 细胞可作为该类患者预后相关的辅助预测因子。

3 结 论

综上所述,CD3bright T 细胞为 T 细胞中具有 CD3 高表达现象的细胞亚群,主要为双阴性 $\gamma\delta$ T 细胞,可能为 $V\gamma 9^+ V\delta 2^+$ T 细胞,在外周中分布广泛,且具有 $\gamma\delta$ T17 细胞的表型特征,与常规 $\gamma\delta$ T 细胞相比,具有反应迅速、升高明显、增殖能力强、持续时间长等免疫反应特点。CD3bright T 细胞可通过产生细胞因子 IL-17 及炎性介质参与免疫反应,还可促进中性粒细胞等炎性细胞在组织中的浸润,放大靶器官和肿瘤微环境的免疫反应及炎症性破坏,与感染性疾病和肿瘤等的发生发展密切相关。之前的报道表明,产生 IL-17 的 $\gamma\delta$ T 细胞具有良好的抗肿瘤活性,而越来越多的证据显示其亦可促进肿瘤的进展。目前,CD3bright T 细胞在肿瘤发生发展中的作用亦存在争论,具体机制尚不清楚。此外,CD3bright T 细胞是否存在其他亚群、与其他免疫细胞相互作用的机制、如何向炎症及肿瘤部位迁移、剧烈的炎症刺激和肿瘤微环境对 CD3bright T 细胞又有什么样的影响,这些值得进一步探究。相信通过对 CD3bright T 细胞的进一步研究,将有助于丰富对先天性免疫细胞在炎症及肿瘤发生发展中作用的认识。

参考文献

- [1] LAMBERT C, GENIN C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells[J]. Cytometry Part B Clinical Cytometry, 2004, 61(1): 45.
- [2] GUY C S, VIGNALI K M, TEMIROV J, et al. Distinct

- TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(3):262-270.
- [3] PAGET C, CHOW MT, GHERARDIN NA, et al. CD3^{bright} signals on $\gamma\delta$ T cells identify IL-17 A-producing V γ 6V δ 1⁺ T cells[J]. *Immunol Cell Biol*, 2015, 93(2):198.
 - [4] 张通通, 袁向亮, 沈立松. CD3 高表达 T 淋巴细胞的表型特征及其在胃癌中的临床意义[J]. *诊断学理论与实践*, 2011, 10(3):239-242.
 - [5] AGGARWAL N, FISCHER J, SWERDLOW S H, et al. Splenic lymphoid subsets with less well-recognized phenotypes mimic aberrant antigen expression[J]. *Am J Clin Pathol*, 2013, 140(6):787-794.
 - [6] PAUL S, SHILPI, LAL G. Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity[J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(2):259.
 - [7] FLEMING C, MORRISSEY S, CAI Y, et al. $\gamma\delta$ T Cells: Unexpected Regulators of Cancer Development and Progression[J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(8):561.
 - [8] PINGET G V, CORPUZ T M, STOLP J, et al. The majority of murine $\gamma\delta$ T cells at the maternal-fetal interface in pregnancy produce IL-17[J]. *Immunol Cell Biol*, 2016, 94(7):623.
 - [9] POLESE B, GRIDELET V, D'HAUTERIVE S P, et al. Accumulation of IL-17⁺ V γ 6⁺ $\gamma\delta$ T cells in pregnant mice is not associated with spontaneous abortion[J]. *Clin Transl Immunology*, 2018, 7(1):e1008.
 - [10] COULTER F, A PARRISH A, MANNING D, et al. IL-17 Production from T Helper 17, Mucosal-Associated Invariant T, and $\gamma\delta$ Cells in Tuberculosis Infection and Disease[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1252.
 - [11] YI B, LI G, MO J. Characterization of $\gamma\delta$ T cells in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1):1133.
 - [12] DIMOVA T, BROUWER M, GOSSELIN F, et al. Effector V γ 9V δ 2 T cells dominate the human fetal $\gamma\delta$ T-cell repertoire[J]. *P N A S*, 2015, 112(6):556-565.
 - [13] RIBOT J C, DEBARROS A, PANG D J, et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(4):427-436.
 - [14] LI J, LIU J, MAO X, et al. IL-7 receptor blockade inhibits IL-17-producing $\gamma\delta$ cells and suppresses melanoma development[J]. *Inflammation*, 2014, 37(5):1444-1452.
 - [15] YOKOBORI N, SCHIERLOH P, GEFFNER L, et al. CD3 expression distinguishes two $\gamma\delta$ T cell receptor subsets with different phenotype and effector function in tuberculous pleurisy[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(3):385-394.
 - [16] XIAO S, YOSEF N, YANG J F, et al. Small-molecule ROR γ t antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms[J]. *Immunity*, 2014, 40(4):477-489.
 - [17] REI M, GONCALVESSOUSA N, LANCA T, et al. Murine CD27(-) V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages[J]. *P N A S*, 2014, 111(34):3562-3570.
 - [18] COFFELT S B, KERSTEN K, DOORNEBAL C W, et al. IL-17-producing [gamma][delta] t cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2015, 522(7556):345.
 - [19] SEN S, HE Z, GHOSH S, et al. PRMT1 plays a critical role in Th17 differentiation by regulating reciprocal recruitment of STAT3 and STAT5[J]. *J Immunol*, 2018, 201(2):ji1701654.
 - [20] M HASSANE, D DEMON, D SOULARD, et al. Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1|[beta]| secretion regulates the [gamma][delta]T17 cell response in respiratory bacterial infections[J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(4):1056-1068.
 - [21] SCHMOLKA N, SERRE K, GROSSO A R, et al. Epigenetic and transcriptional signatures of the stable and plastic differentiation of proinflammatory $\gamma\delta$ T-cell subsets[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(10):1093.
 - [22] GUO C, SHEN X, FU B, et al. CD3^{bright}CD56⁺ T cells associate with pegylated interferon-alpha treatment non-response in chronic hepatitis B patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25567.
 - [23] ZHAO Y, NIU C, CUI J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):3.
 - [24] PATIN E C, SOULARD D, FLEURY S, et al. Type I IFN receptor signalling controls IL-7-dependent accumulation and activity of protumoral IL-17 A-producing $\gamma\delta$ T cells in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2017, 78(1):1416.
 - [25] REI M, GONCALVES SOUSA N, LANCA T, et al. Murine CD27(-) V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages[J]. *P N A S*, 2014, 111(34):E3562.
 - [26] HRISTOV A C, VONDERHEID E C, BOROWITZ M J. Simplified flow cytometric assessment in mycosis fungoides and sézary syndrome[J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(6):944.