

·基础研究·

特异性免疫治疗对屋尘螨致敏哮喘小鼠 NKT 细胞的影响*

卢燕鸣 曹兰芳[△] 李琛 赵瑜 陈伟 张文明

(上海交通大学医学院附属仁济医院 儿科 上海 200001)

摘要 目的 研究特异性免疫治疗(SIT)对哮喘小鼠自然杀伤 T(NKT)细胞的影响。方法 24 只 BALB/C 小鼠随机分为对照组(A 组)、哮喘模型组(B 组)、哮喘免疫治疗(SIT)组(C 组),各 8 只。通过屋尘螨提取液(HDM)诱导建立哮喘小鼠模型并进行 SIT 治疗。检测各组小鼠的气道反应性、支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞计数及分类、ELISA 检测 IL-4、IFN- γ 以及应用流式细胞仪检测 NKT 细胞数目,通过 RT-PCR 方法检测 T-bet 和 GATA-3 mRNA 表达水平;HE 染色观察小鼠肺组织的改变。结果 与 B 组相比,C 组气道反应性明显下降($P<0.01$)。BALF 中细胞总数及嗜酸性粒细胞(EOS)数显著减少($P<0.01$);血清 IL-4 分泌显著降低($P<0.01$),IFN- γ 显著升高($P<0.01$);NKT 细胞数及其成熟型比例明显升高($P<0.05$);T-bet mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$),且与 NKT 细胞数及其成熟型比例呈正相关性,GATA-3 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$),且与 NKT 细胞数及其成熟型比例呈负相关性。B 组肺部管腔周围炎性细胞聚集,组织上皮损伤,组织水肿,而 C 组肺部变应性炎症明显减轻。C 组其他各项指标接近 A 组。结论 哮喘的发生可能与 NKT 细胞失调相关,通过改变 NKT 细胞数目及其成熟型比例来调节 GATA-3/T-bet 的表达可能是 SIT 治疗哮喘的作用机制之一。

关键词 哮喘 特异性免疫治疗 NKT 细胞 屋尘螨 小鼠

中图分类号 Q95-3,R562.24 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)07-1201-04

Effect of Specific Immunotherapy on the Expression of NKT Cells in House Dust Mite Extracts-Sensitized Murine Model*

LU Yan - ming, CAO Lan-fang[△], LI Chen, ZHAO Yu, CHEN Wei, ZHANG Wen-ming

(Department of Pediatrics, Renji Hospital Affiliated to Medical School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of specific immunotherapy on the NKT cells in house dust mite (HDM) extracts-sensitized murine model. **Methods:** Twenty-four BALB/C mice were randomly divided into three groups (with 8 in each group): control group (group A), asthma group (group B), SIT group (group C). The model of asthma were sensitized and challenged by HDM extracts while SIT group were subcutaneously immunized by HDM extracts. Twenty-four hours after the challenge, airway hyperresponsiveness of mice, total cellular score and cell classification in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), the serum level of IL-4 were examined. IFN- γ was detected by ELISA, the number of NKT cells was determined by flow-cytometry, the expression of T-bet and GATA-3 mRNA was detected by RT-PCR, lung inflammation was detected by HE stain. **Results:** Compared with that in the group B, airway hyperresponsiveness in group C decreased ($P<0.01$). Specific immunotherapy significantly inhibit inflammation in mouse lung tissue pathological changes; Total cells and eosinophils (EOS) in BALF reduced significantly ($P<0.01$); Serum IL-4 was significantly lower ($P<0.01$); IFN- γ secretion was significantly higher ($P<0.01$); NKT cells number and the proportion of mature cells increased significantly ($P<0.05$); The level of T-bet mRNA expression increased significantly ($P<0.01$), and it was positively correlated with the number of NKT cells and its proportion of mature; The level of GATA-3 mRNA expression were significantly lower ($P<0.05$), and it was negatively correlated with the number of NKT cells and its proportion of mature. The interstitial space surrounding the airway lumen was characterized by a densely mixed cellular infiltrate, epithelium tissue damage and tissue edema in group B, while lung inflammation of group C reduced considerably. Each test value of group C was substantially similar with that of group A. **Conclusion:** The occurrence of asthma may be associated with NKT cell dysfunction. By changing the number of NKT cells and its proportion of mature to regulate the GATA-3/T-bet expression may be one of the mechanisms by which SIT was in the treatment of asthma.

Key words: Asthma; Specific immunotherapy; Nature killer T cells; House dust mite; Mouse

Chinese Library Classification: Q95-3, R562.24 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 07-1201-04

前言

支气管哮喘(简称哮喘)是小儿常见的呼吸道变应性疾病之

* 基金项目:上海市科委基金资助项目 (0841195310)

作者简介 卢燕鸣(1973-),男,博士研究生,副主任医师,主要研究方向:儿童免疫紊乱性疾病的基础和临床研究,

Tel:13611704368, E-mail:luyanming1973@yahoo.com.cn

△通讯作者 曹兰芳,女,博士生导师,主任医师

(收稿日期 2011-10-18 接受日期 2011-11-13)

一,近年来其患病率在全球范围内有逐年增加的趋势。目前常规药物治疗虽能控制大多数患者的临床症状,但是均非对因治疗,不能从根本上阻止变应性炎症的自然进程,而特异性免疫治疗(specific immunotherapy, SIT)是 WHO 推荐的唯一针对哮喘病因的治疗方法^[1],它可改变哮喘进程,阻滞症状的恶化,并可防止产生新的过敏症状^[2],但其对于 SIT 治疗机制目前尚不完全清楚。自然杀伤 T 细胞(natural killer T cell, NKT 细胞)是于鼠和人免疫细胞中发现的一类特殊的 T 细胞,既可以表达 T 细胞表面标志,又可以表达自然杀伤细胞表面标志,被认定为第 4 类免疫细胞。近年来研究发现, NKT 细胞在哮喘中也扮演着重重要的角色^[3]。本研究通过屋尘螨提取液(HDM)诱导建立哮喘小鼠模型并进行 SIT 治疗,观察 SIT 对哮喘小鼠 NKT 数目及成熟型比例的影响,探讨 SIT 可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 标准化的屋尘螨提取液(丹麦 ALK 公司),主要成分是 Der p1 和 Der p2,含量为 100 000U/ml; FITC CD3 单抗、PE a-galcer-CD1d 四聚体、PE/CY5 CD69 单抗(美国 Biolegend 公司); RPMI1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); IL-4 / IFN- γ ELISA 试剂盒(美国 RD 公司); Trizol 试剂盒(美国 invitrogen 公司); Sybr green 荧光定量试剂盒(日本 TAKARA 公司); DEPC(上海博彩生物技术公司); 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.1.2 实验动物及分组 6-8 周雌性 SPF 级 BALB/C 小鼠 24 只,体质量(20 $\pm$ 2)g,按随机数字表法分为 3 组,即为对照组(A 组)、哮喘模型组(B 组)、哮喘免疫治疗(SIT)组(C 组),每组各 8 只。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制 参照文献稍加改良^[4,5], B、C 两组在第一天皮下注射含 2%氢氧化铝的 4000U/ml 屋尘螨提取液 50 μ l,第 8、15 天腹腔注射含 2%氢氧化铝的 4000U/ml 屋尘螨提取液 50 μ l。A 组以 0.1mol/L PBS 代替变应原。末次致敏后 2 周,进行免疫治疗, C 组隔天皮下注射含 2%氢氧化铝的 4000U/ml 屋尘螨提取液 100 μ l,共 6 次。A、B 两组以 PBS 代替变应原。末次治疗一周, B、C 两组用 0.3%戊巴比妥将小鼠麻醉后,用 4000U/ml 屋尘螨提取液 50 μ l/次缓慢滴鼻,1 次/d,共 5 次。A 组以 PBS 代替变应原。其余处理与 B 组相同。

1.2.2 小鼠气道反应性的检测 末次激发 24h 后,通过 Buxco 小鼠肺功能仪有创肺阻抗法测定小鼠的气道反应性。各组小鼠先后雾化吸入 PBS 缓冲液和 6.25、12.5、25mg / ml 乙酰甲胆碱(Mch)后测定基础肺阻力(lung resistance, RL),根据 RL 的变化来绘制呼吸曲线。

1.2.3 标本的获取 用摘眼球方法处死小鼠,剪开胸腔,暴露气管、心肺。结扎右主支气管,用高温消毒的眼科剪剪取右肺叶,一部分浸入 4%多聚甲醛固定,用作 HE 染色。剩余部分存置于 DEPC 浸泡过的高压灭菌冻存管,于液氮中速冻后放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,留作 RT-PCR 用。然后在小鼠颈部结扎气管,在结扎下端做一横切口,插入 20G 针头,1.2ml 生理盐水分 3 次灌注左肺,采集灌注液,置于低温离心机 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min (2000

r/min),抽取上清液 200 μ l/只,放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存留作 ELISA 测定用。细胞沉淀用 1ml PBS 重悬,取少许用于细胞计数。余液再次离心后弃上清,用少许 PBS 重悬后涂片,空气中晾干后放于 4%多聚甲醛固定液固定过夜。次日冲洗后常规 HE 染色,光学显微镜下进行细胞分类。

1.2.4 BALF 中的 IL-4、IFN- γ 含量的测定 具体步骤按 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

1.2.5 肺的病理组织学检查 固定于 4%多聚甲醛的肺组织常规脱水、石蜡包埋,切片,HE 染色后,光镜下观察血管和支气管周围嗜酸性粒细胞(EOS)浸润,水肿和气道上皮损伤情况。

1.2.6 小鼠肺组织 T-bet、GATA-3 mRNA 表达水平的检测 将 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存的肺组织取出剪碎,充分碾磨后,加 1ml Trizol 提取液于 EP 管中彻底匀浆,参照 Trizol 试剂盒说明书,用一步法抽提总 RNA。引物: T-bet-F GTTCCATTCTCTGTCCTTCA, T-bet-R ACCCACTTGCCGCTCTG, 113bp; GATA3-F GGGTTCGGATGTAAGTCG, GATA3-RTACCATCTCGCCGC-CAC 103bp; gapdh-F AGGTCGGTGTGAACGGATTG, gapdh-RTGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 123bp,退火温度均为 60 $^{\circ}$ C。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 40 个循环。

1.2.7 小鼠脾脏单个核细胞的分离 无菌开腹取脾脏,置于含 1640 培养液的平皿中,装入尼龙滤网,碾碎后,再用 200 目筛网过滤除去组织块。细胞悬液沿着管壁轻轻加入含 Ficoll-Hypaque 试管中。细胞悬液和分离液的比例为 2:1, 20 $^{\circ}$ C 2000 r/min 离心 20min。取中间层细胞,此即为单个核细胞。

1.2.8 各组小鼠的 NKT 比例及成熟度的分析 取含有 1×10^6 个小鼠脾脏单个核细胞的细胞悬液中加入抗鼠 CD16 / CD32 抗体 1 μ l 封闭,分为三份,两份加入 2 μ l 的 PE 标记的 a-Galcer-CD1d 四聚体、一份加入相同量的同型对照,暗室中冰上孵育 30 分钟。用洗涤缓冲液洗涤一次,往已加入 2l 的 PE 标记的 a-Galcer-CD1d 四聚体的样本管中加入 PE/CY5 标记的 CD69 抗体 2.6 μ l,以及相同量的同型对照。用洗涤缓冲液洗涤一次,再向已加入 2 μ l 的 PE 标记的 a-Galcer-CD1d 四聚体的样本管中加入 FITC 标记的 CD3 抗体 1 μ l,以及相同量的同型对照,暗室中冰上孵育 30 分钟。用洗涤缓冲液洗涤一次,暗室中保存送检。以淋巴细胞大小 FSC/SSC 设门,分析其中 a-Galcer-CD1d 四聚体、CD3 抗体双阳性细胞所占比例,再以 a-Galcer-CD1d 四聚体、CD3 抗体双阳性细胞设门,分析其中 CD69 表达阳性细胞所占比例。流式细胞仪检测数据用分析软件 CELLQuest 分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 统计软件分析,组间均数比较采用完全随机对照方差分析,两变量的相关分析采用直线相关分析法分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组小鼠气道反应性的变化:

与 B 组相比, C 组的气道反应性明显下降(P<0.01),而 C 组与 A 组的气道反应性无显著性差异(P>0.05)。

2.2 三组小鼠 BALF 中细胞计数的变化

A 组 BALF 中的细胞总数较少,以单核细胞和淋巴细胞为

主。而 B 组 BALF 中的细胞总数明显增多,以中性粒细胞和嗜酸粒细胞为主 C 组 BALF 中细胞总数和嗜酸性细胞数与 B 组比较明显减少 (P<0.01) (表 1)。

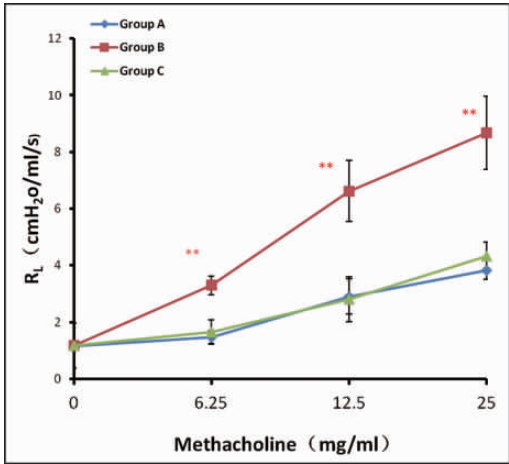


图 1 小鼠气道高反应性的变化
注 与 A 组比较,▲ P<0.01。

Fig.1 Airway hyperresponsiveness assay in mice
Note 与 A 组比较,▲ P<0.01。

表 1 BALF 中细胞总数和嗜酸性粒细胞数 (n=8, $\bar{x} \pm s$)
Table 1 The number of total cells and Eosinophil in BALF of mice (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数 ($\times 10^5/m$)	嗜酸性粒细胞 ($\times 10^5/m$)
Group	Total cells	Eosinophil
A Group	2.12 $\pm$ 0.49	0
B Group	6.07 $\pm$ 0.64 [▲]	1.23 $\pm$ 0.89 [▲]
C Group	3.86 $\pm$ 0.65 ^{▲*}	0.40 $\pm$ 0.31 [*]

注 与 A 组比较,▲ P<0.01, P<0.05 与 B 组比较,★P<0.01。
Note 与 A 组比较,▲ P<0.01, P<0.05 ;Compare with group B, ★P<0.01。

2.3 三组小鼠 BALF 中的 IL-4、IFN- γ 水平变化

与 B 相比,C 组小鼠 BALF 中 IL-4 的水平明显降低 (P<0.01), IFN- γ 的水平明显升高 (P<0.01), 而 C 组与 A 组小鼠 BALF 中 IL-4、IFN- γ 分泌无显著性差异 (P>0.05) (表 2)。

表 2 三组小鼠 BALF 中的 IL-4、IFN- γ 水平 (n=8, $\bar{x} \pm s$)
Table 2 The level of IL-4 and IFN- γ in BALF of mice (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
A Group	62.23 $\pm$ 16.15	733.11 $\pm$ 168.09
B Group	92.83 $\pm$ 15.28 [▲]	406.89 $\pm$ 190.84 [▲]
C Group	73.09 $\pm$ 14.53 [*]	619.03 $\pm$ 212.64 [*]

注 与 A 组比较,▲ P<0.01 与 B 组比较,★P<0.01。
Note 与 A 组比较,▲ P<0.01 ;Compare with group B, ★P<0.01。

2.4 三组小鼠肺部炎症的变化

B 组小鼠的支气管上皮和血管周围有明显的炎性细胞浸润,以嗜酸粒细胞、中性粒细胞为主,气道上皮结构紊乱,部分上皮细胞脱落,部分可见粘液栓,上皮充血水肿明显。C 组

的上述病理改变明显减轻,但未完全消失,仍有少量炎症细胞。A 组肺组织病理检查无明显变化,未见明显炎症细胞浸润。

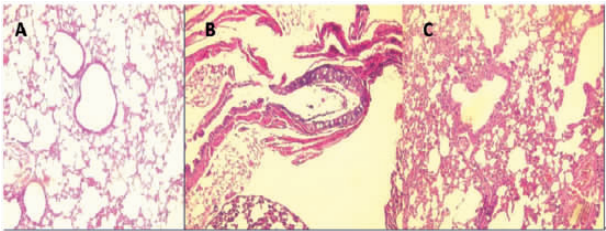


图 2 小鼠肺组织病理变化 (HE 染色,× 200)

Fig.2 Histological examination of lung in mice (HE staining,× 200)

2.5 三组小鼠肺部 T-bet 和 GATA-3mRNA 表达水平

C 组小鼠 T-bet mRNA 表达水平显著高于 B 组小鼠 (P<0.01), 与 A 组比较无显著性差异 (P>0.05); 而 C 组小鼠 GATA-3mRNA 表达水平低于 B 组小鼠 (P<0.05), 但较 A 组小鼠有所升高 (P<0.05) (表 3)。

表 3 三组小鼠肺部 T-Bet 和 GATA-3mRNA 表达水平 (n=8, $\bar{x} \pm s$)
Table 3 The level of T-bet and GATA-3 mRNA expression of lung in mice (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	T-bet mRNA	GATA-3mRNA
A Group	0.971 $\pm$ 0.10	0.790 $\pm$ 0.16
B Group	0.78 $\pm$ 0.12 [▲]	1.040 $\pm$ 0.17 [▲]
C Group	0.95 $\pm$ 0.99 [*]	0.951 $\pm$ 0.13 [*]

注 与 A 组比较,▲ P<0.01, P<0.05 与 B 组比较,★P<0.01, ★P<0.05。
Note 与 A 组比较,▲ P<0.01, P<0.05 ;Compare with group B, ★P<0.01, ★P<0.05。

2.6 三组小鼠 NKT 细胞和成熟度分析

与 B 比较,C 组小鼠 NKT 细胞和成熟 NKT 细胞的比例均明显升高 (P<0.01), 与 A 组比较无显著性差异 (P>0.05) (表 4、图 3)。

表 4 三组小鼠 NKT 细胞和成熟 NKT 细胞的比例数 (n=8, $\bar{x} \pm s$)
Table 4 The number of NKT cells and its proportion of mature in mice (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	NKT 细胞 NKT cells	成熟 NKT 细胞 proportion of mature NKT cells
A Group	31.39 $\pm$ 3.80	73.91 $\pm$ 3.29
B Group	21.75 $\pm$ 5.23 [▲]	62.06 $\pm$ 4.91 [▲]
C Group	28.78 $\pm$ 4.12 [★]	71.16 $\pm$ 3.27 [★]

注 与 A 组比较,▲ P<0.01 与 B 组比较,★P<0.01。
Note 与 A 组比较,▲ P<0.01 ;Compare with group B, ★P<0.01。

2.7 相关性分析

三组小鼠 NKT 和成熟 NKT 细胞比例与小鼠肺组织 T-bet mRNA 表达水平的有明显正相关性 (r=0.660, P<0.01; r=0.756, P<0.01), 而与 GATA-3mRNA 表达水平的则有明显的负相关性 (r=-0.406, P<0.05; r=-0.751, P<0.01)。

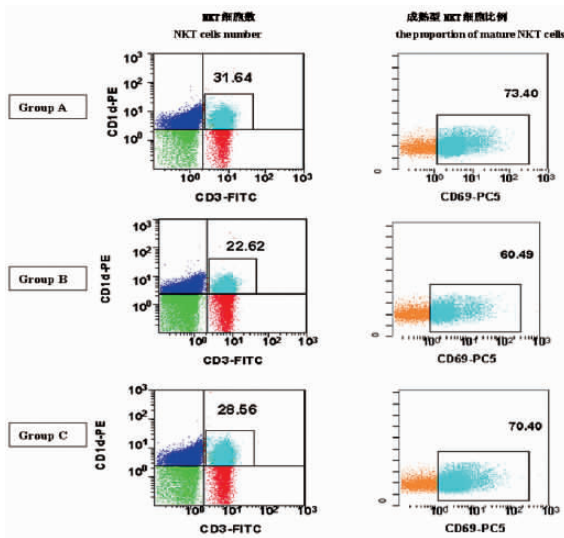


图3 小鼠 NKT 细胞流式细胞分析结果

Fig.3 The number of NKT cells and its proportion of mature in mice by cytometry analysis

3 讨论

有学者指出对于那些明确因接触变应原而引起临床症状的患者,是适合变应原 SIT 的患者,应该在用药物控制症状后,病情还处于可塑期,气道未发生不可逆的病理改变前,尽早应用变应原 SIT,从而达到改变疾病进程、改善预后的目的^[6]。目前,临床传统的 SIT 方法是通过定期接受递增剂量的变应原以增强病人对变应原的耐受,患者治疗疗程常需 3-5 年。如果用这种方法来复制动物模型显然是不合适的。现已发现应用快速免疫治疗的方法治疗哮喘在临床上也取得了与传统疗法相近的效果^[7],所以有学者就此成功复制了哮喘快速免疫治疗的小鼠模型^[4]。由于大多数哮喘动物模型多使用卵蛋白(OVA)来致敏和激发,但 OVA 并不是导致人类哮喘发病常见的变应原,尘螨仍然是我国最常见、分布最广的主要变应原之一^[8,9],因此尘螨模型的复制在哮喘儿童的研究中显得尤为重要。本实验在文献的基础上,稍加改良,复制了屋尘螨致敏的哮喘小鼠特异性免疫治疗模型,并通过检测气道反应性、肺部病理改变、BALF 中的 ESO 计数和 Th1/Th2 类细胞因子的分泌来加以证实。因此,该模型可用来探讨人类哮喘及其哮喘 SIT 治疗机制的研究。

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,现认为促进 Th2 细胞向 Th1 细胞极化偏移、诱导外周抗原特异性免疫耐受的形成是 SIT 治疗哮喘的有效机制之一,但是,确切的机理至今尚未完全阐明。近年来的研究发现^[10],NKT 细胞对哮喘的 Th1/Th2 失衡以及气道高反应的产生起着重要的作用。NKT 细胞同时具有分泌 Th1、Th2 相关细胞因子的潜能,在某些情况下有利于 Th1 型细胞因子的产生,从而增强细胞介导的免疫应答;而有时又有利于 Th2 型细胞因子的产生,从而加重变应性疾病。Gadue 等认为,NKT 的未成熟型细胞在高表达 TCR 时只有 IL-4 或者少量的 IFN- γ 分泌能力^[11]。成熟的 NKT 细胞则是以 CD69⁺ 的表达为标志,以分泌 IFN- γ 为主。本实验结果显示,B 组小鼠 BALF 中 EOS 数和 IL-4 分泌较对照组明显增加 ($P < 0.01$),而 IFN- γ 分泌显著减少 ($P < 0.01$),小鼠脾脏单核细胞中 NKT 细胞数和成熟型比例明显低于对照组 ($P < 0.01$),这可能在引起哮喘小鼠气道慢性炎症、气道高反应性及其发病方面起着重要作用。经 SIT 后可使 BALF 中上述炎症细胞数量下降和 NKT 细胞数和成熟型比例上调并渐趋于正常,提示哮喘 SIT 可能通过促进 NKT 细胞数和成熟型比例的生成和释放而抑制哮喘气道炎症反应。

目前研究认为能够影响传统 T 细胞分化能力的转录因子 T-Bet 和 GATA-3 在哮喘的发生和 SIT 治疗中起重要作用^[12],同时 T-Bet 和 GATA-3 在 NKT 细胞发育分化阶段也有着不同的作用。T-Bet 的基因水平随着 NKT 细胞的阶段发育而逐渐上调^[13],T-Bet 对于 NKT 细胞的终末成熟至关重要,而转录因子 GATA-3 主要作用于未成熟 NKT 细胞^[14,15]。本研究发现,NKT 细胞及其成熟型比例和 T-bet mRNA 的表达水平呈正相关性。在哮喘的发病机制中,T-bet 起负向调节作用,是 Th1 型细胞分化的特异性转录因子。NKT 细胞及其成熟型比例和 GATA-3 mRNA 表达水平有明显的负相关性,GATA-3 为 Th2 型细胞分化所必需,且仅在 Th2 型细胞中表达,能促使正在分化或已分化的合成 Th2 细胞因子。所以,SIT 治疗哮喘可能是通过改变 NKT 细胞水平及其成熟型比例来调节 GATA-3 /T-bet mRNA 的表达平衡,从而促进 IFN- γ 等 Th1 型细胞因子分泌并阻止 Th2 型细胞因子 IL-4 等的分泌,进而增强细胞介导的免疫应答,减轻哮喘的气道炎症,这也可能是 SIT 治疗哮喘的重要作用机制之一。

参考文献(References)

- [1] Bousquet J, Lockey R, Malting M, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American Board of Allergy, Asthma and Immunology [J]. An Allergy Asthma Immunology, 1998, 81: 401-440
- [2] Niggemann B, Jacobsen L, Dreborg S, et al. Five-year follow-up on the PAT study: specific immunotherapy and long-term prevention of asthma in children[J]. Allergy, 2006, 61 (7): 855-859
- [3] Lombardi V, Stock P, Singh AK, et al. A CD1d-dependent antagonist inhibits the activation of invariant NKT cells and prevents development of allergen-induced airway hyperreactivity [J]. J Immunol, 2010, 184(4): 2107-2115
- [4] 程晓明, 钱桂生, 朱波, 等. 免疫治疗对支气管哮喘小鼠树突细胞共刺激分子的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29 (3): 171-175
Cheng Xiao-ming, Qian Gui-sheng, Zhu Bo, et al. Effects of immunotherapy on the expression of costimulatory molecules on dendritic cells in a mouse model of asthma [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2006, 29 (3): 171-175
- [5] Ahn JH, Kim CH, Kim YH, et al. Inflammatory and remodeling events in asthma with chronic exposure to house dust mites: a murine model[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(6): 1026-1033
- [6] 赵京. 特异性免疫疗法在儿童哮喘治疗中的应用[J]. 医学与哲学(临床决策论坛版), 2009, 30 (11): 22-23
Zhao Jing. The Application of Specific Immunotherapy Treatment in Children with Asthma[J]. Medicine & Philosophy(Clinical Decision Making Forum Edition), 2009, 30 (11): 22-23

(下转第 1218 页)

- pretreatment against focal cerebral ischemia through activation of extracellular signal-regulated kinases in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645(1-3): 102-107
- [10] Noshita N, Lewe 'n A, Chan PH, et al. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(12): 1442-1450
- [11] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral occlusion in rats [J]. Statistical validation. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634
- [12] Wang Q, Zhang X, Xiong L, et al. Limb remote postconditioning alleviates cerebral reperfusion injury through reactive oxygen species-mediated inhibition of delta protein kinase C in rats [J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(5): 1180-1187
- [13] Mamoru Shibata , Takemori Yamawaki, et al. Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *Brain Research*, 942 (2002):1-10
- [14] Hu J, Chai Y, Du L, et al. PI3K p55 γ promoter activity enhancement is involved in the anti-apoptotic effect of berberine against cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2-3):132-142
- [15] De la Torre AV, Junyent F, Camins A, et al. GSK3 β inhibition is involved in the neuroprotective effects of cyclin-dependent kinase inhibitors in neurons[J]. *Pharmacol Res*, 2011 Aug 22 [Epub ahead of print]
- [16] Ha YM, Kim MY , Chang KC, et al. Higenamine reduces HMGB1 during hypoxia-induced brain injury by induction of heme oxygenase-1 through PI3K/Akt/Nrf-2 signal pathways [J]. *Apoptosis*, 2011, Dec, 20 [Epub ahead of print]
- [17] Kao TC, Shyu MH, Yen GC. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid inhibit inflammation via PI3K/Akt/GSK3 β signaling and glucocorticoid receptor activation[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58 (15):8623-8629
- [18] Wang Q, Peng Y, Xiong L, et al. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system[J]. *Stroke*, 2009, 40(6):2157-2164
- [19] Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 331 (2): 115-118
- [20] Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain [J]. *J Neurochem*. 2007, 102(4):1105-1114
- [21] Molina-Holgado E, Vela JM, Guaza C, et al. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(22): 9742-9753

(上接第 1204 页)

- [7] Jung K. Safety and tolerability of immunotherapy using various up dosing schedules of a new SCIT product with an optimised allergen/aluminium hydroxide ratio[J]. *Allergy*, 2011, 66(95):41-43
- [8] 曹瑞娟, 许昱. 尘螨 DNA 疫苗在变应性疾病中的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10 (19) : 3768-3771
CAO Rui-juan, XU Yu. Research on DNA vaccine of dust mites in allergic diseases [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10 (19) : 3768-3771
- [9] Li J, Sun B, Huang Y, et al. A multicentre study assessing the prevalence of sensitizations in patients with asthma and/or rhinitis in China[J]. *Allergy*, 2009, 64(7): 1083-1092
- [10] Umetsu DT, Dekruyff RH. Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma: the many pathways to asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(5):975-979
- [11] Gadue P, Stein P L. NKT cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5):2397-2406
- [12] 李付广, 王芳, 杜英. 儿童过敏性哮喘尘螨特异性免疫治疗中干扰素- γ 、白介素 4、T-bet 和 GATA-3 mRNA 表达变化的研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2009, 24 (4) :267-269
LI Fu-guang, WANG Fang, DU Ying. Changes of expression of IFN- γ , IL-4, T-bet and GATA-3 mRNA during house dust mites specific immunotherapy for children with allergic asthma[J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2009, 24 (4) :267-269
- [13] Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and V α 14 iNKT cells[J]. *J Exp Med*, 2006, 203 (3): 755-766
- [14] Matsuda JL, Zhang Q, Ndonge R, et al. T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of V α 14 iNKT cells[J]. *Blood*, 2006, 107 (7) 2798 - 2805
- [15] Kim PJ, Pai SY, Brigl M, et al. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177 (10) : 6650-6659