

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.011

过敏性哮喘小鼠树突状细胞负荷 Der p2 后改变及与 T 细胞增殖分化的关系研究*

连利霞¹ 彭霞² 李莉² 朱伟彦¹ 安云霞¹ 孔存权^{1△}

(1 河南省人民医院(郑州大学人民医院) 河南 郑州 450003; 2 上海交通大学第一人民医院 上海 200080)

摘要 目的:探讨哮喘小鼠与正常小鼠骨髓源性树突状细胞(DC)负荷 Der p2 抗原后表达表面分子(CD11c、CD86)和细胞因子(IL-10、IL-12p70)的差异及其对 Th1 和 Th2 型细胞因子平衡的影响,进一步研究过敏性哮喘发生中 DC 的可能作用。**方法:**分别从哮喘组和对照组提取骨髓培养 DC,第五天负荷 Der p2,24 小时后吹打收集细胞,观察 DC 形态,用流式细胞仪检测解育后细胞表面 CD11c、CD86 表达。并留取负荷 Der p2 前后培养上清,ELISA 法检测 IL-10 及 IL-12p70 含量。同时以 DC:反应细胞比例为 1:10 混合培养,72 h 后 ELISA 法检测混合培养上清中 IL-4、IL-5、IFN- γ 的水平。**结果:**①负荷 Der p2 后,哮喘组 CD86、CD11c 表达比对照组高,分别为($t=11, P<0.05$)($t=4.9, P<0.05$),差异有统计学意义;②在细胞因子分泌方面,Der p2 负荷前,两组 DC 均能分泌 IL-10 与 IL-12p70,IL-10 水平哮喘组高($t=9.5, P<0.05$),而 IL-12p70 水平对照组高($P<0.05$);负荷 Der p2 后,对照组 IL-10、IL-12p7 分泌量比负荷前明显增加($P<0.05$),哮喘组无明显差异($P>0.05$);③在 DC 刺激同种 T 细胞因子分泌方面,负荷 Der p2 后哮喘组 DC 刺激 T 细胞分泌 IL-4、IL-5 分泌能力明显增强($P<0.05$),而刺激 INF- γ 能力降低($P<0.05$)。**结论:**DC 在过敏性哮喘中起着重要作用,异常 DC 通过增加 CD86、CD11c 的表达和减少 IL-10 及 IL-12 的合成,致使 T 细胞向 Th2 细胞优势分化。

关键词:过敏性哮喘;树突状细胞;Der p2

中图分类号:Q95-3;R562.25 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)35-6843-05

Effects of Der p2 on DC and the Relationship between DC and T Cell Proliferation*

LIAN Li-xia¹, PENG Xia², LI Li², ZHU Wei-yan¹, AN Yun-xia¹, KONG Cun-quan^{1△}

(1 People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450003, China; 2 Department of Laboratory Medicine, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the differences of the expression of CD11c, CD86 and the secretion of IL-10 and IL-12p70 in the dendritic cells (DCs) from allergic asthmatics and healthy donors, which loaded the Der p2 antigen, and further study the possible role of DCs in the occurrence of allergic asthma. **Methods:** Marrow-derived dendritic cells (DC) were extracted and cultured, and the cells were collected after the Derp2 load 24 hours at the 5th day, the cells morphology was observed, and the CD11c, CD86 expression was tested with flow cytometry cell. After and before the Derp2 loaded, the culture supernatants was collected to test the IL-10 and IL-12P70 levels with ELISA, then co-culture the DC and T cells with a proportion of 1:10 to test the levels of IL-4, IL-5 and INF- γ in culture supernatant with ELISA. **Results:** ① After loading Der p2, compared with control group, the expression of CD86, CD11c in asthma group was increased with statistical significance, respectively ($t=11, P<0.05$) ($t=4.9, P<0.05$); ② In the aspect of secretion of the cytokines, both groups could secrete IL-10 and IL-12P70 before Der p2 loaded, and the level of IL-10 in the asthma group was higher ($t=9.5, P<0.05$), while the level of IL-12p70 in the control group was higher ($t=6.56, P<0.05$); after Der p2 load, the level of IL-10 and IL-12p70 of the control group was increased significantly ($t=19.4, P<0.05$), while asthma group had no significant difference($P>0.05$). ③ In the aspect of DC stimulation on secretion of T cells, after Der p2 loaded, for the asthma group, the levels of IL-4 and IL-5 secreted by T cells by DC stimulation was significantly enhanced ($P<0.05$), while the level of INF- γ was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** These results identify abnormal DC can increase CD86 and CD11c expression and reduce the synthesis of IL-10 and IL-12 which are necessary and sufficient for the T cells differentiation into Th2 cells.

Key words: Allergic asthma; Dendritic cells; Der p2

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R562.25 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6843-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30671919;309728248)

作者简介:连利霞,女,硕士研究生,主治医师,主要从事树突状细胞与肿瘤研究,E-mail:lianlixiasuda@163.com

△通讯作者:孔存权,E-mail:kaquan@126.com,电话:15138468716

(收稿日期:2014-06-25 接受日期:2014-07-20)

前言

过敏性哮喘是一种严重危害健康的常见病和多发病,其发病机制并不十分清楚。目前认为,过敏性哮喘是一种机体对外界过敏原的免疫耐受发生缺陷的疾病,由于对过敏原免疫耐受缺乏,使得机体在接触过敏原后出现 Th2 型免疫反应,导致气道炎症和气道高反应性的发生^[1]。树突状细胞(Dendritic cells, DC)被认为是机体在稳定状态下最重要的 APCs(antigen presenting cells),越来越多的证据表明在过敏原激发过程中 DC 影响着 Th2 相关细胞激活,在诱导初始型 T 细胞对吸入抗原的初次免疫和过敏反应中起着重要作用^[2]。某种程度上讲,过敏性哮喘就是由变应原诱导 DC 异常成熟,进而引起 T 细胞活化引发的病理应答所致的一系列症候群。本文通过 DC 培养、抗原负载以及混合淋巴细胞培养,探讨 DC 在过敏性哮喘中的作用与机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康 4~6 周 BALB/c 小鼠(中科院实验动物中心提供),体重 16~20 g,SPF 级饲养于第二军医大学实验动物中心;试剂:RPMI 1640 培养基(Hwclone),干粉尘螨(复旦大学寄生虫教研室程训佳与庄义军老师惠赠),重组小鼠细胞因子 IL-4、GM-CSF(peprotech),FITC-CD11c、FITC-CD86(eBioscience),红细胞裂解液(Genmed),T 细胞分离尼龙毛柱(PolyScience),重组 Der p2 蛋白(盐城卫生职业技术学院崔玉宝老师赠),IL-4、IL-5、INF- γ ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国),Al(OH)₃(上海生物试剂公司),酶标仪(MK3 型,Thermo Electron Corporation)。

1.2 过敏性哮喘模型的建立

18 只 Balb/c 小鼠随机分成两组,9 只/组,任取一组作为对照组,对照组小鼠暂不做处理,另外一组采用腹腔注射 50 μ L 含 Al(OH)₃(4 mg/50 μ L)尘螨粗提浸液(CDM),第 21 天开始用尘螨粗提浸液 50 μ L/只滴鼻(滴注时间不小于三分钟),连续三天,致使哮喘组 Balb/c 小鼠产生过敏性哮喘相关特征,具体方法见文献《尘螨粗提浸液致敏小鼠的方法学研究》^[3]。

1.3 树突状细胞(DC)的培养

第 25 天,将两组小鼠脱颈处死,75%的乙醇浸泡 5 min,无菌取出股骨、肱骨,剔除肌肉,PBS 缓冲液冲洗,用 1 mL 注射器反复冲洗出骨髓,收入 15 mL 离心管中,离心(1500 r/min,5 min),弃上清,收集沉淀的骨髓细胞。以 1:5 的体积比加入 37 $^{\circ}$ C 预温的红细胞裂解液,反复吹打混匀,置室温 1 min,除去红细胞。收集除去红细胞的骨髓细胞,以含体积分数为 10%的胎牛血清的 RPMI 1640 配成 2×10^9 /L 骨髓细胞悬液,分装于细胞培养板,温育 3 h,然后用 RPMI 1640 完全培养加入培养瓶中,放入 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中培养,在培养的第 48 h 除去未贴壁细胞,继续培养至第 5 天,加入 1 mg/L Der p2 孵育 24 h,强力吹打收集 DC。

1.4 DC 的形态学观察

用倒置显微镜观察对照组及哮喘组 DC 的细胞群形态及

生长情况并拍照。

1.5 DC 表面表达 CD11c、CD86 水平及分泌 IL-10、IL-12p70 量的检测

分别取对照组及哮喘组的悬浮细胞,调整细胞浓度为 5×10^{10} 个/L。各取 100 μ L 细胞悬液加入离心管,依据试剂说明书分别加入相应 1 μ L FITC 标记的 CD11c、CD86 单克隆抗体,设立空白对照,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,洗涤 1 次,最后用 1 mL PBS 液悬浮细胞并上流式细胞仪(Beckman 公司)检测。培养 7 d 的细胞孵育 Der p2 后,ELISA 检测培养上清液 IL-10、IL-12p70 水平。

1.6 制备反应 T 细胞

常规分离对照组小鼠外周脾脏,于 100 目不锈钢网上,用无菌注射器芯挤压研磨,并用 RPMI 1640 培养基轻轻冲洗钢网,制成脾细胞悬液。用 37 $^{\circ}$ C 预温的含 5% FCS 的 RPMI 1640 培养液调至浓度约 1×10^7 /mL,注入 37 $^{\circ}$ C 预温的尼龙毛柱上,5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 30 min,用预温的 RPMI 1640 培养液轻轻洗柱,收集流出液即获 T 细胞(同种异体 T 细胞,作为反应 T 细胞,调节细胞浓度至 1×10^7 /mL,加入 96 孔板培养板,100 μ L/孔)。

1.7 同种异体的混合淋巴细胞反应

分别收集哮喘组和对照组 Der p2 孵育前 1 天(第 4 天)及后 1 天(第 6 天)的 DC,调整浓度至 1×10^6 /mL,加入终浓度为 25 μ g/mL 的丝裂霉素 C。然后以 DC:反应细胞 1:10 的浓度比例调整经尼龙毛柱分离的小鼠的脾脏 T 细胞,以 200 μ L/孔置 96 孔板混合培养,每个浓度设三复孔,设立单一 T 细胞对照。37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱继续培养 72 h。ELISA 法检测混合培养上清 IL-4、IL-5、INF- γ 的水平。

1.8 统计学处理

数据采用 SPASS19.0 软件分析,结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两样本经方差齐性检验后,同组治疗前后比较采用配对 t 检验,治疗组与对照组比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 DC 的形态学特征

每只小鼠能分离出骨髓细胞约 4×10^6 个,溶红细胞后加入含 GM-CSF、IL-4 培养基,体外培养约 24 h~48 h,培养皿底部可见贴壁细胞以及少许细胞集落,重新换培养基后继续培养。体外培养 3 d 后倒置显微镜观察到细胞集落数目明显增多,直径也逐渐增大,可见呈贴壁生长伴伪足样突起的单核巨噬细胞,并可见形状不规则,呈星状、蝌蚪状、梭形等有突起的细胞。体外培养至第 5 d,集落分散,培养液中悬浮细胞增多,高倍镜下可见表面有许多树枝状、刺状突起,甚至遮盖了胞体。正常组与哮喘组分别加入生理盐水和 1 mg/L Der p 250 μ L 继续孵育 24 h 后,各组细胞均呈现脱壁,细胞形态大小不等,毛刺明显,但尚不能确定过敏性哮喘小鼠和正常小鼠 DC 镜下形态是否有明显差异。

2.2 DC 表达分子水平检测

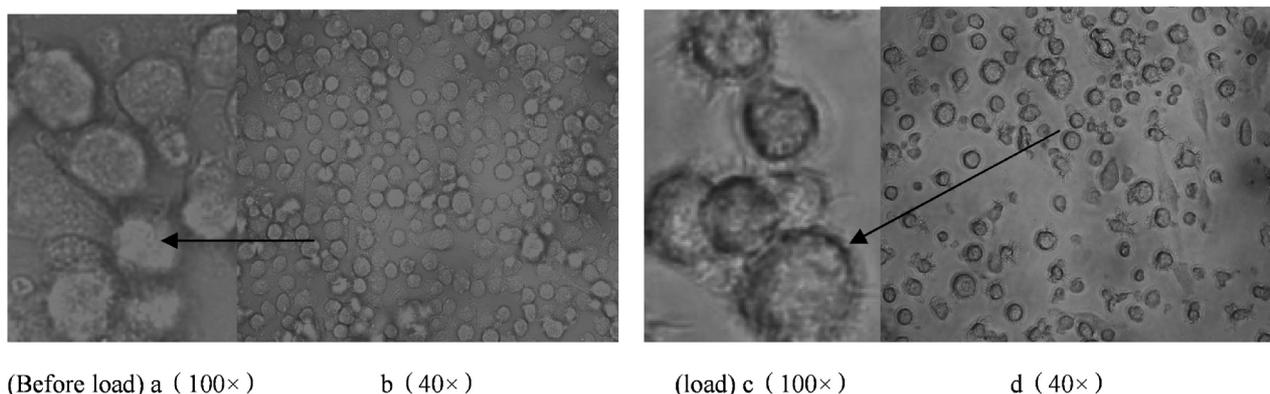


图 1 DC 负荷 Der p2 前后的变化

Fig. 1 Effects of Der p2 load on DC

注: a、b 图示显微镜观测的培养第 5d 的 DC; c、d 图示抗原刺激后的 DC。

Note: a and b showed DC at 5d under microscopy; c and d represents the DC incubated with Der p2 under microscopy.

培养 7 天的细胞 Der p2 孵育后,吹打收集,调整细胞浓度后流式细胞仪检测 CD11c, CD86 表达情况。其中 CD86 在对照组表达处于较低水平(26.79± 5.21),哮喘组较高水平(54.02± 5.32),差异有统计学意义(t=11, P<0.05); CD11c 表达在对照组为(51.49± 7.72),哮喘组为(67.51± 5.99),差异有统计学意义(t=4.9, P<0.05)。

表 1 DC 表面表达分子检测(n=9, $\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Effects of Der p2 on the expression of CD11c, CD86 of DC between the two groups (n=9, $\bar{x} \pm s, \%$)

	Control group	Asthma group
CD11c	51.49± 7.72	67.51± 5.99*
CD86	26.79± 5.26	54.02± 5.32*

注:与对照组比较, * P<0.05。

Note: * P <0.05, compared with control group.

2.3 DC 分泌细胞因子 IL-10 与 IL-12p70 水平的检测

培养 5 d 的细胞孵育 Der p2 后,经 ELISA 检测培养上清液中 IL-10 和 IL-12p70 水平。结果表明:负荷前后哮喘组培养上清中 IL-12p70 水平均较对照组降低(P<0.05);负荷后对照组培养上清中 IL-12p70 较负荷前明显增多(P<0.05),而哮喘组差别不明显(P>0.05)。

表 2 DC 细胞分泌 IL-12P70 水平比较(n=9, $\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

Table 2 Effects of Der p2 on IL-12 p70 synthesis of DC between the two groups (n=9, $\bar{x} \pm s, \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

	Control group	Asthma group
Before load	1.99± 0.19	1.29± 0.26*
After load	6.71± 0.48 [#]	2.08± 0.52*

注:与对照组相比, * P<0.05; Der p2 孵育前后对比, [#] P<0.05。

Note: *P<0.05, compared with control group; [#]P<0.05, comparison of before and after Der p2 load.

负荷前哮喘组培养上清中 IL-10 水平明显高于对照组(t=9.5, P<0.05),而负荷后哮喘组培养上清中 IL-10 水平低于对照组(P<0.05);对照组负荷后培养上清中 IL-10 水平比负荷前明显增加(t=19.4, P<0.05),哮喘组无明显差异(P>0.05)。

表 3 DC 细胞分泌 IL-10 水平比较(n=9, $\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Table 3 Effects of Der p2 on IL-10 synthesis of DC between the two groups (n=9, $\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

	Control group	Asthma group
before load	48.78± 13.62	104.05± 11.36*
after load	289.00± 34.60 [#]	143.58± 64.86*

注:与对照组相比, * P<0.05; Der p2 孵育前后对比, [#] P<0.05。

Note: *P<0.05, compared with control group; [#]P<0.05, comparison of before and after Der p2 load.

2.4 Der p2 负荷前后的 DC 刺激 T 淋巴细胞 IL-4、IL-5、INF-γ 分泌情况

哮喘小鼠 DC 与对照小鼠 DC 均与反应细胞比例为 1:10 混合培养,72 h 后 ELISA 法检测混合培养上清中 IL-4、IL-5、INF-γ 的水平。结果表明:①组内:与正常对照组比较,哮喘组 IL-4、IL-5 的水平在负荷前后均增加,而 INF-γ 在负荷前与负荷后较正常对照组均减少,两组间差异均有统计学意义(P<0.05);②组内:对照组 IL-4、IL-5、INF-γ 水平负荷前后差异显著(P<0.05),过敏性哮喘组 IL-4、IL-5 负荷前后有明显差异(P<0.05),INF-γ 负荷前后差异不明显(P>0.05)。

3 讨论

过敏性哮喘是一种严重危害健康的常见病和多发病,其发病机制并不十分清楚。目前认为^[9]T 淋巴细胞异常激活和释放的多种细胞因子在哮喘发病中起着重要作用,但过敏原吸入的激活过程却知道较少,越来越多的证据表明树突状细胞^[9](Dendritic cells, DC)在过敏原激发过程中影响着 Th2 相关细

表 4 DC 刺激 T 淋巴细胞分泌 IL-4、IL-5、INF- γ 情况(n=9, $\bar{x} \pm s$, pg/L)Table 4 Effects of DC stimulation on the synthesis of IL-4, IL-5, INF- γ by T lymphocytes (n=9, $\bar{x} \pm s$, pg/L)

	IL-4		IL-5		INF- γ	
	Before load	After load	Before load	After load	Before load	After load
Control group	15.5 \pm 9.8	49.1 \pm 18.3 [#]	16.7 \pm 8.3	57.8 \pm 16.7 [#]	284.6 \pm 103.4	484.4 \pm 173.1 [#]
Asthma group	125.3 \pm 45.6 [*]	425.3 \pm 45 ^{##}	39.7 \pm 15.1 [*]	274.0 \pm 80.5 ^{##}	168.0 \pm 83.1 [*]	153.1 \pm 47.9 [*]

注:与对照组相比,* P<0.05;Def2 孵育前后对比,[#] P<0.05。

Note:* P <0.05, compared with control group; [#] P<0.05, comparison of before and after Der p2 load.

胞激活,DC 可以作为过敏性哮喘控制中的一个干预环节。Der p1 和 Der p2 是屋尘螨最重要的变应原,在螨过敏患者的血清中,70%-80%患者的 IgE 结合这两类抗原,并呈现强反应性^[6]。本研究采用 Der p2 作为负荷物,检测 DC 负荷 Der p2 前后 CD86、CD11 的表达水平,并对 DC 自身分泌的 IL-10 和 IL-12 水平进行检测,同时通过过敏性哮喘小鼠的 DC 在体外与同种 T 细胞共培养,初步推断这些指标与 T 细胞因子分泌的 IL-4、IL-5、INF- γ 之间的联系。

T 细胞是获得性免疫系统最重要的细胞,其活化、增殖、分化及产生细胞因子是其发挥免疫功能的基础^[7]。Th1 细胞分泌 INF- γ 等细胞因子,介导细胞免疫和炎症反应,Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子,介导体液免疫应答和超敏反应。选择性激活 Th1 或 Th2 细胞是调节免疫应答的关键环节,而 DC 的抗原致敏信号及微环境中的炎症因子共同决定了初始 T 细胞向 Th1 或 Th2 分化。DC 在体内大部分处于非成熟状态(imature DC, imDC),在摄取抗原(包括体外加工)或受到某些因素刺激时即分化为成熟 DC(mature DC, mDC)^[8,9]。抗原及微环境中的炎症因子正是通过影响 DC 表面分子的表达,进而影响着 DC 的成熟状态,并通过改变 DC 自分泌因子的动态平衡影响 T 细胞的分化。有研究^[10]表明在哮喘患者支气管灌洗液中发现,T 细胞的活化增殖依赖于 CD86 启动初始 T 细胞的活化,并且诱导 Th 细胞向 Th2 细胞分化,诱发 EOS 增多的气道炎症。而 DC 表达分子检测的另一指标 CD11c 也与过敏性哮喘的发生有着重要关系^[11],Leonie S 等^[12] 试验表明体内去除 CD11c+ 树突状细胞能够抑制过敏性哮喘相关特征。本研究中,哮喘组 DC 在负荷 Der p2 后 CD86、CD11c 表达更高水平(P<0.05),但是其自身分泌 IL-10、IL-12p70 能力下降(P<0.05),同时 DC 刺激 T 细胞分泌 IL-4、IL-5 分泌能力明显增强(P<0.05),而刺激 INF- γ 能力降低(P<0.05)。不可否认,在过敏性哮喘的发生过程中,DC 发挥了重要作用,但诸多影响因素,尚有待进一步研究证实,但各种指标相同或相反方向的变化关系,支持 DC 表达分子及自分泌因子水平与其刺激 T 细胞分化存在相关性。

DC 是功能强大的抗原递呈细胞,它不仅能递呈抗原,激活淋巴细胞,而且可以分泌多种可溶性的细胞因子,其中 IL-10 和 IL-12 是其分泌的并与 Th1/Th2 平衡有密切关系的细胞因子^[13]。IL-10 是公认的 T 细胞免疫耐受抑制性细胞因子^[14],我们

的试验数据表明两组 DC 在 Der p2 负荷前均能产生少量的 IL-10,可能来自于 imDC 自分泌。IL-10 水平在负荷 Der p2 前哮喘组高($t=9.5$, $P<0.05$),负荷 Der p2 后对照组 IL-10 分泌量明显增加($t=19.4$, $P<0.05$),哮喘组变化不明显。结合哮喘小鼠骨髓 DC 表达 CD86 分子水平较对照鼠有明显升高($P<0.05$),提示过敏性哮喘 DC 成熟度可能影响 IL-10 产生。同时 Giada Amodio 等研究^[15]表明成熟的单核细胞衍生的 DC 由于失去表达 IL-10 受体的能力,致使 IL-10 对其没有作用。我们的试验表明 IL-10 在对照组负荷 Der p2 后产生的量明显增多,在哮喘组增多不明显,可能正是因为正常小鼠负荷 Der p2 后增多的 IL-10 能够抑制 DC 成熟,刺激 IL-10 继续产生,发挥免疫耐受作用,而在过敏性哮喘小鼠 DC 可能拥有相对成熟的 DC, IL-10 受体表达异常,发挥不了其作为抑制因子的作用,进一步影响 T 细胞的平衡。DC 参与免疫耐受的机制有待于进一步认识,该种功能可用于诱导自身免疫病的治疗。

IL-12 是启动和维持 Th1 细胞反应的关键的细胞因子,IL-12 由 p35 和 p40 两种亚单位组成,其中 p35 亚单位可以在多种细胞表达,但 p40 亚单位的表达比较局限,IL-12 是以两亚基结合形式存在(IL-12p70)而发挥功能的^[16,17]。Zedan 等^[18]研究表明哮喘儿童与正常儿童相比,血清 IL-12 水平明显下降,并提出 IL-12 的产生不足可能是哮喘发病机制中的重要组分。我们的体外实验结果支持上述观点,两组 DC 在 Der p2 刺激前均能产生 IL-12p70,且哮喘组较对照组低($t=6.56$, $P<0.05$),负荷 Der p2 后,又与 Ebner 等^[19]研究结果相近,他们研究显示 DC 在没有受到刺激的情况下就可产生 IL-12,但在受到细菌或细菌产物、病毒、CIN0 配体等刺激后可以大量产生 IL-12,本实验中两组负荷 Der p2 后 IL-12p70 分泌量均比负荷前增加($P<0.05$),且对照组 IL-12p70 分泌水平提高远大于哮喘组($t=19.6$, $P<0.05$),提示过敏性哮喘小鼠 DC 分泌 IL-12 异常。IL-12 正是使 Th 细胞向 Th1 细胞应答的重要因素^[20],哮喘组 IL-12 提高不足,可能导致 T 细胞向 Th2 优势分化,致使 IL-4、IL-5 分泌增多,而 INF- γ 分泌不足,与本研究结果一致。

总体而言,过敏性哮喘 DC 异常,通过增加 CD86、CD11c 的表达和减少 IL-10 及 IL-12 的合成,共同启动原始 T 细胞向 Th2 细胞优势分化,增加 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5 等的释放,导致哮喘发生。本实验证明了 DC 表达分子及自身分泌因子与 T 细胞分泌因子存在关系,有待后续试验进一步阐述。总之,

DC 表型和自身因子分泌的机制如果能进一步认识, 可以为过敏性哮喘治疗提供一种新的手段。

参 考 文 献(References)

- [1] Saleh AM, Ali HA, Ahmed SA. House dust mites: a risk factor to be considered for occupational safety or source of work-related allergens [J]. *J Egypt Soc Parasitol*,2013,43(3):669-678
- [2] Huang HJ, Lin YL, Liu CF, et al. Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma[J]. *Mucosal Immunol*,2011,4(5):519-527
- [3] 孔存权, 彭霞, 白萍, 等. 尘螨粗提液致敏小鼠的方法学研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2010(6) :528-531
Kong Cun-quan, Peng Xia, Bai Ping, et al. Construction of Asthma Model with Different Way and Their Comparison [J]. *International J of laboratory medicine*,2010(6):528-531
- [4] Broide DH, Finkelman F, Bochner BS, et al. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010 [J]. *J Allergy Clin Immunol*,2011,127(3):689-695
- [5] Gill MA. The role of dendritic cells in asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*,2012,129(4):889-901
- [6] Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, et al. Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response [J]. *J Leukoc Biol*, 2003,73(1):91-99
- [7] Morel PA, Feili-Hariri M, Coates PT, et al. Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions [J]. *Clin Exp Immunol*,2003,133(1):1-10
- [8] Lombardi V, Akbari O. Dendritic cell modulation as a new interventional approach for the treatment of asthma [J]. *Drug News Perspect*,2009,22(8):445-451
- [9] Hayashi Y, Ishii Y, Hata-Suzuki M, et al. Comparative analysis of circulating dendritic cell subsets in patients with atopic diseases and sarcoidosis[J]. *Respir Res*,2013,5(4):14-29
- [10] Chen XQ, Yang J, Hu SP, et al. Increased Expression of CD86 and Reduced Production of IL-12 and IL-10 by Monocyte-Derived Dendritic Cells from Allergic Asthmatics and Their Effects on Th1- and Th2-Type Cytokine Balance[J]. *Respiration*,2006,73(1):34-40
- [11] Kurts C. CD11c: not merely a murine DC marker, but also a useful vaccination target[J]. *Eur J Immunol*,2008,38(8):2072-2075
- [12] van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, et al. In vivo depletion of lung CD11c (+) dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma[J]. *J Exp Med*, 2005,201(6):981-991
- [13] Boks MA, Kager-Groenland JR, Haasjes MS. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC [J]. *Clin Immunol*,2012,142(3):332-342
- [14] Wu K, Bi Y, Sun K, et al. IL-10-Producing Type 1 Regulatory T Cells and Allergy [J]. *Cellular & Molecular Immunology*,2007,4(4): 269-275
- [15] Amodio G, Gregori S. Human tolerogenic DC-10: perspectives for clinical applications[J]. *Transplant Res*, 2012, 1(1):1-14
- [16] Fogel M, Long JA, Thompson PJ, et al. Dendritic cell maturation and IL-12 synthesis induced by the synthetic immune-response modifier S-28463[J]. *J Leukoc Biol.*,2002,72(12):932-938
- [17] Machida K, Inoue H. Airway immune responses in asthma [J]. *Arerugi*,2013, 62(12):1565-1574
- [18] Zedan MM, El-Chennawi FA, Fouda AE. Interleukin-12 and peripheral blood invariant natural killer T cells as an axis in childhood asthma pathogenesis [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2010,9(1):43-48
- [19] Ebner S, Ratzinger G, Krösbacher B, et al. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4[J]. *J Immunol*,2001,166(1):633-641
- [20] Vuillefroy SR, Coulon F, Poirier N, et al. Transplant tolerance is associated with reduced expression of cystathionine- γ -lyase that controls IL-12 production by dendritic cells and TH-1 immune responses[J]. *Blood*,2012,119(11):2633-2643

(上接第 6842 页)

- [18] Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process [J]. *Acta Biochim Pol*, 2003,50(4):1019-1038
- [19] Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype [J]. *J Bone Miner Res*,1996,11 (8): 1139-1145
- [20] Price PA, Otsuka AA, Poser JW. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing Protein from bone [J]. *Proc Natl Acad Sc USA*,1976,73(5):1447-1145
- [21] Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption [J]. *Cell Biol Int*, 1994,6:17:18