

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.028

结肠癌中 NMNAT2、p53 的表达及三者相关性研究 *

喻 玉 肖国辉 王天刚[△] 赵 龙 杨伟兴

(西南医科大学附属中医医院 四川 泸州 646000)

摘要 目的:检测结肠癌中烟酰胺核苷腺苷转移酶 2 (Nicotinamide nucleotide adenosine transferase 2, NMNAT2)、p53 的表达并分析三者之间的关系。**方法:**免疫组化 S-ABC 法(<4 分为阴性、≥ 4 分为阳性)检测结肠癌标本(48 例)、癌旁正常组织标本(40 例)中 NMNAT2、p53 的表达,分析其与结肠癌年龄、性别、病理类型、肿瘤形态、分化程度、浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移等临床参数的关系及二者的关系。**结果:**(1) NMNAT2、p53 表达于结肠癌组织细胞质、胞核,呈棕黄或棕褐色,在癌旁正常组织中表达较低或缺失。结肠癌中 NMNAT2、p53 表达阳性者占 83.33%、70.83%,癌旁正常组织中表达阳性者占 7.50%、0.00%,其差异有统计学意义($P<0.05$)。(2) NMNAT2、p53 阳性率,在不同年龄、性别、病理类型、肿瘤形态、分化程度患者中的差异无统计学意义($P>0.05$);(T3-T4)期者为 96.51%、84.62%,高于(T1-T2)期的 68.18%、54.55%($P<0.05$);(III-IV)期者为 95.00%、85.00%,高于(I-II)期的 78.57%、57.14%($P<0.05$);有淋巴结转移者为 100.00%、84.21%,高于无淋巴结转移者的 72.41%、62.07%($P<0.05$)。(3)结肠癌组织中 NMNAT2 与 p53 表达呈正相关($rs=0.809$, $P<0.05$)。**结论:**NMNAT2、p53 与结肠癌发展相关,且二者呈正相关,因此,联合检测有助于对结肠癌诊治与病情评估。

关键词:结肠癌;NMNAT2;p53;免疫组化;浸润深度;淋巴结转移

中图分类号:R735.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2735-05

The Study of the Expression of NMNAT2 and p53 in Colon Cancer and the Correlation between the Three*

YU Yu, XIAO Guo-hui, WANG Tian-gang[△], ZHAO Long, YANG Wei-xing

(Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of nicotinamide nucleotide adenosine transferase 2 (Nicotinamide nucleotide adenosine transferase 2) and p53 in colon cancer and analyze the relationship between the three. **Methods:** S-ABC immunohistochemical method (<4 = 4, divided into negative into positive) detection of colorectal cancer (48 cases) and adjacent normal tissues (40 cases) the expression of NMNAT2, p53, and the analysis of colon cancer age and gender, pathological type, tumor morphology, differentiation, and Jin Runshen TNM staging, lymph node metastasis and other clinical parameters of the relationship and the relationship between the two. **Results:** NMNAT2 and p53 expression in colon cancer tissue cytoplasm and nucleus, with Buffy or brown, expression is low or absent in normal tissues. The positive rate of NMNAT2 and p53 expression in colon cancer was 83.33% and 70.83%, respectively. The positive expression rate in 7.50% normal tissues was 7.50% and 0%, respectively, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive rate of p53 and NMNAT2, there was no significant difference in different age, gender, pathological type, tumor size and differentiation degree in patients ($P>0.05$); (T3-T4) period was 96.51%, 84.62% higher than the 68.18% period (T1-T2), 54.55% ($P<0.05$); (III-IV) period was 95% 85%, higher than (I-II) period of 78.57%, 57.14% ($P<0.05$); lymph node metastasis was 100%, 84.21% higher than those without lymph node metastasis, 72.41%, 62.07% ($P<0.05$). The NMNAT2 and p53 expression in colorectal cancer tissue was positively correlated ($rs=0.809$, $P<0.05$). **Conclusion:** NMNAT2 and p53 are related to the development of colon cancer, and there is a positive correlation between the two. The joint detection can be considered to assist the diagnosis and treatment of colon cancer and the evaluation of the disease.

Key words: Colon cancer; NMNAT2; p53; Immunohistochemistry; Depth of infiltration; Lymph node metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)14-2735-05

前言

结肠癌是临床较为常见、起病较为隐匿、以中年人最为高发的一种大肠癌,随着国民体力劳动的减少和膳食结构的改

* 基金项目:四川省科技厅科研基金项目(2014LC098)

作者简介:喻玉(1982-),女,本科,主治医师,电话:17692650752, E-mail: ykh8303@163.com

[△] 通讯作者:王天刚(1986-),男,硕士,主治医师

(收稿日期:2019-02-07 接受日期:2019-02-28)

变,其发病率在近几年有增无减,尽管国内外学者对其开展了不少针对性研究,但其诊断及病情评估仍较困难,因此,寻求有效、可靠的辅助指标仍是目前研究的热点。据报道^[1-3],结肠癌的发生发展是一个与基因相关的高代谢过程,烟酰胺核苷酸腺苷转移酶 2 (Nicotinamide nucleotide adenosine transferase 2, NMNAT2) 是细胞氧化还原反应等代谢过程的一个限速酶,p53 是大肠癌的一个驱动基因。近年来,驱动基因对肿瘤诊治的影响及限速酶活性的影响正逐渐得到重视。本研究检测结肠癌中 NMNAT2、p53 的表达并分析三者之间的关系,期望为结肠癌的诊断及病情评估提供一定参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2015 年 2 月至 2017 年 2 月期间我院手术切取的结肠癌标本 48 例为研究对象,其中,男 29 例,女 19 例;年龄 (31-81)岁,平均(48.36± 5.24)岁;病理类型:腺癌 39 例,粘液癌 9 例;肿瘤形态:息肉型 17 例,溃疡型 31 例;分化程度:高分化 11 例,中分化 28 例,低分化 9 例;浸润深度:T1 期 6 例,T2 期 16 例,T3 期 15 例,T4 期 11 例;TNM 分期:I 期 8 例,II 期 20 例,III 期 16 例,IV 期 4 例;无淋巴结转移 29 例,伴淋巴结转移 19 例。40 例留取结肠癌旁正常组织标本者作为对照。

1.2 诊断、分期标准

结肠癌诊断参照《大肠癌治疗指南(2014 年版)》^[4],分期参照国际抗癌联盟 / 美国肿瘤联合会提出的 TNM 法^[5],组织学分级(分化程度)参照世界卫生组织于 2000 年提出的标准^[6]。

1.3 纳入与排除标准

纳入标准:^① 满足以上诊断标准、分期明确、经活组织病理进一步确诊为结肠癌,癌旁正常组织距癌灶切缘不低于 5cm;^② 术前未行靶向、化疗、放疗等抗肿瘤治疗;^③ 临床病历资料完整。排除合并急性慢性严重炎症、结肠癌意外其它肿瘤、免疫病、血液病、孕产妇女、过敏体质者。

1.4 切片制备及染色方法

选取新鲜、典型组织,4%多聚甲醛、石蜡分别进行固定、包埋,连续切片(4μm/ 层)后行免疫组化 S-ABC 法染色,具体步骤为:二甲苯脱蜡后过氧化氢水溶液阻断内源过氧化物酶作用,胃蛋白酶 K 修复抗原后滴加兔抗人 NMNAT2 抗体 (1:150 稀释)或鼠抗人 p53 抗体(1:100 稀释)(均购自北京中杉金桥生物技术有限公司),4℃孵育过夜后,滴入链霉素抗生素蛋白 - 过

氧化物酶复合物,二氨基联苯胺(武汉博士德生物技术有限公司)显色液显色后苏木精衬染,最后镜下观察。以磷酸盐缓冲液(无毒且与机体内环境浓度接近,用于调节 pH、清除实验干扰因素)代替一抗作阴性对照。所有操作在我院同两名高年资临床技师指导下严格按照操作说明书进行。

1.5 染色判定方法

在 40 倍镜下进行染色强度评分,其中,无染色记 0 分,淡黄染色记 1 分,棕褐或棕黄染色记 2 分。在高倍镜(× 400)选取 10 个互不重叠的视野进行阳性细胞百分比评分,每个视野取 500 个连续的肿瘤细胞,细胞存在染色即为阳性细胞,阳性细胞在肿瘤细胞中的数量比例不足 5%者记 0 分,5%至 25%者记 1 分,26%至 50%者记 2 分,超过 50%者记 3 分。染色强度、阳性细胞百分比评分之积即为免疫组化染色的总积分,反映结肠癌组织细胞中 NMNAT2、p53 的表达情况,<4 分为阴性,≥ 4 分为阳性。

1.6 资料收集

通过 Excel 表格建立本研究数据库,基于电子及纸质病历,采用双人双录、单人核对、及时备份等方式收集入组结肠癌患者的姓名、年龄、性别、病理类型、肿瘤形态、分化程度、浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移及 NMNAT2、p53 在标本中的表达等情况。

1.7 统计学处理

统计学分析经 SPSS 22.0 完成,TNM 分期等计数资料采用百分率表示,NMNAT2 等阳性率的对比采用 χ^2 检验;NMNAT2、p53 之间的关系采用 Spearman 等级相关分析,设检验水准为 $\alpha=0.05$,差异具有统计学意义的标准为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 NMNAT2 与 p53 的表达情况

NMNAT2 表达于结肠癌组织细胞质、胞核内,呈棕黄或棕褐色(图 1A);在癌旁正常组织中表达较低或缺失(图 1B)。结肠癌 NMNAT2 阳性表达者占 83.33%(40/48),癌旁正常组织中阳性表达者占 7.50%(3/40),二者差异有统计学意义($\chi^2=23.547$, $P=0.000$)。p53 主要表达于结肠癌组织胞核内,呈棕黄或棕褐色(图 2C);在癌旁正常组织中表达缺失(图 2D)。结肠癌 p53 阳性表达者占 70.83%(34/48),癌旁正常组织中阳性表达者占 0.00%(0/40),二者差异有统计学意义($\chi^2=39.904$, $P=0.000$)。

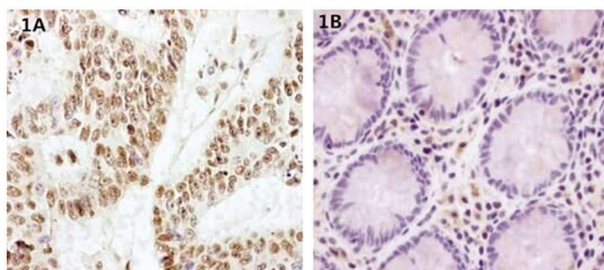


图 1 NMNAT2 的表达(A:结肠癌,B:癌旁正常组织,免疫组化 SABC 法× 400)

Fig.1 Expression of NMNAT2(A: colon cancer, B: adjacent normal tissue, Immunohistochemical SABC× 400)

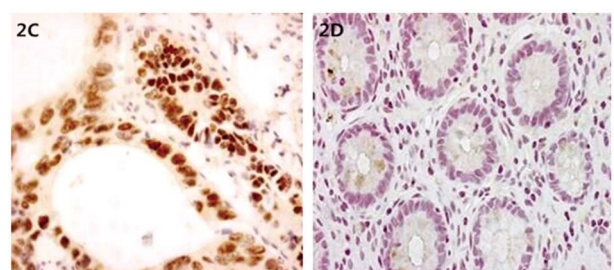


图 2 p53 的表达(C:结肠癌,D:癌旁正常组织,免疫组化 SABC 法× 400)

Fig.2 Expression of p53 (C: colon cancer, D: adjacent normal tissue, Immunohistochemical SABC× 400)

2.2 NMNAT2、p53 与结肠癌的相关性分析

经统计, NMNAT2、p53 阳性率, 在不同年龄、性别、病理类型、肿瘤形态、分化程度患者中的差异无统计学意义($P>0.05$);

(T3-T4)期者高于(T1-T2)期($P<0.05$), (III-IV)期者高于(I-II)期($P<0.05$), 有淋巴结转移者高于无淋巴结转移者($P<0.05$), 见表1。

表 1 NMNAT2、p53 与结肠癌的相关性研究

Table 1 Study on the correlation between NMNAT2, p53 and colon cancer

Variables	Cases	NMNAT2 expression		p53 expression	
		Positive	P value	Negative	P value
Ages			0.154		0.146
>60 years	22	18(81.82%)		16(72.73%)	
≤ 60 years	26	22(84.62%)		18(69.23%)	
Sex			0.187		0.175
Male	29	24(82.76%)		21(72.41%)	
Female	19	16(84.21%)		13(68.42%)	
Pathological type			0.119		0.136
Adenocarcinoma	39	33(84.62%)		26(66.66%)	
Mucous carcinoma	9	7(77.78%)		6(66.66%)	
Tumor morphology			0.107		0.155
Polypoid type	17	14(82.35%)		12(71.59%)	
Ulcerative type	31	26(83.87%)		22(70.97%)	
Degree of differentiation			0.101		0.104
High	11	9(81.82%)		8(72.73%)	
Middle	28	24(85.71%)		20(71.43%)	
Poorly	9	7(77.78%)		6(66.66%)	
Depth of infiltration			0.000		0.011
T1-T2 stage	22	15(68.18%)		12(54.55%)	
T3-T4 stage	26	25(96.15%)		22(84.62%)	
TNM stage			0.000		0.008
I - II	28	21(78.57%)		16(57.14%)	
III-IV	20	19(95.00%)		17(85.00%)	
Lymph node metastasis			0.001		0.016
No	29	21(72.41%)		18(62.07%)	
Yes	19	19(100.00%)		16(84.21%)	

2.3 NMNAT2 与 p53 的相关性分析

48 例结肠癌组织中, NMNAT2、p53 同时表达阳性者占

68.75%(33/48), 同时表达阴性者占 12.50%(6/48), Spearman 分析显示, 二者表达呈正相关($P<0.05$)(表 2)。

表 2 NMNAT2 与 p53 的相关性研究

Table 2 Study on the correlation between NMNAT2 and p53

NMNAT2 expression	p53 expression		rs	P value
	Positive	Negative		
Positive	33	7	0.809	0.000
Negative	1	6		

3 讨论

大肠癌多发于结肠, 是目前危害最大、发病率最高的恶性肿瘤。据统计^[7-9], 全球大肠癌人数达 1400 万, 每年新发、死于大

肠癌的人数分别约为 95 万、50 万, 在中国等亚洲地区大肠癌患者在进入新世纪以来增加了 3 倍左右, 其 5 年生存率不足 50%, 对国民乃至全人类身心健康的影响已不容忽视。现已知, 代谢异常是结肠癌较为常见的特征表现, 瓦尔堡效应理论认为, 肿瘤代谢异常旺盛, 其代谢环境常处于氧饥饿状态, 在原癌、抑癌基因的参与下, 肿瘤代谢网络重新编程, 使得线粒体功能下调, 有氧化反应减弱, 无氧糖酵解反应增强, 即便氧供充足, 肿瘤细胞能量供应仍以糖酵解为主。相关研究还指出^[10], 肿瘤重编程的目的是充分利用机体各种代谢产物及有限资源, 进而支持肿瘤的无限增殖。因此, 若能明确结肠癌病理变化, 无疑对临床诊治、病情评估有重要指导意义。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 对机体代谢反应、钙离子活化等过程具有不可或缺的作用, 通常以 NAD^+ 、 NADPH 等形式维持机体代谢, 来源于烟酰胺单核苷酸, 而 NMNAT 家族是其合成过程的限速酶之一, 其中, NMNAT2 对胞内 NAD 含量的变化最为敏感^[11]。NMNAT2 主要表达于神经、脑、肥厚心肌等高代谢组织中, 本研究结肠癌 NMNAT2 阳性表达者占 80% 以上, 远高于癌旁正常组织中阳性表达比例, 显示了研究的必要性。进一步分析发现, NMNAT2 与浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移显著相关 ($P < 0.05$), 其影响结肠癌的机制可能有^[12-20]: (1) 通过参与 NAD^+ 、 NADPH 含量的调节, 破坏机体氧化还原反应平衡状态, 无氧糖酵解高度活跃, 介导肿瘤生长、增殖、分裂、分化等恶化途径; (2) 结合组蛋白去乙酰化酶 3 后抑制细胞凋亡、促进细胞增殖。此外, Grifantini 等^[14]还指出, 噻唑呋林可通过影响 NMNAT 表达调节 NAD 含量, 进而发挥抗肿瘤作用, 且其对肿瘤细胞的敏感性与 NMNAT2 含量极度相关。

p53 蛋白是基因定位于人 17 号染色体的一种肿瘤重编码调节因子, 本质是一种核结合蛋白, 有野生型和突变型之分, 前者半衰期较短, 检测较为困难; 后者因构象改变半衰期显著延长, 且含量稳定, 易经免疫组化法测得。野生型 p53 的功能有^[21-25]: (1) 缺氧、DNA 损伤时, GADD45 等 DNA 修复基因、p21 等周期素依赖激酶抑制剂表达上调, 从而在生长停滞的 G1 期进行 DNA 修复, 若失败, 则无法进入 S 期, 此时 bax 基因可使修复失败的细胞进入凋亡模式, 以保证基因稳定遗传, 该过程完成依赖 p53 蛋白; (2) p53 通过上调依赖于 p53 的糖酵解和凋亡调控因子进而抑制无氧糖酵解; (3) 细胞色素 C 氧化酶是呼吸链传递电子的组分之一, p53 通过上调其表达而增强氧化磷酸化。当 p53 基因突变或表达缺失时, 以上功能均失活, DNA 损伤无法修复并持续遗传, 糖酵解明显增强。本研究显示, 70% 结肠癌标本 p53 阳性表达, 且与肿瘤浸润、转移等相关, 这与以上观点相符合。

此外, 本研究发现, 结肠癌中 NMNAT2、p53 的表达呈正相关, 其可能的机制是^[26-30]: (1) NMNAT2 是 p53 的下游基因, 突变型 p53 对 NMNAT2 的表达具有诱导、促进作用; (2) NAD^+ 是 p53 基因上游调定点, p53 基因表达上调时, NAD^+ 需求量间接增高, 其合成所需 NMNAT 家族关键酶的表达也随之增高; (3) 当 p53 进行的脱乙酰反应需乙酰化酶沉默调节蛋白 1 参

与, 后者的合成依赖于 NAD^+ 的存在。这还说明 p53 还可能通过调节结肠癌的新陈代谢进而影响肿瘤的演变, 在一定程度上深化了对 p53、结肠癌的认识。

总之, 本研究显示了 NMNAT2、p53、结肠癌三者之间的关系, 既深化了对结肠癌的认识, 又为其诊治、病情评估提供了一定依据。

参考文献 (References)

- [1] Rogers A C, Hanly A M, Collins D, et al. Review article: loss of the calcium-sensing receptor in colonic epithelium is a key event in the pathogenesis of colon cancer[J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2012, 11 (1): 24-30
- [2] Hicks A N, Lorenzetti D, Gilley J, et al. Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 2 (Nmna2) Regulates Axon Integrity in the Mouse Embryo[J]. *Plos One*, 2012, 7(10): e47869
- [3] Dai X L, Liu J, Luo Y, et al. Research progress on drugs targeting p53 [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014, 30(7): 912-916
- [4] 所剑. 日本《大肠癌治疗指南(2014 年版)》解读[J]. *中国实用外科杂志*, 2016, 36(1): 84-92
- [5] Schiffmann L, Eiken A K, Gock M, et al. Is the lymph node ratio superior to the Union for International Cancer Control (UICC) TNM system in prognosis of colon cancer? [J]. *World Journal of Surgical Oncology*, 2013, 11(1): 1-6
- [6] Yasuo Imai, Hidetsugu Yamagishi, Kazunori Fukuda, et al. Differential mucin phenotypes and their significance in a variation of colorectal carcinoma [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2013, 19(25): 3957-3968
- [7] 陈雪, 曹海龙, 王斯南, 等. 高脂饮食促进结直肠癌发生机制的研究进展[J]. *肿瘤药学*, 2016, 6(1): 11-14
- [8] 金多晨, 曹海龙, 董文道, 等. 肠道微生态失衡与结肠炎相关肠癌发生发展的研究进展[J]. *肿瘤药学*, 2016, 6(5): 321-325
- [9] Tao Y, Li S U, Xing-Guang Z A. Epidemic characteristics and risk factors for colorectal cancer [J]. *Journal of Diseases Monitor & Control*, 2015, 10(4): 241-243
- [10] Bol V, Bol A, Bouzin C, et al. Reprogramming of tumor metabolism by targeting mitochondria improves tumor response to irradiation[J]. *Acta Oncologica*, 2015, 54(2): 266
- [11] Ali Y O, Allen H M, Yu L, et al. NMNAT2:HSP90 Complex Mediates Proteostasis in Proteinopathies [J]. *Plos Biology*, 2016, 14 (6): e1002472
- [12] 齐佳. NMNAT2 在结直肠癌中的表达意义及其调控因素的研究 [D]. 南方医科大学, 2017
- [13] Cui C, Jia Q, Deng Q, et al. Nicotinamide Mononucleotide Adenylyl Transferase 2: A Promising Diagnostic and Therapeutic Target for Colorectal Cancer[J]. *Biomed Research International*, 2016, 2016(6): 1804137
- [14] Grifantini M. Tiazofurine ICN Pharmaceuticals[J]. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2000, 1(2): 257-262
- [15] Paradiso A, Rabinovich M, Vallejo C, et al. p53 and PCNA expression in advanced colorectal cancer: Response to chemotherapy and long term prognosis [J]. *International Journal of Cancer*, 2015, 69(6):

- 437-441
- [16] Tomer, Tarcic, Ohad, et al. Mutant p53 Prolongs NF-kappa B Activation and Promotes Chronic Inflammation and Inflammation-Associated Colorectal Cancer[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 634-646
- [17] López I, L P O, Tucci P, et al. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer [J]. *Gene*, 2012, 499(1): 81-87
- [18] Tavana O, Gu W. The Hunger Games: p53 regulates metabolism upon serine starvation[J]. *Cell Metabolism*, 2013, 17(2): 159-161
- [19] Homayounfar R, Jedditehrani M, Cheraghpour M, et al. Relationship of p53 accumulation in peripheral tissues of high-fat diet-induced obese rats with decrease in metabolic and oncogenic signaling of insulin [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2015, 214(1473): 134-139
- [20] Wang S J, Gu W. To be, or not to be: functional dilemma of p53 metabolic regulation [J]. *Current Opinion in Oncology*, 2014, 26(1): 78
- [21] Kasthuber E R, Lowe S W. Putting p53 in Context[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1062-1078
- [22] Liu S, Tackmann N R, Yang J, et al. Disruption of the RP-MDM2-p53 pathway accelerates APC loss-induced colorectal tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2017, 36(10): 1374-1383
- [23] Duffy M J, Synnott N C, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment [J]. *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990), 2017, 83: 258-265
- [24] Lerner L K, Francisco G, Soltys D T, et al. Predominant role of DNA polymerase eta and p53-dependent translesion synthesis in the survival of ultraviolet-irradiated human cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(3): 1270-1280
- [25] Tsai M H, Liu J F, Chiang Y C, et al. Artocarpin, an isoprenyl flavonoid, induces p53-dependent or independent apoptosis via ROS-mediated MAPKs and Akt activation in non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28342-28358
- [26] Kim E M, Jung C H, Kim J, et al. The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins [J]. *Cancer Research*, 2017, 77(11): 3092-3100
- [27] Turkiew E, Falconer D, Reed N, et al. Deletion of Sarm1 gene is neuroprotective in two models of peripheral neuropathy[J]. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 2017, 22(3): 162
- [28] Liu Y, Chen X, Qin B, et al. Knocking Down Snrnp200 Initiates Demorphogenesis of Rod Photoreceptors in Zebrafish [J]. *Journal of Ophthalmology*, 2015, 2015(15): 1-7
- [29] Wang Y J, Zhang Y K, Kathawala R, et al. Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in Anticancer Drug Resistance [J]. *Cancers*, 2014, 6(4): 1925-1952
- [30] Avi H, Ashok A, Ozgur G S, et al. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review [J]. *The World Journal of Men's Health*, 2015, 33(3): 143-145

(上接第 2729 页)

- [17] Hu Y, Liu W, Huang C, et al. Home Dampness, Childhood Asthma, Hay Fever and Airway Symptoms in Shanghai, China: Associations, Dose-response Relationships and Lifestyle's Influences[J]. *Indoor Air*, 2014, 24(5): 450-463
- [18] Parameswaran K, Knight AC, Keaney NP, et al. Ventilation and perfusion lung scintigraphy of allergen-induced airway responses in atopic asthmatic subjects[J]. *Can Respir J*, 2017, 14(5): 285-291
- [19] Farne HA, Johnston SL. Immune mechanisms of respiratory viral infections in asthma[J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 9(48): 31-37
- [20] Liu W, Liu S, Verma M, et al. Mechanism of Th2/Th17-predominant and Neutrophilic, Th2/Th17-low Subtypes of Asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(5): 1548-1558
- [21] Coogan PF, Castro-Webb N, Yu J, et al. Active and Passive Smoking and the Incidence of Asthma in the Black Women's Health Study[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(2): 168-176
- [22] Barben J, Kuehni C E. Hypertonic saline for acute viral bronchiolitis: take the evidence with a grain of salt [J]. *Eur Respir J*, 2014, 44(4): 827-830
- [23] Corcoran TE, Godovchik JE, Donn KH, et al. Overnight delivery of hypertonic saline by nasal cannula aerosol for cystic fibrosis[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2017, 52(9): 1142-1149
- [24] Li P, Li Y, Shao G, et al. Comparison of immune responses to intranasal and intrapulmonary vaccination with the attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 strain in pigs [J]. *J Vet Med Sci*, 2015, 77(5): 519-525