

· 论 著 ·

热休克蛋白 70/CD80 DNA 疫苗与慢性哮喘气道重塑的影响*

李 燕¹, 史小玲^{1#}, 夏晓群², Jyothi Margapuv³, 李世宁², 钟 森⁴, 陈 庄^{1△}

(1. 泸州医学院附属医院医学实验中心, 四川泸州 646000; 2. 泸州医学院病理教研室, 四川泸州 646000; 3. 泸州医学院国际交流学院内科学全科医学, 四川泸州 646000; 4. 成都中医药大学, 成都 610075)

摘要:目的 观察热休克蛋白(HSP)70/CD80 嵌合 DNA 疫苗对慢性哮喘小鼠气道重塑病理学改变的影响。方法 经肌肉注射 HSP70/CD80 DNA 疫苗后, 雌性健康 BALB/c 小鼠采用鸡卵清蛋白建立慢性哮喘小鼠模型。全身体积描记仪检测小鼠气道反应性。苏木素-伊红(HE)染色、过碘雪夫酸(PAS)染色、马氏(Masson)三色染色和免疫组化增殖细胞核抗原(PCNA)染色观察肺组织气道重塑病理学改变情况。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测支气管肺泡灌洗液中细胞因子 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)含量。实时荧光定聚合酶链反应(PCR)测定脾脏组织 IFN- γ 和 IL-4 基因表达水平。结果 与对照组比较, 慢性哮喘组小鼠表现为明显的气道高反应性($P < 0.05$)和气管壁增厚($P < 0.05$)等气道重塑改变。与慢性哮喘组比较, 疫苗组小鼠气道反应性降低($P < 0.05$), 气道重塑减轻; 且疫苗组小鼠细胞因子 IFN- γ /IL-4 比值升高($P < 0.05$), 脾脏组织 IFN- γ /IL-4 基因表达量比值升高($P < 0.05$)。结论 HSP70/CD80 DNA 疫苗对慢性哮喘气道重塑存在抑制作用, 表现为延缓气道病理学改变, 降低气道阻力。其机制可能与促进 IFN- γ 的生成, 增强 Th1 型免疫反应, 恢复 Th1/Th2 平衡有关。

关键词:疫苗; DNA; 哮喘; 气道重塑

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.06.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)06-0607-03

The influence of HSP70/CD80 DNA vaccine on airway remodeling in chronic asthmatic mice*

Li Yan¹, Shi Xiaoling^{1#}, Xia Xiaoqun², Jyothi Margapuv³, Li Shining², Zhong Sen⁴, Chen Zhuang^{1△}

(1. Medical Experimental Center, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000; 2. Department of Pathology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. International Cooperation & Exchange Office, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 4. Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610075, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of HSP70/CD80 DNA vaccine on airway remodeling in chronic asthmatic mice. **Methods** After immunized by intramuscular injection with HSP70/CD80 DNA vaccine, the female healthy BALB/c mice were induced to airway remodeling by ovalbumin. Airway hyperresponsiveness (AHR) were measured. Lung tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS), Masson's Trichrome and immunohistochemical test for observation on morphology changes of airway remodeling. The cytokines of IFN- γ and IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid were measured by ELISA. The gene expression of IFN- γ and IL-4 were measured by real-time PCR. **Results** Compared with normal mice, the airway reactivity increased and the airway wall thickened in asthma group mice ($P < 0.05$). Compared with mice with chronic asthma, the airway reactivity and remodeling significantly reduced in mice treated with HSP70/CD80 DNA vaccine ($P < 0.05$). The ratio of cytokine IFN- γ /IL-4 and the ratio of IFN- γ /IL-4 gene expression were significantly higher than those of chronic asthma mice ($P < 0.05$). **Conclusion** HSP70/CD80 DNA vaccine can delay the pathological changes of airway and reduce airway reactivity, thus reduce the development of airway of remodeling. The mechanism may be related to the promotion of IFN- γ production, enhancement Th1-type immune response, and restoration of the Th1/Th2 balance.

Key words: vaccine; DNA; asthma; airway remodeling

气道重塑 (airway remodeling) 是哮喘长期慢性反复发作导致的气道进行性损伤和结构改变。随着病程的发展, 哮喘患者肺功能逐步恶化, 目前大多认为主要是气道重塑造成的。气道重塑可在疾病的早期发生, 随病情发展而加重, 攻克气道重塑是治疗哮喘的一个重要目标^[1]。在临床上治疗哮喘的方法众多, 最常用的是吸入糖皮质激素, 然而大多只能缓解症状减轻炎症, 并不能缓解气道重塑且有较多不良反应^[2]。因此采用新型免疫治疗方法——核酸疫苗, 用以控制气道重塑的发生和发展, 已成为目前研究的热点^[3]。本研究小组之前所进行的急性哮喘实验结果表明, 热休克蛋白 (HSP) 70/CD80 DNA 疫苗

能有效抑制气道、肺泡和血管周围的炎细胞浸润, 降低气道阻力, 且小鼠肺泡洗脱液中 γ -干扰素 (IFN- γ) 明显升高^[4]。在本研究中以鸡卵清蛋白腹腔致敏和长期雾化吸入建立慢性哮喘小鼠气道重塑模型, 以观察 HSP70/CD80 嵌合 DNA 疫苗对哮喘小鼠气道重塑的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雌性健康 BALB/c 小鼠购自第三军医大学。Endofree Plasmid Giga Kit (德国 QIAGEN 公司), 鸡卵清蛋白 (OVA, 美国 Sigma 公司), 兔抗小鼠 PCNA 多克隆抗体 (北京博奥森公司), 小鼠

* 基金项目: 四川省科技厅应用基础研究资助项目 (2009JY0076)。 作者简介: 李燕 (1984~), 研究实习员, 硕士, 主要从事免疫病理学研究。 △ 通讯作者, Tel: (0830) 3165629; E-mail: zhuangchen_99@yahoo.com。 # 共同第一作者。

表 1 乙酰甲胆碱激发后各组小鼠气道反应性改变($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	1.5 mg/mL	3.0 mg/mL	6.0 mg/mL	12 mg/mL	24 mg/mL	48 mg/mL
A 组	10	12.45±3.37	15.44±3.19	33.27±3.80 [△]	97.69±11.62 [△]	137.64±5.94 [△]	184.76±9.75 [△]
B 组	10	39.52±4.33	67.77±6.23	149.62±9.65*	288.46±11.41*	338.11±9.80*	380.74±10.52*
C 组	10	31.08±5.04	55.50±6.00	107.43±7.87*	252.56±19.29*	286.82±17.92*	381.73±21.09*
D 组	10	3.51±2.33	14.49±2.95	59.24±5.77	150.89±9.36 [△]	217.02±11.17 [△]	238.65±9.29 [△]
F		1.439	2.450	3.732	3.202	3.865	4.066
P		>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; [△]: $P < 0.05$, 与 B 组比较。

IFN- γ 和白细胞介素-4(IL-4)的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 ADL 公司),总 RNA 提取试剂盒(北京天根), TaKaRa RNA PCR Kit(大连宝生物),Eva Green supermix(美国 Bio-Rad 公司),微量核酸定量仪(美国 NanoDrop 公司),WBP system 全身体积描记仪(美国 BUXCO),iCycler iQ 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 制备 DNA 疫苗 HSP70/CD80 嵌合 DNA 疫苗是结核杆菌 HSP70 和人 CD80 基因由 Link 连接后重组于载体质粒 pcDNA3.1(+)^[5]。实验中质粒均按说明书用 QIAGEN 公司去内毒素级质粒大量提取试剂盒制备,溶于生理盐水,浓度调整到 1 mg/mL, -20 °C 存储备用。

1.2.2 慢性哮喘小鼠气道重塑模型的建立^[6] 40 只 BALB/c 小鼠随机分为 4 组,每组各 10 只。对照组(A 组),慢性哮喘组(B 组),pcDNA3.1 载体组(C 组)和 HSP70/CD80 DNA 疫苗组(D 组)。实验第 0、14、28 天分别于 A 组和 B 组股四头肌肌肉注射生理盐水 100 μ L+7.5 g/L 布比卡因 25 μ L,C 组注射 1 mg/mL pcDNA3.1 载体 100 μ L+7.5 g/L 布比卡因 25 μ L,D 组注射 1 mg/mL HSP70/CD80 DNA 质粒 100 μ L+7.5 g/L 布比卡因 25 μ L。布比卡因可作为免疫佐剂^[7]。第 35、49 天 B 组、C 组和 D 组用 OVA 20 μ g 和氢氧化铝 200 μ L 腹腔注射致敏。第 56 天开始 B 组、C 组和 D 组小鼠用 1% OVA 雾化吸入激发,30 min/次。于第 56~61 天,每天 1 次。于 63~105 天,每周 3 次,连续 6 周。小鼠出现明显口唇发绀、呼吸急促、腹肌收缩等表现为激发成功。A 组以生理盐水代替 OVA 腹腔注射和雾化吸入。

1.2.3 气道反应性测定 末次激发 24 h 后,用全身体积描记仪检测气道反应性。检测仪记录 Penh(enhanced pause)指标,结果用公式进行计算:100×(检测 Penh 值-基线 Penh 值)/基线 Penh 值,各组小鼠进行比较。

1.2.4 细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 测定 回收支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。用 ELISA 法作 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子测定。

1.2.5 肺组织学 HE 检查 摘取双肺中段于 4%多聚甲醛固定 20 h,常规制备病理切片,HE 染色。每只小鼠于 200 倍镜下随机选取平滑肌完整的细支气管横截面 8~10 个,并采集图像。用 Image Pro6.0 专业图像分析系统测定气道内径(internal perimeter, Ip)、外径(outer perimeter, Op)、气道壁厚度(airway wall thickness, Awt)、气道基底膜周径(airway basement membrane perimeter, Abp)和气道壁面积(airway wall area, Awa)。计算 Op/Ip、Awt/Abp、Awa/Abp,各组小鼠进行比较。

1.2.6 肺组织学 PAS 染色及 Masson 三色染色检查 常规制备病理切片,用 PAS 染色。对肺组织杯状细胞增生情况评分

计算均数后各组小鼠进行比较^[8]。Masson 三色染色观察上皮呈蓝色的胶原沉积情况。

1.2.7 免疫组化 PCNA 染色观察平滑肌增生情况 采用免疫组化 SP 法。参照文献对细支气管平滑肌细胞胞核进行计数^[6]。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 测定脾脏组织 IFN- γ 和 IL-4 表达

从冻存的脾脏组织中提取总 RNA,反转录制备 cDNA。进行 Real-time PCR 反应。引物序列为:IFN- γ 上游引物 AAC TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA G,下游引物 GAC GCT TAT GTT GTT GCT GAT GG; IL-4 上游引物 TTT TGA ACG AGG TCA CAG GAG A,下游引物 CCT TGG AAG CCC TAC AGA CGA G; β -actin 上游引物 AGG GTG TGA TGG TGG GAA T,下游引物 CTC GGT GAG CAG CAC AGG。反应完成后,用 Bio-Rad iQ5 软件进行分析,按照 Pfaffl 法计算相对表达量。

1.3 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 软件进行分析。当样本方差齐时,用 One-Way ANOVA 检验。样本方差不齐时,用 Kruskal-Wallis H 检验和 Mann-Whitney U 检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 激发过程中小鼠行为学 B 组小鼠在雾化激发过程中出现不同程度面部搔痒、呼吸急促、烦躁不安、腹肌抽搐、大小便失禁等。

2.2 气道反应性改变 与 A 组比较,B 组和 C 组小鼠在不同浓度乙酰甲胆碱的激发下气道反应性明显增高,当乙酰甲胆碱激发浓度达 6 mg/mL 以后,气道反应性增高且差异有统计学意义($P < 0.05$);与 B 组比较,D 组小鼠乙酰甲胆碱激发浓度达 12 mg/mL 以后气道反应性降低且差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 肺组织气道重塑病理学改变 与 A 组相比,B 组和 C 组小鼠气道壁增厚($P < 0.05$),黏膜下及气管壁周围可见大量炎细胞浸润,PAS 染色阳性的杯状细胞数明显增多($P < 0.05$),上皮着蓝色的胶原纤维增厚较明显,PCNA 阳性的平滑肌细胞数和总平滑肌细胞数明显增多($P < 0.05$)。与 B 组相比,D 组能有效改善气道重塑,各指标明显降低($P < 0.05$),见表 2、图 1。

2.4 细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的含量变化 B 组 IFN- γ 含量为 [(379.653 ± 92.437) pg/mL], IFN- γ /IL-4 比值为 (638.835 ± 170.264);C 组 IFN- γ 含量为 [(314.131 ± 81.482) pg/mL], IFN- γ /IL-4 比值为 (926.511 ± 261.814),均明显低于 A 组 [(591.015 ± 151.571) pg/mL] 及 (1 217.188 ± 435.381)。D 组 IFN- γ 含量为 [(531.933 ± 132.317) pg/mL], IFN- γ /IL-4

表 2 各组小鼠气道重塑病理学参数比较(±s)

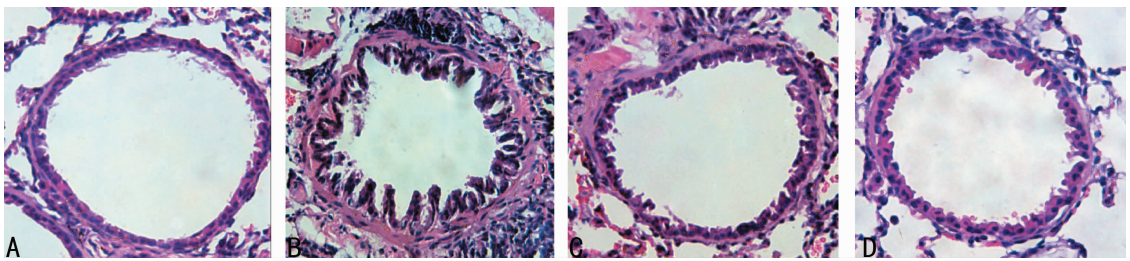
组别	n	Op/Ip	Awt/Abp	Awa/Abp	PAS 染色阳性的杯状细胞	PCNA 阳性的平滑肌细胞数	总平滑肌细胞数(个)
A 组	10	1.06±0.12 [△]	0.014±0.0024 [△]	15.40±2.27 [△]	0.20±0.10 [△]	0.12±0.18 [△]	9.52±1.24 [△]
B 组	10	1.36±0.12*	0.0484±0.0155*	49.06±6.71*	1.50±0.10*	11.28±0.92*	25.32±3.72*
C 组	10	1.24±0.06*	0.0367±0.0081*	43.52±6.55*	0.80±0.05*	8.16±1.82*	19.16±1.82*
D 组	10	1.06±0.06 [△]	0.0196±0.0052 [△]	20.45±3.17 [△]	0.40±0.10 [△]	6.02±4.45 [△]	10.44±3.38 [△]
F		25.732	30.280	31.220	18.822	60.924	37.587
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

*: P<0.05, 与 A 组比较;[△]: P<0.05, 与 B 组比较。

比值为(1 147.426±300.793)较 B 组明显增高(P<0.05)。IL-4 含量在各组小鼠 BALF 中差异无统计学意义(P>0.05)。

2.5 脾脏组织 IFN-γ 和 IL-4 基因表达变化 B 组基因表达

量 IFN-γ/IL-4 比值为(0.674±0.084),明显低于 A 组(1.090±0.921,P<0.05)。D 组基因表达量 IFN-γ/IL-4 比值为(2.365±0.418),明显高于 B 组(P<0.05)。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 1 各组小鼠肺组织切片(HE×100)

3 讨 论

本实验通过使用卵清蛋白致敏和长期激发建立慢性哮喘气道重塑小鼠模型,结果发现慢性哮喘组小鼠气道反应性增高,气道形态学上表现为气道内径缩小,气道壁增厚;细支气管上皮中 PAS 染色阳性的杯状细胞明显增多;细支气管上皮呈蓝色的胶原纤维明显增厚;细支气管上皮肌层增生明显。这些均属于慢性哮喘气道重塑的典型改变。建立慢性哮喘模型是有争议的,因为长期的抗原挑战往往导致气道高反应性,最终引发广泛的肺部炎症。作者在实验诱导建立慢性哮喘模型是在 McMillan 的基础上作出一定的修改。实验中 BALB/c 小鼠置于大小为 20 cm×16 cm×15 cm 密闭容器中,1%OVA 雾化致敏,每次 30 min,每周 3 次持续 8 周。从而减少肺部炎症的扩散,使人类哮喘气道重塑的改变最大化的在小鼠模型上展现。

HSP 是机体在应激条件下产生的一种高效的非特异性蛋白。其中 HSP70,含有多个 B 细胞和 T 细胞表位,具有诱发机体产生特异性免疫应答的特点^[9];CD80,又称 B7-1,是细胞毒性 T 细胞活化抗原-4 (CTL activity antigen-4, CTLA-4) 和 CD28 的配体^[10]。当它与 CTLA-4 和(或)CD28 结合时,可产生免疫活化所必需的第二信号,从而对机体细胞免疫和体液免疫起到全面活化的作用^[11]。本实验中的 HSP70/CD80 DNA 疫苗是将分枝杆菌 HSP70 与人 CD80 的编码基因由 Link 连接后重组于载体质粒 pcDNA3.1(+)而成。以期通过动物实验观察该嵌合质粒在急性哮喘和慢性哮喘模型中的免疫调节作用^[4]。实验结果显示,HSP70/CD80 DNA 疫苗免疫过的小鼠气道高反应性减低,气道重塑减轻。但是,作者发现 pcDNA3.1 质粒免疫小鼠后,也对气道重塑有一定的作用。其原因可能是载体中的 CPG 序列可以刺激机体产生免疫应答^[12],

发挥与弗氏免疫佐剂相似的效果。

哮喘的发生机制涉及多方面的因素,如遗传因素、环境因素、免疫因素等。其中辅助性 T 淋巴细胞的两种亚型 Th1 和 Th2 平衡失调是其重要的发病机制^[13]。Th1 和 Th2 细胞是调控机体免疫功能的一对重要调节细胞。Th0 细胞在正常情况下定向分化为 Th1 和 Th2 细胞。他们有不同的生理功能,调节机体的免疫应答。当遗传因素和环境因素发生变化时,可能导致 Th1/Th2 极化发生异常,从而使与 Th1 或 Th2 有关的疾病发生,如变态反应、自身免疫性疾病、慢性感染等。哮喘气道黏膜 CD4⁺ Th2 细胞,通过分泌多种细胞因子主导哮喘炎症反应^[14]。由于 Th1 反应减弱而 Th2 反应增强,使得 Th1/Th2 平衡,Th1 型细胞因子 IFN-γ、IL-12 等产生减少,而 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-13 等分泌亢进,从而导致嗜酸性粒细胞浸润、气道高反应性和气道重塑的发生^[15]。本实验中,HSP70/CD80 DNA 疫苗免疫过的小鼠 BLAF 中 IFN-γ、IFN-γ/IL-4 升高,脾脏组织 IFN-γ/IL-4 比率升高,可能说明 HSP70/CD80 DNA 疫苗通过调节 IFN-γ 的生成上调 Th1 型免疫反应,促进 Th1/Th2 恢复平衡。为早期阻止气道重塑,进一步改善肺功能提供新的策略。

参考文献:

[1] Mimi LK, John WW, Alastair GS, et al. Airway remodeling in asthma: current understanding and implications for future therapies [J]. Pharmacol Therapeutics, 2006, 112 (2): 474-488.
 [2] Irwin RS, Richardson ND. Side effects with inhaled corticosteroids the physician's perception [J]. Chest, 2006, 130 (1): 41-50.
 (下转第 629 页)

ACL 的患者,主要考虑异体骨-髌腱-骨及跟腱-骨均是骨与肌腱的复合移植,为了保留肌腱的力学强度,通常只采用低温冷冻的方法去其抗原性,因此骨组织的抗原物相对较强所引起的。所有的患者术后未出现感染和疾病传播的情况,终末随访时复查膝关节 X 线片提示无明显的退变性改变。因此,采用同种异体韧带移植重建 ACL 的临床应用是安全的。

综上所述,关节镜下采用同种异体韧带移植重建 ACL 不但临床疗效满意,而且有手术时间缩短、切口小、创伤小、无供区并发症、股四头肌肌力恢复快等优点。但是不能忽略异体韧带重建存在传播疾病、局部排斥反应、延迟愈合等风险,另外手术过程中骨隧道的精确定位、牢固的隧道固定、等长重建、术后良好的关节康复训练也是手术成功的关键因素。

参考文献:

[1] Kartus J, Movin T, Karlsson J. Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts[J]. *Arthroscopy*, 2001, 17(10):971-980.

[2] 张义龙, 李宁, 李志怀, 等. 自体与同种异体肌腱重建膝关节前交叉韧带的比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复杂志*, 2011, 4(31):5743-5746.

[3] Robert C, Schenk Rc Jr. Multiple ligamentous injuries of the knee in the athlete[M]. Rosemont: Academy of Orthopedic Surgeons, 2002:73-90.

[4] Chang SK, Egami DK, Shaieb MD, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction: allograft versus autograft[J]. *Arthroscopy*, 2003, 19(5):453-462.

[5] Scheffler SU, Gonnermann J, Kamp J, et al. Remodeling of

ACL allografts is inhibited by peracetic acid sterilization [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466(8):1810-1818.

[6] Nakata K, Shino K, Horibe S, et al. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction using fresh-frozen bone plug-free allogeneic tendons: 10-year follow-up [J]. *Arthroscopy*, 2008, 24(3):285-291.

[7] Caborn DNM, Selby JB. Allograft anterior tibialis tendon with bioabsorbable interference screw fixation in anterior cruciate ligament reconstruction[J]. *Arthroscopy*, 2002, 18(2):102-105.

[8] Yerys P. Anterior cruciate ligament reconstruction using allograft: single tunnel technique[J]. *Sports Med Arthrosc*, 2007, 15(4):191-198.

[9] Kjaergaard J, Fauno P. Sensibility loss after ACL reconstruction with hamstring graft[J]. *Int J Sports Med*, 2008, 29(6):507-511.

[10] 刘彩龙, 赵金忠, 陈雷, 等. 同种异体半腱肌腱双束重建前交叉韧带的近期临床疗效[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23(12):1451-1455.

[11] Lebel B, Hulet C, Galaud B, et al. Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament using bone-patellar tendon-bone autograft: a minimum 10-year follow-up[J]. *Am J Sports Med*, 2008, 36(14):1275-1282.

[12] 张明, 王岩峰, 韩晓锐, 等. 关节镜下膝关节前交叉韧带断裂同种异体肌腱重建的临床研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2011, 272(6):10-12.

(收稿日期:2012-10-16 修回日期:2012-11-13)

(上接第 609 页)

[3] Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(10):776-788.

[4] 成争艳, 史小玲, 何光彤, 等. 热休克蛋白 70/CD80 嵌合疫苗对支气管哮喘小鼠的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(9):716-717.

[5] 李晖, 史小玲, 钟森. HSP70/CD80 嵌合 DNA 真核表达质粒的构建和鉴定[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(4):244-245.

[6] McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF- α antibody: effect on the Smad signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2005, 174(9):5774-5780.

[7] 余云舟, 李娜, 王双, 等. 电脉冲和布吡卡因增强 A 型肉毒毒素 DNA 核酸疫苗的免疫效果[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(5):33-38.

[8] Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(3):617-624.

[9] Eden WV, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation[J]. *Nat*

Rev Immunol, 2005, 5(6):318-330.

[10] Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4[J]. *Science*, 2011, 332(6029):600-603.

[11] Ndejemi MP, Teijaro JR, Patke DS, et al. Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway [J]. *J Immunol*, 2006, 177(11):7698-7706.

[12] Weiner GJ. The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides [J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 68(5):455-463.

[13] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity [J]. *Nat Med*, 2002, 8(6):567-573.

[14] Desai D, Brightling C. Cytokines and cytokine-specific therapy in asthma[J]. *Adv Clin Chem*, 2012, 57(1):57-97.

[15] Wegmann M. Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, 9(1):85-100.

(收稿日期:2012-10-19 修回日期:2012-11-03)