维普资讯 http://www.cqvip.com

[redacted] 文章编号:0253-3626(2007)01-0040-04

屋尘螨诱导肠道菌群失调小鼠变应性气道反应模型的建立

刘崇海,杨锡强,王莉佳,何 云

(重庆医科大学附属儿童医院免疫实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:在肠道菌群失调小鼠模型上采用屋尘螨变应原诱导气道变应性,建立一种新的变应性气道反应模型。方法:60只 BALB/c 小鼠分 6 组,2 组用于肠道菌群检测;其余 4 组用于气道变应性检测。结果:抗生素组小鼠出现肠道菌群失调伴体重减少,粪便含水量增加。肠道菌群失调后进行屋尘螨变应原激发的小鼠 BALF 中细胞总数、淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸粒细胞增加,IL-4 水平增高,肺部 GATA-3 转录因子 mRNA 表达增加。结论:用屋尘螨变应原在肠道菌群失调小鼠模型上气道激发,诱导小鼠产生 Th2 细胞优势的变应性气道反应。

【关键词】屋尘螨;肠道菌群;气道变应性;动物模型

【中国图书分类法分类号】R322 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-08-30

Establishment of allergic airway response model in mice with intestinal microflora imbalance induced by dermatophagoides pteronyssinus allergens

LIU Chonghai, et al

(*Laboratory of Immunology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish the intestinal microflora imbalance mouse model to construct a novel allergic airway response model induced by dermatophagoides pteronyssinus allergens. *Methods*: Sixty BALB/c mice were divided into six groups. Mice in two groups were prepared for the analysis of the quantity of the intestinal bacterial flora and mice in other four groups for the analysis of allergic airway response. *Results*: Intestinal microflora of mice in antibiotic therapy group presented the weight loss and feces moisture increase. For the mice with intestinal microflora imbalance and induced by dermatophagoides pteronyssinus allergens, the number of total cells, lymphocytes, neutrophils and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) significantly increased, the expression level of IL-4 increased, and the expression of GATA-3 mRNA in the lung tissue were upregulated. *Conclusions*: An allergic airway response model was established successfully by using dermatophagoides pteronyssinus allergens to induce mice with intestinal microflora disruption.

【Key words】Dermatophagoides pteronyssinus; Intestinal microflora; Allergic airway response; Animal model

近几十年来,变应性哮喘发病率在世界范围内大幅度上升,其原因尚无明确解释。因此有必要系统研究哮喘的发病、预防和治疗,在研究哮喘过程中一个重要环节就是变应性模型的建立。由于哮喘病因复杂,故动物模型种类也繁多,但目前还没有完全与人类哮喘相符的动物模型。多项研究发现肠道菌群紊乱可以破坏机体 Th1/Th2 细胞功能之间的平衡,因此我们在肠道菌群失调小鼠模型上,不通过系统致敏,直接采用屋尘螨气道激发,诱导小鼠变应性气道反应,建立一种新的变应性气道反应动物模型。

作者介绍:刘崇海(1976-),男,讲师,博士生。
主要研究方向:儿童感染与免疫。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性清洁级 BALB/c 小鼠共 60 只,5 周龄,由重庆医科大学实验动物中心提供并代养,按实验要求随机分组,每组 10 只。

1.2 主要实验材料

1.2.1 屋尘螨变应原(Dermatophagoides pteronyssinus allergen)皮试液,50000SBU/ml,批号:30011480(Allergopharma, Germany)。

1.2.2 白色念珠菌 临床分离并鉴定的白色念珠菌由重庆医科大学附属儿童医院检验科提供,实验前 5 天将白色念珠菌接种在沙氏培养基上,置于 37℃培养箱中培养,待长成明显菌落后,收集培养基表层白色念珠菌,PBS 洗 3 次,用血球计数

维普资讯 http://www.cqvip.com

池计数并将白色念珠菌调整为 10^9/ml 浓度,4℃保存备用。

1.2.3 头孢哌酮购于海南斯达制药有限公司。肠球菌、肠杆菌、双歧杆菌、乳酸杆菌和白色念珠菌选择性培养基 EMB、EC、BS、LBS 和沙氏培养基均由本实验室配制。小鼠 IL-4 ELISA Kit(Bender, America),小鼠 IFN-γ ELISA Kit(R&D, America)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立 60 只小鼠分 2 部分,第 1 部分 20 只,分为抗生素加白色念珠菌处理组(简称抗生素组)和对照组,第 8 天取盲肠内容物做细菌和真菌培养计数。第 2 部分 40 只小鼠分为 4 组:抗生素加屋尘螨变应原激发组(简称抗+激组)、单纯抗生素组(抗+空组)、单纯屋尘螨变应原激发组(空+激组)和对照组(空+空组)。抗生素组、抗+激组和抗+空组连续口服抗生素头孢哌酮 7 天,25mg/(只·天),第 7 天经口给予白色念珠菌 1 次,50μl/只,促进小鼠肠道内菌群失调。抗+激组和空+激组在第 9 和 16 天经鼻给予屋尘螨变应原 50μl/只诱导气道变应性。对照组小鼠用等量生理盐水代替抗生素、白色念珠菌和屋尘螨变应原进行实验。所有小鼠第 19 天检测肺部有无出现嗜酸性粒细胞性炎症和 Th2 细胞活化倾向(IL-4 水平和 GATA-3 mRNA 表达水平增加)。

1.3.2 肠道细菌培养计数 为避免肠内容物中厌氧菌长时间暴露于空气中,要求称重、稀释、接种至培养基全过程在 30min 内完成。取盲肠内容物 0.1g,加 0.9ml 稀释液,在涡旋器上 200 次/min 振荡 10min,均质化的标本为 10^{-1} 稀释度,取此稀释度标本 0.1ml 加入稀释液 0.9ml 混匀,该稀释度为 10^{-2} 稀释度,如此次第稀释到 10^{-6} 稀释度。取 EMB、EC、LBS、BS 和沙氏培养基分别作肠杆菌、肠球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌和白色念珠菌培养和计数。取 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 3 个稀释度,每次取 10μl 标本液滴种于培养基上,每个稀释度接种 3 个滴液,以便计算均值。将 BS 和 LBS 培养基放入厌氧罐中采用 Gaspak 厌氧法培养,37℃厌氧培养 48~72h,将 EMB、EC 和沙氏培养基放入 37℃孵箱需氧培养,24~48h 后观察结果。选择菌落数在 10~50 个的稀释度进行菌落计算,结果以 Log 的菌落形成单位/g(CFU/g)表示。菌株的鉴定:根据菌落形态特征、革兰氏染色、镜下菌体形态及生化反应进行鉴别。

计算公式:CFU/g= 每稀释度平均菌落数×稀释倍数/滴种体积(ml)

1.3.3 小鼠粪便含水量检测 每日定时用分析天平称取新鲜粪便放入已经称重的 EP 管中,置于台式加热器上 100℃烘烤过夜,再次称重,计算粪便含水量=(新鲜粪便重量-烘烤后粪便重量)/新鲜粪便重量×100%。

1.3.4 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)细胞分类计数 小鼠去眼球放血致死后仰卧位固定,分离颈部皮肤暴露气管,以留置针进行气管插管,0.5ml 预冷 PBS 灌洗 2 次,回收率≥80%,取 20μl 灌洗液用血球计数池进行细胞计数后,4℃1200r/min 离心 5min,上清液 -80℃保存备细胞因子检测,细胞沉渣瑞氏染色进行细胞分类计数。

1.3.5 肺部病理观察 取部分左肺组织放入 10%甲醛液固定过夜。常规取材后,进行梯度酒精脱水,组织透明处理,浸蜡,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察肺组织病理改变。

1.3.6 BALF 中 IL-4 和 IFN-γ 含量测定 根据说明书操作,标本不稀释,标准品按要求倍比稀释,每个标本检测两个复孔。

1.3.7 转录因子 T-bet 和 GATA-3 mRNA 表达水平的 RT-PCR 检测 按 Trizol 使用说明提取肺组织总 RNA,核酸定量仪定量后取 1ug RNA 逆转录合成 cDNA 进行 PCR。小鼠 β-actin 上游引物序列为 5-ACCAACTGGGACGACATGGA-GAAGATC-3',下游引物序列为 5-TAGCCACGCTCG-GTCAGGATCTTCAT-3,退火温度为 59℃,产物为 366bp;T-bet 上游引物序列为 5-AACCAGTATCCTGTTCCCAGC-3',下游引物序列为 5-TGTCGCCACTGGAAGGATAG-3',退火温度为 57℃,产物为 439bp;GATA-3 上游引物序列为 5-GAAGGCATCCAGACCCGAAAC-3',下游引物序列为 5-ACCCATGGCGGTGACCATGC-3',退火温度为 55℃,产物为 255bp。产物用 1.5%琼脂糖电泳,凝胶成像系统扫描,Quantity one V4.4 软件进行定量分析。

1.4 统计方法

所有数据采用 SPSS11.0 统计软件分析,各组检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组比较采用方差分析或者非参数检验(方差齐时采用方差分析,方差不齐时采用非参数检验),组间比较采用 LSD 或者 Nemeny 法,$P<0.05$ 为差异,有统计学意义。

2 结 果

2.1 肠道菌群培养计数

表 1 肠道菌群数量(lg^n/g)

组别	肠球菌	肠杆菌	双歧杆菌	乳酸杆菌	白色念珠菌
对照组	7.139±0.083	7.405±0.051	8.420±0.065	7.155±0.089	0
抗生素组	6.199±0.052	6.334±0.046	7.368±0.063	6.445±0.032	5.337±0.079
t 值	30.38*	49.32*	36.56*	23.72*	213.0*

注:n=10,*P<0.01

维普资讯 http://www.cqvip.com

小鼠肠道内细菌计数结果如表 1，其中对照组未检测到白色念珠菌。抗生素组小鼠肠道内肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌较对照组减少，白色念珠菌增加($P<0.01$)，表明肠道菌群的种类、数量和比例发生异常变化，偏离正常的生理组合，转变为病理性组合状态，出现肠道菌群失调。

2.2 粪便含水量测定

口服头孢哌酮后，小鼠粪便含水量如图 1 所示，对照组粪便含水量基本不变(约 43%)，而抗生素组 1~5 天粪便含水量逐渐增加，5~7 天时粪便含水量为 62%~65%，加用白色念珠菌后，粪便含水量增至 67.9%。

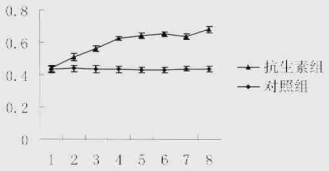


图 1 小鼠粪便含水量测定

2.3 小鼠体重变化

实验第 0 天抗生素组和对照组小鼠体重没有差异($P>0.05$)，加用抗生素 1 周并经口给予白色念珠菌后，抗生素组小鼠体重不增或有所下降，对照组小鼠体重均有增加，实验第 8 天时两组小鼠体重有差异($P<0.01$)，两组小鼠第 8 天与第 0 天时体重变化值有明显差异($P<0.01$)，结果见表 2。

表 2 小鼠体重变化(单位：g)

组别	第 0 天体重	第 8 天体重	体重变化
对照组	16.00 ± 0.88	16.91 ± 0.89	0.91 ± 0.43
抗生素组	15.62 ± 1.07	14.93 ± 1.09	−0.69 ± 0.60
t 值	0.86△	4.45*	6.90*

注：n=10，△$P>0.05$；* $P<0.01$

2.4 BALF 中炎症细胞计数和分类

支气管肺泡灌洗液细胞计数和分类结果见表 3，与对照组比较，抗 + 激组和空 + 激组小鼠 BALF 中炎症细胞总数、淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞增加，且抗 + 激组增加的更明显，而抗 + 空组没有明显改变。

表 3 各组小鼠 BALF 中细胞总数及细胞分类比较(单位：10^6/L)

组别	细胞总数	巨噬细胞	淋巴细胞	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞
空 + 空	4.15 ± 0.47	3.66 ± 0.45	0.17 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.03 ± 0.03
空 + 激	5.65 ± 0.58*	4.45 ± 0.51	0.28 ± 0.06*	0.71 ± 0.14*	0.21 ± 0.06*
抗 + 空	3.90 ± 0.62	3.43 ± 0.55	0.19 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.02 ± 0.03
抗 + 激	7.30 ± 0.89*△	5.11 ± 0.71*△	0.53 ± 0.10*△	1.01 ± 0.14*△	0.65 ± 0.09*△

注：n=10，* 与对照组比较 $P<0.05$，△与空 + 激组比较 $P<0.05$。

2.5 肺组织病理学改变

各组小鼠肺组织病理切片没有明显改变，肺组织基本无炎性改变，肺泡间隔无增厚，没有明显炎症细胞浸润。

2.6 BALF 中 IFN-γ 和 IL-4 的含量

与对照组相比所有组 BALF 中 IFN-γ 水平没有显著差异(见表 4)，但是抗 + 激组小鼠的 BALF 中 IL-4 水平较对照组增高($P<0.05$)，表明肠道菌群失调后进行气道屋尘螨变应原激发可诱发肺部 Th2 型反应，而单纯抗生素使用导致肠道菌群失调或单纯变应原激发对肺部 Th1/Th2 平衡没有影响。

表 4 各组小鼠 BALF 中 IFN-γ 和 IL-4 检测(单位：pg/ml)

组别	IFN-γ	IL-4(pg/ml)
空 + 空	40.06 ± 17.65	35.32 ± 2.53
空 + 激	41.23 ± 12.96	37.94 ± 5.48
抗 + 空	42.85 ± 15.54	33.80 ± 2.82
抗 + 激	34.11 ± 7.02	49.47 ± 3.99*

注：n=10，* 与对照组比较 $P<0.05$

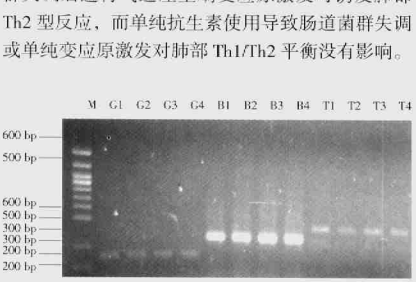


图 2 肺组织 T-bet，GATA-3 和 β-actin 的 PCR 结果电泳图

注：M 为 marker，1 为对照组，2 为单纯激发组组，3 为单纯抗生素组，4 为抗生素加屋尘螨变应原激发组，标有 G 的为 GATA-3，标有 B 的为 β-actin，标有 T 的为 T-bet。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5 T-bet 和 GATA-3 定量分析结果

组别	T-bet/β-actin	GATA-3/β-actin	T-bet/GATA-3
空+空	0.30±0.019	0.41±0.020	0.8±0.035
空+激	0.31±0.018	0.40±0.013	0.77±0.059
抗+空	0.32±0.019	0.42±0.015	0.78±0.050
抗+激	0.31±0.020	0.65±0.015△	0.47±0.032△

注:$n=10$,△与对照组比 $P<0.05$

2.7 转录因子 T-bet 和 GATA-3 的表达水平

肺组织 T-bet,GATA-3 和 β-actin 的 PCR 产物电泳结果如图 2,以 β-actin 为参照,用 Quantity one 软件进行定量分析各组转录因子 mRNA 表达水平(见表 5),结果显示抗生素加屋尘螨变应原激发组小鼠肺部 GATA-3 mRNA 表达水平较对照组高,T-bet mRNA 表达水平没有差异,T-bet/GATA-3 的比值较对照组低。

3 讨 论

支气管哮喘是气道变应性炎症,变应原在哮喘的发生与发展中起重要作用,导致哮喘的变应原多数为吸入性,所以支气管哮喘动物模型多采用变应原系统致敏后,再经气道吸入相同变应原诱导变应性发生。制作哮喘模型的变应原主要有卵蛋白(OVA)、尘螨(dust mite)、蛔虫卵、真菌和花粉等。其中尘螨是哮喘的重要室内变应原[1],哮喘患者 80%对尘螨过敏,能引起变应性反应的尘螨中最常见的就是屋尘螨(Dermatophagoides pteronyssinus)。尘螨能刺激 IgE 产生和嗜酸性粒细胞在气道浸润,诱发气道高反应性,是典型的 Th2 类免疫反应刺激剂,其暴露量与哮喘患病率和严重程度呈正相关[2],因此,使用屋尘螨诱发的变应性模型能很好的反应哮喘的特征,但是不经过系统致敏而直接气道激发很难诱导出变应性气道反应。

肠道固有菌群的持续刺激被认为是免疫成熟所必需的,肠道内正常细菌如乳酸杆菌能刺激外周血细胞产生 IL-12、IL-18、IFN-γ 等细胞因子[3],正常肠道微生物有诱导 Th1 反应、抑制 Th2 反应的作用,从而减少发生变应性疾病的机会。而肠道菌群失调则可阻止 Th1 细胞成熟,促进 Th2 细胞分化。Oyama N[4]等连续7天给3周大小的 BALB/c 小鼠用卡那霉素导致小鼠肠道菌群失调,发现血清中总 IgG1 和 IgE 升高,IgG2 水平降低,脾细胞体外经抗 CD3 抗体刺激后 IL-4 分泌增加而 IFN-γ 降低,提示抗生素导致菌群失调可以阻止 Th1 细胞成熟,促经 Th2 细胞分化。因此我们希望在肠道菌群失调的情况下直接用变应原激发,诱导肺部变应性。

我们选用临床上常用的头孢菌素类抗生素处理小鼠,通过大剂量长时间给小鼠使用头孢哌酮,并经口给予白色念珠菌,进一步促进其菌群失调来建立肠道菌群失调动物模型,以便了解肠道菌群失调对免疫系统的影响。实验发现经头孢哌酮和白色念珠菌处理的小鼠肠道菌群结构发生了改变,表现在肠道内肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌和乳酸杆菌数量下降,白色念珠菌数量上升,小鼠出现大便含水量增加、皮毛凌乱无光泽,体重下降等表现,说明抗生素导致小鼠肠道菌群失调动物模型建立成功。Noverr MC[5]等采用类似方法建立了肠道菌群失调动物模型,发现停用抗生素后 12 天小鼠仍处于肠道菌群失调状态,说明这种肠道菌群失调动物模型比较稳定。

在小鼠肠道菌群失调动物模型的基础上,我们采用屋尘螨变应原诱导变应性气道反应。实验发现经屋尘螨变应原气道诱导后,肠道菌群失调小鼠 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞和 IL-4 的水平较没有肠道菌群失调小鼠明显增加,而 IFN-γ 水平在所有实验组和对照组均无变化,提示肠道菌群失调后气道激发可诱导类似哮喘 Th2 细胞反应的变应性改变,单独使用抗生素而不用屋尘螨变应原气道诱导和不用抗生素而单独使用屋尘螨变应原气道诱导均不出现类似改变。

转录因子 T-bet 特异表达于 Th1 细胞并上调 IFN-γ 的表达,促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,GATA-3 主要表达于 Th2 细胞并上调 Th2 细胞因子的表达,是 Th2 细胞分化所必需的转录因子[6],二者的相互制衡对 T 细胞的分化及其细胞因子的表达至关重要。我们的实验证实肠道菌群失调小鼠经屋尘螨变应原诱导后肺组织 GATA-3 mRNA 表达水平增高,同时 T-bet/GATA-3 的比值较对照组低,从基因水平证实诱导倾向 Th2 细胞反应的气道变应性。

Clarke AH[7]等报道在 C57BL/6 小鼠中,使用极少量的 Der pl 进行皮下注射和滴鼻激发,可以使小鼠肺部出现广泛的嗜酸性粒细胞性炎症。我们也

(下转第 58 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

组在早期相和延迟相的 $^{99}Tc^{m}$-MIBI 摄取比值均明显高于正常对照组。我们通过对部分阴性及可疑病灶的回顾性分析,发现其早期相摄取比值与正常对照相近,但在延迟相均有不同程度的增高,因此对随时间的延长摄取比值增高的病灶应引起我们的高度重视。但具体摄取比值增高多少才能做出阳性诊断,尚需进一步研究。

有关 SPECT 断层显像对 PHPT 的定位诊断是否优于平面显像目前尚有争论,但最近有报道证实,SPECT 断层显像可从三维的角度评价甲状旁腺病灶,并与甲状腺组织分开,对深部病灶、异位病灶及较小的病灶等的诊断均更具价值[8]。本研究中也有 6 个甲状旁腺功能亢进灶通过断层显像才得以证实。因此我们认为,对临床高度怀疑 PHPT,而平面显像又为阴性的病例,应加做 SPECT 断层显像。

参 考 文 献

[1] 唐 玲,王荣福,霍 力.核素显像在甲状旁腺功能亢进诊断中的价值[J].中国医学影像技术,2003;19(7):863-865.

[2] 姜兆明.原发性甲状旁腺机能亢进症的诊断和治疗[J].实用医技杂志,2006;13(3):338-339.

[3] 韩恩昆,刘自宽,高 硕,等.影像学检查在原发性甲状旁腺功能亢进症术前定位诊断中的作用[J].中华普通外科杂志,2004;19(4):219-221.

[4] Rubello D,Casara D,Shapiro B.Recent advances in preoperative and intra-operative nuclear medicine procedures in patients with primary hyperparathyroidism[J].Panmineva Med,2002;44(2):99-101.

[5] Casara D,Rubello D,Cauzzo C,et al.99mTc-MIBI radio-guided minimally invasive parathyroidectomy:experience with patients normal thyroids and nodular goiters[J].J thyroid,2002;12(1):53-56.

[6] 李 艳,李伏燕,吴立兵,等.$^{99}Tc^{m}$-MIBI 双时相显像定位诊断原发性甲状旁腺机能亢进症[J].现代临床医学生物工程学杂志,2005;11(4):305-307.

[7] Taillefer R,Boucher Y,Potvin C,et al.Detection and localization of parathyroid adenomas in patients with hyperparathyroidism using a single radionuclide imaging procedure with technetium-99m-sestasmibi (double-phase study)[J].J Nucl Med,1996;37:798-804.

[8] 王 辉,江旭峰,田伟家,等.$^{99}Tc^{m}$ MIBI 双时相显像评价甲状旁腺机能亢进症的临床研究[J].中国临床医学影像杂志,2002;13(5):320-322.

(上接第 43 页)

采用了小剂量激发的方法,但是难以诱发肺部明显的病理改变炎症,其原因可能是:1 我们采用的是 BALB/c 小鼠,较 C57BL/6 难出现变应性炎症;2 我们没有进行系列的量效对比实验,如果增加激发次数和剂量可能会获得较好的效果;3 组织病理学检测是一种大体标本的检测,并不能显示比较轻微的病理学改变。虽然肺组织病理切片显示肺部无明显的炎症改变,但实验结果显示 BALF 中炎症细胞总数和嗜酸性粒细胞数量增加,同时有 Th2 细胞活化倾向,表明变应性反应已经出现,此结果也提示应重视临床中未出现症状的亚临床变应性反应。

综上所述,我们采用屋尘螨变应原,不经过系统致敏,在抗生素导致小鼠肠道菌群失调动物模型上,直接气道激发,诱导小鼠产生类似哮喘的 Th2 细胞优势的变应性气道反应,建立了一种新的变应性气道反应动物模型,该动物模型出现了肺部 Th2 细胞活化倾向,但没有出现明显病理改变,这种类似亚临床变应性气道反应动物模型值得进一步研究。

参 考 文 献

[1] Milian E,Diaz AM.Allergy to house dust mites and asthma[J].P R Health Sci,2004;23(1):47-57.

[2] Lau S,Illi S,Sommerfeld C,et al.Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma:a cohort study[J].Lancet,2000;356(9239):1392-1397.

[3] Miettinen M,Matikainen S,Vuopio-Varkila J,et al.Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12),IL-18,and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells[J].Infect Immun,1998;66(12):6058-6062.

[4] Oyama N,Sudo N,Sogawa H,et al.Antibiotic use during infancy promotes a shift in the T(H)1/T(H)2 balance toward T(H)2-dominant immunity in mice [J].J Allergy Clin Immunol,2001;107(1):153-159.

[5] Noverr MC,Noggle RM,Toews GB,et al.Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses [J].Infect Immun,2004;72(9):4996-5003.

[6] Szabo SJ,Kim ST,Costa GL,et al.A novel transcription factor,T-bet,directs Th1 lineage commitment[J].Cell,2000;100(6):655-669.

[7] Clarke AH,Thomas WR,Rolland JM,et al.Murine allergic respiratory responses to the major house dust mite allergen Der p 1 [J]. Int Arch Allergy Immunol,1999;120(2):126-134.