

## T-bet 基因转染对哮喘小鼠脾脏 Th1/Th2 平衡的影响

蓝丹, 檀卫平, 夏焱, 吴葆菁, 麦贤弟, 李晓圆, 黄花荣

(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】观察气道内 T-bet 基因转染对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞 Th1/Th2 平衡、T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达的影响。【方法】将 C57BL/6 小鼠 32 只随机分为 4 组, 每组 8 只, 分别为正常对照组(A 组)、哮喘模型组(B 组)、空质粒干预组(C 组)和 T-bet 质粒干预组(D 组)。卵白蛋白(OVA)抗原溶液腹腔注射致敏, 滴鼻造模。空质粒组和 T-bet 质粒干预组 OVA 激发 24 h 前, 分别经鼻滴入 50  $\mu$ g 空质粒、重组 T-bet 质粒, 对照组用生理盐水代替 OVA。最后一次滴鼻激发 48 h 后处死小鼠, 流式细胞仪检测各组实验小鼠的脾脏淋巴细胞的 Th1/Th2, RT-PCR 检测小鼠脾脏淋巴细胞的 T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达。【结果】哮喘小鼠气道转染 pcDNA3-T-bet 质粒后:①流式细胞仪检测发现, 脾脏 Th1 百分率较哮喘模型组显著升高 [(2.29  $\pm$  1.55)% vs. (1.93  $\pm$  1.14)%,  $P < 0.05$ ], Th2 百分率显著降低 [(0.93  $\pm$  0.64)% vs. (1.63  $\pm$  0.59)%];②RT-PCR 检测发现脾脏淋巴细胞转录因子 T-bet mRNA 表达水平显著增加 (0.53  $\pm$  0.027 vs. 0.28  $\pm$  0.035,  $P < 0.05$ ), GATA-3 mRNA 表达水平显著降低 (0.24  $\pm$  0.022 vs. 0.58  $\pm$  0.038,  $P < 0.05$ )。而 pcDNA3 空质粒干预后与哮喘模型组比较无显著差异。【结论】气道内转染 pcDNA3-T-bet 质粒后, 可显著上调哮喘小鼠体内 T-bet mRNA 表达, 下调 GATA-3 mRNA 表达, 有效改善哮喘小鼠体内 Th1/Th2 比例失衡, 从而抑制哮喘小鼠的气道炎症, 为哮喘的 T-bet 基因治疗提供依据。

**关键词:** 哮喘; T-bet; GATA-3; Th1; Th2

**中图分类号:** R725.6

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2010)01-0074-05

### Effect of Intranasal T-bet Plasmid Transfer on Th1/Th2 Balance in Spleen MNC in a Established Murine Allergic Asthmatic Model

LAN Dan, TAN Wei-ping, XIA Yan, WU Bao-jing, MAI Xian-di, LI Xiao-yuan, HUANG Hua-rong

(Pediatric Department, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study was designed to determine Th1, Th2 cell numbers and investigate T-bet mRNA, GATA-3 mRNA expression of spleen MNC in a murine asthmatic model which intended to understand effect of airway T-bet plasmid gene transfer on Th differentiation. 【Methods】 A mouse asthmatic model was established by sensitization with ovalbumin (OVA). Thirty-two C57BL/6 mice were divided into four groups (8 mice in each group): the normal control group (group A), the asthmatic model group (group B), the pcDNA3 plasmid group (group C), the pcDNA3-T-bet group (group D). All animals were sensitized and challenged with OVA, except group A normal saline was applied. The group C was intranasally administered 50  $\mu$ g pcDNA3 plasmid at 24 h before intranasal challenges, and the 50  $\mu$ g pcDNA3-T-bet plasmid for the mice of group D. We investigated Th1 and Th2 cell numbers by FACS and T-bet, GATA-3 mRNA expression of spleen mononuclear cells (MNC) by semi-quantitative PCR in the four groups. 【Result】 Th1 percent in spleen MNC of pcDNA3-T-bet treated mice was significantly increased [(2.29  $\pm$  1.55)% vs. (1.93  $\pm$  1.14)%,  $P < 0.05$ ], while Th2 percent was significantly decreased [(0.93  $\pm$  0.64)% vs. (1.63  $\pm$  0.59)%], compared with that of the asthmatic control group mice by FACS. Spleen MNC was detected a high level of T-bet mRNA expression (0.53  $\pm$  0.027 vs. 0.28  $\pm$  0.035,  $P < 0.05$ ) and a low level of GATA-3 mRNA expression (0.24  $\pm$  0.022 vs. 0.58  $\pm$  0.038,  $P < 0.05$ ) after pcDNA3-T-bet treatment by RT-PCR. There was no significant change between the pcDNA3 plasmid

收稿日期: 2009-04-24

基金项目: 广东省自然科学基金(031668A, 06021301A)

作者简介: 蓝丹, 硕士生, E-mail: landan020@163.com; \* 通信作者: 檀卫平, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 儿童哮喘、免疫, E-mail: weptan@yahoo.com.cn

group and the asthmatic model group. 【Conclusion】 The intranasal transfer of pcDNA3-T-bet plasmid was effective in modulating the imbalance of Th1/Th2 in mice asthma model, which provides a novel therapeutic strategy for transferring transcriptional factor in allergic asthma.

**Key words:** asthma; T-bet; GATA-3; Th1; Th2

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1): 74-78]

支气管哮喘(简称哮喘)是一种常见的严重危害人类健康的疾病,发病率高,治疗棘手。哮喘发病机制较为复杂,研究表明哮喘的本质是气道的慢性炎症,其中 Th1/Th2 平衡失调,即 Th1 功能不足与 Th2 功能亢进是气道炎症发生的基础。增强 Th1 活性或抑制 Th2 功能成为近年哮喘治疗的新策略<sup>[1-2]</sup>。我们前期研究发现哮喘患儿 Th1/Th2 失衡直接源于其上游转录因子 T 细胞 T 盒蛋白(T-box expressed in T cells, T-bet)/GATA 结合蛋白(GATA-binding protein, GATA)-3 平衡失调<sup>[3]</sup>, Th1 特异性转录因子 T-bet 基因缺失可导致小鼠自发出现哮喘样气道炎症表现<sup>[4]</sup>。体外研究显示, T-bet 能够阻断或抑制 Th2 分化的信号,甚至还能诱导已定向 Th2 的细胞向相反的 Th1 方向分化<sup>[5]</sup>。T-bet 因而成为哮喘基因治疗的热门靶点。本研究在成功构建小鼠 T-bet 基因真核表达载体的基础上<sup>[6]</sup>,进一步研究气道内 T-bet 基因转染对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞 Th1/Th2 平衡的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA): V 级购自美国 Sigma 公司, pcDNA3(-)、Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司, Cychrome 标记的大鼠抗小鼠 CD3、CD4, PE 标记的大鼠抗小鼠干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$ 、白介素(interleukin, IL)-4 均购自美国 BD 公司, 小鼠 T-bet、GATA-3 及  $\beta$ -肌动蛋白(actin)检测引物由上海博亚生物工程有限公司合成。

### 1.2 主要仪器

光学显微镜: 日本 Olympus 公司, -20 °C 低温冰箱: 日本 SANYO 公司, 低温高速离心机: 美国 BECKMAN 公司, CO<sub>2</sub> 细胞培养箱: 美国 Shelllab 公司, 流式细胞仪(fluorescence-activated cell sorter, FACS): 美国 Beckman Coulter 公司。

### 1.3 实验动物

健康 5 ~ 6 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠,

(12  $\pm$  2) g, 购自第一军医大学实验动物中心, 合格证号: 广东省实验动物检测所合格证 2002A038、2002B020 号。本校实验动物中心按 SPF 级饲养, 环境温度 25 °C, 湿度 70%。

### 1.4 实验动物分组

健康 5 ~ 6 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 32 只, 随机分为 4 组, 每组 8 只, 分别为正常对照组(A 组)、哮喘模型组(B 组)、模型 pcDNA3 空质粒干预组(C 组)和模型 pcDNA3-T-bet 质粒干预组(D 组)。

### 1.5 实验方案

①哮喘模型组(B 组): 每只小鼠腹腔注射抗原溶液 0.1% OVA 0.1 mL, 100 g/L 氢氧化铝 0.2 mL 进行致敏, 第 14 天、21 天同样剂量、方法加强; 然后于第 28、29、30 天连续 3 d 用 3 g/L 戊巴比妥钠 0.3 mL 腹腔注射麻醉小鼠后, 1% OVA 溶液 50  $\mu$ L 滴鼻激发; ②正常对照组(A 组): 方法和步骤同上, 采用生理盐水代替 0.1% OVA; ③空质粒干预组(C 组): 采用上述方法建立哮喘模型, 在诱导哮喘的第 27 d, 戊巴比妥钠麻醉后经鼻滴入空质粒 pcDNA3(-)和 Lipofentamine 2000 混合液 50  $\mu$ L, 两者体积比 1:2, 后转动小鼠身体, 空质粒在气道内分布均匀; ④T-bet 质粒干预组(D 组): 方法同空质粒组, 第 27 天采用 pcDNA3-T-bet 代替空质粒滴鼻。4 组小鼠最后一次滴鼻激发 48 h 后处死小鼠。

### 1.6 小鼠脾脏淋巴细胞 Th1/Th2 平衡的三色荧光流式细胞仪检测

1.6.1 小鼠脾脏单个核细胞的分离与培养 无菌条件下将脾组织切块、剪碎, 以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)研成组织匀浆, 收集细胞悬液, 经过滤后, 800 r/min ( $r = 5.8$  cm) 离心 5 min, 以 PBS 洗两次, 离心沉淀, 再以 6 mL PBS 重悬。以淋巴细胞分离液常规分离脾脏单个核细胞, 将以上脾淋巴细胞用 100 mL/L 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的培养基 RPMI-1640 按 1  $\times$  10<sup>6</sup>/mL 配成细胞悬液, 加佛波醇酯(PMA) 25  $\mu$ g/mL, 离子霉素(ionomycin) 1  $\mu$ g/mL 作刺激原, 同时

加蛋白质转运抑制剂 (monensin) 2  $\mu\text{mol/L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养 6 h。

1.6.2 小鼠脾脏单个核细胞的流式细胞仪检测 裂解红细胞, 2 mL DPBS 缓冲液洗 1 次, 弃上清, 大鼠抗小鼠 CD3-TC 50  $\mu\text{L}$ 、CD4- 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 50  $\mu\text{L}$ , 室温避光 45 min。同时做空白对照及同种阴性对照, 2 mL 缓冲液洗 1 次, 1 500 r/min ( $r = 5.8 \text{ cm}$ ) 离心 5 min, 弃上清。加 40 g/L 多聚甲醛 500  $\mu\text{L}$ , 固定 20 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。然后加含 0.1% 皂素的缓冲液 2 mL 破膜 10 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。再用大鼠抗小鼠 IFN- $\gamma$ -PE 及大鼠抗小鼠 IL-4-PE 单抗 (0.2  $\mu\text{g}/\text{管}$ ) 室温避光孵育 30 min, 2 mL 含 0.1% 皂素的缓冲液洗 1 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。最后用 500  $\mu\text{L}$  DPBS/2% 多聚甲醛悬浮细胞, 上机检测, 每一样品检测 20 000 个细胞。

### 1.7 逆转录-聚合酶链反应检测小鼠脾脏淋巴细胞 T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达

淋巴细胞总 RNA 提取与定量, 参照 TRIZOL 说明书进行。1% 琼脂糖电泳分析 RNA 的完整性, RNA 用荧光分光光度计定量后置 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA 根据逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA。所得第一链 cDNA 产物迅速冰浴后置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。小鼠 T-bet 引物可扩增长度为 374 bp (F: 5'-gggtctctgggaagctgagag-3', R: 5'-tctgggtcacattgttgaa-3'), 小鼠 GATA-3 引物可扩增长度为 556 bp (F: 5'-ccagcaccagacagatga-3', R: 5'-gttgacagttgggtccaggt-3'),  $\beta$ -actin 引物可扩增片段长度为 259 bp (F: 5'-gtggccgccccgacacca-3', R: 5'-cggtggccttgggattag-3')。PCR 反应体系: 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP Mix 5  $\mu\text{L}$ , cDNA (RT 产物) 2  $\mu\text{L}$ , 上游引物 20  $\mu\text{mol/L}$ , 下游引物 20  $\mu\text{mol/L}$ , Taq polymerase 0.25  $\mu\text{L}$ , 灭菌水调总反应体积为 50  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。取 T-bet、GATA3 及  $\beta$ -actin 扩增产物 10  $\mu\text{L}$  在 1.2% 琼脂糖凝胶中, 100 V 电泳 20 min。凝胶电泳图像输入 Kodak digital Science System DC40 凝胶成像系统, 应用图像分析软件进行各条带平均灰度值分析, 以同时扩增的  $\beta$ -actin 为内参照, 用转录因子/ $\beta$ -actin 的比值表示转录因子相对表达量。

### 1.8 统计学处理

数据用均数  $\pm$  标准差表示, 各组间均数比较采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析, 检验水平  $\alpha = 0.05$  (双侧)。

## 2 结 果

### 2.1 小鼠脾脏淋巴细胞 Th1/Th2 测定结果

哮喘模型组 Th1 百分率和 Th1/Th2 比值均显著低于正常对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), Th2 细胞百分率显著高于模型对照组 ( $P < 0.05$ ); 经 T-bet 转染后, Th1 百分率和 Th1/Th2 比值均显著升高 ( $P$  均  $< 0.05$ ), Th2 细胞百分率显著降低 ( $P < 0.05$ )。空质粒干预后, Th1、Th2 百分率和 Th1/Th2 比值差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 表 1)。

表 1 哮喘小鼠脾脏淋巴细胞 Th1/Th2 比值

Table 1 Ratio of spleen Th1/Th2 cell number of murine asthmatic model

Group	n	Th1 (%)	Th2 (%)	Th1/Th2
Normal control	8	2.69 $\pm$ 0.68	0.91 $\pm$ 0.57	3.09 $\pm$ 0.47
Asthmatic model	8	1.93 $\pm$ 1.14 <sup>1)</sup>	1.63 $\pm$ 0.59 <sup>1)</sup>	1.33 $\pm$ 0.65 <sup>1)</sup>
pcDNA3 control	8	1.91 $\pm$ 0.81 <sup>1)</sup>	1.56 $\pm$ 0.32 <sup>1)</sup>	1.21 $\pm$ 0.29 <sup>1)</sup>
pcDNA3-T-bet	8	2.29 $\pm$ 1.55 <sup>1)2)</sup>	0.93 $\pm$ 0.64 <sup>1)2)</sup>	2.32 $\pm$ 0.25 <sup>1)2)</sup>
F		68.32	47.79	113.65

1) compared with normal control,  $P < 0.05$ ; 2) compared with pcDNA3 control,  $P < 0.05$

### 2.2 小鼠脾脏淋巴细胞 T-bet 及 GATA-3 mRNA 检测结果

哮喘模型组小鼠脾脏淋巴细胞转录因子 T-bet mRNA 表达水平显著低于正常对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 转录因子 GATA-3 mRNA 表达水平显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ); 经 pcDNA3-T-bet 转导后 T-bet mRNA 表达水平较哮喘模型组显著升高 ( $P < 0.05$ )。空质粒干预后, T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达水平较哮喘模型组无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。(表 2, 图 1)。

### 2.3 小鼠脾脏淋巴细胞 T-bet/GATA-3 mRNA 表达水平与 Th1/Th2 间的相关分析

小鼠脾脏淋巴细胞 T-bet mRNA 表达量与 Th1 细胞比率呈正相关 ( $r = 0.745$ ), 与 Th2 细胞比率呈负相关 ( $r = -0.627$ ); GATA-3 mRNA 表达量与 Th1 细胞比率呈负相关 ( $r = -0.602$ ), 与 Th2 细

表 2 小鼠脾脏淋巴细胞 T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达水平比较

Table 2 Expression of T-bet and GATA-3 mRNA in spleen MNC of murine asthmatic model

Group	n	T-bet/ $\beta$ -actin	GATA-3/ $\beta$ -actin	T-bet/GATA-3
Normal control	8	0.63 $\pm$ 0.041	0.13 $\pm$ 0.012	5.11 $\pm$ 0.213
Asthmatic model	8	0.28 $\pm$ 0.035 <sup>1)</sup>	0.58 $\pm$ 0.038 <sup>1)</sup>	0.52 $\pm$ 0.013 <sup>1)</sup>
pcDNA3 control	8	0.31 $\pm$ 0.051 <sup>1)</sup>	0.53 $\pm$ 0.036 <sup>1)</sup>	0.67 $\pm$ 0.049 <sup>1)</sup>
pcDNA3 -T-bet	8	0.53 $\pm$ 0.027 <sup>1)2)</sup>	0.24 $\pm$ 0.022 <sup>1)2)</sup>	2.26 $\pm$ 0.316 <sup>1)2)</sup>
<i>F</i>		87.33	105.78	134.97

1) compared with normal control,  $P < 0.05$ ; 2) compared with pcDNA3 control,  $P < 0.05$

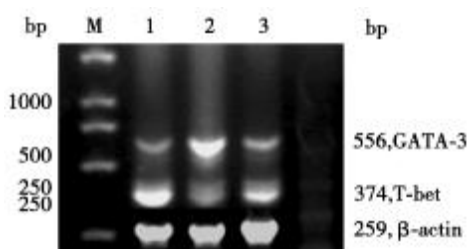


图 1 小鼠脾脏 T-bet /GATA-3 mRNA 表达

Fig.1 Expression of T-bet/GATA-3 mRNA in spleen MNC of mouse

Lane 1: normal control; 2: asthmatic model; 3: pcDNA3-T-bet group Expression of T-bet and GATA-3 mRNA in spleen MNC was analyzed by RT-PCR. The results showed that T-bet mRNA in asthmatic model group were lower, while GATA-3 mRNA was higher than those of control group ( $P < 0.05$ ). After pcDNA3-T-bet treatment, T-bet mRNA increased, while GATA-3 mRNA decreased significantly ( $P > 0.05$ ), M: DL2000

胞比率呈正相关( $r = 0.697$ ); T-bet/GATA-3 mRNA 比值与 Th1 细胞比率呈正相关( $r = 0.887$ ), 与 Th2 细胞比率呈负相关( $r = -0.893$ ), 与 Th1/Th2 比值呈正相关( $r = 0.629$ )。

### 3 讨 论

哮喘发病机制十分复杂, 目前越来越多的学者认为哮喘的本质是气道的慢性炎症, Th1/Th2 平衡失调是气道炎症发生的基础。本实验中哮喘模型组小鼠脾脏淋巴细胞也表现为 Th1 细胞比例降低, Th2 细胞比例升高, 完全符合上述机制。随着分子免疫学与分子生物学的发展和对哮喘发病机制的深入研究, 免疫治疗突破了传统的概念, 有了较大更新与拓展, 使人们有可能在基因水平上

对哮喘进行免疫治疗, 即免疫纠偏基因治疗成为哮喘研究的一个新的方向。在细胞因子水平干预治疗来纠正 Th1/Th2 失衡是新的哮喘免疫治疗策略, 国内外在这方面进行了大量的研究, 包括用 Th2 因子基因封闭和 Th1 因子基因转染治疗, 效果并不满意<sup>[7-8]</sup>。Th1、Th2 特异性转录因子 T-bet、GATA-3 基因的发现为哮喘基因治疗带来了新的希望, 调控 T-bet/GATA-3 基因的表达可以从 Th1/Th2 细胞分化上游控制 Th1/Th2 平衡<sup>[9]</sup>, 克服了单一细胞因子作用的片面性<sup>[10]</sup>。Szabo 等体外研究发现逆转录病毒介导的 T-bet 基因传导, 可使已分化的 Th2 细胞向 Th1 细胞逆转<sup>[5]</sup>。这一点在哮喘治疗中具有特殊意义。

本研究采用脂质体包裹 pcDNA3-T-bet 质粒, 滴鼻方式气道内转导, 结果发现气道内转导 T-bet 质粒 120 小时后, 哮喘小鼠脾脏淋巴细胞 T-bet/GATA-3 mRNA 平衡与脾脏淋巴细胞 Th1/Th2 比例失衡均得到有效纠正, pcDNA3 空质粒干预则无此作用。其作用机制可能是 pcDNA3-T-bet 质粒经气道上皮转染表达后, 由局部树突状细胞呈递到淋巴细胞, 经淋巴及血液循环到胸腺及脾脏组织, 通过调节脾脏淋巴细胞 T-bet /GATA-3 mRNA 表达, 进而调节 Th1/Th2 平衡失调<sup>[11]</sup>。pcDNA3-T-bet 质粒经气道途径转染治疗哮喘的优势在于, 不仅能直接抑制气道炎症, 同时可避免全身用药时容易诱导抗体的产生, 而导致基因治疗失败可能<sup>[12]</sup>。T-bet 基因治疗是对哮喘经典治疗的有益补充, 有可能为难治性哮喘特别是激素耐药性哮喘治疗带来新的希望。

目前用于基因治疗的载体系统很多, 和病毒载体相比, 虽然质粒 DNA 载体转移效率较低, 但它不存在致病、致突变等安全性问题, 且无免疫原性, 可以反复应用而不产生中和抗体。此外, 质粒 DNA 易纯化、稳定而利于保存。因此, 不失为一种理想的载体系统。本课题前期已成功构建并扩增纯化出高滴度的 pcDNA3-T-bet 质粒<sup>[6]</sup>。在此基础上, 我们发现经气道内转染 T-bet 能有效改善小鼠的 Th1/Th2 失衡, 对气道炎症有显著的抑制作用, 为将来哮喘治疗研究提供了新的思路。但哮喘动物模型实验的结果能否在人体取得相同的预期结果, 尚有待于进一步探索。随着人们对哮喘发病机制的深入认识和基因转移技术的迅速发展, 有可能将 T-bet 基因, 通过高效、无毒基因载体应用于

临床,从而为哮喘患者提供崭新的选择<sup>[13]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Park JW, Min HJ, Sohn JH, et al. Restoration of T-box-containing protein expressed in T cells protects against allergen-induced asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009,123(2):479-485.
- [2] Ko FW, Lun SW, Wong CK, et al. Decreased T-bet expression and changes in chemokine levels in adults with asthma [J]. *Clin Exp Immunol*, 2007,147(3):526-532.
- [3] 檀卫平,麦贤弟,吴葆菁,等. 哮喘患儿转录因子 T-bet/GATA-3 mRNA 表达及其与 Tc1/Tc2 平衡间的关系 [J]. *中华儿科杂志*,2007,45(4):284-287.
- [4] Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet [J]. *Science*, 2002,295(5553):336-338.
- [5] Mullen AC, High FA, Hutchins AS, et al. Role of T-bet in commitment of Th1 cells before IL-12-dependent selection [J]. *Science*, 2001,292(5523):1907-1910.
- [6] 檀卫平,麦友刚,黄嘉凌,等. 小鼠 T-bet 基因真核表达载体的构建 [J]. *广东医学*,2005,26(10):1332-1334.
- [7] Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment

of chronic airway diseases [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003,14(6):511-522.

- [8] Leckie MJ. Anti-interleukin-5 monoclonal antibodies: preclinical and clinical evidence in asthma models [J]. *Am J Respir Med*, 2003,2(3):245-259.
- [9] Dong L, Chen M, Zhang, et al. T-bet/GATA-3 ratio is a surrogate measure of Th1/Th2 cytokine profiles and may be novel targets for CpG ODN treatment in asthma patients [J]. *Chin Med J*, 2006,119(16):1396-1399.
- [10] Finotto S, Glimcher L. T cell directives for transcriptional regulation in asthma [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 2004,25(3-4):281-294.
- [11] Hohler T, Reuss E, Adams P. A genetic basis for IFN-gamma production and T-bet expression in humans [J]. *J Immunol*, 2005,175(8):5457-5462.
- [12] Wang SY, Yang M, Xu XP, et al. Intranasal delivery of T-bet modulates the profile of helper T cell immune responses in experimental asthma [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2008,18(5):357-365.
- [13] Gill DR, Davies LA, Pringle IA, et al. The development of gene therapy for disease of lung [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004,61(3):355-368.

(编辑 张恩健)

(上接第 54 页 from page 54)

- (3-4):131-140.
- [9] Berridge MJ. Unlocking the secrets of cell signaling [J]. *Annu Rev Physiol*, 2005,67:1-21.
- [10] Roderick HL, Bootman MD. Pacemaking, arrhythmias, inotropy and hypertrophy: the many possible facets of IP<sub>3</sub> signalling in cardiac myocytes [J]. *J Physiol*, 2007,581(3):883-884.
- [11] Kockskämper J, Zima AV, Roderick HL, et al. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008,45(2):128-147.
- [12] Luisa Gorza, Stefano Schiaffino, Pompeo Volpe. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in heart: evidence for its concentration in Purkinje myocytes of the conduction system [J]. *J Cell Biol*, 1993,121(2):345-353.

- [13] Woodcock EA, Matkovich SJ. Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> receptors and inositol phosphates in the heart-evolutionary artifacts or active signal transducers? [J]. *Pharmacol Ther*, 2005,107(2):240-251.
- [14] Li X, Zima AV, Sheikh F, et al. Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)-receptor type 2-deficient mice [J]. *Circ Res*, 2005,96(12):1274-1281.
- [15] Domeier TL, Zima AV, Maxwell JT, et al. IP<sub>3</sub> receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008,294(2):596-604.

(编辑 孙慧兰)