

· 实验研究 ·

孟鲁司特和卡介苗多糖核酸对哮喘大鼠血单个核细胞中 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 表达的影响

金耀建¹, 宋志燕², 胡野¹, 钱旭波¹, 王晓杨¹, 何旭瑛¹

(1 金华职业技术学院医学院免疫学教研室, 浙江 金华 321017; 2 金华市中医医院, 浙江 金华 321017)

[摘要] 目的 研究孟鲁司特和卡介苗多糖核酸对哮喘大鼠血单个核细胞中信号转导子和转录激活子 5b (STAT5b) mRNA 和白细胞介素 4 (IL-4) mRNA 的转录表达的影响。方法 52 只体重为 140~200 g 清洁级 Sprague-Dawley 雄性大鼠, 随机分为 4 组: 哮喘组、孟鲁司特组、卡介苗多糖核酸组和正常对照组。用卵白蛋白制备大鼠哮喘模型。计数血中嗜酸性粒细胞 (EOS); 应用双抗体夹心酶联免疫吸附试验测定血浆中 IL-4 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 浓度; 采用 SYBR GREEN 荧光实时定量 PCR 法测定 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的相对表达量。结果 ① 哮喘组血单个核细胞中 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的表达量高于其他各组 ($P < 0.01$); 在孟鲁司特组和卡介苗多糖核酸组中两者的表达量相近 ($P > 0.05$)。哮喘组除了 IFN- γ 水平低外, 其余无论是 STAT5b mRNA、IL-4 mRNA、EOS 绝对值等都是 4 组中最高的 ($P < 0.01$); 除哮喘组外, 其余组的各项指标相近 ($P > 0.05$)。② STAT5b mRNA 表达量与 IL-4 mRNA 表达量、IL-4 浓度、EOS 绝对值呈正相关 ($P < 0.01$), 与 IFN- γ 浓度呈负相关 ($P < 0.01$)。结论 哮喘大鼠血单个核细胞中 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的表达增强且呈正相关; 孟鲁司特和卡介苗多糖核酸可以下调 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的表达, 可能为其抑制哮喘气道炎症形成的重要机制之一。

[中国当代儿科杂志, 2009 11(2): 133-137]

[关键词] 哮喘; 孟鲁司特; 卡介苗多糖核酸; STAT5b mRNA; IL-4 mRNA; 大鼠

[中图分类号] R562.2 R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)02-0133-05

Effects of montelukast and BCG-PSN on the expression of STAT5b mRNA and IL-4 mRNA in blood mononuclear cells of rats with asthma

JIN Yao Jian, SONG Zhi Yan, HU Ye, QIAN Xu Bo, WANG Xiao Yang, HE Xu Ying. Department of Immunology, Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua, Zhejiang 321007, China (Email: jin1999@126.com)

Abstract Objective To study the expression of signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) mRNA and interleukin 4 (IL-4) mRNA in blood mononuclear cells in a rat model of asthma and the effect of montelukast (MK) and BCG-polysaccharide and nucleic acid injection (BCG-PSN) on STAT5b mRNA and IL-4 mRNA expression. Methods Fifty two male Sprague-Dawley rats (weight 140-200 g) were randomly divided into four groups: asthma, MK-treated and BCG-PSN-treated and control groups. Rat model of asthma was prepared by ovalbumin (OVA) sensitization. The rats were sacrificed 24 hrs after the last sensitization. Blood eosinophils (EOS) were counted. Plasma contents of IL-4 and interferon- γ (IFN- γ) were measured using ELISA. Expression of STAT5b mRNA and IL-4 mRNA in blood mononuclear cells was detected with SYBR GREEN I fluorescent quantitation PCR method. Results Blood contents of STAT5b mRNA and IL-4 mRNA in the untreated asthma group were significantly higher than those in the other three groups ($P < 0.01$). Blood EOS count and plasma IL-4 contents in the untreated asthma group significantly increased while plasma IFN- γ contents significantly decreased compared with the other three groups ($P < 0.01$). There were no significant differences in the parameters measured among the MK-treated, the BCG-PSN-treated and the control groups. STAT5b mRNA expression was positively correlated to IL-4 mRNA expression, IL-4 content and EOS count ($r = 0.730, 0.650, 0.664$ respectively, $P < 0.01$), but negatively correlated to IFN- γ content ($r = -0.798, P < 0.01$). Conclusions STAT5b mRNA and IL-4 mRNA were strongly expressed in blood mononuclear cells in rats with asthma, and there was a positive correlation between them. MK and BCG-PSN had inhibitory effects on the expression of STAT5b mRNA and IL-4 mRNA, which might be contributed to suppression of airway inflammation in asthma. [Chin J Contemp Pediatr 2009 11(2): 133-137]

Key words: Asthma; Montelukast; BCG-PSN; STAT5b mRNA; IL-4 mRNA; Rats

[收稿日期] 2008-05-02 [修回日期] 2008-06-12

[基金项目] 金华市科学技术研究项目 (2005-1-344)

[作者简介] 金耀建, 男, 硕士, 副教授。主攻方向: 临床免疫学研究。

信号转导子和转录激活子 (signal transducers and activators of transcription, STATs) 是一种新型的能与靶基因调控区 DNA 结合的转录因子家族。近年的许多研究表明, STAT5 蛋白活化、过度表达、持续诱导骨髓中的多能造血干细胞向成熟的 EOS 分化、增殖, 是哮喘时 EOS 生成增多的主要原因^[1~3]。STAT5 在 Th2 细胞的分化和过敏性气道炎症中起重要作用^[4]。

杨玉成等^[5]报道, 卡介苗多糖核酸 (BCG-polysaccharide and nucleic acid injection, BCG-PSN) 治疗变应性鼻炎病人后, 外周血单个核细胞培养上清液中 IL-4、IL-5、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 水平明显降低, IFN- γ 含量显著升高。洗乐武等^[6]报道, 孟鲁司特 (montelukast, MK) 处理后的哮喘大鼠外周血单个核细胞培养液中 IL-4 水平升高而 IFN- γ 水平下降。但 BCG-PSN 和 MK 对 STAT5 b mRNA 和 IL-4 mRNA 的影响鲜有报道。本实验观察 BCG-PSN 和 MK 对 STAT5 b mRNA 和 IL-4 mRNA 表达的影响, 旨在从基因调控水平上探讨哮喘的发病机制和抗哮喘药物的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 52 只, 体重 140~200 g 温州医学院动物实验中心提供; MK (杭州默沙东制药有限公司产品, 规格: 10 mg/片); BCG-PSN (浙江万马药业有限公司产品, 规格: 1 mL/支, 0.5 mg); 淋巴细胞分离液 (上海华精生物高科技有限公司产品); TRI REAGENT (mRNA 抽提剂, 美国 MRC 公司产品); RevertAidTM First strand cDNA Synthesis Kit (逆转录 cDNA 合成试剂盒, 美国 MBI Fermentas 公司产品); SYBR GREEN Master Mix 荧光 PCR 试剂盒, 美国 ABI 公司产品); PCR 仪 (德国 EPPENDORF 公司, 规格: Master Cycler 533); 7000 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司产品); 低温高速离心机 (美国 BECKMAN COULTER 公司产品); IL-4 和 IFN- γ 测定用 ELISA 试剂盒 (购自上海轩昊科技发展有限公司, 美国 R&D 公司生产, 进口分装)。

1.2 方法

1.2.1 哮喘模型的建立和取材 将 52 只雄性 SD 大鼠, 按照随机数字表法分为哮喘组、MK 组、BCG-PSN 组和正常对照组, 每组 13 只。采用卵白蛋白 (OVA V 级, Sigma 公司产品) 制备模型, 哮喘

模型的制备参照叶乐平^[7]和 Paňmans 等^[8]的方法略作修改, 分致敏和激发两个阶段。哮喘组、MK 组、BCG-PSN 组分别于第 1 天和第 9 天, 每只大鼠给予 1.5 mL 含 2 mg OVA 和 100 mg 氢氧化铝凝胶的无菌抗原液, 分 5 处注射 (四肢近侧端内侧皮下各注射 0.2 mL, 腹腔注射 0.7 mL); 正常对照组用不含 OVA 的氢氧化铝凝胶代替抗原液, 注射方法同其他 3 组。第 17 天开始将哮喘组、MK 组和 BCG-PSN 组大鼠分别置于自制的密闭有机玻璃箱 (40 cm \times 30 cm \times 20 cm) 中, 用雾化器 (德国百瑞公司产品) 将含 1% OVA 的无菌生理盐水溶液雾化吸入, 每日 1 次, 每次 20 min 正常对照组用无菌生理盐水代替, 方法同上。MK 组于激发前 3 d (第 14 天) 用 MK 灌胃 (5 mg/kg), 每日 1 次, 第 17 天开始每日激发前 1.5 h 用 MK 灌胃, 剂量同上。BCG-PSN 组于激发前 8 d (第 9 天) 给予腹腔注射 BCG-PSN (0.25 mg/kg), 每日 1 次, 第 17 天开始每日激发前给予腹腔注射 BCG-PSN, 剂量同上。连续激发 6 d 哮喘组大鼠出现烦躁不安、抓鼻、呼吸急促、继而俯伏不动、口唇紫绀等症状, 表明哮喘模型已建立。各组末次激发 24 h 后处死取材。

用 20% 乌拉坦溶液腹腔注射麻醉大鼠 (1.300 mg/kg), 腹主动脉采血 4~5 mL 注入含肝素抗凝剂的无菌试管内, 混匀; 同时, 留取左肺中下段肺组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 包埋, 切片 (4 μ m 厚), 经苏木精伊红染色后观察支气管周围的炎症病变。

1.2.2 血中 IL-4 和 IFN- γ 浓度的测定和 EOS 绝对值计数 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验测定血浆中 IL-4 和 IFN- γ 的浓度, 测定方法按说明书进行操作。EOS 绝对值计数用伊红染色液, 手工计数。

1.2.3 总 mRNA 的抽提和逆转录合成 cDNA 取单个核细胞加 1 mL TRI REAGENT 抽提剂, 以后步骤按说明书操作, 最后将抽提的总 mRNA 溶解于 11 μ L DEPC 处理水中。在含总 mRNA 的 11 μ L DEPC 处理水中加入 Oligo (dT)₁₈ Primer (0.5 μ g/ μ L) 1 μ L 轻轻摇匀, 70 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 加入 5 \times reaction buffer 4 μ L, RibolockTM Ribonuclease inhibitor (20 U/ μ L) 1 μ L, 10 mM dNTP mix 2 μ L 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 最后加入 RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) 1 μ L 轻轻混匀。置 PCR 扩增仪, 42 $^{\circ}$ C 维持 60 min 然后 70 $^{\circ}$ C 维持 10 min 取出一 80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 荧光定量 PCR 测定 STAT5 b mRNA 和 IL-4 mRNA 用 SYBR GREEN I 作为荧光染料, 每份

标本同时测定 STAT5b mRNA、IL-4 mRNA 和 3 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) mRNA。STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的相对表达量分别用公式^[9] $2^{-(C_{STAT5b}-C_{GAPDH})} \times 1000$ 和 $2^{-(C_{IL4}-C_{GAPDH})} \times 1000$ 计算得出。STAT5b mRNA 寡核苷酸引物序列: 上游引物 5'-GACTACAACAGCATGTCCGTC-3', 下游引物 5'-TCAAACCCTGCCAGAAAGTGT-3', 产物长度 86 bp; IL-4 mRNA 寡核苷酸引物序列: 上游引物 5'-CTGTCACCCCTGTTCTGCTTCTC-3', 下游引物 5'-TCGTCTCCGTTGGTTCCT-3', 产物长度 175 bp; GAPDH mRNA 寡核苷酸引物序列: 上游引物 5'-TCAACTACATGGTCTACATGTCCAG-3', 下游引物 5'-AGCGGGATCTCGCTCCTG-3', 产物长度 131 bp。以上引物均由上海基康生物有限公司合成。STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 荧光定量 PCR 反应体系如下: 上游引物和下游引物各 0.3 μL (终浓度为 300 nm/L), Master Mix (2×) 10 μL (终浓度为 1×), cDNA 模板 2 μL, DEPC 处理水 7.4 μL。GAPDH mRNA 荧光定量 PCR 反应体系如下: 上游引物和下游引物各 0.2 μL (终浓度为 200 nm/L),

Master Mix (2×) 10 μL (终浓度为 1×), cDNA 模板 2 μL, DEPC 处理水 7.6 μL。反应体系均为 20 μL。扩增条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火和延伸 1 min, 40 个循环。

1.2.5 统计学方法 统计学分析采用 SPSS 11.5 软件完成, 所有数据均进行正态性检验。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组样本均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐者两两比较采用 SNK 检验, 两变量的相关性分析采用 Pearson 直线相关法。

2 结果

2.1 组织病理学特点

哮喘组支气管痉挛收缩呈菊花状, 管腔内有分泌物, 支气管和血管周围可见明显的炎性细胞浸润, 以淋巴细胞和 EOS 为主; MK 组和 BCG-PSN 组肺组织炎性细胞浸润等病理改变与哮喘组比较明显减轻; 正常对照组肺组织正常 (图 1)。

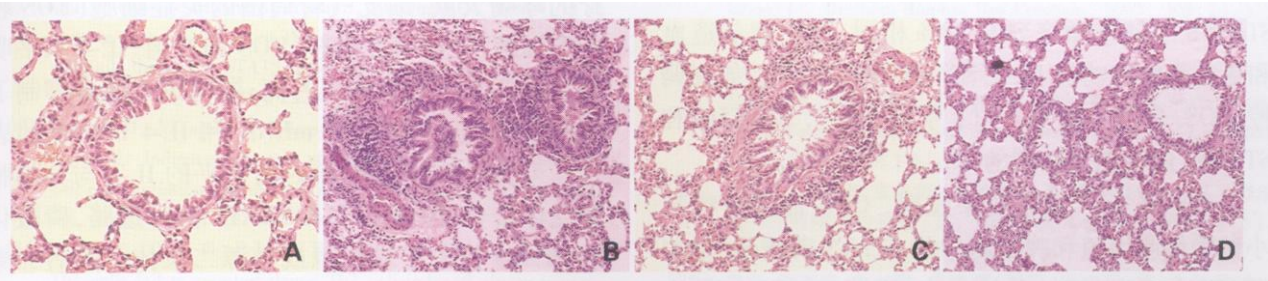


图 1 肺组织病理学切片图 (苏木精-伊红染色, ×100) A 正常对照组大鼠肺组织切片; B 哮喘组大鼠肺组织显示气道周围有大量的炎性细胞浸润; C BCG-PSN 组肺组织气道周围可见炎性细胞浸润但较哮喘组为轻; D MK 组肺组织显示气道周围少量炎性细胞浸润, 较哮喘组明显减轻。

2.2 4 组大鼠血中 EOS 绝对值、IL-4 和 IFN-γ 水平 哮喘组 EOS 绝对值和 IL-4 水平与 MK 组、BCG-PSN 组和正常对照组相比显著升高, IFN-γ 水平明显下降, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$); MK 组、BCG-PSN 组及正常对照组之间的 EOS 绝对值、IL-4 和 IFN-γ 水平比较, 差异无显著性意义 (表 1)。

2.3 血单个核细胞中 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的表达水平

哮喘组 STAT5b mRNA 的表达量显著高于 MK 组和正常对照组, IL-4 mRNA 的表达量显著高于 BCG-PSN 组和正常对照组, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 哮喘组 STAT5b mRNA 的表达量高于 BCG-PSN 组, IL-4 mRNA 的表达量高于 MK 组, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$); MK 组与 BCG-PSN 组 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的表达量相近, 差异无显著性意义 (表 2)。

2.4 相关性分析

血单个核细胞中 STAT5b mRNA 表达量与 IL-4 mRNA 表达量、IL-4 浓度、EOS 绝对值呈正相关 ($r = 0.730, 0.650, 0.664; P < 0.01$), 与 IFN-γ 浓度呈显著负相关 ($r = -0.646, P < 0.01$)。IL-4 mRNA 的

表 1 4 组大鼠血中 EOS 绝对值、IL-4 和 IFN-γ 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EOS 绝对值 ($10^8/L$)	IL-4 (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)
正常对照组	13	3.64 ± 2.66	17.18 ± 6.25	25.37 ± 6.16
哮喘组	13	10.12 ± 5.10	36.75 ± 14.73	16.45 ± 4.12
BCG-PSN 组	13	5.26 ± 2.85	19.62 ± 9.66	23.24 ± 4.88
MK 组	13	6.08 ± 3.83	20.88 ± 9.46	21.42 ± 4.86
F 值		29.81	31.04	11.66
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

表达量分别与血浆中的 IL-4 浓度、EOS 绝对值呈正相关 ($r=0.918, 0.806, P<0.01$), 与血浆中 IFN- γ 浓度呈负相关 ($r=-0.798, P<0.01$)。

表 2 4 组大鼠血中单个核细胞 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 表达结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	STAT5b mRNA	IL-4 mRNA
正常对照组	13	5.90 ± 2.85	7.79 ± 4.79
哮喘组	13	61.54 ± 44.73 ^a	64.99 ± 35.90 ^a
BCG-PSN 组	13	33.66 ± 19.30 ^b	28.76 ± 13.02 ^b
MK 组	13	28.99 ± 15.38 ^{a, c}	30.95 ± 14.94 ^b
F 值		10.44	19.00
P 值		< 0.01	< 0.01

^a 正常对照组比较, $P<0.01$; 与哮喘组比较 ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$

3 讨论

STAT5 属于信号转导子和转录激活子家族的一员, 在细胞质内以潜伏的单体形式存在; 由基因序列高度相同的 STAT5a 和 STAT5b 组成, 其编码基因位于大鼠 10q32.1, 两者紧密相连。因 STAT5a 和 STAT5b 的氨基酸序列有 90% 相同, 故在调节造血和免疫细胞的功能上, 二者具有相同的作用, 如在调控 EOS 分化、增殖的信号传导上, STAT5a 和 STAT5b 的功能是相同的^[10]。

李国平等^[11] 在研究中发现, OVA 能诱导哮喘小鼠脾细胞增殖和脾细胞中的 STAT5 磷酸化, 增加 STAT5 与 DNA 探针的结合力, 说明 STAT5 信号途径在 OVA 诱导的哮喘发病过程中起重要作用。Zamorano 等^[12] 研究发现, STAT5 对于阻止细胞凋亡、促进细胞增殖是必须的。如在 EOS 分化过程中, 早期 STAT5b 被活化, 而在终末期 STAT5a 也被活化。Buitenhuijs 等^[10] 用脐带血的 CD34⁺ 细胞研究发现, STAT5 在 EOS 分化、增殖中具有重要的作用。

本实验发现, 哮喘组大鼠血中单个核细胞 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的相对表达量高于正常对照组, 且呈正相关, 同时哮喘组与正常对照组相比, EOS 绝对值和 IL-4 水平明显增高, IFN- γ 水平明显降低; 哮喘大鼠肺组织光镜下可见细支气管及血管周围炎性细胞明显浸润, 以 EOS 和淋巴细胞为主; STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的相对表达量分别与 EOS 绝对值、IL-4 水平呈正相关, 与 IFN- γ 水平呈负相关。说明大鼠哮喘炎症反应时, STAT5b 和 IL-4 的基因转录、翻译水平皆升高。Zhu 等^[13] 和 Takatori 等^[14] 报道, 在缺乏 STAT6 的情况下,

STAT5a 的过量表达会引起幼稚 CD4⁺ T 细胞向 CD4⁺ Th2 细胞分化, 提示 STAT5 在 CD4⁺ Th2 细胞 IL-4 基因转录活化中起关键作用。STAT5b 的高表达可能进一步诱导其下游炎症基因 IL-4 等 Th2 型细胞因子大量产生, 抑制 IFN- γ 的产生, 使 Th1/Th2 比例失衡。Th2 分泌 IL-4 和 IL-5 通过调节 IE 产生和肥大细胞、嗜碱性粒细胞、EOS 的分化和募集, 在启动和维持哮喘反应中起重要作用^[15]。IL-4 对 Th 有交叉调节作用, 且能使 Th0 细胞分化为 Th2 细胞^[16], 抑制 Th0 细胞分化为 Th1 细胞, 造成 Th1 细胞和 Th2 细胞的比例失调, IFN- γ 水平下调。

MK 是一种高选择性半胱氨酰白三烯受体拮抗剂, 它可抑制血清可溶性 IL-2 受体、IL-4 可溶性细胞间黏附分子-1 和嗜酸性粒细胞阳离子蛋白等多种细胞因子及炎症介质的释放^[17]; 还能抑制炎症细胞的游走、聚集、增殖和活化^[18]。

BCG-PSN 是从 BCG 提取的多糖核酸, 以脂多糖为主, 其余为核酸成分, 具有多种免疫调节作用; 并且 DNA 中含有丰富的 CPG 结构, 具有较强的 Th1 刺激作用^[19]。本实验发现: 用 MK 和 BCG-PSN 治疗的哮喘大鼠, 细支气管周围的炎症细胞 (EOS 和淋巴细胞) 浸润明显减轻, EOS 绝对值、IL-4 水平明显下降, IFN- γ 水平明显升高; 同时也有效地抑制了单个核细胞中 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的表达。可能的机制是: 哮喘时高水平的 IL-4 与其细胞膜受体结合, 激活了 JAK/STAT5 信号通路, 磷酸化的 STAT5 分子形成同源或异源二聚体。然后二聚体进入细胞核, 起转录因子的作用, 促使细胞分化、增殖相关基因的表达^[20-23]。现 MK 和 BCG-PSN 都能抑制 Th2 型细胞因子 IL-4 的分泌, 促进 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的分泌, 从而抑制 STAT5b mRNA 和 IL-4 mRNA 的表达, 达到了治疗哮喘的目的^[24-25]。

[参 考 文 献]

- [1] Buitenhuijs M, Baltus B, Lammers JW, Coffey PJ, Koenderman L. Signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) is required for eosinophil differentiation of human cord blood-derived CD34⁺ cells. *J. Blood* 2003; 101(1): 134-142
- [2] Soldani E, John S, Moro S, Boltenbacher J, Schindler U, Leonard WJ. DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol Cell Biol* 2000; 20(1): 389-401
- [3] Sergejeva S, Tomaki M, Pullerits T, Zhao LL, Johnson M, Livviall J. Inhaled fluticasone propionate inhibits allergen-induced bone marrow eosinophilic infiltration. *Pharm Ther* 2002; 15(2): 129-134
- [4] Takatori H, Nakajima H, Hirose K, Kagami S, Tamachi T, Suto A, et al. Indispensable role of Stat5a in Stat6-independent Th2

cell differentiation and allergic airway inflammation [J]. *J Immunol* 2005 174(6): 3734-3740.

[5] 杨玉成, 洪苏玲, 黄江菊, 王祎琴, 孙荣, 钱迪, 等. 卡介苗多糖核酸对变应性鼻炎病人 Th1/Th2 失衡状态的调节 [J]. 第三军医大学学报, 2005 27(12): 1279-1281.

[6] 洗乐武, 梁宗安, 刘春涛. 支气管哮喘大鼠单个核细胞 Th1/Th2 的变化及孟鲁司特的干预作用 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003 26(5): 312-313.

[7] 叶乐平, 谢丽微, 李昌崇. 布地奈德对哮喘大鼠信号转导子和转录激活子 6 的表达 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005 25(7): 588-593.

[8] Patrans E, Vanacker NJ, Pauwels RA, Kips JC. Effect of age on allergen-induced structural airway changes in brown Norway rats [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 165(9): 1280-1284.

[9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta-Delta}CT method [J]. *Methods* 2001 25(4): 402-408.

[10] Buijenhuis JM, Baltus B, Lammens WJ, Coffier PJ, Koenderman L. Signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) is required for eosinophil differentiation of human cord blood-derived CD34⁺ cells [J]. *Blood* 2003 101(1): 134-142.

[11] 李国平, 刘志刚, 冉丕鑫, 丘劲, 钟南山. 卵白蛋白诱导哮喘小鼠脾细胞增殖中 STAT5 的变化 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004 20(5): 611-614.

[12] Zamorano J, Wang HY, Wang R, Shi Y, Longmore GD, Keegan AD. Regulation of cell growth by IL-2: role of STAT5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression [J]. *J Immunol* 1998 160(7): 3502-3512.

[13] Zhu Y, Chen L, Huang Z, Alkan S, Bunting KD, Wen R, et al. Cutting edge: IL-5 primes Th2 cytokine-producing capacity in eosinophils through a STAT5-dependent mechanism [J]. *J Immunol* 2004 173(5): 2918-2922.

[14] Takatori H, Nakajima H, Hirose K, Kagami S, Tamachi T, Suo A, et al. Indispensable role of Stat5a in stat5-independent Th2 cell differentiation and allergic airway inflammation [J]. *J Immunol* 2005 174(6): 3734-3740.

[15] Hansen G, Berry G, Dekruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperactivity but cause severe airway inflammation [J]. *J Clin Invest* 1999 103(2): 175-183.

[16] Lingnau K, Hoehn P, Kerlme S, Koesch S, Neudorfl C, Palm N, et al. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12 [J]. *J Immunol* 1998 161(9): 4709-4718.

[17] Steinhach J, Jerzynska J, Kuna P. A randomized double-blind trial of the effect of treatment with montelukast on bronchial hyperresponsiveness and serum eosinophilic cationic protein (ECP), soluble interleukin 2 receptor sIL-2R), IL-4 and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in children with asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2002 109(2): 257-263.

[18] Braccini F, Dorman SC, O'Byrne JM, Imman MD, Denburg JA, Parameswaran K, et al. The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2002 110(1): 96-101.

[19] Homer AA, Van Uden H, Zubeldia M, Broide D, Raz E. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease [J]. *Immunol Rev* 2001 179: 102-118.

[20] Ambrosio R, Finiani G, Monfregola J, Sanzari E, De Felice N, Salemo MC, et al. The structure of human STAT5A and B gene reveals two regions of nearly identical sequence and an alternative tissue-specific STAT5B promoter [J]. *Gene* 2002 285(1-2): 311-318.

[21] Crispi S, Sanzari E, Monfregola J, De Felice N, Finiani G, Ambrosio R, et al. Characterization of the human STAT5A and STAT5B promoters: evidence of a positive and negative mechanism of transcriptional regulation [J]. *FEBS Lett* 2004 562(1-3): 27-34.

[22] Uddin S, Leqmune F, Sassano A, Rui H, Fish EN, Planas LC. Role of Stat5 in type I interferon signaling and transcriptional regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 308(2): 325-330.

[23] Yamashita H, Nevalainen MT, Xu J, LeBarron MJ, Wagner KV, Erwin RA, et al. Role of serine phosphorylation of Stat5a in prolactin-stimulated beta casein gene expression [J]. *Mol Cell Endocrinol* 2001 183(1-2): 151-163.

[24] 王曼芝, 何庆南, 袁红霞, 刘晓亮. IL-4、IL-5 及 IFN-γ 在儿童哮喘变异型哮喘中的价值 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006 8(5): 382-384.

[25] 李光, 赵育莹, 曲书强, 逮晓辉, 刘晨, 唐建民, 等. 支气管哮喘模型大鼠 IL-4、IL-10、IFN-γ 的检测 [J]. 中国当代儿科杂志, 2004 6(6): 474-476.

(本文编辑: 吉耕中)