

## 短发夹 RNA 沉默 Tim-3 分子表达对哮喘小鼠 外周血 Th1 和 Th17 细胞的影响

陆小霞 徐佳莉 董宗祈 陈鹏 王莹

(武汉市儿童医院呼吸内科,武汉 430016)

**[摘要]** 目的 建立小鼠支气管哮喘模型,采用 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(Tim-3)特异短发夹 RNA(shRNA)沉默外周血单个核细胞(PBMCs)中 Tim-3 的表达,探讨 Tim-3 对辅助性 T 细胞 1(Th1)和 Th17 细胞分化的影响。**方法** 用卵白蛋白(OVA)致敏并激发建立哮喘小鼠模型,分离哮喘小鼠 PBMCs,用 Tim-3 特异的 shRNA 片段沉默哮喘小鼠 PBMCs 中高表达的 Tim-3 基因。Real-time PCR 和 Western blot 检测 Tim-3 的表达,流式细胞分析技术(FACS)检测 Th1 和 Th17 的比例;ELISA 检测细胞培养上清液中干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ),白介素-4(IL-4),和白介素-17(IL-17)的水平。**结果** 哮喘组小鼠 PBMCs 中 Tim-3 mRNA 表达明显升高;使用特异 Tim-3 shRNA 沉默哮喘小鼠 PBMCs 后,沉默组 PBMCs 中 Th1 细胞比例显著升高,Th17 细胞比例显著下降,与阴性对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );沉默组 PBMCs 培养上清液中 IFN- $\gamma$  明显升高,IL-17 明显降低,与阴性对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),IL-4 水平无明显变化。**结论** 特异 Tim-3 shRNA 有效地沉默了 Tim-3 的表达, Tim-3 表达的改变影响了 T 细胞的分化。  
[中国当代儿科杂志,2013,15(4):302-307]

**[关键词]** 哮喘;Tim-3;RNA 沉默;T 细胞;小鼠

### Small hairpin RNA silencing Tim-3 affects peripheral blood Th1 and Th17 cells differentiation in asthmatic mice

LU Xiao-Xia, XU Jia-Li, DONG Zong-Qi, CHEN Peng, WANG Ying. Department of Pulmonary Medicine, Wuhan Children's hospital, Wuhan 430016, China (Email: lusi74@163.com)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of down-regulating Tim-3 gene in the peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) of an asthmatic mouse model by short hairpin RNA(shRNA) and to explore the effect of Tim-3 on Th1 and Th17 cell differentiation. **Methods** An asthmatic murine model was established by ovalbumin sensitization and challenge. PBMCs were isolated from asthmatic mice and transfected by shRNA targeting Tim-3 gene. The mRNA and protein expressions of Tim-3 were detected by quantitative PCR and Western blot. Flow cytometry analysis was performed to determine the levels of Th1 and Th17, and ELISA was performed to determine concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-17 in the supernatant. **Results** Tim-3 mRNA expression in PBMCs was significantly increased in asthmatic mice. The mRNA and protein expression of Tim-3 decreased significantly in the shRNA group. Compared with the negative groups, Th1 cell levels increased and Th17 cell levels decreased significantly in the asthmatic groups after Tim-3 shRNA interference. In the Tim-3 shRNA interference groups concentrations of IFN- $\gamma$  increased significantly while IL-17 decreased significantly. **Conclusions** Specific Tim-3 shRNA effectively silences the expression of Tim-3 and change in Tim-3 expression could affect T cell differentiation.  
[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(4):302-307]

**Key words:** Asthma; Tim-3; RNA interference; T helper cells; Mice

在过去 20 多年中经典免疫学说认为支气管哮喘(哮喘)的发病机制与辅助性 T 细胞(T helper cells, Th cells)亚群功能失衡密切相关,主要表现为 Th1 功能减弱或/和 Th2 细胞功能亢进。然而越来越多的研究表明抑制 Th2 型细胞因子的分泌并不

能完全有效减轻哮喘的气道炎症,单纯使用外源性干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )干预哮喘动物模型不能达到缓解气道炎症的作用反而加重病情<sup>[1-2]</sup>。Th17 细胞是近来发现的不同于 Th1、Th2 的另一种 CD4<sup>+</sup>T 细胞的新亚型,在哮喘和过敏性疾病的发生

[收稿日期]2012-09-27; [修回日期]2012-10-29

[项目基金]国家自然科学基金青年科学基金项目(项目编号:81200006);吴阶平医学基金(项目编号:320.6750.1285);湖北省自然科学基金(项目编号:2010CDB08804);武汉市卫生局科研项目(项目编号:WX11B10)。

[作者简介]陆小霞,女,博士,副主任医师。

发展中起着非常重要的作用<sup>[3]</sup>。T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein-3, Tim-3) 是一种优先表达于活化的 Th1 和 Th17 细胞表面的跨膜蛋白,在 T 细胞分化、凋亡及 T 细胞耐受的诱导等方面有着重要的免疫功能<sup>[4]</sup>。

研究表明卵白蛋白(ovalbumin, OVA)致敏或输注抗原活化的 Th2 细胞均可导致肺组织 CD4 细胞高表达 Tim-3<sup>[5]</sup>,并且与疾病的发生和发展密切相关,因此本实验通过建立 BALB/c 哮喘小鼠模型,体外培养外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),通过短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)沉默哮喘组中高表达的 Tim-3 基因,在细胞水平探讨 Tim-3 分子是否参与哮喘中 Th1 和 Th17 细胞的调节。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及材料

30 只 6~8 周龄 SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠,体重 18~22 g,非 OVA 饲料喂养,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。将所有小鼠随机分为对照组和哮喘组,每组 15 只。

ABI 7900 Realtime-PCR 系统(美国 ABI 公司),流式细胞仪(美国 BECKMAN-COULTER 公司),卵白蛋白(OVA,美国 Sigma 公司),小鼠淋巴细胞分离液(美国 Sigma 公司),FERMENTAS(MBI)逆转录试剂盒(武汉华瑞康生物科技有限公司),SYBR GreenPCR Master Mix(美国 ABI 公司),Lipofectamine™ 2000 试剂(美国 Invitrogen),pGPU6/GFP/Neo-Tim-3 及阴性对照质粒 pGPU6/GFP/Neo-shNC 载体(上海吉玛公司),anti-mouse-APC-IL-17、anti-mouse-FITC-CD4 及 anti-mouse-APC-IFN- $\gamma$  流式抗体(美国 eBioscience),ELISA 试剂盒(美国 Invitrogen)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 哮喘小鼠模型的建立 参照 North 等<sup>[6]</sup>的方法并加以改进,第 0 天和第 7 天经小鼠腹腔注射 0.01% OVA 和氢氧化铝混合液 0.1 mL 致敏,第 14 天至第 21 天,每天将小鼠置于 5 L 密闭容器中,以 1% OVA 生理盐水溶液雾化激发,使小鼠暴露在 OVA 气雾中 30 min,由喷射雾化器雾化。对照组小鼠,以生理盐水代替 OVA 同步进行实验。小鼠出现烦躁不安、呼吸急促、腹肌痉挛、喘鸣为阳性反应。各组于最后一次激发后 24 h 处死动物进行各项检测。哮喘小鼠模型验证:每组各取 5 只小鼠右下肺

组织,10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色镜检。

1.2.2 小鼠 PBMCs 的分离及培养 将 2 组小鼠分别麻醉后心脏穿刺取血,每只小鼠取抗凝血 1.5 mL,以等体积 Hanks 液稀释后,轻轻加入等体积小鼠淋巴细胞分离液上层,2000 g 离心 20 min。取出试管后,轻轻吸取液相交的 PBMCs,加入 Hanks 液 3 mL,混匀后,1500 g 离心 5 min。弃去上清,用含 10% 胎牛血清和含终浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  刀豆蛋白 A 的 RPMI 1640 培养液,调整 PBMCs 浓度至  $1 \times 10^9/\text{L}$  进行培养。

1.2.3 Real-time PCR 检测 PBMCs 中 Tim-3 mRNA 的表达 取 2 组 PBMCs 悬液,PBS 洗 2 遍,TRIzol 法抽提细胞总 RNA,反转录后采用荧光定量 PCR 法检测 2 组 PBMCs 中 Tim-3 mRNA 表达情况。Tim-3 引物采用 Primer 3.0 在线软件设计。Tim-3 正义链:5'-TTGGAGTGGGAGTCTCTGCT-3',反义链:5'-ATCCTGACTGCTCCTGCATT-3';产物长度 160 bp;GAPDH 正义链:5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3',反义链:5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3',产物长度 132 bp。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s,59  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s,共 40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 5 min。样品均重复检测 3 次,最后通过计算  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  获得各基因的相对含量。

1.2.4 Tim-3 特异的 shRNA 转染 PBMCs 及转染效率检测 将哮喘组小鼠血液分离的 PBMCs 悬液接种于 6 孔板上,接种密度为  $1 \times 10^5/\text{孔}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养。细胞种于 24 孔板并于转染前更换成不含抗生素及血清的 DMEM 培养基。pGPU6/GFP/Neo-Tim-3 共设计合成 3 对 Tim-3 特异的 shRNA,选择干预效果最好的进行实验。pGPU6/GFP/Neo-Tim-3 序列:正义链 5'-CACCGCTTCTCCAAGAACCCTAACCTTCAAGAGAGGTTAGGGTTCTTGGAGAAGCTTTTTTTG-3',反义链 5'-GATCCAAAAAAGCTTCTCCAAGAACCCTAACCTTCTTGAAGGTTAGGGTTCTTGGAGAAGC-3'。阴性对照 pGPU6/GFP/Neo-shNC 序列为随机错配成对 Tim-3 无靶向性的核酸序列:正义链 5'-CACCGTCTCCGAACGTGTCACGTCAAGAGATTACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTTG-3';反义链 5'-GATCCAAAAAATCTCCGAACGTGTCACGTAATCTCTTGACGAATGACACGTTCCGAGAAGC-3'。实验分成 3 组,包括空转组(仅加等量转染试剂)、阴性 shRNA 组和特异 shRNA 组,每组细胞设 3 个复孔。转染 PBMCs:采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂,按使用说明书进行转染实验。将特异 Tim-3 shRNA 表达质粒瞬时转染入 PBMCs,同时以转染 NC 质粒为对照。置

入 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 6 h 后换成正常培养液。转染 24 h 后进行荧光显微镜检查转染效率：转染效率 = (发出绿色荧光的细胞数/可见光下的总细胞数) × 100 %。

**1.2.5 Real-time PCR 和 Western blot 检测 Tim-3 的沉默效率** 细胞在正常培养液中培养 48 h 后,收集细胞。部分细胞收集加 TRIzol 后进行 Tim-3 的 mRNA 检测,部分提取蛋白,以 β-actin 为内参照,常规进行 Western blot 检测。方法简要如下:提取各实验组细胞总蛋白,蛋白定量后,用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,分离的蛋白电泳转移至 PVDF 膜后,用 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 ~ 2 h,加入 1:1 000 稀释的 Tim-3 抗体,4 °C 孵育过夜,以 1:5000 稀释的酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG)室温孵育 2 h,用化学发光试剂盒进行发光, Bio-Rad Image Lab 软件进行成像及蛋白条带灰度分析。

**1.2.6 流式细胞仪检测沉默后 PBMCs 中 Th1 和 Th17 细胞的比例** 分别取沉默后各组 PBMCs 100 μL 于流式管中,均分成两份,加入流式抗体 anti-mouse-APC-IL-17 和 anti-mouse-FITC-CD4 或 anti-mouse-APC-IFN-γ 和 anti-mouse-FITC-CD4 进行双标记(操作按美国 eBioscience 公司试剂盒说明书要求进行)。室温 25 °C,避光染色 30 min。用洗涤液洗 2 次,每次加洗涤液 2 mL,1000 r/min 离心 5 min。弃上清,加入 2% 的多聚甲醛固定液 300 μL 重悬细胞。流式细胞仪分析。

**1.2.7 ELISA 检测沉默后 PBMCs 细胞上清液中 IFN-γ、IL-4 和 IL-17 的水平** 试剂盒由美国 Invitrogen 提供,操作步骤按说明书进行。

### 1.3 统计学分析

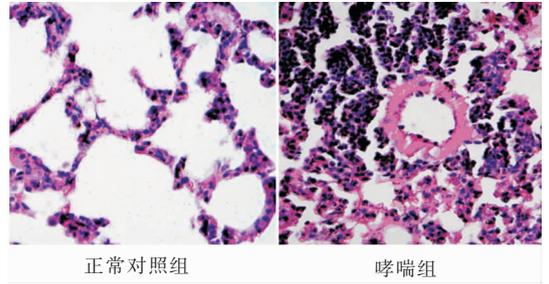
应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,方差齐性者组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠肺组织 HE 染色

正常对照组支气管及肺泡结构正常,支气管纤毛排列整齐,支气管黏膜上皮完整,未见明显的炎症细胞浸润。急性哮喘组支气管周围、黏膜下以及肺泡间质组织中大量单核细胞浸润(以嗜酸性细胞为主,部分中性粒细胞以及淋巴细胞),支气管黏膜上皮

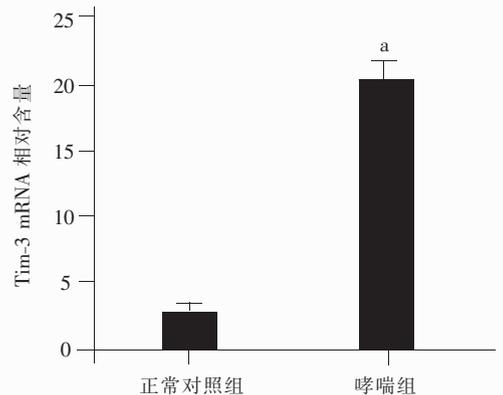
增生变厚,显示较典型哮喘模型改变。见图 1。



**图 1** 各组小鼠肺组织病理改变(苏木精-伊红染色, ×200) 哮喘组支气管周围、黏膜下以及肺泡间质组织中可见明显炎症细胞浸润,包括嗜酸性粒细胞,中性粒细胞以及淋巴细胞,支气管黏膜上皮增生变厚,显示较典型哮喘模型改变。正常对照组支气管及肺泡结构正常,未见明显的炎症细胞浸润。

### 2.2 小鼠 PBMCs 中 Tim-3 mRNA 的表达

Real-time PCR 检测 PBMCs 中 Tim-3 mRNA 的表达水平,结果显示哮喘组 Tim-3 mRNA 的表达较正常对照组显著增高( $P < 0.01$ )。见图 2。



**图 2** Tim-3 mRNA 的相对表达水平( $n = 10$ ) a: 与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。

### 2.3 shRNA 转染效率的检测

将带有绿色荧光蛋白(GFP)的 shRNA 转染 PBMCs,通过荧光显微镜与普通光镜下视野对比可知,细胞的转染效率达到 80% 以上。见图 3。

### 2.4 shRNA 沉默 Tim-3 效率的检测

Real-time PCR 和 Western blot 分别检测空白对照组(Mock 组)、阴性 shRNA 组(NC 组)和特异 shRNA 组(shRNA 组)的 Tim-3 mRNA 和蛋白的相对表达量。与 Mock 组和 NC 组比较,特异 shRNA 组的 mRNA 和蛋白表达均显著降低( $P < 0.01$ )。见图 4。

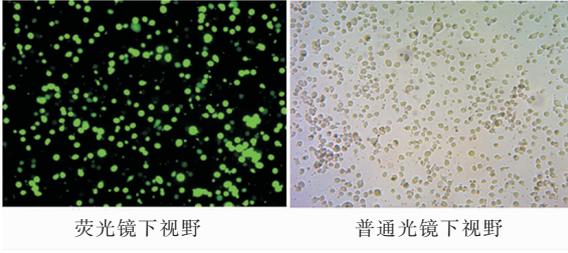


图3 shRNA 转染后不同光镜下的 PBMCs (×100) 荧光镜下观察到显绿色荧光的 PBMCs 为 shRNA 成功转染的 PBMCs。

## 2.5 沉默后 PBMCs 中 Th1 及 Th17 细胞比例的变化

Th1 细胞比例在 shRNA 组 ( $14.7\% \pm 3.4\%$ ) 显著高于 NC 组 ( $9.4\% \pm 2.4\%$ ,  $P < 0.01$ ); shRNA 组 Th17 细胞比例 ( $2.38\% \pm 0.03\%$ ) 显著低于 NC 组 ( $6.09\% \pm 0.08\%$ ,  $P < 0.01$ ); Th1 及 Th17 细胞在 Mock 组与 NC 组之间差异均无统计学意义。见图 5。

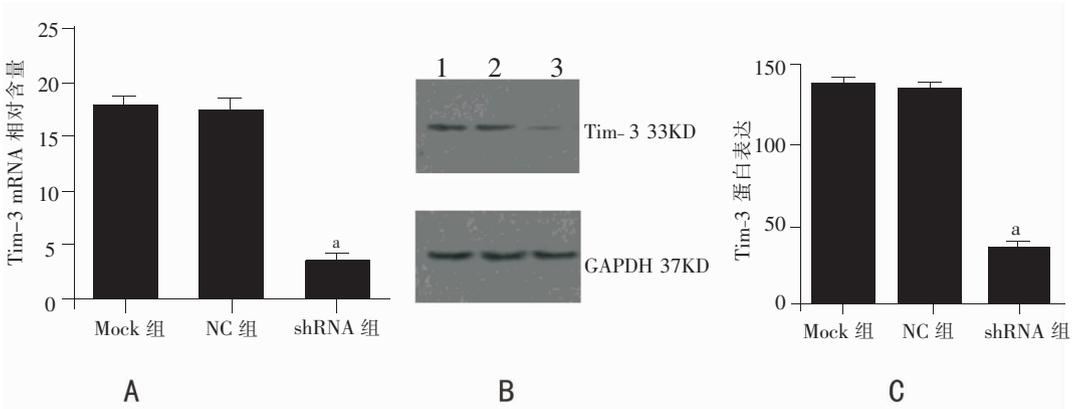


图4 shRNA 转染对哮喘大鼠 PBMCs 中 Tim-3 mRNA 和蛋白表达的影响 ( $n=6$ ) A: Tim-3 mRNA 表达统计图, a: 与 Mock 组与 NC 组比较,  $P < 0.01$ ; B: Tim-3 蛋白表达条带图, 1: Mock 组, 2: NC 组, 3: shRNA 组; C: Tim-3 蛋白表达统计图, a: 与 Mock 组与 NC 组比较,  $P < 0.05$ 。

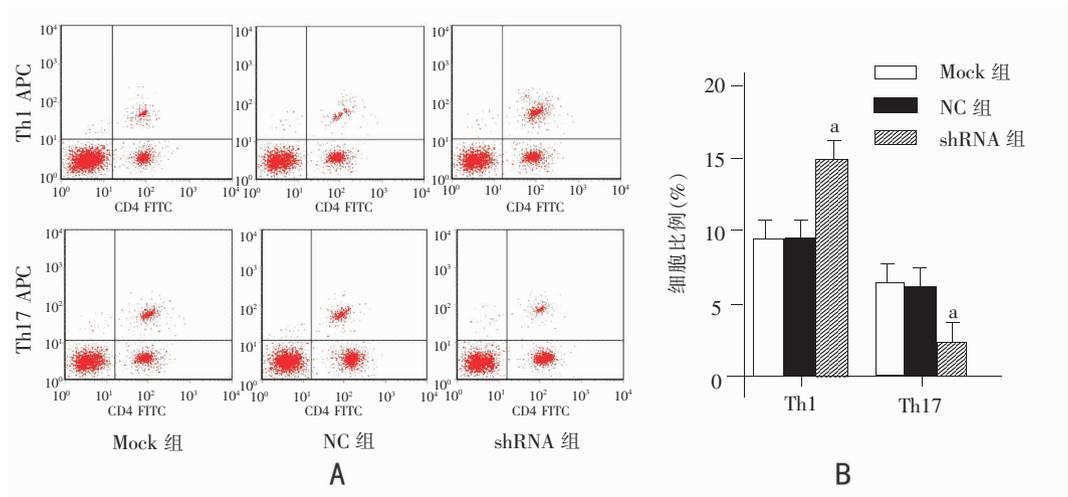


图5 沉默 Tim-3 后 PBMCs 中 Th1 及 Th17 细胞比例检测结果 ( $n=6$ ) A 细胞流式分析图; B: 柱状图, a: 与 Mock 组和 NC 组比较,  $P < 0.01$ 。

## 2.6 沉默后 PBMCs 上清液中 IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17 的表达变化

shRNA 组 IFN- $\gamma$  水平显著高于 NC 组 ( $P < 0.05$ ); 而 IL-17 水平显著低于 NC 组 ( $P < 0.05$ ); 提示 shRNA 沉默 Tim-3 后仅 IFN- $\gamma$  和 IL-17 表达水平发生变化, 而对 IL-4 表达水平无影响。见表 1。

表1 各组小鼠 PBMCs 上清液中 IL-4、IFN- $\gamma$  和 IL-17 的水平 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	鼠数	IL-4	IFN- $\gamma$	IL-17
Mock 组	8	64 ± 17	49 ± 15	97 ± 19
NC 组	8	65 ± 16	50 ± 15	95 ± 20
shRNA 组	8	58 ± 13	83 ± 17 <sup>a</sup>	50 ± 13 <sup>a</sup>
F 值		2.08	68.51	92.34
P 值		> 0.05	< 0.01	< 0.01

a: 与 Mock 组和 NC 组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

Th17 细胞是以表达 IL-17 为特征的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚型,研究证实 Th17 与哮喘气道炎症的发生和发展密切相关;Zhao 等<sup>[7]</sup>及 Agache 等<sup>[8]</sup>检测发现哮喘患者 PBMCs 中 Th17 细胞及其 IL-17 水平较健康对照组明显升高,且与哮喘的严重程度呈正相关;痰液中 IL-17A 的增加与哮喘时气道高反应性有关,也是重度哮喘的独立危险因素。哮喘动物模型实验也发现 Th17 细胞一方面可以促进气道中性粒细胞炎症,另一方面可以和 Th2 细胞协同作用,促进气道高反应性的产生<sup>[9]</sup>。Nakae 等<sup>[10]</sup>发现在小鼠过敏性气道炎症模型中系统性敲除 IL-17 基因,其肺部嗜酸性粒细胞浸润、Th2 类细胞因子的水平以及气道高反应性明显降低。这些结果均提示 Th17 参与了哮喘发展的病理生理过程。通过抑制 Th17 及细胞因子的表达可减轻哮喘气道炎症反应,成为有效阻止哮喘气道炎症恶化的重要治疗策略<sup>[11]</sup>。最近研究发现 Th17 和 Th1 细胞共同分享一个通路,IFN- $\gamma$  可以抑制 Th17 细胞的分化和形成;而在一定因素的刺激下,二者之间又可以互相转化<sup>[12-14]</sup>,与哮喘及多种自身免疫性疾病的发病密切相关。

Tim-3 是在寻找区分 Th1/Th2 细胞特异性表面标志物时发现并鉴定的一个细胞表面分子,优先表达在活化的 Th1 和 Th17 细胞表面,作为一种负性调节信号调节 CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的免疫应答,在变态反应和自身免疫性疾病的发生和发展中发挥着重要的作用<sup>[4,14]</sup>。实验性变态反应性脑脊髓炎是一种自身免疫性疾病,在一定程度上该病的进程取决于 Th1/Th2 的平衡状态,Th1 细胞与该病的恶化相关,Monney 等<sup>[15]</sup>发现在疾病过程中引入 Tim-3 中和抗体可观察到 Th1 细胞及 IFN- $\gamma$  过度表达,提示 Tim-3/Tim-3 配体途径一旦被阻断,将导致 Th1 介导的疾病恶化,因此 Tim-3 与配体的作用是提供抑制信号来下调 Th1 免疫应答。目前研究显示 OVA 致敏或输注抗原活化的 Th2 细胞均可导致小鼠肺组织高表达 Tim-3,使用 Tim-3 中和抗体可显著减轻致敏小鼠的气道高反应和改变肺泡灌洗液中 Th1 细胞因子水平来调节 Th1/Th2 的平衡<sup>[6,16]</sup>。本实验的研究结果与其一致,研究发现哮喘小鼠 PBMCs 中 Tim-3 mRNA 的表达显著高于正常对照组,与哮喘的发病密切相关。

鉴于 Tim-3 基因在哮喘中的表达及与 Th1 和 Th17 细胞之间的调控关系,本研究选择了此目的基

因作为 RNA 干扰的靶位点。RNAi 是介导基因沉默的一种转录后作用机制,其最大的益处是能特异降解同源序列的靶 mRNA,从而达到抑制基因表达的目的。研究发现,将 siRNA-STAT6 滴鼻给 OVA 致敏小鼠,可以明显减轻 OVA 诱导的气道炎症和呼吸道高反应性<sup>[17-18]</sup>。目前用 RNAi 技术治疗气道过敏性炎症的临床试验已经开展。作为 RNAi 的载体,siRNA 和 shRNA 都可以在体外人工合成进行基因沉默研究,但是 siRNA 容易降解,干扰的时效性较差;而 shRNA 通过稳定转染的质粒载体能够长效的抑制基因表达,同时真核表达载体与病毒载体相比其生物相容性更好,可以实现对目的基因长期、稳定的干扰而不引起特异性反应<sup>[19]</sup>。因此本研究应用真核表达载体 pGPU6/GFP/Neo-Tim-3 干扰哮喘小鼠 PBMCs,荧光显微镜下显示细胞的转染效率均达到 80% 以上,实时定量 PCR 及 Western blot 检测结果表明构建的 Tim-3 shRNA 干扰质粒有效的抑制 Tim-3 mRNA 和蛋白的表达。进一步我们用 Tim-3 shRNA 阻断 Tim-3 的表达后,从细胞水平来观察 Th1 和 Th17 细胞及相关细胞因子的变化。观察发现,沉默 Tim-3 基因后,CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 水平显著升高,伴随 Th1 细胞因子 IFN- $\gamma$  表达增高;而 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> 水平显著降低,伴随 Th17 细胞因子 IL-17 的表达下降,表明 Tim-3 信号通路对哮喘 Th1 和 Th17 细胞起着调控作用。我们推测使用特异 shRNA 沉默 Tim-3 在哮喘中的高表达之后,可能是通过诱导 Th1 细胞活化,IFN- $\gamma$  分泌增加的途径来达到抑制 Th17 细胞的形成和分化的。

在本研究中,成功实现了采用 shRNA 所介导的 RNAi 技术沉默小鼠 Tim-3 基因的表达,并观察到阻断 Tim-3 通路会对小鼠 PBMCs 中 Th1 和 Th17 细胞的表达产生影响,为后续的动物体内实验提供了重要的实验基础。本实验结果验证了 shRNA 技术的可行性,同时为哮喘发病机制研究和治疗提供了新思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, Leckie MJ, Kanabar V, Khan J, et al. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response[J]. *Lancet*, 2000, 356(9248): 2149-2153.
- [2] Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in atopic asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(3): 224-230.
- [3] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells

- develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [4] Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4<sup>+</sup> T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(9): 2492-2501.
- [5] Kearley J, McMillan SJ, Liloyd CM. Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment in vivo[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(6): 1289-1294.
- [6] North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasemann H, Scott JA. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(6): L911-L920.
- [7] Zhao Y, Yang J, Gao YD, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 151(4): 297-307.
- [8] Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma[J]. *Respir Med*, 2010, 104(8): 1131-1137.
- [9] Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(8): 720-730.
- [10] Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-Specific T Cell Sensitization Is Impaired in IL-17-Deficient Mice, Causing Suppression of Allergic Cellular and Humoral Responses[J]. *Immunity*, 2002, 17(3): 375-387.
- [11] 胡斯明, 罗雅玲, 赖文岩. 地塞米松对哮喘小鼠肺组织中转录因子 ROR $\gamma$ t mRNA 表达的干预作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(12): 1115-1118.
- [12] Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17[J]. *J Leukocyte Biol*, 2007, 81(5): 1258-1268.
- [13] 陈伟超, 刘恩梅, 邓昱, 何云, 陈杰华, 刘玮, 等. 新生儿卡介苗接种对实验性哮喘小鼠肺 Th17 细胞和 IL-17 的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(8): 650-653.
- [14] Kurschus FC, Croxford AL, Heinen AP, Wortge S, Lelo D, Waisman A. Genetic Proof for the transient nature of the Th17 phenotype[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(12): 3336-3346.
- [15] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease[J]. *Nature*, 2002, 415(6871): 536-541.
- [16] 张志英, 栾斌, 冯晓霞. Galectin-9 及其受体 Tim-3 在哮喘小鼠肺组织中的表达[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(5): 406-410.
- [17] Darcan-Nicolaisen Y, Meinicke H, Fels G, Hegend O, Haberland A, Kuhl A, et al. Small interfering RNA against transcription factor STAT6 inhibits allergic airway inflammation and hyperreactivity in mice[J]. *Immunol*, 2009, 182(12): 7501-7508.
- [18] Moriwaki A, Inoue H, Nakano T, Matsunaga Y, Matsuno Y, Matsumoto T, et al. T Cell treatment with small-interfering RNA for suppressor of cytokine signaling 3 modulates allergic airway responses in a Murine Model of Asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(4): 448-455.
- [19] Bernards R, Brummelkamp TR, Beijersbergen RL. shRNA libraries and their use in cancer genetics[J]. *Nat Methods*, 2006, 3(9): 701-706.

(本文编辑:刘伟)

· 消息 ·

## 2013 年第四届国际儿科肾脏病学会 (IPNA) 研讨会 暨第 23 届全国儿科肾脏病学习班通知 (第一轮)

由北京大学第一医院儿科主办, 2013 年第四届国际儿科肾脏病学会研讨会暨第 23 届全国儿科肾脏病学习班定于 2013 年 6 月 19 日~6 月 23 日在北京举行。本次研讨会为国家级继续医学教育项目, 同时也是国际儿科肾脏病学会 (International Pediatric Nephrology Association, IPNA) 的继续教育项目。

北京大学第一医院儿科自 1983 年开始举办全国儿科肾脏病学习班, 至此期学习班正逢 30 周年。本届研讨会将邀请来自韩国、新加坡的 IPNA 国际著名肾脏病专家以及中国台湾儿科肾脏病专家林清渊教授授课, 国内有著名的儿科肾脏病专家杨霖云教授、丁洁教授及肖慧捷、姚勇主任医师等共同授课, 授课将采用讲座与临床-病理讨论 (CPC) 相结合的形式, 重点讲授近年来小儿肾脏病学临床治疗, 发病机制及基础研究方面的新进展和新思路。并安排时间欢迎广大医生自带病例参与讨论和交流。结业时授予国家继续教育 I 类学分 8 分。

学习班负责人: 肖慧捷

联系人: 张琰琴, 钟金龙 电话: 010-52428195 传真: 010-84855358

电子邮件: bdes@htbr.cn

北京大学第一医院 儿(肾)科  
国际儿科肾脏病学会 (IPNA)

2012 年 12 月 6 日