

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.12.016

论著 · 实验研究

## 骨桥蛋白在哮喘小鼠肺组织中的表达及地塞米松的干预作用

孙海会 尚云晓 杨男

(中国医科大学附属盛京医院小儿呼吸内科, 辽宁 沈阳 110004)

**[摘要]** **目的** 探讨哮喘气道炎症与骨桥蛋白(OPN)表达的相关性,以及地塞米松(DXM)对OPN表达的影响。**方法** 50只小鼠随机分为正常对照组、不同程度哮喘组(卵清蛋白OVA激发1周和2周组)及DXM治疗1周和2周组,每组10只;OVA致敏、激发建立急性哮喘模型;苏木精-伊红染色观察各组小鼠气道炎症情况;ELISA法检测血清OVA-sIgE水平;免疫组化和Western blot法分别定位和定量分析肺组织OPN表达;Real-time PCR检测肺组织OPN mRNA水平。**结果** 哮喘组气道病理学改变较对照组和DXM组明显,且OVA激发2周哮喘组改变较激发1周组明显。哮喘组血清OVA-sIgE水平较对照组和DXM组明显升高( $P<0.01$ );且OVA激发2周组高于激发1周组( $P<0.01$ )。Western blot和Real-time PCR结果显示哮喘组OPN及OPN mRNA表达较对照组和DXM组均显著升高( $P<0.01$ );且OVA激发2周组的表达水平明显高于激发1周组( $P<0.01$ )。**结论** OPN可能是哮喘发病机制中的重要因素,哮喘气道炎症越重,OPN表达水平可能越高;DXM可能通过抑制OPN的表达来减轻哮喘炎症。**[中国当代儿科杂志, 2014, 16(12): 1265-1270]**

**[关键词]** 骨桥蛋白;哮喘;地塞米松;气道炎症;小鼠

### Effect of dexamethasone on osteopontin expression in the lung tissue of asthmatic mice

SUN Hai-Hui, SHANG Yun-Xiao, YANG Nan. Department of Pediatric Respiratory Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Shang Y-X, Email: shangyunx@sina.com)

**Abstract: Objective** To study the correlation between airway inflammation and osteopontin (OPN) level in the lung tissue, and to study the effect of dexamethasone (DXM) on OPN expression. **Methods** Fifty mice were randomly divided into 5 groups: normal control, ovalbumin (OVA)-challenged asthma groups (OVA inhalation for 1 week or 2 weeks) and DXM-treated asthma groups (DXM treatment for 1 week or 2 weeks). The mice were sensitized and challenged with OVA to prepare mouse model of acute asthma. Alterations of airway inflammation were observed by haematoxylin-eosin staining. Serum level of OVA-sIgE was evaluated using ELISA. OPN expression in the lung tissue was located and measured by immunohistochemistry and Western blot respectively. OPN mRNA level in the lung tissue was detected by real-time PCR. **Results** The asthma groups showed more pathological changes in the airway than the normal control and the DXM-treated groups. Compared with the OVA-challenged 1 week group, the pathological alterations increased in the OVA-challenged 2 weeks group. The level of OVA-sIgE in serum increased in the asthma groups compared with the control and the DXM groups ( $P<0.01$ ). Serum OVA-sIgE level increased more significantly in the OVA-challenged 2 weeks group compared with the OVA-challenged 1 week group ( $P<0.01$ ). OPN protein and mRNA levels were significantly raised in the asthma groups compared with the normal control and the DXM groups ( $P<0.01$ ), and both levels increased more significantly in the OVA-challenged 2 weeks group compared with the OVA-challenged 1 week group ( $P<0.01$ ). **Conclusions** The increased OPN expression in the lung tissue is associated with more severe airway inflammation in asthmatic mice, suggesting that OPN may play an important role in the pathogenesis of asthma. DXM can alleviate airway inflammation possibly by inhibiting OPN production.

**[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(12): 1265-1270]**

**Key words:** Osteopontin; Asthma; Dexamethasone; Airway inflammation; Mice

[收稿日期] 2014-04-19; [接受日期] 2014-06-24

[作者简介] 孙海会,女,硕士研究生。

[通信作者] 尚云晓,男,主任医师,教授。

支气管哮喘(简称哮喘)是以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞和中性粒细胞等多种细胞及细胞组分参与的一种气道慢性炎症性疾病。气道慢性炎症是哮喘的本质特点,是导致气道高反应和肺功能持续性下降的重要原因。明确气道慢性炎症机制是预防和控制气道慢性炎症的必要条件,也是干预和治疗哮喘的有效途径。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是细胞外基质中一种重要的多功能磷酸化糖蛋白,表达于T细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)、单核细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞等多种免疫细胞内。研究表明,OPN作为一种新型细胞因子参与免疫炎症反应<sup>[1]</sup>,包括介导多种细胞分泌促炎性因子<sup>[2-5]</sup>,维持气道慢性炎症<sup>[6-9]</sup>等。近年来,对于OPN是否参与哮喘发病机制,以及OPN在哮喘发病中的具体作用,越来越引起国内外学者的关注。已有研究表明OPN参与哮喘气道重塑<sup>[10-12]</sup>。然而OPN是否也参与哮喘气道炎症呢,国内外的研究相对较少。此外,糖皮质激素作为治疗哮喘的一线用药,明确其对OPN表达的影响,也具有重要的意义。

本研究通过建立不同程度哮喘及糖皮质激素干预治疗的小鼠模型,并对各组小鼠肺组织中OPN表达进行检测,来明确OPN是否参与哮喘发病、是否与气道炎症程度相关、是否受糖皮质激素的影响,进而初步探讨OPN在哮喘发病中的具体作用,为阐明哮喘的发病机制开辟新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝购于Sigma-Aldrich公司;兔源OPN一抗购于Bioss公司;免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购于碧云天生物技术研究;ECL显色试剂盒及BCA蛋白定量试剂盒为Pierce公司产品;TRIzol试剂液及OPN引物购于Invitrogen公司;SYBR Premix Ex Taq及PrimeScript RT试剂盒购于TaKaRa公司; $\beta$ -actin引物为凯基生物产品;小鼠血清OVA-sIgE ELISA试剂盒购于沈阳宝信生物公司。

### 1.2 小鼠分组及模型建立

4~6周龄SPF级雌性BALB/c小鼠50只,体重16~20g,由中国医科大学附属盛京医院中心实

验室提供并饲养。按随机数字表法分为正常对照组、不同程度哮喘组(OVA激发1周组、OVA激发2周组)及相应的地塞米松(DXM)治疗组(DXM治疗1周组、DXM治疗2周组),每组10只。模型制备参考文献<sup>[13-14]</sup>:哮喘组及DXM治疗组小鼠分别于第0、7和14天腹腔内注射含10  $\mu$ g OVA和1 mg 氢氧化铝的混悬液共0.4 mL致敏,第21天开始雾化吸入2%OVA诱导激发哮喘1周或2周,1次/d,30 min/次。DXM治疗组则在每次激发前1 h,腹腔内注射DXM 3 mg/kg。正常对照组致敏和激发均用等体积的缓冲液(PBS)替代OVA。

### 1.3 标本制备

每只小鼠于取材前腹腔注射10%水合氯醛0.1 mL麻醉,最后一次激发后24 h内断颈处死小鼠,行左心取血,低温离心后取上清,用于ELISA分析。取新鲜双肺组织,将左肺以10倍体积的4%多聚甲醛溶液固定,常规方法石蜡包埋、切片。采用连续切片,厚度4  $\mu$ m,每3张切片中取1张,行苏木精-伊红(HE)染色及免疫组织化学检测。按肺叶结构解剖右肺,分装后液氮冻存用于Western blot法及Real-time PCR法分析。

### 1.4 肺组织 HE 染色

随机选取每只小鼠肺组织3张切片,常规二甲苯脱蜡及酒精复水,然后苏木素染色、冲洗、伊红染色,最后梯度酒精脱水、二甲苯透明及中性树胶封片,显微镜下每张切片随机选取5个以上的高倍镜视野,观察支气管壁的形态学变化。

### 1.5 ELISA 法检测血清 OVA-sIgE 的表达

根据ELISA试剂盒说明书步骤,设标准孔、待测样品孔、空白孔,分别加样,37  $^{\circ}$ C温育1 h,洗板5次,加入A、B显色液,37  $^{\circ}$ C温育30 min,然后加入终止液终止,利用酶标仪按照450 nm波长测量各孔的光密度,根据标准曲线计算样品OVA-sIgE的浓度。

### 1.6 免疫组化法定位检测 OPN 表达

免疫组化步骤按说明书进行。随机选取每只小鼠肺组织3张切片,行常规脱蜡水化,3%  $H_2O_2$ 阻断30 min,进行抗原修复,山羊血清封闭30 min,滴加兔源OPN一抗4  $^{\circ}$ C过夜,生物素标记山羊抗兔IgG 37  $^{\circ}$ C温箱孵育40 min,辣根酶标记链酶卵白素37  $^{\circ}$ C温箱孵育15 min, DAB显色,然后复染、脱水、透明、封片,光镜下观察。空白对照组用PBS代替一抗,步骤同前。每张切片随

机选取5个以上的高倍镜视野,应用NIS-Elements Br 3.0图像分析软件计算出平均灰度值(Mean Density)作为该片蛋白半定量结果。

### 1.7 Western blot 检测肺组织中 OPN 的表达

分别取每只小鼠1份右肺叶标本,肺叶组织称重后按每100 mg标本加入0.5 mL PIPA裂解液,冰上剪碎组织,超声匀浆30 s,4℃ 14000 r/min离心15 min,取上清分装-80℃保存。上样后以10% SDS-PAGE凝胶电泳,分离蛋白质并转到PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭2 h,4℃一抗孵育过夜,二抗室温孵育2 h,ECL发光,凝胶成像仪成像。结果用ImageJ软件分析测定条带的积分光密度值,结果以OPN与内参GAPDH的比值表示。

### 1.8 Real-time PCR 检测肺组织中 OPN mRNA 的表达

分别取每只小鼠肺组织称重剪碎,加入适量TRIzol提取总RNA。参照反转录及扩增试剂盒说明书,将总RNA反转录为cDNA,取cDNA 2 μL、SYBR预混液16 μL、上下游引物2 μL共计20 μL总反应体系行实时定量PCR。小鼠OPN引物(336 bp)上游序列:5'-TGTGTCCTCTGAAGAAA-GGATGAC-3';下游序列:5'-TCTGTGGCATCAGGA-TACTGTTCA-3'。小鼠内参β-actin引物(136 bp)上游序列:5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3';下游序列:5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'。扩增反应条件均为95℃变性30 s,59℃退火1 min,

72℃延伸30 s,共40个循环。荧光定量PCR仪(ABI7500型号)自动分析并计算出每个样本的CT值,OPN mRNA的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 形式得出。

### 1.9 统计学分析

所有数据采用SPSS 19.0统计软件分析,计量数据以均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠症状比较

哮喘组雾化激发后出现烦躁不安、呼吸急促、抓耳抓鼻、腹肌抽搐和大小便失禁等表现,多次激发后出现毛发杂乱、光泽度差、体重增长缓慢;DXM组上述症状较轻;对照组无上述症状。

### 2.2 各组小鼠肺组织病理改变

HE染色可见对照组小鼠支气管管壁完整光滑,上皮细胞排列整齐,管腔光滑无狭窄,支气管及周围血管组织无明显炎性细胞浸润。哮喘组小鼠支气管管壁完整性受损,上皮细胞排列紊乱、脱落,管腔明显缩窄;支气管及周围血管组织可见大量的炎性细胞浸润;且OVA激发2周组上述病理学改变较OVA激发1周组重。DXM组小鼠上述表现较哮喘组轻,见图1。

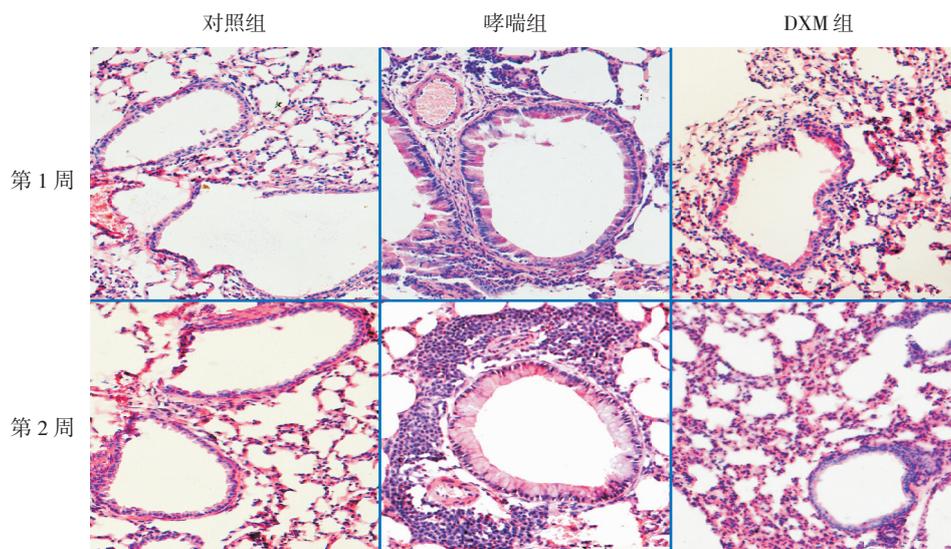


图1 各组小鼠肺组织病理形态学变化(苏木素-伊红染色,×200) 对照组气管管壁完整,上皮细胞排列整齐,管腔无狭窄,无明显炎性细胞浸润。哮喘组小鼠气管管壁完整性受损,上皮细胞排列紊乱,管腔明显缩窄;大量炎性细胞浸润;且OVA激发2周时上述病理学改变较1周时重。DXM组气管管壁较哮喘组相对完整,上皮细胞脱落减少,炎性细胞浸润减少。

### 2.3 ELISA 法检测各组血清 OVA-sIgE 水平

ELISA 结果显示,哮喘组小鼠血清 OVA-sIgE 明显高于对照组 ( $P<0.001$ ),且 OVA 激发 2 周组血清 OVA-sIgE 水平较激发 1 周组明显升高 ( $P<0.001$ );DXM 治疗组血清 OVA-sIgE 水平低于哮喘组但仍高于对照组 ( $P<0.001$ ),且 DXM 治疗 2 周组与治疗 1 周组比较差异无统计学意义 ( $P=0.549$ ),见图 2。

### 2.4 免疫组化法检测 OPN 在各组肺组织中的定位表达

免疫组化法结果显示,OPN 在肺组织中的表达主要定位于支气管上皮及气道和血管周围浸润的炎症细胞;经图像分析,OVA 激发 1 周( $44.8 \pm 3.5$ )及 2 周组( $66.3 \pm 4.9$ )肺组织 OPN 表达高于对照组( $11.5 \pm 2.8$ ) ( $P<0.001$ ),且 OVA 激发 2 周组 OPN 水平高于激发 1 周组 ( $P<0.001$ );DXM 治疗 1 周( $29.2 \pm 3.7$ )及 2 周组( $28.5 \pm 3.3$ ) OPN 表达均分别低于同时间点 OVA 组 ( $P<0.001$ ),见图 3。

### 2.5 Western blot 分析各组肺组织 OPN 的表达

Western blot 结果显示,哮喘组小鼠肺组织 OPN 表达明显高于对照组 ( $P<0.001$ ),且激发 2 周组 OPN 水平较激发 1 周组明显升高 ( $P<0.001$ );DXM 治疗组 OPN 水平低于哮喘组却高于对照组 ( $P<0.001$ ),且治疗 2 周组与治疗 1 周组比较差异无统计学意义 ( $P=0.925$ ),见图 4。

### 2.6 Real-time PCR 检测各组肺组织 OPN mRNA 的相对表达量

Real-time PCR 结果显示,哮喘组小鼠肺组织 OPN mRNA 相对表达量明显高于对照组 ( $P<0.001$ ),且激发 2 周组 OPN mRNA 水平较激发 1 周组明显升高 ( $P<0.001$ );DXM 治疗组 OPN mRNA 水平低于哮喘组却高于对照组 ( $P<0.001$ ),且治疗 2 周组与治疗 1 周组比较差异无统计学意义 ( $P=0.928$ ),见图 5。

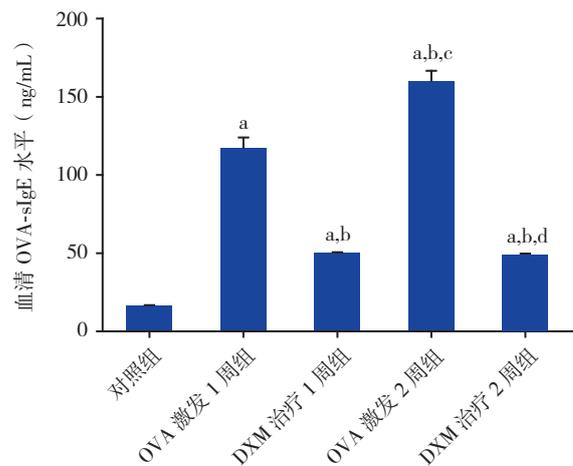


图 2 ELISA 法检测各组小鼠血清 OVA-sIgE 表达水平 ( $n=10$ ) a: 与对照组比较,  $P<0.001$ ; b: 与 OVA 激发 1 周组比较,  $P<0.001$ ; c: 与 DXM 治疗 1 周组比较,  $P<0.001$ ; d: 与 OVA 激发 2 周组比较,  $P<0.001$ 。

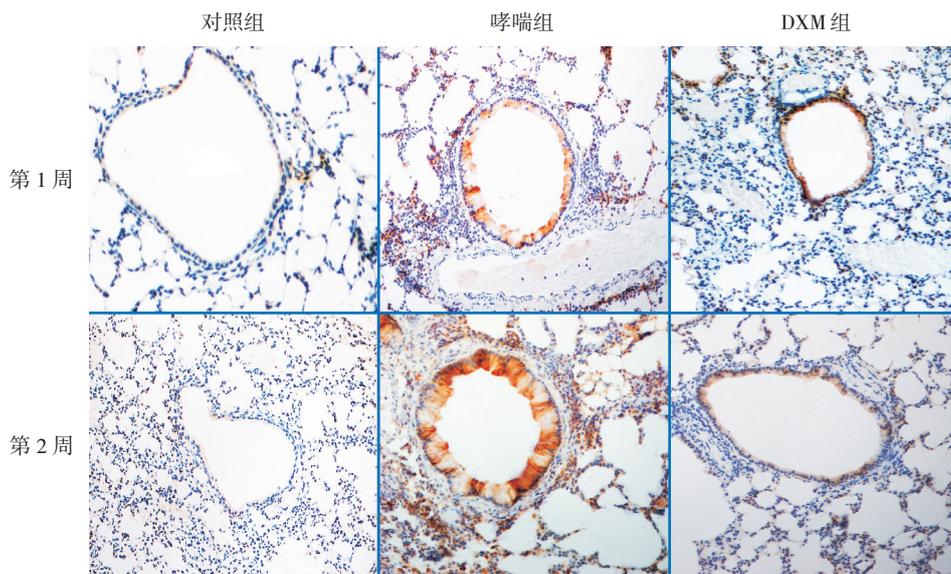


图 3 各组小鼠肺组织 OPN 表达 (DAB 染色,  $\times 200$ ) 棕褐色为 OPN 阳性表达,哮喘组 OPN 表达明显高于对照组,且 OVA 激发 2 周时 OPN 表达高于 1 周时,DXM 组 OPN 表达在各时间点均低于哮喘组。

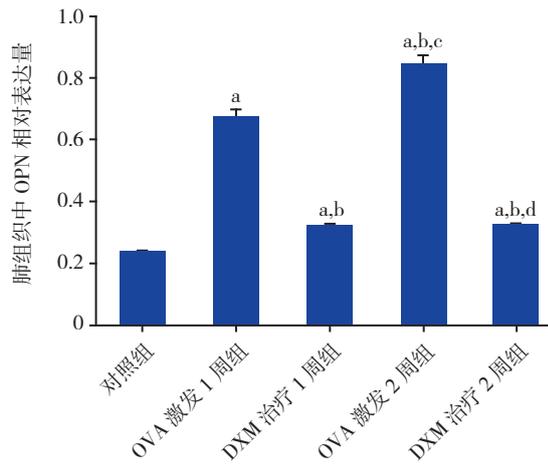


图4 Western blot 法检测各组小鼠肺组织 OPN 表达水平 (n=10) a: 与对照组比较, P<0.001; b: 与 OVA 激发1周组比较, P<0.001; c: 与 DXM 治疗1周组比较, P<0.001; d: 与 OVA 激发2周组比较, P<0.001。

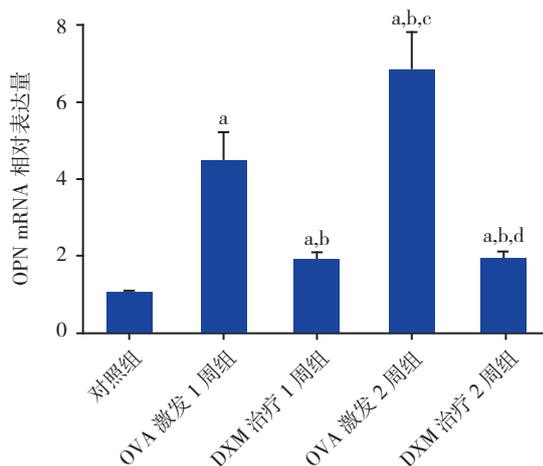


图5 Real-time PCR 法检测各组小鼠肺组织 OPN mRNA 表达水平 (n=10) a: 与对照组比较, P<0.001; b: 与 OVA 激发1周组比较, P<0.001; c: 与 DXM 治疗1周组比较, P<0.001; d: 与 OVA 激发2周组比较, P<0.001。

### 3 讨论

OPN 是细胞外基质中一种重要的多功能磷酸化糖蛋白, 最早从骨基质中分离, 因其能介导骨组织细胞与骨基质的连接、参与骨基质矿化和重吸收过程而得名。OPN 基因位于人染色体 4q13 上(位于鼠 5 号染色体上), 分子量为 44~75 KDa, 具有良好的可溶性。在活化的 T 细胞、DC、单核细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞等多种免疫细胞中均有其诱导性表达<sup>[1]</sup>。已有研究证实, OPN 与多种 Th1 细胞免疫相关疾病的发病机制有关, 如结节病<sup>[15]</sup>、

结核病<sup>[16]</sup>、类风湿关节炎<sup>[17]</sup>、Crohn's 病<sup>[18]</sup> 和多发性硬化<sup>[19]</sup> 等。那么, 在支气管哮喘等 Th2 细胞免疫疾病发病机制中, OPN 是否也发挥重要的作用呢? 众所周知, 支气管哮喘是由多种细胞(如嗜酸性细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞和气管上皮细胞等), 以及细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。近年来, 相关临床和动物实验均表明, OPN 在支气管上皮细胞、T 细胞、DC、嗜酸性粒细胞中均有诱导性表达<sup>[20-21]</sup>, 可通过黏附 T 细胞、DC 和巨噬细胞来影响不同细胞因子的分泌。此外, 相比正常鼠, OPN 基因敲除(OPN<sup>-/-</sup>)分泌高水平 IL-13 而低水平 IFN- $\gamma$ <sup>[7,22-23]</sup>。又有研究表明 OPN 还能够下调 IL-4 的水平<sup>[8,24]</sup>。Xanthou 等<sup>[9]</sup>发现 OPN 可以介导不同类型的 DC 细胞, 在气道炎症反应中发挥着双重作用。另外, Takahashi 等<sup>[2]</sup>和 Puxeddu 等<sup>[3]</sup>先后发现, OPN 表达水平与嗜酸性粒细胞数目呈正相关, 并且具有能够诱导嗜酸性粒细胞迁移的效应。综上所述, OPN 能够影响多种炎症细胞及其炎症因子的分泌, 这些细胞因子与炎症细胞相互作用相互影响构成复杂的网络, 进而影响气道炎症。而气道慢性炎症又是哮喘的本质特点, 这就提示 OPN 可能与哮喘的发病机制存在某种关系。所以, 研究 OPN 在不同程度哮喘模型中的表达水平, 对于明确 OPN 与哮喘气道炎症的关系以及进一步研究哮喘的发病机制, 都具有重要的意义。

本研究以 OVA 致敏和激发建立不同程度急性哮喘模型, 并以 DXM 对哮喘小鼠进行干预。通过 3 次致敏、1 周或 2 周的激发, 哮喘组小鼠出现呼吸急促、鼻部瘙痒和口唇紫绀等哮喘症状, 血清中 OVA-sIgE 表达显著增加, 病理切片 HE 染色显示小鼠支气管上皮破坏、黏膜水肿、管腔狭窄、大量炎性细胞浸润, 说明哮喘模型建立成功。并且激发 2 周组上述所有变化均较激发 1 周组明显, 说明在哮喘模型中, 激发 2 周组的气道炎症比激发 1 周组严重。研究结果显示, OPN 主要表达于哮喘小鼠支气管上皮细胞及浸润的炎症细胞内, 哮喘组肺组织 OPN 及 OPN mRNA 表达水平明显高于对照组, 其中激发 2 周组显著高于激发 1 周组, 这表明 OPN 可能参与哮喘的发病并与气道炎症程度密切相关, 即气道炎症程度越重, OPN 表达水平可能越高。根据本实验结果和既有的文献报道,

我们推测 OPN 可能是通过调节多种炎性细胞因子来维持气道炎症进而参与哮喘发病。关于其具体机制,尚需要进一步探究。

糖皮质激素作为哮喘治疗的一线用药,主要是控制哮喘的免疫炎症反应,已获得极大的成效。本研究动物模型中,DXM 组小鼠的哮喘症状、血清中 OVA-sIgE 水平和病理学的相关变化都明显低于哮喘组,这说明 DXM 治疗哮喘有效。本研究发现,DXM 组肺组织 OPN 蛋白及 mRNA 表达水平明显低于哮喘组,表明 DXM 能够下调 OPN 的表达水平。由此认为,DXM 抑制 OPN 的表达可能是其控制哮喘炎症的机制之一。DXM 影响 OPN 表达的机制尚不清楚,仍需我们进一步的努力探索。

总之,本研究首次评估了 OPN 与不同气道炎症程度的相关性,并且分别从蛋白水平及转录水平上,综合的评估 OPN 在哮喘及 DXM 模型中的表达。研究者认为,本研究可能对拓展哮喘的发病机制提供一个新的视角。

#### [参 考 文 献]

[1] Morimoto J, Kon S, Matsui Y, et al. Osteopontin; as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(4): 494-505.

[2] Takahashi A, Kurokawa M, Konno S, et al. Osteopontin is involved in migration of eosinophils in asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(8): 1152-1159.

[3] Puxeddu I, Berkman N, Ribatti D, et al. Osteopontin is expressed and functional in human eosinophils[J]. *Allergy*, 2010, 65(2): 168-174.

[4] Kurokawa M, Konno S, Matsukura S, et al. Effects of corticosteroids on osteopontin expression in a murine model of allergic asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009, 149 Suppl 1: 7-13.

[5] Liu Y, Lu X, Yu HJ, et al. The expression of osteopontin and its association with Clara cell 10 kDa protein in allergic rhinitis[J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(11): 1632-1641.

[6] Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity[J]. *Science*, 2000, 287(5454): 860-864.

[7] Kurokawa M, Konno S, Takahashi A, et al. Regulatory role of DC-derived osteopontin in systemic allergen sensitization[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(12): 3323-3330.

[8] Seier AM, Renkl AC, Schulz G, et al. Antigen-specific induction of osteopontin contributes to the chronification of allergic contact dermatitis[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(1): 246-258.

[9] Xanthou G, Alissafi T, Semitekolou M, et al. Osteopontin has

a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 570-578.

[10] Kariyawasam HH, Robinson DS. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6): 681-686.

[11] Singh M, Foster CR, Dalal S, et al. Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(3): 538-543.

[12] Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1583-1594.

[13] Kurokawa M, Kokubu F, Matsukura S, et al. Effects of corticosteroid on the expression of thymus and activation-regulated chemokine in a murine model of allergic asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 137 Suppl 1: 60-68.

[14] Suzuki S, Kokubu F, Kawaguchi M, et al. Expression of interleukin-17F in a mouse model of allergic asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 143 Suppl 1: 89-94.

[15] Koguchi Y, Kawakami K, Uezu K, et al. High plasma osteopontin level and its relationship with interleukin-12-mediated type 1 T helper cell response in tuberculosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(10): 1355-1359.

[16] Xu G, Nie H, Li N, et al. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(4): 1060-1067.

[17] Sato T, Nakai T, Tamura N, et al. Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response[J]. *Gut*, 2005, 54(9): 1254-1262.

[18] Comabella M, Pericot I, Goertsches R, et al. Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis[J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 158(1-2): 231-239.

[19] Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, et al. Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(4): 752-761.

[20] Li X, O'Regan AW, Berman JS. IFN-gamma induction of osteopontin expression in human monocytoic cells[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2003, 23(5): 259-265.

[21] Konno S, Eckman JA, Plunkett B, et al. Interleukin-10 and Th2 cytokines differentially regulate osteopontin expression in human monocytes and dendritic cells[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2006, 26(8): 562-567.

[22] Delimpoura V, Bakakos P, Tseliou E, et al. Increased levels of osteopontin in sputum supernatant in severe refractory asthma[J]. *Thorax*, 2010, 65(9): 782-786.

[23] Samitas K, Zervas E, Vittorakis S, et al. Osteopontin expression and relation to disease severity in human asthma[J]. *Eur Respir J*, 2011, 37(2): 331-341.

[24] Hillas G, Loukides S, Kostikas K, et al. Increased levels of osteopontin in sputum supernatant of smoking asthmatics[J]. *Cytokine*, 2013, 61(1): 251-255.

( 本文编辑: 周勇 )