

RANTES 在哮喘大鼠肺组织中的 表达及维生素 D 的干预作用

陈伟伟¹ 蔡栩栩¹ 田维敏² 尚云晓¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院小儿呼吸内科, 辽宁 沈阳 110004;
2. 厦门大学附属中山医院儿科, 福建 厦门 361004)

【摘要】目的 探讨维生素 D 对哮喘大鼠肺组织中调节正常 T 细胞表达和分泌的趋化因子(RANTES)表达的影响及维生素 D 参与控制哮喘气道炎症及与激素协同作用的作用机制。**方法** 40 只雌性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、哮喘组、维生素 D 干预组、布地奈德干预组、布地奈德联合维生素 D 干预组, 每组 8 只。采用苏木精-伊红染色观察肺组织病理改变; 免疫组化方法测定肺组织 RANTES 蛋白的表达; ELISA 检测肺泡灌洗液(BALF)中 RANTES 的含量; 实时定量 PCR 测定 RANTES mRNA 的表达。**结果** 哮喘组大鼠气道炎症反应最明显, 出现炎症细胞浸润、气道狭窄变形及平滑肌的断裂, 各个干预组较哮喘组有不同程度的缓解, 其中布地奈德干预组的缓解程度优于维生素 D 组; 联合干预组的病理改变最轻, 与正常对照组相近。哮喘组大鼠肺组织及 BALF 中 RANTES 蛋白的表达明显高于正常对照组($P < 0.05$), 各干预组的表达较哮喘组有不同程度下降, 除维生素 D 干预组与哮喘组 BALF 中 RANTES 蛋白的表达差异无统计学意义外, 其余各干预组与哮喘组之间的差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且联合干预组肺组织及 BALF 中 RANTES 蛋白表达量均低于单独使用布地奈德及维生素 D 组($P < 0.05$); 哮喘组 RANTES mRNA 的表达较正常对照组显著升高($P < 0.05$), 各干预组较哮喘组有不同程度的下降($P < 0.05$), 但各干预组间差异无统计学意义, 且联合干预组 RANTES mRNA 表达的下降幅度最大, 与正常对照组比较差异无统计学意义。**结论** 哮喘大鼠 BALF、肺组织中的 RANTES 蛋白及其 mRNA 的表达水平明显增高; 维生素 D 干预可以降低其表达水平, 提示维生素 D 可以通过调节 RANTES 的表达来减轻气道炎症反应; 且维生素 D 可以协同布地奈德进一步降低 RANTES 蛋白及 mRNA 的表达水平。 [中国当代儿科杂志, 2012, 14(11): 863-868]

【关键词】 维生素 D; 哮喘; RANTES; 大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)11-0863-06

Expression of RANTES in the lung tissue of asthmatic rats, and the intervention effect of vitamin D on RANTES expression

CHEN Wei-Wei, CAI Xu-Xu, TIAN Wei-Min, SHANG Yun-Xiao. Department of Pediatric Respiratory, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Cai X-X, Email: caixx@sj-hospital.org)

Abstract: Objective To investigate the effect of vitamin D on the expression of chemokine regulated on activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) in the lung tissue of asthmatic rats, and the role of vitamin D in the control of asthmatic airway inflammation and the synergistic action of hormones. **Methods** Forty female Wistar rats were randomly and equally divided into normal control, asthma, vitamin D intervention, budesonide intervention, and budesonide + vitamin D intervention groups. Hematoxylin and eosin staining was used to observe pathological changes in the lung tissue. Immunohistochemistry was used to measure the protein expression of RANTES in lung tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the level of RANTES in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Real-time quantitative PCR was used to measure the mRNA expression of RANTES. **Results** The asthma group showed the most significant pathological changes in the lung tissue, including inflammatory cell infiltration, bronchial stenosis and distortion and smooth muscle rupture, while the intervention groups showed fewer pathological changes. Of the intervention groups, the budesonide intervention group showed fewer pathological changes than the vitamin D intervention group, and the budesonide + vitamin D intervention group showed the mildest pathological changes, which were similar to those observed in the normal control group. Protein expression of RANTES in the lung tissue and BALF was significantly higher in the asthma group than in the normal

[收稿日期] 2012-06-14; [修回日期] 2012-06-28
[基金项目] 沈阳市科学技术计划(No. 1081269-9-00)。
[作者简介] 陈伟伟, 女, 硕士研究生。
[通信作者] 蔡栩栩, 教授。

control group ($P < 0.05$), while it was lower in the intervention groups than in the asthma group, exhibiting significant differences between each intervention group and the asthma group ($P < 0.05$) (except the difference in protein expression of RANTES in BALF between the vitamin D intervention and asthma groups). The budesonide + vitamin D intervention group showed less protein expression of RANTES in the lung tissue and BALF than both the budesonide intervention and vitamin D intervention groups ($P < 0.05$). The mRNA expression of RANTES was significantly higher in the asthma group than in the normal control group ($P < 0.05$), while it was significantly lower in three intervention groups than in the asthma group ($P < 0.05$), however no significant difference was found between the intervention groups in this regard. The budesonide + vitamin D intervention group showed the lowest level of RANTES mRNA, with no significant difference from the normal control group. **Conclusions** The mRNA and protein expression of RANTES in BALF and lung tissue increases significantly in asthmatic rats. Vitamin D intervention can decrease the expression of RANTES, suggesting that vitamin D can reduce airway inflammation by regulating the expression of RANTES. Vitamin D can be used together with budesonide to further decrease the mRNA and protein expression of RANTES. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(11):863-868]

Key words: Vitamin D; Asthma; RANTES; Rats

支气管哮喘是最常见的儿童慢性气道炎症性疾病,发病率呈上升趋势,急性发作时甚至会导致死亡。其基础病变为气道炎症,继发可逆性气流受限、气道高反应和气道重塑等。哮喘的气道炎症反应中涉及多种炎症细胞及趋化因子,其中嗜酸性粒细胞是主要的效应细胞。调节正常T细胞表达和分泌的趋化因子(regulated on activation, normal T cells expressed and secreted, RANTES)是一种重要的嗜酸性粒细胞相关的趋化因子,不仅对嗜酸性粒细胞具有特异的趋化活性,而且也参与嗜酸性粒细胞的活化过程。在哮喘的变态反应性炎症中,RANTES一方面促使嗜酸性粒细胞从骨髓中释放;另一方面,局部释放的RANTES可以募集嗜酸性粒细胞迁移至气道组织中,使嗜酸性粒细胞作为主要的效应细胞形成气道的炎性病变;有研究证实RANTES的表达升高与气道炎症的严重程度相关^[1-2]。1,25-二羟维生素D₃[1,25-(OH)₂D₃]是维生素D₃的生物活性代谢产物,属开环甾体类化合物激素,除调节骨钙代谢外,还具有重要的免疫调节作用,被认为可以作为一种新型的免疫调节剂运用到多种免疫相关性疾病的治疗中。流行病学研究发现维生素D缺乏在哮喘儿童中的发生率相对正常儿童的发生率高,且与哮喘的严重程度具有相关性^[3],提示维生素D在哮喘的防治中可能会发挥一定的作用^[4-6],但维生素D与哮喘气道炎症之间的关系尚不明确。本研究探讨哮喘大鼠肺组织RANTES在受到维生素D干预时的表达变化,从而进一步明确维生素D对控制哮喘气道炎症的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

4~6周龄SPF级的Wistar雌性大鼠40只,体重140~160 g,由中国医科大学实验动物中心提供。

将所有大鼠随机分为正常对照组、哮喘组、维生素D干预组、布地奈德干预组和联合干预组(即布地奈德与维生素D联合干预组),每组8只。按照Wistar大鼠哮喘模型制作方法制作哮喘模型^[7]。各组大鼠分别于第1天和第8天经腹腔注射含有0.1%卵清蛋白(OVA)1 mg、氢氧化铝100 mg及 6×10^9 个灭活的百日咳杆菌的混合液1 mL进行致敏;第15天至第21天,将各组大鼠置于密闭的玻璃容器内(20 cm × 20 cm × 20 cm),以1%的OVA进行雾化吸入激发,每次30 min;正常对照组用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替OVA溶液;布地奈德干预组在激发前1 h泵吸含0.5 mg布地奈德混悬液,泵吸10 min;维生素D干预组在激发前腹腔注射1,25-(OH)₂D₃(2.5 μg/kg);联合干预组在激发前1 h泵吸布地奈德混悬液,并腹腔注射1,25-(OH)₂D₃,然后进行激发。最后一次激发完成后24 h内取材。留取肺组织分装后于-80℃冰箱保存。

1.2 主要药品与试剂

OVA(美国Sigma公司)、百日咳疫苗(北京生物制品研究所)、1,25-(OH)₂D₃(美国Sigma公司)、布地奈德混悬液(阿斯利康公司)、大鼠RANTES免疫组化试剂盒(博士德公司)、大鼠ELISA试剂盒(美国GBD公司)、PCR引物(Invitrogen 英骏生物技术有限公司)、DEPC水(上海生工生物有限公司)、dNTP(大连宝生物有限公司)、Real time quantitative PCR(SYBRPremix Ex TaqTM)试剂盒(大连宝生物工程有限公司)、Trizol试剂(美国Invitrogen公司)。

1.3 方法

1.3.1 肺泡灌洗液的收集 每组大鼠于末次激发24 h内腹腔注射10%水合氯醛(40 mg/kg)进行麻醉,麻醉后将大鼠仰卧位固定,常规碘酒、酒精消毒颈部及胸部,以无菌专用器械操作。打开胸腔,分离颈部气管,结扎右主支气管,气管插管约0.5 cm,分3次从气管插管处缓慢注入4℃预冷的生理盐水,每次

0.8 mL,保留 30 s 后缓慢回抽,收集全部肺泡灌洗液(BALF)(回收率 >85% 为合格),1500 r/min,4℃ 离心 10 min,取上清于 -80℃ 冰箱冻存。

1.3.2 苏木精-伊红染色观察肺组织病理改变

制备好的石蜡切片常规脱蜡脱水(二甲苯 I 10 min,二甲苯 II 20 min,100%、95%、85%、75% 依次脱水各 3 min,自来水冲洗 15 min),然后用苏木精染色 10 min,伊红复染 1 min,脱水,透明,中性树胶封片,光镜下观察肺组织的病理改变。

1.3.3 免疫组化检测肺组织中 RANTES 蛋白的表达

肺组织 RANTES 蛋白表达检测步骤按 SP 试剂盒使用说明书进行。一抗为 RANTES 兔抗大鼠多克隆抗体,稀释度为 1:160;二抗及检测试剂盒为 SP 工作液,3,3'-二氨基苯联胺(DAB)显色,苏木精复染。本实验 RANTES 蛋白阳性表达主要集中于各级支气管(细支气管、终末细支气管和呼吸性细支气管)的气道平滑肌细胞,气道上皮细胞和肺泡表皮细胞也有表达;显微镜(尼康)下观察组织着色情况,细胞质清晰、胞浆染色呈棕黄色为阳性;对图像进行采集(使用 NIS-Elements F 3.0 系统),采用图像分析软件(NIS-Elements Br 3.0)对 RANTES 阳性部位进行原位定量检测,得到光密度值。

1.3.4 ELISA 检测 BALF 中 RANTES 含量

按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,最后使用 Bio-Tek 酶标仪测量 450 nm 波长处的吸光度值(A)。

1.3.5 实时定量 PCR 法检测肺组织中 RANTES mRNA 的表达 采用 Trizol 法提取右肺总 RNA,并反转录成 cDNA,设计引物扩增目的片段。RANTES 的正义链引物序列为 5'-CCGTCATCCTCGTTG-3',反义链引物序列为 5'-TTGGCGGTTCTTCG-3',片段长度为 188 bp;内参 GAPDH 正义链为 5'-GCAAGTTCAACGGCACA-3',反义链为 5'-CATTTCATGTTAGCGGGAT-3',片段长度为 100 bp。反应条件均为 95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 34 s,共 40 个循环。得出标准曲线,荧光定量 PCR 仪自动分析并计算结果,待测基因 mRNA 的相对表达量应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法得出相对倍数。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较在方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠激发后表现

哮喘组大鼠激发时,均出现不同程度的烦躁不安、呼吸加快、腹肌抽搐、打喷嚏、搔抓口鼻或俯卧不动等症状;维生素 D 干预组的表现较哮喘组大鼠的表现减轻,布地奈德干预组的表现进一步缓解,联合干预组的表现最轻,正常对照组无上述异常改变。

2.2 肺组织病理学改变

在光学显微镜下观察,对照组大鼠的肺组织形态学正常。哮喘组大鼠肺组织内可见支气管腔中有黏液栓形成,支气管上皮结构不规则、细胞脱落;气道平滑肌细胞增多,局部出现断裂,管腔变形;气道壁及肺间质中有大量炎症细胞浸润。各干预组较哮喘组有不同程度的改善,其中布地奈德干预组比维生素 D 干预组明显减轻,联合干预组的肺组织结构完整,气管及肺泡形态规则,官腔内分泌物少,炎症细胞浸润不明显,气道平滑肌没有明显的变化,与对照组最为接近。见图 1。

2.3 免疫组化检测肺组织中 RANTES 蛋白的表达

各组均有 RANTES 蛋白表达,且差异有统计学意义($F = 67.232, P < 0.05$)。主要表达在气道平滑肌细胞、气道上皮细胞的胞浆中,其中正常对照组表达最少,光密度值为 0.124 ± 0.020 ;哮喘组表达最强,光密度值为 0.435 ± 0.087 ;维生素 D 干预组的阳性表达较哮喘组减轻,光密度值为 0.300 ± 0.048 ($P < 0.05$);布地奈德干预组阳性表达低于维生素 D 干预组,光密度值为 0.248 ± 0.021 ($P < 0.05$);联合干预组与维生素 D 和布地奈德干预组相比阳性表达进一步下降,光密度值为 0.165 ± 0.022 (分别 $P < 0.05$),与正常对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

2.4 ELISA 法检测 BALF 中 RANTES 的含量

正常对照组 BALF 中 RANTES 的含量最低,哮喘组明显升高($P < 0.05$),经维生素 D 干预后 RANTES 含量降低,但与哮喘组的差异无统计学意义($P = 0.994$);布地奈德干预组较哮喘组下降明显($P < 0.05$),但与维生素 D 干预组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);联合干预组 RANTES 下降最为显著,与哮喘组、维生素 D 干预组及布地奈德干预组相比差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 3。

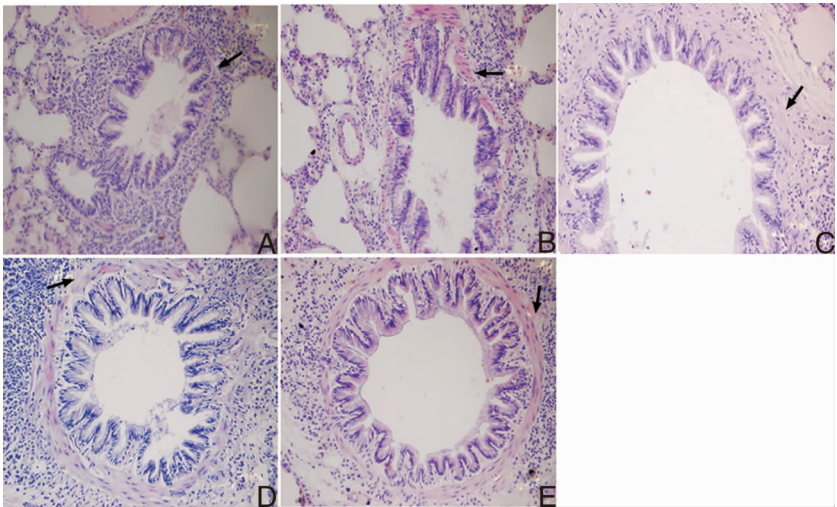


图 1 肺组织病理形态学改变(苏木精 - 伊红染色, ×200) A: 正常对照组;B: 哮喘组;C: 维生素 D 干预组;D: 布地奈德干预组;E: 联合干预组。正常对照组肺组织形态学正常;哮喘组肺组织内可见支气管上皮结构不规则、细胞脱落, 气道平滑肌细胞增多、局部出现断裂、管腔变形, 气道壁及肺间质中有大量炎性细胞浸润;3 个干预组的改变较哮喘组减轻, 其中联合干预组与正常对照组最接近。箭头所示为气道平滑肌细胞及周围炎症细胞的浸润。

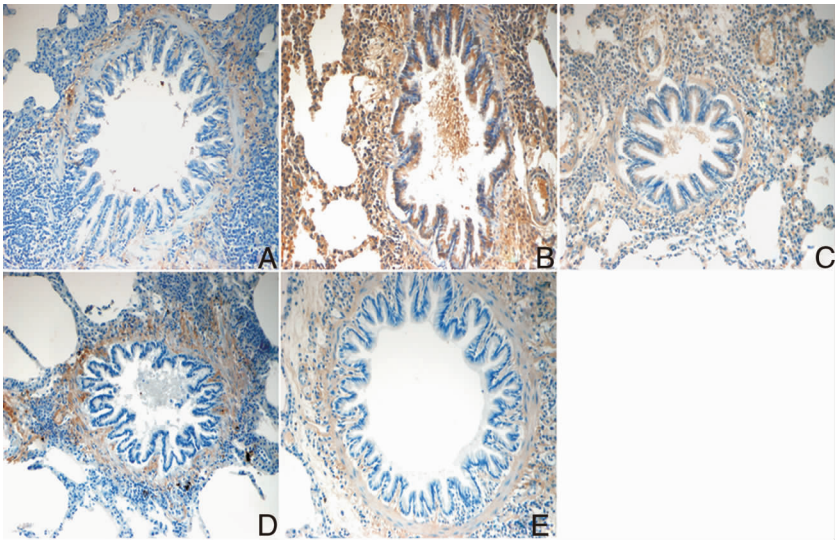


图 2 RANTES 蛋白在肺组织中的表达(DAB 显色, ×200) A: 正常对照组;B: 哮喘组;C: 维生素 D 干预组;D: 布地奈德干预组;E: 联合干预组。正常对照组 RANTES 表达较弱;哮喘组表达最强;3 个干预组的表达较哮喘组减少, 其中联合干预组的表达最少。图中棕黄色颗粒为 RANTES 阳性表达。

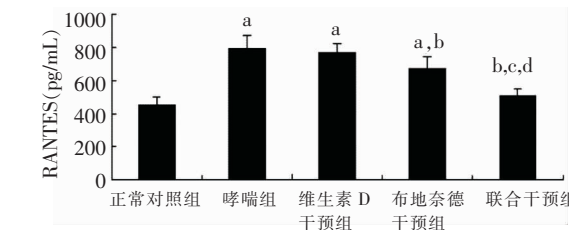


图 3 不同组大鼠 BALF 中 RANTES 含量比较($n=8$)
a: 与正常对照组比较, $P<0.05$; b: 与哮喘组比较, $P<0.05$; c: 与维生素 D 干预组比较, $P<0.05$; d: 与布地奈德干预组比较, $P<0.05$ 。

2.5 实时定量 PCR 检测肺组织中 RANTES mRNA 的表达

正常对照组大鼠肺组织中 RANTES mRNA 的表达最弱, 哮喘组 RANTES mRNA 的表达明显高于正常对照组 ($P<0.05$); 各干预组与哮喘组相比差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 但 3 个干预组间的差异无统计学意义 ($P>0.05$); 联合干预组下降最明显, 与正常对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。图 4。

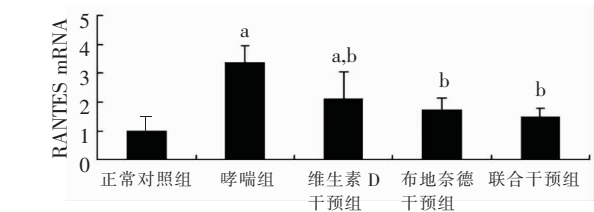


图4 各组肺组织中 RANTES mRNA 表达比较($n=8$)
a: 与正常对照组比较, $P<0.05$;b: 与哮喘组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

气道炎症是支气管哮喘最基础的病理改变,气道高反应、可逆性气流受限及气道重塑往往是气道炎症所引起的级联反应。气道慢性炎症学说认为尽管哮喘在缓解期可以没有任何症状和体征,但气道炎症始终存在。因此不管是在哮喘的急性发作期还是在慢性缓解期,控制气道炎症都是治疗哮喘的关键。哮喘气道炎症反应中的主要效应细胞是嗜酸性粒细胞,其活化后能够释放多种毒性蛋白、细胞因子以及脂类介质等,这些物质对于气道局部的组织结构都具有直接或间接的损害作用。RANTES 和 eotaxin 是重要的嗜酸性粒细胞趋化因子,可以直接动员嗜酸性粒细胞迁移至气道管腔内以扩大炎症反应;同时,活化的嗜酸性粒细胞具有激发 Th2 反应的能力,因此阻断嗜酸性粒细胞生成及活化过程可能是哮喘治疗的另一种途径。本课题组前期的研究证实维生素 D 可以使 eotaxin 的表达下调^[8],本实验进一步研究维生素 D 对哮喘大鼠肺组织中 RANTES 表达的影响。

Meta 分析认为 RANTES 基因多态性与哮喘的发病有关^[9-10]。以往的研究发现,在哮喘患者的 BALF 中,RANTES 的含量显著升高^[11]。动物实验也证实,使用 RANTES 的抑制剂后,随着 RANTES 分泌量的下降,哮喘的气道炎症也有所缓解^[1]。本实验中哮喘组大鼠肺组织炎症反应最重,其 BALF 中 RANTES 的浓度及肺组织中 RANTES 蛋白及 mRNA 的表达较正常对照组均显著升高。提示哮喘大鼠肺组织生成 RANTES 的量较正常对照组增多,证实 RANTES 与哮喘气道炎症有一定的关系,这与以往的研究一致^[1]。

维生素 D 是一种第二类固醇激素,除了经典的调节骨钙平衡的作用外,还可以影响肺组织结构和功能的发育^[12-13],并且在肺的微环境中发挥免疫调节作用^[14-17]。本研究采用苏木精-伊红染色、免疫组化、ELISA、实时 PCR 的方法检测哮喘大鼠肺组织的气道炎症改变、RANTES 在蛋白及基因水平的表达和

维生素 D 的调控作用。结果表明,哮喘大鼠肺组织的炎症反应最重,且 RANTES 在蛋白和基因水平上的表达较正常对照组显著升高,经维生素 D 干预后,肺组织病理改变较哮喘组有改善,同时 RANTES 蛋白及其 mRNA 的表达也有下调;布地奈德干预组中 RANTES 蛋白及其 mRNA 的表达较维生素 D 干预组进一步下降;联合干预组的下降最明显,优于单独使用布地奈德和维生素 D 组,提示布地奈德与维生素 D 联合应用时可以增强布地奈德抑制 RANTES 表达的作用,进一步降低哮喘的气道炎症反应。

维生素 D 可以通过多种途径影响 RANTES 的表达和分泌,已知 RANTES 的启动子区域包含数个重要的反应元件,包括 2 个激活子蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 结合位点,STAT 结合蛋白及 NF- κ B 结合元件。本实验中,维生素 D 抑制 RANTES 的表达,可能是通过以下途径实现的:(1) NF- κ B 途径,NF- κ B 是一种转录调节因子,激活后可以转位入核与靶基因启动子或增强子上的特异性 DNA 序列结合,可诱导多种因子的转录,包括细胞因子、趋化因子、急性期蛋白、补体、生长因子等的表达。已知人类 RANTES 基因启动区的上游区域含有 4 个 NF- κ B 结合位点^[18],提示 NF- κ B 可能在维生素 D 调节 RANTES 的表达和分泌中起到一定作用。体外实验也已证实维生素 D 能够抑制 NF- κ B 向核内易位,最终导致炎症趋化因子分泌的减少^[16,19]。(2) STAT 途径,RANTES 的启动子区域包含数个重要的反应元件,其中包括 STAT 结合蛋白,STAT 转位入核后可以结合到靶基因启动子区的 9 bp 回文结构序列而调节基因转录,已有研究证实 STAT 在气道上皮细胞中参与 RANTES 分泌的调节^[20],有学者认为糖皮质激素治疗哮喘的机制与其抑制 STAT6 的表达密切相关^[21],但关于维生素 D 对 STAT 途径的影响还缺乏足够的证据,尚需要继续深入研究。

目前预防哮喘发作的最有效措施是进行持久的抗炎治疗,而吸入糖皮质激素是首选的一线治疗药物。如何能够提高糖皮质激素的作用,以更好地控制哮喘尤其是难治性哮喘患者的气道炎症反应是人们一直关心的问题。有研究发现,维生素 D 可以通过对 Treg 发挥调节作用进而影响对激素耐受的患者们的治疗效果,一旦哮喘患儿 Treg 的调节性功能受损,维生素 D 便可以恢复 Treg 的调节能力,促进 IL-10 的分泌,进而抑制 Th2 的免疫应答^[22]。另外,在体外培养的 CD4⁺ T 细胞中,维生素 D 虽然不能增加糖皮质激素受体 (GR) 的表达,但可以防止地塞米松造成的 GR 表达的下调^[22]。而且,目前已有研究

认为,血清维生素 D 的水平降低与糖皮质激素治疗的反应性下降有关,研究认为维生素 D 能够促进地塞米松发挥作用^[23-24]。本实验中给予哮喘大鼠使用布地奈德联合维生素 D 后,RANTES mRNA 及蛋白的表达下降更明显,优于单独使用布地奈德和维生素 D。结果表明,布地奈德可部分阻断、抑制 RANTES 的表达和分泌,降低哮喘气道的炎症反应,在这个过程中,维生素 D 可以发挥一定的协同作用。

尽管目前还缺乏临床试验,但联合应用布地奈德和维生素 D 可能是一种积极的控制哮喘气道炎症的有效措施。

[参 考 文 献]

[1] Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation[J]. *J Immunol*, 1997, 158(9): 4398-4404.

[2] Pan ZZ, Parkyn L, Ray A, Ray P. Inducible lung-specific expression of rantes; preferential recruitment of neutrophils[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(4): L658-L666.

[3] Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(9): 765-771.

[4] Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3y of age [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85(3): 788-795.

[5] Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing[J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85(3): 853-859.

[6] Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, Kronberg-Kippilä C, Ahonen S, Nevalainen J, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(6): 875-882.

[7] Li M, Shang YX, Wei B, Yang YG. The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2011, 8(1): 18.

[8] 田维敏,尚云晓,蔡栩栩,魏秀清. 1,25-二羟维生素 D3 对哮喘大鼠 BALF 中 Eotaxin 及 IL-8 表达的影响[J]. *实用药物与临床*, 2011, 14(6): 451-454.

[9] Zhang YG, Huang J, Zhang J, Li XB, He C, Xiao YL, et al. RANTES gene polymorphisms and asthma risk: A meta-analysis [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(1): 50-58.

[10] Fang Q, Wang F, Zhao D. Association between regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) -28C/G polymorphism and asthma risk--a meta-analysis[J]. *Int J*

Med Sci, 2010, 7(1): 55-61.

[11] Tillie-Leblond I, Hammad H, Desurmont S, Pugin J, Wallaert B, Tonnel AB, et al. CC chemokines and interleukin-5 in bronchial lavage fluid from patients with status asthmaticus. Potential implication in eosinophil recruitment[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(2 Pt 1): 586-592.

[12] Gaultier C, Harf A, Balmain N, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Lung mechanics in rachitic rats[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1984, 130(6): 1108-1110.

[13] 顾海燕,赵德育,王全. 维生素 D 缺乏对子代大鼠肺形态结构及血小板源性生长因子-A 表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(4): 326-330.

[14] Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lohan N, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form; potential effects on host defense[J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 7090-7099.

[15] Bartlett JA, Fischer AJ, McCray PB Jr. Innate immune functions of the airway epithelium[J]. *Contrib Microbiol*, 2008, 15: 147-163.

[16] Hansdottir S, Monick MM, Lohan N, Powers L, Gerke A, Hunninghake GW. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF-kappaB-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state[J]. *J Immunol*, 2010, 184(2): 965-974.

[17] Witteke A, Chang A, Froicu M, Harandi OF, Weaver V, August A, et al. Vitamin D receptor expression by the lung micro-environment is required for maximal induction of lung inflammation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 460(2): 306-313.

[18] Casola A, Henderson A, Liu T, Garofalo RP, Brasier AR. Regulation of RANTES promoter activation in alveolar epithelial cells after cytokine stimulation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(6): L1280-L1290.

[19] Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725-734.

[20] Homma T, Matsukura S, Hirose T, Ohnishi T, Kimura T, Kurokawa M, et al. Cooperative activation of CCL5 expression by TLR3 and tumor necrosis factor-alpha or interferon-gamma through nuclear factor-kappaB or STAT-1 in airway epithelial cells[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 152 (Suppl 1): 9-17.

[21] 李昌崇,叶乐平,陈小芳,李绍波,蔡晓红,董琳,等. 哮喘大鼠信息传递与转录活化因子 6 的表达和地塞米松对其表达的影响[J]. *中华儿科杂志*, 2005, 43(7): 521-525.

[22] Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(1): 146-155.

[23] Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, Stevens AD, Leung DY. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(7): 699-704.

[24] Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DY. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(5): 995-1000.

(本文编辑:万静)