

HIF-1 α 在低氧刺激的气道平滑肌细胞中的表达及意义

朱洁晨¹, 沈吉凤², 朱述阳^{1*}, 石瑞瑞¹, 陈琳¹

(¹徐州医学院附属医院呼吸内科, 江苏 徐州 221002; ²大屯煤电集团责任(有限)公司中心医院内科, 江苏 徐州 221611)

[摘要] 目的: 观察低氧状态下大鼠气道平滑肌细胞 (airway smooth muscle cell, ASMC) 增殖情况及低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 表达变化, 探讨 ASMC 低氧反应机制。方法: 体外传代(5代)培养大鼠 ASMC 分 3 组: 常氧状态下培养为正常对照组 (A 组), 低氧状态下培养为单纯低氧组 (B 组), 低氧 + HIF-1 α 抑制剂 2-甲氧雌二醇 (2-methoxyestradiol, 2ME) 为低氧 2ME 干预组 (C 组)。甲基甲苯基硫 (MTS) 法检测细胞增殖, 荧光实时定量 RT-PCR 检测 HIF-1 α mRNA 表达, Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达。结果: ①大鼠 ASMC 增殖 B 组比 A 组更加明显 (1.123 ± 0.006 vs 0.809 ± 0.003 , $P < 0.05$), C 组较 B 组明显受抑制 (1.012 ± 0.005 vs 1.123 ± 0.006 , $P < 0.05$); ②HIF-1 α mRNA 和蛋白表达 B 组比 A 组表达明显增加 (5.265 ± 0.040 vs 0.449 ± 0.017 , $P < 0.05$ 和 0.905 ± 0.013 vs 0.105 ± 0.008 , $P < 0.05$), C 组较 B 组表达明显减少 (1.903 ± 0.044 vs 5.265 ± 0.040 , $P < 0.05$ 和 0.278 ± 0.012 vs 0.905 ± 0.013 , $P < 0.05$)。ASMC 增殖与 HIF-1 α mRNA 表达呈正相关 ($r = 0.850$), 与 HIF-1 α 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.883$)。结论: 低氧刺激促进大鼠 ASMC 增殖, 可能是由 HIF-1 α 所介导。

[关键词] 低氧; 气道平滑肌细胞; HIF-1 α

[中图分类号] R364.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1308-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141003

Expression of HIF-1 α on airway smooth muscle cells suffering from hypoxia and related clinical importance

Zhu Jiechen¹, Shen Jifeng², Zhu Shuyang^{1*}, Shi Ruirui¹, Chen Lin¹

(¹Department of Respiration Medicine, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002; ²Department of Medicine, Central Hospital, Datun Coal-Electricity (Group) CO., LTD, Xuzhou 221611, China)

[Abstract] Objective: To explore whether hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) mediates hypoxic proliferation in airway smooth muscle cells (ASMC). **Methods:** Rat ASMC were incubated *in vivo* and grouped in three; ASMC that is cultured under normoxia was defined as control group (A group), ASMC that is cultured under hypoxia was defined as pure hypoxia group (group B), ASMC that is cultured under hypoxia and pretreated with 2-methoxyestradiol (2ME), which is inhibitor of HIF-1 α , was defined as hypoxia and 2ME pretreatment group (group C). Proliferation of ASMC was evaluated by MTS. Real-time PCR and Western blot were used to analyze expression of HIF-1 α mRNA and protein. **Results:** ①The proliferation of rats ASMC is significantly higher in group B than that in group A (1.123 ± 0.006 vs 0.809 ± 0.003 , $P < 0.05$), but it is significantly lower in group C than that in group B (1.012 ± 0.005 vs 1.123 ± 0.006 , $P < 0.05$). ②Expression of HIF-1 α mRNA and protein increased significantly in group B than that in group A (5.265 ± 0.040 vs 0.449 ± 0.017 , $P < 0.05$ and 0.905 ± 0.013 vs 0.105 ± 0.008 , $P < 0.05$), and decreased significantly in group C than that in group B (1.903 ± 0.044 vs 5.265 ± 0.040 , $P < 0.05$ and 0.278 ± 0.012 vs 0.905 ± 0.013 , $P < 0.05$), expression of HIF-1 α mRNA ($r = 0.850$) and protein ($r = 0.883$) in ASMC correlated significantly with proliferation. **Conclusion:** HIF-1 α mediated rat ASMC proliferation under hypoxia.

[Key words] hypoxia; airway smooth muscle cell; HIF-1 α

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1308-1312]

[基金项目] 徐州市科技局资助项目(XM098077)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jiechenz356@sohu.com

com

气道平滑肌是控制气道直径的效应器。气道平滑肌层是由气道平滑肌细胞 (airway smooth muscle cell, ASMC)、细胞外基质、零星的血管和炎症细胞组成^[1]。哮喘严重性与气道平滑肌厚度增加相关, 气道

平滑肌结构改变是哮喘气道高反应性的基础^[2-3]。病理学研究发现气道平滑肌厚度增加或许是由于 ASMC 数量增加(增生)或 ASMC 体积变大(肥大),或其他成分容积的增加。低氧对气道高反应性、气道炎症以及气道重塑有促进作用。细胞对低氧反应的关键介质是低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1 α), HIF-1 α 赋予了低氧诱导 HIF-1 转录活性的敏感性和特异性。HIF-1 α 被认为具有促炎作用^[4-5],其可能引起与气道重塑相关的关键基因的转录激活。已有实验证实 HIF-1 α 与哮喘时的气道高反应性及气道平滑肌层增厚有关^[6]。但有关低氧刺激是否引起 ASMC 增殖以及与 HIF-1 α 表达变化间的关系尚无报道,为此本实验通过体外培养大鼠 ASMC,并使用 HIF-1 α 特异性抑制剂 2ME 干预,检测 ASMC 增殖情况,以及 HIF-1 α mRNA 及蛋白的表达,探讨低氧刺激是否影响大鼠气道平滑肌细胞增殖及 HIF-1 α 表达,为慢性持续缺氧性疾病的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

健康清洁级 SD 大鼠 6 只,由徐州医学院实验动物中心提供。

兔抗大鼠 HIF-1 α 抗体(Epitomics 公司,美国),小鼠抗大鼠肌动蛋白(α -actin)抗体(北京中杉公司),2ME(大连美仑公司),MTS 试剂盒(Promega 公司,美国),总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根公司)。

1.2 方法

1.2.1 ASMC 的培养和传代

无菌摘取大鼠气道平滑肌组织,胰酶消化法原代培养 ASMC,实验用第 5 代细胞。培养的 ASMC 经细胞形态学观察和 α -actin 免疫组化法进行鉴定^[7]。将第 5 代 ASMC 按 1×10^5 个/ml 接种于 6 孔板上,待细胞贴壁后,换无血清培养液培养 24 h 后换含 1% 胎牛血清或 1% 胎牛血清+2ME(10 μ mol/L)的培养液,将细胞分为正常对照组(A 组)、单纯低氧组(B 组)、低氧 2ME 干预组(C 组),常氧(21% O₂、5% CO₂、74% N₂、37 $^{\circ}$ C)、低氧(1% O₂、5% CO₂、94% N₂、37 $^{\circ}$ C)状态下培养 48 h。

1.2.2 MTS 法检测细胞增殖

取(1~10) $\times 10^5$ 个/ml 细胞制成细胞悬液接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔,每孔加 MTS 溶液 20 μ l,孵育 2 h,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测

仪上测定各孔吸光值,用来反映细胞增殖的情况,可以认为吸光值正比于细胞数^[8]。

1.2.3 Real-time PCR 检测 HIF-1 α mRNA 表达

TRIzol 法提取总 RNA。逆转录反应按照试剂盒说明书进行 cDNA 合成。Real-time PCR 反应采用 ABI SybrGreen PCR Master Mix,构建 10 μ l 反应体系。引物设计为:GAPDH 上游引物 5'-AGCGAG-CATCCCCAAAGTT-3',下游引物 5'-GGGCAC-GAAGGCTCATCATT-3';HIF-1 α 上游引物 5'-AGC-GATGACACGGAAACTG-3',下游引物 5'-TCAGAG-GCAGGTAATGGAGAC-3'。Real-time PCR 反应条件:步骤一:95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,39 个循环;步骤二:溶解温度 55~95 $^{\circ}$ C,12 $^{\circ}$ C。目的基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct =$ 目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值)。

1.2.4 Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达

提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性后每孔上样量为 20 μ g,8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,TBST 洗涤后 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗(兔抗大鼠 HIF-1 α ,稀释浓度 1:500,内参 β -actin 稀释浓度 1:1 000),二抗(羊抗兔稀释浓度 1:10 000),室温孵育 1 h。ECL 显影,压片 5 min 曝光。扫描胶片后,用 Image J 软件对图片条带面积和灰度值进行分析,以目标条带与内参条带的面积比值代表相对表达水平。

1.3 统计学方法

应用 SPSS20.0 统计软件分析处理数据。正态分布计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;各组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 LSD 检验;相关分析采用 Spearman 相关。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

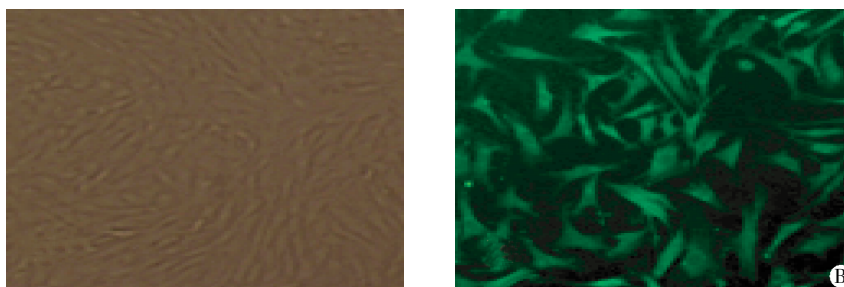
2 结果

2.1 ASMC 鉴定

倒置相差显微镜下,ASMC 呈梭形或多边形,平行生长,束状排列,密集与稀疏处相互交错呈“峰谷”状。免疫细胞化学检测法表明,平滑肌 α -actin 呈阳性染色,即胞浆内可见大量绿色荧光,证实所培养细胞是 ASMC(图 1)。

2.2 ASMC 增殖情况

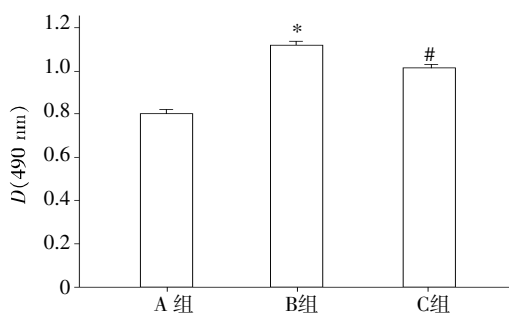
MTS 法检测大鼠 ASMC 增殖,A 组吸光度为 0.809 ± 0.003 ,B 组为 1.123 ± 0.006 ,C 组为 1.012 ± 0.005 ,B 组比 A 组增殖更加明显, $P < 0.05$,C 组较 B 组增殖明显受抑制($P < 0.05$,图 2)。



A: 第 5 代 ASMCs 倒置显微镜下, 培养的 ASMCs 呈梭形, 平行生长, 束状排列, 密集与稀疏相互交错呈“峰谷”状($\times 100$); B: ASMCs 抗 α -actin 免疫荧光染色显示, α -actin 呈阳性染色, 即胞浆内可见大量绿色荧光, 证实所培养的细胞为 ASMCs($\times 400$)。

图 1 ASMC 鉴定

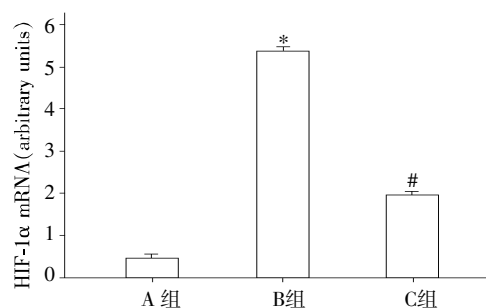
Figure 1 Identification of ASMC



与 A 组相比, $*P < 0.05$; 与 B 组相比, $*P < 0.05 (n = 6)$ 。

图 2 各组 ASMC 增殖情况

Figure 2 Proliferation of ASMC in each groups



与 A 组相比, $*P < 0.05$; 与 B 组相比, $*P < 0.05 (n = 6)$ 。

图 3 各组 ASMC HIF-1 α mRNA 表达情况

Figure 3 Expression of HIF-1 α mRNA in ASMC in each group

2.3 各组 HIF-1 α mRNA 的表达

Real-time PCR 检测 HIF-1 α mRNA 表达, A 组为 0.449 ± 0.017 , B 组为 5.265 ± 0.040 , C 组为 1.903 ± 0.044 , B 组比 A 组表达明显增加 ($P < 0.05$, $n = 6$), C 组较 B 组表达明显减少 ($P < 0.05$, $n = 6$, 图 3)。

2.4 各组 HIF-1 α 蛋白的表达

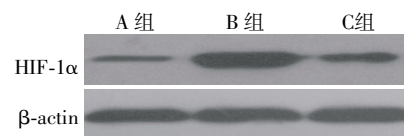
Western blot 检测各组 HIF-1 α 蛋白表达, A 组为 0.105 ± 0.008 , B 组为 0.905 ± 0.013 , C 组为 0.278 ± 0.012 , B 组比 A 组表达明显增加 ($P < 0.05$, $n = 6$), C 组较 B 组表达明显减少 ($P < 0.05$, $n = 6$, 图 4)。

2.5 HIF-1 α 表达与增殖的相关性

Spearman 等级相关分析表明细胞增殖与 HIF-1 α mRNA 表达呈正相关 ($r = 0.850, P < 0.05$), 与 HIF-1 α 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.883, P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

低氧是引起一系列病理变化的始动因素。低氧性疾病包括间断低氧性疾病如哮喘、睡眠呼吸暂停综合征和慢性持续低氧性疾病如慢性阻塞性肺疾病、肿瘤等。已注意到在哮喘和慢性阻塞性肺病患者



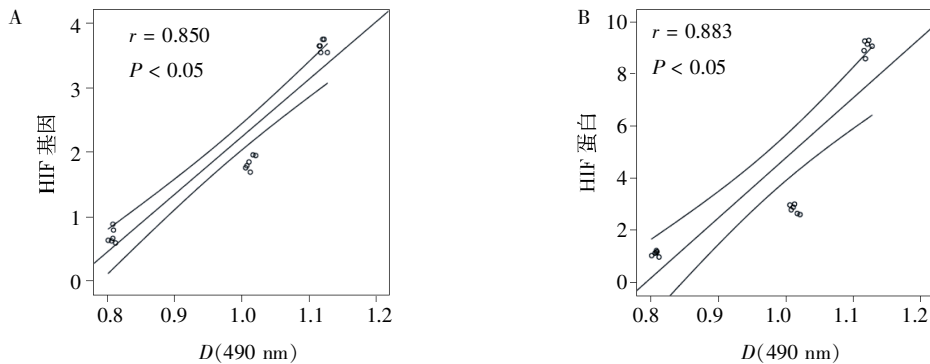
与 A 组相比, $*P < 0.05$; 与 B 组相比, $*P < 0.05 (n = 6)$ 。

图 4 各组 ASMC HIF-1 α 蛋白表达情况

Figure 4 Expression of ASMC HIF-1 α protein in each groups

支气管活检标本低氧反应途经激活增加^[9-10]。低氧对气道高反应性、气道炎症以及气道重塑有促进作用。气道炎症过程中各种炎性因子反复刺激气道上皮细胞, 造成气道上皮的慢性损伤与异常修复, 导致气道重塑。

感知和对氧浓度改变作出反应的能力是所有微生物生存的基础需要。随着生物进化, 对低氧的反应



A: ASMC 增殖与 HIF-1 α mRNA 表达呈正相关($r = 0.850, P < 0.05$); B: ASMC 增殖与 HIF-1 α 蛋白表达呈正相关($r = 0.883, P < 0.05$)。

图 5 HIF-1 α 表达与增殖的相关性

Figure 5 Correlation between expression of HIF-1 α and proliferation

存在一个复杂的系统,其主要涉及大量基因的协调调控,在很大程度上是在转录水平的调控,HIF-1 已被确定为适应低氧的关键介质^[11]。HIF-1 是一种高度保守的转录因子,几乎在所有细胞类型中表达,受到氧浓度高低的严密调节,同时 HIF-1 又调节着数百种基因的表达^[12]。HIF-1 是由 α 亚基和 β 亚基组成的具有转录活性的异源二聚体,其中 β 亚基是持续表达的, α 亚基是由低氧诱导的,是 HIF-1 的调节亚基。在有氧情况下,脯氨酰羟化酶(PHD)使 HIF-1 α 羟化并使其能与 pVHL 相互作用,产生泛素化和随后蛋白酶体的降解。当氧受限时,HIF-1 α 的羟基化受限制,阻碍了与 pVHL 的相互作用,结果 HIF-1 α 稳定并移入核内,与核内的 HIF-1 β 聚合成二聚体形成有活性的 HIF-1 转录因子^[13]。HIF-1 α 赋予了低氧诱导 HIF-1 转录活性的敏感性和特异性。

HIF-1 α 被认为具有促炎作用。HIF-1 α 是骨髓源性细胞包括嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、肥大细胞和巨噬细胞的炎症活动的主要调节因子^[14]。伴有慢性持续性气道阻塞的重症哮喘患者伴 Th1 (IL-12 和 IFN- γ) 和 Th2(嗜酸性粒细胞和 IL-13)增加的炎症反应,并且存在气道平滑肌的增加^[15]。在对钴诱导的 HIF-1 α 基因敲除鼠肺损伤模型的研究发现 HIF-1 α 缺陷鼠发生了类似于哮喘的 Th2 反应,包括嗜酸性粒细胞浸润、黏液细胞增生和壳质样蛋白表达。上述结果提示上皮源性 HIF-1 α 信号在建立组织炎症反应中具有重要作用,限制 HIF-1 α 信号使组织倾向于产生 Th2 介导的炎症反应^[16]。在对 HIF-1 α 基因敲除鼠骨髓的嗜酸性粒细胞的研究发现,HIF-1 α 对嗜酸性粒细胞的迁移、氧化和脱颗粒具有调节作用^[14]。在对 HIF-1 α 部分基因缺陷鼠(HIF-1 $\alpha^{+/-}$)标准哮喘模型的研究发现,HIF-1 α 部分缺陷会导致肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞减少,这可能与变应原驱动的 IFN- γ

产生增多有关^[17]。应用 HIF-1 α 缺陷髓源性细胞的研究证实了 HIF-1 α 直接参与低氧时中性粒细胞生存的调节^[18]。在激活的巨噬细胞中,HIF-1 α 表达增加^[19]。在应用卵蛋白刺激的小鼠哮喘模型研究中发现,急性气道炎症过程中肺组织的 HIF-1 α 增加,大部分见于支气管上皮,增加的低氧反应导致哮喘表型的恶化。给予 DHB(PHD 抑制剂)或应用由 siRNA 介导的基因敲除小鼠改变 HIF-1 α 活性后发现高剂量 DHB 会显示剂量依赖的气道炎、黏液化生和胶原沉积增加^[6]。哮喘活检标本中发现 HIF-1 α 在哮喘气道中表达增加,HIF-1 α 靶基因血管内皮生长因子(VEGF)表达同样增加,并引起血管新生^[20]。应用 HIF-1 α 抑制剂 2ME 处理后发现鼠肺组织血管周、气管周和间质中 HIF-1 α 和 VEGF 表达显著降低,肺组织中细胞浸润、杯状细胞黏液产生、气道纤维化、平滑肌厚度和血管数目显著减少^[5]。有研究发现一种新的巯基化合物可减轻鼠的变应性气道炎症,其与 HIF-1 α 表达减少相关^[21]。

2ME 是 HIF-1 α 的特异性抑制剂,其通过非依赖氧和蛋白酶体的途径阻滞 HIF-1 α 在核内积聚和 HIF-1 α 活性^[5]。本实验研究发现在低氧刺激的气道平滑肌细胞中,HIF-1 α 表达明显增加,气道平滑肌增殖增加,应用 HIF-1 α 特异性抑制剂 2ME 后,HIF-1 α 表达减少,气道平滑肌增殖受抑制,并且大鼠气道平滑肌增殖与 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达均呈正相关,说明 HIF-1 α 可能介导低氧刺激的大鼠气道平滑肌细胞的增殖。

本研究初步探索了 HIF-1 α 介导低氧刺激 ASMC 增殖,仍存在以下不足之处:①本实验只在持续低氧刺激条件下进行,进一步实验可以设置间歇低氧,或者在不同氧浓度条件下进行实验;②除了本实验中采用的 MTS 法,还可以用更敏感的实验方法

检测细胞增殖,比如测定细胞增殖标记物如增殖的细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和肝素结合的表皮生长因子 (heparin-binding epidermal growth factor, HB-EGF) 的表达^[22]; ③ 本实验仅在体外水平证实了 HIF-1 α 介导的低氧刺激 ASMC 增殖, 今后可用 HIF-1 α 基因敲除小鼠进一步探讨低氧刺激下, HIF-1 α 与 ASMC 增殖之间的关系。

[参考文献]

- [1] Jones RL, Elliot JG, James AL. Estimating airway smooth muscle cell volume and number in airway sections. Sources of variability [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(2): 246-252
- [2] Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma [J]. *Eur Respir J*, 2014, 43(2): 343-373
- [3] Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma [J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(1): 61-69
- [4] Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(7): 656-665
- [5] Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Garcia-Zepeda R, et al. 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model [J]. *Clin Immunol*, 2008, 129(2): 313-324
- [6] Ahmad T, Kumar M, Mabalirajan U, et al. Hypoxia response in asthma: differential modulation on inflammation and epithelial injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(1): 1-10
- [7] Oldenburg PJ, Wyatt TA, Sisson JH. Ethanol attenuates contraction of primary cultured rat airway smooth muscle cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43(5): 539-545
- [8] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63
- [9] Aerts JG, Amelink A, van der Leest C, et al. HIF1 α expression in bronchial biopsies correlates with tumor microvascular saturation determined using optical spectroscopy [J]. *Lung Cancer*, 2007, 57(3): 317-321
- [10] Polosukhin VV, Lawson WE, Milstone AP, et al. Association of progressive structural changes in the bronchial epithelium with subepithelial fibrous remodeling: a potential role for hypoxia [J]. *Virchows Arch*, 2007, 451(4): 793-803
- [11] Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(2): 152-156
- [12] Loenarz C, Coleman ML, Boleininger A, et al. The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens* [J]. *EMBO Rep*, 2011(1), 12: 63-70
- [13] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. *Cell*, 2012, 148(3): 399-408
- [14] Crotty Alexander LE, Nicatia S, McEachern E, et al. Hypoxia inducible factor (HIF) α subunits modulate eosinophil migration, oxidative burst, and degranulation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(2): AB239
- [15] Kaminska M, Foley S, Maghni K, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(1): 45-51
- [16] Saini Y, Kim KY, Lewandowski R, et al. Role of hypoxia-inducible factor 1 α in modulating cobalt-induced lung inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(2): L139-L147
- [17] Guo J, Lu W, Shimoda LA, et al. Enhanced interferon-gamma gene expression in T cells and reduced ovalbumin-dependent lung eosinophilia in hypoxia-inducible factor-1 α -deficient mice [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009, 149(2): 98-102
- [18] Walmsley SR, Print C, Farahi N, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(1): 105-115
- [19] Walczak-Drzewiecka A, Ratajowski M, Wagner W, et al. HIF-1 α is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT [J]. *J Immunol*, 2008, 181(3): 1665-1672
- [20] Lee SY, Kwon S, Kim KH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2006, 97(6): 794-799
- [21] Lee KS, Kim SR, Park HS, et al. A novel thiol compound, N-acetylcysteine amide, attenuates allergic airway disease by regulating activation of NF- κ B and hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(6): 756-768
- [22] Hassan M, Jo T, Risse PA, et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(5): 1037-1045

[收稿日期] 2014-03-04