

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201901009

· 论著 ·

Orai1 蛋白体外干预对小鼠 nuocyte 细胞功能的影响

蔺林, 陈峥, 戴飞, 魏瑾瑾, 汤欣玥

(复旦大学附属华山医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200040)

摘要: **目的** 探讨 nuocyte 细胞是否表达 Orai1 蛋白及该蛋白的功能。**方法** 用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)建立小鼠变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)模型,计数 AR 小鼠的打喷嚏、挠鼻次数,分离、提纯并体外培养 AR 小鼠鼻相关淋巴组织(nasal-associated lymphoid tissue, NALT)中的 nuocyte 细胞,用激光扫描共聚焦显微镜定性检测该细胞 Orai1 蛋白的表达,以 ELISA 法和实时荧光定量 RT-PCR 法分别定量检测该细胞 Orai1 蛋白及其 mRNA 的表达量,将小鼠重组(recombinant, rm)白介素(interleukin, IL)-33 加入 nuocyte 细胞培养基,检测其中 IL-5 和 IL-13 蛋白及其 mRNA 的浓度,然后再将 Orai1 蛋白抗体加入 nuocyte 细胞培养基,再次检测其中 IL-5 和 IL-13 蛋白及其 mRNA 的含量。**结果** 小鼠 AR 模型打喷嚏和挠鼻次数较正常小鼠显著增多,OVA 诱导 NALT 来源的小鼠 nuocyte 细胞被鉴定为 CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cFcεR1 (lineage)⁻ ICOS⁺, 该细胞表面表达 Orai1 蛋白,其蛋白和 mRNA 含量均较正常小鼠显著升高,rmIL-33 加入 nuocyte 细胞培养基后,IL-5 和 IL-13 蛋白及其 mRNA 的浓度均明显增多,而加入 Orai1 蛋白抗体后,其浓度出现下降。**结论** nuocyte 细胞表达 Orai1 蛋白,该蛋白的干预抑制 nuocyte 细胞的正常功能。

关键词: 变应性鼻炎; Orai1 蛋白; nuocyte 细胞; 小鼠; 鼻相关淋巴组织; 白介素
中图分类号: R765.21

The influence of intervention of Orai1 protein on the function of nuocytes in vitro

LIN Lin, CHEN Zheng, DAI Fei, WEI Jin-jin, TANG Xin-yue

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Orai1 protein and its function in nuocytes. **Methods** Mice allergic rhinitis (AR) models were established using ovalbumin (OVA), and numbers of sneezing and nasal rubbing were counted. Then nuocytes were sorted and purified from the mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT), and the AR mice nuocytes were cultured in vitro. Qualitative examination of Orai1 protein was performed using confocal laser scanning microscopy, and quantitative examinations of this protein and its mRNA through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). After that, mouse recombinant (rm) interleukin (IL)-33 was administered into nuocytes cultures, and the proteins and mRNAs of IL-5 and IL-13 were detected. Finally, Orai1 antibody was applied into the cultures, and the two cytokines proteins and their mRNAs were re-evaluated. **Results** Numbers of sneezing and nasal rubbing were increased in mice AR models. Nuocytes were identified as CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cFcεR1 (lineage)⁻ ICOS⁺, and Orai1 protein was expressed in these cells. Its protein and mRNA were enhanced in AR mice compared to normal ones. After administration of rmIL-33, IL-5 and IL-13 proteins and mRNAs were elevated significantly in nuocytes cultures. However, their expressions were all reduced after application of Orai1 antibody. **Conclusion** The intervention of Orai1 protein in nuocytes inhibits their cellular function in vitro.

Key words: Allergic rhinitis; Orai1 protein; Nuocytes; Mouse; Nasal-associated lymphoid tissue (NALT); Interleukin

基金项目:国家自然科学基金(81371076);上海申康医院发展中心郊区医院临床能力建设项目(SHDC12015905)。

作者简介:蔺林,男,博士研究生,主任医师,教授;陈峥,男,硕士研究生,住院医师。蔺林和陈峥对本文有同等贡献,为并列第一作者。
通信作者:蔺林,Email: linlinhsn@aliyun.com

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是由变应原激发、免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)-E介导的Th2型免疫反应,其发病机制中,Th2细胞合成和释放的Th2型白介素(interleukin, IL) IL-5和IL-13等起着至关重要的作用^[1]。最新研究证实,无论是适应性免疫还是固有免疫,都在AR的发生、发展过程中有着相应的作用^[2]。

新发现的nuocyte细胞属于II型固有淋巴样细胞(type-2 innate lymphoid cells, ILC2s),在小鼠寄生虫免疫中起着重要作用,这种细胞受到鼠重组(recombinant, rm)IL-33的刺激后可以在肠系膜淋巴结和脾脏中大量增殖,并产生和释放Th2型细胞因子如IL-5和IL-13,尤其是IL-13,从而对寄生虫产生排斥反应^[3]。nuocyte细胞不仅可以在肠道II型炎症反应中发挥作用,研究证实,该细胞也可以在小鼠气道高反应性疾病如哮喘中发挥效用,其机制主要是通过释放大量IL-13增强了支气管黏膜的变应性炎症反应所致^[4]。

我们有研究已经证实,nuocyte细胞在卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导建立的AR小鼠模型的鼻相关淋巴组织(nasal-associated lymphoid tissue, NALT)中可以出现一定程度的增殖,并发现将体外培养的OVA诱导NALT来源的nuocyte细胞过继转移给小鼠后,可以加剧AR小鼠鼻黏膜局部的炎症程度^[5]。但该项研究未对nuocyte细胞本身的特征进一步探讨,本文旨在研究nuocyte细胞表达Orail蛋白的情况及该蛋白相应的功能。

1 资料和方法

1.1 实验动物

健康雌性BALB/c小鼠(SPF级)12只,6~8周龄,购自中科院上海实验动物中心,小鼠由复旦大学上海医学院实验动物科学部代养。该研究获得复旦大学实验动物科学部动物福利和伦理小组的批准(伦理号:201808001Z)。实验动物分为2组,每组6只。动物模型的建立按照常规方法对小鼠AR建模^[6]。

1.2 NALT的获取

常规方法处死小鼠,去掉其前牙和面颊部肌肉,由硬腭后半部边缘以细针头小心获取NALT组织,并将该组织放入添加了10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的罗斯韦尔公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, PRMI)1640培养基中,然后将其通过70 μm Falcon细胞筛网滤过,并用三羟甲

基氨基甲烷-氯化铵缓冲液(tris-buffered ammonium chloride solution; 0.83% NH₄Cl and 20 mM Tris/Cl)裂解红细胞。

1.3 nuocyte细胞的获取

NALT细胞悬液在4°C温度和200 g离心力下离心10 min后进行流式细胞仪检测。基于多项相关研究所证实的nuocyte细胞膜表面分子表达的特点即CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cFcεR1(lineage)-ICOS+进行设门^[4],细胞用200 μl流式细胞液【1%牛血清白蛋白溶液和0.1%叠氮化钠溶于磷酸缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)溶液】洗涤,并与兔血清在室温下共培养5 min以封闭Fcγ,然后再用流式细胞液洗涤3次,将细胞调成浓度为1×10⁸个/ml,分别用50 μl结合了荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖的一抗(抗CD3、CD4、CD8、CD19、CD11b、CD11c、FcεR1的抗体)(美国MyBioSource或美国BioLegend)在4°C温度下染色30 min,随后用结合了藻红蛋白的单克隆抗体(抗ICOS的抗体)(美国MyBioSource)再染,然后再次洗涤,并与结合了生物素的50 μl兔抗小鼠的二抗IgG共培养,随后加入50 μl结合了链霉亲和素的藻红蛋白(丹麦Dako),对照组只用与上述抗体同型的一抗染色。样品用装备了ACSDIVA软件系统(美国BD Biosciences)的LSR II型流式细胞仪进行分析,并用FlowJo version 10进行数据输出。

1.4 nuocyte细胞体外培养

nuocyte细胞分离、提纯后调成6×10⁷个/ml浓度,并在含有10% FBS、1%青霉素/链霉素、0.1%β-巯基乙醇、10 ng/ml小鼠rmIL-7(美国MyBioSource)和10 ng/ml小鼠rmIL-33(美国MyBioSource)的RPMI培养基中进行体外培养6 d。

1.5 免疫荧光检测

弃去培养液,将nuocyte细胞爬片48 h,用PBS液清洗2次,然后以4%多聚甲醛在室温下固定5 min,用含有0.2% Triton X-100的PBS溶液(PBS-T)洗涤3次,3%牛血清白蛋白封闭30 min,再将样品与一抗Orail蛋白单克隆抗体(美国Sigma)在室温下孵育过夜,PBS溶液清洗3次,共15 min,然后与结合了FITC的二抗在室温下黑暗中孵育1 h,再将样品用PBS-T洗涤2次,后以浓度为10 mg/ml的4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)在室温下进行细胞核染色5 min,再用PBS-T溶液洗3次,用PBS溶液洗2次,最后用防荧光淬灭剂封片,拍照用徕卡激光扫描共聚焦显微

镜(型号:TCS SP5)(德国 Leica 公司),图片分析用 LCS Lite 相关软件。

1.6 nuocyte 细胞对 rmIL-33 和 Orai1 抗体的反应

收集培养基中 nuocyte 细胞,重新加入 100 ng/ml 小鼠 rmIL-33 (美国 MyBioSource),培养 3 d,用酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和实时荧光定量 RT-PCR 法检测培养基中 IL-5 和 IL-13 蛋白和其 mRNA 的浓度;随后将 100 μg Orai1 蛋白单克隆抗体 (美国 Sigma) 加入培养基共培养,24 h 后再次检测培养基中 IL-5 和 IL-13 蛋白和其 mRNA 的含量。

1.7 ELISA 检测

采用 ELISA 法对 nuocyte 细胞培养基中 Orai1、IL-5 和 IL-13 蛋白浓度进行检测,具体方法分别按照小鼠 Orai1 (美国 MyBioSource)、IL-5 (美国 MyBioSource) 和 IL-13 ELISA 试剂盒 (美国 MyBioSource) 所规定的步骤进行。

1.8 实时荧光定量 RT-PCR 检测

采用实时荧光定量 RT-PCR 法对 nuocyte 细胞中 Orai1 mRNA、IL-5 mRNA 和 IL-13 mRNA 的含量进行检测,小鼠 Orai1 的引物采用上游引物:5'-TTTGC-CCTCATGATCAGCAC-3',下游引物:5'-TTG-GCCACGATGACTGATTG-3';小鼠 IL-5 的引物采用上游引物:5'-TCAGCTGTGTCTGGGCCACT-3',下游引物:5'-TTATGAGTAGGGACAGGAAGCCTCA-3',小鼠 IL-13 的引物采用上游引物:5'-TGCTTGCCTTGGTG-GTCTC-3',下游引物:5'-CAGGTCCACACTCCAT-ACC-3',实验按照实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒所规定的步骤进行,实验所得数据用 ΔCT 法来表示。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 统计软件分析所得数据,因数据经检验呈正态分布,而样本量又较小,所以组内差异的比较采用 t 检验,组间差异的比较采用方差分析,本试验中数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 AR 模型的建立

小鼠采用常规方式建模,以浓度为 0.5 mg/ml 的 OVA (美国 Sigma) 和 20 mg/ml 的 Al(OH)₃ 生理盐水溶液共 0.2 ml 对小鼠进行腹腔注射致敏,致敏 3 次,每周 1 次 (第 1、8 和 15 天),然后用浓度为 40 mg/ml 的 OVA 生理盐水溶液 0.02 ml 滴入小鼠

鼻孔进行激惹,激惹 8 次,每天 1 次 (第 22 ~ 29 天),即为 AR 小鼠 (图 1),对照组只用生理盐水 (正常组) 进行致敏和激惹。打喷嚏和挠鼻次数在最后一次激惹结束后 10 min 进行计数,发现 AR 组打喷嚏次数与正常组比较,AR 模型明显超过正常小鼠 ($t = 54.44, P < 0.0001$) (图 2A),AR 模型挠鼻次数明显超过正常小鼠 ($t = 33.75, P < 0.0001$) (图 2B)。结果说明,AR 小鼠模型建立成功。

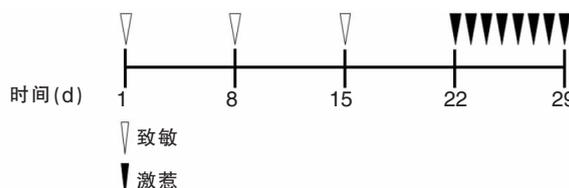


图 1 AR 小鼠模型的建模过程

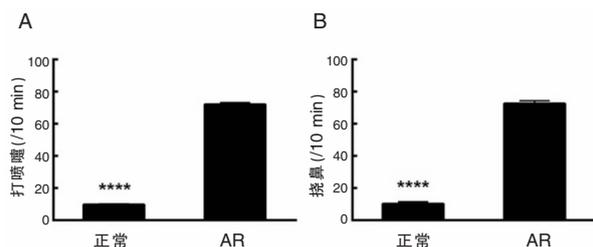


图 2 小鼠 AR 模型的建立情况 A: 小鼠 AR 模型的打喷嚏次数; B: 小鼠 AR 模型的挠鼻次数 (**** $P < 0.0001$)

2.2 nuocyte 细胞的鉴定

本实验中,我们课题组用 OVA 及其佐剂建立小鼠 AR 模型,然后用流式细胞仪设门技术,分选、提纯 NALT 中 nuocyte 细胞^[4]。nuocyte 细胞被鉴定为 CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cFcεR1 (lineage) - ICOS+ (图 3)。该细胞与其他类型的 ILC2s 虽然同属于一类,但是因为发现的部位不同,更重要的是细胞表面表达的分子特征不同,因此命名不同,本研究中鉴定 nuocyte 细胞的方法系参考已经发表的学者 Barlow 等^[4] 建议的步骤和流程。该项研究是从 OVA 诱导建立的小鼠变应性哮喘模型的肺组织中发现该类细胞,根据“同一气道、同一疾病”的理论^[6],我们课题组采用了该鉴定方法。

2.3 nuocyte 细胞中 Orai1 蛋白的表达

为了证实 Orai1 蛋白是否在 nuocyte 细胞中存在,我们用激光扫描共聚焦显微镜定性检测 AR 小鼠的该细胞中 Orai1 蛋白的表达情况,结果发现,该蛋白表达于 nuocyte 细胞膜 (图 4A); 随后我们课题

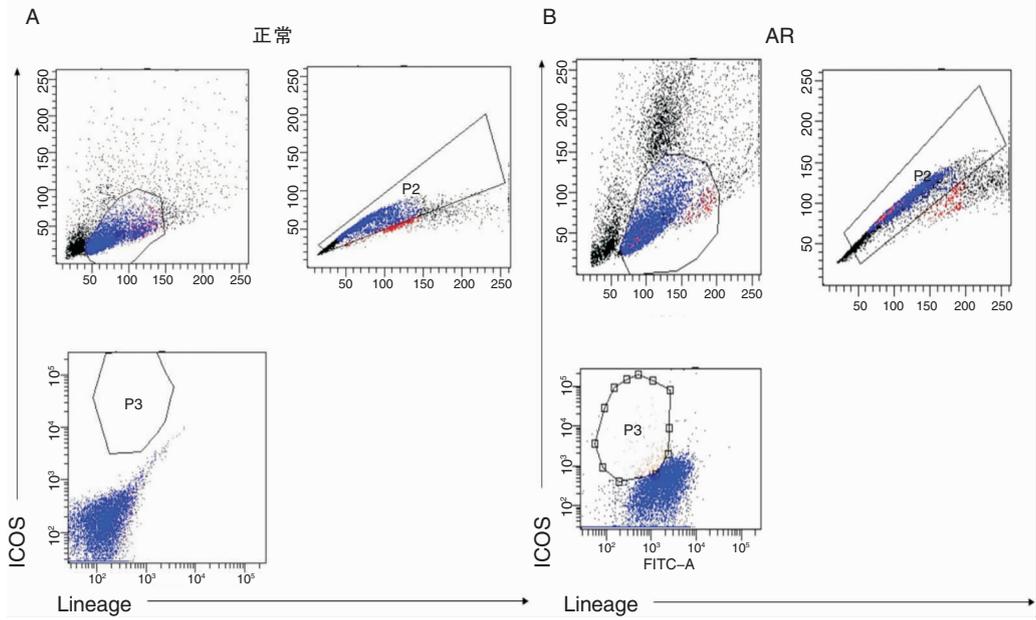


图3 小鼠AR模型的NALT中nuocyte细胞的流式细胞仪分析 A:正常小鼠nuocyte细胞的流式细胞仪分析; B:AR小鼠nuocyte细胞的流式细胞仪分析。P3区域内细胞表示分选出的nuocyte细胞

组又用ELISA法和实时荧光定量RT-PCR法分别定量检测该细胞Orai1蛋白及其mRNA的表达量,结果发现AR组与正常组比较,无论是其蛋白含量($t = 10.13, P < 0.0001$)(图4B)还是其mRNA含量($t = 12.12, P < 0.0001$)(图4C),AR小鼠都显著超过正常小鼠。说明nuocyte细胞在变应性炎症状态下处于激活状态,其Orai1蛋白的过表达正表明该蛋白可能参与了该细胞的一些功能。

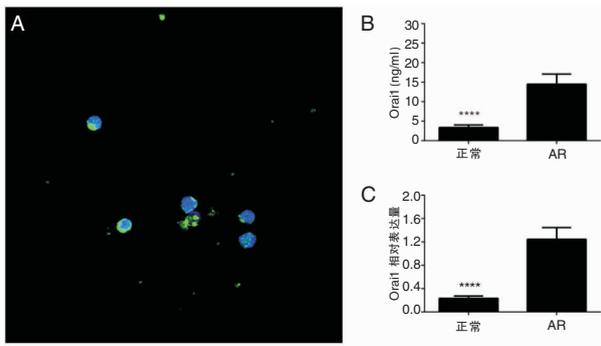


图4 小鼠AR模型NALT来源的nuocyte细胞中Orai1蛋白的表达情况 A:Orai1蛋白的激光扫描共聚焦显微镜定性分析; B:Orai1蛋白的ELISA定量分析; C:Orai1 mRNA的实时荧光定量RT-PCR定量分析。绿色荧光表示Orai1蛋白的染色,蓝色荧光表示DAPI的核染色**** $P < 0.0001$

2.4 nuocyte细胞体外对rmIL-33和Orai1抗体的反应 nuocyte细胞的特点是合成和释放II型细胞因

子如IL-5和IL-13,尤其是后者,不仅对寄生虫有排斥反应,在变应性炎症发生、发展过程中也起了至关重要的作用。为了检测OVA诱导NALT来源的nuocyte细胞是否具有其相应的功能。

我们分别用ELISA法和实时荧光定量RT-PCR法检测体外培养的此种细胞是否表达IL-5和IL-13的蛋白和mRNA。结果发现,rmIL-33干预后体外培养的nuocyte细胞大量合成和释放IL-5和IL-13,与干预前相比较,IL-5的蛋白及其mRNA浓度具有显著统计学差异,干预后显著高于干预前($t = 26.07, P < 0.0001$, rmIL-33干预后 vs 未干预; $t = 15.77, P < 0.0001$, rmIL-33干预后 vs 未干预)(图5A、C); IL-13的浓度也具有显著统计学差异,干预后显著高于干预前($t = 22.62, P < 0.0001$, rmIL-33干预后 vs 未干预; $t = 19.98, P < 0.0001$, rmIL-33干预后 vs 未干预)(图5B、D)。这证明OVA诱导产生的nuocyte细胞具有其正常的生理功能。为了验证Orai1蛋白的干预是否能够影响nuocyte细胞的合成和分泌功能,我们课题组体外用抗Orai1蛋白的抗体与该细胞进行共培养,同样分别用ELISA法和实时荧光定量RT-PCR法检测nuocyte细胞中IL-5和IL-13的蛋白和mRNA的表达变化。结果发现,Orai1蛋白的抗体干预后体外培养的nuocyte细胞合成和释放IL-5和IL-13的浓度出现减少,与干预前相比较,干预后IL-5的蛋白及其mRNA浓度显著低于干预前($t = 7.22, P < 0.0001$, rmIL-33干预后 vs Orai1; $t = 9.90$,

$P < 0.0001$, rmIL-13 干预后 vs Orai1) (图 5A、C); IL-13 的浓度也具有显著统计学差异,干预后显著低于干预前 ($t = 13.26, P < 0.0001$, rmIL-13 干预后 vs Orai1; $t = 14.60, P < 0.0001$, rmIL-13 干预后 vs Orai1) (图 5B、D)。这说明,nuocyte 细胞中 Orai1 蛋白参与了该细胞合成和释放 II 型细胞因子 IL-5 和 IL-13 的功能,该蛋白的阻滞导致了 nuocyte 细胞产生和释放这些细胞因子的能力降低。

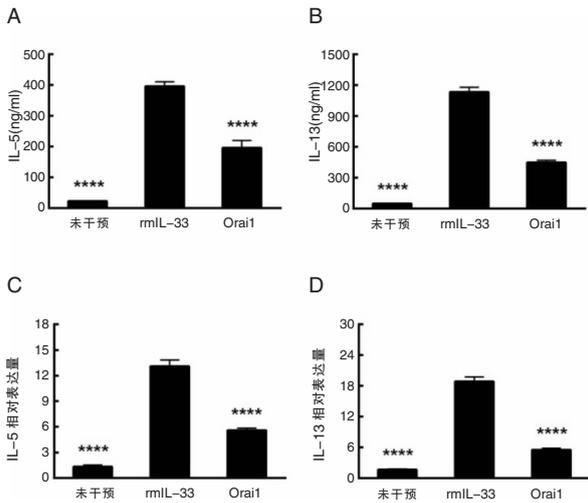


图 5 nuocyte 细胞体外对 rmIL-33 和 Orai1 抗体的反应情况 A:IL-5 蛋白的表达;B:IL-13 蛋白的表达;C:IL-5 mRNA 的表达;D:IL-13 mRNA 的表达 **** $P < 0.0001$

3 讨论

Orai1 蛋白主要表达于免疫系统细胞膜表面,也可以存在于其他类型细胞膜^[7],这是一种细胞质中内质网钙储备调控性钙离子通道蛋白^[8],它的激活可以使细胞外钙离子大量内流^[9],上调胞质内游离钙离子浓度,从而促进各种细胞功能的表达,比如细胞增殖分化、胞质内颗粒释放以及细胞因子的合成和释放等^[10]。Orai1 蛋白尚有两种异构体 Orai2 和 Orai3,但 Orai1 的变异和缺失对细胞功能的影响最大^[11],因此对 Orai1 蛋白的研究最为重要。但就 nuocyte 细胞是否表达该蛋白尚未见相关报道,我们课题组基于以前的多项研究^[12-19],提出该细胞可能表达 Orai1 蛋白,而且该蛋白可能影响 nuocyte 细胞的功能。

nuocyte 细胞属于 ILC2s,后者还包括自然辅助细胞(natural helper cells)和固有辅助细胞 II 型(innate helper 2 cells),虽然这些细胞种类不同,但它们

共同的特点都是表达 IL-25 受体(IL-17BR)和 IL-33 受体(T1/ST2),都可以在 IL-25 和 IL-33 的作用下产生炎症介质 IL-5 和 IL-13^[20]。变应性炎症状态下,IL-25 和 IL-33 主要由气道黏膜上皮细胞产生^[21],虽然它们属于不同的细胞因子家族,但却具有上述类似的细胞反应^[22]。大量研究表明,这两种细胞因子均可以诱导 II 型免疫反应,用 IL-25 和/或 IL-33 干预后,尤其是后者干预后,会产生大量 II 型细胞因子如 IL-5 和 IL-13,并导致局部相应的病理改变^[23-24]。那么 nuocyte 细胞的上述功能是受什么通道或蛋白的调控呢?我们课题组提出,Orai1 蛋白及其影响的通道可能是影响 nuocyte 细胞合成和释放 IL-5 和 IL-13 的主要调节机制。

本研究显示,小鼠 AR 建模后行为学表现如打喷嚏和挠鼻次数均较致敏和激惹前明显增多,其差异均具有统计学意义($P < 0.05$),说明该小鼠 AR 模型建立成功。随后我们从小鼠 NALT 组织中分离并提纯出 nuocyte 细胞,并对 AR 小鼠中的此类细胞进行免疫荧光染色,用激光扫描共聚焦显微镜进行观察,发现 nuocyte 细胞膜上表达 Orai1 蛋白;然后我们又用 ELISA 和实时荧光定量 RT-PCR 检测该蛋白及其 mRNA 的含量,发现 AR 小鼠明显高于正常小鼠,说明在变应性炎症状态下,该蛋白在 nuocyte 细胞中过表达,这就意味着它可能对该细胞的功能有所影响。

体外实验中,我们将 rmIL-33 加到从 AR 小鼠 NALT 组织中获取的 nuocyte 细胞培养基中,以检查该细胞是否功能如常,结果发现,干预前和干预后 nuocyte 细胞合成和释放 II 型细胞因子的浓度差异具有统计学意义($P < 0.05$),rmIL-33 刺激后 IL-5 和 IL-13 的蛋白和 mRNA 含量均明显升高,说明该细胞功能正常。我们选择 AR 小鼠 NALT 中的 nuocyte 细胞,是因为炎症状态下的该细胞处于激活状态,可以直接对小鼠 AR 的发病起作用,而正常小鼠的 nuocyte 细胞不具有此功能^[5]。随后我们又在该培养基中加入 Orai1 蛋白的抗体进行共培养,以观测该细胞功能是否受到影响,结果发现,抗体作用后,nuocyte 细胞合成和释放 II 型细胞因子的浓度差异也具有统计学意义($P < 0.05$),IL-5 和 IL-13 的蛋白和 mRNA 含量均显著降低,说明该蛋白的干预抑制了 nuocyte 细胞的功能,换句话说,nuocyte 细胞上 Orai1 蛋白阻滞后会抑制该细胞促进变应性炎症的功能。其机理可能是,该蛋白的干预影响了它所主宰的通道的功能,于是影响了细胞外钙离子的内流,胞质内

游离钙离子浓度随即降低,其合成细胞因子 IL-5 和 IL-13 的量减少,而且降低的游离钙势必影响到细胞膜的分泌功能,因而其释放这些细胞因子的能力也降低,在上述两种因素的共同影响下,nuocyte 细胞产生并分泌 II 型细胞因子的能力下降,表现在具体实验中便是培养基内上述物质含量的降低。

因此,我们可以设计出针对 nuocyte 细胞或其他免疫系统细胞如 T 细胞、B 细胞、肥大细胞等细胞膜上 Orai1 蛋白的特异性阻滞剂,可以同时从固有免疫和适应性免疫着手控制上下气道的变应性炎症。

总之,本研究发现 nuocyte 细胞表达 Orai1 蛋白,对该蛋白的干预可以抑制 nuocyte 细胞的功能。

参考文献:

- [1] Bernstein DI, Schwartz G, Bernstein JA. Allergic rhinitis: mechanisms and treatment[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2016, 36(2): 261-278.
- [2] Matsushita K, Kato Y, Akasaki S, et al. Proallergic cytokines and group 2 innate lymphoid cells in allergic nasal diseases[J]. *Allergol Int*, 2015, 64(3): 235-240.
- [3] Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1367-1370.
- [4] Barlow JL, Bellosi A, Hardman CS, et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(1): 191-198. e1-4.
- [5] Lin L, Dai F, Wei JJ, et al. Allergic inflammation is exacerbated by allergen-induced type 2 innate lymphoid cells in a murine model of allergic rhinitis[J]. *Rhinology*, 2017, 55(4): 339-347.
- [6] Hiromura Y, Kishida T, Nakano H, et al. IL-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis[J]. *J Immunol*, 2007, 179(10): 7157-7165.
- [7] Giavina-Bianchi P, Aun MV, Takejima P, et al. United airway disease: current perspectives[J]. *J Asthma Allergy*, 2016, 9: 93-100.
- [8] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(7): 517-529.
- [9] Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(2): 757-810.
- [10] Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, et al. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(7): 771-773.
- [11] Mercer JC, DeHaven WI, Smyth JT, et al. Large store-operated calcium-selected currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, stim1[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34): 24979-24990.
- [12] Feske S, Gwack Y, Prakriya M, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function[J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 179-185.
- [13] Lin L, Zheng C, Zhang L, et al. Up-regulation of Orai1 in murine allergic rhinitis[J]. *Histochem Cell Biol*, 2010, 134(1): 93-102.
- [14] Lin L, Zheng C, Zhang L, et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis[J]. *Am J Otolaryngol*, 2011, 32(4): 318-328.
- [15] Wang Y, Lin L, Zheng C. Downregulation of the expression of Orai1 in the airway alleviates murine allergic rhinitis[J]. *Exp Mol Med*, 2011, 44(3): 177-190.
- [16] Lin L, Zhao X, Yan W, et al. Influence of Orai1 intervention on mouse airway epithelium reactions in vivo and in vitro[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2012, 108(2): 103-112.
- [17] Lin L, Zhao X, Yan W, et al. Amelioration of Muc5b mucin hypersecretion is enhanced by IL-33 after 2-APB administration in a murine model of allergic rhinitis[J]. *Biotech Histochem*, 2014, 89(4): 273-286.
- [18] Lin L, Dai F, Chen Z, et al. In vitro treatment with 2-APB inhibits the inflammation in nasal polyps[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 153(3): 461-467.
- [19] Lin L, Dai F, Chen Z, et al. The intervention of CRAC channels alleviates inflammatory responses in nasal polyps[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2015, 167(4): 270-279.
- [20] 蔺林, 戴飞, 孙庭钰. Orai1 抗体对变应性鼻炎小鼠模型的治疗作用[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 51(1): 43-49.
- Lin L, Dai F, Sun TY. The Orai1 antibody treatment for a mouse model of allergic rhinitis[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2016, 51(1): 43-49.
- [21] Fahy JV, Locksley RM. The airway epithelium as a regulator of Th2 responses in asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(4): 390-392.
- [22] Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25-and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR2 and CD161[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(11): 1055-1062.
- [23] Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo[J]. *Immunity*, 2001, 15(6): 985-995.
- [24] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines[J]. *Immunity*, 2005, 23(5): 479-490.

(收稿日期:2018-09-02)

本文引用格式:蔺林,陈峥,戴飞,等. Orai1 蛋白体外干预对小鼠 nuocyte 细胞功能的影响[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(1):41-46. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201901009

Cite this article as: LIN Lin, CHEN Zheng, DAI Fei, et al. The influence of intervention of Orai1 protein on the function of nuocytes in vitro[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2019, 25(1):41-46. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201901009