

卵白蛋白诱导的WHBE兔树突状细胞 甘露糖受体的表达及功能研究

屠 珏¹ 谷焕鹏² 蔡月琴¹ 凌 云¹ 刘军平¹ 徐剑钦^{1*}

(¹浙江中医药大学比较医学研究所/动物实验研究中心, 杭州 310053; ²浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310053)

摘要 该文研究了卵白蛋白诱导的WHBE(white hair black eyes)兔外周血来源树突状细胞(dendritic cells, DCs)甘露糖受体(mannose receptor, MR)的表达及功能,以阐明其对变应原易感的机制。分离WHBE兔外周血单核细胞,以20 ng/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和20 ng/mL IL-4(interleukin-4)在体外联合诱导培养6 d,获得的细胞显示典型的树突状细胞形态特征。流式细胞术检测DCs表面分子CD86和人白细胞DR抗原(human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)的表达,结果显示,WHBE兔和日本大耳白(Japanese white, JW)兔外周血DCs经卵白蛋白(ovalbumin, OVA)诱导后,CD86和HLA-DR表达水平均升高,其中,WHBE兔CD86水平高于JW兔。荧光定量PCR检测结果显示,OVA诱导后,两个品系兔外周血DCs的MR mRNA相对水平均显著升高($P < 0.05$),且WHBE兔显著高于JW兔($P < 0.05$)。抗原摄取实验发现,DCs经OVA刺激24 h后,抗原摄取能力低于对照组,MR抑制剂能显著降低DCs的抗原摄取率($P < 0.05$, $P < 0.01$)。WHBE兔DCs抗原摄取率和平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)均高于JW兔相同处理组,其中MFI值呈现极显著性差异($P < 0.01$)。该研究结果表明,OVA诱发后,WHBE兔DCs可能通过其表面共刺激分子CD86、抗原识别受体MR的高表达,使抗原递呈功能增强,介导Th2型细胞过度活化,导致气道变态反应性炎症。WHBE兔MR的表达及功能特点可能是影响WHBE兔DCs对变应原敏感性的关键因素。

关键词 卵白蛋白; WHBE兔; 树突状细胞; 甘露糖受体

Expression and Function of Mannose Receptor of Dendritic Cells Induced by Ovalbumin in WHBE Rabbits

Tu Jue¹, Gu Huanpeng², Cai Yueqin¹, Ling Yun¹, Liu Junping¹, Xu Jianqin^{1*}

(¹Comparative Medical Institute, Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; ²School of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract This paper aimed to study the expression and function of mannose receptor (MR) of dendritic cells (DCs) induced by ovalbumin (OVA) in white hair black eyes (WHBE) rabbits. The peripheral blood lymphomonocytes were separated and cultured for six days in RPMI 1640 complete medium with both 20 ng/mL granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and 20 ng/mL interleukin-4 (IL-4), and exhibited typical dendritic morphology. Besides, the levels of CD86 and human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) on cell surface were detected by flow cytometry at six days of culture. The results showed that expressions of CD86 and

收稿日期: 2016-08-09 接受日期: 2017-02-20

浙江省科技计划项目(批准号: 2014C37007)和浙江中医药大学比较医学创新团队(批准号: XTD201301)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86613643, E-mail: xujianqing1@zcmu.edu.cn

Received: August 9, 2016 Accepted: February 20, 2017

This work was supported by the Zhejiang Provincial Science and Technology Council (Grant No.2014C37007) and the Comparative Medical Innovation Team of Zhejiang Chinese Medical University (Grant No.XTD201301)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86613643, E-mail: xujianqing1@zcmu.edu.cn

网络出版时间: 2017-04-11 10:59:37 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170411.1059.020.html>

HLA on cell surface were significantly upregulated, which defined typical DCs. The results of Real-time PCR assay showed that *MR* mRNA levels of DCs were both upregulated induced by OVA in two strains of rabbits, moreover, the *MR* mRNA levels in WHBE rabbits were higher than Japanese white (JW) rabbits. The results of OVA₆₄₇ internalization detected by flow cytometry showed that allergen uptake of DCs reduced after stimulation by OVA and MR inhibitor could significantly down-regulate the antigen uptake. Meanwhile, OVA₆₄₇ internalization of DCs in WHBE rabbits was higher than which in JW rabbits after equal treatments. In conclusion, it suggested that DCs in WHBE rabbits could active Th2 type T cells polarization, mediated by high levels of CD86 and MR with boost of antigen presentation, which subsequently lead to airway allergic inflammation. The sensitivity of DCs to allergen in WHBE rabbits may largely depend on the expression and function of mannose receptor.

Keywords ovalbumin; WHBE rabbits; dendritic cells; mannose receptor

白毛黑眼(white hair black eyes, WHBE)兔是本中心自日本大耳白(Japanese white, JW)兔生产群中发现并培育的一个新的实验兔封闭群品系, 遗传比较稳定, 近交程度比其他品种的封闭群兔相对要高^[1-2]。我们在研究变应性气道炎症中发现, 卵白蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的特应性哮喘(atopic asthma, AA)和变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)动物模型中, WHBE兔均较JW兔更敏感, 很可能是变应性气道疾病的天然实验动物^[3]。

变应性气道疾病是特应性个体接触变应原后引起的Th2型免疫应答介导的气道炎症疾病, 其主要病理特征包括Th2型CD4⁺T细胞极化、Th2型细胞因子释放、诱导特异性免疫球蛋白E(IgE)大量产生、酸性粒细胞和肥大细胞等效应细胞募集^[4-5]。随着全球气温变暖, 加之近年来空气污染日益严重, 变应性气道疾病的患病率逐年上升, 成为目前最主要的过敏性疾病之一, 影响着全球20%的人群健康^[6-7]。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是目前已知的功能最强的抗原递呈细胞, 广泛分布于皮肤和黏膜系统, 已证实DCs在变应性免疫反应的激发和进程中扮演着重要角色^[8], DCs识别变应原后成熟、活化, 诱导CD4⁺T细胞向Th2型T细胞分化, 是变应性气道炎症发病的必要条件^[9-10]。WHBE兔对变应性气道炎症易感可能与其树突状细胞功能特点有关。目前, WHBE兔DCs功能特点尚未见任何相关报道。本文拟分离WHBE兔的外周血DCs, 通过与JW兔的外周血DCs进行比较来研究经OVA体外诱导后WHBE兔DCs抗原识别受体的表达与功能。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级WHBE兔、JW兔, 2.0~2.5 kg, 雄性, 购于

新昌县大市聚镇欣健兔场。饲养及实验操作均在浙江中医药大学动物实验研究中心普通环境内进行。所有动物实验操作均经过浙江中医药大学伦理委员会批准。

1.2 主要仪器与试剂

Nikon eclipse 80i显微镜购自Nikon公司。Forma 3111型细胞培养箱、生物安全柜购自Thermo公司。Axiovert 200荧光倒置显微镜购自ZEISS公司。Fc500流式细胞仪购自Beckman公司。Bio-Rad IQ5 PCR仪购自Bio-Rad公司。OVA(A5503)购自Sigma公司。RPMI 1640、胎牛血清(FBS)、青-链霉素购自Gibco公司。兔外周血淋巴细胞分离液购自中国医学科学院生物医学工程研究所。重组人GM-CSF和IL-4购自Peprotech公司。CD86(B7-2)-PE抗体购自Beckman公司。HLA-DR-FITC抗体购自BD公司。Alexa Fluor 647标记的OVA(OVA₆₄₇)购自Molecular Probes公司。BioTekeTM细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)购自北京百泰克生物技术有限公司。SYBRTM Premix EX Taq II试剂盒购自TaKaRa公司。

1.3 外周血DCs分离培养

兔耳中动脉取血, 肝素钠(20 IU/mL)抗凝后等体积Hank's液稀释, 小心添加到兔外周血淋巴细胞分离液上层, 以2 000 r/min离心20 min, 收集中间云雾状细胞层, 用PBS洗涤3次, 去上清后以RPMI 1640完全培养液重悬细胞, 在37 °C、5% CO₂培养箱中培养2 h后, 吸出未贴壁细胞, PBS轻柔冲洗培养瓶。加入含20 ng/mL GM-CSF和20 ng/mL IL-4的RPMI 1640完全培养液, 在37 °C、5% CO₂培养箱中隔日换液培养6 d。

1.4 流式细胞术检测DCs表面共刺激分子的水平

培养第6 d的DCs以10 μg/mL OVA刺激过夜, 以PBS洗涤, 4%多聚甲醛37 °C固定5 min, 以FITC和PE

标记的一抗室温孵育30 min, PBS洗涤, PBS重悬细胞后上流式细胞仪检测HLA-DR和CD86的水平。

1.5 荧光定量PCR检测DCs甘露糖受体的mRNA水平

培养第6 d的外周血DCs分别以不同浓度的OVA(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激24 h, 参照试剂盒说明书, 采用离心柱法抽提细胞总RNA, 反转录cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。甘露糖受体(mannose receptor, MR)基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成(NCBI Reference Sequence: XM_002717356.3)。引物序列为(F): 5'-GCC CAC CAC AAC TCC TGA AC-3'; R: 5'-AGC CAA CTC TCC ACC CAC A-3', 长度154 bp。Real-time PCR检测细胞目的基因mRNA的水平, 以 β -actin作内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对水平。

1.6 DCs对OVA摄取能力的检测

将外周血DCs调整浓度为 $5\times 10^5/\text{mL}$, 接种于24孔细胞培养板, 分别以不同浓度的OVA(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激24 h, 抑制剂组加入3 mg/mL甘露糖, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预孵育20 min。每孔加入OVA₆₄₇(终浓度20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱共同孵育1 h, 流式细胞术检测DCs对OVA₆₄₇的摄取率和平均荧光强度。

1.7 统计学处理

用SPSS 16.0软件进行统计分析, 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 表示有统计学意义, $P<0.01$ 表示有极显著性统计学意义。

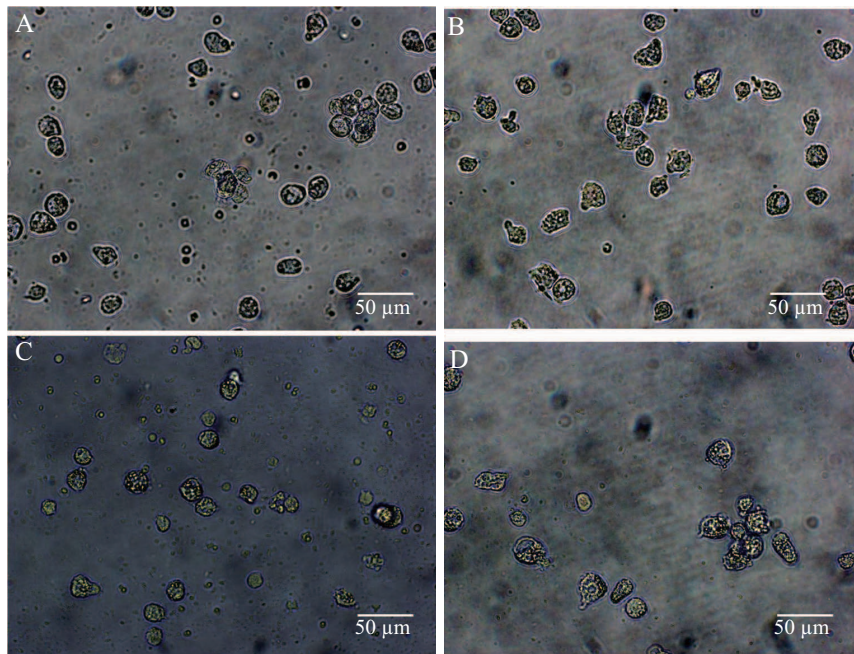
2 结果

2.1 DCs的培养及形态学观察

WHBE兔和JW兔外周血单核细胞以GM-CSF和IL-4在体外联合诱导培养6 d, 细胞形态学变化过程大致相似, 未呈现明显差异。培养第1 d, 几乎所有细胞贴壁生长, 在光镜下仍维持单核细胞的形态, WHBE兔单核细胞数多于JW兔。培养第4 d, 悬浮细胞增多, 形成集落, 细胞体积增大, 光镜下细胞膜周边折光性增强, 不规则形状的细胞增多(图1A和图1C)。培养第6 d, 大部分细胞悬浮生长, 大小为成熟单核细胞的1~1.5倍, 细胞表面粗糙带有很多皱褶, 某些体积较大的细胞可见明显毛刺样突起(图1B和图1D)。

2.2 DCs表面CD86和HLA-DR的水平

CD86和HLA-DR是DCs的标记性抗原, 通过流式细胞术检测DCs表面分子CD86和HLA-DR的



WHBE兔外周血DCs分离培养第4 d(A)和第6 d(B)的细胞形态。JW兔外周血DCs分离培养第4 d(C)和第6 d(D)的细胞形态。

The morphology of cultured dendritic cells of WHBE rabbits on the day 4 (A) and day 6 (B). The morphology of cultured dendritic cells of JW rabbits on the day 4 (C) and day 6 (D).

图1 显微镜观察WHBE兔和JW兔外周血DCs的细胞形态

Fig.1 Morphology of DCs from WHBE rabbits and JW rabbit under microscopy

水平。结果显示, WHBE兔和JW兔外周血DCs体外培养6 d后, 经变应原OVA诱导成熟, 均表达较高水平的CD86和HLA-DR, 结合形态学观察, 证实分离获得的细胞具备典型的DCs特征。此外, WHBE兔HLA-DR的水平与JW兔相当, CD86的水平高于JW兔, 但没有统计学意义($P>0.05$)(图2)。

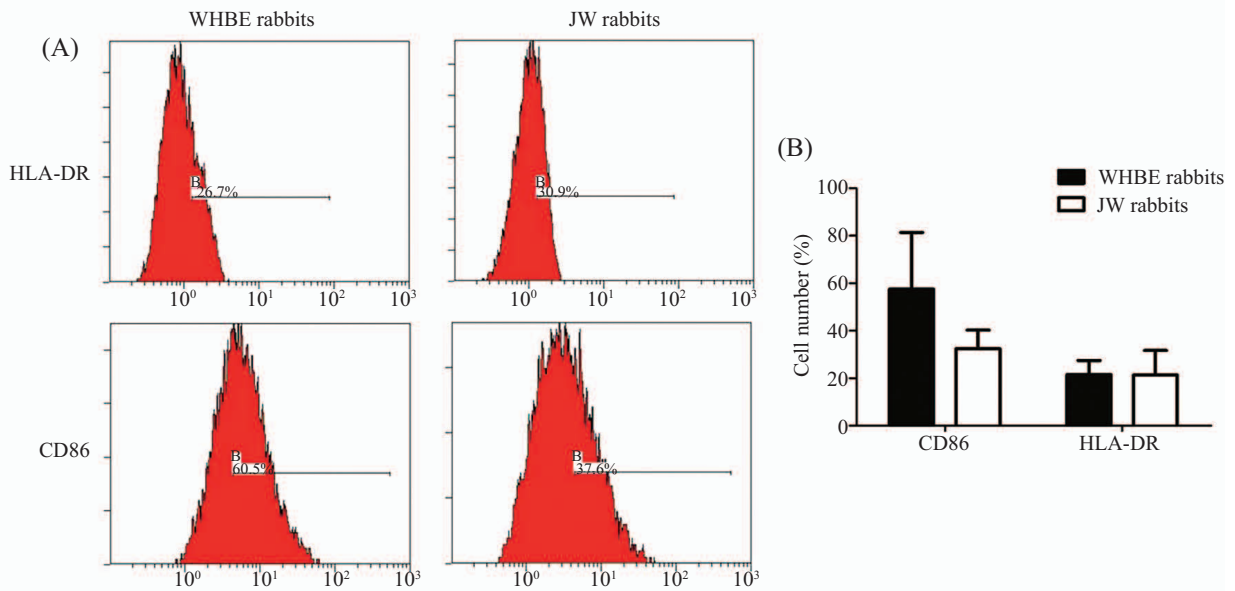
2.3 OVA诱导外周血DCs MR的mRNA水平

运用荧光定量PCR法检测培养第7 d的外周血DCs MR的mRNA水平。结果显示, WHBE兔MR mRNA相对水平显著高于JW兔($P<0.05$); 经10 $\mu\text{g/mL}$

OVA刺激24 h, 2个品系兔的外周血DCs MR mRNA相对水平均显著升高($P<0.05$), 且WHBE兔显著高于JW兔($P<0.05$)(图3)。

2.4 外周血DCs摄取抗原的能力

通过流式细胞术检测DCs的抗原摄取能力。结果显示, 培养6 d的DCs经10 $\mu\text{g/mL}$ OVA刺激过夜后, OVA₆₄₇摄取率低于对照组, 但没有统计学差异($P>0.05$)。MR抑制剂能显著降低DCs的抗原摄取率($P<0.05$, $P<0.01$)。此外, WHBE兔各组DCs抗原摄取率均高于JW兔相同处理组, 但没有统计学意义

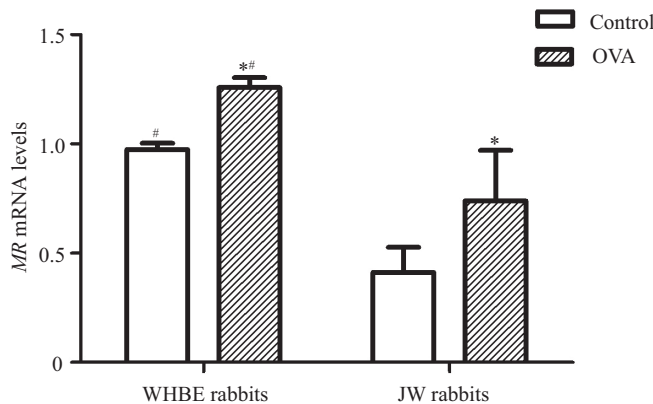


A: 培养第6 d的WHBE兔和JW兔DCs以10 $\mu\text{g/mL}$ OVA刺激过夜, 流式细胞仪检测DCs表面分子CD86和HLA-DR的水平; B: CD86和HLA-DR表达阳性的细胞百分率。

A: cells cultured in GM-CSF and IL-4 for six days were stimulated with OVA overnight and the levels of CD86 and HLA-DR on cell surface were detected by flow cytometry; B: percentage of cells positive for cell surface markers of DCs phenotype.

图2 流式细胞术检测DCs表面分子CD86和HLA-DR的水平($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig.2 The levels of CD86 and HLA-DR of DCs by flow cytometry ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)



* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与JW兔组比较。

* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with JW rabbits group.

图3 外周血DCs MR的mRNA水平($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig.3 MR mRNA levels of dendritic cells ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

表1 外周血DCs抗原摄取能力($\bar{x}\pm s$, $n=3$)Fig.1 Antigen internalization of dendritic cells derived from peripheral blood ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

品系 Breed	Control		OVA		OVA+mannan	
	摄取率(%)	平均荧光强度	摄取率(%)	平均荧光强度	摄取率(%)	平均荧光强度
	Uptake (%)	MFI	Uptake (%)	MFI	Uptake (%)	MFI
WHBE rabbits	62.90±9.70	8.94±0.57**	44.63±5.64	8.86±0.30**	15.20±8.79 [#]	4.70±0.27
JW rabbits	44.17±2.91	4.94±0.08	38.77±4.18	4.83±0.13	8.47±1.67 ^{##}	4.36±0.08

** $P<0.01$, 与JW兔比较; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, 与OVA组比较。

** $P<0.01$ compared with JW rabbits; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ compared with the OVA-induced alone group.

($P>0.05$)。进一步比较2个品系兔DCs摄取抗原的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI), 结果显示, WHBE兔DCs在未经诱导和经OVA诱导状态下, MFI均极显著高于JW兔相同处理组($P<0.01$), 表明WHBE兔DCs摄取抗原的能力高于JW兔(表1)。

3 讨论

广泛分布于皮肤和呼吸道黏膜等外周组织中的不成熟DCs主要通过表达于其表面的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别吸入性变应原。PRRs主要分为Toll样受体和C型凝集素受体2大类, 分别参与识别脂蛋白抗原和糖蛋白抗原。PRRs介导的内吞是DCs摄取变应原的主要途径之一^[11]。MR是C型凝集素受体家族的重要成员之一, 属I型膜蛋白受体, 主要表达于树突状细胞, 是DCs内吞环境中糖蛋白变应原的最初受体^[12]。MR通过其糖识别区与大部分糖蛋白抗原上糖部分结合。内吞抗原, 通过激活NF- κ B通路, 促进IL-6的分泌, 继而诱导下游Th2细胞极化^[13]。研究发现, MR在变应性鼻炎和哮喘病人DCs中的表达量显著高于健康人群, 是DCs摄取变应原的主要受体, 直接影响DCs对变应原的敏感性, 被认为是治疗变应性气道疾病的关键靶点之一^[14-17]。

本文从WHBE兔和JW兔外周血中分离单核细胞, 体外诱导培养6 d, DCs分化过程未见明显差异。形态学观察均显示, 大部分细胞悬浮, 体积增大, 表面有很多皱褶, 部分细胞表面有毛刺样突起, 具备典型的树突状细胞形态特征。CD86和HLA-DR是DCs表面表达的共刺激分子, 为T细胞活化提供共刺激信号, 其中, DCs表达的CD86可启动Th0细胞向Th2细胞分化, 是调节Th2分化的协同刺激分子。已证实CD86和HLA-DR不仅是DCs的标记性抗原, 它

们的表达水平更代表着DCs分化成熟的能力^[18]。流式细胞仪检测结果显示, WHBE兔和JW兔外周血DCs经OVA诱导成熟后, 均表达较高水平的CD86和HLA-DR, 证实我们获得的细胞为典型的树突状细胞。WHBE兔DCs CD86的水平呈现高于JW兔的趋势, 提示WHBE兔DCs分化成熟、调节Th2型细胞分化的能力可能高于JW兔。

DCs对变应原的识别和摄取是启动Th2型变应性气道炎症级联反应的关键步骤, 决定了机体对变应原的反应能力和敏感性^[19]。因此, 本文进一步研究了WHBE兔DCs经变应原诱导后抗原识别受体MR的表达及其介导的抗原摄取能力。实验发现, OVA诱导后, 两个品系兔外周血DCs MR的mRNA相对水平均显著升高, 且WHBE兔显著高于JW兔。可见, OVA诱发后, WHBE兔DCs可能通过其表面共刺激分子CD86、抗原识别受体MR的高表达, 使抗原提呈功能增强, 介导Th2型细胞过度活化, 导致气道变态反应性炎症。抗原摄取实验发现, DCs经OVA刺激24 h后, 抗原摄取能力低于对照组, MR抑制剂能显著降低DCs的抗原摄取率。此外, WHBE兔DCs抗原摄取能力高于JW兔相同处理组。这些结果说明, 兔的外周血中未成熟DCs(imature dendritic cells, iDCs)抗原摄取能力强于成熟DCs。已有研究表明, 正常情况下外周血中DCs大多处于未成熟状态, 其表达低水平的共刺激分子, 抗原提呈能力较弱, 但具有极强的抗原内吞和加工处理能力; 而成熟的DCs具有较弱的抗原摄取和处理能力, 但具备较强的抗原提呈能力^[20]。同时再一次证实, MR在DCs识别、摄取变应原的过程中发挥着关键作用。WHBE兔吞噬抗原的能力高于JW兔, 可能与其MR受体表达更高有关。

我们在体内研究中已发现, WHBE兔、JW兔变应性鼻炎模型组的外周血DCs与同种异体T细胞共

培养5 d, 均能诱导T细胞分泌高水平的IL-10(598 vs 46 pg/mL, 493 vs 45 pg/mL), 并且, WHBE兔模型组IL-10含量显著高于JW兔模型组(待发表数据)。而IFN- γ (interferon- γ)分泌水平在正常组和模型组之间未见显著性差异。这说明, WHBE兔DCs具有更强的诱导Th2细胞分化的能力。

由此, 我们推测, MR受体可能是调控WHBE兔DCs对变应原敏感性及Th2型免疫应答的关键因素。深入研究WHBE兔DCs及其表面受体MR的功能特点有利于阐明其对变应原易感的机制, 为WHBE兔在变应性气道疾病模型中的开发与应用提供详实的实验依据。

参考文献 (References)

- 1 陈民利, 蔡月琴, 陶涛, 余佳, 肖慧, 朱亮, 等. 微卫星标记对WHBE兔封闭群、日本大耳白兔和新西兰兔的遗传分析. 中国比较医学杂志(Chen Minli, Cai Yueqin, Tao Tao, Yu Jia, Xiao Hui, Zhu Liang, *et al.* Genetic analysis of WHBE rabbit, Japanese rabbit and New Zealand rabbit by microsatellite Loci. Chinese Journal of Comparative Medicine) 2008; 18(9): 21-7.
- 2 朱亮, 应华忠, 陈民利, 蔡月琴, 余佳, 肖慧, 等. 微卫星标记对封闭群和近交系第五代WHBE兔的遗传分析. 实验动物与比较医学(Zhu Liang, Ying Huazhong, Chen Minli, Cai Yueqin, Yu Jia, Xiao Hui, *et al.* Genetic analysis of outbred and inbred F5 of WHBE rabbit by microsatellite Loci. Laboratory Animal and Comparative Medicine) 2009; 29(5): 334-40.
- 3 徐孝平, 徐剑钦, 张利棕, 陈方明, 蔡月琴, 陈民利. WHBE兔对卵白蛋白诱发变应性鼻炎的敏感性研究. 临床和实验医学杂志(Xu Xiaoping, Xu Jianqin, Zhang Lizong, Chen Fangming, Cai Yueqin, Chen Minli. Sensitivity of WHBE rabbit to ovalbumin-induced allergic rhinitis. Journal of Clinical and Experimental Medicine) 2011; 10(12): 881-2.
- 4 Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? Nat Rev Immunol 2010; 10(4): 225-35.
- 5 Karp CL. Guilt by intimate association: What makes an allergen an allergen? J Allergy Clin Immunol 2010; 125(5): 955-60.
- 6 Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 108(5 Suppl): S147-334.
- 7 Bousquet J, Bieber T, Fokkens W, Kowalski M, Humbert M, Niggemann B, *et al.* In Allergy, 'A new day has begun'. Allergy 2008; 63(6): 631-3.
- 8 El-Gammal A, Oliveria JP, Howie K, Watson R, Mitchell P, Chen R, *et al.* Allergen-induced changes in bone marrow and airway dendritic cells in asthmatic subjects. Am J Respir Crit Care Med 2016; doi: 10.1164/rccm.201508-1623OC.
- 9 KleinJan A, Willart M, van Rijst LS, Braunstahl GJ, Leman K, Jung S, *et al.* An essential role for dendritic cells in human and experimental allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2006; 118(5): 1117-25.
- 10 Pilette C, Jacobson MR, Ratajczak C, Detry B, Banfield G, VanSnick J, *et al.* Aberrant dendritic cell function conditions Th2-cell polarization in allergic rhinitis. Allergy 2013; 68(3): 312-21.
- 11 Salazar F, Sewell HF, Shakib F, Ghaemmaghami AM. The role of lectins in allergic sensitization and allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2013; 132(1): 27-36.
- 12 Li J, Jiang H, Wen W, Zheng J, Xu G. The dendritic cell mannose receptor mediates allergen internalization and maturation involving notch 1 signalling. Clin Exp Immunol 2010; 162(2): 251-61.
- 13 Al-Ghoulah A, Johal R, Sharquie IK, Emara M, Harrington H, Shakib F, Ghaemmaghami AM. The glycosylation pattern of common allergens: the recognition and uptake of Der p 1 by epithelial and dendritic cells is carbohydrate dependent. PLoS One 2012; 7(3): e33929.
- 14 Deslee G, Charbonnier AS, Hammad H, Angyalosi G, Tillie-Leblond I, Mantovani A, *et al.* Involvement of the mannose receptor in the uptake of Derp 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. J Allergy Clin Immunol 2002; 110(5): 763-70.
- 15 Kayserova J, Zentsova-Jaresova I, Budinsky V, Rozkova D, Kopecka J, Vernerova E, *et al.* Selective increase in blood dendritic cell antigen-3-positive dendritic cells in bronchial veolar lavage fluid in allergic patients. Scand J Immunol 2012; 75(3): 305-13.
- 16 Royer PJ, Emara M, Yang C, Al-Ghoulah A, Tiqhe P, Jones N, *et al.* The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. J Immunol 2010; 185(3): 1522-31.
- 17 Emara M, Royer PJ, Abbas Z, Sewell HF, Mohamed GG, Singh S, *et al.* Recognition of the major cat allergen Fel d1 through the cysteine-rich domain of the mannose receptor determines its allergenicity. J Biol Chem 2011; 286(15): 13033-40.
- 18 Cody V, Shen H, Shlyankevich M, Tigelaar RE, Brandsma JL, Hanlon DJ. Generation of dendritic cells from rabbit bone marrow mononuclear cell cultures supplemented with hGM-CSF and IL-4. Vet Immunol Immunopathol 2005; 103(3/4): 163-72.
- 19 Gill MA. The role of dendritic cells in asthma. J Allergy Clin Immunol 2012; 129(4): 889-901.
- 20 Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001; 106(3): 255-8.