

·论 著·

过敏性休克死亡豚鼠肺组织中CD63的表达

张楚楠, 于浩, 王晓龙, 王鹏飞, 冯春梅, 尤家斌, 王昌亮, 徐国辉, 张国华
(中国医科大学法学院, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: 目的 研究过敏性休克死亡豚鼠肺组织中分化抗原簇63(cluster of differentiation 63, CD63)的蛋白表达, 探讨CD63对过敏性休克死亡的诊断价值。方法 20只豚鼠随机分为对照组, 过敏性休克死亡即刻组、冷藏组(4℃贮藏48 h)、冷冻组(-20℃贮藏7 d)。采用人混合血清注射建立过敏性休克死亡豚鼠动物模型。应用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、免疫组织化学染色、Western印迹法、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和real-time RT-PCR检测肺组织中CD63蛋白及CD63 mRNA的表达变化。结果 HE染色结果显示, 各过敏性休克组肺组织淤血、水肿, 嗜酸性粒细胞浸润。Western印迹法检测结果显示, 过敏性休克豚鼠肺组织中CD63蛋白表达高于对照组($P<0.05$), 各过敏性休克组组间比较, 差异无统计学意义。免疫组织化学染色、real-time RT-PCR结果与Western印迹法结果一致。ELISA检测结果显示, 死亡即刻组CD63蛋白表达高于对照组($P<0.05$)。结论 过敏性休克死亡豚鼠肺组织中CD63蛋白和CD63 mRNA表达明显增强。动物尸体冷藏48 h和冷冻7 d不影响上述指标的检查, CD63有望成为过敏性休克死亡的辅助诊断指标。

关键词: 法医病理学; 过敏反应; 休克; 肺; 分化抗原簇63; 豚鼠

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2019.04.003

文章编号: 1004-5619(2019)04-0396-06

Expression of CD63 in Lung Tissue of Guinea Pigs Dying of Anaphylactic Shock

ZHANG Chu-nan, YU Hao, WANG Xiao-long, WANG Peng-fei, FENG Chun-mei, YOU Jia-bin, WANG Chang-liang, XU Guo-hui, ZHANG Guo-hua

(School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract: **Objective** To study the protein expression of cluster of differentiation 63 (CD63) in lung tissues of guinea pigs that died of anaphylactic shock and discuss the diagnostic value of CD63 for death from anaphylactic shock. **Methods** Twenty guinea pigs were randomly divided into control group, anaphylactic shock immediate death group, cold storage group (4℃ for 48 h) and frozen group (-20℃ for 7 d). The animal model of guinea pigs that died of anaphylactic shock was established with human mixed serum injection. The expression changes of CD63 protein and CD63 mRNA in lung tissues were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining, immunohistochemical staining, Western blotting, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time RT-PCR. **Results** HE staining results showed congestion, and edema of lung tissues, and eosinophil infiltration in the anaphylactic shock groups. Western blotting analysis results showed that the expression of CD63 protein in the lung tissues of guinea pigs that died of anaphylactic shock was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). Comparison between the anaphylactic shock groups was made, and the differences had no statistical significance. The results of immunohistochemical staining and real-time RT-PCR were consistent with that of Western blotting. ELISA results showed that CD63 protein expression in the immediate death group was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of CD63 protein and CD63 mRNA in the lung tissues of guinea pigs that died of anaphylactic shock is significantly enhanced. Animal carcasses which were put in cold storage for 48 h and frozen for 7 d do not affect the examination of the above indicators. CD63 protein is expected to become an auxiliary diagnostic indicator of death from anaphylactic shock.

Keywords: forensic pathology; anaphylaxis; shock; lung; cluster of differentiation 63 (CD63); guinea pig

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(2015020511)

作者简介: 张楚楠(1992—), 男, 硕士, 主要从事法医病理学鉴定和研究; E-mail: 1154874846@qq.com

通信作者: 张国华, 男, 教授, 主要从事法医学教学、科研和鉴定; E-mail: ghzhang@cmu.edu.cn

过敏性休克是临床常见的急症之一,发病突然,尤其药物所致过敏性休克死亡者,常常引发医患纠纷。常规的尸体解剖和组织病理学检验常常缺乏特异性的病理学改变,因此过敏性休克死亡是法医学鉴定的一大难题。深入探讨过敏性休克发生的机制,寻找准确可靠的诊断指标和简单易行的诊断方法,已经成为法医学研究的重要内容之一。

嗜碱性粒细胞在过敏性炎症反应中发挥着重要作用。分化抗原簇63(cluster of differentiation 63, CD63)是一个四次跨膜超家族成员。在静止的嗜碱性粒细胞中,CD63位于细胞内分泌颗粒膜上,当被IgE受体FcεRI激活后,这些颗粒与细胞膜融合,CD63就表达在脱颗粒的嗜碱性粒细胞表面^[1]。应用流式细胞学等技术研究发现,在过敏反应中当机体再次接触过敏原时,嗜碱性粒细胞膜表面表达多种蛋白标志物,如CD13、CD45、CD63、CD69、CD203c、CD107a和CD164等表达明显上调^[1-2]。其中,CD63和CD203c被认为是嗜碱性粒细胞活化的重要标志物^[3]。SANZ等^[4]报道,在粉尘螨过敏的哮喘患者中,嗜碱性粒细胞激活后CD63表达的灵敏度及特异度均较高。在IgE介导的食物过敏中,通过检测嗜碱性粒细胞CD63有助于食物过敏的诊断^[5]。因此,CD63在过敏反应中发挥的作用不容忽视。

目前,国内外对过敏性休克CD63的表达研究仅局限于血液嗜碱性粒细胞^[6-10]。本实验通过对过敏性休克死亡豚鼠肺组织中CD63的表达进行研究,采用人混合血清注射建立过敏性休克死亡豚鼠动物模型。应用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肺组织形态学变化,应用免疫组织化学染色、Western印迹法和酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测肺组织中CD63蛋白的表达情况,并采用real-time RT-PCR检测肺组织CD63 mRNA的表达变化,以探讨CD63对过敏性休克死亡的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康成年豚鼠20只,体质量250~300 g,购自北京维通利华公司,适应性饲养1周。将实验动物随机分为对照组,过敏性休克死亡即刻组、冷藏组(4℃贮藏48 h)、冷冻组(-20℃贮藏7 d),每组5只。本实验经中国医科大学动物伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器

山羊抗兔SP检测试剂盒(SP-9001)、小鼠抗β-actin抗体(TA-09)与辣根过氧化物酶结合的山羊抗

兔IgG(ZB-2301)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗CD63抗体(25682-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司,Total RNA提取试剂(D9108)、反转录试剂盒(RR037A)与染料法荧光定量试剂盒(RR820A)均购自宝生物工程(大连)有限公司,CD63 ELISA试剂盒(CSB-E14117r)购自武汉华美生物工程有限公司。

7500型实时荧光定量PCR仪(美国AB公司)、Tanon5500化学发光分析系统(上海天能科技有限公司)、TP600型PCR仪(日本TaKaRa公司)、ELX808吸收光酶标仪(美国BioTek公司)、BG-verMINI垂直电泳仪(北京百晶生物技术有限公司)、BX41光学显微镜(日本Olympus公司)、Motic Images Advanced 3.2图像分析系统(厦门麦克奥迪实业集团有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立及取材

按文献[8]的方法建立动物模型,过敏性休克死亡即刻组、冷藏组、冷冻组均将0.5 mL人混合血清用生理盐水以体积比1:10稀释,注射于豚鼠后掌皮内致敏。普食喂养2周后,心腔内注射人混合血清1 mL,诱发过敏反应,动物迅速死亡。对照组以等量生理盐水替代混合血清,用颈椎脱臼法处死。冷藏组和冷冻组的动物尸体用塑料袋密封后分别于冰箱4℃冷藏48 h和-20℃冷冻7 d后解冻解剖。提取肺组织,左肺上叶肺组织固定、石蜡包埋、切片制作,用于HE染色和免疫组织化学染色,右肺上叶肺组织超声打碎,用于Western印迹法、ELISA、real-time RT-PCR检验。

1.3.2 HE染色

各组肺组织于4%多聚甲醛溶液4℃下固定24 h后进行脱水、透明、浸蜡、包埋,制备5 μm厚石蜡切片,常规HE染色,光学显微镜下观察。

1.3.3 免疫组织化学染色

采用兔链霉卵白素-生物素法,兔抗CD63一抗4℃孵育过夜,其余步骤同试剂盒说明书。染色过程中以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)代替一抗作为空白对照。光学显微镜下观察,拍照。

应用Motic Images Advanced 3.2图像分析系统对CD63免疫组织化学染色的肺组织切片进行观察,在高倍视野(×400)下对每张切片随机选取5处,计算单位面积内阳性细胞(染成棕黄色的细胞)个数,取平均值作为各切片的测定结果。

1.3.4 Western印迹法

提取的肺组织匀浆标本用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法进行蛋白定量。取等量样品,加入等体积的6×上样缓冲液混匀,置入100℃金属浴中

5 min,以10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)的凝胶电泳分离,分离的蛋白用湿转法转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜,室温下用5%脱脂奶粉溶液封闭2 h后加入用含有吐温的Tris缓冲盐溶液(Tris-buffered saline tween, TBST)稀释的一抗,4℃过夜(稀释度1:500);用TBST洗涤3次,每次5 min;用TBST稀释的辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔IgG(稀释度1:5 000)孵育2 h;用化学发光法显色,Tanon5500化学发光分析系统拍照、分析。

1.3.5 ELISA检测

标准品配制:按照ELISA试剂盒说明书配制。

提取的肺组织放入1 mL冷PBS中匀浆,-20℃过夜,反复冻融两次破坏细胞膜;室温解冻后以5 000×g离心5 min,取上清液;进行预实验确定稀释倍数;每孔加入标准品或待测样本100 μL,轻晃混匀,覆上板贴,37℃温育2 h;弃去液体,甩干,不洗;每孔加生物素标记抗体工作液100 μL,覆上新板贴,37℃温育1 h;弃去孔内液体,甩干,洗板3次,每次2 min;每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100 μL,覆上新板贴,37℃温育1 h;弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次2 min;依序每孔加底物溶液90 μL,37℃避光显色20 min;依序每孔加终止溶液50 μL,终止反应;5 min内用酶标仪在450 nm波长下测量各孔的光密度(D)。利用Curve Expert 1.3软件(www.curveexpert.net)对结果进行分析,并计算样本浓度。

1.3.6 real-time RT-PCR检测

按照说明书用Total RNA提取试剂提取肺组织总RNA,立即用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。

得到的cDNA与特定的引物序列(CD63的上游引物为5'-ACAAGGTGAGGAGAGT-3',下游引物为5'-ATACAGCAGGAGTCAGGAA-3';β-actin的上游引物为5'-CTCACTCTCCACCTTCCA-3',下游引物为5'-CAACTGCTGTCACCTTCA-3')进行real-time RT-PCR。利用染料法荧光定量试剂盒在7500型实时荧光定量PCR仪下进行PCR扩增。通过比较Ct值(ΔΔCt)的方法测定CD63和β-actin的cDNA相对含量。

1.4 统计学处理

免疫组织化学法测得阳性细胞数、Western印迹法所得条带灰度值、ELISA检测样本浓度值、real-time RT-PCR检测cDNA相对含量值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析。各过敏性休克组与对照组比较,使用单因素方差分析进行统计;各过敏性休克组组间比较,使用Tukey检验进行统计分析。检测水准 $\alpha=0.05$ 。

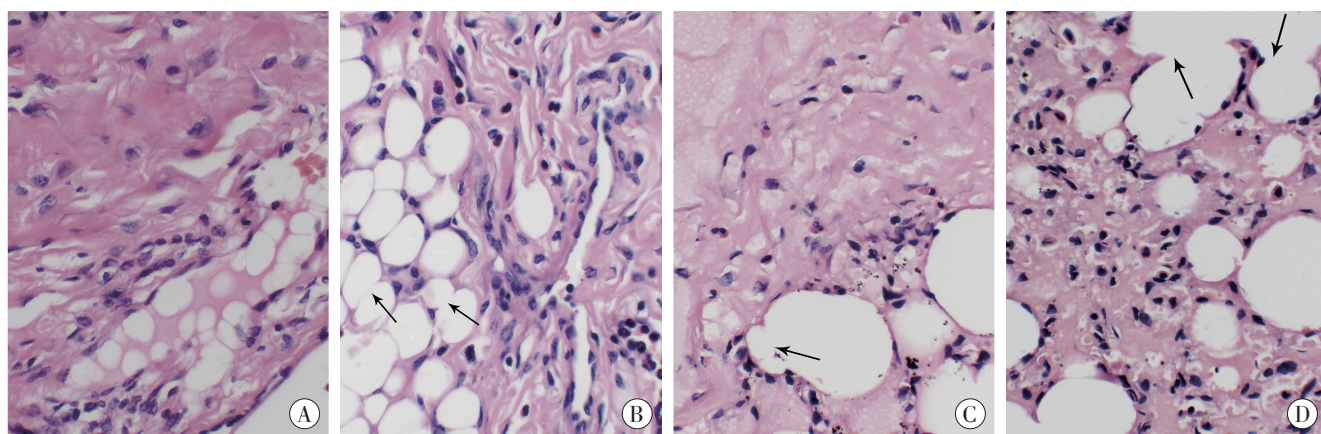
2 结果

2.1 豚鼠过敏性休克死亡的观察

致敏豚鼠胸腔内注射混合血清后1 min左右便出现搔鼻、躁动、流涎、抽搐、呼吸困难、四肢软弱无力、口唇黏膜发绀、大小便失禁,全部于1~5 min死亡。解剖动物尸体,见豚鼠喉头和肺组织水肿,各器官组织明显淤血。对照组注射生理盐水后无异常表现。

2.2 HE染色形态观察

对照组豚鼠肺组织细支气管、肺泡结构清晰,肺泡间隔正常,未见明显病理改变。过敏性休克死亡即刻组、冷藏组和冷冻组的豚鼠肺组织淤血、水肿,部分肺泡腔扩张,肺泡壁破裂,肺内细支气管壁内和肺泡壁内散在嗜酸性粒细胞浸润(图1)。



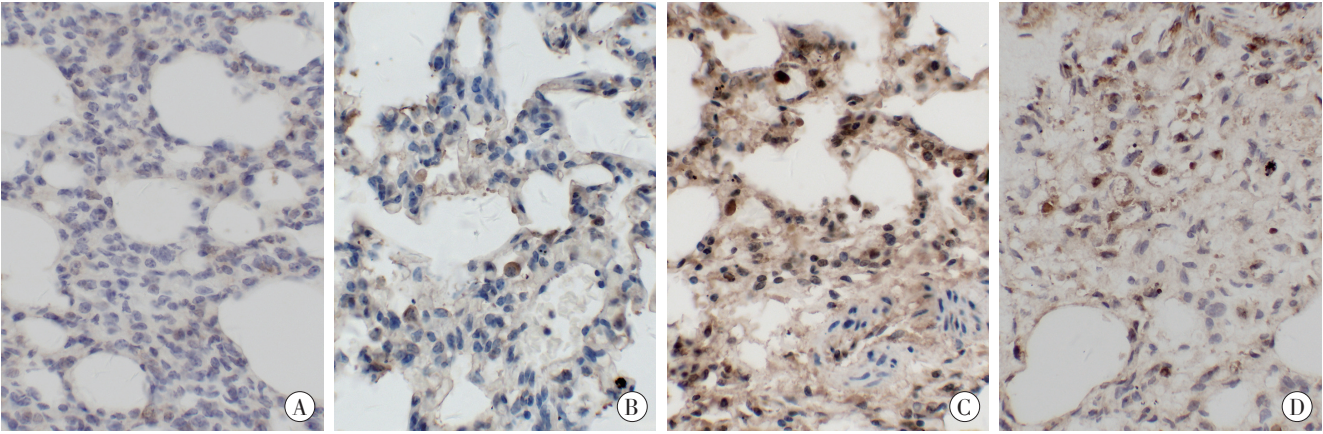
A:对照组;B:死亡即刻组;C:冷藏组;D:冷冻组。箭头示肺泡壁破裂。

图1 豚鼠肺组织HE染色结果(×400)

2.3 CD63免疫组织化学染色

CD63作为嗜碱性粒细胞和肥大细胞的活化标志物,染色产物位于肥大细胞和嗜碱性粒细胞等细胞内,呈棕黄色。对照组豚鼠肺间质内散在少量阳性细

胞,但过敏性休克死亡豚鼠的肺间质弥漫分布呈棕黄色染色的阳性细胞,数目较对照组增多($P<0.05$)。各过敏性休克组间阳性细胞数差异无统计学意义($P>0.05$,图2,表1)。



A:对照组;B:死亡即刻组;C:冷藏组;D:冷冻组。

图2 豚鼠肺组织CD63免疫组织化学染色($\times 400$)

表1 豚鼠肺组织CD63免疫组织化学染色阳性细胞数
($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	阳性细胞数
对照	2.8 ± 1.9
死亡即刻	$11.0 \pm 3.8^{(1)}$
冷藏	$13.0 \pm 4.2^{(1)}$
冷冻	$9.5 \pm 2.0^{(1)}$

注:1)与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.4 肺组织中CD63蛋白表达变化

Western印迹法结果(图3,表2)显示:豚鼠肺组织中CD63蛋白表达水平在死亡即刻组与冷冻组明显高于对照组($P<0.05$);死亡即刻组与冷藏组、冷冻组蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

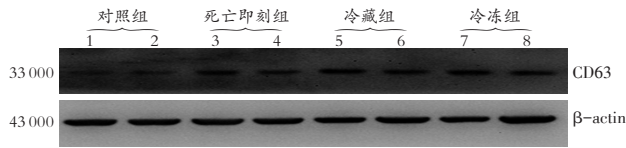


图3 豚鼠肺组织CD63 Western印迹法检测结果

表2 豚鼠肺组织CD63蛋白及mRNA相对表达量
($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	CD63蛋白	CD63 mRNA
对照	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.19
死亡即刻	$3.97 \pm 1.68^{(1)}$	$19.74 \pm 1.36^{(1)}$
冷藏	3.06 ± 0.54	$24.99 \pm 3.67^{(1)}$
冷冻	$4.11 \pm 1.21^{(1)}$	$20.12 \pm 4.44^{(1)}$

注:1)与对照组比较, $P<0.05$ 。

ELISA检测结果显示:豚鼠肺组织中CD63蛋白表达水平在死亡即刻组为(11.19 ± 1.79) pg/mg、对照组为(7.29 ± 0.48) pg/mg,死亡即刻组高于对照组($P<0.05$)。

2.5 肺组织中CD63 mRNA表达变化

豚鼠肺组织中CD63 mRNA表达水平在死亡即刻组、冷藏组、冷冻组均高于对照组($P<0.05$);死亡即刻组与冷藏组、冷冻组CD63 mRNA表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$,表2)。

3 讨论

本实验采用经典的人混合血清诱发豚鼠过敏性休克死亡动物模型^[11]。已致敏的豚鼠再次注射人混合血清后1 min左右实验动物出现搔鼻、躁动、流涎、抽搐、呼吸困难、四肢软弱无力、口唇黏膜发绀、大小便失禁等过敏性休克症状,所有豚鼠于激发过敏后5 min内死亡。解剖见豚鼠肺水肿、各器官组织淤血。对照组注射生理盐水后无异常表现。HE染色组织病理学检验见肺组织水肿,部分肺泡扩张、破裂,肺组织嗜酸性粒细胞浸润。对照组未见明显改变。豚鼠过敏性休克死亡动物模型成功建立。

CD63被称为溶酶体相关膜糖蛋白-3(lysosomal-associated membrane glycoprotein-3, LAMP-3),是一个相对分子质量为53 000的四次跨膜超家族成员。CD63除在活化的嗜碱性粒细胞膜表面表达外,也表达在血小板、内皮细胞、淋巴细胞、单核细胞以及中性粒细胞膜表面^[12]。嗜碱性粒细胞是过敏反应的重要效应细胞之一,观察其是否激活有助于过敏状态的诊断。关于嗜碱性粒细胞在过敏性疾病中角色的早期研究集中于介质释放,如组胺和白三烯^[13-15]。早期的研究结果^[11,16]表明,CD63与包含组胺的内分泌颗粒有关,这说明CD63上调可以作为组胺释放的间接标

志。然而,最近的研究结果^[17]显示,组胺释放可能是过敏性脱颗粒和片段状脱颗粒的总和,并且CD63的上调可能仅仅是过敏性脱颗粒的代表。嗜碱性粒细胞发挥其生物学功能有赖于其活化。研究^[1-2]发现,其活化后表面膜蛋白CD63表达上调,因此,CD63被认为是嗜碱性粒细胞活化的标记蛋白。邓真真^[18]发现检测胞膜CD63的表达情况可评估嗜碱性粒细胞的活化状态。

CD63在特异性IgE介导的肥大细胞的脱颗粒与过敏反应中发挥重要作用。研究结果^[1]表明,用抗IgE抗体激活人嗜碱性粒细胞后,用流式细胞技术检测,发现其表面的CD63表达增加,说明肥大细胞脱颗粒的过程是细胞内嗜碱性颗粒运动到细胞膜表面,与细胞膜融合后,释放出颗粒内活性物质的过程,CD63的表达与脱颗粒呈正相关^[16]。有研究^[19]利用CD63基因敲除小鼠研究CD63在肥大细胞中的作用,发现CD63缺乏并未影响体内肥大细胞的数量及组织分布。骨髓源性肥大细胞在缺乏CD63蛋白的情况下发育正常。然而,缺乏CD63显著降低IgE受体FcεRI介导的骨髓源性肥大细胞脱颗粒,进而减少体内的急性过敏反应,证明CD63对IgE介导的肥大细胞脱颗粒和过敏是必要的^[19]。在对食物、花粉过敏患者的研究^[4-5]中发现,嗜碱性粒细胞激活后CD63表达的敏感性和特异性较高,并与组胺和白三烯释放的水平显著相关。

本研究通过对过敏性休克死亡豚鼠肺组织的免疫组织化学染色和阳性细胞数计数统计分析,发现对照组和各过敏性休克组的肺组织内均有CD63的阳性表达,染色颗粒呈棕黄色,阳性细胞主要分布于肺间质内。对照组的阳性细胞反映了嗜碱性粒细胞和肥大细胞的正常形态、数量和分布。死亡即刻组肺组织中CD63阳性细胞的免疫组织化学染色较对照组明显加深,阳性细胞数也明显增多,非特异性染色少,可见肺组织可以成为良好的诊断器官,这与景丽霞等^[6]采用荧光免疫组织化学染色法所观察到的过敏性休克死亡即刻组大鼠肺组织中嗜碱性粒细胞CD63数目表达较对照组增多的结果相一致。本研究对4℃冷藏48h和-20℃冷冻7d保存条件下豚鼠过敏性休克死亡肺组织中CD63蛋白的免疫组织化学染色进行检查,并与死亡即刻组进行比较,发现这两种保存条件对CD63的免疫组织化学染色及蛋白表达变化影响不大。进一步应用Western印迹法检测,发现死亡即刻组肺组织中CD63蛋白表达高于对照组,免疫组织化学染色结果也证实了这一点。冷藏组、冷冻组肺组织中CD63的蛋白表达量与死亡即刻组比较差异无统计学意义。ELISA检测发现死亡即刻组肺组织CD63蛋

白表达量明显高于对照组。本研究结果在蛋白水平充分证明了过敏性休克肺组织中CD63表达增强,并进一步证明了4℃冷藏48h和-20℃冷冻7d保存条件对CD63蛋白检测没有明显影响。经real-time RT-PCR检查,发现死亡即刻组、冷藏组、冷冻组肺组织CD63 mRNA表达相对于对照组增长了20倍,差异有统计学意义,这从蛋白质转录水平证明了上述豚鼠过敏性休克肺组织中CD63蛋白检测结果的科学性和可靠性。本研究结果证实了CD63对过敏性休克的诊断具有良好的灵敏度和特异度,有望成为过敏性休克的辅助诊断指标。

参考文献:

- [1] KNOL E F, MUL F P, JANSEN H, et al. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435[J]. J Allergy Clin Immunol, 1991,88(3 Pt 1):328-338.
- [2] HENNERSDORF F, FLORIAN S, JAKOB A, et al. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation[J]. Cell Res, 2005, 15(5):325-335.
- [3] EBO D G, BRIDTS C H, HAGENDORENS M M, et al. Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in allergology[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2008, 74(4):201-210.
- [4] SANZ M L, SANCHEZ G, GAMBOA P M, et al. Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*[J]. Clin Exp Allergy, 2001, 31(7):1007-1013.
- [5] ASERO R, BALLMER-WEBER B K, BEYER K, et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives[J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(1):135-147.
- [6] 景丽霞,郭相杰,靳茜茜,等. 过敏性休克大鼠嗜碱性粒细胞CD63的表达[J]. 法医学杂志, 2012, 28(3):172-174,178.
- [7] SUDHEER P S, HALL J E, READ G F, et al. Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c[J]. Anaesthesia, 2005, 60(3):251-256.
- [8] van GASSE A L, SABATO V, UYTTEBROEK A P, et al. Immediate moxifloxacin hypersensitivity: Is there more than currently meets the eye?[J]. Allergy, 2017, 72(12):2039-2043.
- [9] YANG H, YANG L, WANG D W, et al. Anaphylactic shock caused by haemocoagulase injection in China[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(4):1547-1553.

- [10] LARSEN L F, JUEL-BERG N, HANSEN K S, et al. A comparative study on basophil activation test, histamine release assay, and passive sensitization histamine release assay in the diagnosis of peanut allergy[J]. *Allergy*, 2018, 73(1): 137-144.
- [11] 任广睦, 白吉伟, 高彩荣, 等. 混合人血清诱发豚鼠过敏性休克猝死模型的建立[J]. *法医学杂志*, 2005, 21(3): 169-170.
- [12] 包晓婧, 冯若飞, 马忠仁. CD63分子的研究进展[J]. *西北民族大学学报(自然科学版)*, 2015, 36(3): 22-26.
- [13] LICHTENSTEIN L M, NORMAN P S, WINKENWERDER W L. Clinical and *in vitro* studies on the role of immunotherapy in ragweed hay fever[J]. *Am J Med*, 1968, 44(4): 514-524.
- [14] MAY C D. High spontaneous release of histamine *in vitro* from leukocytes of persons hypersensitive to food[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1976, 58(3): 432-437.
- [15] TOGIAS A G, NACLERIO R M, WARNER J, et al. Demonstration of inhibition of mediator release from human mast cells by azatadine base. *In vivo* and *in vitro* evaluation[J]. *JAMA*, 1986, 255(2): 225-229.
- [16] FURUNO T, TESHIMA R, KITANI S, et al. Surface expression of CD63 antigen (AD1 antigen) in P815 mastocytoma cells by transfected IgE receptors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 219(3): 740-744.
- [17] MACGLASHAN D J. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes[J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(9): 1365-1377.
- [18] 邓真真. 嗜碱粒细胞CD63和CD203c表达及其与组胺释放关系的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2014, 34(3): 247-249, 254.
- [19] KRAFT S, JOUVIN M H, KULKARNI N, et al. The tetraspanin CD63 is required for efficient IgE-mediated mast cell degranulation and anaphylaxis[J]. *J Immunol*, 2013, 191(6): 2871-2878.

(收稿日期:2017-09-04)

(本文编辑:李正东)

(上接第395页)

- [4] 郑哲, 翟仙敦, 夏志远, 等. 大鼠死后不同组织电导率与死亡时间关系的研究[J]. *中国法医学杂志*, 2017, 32(3): 266-268.
- [5] 杨秀娟, 张曦, 赵金燕, 等. 应用电导率评价猪肉的新鲜度[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(5): 1178-1180, 1191.
- [6] JANDASEK J, MILERSKI M, LICHOVNIKOVA M. Effect of sire breed on physico-chemical and sensory characteristics of lamb meat[J]. *Meat Sci*, 2014, 96(1): 88-93.
- [7] YAO L, LUO Y, SUN Y, et al. Establishment of kinetic models based on electrical conductivity and freshness indicators for the forecasting of crucian carp (*Carassius carassius*) freshness[J]. *J Food Eng*, 2011, 107(2): 147-151.
- [8] 丛斌, 齐倩. 法医转化医学模式——法医学发展的新契机[J]. *中国法医学杂志*, 2015, 30(6): 553-555.
- [9] 夏志远, 翟仙敦, 刘蓓蓓, 等. 大鼠死后肌肉电导率与腐败程度的关系[J]. *法医学杂志*, 2017, 33(1): 17-20.

(收稿日期:2018-05-11)

(本文编辑:张建华)