

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.30.002

小鼠骨髓来源肥大细胞的培养及鉴定*

彭霞[#] 梁玉婷[#] 林堃 尹悦 李莉[△]

(上海交通大学附属第一人民医院检验科 上海 200080)

摘要 目的:探讨小鼠骨髓来源肥大细胞体外大量培养及鉴定方法。**方法:**采用 IL-3 (10 ng/mL) 和不同浓度的 SCF 联合刺激小鼠骨髓细胞, 培养四周, 采用普通光学显微镜观察细胞形态, 牛鲍氏血细胞计数板进行细胞计数, 甲苯胺蓝染色观察其胞浆颗粒物质, 流式细胞仪检测细胞表面 CD117 和 FcεRI 的表达情况, β-己糖苷酶释放试验评估肥大细胞活化能力。**结果:**培养条件为 10 ng/mL IL-3 和 20 ng/mL SCF 时, 悬浮细胞数目能达到 1×10^8 细胞, 其中 CD117 和 FcεRI 双阳性细胞比例达 90% 以上; 甲苯胺蓝染色可见细胞胞浆含有大量紫红色颗粒; 细胞经 IgE-DNP 致敏及 DNP-HSA 激发后, β-己糖苷酶释放率明显增加, 且 SCF 能促进肥大细胞释放 β-己糖苷酶。**结论:**采用 10 ng/mL IL-3 和 20 ng/mL SCF 诱导骨髓细胞能够获得大量高纯度的小鼠骨髓来源肥大细胞, 为肥大细胞特性及功能学研究提供了基础。

关键词:小鼠; 骨髓; 肥大细胞; 培养; β-己糖苷酶释放

中图分类号:R-332; R329.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)30-5807-05

Culture and Identification of Bone Marrow-derived Mast Cells in Mice*

PENG Xia[#], LIANG Yu-ting[#], LIN Kun, YIN Yue, LI Li[△]

(Department of Laboratory Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To explore a method to obtain mass mast cells with high purity in vitro. **Methods:** Murine bone marrow cells were cultured in the medium containing 10 ng/mL IL-3 and different concentration of SCF in vitro. After 4 weeks, the morphology of cells was observed using optical microscopy, and the cell numbers were counted using NiuBao's blood count plate. Then, the particles in the cytoplasm of the cells were analyzed using toluidine blue staining. Besides, the expression of CD117 and FcεRI on the cell surface was detected by flow cytometry. Finally, the cell activation was evaluated by β-hexosaminidase release assay. **Results:** When cultured in the medium containing 10 ng/mL IL-3 and 20 ng/mL SCF, 1×10^8 suspension cells were obtained, and the ration of CD117 and FcεRI double positive cells was above 90%. A large number of purple red granules were observed in the cytoplasm of the cells. After sensitized with anti-DNP IgE and challenged with DNP-HSA, the rate of released β-hexosaminidase was significantly increased compare with control group, and β-hexosaminidase release of mast cells could be potentiated by SCF. **Conclusions:** A large number of mast cells with high purity could be obtained by stimulating the bone marrow cells by 10 ng/mL IL-3 and 20 ng/mL SCF, which may provide foundation for the characteristics and functional study of mast cell.

Key words: Mouse; Bone marrow; Mast cell; Culture; β-hexosaminidase release

Chinese Library Classification (CLC): R-332; R329.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2017)30-5807-05

前言

肥大细胞起源于骨髓造血干细胞, 进入外周组织后在细胞因子的作用下分化成熟。肥大细胞最广为人知的功能是作为过敏反应的效应细胞, 主要的作用机制是其表面的 IgE 高亲和力受体 (FcεRI) 与过敏原特异性 IgE 结合, 当过敏原与肥大细胞表面的 IgE 结合后引起肥大细胞表面相邻的 FcεRI 交联, 导致肥大细胞活化, 释放颗粒物质 (酶类、组胺等)、脂类介质 (白三

烯、前列腺素等) 和细胞因子 (IL-6、TNF-α 等), 引起局部或全身性的过敏症状, 导致过敏性哮喘、鼻炎、皮炎、过敏性休克等疾病的发生^[1]。随着对肥大细胞研究的不断深入, 发现肥大细胞除参与过敏反应外, 还参与了多种生理病理过程。近年来研究发现, 肥大细胞的数目及其释放的酶类在自身免疫病、肿瘤、动脉粥样硬化等疾病中显著增加, 且与疾病严重程度呈正相关, 这就说明肥大细胞可能在这些疾病中也发挥重要的致病作用^[2-6]。尽管存在传代的肥大细胞株 (如 P815、MC/9、HMC-1) 用于

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81471593, 81601395); 上海市青年扬帆计划 (16YF1409200)

[#] 并列第一作者

作者简介: 彭霞 (1988-), 博士, 技师, 主要研究方向: 肥大细胞凋亡与过敏治疗, 电话: 021-63240090, E-mail: pengxiajiao1@163.com

梁玉婷 (1989-), 博士研究生, 主要研究方向: 肥大细胞分泌体, 电话: 021-63240090, E-mail: liangyuting666@126.com

[△] 通讯作者: 李莉, 博士生导师, 主任医师, 主要研究方向: 肥大细胞与疾病, 电话: 021-63240090, E-mail: annylish@126.com

(收稿日期: 2017-04-22 接受日期: 2017-05-18)

肥大细胞功能学研究,实验室在前期研究中发现这些细胞株缺乏成熟肥大细胞的表面特征性分子(FcεRI)或活化能力,不能完全满足实验需求。体外原代培养的肥大细胞具备成熟肥大细胞的特性,因此获得大量原代培养的肥大细胞对于肥大细胞的研究至关重要。利用细胞因子白介素-3(interleukin-3,简称IL-3)、干细胞因子(stem cell factor,简称SCF)诱导骨髓细胞分化是目前获取原代培养的肥大细胞的常用的方法,并通过甲苯胺蓝染色检测胞浆嗜碱性颗粒及流式细胞仪检测细胞表面的特征性分子FcεRI和干细胞因子受体(stem cell factor receptor,简称KIT,亦称CD117)鉴定肥大细胞的纯度和成熟度。然而各实验室采用的细胞因子浓度(尤其是SCF浓度)尚不一致,由此获得的细胞纯度和数目也存在差异^[7,8]。本研究分析不同SCF浓度刺激下小鼠骨髓来源肥大细胞的数目和纯度,以建立一种经济、高效的大量肥大细胞培养方法,为肥大细胞的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性BABL/c小鼠,4-6周龄,清洁级,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.1.2 主要试剂 小鼠重组IL-3(rmIL-3)、SCF(rmSCF)(Pepro-rotech),RPMI 1640培养基、胎牛血清(FBS)、牛血清白蛋白(BSA)、非必需氨基酸、丙酮酸钠、青霉素、L-谷氨酰胺(Thermo-fisher),FITC-CD117、PE-Cyanine7-FcεRI(eBioscience),甲苯胺蓝、对硝基苯-N-乙酰-β-D葡萄糖酰胺、抗DNP IgE(IgE-DNP)(sigma),DNP-HSA(Biosearch),台式缓冲液(上海君瑞生物技术有限公司),CCK-8检测试剂(碧云天),其他试剂购自国药试剂。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓来源肥大细胞的制备和培养 无菌条件下取小鼠的股骨和胫骨,剔除肌肉组织,用2 mL注射器抽取冲洗液(RPMI 1640培养基+10% FBS),将骨髓细胞从骨髓腔冲出,直至骨髓腔变白,将未冲干净的股骨两端剪碎,放入冲洗液中。收集液体至15 mL离心管中,用吸管吸取离心管中的液体,对着管底吹打,反复多次,以1500 rpm离心3 min,弃上清液,用培养液(RPMI 1640培养基、10% FBS、青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/mL、0.1 mM非必需氨基酸、2 mM L-谷氨酰胺、10 ng/mL rmIL-3、20 ng/mL rmSCF)重悬细胞沉淀,调整细胞浓度为 1×10^6 mL,加入6孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养。第7天,收集细胞,1500 rpm离心3 min,弃上清,用培养液重悬细胞沉淀,调整细胞浓度至 1×10^6 mL,转移至175 cm²培养瓶中继续培养,每7天更换一次培养基。培养第4周,收集悬浮细胞,对细胞形态及功能进行鉴定。

1.2.2 SCF对小鼠骨髓来源肥大细胞数目的影响 骨髓细胞在含有10 ng/mL rmIL-3和不同浓度的rmSCF(0、5、10、15、20、30、40 ng/mL)的培养基培养四周,收集培养瓶中的悬浮细胞,充入牛鲍氏血细胞计数板计数,计算细胞数目。

1.2.3 小鼠骨髓来源肥大细胞甲苯胺蓝染色 收集悬浮细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤1次,细胞沉淀以200 μL PBS重悬,滴至载玻片上,待干燥后,用1% pH3.5的甲苯胺蓝染液染20

s,再以95%酒精分色,中性树胶封片,显微镜下观察细胞颗粒。

1.2.4 流式细胞术鉴定 收集悬浮细胞,PBS洗涤2次,加入含有100 μL 1%BSA的PBS重悬,再加1 μL FITC标记的抗小鼠CD117抗体和0.5 μL PE-Cyanine7标记的抗小鼠FcεRI抗体进行标记,4℃孵育45 min,PBS洗涤2次,加0.3 mL PBS重悬细胞,采用流式细胞仪检测细胞表面FcεRI和CD117的表达水平。

1.2.5 肥大细胞活化鉴定 收集悬浮细胞,分别在含有或不含有SCF的培养基中培养24 h,调整细胞浓度为 6×10^5 mL,接种在24孔板上,每孔0.5 mL。加入0.5 μg/mL IgE-DNP致敏,37℃、5% CO₂培养过夜。用台式缓冲液洗涤2次,以0.2 mL台式缓冲液重悬细胞,再加0.5 μg/mL DNP-HSA激发30 min,3000 rpm,离心5 min,收集上清(标记为A液),于4℃保存。细胞沉淀加200 μL含有0.5% Triton X-100的裂解液,37℃中裂解30 min,9000 rpm离心10 min,收集上清(标记为B液),于4℃保存。对照组以PBS进行致敏和激发。

样本与底物(对硝基苯-N-乙酰-β-D葡萄糖酰胺溶液)以1:1的比例混合,加入96孔板中,37℃反应1.5 h,再加0.4 M甘氨酸终止反应,于405 nm检测吸光度。β-己糖苷酶释放率按照以下公式进行计算。

$$\beta\text{己糖苷酶释放率} = \frac{\text{A液OD值}}{\text{A液OD值} + \text{B液OD值}} \times 100\%$$

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0对所得数据进行统计学分析,采用单因素方差分析对组件数据进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

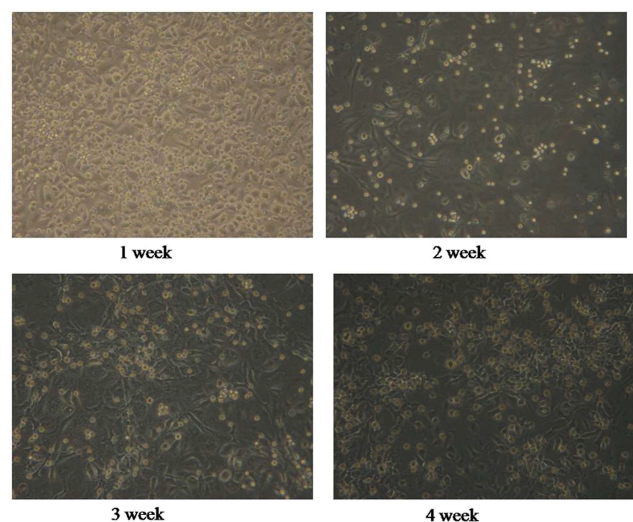


图1 光镜下的肥大细胞的特征(200×)

Fig.1 Characteristic of mast cells under light microscope
(magnification × 200)

2 结果

2.1 肥大细胞形态学观察

培养第3天开始出现贴壁细胞,贴壁细胞呈梭形,同时可见大小不一的悬浮细胞,悬浮细胞中包括骨髓中的大量红细胞(体积偏小)以及有核细胞(体积偏大)。由于营养成分缺乏,红细胞逐渐死亡,约2周时完全消失,此时悬浮细胞大小、形态逐

渐趋于均一且具有折光性。随着培养时间增加,悬浮细胞逐渐增多。

2.2 SCF 对小鼠骨髓肥大细胞数目的影响

在小鼠骨髓来源肥大细胞培养基中加入不同浓度的 rm-SCF (0、5、10、15、20、30、40 ng/mL), 观察肥大细胞增殖情况。研究发现, 随着 SCF 浓度增加, 细胞数目增加, 但当 SCF 超过 20 ng/mL 时, 细胞数目的增长趋势变缓; 20 ng/mL SCF 培养四周时, 每只小鼠能获得的悬浮细胞数目能够达约 1×10^6 (图 2)。

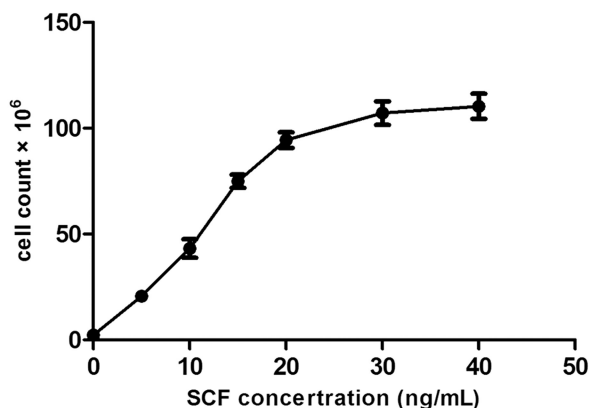


图 2 SCF 对肥大细胞数目的影响

注: 数据以 $\pm$ SD 表示, $n=3$ 。

Fig. 2 The effect of SCF to mast cell proliferation

Note: Data were expressed as $\pm$ SD, $n=3$.

2.3 小鼠骨髓来源肥大细胞甲苯胺蓝染色

培养 1 周时, 可见部分细胞胞浆存在紫红色颗粒, 但由于颗粒较少, 着色偏浅; 随着培养时间增加, 细胞内紫红色颗粒逐渐增多; 第四周时, 可见细胞胞浆呈明显紫红色, 充斥着大量嗜碱性颗粒, 镜下计数超过 90 % 的细胞胞浆含有紫红色颗粒, 说明本研究诱导的细胞为肥大细胞且具有较高纯度 (图 3)。

2.4 小鼠骨髓来源肥大细胞表面分子检测

采用流式细胞分析术检测细胞表面的 CD117 和 FcεRI 的表达情况。图 4 可见, 培养第 2 天, FcεRI 即大量表达, FcεRI 阳性率在 70 % 以上, 相比而言, CD117 的表达则较缓慢; 随着培养时间延长, CD117 的表达量逐渐增加, FcεRI 和 CD117 表达双阳性细胞比例也增多; 培养至第四周, FcεRI 和 CD117 表达双阳性细胞比例达到 90 % 以上。说明本研究获得的肥大细胞具有较高的纯度。

2.5 小鼠骨髓来源肥大细胞脱颗粒能力检测

用 IgE-DNP 致敏和 DP-HSA 激发激活肥大细胞, 通过检测 β -己糖苷酶的释放率评估其活化水平。结果可见, 小鼠骨髓来源肥大细胞经 IgE 介导的途径激活后, β -己糖苷酶释放率出现增加, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。尽管单纯的 SCF 不能促进小鼠骨髓来源肥大细胞脱颗粒, 在含有 SCF 的条件下, 小鼠骨髓来源肥大细胞的 β -己糖苷酶释放率进一步增加, 与不含 SCF 状态下的激发组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着 SCF 浓度增加, 肥大细胞 β -己糖苷酶释放率也增加 (图 5)。这说明在含有 SCF 的条件下, IgE 介导的小鼠骨髓来源肥大细胞的活化能够增强。

3 讨论

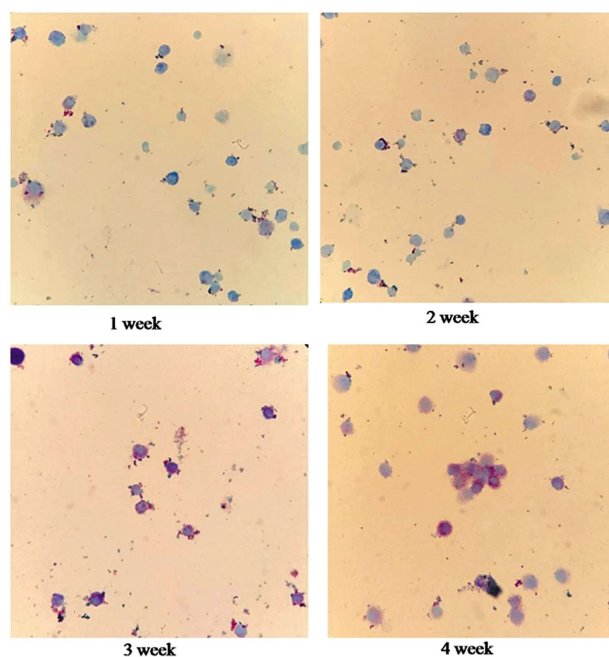


图 3 小鼠骨髓来源肥大细胞甲苯胺蓝染色 (1000 $\times$)

Fig.3 Toluidine blue staining of mast cells (magnification $\times 1000$)

肥大细胞起源于骨髓 CD34⁺ 的多能干细胞, 迁移至各组织后在细胞因子的作用下分化成熟, 是一种定居在组织的长寿细胞。肥大细胞表面表达大量的受体如 IgE 高亲和力受体、细胞因子受体、趋化因子受体、凋亡受体、Toll 样受体; 胞质内充满粗大的嗜碱性颗粒, 颗粒内含肝素、组胺、酶类、嗜酸性粒细胞趋化因子等; 被激活后, 肥大细胞还能新合成脂类介质和细胞因子。这些特性使肥大细胞的功能存在多样性, 在固有免疫和适应性免疫应答中都发挥了重要的作用^[9,10]。

IL-3 也称为多克隆集落刺激因子, 是促小鼠肥大细胞分化作用最强的细胞因子, 主要在肥大细胞分化早期发挥重要作用。SCF 是维持肥大细胞生存并促进肥大细胞增殖的重要细胞因子, SCF 的浓度将影响肥大细胞的数量; 此外, SCF 也能协助 IL-3 介导的肥大细胞分化, 在肥大细胞成熟晚期发挥较 IL-3 更重要的作用^[11,12]。使用 IL-3 或 / 和 SCF 诱导小鼠骨髓干细胞分化成肥大细胞是目前常用的原代肥大细胞培养方法^[13,14]。目前培养方法尚无统一标准, 尤其是培养过程中 SCF 浓度差异较大: SCF 浓度从 0 ng/mL 到 50 ng/mL 不等^[7,15-19]。这给实验室原代肥大细胞的培养带来一些困难: ① SCF 浓度过低时获得的肥大细胞数目过少, ② 由于细胞因子价格较昂贵, SCF 浓度过高时培养成本增加。因此本研究分析了 SCF 浓度对肥大细胞数量的影响, 确定合适的用于肥大细胞培养的细胞因子浓度, 以建立一种经济高效的肥大细胞大量培养方法。

在探讨 SCF 浓度对小鼠骨髓来源肥大细胞数目影响的研究中, 我们发现 SCF 超过 20 ng/mL 后, 随着 SCF 浓度增加, 细胞数目的增幅变缓, 可能此时 CD117 与 SCF 的结合趋于饱和。有文献报道, SCF 浓度过高时会限制肥大细胞表面 FcεRI 和 CD117 的表达水平, 从而影响肥大细胞纯度^[20]。本研究发现, SCF 浓度 ≤ 20 ng/mL 时, FcεRI 和 CD117 表达双阳性细胞比例在 93 % 以上; SCF 浓度达到 30 ng/mL 时, FcεRI 和 CD117 表达双阳性细胞比例减少为 80 % 左右, 说明 20 ng/mL SCF 是比

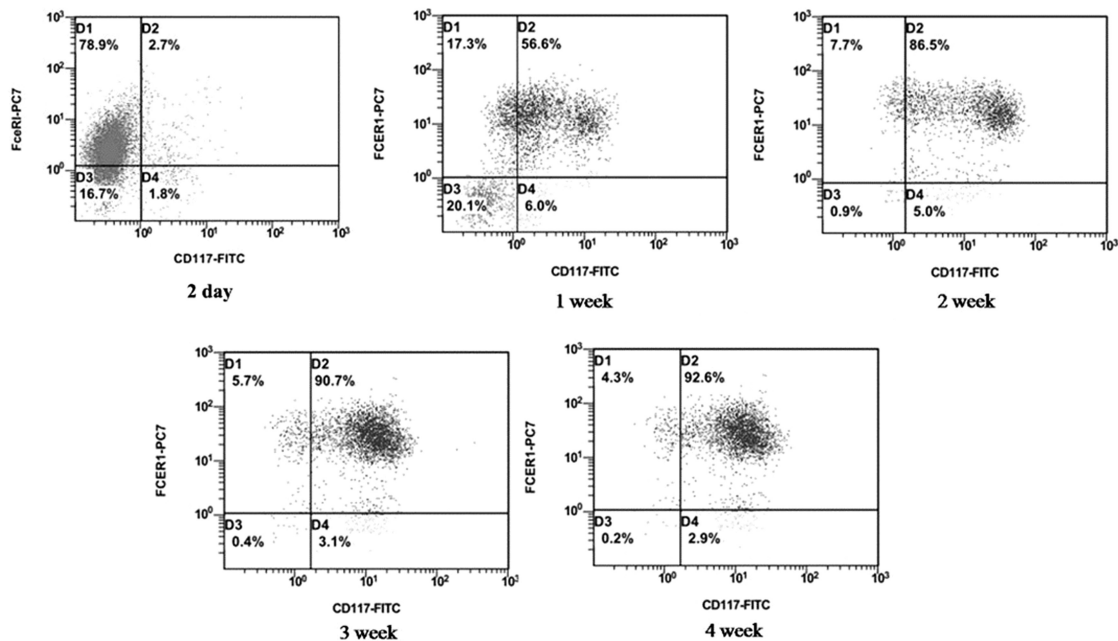


图4 小鼠骨髓来源肥大细胞 FcεRI 和 CD117 的表达情况

Fig.4 Expression of FcεRI and CD117 on mast cells

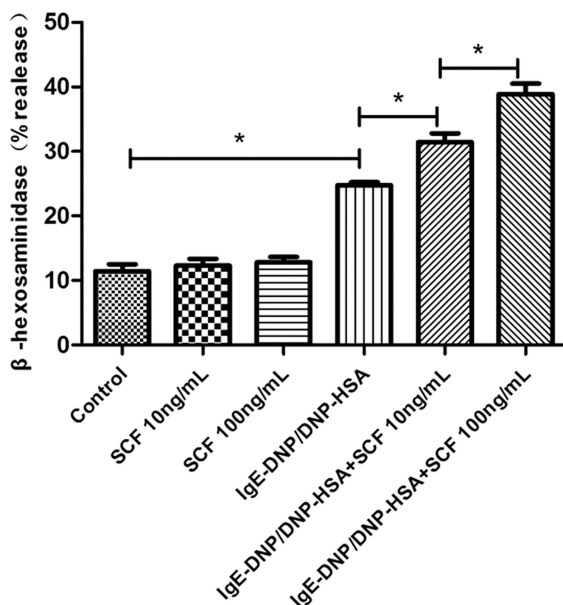


图5 小鼠骨髓来源肥大细胞 β-己糖苷酶释放实验

Fig.5 β-hexosaminidase release of bone marrow-derived mast cells in mice

注:数据以 ± SD 表示, n=3, * 表示 P<0.05。

Note: Data were expressed as ± SD, n=3, *P<0.05.

较适合肥大细胞培养的浓度,在此条件下培养能获得大量高纯度的肥大细胞。

另外,本研究采用普通光学显微镜观察了肥大细胞的形态、甲苯胺蓝染色法观察了肥大细胞的颗粒。研究发现,培养体系中存在贴壁细胞和悬浮细胞,肥大细胞为悬浮状态。有研究发现随着培养时间延长,贴壁细胞逐渐减少甚至消失^[20]。本研究发现,贴壁细胞在培养过程中一直存在,铺满培养瓶底部,且第三天是否出现贴壁细胞是早期判断肥大细胞培养是否功能的一个重要指标。这可能与 SCF 的作用相关,作为一种多功能

细胞因子,其具有维持细胞生存并促进增殖的作用:一方面培养基中添加的 SCF 能促进贴壁的骨髓基质细胞的生存及增殖,减少其凋亡;另一方面,这些贴壁的骨髓基质细胞也能分泌 SCF 及其他多种营养因子,促进自身及肥大细胞的增殖和分化,因此贴壁的基质细胞的生存状态会影响骨髓细胞的分化,尤其在早期阶段^[21]。

肥大细胞颗粒通过甲苯胺蓝染色进行分析,研究中发现培养至第四周时,细胞胞浆出现大量的紫红色颗粒。这些结果也佐证了本研究培养的为肥大细胞。

本研究还采用流式细胞术检测细胞表面 CD117 和 FcεRI 的表达情况以分析肥大细胞的成熟度和纯度。在骨髓中,CD117 仅表达在 CD34⁺造血干细胞以及肥大细胞表面,在其他成熟的造血细胞上不表达,因此是用于鉴定及计数肥大细胞的可靠标志之一;FcεRI 在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面大量表达,是肥大细胞发挥功能的重要表面分子,尽管单核细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞等细胞表面也表达 FcεRI,但其数量不及肥大细胞和嗜碱性粒细胞的 1/100^[22,23]。因此,采用流式细胞术检测 CD117 和 FcεRI 双阳性表达细胞是判断肥大细胞成熟度和纯度的可靠指标^[24,25]。本研究发现,以细胞因子诱导四周后,CD117 和 FcεRI 双阳性细胞比例达到 92% 以上,这也进一步证实了所获得的细胞为肥大细胞,且具有较高的纯度。

β-己糖苷酶是肥大细胞颗粒中预先合成的一种酶类,是肥大细胞脱颗粒的重要标志之一,因此检测肥大细胞 β-己糖苷酶释放率是评估肥大细胞活化的有效方式^[26]。本研究发现小鼠骨髓来源肥大细胞能通过经典的 IgE 途径活化,在含有 SCF 的条件下,IgE 介导的肥大细胞活化作用被增强。这可能与 SCF 及 CD117 介导的肥大细胞增殖信号通路和 IgE 及 FcεRI 介导的活化信号通路之间存在共同的信号转导环节或关键调控分子有关,即共同的调控分子同时接收来自 SCF-KIT 和 IgE-FcεRI 通路的信号,导致自身活化水平增高^[27-29]。

4 结论

本研究采用 20 ng/mL SCF 和 10 ng/mL IL-3 诱导骨髓细胞产生大量的肥大细胞, 每只小鼠能获得的肥大细胞数量高达 1×10^8 , 细胞纯度达 92% 以上, 形态学和功能学鉴定结果显示获得的细胞具备成熟肥大细胞的特征和活化能力。这些研究结果表明 20 ng/mL SCF 和 10 ng/mL IL-3 可在体外成功地培养出大量高纯度成熟的肥大细胞, 所建立的肥大细胞培养方法简单、经济、高效, 可用于肥大细胞及其相关疾病的研究。

参考文献(References)

- [1] Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(5): 362-375
- [2] Shi GP, Bot I, Kovanen PT. Mast cells in human and experimental cardiometabolic diseases[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(11): 643-658
- [3] 刘亚楠, 蒯丽慧, 李莉, 等. 肥大细胞促早期胃癌形成及其生物学意义[J]. *检验医学*, 2013, 28(1): 67-71
Liu Ya-nan, Lin Li-hui, Li Li, et al. Mast cells exerting protumorigenic role in the early phase of gastric carcinoma and its biological significance[J]. *Laboratory Medicine*, 2013, 28(1): 67-71
- [4] Suurmond J, van der Velden D, Kuiper J, et al. Mast cells in rheumatic disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778: 116-124
- [5] Oldford SA, Marshall JS. Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors[J]. *Mol Immunol*, 2015, 63(1): 113-124
- [6] Willems S, Vink A, Bot I, et al. Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaquemicrovessel density and the occurrence of future cardiovascular events [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(48): 3699-3706
- [7] Yoshida K, Ito M, Matsuoka I. Divergent regulatory roles of extracellular ATP in the degranulation response of mouse bone marrow-derived mast cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 43: 99-107
- [8] Huang L, Ng NM, Chen M, et al. Inhibition of TRPM7 channels reduces degranulation and release of cytokines in rat bone marrow-derived mast cells[J]. *Int J MolSci*, 2014, 15(7): 11817-11831
- [9] Harvima IT, Levi-Schaffer F, Draber P, et al. Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies [J]. *J Allergy ClinImmunol*, 2014, 134(3): 530-544
- [10] Migalovich-Sheikhet H, Friedman S, Mankuta D, et al. Novel identified receptors on mast cells [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 238-254
- [11] Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, et al. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells [J]. *J Immunol*, 1992, 148(3): 772-777
- [12] Lantz CS, Boesiger J, Song CH, et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites[J]. *Nature*, 1998, 392(6671): 90-93
- [13] Xiang Y, Eysers F, Young IG, et al. Identification of microRNAs regulating the developmental pathways of bone marrow derived mast cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98139
- [14] Meurer SK, Neß M, Weiskirchen S, et al. Isolation of Mature (Peritoneum-Derived) Mast Cells and Immature (Bone Marrow-Derived) Mast Cell Precursors from Mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158104
- [15] Mirzahassemi A, Dalmadi B, Csutora P. Histamine receptor H4 regulates mast cell degranulation and IgE induced FcεRI upregulation in murine bone marrow-derived mast cells [J]. *Cell Immunol*, 2013, 283(1-2): 38-44
- [16] Abebayehu D, Spence AJ, Qayum AA, et al. Lactic Acid Suppresses IL-33-Mediated Mast Cell Inflammatory Responses via Hypoxia-Inducible Factor-1α-Dependent miR-155 Suppression [J]. *J Immunol*, 2016, 197(7): 2909-2917
- [17] Galand C, Leyva-Castillo JM, Yoon J, et al. IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells [J]. *J Allergy ClinImmunol*, 2016, 138(5): 1356-1366
- [18] Chae HS, Song HH, Kim YM, et al. Euphorbia supina inhibits inflammatory mediators in mouse bone marrow-derived mast cells and macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 966-973
- [19] Phong B, Avery L, Menk AV, et al. Cutting Edge: Murine Mast Cells Rapidly Modulate Metabolic Pathways Essential for Distinct Effector Functions[J]. *J Immunol*, 2017, 198(2): 640-644
- [20] 张维娜, 吴轲, 周鸿敏, 等. 小鼠骨髓源性肥大细胞的培养及鉴定 [J]. *内科急危重症杂志*, 2009, 15(2): 95-97
Zhang Wei-na, Zhou Ke, Zhou Hong-mei, et al. Culture and identification of bone marrow derived mast cells in murine[J]. *Journal of Internal Intensive Medicine*, 2009, 15(2): 95-97
- [21] Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, et al. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(16): 7350-7354
- [22] Orfao A, Escibano L, Villarrubia J, et al. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples: identification and enumeration [J]. *Am J Pathol*, 1996, 149(5): 1493-1499
- [23] Macglashan D Jr. IgE and Fc {epsilon}RI regulation [J]. *Ann N Y AcadSci*, 2005, 1050: 73-88
- [24] Xue L, Geng Y, Li M, et al. The effects of D3R on TLR4 signaling involved in the regulation of METH-mediated mast cells activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36: 187-198
- [25] Chacó n-Salinas R, Chen L, Chá vez-Blanco AD, et al. An essential role for platelet-activating factor in activating mast cell migration following ultraviolet irradiation. *J LeukocBiol*, 2014, 95(1): 139-148
- [26] Fukuishi N, Murakami S, Ohno A, et al. Does β-hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of β-hexosaminidase in mast cell granules [J]. *J Immunol*, 2014, 193(4): 1886-1894
- [27] Ullerås E, Karlberg M, Möller Westerberg C, et al. NFAT but not NF-kappaB is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells [J]. *Blood*, 2008, 111(6): 3081-3089
- [28] Tkaczyk C, Horejsi V, Iwaki S, et al. NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation[J]. *Blood*, 2004, 104(1): 207-214
- [29] Iwaki S, Spicka J, Tkaczyk C, et al. Kit- and Fc epsilonRI-induced differential phosphorylation of the transmembrane adaptor molecule NTAL/LAB/LAT2 allows flexibility in its scaffolding function in mast cells[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(1): 195-205