粉尘螨组分在过敏性哮喘发生过程中的作用

王辉[†], 刘晓宇[†], 李国平, 刘志刚^{*}

深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: lzg@szu.edu.cn

收稿日期: 2017-10-20; 接受日期: 2017-11-15; 网络版发表日期: 2018-01-18

国家自然科学基金海外及港澳学者合作研究延续项目(批准号: 31729002)、国家自然科学基金重大研究计划培育项目(批准号: 91542104)、国家重点研发计划“精准医学研究”项目(批准号: 2016YFC0905802)、广东省科技计划项目(批准号: 2013B031800023, 2016A020216029)、深圳市科技计划基础研究学科布局项目(批准号: JCYJ20160328144536436)和深圳市科技计划基础研究项目(批准号: JCYJ20160422091132854)资助

哮喘是一种临床上常见的慢性呼吸道疾病, 其特点是病人气道反复阻塞和喘息, 过敏性哮喘是其最常见的形式^[1]. 据统计, 全世界哮喘的发病率高达5%~16%, 在美国全年用于哮喘的治疗费用超过了AIDS和肺结核治疗费用的总和^[2]. 我国约有哮喘患者3000万人, 哮喘已经成为危害我国人民健康的重大疾病^[3,4]. 在众多吸入性过敏原中, 尘螨是诱发呼吸道过敏最重要的因素, 约有80%左右的哮喘患者对尘螨敏感^[5,6]. 屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*)和粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*)是我国室内最主要的两种螨种, 而在华南地区则主要是粉尘螨^[7]. 到目前为止, 对于粉尘螨致敏机制的研究还相对较少, 大部分集中在对其主要过敏原的研究. 但是到目前为止针对粉尘螨诱发的过敏性哮喘还没有很好的预防与治疗措施. 本研究发现, 除了主要过敏原, 粉尘螨中还存在大量的次要过敏原、非过敏原蛋白和细菌蛋白, 猜测其在过敏性哮喘的发生过程中同样具有重要作用. 为了进一步明确这些粉尘螨组分对于过敏性哮喘的影响, 本文将结合现有研究与本实验室的工作, 对粉尘螨组分与过敏

性哮喘的研究现状进行论述.

1 过敏性哮喘的发病机制

过敏性疾病的发生被认为主要是由于Th1/Th2型免疫失衡所致^[8-10]. DC细胞作为人体内最为重要的抗原提呈细胞, 能够识别过敏原, 进而加工递呈于T细胞^[11]. DC细胞诱导Th0细胞极化不仅需要MHC II分子, 也需要表面共刺激分子(如CD80, CD40和CD83等)的辅助^[12]. 过敏原进入机体以后, 首先被抗原递呈细胞(如DC细胞)所识别, 进而促使Th0细胞向Th2型分化, 分泌IL-4, IL-5和IL-13等Th2型细胞因子, 从而促进B细胞分泌大量的IgE, 激活嗜酸性粒细胞与肥大细胞, 并将其招募到炎症部位^[13-15]. 激活的嗜酸性粒细胞与肥大细胞能够产生大量的细胞因子和趋化因子, 从而诱发黏液分泌与平滑肌收缩, 最终导致哮喘的发生^[16].

肺部的免疫系统与常规的免疫系统存在较大差异, 聚集了一批特殊的细胞亚群和关键分子, 具有明显的区域性. 肺上皮细胞作为人体气道的第一道防线, 在外界过敏原的刺激下可以产生多种细胞因子, 包括

引用格式: 王辉, 刘晓宇, 李国平, 等. 粉尘螨组分在过敏性哮喘发生过程中的作用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 73-77

Wang H, Liu X Y, Li G P, et al. The role of components of *Dermatophagoides farinae* in development of allergic asthma (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 73-77, doi: [10.1360/N052017-00230](https://doi.org/10.1360/N052017-00230)

CCL17, CCL22, IL-25, IL-33和胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)等, 这些细胞因子参与到Th2细胞的极化与局部炎症的形成^[17-19]. TSLP是上皮细胞应对细菌、过敏原与炎症因子等分泌的最为重要的细胞因子^[20]. 已有的研究发现, 在小鼠(*Mus musculus*)体内高表达TSLP的情况下, 过敏性哮喘的症状显著增强; 而在抑制TSLP表达的情况下, 过敏性哮喘的症状得到了显著的改善^[21]. 进一步研究发现肺上皮细胞分泌的细胞因子TSLP能够通过OX40/OX40L激活DC细胞, 从而诱导Th0向Th2分化^[22]. 所以, TSLP在过敏性疾病的发生过程中起到了至关重要的作用. 但是, 到目前为止上皮细胞中的TSLP是如何被过敏原诱导产生的机制尚不明确.

目前普遍认为, 细胞因子微环境在Th0细胞分化过程中发挥着至关重要的作用^[13]. 已有研究发现, IL-4能够与其受体结合后激活STAT6, 从而诱导细胞内转录因子GATA3的表达, 继而使得Th0细胞向Th2型分化^[13]. 但是一直以来, 对于哪些细胞产生细胞因子作用于Th0细胞分化还不是十分的清楚. 最近的研究发现, 分布于人和小鼠肺与肠道中的二型固有淋巴细胞(group 2 innate lymphoid cells, ILC2)能够特异性的产生IL-5和IL-13等Th2型细胞因子, 在Th0分化过程中起着至关重要的作用^[13,16,23,24]. 利用木瓜蛋白酶建立小鼠哮喘模型, 小鼠体内的ILC2细胞数目显著增多^[13]. 在缺失ILC2细胞的*Rag1*^{-/-}小鼠中, 过敏原引起的气道炎症显著减弱, 而在回输ILC2细胞以后该表型回复^[25]. 研究发现, ILC2细胞分泌的IL-13对于肺部DC细胞到达局部淋巴结起到了至关重要的作用^[13]. 同时发现肺上皮细胞分泌的TSLP能够直接作用肺部ILC2细胞, 从而激活ILC2细胞产生IL-5和IL-13^[25].

研究发现, 气道上皮屏障功能障碍在过敏性哮喘的发病过程中起着重要的作用^[26]. 气道上皮细胞通过细胞顶端的一系列细胞连接(包括紧密连接和黏附连接), 维持上皮屏障功能^[27]. 对临床哮喘患者肺部组织进行检查, 发现上皮细胞的紧密连接(主要是E-钙黏蛋白)是有缺陷的, 体外分离培养哮喘患者的上皮细胞, 同样发现其紧密连接存在缺陷^[28]. 研究发现, 过敏原可以诱导上皮细胞紧密连接缺陷, 同时E-钙黏蛋白的表达降低, 而这种作用主要依赖过敏原的酶活性^[18]. 同时E-钙黏蛋白的表达降低可以激活DC细胞, 从而使得机体更容易过敏. 此外, 培养E-钙黏蛋白缺损的上皮

细胞, 其分泌的TSLP水平显著升高^[29]. E-钙黏蛋白是KLRG-1的配体(ILC2细胞表达), 正常情况下, E-钙黏蛋白结合KLRG-1后, 可以抑制ILC2细胞产生IL-5和IL-13, 而在其缺失的情况下则促进ILC2细胞产生Th2型细胞因子^[30].

2 已知粉尘螨过敏原及其诱发哮喘的机制

到目前为止, 已经发现并且被国际过敏原命名委员会(WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee)命名的粉尘螨过敏原大约有36种. 其中Der f 1, 2为主要过敏原, 对过敏性疾病(哮喘)患者免疫诊断阳性率达到87.8%^[31,32]. Der f 1属于半胱氨酸蛋白酶家族, 而Der f 2属于脂结合蛋白家族. 其他过敏原中, 有9个属于蛋白酶类. 其中, 由本实验室发现并命名的过敏原包括: Der f 20, Der f 21, Der f 24, Der f 26, Der f 27, Der f 29b, Der f 31, Der f 32, Der f 33^[33-38].

粉尘螨的主要过敏原Der f 1的101~131区域内存在环状结构可使T细胞受体活化, 并释放细胞因子IL-4进而促进T细胞向Th2型分化^[39,40]. 同时尘螨Der f 1能够破坏气道上皮细胞之间的紧密连接, 从而增高上皮的通透性使其更容易被抗原提呈细胞所识别^[41]. 另外, Der f 1还能够直接作用于肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 导致其脱颗粒及分泌相应的细胞因子, 从而介导过敏反应的发生^[42,43]. Der f 2与ML脂类结合蛋白(MD-2)具有结构同源性, 因此能够调节DC的功能, 促使Th0细胞向Th2型偏移, 从而诱发过敏^[44]. 本课题组发现, Der f 8不同于其他过敏原, 能够显著性地升高DC细胞TIM4的表达, 继而促使Th0向Th2的分化^[45]. 粉尘螨 α -Tubulin蛋白(Der f 33)作为一种过敏原能够显著性地诱导DC细胞表面MHC II与共刺激分子的表达, 同时能够诱导小鼠过敏性哮喘^[38]. 虽然对于尘螨主要过敏原的致敏机制已经有了很多的研究, 但是还有很多次要过敏原的致敏机制不清楚.

3 粉尘螨非过敏原成分在诱发过敏性哮喘中的作用

在临床过敏性疾病诊断和防治中困扰多年的一个基础科学问题: 在自然界存在众多过敏原(如尘螨、花粉、蟑螂、真菌等)的情况下, 为什么过敏性疾病患者

唯独对尘螨过敏原阳性率高达70%~80%, 而对其他过敏原阳性率却相对较低? 这就提示除经典的过敏发生机制外, 尘螨致敏也许还存在其他的机制. 本课题组于2011~2013年首次对粉尘螨基因组和转录组开展大规模测序和生物信息学分析研究, 发现除了过敏原外, 粉尘螨体内还存在其他多种非过敏原蛋白和细菌组分^[35]. 经过同源性比对, 发现其中一个蛋白与中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)和意蜂(*Apis mellifera Ligustica Spinola*)等体内的亲环素蛋白——肤酞脯氨酸顺/反异构酶(peptidyl-prolylisomerases, Pplase)具有很高的同源性, 因此被命名为粉尘螨Pplase. 继克隆表达、蛋白纯化后, 经由临床皮肤试验、sIgE检测, 证实粉尘螨Pplase蛋白不是过敏原组分, 但进一步研究显示, Pplase体外细胞实验可上调Th2反应, 且能够增强由过敏原引起的Th2反应. 同时利用Pplase体外刺激DC细胞再回输到正常小鼠, 能够显著提高过敏原诱发的过敏反应^[46]. 以上证据说明粉尘螨非过敏原组分在过敏反应发生的过程中起到了“协同”作用. 本课题组认为, 在尘螨体内应该存在大量具有“协同作用”的非过敏原成分, 从而使得尘螨的过敏阳性率显著高于其他过敏原.

目前SIT治疗哮喘主要有天然尘螨疫苗和基因工程尘螨疫苗, 但临床实践中却发现用天然尘螨疫苗SIT的疗效远优于基因工程疫苗^[5,47,48]. 本课题组在国际上首次发现在从粉尘螨提取的DNA中, 细菌DNA含量占40%. 对细菌DNA进一步分析后发现其中包含有50多

种细菌, 其中肠杆菌为优势菌群^[35]. 进一步利用蛋白质二维电泳和质谱分析标准化粉尘螨疫苗, 发现其中含有肠杆菌菌毛H (fimbriae H, FimH)蛋白^[49~52]. FimH是肠杆菌科细菌的重要菌毛蛋白, 具有甘露糖识别位点, 其结合于细胞表面的TLR4可活化固有免疫系统, 介导抗细菌和抗病毒感染的保护反应^[53~55]. 所以推测FimH蛋白有可能在过敏原疫苗特异性免疫治疗中发挥免疫调节作用. 利用FimH与Der f 1/2进行SIT治疗, 对其功能进行了初步探讨, 发现其疗效优于单独使用Der f 1/2. 基于此, 认为粉尘螨中的细菌成分在尘螨疫苗诱导的免疫耐受中发挥着重要的作用, 是天然尘螨疫苗疗效优于基因工程尘螨疫苗的重要原因.

4 总结

粉尘螨作为过敏性哮喘的重要过敏原, 对其过敏原的分离鉴定与机制研究将有助于过敏性哮喘的预防与治疗. 但是目前的研究主要集中于主要过敏原, 对于其他次要过敏原的研究还很少. 本课题组认为, 次要过敏原同样在过敏性哮喘的发病过程中起着重要的作用, 能够协同增强主要过敏原诱发的过敏症状. 同时粉尘螨体内除了含有过敏原外, 还含有大量的非过敏原蛋白与细菌成分. 作为诱发过敏性哮喘最为重要的过敏原, 粉尘螨能够通过其不同组分的相互协同从而增强宿主的过敏反应.

参考文献

- Kim H Y, DeKruyff R H, Umetsu D T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 2010, 11: 577–584
- Cisternas M G, Blanc P D, Yen I H, et al. A comprehensive study of the direct and indirect costs of adult asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111: 1212–1218
- Jiang W, Oken H, Fiuzat M, et al. Plasma omega-3 polyunsaturated fatty acids and survival in patients with chronic heart failure and major depressive disorder. *J Cardiovasc Trans Res*, 2012, 5: 92–99
- Tovey E, Ferro A. Time for new methods for avoidance of house dust mite and other allergens. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2012, 12: 465–477
- Akdis C A, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127: 18–27, 28–29
- Gregory L G, Lloyd C M. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*, 2011, 32: 402–411
- Barnes P J. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev*, 2011, 242: 31–50
- Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113: 395–400
- Anderson G P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*, 2008, 372: 1107–1119
- Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science*, 2012, 337: 431–435

- 11 Ruiter B, Shreffler W G. The role of dendritic cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129: 921–928
- 12 Salazar F, Ghaemmaghami A M. Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells. *Front Immunol*, 2013, 4: 356
- 13 Halim T Y F, Steer C A, Mathä L, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, 2014, 40: 425–435
- 14 Steinke J W, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res*, 2001, 2: 66–70
- 15 Huang B. Tumor microenvironment: a mechanical force link. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 202–204
- 16 Motomura Y, Morita H, Moro K, et al. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity*, 2014, 40: 758–771
- 17 Islam S A, Luster A D. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med*, 2012, 18: 705–715
- 18 Hammad H, Lambrecht B N. Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity. *Immunity*, 2015, 43: 29–40
- 19 Juncadella I J, Kadl A, Sharma A K, et al. Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature*, 2013, 493: 547–551
- 20 Comeau M R, Ziegler S F. The influence of TSLP on the allergic response. *Mucosal Immunol*, 2010, 3: 138–147
- 21 Zhou B, Comeau M R, De Smedt T, et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1047–1053
- 22 Ito T, Wang Y H, Duramad O, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*, 2005, 202: 1213–1223
- 23 Kabata H, Moro K, Fukunaga K, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun*, 2013, 4: 2675
- 24 Morita H, Arae K, Unno H, et al. An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity*, 2015, 43: 175–186
- 25 Halim T Y F, Krauss R H, Sun A C, et al. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*, 2012, 36: 451–463
- 26 Holgate S T. Novel targets of therapy in asthma. *Curr Opin Pulmonary Med*, 2009, 15: 63–71
- 27 Niessen C M. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007, 127: 2525–2532
- 28 Xiao C, Puddicombe S M, Field S, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 128: 549–556.e12
- 29 Heijink I H, Kies P M, Kauffman H F, et al. Down-regulation of E-cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependent Th2 cell-promoting activity. *J Immunol*, 2007, 178: 7678–7685
- 30 Salimi M, Barlow J L, Saunders S P, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med*, 2013, 210: 2939–2950
- 31 Takai T, Kato T, Hatanaka H, et al. Modulation of allergenicity of major house dust mite allergens Der f 1 and Der p 1 by interaction with an endogenous ligand. *J Immunol*, 2009, 183: 7958–7965
- 32 Thomas W R, Smith W A, Hales B J. The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J*, 2004, 27: 563–569
- 33 Xing P, Yu H, Li M, et al. Characterization of arginine kinase, a novel allergen of *Dermatophagoides farinae* (Der f 20). *Am J Transl Res*, 2015, 7: 2815–2823
- 34 Wu Y, Jiang C, Li M, et al. Der f 21, a novel allergen from *Dermatophagoides farinae*. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 49–59
- 35 Chan T F, Ji K M, Yim A K Y, et al. The draft genome, transcriptome, and microbiome of *Dermatophagoides farinae* reveal a broad spectrum of dust mite allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135: 539–548
- 36 Lin J, Li M, Liu Y, et al. Expression, purification and characterization of Der f 27, a new allergen from *Dermatophagoides farinae*. *Am J Transl Res*, 2015, 7: 1260–1270
- 37 Lin J, Wang H, Li M, et al. Characterization and analysis of a cDNA coding for the group 29b (Der f 29b) allergen of *Dermatophagoides farinae*. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 568–577
- 38 Wang H, Lin J, Liu X, et al. Identification of α -tubulin, Der f 33, as a novel allergen from *Dermatophagoides farinae*. *Immunobiology*, 2016, 221: 911–917

- 39 Machado D C, Horton D, Harrop R, et al. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. [Eur J Immunol](#), 1996, 26: 2972–2980
- 40 Xie D, Zhu S, Bai L. Lactic acid in tumor microenvironments causes dysfunction of NKT cells by interfering with mTOR signaling. [Sci China Life Sci](#), 2016, 59: 1290–1296
- 41 Wan H, Winton H L, Soeller C, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. [J Clin Invest](#), 1999, 104: 123–133
- 42 Calderón M A, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: what do we really know? [J Allergy Clin Immunol](#), 2015, 136: 38–48
- 43 Yi M, Kim H P, Jeong K Y, et al. House dust mite allergen Der f 1 induces IL-8 in human basophilic cells via ROS-ERK and p38 signal pathways. [Cytokine](#), 2015, 75: 356–364
- 44 Trompette A, Divanovic S, Visintin A, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. [Nature](#), 2009, 457: 585–588
- 45 Mo L H, Yang L T, Zeng L, et al. Dust mite allergen, glutathione S-transferase, induces T cell immunoglobulin mucin domain-4 in dendritic cells to facilitate initiation of airway allergy. [Clin Exp Allergy](#), 2017, 47: 264–270
- 46 Wang H, Mo L, Xiao X, et al. Pplase of *Dermatophagoides farinae* promotes ovalbumin-induced airway allergy by modulating the functions of dendritic cells in a mouse model. [Sci Rep](#), 2017, 7: 43322
- 47 Cao Z, Ren D, Ha T, et al. CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: involving activation of PI3K/Akt signaling. [Biochim Biophys Acta](#), 2013, 1832: 96–104
- 48 Bousquet J, Lockey R, Malling H J, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. [Ann Allergy Asthma Immunol](#), 1998, 81: 401–405
- 49 Zhang Y Y, Sun X, Liu Z G. Morphology and three-dimensional reconstruction of the digestive system of *Dermatophagoides farinae*. [Int Arch Allergy Immunol](#), 2008, 146: 219–226
- 50 Yu H Q, Li X H, Guo H, et al. Sublingual immunotherapy efficacy of *Dermatophagoides farinae* vaccine in a murine asthma model. [Int Arch Allergy Immunol](#), 2010, 152: 41–48
- 51 Liu Z, Guo H, Wu Y, et al. Local nasal immunotherapy: efficacy of *Dermatophagoides farinae*-chitosan vaccine in murine asthma. [Int Arch Allergy Immunol](#), 2009, 150: 221–228
- 52 Li J, Liu Z, Wu Y, et al. Chitosan microparticles loaded with mite group 2 allergen Der f 2 alleviate asthma in mice. [J Invest Allergol Clin Immunol](#), 2008, 18: 454–460
- 53 Ashkar A A, Mossman K L, Coombes B K, et al. FimH adhesin of type 1 fimbriae is a potent inducer of innate antimicrobial responses which requires TLR4 and type 1 interferon signalling. [PLoS Pathog](#), 2008, 4: e1000233
- 54 Mian M F, Lauzon N M, Andrews D W, et al. FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. [Mol Ther](#), 2010, 18: 1379–1388
- 55 Abdul-Careem M F, Firoz Mian M, Gillgrass A E, et al. FimH, a TLR4 ligand, induces innate antiviral responses in the lung leading to protection against lethal influenza infection in mice. [Antiviral Res](#), 2011, 92: 346–355