

粉尘螨Ⅲ类重组变应原对哮喘小鼠免疫治疗的效果

李娜¹, 姜玉新², 刁吉东¹, 赵蓓蓓¹, 李朝品^{1*}

【摘要】 目的 探讨粉尘螨Ⅲ类重组变应原 (rDer f 3) 对过敏性哮喘小鼠的免疫治疗效果。方法 随机将 40 只 BALB/c 小鼠均分为 4 组, 哮喘组、免疫治疗组、卵清蛋白 (OVA) 组和 PBS 组, 分别在第 0、第 7 和第 14 天哮喘组和免疫治疗组每鼠经腹腔注射 100 μ l 致敏液 (含 rDer f 3 10 μ g); 卵清蛋白组每鼠经腹腔注射 100 μ l 致敏液 (含 OVA 10 μ g); PBS 组则以 PBS 代替致敏液。第 21 天起, 哮喘组和免疫治疗组小鼠用 rDer f 3 进行滴鼻激发试验, 连续 7 d, 免疫治疗组小鼠在第 25~27 天滴鼻激发前 30 min, 用 100 μ g rDer f 3 纯化蛋白皮下注射进行特异性免疫治疗。PBS 组和卵清蛋白组则分别用 PBS 和 OVA 进行滴鼻激发和腹腔注射, 最后 1 次滴鼻激发 24 h 后脱臼处死小鼠。收集各组小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 进行白细胞和嗜酸粒细胞计数; 对肺组织病理切片进行 HE 染色, 镜下观察肺组织炎症细胞浸润情况。ELISA 检测 BALF 和脾细胞培养上清 (SSCS) 中白细胞介素-5 (IL-5) 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 及血清中变应原特异性 IgE、IgG_{2a} 抗体水平。结果 肺组织病理切片结果显示, 免疫治疗组小鼠炎症反应明显减轻。小鼠 BALF 中白细胞总数在免疫治疗组、卵清蛋白组和哮喘组分别为 (7.03 \pm 1.38) \times 10⁸/ml、(22.11 \pm 3.70) \times 10⁸/ml 和 (22.75 \pm 3.24) \times 10⁸/ml, 免疫治疗组低于卵清蛋白组和哮喘组 (P <0.01), 嗜酸粒细胞的变化趋势与白细胞类似。免疫治疗组、卵清蛋白组和哮喘组 BALF 中 IL-5 的水平分别为 (108.20 \pm 11.02) pg/ml、(182.04 \pm 13.94) pg/ml 和 (195.33 \pm 15.33) pg/ml, SSCS 中 IL-5 的水平分别为 (98.34 \pm 13.06) pg/ml、(208.26 \pm 10.63) pg/ml 和 (179.54 \pm 13.65) pg/ml, 免疫治疗组均明显低于卵清蛋白组和哮喘组 (P <0.01)。而 IFN- γ 含量则高于卵清蛋白组和哮喘组 (P <0.01)。IgE 水平免疫治疗组、卵清蛋白组和哮喘组分别为 (9.12 \pm 3.78) IU/ml、(26.87 \pm 4.30) IU/ml 和 (35.25 \pm 8.84) IU/ml, 与卵清蛋白组和哮喘组相比, 免疫治疗组明显降低 (P <0.01), 而 IgG_{2a} 水平 (38.52 \pm 6.33) μ g/ml 则显著升高 (P <0.01)。结论 粉尘螨Ⅲ类变应原可逆转哮喘小鼠的变态反应性气道及肺部炎症。

【关键词】 粉尘螨; Der f 3; 变应原; 哮喘; 免疫治疗

中图分类号: R384.4 文献标识码: A

Effect of Immunotherapy with Recombinant Allergen Group 3 from *Dermatophagoides farinae* in Asthma Mice

LI Na¹, JIANG Yu-xin², DIAO Ji-dong¹, ZHAO Bei-bei¹, LI Chao-pin^{1*}

(1 Department of Medical Parasitology, 2 Department of Physiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of specific immunotherapy with major 3 group recombinant allergen rDer f 3 of *Dermatophagoides farinae* in murine asthma model. **Methods** Forty BALB/c mice were randomly divided into 4 groups, namely PBS group (negative control), ovalbumin(OVA) group (positive control), rDer f 3 allergen sensitization group (asthma group), and rDer f 3 specific immunotherapy group(SIT group). The mice in asthma group and SIT group were injected intraperitoneally with purified rDer f 3 protein on days 0, 7 and 14, respectively, and rDer f 3 solution was inhaled from day 21 for 7 days. During the 25th–27th day, mice in SIT group were injected subcutaneously with 100 μ g rDer f 3 allergen for 30 min before nasal inhalation. Mice in groups of PBS and OVA were treated with PBS and OVA, respectively. Twenty-four hours after the final challenge, all mice were sacrificed, the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and the total number of white blood cells and the number of eosinophils were recorded. The levels of IL-5 and IFN- γ in BALF and supernatant of cultured splenocytes were detected by ELISA, as well as the serum levels of specific IgE and IgG_{2a} antibodies. Lung tissues were stained with haematoxylin and eosin for histological analysis. **Results** Compared with the asthma group, the rDer f 3-induced lung inflammation was significantly alleviated in SIT group. The total number of white blood cells [(7.03 \pm 1.38) \times 10⁸/ml] in SIT group was considerably lower than that of

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81270091, 30872367, 81172790); 安徽省自然科学基金 (No. 070413088)

作者单位: 皖南医学院, 1 寄生虫学教研室; 2 生理学教研室, 芜湖 241002

* 通讯作者, E-mail: cpli001@126.com

OVA group $[(22.11 \pm 3.70) \times 10^9/\text{ml}]$ and asthma group $[(22.75 \pm 3.24) \times 10^9/\text{ml}]$ ($P < 0.01$). The change trend of eosinophil leukocytes was similar with that of white blood cells. IL-5 levels in BALF $[(108.20 \pm 11.02) \text{ pg/ml}]$ and splenocyte culture supernatant $[(98.34 \pm 13.06) \text{ pg/ml}]$ in SIT group were significantly lower than that of OVA group $[(182.04 \pm 13.94) \text{ pg/ml}]$, (208.26 \pm 10.63) $\text{pg/ml}]$ and asthma group $[(195.33 \pm 15.33) \text{ pg/ml}]$, (179.54 \pm 13.65) $\text{pg/ml}]$ ($P < 0.01$). Whereas, the level of IFN- γ in BALF $[(107.98 \pm 12.64) \text{ pg/ml}]$ and supernatant of cultured splenocytes $[(105.51 \pm 11.62) \text{ pg/ml}]$ in SIT group was significantly higher than those of OVA group and asthma group ($P < 0.01$). Compared with OVA group $[(26.87 \pm 4.30) \text{ IU/ml}]$ and asthma group $[(35.25 \pm 8.84) \text{ IU/ml}]$, a lower level of allergen-specific IgE $[(9.12 \pm 3.78) \text{ IU/ml}]$ and higher level of allergen-specific IgG_{2a} $[(38.52 \pm 6.33) \mu\text{g/ml}]$ were observed in SIT group ($P < 0.01$). **Conclusion** rDer f 3 allergen can reverse allergen-induced airway and lung inflammation in murine asthma model.

[Key words] *Dermatophagoides farinae*; Der f 3; Allergen; Asthma; Specific allergen immunotherapy

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81270091, 30872367 and 81172790) and the Anhui Provincial Natural Science Fund (No. 070413088)

* Corresponding author, E-mail: cpli001@126.com

I型变态反应性疾病是当今世界的重要公共卫生问题,其总发病率高达10%~30%^[1,2]。过敏性哮喘属于I型变态反应,是临床上的常见病和多发病,其发病率呈逐年上升趋势。尘螨是最常见的吸入性变应原^[3],其中与人类变态反应性疾病关系最密切的主要有粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*)和屋尘螨(*D. pteronyssinus*)^[4,5],其分泌物、排泄物和尸体的降解产物均可引起人类变态反应性疾病^[6]。现已报道的尘螨变应原逾30种,其中最重要且研究最多的是I类和II类变应原,而对粉尘螨III类变应原(Der f 3)的研究尚浅。rDer f 3与过敏性哮喘患者血清IgE抗体的特异性结合率为16%~100%,且具有胰蛋白酶活性^[7]。本课题组前期以rDer f 3为致敏原成功诱导了小鼠产生过敏性哮喘^[8],本研究拟以rDer f 3为疫苗,治疗以该重组变应原致敏的过敏性哮喘小鼠模型,通过观察小鼠肺组织病理切片、支气管肺泡灌洗液(BALF)和脾细胞上清中白细胞介素-5(IL-5)和 γ 干扰素(IFN- γ)水平、血清中特异性IgE抗体和IgG_{2a}抗体水平,以及BALF中白细胞和嗜酸粒细胞计数等指标,评价其治疗效果,从而为后期进一步制备广谱、高效的粉尘螨抗原特异性疫苗提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 BALB/c雌性小鼠40只(SPF级),6~8周龄,体重18~22 g,购于扬州大学比较医学中心。

1.1.2 主要试剂 原核表达并纯化的rDer f 3由本实验室保存;小鼠变应原特异性IgE、IgG_{2a}抗体,IL-5和IFN- γ 等ELISA检测试剂盒购自美国R&D公司;鸡卵清蛋白(OVA) Grade V购自美国Sigma公司;刘氏染液(Liu's stain)购自珠海贝索生物技术公司;台盼

蓝购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 实验分组 40只BALB/c小鼠随机均分为4组,哮喘(Asthma)组、免疫治疗(SIT)组、卵清蛋白(OVA)组和PBS组,分别在第0、7和14天哮喘组和免疫治疗组小鼠经腹腔注射100 μl 致敏液(含rDer f 3 10 μg , Al(OH)₃ 2 mg,溶于PBS, pH 7.2),卵清蛋白组每鼠经腹腔注射100 μl 致敏液(含OVA 10 μg , Al(OH)₃ 2 mg,溶于PBS, pH 7.2),PBS组则以PBS代替致敏液。第21天起,哮喘组和免疫治疗组小鼠进行滴鼻激发试验(将10 $\mu\text{g/ml}$ rDer f 3蛋白溶液用PBS稀释,每天滴鼻10 min,连续滴鼻7 d),免疫治疗组小鼠在第25~27天滴鼻激发前30 min,用100 μg rDer f 3纯化蛋白皮下注射进行特异性免疫治疗。PBS组和OVA组分别用PBS和OVA进行滴鼻激发和皮下注射,最后一次滴鼻激发24 h后进行取材检测。

1.2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)的制备和检测 最后1次滴鼻激发后24 h内,各组小鼠均给予腹腔注射10%水合氯醛0.2~0.3 ml进行麻醉,仰卧固定,行气管插管,缓慢注入无菌预冷的PBS 1 ml进行支气管肺泡灌洗,按0.4 ml、0.3 ml、0.3 ml灌洗3次后,回收BALF,回收率>90%。4 $^{\circ}\text{C}$ 1 000 $\times g$ 离心10 min,收集细胞沉淀,用1 ml PBS进行重悬,调节细胞浓度至2 $\times 10^6/\text{ml}$;另取细胞悬液涂片,进行刘氏染色后,光镜下计数白细胞和嗜酸粒细胞数。ELISA检测上清中变应原特异性细胞因子IL-5和IFN- γ 的含量,在样品孔中依次加入待测样品血清(40 $\mu\text{l}/\text{孔}$)、抗-IL-2/IFN- γ 抗体(10 $\mu\text{l}/\text{孔}$)、链霉亲和素-HRP(50 $\mu\text{l}/\text{孔}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。用洗涤液洗板5次,避光显色10 min,最后加入终止液终止反应,测吸光度(A_{450})值。

1.2.3 血清中特异性IgE抗体和IgG_{2a}抗体测定 取各组小鼠眼球血,ELISA板样品孔中依次加入待测样品

血清 (40 μl/孔)、抗-IgE/IgG2a抗体 (10 μl/孔)、链霉亲和素-HRP (50 μl/孔), 37 °C 孵育 1 h。用洗涤液洗板 5 次, 避光显色 10 min, 最后加入终止液终止反应, 测 A₄₅₀ 值。

1.2.4 脾细胞培养上清 (SSCS) 中细胞因子检测 取血后将小鼠脱臼处死, 75% 酒精中浸泡 30 min 后, 无菌条件下分离小鼠脾脏, 用 300 目细胞筛过滤, PBS 平衡液重悬脾细胞, 红细胞裂解液 (EDTA-NH₄Cl) 裂解, 静置 10 min, 4 °C 1 000×g 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 RPMI-1640 完全培养液 (含 10% 胎牛血清、100 μg/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素) 重悬, 制成脾细胞悬液, 调整细胞密度至 5×10⁶/ml。然后用台盼蓝染色, 观察活细胞 >98% 者即可用于实验。取脾细胞悬液 1 ml 加入 96 孔板中, PBS 组、卵清蛋白组、哮喘组和免疫治疗组分别加入相应抗原溶液至终浓度为 25 μg/ml, 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱培养 72 h, 取上清, ELISA 检测变应原特异性细胞因子 IL-5 和 IFN-γ 的含量。

1.2.5 肺组织病理切片 HE 染色 取各组小鼠肺组织, 10% 甲醛溶液固定过夜, 石蜡包埋, 常规切片并进行 HE 染色, 镜下观察肺组织炎症细胞浸润情况。

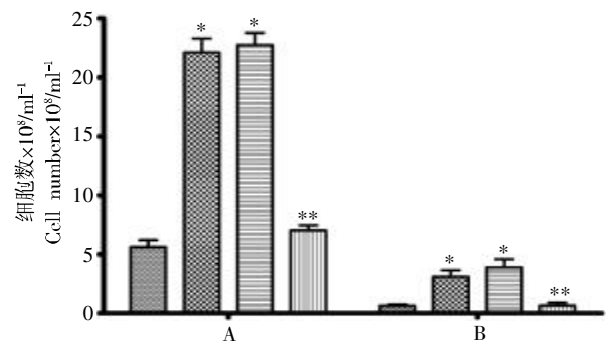
1.3 统计学分析 采用 SPSS16.0 统计学软件进行单因素方差分析, 统计数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 检验水平为 α=0.05。

2 结果

2.1 肺组织病理切片结果 肺组织切片经 HE 染色后, 哮喘组和卵清蛋白组小鼠支气管、血管黏膜下和周围肺部组织有明显的炎症细胞浸润, 以淋巴细胞、嗜酸粒细胞为主, 大量炎症细胞向血管和小支气管迁移, 肺泡和肺间质内也可见炎症细胞浸润; 支气管管壁增厚, 血管壁明显水肿; 支气管上皮细胞部分断裂及脱落, 偶见纤维化增生, 部分可见黏液栓 (图 1A、B)。而免疫治疗组小鼠炎症反应明显减轻, 气道、血管和

肺泡结构与 PBS 组相近, 基本无炎症细胞浸润现象 (图 1C、D)。

2.2 BALF 中细胞分类计数 对 BALF 中白细胞进行计数, 卵清蛋白组、哮喘组和免疫治疗组分别为 (22.11±3.70)×10⁸/ml、(22.75±3.24)×10⁸/ml 和 (7.03±1.38)×10⁸/ml, 与 PBS 组相比, 卵清蛋白组和哮喘组的白细胞总数显著增多 (P<0.01); 而免疫治疗组与 PBS 组相比, 差异无统计学意义 (P>0.05), 但明显低于卵清蛋白组和哮喘组 (P<0.01)。BALF 中嗜酸粒细胞的变化趋势与白细胞类似 (图 2)。

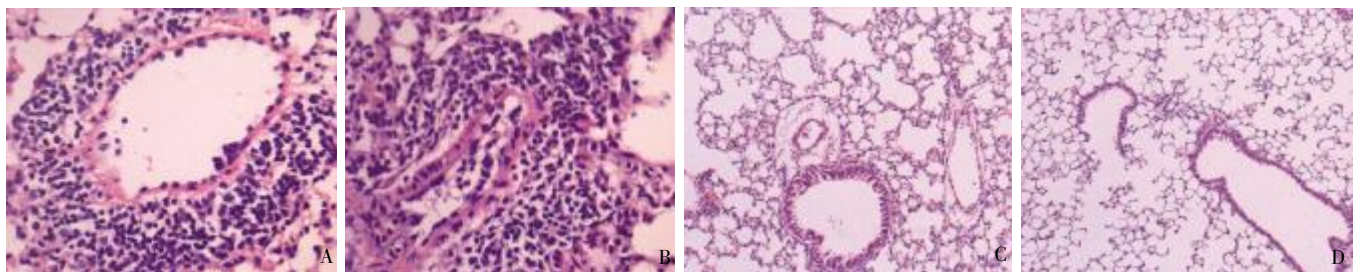


■ PBS 组 PBS group ■ 卵清蛋白组 OVA group
■ 哮喘组 Asthma group ■ 免疫治疗组 SIT group

注: * 与 PBS 组比较, P<0.01; ** 与卵清蛋白组和哮喘组比, P<0.01。
Note: * Compared with PBS group, P<0.01; ** Compared with OVA and Der f 3 groups, P<0.01.

图 2 各组支气管肺泡灌洗液中白细胞总数 (A) 和嗜酸粒细胞数 (B)
Fig. 2 The total number of white blood cells (A) and the number of eosinophils (B) in bronchoalveolar lavage fluid in all groups

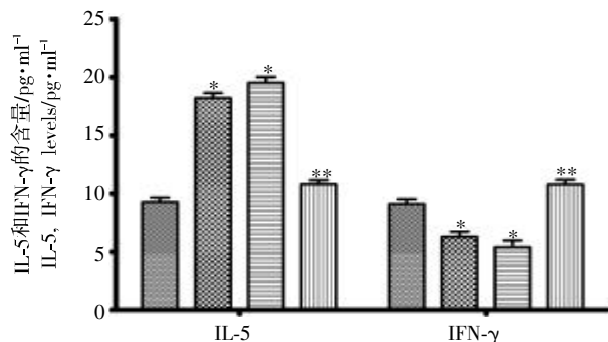
2.3 BALF 中特异性细胞因子 IL-5 和 IFN-γ 的含量 ELISA 检测结果显示, IL-5 水平卵清蛋白组、哮喘组和免疫治疗组分别为 (182.04 ± 13.94) pg/ml、(195.33 ± 15.33) pg/ml 和 (108.20 ± 11.02) pg/ml, 与 PBS 组相比, 卵清蛋白组和哮喘组明显升高 (P<0.01); 而免疫治疗组与 PBS 组相比, 差异无统计学意



A: 哮喘组, 大量炎性细胞浸润 (×400); B: 卵清蛋白组, 大量炎性细胞浸润 (×400); C: 免疫治疗组, 无炎性细胞浸润 (×100); D: PBS 组 (×100)。
A: Asthma group, abundant inflammatory cell infiltration (×400); B: OVA group, abundant inflammatory cell infiltration (×400); C: SIT group, no inflammatory cell infiltration (×100); D: PBS group (×100).

图 1 肺组织病理切片结果 (HE 染色)
Fig 1 Pathological change in lung tissues (HE staining)

义 ($P>0.05$), 但低于卵清蛋白组和哮喘组 ($P<0.01$)。BALF中IFN- γ 的变化趋势则与IL-5相反, 卵清蛋白组、哮喘组和免疫治疗组IL-5的水平分别为 (62.97 ± 14.08) pg/ml、(54.01 ± 17.99) pg/ml和 (107.98 ± 12.64) pg/ml, 与PBS组相比, 卵清蛋白组和哮喘组明显降低 ($P<0.01$); 而免疫治疗组与PBS组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但显著高于卵清蛋白组和哮喘组 ($P<0.01$) (图3)。



注: *与PBS组比较, $P<0.01$; **与卵清蛋白组和哮喘组相比, $P<0.01$ 。
Note: * Compared with PBS group, $P<0.01$; ** Compared with OVA and Der f 3 groups, $P<0.01$.

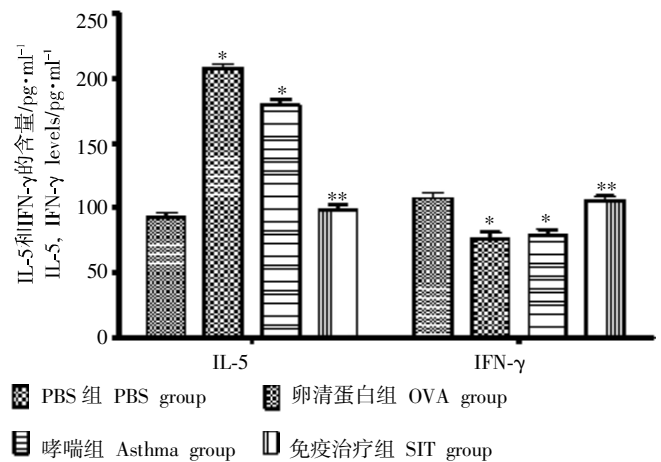
图3 BALF中IL-5和IFN- γ 的含量变化

Fig 3 Changes of IL-5 and IFN- γ levels in bronchoalveolar lavage fluid

2.4 脾细胞培养上清中细胞因子的含量变化 ELISA检测结果显示, 卵清蛋白组和哮喘组中IL-5的水平分别为 (208.26 ± 10.63) pg/ml和 (179.54 ± 13.65) pg/ml, 明显高于PBS组 ($P<0.01$); 而免疫治疗组的IL-5水平 [(98.34 ± 13.06) pg/ml] 显著低于与卵清蛋白组和哮喘组 ($P<0.01$), 但与PBS组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

卵清蛋白组和哮喘组脾细胞培养上清中IFN- γ 的水平分别为 (73.82 ± 17.61) pg/ml和 (78.84 ± 14.12) pg/ml, 明显低于PBS组 ($P<0.01$); 而免疫治疗组中的IFN- γ 水平 [(105.51 ± 11.62) pg/ml] 明显高于卵清蛋白组和哮喘组 ($P<0.01$), 但与PBS组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图4)。

2.5 血清中特异性IgE和IgG_{2a}抗体含量的变化 ELISA检测结果显示, 卵清蛋白组和哮喘组血清中的特异性IgE抗体水平分别为 (26.87 ± 4.30) IU/ml和 (35.25 ± 8.84) IU/ml, 明显高于PBS组 ($P<0.01$); 而免疫治疗组中IgE抗体水平 [(9.12 ± 3.78) IU/ml] 明显低于卵清蛋白组和哮喘组 ($P<0.01$), 但与PBS组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图5A)。



注: *与PBS组比较, $P<0.01$; **与卵清蛋白组和哮喘组相比, $P<0.01$ 。
Note: * Compared with PBS group, $P<0.01$; ** Compared with OVA and Der f 3 groups, $P<0.01$.

图4 小鼠脾细胞培养上清中IL-5和IFN- γ 的含量变化

Fig 4 Changes of IL-5 and IFN- γ levels in the supernatant of cultured splenocytes

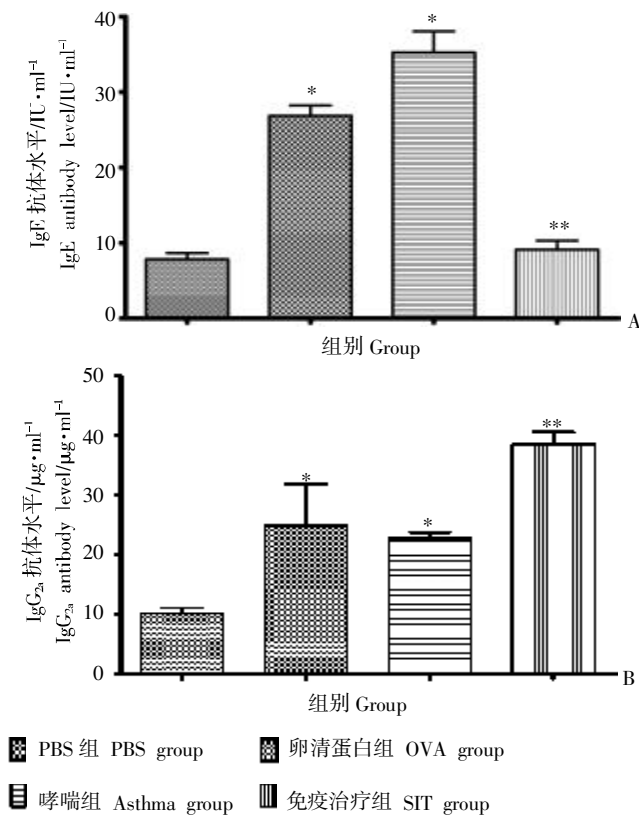
卵清蛋白组和哮喘组血清中特异性IgG_{2a}抗体水平分别为 (24.82 ± 6.94) μ g/ml和 (22.75 ± 2.99) μ g/ml, 明显高于PBS组 ($P<0.01$); 而免疫治疗组IgG_{2a}抗体水平 [(38.52 ± 6.33) μ g/ml] 显著升高 ($P<0.01$), 与PBS组、卵清蛋白组和哮喘组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$) (图5B)。

3 讨论

过敏性哮喘是一种以肺部嗜酸粒细胞浸润、黏液过度分泌和气道高反应性为特征的慢性气道炎症疾病^[9], 而粉尘螨变应原是最重要的诱发因素之一, 约80%的哮喘患者对粉尘螨过敏^[5]。其中粉尘螨Ⅲ类变应原 (Der f 3) 具有较强的变应原性, 可激活人体激肽释放酶-激肽系统, 引起外周血特异性IgE抗体水平升高^[10]。本课题组前期研究证实, 用粉尘螨Ⅲ类重组变应原 (rDer f 3) 为致敏源可成功诱发小鼠产生过敏性哮喘^[8], 说明其具有较强的变应原性。

目前认为, 哮喘的发病机制主要是由于Th0偏向Th2分化导致Th1/Th2失衡所致^[11]。Th1细胞主要分泌IFN- γ 和IL-2等细胞因子^[12], IFN- γ 在小鼠B淋巴细胞合成IgG_{2a}抗体过程中起着关键作用, 同时IFN- γ 能有效抑制IL-4诱导的IgE抗体产生^[13]; 而Th2细胞则主要分泌IL-4、IL-5和IL-13等细胞因子^[12]。

特异性免疫治疗 (SIT) 是目前唯一可改变变应性疾病进程的病因疗法^[14,15]。成功的特异性免疫治疗不仅能有效降低Th2型细胞因子 (如IL-5) 的水平, 也能诱导Th1型细胞因子的分泌水平增高^[16,17], 从而能有效地调节免疫应答和降低变态反应。特异性免疫



注: * 与PBS组比较, $P < 0.01$; ** 与PBS组、卵清蛋白组和哮喘组相比, $P < 0.01$ 。

Note: * Compared with PBS group, $P < 0.01$; ** Compared with PBS, OVA and Der f 3 groups, $P < 0.01$.

图5 血清中特异性IgE和IgG_{2a}抗体水平变化

Fig 5 Changes of the serum levels of IgE and IgG_{2a} antibodies

治疗的临床疗效证实, 其不仅可降低变应性致敏, 也可降低治疗后哮喘的发病率^[18-24]。

本研究发现, 哮喘组小鼠的IFN- γ 表达降低而IL-5等细胞因子产生增高, 而免疫治疗组小鼠IFN- γ 的表达水平升高而IL-5则明显降低, 同时IgG_{2a}抗体水平增高, 而IgE抗体水平则降低, 说明rDer f 3在一定程度上可有效减轻小鼠螨性哮喘的肺部炎症和哮喘症状, 并能有效调节过敏性炎症中的Th1/Th2平衡, 抑制IgE抗体生成, 为临床过敏性疾病的疫苗制备奠定一定的理论基础。

参 考 文 献

[1] Ferreira F, Wallner M, Breiteneder H, *et al.* Genetic engineering of allergens: future therapeutic products [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 128(3): 171-178.
 [2] 张豪, 郑小英, 詹希美. 尘螨主要重组变应原的研究现状[J]. *国际医学寄生虫病杂志*, 2006, 33(4): 215-220.
 [3] Yasue M, Yokota T, Yuasa M, *et al.* Effects of oral hyposensitization with recombinant Der f 2 on immediate airway constriction in a murine allergic model[J]. *Eur Respir*, 1998, 11(1): 144-150.
 [4] Arlian LG. House-dust-mite allergens: a review [J]. *Exp Appl Ac-*

rol, 1991, 10: 167-186.
 [5] Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, *et al.* Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, 89: 1046-1060.
 [6] 李盟, 包莹, 刘志刚. 粉尘螨2型变应原抗原定位的研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2007, 25(1): 49-52.
 [7] 蔡成郁, 白羽, 刘志刚, 等. 粉尘螨Ⅲ类变应原基因的克隆、表达、纯化与变应原性鉴定 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2007, 25(1): 22-26.
 [8] 唐小牛, 马红丹, 姜玉新, 等. 粉尘螨Ⅲ类重组变应原致敏的小鼠哮喘模型致敏效果分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(9): 880-884.
 [9] Vargas MH, Diaz-Mejia GS, Furuya ME, *et al.* Trends of asthma in Mexico: an 11 year analysis in a nationwide institution [J]. *Chest*, 2004, 125(6): 1993-1997.
 [10] Thomas W R, Smith W A, Hales BJ, *et al.* Characterization and immunobiology of house dust mite allergens [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 129(1): 1-18.
 [11] Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: Re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 Cells and IL-17 [J]. *J Dent Res*, 2008, 87(9): 817-828.
 [12] 赵金红, 王海宁, 姜玉新, 等. 重组Der f 1变应原诱导小鼠哮喘模型的建立 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2011, 32(20): 3257-3259.
 [13] Elkord E. Role of regulatory T cells in allergy: implications for therapeutic strategy [J]. *Inflam Allergy Drug Targets*, 2006, 5(4): 211-217.
 [14] Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(4): 780-789.
 [15] Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(10): 761-771.
 [16] Ebner C, Siemann U, Bohle B. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative response to allergen and shift from Th2 to Th1 in T cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen [J]. *Clin Exp Allergy*, 1997, 27(9): 1007-1015.
 [17] Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, *et al.* Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4⁺T cells from allergic individuals[J]. *J Exp Med*, 1993, 178(6): 2123-2130.
 [18] Mueller GA, Smith AM, Chapman MD, *et al.* Hydrogen exchange nuclear magnetic resonance spectroscopy mapping of antibody, epitopes on the house dust mite allergen Der f 2 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 9359-9365.
 [19] Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA, *et al.* Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study)[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109(2): 251-256.
 [20] Shim JY, Kim BS, Cho SH, *et al.* Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin E-mediated basophil histamine releasability [J]. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33(1): 52-57.
 [21] Tazaki T, Minoguchi K, Yokoe T, *et al.* Allergen rush immunotherapy increases interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta2 chain expression in patients with allergic asthma [J]. *Cell Immunol*, 2004, 228(1): 20-26.
 [22] Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25⁺ T cells by grass pollen immunotherapy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(6): 1255-1261.
 [23] 邢道荣, 温廷桓, 余扬林, 等. 荨麻疹与螨性过敏的关系及粉尘螨注射液免疫治疗 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2008, 26(6): 422-427.
 [24] 温廷桓. 上海粉尘螨变应原及特异性免疫治疗[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2009, 27(5): 419-425.

(收稿日期: 2014-05-13 编辑: 衣凤芸)