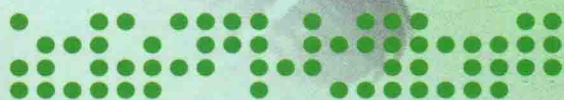


国家自然科学基金 (31402257, 30871783)

海南省重点研发计划 (ZDYF2017110)

海南省自然科学基金 (20153084)



DNA疫苗和蛋白疫苗共免疫 防治猫过敏症及其作用机理研究

◎ 裴业春 著

10

20

30

40

50

60

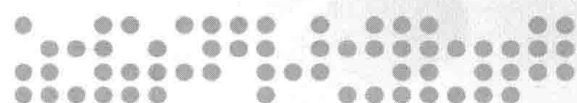


中国农业科学技术出版社

国家自然科学基金 (31402257, 30871783)

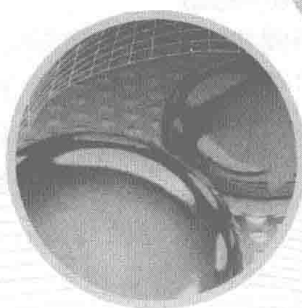
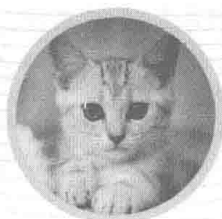
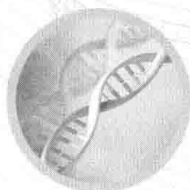
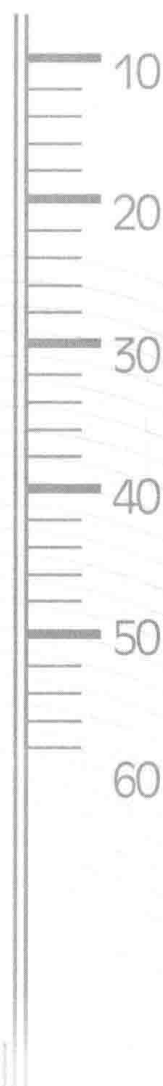
海南省重点研发计划 (ZDYF2017110)

海南省自然科学基金 (20153084)



DNA疫苗和蛋白疫苗共免疫 防治猫过敏症及其作用机理研究

◎ 裴业春 著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

DNA 疫苗和蛋白疫苗共免疫防治猫过敏症及其作用机理研究 / 裴业春著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2017. 8

ISBN 978-7-5116-3197-8

I. ①D… II. ①裴… III. ①猫病-变态反应病-免疫法-预防接种-研究
IV. ①S858.293

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 181419 号

责任编辑 王更新 李 华

责任校对 李向荣

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82106664(编辑室) (010)82109702(发行部)

(010)82109709(读者服务部)

传 真 (010)82106631

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 全国各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 710 mm×1 000 mm 1/16

印 张 8 彩插 12 面

字 数 155 千字

版 次 2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 次印刷

定 价 68.00 元

▶ 版权所有·翻印必究 ◀

前 言

猫性情温顺，已经成为最重要的家庭宠物之一。然而，猫会诱发相当部分的养猫者患上过敏症，症状包括打喷嚏、眼睛发痒、嗓子异常和皮肤红肿等，甚至诱发过敏性鼻炎和哮喘，令许多爱猫人士苦恼不已。本人从攻读博士学位期间开始，一直致力于过敏性疾病的防治研究。DNA 疫苗被称为继传统疫苗及基因工程亚单位疫苗之后的“第三代疫苗”，是当今疫苗研究的热点。该研究利用 DNA 疫苗和蛋白疫苗共免疫，诱导调节性 T 细胞的产生，发挥免疫耐受功能，从而抑制猫过敏症的发生。

本书是在多年课题研究基础上总结撰写而成，全部由本人撰写完成。本书共分为 9 章：第 1 章猫变应原 Fel d 1，主要介绍猫过敏症发生概述与猫主要变应原 Fel d 1；第 2 章 DNA 疫苗，主要介绍 DNA 疫苗的作用机制、优缺点及其应用等；第 3 章调节性 T 细胞，主要介绍调节性 T 细胞的分类及其在过敏反应中的应用情况；第 4 章至第 7 章，重点讲述 DNA 疫苗及其编码的蛋白疫苗共免疫抑制猫过敏症的过程及其机理；第 8 章主要介绍乙肝病毒核心抗原 HBcAg 与猫主要变应原 Fel d 1 融合表达的相关研究；第 9 章总结与展望。

本书涉及的相关课题研究是在中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室安晓荣研究员的课题组和海南大学热带农林学院生物技术与分子药理学实验室完成的，也受到了原中国农业大学生物学院王宾教授（现工作单位为复旦大学上海医学院）课题组的大力支持。回想起该研究的完成过程和课题组老师、学生们的通力协作与帮助，感激之情难以言表。在本书付梓之时，特向在研究过程中给予无私帮助的人们深深鞠躬致敬！在本书的撰写过程中，得到了中国农业大学生物学院陈永福教授、安晓荣研究员、侯健教授、闫凤祥老师、关宏老师的悉心指导，海南大学热带农林学院动物科技学院王凤阳教授、杨雨辉教授对本书章节的构思提出了许多宝贵的建议，在此表示深深的感谢！

在本书涉及的课题研究和撰写过程中，引用了众多参考文献的作者们做出的卓越成果，并且得到了国家自然科学基金（31402257，30871783）、海南省重点研发计划项目（ZDYF2017110）和海南省自然科学基金（20153084）等项目的

大力资助。本书的出版一方面是表达对从事疫苗研究诸多专家的敬意，另一方面是希望自己能对已有的研究做一个梳理与总结，以更大的热情投身到疫苗研究与过敏性疾病的防治研究中。

由于时间和水平有限，书中难免存在疏漏之处，恳请读者批评指正！

裴业春

于海南大学东坡湖畔

2017 年 6 月

目 录

1 猫变应原 Fel d 1	(1)
1.1 猫过敏症的概述	(1)
1.2 变应原 Fel d 1 蛋白的发现和分布	(2)
1.3 Fel d 1 的基因结构特点	(3)
1.4 Fel d 1 蛋白结构的研究	(4)
1.5 Fel d 1 与猫过敏症的诊断	(5)
1.6 Fel d 1 的变应原性	(6)
1.7 环境中 Fel d 1 蛋白的传播性	(6)
1.8 本章小结	(7)
参考文献	(8)
2 DNA 疫苗	(15)
2.1 DNA 疫苗的定义	(15)
2.2 DNA 疫苗的发展简史	(15)
2.3 DNA 疫苗的设计	(16)
2.4 DNA 疫苗的作用机理	(17)
2.5 DNA 疫苗优缺点	(18)
2.6 DNA 疫苗改进方案	(19)
2.7 DNA 疫苗的应用	(21)
2.8 本章小结	(25)
参考文献	(27)
3 调节性 T 细胞	(32)
3.1 调节性 T 细胞的分类	(32)
3.2 Foxp3 对 Treg 的作用	(35)
3.3 Treg 的分化	(36)
3.4 Treg 细胞维持体内免疫系统平衡的作用机理	(39)
3.5 Treg 细胞与过敏症	(42)
3.6 本章小结	(43)

参考文献	(44)
4 猫 Fel d 1-DNA 疫苗与蛋白疫苗的制备	(62)
4.1 材料与方法	(62)
4.2 结果与分析	(67)
4.3 讨论	(70)
4.4 本章小结	(70)
参考文献	(71)
5 DNA/蛋白疫苗共免疫法预防与治疗 rFel d 1 诱发的过敏小鼠模型	(72)
5.1 材料与方法	(72)
5.2 结果与分析	(76)
5.3 讨论	(79)
5.4 本章小结	(80)
参考文献	(80)
6 DNA/蛋白疫苗共免疫法预防与治疗 nFel d 1 诱发的过敏小鼠模型	(82)
6.1 材料与方法	(82)
6.2 结果与分析	(86)
6.3 讨论	(90)
6.4 本章小结	(91)
参考文献	(91)
7 DNA/蛋白疫苗共免疫抑制 Fel d 1 过敏反应的机理	(93)
7.1 材料与方法	(93)
7.2 结果与分析	(98)
7.3 讨论	(103)
7.4 本章小结	(105)
参考文献	(105)
8 猫重组变应原 Fel d 1 与乙肝病毒核心抗原融合基因的原核表达	(108)
8.1 材料与方法	(108)
8.2 结果与分析	(111)
8.3 讨论	(113)
8.4 本章小结	(114)
参考文献	(114)
9 总结与展望	(118)
9.1 总结	(118)
9.2 展望	(119)

1 猫变应原 Fel d 1

猫在分类上属于脊索动物门脊椎动物亚门哺乳动物纲食肉目猫科猫属。猫行动敏捷，性情温顺，聪明活泼，通晓人性。猫作为家庭宠物已经有长久的历史，尤其是在西方国家更为普遍。在法国，约有 1/2 的家庭饲养宠物，而这其中约有 1/4 的家庭以猫为宠物。然而，猫有时会诱发养猫者患上过敏症。猫过敏症的症状包括打喷嚏、眼睛发痒、嗓子异样和皮肤红肿等，甚至诱发过敏性鼻炎和哮喘。在美国，约有 10% 的人对猫过敏^[1]，有 20%~30% 的哮喘患者对猫的过敏原呈皮试阳性反应^[2,3]。近年来越来越多的研究表明，主要的变应原是猫体内的一种变应原蛋白，被命名为猫变应原 1（cat allergen 1，又名 *Felis domesticus* allergen 1，Fel d 1）。因此，对于 Fel d 1 的深入了解必将为猫过敏症防治的研究提供理论依据。

1.1 猫过敏症的概述

猫是最为常见的家庭宠物之一。2012 年，美国兽医医学协会（AVMA）发布报告称，30.4% 的美国家庭拥有 7 400 万只宠物猫。在中国，拥有宠物猫的人群也逐渐壮大。然而，猫给人们带来了过敏的困扰。猫过敏症十分普遍，对美国 3 431 例 7~8 岁患过敏性疾病的儿童的研究发现，湿疹、鼻炎、哮喘患儿对猫过敏的比例分别为 29%、49% 和 40%^[4]；而对广州地区 183 例患支气管哮喘和变应原鼻炎的儿童调查发现，约有 34.4% 的患儿呈猫毛变应原阳性^[5]。猫变应原能够引起严重的过敏反应，包括皮肤红、肿、痒，眼睛发痒流泪，鼻塞、鼻痒，咳嗽、气喘、打喷嚏、慢性咽喉炎或喉痒，甚至诱发哮喘等^[6,7]。遗传性过敏性哮喘患者在高浓度变应原的环境中会引发更严重的过敏反应^[8-11]。

研究已经证实猫体内的 Fel d 1 变应原是诱发过敏的罪魁祸首。研究表明，空气中低于 100ng/m³ 的 Fel d 1 便足以引起鼻子和支气管的过敏症状，严重影响肺部功能。一般认为，引起过敏的猫变应原浓度为 1~8μg/g 尘埃^[12,13]。可见，即便是低量 Fel d 1 的存在也能够引起猫过敏症患者的过敏反应，威胁到患者的

健康甚至生命。目前,临床上对猫过敏症的治疗主要采用抗组胺药、减充血剂或者其他一些药物。但是这些药物只能缓解过敏症状,并不能从机体免疫系统角度去抑制过敏反应。因此,如何更加有效地预防和治疗猫过敏症具有十分重要的现实意义和临床应用价值。

1.2 变应原 Fel d 1 蛋白的发现和分布

1974 年, Ohman 等将猫的毛皮提取物在 7% 丙烯酰胺凝胶中分离,发现有一种分子量介于 30 000~60 000 道尔顿的酸性蛋白具有前清蛋白的流动性,并将该蛋白命名为 cat allergen 1, 又名 *Felis domesticus* allergen 1, 即 Fel d 1^[14]。Ohman 等还最先对 Fel d 1 蛋白的分布进行了研究。他们利用了放射免疫吸附技术对猫的 13 种组织进行了分析,结果发现猫的毛皮组织、脑组织和腮腺组织提取物能引起比较强烈的过敏反应。之后,关于 Fel d 1 的研究报道逐渐增多。1978 年, Ohman 等统计了在马萨诸塞州总医院过敏诊所就诊过哮喘、鼻炎的 300 名患者,发现有 68 例患者接触过猫^[15]。1981 年, Anderson 等通过放射免疫扩散试验和双向放射免疫电泳证实唾液腺是 Fel d 1 蛋白的合成部位之一^[16]。1984 年, Brown 等以一只雄猫和一只雌猫为研究对象研究了 Fel d 1 的组织分布,指出唾液腺是 Fel d 1 的合成部位,而毛皮则是 Fel d 1 的存储部位。另外,雌猫较雄猫而言,其毛皮中 Fel d 1 蛋白数量更多^[17]。1985 年, Anderson 等又指出皮脂腺仅是 Fel d 1 蛋白的合成部位之一^[18]。之后的研究者做了进一步的研究,发现 Fel d 1 蛋白的最主要来源包括皮脂腺、唾液腺、肛周腺、皮肤和毛发等^[19~22]。1990 年, Wentz 等扩大了研究样本,对 4 只雄猫和 8 只雌猫分别收集了单位皮肤面积上的 Fel d 1 并进行测定,发现雄猫中的 Fel d 1 约为雌猫的 1.6 倍^[23]。这一结果与之前 Brown 等得到的结论存在部分差异。随后 Lanteaume 等的研究得到了与 Wentz 等类似的结论。Lanteaume 研究组对 10 只年龄为 1.5~2 岁的家猫进行研究(其中雌雄猫各 5 只),发现 Fel d 1 在雄猫的皮肤和毛皮中的分布数量明显高于在雌猫中的分布^[24]。Dabrowski 等对正常雄猫和阉割后的雄猫进行了比较,发现雄猫阉割后 Fel d 1 蛋白数量明显下降,而雌猫阉割后 Fel d 1 的合成不会受到影响^[25]。这暗示了在雄猫中 Fel d 1 的合成受到雄性激素的调节。后来的一些研究也表明,皮脂腺分泌皮脂受到雄性激素的调节,阉割的雄猫的皮脂和 Fel d 1 都显著下降,而对其注射睾丸激素后能逆转这一现象^[26,27]。

1.3 Fel d 1 的基因结构特点

研究表明, Fel d 1 蛋白在猫的皮毛、唾液腺等部位广泛表达, 其分子量为 39kDa, 由 5~6kDa 的 chain 1 和 16kDa 的 chain 2 两个蛋白亚基组成^[28,29]。如图 1-1 所示, chain 1 蛋白亚基分为 chain 1A 和 chain 1B 两种形式, 其编码基因含有 4 个外显子。其中, chain 1A 由外显子 2、3、4 编码, 在唾液腺和皮毛中均有表达; chain 1B 由外显子 1、3、4 编码。如图 1-2 所示, chain 2 蛋白亚基也以两种形式存在, chain 2L 和 chain 2S, 其编码基因含有 3 个外显子。chain 2L 由 92 个氨基酸残基组成, 优先在猫的唾液腺中表达; chain 2S 由 90 个氨基酸残基组成, 优先在猫的皮毛等部位表达^[30]。

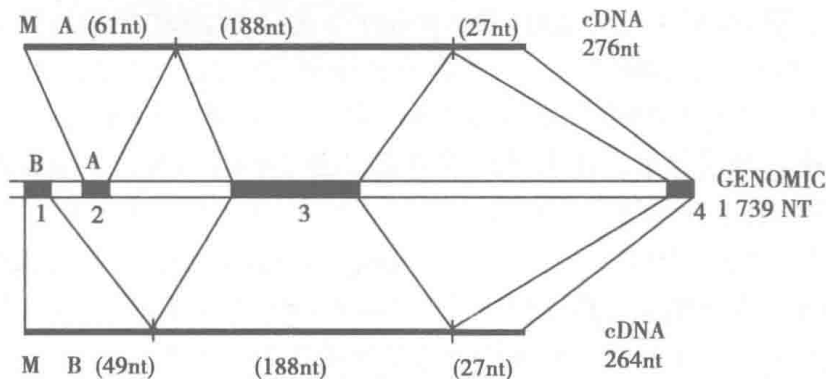


图 1-1 chain 1 基因的外显子与内含子的结构^[30]

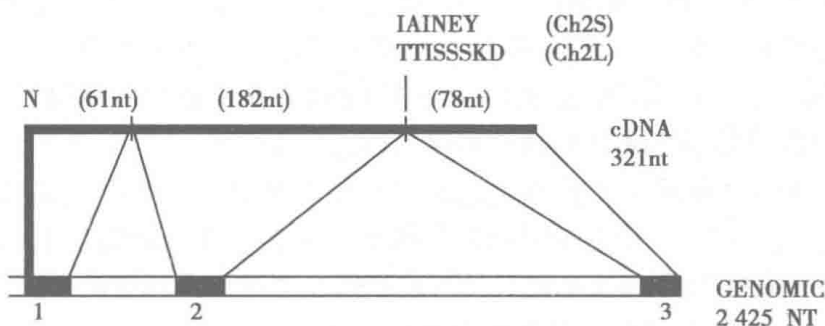


图 1-2 chain 2 基因的外显子与内含子的结构^[30]

1.4 Fel d 1 蛋白结构的研究

1992 年, Van Milligen 等发现了在上皮细胞提取物和家居灰尘提取物中均含有 Fel d 1 蛋白 35kDa 的四聚物、17kDa 的二聚体以及分离状态下的 chain 1 和 chain 2 亚基^[31]。虽然 Fel d 1 的结构特点基本清楚, 但其生理功能和作用仍不清楚。为了研究 Fel d 1 结构和功能之间的关系, 科学家们开始尝试体外表达重组 Fel d 1 蛋白。2000 年, P C Ring 等纯化出 18kDa 的 Fel d 1 蛋白亚基并研究了该亚基的酶活性, 发现该亚基能使胶原蛋白退化变性, 且能裂解血浆纤维结合蛋白 A 链 20kDa 的片段。利用半胱氨酸肽酶、基质金属蛋白酶或者二价阳离子去除剂等方法均不能抑制 Fel d 1 蛋白亚基的催化活性。这表明 Fel d 1 的致过敏性可能与其催化活性相关^[32]。2003 年, Kaiser 等发现 Fel d 1 蛋白与人子宫珠蛋白的结构十分相似 (彩插图 1-1), 尽管两者序列的同源性仅为 20%^[33], 这表明 Fel d 1 属于分泌型球蛋白 (secretoglobin) 家族^[34]。同年, Grönlund 等将 chain 2 和 chain 1 序列拼接起来, 在大肠杆菌中表达出 chain 2-chain 1 融合蛋白, 并发现该融合蛋白的生物化学和免疫学特性与天然 Fel d 1 蛋白很类似^[35]。2005 年, 该实验室又在大肠杆菌中表达出 chain 1-chain 2 拼接的重组蛋白, 该重组蛋白也与天然 Fel d 1 具有相似的免疫特性^[36]。Fel d 1 的 chain 1 和 chain 2 拼接示意图如图 1-3 所示^[36]。虽然大肠杆菌中表达的重组蛋白与天然 Fel d 1 蛋白类似, 但大肠杆菌中表达的重组蛋白并不能进行糖基化修饰, 而 Fel d 1 恰恰是糖基化蛋白。2005 年, Seppälä 等利用杆状病毒表达载体系统表达出完整的 Fel d 1 重组蛋白, 该重组蛋白具有糖基化修饰, 且结构上与天然的 Fel d 1 蛋白基本一致^[37]。Seppälä 等还分析了 Fel d 1 重组蛋白二硫键的位置分别是 $\alpha 70-\beta 7$ 、 $\alpha 44-\beta 48$ 和 $\alpha 3-\beta 73$ 。2007 年, Kaiser 等表达出 Fel d 1 (1+2) 重组蛋白, 得到了 1.6Å 分辨率的 Fel d 1 四聚体的晶体, 并对该晶体结构进行了分析^[38]。有趣的是, 四聚体 Fel d 1 的晶体结构揭示了两种不同的钙离子结合位点。其中, 外部的两个钙离子结合位点对称分布在 Fel d 1 蛋白的外侧, 与子宫珠蛋白上假定的钙离子结合位点相对应^[39]。第二个钙离子结合位点位于两个亚基的内聚接口, 起到稳定 Fel d 1 四聚体的作用, 并且能引起亚基构象的变化, 形成两个亲水性空腔。钙离子在 Fel d 1 四聚体中的位置如彩插图 1-2 所示^[38]。根据 Fel d 1 四聚体的晶体结构特点, 作者推断^[38]: ①与子宫珠蛋白类似, 猫变应原 Fel d 1 可能也能够隔离磷脂酶 A2 的钙离子, 从而诱导血小板活化因子并导致过敏性反应的激活。② Fel d 1 晶体中空腔的作用可能是在形成四聚体时为构象重排提供空间支持。

2008 年, Wünschmann S 等^[40]在毕赤酵母中表达了 Fel d 1 重组蛋白混合物, 包含了糖化和非糖化异二聚体和四聚体。将重组 Fel d 1 蛋白的 N-糖基序 (N103) 中断, 从而消除 Fel d 1 的糖基化。无论结构上还是免疫原性, 去糖基化的 Fel d 1 重组蛋白与天然 Fel d 1 蛋白都十分相似。这种改进后的去糖基化 Fel d 1 重组蛋白将有益于变应原的标准化, 以发展改善猫过敏症的诊断和治疗方法。

Fel d 1 蛋白结构解析的日渐清楚为临床上改进猫变应原免疫治疗提供了可能性, 对生理学上研究 Fel d 1 的功能提供支持。

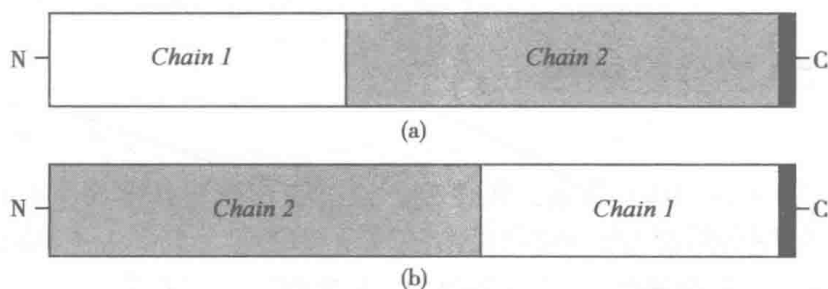


图 1-3 Fel d 1 的 chain 1 和 chain 2 拼接示意图^[36]

1.5 Fel d 1 与猫过敏症的诊断

哺乳动物变应原基本为脂质转运蛋白, 猫变应原是唯——种属于子宫珠蛋白样蛋白的变应原^[33]。目前利用猫天然毛皮提取物作为诊断猫过敏症的技术已被成熟应用。由于这些提取物中含有多种致敏性及非致敏性的成分而难于标准化。在猫毛皮提取物中现已鉴定出 6 种变应原性分子, 包括 Fel d 1^[14]、Fel d 2^[41,42]、Fel d 3^[43]、Fel d 4^[44]、Fel d 5^[45]和 Fel d 6^[45]。其中 80%~95%猫过敏症患者体内含有 Fel d 1 特异的 IgE 抗体^[46-48], 占猫变应原诱导的 IgE 抗体的 60%^[49]。

以 Fel d 1 代替猫毛皮提取物对猫过敏症进行诊断的可行性正在被越来越多的学者所关注。Ohman 和 Lowell 发现 65%的猫过敏症患者可被 Fel d 1 致敏^[47]。Van Ree 及同事调查了 509 例猫过敏症患者, 其中 96%患者的血清可与不完全重新折叠的 Fel d 1 双链混合物发生相互作用, 并且在能够与猫变应原发生相互作用的 IgE 中有 88%可与 Fel d 1 作用^[46]。Ichikawa 等在对日本地区猫过敏性哮喘病人血清中猫毛皮提取物特异的 IgE 反应进行评价时发现, 95%的患者血清含有 Fel d 1 特异的 IgE^[43]。因此, Fel d 1 适合作为猫过敏反应的标志物。

Grönlund 等对抗体与适当折叠的重组 Fel d 1 (recombinant Fel d 1, rFel d 1)

之间的相互作用进行了评估^[48]。他们以瑞典和澳大利亚地区 140 名患有猫过敏性哮喘的儿童及成人的血清作为样本,利用变应原检测系统 ImmunoCAP 分别检测了血清中 IgE 和 IgG4 与猫毛皮提取物和 rFel d 1 的反应性,结果发现 95.6% 的儿童及 94.4% 的成人血清中的 IgE 可与 rFel d 1 发生相互作用,与猫毛皮提取物作用结果极为相近,同时也检测到 IgG4 与 rFel d 1 的相互作用。因此,适当折叠的 Fel d 1 在体外诊断猫过敏症中的灵敏性与可行性得到了证实,它与其他猫变应原的联合应用必将提高猫过敏症的诊断及治疗效率。

1.6 Fel d 1 的变应原性

根据 Fel d 1 的 cDNA 及基因组序列,通过蛋白重组技术将 Fel d 1 蛋白与 IgG 及 IgE 抗体相连接的融合蛋白可由抗原呈递细胞 (Antigen-presenting cells, APCs) 识别,重组的 Fel d 1 蛋白通过 CD64 被定位于 APCs 上。

最初的研究认为, Fel d 1 的 T 细胞抗原决定簇位于其 *chain 1* 上^[50,51]。而 Amanda J 等将 Fel d 1 的 T 细胞表面抗原决定簇定位于其 *chain 2* 上, Fel d 1 的 *chain 2* 可有效诱导白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 和干扰素- γ (interferon-gama, IFN- γ) 的表达^[52]。IL-10 可调节 T 细胞与 *chain 2* N-端的反应,选择性地提高 IgG4 的水平而抑制 IgE 水平^[53,54],同时来自 Fel d 1 的 T 细胞多肽能够诱导小鼠体内 T 细胞耐受^[55]。

Fel d 1 可引起过敏性哮喘,然而二者之间的关系并非如此简单。早期接触过猫变应原的儿童在猫变应原蛋白引起的过敏症中,其过敏反应的症状较未接触过猫变应原的儿童更轻^[56-59],并且接触过高剂量猫变应原的儿童对猫过敏的风险也会显著降低^[60]。一种解释认为高剂量的变应原能够诱导机体产生大量的 IgG 和 IgG4 抗体反应,从而避免过敏及过敏性哮喘的风险。这一改进的 T 辅助细胞 (T helper cell, Th) 2 型反应被认为是诱导耐受的一种形式。以上结果均已由 Custovic 等证实^[61-63],并认为低剂量和高剂量的变应原作用都能够保护机体免于发生过敏症,只有中等剂量 Fel d 1 的作用才会增加过敏的风险。

1.7 环境中 Fel d 1 蛋白的传播性

Fel d 1 广泛存在于空气中,其空气传播的动力学研究有利于深入了解 Fel d 1 的致敏方式,设计适当的方法避免患者与变应原接触。研究表明,约有

75%的 Fel d 1 由直径约为 $10\mu\text{m}$ 或更大的颗粒携带, 25%由直径小于 $5\mu\text{m}$ 的颗粒携带。这些携带着 Fel d 1 的颗粒质量很轻, 使得变应原可以在室内空气中长时间的滞留^[64]。许多数据表明, 尘埃中猫变应原的水平在 $\leq 1\mu\text{g/g}$ 至 $\geq 3000\mu\text{g/g}$ 的范围内^[6,64]。即便是未饲养过猫的房间, 室内的猫变应原含量依旧很高, 同时携带有猫变应原的颗粒极易吸附在墙壁、衣物上, 便于变应原由室内传播到公众场合^[13,65-69]。与猫变应原的间接接触足以引起过敏反应, 并使过敏患者诱发哮喘。对于已被致敏的患者而言, 即便是低剂量的 Fel d 1 变应原都足以加重非特异性的支气管高反应性^[70]。

1.8 本章小结

猫行动敏捷, 性情温顺, 聪明活泼, 通晓人性, 是最受欢迎的家庭宠物之一。然而, 有很多爱猫人士对猫过敏, 其症状包括打喷嚏、眼睛发痒、嗓子异样和皮肤红肿等, 甚至诱发过敏性鼻炎和哮喘。越来越多的研究表明, 猫主要变应原是猫体内的一种变应原蛋白, Fel d 1 (*Felis domesticus* allergen 1, Fel d 1)。即使是低剂量 Fel d 1 的存在也能够引起猫过敏症患者的过敏反应, 威胁到患者的健康甚至生命。

研究表明, 唾液腺是 Fel d 1 的主要合成部位, 其他的合成部位包括皮脂腺和肛周腺等, 而毛皮则是 Fel d 1 的存储部位。不同性别、不同个体的猫体内 Fel d 1 的含量不同, 存在个体差异和性别差异。研究证实, 雄性猫的毛发中 Fel d 1 含量要高于雌性猫的毛发 Fel d 1 含量, 且 Fel d 1 的含量似乎受到了雄性激素的调控, 而不受雌性激素的调节。

Fel d 1 的基因结构特点包括: 由 5~6kDa 的 chain 1 和 16kDa 的 chain 2 两个蛋白亚基组成; chain 1 蛋白亚基分为 chain 1A 和 chain 1B 两种形式, 其编码基因含有 4 个外显子; chain 2 蛋白亚基也以两种形式存在, chain 2L 和 chain 2S, 其编码基因含有 3 个外显子。Kaiser 等发现 Fel d 1 蛋白与人子宫珠蛋白的序列同源性仅为 20%, 但是两者的结构十分相似, 这表明 Fel d 1 属于分泌型球蛋白 (secretoglobin) 家族。哺乳动物变应原基本为脂质转运蛋白, 猫变应原是唯一一种属于子宫珠蛋白样蛋白的变应原。

Fel d 1 广泛存在于空气中, 约有 75%的 Fel d 1 由直径约为 $10\mu\text{m}$ 或更大的颗粒携带, 25%由直径小于 $5\mu\text{m}$ 的颗粒携带。这些携带着 Fel d 1 的颗粒质量很轻, 使得变应原可以在室内空气中长时间的滞留。猫变应原的间接接触足以引起过敏反应, 并使过敏患者诱发哮喘。对于已被致敏的患者而言, 即便是低剂量的

Fel d 1 变应原都足以加重非特异性的支气管高反应性。

以 Fel d 1 代替猫毛皮提取物对猫过敏症进行诊断的可行性正在被越来越多的学者所关注。超过 90% 的猫过敏患者血清含有 Fel d 1 特异的 IgE, 因此, Fel d 1 适合作为猫过敏反应的标志物, 可以替代猫毛皮提取物。Grönlund 等对抗体与适当折叠的重组 Fel d 1 (recombinant Fel d 1, rFel d 1) 之间的相互作用进行了评估。他们以瑞典及澳大利亚地区 140 名患有猫过敏性哮喘的儿童及成人的血清作为样本, 结果发现 95.6% 的儿童及 94.4% 的成人血清中的 IgE 可与 rFel d 1 发生相互作用, 与猫毛皮提取物作用结果极为相近, 同时也检测到 IgG4 与 rFel d 1 的相互作用。这暗示着重组 Fel d 1 可以替代 Fel d 1 作为猫过敏反应的检测标志物。

参考文献

- [1] Freidhoff L R, Meyers D A, Marsh D G. A genetic-epidemiologic study of human immune responsiveness to allergens in an industrial population. II. The associations among skin sensitivity, total serum IgE, age, sex, and the reporting of allergies in a stratified random sample [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1984, 73 (4): 490-499.
- [2] Bryant D H, Burns M W. Skin-prick test reactions to inhalant allergens in asthmatic patients [J]. *Med J Aust*, 1976, 1 (24): 918-924.
- [3] Sarsfield J K, Boyle A G, Rowell E M, et al. Pet sensitivities in asthmatic children [J]. *Arch Dis Child*, 1976, 51 (3): 186-189.
- [4] Ronmark E, Perzanowski M, Platts-Mills T, et al. Different sensitization profile for asthma, rhinitis, and eczema among 7-8-year-old children: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden studies [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2003, 14 (2): 91-99.
- [5] 陈德晖, 孙宝清, 钟南山. 广州地区儿童呼吸道变态反应性疾病常见变应原的流行病学分析 [J]. *国际呼吸杂志*, 2009, 29 (7): 385-388.
- [6] Chapman M D, Wood R A. The role and remediation of animal allergens in allergic diseases [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 107 (3 Suppl): S414-421.
- [7] Platts Mills T A, Chapman M D. Dust mites: immunology, allergic dis-

- ease, and environmental control [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1987, 80 (6): 755-775.
- [8] Custovic A, Taggart S C, Francis H C, et al. Exposure to house dust mite allergens and the clinical activity of asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, 98 (1): 64-72.
- [9] Peat J K, Tovey E, Gray E J, et al. Asthma severity and morbidity in a population sample of Sydney schoolchildren: Part II -- Importance of house dust mite allergens [J]. *Aust N Z J Med*, 1994, 24 (3): 270-276.
- [10] Sporik R, Platts Mills T A, Cogswell J J. Exposure to house dust mite allergen of children admitted to hospital with asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 1993, 23 (9): 740-746.
- [11] Tunnicliffe W S, Fletcher T J, Hammond K, et al. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity [J]. *Eur Respir J*, 1999, 13 (3): 654-659.
- [12] Woodfolk J A, Luczynska C M, de Blay F, et al. Cat allergy [J]. *Ann Allergy*, 1992, 69 (4): 273-275.
- [13] Neal J S, Arlian L G, Morgan M S. Relationship among house-dust mites, Der 1, Fel d 1, and Can f 1 on clothing and automobile seats with respect to densities in houses [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2002, 88 (4): 410-415.
- [14] Ohman J L Jr, Lowell F C, Bloch K J. Allergens of mammalian origin. III. Properties of a major feline allergen [J]. *J Immunol*, 1974, 113 (6): 1 668-1 677.
- [15] Ohman J L. Allergy in man caused by exposure to mammals [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1978, 172 (12): 1 403-1 406.
- [16] Anderson M C, Baer H. Allergically active components of cat allergen extracts [J]. *J Immunol*, 1981, 127 (3): 972-975.
- [17] Brown P R, Leitermann K, Ohman J L Jr. Distribution of cat allergen 1 in cat tissues and fluids [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1984, 74 (1): 67-70.
- [18] Anderson M C, Baer H, Ohman J L Jr. A comparative study of the allergens of cat urine, serum, saliva, and pelt [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1985, 76 (4): 563-569.

- [19] Mata P, Charpin D, Charpin C, et al. Fel d 1 allergen: skin and or saliva? [J]. *Ann Allergy*, 1992, 69 (4): 321-322.
- [20] Charpin C, Mata P, Charpin D, et al. Fel d 1 allergen distribution in cat fur and skin [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1991, 88 (1): 77-82.
- [21] Van Milligen F J, Vroom T M, Aalberse R C. Presence of *Felis domesticus* allergen I in the cat's salivary and lacrimal glands [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1990, 92 (4): 375-378.
- [22] De Andrade A D, Birnbaum J, Magalon C, et al. Fel d 1 levels in cat anal glands [J]. *Clin Exp Allergy*, 1996, 26 (2): 178-180.
- [23] Wentz P E, Swanson M C, Reed C E. Variability of cat - allergen shedding [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 85 (1 Pt 1): 94-98.
- [24] Jalil Colome J, de Andrade A D, Birnbaum J, et al. Sex difference in Fel d 1 allergen production [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, 98 (1): 165-168.
- [25] Dabrowski A J, Van der Brempt X, Soler M, et al. Cat skin as an important source of Fel d 1 allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 86 (4 Pt 1): 462-465.
- [26] Zielonka T M, Charpin D, Berbis P, et al. Effects of castration and testosterone on Fel d 1 production by sebaceous glands of male cats: I-Immunological assessment [J]. *Clin Exp Allergy*, 1994, 24 (12): 1 169-1 173.
- [27] Charpin C, Zielonka T M, Charpin D, et al. Effects of castration and testosterone on Fel d 1 production by sebaceous glands of male cats: II-Morphometric assessment [J]. *Clin Exp Allergy*, 1994, 24 (12): 1 174-1 178.
- [28] Duffort O A, Carreira J, Nittig, et al. Studies on the biochemical structure of the major cat allergen *Felis domesticus* I [J]. *Mol Immunol*, 1991, 28 (4-5): 301-309.
- [29] Morgenstern J P, Griffith I J, Brauer A W, et al. Amino acid sequence of Fel d 1, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88 (21): 9 690-9 694.
- [30] Griffith I J, Craig S, Pollock J, et al. Expression and genomic structure of the genes encoding Fd1, the major allergen from the domestic cat [J].