

霜天蛾昆虫变应原的变应原性及免疫原性分析

孙秀珍,刘 昀,周 玎,李 维,冯向莉,徐 晶(西安交通大学医学院第二附属医院呼吸内科,陕西 西安710004)

摘要:目的 分析霜天蛾主要变应原的变应原性和免疫原性,为进一步制备霜天蛾标准化变应原疫苗和基因工程重组霜天蛾昆虫变应原奠定基础。方法 应用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳对霜天蛾变应原蛋白成分进行分离,对 9 例霜天蛾过敏患者血清分别进行 IgE、IgG 免疫印记分析,并对比分析 IgE、IgG 反应变应原成分。结果 霜天蛾提取液经 SDS-PAGE 染色后显示出 20 余种蛋白质成分,相对分子质量 12 000~128 000。免疫印迹分析结果显示具有变应原性的蛋白相对分子质量及反应率分别为:74 000(88.9%),66 000(22.2%),49 000(22.2%),36 000(77.8%),25 000(33.3%),具有免疫原性的蛋白相对分子质量及反应率分别为:79 000(33.3%),74 000(66.7%),66 000(22.2%),49 000(22.2%),36 000(44.4%),25 000(55.6%)。结论 霜天蛾变应原中具有较强变应原活性的蛋白质相对分子质量为 74 000 和 36 000,具有较强免疫原活性的蛋白质相对分子质量为 74 000 和 25 000 的蛋白质,是霜天蛾过敏患者特异性过敏诊断和治疗的主要成分。

关键词:霜天蛾;变应原;昆虫;变应原性;免疫原性

中图分类号:R392.8 **文献标识码:**A **文章编号:**16734254(2008)07-1161-04

Analysis of the allergenicity and immunogenicity of *Psilogramma menephron* allergen

SUN Xiu-zhen, LIU Yun, ZHOU Ding, LI Wei, FENG Xiang-li, XU Jing

Respiratory Department of the Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Shannxi, Xi'an 710004, China

Abstract: **Objective** To analyze the allergenicity and immunogenicity of *Psilogramma menephron* allergen so as to provide the basis for preparing recombinant and standardized allergen vaccines of *Psilogramma menephron*. **Methods** The extracts of *Psilogramma menephron* were analyzed by SDS-PAGE, and the allergenicity and immunogenicity of the extracts were tested with 9 sera from allergic patients by means of immunoblotting. **Results** More than 20 allergen proteins were separated from the extract of *Psilogramma menephron* by SDS-PAGE, with the relative molecular weight ranging from 12000 to 128000. The relative molecular weight of the allergenic proteins were 74 000 (88.9%), 66 000 (22.2%), 49 000 (22.2%), 36 000 (77.8%), or 25 000 (33.3%), and those of the immunogenic proteins were 79 000 (33.3%), 74 000 (66.7%), 66000 (22.2%), 49 000 (22.2%), 36 000 (44.4%), or 25 000 (55.6%). **Conclusion** The relative molecular weight of the major allergenic proteins of *Psilogramma menephron* are 74 000 and 36000, and 74 000 and 25 000 for the major immunogenic proteins. These proteins constitute the major allergenic components for diagnosis and specific treatment of *Psilogramma menephron* allergy.

Key words: *Psilogramma menephron*; insect, allergen; allergenicity; immunogenicity

过敏性哮喘是常见的呼吸道变态反应性疾病。引起过敏性哮喘的变应原很多,其中花粉、昆虫、真菌等是重要的吸入性变应原。近年来,研究发现蛾类变应原致敏性哮喘的发生率有所上升,认为蛾类是人类变态反应疾病最常见的致敏原之一。根据我们对西安地区致敏性昆虫调查结果发现霜天蛾(*Psilogramma menephron*)是西安地区优势致敏鳞翅目昆虫^[1]。本实验应用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳对霜天蛾变应原蛋白成分进行分离,并进一步了其变应原活性和免疫原活性。

1 材料和方法

收稿日期:2007-10-09

基金项目:国家自然科学基金(30271160)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30271160)

作者简介:孙秀珍(1951-),女,主任医师,教授,电话:029-81935518,

E-mail: doc-ly@sohu.com

1.1 霜天蛾变应原提取液的制备

捕捉霜天蛾成虫,鉴定后灭活,干燥,粉碎,乙醚脱脂,取 50 g 脱脂霜天蛾干粉,加 Coca's 液浸泡 24 h,超声波粉碎仪粉碎 10 min,离心取上清液,置于 Coca's(pH 8.2)液中提取 72 h,浓缩至总体积的 1/10,无菌滤过,细菌培养,无菌生长后,4℃冷藏备用。

1.2 霜天蛾变应原提取液蛋白浓度的测定

采用 Bradford 法测定提取液蛋白浓度。以牛血清白蛋白为标准蛋白,依次加入考马斯亮蓝、NaCl、标准蛋白后,置振荡器上震荡 10 s,充分反应 3 min 后测定 A_{595 nm} 吸光度,绘制标准曲线,得到标准曲线方程,计算蛋白浓度。

1.3 霜天蛾过敏患者血清抗体的筛选

2004 年 2 月~11 月呼吸科门诊霜天蛾过敏性哮喘患者 9 例,其中男性 4 例,女性 5 例;年龄(35.1±21.4)岁,病程(11.5±9.6)年。哮喘诊断根据第四届全国哮喘学术会议制定标准^[2]。霜天蛾过敏诊断根据霜

天蛾皮肤点刺结果 $\geq$ 阳性对照,BSA-ELISA(链霉亲和素-酶联吸附试验)法检测特异性 IgE(sIgE)结果 $>$ 阴性对照两倍。抽取上述病人静脉血 3 ml,以 $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times 15\text{ min}$ 离心后将血清移至另一试管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。

1.4 SDS-PAGE 法分析霜天蛾主要变应原蛋白组分

取标准蛋白及霜天蛾提取液各 $20\text{ }\mu\text{l}$ 按 1:1 比例加入 $20\text{ }\mu\text{l}$ 上样缓冲液充分混匀后,沸水浴中加热 10 min ,冷却后离心 $10\text{ }000\text{ g}\cdot\text{min}^{-1}\times 10\text{ min}$ 。采用不连续变性凝胶电泳(SDS-PAGE):浓缩胶(5%)电压为 30 V/cm ,分离胶(12%)为 20 V/cm ,待溴酚蓝线到达分离胶底部后停止电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色、脱色至背景清晰。凝胶成像系统测定各条带蛋白相对分子质量。

1.5 转印

将三层滤纸、纤维垫、转移盒放入电转移缓冲液浸泡平衡 30 min 以上,PVDF 膜预先在 100%甲醇中短暂浸泡,蒸馏水中洗 5 min ,转移平衡液中平衡 $10\sim 15\text{ min}$;霜天蛾变应原蛋白电泳后,将滤纸、PVDF 膜和凝胶形成的一套夹心“三明治”置于转印槽中。加转移缓冲液,恒压 2.5 V ,转印 2.5 h ;转印结束后,凝胶常规考马斯亮蓝染色确定转印效率,PVDF 膜丽春红染色,标明标准蛋白条带。将膜切成小条,便于加不同的抗体进行反应。

1.6 免疫印迹

TBST 缓冲液冲洗 PVDF 膜 3 次;含有 2%牛血清白蛋白的 TBS 缓冲液中封闭,室温摇动 2 h ;PVDF 膜浸入稀释的霜天蛾过敏患者血清(1:10 稀释), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;分别加入 TBS 稀释的抗人 IgG-HRP(1:500)、抗人 IgE-HRP(1:2000),室温摇动 1 h ;加底物反应至抗原区带呈紫色,将 PVDF 膜夹在滤纸中干燥,成相后置暗处保存。

2 结果

2.1 霜天蛾变应原提取液蛋白浓度的测定

用 Bradford 法测定提取液蛋白浓度,牛血清白蛋白制作标准曲线,以 595 nm 处吸光度为纵坐标,蛋白浓度为横坐标,得到标准曲线,方程 $y=10.221x+0.0049$,根据标准曲线计算霜天蛾变应原提取液蛋白浓度为 1.896 mg/ml 。

2.2 霜天蛾变应原经 SDS-PAGE 各组分相对分子质量测定结果

霜天蛾粗浸液经 SDS-PAGE 染色后显示出了 20 余种蛋白质成分(图 1),相对分子质量在 $12\text{ }000\sim 128\text{ }000$ 。

2.3 变应原性分析

霜天蛾提取液经 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜

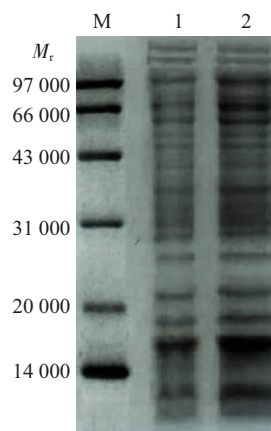


图 1 霜天蛾昆虫粗制液 12% SDS-PAGE 分析

Fig.1 Analysis of the extract of *Psilogramma menephron* by 12% SDS-PAGE

M: Protein marker; Lanes 1,2: Coea's extract (20 and $30\text{ }\mu\text{l}$ protein was added separately)

上,再分别与 9 例霜天蛾过敏性哮喘患者血清中特异性 IgE 结合,经辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgE 第二抗体显色后,蛋白条带见图 2。

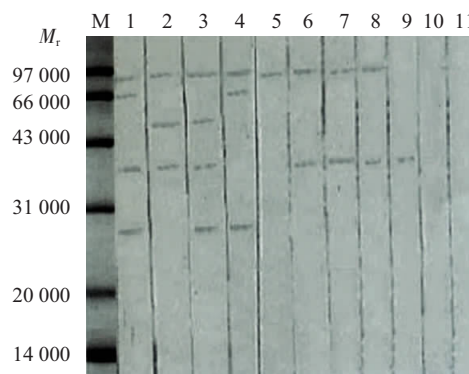


图 2 霜天蛾主要变应原免疫学鉴定结果

Fig.2 Immunological identification of the major allergens in *Psilogramma menephron* extract

M: Protein maker; Lanes 1-9: Serum IgE from the 9 allergic patients; Lane 10: Negative control; Lane 11: Blank control

霜天蛾变应原提取液与患者血清特异性 IgE 的反应条带有 5 条,其相对分子质量及反应率分别为: $74\text{ }000(88.9\%)$, $66\text{ }000(22.2\%)$, $49\text{ }000(22.2\%)$, $36\text{ }000(77.8\%)$, $25\text{ }000(33.3\%)$,阴性对照健康人血清及空白对照 TBS 均无反应条带。

由图 2 可知, $74\text{ }000$ 和 $36\text{ }000$ 的蛋白质与霜天蛾过敏性哮喘患者血清特异性 IgE 的结合率均在 50% 以上,认为它们是霜天蛾昆虫具有变应原活性的主要物质。

2.4 免疫原性分析

霜天蛾粗浸液经 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜

上, 再与 9 例霜天蛾地敏性哮喘患者血清中特异性 IgG 结合, 经辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 第二抗体显色后, 蛋白条带见图 3。

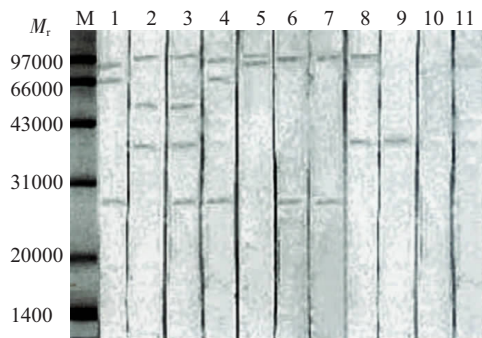


图 3 霜天蛾主要变应原免疫学鉴定结果

Fig.3 Identification of the major allergens with strong immunogenicity in *Psilogramma menephron* extract

M: Protein maker; Lanes 1-9: Serum IgE from the 9 allergic patients; Lane 10: Negative control; Lane 11: Blank contrast

霜天蛾变应原提取液与患者血清特异性 IgG 的反应条带有 6 条, 其相对分子质量及反应率分别为: 79 000 (33.3%), 74 000 (66.7%), 66 000 (22.2%), 49 000 (22.2%), 36 000 (44.4%), 25 000 (55.6%)。阴性对照健康人血清空白对照 TBS 均无条带。

由图 3 可以看出, 霜天蛾昆虫变应原中具有较强免疫原活性的蛋白质是相对分子质量为 74 000 和 25 000 的蛋白质, 它们与患者血清特异性 IgG 的反应率均在 50% 以上, 是具有强免疫活性的主要变应原成分。相对分子质量为 79 000、36 000、66 000、49 000 的蛋白质反应率小于 50%; 是霜天蛾昆虫变应原具有弱免疫原活性的次要变应原成分。

表 1 对比了霜天蛾变应原提取液与患者血清特异性 IgE、IgG 结合的蛋白条带及结合率, 结果显示血清特异性 IgE、IgG 所识别的蛋白基本相似, 但各有侧重, IgE 以识别 74 000 和 36 000 的蛋白为主, 而 IgG 以识别 74 000 和 25 000, 说明 74 000 的蛋白即具有较强的变应原性, 也具有较强的免疫原性, 是主要的致敏蛋白组分, 既是特异性诊断的关键蛋白质, 也是用于特异性免疫治疗的主要蛋白。而 36 000 和 25 000 的蛋白质则分别以变应原性和免疫原性为主, 也是用于特异性诊断和免疫治疗的关键蛋白成分。

3 讨论

引起过敏性哮喘的变应原有很多, 如花粉、屋尘、真菌、人与动物的皮屑、羽毛、昆虫等, 在这些变应原中, 气传致敏原在过敏性疾病特别是支气管哮喘及过敏性鼻炎的发病中起重要作用^[3,4]。在众多气传致敏

表 1 霜天蛾变应原与特异性过敏患者血清 IgE、IgG 反应结果

Tab.1 Reactions of the major allergens in *Psilogramma menephron* extract with serum IgG and IgE from the asthma patients

Protein molecular weight	The case number(rate) of reaction with serum IgE	The case number(rate) of reaction with serum IgG
79 000	0(0)	3(33.3%)
74 000	8(88.9%)	6(66.7%)
66 000	2(22.2%)	2(22.2%)
49 000	2(22.2%)	2(22.2%)
36 000	7(77.8%)	4(44.4%)
25 000	3(33.3%)	5(55.6%)

原, 昆虫致敏原在呼吸系统疾病的发生、发展中与花粉、真菌起同等重要的作用^[5]。

近几年由昆虫引起的变态反应性疾病日益受到国内外学者的重视^[6], 目前已发现昆虫变应原微粒可悬浮于空气中, 造成变应原的扩散, 通过呼吸道吸入引起变态反应, 表现为过敏性哮喘、过敏性肺炎、过敏性鼻炎等。由于地域环境、植被特点及气候的影响, 各国致敏昆虫种类存在地区差异。本课题组调查研究了西安地区气传昆虫种类, 发现气传优势昆虫主要是蝶和蛾, 应用优势昆虫的提取液给哮喘患者行皮肤点刺试验及特异性 IgE 测定, 发现霜天蛾的阳性率最高, 分别为 52% 及 42%^[7], 进一步应用霜天蛾提取液对 64 例过敏性哮喘患者进行特异性免疫治疗, 总有效率达 76.5%^[8], 提示霜天蛾是西安地区主要气传昆虫致敏原。

本试验分析了霜天蛾变应原提取液的免疫学特性。Western blotting 结果显示相对分子质量为 74 000 和 36 000 的蛋白质与霜天蛾过敏性哮喘患者血清特异性 IgE 的结合率均在 50% 以上, 认为它们是霜天蛾昆虫具有变应原活性的主要白质; 相对分子质量为 74 000 和 25 000 的蛋白质与霜天蛾过敏性哮喘患者血清特异性 IgG 的结合率均在 50% 以上, 认为它们是霜天蛾昆虫具有免疫原活性的主要蛋白质。对比分析霜天蛾变应原血清特异性 IgE 和 IgG 的反应条带, 二者之间有共性, 但也各有侧重, 相对分子质量为 74 000 的蛋白即具有较强的变应原性, 也具有较强的免疫原性, 是主要的致敏蛋白组分, 既是特异性诊断的关键蛋白质, 也是用于特异性免疫治疗的主要蛋白。分析其原因, 可能与免疫球蛋白的结构上存在恒定区和可变区, 而使其功能上既存在共性也存在各自的特性有关。

IgE 介导的 I 型过敏反应是速发型哮喘的主要发病机制。IgE 在血清中的含量极低, 仅占血清总抗体的 0.002%。IgE 合成受遗传、接触变应原机会等多因素影响。而 IgG 抗体是血清中的主要抗体, 约占总 Ig

的 75%。是哮喘病程中抗原刺激机体产生的保护性抗体,它能阻滞 IgE 与致敏原在肥大细胞表面的结合,从而防止肥大细胞脱颗粒,产生对特异性抗原的耐受性,减少哮喘的发作。相对分子质量为 74000 和 25000 的蛋白质有较强的免疫原活性,是特异性免疫治疗中产生的主要保护性抗体^[9]。但有报道提示 IgG 可以介导 II 型、III 型和部分 I 型过敏反应,引起哮喘发作,尚待进一步研究。

目前变态反应性疾病诊断及治疗试剂的发展趋势是尽可能的包括变应原的所有致敏蛋白组分,而且可以对各组分进行标准化,本实验分析了粗制霜天蛾变应原的变应原性及免疫原性,为制备标准化的变应原浸液用于变态反应疾病的诊断和治疗奠定基础。

参考文献:

- [1] Sun XZ, Liu Y. Study of airborne allergen of Lepidoptera in asthmatic patients[J]. Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci, Eng), 2003, Suppl: 43-5.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案)[J]. 中华呼吸和结核杂志, 2003, 26: 3.
- [3] Deschildre A. Allergens causing respiratory allergy: the aeroallergens [J]. Arch Pediatr, 1999, 6 (Suppl):48S-54S.
- [4] Loureiro G, Rabaca MA, Blanco B, et al. Aeroallergens sensitization in an allergic paediatric population of Cova da Beira, Portugal [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2005, 33(4):192-8.
- [5] Singh AB, Kumar P. Common environmental allergens causing respiratory allergy in India [J]. India J Pediatrics, 2002, 69 (3): 245-50.
- [6] Berzhets VM, Radikova OV, Khlgatian SV, et al. Evaluation of specific activity of preparations of allergens from synanthropic insects[J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2006, 11(7): 74-8.
- [7] 孙秀珍, 刘 昀, 李雅莉. 哮喘患者气传昆虫变应原疫苗的实验[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(19): 1813-5.
- [8] 李雅莉, 孙秀珍, 张 洁, 等. 霜天蛾过敏性哮喘患者特异性免疫治疗的效果评价[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2003, 24(3): 237-8.
- [9] Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy[J]. Chem Immunol Allergy, 2006, 91: 195-203.
- [3] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health initiative randomized controlled trial[J]. JAMA, 2002, 288(3): 321-33.
- [4] Hopp TA, Weisis HL, Hilsenbeck SG, et al. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-Rich tumors have poor disease-free survival rates[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(8): 2751-60.
- [5] Mote PA, Leary JA, Avery KA, et al. Germ-line mutations of BRCA1 and BRCA2 in the breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2004, 39(3): 236-48.
- [6] Haile DT, Parvin JD. Activation of transcription *in vitro* by the BRCA1 carboxyl-terminal domain [J]. J Biol Chem, 1999, 274(4): 2113-7.
- [7] Monteiro AN, August A, Hanafusa H, et al. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region [J]. PNAS, 1996, 93(24): 13595-9.
- [8] Chapman MS, Verma IM. Transcriptional activation by BRCA1 [J]. Nature, 1996, 382(6593): 678-9.
- [9] Eakin CM, Maccoss MJ, Finney GL, et al. Estrogen receptor α is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase[J]. PNAS, 2007, 104(14): 5794-9.
- [10] Horwitz AA, Bachir Affar EL, Heine G, et al. A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase[J]. PNAS, 2007, 104(16): 6614-9.
- [11] Akahira J, Inoue T, Suzuki T, et al. Progesterone receptor isoform A and B in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR studies[J]. Br J Cancer, 2000, 83(11):1488-94.
- [12] Shyamala G, Yang X, Silberman G, et al. Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit development abnormalities in mammary glands[J]. PNAS, 1998, 95(2): 696-701.
- [13] Shyamala G, Yang X, Cardiff RD, et al. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development [J]. PNAS, 2000, 97(7): 3044-9.
- [14] Fan S, Wang J, Ma Y, et al. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells[J]. Science, 1999, 284(5418): 1354-6.
- [15] Yeh S, Hu YC, Rahamn M, et al. Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells[J]. PNAS, 2000, 97(21): 11256-61.