

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202322418

· 论著 ·

变应性鼻炎儿童蒿花粉变应原组分诊断

王育民¹, 宋惠芳¹, 赵晨², 夏远³, 张星光³

(1. 内蒙古自治区妇幼保健院 儿内科, 内蒙古 呼和浩特 010000; 2. 内蒙古医科大学研究生学院, 内蒙古 呼和浩特 010010; 3. 内蒙古医科大学公共卫生学院, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要: **目的** 本文旨在对季节性变应性鼻炎(AR)患儿进行变应原组分筛查,了解AR患儿代表性蒿属植物花粉变应原致敏组分。**方法** 采集黄花蒿和大籽蒿花粉,提取花粉蛋白,以临床确诊为AR且艾蒿特异性免疫球蛋白E(sIgE)检测为阳性患儿血清为一抗,通过蛋白质免疫印迹法筛查花粉中变应原组分。**结果** 蛋白质免疫印迹显示2种蒿属植物花粉蛋白提取物中主要有3条带能与血清IgE特异性结合,相对分子量(Mr)分别为12、25和70 kDa。黄花蒿花粉中70 kDa变应原为AR儿童最常见的变应原分子,阳性检出率为85.19%,25 kDa和12 kDa变应原分别为37.04%和14.81%。大籽蒿花粉中70 kDa变应原阳性检出率低于黄花蒿($P < 0.05$),为51.85%,25 kDa和12 kDa变应原阳性检出率与黄花蒿相似($P > 0.05$)。另外,同一个体血清对2种蒿属植物同源变应原阳性反应存在差异,不同患儿对1种或多种变应原分子敏感。**结论** AR患儿黄花蒿花粉致敏率更高,推荐增加黄花蒿花粉组分蛋白进行诊断和免疫治疗,尤其是70 kDa变应原分子。

关键词: 变应性鼻炎; 儿童; 蒿属植物花粉; 变应原

中图分类号: R765.21

Component-resolved diagnosis of artemisia pollen in children with allergic rhinitis

WANG Yumin¹, SONG Huifang¹, ZHAO Chen², XIA Yuan³, ZHANG Xingguang³

(1. Department of Pediatrics, Inner Mongolia Maternal and Child Health Hospital, Hohhot 010000, China; 2. Graduate School of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China; 3. School of Public Health, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China)

Abstract: **Objective** To screen children with seasonal allergic rhinitis (AR) for allergen components and understand the allergenic components of pollen in children with AR. **Methods** Artemisia annua and artemisia sieversiana pollens were collected and pollen proteins were extracted. Taking serum from children with clinically confirmed AR and special immunoglobulin E (sIgE) positive for artemisia as primary antibody, western blotting was used to screen for allergenic components in pollen. **Results** Western blotting showed that three main bands of the protein extracts were specifically bound to sIgE, with relative molecular mass (Mr) of 12, 25, and 70 kDa, respectively. The 70 kDa allergen in Artemisia annua pollen was the most common allergen molecule in children with AR, with a positive detection rate of 85.19%, 25 kDa and 12 kDa allergens of 37.04% and 14.81%, respectively. The positive detection rate of 70 kDa allergen in Artemisia sieversiana was lower than that of Artemisia annua 51.85% ($P < 0.05$), and the positive detection rates of 25 kDa and 12 kDa allergens were similar to those of Artemisia scutellaria ($P > 0.05$). In addition, there were differences in the positive responses of the same serum to the two artemisia homologous allergens, and different children were sensitive to one or more allergen molecules. **Conclusion** With high sensitization rate of Artemisia annua pollen in AR children, it is recommended to increase the pollen component protein of Artemisia scutellaria, especially the 70 kDa allergen molecule, for the diagnosis and immunotherapy of pediatric AR.

Keywords: Allergic rhinitis; Children; Artemisia pollen; Allergen

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2020MS08200)。

第一作者简介:王育民,男,硕士,主任医师;宋惠芳,女,硕士,医师;赵晨,女,在读硕士研究生。王育民、宋惠芳、赵晨对本文有同等贡献,为并列第一作者。

通信作者:夏远,Email:xiayuan925@hotmail.com;张星光,Email:zxg311@126.com

呼吸道过敏性疾病是全球最常见的慢性疾病之一,造成国家卫生保健系统资源消耗的主要负担之一。国际儿童哮喘和变态反应研究(international study of asthma and allergies in childhood, ISAAC)对56个国家和地区儿童哮喘与过敏性疾病横断面调查发现,6~7岁和13~14岁儿童变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)的患病率分别波动于2.2%~24.2%和4.5%~45.1%^[1]。目前国内相关的流行病学调查资料还十分有限,不同城市儿童AR的患病率不尽相同^[2-4],受遗传因素、生活习惯、居住地环境与植被等因素影响。通常AR患儿发展成过敏性鼻炎的风险会提高4~5倍,而继发过敏性鼻炎与其致敏成分、病程等相关。在世界范围内主要的气传致敏原为气传花粉^[5],而我国引起季节性呼吸道过敏性疾病的主要花粉种属中,蒿属花粉的关联指数最高,研究表明蒿属花粉是中国、尤其是内蒙古地区引起呼吸系统过敏性疾病最主要的室外致敏原之一^[6-9]。在内蒙古地区夏秋季蒿花粉浓度逐年攀高,我国多项研究证实大籽蒿和黄花蒿花粉是致敏率最高的花粉之一^[10-11]。

变应原组分诊断是在生物分子层面明确变应原致敏组分蛋白的新型诊断技术,应用提取天然变应原组分、重组变应原分子,了解变应原分子与免疫球蛋白E(immunoglobulin E, IgE)的结合力,可高效准确的认识变应原分子及致敏特征^[12],其在诊断及免疫治疗中具有更高的效力^[13-14]。本研究旨在获取AR患儿夏末和秋季有关黄花蒿、大籽蒿花粉变应原分子致敏性的特征,为花粉致呼吸道过敏性疾病的预防和变应原免疫治疗提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 患者的选择

每年8~9月份是季节性AR高发期,根据可靠的临床病史、夏秋季艾蒿花粉过敏史以及符合AR、儿童哮喘诊断和治疗指南^[15-16]的诊断标准,共收集27例AR患儿血清进行后续检测,男20例,女7例,年龄2~13岁,平均(5.85±3.02)岁。纳入标准:受试者艾蒿特异性IgE抗体(酶联免疫法)检测为阳性;12个月内未接受免疫治疗;4周内未服用糖皮质激素;有季节性过敏症状或症状加重。排除标准:过敏原特异性IgE抗体检测阴性;12个月内接受过

免疫治疗;4周内服用过糖皮质激素;过敏症状非季节性发作或加重;非呼吸道过敏患儿;排除患有癌症、自身免疫性疾病和寄生虫病的患儿。所有患儿样本均在监护人知情同意的情况下采集,本研究经内蒙古自治区妇幼保健院伦理委员会批准。

1.2 蒿属植物和蛋白质提取物

两种蒿属植物的花粉于花开季节采集自内蒙古呼和浩特市市郊区,花粉去除杂质、分样过筛,-20℃低温保存备用。提取花粉蛋白全程冰上操作,使用花粉蛋白提取试剂盒(上海贝博),花粉蛋白提取液在4℃、2 000×g离心10 min,取上清后4℃、14 000×g离心10 min,弃沉淀取上清分装-80℃存储备用。使用BCA蛋白质定量检测试剂盒(碧云天生物技术)测定样本蛋白浓度。

1.3 花粉蛋白提取物免疫印迹实验

大籽蒿、黄花蒿蛋白提取液根据所测蛋白浓度按等质量配平,将蛋白提取液与SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5×)4:1混匀。SDS-PAGE分离花粉蛋白组分,12.5%分离胶、5%浓缩胶的PAGE凝胶在电泳缓冲液中以100 V运行1.5 h。

通过半干转方式将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,封闭膜15 min,然后以AR患儿血清作为一抗孵育。TBST洗涤液冲洗膜3次,然后以HPR标记的山羊抗人IgE二抗孵育,清洗膜后Affinity Bioscience ECL发光液均匀覆盖膜并成像。

1.4 统计学分析

运用SPSS 20.0软件进行统计学分析。计数资料以例数和构成比表示,两组之间阳性率的比较采用 χ^2 检验。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 花粉蛋白提取物免疫印迹分析

以27例AR患儿血清作为一抗与2种蒿属植物分别进行免疫印迹检测,所有结果中可以看到3个主要条带:12、25和70 kDa的IgE结合率高。其中7例患儿仅表现出对黄花蒿单一植物过敏,20例患儿对2种植物花粉均过敏,黄花蒿和大籽蒿花粉过敏阳性率分别为100.00%和74.07%。见表1。

表1 27例过敏患儿一般信息和2种花粉过敏组分资料

患儿	性别	年龄(岁)	黄花蒿			大籽蒿		
			Mr	Mr	Mr	Mr	Mr	Mr
			70 kDa	25 kDa	12 kDa	70 kDa	25 kDa	12 kDa
N1	男	9	+	+	-	-	+	+
N2	男	5	-	+	-	-	+	-
N3	男	8	+	-	-	-	-	-
N4	女	4	+	+	-	-	+	-
N5	男	5	-	+	-	-	+	-
N6	女	3	+	-	-	+	-	-
N7	男	5	+	+	-	+	+	-
N8	男	10	+	-	-	-	-	-
N9	男	3	+	-	-	-	-	-
N10	男	4	+	+	-	+	+	-
N11	男	5	+	-	+	+	-	+
N12	男	3	+	-	+	+	-	+
N13	女	2	+	-	-	+	-	-
N14	男	12	+	-	-	+	-	-
N15	女	6	+	-	-	-	-	-
N16	女	5	+	+	-	+	+	-
N17	男	4	+	-	-	+	-	-
N18	男	13	+	+	+	+	+	+
N19	男	2	-	+	-	-	+	-
N20	男	10	+	-	-	-	-	-
N21	女	8	+	-	-	-	-	-
N22	男	4	-	+	+	-	+	-
N23	男	5	+	-	-	+	-	-
N24	女	7	+	-	-	-	-	-
N25	男	9	+	-	-	+	-	-
N26	男	3	+	-	-	+	-	-
N27	男	4	+	-	-	+	-	-

表2 黄花蒿和大籽蒿变应原分子结果分析 [例(%)]

提取物	黄花蒿	大籽蒿	χ^2	P
12 kDa 阳性	4 (14.81)	4 (14.81)	0.000	1.000
25 kDa 阳性	10 (37.04)	10 (37.04)	0.000	1.000
70 kDa 阳性	23 (85.19)	14 (51.85)	6.954	0.018

2.2 个体致敏差异

部分个体血清 IgE 对 2 种植物提取物的同 1 条带位置阳性反应不一致,如 33.33% (9/27) 显示黄花蒿提取物 70 kDa 条带阳性,而大籽蒿阴性;另外,1 份血清 IgE 可能表现为与某一蒿属植物中的 1 种或 2 种组分蛋白相结合,个体差异明显。见表 1、图 2。

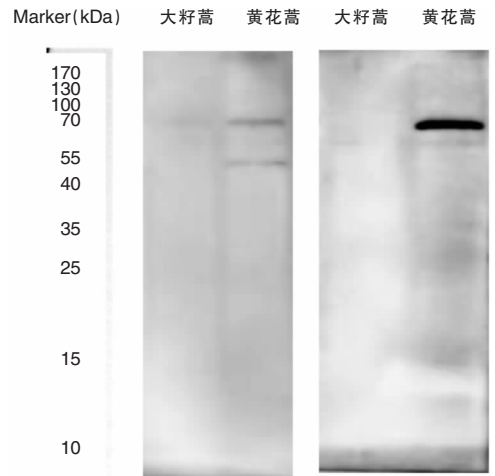


图2 N23、N24 患儿免疫印迹图 注:Marker(预染蛋白分子量标准)。

黄花蒿免疫印迹结果显示:27 例 AR 患儿血清中,对 12 kDa 条带识别 4 例(37.04%),25 kDa 条带识别 10 例(14.81%),70 kDa 条带识别 23 例(85.19%)。大籽蒿免疫印迹结果显示:12 kDa 条带识别 4 例(37.04%),25 kDa 条带识别 10 例(14.81%),70 kDa 条带识别 14 例(51.85%)。见图 1、表 2。此外,黄花蒿提取物免疫印迹检测显示 N14 患儿在 35~40 kDa 有 1 条微弱条带,N23 患儿在 55 kDa 条带位置识别显影。

3 讨论

蒿属植物花粉浓度高峰在 8 月中旬至 9 月底,季节性致敏特点十分明显,蒿属植物种类繁多,目前已分离鉴定出多种变应原,且致敏性存在差异。近年来 AR 患病率、发展为哮喘的人群大幅度提升,年龄段逐渐幼龄化,甚至于幼儿期就出现明显的季节性呼吸道过敏症状,给患儿及家长在生活质量、学业、心理上带来沉重负担。在王晓艳等^[17]的研究中表明艾蒿花粉特异性 IgE 的浓度在儿童和青少年组显著高于成人组。因此,我们需要在儿童人群中寻找致敏变应原成分、了解致敏模式,在精确诊断和免疫治疗上年龄段关口前移。

本实验对黄花蒿、大籽蒿 2 种植物花粉提取物的变应原进行研究,分别与每一个体血清检测,以了解个体差异性,2 种植物花粉表现出相似的变应原

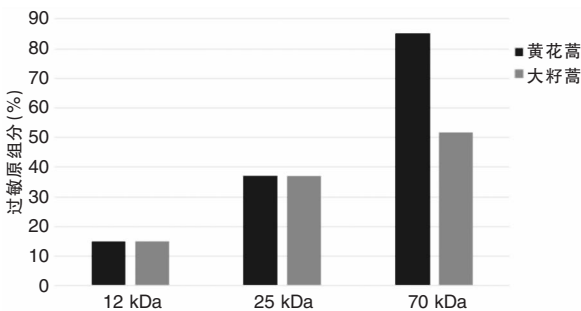


图1 AR 患儿对 2 种蒿属植物主要致敏组分的阳性率

谱,结果显示2种蒿属植物12、25、70 kDa组分条带明显,但二者带谱阳性反应存在差异,一些患儿对2种植物提取物的同一条带位置阳性反应不一致,不同患儿对其中1种或多种变应原分子敏感,蒿过敏AR患儿对这3种变应原分子阳性结合率较高,为主要变应原,这与Gao等^[18]和来自欧洲的变应原免疫印迹结果基本一致。同样我们的实验结果与李兴永等^[19]对大籽蒿花粉、杨慧等^[20]对艾蒿花粉过敏原进行分离鉴定出的主要致敏原是62 kDa的变应原分子结果亦相同。黄花蒿变应原分子70 kDa蛋白的致敏率在所有检测的变应原分子中最高,该变应原分子在西班牙与荷兰的人群中致敏率分别为92%和95%,在2018年Fu等^[21]实验中确定70 kDa蛋白条带位置的变应原是一种相对分子量为62 kDa的半乳糖氧化酶分子,现在被IUIS变应原命名小组指定为Art an 7,该实验样本中Art an 7分子的致敏率为85%。我们亦认为变应原分子70 kDa为蒿属气传植物花粉的主要致敏原,那么含有变应原分子70 kDa的免疫试剂可能对相关过敏性疾病诊断及特异性免疫治疗更有效。

黄花蒿和大籽蒿提取物中70 kDa蛋白分子的IgE阳性结合率差异明显,前者更高,考虑可能为2种变应原分子生物学信息的差异、序列位点的改变与致敏性差异相关。实验研究证实同源物异构体对IgE结合有潜在影响,完成生物学信息的比对及进一步纯化,在大样本人群中评估致敏差异性^[22]。同源变应原致敏差异需要在不同地理区域的大量具有代表性的血清样本中进行评估,以获得更为全面的数据与观点。

本实验中黄花蒿花粉提取物与AR儿童血清IgE抗体识别度更高,而大籽蒿较弱,与Zhao等^[22]的实验结果显示黄花蒿和北艾的IgE结合能力显著高于大籽蒿、铁杆蒿、野艾蒿的结果一致,也与于睿莉等^[11]对内蒙古锡林郭勒黄花蒿、大籽蒿及艾蒿3种蒿属花粉的致敏性研究所显示的黄花蒿致敏性强于大籽蒿结果亦一致。对大多数蒿过敏患儿而言,研究显示黄花蒿花粉提取物的IgE结合率最高^[23]。尽管黄花蒿在20世纪80年代即被认为是一种重要的变应原,但一直以来中国用于皮肤点刺的商业蒿花粉提取物主要来自大籽蒿^[24]。艾蒿提取物也是我国目前主要蒿属植物过敏诊断商品,普遍适用于体外试验。2020年Lou等^[6]研究证实黄花蒿提取物可被选择作为季节性AR的舌下免疫治疗产品,2021年全球首个用于治疗黄花蒿/艾蒿花

粉过敏引起的AR(或伴有结膜炎)的标准化脱敏药物—黄花蒿花粉变应原舌下滴剂(商品名:畅皓)获批上市。同时研究显示多变应原组分过敏的人群更易患过敏性哮喘,在中国北方人群较南方人群更易患哮喘,近一半的秋季花粉AR患者在9年内发展为季节性过敏性哮喘^[25-26],对2种以上变应原致敏增加了患过敏性哮喘的风险,其中Art v 1、Art v 3、Art an 7导致致敏患者发生过敏性哮喘的风险增加约3倍^[17]。

实验中变应原分子12、25、70 kDa与AR患儿血清IgE的结合率高,且免疫印迹结果显示阳性结合反应基本集中在这3种变应原分子中,为主要致敏组分,2种变应原组分同时致敏率易偏高,因此认为作为商品蒿过敏诊断试剂或免疫制剂建议包含这3种变应原组分,将提高精准诊断及特异性免疫效率,当然仍需大样本人群检测来筛查潜在致敏原及更准确了解致敏组分信息。免疫治疗是目前唯一可能影响过敏性疾病自然病程的医疗干预,对于过敏人群意义重大,明确真正的致敏组分蛋白后针对性的免疫制剂可以有效降低免疫治疗中的不良反应,减少社会医疗经济成本消耗。

参考文献:

- [1] Asher MI, Montefort S, Björkstén B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys[J]. *Lancet*, 2006, 368(9537): 733-743.
- [2] Zhang YM, Zhang J, Liu SL, et al. Prevalence and associated risk factors of allergic rhinitis in preschool children in Beijing[J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(1): 28-35.
- [3] 王媛,曹春婷,漆可,等.北京市中小学生变应性鼻炎患病率调查[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2015, 22(9): 465-469.
- [4] Song Y, Wang M, Xie J, et al. Prevalence of allergic rhinitis among elementary and middle school students in Changsha city and its impact on quality of life[J]. *J Laryngol Otol*, 2015, 129(11): 1108-1114.
- [5] Brighetti MA, Costa C, Menesatti P, et al. Multivariate statistical forecasting modeling to predict Poaceae pollen critical concentrations by meteorological data[J]. *Aerobiologia*, 2014, 30(1): 25-33.
- [6] Lou H, Huang Y, Ouyang Y, et al. Artemisia annua-sublingual immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: A randomized controlled trial[J]. *Allergy*, 2020, 75(8): 2022-2032.
- [7] 萨日娜. 内蒙古地区过敏性鼻炎流行病学调查研究[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学, 2020.
- [8] 武静,宋岚. 二连浩特市夏秋季气传花粉致敏性研究[J]. *环境*

- 与健康杂志,2016,33(2):159-161.
- [9] 乔秉善. 中国气传花粉和植物彩色图谱[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2014.
- [10] 宋柏龙,许栋岳,马智杰,等. 内蒙古地区花粉观察及变应性鼻炎的防治分析[J]. 中国医学文摘(耳鼻咽喉科学),2019,34(3):174-176,180.
- [11] 于睿莉,杨波,兰天飞,等. 内蒙古锡林郭勒地区黄花蒿、大籽蒿和艾蒿花粉变应原致敏性及其临床意义[J]. 解放军医学院学报,2018,39(12):1058-1060,1066.
- [12] Hamilton RG, Kleine-Tebbe J. Molecular allergy diagnostics: Analytical features that support clinical decisions[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*,2015,15(9):57.
- [13] González-Mancebo E, Domínguez-Ortega J, Blanco-Bermejo S, et al. Comparison of two diagnostic techniques, skin-prick test and component resolved diagnosis in the follow-up of a cohort of paediatric patients with pollinosis. Multicentre pilot study in a highly exposed allergenic area [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2017,45(2):121-126.
- [14] Stringari G, Tripodi S, Caffarelli C, et al. The effect of component-resolved diagnosis on specific immunotherapy prescription in children with hay fever[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2014,134(1):75-81.
- [15] Cheng L, Chen J, Fu Q, et al. Chinese Society of Allergy Guidelines for diagnosis and treatment of allergic rhinitis[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2018, 10(4):300-353.
- [16] 中华儿科杂志编辑委员会,中华医学会儿科学分会呼吸学组,中国医师协会儿科医师分会儿童呼吸专业委员会. 儿童支气管哮喘规范化诊治建议(2020年版)[J]. 中华儿科杂志,2020,58(9):708-717.
- [17] 王晓艳,丁佳琪,陈艳蕾,等. 豚草花粉在夏秋季花粉症中的致敏特点分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2020,27(4):180-183.
- [18] Gao Z, Fu WY, Sun Y, et al. Artemisia pollen allergy in China: Component-resolved diagnosis reveals allergic asthma patients have significant multiple allergen sensitization [J]. *Allergy*,2019,74(2):284-293.
- [19] 李兴永,肖小军,孙宏治,等. 大籽蒿花粉过敏原的分离、鉴定与纯化[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(7):913-916.
- [20] 杨慧,刘志刚,韩庆国,等. 艾蒿花粉主要变应原的分离、纯化与鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(1):73-77.
- [21] Fu W, Gao Z, Gao L, et al. Identification of a 62 kDa major allergen from Artemisia pollen as a putative galactose oxidase[J]. *Allergy*,2018,73(5):1041-1073.
- [22] Zhao L, Fu W, Gao B, et al. Variation in IgE binding potencies of seven Artemisia species depending on content of major allergens [J]. *Clin Transl Allergy*,2020,10(1):50.
- [23] Tang R, Sun JL, Yin J, et al. Artemisia allergy research in China [J]. *Biomed Res Int*, 2015,2015:1-9.
- [24] Ma TT, Wang XD, Zhuang Y, et al. Prevalence and risk factors for allergic rhinitis in adults and children living in different grassland regions of Inner Mongolia [J]. *Allergy*,2020,75(1):234-239.
- [25] 尹佳,岳凤敏,王良录,等. 夏秋季花粉症患者变应性鼻炎发展至变应性哮喘进程的临床研究[J]. 中华医学杂志,2006,86(23):1628-1632.
- [26] Guan K, Liu B, Wang M, et al. Principles of allergen immunotherapy and its clinical application in China: Contrasts and comparisons with the USA [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*,2019,57(1):128-143.

(收稿日期:2022-10-14)

本文引用格式:王育民,宋惠芳,赵晨,等. 变应性鼻炎儿童蒿花粉变应原组分诊断[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2023,29(5):46-50. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202322418

Cite this article as:WANG Yumin, SONG Huifang, ZHAO Chen, et al. Component-resolved diagnosis of artemisia pollen in children with allergic rhinitis [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2023, 29(5):46-50. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202322418