

doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2024.170

Der p2 B 细胞表位 RNA 疫苗制备及其对过敏性鼻炎小鼠特异性 IgE 抑制作用

杨贵¹, 胡田勇², 贺海鹏², 马莉², 魏海峰², 黄佳敏², 刘志强²

1. 深圳市龙岗中心医院; 2. 深圳市龙岗区耳鼻咽喉医院/深圳市耳鼻咽喉研究所, 广东 深圳 518172

摘要:目的 尘螨过敏原 Der p2 B 细胞表位 RNA 疫苗的制备及其对过敏性鼻炎小鼠特异性 IgE 影响。方法 经表位预测软件分析预测 Der p2 蛋白序列上 B 细胞表位肽, 合成 B 细胞表位肽并进行体外 IgE 反应性分析, 将 B 细胞表位肽与载体蛋白相连, 构建 B 细胞表位 RNA 疫苗, RNA 疫苗经脂质体包裹后, 皮下注射给予过敏性鼻炎小鼠进行治疗, 检测小鼠外周血特异性 IgE、IgG4 水平及 Treg、Th17 细胞变化。结果 与 Der p2 阳性对照组相比, 预测的四段 B 细胞表位肽均显示出低 IgE 反应性, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$); 与过敏性鼻炎组小鼠相比, 经 Der p2 B 细胞表位 RNA 疫苗治疗后, 血清特异性 IgE 水平明显下降, IgG4 水平升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时, 治疗后外周血中 Treg 比率有所增加, Th17 比率降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 成功构建了 Der p2 B 细胞表位 RNA 疫苗, 并可有效降低过敏性鼻炎小鼠外周血特异性 IgE, 提高中和型抗体 IgG4 水平及 Treg 比率。

关键词: 尘螨; B 细胞表位; RNA 疫苗; 特异性 IgE

中图分类号: R765.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2024)05-0006-07

引用格式: 杨贵, 胡田勇, 贺海鹏, 等. Der p2 B 细胞表位 RNA 疫苗制备及其对过敏性鼻炎小鼠特异性 IgE 抑制作用[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2024, 38(5):6-12. YANG Gui, HU Tianyong, HE Haipeng, et al. Preparation of a Der p2 B cell epitope RNA vaccine and its specific IgE inhibition in mice with allergic rhinitis[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(5):6-12.

Preparation of a Der p2 B cell epitope RNA vaccine and its specific IgE inhibition in mice with allergic rhinitis

YANG Gui¹, HU Tianyong², HE Haipeng², MA Li², WEI Haifeng², HUANG Jiamin², LIU Zhiqiang²

1. Shenzhen Longgang Central Hospital; 2. Shenzhen Otolaryngology Institute/Longgang Otolaryngology Hospital, Shenzhen 518172, Guangdong, China

Abstract: Objective This study aimed to construct a house dust mite allergen Der p2 B cell epitope RNA vaccine and evaluate its inhibitory potency against antigen-specific IgE in allergic rhinitis mice. **Methods** Epitope prediction software was utilized to predict potential B-cell epitope peptides on the Der p2 protein sequence, followed by synthesis of these peptides and analysis of their IgE reactivity in vitro. The B-cell epitope peptide was then linked with a carrier protein to construct the B-cell epitope RNA vaccine, which was administered to allergic rhinitis mice via subcutaneous injection. Levels of specific IgE, IgG4, Treg, and Th17 cells in the peripheral blood of the mice were subsequently tested. **Results** Compared with the recombinant Der p2 positive control group, the predicted four B cell epitope peptides exhibited significantly lower IgE reactivity ($P < 0.001$). Furthermore, treatment with the Der p2 B cell epitope RNA vaccine led to a significant decrease in serum levels of specific IgE and an increase in IgG4 compared to mice in the allergic rhinitis group ($P < 0.05$). Additionally, there was an increase in Treg ratio and a reduction in Th17 ratio after treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** The construction of the Der p2 B cell epitope RNA vaccine has been successfully achieved and it effectively reduces specific IgE levels while increasing neutralizing antibody levels and Treg ratios in peripheral blood of allergic rhinitis mice.

Key words: house dust mite; B cell epitope; RNA vaccine; specific IgE

收稿日期: 2024-04-03

基金课题: 国家自然科学基金资助项目(82371122, 82071807); 广东省自然科学基金资助项目(2022A1515012617); 深圳市科技创新委员会(JCYJ20210324142207019); 深圳市龙岗区科技发展专项资金(LGKCYLWS2023008, LGKCYLWS2023023, LGKCYLWS2022031)

通信作者: 刘志强. E-mail: 1033622665@qq.com

由尘螨、植物花粉等过敏原引起的过敏性疾病已成为危害患者健康的公共卫生问题^[1-2],其机制为致敏原引起的机体局部黏膜免疫功能异常,导致以 Th2 细胞极化、特异性 IgE 释放、肥大细胞脱颗粒及嗜酸性粒细胞浸润为特征的过敏性炎症反应^[3]。过敏原特异性免疫疗法 (Allergen specific immunotherapy, AIT) 被认为是能够干预过敏性疾病自然进程的对因治疗方法,可以阻止过敏性鼻炎向哮喘发展^[4-5],然而其疗程长、患者依从性较差、安全性也有待进一步提高^[6],且临床上维持治疗效果的剂量很难达到^[7]。随着基因工程、分子生物学技术的发展,建立在过敏原蛋白序列分析基础上构建的新型表位疫苗、基因疫苗已经成为过敏性疾病免疫治疗的研究热点^[8-9]。将过敏原 B 细胞表位区融合于非致敏蛋白载体上的 B 细胞表位疫苗有望为过敏性疾病治疗提供新的发展策略^[8]。尘螨是主要吸入性过敏原,其导致的相关过敏性疾病在世界范围内流行,发病率大概为 1%~2%,Der p1 和 Der p2 作为两种屋尘螨主要的过敏原,在呼吸道过敏患者中,其血清特异性 IgE 抗体阳性率达到 80%~85%^[10]。本研究将探讨 Der p2 B 细胞表位 RNA 疫苗的构建及其对过敏性鼻炎小鼠特异性 IgE 的抑制作用,为尘螨引起的呼吸道过敏性疾病新型特异性免疫治疗方法研究提供前期基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

胎牛血清 (Thermofisher 公司,美国), CD4、CD25、Foxp3、ROR γ t 荧光抗体 (ebioscience 公司,美国), 血蓝蛋白 (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) (Thermofisher 公司,美国), 重组 Der p2 蛋白 (Ray Biotech, 美国), HRP 标记的抗鼠、抗人 IgE、IgG4 抗体 (Southern Biotech, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 屋尘螨过敏原 Der p2 的 B 细胞表位预测

采用 ABCpred 和 BepiPred 软件预测 Der p2 (GenBank: AF276239.1) 潜在的 B 细胞表位。应用 DNASTAR 软件及线上蛋白二级结构分析系统对预测的 B 细胞表位亲水性、柔韧性、表面可能性和二级结构进行分析,并对预测得到的 B 细胞表位进行 WHO 过敏原数据库分析比对。

1.2.2 将 B 细胞表位与 KLH 偶联

采用戊二醛偶联法将合成的 B 细胞表位肽与血蓝蛋白 (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) 偶联使其获得 T 细胞辅助发挥免疫原性产生抗体。将

KLH 与多肽混合,然后应用戊二醛法交联,以甘油封闭为反应的戊二醛将二者偶联。

1.2.3 B 细胞表位肽的 IgE 反应性检测

ELISA 法检测 Der p2 B 细胞表位的 IgE 反应性,包被 5 μ g/mL 的重组 Der p2 蛋白 (rDer p2)、KLH-Der p2 多肽 1-4、KLH 蛋白,3% BSA 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;收集尘螨过敏性患者血清作为一抗 (每组 18 例患者血清),以正常人血清为阴性对照,室温孵育 2 h;鼠抗人 IgE 抗体为二抗,按照 1:2 000 稀释,室温孵育 1 h;显色后酶标仪检测 OD_{450} 吸光度。

1.2.4 B 细胞表位肽诱导产生的特异性 IgG 抑制尘螨过敏患者 IgE 效率

分别用 rDer p2、KLH-Der p2 的 B 细胞表位肽免疫兔子,1 次/月,200 μ g/次,共 3 次;收集免疫前和三次免疫后的兔血清。检测免疫前后 Der p2 特异性 IgG 抗体水平,获得四段 B 细胞表位肽的兔免疫特异性 IgG 抗体。然后包被重组 Der p2 (0.5 μ g/well) 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗板两次。加入兔抗 Der p2 抗血清、四种兔抗 Der p2 B 细胞表位肽抗血清、免疫前血清 (PBST, 0.5% (w/v) BSA, 稀释 1:100), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗板后,用屋尘螨过敏患者血清 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (1:10 稀释)。加入 HRP-山羊抗人 IgE 抗体 (KPL), 显色后酶标仪检测 OD_{450} 吸光度。IgE 结合抑制率用 $100 - (OD_s / OD_p) \times 100\%$ 计算, OD_s 和 OD_p 分别代表兔抗血清和免疫前血清。

1.2.5 Der p2 B 细胞表位 RNA 疫苗的构建

将上述步骤预测的四段 Der p2 B 细胞表位肽 (见表 1) 连接到载体蛋白 Pre S (GenBank: AAT28735.1) 上^[11],中间以连接序列相连接,并在整个序列起始处添加信号肽序列。mRNA 疫苗由生工生物工程 (中国上海) 股份有限公司制备。简要制备步骤:利用基因工程制备出用于转录的质粒 DNA,以编码特定 mRNA 序列。以 DNA 为模板转录 RNA,获得初始的 mRNA 分子。将帽子结构 (Cap) 添加至 mRNA 的 5' 端,3' 端多聚腺苷酸尾、5' 和 3' 非翻译区、编码区等进行修饰,提高 mRNA 的稳定性与翻译效率。将合成的 mRNA 放入色谱柱中进行纯化,除去杂质。

1.2.6 实验动物及分组

选用雌性 6~8 周龄 Balb/c 健康小鼠 18 只,购于广东省医学实验动物中心。随机分成 3 组,每组 6 只,分为对照组 (Control)、模型组 (AR)、RNA 疫苗治疗组。按照图 1 流程,进行小鼠过敏性鼻炎建模,并给予 RNA 疫苗治疗。分别在 0、7、14 d 致敏小鼠,AR 组及 RNA 疫苗治疗组每次经皮下注射

5 μg Der p2 重组蛋白+5 μg 尘螨粗提蛋白和霍乱毒素 (CT) 10 μg, Control 组用 PBS 代替。模型建立的第 4 周, AR 组及 RNA 疫苗治疗组从第 21 天开始经 5 μg Der p2 重组蛋白+5 μg 尘螨粗提蛋白鼻腔激发, 1 次/d, 共 7 d。RNA 疫苗治疗组在 35、42、

49 d, 经皮下注射方式给予经脂质体包裹 RNA 疫苗治疗 (10 μg/只), 第 56 天再次给予小鼠滴鼻激发, 24 h 后处死小鼠, 收集小鼠外周血, ELISA 及流式细胞仪分析。

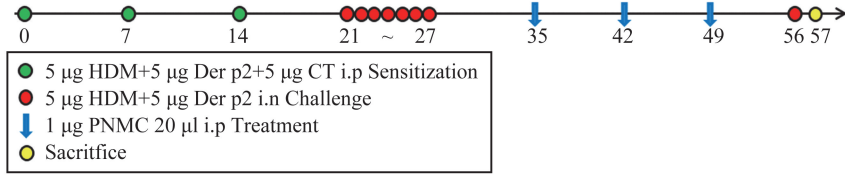


图 1 过敏性鼻炎小鼠模型建立及免疫治疗流程图

Figure 1 Flow chart depicting the establishment of a mouse model for allergic rhinitis and its immunotherapy

1.2.7 血清 Der p2 特异性 IgE、IgG4 检测

采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测小鼠血清中 Der p2 特异性抗体含量, 在酶标板中分别加入 100 μL 5 μg/mL 的 rDer p2 蛋白 4 °C 包被 12 h, 去除抗原包被液, 洗涤 3 次后用 3% 的牛血清白蛋白 4 °C 封闭过夜, 弃封闭液后, 加入稀释后的各组小鼠血清 (按照 IgE 1:5, IgG 1:1 000 的比例用 1% BSA-PBST 稀释), 于室温下孵育 2 h, 弃血清, 洗涤 5 次; 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠 IgE、IgG4 抗体, 按照 1:2 000 稀释, 室温孵育 1 h, 显色后酶标仪检测 OD₄₅₀ 吸光度。

1.2.8 流式细胞分析

收集各组小鼠脾细胞, 梯度离心分离外周血单个核细胞, 经 PBS 液清洗 3 次, 用 1% 的胎牛血清封闭 30 min, 加入抗 CD4 和 CD25 荧光抗体染色 30 min, 随后用多聚甲醛固定 15 min 后, 穿孔液穿孔 30 min, 加入 Foxp3, RORγt 荧光抗体染色, 4 °C 冰箱

孵育过夜, 经 PBS 液清洗后, 流式细胞仪分析各组中 Treg, Th17 细胞比率变化。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 进行数据分析, 多样本均数间比较采用单因素方差分析, 进一步采用 Tukey's test 进行组间比较。以 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 屋尘螨过敏原 Der p2 的 B 细胞表位预测

经 ABCpred、BepiPred 分析软件在线分析尘螨主要过敏原 Der p2 (GenBank: AF276239.1) 蛋白序列, 预测得到四段 B 细胞表位肽区域, 分别为 P16-33 (P1)、P87-106 (P2)、P102-121 (P3)、P73-92 (P4), 见表 1。预测的 B 细胞表位在 Der p2 蛋白表面展示, 见图 2。

表 1 预测的 B 细胞表位肽段

Table 1 Predicted B-cell epitope peptide segments

位点	序列	大小	命名
P ₁₆₋₃₃	RDQVDVKDCANHEIKKVL	18aa	P1
P ₈₇₋₁₀₆	NACHYMKCPLVKGQQYDIKY	20aa	P2
P ₁₀₂₋₁₂₁	YDIKYTWNVPKIAPKSENVV	20aa	P3
P ₇₃₋₉₂	SIDGLEVDVPGIDPNACHYM	20aa	P4

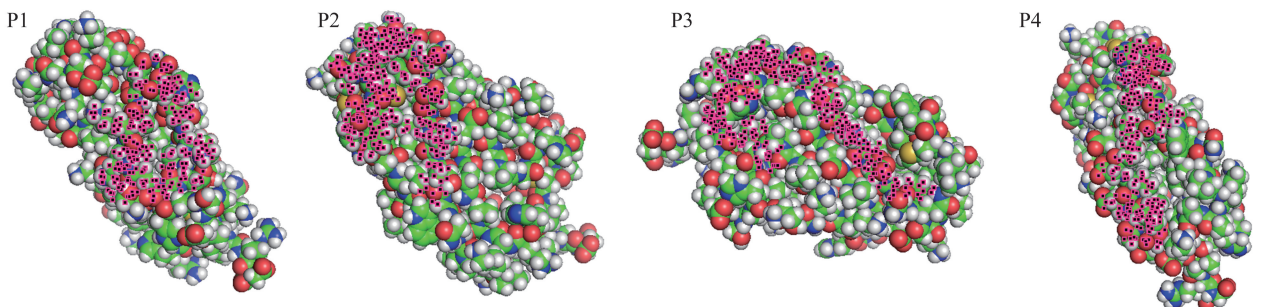


图 2 4 段预测的 B 细胞表位肽在 Der p2 表面展示; 红点标记部分为预测的 B 细胞表位肽序列

Figure 2 Four predicted B-cell epitope peptides are presented on the surface of Der p2 (marked with red dots)

2.2 IgE 反应性分析及 IgG 抑制 IgE 效率

经上海强耀生物科技公司合成预测的四段 B 细胞表位肽,并与血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)偶联形成完全抗原,ELISA 法检测各肽段与尘螨过敏患者阳性血清 IgE 反应性。

结果显示,与 Derp2 阳性对照组相比,P1、P2、P3、P4 均呈 IgE 低反应性,结果具有统计学意义

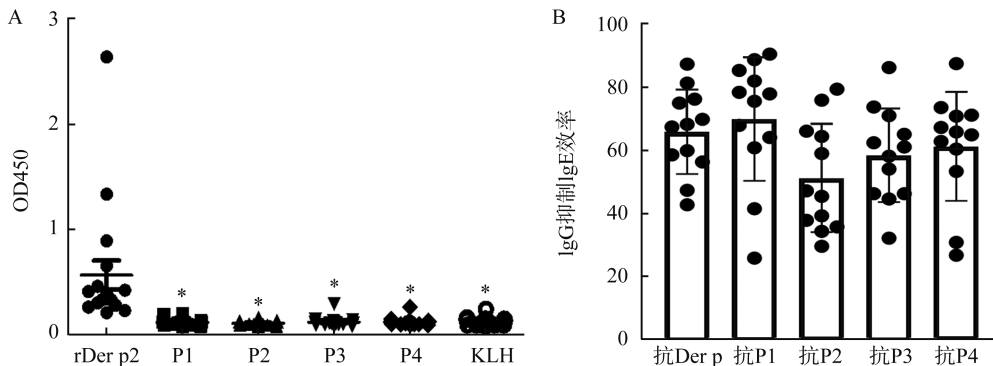


图 3 B 细胞表位肽 IgE 反应性及 IgG 抑制 IgE 效率分析

A: 各段 B 细胞表位肽 IgE 反应性; B: 产生的特异性 IgG 抑制 IgE 效率分析

* 与重组 Der p2 (rDer p2) 组相比, P1、P2、P3、P4、KLH 对照组 IgE 反应性均较低 ($P < 0.001$)

Figure 3 Reactivity of IgE to B-cell epitope peptide and inhibitory efficacy of specific IgG against IgE

A: Reactivity of IgE to B-cell epitope peptide; B: The inhibitory efficacy of specific IgG against IgE

* IgE reactivity in P1, p2, P3, P4, and KLH controls was lower than in recombinant Der p2 (rDer p2) group ($P < 0.001$)

2.3 mRNA 疫苗可降低外周血特异性 IgE 提高 IgG4 水平

将 4 段 Der p2 B 细胞表位肽连接到载体蛋白 Pre S (GenBank: AAT28735.1) 上, 构建分泌型 mRNA 疫苗, mRNA 疫苗经脂质体包裹后用皮下注

($P < 0.001$) (见图 3A)。经四段 B 细胞表位肽免疫兔子, 获得 B 细胞表位特异性 IgG 抗体, 经 ELISA 检测, 显示 P1 特异性 IgG 抑制尘螨过敏患者 IgE 效率为 69.93%, P2 为 51.21%, P3 为 58.46%, P4 为 61.30%, 而抗 Der p2 蛋白特异性 IgG 抑制效率为 65.91% (见图 3B), 提示选取的四段 B 细胞表位肽具有一定的竞争性抑制 IgE 的功能。

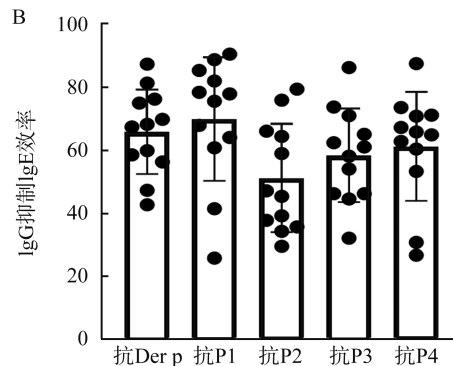


图 4 mRNA 疫苗治疗对小鼠外周血尘螨特异性 IgE、IgG4 水平影响

A: IgE 表达; B: IgG4 表达

* 与 AR 组相比 $P < 0.05$

Figure 4 The impact of mRNA vaccine treatment on the levels of specific IgE and IgG4 antibodies against dust mite.

A: Expression of IgE; B: Expression of IgG4

* Compared with AR group ($P < 0.05$)

2.4 mRNA 疫苗治疗对 Treg、Th17 细胞的影响

无菌取各组小鼠脾细胞, 分离单个细胞, 经抗 CD4、抗 CD25、抗 Foxp3、抗 ROR γ t 荧光抗体染色, 流式细胞仪检测各组小鼠中 CD4+CD25+Foxp3+T

细胞及 CD4+ROR γ t+T 细胞比率变化。结果显示, 经 mRNA 疫苗治疗后, 外周血中的 Treg 细胞比率有所增加, 而 Th17 细胞降低, 差异具有统计学意义, 见图 5。

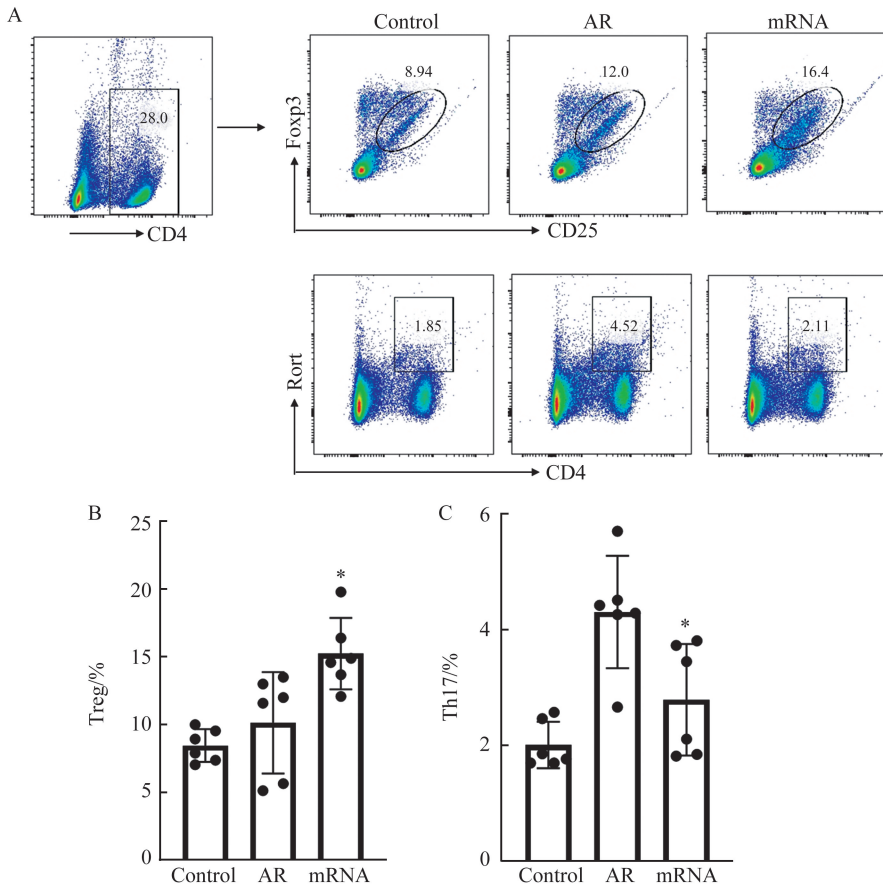


图 5 mRNA 治疗对小鼠脾脏中 Treg、Th17 细胞比率影响
A: 流式分析; B: Treg 细胞统计分析图; C: Th17 细胞统计分析柱状图
* 与 AR 组相比 $P < 0.05$

Figure 5 The impact of mRNA therapy on the Treg/Th17 cell ratio in the spleen
A: Flow cytometry analysis; B: Histogram of the Treg statistical analysis; C: Histogram for Th17 cells
* Compared with AR group ($P < 0.05$)

3 讨论

呼吸道过敏性疾病是外界致敏原作用于易感个体导致的局部黏膜以 Th2 细胞极化、特异性 IgE 释放、嗜酸性粒细胞浸润等为特征的过敏性炎症反应^[12]。目前,除了对症治疗外,寻求安全有效、便捷的对因治疗策略仍存在诸多挑战。既往研究中,建立在过敏原序列分析基础上的新型过敏原特异性免疫疗法(AIT)已有较多尝试,并取得了一定的治疗效果。研究显示^[13],重组过敏原疫苗与尘螨粗提液相比显示了同样的治疗效果,并减少了粗提液可能带来的不良反应。为进一步优化,减少 AIT 疗法可能诱导的 IgE 反应,构建的低致敏性过敏原衍生物疫苗,如重组过敏原 T 细胞表位疫苗,突变过敏原位点疫苗等显示了较好的疗效,并已进入了临床 II 期实验^[14-15]。然而,T 细胞表位疫苗仍易引起 T 细胞介导的迟发性过敏反应。通过对过敏原蛋白序列分析,尽可能去除其中的 T 细胞表位区,选取部

分 B 细胞表位区肽段,通过基因重组的方式连接到非致敏型载体蛋白上,构建的 B 细胞表位疫苗具有明显的优势,研究显示,B 细胞表位疫苗可抑制 IgE 产生,促进 B 细胞分化,显示了良好的治疗效果^[16]。针对草花粉过敏的 B 细胞表位疫苗可明显降低过敏患者 T 细胞增殖及 IgE 反应,抑制嗜碱性粒细胞脱颗粒^[15]。尘螨作为主要的吸入性过敏原,Der p2 在过敏性哮喘中具有较高的血清阳性率,本研究中预测了 Der p2 的 B 细胞表位,合成的 B 细胞表位肽具有较低的 IgE 反应性,经免疫兔子获得的特异性 IgG 抗体具有一定的竞争性抑制 IgE 的功能,用四段 Der p2 的 B 细胞表位肽构建的 mRNA 疫苗,通过皮下注射方式给予过敏性鼻炎小鼠进行治疗,可明显抑制小鼠体内特异性 IgE 反应,提高中和抗体 IgG4 水平。提示 Der p2 的 B 细胞表位疫苗可能具有抑制尘螨诱导的过敏性炎症的作用。

基因疫苗是通过将编码抗原的编码基因以 DNA 或 RNA 的形式,直接导入到机体细胞内,通过

宿主细胞表达合成抗原并诱导机体产生对该抗原的免疫反应的一类疫苗,可起到预防或治疗疾病的作用^[17]。目前,国内外针对过敏性疾病的基因疫苗治疗方面仍处于探索阶段,与 DNA 疫苗相比,mRNA 疫苗可在细胞外迅速降解、没有整合宿主 DNA 的风险,更适合用作过敏性疾病的治疗性疫苗的研发^[18,19]。动物实验显示,皮下注射梯牧草花粉过敏原 mRNA 疫苗可抑制 IgE 反应,减轻过敏症状^[20]。本研究中,我们将 Der p2 的 B 细胞表位肽融合于非致敏载体蛋白上,并构建了分泌型 mRNA 疫苗,结果显示可明显降低小鼠特异性 IgE 反应,并提高小鼠体内调节性 T 细胞的比率。既往国内外研究中,将 mRNA 技术用于过敏性疾病的治疗性研究仍有待进一步探讨,我们创新性地将过敏原 B 细胞表位疫苗构建后以 mRNA 的形式递送,用于呼吸道过敏炎症的治疗,可避免重组蛋白疫苗等治疗方式引起的超敏反应且安全便捷,有望为呼吸道过敏性疾病新型 AIT 治疗策略的研发提供理论基础。本研究针对呼吸道过敏性疾病新型特异性免疫治疗策略方面做了初步探讨,研究仍存在一定局限性,如对预测的过敏原 B 细胞表位肽前期鉴定工作及 mRNA 疫苗在体内存在时间、表达等情况仍需进一步探讨、完善。

总之,本研究初步构建了尘螨主要过敏原 Der p2 的 B 细胞表位 RNA 疫苗,其 B 细胞表位肽具有较低的 IgE 反应性,经 RNA 的方式皮下给予过敏小鼠,可明显抑制小鼠尘螨特异性 IgE 反应。

参考文献:

[1] Zhang Y, Lan F, Zhang L. Advances and highlights in allergic rhinitis [J]. *Allergy*, 2021, 76(11): 3383-3389. doi:10.1111/all.15044

[2] 程雷,钱俊俊,田慧琴. 变应性鼻炎研究的若干进展 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2017, 31(3): 1-3. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.1.2017.021

CHENG Lei, QIAN Junjun, TIAN Huiqin. Research progresses on allergic rhinitis [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2017, 31(3): 1-3. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.1.2017.021

[3] Bousquet J, Anto JM, Bachert C, et al. Allergic rhinitis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 95. doi: 10.1038/s41572-020-00227-0.

[4] Durham SR, Shamji MH. Allergen immunotherapy: past, present and future [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(5): 317-328.

[5] 庞冲,边赛男,张冰,等. 儿童过敏性鼻炎粉尘螨特异性舌下免疫治疗短期疗效评估 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2022, 36(1): 70-74. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.

2021.117

PANG Chong, BIAN Sainan, ZHANG Bing, et al. Short-term effect of *Dermatophagoides farinae* specific sublingual immunotherapy for children with allergic rhinitis [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2022, 36(1): 70-74. doi: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.117

[6] Lee SP, Shin YS, Kang SY, et al. Recent advances in allergen-specific immunotherapy in humans: a systematic review [J]. *Immune Netw*, 2022, 22(1): 12. doi:10.4110/in.2022.22.e12

[7] Cantone E, Gallo S, Torretta S, et al. The role of allergen-specific immunotherapy in ENT diseases: a systematic review [J]. *J Pers Med*, 2022, 12(6): 946. doi:10.3390/jpm12060946

[8] Valenta R, Campana R, Niederberger V. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes [J]. *Immunol Lett*, 2017, 189: 19-26. doi:10.1016/j.imlet.2017.04.015

[9] Niederberger V, Neubauer A, Gevaert P, et al. Safety and efficacy of immunotherapy with the recombinant B-cell epitope-based grass pollen vaccine BM32 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(2): 497-509.e9. doi:10.1016/j.jaci.2017.09.052

[10] Huang HJ, Sarzsinszky E, Vrtala S. House dust mite allergy: the importance of house dust mite allergens for diagnosis and immunotherapy [J]. *Mol Immunol*, 2023, 158: 54-67. doi:10.1016/j.molimm.2023.04.008

[11] Qin QZ, Tang J, Wang CY, et al. Construction by artificial intelligence and immunovalidation of hypoallergenic mite allergen Der f 36 vaccine [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1325998. doi:10.3389/fimmu.2024.1325998

[12] Cevhertas L, OguLur I, Maurer DJ, et al. Advances and recent developments in asthma in 2020 [J]. *Allergy*, 2020, 75(12): 3124-3146. doi:10.1111/all.14607

[13] Pavón-Romero GF, Parra-Vargas MI, Ramírez-Jiménez F, et al. Allergen immunotherapy: current and future trends [J]. *Cells*, 2022, 11(2): 212. doi:10.3390/cells11020212

[14] Nony E, BouLey J, Le Mignon M, et al. Development and evaluation of a sublingual tablet based on recombinant Bet v 1 in birch pollen-allergic patients [J]. *Allergy*, 2015, 70(7): 795-804. doi:10.1111/all.12622

[15] Focke-Tejkl M, Weber M, Niespodziana K, et al. Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(5): 1207-1207.e1-11. doi:10.1016/j.jaci.2014.09.012

[16] Moten D, Kolchakova D, Todorov K, et al. Design of an epitope-based peptide vaccine against the major aller-

- gen amb a 11 using immunoinformatic approaches [J]. *Protein J*, 2022, 41(2): 315-326. doi:10.1007/s10930-022-10050-z
- [17] Sung YK, Kim SW. Recent advances in the development of gene delivery systems [J]. *Biomater Res*, 2019, 23: 8. doi:10.1186/s40824-019-0156-z
- [18] Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, et al. Immunize and disappear-safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(5): 1070-1077. e1-11. doi:10.1016/j.jaci.2009.06.036
- [19] Oğuz F, Atmaca H. mRNA as a therapeutics: understanding mRNA vaccines [J]. *Adv Pharm BuLi*, 2022, 12(2): 274-282. doi:10.34172/apb.2022.028
- [20] Hattinger E, Scheiblhofer S, Roesler E, et al. Prophylactic mRNA vaccination against allergy confers long-term memory responses and persistent protection in mice [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 797421. doi:10.1155/2015/797421
- (编辑:李纬)
-
- (上接第 5 页)
- [16] Subtil J, Araújo JP, Saraiva J, et al. Informed treatment consent and refusal in advanced endonasal surgery: the ethical dilemma of olfaction sacrifice in surgery for chronic rhinosinusitis with polyposis [J]. *Acta Med Port*, 2015, 28(4): 513-516
- [17] Frari V, Capuano F, Micera A, et al. The potential role of trans-resveratrol/carboxymethylated (1.3/1.6)- β -d-glucan minimizing symptoms and improve healing after functional endoscopic sinus surgery [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(23): 12395-12399. doi:10.26355/eurrev_202012_24034
- [18] Belsky MA, Corredera E, Banerjee H, et al. Association of mast cell burden and TIM-3 expression with recalcitrant chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2021, 130(9): 1069-1077. doi:10.1177/0003489421995038
- [19] Kupferberg SB, Bent JP. Allergic fungal sinusitis in the pediatric population [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1996, 122(12): 1381-1384. doi:10.1001/archotol.1996.01890240087019
- [20] Huang HM, Cheng JJ, Liu CM, et al. Mucosal healing and mucociliary transport change after endoscopic sinus surgery in children with chronic maxillary sinusitis [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2006, 70(8): 1361-1367. doi:10.1016/j.ijporl.2006.01.016
- [21] Gupta S, Chittoria RK, Chavan V, et al. Role of burn blister fluid in wound healing [J]. *J Cutan Aesthet Surg*, 2021, 14(3): 370-373. doi:10.4103/JCAS.JCAS_90_19
- [22] Yoo K, Suh KY, Choi GH, et al. Serial changes of heat shock protein 70 and interleukin-8 in burn blister fluid [J]. *Ann Dermatol*, 2017, 29(2): 194-199. doi:10.5021/ad.2017.29.2.194
- [23] Chen WY, Wang WB, Zhou LL, et al. Elevated AST/ALT ratio is associated with all-cause mortality and cancer incident [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(5): e24356. doi:10.1002/jcla.24356
- [24] Aksoy MNM, Turna F, Sahin I, et al. Is AST/ALT ratio a predictor of In-hospital mortality in pulmonary embolism patients [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2022, 32(2): 171-176. doi:10.29271/jcpcsp.2022.02.171
- [25] A Y, R V. The Study of De Ritis (Ast/Alt) Ratio in Comparision with Other Parameters for Predicting Poor Prognosis in Covid 19 Patients [J]. *J Assoc Physicians India*, 2022, 70(4): 11-12
- [26] Pan SC, Wu LW, Chen CL, et al. Angiogenin expression in burn blister fluid: implications for its role in burn wound neovascularization [J]. *Wound Repair Regen*, 2012, 20(5): 731-739. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00819.x
- (编辑:曾婕)