

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2320-B002-108

執行期限：90年8月1日至91x年7月30日

主持人：胡忠怡 台大醫學院 醫事技術學系

共同主持人：許秉寧 台大醫學院 免疫學研究所

一、中文摘要

臨床報告顯示30-70%氣喘病童於青春後氣喘症狀有明顯改善。欲探討塵蟎過敏性氣喘患者後續氣喘症之臨床表現與塵蟎過敏原特異性抗體、及塵蟎過敏原特異性T細胞的細胞素表現型的關聯。收集確定診斷有塵蟎過敏性氣喘病史個案49例，依近一年內是否有氣喘發作分為兩組：症狀改善組(23例)、症狀持續組(26例)。偵測個案血清中Der p2特異性抗體，結果發現兩組個案間IgE、IgG抗體效價無顯著差異。顯示病人血清中塵蟎過敏原特異性IgE抗體效價並非決定氣喘症之後續臨床表現的因子。比較兩組個案體內塵蟎過敏原特異性細胞針對Der p2刺激產生細胞素IFN γ 、IL4的差異性。以細胞內cytokine染色配合流式細胞儀分析Der p2或Der p2及PMA/Ionomycin刺激之PBMCs產生IFN γ 或IL4的細胞比例與氣喘的後續症狀是否緩解無關。分析僅加Der p2刺激的PBMC亦顯示週邊血液淋巴球中產生IFN γ 及IL4的細胞比例與氣喘症狀緩解與否並無直接相關。欲了解塵蟎過敏原特異性IgE抗體及Th cells與氣喘後續症狀是否緩解的關聯，進一步分析呼吸道組織中mast cells的細胞數目及其表面上的IgE受體/IgE術表現情形、呼吸道中塵蟎過敏原特異性lymphocyte subsets及其產生之cytokines亦將不可避免。

關鍵詞：家塵蟎、Der p2過敏原、過敏原特異性IgE抗體、氣喘、臨床表現、細胞素IFN γ /IL4

Abstract

Some of the asthmatic children grow out of the disease after adolescence. Although allergen-specific Th2 cells, the Th2 cytokines, and allergen-specific IgE are important in the pathogenesis of the development of asthma. The immunological basis underlying the improvement of asthmatic clinical manifestation remained undefined. For investigating of the possible factors contribute to the improvement of clinical manifestation of asthma, we recruited 49 adult subjects with history of HDM-sensitive asthma and studied their serum Der p2-specific antibodies as well as T cell response to Der p2. Among these subjects, 23 (46.9%) had improved clinical manifestation (group AS/N) with no asthmatic attack for at least 24 months, whereas 26 (53.1%) of them had recurrent asthmatic attacks (group AS/Y) and had at least one asthmatic attack within 12 months. The status of clinical manifestation was not correlated to subjects' gender, age-of-disease onset, presence of atopic dermatitis or practicing specific immunotherapy. The level of sera Der p2-specific IgE and IgG antibodies did not show correlation with the clinical manifestation. To investigate the Der p2-specific Th cytokines IFN γ /IL4 production, PBMCs were collected and stimulated with rDer p2 or rDer p2 plus PMA/Ionomycin and subjected to intracellular cytokine staining. It revealed that the proportion of IFN γ or IL4-producing PBLs in response to Der p2 stimulation did not differ between asthmatic subjects with different clinical manifestation. These results indicated that it would become inevitable to study the number of mast cells, number of Fc ϵ RI/IgE on mast cells and the HDM allergen-specific T cell subsets and their cytokines in the inflammatory airway to get a clear picture of allergen-specific IgE, T subsets and their roles in determining clinical manifestation of mite-sensitive asthma in adulthood.

Keywords: House dust mite (HDM), Der p2 allergens, asthma, clinical manifestation, Th cells, IFN γ , IL4

二、緣由與目的

幼時罹患氣喘的病童往往在步入青春期後就逐漸脫離氣喘的陰影，在國外長期追蹤報告中過敏性氣喘大部份(80%)皆在六歲前發病，但到青春期時，27%的病童已不再有氣喘發作(1)檢視病童序列血清中塵蟎特異性IgE及IgG抗體則可發現大部份病人的兩種抗體效價皆持續下降，然而塵蟎特異性抗體IgE效價的降低或消失卻無法和症狀緩解有直接關聯，因為許多到青少、成年仍維持氣喘症狀的病人血清中塵蟎特異性IgE效價也降低或消失(2-4)。

追蹤接受塵蟎減敏治療(specific immunotherapy, SIT)有反應的病患，可發現對塵蟎觸發的氣管過敏、皮膚試驗、淋巴球分裂、眼鼻及呼吸道黏膜反應及氣喘發作症狀皆有顯著的減緩。同時檢測病人臨床及免疫指標可發現受過敏原挑釁時，鼻道內mast cell及匯入氣管eosinophil亦減少。病人血清中的塵蟎特異性IgE效價起先增高，然後才逐漸降低到治療前效價以下，並且病人血清中可測到塵蟎過敏性IgG₄抗體次群(blocking antibody)。在治療初期，皮膚試驗敏感度下降時正是塵蟎特異性IgE效價增高期，且IgG₄ blocking antibody在此階段則尚未產生，暗示塵蟎特異性IgE雖被認為是引發mast cells敏感化進而引發過敏性免疫反應的重要分子，但卻和SIT初期氣喘的症狀表現變化沒有直接關係(5)。觀察以Der p2刺激週邊血液T細胞產生細胞素的變化則發現SIT後Der p2特異性T細胞產生IFN γ 及IL4皆降低(6)或見IL4產生減少而IFN γ 無顯著變化(7)。或有研究指出SIT後週邊血液PBMC在PMA與Ionomycin刺激下，產生IFN γ 的細胞比例較SIT前顯著增加，而產生IL4的細胞則無變化(5)。雖然各研究採用的SIT治療方式與時程不一，對PBMC刺激的方法也不同，但可結論出若減敏療法有效果，則病人血液中T細胞的cytokine產生形態會有變化，IL4/IFN γ 比例可望下降。由SIT治療後相關免疫分析似乎指向Th2 cytokines抑制或Th1 cytokines增加可減緩氣喘發作及呼吸道的發炎反應。另一方面，部份研究亦顯示Th1細胞素與氣喘發作時呼吸道中發炎反應密切相關：首先，呼吸道病毒感染(可引起強烈的Th1免疫反應)在臨床上是十分重要的氣喘誘發因子(8)。其次，由氣喘病人BAL中分離出的T細胞(9)或養成的細胞線用PMA/Ionomycin刺激後以細胞內細胞素染色可見產生IFN γ 的細胞數較非氣喘對照組為高。由此看來，Th1與Th2細胞在過敏性氣喘發作時呼吸道中產生發炎反應的致病過程中扮演的角色至今仍未定論。

三、結果

1. 氣喘病史患者的後續臨床表現

研究中網羅49名有氣喘病史者，包括23名男性，26名女性。年齡介於15至67歲間，氣喘病史達6至57年。男性個案中11名(47.8%)，女性

個案中12名(46.6%)參加本研究時仍有反覆氣喘發作，最後一次發作發生於十二個月內，被歸類為氣喘再發組(AS/Y)，其餘受試者在受訪前二年之內都不曾有氣喘發作，歸類為氣喘無再發(症狀緩解)組(AS/N)。男性個案中20人(87%)在十歲前發病(幼年發病 childhood onset)。女性個案幼年發病比例(14/26, 53.8%)明顯低於男性個案(卡方檢定 $p=0.021$)。然個案是否仍有反覆氣喘發作與性別或是否為幼年發病沒有顯著相關(幼年發作者47.1%常再發，非幼年發作者46.7%常有再發)。受試者中29例曾經或正在接受塵蟎減敏治療(SIT)，但有無接受減敏治療也與氣喘是否常反覆發作無關聯(接受SIT個案48.3%常氣喘發作，未接受SIT個案45%常氣喘發作)。30個案(61.2%)同時併有異位性皮膚炎(atopic dermatitis, AD)，然而是否併發異位性皮膚炎亦與氣喘近期反覆發作無關(有AD個案52.6%，無AD個案43.3%常有氣喘發作)。總言之，本研究網羅的塵蟎過敏性氣喘病史個案中，約有半數仍持續有反覆氣喘發作(AS/Y組)，另外一半則氣喘症狀已緩解，二年之內沒有氣喘發作(AS/N組)，近期反覆性氣喘發作與病人性別、是否為幼年發病、是否接受減敏治療或併發有異位性皮膚炎並無直接相關。

2. 氣喘後續症狀與塵蟎過敏原 Der p2 特異性 IgE、IgG 抗體效價的相關性：

比較AS/Y與AS/N組之Der p2特異性IgE、IgG抗體效價(以A₄₀₅與臍帶血液之A₄₀₅比值表示為吸光度單位(AU, absorption unit)，雖然在氣喘持續反覆發作組之IgE(AU)單位中值(6.3)較症狀緩解組(5.7)略高，但二組數據間並無統計上顯著差異。Der p2 specific IgG的level在氣喘再發組(median AU%=85.4%)及症狀緩解組(median AU%=84.6%)亦無差異(圖一)。雖然病患在診斷時都曾經確認為塵蟎過敏的個體，但將近半數的受試者目前IgE的AU單位甚至低於5。比較所有受試者，無論IgE單位高或低，其IgG的吸光度單位(absorption unit AU%)並無顯著差別(data not shown)，在氣喘近期發作病例組(AS/Y)與症狀緩解個案組(AS/N)皆可見IgE或IgG效價極低者，除氣喘反覆發作組外，氣喘症狀緩解組(AS/N)中亦可見IgE效價極高(>50AU)的例子，顯示出有氣喘病史患者其氣喘症狀改善與否與血液中塵蟎主要過敏原Der p2特異性IgE及IgG抗體效價並無絕對關聯。

3. 週邊血液 Der p2-specific lymphocytes 產生 cytokine IFN γ /IL4 與氣喘後續症狀的相關性

以細胞內細胞素染色分析純粹以Der p2刺激48小時的PBMC，可發現大部份檢體都可染出一小群產生IL4的細胞，但IFN γ 產生細胞群卻非常少(圖二)。若將PBMC培養44小時後，繼續以PMA/Ionomycin(P/I)施以強刺激4小時，則可同時清楚染出IFN γ 及IL4產生淋巴細胞(PB lymphocyte, PBL)，PMA/Ionomycin會顯著upregulate IFN γ 的表現，但對IL4表現則沒有太大的影響(圖二)。

比較AS/Y與AS/N兩組有氣喘病史的個案及10名無塵蟎過敏或氣喘病的健康成人(control. C組)，若以Der p2與P/I刺激PBMC，則兩組家塵

蟎過敏性氣喘個案之淋巴球 (PBLs) 產生 IL4 細胞的比例皆略高於非塵蟎過敏對照組，但未達統計上顯著差異 [圖三]，其中 CD4⁺PBs 中產生 IL4 的比例相差尤為顯著 (data not shown)。PBMC 在 Der p2 加 P/I 刺激下，大幅 upregulate 產生 IFN γ 細胞。然而比較 AS/Y、AS/N 之 IFN γ 產生細胞比例相近，不見明顯差異。若僅以 Der p2 刺激 PBMC 48 小時，則 AS/Y、AS/N 與 C 組 PBLs 中產生之 IFN γ 與 IL4 比例皆不見顯著差別 [圖四]。鑑於流式細胞儀偵測值是染色陽性細胞的比例，而非實際細胞數，若配合受試者採血時採血量、分離出 PBMC 細胞總數、圈選活 PBsL 所佔百分比等數據，可估算出個體的單位週邊血液中的 PBLs 數目，再與 IFN γ 、IL4 染色呈陽性細胞比例值估算出週邊血液中 PBMCs 在受 Der p2 短期刺激可以產生 IFN γ 及 IL4 的 PBLs 數目。比較 AS/Y 與 AS/N 兩組之 PBLs 數目無顯著差異，比較推估得產生 IFN γ 的 PBLs 細胞數，雖然數目很少，但發現有反覆氣喘發作組 (AS/Y) 顯著高於氣喘症狀緩解組 (AS/N)，而比較推估得產生 IL4 細胞的數目則與氣喘症狀是否緩解無顯著關聯 (data not shown)。利用 intracellular cytokine staining 檢測結果顯示，利用 Der p2 刺激 PBMC 只可見到極少數可產生 IFN γ 及 IL4 的細胞，且 PBL 中產生 IFN γ 及 IL4 的細胞比例和氣喘病症狀的後續發展是否緩解沒有關聯，而在 Der p2 配合 PMA/Ionomycin 的強烈刺激下雖可大幅提昇 IFN γ production，但可能因亦同時激發了所有有能力產生 IFN γ 的細胞皆產生 IFN γ ，所以無法看出 IFN γ 產生細胞的比例與氣喘後續症狀的關聯，但曾有塵蟎過敏性氣喘的病人 PBLs 產生 IL4 的細胞比例則略高於非塵蟎過敏對照組。總之，PB lymphocytes 中可針對 Der p2 刺激產生 IFN γ 或 IL4 的細胞比例都和過敏性氣喘後續症狀是否緩解無關。

四、討論與自評

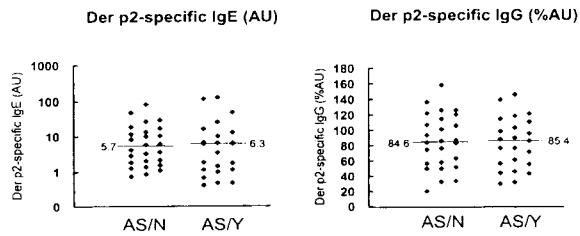
本研究以 Der p2 對 PBMC 行短暫刺激，用 intracellular cytokine stain 分析即可看到染出 IL4 的細胞，但染出 IFN γ 的細胞只見不十分顯著的螢光偏移，比較二組有過敏性氣喘病史的個案並未發現單純以 Der p2 刺激下 PBL 產生 IFN γ 或 IL4 的比例有差異。唯有將分析所得百分比值轉換為細胞數後看出在 AS/Y 組個案週邊血液中以 Der p2 刺激下有較高數量的 IFN γ -producing PBLs。本研究中以 Der p2 過敏原刺激 PBMC 48 小時，並未觀察到 PBMC 有分裂現象，比起外加 P/I 刺激似乎更能反映出個體血液中實際會對過敏原產生反應且分泌 IFN γ 細胞群的數目與比例，但由於這群細胞數目太少，且染色結果不似 IL4 染色可和背景值有顯著差異，以目前 intracellular cytokine staining 和流式胞儀分析的方法測定這群 IFN γ 產生細胞仍然有困難。由於塵蟎過敏原廣泛存在於環境中，個體應處於反覆暴露於過敏原的狀態，塵蟎過敏原特异性 T 細胞理論上應會持續集中於呼吸道或皮膚等可與塵蟎過敏原直接接觸的組織或器官中。但由於周邊血液中 HDM-specific lymphocytes 所佔比例太少，致使本研究的分析方法所測得的數據變異性大。而以觀察週邊血液中 PBLs 針對過敏原刺激引發的 IFN γ 或 IL4 產生可能也無法確實反映出個案體內所有 Der p2-specific lymphocytes 的情形。若能分析所有個案的 BAL 細胞可能可以得到更明確的結果。此外已

知 allergen 或 IgE 可促使 mast cells 表面 Fc ϵ RI 大幅上升 (10)，可預期在塵蟎過敏氣喘病史個案呼吸道組織中 mast cells 數目、mast cells 表面 Fc ϵ RI 表現、及所吸附的 allergen-specific IgE 數量將影響 IgE-mediated mast cell activation。研究氣喘後續症狀關聯的免疫因子，若僅採樣於週邊血液，似乎無法確實反應個案體內 allergen-specific IgE 及 T cell subsets 的實際狀態。顯示探討這些問題將無可避免的必須深入呼吸道及其發炎組織才有機會得到完整的解答。

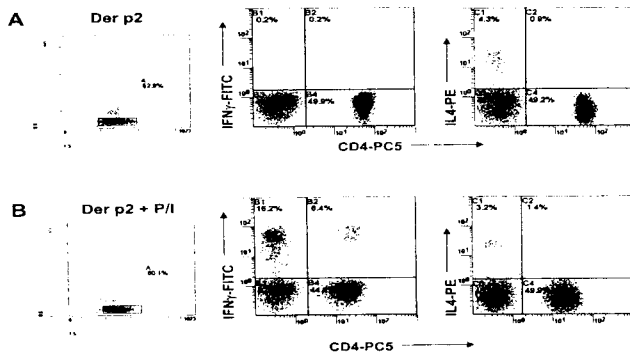
本研究依計劃預定內容與方式執行完畢目前正預備論文投稿中。

五、參考文獻

1. Croner S, Kjellman N-IM. Natural history of bronchial asthma in childhood: A prospective study from birth up to 12-14 years of age. *Allergy* 1992; 47: 150-157.
2. Rawle FC, Burr ML, Platts-Mills TAE. Long-term falls in antibodies to dust mite and pollen allergens in patients with asthma or hay fever. *Clinical allergy* 1983; 13: 409-417.
3. Hill DJ, Hosking CS, Shelton MJ, Turner MW. Growing out of asthma: clinical and immunological changes over 5 years. *Lancet* 1981; 19/26:1359-1361.
4. Hill DJ, Hosking CS, Turner MW. Childhood asthma: clinical and immunological changes over a decade. *Clinical Experimental Allergy* 1991; 21:343-349.
5. O'Hehir RJ. Immunotherapy of allergy: anergy, deletion, and immune deviation. *Current Opinion Immunology* 1998; 10: 640-645.
6. O'Brien RM, Byron KA, Varrigos GA, Thomas WR. House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p2-specific IFN γ and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. *Clinical and Experimental Allergy* 1997; 27:46-51.
7. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4⁺ T cells from allergic individuals. *J Experimental Medicine* 1993; 178: 2123-2130.
8. Grunberg K, and Streck PJ. (1999) Rhinovirus infections: induction and modulation of airways inflammation in asthma. *Clinical Experimental Allergy* 29s2: 65-73.
9. Krug N, Madden J, Redington AE, Lackie P, Djukanovic R, Schauer U, Holgate ST, Frew AJ, and Howarth PH. (1996) T cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology* 14: 319-326.
10. Williams CMM, Galli SJ (2000) The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunology* 105: 847-859.

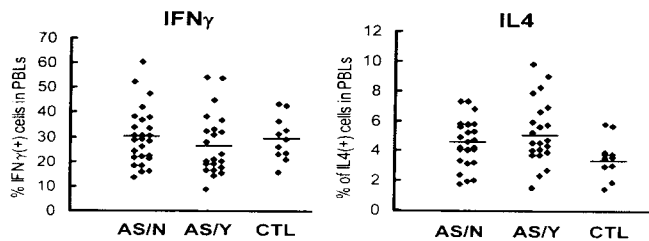


圖一 有塵蟎過敏性氣喘病史個案的血液 (A) Der p2 specific IgE 及 (B) Der p2 specific IgG level

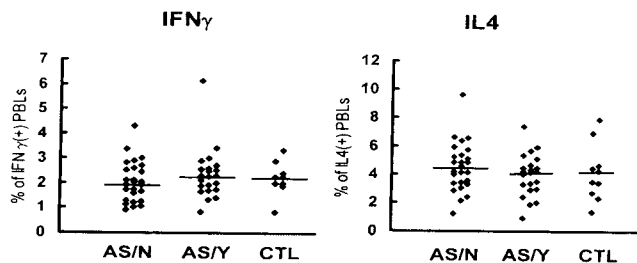


圖二 Intracellular cytokine staining of Der p2-reactive peripheral blood lymphocytes

2×10^6 PBMCs 經 Der p2 ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$ complete medium) 刺激 44 小時後，加入 Brefeldin A ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) (A) 或 PMA ($2 \text{ng}/\text{ml}$)、Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) 及 Brefeldin A ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) (B) 繼續培養 4 小時後行 intracellular IFN γ /IL4 staining。



圖三 PBMC 受 Der p2/PI 刺激後產生 IFN γ 及 IL4 的情形



圖四 PBMC 受 Derp2 刺激後產生 IFN γ 及 IL4 的情形