

靶向IL-4主动免疫抑制屋尘螨抽提物诱导的 小鼠气道炎症反应

高瑞雨 严皎 袁明翠 马雁冰*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

摘要 以IL-4为主要驱动的Th2应答是过敏性哮喘的主要免疫病理特征, 该文旨在探讨靶向IL-4主动免疫对屋尘螨过敏原刺激的小鼠气道炎症反应的干预作用及潜力。研究以重组制备的、呈现IL-4肽表位的乙肝核心抗原病毒样颗粒免疫BALB/c小鼠, 并以屋尘螨抽提物诱导气道过敏性炎症反应。结果显示, 靶向IL-4的主动免疫激发了持续的IL-4特异IgG抗体高水平应答; 显著减少气道浸润的总炎性细胞以及其中占主要的嗜酸性粒细胞数目; 显著降低了支气管肺泡灌洗液中Th2细胞因子IL-4、IL-13和IL-5水平, 而Th1的IFN- γ 有升高趋势; 显著下调了血清IgG1而上调IgG2a水平; 此外, 显著抑制了乙酰甲胆碱刺激的过敏小鼠气道高反应性。研究表明, 靶向IL-4的主动免疫具有抑制过敏性气道炎症反应的潜力。

关键词 白细胞介素-4; 病毒样颗粒; 屋尘螨抽提物; 哮喘

Active Immunization against Interleukin-4 Suppresses Allergic Airway Inflammation in A Mouse Model Induced by House Dust Mite Extracts

Gao Ruiyu, Yan Jiao, Yuan Mingcui, Ma Yanbing*

(Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Disease, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract Asthma is featured by Th2 dominated inflammatory responses which mainly driven by IL-4. This study was purposed to evaluate the efficacy of active immunization against IL-4 in a mouse model of allergic airway inflammation. By using gene recombinant techniques, a vaccine presenting IL-4 antigen epitope on the surface and in the immune-dominant domain of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) virus-like particle (VLP) were constructed. The recombinant protein HBcAg/IL-4 was expressed by induction with IPTG, and then purified by a procedure consists of ammonium sulfate precipitation and sucrose density gradient centrifugation. The VLPs structure was further identified with electron microphotographic techniques. Mice were immunized with vaccine 3 times at 2 week intervals before the repeated sensitization and challenge with house dustmite extracts (HDM). The numbers of total inflammatory cells and eosinophils in BALF((bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer) were counted. The level of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ was measured and the IL-4 -specific IgG and HBcAg-specific IgG1 and IgG2a responses were analyzed using ELISA. The airway and lung tissue

收稿日期: 2018-11-14 接受日期: 2019-03-07

国家自然科学基金(批准号: 81773270)和云南省科技项目(批准号: 2016FA049)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-68339287, E-mail: may@imbcams.com.cn

Received: November 14, 2018 Accepted: March 7, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81773270) and the Science and Technology Project of Yunan Province (Grant No.2016FA049)

*Corresponding author. Tel: +86-871-68339287, E-mail: may@imbcams.com.cn

网络出版时间: 2019-06-13 16:26:59

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1626.006.html>

mechanics were measured using flexiVent. In the mice immunized with the immunization with recombinant HBcAg/IL-4 VLP vaccine, the IL-4-specific IgG was induced and maintained at high level through the experiment; the infiltrated airway inflammatory cells, especially eosinophils, as well as the levels of Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 in BALF, were significantly reduced; the HBcAg-specific IgG1 response was suppressed significantly whereas IgG2a response was elevated; in addition, airway hyperresponsiveness was significantly ameliorated. Active immunization with a VLP vaccine targeting IL-4 significantly suppressed HDM-induced airway inflammatory responses, providing a potential approach for the study on immune-pathogenic mechanisms and immunotherapeutic intervention of asthma.

Keywords interleukin-4; VLP; HDM; airway inflammation

哮喘是一种常见的肺部气道慢性炎症疾病, 常表现为急性炎症反复发作以及气道重塑造成的肺功能损失。Th2型细胞及其因子在人类哮喘和小鼠过敏性气道疾病的发病机制中起重要作用^[1]。研究发现, 在哮喘患者的血清和支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中IL-4和IL-13水平显著升高, 人类哮喘的疾病发展与气道中IL-4和IL-13水平增加呈正相关^[2-3]。此外, 哮喘患者IL-5及其趋化的嗜酸性粒细胞, 且免疫球蛋白E(IgE)水平也呈显著升高^[4-5]。在Th2应答中, IL-4是主要驱动者。IL-4和IL-4R α 基因的多态性变异增加了携带者患哮喘的风险^[6-8]。同时, 使用IL-4可溶性受体靶向IL-4可有效抑制小鼠的气道过敏反应^[9-10]; 气道给予外源性的IL-4或IL-13或真核表达质粒使其过表达, 诱导气道嗜酸性粒细胞增多及气道高反应性(airway hyperresponsiveness, AHR)^[11-13]。IL-4的关键作用在于其对Th2发育的影响, 诱导IgE产生, 对T细胞和嗜酸性粒细胞凋亡的抑制, 促进细胞迁移至炎症位点, 以及刺激黏液产生杯状细胞和成纤维细胞^[14]。目前, IL-4可溶性受体、IL-4突变蛋白、IL-4单克隆抗体等被动免疫干预方式已进行了人体试验研究^[15]。抗细胞因子疫苗是一种具有潜力的疾病机理研究以及治疗干预的新手段, 微量的免疫原数次免疫即可提供一定时间内持续的作用, 其在慢性疾病的治疗中较之被动免疫干预具备明显优势。乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)能够在大肠杆菌中高效组装成病毒样颗粒(VLP), 具有强免疫原性, 可广泛用作疫苗载体^[16]。

本研究以屋尘螨抽提物(house dust mite extract, HDM)这一天然过敏原刺激小鼠气道炎症反应, 利用HBcAg VLP呈现IL-4抗原表位、有效诱导特异

抗体、持续阻断过敏小鼠异常表达、积累的IL-4等特点, 从而探讨靶向IL-4主动免疫对哮喘的疾病干预作用、特点及潜力。

1 材料与方法

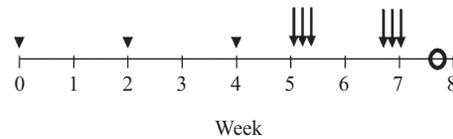
1.1 实验材料与试剂

1.1.1 质粒与菌株 用于在大肠杆菌系统中表达异源蛋白的质粒pThioHisA购自Invitrogen公司。质粒pThioHisA-HBcAg由本科室构建并保存, 是将HBcAg的1~149 aa基因片段克隆于pThioHisA表达载体的Nde I与Pst I之间, 并在78~79 aa之间引入BamH I与EcoR I位点, 用于外源蛋白或抗原肽片段插入HBcAg优势抗原位点; DH5 α 感受态由本科室制备并保存。

1.1.2 试剂及试剂盒 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 屋尘螨抽提物购自美国Greer Laboratories公司; IL-4细胞因子标准品购自Peprotech公司; 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测抗体生物素化IgG抗体购自上海圣克鲁斯生物技术有限公司; 生物素化抗鼠IgG1、IgG2a抗体购自Biolegend公司; 抗鼠IFN- γ 、IL-4、IL-13和IL-5捕获抗体与生物素化检测抗体购自eBioscience公司; 亲和素偶联碱性磷酸酶、碱性磷酸酶底物购自Sigma-Aldrich公司; Sephadex G25填料购自美国GE公司。

1.2 实验动物

6~8周龄雌性BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司, 饲养于中国医学科学院医学生物学研究所SPF级动物房内, 本实验遵循《实验动物保护条例》。



▼: 疫苗或载体皮下免疫; ↓: 滴鼻注入10 μg 屋尘螨抽提物; ○: 实验终点 (AHR测定与取样)

▼: subcutaneous injection with vaccine or carrier; ↓: ntranasal challenge with 10 μg of dustmite extracts; ○: termination (AHR measurement and sampling)

图1 动物模型实验操作程序

Fig.1 The protocol used for the animal experiment

1.3 实验方法

1.3.1 克隆构建 详细的抗原肽选择及质粒构建信息参见我们之前的报道^[17]。编码鼠IL-4抗原肽(2~15 aa: DKNHLREIIGILNE)的寡核苷酸序列由生物工程(上海)股份有限公司合成。将合成的正负链寡核苷酸进行退火复性后与经BamH I与EcoR I双酶切后胶回收的pThioHisA-HBcAg载体片段进行连接, 转化DH5α感受态细胞, 酶切鉴定重组质粒pThioHisA-HBcAg/IL-4。

1.3.2 蛋白表达与纯化鉴定 用1 mmol/L IPTG在37 °C诱导菌液4 h。通过15% SDS-PAGE鉴定重组蛋白HBcAg/IL-4的表达。使用以下方法纯化重组蛋白: 超声裂解菌体, 收集上清进行40%饱和硫酸铵沉淀, 经20%饱和硫酸铵洗涤后, PBS重悬目的蛋白; 将初步纯化的重组蛋白样品进行蔗糖密度梯度离心, 从上至下蔗糖浓度分别为10%、20%、30%、40%和50%, 每层1.8 mL, 将蛋白样品2 mL加至蔗糖梯度最上层, 40 000 ×g、4 °C离心4 h。离心后的样品从上至下逐层取样, 每层1 mL, 每层样品进行15% SDS-PAGE分析。再用Sephadex G25凝胶层析柱将样品脱盐置换为PBS缓冲液。使用透射电子显微镜确认VLP的存在。将纯化的蛋白质保持在-80 °C, 用于免疫。

1.3.3 动物模型及免疫 将纯化的HBcAg VLP(本研究中的carrier)以及嵌合蛋白 HBcAg/IL-4 VLP(本研究中的vaccine), 以50 μg的剂量无常规佐剂皮下免疫小鼠。每2周1次, 共3次。最后1次免疫后的第7、8、9、21、22、23天滴鼻注入屋尘螨抽提物, 每次40 μL含10 μg过敏原。第26天检测小鼠AHR并收集样品。具体操作程序如图1所示。

1.3.4 BALF采集及气道浸润细胞分型计数 用1 mL冷PBS收集BALF, 轻缓冲洗3次。4 °C、500 ×g离心5 min。使用血细胞计数器计数BALF中的总细胞数。离心后的上清液保持在-80 °C待细胞因子检测。将

细胞沉淀用PBS重新悬浮, 然后经cytospin分布到玻璃片上, 用瑞氏-吉姆萨复合染色液染色。在光学显微镜下计数3个视野中嗜酸性粒细胞和总细胞的数量来获得嗜酸性粒细胞的百分比。通过使用获得的百分比乘以总的BALF细胞数计算每个样品的嗜酸性粒细胞数。

1.3.5 酶联免疫吸附试验(ELISA) 细胞因子浓度检测根据试剂盒说明进行, 简单过程如下: 以捕获抗体(2 μg/mL) 4 °C下湿盒包被酶标板过夜, 2% BSA封闭2 h, 加入BALF样品或细胞因子标准品, 室温孵育2 h, 加入生物素化的检测抗体(2 μg/mL)室温孵育1 h, 加入碱性磷酸酶标记的Avidin室温孵育1 h, 加入显色底物, 测定405 nm光吸收值。样品中细胞因子浓度根据标准曲线计算获得。实验中工作体积为50 μL, 每一步骤间洗板3~5次。

抗体检测的简单过程如下: 分别以1 μg/mL IL-4标准品包板检测IL-4特异IgG应答, 以2 μg/mL HBcAg包板检测IgG1和IgG2a水平, 2% BSA封闭, 加入血清样品(IgG和IgG1检测的稀释度为1:5 000, IgG2a检测的稀释度为1:1 000), 之后分别加入生物素化抗小鼠IgG、IgG1和IgG2a抗体, 再加入碱性磷酸酶标记的Avidin, 最后加入显色底物, 读取405 nm光吸收值。抗体滴度测定方法为: 将疫苗免疫组与对照组血清样品按1:200, 1:400, 1:800, 1:1 600进行倍比稀释, 至疫苗免疫组样品在405 nm处光吸收值与对照组比值刚好大于2.1倍时, 此时的稀释度即为该样品的抗体滴度。

1.3.6 小鼠气道反应性 使用FlexiVent小动物肺功能仪检测实验小鼠的气道反应性^[18]。将小鼠麻醉, 然后接受连续稀释的乙酰甲胆碱刺激, 其通过插入气管中的套管使其雾化。使用强制低频振荡技术, 通过设置的参数分析评估气道和肺组织力学, 反映中枢及外周气道反应性。

1.4 数据统计

动物模型实验各指标中载体免疫组与疫苗免

疫组间的差异分析采用Student's *t*-test。* $P < 0.05$, 表示差异有统计学意义; # $P < 0.01$, 表示差异有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 HBcAg/IL-4的表达及VLP装配

重组蛋白HBcAg/IL-4的理论分子量为19.04 kDa。通过SDS-PAGE分析, 诱导后的样品较之诱导前在19 kDa左右出现明显的特异表达条带, 显示重组蛋白HBcAg/IL-4在大肠杆菌中有效表达(图2A)。经硫酸铵盐析法初步纯化的样品以蔗糖密度梯度进一步纯化, SDS-PAGE分析可见, 目的蛋白条带主要分布于蔗糖密度梯度离心收集样的第7~9层(图2B), 与HBcAg行为相似, 提示重组蛋白主要以VLP形式

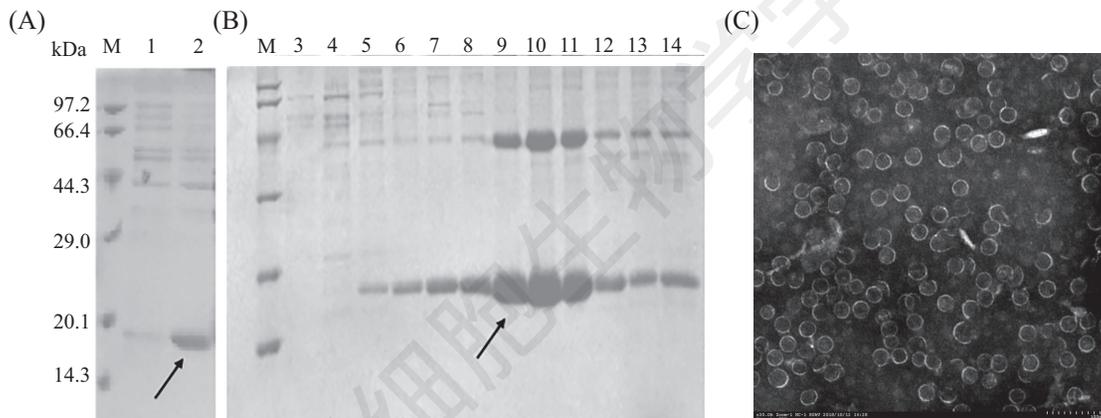
存在。此外, 用透射电子显微镜观察, 直接证实了VLP的存在, 直径20~30 nm(图2C), 其大小及形态与HBcAg所形成颗粒类似, 表明在VLP上插入IL-4抗原表位并没有影响在大肠杆菌中的表达的重组蛋白形成VLP的能力。

2.2 HBcAg/IL-4 VLP免疫小鼠的抗体水平测定

分别取第2次与第3次免疫后1周以及实验终点的小鼠血清, 通过ELISA检测IL-4特异的IgG抗体水平。结果显示, 相对HBcAg对照组, HBcAg/IL-4疫苗免疫组产生了强的IL-4特异的抗体应答, 且在过敏原刺激的整个实验过程中保持高水平(图3)。选择代表性样品进行滴度分析显示, 最高应答可达64 000。

2.3 小鼠BALF总细胞及分型计数

BALF中炎性细胞浸润是气道炎症反应的重要



A, B: SDS-PAGE analysis. M: 蛋白marker; 1: 重组蛋白HBc-Ag/IL-4诱导前; 2: 重组蛋白HBc-Ag/IL-4诱导后; 3~14: 从上到下密度梯度离心1~12层。箭头所指为目的蛋白; C: 电镜鉴定密度梯度离心第8层病毒样颗粒。

A, B: SDS-PAGE analysis. M: protein marker; 1: the cell lysates of recombinant bacteria expressing HBc-Ag/IL-4 collected before the induction with IPTG; 2: the cell lysates collected at 4h after the induction; 3-14: 12 collected sample fractions of sucrose density gradient centrifugation from top to bottom. The interest protein is indicated by the arrow; C: electronic microscopy of the 8th fraction from sucrose density gradient centrifugation.

图2 重组蛋白HBcAg/IL-4的表达与鉴定

Fig.2 Expression and identification of the recombinant protein HBcAg/IL-4

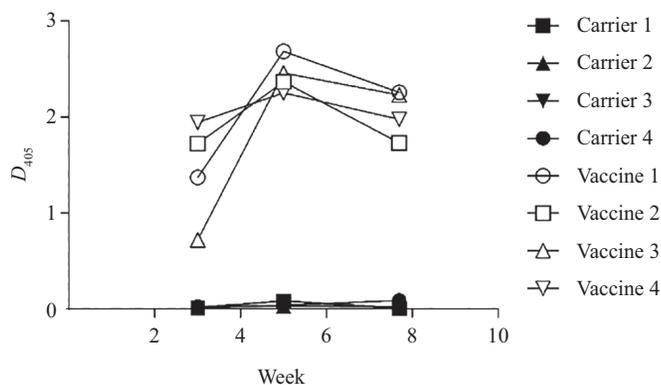
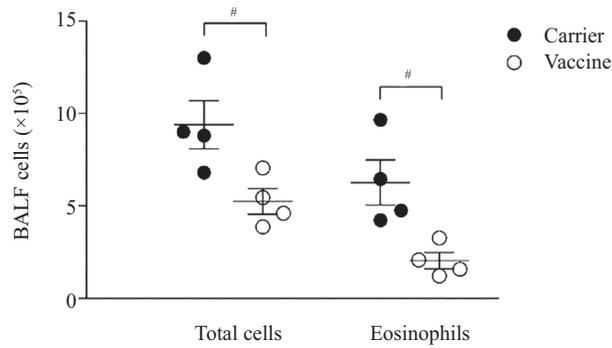


图3 血清中IL-4特异性IgG抗体应答

Fig.3 IL-4-specific IgG responses in the serum

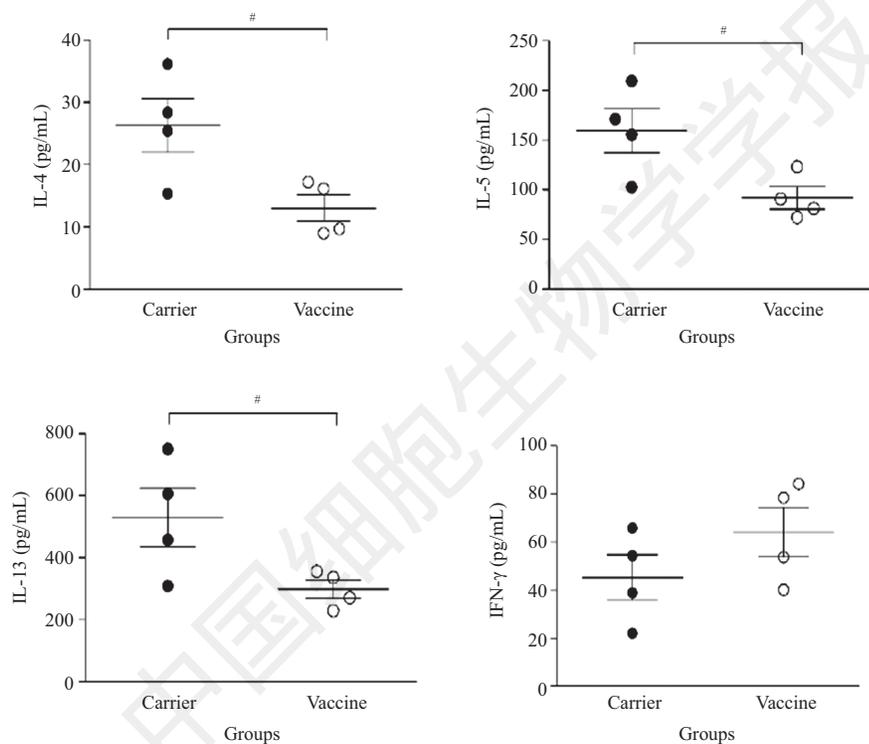


$P < 0.05$, 与载体对照组比较。

$P < 0.05$ compared with the carrier group.

图4 小鼠BALF总细胞及炎性细胞计数

Fig.4 Total cells and inflammatory cell counting in BALF



$P < 0.05$, 与载体对照组比较。

$P < 0.05$, compared with the carrier group.

图5 BALF的细胞因子水平

Fig.5 Cytokine levels in BALF

指标。BALF总细胞计数结果显示, 疫苗免疫组小鼠BALF总细胞数量平均约 5.2×10^5 细胞/mL, 显著低于对照组 9.5×10^5 细胞/mL。嗜酸细胞是过敏性哮喘的主要效应细胞, 细胞分型计数结果显示, 疫苗免疫组嗜酸细胞数量平均约为 2.1×10^5 细胞/mL, 显著低于VLP载体对照组 6.1×10^5 细胞/mL(图4)。结果表明, 拮抗IL-4能够显著降低由HDM导致的气道炎性细胞浸润。

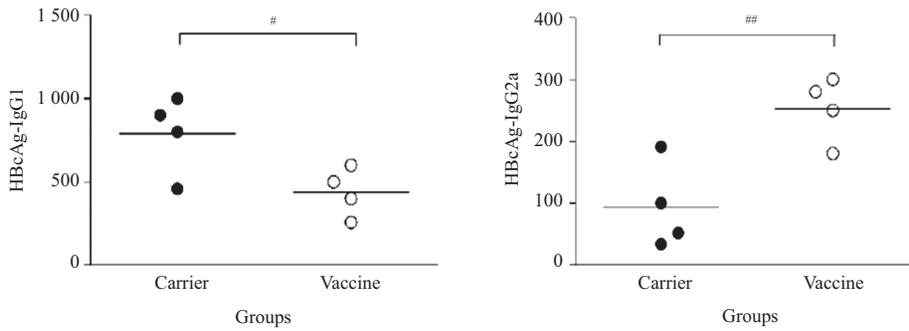
2.4 小鼠BALF细胞因子检测

IL-4、IL-5和IL-13是主要的Th2细胞因子, 在由

HDM导致的哮喘中发挥重要的作用^[19]。IFN- γ 是Th1细胞的标志性细胞因子。对小鼠BALF中的细胞因子表达进行ELISA检测, 疫苗免疫组IL-4、IL-5和IL-13的水平均显著低于载体对照组, 而IFN- γ 的含量显示了一定上升趋势, 但无显著差异(图5)。这表明靶向IL-4的主动免疫能够有效地降低由HDM导致的Th2应答。

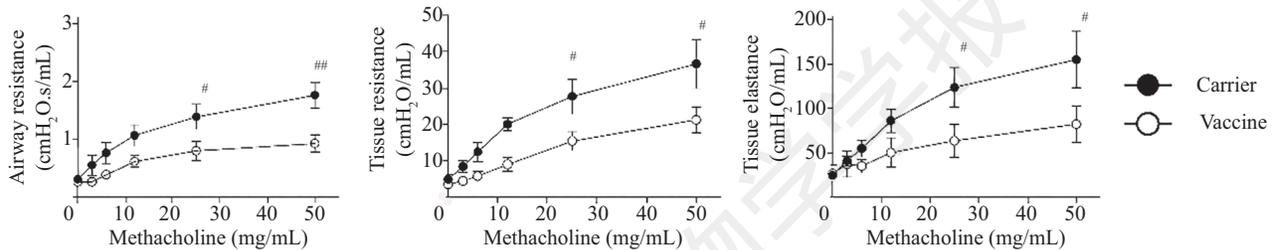
2.5 HBcAg特异性IgG1、IgG2a抗体亚型检测

IgG1与IgG2a的抗体水平可以间接反映Th2和



[#]*P*<0.05, 与载体对照组比较; ^{##}*P*<0.01, 与载体对照组比较。
[#]*P*<0.05, compared with the carrier group; ^{##}*P*<0.01 compared with the carrier group.

图6 HBcAg特异的IgG1和IgG2a抗体水平
 Fig.6 HBcAg-specific IgG1 and IgG2a responses in the serum



[#]*P*<0.05, 与载体对照组比较; ^{##}*P*<0.01, 与载体对照组比较。
[#]*P*<0.05, compared with the carrier group; ^{##}*P*<0.01 compared with the carrier group.

图7 气道与组织力学分析
 Fig.7 Measurement of the airway and lung tissue mechanics

Th1的免疫应答偏向。ELISA检测HBcAg特异的IgG1与IgG2a可反映小鼠总体的IgG亚型应答。疫苗免疫组IgG1的水平显著低于载体对照组, 而IgG2a水平显著高于载体对照组, 提示靶向IL-4的主动免疫调控可促进Th1偏向的免疫应答(图6)。

2.6 气道反应性检测

气道高反应性是哮喘的重要病理特征之一, IL-4驱动的气道炎症反应对于气道高反应性具有重要作用。小鼠气道接受乙酰甲胆碱的刺激, 经肺功能仪分析肺组织力学。结果显示, 与载体对照组小鼠相比, 疫苗免疫组免疫小鼠的气道抗性、组织抗性与组织弹性显著改善, 反映中枢与外周气道高反应性获得显著抑制(图7)。

3 讨论

在支气管哮喘动物模型研究中, 最早使用的致敏原为卵清白蛋白(ovalbumin, OVA), OVA也是目前应用最多的致敏原之一^[20]。但OVA作为单一蛋白, 不是天然过敏原, 其诱导的免疫病理应答与病理特

征与临床疾病存在一定差异。屋尘螨分泌物是临床导致过敏性哮喘、鼻炎和特应性皮炎的一类主要天然过敏原^[21]。在小鼠中, 利用HDM经气道反复滴注或雾化吸入, 可以诱导哮喘气道过敏性炎症模型^[22]。与OVA不同, HDM可直接通过呼吸道引起人类哮喘的发生, 在小鼠中应用所激发的病理应答与人类的哮喘发病过程与机理更为接近, 因此可能会更好地反映临床哮喘情况, 有利于疾病机理与治疗干预研究。

哮喘的主要特征包括气道炎症、气道组织结构重塑及气道高反应性等。Th1/Th2失衡造成Th2过度应答被认为是哮喘发病的关键机制。细胞因子(例如IL-4、IL-13和IFN- γ)间的相互作用是维持Th1/Th2平衡的关键。使用单克隆抗体或可溶性受体被动免疫阻断异常表达及积累的在疾病病理中发挥关键作用的细胞因子是一种有效的治疗方法, 在临床中已获得成功应用^[23-24]。然而, 这些干预措施无法在体内产生持久的临床效益, 需要大剂量反复应用。主动免疫策略, 即以疫苗形式经几次免疫激发机体

产生针对靶分子的一定时间内持续存在的中和抗体,较之被动免疫具有显著优势。本研究中,我们以VLP形式打破了B细胞耐受,未使用常规免疫佐剂,仍有效诱导了高水平IL-4抗体。究其原因,VLP提供了高度重复、高度有序的表位呈现;同时,VLP具有纳米结构,利于抗原递呈细胞的摄取并具有淋巴结迁移接触更多抗原递呈细胞的能力,因此具有高免疫原性;此外,其内部包裹的核酸片段可进一步发挥免疫佐剂活性。本研究利用VLP的特点,经硫酸铵沉淀、洗涤以及蔗糖密度梯度离心进行纯化,以分离杂蛋白。SDS-PAGE分析显示,在约40 kDa处有似HBcAg二聚体的蛋白条带(图2)。经分析,该蛋白条带的大小与二聚体相符,行为与单体完全一致,主要富集于密度梯度离心7~9层中,表现了典型的VLP行为,且Western blot结果(未在本文显示)证实该条带可与抗IL-4抗体特异反应。因此,其也是表达的目的蛋白。我们推测出现二聚体的原因可能是,VLP中有二硫键被氧化,或者是SDS-PAGE样品缓冲液中的巯基乙醇未能打开所有二硫键或电泳过程中还原的-SH有少部分又形成二硫键(当然其他分子间力同样可能对二聚体的存在有着贡献)。值得说明的是,电泳结果中有二聚体的存在,不代表样品中其以非颗粒形式存在,并且即使以非颗粒形式存在,其同样可以激发IL-4特异的抗体应答,只是能力弱于VLP,原因在于我们采用的是IL-4线性的B细胞表位,而HBcAg提供了外源性Th细胞表位,已经满足打破B细胞耐受、激发IL-4特异抗体所需的基本条件。综上所述,我们认为电泳中反映的情况对主动免疫结果不会产生明显影响。

本研究中,靶向IL-4的主动免疫显著下调了BALF中Th2细胞因子如IL-4的水平,而上调了Th1细胞因子,此外,提高了IgG2a的水平而降低IgG1水平,提示免疫应答从Th2向Th1类型偏向。我们知道,IL-4与IL-13是两个关键的Th2应答相关细胞因子,功能有相似及重叠的地方,但也存在各自特点及信号传导通路。尽管IL-4在BALF中的绝对含量低于IL-13,但其在Th2细胞分化及应答的起始中作用较强,而IL-13相较则更偏于效应相,因此,IL-4可能在哮喘早期起关键作用,而IL-13可能在哮喘的维持和发展中发挥重要作用。我们也开展了针对IL-13的调控干预研究,以及IL-4与IL-13的协同干预研究,相信综合性的分析,能更好地评估靶向IL-4或IL-13主

动免疫对屋尘螨过敏原刺激的小鼠气道炎症反应的干预作用及潜力。

总而言之,本研究表明,用疫苗持续阻断IL-4可有效抑制Th2反应,从而下调气道过敏性炎症反应,为深入认识哮喘分子病理机制及探索新型免疫治疗干预手段提供了参考。

参考文献 (References)

- 1 Finkelman FD, Wills-Karp M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(3): 603-6.
- 2 Brasier AR, Victor S, Boetticher G, Ju H, Lee C, Bleecker ER, *et al.* Molecular phenotyping of severe asthma using pattern recognition of bronchoalveolar lavage-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(1): 30-7. e6.
- 3 Kotsimbos TC, Ernst P, Hamid QA. Interleukin-13 and interleukin-4 are coexpressed in atopic asthma. *Proc Assoc Am Physicians* 1996; 108(5): 368-73.
- 4 Barnes PJ. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 454-66.
- 5 Chung KF. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. *Lancet* 2015; 386(9998): 1086-96.
- 6 Hytonen AM, Lowhagen O, Arvidsson M, Balder B, Bjork AL, Lindgren S, *et al.* Haplotypes of the interleukin-4 receptor alpha chain gene associate with susceptibility to and severity of atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1570-5.
- 7 Li Y, Guo B, Zhang L, Han J, Wu B, Xiong H. Association between C-589T polymorphisms of interleukin-4 gene promoter and asthma: a meta-analysis. *Respir Med* 2008; 102(7): 984-92.
- 8 Tachdjian R, Mathias C, Al Khatib S, Bryce PJ, Kim HS, Blaeser F, *et al.* Pathogenicity of a disease-associated human IL-4 receptor allele in experimental asthma. *J Exp Med* 2009; 206(10): 2191-204.
- 9 Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, *et al.* Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996; 183(1): 109-17.
- 10 Henderson WR Jr, Chi EY, Maliszewski CR. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2000; 164(2): 1086-95.
- 11 Perkins C, Wills-Karp M, Finkelman FD. IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(2): 410-9.
- 12 Shi HZ, Deng JM, Xu H, Nong ZX, Xiao CQ, Liu ZM, *et al.* Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(6 Pt 1): 1818-21.
- 13 Rankin JA, Picarella DE, Geba GP, Temann UA, Prasad B, DiCosmo B, *et al.* Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15): 7821-5.

- 14 Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, *et al.* Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103(6): 779-88.
- 15 Steinke JW. Anti-interleukin-4 therapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24(4): 599-614.
- 16 Roseman AM, Borschukova O, Berriman JA, Wynne SA, Pumpens P, Crowther RA. Structures of hepatitis B virus cores presenting a model epitope and their complexes with antibodies. *J Mol Biol* 2012; 423(1): 63-78.
- 17 唐增华, 龙琼, 姚宇峰, 黄惟巍, 杨旭, 孙文佳, 等. 呈现人白细胞介素-13抗原表位的病毒样颗粒疫苗的构建. *中国生物制品学杂志*(Tang Zenghua, Long Qiong, Yao Yufeng, Huang Weiwei, Yang Xu, Sun Wenjia. Construction of virus-like particles embedding B cell epitope of human interleukin-13. *Chinese Journal of Biologicals*) 2013; 26(11): 1533-9.
- 18 Kadkhoda K, Wang S, Fan Y, Qiu H, Basu S, Halayko AJ, *et al.* ICOS ligand expression is essential for allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Int Immunol* 2011; 23: 239-49.
- 19 Walsh GM. Biologics targeting IL-5, IL-4 or IL-13 for the treatment of asthma—an update. *Expert Rev Clin Immunol* 2017; 13(2): 143-9.
- 20 孟鹏飞, 吕岳. 简述用卵蛋白制作大鼠哮喘模型的要点. *甘肃中医药大学学报*(Meng Pengfei, Lü Yue. The summary about the main point of using the ovalbumin to manufacture the rat asthma model. *Journal of Gansu University of Chinese Medicine*) 2011; 28(2): 27-9.
- 21 Gandhi VD, Davidson C, Asaduzzaman M, Nahirney D, Vliagoftis H. House dust mite interactions with airway epithelium: role in allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; 13: 262-70.
- 22 Juncadella IJ, Kadl A, Sharma AK, Shim YM, Hochreiter-Hufford A, Borish L, *et al.* Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature* 2013; 493(7433): 547-51.
- 23 Liopsis SN, Tsokos GC. Monoclonal antibodies and fusion proteins in medicine. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(4): 721-9.
- 24 Prete M, Perosa F, Favoino E, Dammacco F. Biological therapy with monoclonal antibodies: a novel treatment approach to autoimmune disease. *Clin Exp Med* 2005; 5(4): 141-60.