

小鼠过敏模型在食品过敏原分析中的研究与应用

蒋栋磊¹, 孙秀兰^{*1}, 张银志², 单晓红¹,
管露¹, 尤继明³, 李红梅³

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 3. 国家有机食品质量监督检验中心, 江苏 宝应 225800)

摘要: 建立牛乳蛋白、河虾蛋白的 ICR 小鼠过敏模型, 检测食品过敏原体外激发小鼠致肥大细胞的组胺释放率, 探讨食品过敏原鉴定并验证所建过敏原体外评价新方法。方法 以牛奶蛋白、河虾蛋白, 氢氧化铝佐剂免疫 ICR 小鼠, 建立 IgE 高反应性食物过敏动物模型。间接 ELISA 测定激发后第 7、14、21 d 血清中过敏原 sIgE 水平; 并在激发第 14 d 分离小鼠腹腔肥大细胞, 过敏原体外激发, 紫外分光光度法检测类胰蛋白酶定向释放水平。①模型小鼠血清 sIgE 水平明显高于对照组, 且在过敏激发后第 14 d sIgE 效价最高, 河虾组和牛奶蛋白组的 sIgE 效价分别达到 1/25 600 和 1/12 800。②牛奶组类胰蛋白酶释放率达 38.5%; 河虾组的类胰蛋白酶释放率达 47.1%, 所有模型组与对照组间差异均达显著水平($P < 0.05$)。建立了一种小鼠过敏模型, 通过检测过敏原体外激发类胰蛋白酶释放率可以作为一种鉴定与评价食品过敏原的有效方法。

关键词: sIgE; 类胰蛋白酶; 肥大细胞; 食品过敏原

中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0499-06

Construction and Application of Allergic Models with ICR Mice in Vitro for Analysis of Food Allergens

JIANG Dong-Lei¹, SUN Xiu-Lan^{*1}, ZHANG Yin-Zhi², SHAN Xiao-hong¹,
GUAN lu¹, YOU Ji-ming³, LI Hong-mei³

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3 The National Center of Supervision and Inspection for Organic Food Quality; Bao YING 225800, China)

Abstract: Objectives To establish allergic model with ICR mice for milk and shrimp protein, develop a novel technique based on determining histamine release from mouse sensitized cells stimulated in vitro for assessing and identifying food allergens. Methods The ICR mice were immunized by injection of river shrimp proteins or milk proteins with aluminum hydroxide as adjuvant. The sensitized mouse were challenged for one time at 7th day after sensitization. The sIgE of food allergens was measured by indirect ELISA at 7/14 and 21 days after challenge; and the peritoneal Mast cells were collected at 14th day and were stimulated by allergen in vitro.

收稿日期: 2011-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(20806033); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAK10B03); 国家 973 计划项目(2012CB720804); 2010 年度公益性行业(农业)科研专项项目(201003008-08); 江苏省质监局立项项目(KJ122704)。

*通信作者: 孙秀兰(1976-), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全检测方面研究。

E-mail: sxlzzz@yahoo.com.cn

The liberation of tryptase was measured by ultraviolet spectrophotometry assay and was converted to releasing rate for statistical analysis with Student's system. Results ①The levels of sIgE in the experimental groups were higher than on control at three different points. They reached the peak at 14 day after challenge, with a value of 1/25600 in river shrimp and 1/12800 in milk group. ②The tryptase liberation ratio group was 38.5% in milk group and 36.14% in control group; The liberation ratio was 74.5% in river shrimp group and 47.1% in the control. All the model groups revealed significant difference compared with the control ($P < 0.05$). Conclusion The present data indicated that tryptase release test with sensitized cells from mouse model challenged by food allergen in vitro maybe a prospective technique for assessing and identifying food allergens.

Key words: sIgE tryptase mast cell food allergy

食品过敏原的安全问题已引起广泛的关注,其潜在的过敏源性是急需研究的新课题。过敏症是在全世界广泛流行的一类常见变态反应性疾病,由于其症状复杂,种类繁多,危害广泛且难以根治,成为长期以来医学界的一大难题^[1],食品过敏原或混合物的分布范围非常广泛,包括农作物、畜禽产品、水产品、水果、蔬菜等。世界粮农组织(FAO)1995年报告^[2],90%以上的食物过敏是由牛奶、鸡蛋、鱼、贝壳海产品、花生、大豆、坚果类和小麦引起。

牛乳是母乳特别重要的替代品,也是新生儿最早接触到的过敏原之一,因而牛乳过敏在婴幼儿中最常见。通常引起牛奶过敏的过敏原主要有酪蛋白、 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白,其中以 β -乳球蛋白的过敏活性最高^[3]。在发达国家,有2%~7.5%的婴幼儿发生牛奶过敏症这主要是由于其抗消化活性最高从而导致在肠内不易失去过敏性的缘故。

虾中过敏原组分有多种,2004年赖荷等研究发现,虾中存在12种过敏原组分^[4],最主要是相对分子质量(M)为36000左右的原肌球蛋白,由于不同过敏症患者对不同过敏原组分的敏感度不同,同时获得多种纯化、单一过敏原组分较难,影响了虾过敏症诊断和过敏原检测的灵敏度,导致虾过敏原标准化的困难。

IgE介导的免疫应答是食品过敏的主要效应,为I型超敏反应,由Th2型T淋巴细胞的活化介导体液免疫应答。在鼠体内,Th2反应主要引起IgE和IgG1型抗体产生,而Th1反应产生IgG2a型抗体^[5]。脾脏是机体最大的免疫器官,当血液中出现外源体时,脾脏中的巨噬细胞、淋巴细胞会发生免疫反应,吞食外源体,结果造成脾脏肿大,因此

可以把脾脏的外形变化作为鉴定致敏效果的指标之一。

本研究用河虾蛋白和牛奶蛋白免疫ICR小鼠,建立食物过敏症动物模型,间接ELISA检测过敏原特异性IgE效价,紫外法测定腹腔肥大细胞体外类胰蛋白酶定向释放,证实成功建立了河虾和牛奶过敏的动物模型,为建立体外过敏原评价体系奠定了基础,为食品过敏原的标准化及解决食品中过敏原表示等问题提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

山羊抗小鼠IgE抗体:Sigma公司产品;precoll分离液:上海源叶生物公司产品;ICR小鼠:无锡惠山实验动物养殖中心;96孔8×12可拆酶标板:上海春博生物实验仪器有限公司产品,Multiskan MK3酶标仪:Thermo Labsystems公司产品;WFJ2000型722紫外分光光度计:上海市三分析仪器厂生产。

1.2 实验动物与分组

ICR小鼠21只,雌性,6~8周龄,体重约16~18g,随机分为3组:虾蛋白致敏组、牛奶蛋白致敏组及PBS对照组,实验组各9只,对照组3只。用不含河虾蛋白和牛奶蛋白的特种饲料喂养。

1.3 过敏原制备

实验用过敏原参照《变态反应学实验技术》^[6]制备,过敏原蛋白经过脱脂、浸提、冷冻离心后进行硫酸铵分级沉淀和等电点沉淀,经透析后获得比较纯净的过敏原蛋白。用考马斯亮蓝法进行蛋白质定量,PBS稀释到10 mg/mL,0.25 μ m微孔滤膜过

滤除菌、分装, -20°C 贮存, 备用。

1.4 小鼠免疫

小鼠饲养 7 d 后开始免疫, 取 1 mg/mL 过敏原蛋白提取液与 2.5 mg/mL $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂等体积混匀后, 按分组腹腔注射 0.2 mL/只 , 对照组注射等体积 0.01 mol/L , $\text{pH } 7.4$ PBS, 每隔一周激发 1 次, 一共激发 3 次, 期间观察激发后小鼠过敏症状。各实验组 9 只小鼠又分为 3 小组, 分别在激发后第 7、14、21 d 各组分别眼球采血, 分离血清, -20°C 贮存备用。小鼠处死后立即收集腹腔肥大细胞用于体外组胺释放测定。

1.5 腹腔肥大细胞的分离和纯化

腹腔肥大细胞的采集参照《肥大细胞体外脱颗粒的检测方法》^[7] 中的方法加以改进。小鼠眼球采血处死后, 向小鼠腹腔注射 5 mL HBSS 液, 按摩小鼠腹部 5 min, 抽取腹腔液。将其缓慢注入到体积比 $30\%:80\%$ 的 percoll 梯度分离液中。室温下 1000 r/min 离心 10 min, 吸出中间层的细胞, 即为肥大细胞。用 HBSS 液调至 10 mL/管 , 充分混匀后, 1500 r/min 离心 10 min, 重复两次。冲洗后的细胞重新悬浮于 3 mL HBSS 液中, 置于 4°C , 备用。

1.6 肥大细胞的计数与鉴定

光镜下计数, 调细胞浓度至 10^5 个细胞/ mL 。分别用台盼蓝和甲苯胺蓝染色, 镜下观察活细胞和肥大细胞纯度比例。按常规制作标本, 观察过敏原激发前后肥大细胞形态变化。

1.7 小鼠脾脏观察及占体重比值计算

取血前称量小鼠的体质量记作 m_1 , 解剖取脾脏称取其质量, 记作 m_2 , 比较致敏组和对照组的 m_1/m_2 值, 即脾脏占体重的百分比, 来评价致敏作用的效果。

1.8 间接 ELISA 检测小鼠血清过敏原 sIgE

用 $\text{pH } 9.4$ 碳酸盐缓冲液稀释过敏原包板, 4°C 过夜, PBS-T(含体积分数 0.05% Tween-20) 洗板 5 次, 每次 3 min; 5 g/dL 脱脂奶粉 $200\text{ }\mu\text{L}$ 孔封闭, 37°C , 湿盒中温育 2 h 后洗板; 加待测血清和阴性对照血清, 37°C 反应 2 h, 同上洗涤; 加山羊抗鼠 IgE 抗体 ($1:5000$ 稀释), 37°C 反应 2 h, 同上洗涤; 加底物 OPD, 37°C 显色 15 min; 2 mol/L H_2SO_4 $50\text{ }\mu\text{L}$ 孔终止反应, 15 min 内在酶标仪上测量 OD 值 (A_{450})。

1.9 体外类胰蛋白酶定向释放测定

类胰蛋白酶活力测定采用专一性底物^[8] $\alpha\text{-N}$ -苯甲酰-DL-精氨酸-P-硝基苯胺 (Na-benzoyl-DL-arginine-P-nitroanilide, BAPNA)。BAPNA 以 20 g/L 溶于二甲基亚砜, 取 $40\text{ }\mu\text{L}$ 加入含 1 mL 细胞上清的 Tris-HCl (0.1 mol/L , $\text{pH } 7.4$) 反应缓冲液 1.5 mL 中, 37°C 反应 30 min 后, 加入 0.5 mL 300 mL/L 乙酸终止反应。相应的细胞被 1.5 mL 反应缓冲液重悬后, 经过细胞破碎仪彻底破碎, 其他处理方式同上清。在 405 nm 测光吸收值。以反应缓冲液做参比调零。根据制定的类胰蛋白酶标准曲线计算细胞上清中的类胰蛋白酶含量与细胞中的类胰蛋白酶含量。释放率 = 上清的类胰蛋白酶 / (上清类胰蛋白酶 + 胞内类胰蛋白酶) $\times 100\%$ 。校正类胰蛋白酶释放率 = 类胰蛋白酶释放率 - 空白对照组类胰蛋白酶自发释放率。

2 结果与分析

2.1 致敏小鼠过敏症状分析

第一次免疫后, 致敏组 ICR 小鼠出现明显过敏症状, 前爪频繁搔挠口鼻处, 体毛直立, 身体颤抖, 呼吸频率加快, 精神萎靡, 活动减少^[9]; 对照组无过敏症状, 说明小鼠过敏模型建立成功。

2.2 肥大细胞计数鉴定及光镜观察

经染色后光镜下计数观察: 分离纯化的腹腔肥大细胞台盼蓝染色, 细胞数为 10^5 个/ mL , 活细胞占总细胞的 94% , 甲苯胺蓝染色, 纯度 91% 。正常肥大细胞核较大, 胞内有许多致密小颗粒。光镜观察可见正常细胞呈圆球形, 轮廓清楚、完整 (见图 1); 牛奶、河虾致敏组脱颗粒细胞形态变得不规则, 表面出现一些空洞, 轮廓模糊不清 (如图 2、3)。



图 1 PBS 对照组 PMC

Fig. 1 Peritoneal mast cell of PBS control group

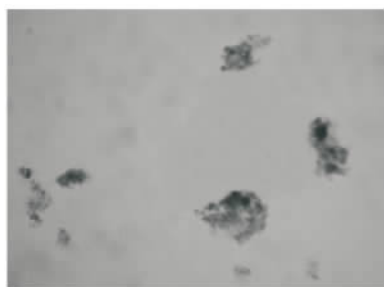


图2 牛奶致敏组 PMC

Fig. 2 Peritoneal mast cell of milk sensitized group



图3 河虾致敏组 PMC

Fig. 3 Peritoneal mast cell of shrimp sensitized group

2.3 脾脏观察与称重

激发后取小鼠脾脏,每周一次,连续3周,分别计算致敏组和PBS对照组脾脏占体质量的比值(质量百分比),发现致敏组小鼠脾脏占体重比值明显大于对照组,说明发生了脾脏肿大,结果如图4:

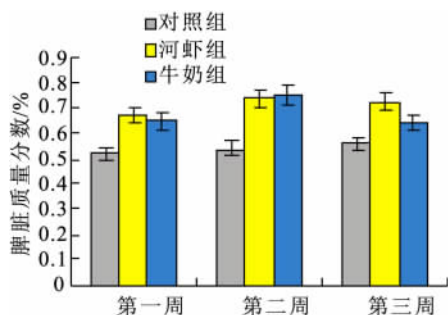


图4 不同致敏组小鼠脾脏质量比较

Fig. 4 Comparison of mice spleen weight in different sensitized groups

2.4 模型小鼠血清 sIgE 水平

分别于初次免疫激发前(0 d)和激发后第7、14、21天检测河虾组、牛奶组及对照组小鼠血清过敏原 sIgE 效价。结果判定以阳性 OD 值为阴性 2.1 倍为准。不同时间及不同组别小鼠血清 sIgE 效价如表1所示。可见各组血清 sIgE 效价均在激发后第7天已上升,第14天达到最高,第21天又有

所下降。从表1中还可看出免疫河虾蛋白组比免疫牛奶组致敏效果更佳。

表1 过敏原激发的 sIgE 效价

Tab. 1 Titer of sIgE sensitized by allergen

组别	免疫前	第7天	第14天	第21天
河虾免疫组	—	1/12 800	1/25 600	1/25 600
牛奶免疫组	—	1/6 400	1/12 800	1/6 400
PBS 对照组	—	—	—	—

2.5 类胰蛋白酶释放率测定结果

因各组小鼠均在激发后第14天 sIgE 效价最高,故选择在激发后第14天测定腹腔肥大细胞组胺定向释放,结果如图5。图5为免疫牛奶组定向释放率达38.5%,免疫河虾组达到47.1%,对照组为5.7%。数据均为每组测量3只小鼠取平均值, t 检验,所有实验组与对照组比较呈显著差异($P < 0.05$)。

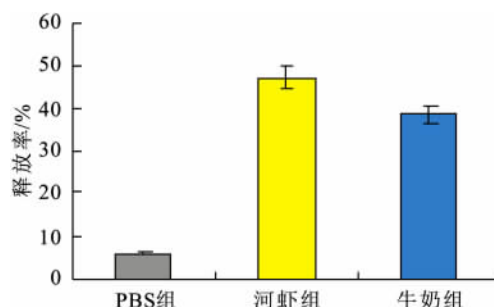


图5 不同致敏组类胰蛋白酶释放率

Fig. 5 Release rate of Trypsin in different groups

3 结语

食物过敏主要是I型过敏反应(速发性过敏反应),具体作用机制是肥大细胞膜特异性受体结合IgE抗体,经过抗原的交联作用,激活了肥大细胞,促使其脱颗粒,释放出多种类型的过敏介质如组胺,而产生食物过敏症状,其中,全身性反应(如血压下降导致的休克)是最严重的反应^[10]。所以本研究选择 sIgE 和组胺作为评价过敏状态的指标。

虽然 Balb/c 系小鼠受过敏原刺激后能产生高滴度的 IgE,是常用于食物过敏性研究中的品系。但由于其价格昂贵,养殖要求比较高,死亡率较高,故本实验选用 ICR 小鼠进行建模对象,据报道 ICR

小鼠也是进行免疫药物筛选,复制病理模型较常用的实验动物,并且根据本研究结果看出,选用 ICR 作为实验对象也能较好的得到需要的结果,小鼠经过河虾、牛奶蛋白的免疫体内确实产生了较为强烈的免疫反应,并通过血清效价和肥大细胞组胺释放率表现出来。建立过敏模型主要有经胃肠道(口服)和非胃肠道(腹腔或皮下注射)这两大类途径,虽前者更好模拟了食物引起人们过敏的途径,但易导致免疫耐受;后者不但能避免口服耐受,且能引起更高滴度 sIgE 的产生^[11]。本实验选用了河虾和牛奶两种致敏原,通过腹腔注射致敏途径建立动物模型。间接 ELISA 结果表明,无论注射河虾组还是牛奶组均产生了较高滴度的 sIgE 抗体,分别在 3 个不同时间点检测 sIgE 水平,激发后第 14 天 IgE 效价达到最高。比较河虾组和牛奶组,结果显示河虾蛋白致敏效果要优于牛奶蛋白。

肥大细胞在变态反应性疾病发病机制具有核心作用,是连接变态反应的诱导阶段与效应阶段的纽带,有将过敏原的信号放大的能力。组胺是经典的过敏介质,以往主要用来标记肥大细胞脱颗粒的程度^[12],但是 Schwartz 等^[13]曾报道组胺这种物质在生理条件下半衰期很短,仅为几分钟,且释放不够稳定,所形成的荧光物质易分解,重复性差,从而导致检测结果的不稳定。而类胰蛋白酶是肥大细胞内预先合成的蛋白酶经肥大细胞脱颗粒释放到胞外与其他介质一起参与过敏反应。有研究结

果^[14]表明类胰蛋白酶占肥大细胞蛋白酶的 25%,在细胞上清液中含量较高,易于检出,此外类胰蛋白酶的检测方法简单,不需要形成荧光物质参与反应,相比组胺的常规检测有明显优势,它能够更精确、更稳定的反映肥大细胞脱颗粒的程度,因此更适合作为检测肥大细胞脱颗粒时的标志物。因激发后第 14 天过敏原 sIgE 水平最高,故测定了第 14 天腹腔肥大细胞的类胰蛋白酶定向释放率,实验组都明显高于对照组,统计分析呈显著性差异,且与 sIgE 检测结果相对应。

此外,由于脾脏是机体最大的免疫器官,可以制造免疫球蛋白、补体等免疫物质,发挥免疫作用。当血液中出现病菌、抗原、异物、原虫时,脾脏中的巨噬细胞、淋巴细胞会发生免疫反应,吞食外源体,结果造成脾脏肿大,因此可以把脾脏的外形及重量变化作为鉴定致敏效果的指标之一。实验结果表明,致敏组小鼠脾重占体重比值明显大于对照组,且河虾致敏组的脾脏比值最大,说明致敏组小鼠体内确实发生了较明显的免疫反应,且河虾蛋白致敏效果更为明显。

综上本研究用河虾、牛奶蛋白皮下免疫 ICR 小鼠建立了过敏症模型,腹腔肥大细胞体外定向组胺释放率和特异性 IgE 水平检测可用于食品过敏原鉴定与评价,对研究食物过敏症的诊断和治疗具有十分重要的意义。

参考文献(References):

- [1] 聂凌鸿. 食品过敏原研究进展[J]. 生命的化学, 2002(22): 474—477.
Nie ling-hong the process of research in food allergen[J]. *Chemistry of Life*, 2002(22): 474—477. (in Chinese)
- [2] Food and Agriculture Organization, FAO Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies[R]. Rome: 1995.
- [3] BUORO S, FERRARESE P, CH IAVEGATO A, et al. Myofibroblast - derived smooth muscle cells during remodeling of rabbit urinary bladder induced by partial outflow obstruction[J]. *Lab Invest*, 1993, 69 (5) : 589—590.
- [4] Zwimer NW, Fuertes MB, Ginn MV, et al. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: Role of the MICA-NKG2D system[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18(1): 159—70.
- [5] Halstensen ST. Why are we not all allergic; basic mechanisms for tolerance development[J]. *Environ Toxicol Pharmcol*, 1997, 4: 25—26.
- [6] 乔秉善. 变态反应学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002. 6—36.
- [7] 郭薇, 陈玉川, 刘水平, 等. 肥大细胞体外脱颗粒的检测方法[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(8): 1023—1025.
GUO wei, CHEN yu-chuan, LIU shui-ping et al. A new method on testing the degranulation of mast cells in vitro[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2002, 18(8): 1023—1025. (in Chinese)

- [8] Lavens SE, Proud D, Warner JA. A sensitive colorimetric assay for the release of tryptase from human lung mast cells [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 166(1): 93–102.
- [9] PEI C, ANDREW J, STUART K. Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration [J]. *Food Chemistry*, 2003, 83: 575–583.
- [11] Dearman RJ, Kimber I. Determination protein allergenicity: studies in mice [J]. *Toxicology letters*, 2001, 120: 18–20.
- [12] 孙仁山. 肥大细胞脱颗粒的标志 [J]. *国外医学·临床生物化学与检验学分册*, 2001, 22(2): 100–101.
SUN ren-shan. The symbol of Mast cells degranulation [J]. *Foreign medical sciences*, 2001, 22(2): 100–101. (in Chinses)
- [13] Schwartz LB, Atkins PC, Bradford TR, et al. Release of tryptase together with histamine during the immediate cutaneous response to allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1987, 80(6): 850–855.
- [14] 郭永超, 组胺、类胰蛋白酶、 β -己糖胺酶在肥大细胞体外释放过程中的相互关系 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*. 2009, 25(12): 1073–1075.
GUO yong-chao. Investigation on the relationship among histamine, tryptase and β -hexosaminidase in the process of mast cell degranulation [J]. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 2009, 25(12): 1073–1075. (in Chinses)

科技信息

欧盟批准二甲酸钾作为动物饲料添加剂

4月20日, 欧盟委员会发布(EU)No333/2012号法规, 批准二甲酸钾(potassium diformate)作为动物饲料添加剂, 并修订了(EC)No492/2006号法规。生鱼和作为饲料的鱼副产物中限量为9000mg/kg, 混合猪饲料中限量为18000mg/kg, 母猪和仔猪增肥用的饲料中限量为12000mg/kg。使用说明中必须指出: 同时使用其他有机酸时禁止使用最大剂量; 为了安全, 在操作过程中应当采取呼吸保护、眼睛保护, 以及手套等措施。新法规将于公布20天后生效。[信息来源] European Union. concerning the authorisation of a preparation of potassium diformate as a feed additive for all animal species and amending Regulation (EC) No 492/2006.

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 333/2012, (2012-4-20). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:108:0003:0005:EN:PDF>

微波食品配料研究成果通过鉴定

由江南大学承担的国家轻工业科技发展项目“微波食品配料的研究和开发”技术成果, 日前通过了国家轻工业局组织的专家鉴定。该项研究系国内首创, 采用配料的方法解决微波食品技术难题, 研究成果居国内领先, 部分达到了国际先进水平。

据课题组负责人张灏教授介绍, 该研究以食品胶体、淀粉化学和风味化学等理论为指导, 系统分析了微波加热对食品品质的影响, 指出了微波食品存在的问题, 提出了微波食品配料新的解决思路, 并针对性地开发出了微波面食品持水剂、油炸食品脆性剂和强化风味料, 解决了微波食品在微波重制过程中出现的风味和品质问题, 而且功能性配料的研究思路为国内首创。应用试验表明, 相应的微波食品经微波解冻或加热后, 能达到或接近传统加工(或烹调)食品的效果。

[信息来源] 中国食品安全报. 微波食品配料研究成果通过鉴定 [EB/OL]. (2012-3-27). <http://www.cfqn.com.cn/Article/2012/2140q/2140d/09573353822067.htm>.