

热处理对食物致敏性的影响及其体外细胞学评价

匡 华¹, 高毕远¹, Yevonne Vissers², 高中山³

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 雀巢研发中心营养和卫生部, 瑞士洛桑; 3. 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 综述了热加工处理对典型食物过敏原致敏性的影响, 重点介绍了体外细胞学评价方法在评价食物过敏原致敏性变化方面的一些研究进展。人们生活方式和环境的改变, 以及日常食物丰富所致过敏诱发因素的增加, 食物过敏发生比例大幅提高, 食品过敏问题已成为目前国内外食品安全研究的热点之一。食品热加工可以改变食物过敏原的蛋白表位结构、聚合特性以及过敏原诱发淋巴细胞释放细胞因子的特性。由于食品基质、配料和处理过程的差异, 加工过程中食品致敏性的变化尚无普遍规律可循。通过对典型食物过敏原的分离纯化、分子鉴定, 可以追踪过敏原组分在食物加工过程中的改变规律。目前过敏效应分子 IgE 抗体的水平变化常常被作为致敏性评价的指标, 酶联免疫分析和免疫印迹试验是常用的测定手段。然而, 对于过敏反应阶段由 IgE 抗体与效应细胞上 FcεR 受体之间的结合引发系列炎症反应的部分, 则无法通过这些方法进行判断。全面评价食物过敏原的致敏效应不但需要监测 IgE 抗体水平, 也需要监测效应细胞致敏程度, 以及释放的细胞因子水平。

关键词: 食物过敏; 食品热加工; 致敏性; 细胞学评价

中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0907—07

Food Allergenicity Influenced by Thermal Processing and in Vitro Cellular Assay

KUANG Hua¹, GAO Bi-yuan¹, Yevonne Vissers², GAO Zhong-shan³

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Nutrition and Health Department, Nestec Ltd/Nestlé Research Centre, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland; 3. Allergy Research Center, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The prevalence of food allergy is continually increasing due to a large variety of food intake and tremendous lifestyle and living environmental changes in modern world. Food allergy incidences have gotten a sharp increase in recent years and food allergy has regarded as one of hot topics in food safety. Food processing may change the epitopes and the binding properties of allergenic protein, and subsequently causes the differences in activation of lymphocyte and cytokine release in the process of allergic reactions. However, due to the differences between food kinds, ingredients or processing techniques, without a general rules for food allergenicity changes caused

收稿日期: 2012-12-04

基金项目: 江苏省社会发展计划项目(BE2011626)。

作者简介: 匡 华(1981—), 女, 河南长垣人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全与分析研究。

E-mail: kuangh@jiangnan.edu.cn

by the way of processing. The IgE antibody level was regarded as the marker in allergy reaction, which was usually detected using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) or immunoblotting measure. However, the methods above couldn't tell whether allergens caused cross-linking between FcεR1 and IgE, which leads to secondary inflammatory reaction. The overall assessment of food allergen not only includes the monitoring of IgE level but also includes the detection of effective cell activation and the release of cytokines. In this review, the effects of thermal processing on the allergenicity of food were summarized and the recent progress of in vitro cellular assay were highlighted for its application in assessment of food allergy.

Keywords: food allergy, food thermal processing, allergenicity, cellular measurement

现代生活, 食品种类的多样和生活方式的变革, 使得食物过敏发生率呈现上升趋势。有报道称, 西方国家大约 1%~2% 的成人和 5%~7% 的儿童有食物过敏史^[1]。中国疾控中心营养与食品安全所的调查表明, 我国 15~24 岁的健康人群中, 约有 6% 的人曾有食物过敏经历^[2]。由于食物过敏与人群年龄、当地食物类型, 以及环境气候等多种因素相关^[3], 因此不同地区、不同人群的食物过敏发生率差异较大。如牛奶、鸡蛋、花生和海产品食物致敏率为 0.1%~10.8%^[3], 水果和蔬菜的致敏率为 0.1%~4.3%^[4]。过敏反应可以在摄入食物后的几个小时甚至几分钟内发作, 因此对于某种食物过敏的人群, 其日常生活质量受到很大的影响。目前的研究发现, 尽管几乎所有食物都可能引发过敏反应, 但不同食物的过敏原可以归纳为少数几个蛋白质家族^[5]。对于食品过敏性的评价可以分为体内试验和体外试验两种类型, 目前大多数采用后者。较为简便的体外监测方法是基于过敏原-IgE 抗体结合的酶联免疫分析 (Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA) 和免疫印迹。

随着最近 10 年里细胞生物学的迅速发展, 从细胞和分子水平上研究过敏机理、评估致敏过程已越来越受到关注。例如过敏原的致敏活性可以通过流式细胞仪分析嗜碱性粒细胞特异性启动标志细胞 CD63 或者 CD 203c 的上调来评价, 即嗜碱性粒细胞活化试验 (Basophile Activation Test, BAT); 亦可通过检测 T 细胞诱导的免疫反应来进行评价。研究者可以使用同源的或者被动致敏的异源人体嗜碱性粒细胞开展组胺释放实验 (Histamine Release Test, HRT); 或者通过细胞过敏原激发试验 (Cellular Allergen Stimulation Test, CAST) 检测肥大

细胞白三烯的释放, 以评估过敏原在人血嗜碱粒细胞中的脱颗粒的能力。本文中主要讨论食品加工对食物过敏蛋白致敏性的影响, 并重点介绍食品致敏性评价中细胞学方法的最新研究进展。

1 食品热处理对食物过敏原致敏性的影响

现代食品加工不仅要改善食物的颜色、风味、质地等方面的性质, 还要着力提高食品的安全性。食物的加工处理会掩盖或者暴露食物蛋白的抗原表位, 影响人体免疫系统对过敏原蛋白的识别和反应, 因而导致食物蛋白致敏性的改变。过去 20 年, 科学家们在食物过敏蛋白的分子鉴定方面做了大量研究, 这为深入研究食品加工对食物过敏蛋白的理化性质及其致敏性变化奠定了基础。

1.1 食品基质对致敏性的影响

加工过程中食品基质对过敏原的致敏性有一定的影响。Grimshaw 等^[6]发现巧克力里的脂肪对食物过敏临床症状反应影响很大。另外, 高脂肪含量会影响 IgE 抗体对花生过敏原的识别, 导致 ELISA 检测敏感性降低。此研究表明, 用于过敏性激发实验的食品配方 (Provocation Recipes) 中的脂肪含量很重要, 因为它可以影响食物激发病人的临床反应。由于食品基质脂肪会掩盖花生过敏原表位, 在食物激发试验中, 导致测试方法对口腔和皮试的反应敏感度下降, 只有待受试人肠胃消化之后才能检测到。然而食物激发测试中若用量加大会引发受试人较为严重的过敏反应。

通过过敏小鼠模型可以测试食物基质的致敏性。在该模型里, 将食品基质充当活化树突细胞的佐剂。例如, 对于花生基质中花生过敏原的致敏性测试, 可以选择一伴随佐剂, 用来活化抗原呈递细

胞(APCs)和诱发随后的免疫刺激(Stimulation)^[7]。比如:脂肪,会影响蛋白质的抗原反应性^[8];食品基质的水解加工处理中,某些有免疫活性的蛋白其N末端肽链解开^[8],或者酶促反应等处理会改变过敏蛋白与IgE的结合活力^[9-11]。

1.2 不同热加工方式对食物致敏性的影响

热加工是食品加工中常见的方法,加工方法对于食品致敏性的影响因食物、蛋白类型的不同而异。一些引发严重过敏的食物蛋白常常结构很稳定,多具有二硫键,具有很强的耐酸碱和消化酶特性,加工过程也对它们影响较小。还有一些过敏蛋白的稳定性一般,日常的食品热加工方法可能破坏或者产生新的表位簇(epitope),从而影响食物的致敏性。如热加工可导致某些食物过敏蛋白三维构象表位变化,使得其与人IgE结合活性降低,或者由于一些过敏蛋白非常不稳定,经过热加工使其致敏性丧失;然而热加工亦可引起蛋白致敏性新表位的产生,或者之前隐藏的蛋白表位暴露,提高了其与IgE的结合能力,将导致食物致敏性的增强。

虾的过敏原蛋白组分主要是原肌球蛋白,张俊英等研究表明,热加工可以显著降低虾致敏性,80℃水浴加热10 min的乳清蛋白水解产物中过敏原含量显著低于未经过加热处理的乳清蛋白中过敏原含量^[12],烘干处理(105℃烘箱中烘烤2 h)后的虾免疫活性降低了85%^[13]。牛奶的过敏原乳球蛋白在加热后并没有完全破坏IgE结合的能力,但是增加了乳清蛋白的体外可消化性,在小鼠模型上发现可以降低鼠嗜碱粒细胞中介质的释放和嗜碱粒细胞的活化作用^[14]。

荷兰学者Vissers等^[15]设计了水煮和烘焙两种热加工方法处理花生,并以未加工的花生作为对照,比较花生过敏原致敏性的变化。她分别纯化了花生主要过敏原Ara h 1、Ara h 2和Ara h 6,比较了两种处理方式下过敏原结构的变化,并且评估了其诱导效应细胞分化和细胞因子释放能力,以及引起IgE结合和交联的能力。研究发现,对于Ara h 1过敏原而言,水煮法可导致Ara h 1自身聚合,从而降低了与IgE结合和交联的活性,其致敏T细胞的活性并未受影响。而从烘焙花生中提取的Ara h 1则高度变性,会形成更多的球状小的聚合物,但其与IgE的结合活性不变。对于Ara h 2和Ara h 6来讲,水煮热加工对于T细胞反应活性没有影响,但

水煮处理降低了这两种过敏蛋白的IgE结合和交联能力,从而使其致敏性显著降低;但从烘烤花生提取的可溶性Ara h 2和Ara h 6与未加工的没有差别。

其它常见的食物成分,如大豆提取物,通常包括种子贮藏性11S和7S球蛋白,这些蛋白比较耐热,这类过敏原通常具有 β -桶状(β -barrel)的蛋白基序(Motif)和高度稳定的结构域特征,在热处理下仅出现部分和轻微的构象变化^[16-17]。7S球蛋白在70~75℃时发生热转换,而11S球蛋白则在94℃以上的温度下解开。Bohel等研究表明,60 min烹饪不同的重组Bet v 1(一种桦树花粉过敏原)相关过敏原,可以完全消除其与IgE的结合能力,但是并未观察到该过敏原致敏特异性T细胞活力的降低^[18]。

有些食物过敏原蛋白非常稳定,如桃和苹果等果实中脂质转移蛋白(LTP),分子量仅为9 kDa,包含4对二硫键。研究表明,天然纯化的苹果果实脂质转移蛋白(Mal d 3, LTP)在含或者不含葡萄糖的基质中热处理(90℃, 20 min)后,其IgE结合活性没有发生改变。在较高温度和较长时间(100℃, 2 h)处理后,才发生些许结构变化,但其IgE结合活性显著降低(近30倍)。在葡萄糖存在下进行热处理,则导致4个葡萄糖分子和1个Mal d 3蛋白分子结合,使得IgE结合活性降低至原来的10%~50%^[19]。

由以上研究对比可知,热加工既可以降低食物过敏原的致敏性,亦可以增强食物过敏原的致敏性,一切因食物蛋白、加工方式和热加工类型不同而异。

1.3 美拉德(Mail lard)反应对食品致敏性的影响

在食品热加工过程中,最重要的非酶促化学变化是美拉德反应。过敏原氨基酸的糖基化的程度取决于不同的环境条件,比如温度、pH、水分活度、加热时间和存在的还原糖浓度及种类^[20]。李庆丽等发现,不同的还原糖对虾过敏原的免疫活性影响差异很大。实验表明,在合适的条件下,美拉德反应能够有效降低虾过敏原的免疫活性^[21]。葡萄糖使虾过敏原免疫活性降低约10%,麦芽糖能够使虾过敏原的免疫活性降低60%。Ilchmann等探索了温度对美拉德反应的影响,发现高温导致苹果果实脂质转移蛋白(Mal d 3)的致敏性显著减弱,然而糖化作用则对过敏原起到保护作用。水果中还原糖的存在让热加工过程中脂质转移蛋白(LTP)的过敏活性变得更加

稳定^[22]。然而对于荞麦过敏原 Fag e 1 而言,却呈相反的现象。Nakamura 等研究发现,多糖链在 Fag e 1 表面结合减弱了它的致敏性^[23]。同样地,Iwan 等研究发现,60~145 °C热处理,榛子过敏原 Cor a 11 的糖化作用有可能减弱其与 IgE/IgG 的结合能力,但是其致敏嗜碱粒细胞的活力不受影响。这有可能与美拉德反应导致的蛋白聚集有关^[24]。最近研究表明,水煮花生中加糖与否对致敏性没有影响^[25]。因此,美拉德反应对食物过敏原致敏性的影响与食物的种类有很大关系。

2 食物过敏原致敏性的体外细胞学评价

食物过敏反应是人体免疫球蛋白 IgE 介导的超敏反应,是一种复发率很高的病理反应。过敏患者受到抗原(或半抗原)的刺激,体内产生相应的抗体或致敏淋巴细胞;当再次接触同一种抗原后,在患者体内引起体液或细胞免疫应答,导致组织损伤或机体生理机能障碍。致敏过程原理根据 Burks A W 的附图、Zhou C 和 Alexandra Zhernakova 的综述绘制^[26-28],如图 1 所示。

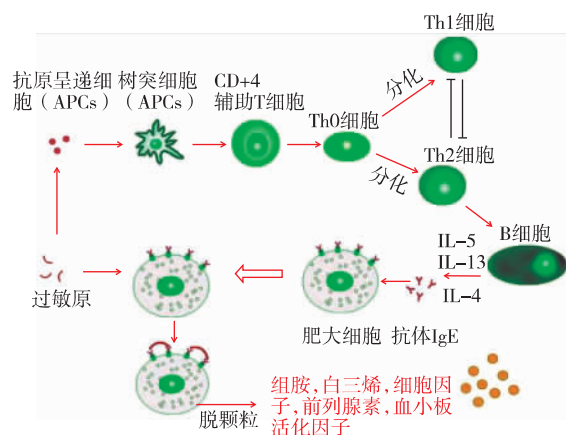


图 1 过敏反应机制示意图

Fig. 1 Skeptical diagram of the mechanism of allergic reaction

Treg 细胞(T 调节细胞)有调节降低免疫应答的作用,它由天然的 Treg 细胞(CD4⁺)和适应性或者诱导产生的 Treg 细胞(Tr1)组成。Treg 细胞可以抑制抗原产生特异的 Th 2 和 Th 1 细胞发育反应,因此在健康免疫应答中扮演了重要的角色^[29]。静默状态的 CD4⁺T 细胞(Th)释放很少的细胞因子。当受到过敏原和抗原呈递细胞激发后产生 IL-2 的状态称做 Th0, Th0 持续受到激发信号后发生极化进程,根据

激发位点的细胞因子性质分为 Th1、Th2、Th17^[30]。

过敏性疾病是由异常 T 细胞(长寿命的 Th2 细胞)对过敏原产生应答反应而导致^[31]。抗原特异 CD4⁺ Th2 细胞受到刺激后分泌大量的细胞因子 IL-4 和 IL-13,它们诱导特异性过敏原 IgE 抗体大量合成。这些 IgE 抗体继而介导级联超敏反应^[32-34]。除此之外,抗原特异 Th2 细胞也会直接参与肺和皮肤器官的迟发型过敏反应^[35]。

食品加工对食物过敏原致敏性的影响可以通过多种手段进行分析评价。如通过监测动物过敏模型暴露于潜在过敏原后的病理性反应,来评估该过敏原诱导敏感人群发生过敏反应的能力。用于检测过敏原和 IgE 的结合能力的免疫印迹或者酶联免疫法简便易行,然而这些检测方法无法确定过敏原是否可引起嗜碱性粒细胞过敏原特异 IgE 抗体与受体 FcεR1 的交联这一致敏生理过程。

近年来的研究热点是通过监测 T 细胞的极化(polarisation)来分析 T 细胞介导的过敏反应。

该方法从细胞生物学的角度来监测 IgE 抗体与受体 FcεR1 的交联引起效应细胞免疫应答、组胺释放的能力。研究者可以使用 T 细胞极化分析来衡量食物中的蛋白质能否启动 CD4⁺辅助性 T 细胞以及 Th2 细胞的活化^[28]。研究过敏蛋白的生物活性以及食品加工或者消化对蛋白致敏潜力的影响时,一般使用较为稳定的人化嗜碱粒细胞,而非捐献血液中初步提取的嗜碱细胞。体外检测嗜碱细胞脱颗粒或组胺释放,可进行自体或异源人嗜碱细胞系的被动激发试验。可定量检测硫化白三烯(sulfidoleukotriene)的释放水平来评价食物过敏原导致嗜碱性细胞脱颗粒的能力。另外,食物过敏原的致敏活力测试,还可通过流式细胞仪进行分析嗜碱性细胞活化的标志物 CD63 或者 CD203c 分子来进行^[32]。

2.1 外周血单细胞(PBMC)模型

外周血单细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)可通过外周血的密度梯度分离而获得。从过敏患者和健康人(对照)身上抽血,菲可(FICOLL,葡聚糖)密度梯度离心后,顶层清液含有血浆和血小板,第二层是 PBMC 层,第三层是聚蔗糖和粒细胞,第四层含有红细胞。PBMC 包括 T 细胞和 B 细胞、自然吞噬细胞和单核细胞。

T 细胞极化分析是基于人的 PBMC 的培养而

进行的。T 细胞的启动需要至少两个信号:主要组织相容性复合体-多肽与 T 细胞受体(TCR/CD3)相结合信号以及抗原呈递细胞(APC)表达的 CD28 结合 B7-1/2(CD80/CD86)发出的第二个信号(因此被称为共刺激信号)^[36]。在 PBMC 培养液中加入过敏原后,过敏蛋白经过 APC 呈递给适应性免疫应答细胞。随后经过级联反应而诱导 T 细胞的活化和特殊细胞因子的生成^[37]。通过监测淋巴细胞表面标记,结合多色流式细胞染色技术,可以分析 PBMC 培养液中的细胞表型。分离血液中 PMBC 部分后,可采用特定细胞表面抗原的特异性单克隆抗体如 α -hCD3, α -hCD4, α -hCD8, α -hCD25, α -hCD14, α -hCD16, α -hCD19 和 α -hCD56^[35]等进行特定细胞染色,采用流式细胞仪分析。此外,还可采用细胞因子来校准 T 细胞的数量。

2.2 细胞培养基质以及新鲜或冻存 PBMC 选择

对于免疫应答过程而言,在接受抗原刺激 1~2 d 的阶段为先天固有(innate)反应(特异单核细胞应答)阶段,接受抗原刺激 5~7 d 后是适应免疫系统应答(特异 T 细胞应答)阶段。PBMC 模型的优点在于可在不同时间阶段测定特定细胞的应答反应,实验结果可以归因于先天固有的和适应性免疫反应所产生的特定细胞反应。它的缺点是血液中的特异抗原致敏产生的淋巴细胞浓度常常很低,抗原特异激发后很难观察到效果。另外, PBMC 群体因人和取样日期而异,因此需要格外精心控制。建议统一取样和测试方法,如用新鲜或者冷冻保存的细胞、相同的培养基和同样的仪器系统,以及用相同的测试时间点。

Yessel 培养基是一种基于伊思考夫改良后的杜尔贝可培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Media, IMDM),不含血清。采用 Yessel 培养基可以较好地呈现 PBMC 表达细胞因子的水平。单细胞可以成功超低温保存,恢复率 50%~75%。

2.3 细胞因子的产生和扩增

食物过敏患者的 T 细胞受到过敏原活化并分化会产生一组典型的细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13, 它们是 Th2 淋巴细胞活化的标志性细胞因子。因此,可以通过对特定的细胞因子的分泌情况进行检测。可采用多重微珠流式细胞仪(BD Bioscience)

测定细胞上清液或者血清,抑或用 ELISA 来测定特定的细胞因子。但这些方法不能判断活化的细胞类型及其比例。使用细胞表面标记物的多重荧光染色结合细胞内细胞因子的染色的方法,可以确定细胞亚型及其分泌的特定细胞因子。该方法可以在单细胞水平上提供更有价值的信息。因为每个刺激物产生不同的细胞动力学反应和细胞因子,可以方便地优化不同细胞因子的最佳刺激时期。

2.4 食物过敏原对特异致敏淋巴细胞的影响

血液中的特异致敏淋巴细胞的比率一般较低。如桦树花粉过敏原 Bet v 1 特异 CD4⁺ T 细胞在非桦树花粉季节的水平约为 CD4⁺ T 细胞总数的十万到百万分之一(过敏和正常人群),在花粉季节上升到千分之一^[37-38]。此外,不同过敏原致敏特异性 T 细胞能力也差异很大。由于致敏细胞低丰度的特点,使得通过特异抗原的激发试验很难观察到显著的细胞增殖和细胞因子水平变化。尤其对于低、中程度的过敏患者的样本,很难发现致敏性淋巴细胞的应答变化,因而常采用多克隆共刺激物来放大应答反应。

3 结 语

我国在食物过敏原以及加工后食物过敏原致敏性的评价方面目前大多是基于提取物和特异性 IgE 的体外检测技术,而对于过敏蛋白组分分离鉴定和细胞学致敏性检测方法已经在西方国家获得应用。与国内现行的 ELISA 相比,基于细胞学的过敏原分析可以检测过敏反应诱导的 T 细胞级联反应,而非单单地检定过敏原与 IgE 抗体的亲和程度。本文对外周血细胞过敏模型的介绍可为研究食物过敏以及评估潜在食物过敏原提供参考。

致谢: 本文部分内容源于 Vissers Y M, Wichers H J, Savelkoul H F J 的文章: Influence of Food Processing, Digestion and the Food Matrix on Allergenicity & Cellular Measures of Allergenicity, 见 Gao Z S, Shen H H, Zheng M 等所编。Multidisciplinary Approaches to Allergy 一书,由杭州浙江大学出版社 2012 年出版,第 203-227 页。感谢浙江大学出版社! 江苏大学董英教授对文稿提出了修改建议和专业指正,对此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2006, 117(2):470-475.
- [2] 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光, 等. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. **中国食品卫生杂志**, 2005, 17(2):119-121.
LV Xiang-zheng, LIU Xiu-mei, YANG Xiao-guang, et al. Preliminary survey on status of food allergy in young Chinese students[J]. **Chinese Journal of Food Hygiene**, 2005, 17(2):119-121. (in Chinese)
- [3] Rona R J, Keil T, Summers C, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2007, 120(6):38-46.
- [4] Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona R J, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2008, 121(5):1210-1218.
- [5] Mills E N, Breiteneder H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins[J]. **Biotechnol Adv**, 2005, 23(6):409-414.
- [6] Grimshaw K E, King R M, Nordlee J A, et al. Presentation of allergen in different food preparations affects the nature of the allergic reaction—a case series[J]. **Clin Exp Allergy**, 2003, 33(11):1581-1585.
- [7] VAN Wijk F, Nierkens S, Hassing I, et al. The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens[J]. **Toxicol Sci**, 2005, 86(2):333-341.
- [8] Wichers H J, Debeijer T, Huud F F, et al. The major peanut allergen Ara h 1 and its cleaved-off N-terminal peptide; possible implications for peanut allergen detection[J]. **J Agric Food Chem**, 2004, 52(15):4903-4907.
- [9] Chung S Y, Maeleki S J, Champagne E T. Allergenic properties of roasted peanut allergens may be reduced by peroxidase[J]. **J Agric Food Chem**, 2004, 52(14):4541-4545.
- [10] Gruber P, Becher W-M, Hofmann T. Influence of the maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin[J]. **J Agric Food Chem**, 2005, 53(6):2289-2296.
- [11] Garcia A, Wichers H, Wichers J H. Decrease of the IgE-binding by Mal d 1, the major apple allergen, by means of polyphenol oxidase and peroxidase treatments[J]. **Food Chemistry**, 2007, 103(1):94-100.
- [12] 张俊英, 孟艳琴, 杨建华, 等. 水解乳清蛋白工艺流程的研究[J]. **乳业科学与技术**, 2011, 34(2):55-57.
ZHANG Jun-ying, MENG Yan-qin, YANG Jian-hua, et al. Hydrolysis processing research of whey protein[J]. **Journal of Dairy Science and Technology**, 2011, 34(2):55-57. (in Chinese)
- [13] 刘一璇, 林洪, 吴丽莎, 等. 加工方式对刀额新对虾主要过敏原免疫原性的影响[J]. **水产学报**, 2011, 35(6):948-952.
LIU Yi-xuan, LIN Hong, WU Li-sha, et al. Study on effects of different processings on immunogenicity of shrimp (*Metapenaeus*) allergen[J]. **Journal of Fisheries China**, 2011, 35(6):948-952. (in Chinese)
- [14] Martos G, Lopez-Exposito I, Bencharitwong R, et al. A mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2011, 127(4):990-997.
- [15] Vissers Y M, Blanc F, Skov P S, et al. Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut [J]. **Plos One**, 2011, 6(8):e23998.
- [16] Mills E N, Marigheto N A, Wellner N, et al. Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean (*Glycine max*)—an in situ spectroscopic study[J]. **Biochim Biophys Acta**, 2003, 1648(1-2):105-114.
- [17] Mills E N, Sancho A I, Rigby N M, et al. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens[J]. **Mol Nutr Food Res**, 2009, 53(8):963-969.
- [18] Bohle B, Zwolfer B, Heratizadeh A, et al. Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE- and T-cell-mediated reactivity in vitro and in vivo[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2006, 118(1):242-249.
- [19] Sancho A I, Rigby N M, Zuidmeer L, et al. The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3[J]. **Allergy**, 2005, 60(10):1262-1268.
- [20] Renn P T, Sathe S K. Effects of pH, temperature, and reactant molar ratio on L-leucine and D-glucose Maillard browning reaction in an aqueous system[J]. **J Agri Food Chem**, 1997, 45(10):3782-3787.
- [21] 李庆丽, 李振兴, 林洪, 等. 美拉德反应中麦芽糖、葡萄糖对虾过敏原活性影响的研究[J]. **食品工业科技**, 2009, 30(1):79-84.
LI Qing-li, LI Zhen-xing, LIN Hong, et al. Study on the influence of maltose and glucose in Maillard reaction on the activity of the shrimp allergen[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2009, 30(1):79-84. (in Chinese)

- [22] Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, et al. Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: role of macrophage scavenger receptor class A type I and II[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2010, 125(1): 175–183.
- [23] Nakamura S, Suzuki Y, Ishikawa E, et al. Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides[J]. **Food Chemistry**, 2008, 103(3): 538–545.
- [24] Iwan M, Vissers Y M, Eva F, et al. Impact of maillard reaction on immunoreactivity and allergenicity of the hazelnut allergen cor a 11[J]. **J Agric Food Chem**, 2011, 59(13): 7163–7171.
- [25] Blanc F, Vissers Y M, Adel-Patient K, et al. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity[J]. **Mol Nutr Food Res**, 2011, 55(12): 1887–1894.
- [26] Zhernakov A A, Vandiemmen C C, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases[J]. **Nature Reviews Genetics**, 2009, 10(1): 43–55.
- [27] Burks A W. Peanut allergy[J]. **Lancet**, 2008, 37: 1538–1546.
- [28] Zhou C. Mechanism of type I hypersensitivity[M]//Gao Z S, Shen H H, Zheng M. Multidisciplinary Approaches to Allergy. 杭州: 浙江大学出版社, 2012: 19–32.
- [29] Haselden B M, Kay A B, Larche M, et al. Immunoglobulin E-independent major histocompatibility complex-restricted T-cell peptide epitope-induced late asthmatic reactions[J]. **J Exp Med**, 1999, 189(12): 1885–1894.
- [30] Ozdemir C, Akdis M, Akdis C A. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation[J]. **Clin Exp Allergy**, 2009, 39(5): 626–639.
- [31] Vissers Y M, Wichers H J, Savelkoul H F J. Influence of food processing, digestion and the food matrix on allergenicity & cellular measures of allergenicity[M]//Multidisciplinary Approaches to Allergy. 杭州: 浙江大学出版社, 2012: 203–227.
- [32] Schimek E M, Zwolfer B, Briza P, et al. Gastrointestinal digestion of Bet v 1 – homologous food allergens destroys their mediator-releasing, but not T cell-activating, capacity[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2005, 116(6): 1327–1333.
- [33] Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells[J]. **J Exp Med**, 2004, 199(11): 1567–1575.
- [34] Christensen L H, Holm J, Lund G, et al. Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge[J]. **J Allergy Clin Immunol**, 2008, 122(2): 298–304.
- [35] Akdis M. Immune tolerance in allergy[J]. **Curr Opin Immunol**, 2009, 21(6): 700–707.
- [36] VAN Overtvelt L, Wambre E, Maillere B, et al. Assessment of Bet v 1-specific CD4+T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers[J]. **J Immunol**, 2008, 180(7): 4514–4522.
- [37] Jeurink P V, Vissers Y M, Rappard B, et al. T-cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production[J]. **Cryobiology**, 2008, 57(2): 91–103.
- [38] Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T-cells: functional modules for tailored immunity [J]. **Eur J Immunol**, 2009, 39(8): 2076–2082.