

丽江山荆子表儿茶素抗辣木叶蛋白过敏作用

彭君, 樊莹润, 吴正豪, 李泽林, 艾媛媛, 付晓萍, 宋爽, 范江平*

(云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201)

摘要: 为探讨丽江山荆子表儿茶素 (Epicatechin, EC) 抗辣木叶粗蛋白 (*Moringa oleifera* leaf protein, MOpA) 诱导的过敏作用, 利用小鼠进行食物过敏反应试验, 观察小鼠的过敏症状, 测定其体质量、胸腺指数和脾脏指数; 检测小鼠血清中组胺 (Histamine, HIS)、白细胞介素-4 (Interleukin, IL-4)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor-Alpha, TNF- α) 质量浓度。苏木精-伊红染色法 (Hematoxylin-Eosin Staining, HE) 观察小鼠空肠组织病理变化的影响。结果发现, 用 MOpA 激发后, MC 组小鼠脾脏指数显著高于 NC 组 ($P<0.01$), 胸腺指数相较于 EC 组差异明显 ($P<0.05$); EC 组相较于 MC 组小鼠血清中的 HIS 含量降低了 3.99×10^3 ng/L ($P<0.01$), TNF- α 含量升高了 97.33×10^3 pg/L ($P<0.01$), IL-4 含量降低了 6.22×10^3 pg/L ($P<0.05$); HE 染色发现, MC 组出现肠绒毛断裂及萎缩现象; EC 组病理现象不明显。EC 能够通过保护肠道黏膜屏障和在一定程度上抑制炎症来改善 MOpA 诱导的过敏小鼠的症状。该研究表明 MOpA 和卵清蛋白、牛乳蛋白和花生蛋白等过敏原一样具有潜在的致敏性; EC 可能是一种有效的食物来源的免疫调节剂, 用于治疗食物过敏。

关键词: 丽江山荆子表儿茶素; 辣木叶蛋白; 食物过敏; 组织病变; 活性

文章编号: 1673-9078(2023)10-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1223

Anti-allergic Effects of *Malus rockii* Rehd-derived Epicatechin against the Proteins from *Moringa oleifera* Leaves

PENG Jun, FAN Yingrun, WU Zhenghao, LI Zelin, AI Yuanyuan, FU Xiaoping, SONG Shuang, FAN Jiangping*

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The anti-allergic effects of epicatechin (EC) derived from *Malus rockii* Rehd against reactions induced by the crude proteins of *Moringa oleifera* leaves (MOpA) were analyzed via anaphylaxis testing in a mouse model. The allergic symptoms of mice were observed and body mass, thymus index, and spleen index were measured. Meanwhile, the concentrations of histamine (HIS), interleukin-4 (IL-4), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected in mouse serum. Additionally, the pathological changes in the jejunum were examined via hematoxylin-eosin staining (H&E). The results showed that, following MOpA stimulation, the spleen index of the MC group was significantly higher than that of the NC group ($P<0.01$), and the thymus index differed significantly from that of the EC group ($P<0.05$). However, following treatment with epicatechin, the serum HIS content of the EC group decreased by 3.99×10^3 ng/L ($P<0.01$), whereas the TNF- α increased level by 97.33×10^3 pg/L ($P<0.01$) compared with those of the MC group. Furthermore, the IL-4 content decreased by 6.22×10^3 pg/L ($P<0.05$) in the EC group compared with the MC group. HE staining further revealed intestinal villi damage and atrophy in the MC group, whereas pathological changes were not apparent in the EC group. In summary, MOpA was found to elicit the same level of potential allergenicity as ovalbumin, milk protein, and peanut protein, whereas EC effectively ameliorated the allergic symptoms of MOpA-induced food allergy in mice by protecting the intestinal mucosal barrier and reducing inflammation. The findings of this study suggest that EC could serve as an effective food-derived immune regulator for the treatment of food allergies.

Key words: epicatechin from *Malus rockii* Rehd; *Moringa oleifera* leaf protein; food allergy; tissue lesions; activity

引文格式:

彭君,樊莹润,吴正豪,等.丽江山荆子表儿茶素抗辣木叶蛋白过敏作用[J].现代食品科技,2023,39(10):1-8

PENG Jun, FAN Yingrun, WU Zhenghao, et al. Anti-allergic effects of *Malus rockii* rehd-derived epicatechin against the proteins from *Moringa oleifera* leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 1-8

收稿日期: 2022-09-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31560457)

作者简介: 彭君 (1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 2975409501@qq.com

通讯作者: 范江平 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与功能性食品, E-mail: fjp2282005@126.com

近年来,潜在过敏人群不断扩大,全球有2%左右的成年人和2%~8%左右的婴幼儿在食用特定种类的食物后会引发过敏症状,且正发展成一个重大的公共卫生问题^[1]。食物过敏被定义为机体免疫对摄入食物产生的由免疫介导的不良反应,又称变态反应^[2]。食物过敏在临床上主要表现为皮肤(过敏性皮炎和荨麻疹)、口腔和消化道(腹痛和腹泻)、呼吸道(打喷嚏、流鼻涕和哮喘)等组织和器官的不良症状,严重的食物过敏可能导致过敏患者休克甚至死亡^[3,4],其危害性不容忽视。国内过敏原食物主要有虾、芒果、贝类、鸡蛋、鱼、牛肉、牛奶和羊肉,以动物源性食物为主,与欧洲以花生和大豆为主有差异^[5]。由此可见,高蛋白食物具有潜在的致敏风险。新资源食品辣木叶因其蛋白质含量高备受关注,其蛋白含量在17.9%~26.8%不等^[6]。印度、东南亚和非洲等地都将其作为蔬菜食用^[7],用作对抗营养不良的替代食物来源^[8]。但高蛋白的辣木暴露可能存在潜在的致敏性。有报道显示,一名在化妆品公司工作的男性员工因长期接触辣木粉出现咳嗽、胸闷、呼吸困难和喘息等职业性哮喘症状^[9]。研究人员利用免疫印迹实验,发现辣木蛋白在24 ku~56 ku之间有强烈的IgE反应蛋白^[10],但具体的致敏机理尚不清楚。对食物过敏的干预,临床上通常使用抗组胺类药物、糖皮质激素、肥大细胞膜稳定剂、白三烯受体抑制剂及钙通道阻断剂等方法进行治疗,但长期使用会产生一些副作用^[11]。近年随着相关研究的不断深入,人们发现天然产物在干预过敏类疾病方面显示出良好效果。益生菌、益生元和多酚、黄酮等物质具有缓解过敏症状作用。尤其是多酚、黄酮等物质,有望成为抗过敏药物,能够在过敏免疫反应中影响多个生物途径和免疫细胞功能^[12-15]。Zuercher等^[16]通过卵清蛋白致敏小鼠模型,在致敏期或挑战前灌胃苹果多酚提取物,发现其能缓解过敏症状,降低Th2型促炎因子分泌水平。Zhang等^[17]研究发现二氢杨梅素能够上调卵清蛋白过敏小鼠的直肠温度,抑制腹泻的发展,降低血清组胺水平。表儿茶素(Epicatechin, EC)作为黄酮类物质,具有抗过敏^[19]、抗氧化^[20]、抗炎^[21]等多种药理活性,在小鼠肺损伤炎症模型中已表现出能降低白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子含量^[22]。丽江山荆子表儿茶素是从丽江山荆子(*Malus rockii* Rehd)果实中分离得到的一种黄烷醇类化合物,是丽江山荆子果实的主要生物活性成分之一^[18]。因此推测丽江山荆子表儿茶素可能也具有抗过敏作用。

本研究拟以辣木叶粗蛋白(*Moringa oleifera* Leaf Protein, MOP)为过敏原,建立BALB/c小鼠过敏

模型,通过丽江山荆子表儿茶素进行干预,评价其抗过敏作用,为进一步研究表儿茶素的免疫调节作用及抗过敏作用机制提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)级4~6周龄BALB/c小鼠,雌性,36只,体质量16~22 g,购自云南省昆明医科大学(许可证号码:SCXK(滇)K2020-0004)。所有动物实验操作严格遵守国家科学技术委员会《实验动物护理和使用指南》,经云南农业大学动物伦理委员会批准(生命科学伦理审查号:202203019),在动物实验屏障房内进行。实验小鼠饲料为标准小鼠饲料(不含有辣木叶及相关成分),购于昆明医科大学。

饲养条件:饲养温度20~25℃,相对湿度40%~70%,按昼夜节律采光,12 h明/12 h暗,笼具和垫料定期清洗更换,定期消毒,动物饲养一周,使其适应生长环境,开始实验。

1.2 实验试剂和原材料

乙醚、无水乙醇、二甲苯、中性树脂,国药集团化学试剂有限公司;HE染液套装、生理盐水、磷酸盐缓冲溶液,武汉赛维尔生物科技有限公司;Mouse TNF- α ELISA试剂盒、Mouse IL-4 ELISA试剂盒、Mouse HIS ELISA试剂盒,上海酶联生物有限责任公司;铝佐剂,美国赛默飞世尔科技有限公司;以上化学试剂均为分析纯。

丽江山荆子鲜果:采自云南省丽江市玉龙县拉市乡,经云南农业大学食品科学技术学院园艺产品贮藏与加工方向的袁唯教授与中国科学院昆明植物研究所李忠荣高级工程师鉴定为蔷薇科(Rosales)苹果属(*Malus*)山荆子系的丽江山荆子(*Malus rockii* Rehd)果实。

辣木叶:购于云南省德宏州云南天佑科技开发有限公司;品系为*M. oleifera* PKM1。

1.3 实验仪器

DW-86L578J-80℃低温冰箱,青岛海尔股份有限公司;ZNCL-BS磁力搅拌器,上海越众仪器设备有限公司;Multiskan FC酶标仪,美国赛默飞世尔科技有限公司;TGL-18M低温离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;JB-P5包埋机、JB-L5冰台,武汉俊杰电子有限公司;RM2016病理切片机,上海徕卡仪器有

有限公司; KD-P 组织摊片机, 科迪仪器设备有限公司; Donatello 脱水机、Giotto 染色机, DIAPATH; GFL-230 烤箱, 天津市莱玻璃仪器设备有限公司; Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜、Nikon DS-U3 成像系统, 日本尼康; D-10 兽用电子体温计, 临海医疗仪表厂。

1.4 样品制备

丽江山荆子表儿茶素的制备: 参照任丽蓉等^[23]的方法进行提取、分离纯化。以丽江山荆子鲜果为原料, 采用甲醇超声辅助提取, 依次用 MCI-CHP 20P、ODS、Sephadex 柱层析分离纯化得到表儿茶素单体, 高效液相色谱法检测其纯度为 98%。

辣木叶粗蛋白的制备: 参考杨豪等^[24]的方法进行提取。以辣木鲜叶为原料, 通过磷酸盐缓冲溶液浸提, 硫酸铵沉淀, 透析冻干, 将其作为过敏原密封保存备用, 并将其命名为 (*Moringa oleifera* Leaf Protein, MOpA)。

1.5 动物分组与处理

选用健康 BALB/c 小鼠 36 只, 适应性饲养一周后按照随机数字表法分为 3 组, 每组 12 只。设置 NC 组、MC 组、EC 组。根据张亚芬^[25]和 Yang 等^[26]的方法进行给药。考虑到参照物不同, 对 MOpA 剂量进行了调整。一方面考虑到本次实验使用的 MOpA 是粗蛋白, 没有进行分离纯化, 其中一部分可能是过敏原, 故设置致敏剂量为 10 mg/kg·bw; 另一方面考虑到 MOpA

的溶解性, 和参照蛋白 OVA 相比相对较差, 设定激发剂量为 50 mg/kg·bw。结合预实验结果确定本次实验 EC 剂量为 50 mg/kg·bw。1 周后开始致敏, 第 0、7、14、21 天分别对小鼠进行腹腔注射, NC 组用 200 μ L 的混合液 (含有 PBS+Al(OH)₃ 佐剂) 腹腔注射作为空白对照; MC 组和 EC 组用致敏剂量为 200 μ L 的致敏液 (含有 10 mg/kg·bw 的 MOpA+Al(OH)₃ 佐剂) 进行致敏。从第 28 天开始, NC 组用等体积的 PBS 灌胃激发, MC 组和 EC 组用 50 mg/kg·bw 的 MOpA 进行灌胃激发, 剂量均为 200 μ L, 每 3 d 灌胃一次, 一共 5 次, 直到第 41 天。EC 组从第 32 天开始灌胃 50 mg/kg·bw 的 EC, 每只小鼠 200 μ L, 一共灌胃 9 次。

1.6 MOpA 诱导的过敏性小鼠过敏评分、体温和体质量的检测

通过观察小鼠的临床症状, 以评估小鼠经大量蛋白质攻击后引起过敏反应的能力。通过分析灌胃激发阶段小鼠的过敏症状、直肠温度变化来确定食物过敏的效力。每次激发后评估全身过敏症状, 每只小鼠被单独放在一个单独的笼子里, 监测 1 h。根据熊志乐^[27]的临床评分表对小鼠进行评分, 并在此基础上稍作修改。过敏症状得分 (0~5) 是根据过敏症状 (主要观察抓挠行为、丧失活动能力、肿胀、绒毛情况和呼吸情况) 和腹泻 (主要观察粪便形态) 标准获得的评分的总和。评分标准见表 1。

表 1 小鼠腹泻及过敏症状评分表

Table 1 Standard of diarrhea and clinical anaphylaxis symptom scoring system

得分	过敏症状	腹泻
0	无任何过敏症状	无腹泻症状
1	4~10 次反复抓耳朵、嘴巴和头部	少量湿润且未成形
2	10 次以上反复抓挠, 活动量减少, 眼睛、耳朵红肿	粪便不成形但不完全
3	小鼠静止时间超过 2 min, 嘴巴、尾巴有红疹, 呼吸速率明显增加; 蜷缩	粪便呈浆状且完全不成形, 夹带大量黄色粘液
4	眼球突出; 刺激后无反应; 毛茸茸; 颤抖; 呼吸困难或者发绀	粪便成透明粘稠的黄色水样便, 肛门部位有轻微残留
5	休克、死亡	严重水样便、在肛门处结块, 不及时清理易造成小鼠死亡

于第 0、7、14、21、28、31、34、37、40 天测定小鼠体质量并记录, 共测定体质量 9 次。统计 36 只小鼠这 9 天的体质量, 每组小鼠体质量取平均值, 绘制每组小鼠体质量变化趋势图, 以便观察小鼠体质量改变状况。在最后一次灌胃激发后, 每隔 20 min 用兽用电子体温计测定小鼠直肠温度, 一共测 3 次。

1.7 小鼠免疫脏器指数的检测

建模结束后处死小鼠, 处死小鼠前称量最后一次

体质量, 用于计算脏器指数。利用乙醚麻醉, 在麻醉状态下眼眶取血后处死, 无菌操作取出小鼠胸腺及脾脏, 去除周围结缔组织, 用预冷生理盐水洗净, 吸水纸吸去脏器表面液体后置于电子天平称质量, 记录小鼠脏器质量, 计算免疫脏器指数。

$$IOI = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

IOI——免疫脏器指数, %;

m_1 ——胸腺或脾脏质量, g;

m_2 ——小鼠体质量, g.

1.8 ELISA 检测小鼠血清中 HIS 和 IL-4、

TNF- α 水平

动物建模完成后, 断食不断水 12 h, 利用乙醚麻醉, 在麻醉状态下眼眶取血。收集小鼠血液, 室温静置 30 min, 3 000 r/min, 离心 15 min。收集上清液冻存于 -80 °C, 备用。分别用 HIS、IL-4、TNF- α 试剂盒进行细胞因子的测定, 血清稀释一定倍数后参照相应试剂盒说明书流程进行操作, 通过标准曲线计算小鼠体内血清中细胞因子的含量水平。

1.9 HE 染色观察小鼠空肠组织病理改变

实验最后一天, 利用乙醚麻醉, 在麻醉状态下眼眶取血后颈椎脱臼处死小鼠, 收集新鲜的小鼠空肠组织, 经体积分数 4%多聚甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋后, 制成 5 μ m 厚的组织切片并进行苏木精-伊红 (HE) 染色。经烤片后, 依次将切片放入二甲苯 I 20 min-二甲苯 II 20 min-无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-体积分数 75%酒精 5 min, 自来水洗。切片放入苏木素染液染 3~5 min 后自来水洗、分化液分化、

自来水洗、返蓝液返蓝, 流水冲洗。将切片依次入体积分数 85%、95%的梯度酒精脱水各 5 min, 伊红染液中染色 5 min。使用中性的树胶封片后, 于显微镜下观察空肠组织病理学变化, 根据肠绒毛受损情况对空肠组织进行评价。

1.10 数据分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2、Origin 2021 软件进行数据分析和作图。数据表示为平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm SD)。组间显著性差异分析比较采用单因素方差分析法 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示组间差异有统计显著性, $P < 0.01$ 表示组间差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 小鼠临床症状及解剖观察

在食物过敏中, 腹泻不仅是肠道渗透负荷的结果, 而且是抗原特异性急性免疫反应的结果^[28]。过敏性腹泻是由于肠道离子分泌增加而导致肠道通透性增加引起的。对于过敏小鼠, 在经过过敏原激发后机体会产生一系列的反应, 可能会导致小鼠焦躁不安、抓耳挠腮、毛发直立、胡须脱落、腹泻、休克甚至死亡。因此, 过敏症状是表征过敏反应的一个重要指标。

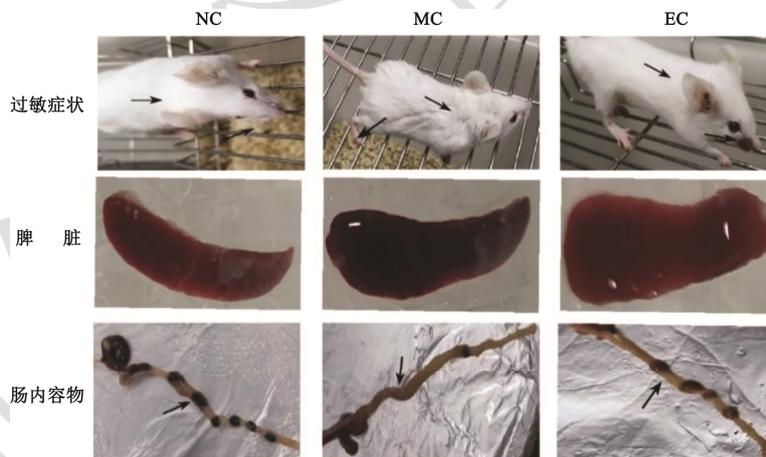


图1 小鼠过敏临床表现、脾脏及肠内容物

Fig.1 Clinical manifestations of allergy, spleen and intestinal contents morphology in mice

此次实验小鼠的症状见图 1, NC 组小鼠在激发前后行为几乎一致, 精神良好, 毛发光亮致密、粪便干燥呈颗粒状; 在灌胃 MOpA 后, 与 NC 小鼠相比, MC 组小鼠活动减少, 毛发失去光泽。小鼠反复抓挠嘴部和头部, 啃咬尾部, 伴随嘴部肿胀, 牙齿出血, 触须脱落, 腹泻, 身体震颤和烦躁不安, 部分小鼠有便血的症状。MC 组小鼠粪便粘稠, 伴随有黄色透明物质, 部分小鼠粪便呈现水样便。EC 组与 MC 组小鼠表现出相似症状, 但是活动能力和进食能力强于

MC 组小鼠, 粪便基本呈颗粒状, 少量伴随有淡黄色粘液。在给予药物干预后, 致敏小鼠的过敏症状低于 MC 组。用 MOpA 致敏小鼠后, 与 NC 组小鼠相比, MC 组小鼠脾脏肿大, 颜色发黑。经过 EC 干预后, 脾脏肿大程度减轻, 有肿大现象, 但不明显, 颜色呈红色。通过小鼠的临床症状和解剖后结肠观察, 一方面发现 MOpA 小鼠过敏症状与夏振江^[29]等建立的 OVA 致敏的过敏性腹泻小鼠症状相似, 说明 MOpA 过敏模型建立成功; 另一方面发现丽江山荆子 EC 对

MOpA 引起的过敏性腹泻有一定的治疗作用。夏振江^[29]等研究发现 OVA 致敏小鼠在给予色氨酸钠干预后, 过敏症状得到有效缓解, 腹泻率低于模型组。由此可见丽江山荆子 EC 对过敏症状有缓解作用。

2.2 EC 对 MOpA 过敏小鼠过敏评分、体温和体质量的影响

体质量的影响

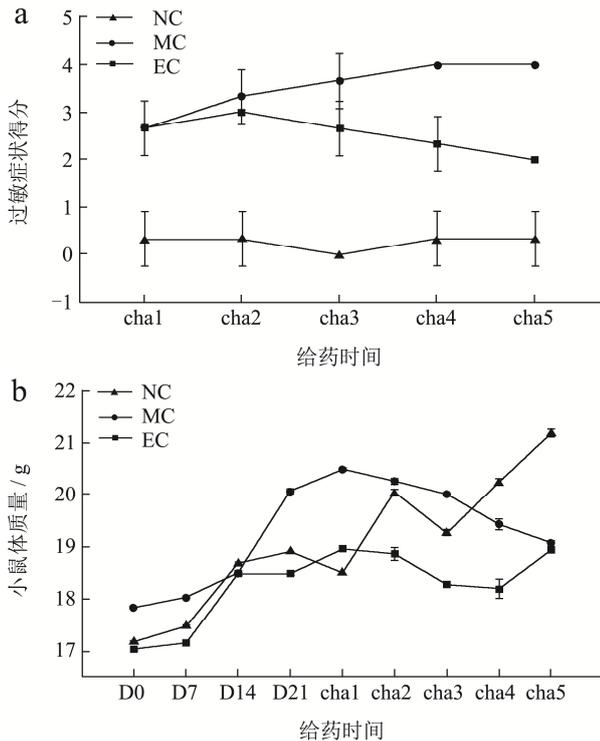


图2 EC 对 MOpA 诱导的小鼠过敏评分 (a) 和体质量变化 (b) 的影响

Fig.2 Effect of EC on the MOpA-induced allergic score (a) and body weigh change (b) in mice

注: cha1~cha5 表示第 1~5 次灌胃激发时间, 分别为第 28、31、34、37、40 天, D0、D7、D14、D21 分别表示第 0、7、14、21 天。

表 2 EC 对 BALB/c 小鼠直肠体温变化的影响

Table 2 Effect of EC on rectal temperature of mice

组别	体温/℃		
	20 min	40 min	60 min
NC	36.23±0.40	36.83±0.21	37.30±0.36
MC	34.43±0.31 ^{###}	35.60±0.44 [#]	35.43±0.32 ^{###}
EC	34.80±0.17	35.80±0.61	35.82±0.21

注: NC 为空白对照组; MC 为 MOpA 模型组; EC 为表儿茶素处理组。表中数据均为均值±标准差, 与 NC 组相比, [#] $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$ 。

为考察丽江山荆子 EC 对过敏小鼠症状的缓解情况, 每次灌胃 MOpA 刺激后 1 h 内观察小鼠对其过敏

症状进行评分。从图 2a 可知, 随着灌胃小鼠 MOpA 次数的增加, MC 组小鼠的过敏症状评分逐渐升高, 显著高于 NC 组; EC 干预后, 过敏症状逐渐减弱, 评分趋于平缓。最后一次灌胃 MOpA 过敏原后 1 h 内测量各组小鼠直肠温度, 从表 2 可以看出, NC 组小鼠灌胃后体温变化不大, 随着激发时间的延长, 体温逐渐恢复。体质量变化是小鼠进食能力和活动能力的表现。从图 2b 可知, 对小鼠进行腹腔注射 MOpA 致敏阶段, 各组小鼠的体质量均有所增加。灌胃激发后, MC 组小鼠体质量减轻, 出现腹泻症状, EC 组小鼠的体质量下降不明显, 且有一定程度的增加, 说明小鼠的进食能力受到影响。抗原的持续暴露会导致体质量下降, 体质量减轻可能与食物厌恶有关^[30]。张亚芬^[25]研究发现随着 OVA 灌胃次数增加, OVA 组小鼠的过敏评分显著上升、直肠温度显著下降, 经吊石苜黄酮干预后能够减轻小鼠腹泻、体温低的症状。以上结果表明 MOpA 灌胃小鼠能产生与 OVA 致敏小鼠相似症状, 经过 EC 灌胃处理, 小鼠体内发生的过敏症状得到缓解。低温反应和过敏症状表明 MOpA 可能和其他过敏原一样具有潜在的致敏性, 比如 OVA^[25]、牛乳蛋白^[31]和花生蛋白^[32]。

2.3 EC 对 BALB/c 小鼠脏器指数的影响

表 3 各组小鼠免疫器官指数变化

Table 3 Immune organ index of mouse in three group

组别	胸腺指数/%	脾脏指数/%
NC 组	0.21±0.02	0.28±0.02
MC 组	0.16±0.06	0.75±0.02 ^{###}
EC 组	0.29±0.03 [*]	0.54±0.02 ^{**}

注: NC 为空白对照组; MC 为 MOpA 模型组; EC 为表儿茶素处理组。表中数据均为均值±标准差, 与 MC 组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与 NC 组相比, ^{###} $P<0.01$ 。

脾脏是重要的免疫器官, 是细胞免疫和体液免疫的中心, 是机体内最大的免疫器官^[33]。表 3 为各组小鼠免疫器官指数的变化情况, 从表可知, MC 组脾脏指数 (0.75%) 相较于 NC 组 (0.28%) 显著升高 ($P<0.01$), 说明 MOpA 诱导的过敏反应对小鼠脾脏有一定的影响, 经 EC 干预后, EC 组 (0.54%) 小鼠脾脏指数低于 MC 组, 可以认为丽江山荆子 EC 对 MOpA 诱导的过敏小鼠的脾脏肿大向正常小鼠水平恢复的趋势。且在胸腺数据中发现, MC 组胸腺指数 (0.16%) 相较于 NC 组 (0.21%) 和 EC 组 (0.29%) 显著降低 ($P<0.05$)。说明建立的 MOpA 过敏模型对小鼠脾脏和胸腺有影响, EC 在一定程度上缓解了 MOpA 过敏引发的器官影响。本次实验结果与隗继

浩^[34]在探讨新橙皮苷二氢查耳酮 (Neohesperidin Dihydrochalcone, NHDC) 体内抗过敏活性时类似, 研究发现 OVA 致敏小鼠脾脏系数增加, 胸腺系数降低, NHDC 对降低过敏小鼠脾脏指数、升高过敏小鼠胸腺指数有积极作用。综上可以认为 MOpA 能够破坏小鼠免疫器官的正常分化, EC 对于 MOpA 引起的免疫器官损伤有一定修复作用, 能够缓解食物过敏引起的免疫器官的不正常分化。

2.4 BALB/c 小鼠血清中 HIS、IL-4、TNF- α

含量和 TNF- α /IL-4 比值分析

当过敏原进入机体被识别后, 诱导 B 细胞产生特异性抗体 IgE。IgE 与效应细胞 (如肥大细胞) 表面的 Fc ϵ R1 结合后, 使肥大细胞发生脱颗粒产生组胺, 组胺有强烈的舒张血管的作用, 并能使毛细血管管壁通透性增强, 血浆渗出组织, 导致局部水肿。因此研究组胺的变化是食物过敏反应的一个重要指标^[35]。由图 3a 可知, 经 MOpA 致敏后, MC 组的组胺含量 (17.08×10^3 ng/L) 与 NC 组 (9.90×10^3 ng/L) 相比显著升高 ($P < 0.01$)。EC 干预后, 发现 EC 的 HIS 含量 (13.09×10^3 ng/L) 显著降低 ($P < 0.01$)。张亚芬^[25]研究发现吊苣黄酮能显著降低 OVA 过敏小鼠血清中的组胺含量 ($P < 0.01$)。由此可见, 丽江山荆子 EC

能抑制 MOpA 过敏小鼠组胺的释放。

食物过敏主要是由 IgE 介导的 I 型过敏反应, 当过敏原进入机体细胞内, 诱导 T 细胞向 Th2 细胞分化, 打破 Th1 和 Th2 细胞平衡, 并分泌 IL-4^[36]。IL-4 在 Th2 细胞分化中扮演了重要角色, 对 B 细胞、T 细胞、肥大细胞和巨噬细胞等都具有免疫调节作用。对血清中的 IL-4 含量进行测定, 结果如图 3b 所示。经 MOpA 致敏后, MC 组 IL-4 含量 (157.15×10^3 pg/L) 与 NC 组 (130.78×10^3 pg/L) 相比显著升高 ($P < 0.01$), EC 干预后, 发现 EC 组的 IL-4 含量 (150.93×10^3 pg/L) 降低, 表明丽江山荆子 EC 可以降低 IL-4 水平。对小鼠血清中的 TNF- α 含量进行测定, 结果如图 3c 所示。经 MOpA 致敏后, MC 组的 TNF- α 含量 (582.80×10^3 pg/L) 与 NC 组 (652.80×10^3 pg/L) 相比显著降低 ($P < 0.01$), EC 干预后 TNF- α 含量 (680.13×10^3 pg/L) 显著升高 ($P < 0.01$), 表明丽江山荆子 EC 可以增强 TNF- α 水平。Lee 等^[37]研究了麦黄酮对 OVA 处理的小鼠的抗过敏作用, 发现麦黄酮通过选择性降低 Th2 细胞因子水平和增强 Th1 细胞因子水平来调节 Th1/Th2 平衡。Yamamoto 等^[38]研究发现葛根素治疗 OVA 过敏小鼠可以通过降低 IL-4 的表达水平来抑制其过敏性腹泻的发生。由此可见, 丽江山荆子 EC 能够通过调节 Th1/Th2 平衡发挥抗过敏作用。

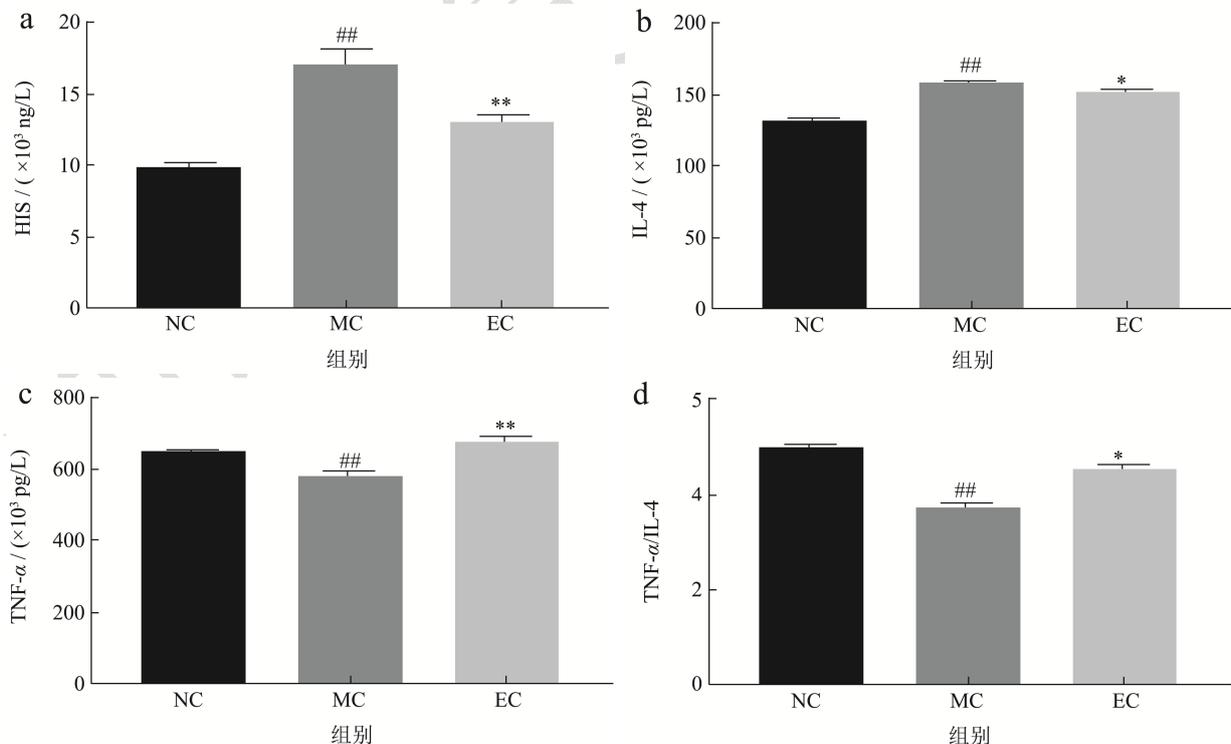


图3 小鼠血清中 HIS、TNF- α 、IL-4 和 TNF- α /IL-4 的测定

Fig.3 Determination of HIS, TNF- α , IL-4 and TNF- α /IL-4 in serum of mice

注: 与 MC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 NC 组相比, ^{##} $P < 0.01$ 。

本试验选用了一种 Th1 细胞亚型细胞因子 TNF- α ，一种 Th2 细胞亚型细胞因子 IL-4。通过测定细胞因子含量，研究小鼠体内 Th1/Th2 的变化，结果如图 3d 所示。MC 组的 TNF- α /IL-4 为 3.71，NC 组 TNF- α /IL-4 比值为 4.99，MC 组的 TNF- α /IL-4 与 NC 组相比降低了 25.65% ($P < 0.01$)，经过 EC 作用后，TNF- α /IL-4 比值 (4.51) 与 MC 组相比升高了 21.56%。EC 能够通过调节 Th1 和 Th2 细胞比率，细胞因子的分泌，缓解 MOpA 过敏反应的发生。对细胞因子含量分析表明，EC 通过上调 TNF- α 水平，下调 IL-4 水平使机体产生免疫作用，发挥抗过敏作用。

2.5 小鼠空肠病理变化分析

空肠是食物过敏结构改变最明显的部位，是食物过敏的评估指标之一，过敏后会出现嗜酸性粒细胞增多，肠道屏障受损，肠粘膜及绒毛结构紊乱和肠道通透性增加等变化^[39]。HE 染色小鼠空肠肠道切片，置于光学显微镜下观察如图 4。通过观察空肠 HE 染色切片图可以发现，NC 组肠绒毛排列规律整齐，结构相对比较完整；而 MC 组小鼠肠道组织开始发生病变，肠绒毛出现断裂、萎缩和破损；EC 组肠绒毛排列和断裂情况良好，肠道结构损伤有所改善。说明 EC 能够在一定程度上修复肠道屏障功能，改善 MOpA 过敏引起的肠道炎症情况。结果与 Bae 等^[40]研究黄芩素可以通过增强 OVA 过敏小鼠的肠道屏障功能发挥抗过敏作用类似。

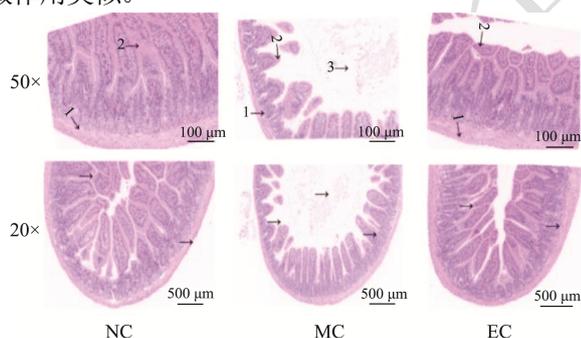


图 4 MOpA 过敏小鼠的肠道形态学观察

Fig.4 Intestinal morphology of MOpA allergic mice

注：1 为肠肌层；2 为肠绒毛；3 为肠腔。

3 结论

本研究建立 MOpA 诱导的小鼠过敏模型，探究了丽江山荆子 EC 对小鼠食物过敏的影响。结果发现，致敏组小鼠在激发后出现了体温下降、体质量减轻、腹泻等全身性过敏性症状和组织病理学的改变，证实了 BALB/c 小鼠对 MOpA 的敏感性。经丽江山荆子 EC 干预后能够减轻食物过敏导致的机体体质量减轻、

体温下降、腹泻等症状，胸腺指数有一定程度的升高；通过选择性降低 Th2 型细胞因子 IL-4 水平和增加 Th1 型细胞因子 TNF- α 水平来调节 Th1/Th2 平衡，且能在一定程度上缓解肠道组织炎症。总体而言，本研究初步表明，MOpA 可能具有在体内条件下诱导过敏反应的能力；丽江山荆子 EC 具有抗过敏活性，可作为潜在食物过敏阻控剂应用于食物过敏的预防和治疗。其抗过敏分子机理研究将在后期进行开展。

参考文献

- [1] 张自业.基于糖基化修饰消减秀丽白虾原肌球蛋白白致敏性及免疫脱敏机理研究[D].无锡:江南大学,2019.
- [2] 胡志和,王星璇,王丽娟,等.虾制品致敏性诱发豚鼠相关细胞因子及 Th1/Th2 细胞平衡的变化[J].食品科学,2019,40(9):122-131.
- [3] Sampson H A, O'mahony L, Burks A W, et al. Mechanisms of food allergy [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(1): 11-19.
- [4] Jones S M, Burks A W. Food allergy [J]. New England Journal of Medicine, 2017, 377(12): 1168-1176.
- [5] Feng H, Chen Y, Chen H B, et al. Methods and applications: a methodology of epidemiologic study in the general population focusing on food allergy-China, 2020 [J]. China CDC Weekly, 2022, 4(34): 749-755.
- [6] 姜晓宇.纳豆芽孢杆菌发酵对辣木叶营养特性的影响[D].无锡:江南大学,2018.
- [7] Singh A K, Rana H K, Tshabalala T, et al. Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop *Moringa oleifera* Lam: An overview [J]. South African Journal of Botany, 2020, 129: 209-220.
- [8] Anwar F, Latif S, Ashraf M, et al. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses [J]. Phytotherapy Research, 2007, 21(1): 17-25.
- [9] Tarlo S M, Lemiere C. Occupational asthma [J]. The New England Journal of Medicine, 2014, 370(7): 640-649.
- [10] Poussel M, Penven E, Richard C, et al. Occupational asthma to "the miracle tree" (*Moringa oleifera*): First description [J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice, 2015, 3(5): 813-814.
- [11] 李恩灿,范潇予,林琳,等.抗过敏药物临床应用研究进展[J].国际药学研究杂志,2018,45(3):176-181.
- [12] Yang T, Li C, Xue W T, et al. Natural immunomodulating substances used for alleviating food allergy [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 60: 1-19.
- [13] Singh A, Holvoet S, Mercenier A. Dietary polyphenols in the

- prevention and treatment of allergic diseases [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2011, 41: 1346-1359.
- [14] Zeng B H, Jiang T Y, Xiong W W, et al. Protective properties of polyphenols in food allergy: A review. [J]. *Allergy*, 2022, 77: 1-3.
- [15] Li J, Zou C, Liu Y X. Amelioration of ovalbumin-induced food allergy in mice by targeted rectal and colonic delivery of Cyanidin-3-O-Glucoside [J]. *Foods*, 2022, 11: 1542.
- [16] Zuercher A W, Holvoet S, Weiss M, et al. Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2010, 40: 942-950.
- [17] Zhang Y F, Liu Q M, Liu B, et al. Dihydromyricetin inhibited ovalbumin-induced mice allergic responses by suppressing the activation of mast cells [J]. *Food Function*, 2019, 10: 7131-7141.
- [18] 韩中惠. 丽江海棠果的化学成分及抗氧化活性研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2014.
- [19] Singh A, Demont A, Actis-Goretta L, et al. Identification of epicatechin as one of the key bioactive constituents of polyphenol-enriched extracts that demonstrate an anti-allergic effect in a murine model of food allergy [J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 112: 358-368.
- [20] Slavova-Kazakova A, Janiak MA, Sulewska K, et al. Synergistic, additive, and antagonistic antioxidant effects in the mixtures of curcumin with (-)-epicatechin and with a green tea fraction containing (-)-epicatechin. [J]. *Food Chemistry*, 2021, 360: 129994.
- [21] Wu H, Xie Y N, Xu Y L, et al. Epicatechin protective effect of on APAP-induced acute liver injury of mice through anti-inflammation and apoptosis inhibition [J]. *Natural Product Research*, 2020, 34: 855-858.
- [22] 李泽林, 代红丽, 沈晓静, 等. 表儿茶素对急性肺损伤小鼠抗氧化应激和抗炎作用研究[J]. *云南农业大学学报*, 2021, 36(5): 848-854.
- [23] 任丽蓉, 杨艳, 付晓萍, 等. 丽江山荆子表儿茶素的分离纯化及其抗氧化活性[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(6): 32-39.
- [24] 杨豪, 刘晓雪, 苏海冉, 等. 响应面法优化辣木叶蛋白提取工艺及凝集活性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(6): 150-157.
- [25] 张亚芬. 吊石苣苔黄酮抗食物过敏活性及机理分析[D]. 厦门: 集美大学, 2020.
- [26] Yang N, Shang Y X. Epigallocatechingallate ameliorates airway inflammation by regulating Treg/Th17 imbalance in an asthmatic mouse model [J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 72: 422-428.
- [27] 熊志乐. 表面表达霍乱毒素 B 与卵清白蛋白枯草芽孢预防 OVA 所致食物过敏的研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2021.
- [28] Brandt E B, Strait R T, Hershko D, et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112: 1666-1677.
- [29] 夏振江, 徐艳, 韩吉春, 等. 卵清蛋白致过敏性腹泻小鼠血清和胃组织中 5-羟色胺系统的代谢分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(4): 320-326.
- [30] 刘艳艳. 硫化氢在小鼠食物过敏中的作用机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [31] Lemos L, Assis H C, Alves J L, et al. Neuroimmune circuits involved in β -lactoglobulin-induced food allergy [J]. *Brain Behavior Immunity Health*, 2022, 23: 100471.
- [32] Wang J J, Song R L, Lan R X, et al. Peanut allergen induces more serious allergic reactions than other allergens involving MAPK signaling pathways [J]. *Food Function*, 2022, 13(17): 8818-8828.
- [33] 杨艳萍. 新橙皮苷对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的抑制作用及其对 OVA 诱导过敏性哮喘的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [34] 隗继浩. 新橙皮苷二氢查耳酮对 OVA 诱导口服耐受的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [35] 傅玲琳, 谢梦华, 王翀, 等. 对虾原肌球蛋白不同致敏途径对 BALB/c 小鼠致敏性的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 166-175.
- [36] 刘翼翔. 橄榄油对 OVA 诱导小鼠食物过敏的干预作用及调控机制研究[D]. 厦门: 集美大学, 2021.
- [37] Lee J Y, Park S H, Jhee K H, et al. *Zizania latifolia* and its major compound tricrin regulate immune responses in OVA-treated mice [J]. *Molecules*, 2022, 27: 3978.
- [38] Yamamoto T, Matsunami E, Komori K, et al. The isoflavone puerarin induces Foxp3 regulatory T cells by augmenting retinoic acid production, thereby inducing mucosal immune tolerance in a murine food allergy model [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 516: 626-631.
- [39] 刘艳艳, 潘礼龙, 孙嘉. 二烯丙基三硫醚通过调节肠道屏障缓解卵清蛋白引起的食物过敏[J]. *食品科学*, 2022, 43(9): 128-135.
- [40] Bae M J, Shin H S, See H J, et al. Baicalein induces CD4(+)Foxp3(+) T cells and enhances intestinal barrier function in a mouse model of food allergy [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32225.