

# 主要坚果类过敏原致敏机理的初步探讨

张爱琳<sup>1,2</sup>, 段筱筠<sup>1</sup>, 王效坤<sup>1</sup>, 苗颖<sup>1,2</sup>

(1. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384)(2. 天津市农副产品深加工技术工程中心, 天津 300384)

**摘要:** 本文以坚果过敏蛋白为抗原, 构建小鼠动物致敏免疫模型, 探讨坚果过敏原的致敏机理, 为坚果类食物安全评价和开发提供有效的实验依据。选取六种坚果为原料, 以昆明小鼠为受试小鼠, 坚果蛋白液以 0.01 mg/g 进行灌胃致敏, 第 33 d 和 34 d 以 0.02 mg/g 激发致敏, 通过测定小鼠血清 IgE、IgG、腹腔肥大细胞及类胰蛋白酶和血象指标, 研究其病理特征。结果表明, 致敏激发后小鼠 IgE 与 IgG 最高水平为 0.91 和 0.93, 组胺释放率阳性组为 58%, 中剂量组为 40%, 高剂量组为 55%; 小鼠腹腔肥大细胞体外激发后脱颗粒高剂量组最多以及类胰蛋白酶活性也最高; 中和高剂量组、阳性组白细胞数较高 ( $9.7\pm 6.1$ 、 $9.6\pm 2.4$ 、 $9.2\pm 2$ )  $\times 10^9/L$ , 低剂量组、中剂量组和高剂量组的小血小板数依次降低。说明致敏后小鼠凝血功能显著减弱, 免疫系统受到侵袭, 体内诱发产生 IgE 抗体, 并启动过敏介质的释放机制, 导致过敏反应 I 型变态反应的发生。

**关键词:** 坚果过敏原; 动物实验; 激发致敏; 致敏机理

文章编号: 1673-9078(2016)11-22-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.004

## Mechanism of Sensitization Induced by Nut Allergens

ZHANG Ai-lin<sup>1,2</sup>, DUAN Xiao-jun<sup>1</sup>, WANG Xiao-kun<sup>1</sup>, MIAO Ying<sup>1,2</sup>

(1. Tianjin Agricultural University College of food science and biotechnology, Tianjin 300384, China)

(2. Tianjin Engineering and Technology Center of Agricultural Products Processing, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** Nut allergenic protein was used as the antigen here to construct a mouse model of sensitization. The mechanism of sensitization of nut allergen was explored to provide an effective experimental basis for the safe development of nut foods and the evaluation of their safety. Six kinds of nuts were used as raw material and Kunming mice were used as test animals, which were fed with 0.01 mg/g nut protein extract by gavage to induce sensitization. On days 33 and 34, the mice were stimulated with 0.02 mg/g nut protein extract to induce sensitization, and pathological features were studied by measuring the serum IgE and IgG levels, the number of peritoneal mast cells, tryptase level, and hematological parameters in the mice. The results showed that the highest levels of IgE and IgG after sensitization in mice were 0.91 and 0.93, respectively, and histamine release rates in the positive, medium-dose, and high-dose groups were 58%, 40%, and 55%, respectively. The highest number of peritoneal mast cells in mice after *in vitro* stimulation of degranulation was found in the high-dose group, which also showed the highest tryptase activity. The medium- and high-dose groups, and the positive group exhibited high white blood cell counts ( $9.7\pm 6.1$ ,  $9.6\pm 2.4$ , and  $9.2\pm 2$ )  $\times 10^9/L$ , respectively, and the platelet counts were in descending order of low-dose group, medium-dose group, and high-dose group. The results indicated that after sensitization, the coagulation function of mice was significantly impaired, and the immune system was affected; the *in vivo* production of IgE antibody was induced, and the release mechanism of allergy mediators was activated, leading to the occurrence of anaphylactic reactions (type I hypersensitivity).

**Key words:** nut-allergen; animal experiment; stimulation-induced sensitization; sensitization mechanism

随着食品的多样化, 过敏引起的食品安全问题越来越严重, 也越来越隐秘。一方面, 随着食品组分的复杂化及食品的多样化发展, 过敏症发病逐年上升, 发达国家有 20% 以上的人具有食品过敏反应<sup>[1]</sup>。而随着全球化进展, 食品的生产、流通和消费方式呈现国

收稿日期: 2015-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601421); 天津市优秀博士后培养计划项目 (2015018); 2015 年大学生国家创新项目 (201510061088)

作者简介: 张爱琳 (1977-), 女, 博士(后), 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 苗颖 (1978-), 女, 博士, 研究方向: 食品科学

际化, 传统的食物过敏所表现的地域性及饮食习惯性差异可能更具有潜在危险<sup>[2]</sup>。国外关于食品过敏的研究较早, 也较成熟, 我国研发技术相对滞后。由于科技进步、管理水平和社会发展的不平衡性, 对食品过敏原问题的理解在不同国家、不同地区各不相同, 公众对它的认同意识也有较大的差异<sup>[3]</sup>。国外结合临床医学、流行病学、公共卫生等相关学科, 对食物过敏较为深入、系统<sup>[4]</sup>。我国关于食品过敏的研究和调查较少仅有关于大米、虾、牛奶和花生等的过敏源检测及脱敏技术研究, 其他鲜见报道。因此, 加快我国食

品过敏的研究,以我国特色食品为基础,研究其致敏特异性,进而挖掘致敏机制,并建立相关研究方法,已迫在眉睫,也必将成为将来我们食品安全控制研究的重点之一。解决坚果食用安全问题,是推进我国坚果产业发展的必由之路<sup>[5,6]</sup>。因此,明确坚果的不安全因素及其危害机制,在此基础上开发出安全控制技术,为坚果的加工和消费提供理论基础,可推动坚果的加工,也将有力推动坚果产业的发展。本研究通过构建小鼠动物致敏试验模型,通过测定免疫期间IgE和IgG的水平,肥大细胞体外脱颗粒观察、组胺释放率、胰蛋白酶的差异,血浆中组胺含量,测定血象指标等分析坚果蛋白的致敏性<sup>[7,8]</sup>,为坚果食品开发、坚果食品安全检测及低敏化处理提供研究基础和技术参数,对坚果食品产业化开发具有较强现实意义和指导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器设备

SPF级KM小白鼠(18±2g),小鼠许可证号SCKK-(军)2012-2014。卵白蛋白,天津市北方天医化学试剂厂;台盼蓝,北京驰明瑞生物科技有限公司;牛血清白蛋白,北京智杰方远有限公司;邻苯二甲醛(OPA),北京龙科方舟生物科技有限公司;组胺,北京龙科方舟生物科技有限公司;硝基苯胺(BAPNA),北京龙科方舟生物科技有限公司;二甲基亚砜,天津市北方天医化学试剂厂;邻苯二胺(OPD),北京龙科方舟生物科技有限公司;羊抗鼠IgG-HRP抗体、羊抗鼠IgE-HRP抗体,北京索莱宝科技有限公司;酶标仪,赛默飞科技有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 试剂的配制

(1)PBST:取300μL Tween-20加入100mL PBS中,混匀后即可使用,现用现配。BPPST:称取牛血清白蛋白(BSA)1g溶于20mL PBST中。

(2)0.1%的OPA-甲醇溶液:将53.3mg OPA溶于50mL 甲醇得到OPA-甲醇溶液。

(3)HBSS溶液:8g/L NaCl, 0.4g/L KCl, 1g/L 葡萄糖, 60mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 47.5mg/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.35g/L NaHCO<sub>3</sub>, 调PH至7.2。

#### 1.2.2 蛋白抗原的制备

(1)取等质量的去壳去膜内种皮后的板栗、榛子、腰果、杏仁、核桃、开心果置于30℃烘箱中干燥48h,烘干后的坚果置于JJ型组织捣碎匀浆机研磨成粉,然后按照去脂、硫酸铵盐析透析、过凝胶柱得到较纯的

坚果过敏蛋白,方法参考<sup>[9]</sup>。

(2)取坚果蛋白粉粗提取物用0.2mol/L的Tris-HCl(pH=7.4)配制为40mg/mL、80mg/mL和160mg/mL三个剂量用于坚果蛋白处理组。另取坚果蛋白粉打成泥,制成条块状,放入托盘置于100℃烘箱烘干3h,制成坚果蛋白饲料作为阴性对照组。卵白蛋白用0.2mol/L的Tris-HCl(pH=7.4)配制1mg/mL的蛋白液作为阳性对照组。

#### 1.2.3 小鼠免疫实验设计

本文所选的坚果:板栗、榛子、腰果、杏仁、核桃和开心果都属于食品过敏原,都存在同源性过敏蛋白,作者在前期研究中应用同类过敏血清,对几种坚果蛋白进行免疫印迹分析和SDS-PAGE电泳分析,均验证了各种坚果含有相同或不同分子量的过敏蛋白,每种坚果都是致敏蛋白,都能导致动物过敏,参考文献<sup>[10]</sup>。为了节省实验工作量,也是对坚果过敏原致敏研究的一次尝试,本文把成年KM清洁级小白鼠分成六组,试验小鼠在不存在免疫佐剂的条件,分别分组灌胃激发致敏,每组6只。试验组分为蛋白低剂量组、蛋白中剂量组、蛋白高剂量组、阴性对照组、阳性对照组、空白对照组。小鼠每天灌胃前称量体重。蛋白低剂量组:40mg/mL的坚果蛋白液按0.01mL/g体重进行灌胃致敏。蛋白中剂量组和蛋白高剂量组按其体重放大剂量的2倍和4倍,33和34d按0.02mL/g体重进行腹腔注射激发致敏。阳性对照组:1mg/mL的卵白蛋白液按0.01mL/g体重进行灌胃致敏,也采取相同的激发致敏措施。

#### 1.2.4 小鼠血清IgE、IgG的测定

小鼠末次致敏后1h进行眼眶取血,于室温静至10min后,4℃离心(1000r/min,10min)吸取上清液即为血清,室温离心(3000r/min,10min)吸取上清液为血浆。血清和血浆于-20℃贮藏备用。小鼠血清IgE、IgG的测定采用间接ELISA法,坚果蛋白用PBS稀释为50μg/mL,以此液100μL/孔浸泡酶标板,4℃过夜,洗涤液(PBST)洗板5次,每次3min。后用ELISA封闭液(BPPST)100μL孔进行封闭,37℃孵育2h后同上洗板,加入以1:100比例稀释的待测血清(100μL/孔),37℃孵育2h,同上洗涤,加入羊抗鼠IgG-HRP(稀释度1:1000)以及IgE-HRP(稀释度1:100),37℃孵育2h,同上洗涤,加底物OPD于37℃显色30min,以50μL/孔加入终止液(2mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止反应,在酶标仪上测量492nm波长的吸光度值OD<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.5 小鼠腹腔肥大细胞体外致敏脱颗粒检测

小鼠采血后断颈处死,向小鼠腹腔注射5mL的HBSS溶液,提起小鼠四肢来回晃动使腹腔液充分混

合,并轻轻按摩小鼠腹部,10 min 后在腹腔上剪开一个小口,用无针头的注射器抽取腹腔液 2 mL,缓慢注入装有 2 mL 淋巴细胞缓冲液的 5 mL 离心管中。离心管于室温下 1500 r/min 离心 10 min,吸取中间层细胞(肥大细胞)置于另一 5 mL 刻度离心管中,用 HBSS 定容到 4 mL,室温 1500 r/min 离心 10 min,重复 2 次,最后将细胞悬浮于 2 mL 的 HBSS 中。取上述小鼠腹腔肥大细胞液 1 mL 置于离心管中,共 6 管,分别向其中加入阴性对照(粗蛋白)、低剂量坚果蛋白(40 mg/mL)、中剂量坚果蛋白(80 mg/mL)高剂量坚果蛋白(160 mg/mL)、阳性对照(1 mg/mL 的卵白蛋白)1 mL 和空白对照(Tris-HCl),混合均匀后于 37 °C 孵育 15 min,之后立即置于冰浴中冷却 10 min,然后在 5000 r/min、4 °C 离心 15 min,收集上清液。应用电子显微镜通过台盼蓝检验肥大细胞的纯度和活力。分别将体外致敏前后的小鼠腹腔肥大细胞溶液滴于红血球计数板上,在电子显微镜下观察体外致敏前后的腹腔肥大细胞形态<sup>[12]</sup>。

### 1.2.6 腹腔肥大细胞及血浆中组胺的测定

(1) 组胺标准曲线的绘制:准确称取组胺标准品 0.0111 g,溶于 0.1 mol/L 的 HCl 配制成 10<sup>4</sup> mg/mL 的组胺母液,4 °C 冷藏备用。取 6 支试管,分别加入组胺母液 1、0.4、0.8、1.2、1.6 和 2.0 mL,用 0.1 mol/L HCl 分别补充到体积 2 mL,再向其中分别依次加入 4 mol/L 的 NaOH 1 mL、0.1% 的 OPA-甲醇溶液 0.5 mL,混合均匀后室温放置 10 min,加入 0.5 mol/L 的 HCl 0.6 mL 终止反应,荧光分光光度计激发波长与发射波长扫描分别为 349 nm 和 443 nm,在此条件下测定荧光强度并绘制标准曲线。标准曲线为  $CON=0.008658 \times INT^{-1}-0.4235$ ,拟合优度 99.761%。

(2) 腹腔肥大细胞组胺释放率的测定:取不同组别肥大细胞悬液 0.51 mL,分别加入等体积的 Tris-HCl、40 mg/mL 坚果蛋白液、200 mg/mL 坚果蛋白液、1 mg/mL 卵白蛋白,充分混匀,37 °C 孵育 1 h 后,于 1500 r/min 离心 10 min,吸取上清液,加入 1 mL、

0.1 mol/L 的 HCl 和 1 mL、4 mol/L 的 NaOH,0.5 mL、0.1% 的 OPA-甲醇溶液,混匀后放置 10 min,加入 0.6 mL、0.5 mol/L HCl,于激发波长 349 nm、发射波长 443 nm 测定组胺含量 Hr。另取各组别细胞悬液 0.5 mL 加热煮沸 1 min 后离心,吸取上清液按上述方法测定组胺含量 Ht。结果以组胺释放率表示(见下式)。

$$Rr=Hr/Ht \times 100\%$$

注:Rr 为释放率(%),Hr 为过敏原释放组胺量(mg),Ht 为总组胺量(mg)。

(3) 血浆中组胺的测定:量取血浆 0.2 mL,加入 1.0 mL 蒸馏水和 0.4 mL 25% (V/V) 的三氯乙酸溶液,混合均匀后 4000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,加入 1 g NaCl、4.0 mL 正丁醇和 0.2 mL、2.5 mol/L NaOH,立即混匀,震荡 10 min,吸取正丁醇相 3.6 mL,向其中加入 0.1 mol/L HCl 和 1.5 mL 的正己烷,震荡 5 min,弃去有机相,取 1.0 mL 的 HCl 相(含组胺溶液)置于试管中按上述方法测定吸光度,根据标准曲线计算组胺含量<sup>[14,15]</sup>。

### 1.2.7 腹腔肥大细胞类胰蛋白酶的测定

取 40  $\mu$ L 腹腔肥大细胞液置于 1.5 mL 的 TBS(0.1 mol/L, pH=7.4),混合均匀后,加入 40  $\mu$ L BAPNA 的二甲基亚砷溶液(20 mg/mL),立即混合均匀后于 30 °C 反应 20 min,加入 0.5 mL、30%(V/V)乙酸终止反应,在 405 nm 测定吸光度(A)<sup>[13]</sup>。以反应缓冲液为参比调零,相对酶活力单位公式计算如下:

$$\text{相对酶活力}=(A_{\text{待测}}/A_{\text{标准}}) \times 100。$$

### 1.2.8 血象指标的测定

抗凝管采血后,血浆上血球分析仪测定。

### 1.2.9 数据分析

实验数据是通过 SPSS 和 EXCEL 分析得出。检验水平为  $p < 0.05$  时为显著差异,具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠体重的变化

表 1 小鼠平均体重变化情况(g/只)

Table 1 Effect of CBM dose on the body weight of mice ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

组别	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d	34 d	总增重
E-1	24.4±2.4	28.2±2.8	30.5±2.8	33.5±3.3	35.7±3.4	37.4±3.7	38.4±3.8	38.7±3.8	38.8±4.4	39.5±3.9	39.3±3.8	21.4±3.4
C-N	25.1±0.9	28.4±1.3	31.6±1.5	34.8±1.9	37.8±1.9	40.4±1.4	42.8±1.2	44.4±1.3	46.0±1.6	46.9±1.7	47.5±1.8	29.8±1.5
E-2	24.3±1.9	28.0±3.3	29.2±3.3	31.2±3.9	33.7±4.4	35.5±4.8	36.7±6.7	35.7±7.1	35.1±6.8	37.1±7.1	37.7±6.3	19.9±5.1
E-3	25.8±1.5	29.2±2.7	31.0±3.1	32.9±2.8	35.0±2.4	35.7±1.5	35.2±2.3	35.8±3.7	37.9±1.4	38.4±1.6	39.5±1.8	20.6±2.3
C-P	24.6±0.9	28.9±1.7	31.6±2.2	34.5±2.6	36.4±2.6	36.5±2.9	36.4±3.8	36.8±3.2	38.0±3.2	39.4±2.9	41.0±0.7	23.5±2.4
C-B	25.1±0.8	28.3±1.7	29.4±2.7	31.7±2.3	32.8±2.3	35.6±1.9	37.6±2.6	39.0±3.5	40.2±2.7	41.0±3.2	40.9±1.4	22.8±2.3

注:C: control; E: experiment; N: negative; P: positive; B: blank.

试验期间每天记录并观察小鼠的临床表现, 饲喂 34 d 后小鼠体重增重见表 4。

从表 1 可知, 实验组小鼠体重增重明显低于对照组, 前 18 d 体重增长明显, 平均增重 12 g, 18 d 后实验组小鼠基本处于生长停滞状态, 中浓度组和高浓度组连续几天出现减重现象, 实验组和阳性对照组出现死亡病例, 从第 23~34 d 相继死亡 5 例。中浓度组部分小鼠在饲喂过程中出现烂眼现象, 高浓度组部分小鼠出现烂眼及抽搐现象。实验表明高浓度坚果过敏蛋白对小鼠的健康生长有一定的危害, 部分小鼠致敏死亡。

## 2.2 小鼠免疫期 IgE 和 IgG 的水平

分别对各实验组小鼠血清进行 IgE 和 IgG 的水平综合分析, 结果见图 1 (a、b)。

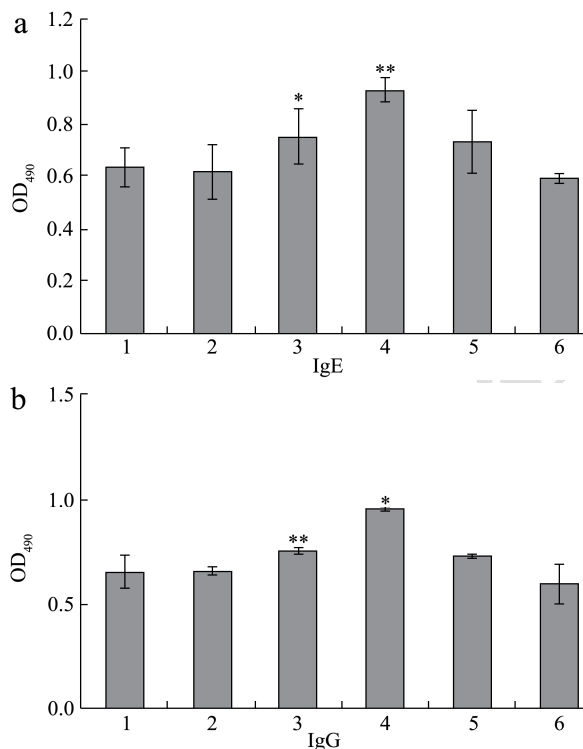


图 1 小鼠免疫期的 IgG 和 IgE 的水平

Fig.1 IgG and IgE levels of mice during the immune period

注: 1, 低剂量组; 2, 阴性组; 3, 中剂量组; 4, 高剂量组; 5, 阳性组; 6, 空白组; \*代表  $p < 0.05$ ; \*\*代表  $p < 0.01$ 。

从图 1 可知, 坚果过敏蛋白实验组小鼠的 IgG 和 IgE 水平随剂量浓度的增加而显著升高, IgG 和 IgE 最高水平吸光度值已接近 0.9 ( $p < 0.05$ ), 且中剂量组 IgG 和 IgE 均呈呈现差异极显著水平具有医学统计学意义。低剂量组与阴性对照组的 IgG 和 IgE 水平相当, 中剂量组与阳性对照组的 IgG 和 IgE 水平相当, 高剂量组的 IgG 和 IgE 水平最高。三个剂量实验组的 IgG 和 IgE 水平显著高于空白对照组 ( $p < 0.05$ ), 说明坚果

类过敏原和卵白蛋白经口灌胃或腹腔注射可诱发小鼠机体产生抗坚果类过敏原和卵白蛋白的 IgE 和 IgG 抗体。IgG 抗体的产生说明该实验组血清具有免疫原性, 在此基础上产生的 IgE 抗体说明该过敏蛋白具有致敏性与文献<sup>[13]</sup>有相似性。

## 2.3 小鼠腹腔肥大细胞体外脱颗粒的观察

实验通过致敏小鼠分离得到肥大细胞, 经过体外培养以相同过敏原使其释放组胺, 测定组胺的释放率来判断坚果类过敏原的过敏性质, 如图 2 所示。

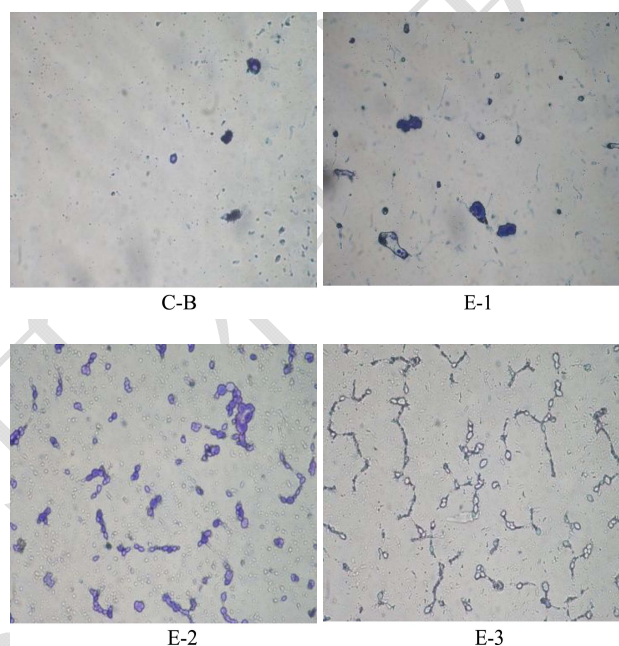


图 2 小鼠腹腔肥大细胞脱颗粒形态学观察 (显微镜观察×100 倍)

Fig.2 Morphology of mast cells in mouse peritoneal cavity after degranulation

从图 2 可知, 给予坚果过敏原的实验组小鼠肥大细胞体外致敏, 可以观察到肥大细胞明显的脱颗粒现象(E-1、E-2、E-3), 而空白对照组没有这一现象(C-B), 说明坚果类过敏原作用于小鼠, 可导致小鼠肥大细胞脱颗粒, 从而释放一定的组胺与文献<sup>[13]</sup>报道一致。

## 2.4 小鼠肥大细胞组胺的释放率

小鼠腹腔肥大细胞体外致敏可激活组胺的释放率测定见图 3。

从图 3 可知, 组胺释放率的不同代表致敏反应程度的不同, 组胺释放率越高说明致敏作用程度越强。空白组、阴性组与低剂量小鼠腹腔肥大细胞组胺释放率相差不多, 均为 20%左右。阳性组为 58%、中剂量组为 40%以及高剂量组为 55%, 组胺释放率差异显著释放率显著  $p < 0.05$ , 高于低剂量组, 说明坚果蛋白对

小鼠有致敏作用。

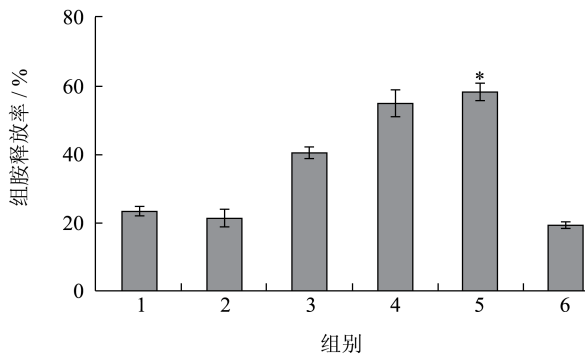


图3 小鼠腹腔肥大细胞组胺释放率

Fig.3 Histamine release rate from mast cells in the mouse peritoneal cavity

注: 1: 低剂量组; 2: 阴性组; 3: 中剂量组; 4: 高剂量组; 5: 阳性组; 6: 空白组; \*代表  $p < 0.05$ 。

### 2.5 小鼠血浆中组胺含量的差异

当机体处于致敏状态时, 血浆组胺是触发变态反应的一种介质, 它可以改变毛细血管扩张, 血管通透性增加, 平滑肌收缩。致敏表现与组胺含量密切相关: 组胺含量小于或等于  $1 \text{ ng/mL}$ , 无症状;  $1 \sim 2 \text{ ng/mL}$ , 仅有皮肤反应; 大于  $3 \text{ ng/mL}$ , 有全身反应; 大于  $100 \text{ ng/mL}$ , 严重全身反应。由此可知, 组胺含量越高, 致敏反应越强烈。

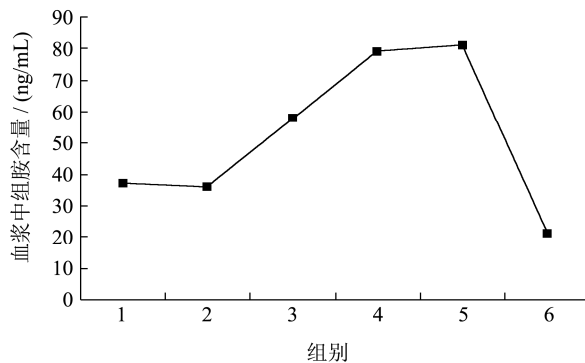


图4 血浆中的组胺含量

Fig.4 Histamine content of mouse plasma

注: 1, 低剂量组; 2, 阴性组; 3, 中剂量组; 4, 高剂量组; 5, 阳性组; 6, 空白组。

由图4可知, 实验组小鼠随给予蛋白抗原的浓度的增加, 血浆中的组胺含量相继升高, 实验组含量为  $37 \text{ ng/mL}$ 、 $58 \text{ ng/mL}$  和  $79 \text{ ng/mL}$ , 小鼠血浆组胺含量明显高于阴性组  $36 \text{ ng/mL}$  和空白组  $21 \text{ ng/mL}$ , 阳性组血浆组胺含量最高为  $81 \text{ ng/mL}$ 。

### 2.6 小鼠肥大细胞类胰蛋白酶的差异

肥大细胞来源于造血干细胞, 易接触病原体 and 变

应原等物质从而参与过敏反应的病理过程, 肥大细胞被激活而释放出类胰蛋白酶等炎症介质增加血管通透性, 促使嗜酸性粒细胞等炎症细胞迁移, 组织浸润及激活, 最终引起过敏反应。

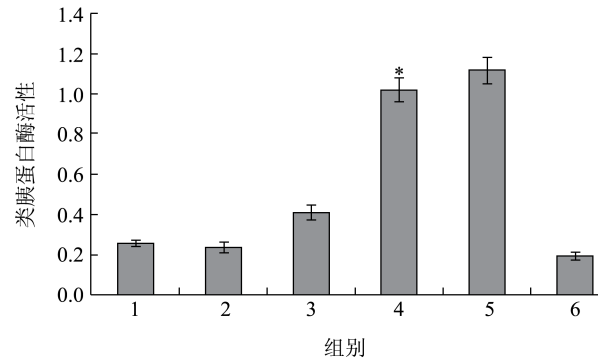


图5 小鼠腹腔肥大细胞类胰蛋白酶活性

Fig.5 Tryptase activity of mast cells in the mouse peritoneal cavity

注: 1, 低剂量组; 2, 阴性组; 3, 中剂量组; 4, 高剂量组; 5, 阳性组; 6, 空白组; \*代表  $p < 0.05$ 。

由图5可知, 不同浓度过敏原实验组类胰蛋白酶含量存在差异, 实验组酶活性显著高于阴性组及空白组, 高剂量组到低剂量组酶活性依次降低, 类胰蛋白酶活性为  $1.02$  个活力单位, 反应差异显著  $p < 0.05$ 。阳性组酶活性略高于高剂量组。过敏原浓度越高, 对肥大细胞类胰蛋白酶的激发也较多, 因而类胰蛋白酶的活性也较强。

### 2.7 小鼠的血象指标

为了减少动物实验次数和受试小鼠试用数量, 进而减少因小鼠个体差异造成的误差, 提高动物过敏评价的准确性, 本实验还研究了利用外周血象指标来评价过敏反应。

从表2发现: 不同抗原浓度对不同实验组受试小鼠血象中红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、血小板(PLT)和淋巴细胞(LY)等指标的影响情况是不同的, 这些指标对疾病诊断和鉴别有重要意义。小鼠免疫末期的血象指标分析可知, 白细胞是机体抵御异物入侵的主要防线, 主要功能是吞噬入侵的细菌等病原微生物, 并参与免疫复合物和坏死组织的清除。急性感染或化脓性炎症均可致其升高。实验发现阴性组、空白组和低剂量组白细胞数偏低, 中剂量组、高剂量组和阳性组白细胞数较高。红细胞表面具有I型补体的受体(CR1), 可与抗原-抗体-补体免疫复合物结合, 促进巨噬细胞对抗原-抗体-补体免疫复合物吞噬, 防止抗原-抗体-补体免疫复合物沉积于组织内而引起免疫性疾病。但本实验红细胞变化规律不明显。淋巴细胞

是免疫系统的基本成分, 过敏反应时由于毛细血管壁通透性增加, 血浆蛋白渗出, 会造成淋巴细胞减少。实验中阴性组空白组的淋巴细胞数远高于实验组和阳

性组。血小板与机体的凝血有关, 实验中发现空白组、阴性组、低剂量组、中剂量组和高剂量组和阳性组的小血小板数依次降低。

表2 不同组别小鼠的血项指标

Table 2 Hematological parameters of mice from different treatment groups

项目代号	低剂量组	阴性组	中剂量组	高剂量组	阳性组	空白组	单位
WBC	6.4±1.3	7.2±1.1	9.7±6.1	9.6±2.4	9.2±2	7.0±1.3	10~9/L
LY #	3.9±0.9	5.3±1.0	3.8±2.4	3.7±0.7	3.8±1	4.5±2	10~9/L
MO #	0.7±0.2	0.8±0.2	1.3±0.8	1.2±0.3	0.9±0.3	0.8±0.2	10~9/L
GR #	2.3±0.4	1.1±0.4	4.2±3.0	4.6±1.6	4.5±0.9	1.7±0.6	10~9/L
LY%	52.6±6.5	73.6±9.0	45.2±7.9	41.1±3.4	40.6±4.3	63±12.3	%
MO%	10.1±2.1	11.9±2.9	12.7±1.7	12.0±1.1	9.6±1.3	11.4±2.5	%
GR%	37.3±7.0	14.5±6.2	42.2±6.8	46.9±4.3	49.8±4.9	25.6±11.4	%
RBC	8.9±0.5	9.6±0.4	8.9±1.2	9.2±0.6	9.3±0.3	8.4±1.3	10~12/L
HGB	186.6±19.3	178±8.8	166.5±24.2	168±12.1	171.5±4.6	158.8±22	g/L
HCT	42.7±1.1	45.4±2.0	41.6±6.7	43.0±3.4	43.0±1.6	41.3±4.1	%
MCV	47.9±1.8	47.1±0.5	46.9±1.1	46.8±1.1	46.6±0.8	49.6±3.8	fL
MCH	18.7±0.9	18.4±0.3	18.4±0.4	18.2±0.3	18.6±0.4	18.9±0.5	pg
MCHC	390±4	392±3.4	392.8±7.6	390.2±3.6	399±6.4	382.6±18.1	g/L
RDW-SD	28.0±1.1	28±0.7	28.2±1.2	28.2±0.8	27.5±0.6	29.9±2.4	fL
RDW-CV	10.4±0.5	9.7±0.6	10.6±0.2	9.9±0.7	10.2±0.4	10.4±0.7	%
PLT	407.6±100.9	413±55.4	386.3±127.3	335.8±66.8	317.5±82.5	490.2±79.5	10~9/L
MPV	5.8±0.5	5.8±0.1	5.7±0.3	5.5±0.2	6.0±0.1	5.9±0.3	fL
PDW	8.8±1.0	9.3±0.4	8.4±0.5	8.3±0.3	8.6±0.3	9.2±0.8	fL
PCT	0.23±0.05	0.19±0.03	0.26±0.06	0.21±0.04	0.19±0.05	0.22±0.04	%

注, WBC, 白细胞; LY#, 淋巴细胞; MO#, 中值细胞数; GR#, 中性细胞数; RBC, 红细胞; HGB, 血红蛋白; HCT, 红细胞压积; MCV, 红细胞平均压积; MCH, 平均血红蛋白量; MCHC, 平均血红蛋白浓度; RDW-SD, 红细胞分布宽度; SD PLT, 血小板计数; MPV, 平均血小板体积; PDW, 血小板分布宽度; PCT, 血小板压积; LY%, 淋巴细胞比率。

### 3 结论

综上所述, 采用主要坚果过敏原饲喂昆明种小鼠 34 d, 小鼠灌胃致敏和腹腔激发均获得了一定的致敏效果。各坚果过敏原都会引起小鼠过敏症状, 混合致敏可以大大减轻实验工作量, 提高工作效率。实验结果显示主要坚果过敏原均影响小鼠的正常生长, 实验组小鼠肾体比、脾体比较正常小鼠明显偏低; 致敏激发后小鼠 IgE 与 IgG 最高水平为 0.91 和 0.93, 组胺释放率阳性组为 58%, 中剂量组为 40%, 高剂量组为 55%; 小鼠腹腔肥大细胞体外激发后脱颗粒高剂量组最多、类胰蛋白酶活性也最高; 中、高剂量组和阳性组白细胞数较高 ( $9.7±6.1$ 、 $9.6±2.4$ 、 $9.2±2$ )  $\times 10^9/L$ , 低剂量组、中剂量组和高剂量组的小血小板数依次降低, 致敏后小鼠凝血功能显著减弱, 免疫系统受到侵袭, 体内诱发产生 IgE 抗体, 并启动过敏介质的释放机制, 导致过敏反应 I 型变态反应的发生, 相关组织脏器发生

炎症细胞浸润。根据小鼠临床过敏反应, 初步获得了坚果过敏原致敏机制, 坚果过敏原进入体内, 与附着在肥大细胞上的 IgE 结合, 启动该细胞释放出生物活性物质如组胺, 并激活肥大细胞类胰蛋白酶, 导致机体组织呈现炎症变化, 从而表现出过敏症状。

### 参考文献

- [1] Margitta Worm, Uta Jappe, Jörg Kleine-Tebbe. Food allergies resulting from immunological cross-reactivity with inhalant allergens [J]. *Allergo Journal International*, 2014, 23(2): 1-16
- [2] Starkl P, Felix F, Krishnamurthy D, et al. An unfolded variant of the major peanut allergen Ara h 2 with decreased anaphylactic potential [J]. *Clin. Exp. Allergy*, 2012, 42(12): 1801-1812
- [3] Roberto Berni Canani, Rita Nocerino, Vincenza Pezzella. Diagnosing and treating food allergy [J]. *Current Pediatrics Reports*, 2013, 1(3):189-197

- [4] Jose C Jimenez Lopez, Simeon O Kotchoni, Maria C Hernandez Soriano, et al. Structural functionality, catalytic mechanism modeling and molecular allergenicity of phenylcoumaran benzylic etherreductase, an olive pollen (Olea e 12) allergen [J]. Journal of Computer-aided Molecular Design, 2013, 27(10): 873-895
- [5] Diesner S C, Knittelfelder R, Krishnamurthy D, et al. Dose-dependent food allergy induction against ovalbumin under acid-suppression: A murine food allergy model [J]. Immunol. Lett., 2008, 121(1): 45-51
- [6] Rona R J, Keil T, Summers C, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis [J]. J. Allergy Clin. Immunol., 2007, 120(3): 638-646
- [7] S Lepski, J Gerwin, J Brockmeyer. Detection of nut allergens by mass spectrometry and structure analysis after food processing [J]. Clinical and Translational Allergy. 2013, 3(S3): 1-1
- [8] Diesner S C, Knittelfelder R, Krishnamurthy D, et al. Dose-dependent food allergy induction against ovalbumin under acid-suppression: A murine food allergy model [J]. Immunol. Lett., 2008, 121(1): 45-51
- [9] Katrina J Allen<sup>1</sup>, Paul J Turner, Ruby Pawankar, et al. Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework [J]. World Allergy Organization Journal, 2014, 7: 10-24
- [10] 张爱琳,王昌禄,胡云峰,等.坚果类过敏原的分离及免疫印迹分析[J].现代食品科技,2014,30(3):99-102  
ZHANG Ai-lin, WANG Chang-lu, HU Yun-feng, et al. Isolation of allergens in nuts and analysis on western blotting [J]. Morden Food Science and Technology, 2014, 30(3): 99-102
- [11] 李敏,周建,蒋春雷.IgE 介导的肥大细胞脱颗粒信号转导途径的研究进展[J].现代生物医学进展,2009,18:145-151  
LI Min, ZHOU Jian, JIANG Chun-lei. Recent advances on the signal transduction pathway of IgE mediated mast cell degranulation [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 18: 145-151
- [12] 范建涛,张爱琳,姚尧,等.间接竞争 ELISA 法检测坚果类过敏原特异性研究[J].食品工业科技,2015,7: 17-19  
FAN Jian-tao, ZHANG Ai-lin, YAO Yao, et al. Detected the specific research to nuts allergen with indirect-competitive ELISA [J]. Science and Technology of Food, 2015, 7: 17-19
- [13] 杨剑婷.白果过敏蛋白及其致敏机理的研究[D].南京:南京林业大学,2010  
YANG Jian-ting. Studies on Ginkgo kernel allergen protein and the allergic mechanism [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010