

BN 大鼠食物过敏动物模型的实验研究

吕相征 刘秀梅 杨晓光

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为了解挪威棕色大鼠(BN)作为食物过敏动物模型的可行性。将24只BN大鼠随机分为灭菌水组(对照组)、卵清蛋白组(Ovalbumin, OVA)、马铃薯酸性磷酸酶组(Potato acid phosphatase, PAP)、鸡蛋清粗提蛋白质组(hen's egg-white protein, HEWP),每组6只。对各组大鼠灌胃,1ml/只, OVA、PAP组蛋白质浓度为1 mg/ml, HEWP组蛋白质浓度为10.0 mg/ml,每天1次,共6周。检测血清中特异IgE抗体滴度,同时进行皮肤过敏反应试验(PCA)。在第28、42天, OVA、HEWP组BN大鼠32倍稀释血清中特异IgE抗体均较对照组升高,并有统计学差异,第14、28、42天的PAP组及第14天的OVA、HEWP组BN大鼠32倍稀释血清中特异IgE抗体较对照组相比无统计学差异。BN大鼠对常见致敏食物蛋白质OVA和HEWP产生过敏反应,对无致敏史食物蛋白质PAP无过敏反应。BN大鼠模型可能是较为理想的食物过敏动物模型。

关键词:食物过敏;疾病模型;动物;大鼠;近交BN

暴露剂量和暴露时间是影响耐药产生的重要因素,我国虽然自70年代中期才逐渐开始在饲料中添加抗生素,晚于西方国家的50年代早期。但由于长期缺乏科学性指导和相应法律法规的约束,造成抗生素的滥用,它所带来的危害开始显现出来,不仅导致多重耐药株的出现,畜牧养殖业成本增加,而且高水平的抗生素残留,影响了我国动物性食品的出口,造成巨大的经济损失。

氟喹诺酮类药物是喹诺酮的换代产品,主要包括环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星(氟哌酸)。本次药敏实验使用的是诺氟沙星和氧氟沙星,所有菌株均对它们敏感。但有研究表明沙门菌对环丙沙星的耐药性呈上升趋势^[2]。同时动物耐药菌株会通过交叉感染,影响到人类治疗用药物的耐药性。

本次研究中几乎发现了对我国畜牧养殖业常用抗生素产生耐药的所有菌株,如青霉素、萘啶酮酸、红霉素、四环素、链霉素、磺胺等。特别是耐10种以上抗生素的多重耐药株,每株耐5类以上的抗生素,都是最常用的抗生素。由此可见,我国畜牧养殖业抗生素的滥用,以及由此导致的多重耐药问题已经

到了非常严重的地步,应引起政府相关部门的重视,加强对饲料抗生素类添加剂使用的安全性管理,指导养殖户合理使用抗生素。幸运的是,本研究分析的51株沙门菌对一些抗生素的换代产品,如氟喹诺酮药物和头孢类的三代产品(头孢曲松、头孢他啶、头孢西丁等)均敏感。

参考文献

- [1] Cloeckaert A, Boumedine KS, Flaujac G, et al. Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT014-like antibiotic resistance gene cluster including the floR gene in *S. enterica* serovar agona [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44:1359-1361.
- [2] 刘衡川,叶梅君,余倩,等.沙门氏菌食物中毒菌株的质粒及耐药谱分析[J]. *现代预防医学*, 1996, 23(2):81-83.
- [3] Sheng Chen, Shaohua Zhao, David G White, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *salmonella* serovars isolates from retail meats [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1):1-7.

[收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;R378.22;TS251.55

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2005)02-0100-04

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”(2001AA212291);国家重点基础研究发展规划“973”(2001CB109007)

作者简介:吕相征 男 博士生

通讯作者:刘秀梅 女 首席科学家

This work was supported by National High-Tech Research Program of China (2001AA212291) and National Basic Research Program of China. (2001CB109007)

Assessment of brown Norway rat as suitable animal model for investigation of food allergy

LÜ Xiang-zheng, Liu Xiu-mei, YANG Xiao-yuang

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: To develop an animal model that closely mimics human food allergy, 4 groups of BN rats were given one of the following substances by gavage daily for 42 days: Ovalbumin (1mg in 1ml), Potato acid phosphatase (1 mg in 1 ml), hen's egg white-protein (10 mg in 1 ml) and sterile water (1 ml). The serum levels of specific IgE antibodies were measured on the 14th, 28th and 42nd day by enzyme-linked immunosorbent assay and passive cutaneous anaphylaxis assay. In OVA and HEWP groups, significantly high titres of specific IgE (1:32) were provoked compared with that in the control group at the 28th and 42nd day. However, at the 14th, 28th, and 42nd day in PAP group and at the 14th day in OVA and HEWP groups, the difference of specific IgE between test groups and the control group was not significant. BN rats could be made allergic to OVA and HEWP (major allergenic protein), and could not be made allergic to PAP (non-allergenic protein). It is concluded that BN rats may be a fairly good animal model suitable for the investigation of food allergy.

Key Words: Food Hypersensitivity; Disease Models, Animal; Rats, Inbred BN

伴随着转基因食品的大量生产和食用,其安全性越来越受到公众的关注,转基因食品的潜在致敏性是关注的焦点之一。最常用的转基因食品的潜在致敏性分析方法是2001年FAO/WHO生物技术食品致敏性联合专家咨询会议(Joint FAO/WHO Expert consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology)制定的树状分析法^[1],动物模型实验是其重要的组成部分,狗、幼猪、豚鼠、BalB/c小鼠、C3H/HeJ小鼠、BN大鼠等作为食物过敏动物模型的实验研究均有报道,但目前国际上尚未建立食物致敏原评估的标准动物模型。我们曾进行过BalB/c小鼠食物过敏动物模型的实验研究,发现BalB/c小鼠不适合作为食物过敏动物模型。有文献报道^[3,4],与其它种属动物相比,经口给予食物致敏原(无佐剂),BN大鼠能产生较为理想的I型过敏反应。但未见研究BN大鼠对食物致敏原和非食物致敏原过敏反应差异的报道。本研究选用BN大鼠,经灌胃给予常见致敏食物蛋白质卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)、鸡蛋清粗提蛋白(hen's egg-white protein, HEWP)和无致敏史食物蛋白质马铃薯酸性磷酸酶(Potato acid phosphatase, PAP),检测BN大鼠对食物过敏原和非食物致敏原过敏反应的差异,对BN大鼠作为食物过敏动物模型的可行性进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性挪威棕色大鼠,4~6周龄,购自维通利华公司,三级动物。饲养条件为:二级动物房,温度(23±3),湿度50%~70%,自由饮水、

饮食,饲料中不含受试蛋白质。

1.1.2 主要试剂 OVA、PAP Sigma公司产品,山羊抗大鼠IgE抗体、辣根酶标记兔抗山羊IgG抗体北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鸡蛋清粗提蛋白的制备 无菌取鸡蛋清,称取30g,加270ml灭菌水,4℃搅拌过夜。4℃2500g离心10min,取上清,4℃17000g离心15min,上清用0.2μm滤膜过滤。取滤液,测定其蛋白浓度为23.4mg/ml。

1.2.2 动物分组 24只BN大鼠,随机分为4组,分别为灭菌水组(对照组)、OVA组、PAP组、HEWP组,每组6只。

1.2.3 致敏方式 各组灌胃,1ml/只, OVA、PAP组蛋白浓度为1mg/ml, HEWP组为10.0mg/ml,每天1次,共6周。在第14、28、42天内眦静脉取血,8000r/min离心2min分离血清,分装血清-20℃冻存备用。

1.2.4 特异IgE抗体测定 96孔酶标板,10μg/ml致敏原100μl包被,4℃过夜。PBS/0.05%Tween-20冲洗3次,用20%小牛血清200μl 37℃封闭1h,冲洗3次,加100μl相应组大鼠稀释血清试样,37℃1h,冲洗后加山羊抗大鼠IgE抗体100μl,37℃1h,冲洗3次,加偶联过氧化酶兔抗山羊IgG抗体100μl,37℃1h,冲洗后加OPD溶液,37℃30min。用1mol硫酸30μl终止反应,492nm比色。

1.2.5 皮肤过敏反应试验(PCA) 动物背部剃毛,0.1ml皮内注射血清系列稀释液,48h后,分别静脉注射5mg/ml OVA、PAP、HEWP、水和Evans蓝的混合

液(1:1),20~30 min 观察反应。测量有色渗出的面积,直径大于或等于 5 mm 为阳性。得到阳性结果的最大稀释度为特异性 IgE 滴度。

1.3 数据处理

用 Microsoft Excel 及 SPSS10.0 进行实验数据统计分析,实验组与对照组间比较采用 *t* 检验,计算 *P* 值,*P* < 0.05 具有统计学差异。

2 结果

2.1 特异 IgE 的检测

第 28、42 天 OVA、HEWP 组 BN 大鼠 32 倍稀释血清中特异 IgE 抗体均较对照组升高,并有统计学差异,第 14、28、42 天 PAP 组及第 14 天 OVA、HEWP 组 BN 大鼠 32 倍稀释血清中特异 IgE 抗体较对照组无统计学差异。如表 1 所示。

表 1 各试验组 32 倍稀释血清中特异 IgE 抗体水平($\bar{A} \pm s, n = 6$)

		第 14 天	第 28 天	第 42 天
OVA	对照组	0.095 ± 0.005	0.087 ± 0.006	0.092 ± 0.008
	实验组	0.104 ± 0.020	0.143 ± 0.057 ^a	0.172 ± 0.061 ^a
HEWP	对照组	0.086 ± 0.004	0.082 ± 0.003	0.101 ± 0.006
	实验组	0.101 ± 0.025	0.104 ± 0.011 ^a	0.154 ± 0.047 ^a
PAP	对照组	0.123 ± 0.011	0.123 ± 0.005	0.127 ± 0.006
	实验组	0.102 ± 0.013	0.128 ± 0.018	0.136 ± 0.015

注:a: *P* < 0.05,与对照组相比有统计学差异。

2.2 皮肤过敏反应实验

OVA、HEWP 组在第 28、42 天时,其 PCA 反应均为阳性,特异性 IgE 滴度范围为 1:4~1:32。PAP 组特异性 IgE 滴度范围为 0~1:4,结果见表 2。

表 2 PCA 测定的 IgE 滴度

组别	第 14 天	第 28 天	第 42 天
对照组	-	-	-
OVA	0~1:4	1:4~1:32	1:8~1:32
HEWP	0~1:4	1:4~1:16	1:4~1:32
PAP	0~1:4	0~1:4	0~1:4

3 讨论

BN 大鼠是目前食物过敏性研究中最常用的品系,Knippels 等^[3,4]经灌胃分别给予 BN 大鼠不同剂量的 OVA、HEWP 和脱脂牛奶,发现 OVA、HEWP 和脱脂牛奶均可使 BN 大鼠产生特异的 IgE 和 IgG 抗体,OVA 1mg/d 组抗体滴度最高,该研究认为 BN 大鼠是合适的评价食物致敏原的动物模型。

在进行动物实验时,目前国际上倡导采用 3R 原则,即在保证动物质量和饲养条件的前提下,相关研究的每组动物数均不超过 6 只。通常认为,适宜的食物过敏动物模型暴露于人体食物致敏原后应产生过敏反应,暴露于无致敏史食物后应不产生过敏

反应,同时对不同食物致敏原产生的过敏反应的强度与人体相似,对常见食物致敏原(如花生)产生过敏反应的强度 > 不常见食物致敏原(如牛奶) > 无致敏史食物(如菠菜叶)^[5]。在食物过敏动物模型研究中,研究者经常只注重检测动物暴露于人体食物致敏原后产生过敏反应,而往往忽视检测动物暴露于无致敏史食物后应不产生过敏反应,导致最终产生不确切的结论。曾有研究者认为 BalB/c 小鼠是理想的食物过敏动物模型^[6],但我们研究发现,按相关报道的致敏途径,OVA、PAP 均可使 BalB/c 小鼠产生的过敏反应,OVA 为常见致敏食物蛋白质,而 PAP 为无致敏史食物蛋白质。BalB/c 小鼠并不适合作为食物过敏的动物模型。

本研究分别用 1 mg/d 的 OVA、PAP 和 10 mg/d HEWP 灌胃方式使小鼠致敏,ELISA 结果发现第 28、42 天 OVA、HEWP 组 BN 大鼠 32 倍稀释血清中特异 IgE 抗体均较对照组升高,并有统计学差异,第 14、28、42 天 PAP 组及第 14 天 OVA、HEWP 组 BN 大鼠 32 倍稀释血清中特异 IgE 抗体较对照组相比无统计学差异。PCA 结果与 ELISA 结果基本一致。结果显示,OVA、HEWP 可使 BN 大鼠产生较高滴度的特异 IgE 抗体,PAP 不使 BN 大鼠产生特异 IgE 抗体。BN 大鼠对常见致敏食物蛋白质 OVA 和 HEWP 产生过敏反应,而对无致敏史食物蛋白质 PAP 不产生过敏反应。由此可见,BN 大鼠可能是较为理想的食物过敏动物模型。但要把 BN 大鼠作为常规食物过敏动物模型优选鼠系,还需做进一步的免疫学研究。

参考文献

- [1] Bruijnzeel-Koomen C,Ortolani C,Aas K, et al. Adverse reactions to food[J]. position paper. Allergy, 1995, 50:623-635.
- [2] 吕相征,刘秀梅.转基因食品的致敏性评估[J].中国食品卫生杂志,2003,15(3):238-244.
- [3] LMJ Knippels, HPM van der Kleij, SJ Koppelman, et al. Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk protein in orally sensitized rats and food-allergic patients[J]. Allergy, 2000; 55:251-258.
- [4] LMJ Knippels, AH Penninks, S Spanhaak, et al. Oral sensitization to food proteins: a brown Norway rat model[J]. Clin Exp Allergy, 1998, 28:368-375.
- [5] Bob B Buchanan. Genetic engineering and the allergy issue [J]. Plant Physiol, 2001, (126): 5-7.
- [6] Dearman RJ, I Kimber. Determination of protein allergenicity: studies in mice[J]. Toxicol Lett, 2001, 120: 181-186.

[收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;Q95-3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0103-03