

综述

转基因食品潜在致敏性评价方法的研究进展

李慧,李映波

(中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所,云南 昆明 650118)

摘要: 随着转基因食品在人类消费生活中的应用日益增加,人们对于完善转基因食品潜在致敏性评价方法的需求也不断增强。本文就现有转基因食品潜在致敏性的评价方法,包括决策树、序列同源性、血清学筛选、消化稳定性(抗胃蛋白酶性)以及动物模型等的研究进展做一概述,对其现状做出总结并对其发展提出建议。

关键词: 转基因食品; 潜在致敏性; 决策树; 评估方法

中图分类号: R155.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)06-0587-04

The progress of assessment on the approaches of potential allergenicity of genetically modified foods

Li Hui, Li Yingbo

(Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Institute of Medical Biology, Yunnan Kunming 650118, China)

Abstract: With an increasing usage of genetically modified (GM) foods for human consumption, there is a growing need for the development of approaches suitable for assessing the potential allergenicity of GM foods. The progress of current assessing approaches for the allergenic potential of GM foods, including decision tree, sequence homology, serology screening, digestive stability (pepsin resistance) and animal models were discussed, and an overview on the present condition and recommendations for its development were given in this review.

Key words: Genetically modified foods; potential allergenicity; decision tree; assessment approaches

食物过敏是由于某种食物或食品添加剂等引起的 IgE 介导和非 IgE 介导的导致消化系统局部或全身性的变态反应。全球约 5% ~ 7.5% 的儿童和 1% ~ 2% 的成人反复存在食物过敏的症状^[1]。儿童发病率较成人高。随着生物技术的迅速发展,越来越多的包含遗传修饰生物 (genetically modified organisms, GMOs) 成分^[2]的转基因产品进入人类社会。转基因食品可能引起的人体致敏性问题及其评价指标,日益成为人类关注的热点。

1 转基因食品及其安全性评价的基本原则

转基因食品主要是以基因工程为代表的现代生物技术改造食物,有转基因 DNA 植物、转基因 DNA 微生物、转基因 DNA 动物来源食品。1983 年世界上第一例转基因作物(烟草和马铃薯)问世。目前,转基因食品的主要来源仍是转基因植物。美国食品和药品管理局(FDA)于 2008 年宣布经过克隆的牛、猪和山羊以及它们的后代均可以安全使

用,克隆牛产的奶也可以安全使用,批准克隆动物及其产品进入食品市场;随后,欧盟、日本等国也相继批准体细胞克隆动物进入市场成为人们的消费品。但是,转基因食品,尤其是转基因动物食品的安全性仍然是人们关注的焦点。日前,基因改良型的转基因鲑鱼能否上市和抗禽流感的转基因鸡^[3]的问世引发各界广泛争议。国内外将转基因微生物用于食品和药品的生产和加工已较为普遍,澳大利亚已开始尝试批准用于制作超级面包的酶进入市场应用。

转基因食品安全性评价的基本原则是“实质等同”。但是该原则目前主要应用在转基因植物,转基因动物和转基因微生物的安全性评价,在参考实质等同性原则的同时,仍需要进行食品营养价值的评价和毒理学(包括动力代谢、遗传毒性、致病性、啮齿类动物亚慢性喂养试验和致癌试验等)相关的功能性评价^[4]。

2 转基因食品的致敏性评价

转基因食品的致敏性评价是转基因食品安全性评价的重要内容,其评价方法最早是由国际食品生物技术委员会(IFBC)和国际生命科学学会过敏

收稿日期: 2010-12-10

作者简介: 李慧 女 硕士生 研究方向为病原生物学

通信作者: 李映波 男 研究员 硕士生导师 E-mail: lyb@

imbcams.com

和免疫研究所 (ILSI/AII) 在 1996 年合作制定的判定树分析法 (decision tree approach)^[5], 由于其对来自未知致敏原的转基因食品未给出明确的评价方法, 国际粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 以及国际食品法典委员会 (CAC) 分别在 2001 年和 2003 年对其进行了修改和补充 (见图 1)。修改后的判定树同以前相比, 增加了靶血清筛选和动物模型试验 (见图 2), 使得转基因食品致敏性的评价方法更具有可操作性。以下是评价转基因食品致敏性的几种常用方法。

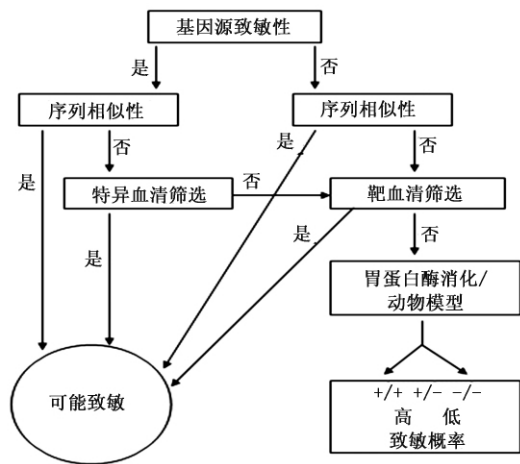


图 1 转基因植物致敏性评估决策树^[6]
(FAO/WHO 2001)

Figure 1 Decision Tree for assessing the potential allergenicity of genetically modified plants (FAO/WHO 2001)

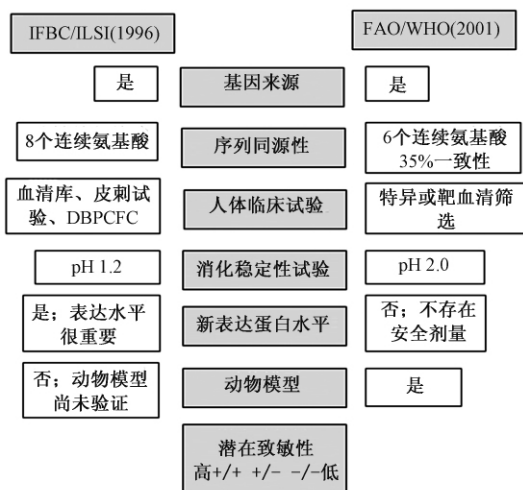


图 2 1996 年和 2001 年判定树的比较^[7]

Figure 2 Comparison of the decision tree in 1996 and 2001

2.1 氨基酸序列同源性和相似度

致敏性评估的首要途径是与已知致敏原氨基酸序列的相似性进行比较^[8]。目前国际上致敏原相关数据库较多, 主要有 SDAP、Farrp、NCBI、SwissProt 和 CBI 等。如果转录的氨基酸序列与数据

库中已知的致敏原序列相似, 则其致敏的可能性大大增加。致敏蛋白在结构和功能上具有一定的保守性, 包括抗消化性、耐酸碱性和热稳定性及特定的氨基酸序列, 因此在理论上能够通过未知致敏原的基因与已知致敏原的氨基酸序列的同源性进行比较做出致敏性评价。目前较普遍的观点认为, 通过检测发现以下几种情况之一的转基因食品可能具有致敏性: ①所转基因编码已知的致敏蛋白; ②基因源含致敏蛋白; ③在转入蛋白与已知致敏蛋白的氨基酸序列免疫学上有明显同源性, 至少有 8 个连续氨基酸相同; ④转入的蛋白属于家族中有致敏蛋白的家族, 如肌动蛋白抑制蛋白 (profilin) 和脂质转运蛋白 (lipid transfer protein, LTP) 均是小分子蛋白, 广泛存在于动物和植物中, 但是花粉中的 profilin 和 LTP 却是一种致敏原^[9]。

虽然序列同源性的比较是评价转基因食品致敏性的首要方法, 但是这种方法也存在一定的缺点。转基因蛋白的全序列和连续 8 aa 不匹配就不存在致敏性, 但是如果转基因蛋白与某种致敏原的连续 6 aa 匹配, 而这 6 aa 不处于蛋白质抗原性决定部位, 就有可能出现假阳性结果, 即, 预测结果有致敏性, 而在进入人体后并无过敏现象。同时, 由于各个致敏原数据库的数据量和算法程序不同, 在预测同一蛋白的结果时也会不一致。

此外, 除了氨基酸顺序决定簇可以引起过敏, 构象决定簇也可引起过敏, 但是现有的序列相似性分析仅局限于氨基酸顺序的比较, 因此, 在序列相似性分析之后, 必要时应做血清学试验来验证目的基因编码的蛋白是否能与特定的 IgE 结合, 从而更准确地判断转入的基因是否引起过敏。

2.2 血清学筛选

临床上 IgE 介导的速发型超敏反应是食物过敏的主要类型, 对某一种或几种食物过敏的病人其血清中往往含有针对这些食物抗原的高浓度特异性 IgE 抗体, 血清筛选试验原理就是利用过敏病人的血清来检测蛋白是否具有结合该食物特异性 IgE 的能力, 从而达到评价待测蛋白与已知食物致敏原同源性或抗原交叉性的目的; 食物不耐受也是一种复杂的变态反应, 致敏原特异性 IgG 的检测有重要的临床意义^[10-11]。免疫印迹法 (电泳或 ELISA^[12]) 和放射性变应原吸附 (RAST)^[13] 抑制试验都是检测致敏原的重要方法。Nakamura 等^[14] 将血清学和二维差异凝胶电泳 (two-dimensional difference gel electrophoresis 2D-DIGE) 分析法结合起来, 测试转基因鸡肉和非转基因鸡肉的致敏性差异, 并在分析实验所得数据后表示血清学和 2D-DIGE 联合使用

是评价转基因食品致敏性的有效手段。

如果评估的新基因来自并无致敏史的生物材料,则需要将该蛋白质的氨基酸序列与已知的致敏原进行比较,根据其相似性判定是否是致敏原,然后选用对类似致敏原发生变态反应的病人血清进行免疫学试验,但是要使血清的质量以及化验的程序标准化。血清筛选就要选取特异性的血清(即与该蛋白类似的致敏原导致患病的病人的血清)来检测 IgE 水平是否升高。如果没有氨基酸序列的相似性,未找到序列同源的致敏原,就需要进行交叉免疫反应,在血清库中进行筛选。但是由于血清库资料有限,可能缺乏对某些致敏原的相关信息或者该致敏基因来源于细菌,可能会出现没有可以诱导高水平 IgE 反应的血清结果,则需要对其消化稳定性进行检测或者在适当的动物模型体内观测其表达状况。

2.3 消化稳定性

致敏蛋白具有抗胃蛋白酶、胰酶和耐酸耐碱的特性。消化稳定性的评估法是指蛋白质在人体或模拟人体的胃肠消化体系中的降解程度。目前几乎所有的消化稳定性试验都在体外模拟胃肠液中进行,要求模拟胃、肠液中蛋白酶、离子成分和 pH 值 3 个因素应尽量符合人体胃肠中的环境。通常是采用外源基因的原核表达产物或转基因食品的初提液进行模拟胃肠液消化试验,消化时间 0、15、30 s 和 1、2、4、8、15、60 min 与对照进行 SDS-PAGE 电泳分析,并设立重复和平行对照,根据电泳结果和蛋白印迹图谱分析原核表达产物或转基因食品中目标蛋白是否具有消化稳定性。一般认为蛋白降解片段可以在 2 min 内被全部消化则认为该蛋白在模拟胃肠液中容易消化^[15],由此可判断该蛋白是否具有消化稳定性。

虽然检测消化稳定性已被普遍认可,但是单独依靠检测新型蛋白质的胃蛋白酶抗性仍非绝对可靠。在进行消化稳定性实验时,研究者应注意待检食品是否含有蛋白酶抑制剂或者其他可以促进或抑制蛋白质降解的物质。因此,研究者进行消化稳定性检测时依然需要结合判定树中的其他方法来判断转基因食品的致敏性。

2.4 皮肤穿刺实验和双盲法食物攻击实验

根据 1996 年 IFBC 与 ILSI/AII 制定的致敏性分析程序,血清学试验中呈阴性的目的蛋白还应进行皮肤穿刺试验(skin prick testing, SPT)^[16]和双盲法食物攻击实验(DBPCFC),如果都为阴性,则表明转入的基因不可能引起过敏。但在考虑到人体试验的潜在危险,2001 年新颁布的致敏性评估程序中,

SPT 和 DBPCFC 被动物模型试验所取代。

2.5 动物模型

动物模型试验是 2001 年 FAO/WHO 发布的致敏性评估程序中提出的。目前尚未有一个评估的标准动物模型,尚需不断研究以期找到能较好地模仿人的抗体反应的动物模型。目前常用的较为敏感的动物模型主要是啮齿类,有 BN 大鼠模型、BALB/c 和 C3H/HeJ 小鼠模型等。BN 大鼠能够很好地通过经口和腹腔注射 2 种途径致敏,致敏引起的全身反应也与人类的临床表现相似;BALB/c 小鼠能够经口给药^[17],但更适用于腹腔注射途径,用以判定蛋白质的内在致敏可能性;C3H/HeJ 小鼠是 Toll 样受体 4 基因突变型小鼠,也能够很好地通过经口和腹腔注射 2 种途径致敏,可能更适用于研究食物致敏的发生机制^[18]。此外,也有学者建立了猪和狗的动物模型来进行研究^[19-20]。随着研究工作的深入,动物模型可能会被划分出高度敏感型、中度敏感型和低度敏感型,或者在建立了标准的动物模型后,针对每一类别的动物模型分别明确其可检测的致敏原的高敏、中敏和低敏类别。

虽然有足够的科学证据表明,一个良好的动物模型能够为新型蛋白潜在致敏性评价提供比较准确和重要的证据,但是,动物模型实验也存在一定的局限性。动物模型的致敏途径有经口和腹腔注射 2 种,采取任何一种都不能够完全排除其他致敏途径可能会导致动物发生过敏现象,因此,需要在相同或不同的动物模型上做 2 种致敏途径或更多致敏途径的试验。由于动物和人体的生理和生活方式上会存在差异,而且不同的实验条件以及实验动物自身也存在个体差异,这也都有可能导致实验结果有所不同。这就需要多次重复性实验,并利用统计学软件进行科学的数据分析处理,得出较为客观的结论。

3 结语

随着转基因技术的进一步发展,转基因食品的潜在致敏性评价方法的研究面临新的挑战。本文提到的评价方法各自有其优缺点,单独使用并非绝对可靠,依然需要参照判定树联合或逐步使用。总体上,序列同源性的预测结果虽有一定缺陷,却仍然具有较高的可信度,仍然是评价致敏性的首要方法,可以为进一步的研究提供借鉴。转基因蛋白是否引起过敏,还取决于该蛋白与高过敏患者血清学反应检测和其在人体消化系统中能否快速被降解和消化。血清学筛选是评价新蛋白致敏性的有效手段,但受到血清库资料有限的影响也会出现疏

漏。消化稳定性作为致敏性评价的参考值,更需要与其他方法共同使用。动物模型可以为转基因食品的致敏性研究提供十分有价值的信息,但现阶段的动物模型还不能够完全反映 IgE 介导的食物过敏在人体反应的各个方面。

今后,从事转基因食品的潜在致敏性评价方法研究的科研工作者须不断更新和维护序列数据库资料和特异性血清库资料,有针对性地增加实验动物种类,早日建立并标准化动物模型,正确界定敏感人群,以及更加有效地利用人体临床数据,根据需要及时更新 2001 年判定树,努力完善对转基因食品致敏性评价方法的研究。同时,倡议 FAO/WHO 向成员国提供技术支持,使各成员国可以承接转基因食品过敏性评价方法的研究;另外,倡议建设一个国际网络平台,促进和加强专家之间的互动,提高标准作业程序,优化实验室规范和临床实验,以便开展转基因食品致敏性评价方法的研究。

参考文献

- [1] 向钱,李宁. 食品致敏性研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2006, 33(6): 376-380.
- [2] ASSAF. Workshop proceedings report on: GMOs for African agriculture: challenges and opportunities [R]. 2010.
- [3] LYALL J, IRVINE R M, SHERMAN A, et al. Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens [J]. Science 2011, 331(6014): 223-226.
- [4] LEBLANC J G, van SINDEREN D, HUGENHOLTZ J, et al. Risk assessment of genetically modified lactic acid bacteria using the concept of substantial equivalence [J]. Curr Microbiol 2010, 61(6): 590-595.
- [5] METCALFEDD, ASTWOODJD, TOWNSEDR, et al. Assessment of the allergenic potential of foods from genetically engineered crop plants [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36(S): 165-186.
- [6] FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. [R]. Rome 2001.
- [7] 黄琼,徐海滨. 食物中潜在致敏物质的评价研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(2): 179-183.
- [8] VERMAAK, MISRAA, SUBASHS, et al. Computational allergenicity prediction of transgenic proteins expressed in genetically modified crops [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol 2010, [Epub ahead of print] doi: 10.3109/08923973.2010.523704 PMID: 20964517.
- [9] BARBER D, de LA TORRE F, FEO F, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study [J]. Allergy 2008, 63(11): 1550-1558.
- [10] 陈嫣, 陈同辛, 朱亚忠. 食物过敏原特异性 IgG 检测的临床意义 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, (2): 143-146.
- [11] 李彩虹, 张振国, 乐宏元. 557 例过敏性疾病患者食物不耐受 IgG 抗体检测结果分析 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2009, 25(4): 303.
- [12] 杨剑婷, 吴彩娥, 李莹莹, 等. 白果蛋白过敏动物模型的试验研究 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3616-3623.
- [13] MARCUCCI F, SENSI L, DI CARA G, et al. Which allergen extract for grass pollen immunotherapy? An in vitro study [J]. Immunol Invest 2010, 39(6): 635-644.
- [14] NAKAMURA R, NAKAMURA R, NAKANO M, et al. Allergenicity study of EGFP-transgenic chicken meat by serological and 2D-DIGE analysis [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(5): 1302-1310.
- [15] 中华人民共和国农业部. 农业部 869 号公告-2-2007 转基因生物及其产品食用安全检测 模拟胃肠道液外源蛋白质消化稳定性试验方法 [S]. 2007.
- [16] ELLIS A K, RATZ J D, DAY A G, et al. Factors that affect the allergic rhinitis response to ragweed allergen exposure [J]. Ann Allergy Asthma Immunol 2010, 104(4): 293-298.
- [17] GIZZARELLI F, CORINTI S, BARLERRA B, et al. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization [J]. Clin Exp Allergy 2006, 36(2): 238-248.
- [18] LÓPEZ-EXPÓSITO I, SONG Y, JÄRVINEN K M, et al. Maternal peanut exposure during pregnancy and lactation reduces peanut allergy risk in offspring [J]. J Allergy Clin Immunol 2009, 124(5): 1039-1046.
- [19] KUEHL P J, BARRETT E G, MCDONALD J D, et al. Formulation development and in vivo evaluation of a new dry powder formulation of albuterol sulphate in beagle dogs [J]. Pharm Res, 2010, 27(5): 894-904.
- [20] HUANGQ, XUH, YUZ, et al. Inbred Chinese Wuzhishan (WZS) minipig model for soybean glycinin and beta-conglycinin allergy [J]. J Agric Food Chem 2010, 58(8): 5194-5198.