

## 论著

## 亲代暴露致敏原对子代 BN 大鼠致敏模型的影响

陈如程<sup>1,2</sup>,李娜<sup>2</sup>,唐晓荞<sup>2</sup>,刘家发<sup>2</sup>,樊柏林<sup>2</sup>,李十月<sup>2</sup>,贾旭东<sup>3</sup>,杨晓光<sup>4</sup>

(1. 浙江中医药大学,浙江 杭州 310053; 2. 湖北省疾病预防控制中心 应用毒理湖北省重点实验室,湖北 武汉 430079; 3. 国家食品安全风险评估中心,北京 100021; 4. 中国疾病预防控制中心营养食品所,北京 100021)

**摘要:**目的 研究 BN 大鼠亲代暴露致敏原后子代对致敏原免疫反应变化。方法 亲代分成暴露与非暴露致敏原,两组所产大鼠均随机分为卵清蛋白(OVA)组、空白对照组,分别每日经口给予 1 mg/ml OVA 溶液、灭菌蒸馏水 1 ml,共 6 周;第 2 周、第 4 周、第 6 周取血分离血清,测定特异性抗体 IgG 和 IgE;第 3 天和第 5 天取血分离血浆,测定组胺;最后测定两组胃肠道渗透性。结果 亲代非暴露致敏原的大鼠可激发较强的过敏反应,特异性 IgG、特异性 IgE、组胺水平平均升高;亲代暴露致敏原的大鼠激发后免疫反应较弱。结论 BN 大鼠亲代接触致敏原后,其子代致敏免疫反应减弱。

**关键词:**BN 大鼠;模型;致敏;子代;动物;致敏原;毒理试验

中图分类号:R155;R392;Q95-3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0521-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.001

**Effect of parental rat exposure to allergen on the sensitization model of filial generation in BN rat**

CHEN Ru-cheng, LI Na, TANG Xiao-qiao, LIU Jia-fa, FAN Bo-lin, LI Shi-yue,

JIA Xu-dong, YANG Xiao-guang

(Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Hangzhou 310053, China)

**Abstract: Objective** To study the immune response of offspring rats after parental rats exposure to allergen. **Methods**

Parental BN rats were divided exposure and non-exposure to allergen groups. The offspring rats were randomly divided into OVA group, control group respectively, OVA and control were daily administrated at the dose of 1 mg/ml OVA or at the dose of sterile water by gavage for 6 weeks. Blood samples were taken on the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 6<sup>th</sup> weeks from the orbital plexus, and centrifuged to obtain sera for analyzing specific IgG and IgE. On the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> weeks, blood samples were taken to obtain plasma for analyzing histamine. In addition, the changes of gut permeability were determined. **Results** Allergenic response could be induced by provoke allergen OVA in BN rats when parental rats were non-exposure to allergen OVA, include specific IgG, IgE increasing and histamine increasing. However, little allergenic response be provoked by OVA in BN rat when parental rats were exposure to allergen OVA. **Conclusion** The immuneresponse of offspring BN rats were weaken after parental rats exposure to allergen.

**Key words:** Brown Norway rats; models; sensitization; offspring; animal; allergenicity; toxicological experiment

随着转基因食品的不断发展和生产,转基因食品的安全性问题,特别是转基因食品的潜在致敏性问题越来越受到公众的关注。2001 年联合国粮食与农业组织/世界卫生组织 (FAO/WHO) 生物技术食品致敏性联合专家咨询会议把动物模型试验添

加到转基因食品致敏性评估树状分析法中<sup>[1]</sup>,并作为树状分析法重要组成部分。BN 大鼠以对免疫球蛋白高反应性及遗传特性上与食物过敏人群非常相似等优点,成为目前应用最为常用的致敏动物模型<sup>[2-3]</sup>,也是较为理想的动物致敏模型,然而 Ladics 等<sup>[4]</sup>在研究中指出 BN 大鼠在做致敏评价时,需要在无致敏原的条件下繁殖。但亲代暴露于致敏原,子代大鼠对致敏原的免疫反应变化研究资料较少,机制不清楚,国内外也未此类文章报道。因此,本研究通过比较亲代暴露与非暴露致敏原后,子代大鼠之间致敏后免疫反应差别,探索亲代暴露致敏原后子代对致敏原耐受性的影响。

收稿日期:2014-07-23

基金项目:农业部“转基因生物新品种培育”科技重大专项资助(2014ZX08011005);湖北省医学领军人才培养工程专项经费资助(鄂卫生计生发[2013]4号)

作者简介:陈如程 男 博士 研究方向为食品安全与流行病学

E-mail: cruc686@163.com

通讯作者:樊柏林 男 博士 研究方向为毒理学

E-mail: vanbolin@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

原代 BN 大鼠,雌性大鼠 16 只,6~8 周龄,体重 140~150 g,雄性大鼠 8 只,8~10 周龄,体重 170~190 g[北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001]。在 SPF 环境中饲养(湖北省疾病预防控制中心,合格证号:0281114),温度(23±3)℃,湿度 50%~70%,饲料为大小鼠维持饲料,粗蛋白含量占 20.4%,其中不含卵清蛋白(OVA),购自武汉市万千佳兴生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂

$\beta$ -乳球蛋白、卵清蛋白(OVA)、辣根过氧化物酶标记兔抗大鼠 IgG 抗体均购自美国 Sigma,大鼠血清特异性 IgE 试剂盒、血清  $\beta$ -乳球蛋白试剂盒、血浆组胺试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物繁殖

原代(F0代)大鼠按雌雄数量比 2:1 进行交配,次日检查阴道涂片阳性的雌性大鼠随机分成两组,一组大鼠妊娠期给予灭菌水,另一组大鼠妊娠期则给予 1 mg/ml OVA 溶液,1 ml/只,每日 1 次,持续 20 d,待 F0 代母鼠产仔 4 d 后,两组母鼠哺乳期分别继续给予灭菌水和 OVA 溶液,1 ml/只,每日 1 次,持续 17 d。两组所产仔鼠断乳后纳入 F1 代大鼠,分别记为 F1a 大鼠和 F1b 大鼠,F1a 大鼠亲代未暴露于致敏原 OVA 溶液,F1b 大鼠亲代暴露于致敏原 OVA 溶液。F0 代大鼠交配后阴道涂片检测为假阴性的大鼠,所产的仔鼠均不纳入到 F1 代大鼠。

#### 1.2.2 动物分组与处理

亲代妊娠期和哺乳期经口给予灭菌水的 F1a 大鼠,随机分成 OVA 组和空白对照组,每组 16 只,雌雄各半。OVA 组和空白对照组经口灌胃分别给予 1 mg/ml OVA 溶液、灭菌蒸馏水,1 ml/只,每日 1 次,持续 6 周。各组大鼠分别于第 2 周、第 4 周、第 6 周,眇静脉取血 500  $\mu$ l,4℃ 2 000 r/min 离心 10 min 分离血清,用于特异性抗体 IgG 和 IgE 测定。于第 3 周和第 5 周,加肝素钠,眇静脉取血 200  $\mu$ l,4℃ 2 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,用于组胺测定。

亲代妊娠期和哺乳期经口给予 1 mg/ml 的 OVA 溶液的 F1b 大鼠,同样随机分成 OVA 组和空白对照组,每组 16 只,雌雄各半。处理方式与 F1a 相同。

#### 1.2.3 血清特异性 IgG 抗体测定

采用间接 ELISA 检测方法,96 孔酶标板,10 mg/L 致敏原 100  $\mu$ l,4℃ 过夜;PBS/0.05% 吐温-20 洗涤 3 次,用 PBS/5% 小牛血清白蛋白封闭,4℃ 过夜,洗涤

3 次,加 100  $\mu$ l 按 1:100(V/V) 稀释的待检血清,37℃ 温育 1 h,洗涤 6 次,加辣根过氧化物酶标记兔抗大鼠 IgG 抗体 100  $\mu$ l,37℃ 温育 1 h,洗涤 6 次,加 OPD 溶液 150  $\mu$ l 显色,37℃ 30 min,加 50  $\mu$ l 1 mol 硫酸终止,450 酶标仪比色。OVA 组相对 OD 值(OVA 组 OD 值 - 空白 OD 值)与对照组相对 OD 值(对照 OD 值 - 空白 OD 值)之比( $P/N$ )>2 为阳性<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.4 特异性 IgE 抗体测定

采用大鼠特异性 IgE ELISA 试剂盒检测,用抗大鼠 IgE 抗体包被,加血清与包被抗体结合,依次加生物素化的抗大鼠 IgE 抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素,形成免疫复合物,加底物显色,用酶标仪在 450 nm 波长处显色。

#### 1.2.5 组胺测定

采用大鼠组胺(His)ELISA 试剂盒检测,用抗 His 抗原包被,加血浆与包被的 His 竞争生物素标记的抗 His 单抗上的位点结合,加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,形成免疫复合物,加底物显色,用酶标仪在 450 nm 波长处显色,测定 His 浓度。

#### 1.2.6 胃肠道渗透性测定

在 42 d 后,OVA 组大鼠和空白给大鼠分别经口灌胃给予 2 ml 50 mg/ml OVA 和灭菌水。30 min 后,再灌胃给予 100 mg/ml 的  $\beta$ -乳球蛋白 1 ml。分别于 0.5、1、2、4、8 h 后内眇静脉取血,4℃ 2 000 r/min 离心 10 min 分离血清,用  $\beta$ -乳球蛋白试剂盒测定<sup>[6]</sup>。

### 1.3 统计学分析

试验的计数资料用 Excel 2003 对数据进行录入,利用 SPSS 13.0 对数据进行描述分析,并进行  $t$  检验和方差分析。

## 2 结果

### 2.1 血清特异性抗体 IgG 检测结果

F1a 大鼠经口致敏后,OVA 组激发较高的特异性抗体,血清 32 倍稀释后,特异性 IgG 的抗体水平明显高于阴性对照组( $P/N > 2$ ),第 2 周、第 4 周、第 6 周 IgG 的阳性率分别为 43.8% (7/16)、93.8% (15/16)、81.3% (13/16);F1b 大鼠第 2 周、第 4 周、第 6 周 IgG 阳性率分别为 0(0/16)、43.8% (7/16)、37.5% (6/16)。F1a 和 F1b 大鼠在第 2 周和第 4 周两个时间点激发的 IgG 抗体水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),F1a 大鼠血清 IgG 抗体水平明显高于 F1b 代的大鼠;两组第 6 周 IgG 抗体水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 特异性 IgE 检测结果

F1a 大鼠 OVA 组激发了一定程度的 IgE 抗体,血清 32 倍稀释后,第 2 周特异性 IgE 抗体水平最

表1 不同时间大鼠特异性 IgG 抗体水平( $\bar{x} \pm s, n = 16$ )

Table 1 Distribution of P/N value of specific IgG in serum of groups at different time

时间	P/N 值		t 值	P 值
	F1a	F1b		
第2周	1.9 ± 1.19	1.0 ± 0.30	2.915	0.010
第4周	4.5 ± 1.47	2.9 ± 2.59	2.086	0.048
第6周	2.4 ± 0.41	2.1 ± 1.59	0.751	0.463

注:P/N 值为 OVA 组相对 OD 值(样品 OD 值—空白 OD 值)与对照组相对 OD 值(对照 OD 值—空白 OD 值)的比值;P/N 值 > 2 为阳性高,第2周、第4周、第6周血清特异性 IgE 抗体阳性率为 62.5% (10/16), 18.8% (3/16), 12.5% (2/16);而 F1b 大鼠 OVA 组只有第2周特异性 IgE 呈阳性,阳性率为 12.5% (2/16),第4周和第6周 OVA 均未能激发特异性 IgE 抗体。F1a 和 F1b 大鼠在第2周激发的 IgE 抗体水平差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),第2周 F1a 大鼠血清中的 IgE 抗体水平明显高于 F1b 大鼠,两组第4周和第6周 IgG 抗体水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表2。

表2 不同时间大鼠特异性 IgE 抗体水平( $\bar{x} \pm s, n = 16$ )

Table 2 Distribution of P/N value of specific IgE in serum of groups at different time

时间	P/N 值		t 值	P 值
	F1a	F1b		
第2周	3.5 ± 1.85	1.8 ± 1.25	3.046	0.005
第4周	1.2 ± 0.59	1.0 ± 0.06	1.414	0.177
第6周	0.9 ± 0.13	1.1 ± 0.70	1.124	0.277

注:P/N 值为 OVA 组相对 OD 值(样品 OD 值—空白 OD 值)与对照组相对 OD 值(对照 OD 值—空白 OD 值)的比值;P/N 值 > 2 为阳性

### 2.3 血浆组胺浓度检测结果

F1a 大鼠第3周血浆组胺比 > 1,说明 F1a 大鼠 OVA 组血浆组胺水平要高于对照组;F1b 大鼠第3周和第5周组胺比均 < 1,说明 F1b 大鼠对照组的组胺水平要高于 OVA 组;F1a 代大鼠第3周和第5周血浆组胺比要高于 F1b 代大鼠,见表3。

表3 不同时间大鼠血浆组胺比水平( $\bar{x} \pm s, n = 16$ )

Table 3 Rate of histamine of groups at different time

时间	组胺比		t 值	P 值
	F1a	F1b		
第3周	1.1 ± 0.25	0.6 ± 0.18	6.492	<0.001
第5周	1.0 ± 0.14	0.8 ± 0.34	2.176	0.042

注:组胺比为 OVA 组组胺浓度与对照组组胺浓度之比

### 2.4 血清中 $\beta$ -乳球蛋白的检测结果

BN 大鼠血清 ELISA 检测结果显示,在经口给予大量致敏原后,ELISA 检测的析光度值均小于空白析光度值,各组大鼠血清中均未检测到  $\beta$ -乳球蛋白。

## 3 讨论

BN 大鼠作为致敏动物模型,在致敏原的激发下,能产生较高水平的特异性 IgE 和 IgG 抗体,具有较强

的致敏免疫反应<sup>[7]</sup>,是目前最常用的致敏动物模型。本研究采用经口致敏的方式研究致敏动物模型,以特异性 IgG 抗体、特异性 IgE 抗体、组胺为指标,通过 OVA 组与空白对照组的比值做为指标来消除暴露以外的因素对免疫反应产生的影响,研究亲代大鼠暴露致敏原后,BN 大鼠致敏模型的可行性。此次研究显示,亲代大鼠孕期和哺乳期未暴露致敏原,大鼠免疫反应的研究结果与李中港<sup>[8]</sup>、贾旭东<sup>[9-10]</sup>等的研究结果相似,而亲代大鼠孕期和哺乳期暴露在致敏原下的 BN 大鼠的免疫反应却与以往研究结果不同<sup>[9-10]</sup>。

动物体内的 IgE 水平与其致敏敏感性相关<sup>[11]</sup>。研究表明<sup>[8]</sup>,特异性 IgE 指标是 I 型超敏反应检测体系中的一项重要指标。从本研究免疫蛋白的反应水平可以看出,大鼠致敏后特异性 IgG 指标的敏感性要高于特异性 IgE 指标,这提示在今后的致敏试验中特异性 IgG 可作为一项重要指标。

本研究结果显示,亲代非暴露致敏原的大鼠经口致敏2周后,产生较高的 IgE 抗体水平,亲代暴露致敏原的大鼠特异性 IgE 抗体水平较低,只有第2周个别血清 IgE 呈阳性。亲代暴露致敏原的大鼠在第2周、第4周致敏后特异性 IgG 抗体水平均低于未暴露的大鼠,这表示亲代大鼠孕期、哺乳期均暴露致敏原。大鼠致敏的免疫反应较弱,与亲代未暴露致敏原的大鼠相比,大鼠对致敏原产生一定耐受性。

致敏动物发生 I 型超敏反应时,体内组胺会大量释放,导致血浆组胺浓度升高,本研究结果表明,亲代未暴露大鼠血浆组胺浓度要高于对照组,与以往研究结果相似<sup>[10]</sup>,而亲代暴露大鼠 OVA 组血浆组胺浓度却要低于对照组,说明亲代暴露大鼠组胺升高并不是 OVA 致敏原所致,其具体升高原因还需要进一步进行研究。I 型超敏反应会导致胃肠渗透性增大,常会出现腹泻等胃肠道症状<sup>[12]</sup>。本研究中,亲代暴露和非暴露大鼠血清中均检测到  $\beta$ -乳球蛋白,这可能由于经口致敏免疫反应强度不够,所以并未引起胃肠渗透性的生理变化。

综上所述,亲代非暴露致敏原的 BN 大鼠是较为理想的动物致敏模型,通过血清特异 IgG 抗体,特异性 IgE 抗体水平、血浆组胺指标,能有效反应致敏原的免疫效应。然而亲代暴露致敏原的 BN 大鼠,其各个指标免疫效应较弱,说明亲代致敏后对子代致敏模型有一定影响,因此 BN 在作为致敏模型评价某种蛋白致敏性时,要考虑到亲代对子代致敏模型的影响,严格控制亲代 BN 大鼠暴露于评价蛋白,防止出现假阴性结果。但 BN 大鼠亲代多代口服致敏原后大鼠耐受性是否会加强以及耐受消失条件还需要进一步对后续几代大鼠进行研究。



## 参考文献

- [1] FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods[R]. Rome: FAO, 2001.
- [2] Dearman R J, Kimber I. A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization[J]. *Methods*, 2007, 41(1): 91-98.
- [3] Akiyama H, Teshima R, Sakushima J I, et al. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice[J]. *Immunol Lett*, 2001, 78(1): 1-5.
- [4] Ladies G S, Holsapple M P, Astwood J D, et al. Workshop overview: approaches to the assessment of the allergenic potential of food from genetically modified crops[J]. *Toxicol Sci*, 2003, 73(1): 8-16.
- [5] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 352-356.
- [6] Knippels L M, Penninks A H, Smit J J, et al. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats; further characterization of a rat food allergy model[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, 156(3): 161-169.
- [7] Knippels L M, Penninks A H, Spanhaak S, et al. Oral sensitization to food proteins; a Brown Norway rat model[J]. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28(3): 368-375.
- [8] 李中港, 秦慧迪, 汪怀山, 等. BN大鼠与Wistar大鼠I型过敏反应敏感性的比较[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2010, 24(1): 30-34.
- [9] 贾旭东, 李宁, 王伟, 等. 蛋白过敏性研究——BN大鼠动物模型[J]. *卫生研究*, 2004, 33(1): 63-65.
- [10] 向钱, 贾旭东, 王伟, 等. BN大鼠致敏动物模型研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2008, 20(5): 393-396.
- [11] Lewkowich I P, Rempel J D, HayGlass K T. In vivo IgE levels in exogenous antigen stimulated responses; measurement of total IgE as a valid, simple surrogate for Ag-specific IgE[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 286(1/2): 123-132.
- [12] Gonzalez cmssi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin[J]. *Am J Pathol*, 1983, 112(1): 127-135.

## 论著

## 不同烷基醛类对脱细胞-核 DNA 影响的研究

李谦<sup>1,2</sup>, 苏卿<sup>2,3</sup>, 张文众<sup>2</sup>, 贾旭东<sup>2</sup>, 李宁<sup>2</sup>, 张立实<sup>1</sup>

(1. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041; 2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 3. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715)

**摘要:**目的 研究甲醛、乙醛、丙醛、丁醛、己醛、戊醛对脱细胞-核 DNA 的影响。方法 将甲醛、乙醛、丙醛、丁醛、己醛、戊醛用缓冲液分别配制浓度为 10 mmol/L 的溶液作为受试物; 用羟自由基损伤的脱细胞-核 DNA 断片模型检测受试物与 DNA 交互作用的能力; 用未经羟自由基处理的脱细胞-核 DNA 模型检测受试物导致 DNA 断裂的程度。两种模型均为每组 6 个平行板, 处理时间均为 60 min, 用彗星实验检测 DNA 拖尾情况, 每张板用彗星分析软件(Comet A1.0)分析 50 个脱细胞-核 DNA, 组间差异用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。结果 经甲醛处理的脱细胞-核 DNA 断片模型无 DNA 片段泳出; 经乙醛处理的脱细胞-核 DNA 断片模型中 DNA 片段泳出量明显低于对照组; 其他醛类对脱细胞-核 DNA 断片模型的 DNA 断片泳出量与对照组比较差异无统计学意义; 所有醛类均未导致未经羟自由基处理的脱细胞-核 DNA 模型的 DNA 断裂。结论 甲醛和乙醛均可直接与脱细胞-核 DNA 断片形成加合物和/或产生 DNA-DNA 交联, 且形成加合物和/或 DNA-DNA 交联的能力随醛类烷基数量的增加而减弱。

**关键词:**脱细胞 DNA; 彗星试验; 醛类; DNA 加合物

中图分类号: R155; R99 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)06-0524-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.06.002

**Effect of different alkyl aldehydes on acellular-nuclear DNA**

LI Qian, SU Qing, ZHANG Wen-zhong, JIA Xu-dong, LI Ning, ZHANG Li-shi

(West China School of Public Health Sichuan University, Sichuan Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** To explore the impact of formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, hexanal, and pentanal on acellular-nuclear DNA. **Methods** Different alkyl aldehydes were respectively dissolved in buffer to final

收稿日期: 2014-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373009); “十二五”国家科技支撑重大计划项目(2012BAK01B04)

作者简介: 李谦 女 研究生 研究方向为食品毒理 E-mail: liqian19911991@163.com

通讯作者: 张文众 男 教授 研究方向为食品毒理 E-mail: zhangwz2002@sina.com

张立实 男 教授 研究方向为食品毒理 E-mail: shizhang\_56@163.com