

[14] ZHANG L D, HUANG Y Y, ZOU Z H, et al. Sortaller; predicting allergens using substantially optimized algorithm on allergen family featured peptides [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28 (16): 2178-2179.

[15] 张英, 刘珊, 徐海滨, 等. 转基因牛的重组人 $\alpha$ -乳清白蛋白的离体和体外消化稳定性研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(3):205-210.

## 论著

# BN大鼠经口致敏动物模型研究

孙拿拿, 张倩男, 王珊, 耿雪, 贾旭东

(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)

**摘要:**目的 建立经口灌胃途径给予造模致敏原的挪威棕色(Brown Norway, BN)大鼠致敏动物模型。方法 选用不同周龄(4周龄和8周龄)及不同性别(雄性和雌性)的BN大鼠, 每天经口灌胃给予不同剂量(10.0、1.0、0.1 mg)的造模致敏原—卵清蛋白(OVA), 共35天。在第28和35天分别进行内眦静脉取血并分离血清, 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测血清中OVA特异性IgE(OVA sIgE)浓度。结果 中剂量组雌性4周龄和8周龄BN大鼠血清中OVA sIgE浓度在第28和35天较阴性对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 低剂量组雄性8周龄BN大鼠血清中OVA sIgE浓度在第28天较阴性对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 各组雄性4周龄BN大鼠血清中OVA sIgE浓度在第28和35天均较阴性对照组差异无统计学意义。结论 经口灌胃途径给予不同性别和周龄的BN大鼠不同剂量的OVA, 雌性大鼠比雄性大鼠更敏感; 周龄对敏感性无影响; 1.0 mg的致敏剂量较适合。因此, 选用雌性BN大鼠, 每天经口灌胃给予1.0 mg OVA, 28~35天即可建立比较理想的BN大鼠经口致敏动物模型。

**关键词:**食物过敏; 动物模型; BN大鼠; 灌胃; 转基因食品; 食品安全

中图分类号: R155; Q503 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)03-0214-04

## Study on animal model of food allergenicity in BN rats by oral administration

Sun Nana, Zhang Qiannan, Wang Shan, Geng Xue, Jia Xudong

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To establish an oral Brown Norway (BN) rat model for food allergy. **Methods** Different doses (0.1, 1.0, and 10.0 mg/d) of ovalbumin (OVA) were administered to male and female BN rats with different age (4 and 8 weeks) by gavage for 35 days. Specific serum IgE against OVA on the 28<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup> days was analysed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Daily gavage of 1.0 mg OVA to 4-week female and 8-week female BN rats resulted in significantly higher concentrations of OVA sIgE on day 28 and 35 compared to the control group ( $P < 0.05$ ). On day 28, the concentration of OVA sIgE was significantly higher in 8-week male BN rats exposed to 0.1 mg OVA/day than the control group ( $P < 0.05$ ). The concentration of OVA sIgE had no significant difference among all groups of 4-week male BN rats on day 28 and 35. **Conclusion** Different doses of OVA were administered orally to BN rats with different sex and age. Females were more sensitive than males; age did not significantly influence the concentration of OVA sIgE; the better dose was 1.0 mg. Therefore, an ideal animal model of food allergenicity can be established by 1.0 mg/d OVA gavage to female BN rats for 28~35 days.

**Key words:** Food allergy; animal model; BN rat; gavage; transgenic food; food safety

转基因食品 (genetically modified food, GMF) 是

以转基因生物 (genetically modified organism, GMO) 为直接食品或为原料加工生产的食品。为了增强植物抗虫抗病能力、改善植物品质、提高植物产量, 可以利用转基因技术向植物内导入某一特定基因。而宿主植物可能由于基因重组产生新的蛋白质, 并可能对人体产生包括致敏性在内的毒效应<sup>[1]</sup>, 因此转基因食品潜在的致敏性已被世界各国所关注。

收稿日期: 2013-02-22

基金项目: 转基因重大专项 (2011ZX08011-005)

作者简介: 孙拿拿 女 实习研究员 研究方向为营养与食品卫生

E-mail: sunnana28@yahoo.com

通信作者: 贾旭东 男 研究员 研究方向为食品毒理

E-mail: jiaxudong@yahoo.com

尽管目前国内外在转基因食品致敏性评价中,尚没有广泛公认的动物模型,但使用动物模型进行研究能够提供如新表达蛋白的潜在致敏性等其他信息<sup>[2-3]</sup>,并有助于我们对食物过敏反应复杂的免疫学及病理学机制进行了解<sup>[4]</sup>。

美国 NIAID 将食物过敏定义为:由于机体暴露于某种食物而重复产生的由特异性免疫反应引起的不良健康效应<sup>[5]</sup>。这其中包括了由 IgE、非 IgE 介导的免疫反应或由二者共同介导的免疫反应<sup>[6]</sup>。大多数食物过敏是由 IgE 介导的 I 型过敏反应,即速发型过敏反应<sup>[7]</sup>。作为食物过敏反应的主要介质,致敏原特异性 IgE 几乎被国内外所有有关食物致敏性动物模型研究选为首要评价指标<sup>[8-17]</sup>。正因为 BN 大鼠是免疫球蛋白(尤其是 IgE)高应答品系,因此成为研究转基因食品致敏性评价的主要动物模型之一。经口给予鸡蛋清或牛奶而致敏的 BN 大鼠诱导产生的抗体,经免疫印迹实验证明,与对鸡蛋清或牛奶过敏的病人血清识别相似的食物致敏原<sup>[18]</sup>。

鸡蛋清中含有几种致敏原,包括卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、卵类粘蛋白(ovomucoid)、卵转铁球蛋白(ovotransferin)和溶菌酶(lysozyme)。其中 OVA 是最丰富的,约占总蛋清蛋白质的 60%<sup>[19]</sup>,因此 OVA 常被用来进行食物过敏的相关研究。本实验室已经对 BN 大鼠致敏动物模型进行了初步研究<sup>[8-10]</sup>,认为 BN 大鼠是评价食物致敏性比较理想的动物模型。但国内外食物致敏性啮齿类动物模型的研究对动物性别的选择各异<sup>[8,11-17]</sup>,周龄为 4~10 周不等<sup>[9,11-13,15-16]</sup>,致敏剂量则从 0.1~10.0 mg/d 不等<sup>[8,10,15-17]</sup>。据此,本研究在本实验室初步建立的 BN 大鼠致敏动物模型基础上,与国际上有关研究相结合,拟对 BN 大鼠经口致敏动物模型进行完善。采用经口灌胃无佐剂途径,给予 BN 大鼠造模致敏原 OVA,从动物性别、周龄及致敏原剂量三个方面进行研究,使其能够更好地应用于转基因食品的致敏性评价体系中。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物及饲养

BN 大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SPF 级,许可证号:SCXK(京)2007-0001];饲料购于中国医学科学院实验动物研究所[许可证号:SCXK(京)2006-0003];饲养于中国疾病预防控制中心营养与食品安全所动物房[许可证号:SYXK(京)2008-0017],室温 20~25℃,湿度 40%~70%。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

多功能酶标仪(美国 Biotek 公司)、卵清蛋白(OVA, grade V, Sigma 公司)、大鼠卵清蛋白特异性 IgE(OVA sIgE)酶联免疫吸附测定试剂盒(武汉中美科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及处理

根据动物的性别和周龄设计 4 个平行试验:试验 1,20 只雄性 8 周龄 BN 大鼠,随机分为高、中、低 3 个试验组和 1 个对照组,每组 5 只,每天分别经口灌胃给予 10.0、1.0、0.1 mg OVA(灌胃体积为 1 ml),对照组给予相同体积的溶剂(蒸馏水),共进行 35 d。试验 2、3 和 4,分别选用 20 只雌性 8 周龄、20 只雄性 4 周龄和 20 只雌性 4 周龄 BN 大鼠,进行相同分组及处理。

#### 1.2.2 测定指标

分别于第 28 和 35 天对各组大鼠内眦静脉取血,2 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-20℃保存待测。用大鼠卵清蛋白特异性 IgE(OVA sIgE)酶联免疫分析试剂盒检测各组 BN 大鼠血清中 OVA sIgE 浓度。

### 1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行单因素方差分析,进一步的两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同致敏原剂量比较

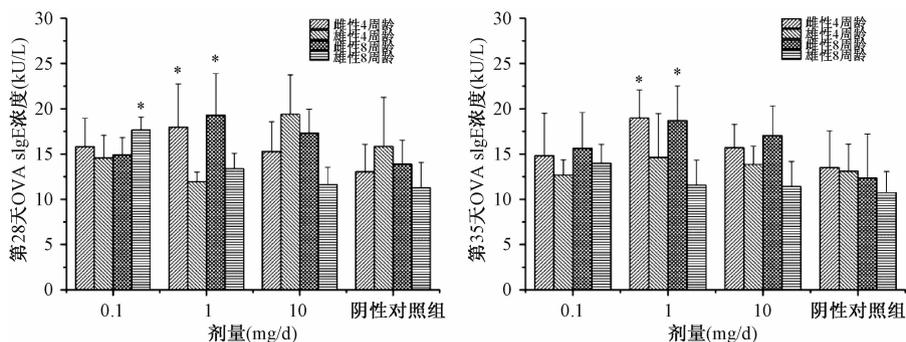
每天分别经口灌胃给予各组 BN 大鼠不同剂量的 OVA,低剂量组仅雄性 8 周龄大鼠在第 28 天血清中 OVA sIgE 浓度明显高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );中剂量组雌性 4 周龄和 8 周龄大鼠在第 28 和 35 天血清中 OVA sIgE 浓度均明显高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );高剂量组大鼠血清中 OVA sIgE 浓度较阴性对照组之间差异均无统计学意义,见图 1。因此本研究认为 1.0 mg/d 的致敏剂量较合适。

### 2.2 不同性别大鼠比较

每天分别经口灌胃给予 BN 大鼠 1 mg OVA,雌性 4 周龄和 8 周龄大鼠血清中 OVA sIgE 浓度在第 28 和 35 天均持续明显高于阴性对照组,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );雄性大鼠血清中 OVA sIgE 浓度则较阴性对照组差异无统计学意义,见图 2。因此本研究认为雌性比雄性 BN 大鼠更敏感。

### 2.3 不同周龄大鼠比较

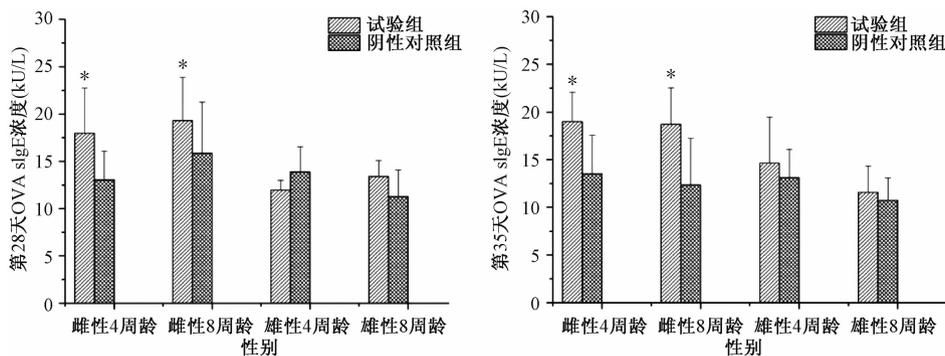
每天分别经口灌胃给予 BN 大鼠 1 mg OVA,在



\* : 与阴性对照相比,  $P < 0.05$ 。

图1 每天灌胃给予BN大鼠不同剂量OVA,第28、35天各组大鼠血清中OVA特异IgE浓度比较

Figure 1 The concentration of OVA specific IgE in BN rats dosed daily by gavage for 28 and 35 days with 0.1, 1.0 and 10.0 mg OVA



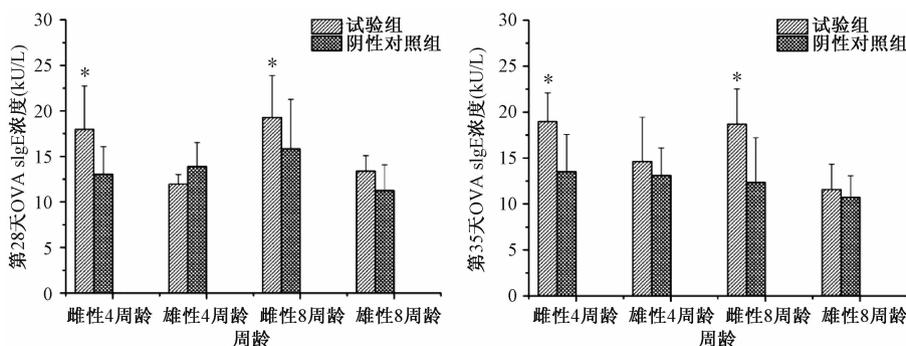
\* : 与阴性对照相比,  $P < 0.05$ 。

图2 每天灌胃给予BN大鼠1 mg OVA,第28、35天不同性别大鼠血清中OVA特异IgE浓度比较

Figure 2 The concentration of OVA specific IgE in male and female BN rats dosed daily by gavage for 28 and 35 days with 1 mg OVA

第28和35天,无论4周龄还是8周龄大鼠,雄性大鼠血清中OVA sIgE浓度较阴性对照组差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );雌性大鼠血清中OVA sIgE浓

度持续明显高于阴性对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图3。因此本研究认为周龄对致敏性无影响。



\* : 与阴性对照相比,  $P < 0.05$ 。

图3 每天给予BN大鼠1 mg OVA,第28、35天不同周龄大鼠血清中OVA特异IgE浓度比较

Figure 3 The concentration of OVA specific IgE in 4-week and 8-week BN rats dosed daily by gavage for 28 and 35 days with 1 mg OVA

### 3 讨论

理想的食物致敏性评价动物模型应符合以下标准:①能够通过口服途径致敏或激发;②激发后能够产生相应的临床症状;③能够与人类血清识别相似的IgE抗原决定簇;④能够诱导产生IgE抗体;⑤能够对已知致敏原产生选择性反应;⑥不需要佐剂;⑦实验室内及实验室之间结果可重复性

好<sup>[4]</sup>。本研究使用的BN大鼠能够很好地通过口服无佐剂途径激发致敏且选择性产生OVA特异性IgE,也有研究证明其致敏后血清能够与人类血清识别相似的IgE抗原决定簇<sup>[18]</sup>,并在激发后产生如血压下降等临床症状<sup>[9]</sup>。因此BN大鼠是较理想的转基因食品致敏性评价动物模型<sup>[8-10]</sup>。

食物过敏是一个多步过程,需要某一特定食物

抗原的重复激发,并受食物致敏原的类型和剂量以及个体年龄等因素的影响。在国内外的大多数研究中,经口灌胃给予 BN 大鼠 OVA 的剂量常采用  $1 \text{ mg/d}$ <sup>[8-9,13,16-18]</sup>。有研究通过 42 d 经口灌胃途径给予 BN 大鼠不同剂量(0.01、0.10 和 1.00  $\text{mg/d}$ )的蛋白,观察到致敏 BN 大鼠对致敏蛋白产生了特异的 IgE 反应,且高剂量( $1 \text{ mg/d}$ )蛋白激发的反应最为强烈<sup>[20]</sup>。Pilegaard 和 Madsen 经口给予不同周龄的雌性和雄性 BN 大鼠 OVA,发现雌性比雄性更易激发产生 OVA sIgE,而周龄则对致敏性无影响<sup>[21]</sup>。本研究结合以上相关研究结果,选用致敏原特异性 IgE 为评价指标,通过经口灌胃不加佐剂途径给予 BN 大鼠 OVA,对其性别、周龄以及致敏原剂量进行了完善。试验结果表明,雌性比雄性更敏感,周龄对致敏性无影响, $1.0 \text{ mg/d}$ 的致敏剂量较合适。对于致敏周期,大多数研究选择了 6 周(即 42 天)<sup>[8-10,12-13,15-16,18]</sup>。依据本试验的研究结果,每天经口灌胃给予雌性 BN 大鼠  $1.0 \text{ mg}$  致敏原 OVA,28~35 天即可建立较理想的 BN 大鼠经口致敏动物模型。

当然,在今后的试验中还需要使用其他食物蛋白对该模型进行进一步验证,并进行实验室内和实验室间的验证,从而使 BN 大鼠经口致敏动物模型能够更好地应用于转基因食品致敏性评价体系中。

## 参考文献

[1] 环境保护部. 中国转基因生物安全性研究与风险管理[M]. 北京:中国环境科学出版社,2008:103-105.

[2] European Food Safety Authority. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Panels on Genetically Modified Organisms (GMO) [J]. EFSA Journal, 2011,9(5):2150.

[3] European Food Safety Authority. Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals and on animal health and welfare aspects. EFSA Panels on Genetically Modified Organisms(GMO) and Animal Health and Welfare (AHAW) [J]. EFSA Journal,2012,10(1):2501.

[4] Dearman R J, Kimber I. Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges[J]. Clin Exp Allergy, 2009,39:458-468.

[5] Boyce J A, Assa'ad A, Burks A W, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel [J] Allergy Clin Immunol,2010,126(suppl):S1-S58.

[6] Burks A W, TANG M, Sicherer S, et al. ICON: food allergy[J]. J Allergy Clin Immunol,2012,129(4):906-920.

[7] Kumar S, Verma A K, Das M, et al. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13(4): 432-439.

[8] 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.

[9] JIA X D, LI N, WU Y N, et al. Studies on BN rat model to determine the potential allergenicity of proteins from genetically modified foods [J]. World J Gastroenterol, 2005 (11): 5381-5384.

[10] 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.

[11] Atkinson H A, Johnson I T, Gee J M, et al. Brown Norway rat model of food allergy: effect of plant components on the development of oral sensitization[J]. Food Chem Toxicol,1996, 34(1):27-32.

[12] Knippels L M, Penninks A H, Van Meeteren M, et al. Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin [J]. Food Chem Toxicol, 1999, 37(8): 881-888.

[13] 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]. Toxicol Appl Pharmacol,1999,156(3):161-169.

[14] Knippels L M, Van der Kleij H P, Koppelman S J, et al. Comparison of antibody responses to hens egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients [J]. Allergy,2000,55(3):251-258.

[15] 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.

[16] 吕相征,刘秀梅,杨晓光. BN 大鼠食物过敏动物模型的实验研究 [J]. 中国食品卫生杂志,2005,17(2):103-105.

[17] Akiyama H, Teshima R, Sakushima J, et al. Examination of oral sensitisation with ovalbumin in Brown Norway rat and three strains of mice [J]. Immunol Lett,2001,78:1-5.

[18] Knippels L M, Penninks A H. Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model [J]. Environ Health Perspect,2003,111(2):233-238.

[19] Golias J, Schwarzer M, Wallner M, et al. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy [J]. PLoS One,2012,7(5):e37156.

[20] Ladics G S, Knippels L M, Penninks A H, et al. Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops [J]. Regul Toxicol Pharmacol,2010,56(2):212-224.

[21] Pilegaard K, Madsen C. An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation [J]. Toxicology,2004,196:247-257.