

综述

花生过敏及其主要致敏原 Ara h1 的研究进展

何伟逸¹,冯玥¹,蒋聪利¹,曹际娟²,刘志刚³,黄海珍³,吴序栋³(1. 深圳大学生命科学学院,广东 深圳 518060; 2. 辽宁出入境检验检疫局,辽宁 大连 116001;
3. 深圳大学医学院,广东 深圳 518060)

摘要:花生是一种具有致敏作用的重要食品,能够引起严重的过敏反应。花生的致敏性研究是食品安全研究领域的一个重要课题。本文主要论述了近年来花生致敏现状及花生主要致敏原 Ara h1 研究进展,包括花生致敏特点、脱敏方法等方面的内容。对降低花生引起的过敏反应风险具有一定意义,同时为对花生过敏者的临床脱敏治疗提供理论依据。

关键词:过敏反应;花生;致敏原;脱敏;Ara h1;致敏原蛋白;食物致敏

中图分类号:S565.2;R593.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2013)06-0571-05

Review on peanut allergy and its main allergen Ara h1

HE Wei-yi, FENG Yue, JIANG Cong-li, CAO Ji-juan, LIU Zhi-gang, HUANG Hai-zhen, WU Xu-li
(College of Life Science of Shenzhen University, Guangdong Shenzhen 518060, China)

Abstract: Peanut is an important food allergen which can cause sever allergic reactions. Peanut allergy research is an important topic in the field of food safety study. This paper mainly reviews the current status of peanut allergy and the recent advances of the main allergen Ara h1, including the characteristics of peanut allergy and the desensitization methods, etc. It would help to reduce the risk of peanut allergic reaction and provide a theoretical basis for clinical desensitization therapy in peanut allergy sufferers.

Key words: Allergic reactions; peanut; allergen; desensitization; Ara h1; allergic protein; food sensitization

花生是人们日常生活中食用广泛,味道鲜美且营养丰富的食品,但花生蛋白却是一种重要的食物致敏原。研究表明,对食物过敏人群中约有30%的人对花生过敏^[1]。对花生的过敏反应因其潜在的危险性、长期性以及发病率不断增加而日益受到重视^[2]。

迄今为止,花生引起的过敏反应尚无特效疗法,避免食用含有花生的食品是对花生过敏者的最佳选择。然而含有花生的食物制品广泛存在于日常饮食中,完全避免花生成分的摄入非常困难。由于对花生过敏者人数众多,严重影响了很多人的生活质量与身心健康,因此深入研究花生的致敏蛋白,探讨花生致敏的机理,开发脱敏花生制品,保护对花生过敏者的消费安全有重要的意义。

1 花生过敏概括

花生引起的过敏反应在世界各地都有所报道,在英国0.5%的人对花生产生过敏反应,法国对儿童的调查显示,8%的儿童对花生的皮试试验呈现阳性^[3]。美国的研究表明,0.6%的美国人花生过敏^[4]。花生过敏反应属于速发型过敏反应,最常涉及的靶器官是胃肠道,其他主要过敏靶器官包括皮肤和呼吸系统^[2]。对花生的过敏反应主要表现为咽喉水肿、腹痛、腹泻、荨麻疹、哮喘、过敏性皮炎、过敏性休克,严重者危及生命^[5]。

2 花生致敏机理

花生致敏同其他食物致敏一样属于即时性致敏,通常也叫I型变态反应,是机体对致敏原物质产生的一种变态反应^[6]。当致敏原或抗原与过敏机体首次接触后,使T细胞和B细胞激活,进而使得效应B细胞分泌特异性IgE抗体。IgE抗体与肥大细胞表面的FC ϵ RI受体结合,这一阶段称为致敏的诱导阶段。当致敏原再次进入机体后与肥大细胞表面的IgE结合使肥大细胞脱颗粒启动病理过程,这一阶段称为效应阶段,使细胞释放出血管活性物

收稿日期:2013-04-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31101280);广东省自然科学基金(S2012010008514);深圳市重点实验室项目(SW201110010)

作者简介:何伟逸 男 硕士生 研究方向为食物致敏

E-mail:hewei55@163.com

通讯作者:吴序栋 男 副教授 研究方向为食物致敏及食品安全

E-mail:wxl@szu.edu.cn

刘志刚 男 教授 研究方向为过敏性疾病

E-mail:lzg@szu.edu.cn

质如 5-羟色胺、组胺等,引发一系列的过敏症状^[7]。

3 花生主要致敏原及其特征

花生引起过敏反应的蛋白有 11 种,主要为糖蛋白,具有热稳定性强、耐酸、耐酶解的特性。其中 Ara h1、Ara h2、Ara h3/4、Ara h 6 为主要致敏原,可被 90% 的对花生过敏者的血清所识别^[8-9]。

Ara h2 是一种糖蛋白,属于种子贮藏蛋白,占花生蛋白总量的 5.9% ~ 9.3%^[10]。通过光谱分析表明,Ara h2 有两种异构体 Ara h2.01 和 Ara h2.02,它们的分子量分别为 16.67 和 18.05 kD。二者的不同之处在于 Ara h2.01 比 Ara h2.02 多了 1 个抗原表位,所以 Ara h 2.01 的致敏性会更强^[11]。

Ara h3 属于 cupin 家族的蛋白,它是由全长 1 530 bp 的 cDNA 编码的蛋白分子,相对分子质量为 57 kD,它与大豆的 11S 贮藏蛋白具有比较高的相似性,可被 45% 的对花生过敏者特异性 IgE 所识别^[12]。天然状态下,Ara h3 以三聚体形式存在,Ara h3 的单体有两个结构域,分别是氨基端结构域和羧基端结构域,两个结构域将两个 cupin 折叠包裹在其中,而 cupin 折叠结构由 β 折叠、无规则卷曲和 α 螺旋组成^[13]。Ara h4 是分子量为 37 kD 的种子贮藏蛋白,属于 cupin 家族,由于其与 Ara h3 氨基酸序列同源性达到 91.3%,所以一般将两种致敏原归为一种蛋白,称为 Ara h 3/4^[14]。

Ara h6 是花生主要致敏原之一,其相对分子质量约为 15 kD,等电点为 pI 5.2,其氨基酸序列有 59% 与 Ara h2 具有同源性^[15]。Ara h6 约占花生总蛋白的 4.5%^[16]。

在花生的所有致敏原中,Ara h1 是花生中含量最高的一种致敏原蛋白,下文简要综述花生主要致敏原 Ara h1 研究的进展。

4 花生主要致敏原 Ara h1 的研究现状

Ara h1 是花生的主要致敏原之一,能与 90% 的对花生过敏者的血清 IgE 结合,因此 Ara h1 的研究成为花生致敏原研究的一个热点。李宏等^[17]根据 Ara h1 的基因序列设计引物,然后提取总 RNA,通过 RT-PCR 大量合成扩增 Ara h1 的 cDNA。随后将基因重组克隆到原核表达载体 pRSET-B 上,经过诱导表达,成功表达出了 Ara h1 蛋白,酶联免疫印迹试验表明其有免疫反应性。Ara h1 在大肠杆菌中克隆表达的成功,提示研究者可以通过定点突变来获得低致敏性的 Ara h1。

Ara h1 在花生蛋白中所占的比重较大,因此在食品中对花生致敏原 Ara h1 的鉴定至关重要。陈

家杰等^[18]采用套式 PCR 和荧光实时定量 PCR 两种方法检测食品中花生主要致敏原 Ara h1 基因成分,从而推断食品中是否含有花生致敏成分 Ara h1,利用这两种方法检测了来自美国、中国、日本 3 个国家的饼干、方便面等 8 种食品,检测结果均与致敏原标注内容相符。这两种方法具有灵敏度高,快速高效的特点,能够快速准确地检测出食品中的花生致敏原 Ara h1,对防止消费者误食含有花生致敏原的食品导致严重的过敏反应具有重要意义。

Ara h1 作为花生的主要致敏原之一,对其结构与抗原决定簇的研究是研究其致敏机理的关键。Ara h1 是分子量为 63.5 kD 的糖蛋白,等电点为 pI 4.55,在天然状态下可能以较大的蛋白形式(150 ~ 200 kD)存在^[19]。通过对 Ara h1 蛋白空间结构的研究表明,其在二级结构水平上具有清晰的二级折叠,其中 31% 是 α 螺旋,36% 是 β 折叠,33% 是无规则卷曲;四级结构水平上是含有 3 个单体的复合物^[20]。Shin 等^[21]的研究表明,Ara h1 有 23 个 IgE 线性结合表位,表位中单个氨基酸的替换会导致 IgE 结合能力的增强或者减弱,其中表位中亲水性氨基酸残基对 IgE 的结合强弱具有重要影响。丛艳君等^[22]以对花生过敏者的血清为抗体,采用了固相合成肽技术合成 Ara h1 的 23 条多肽来鉴别和定位 Ara h1 的抗原决定簇,发现 Ara h1 氨基酸序列的第 21 ~ 34、89 ~ 98、393 ~ 403、498 ~ 507 和 594 ~ 605 位的识别率达到 60% 以上,从而推断其为 Ara h1 的主要抗原决定簇。此外,他们还发现用丙氨酸取代一些肽段的氨基酸会导致致敏性的增强或者减弱,第 498 位精氨酸被丙氨酸取代后其肽段致敏性增强,而第 505 位赖氨酸被丙氨酸取代后,其肽段的致敏性有一定程度的降低,表明该肽段第 498 位的精氨酸与第 505 位的赖氨酸是决定其致敏性的关键氨基酸。

深入研究花生致敏原,必须获得高纯度的花生致敏原蛋白,Ara h1 是花生致敏原中含量最高的一种蛋白,对 Ara h1 分离纯化的研究国内外都有所报道。Burks 等^[23]首先对花生进行脱脂处理,用 PBS 缓冲液浸提花生总蛋白,然后将花生总蛋白经过阴离子交换层析柱进行分离纯化,以 0 ~ 1.5 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,收集各个洗脱峰并做 SDS-PAGE 电泳分析和免疫印迹鉴定,最终得到所需纯度的 Ara h1。吴序栋等^[24]采用硫酸铵沉淀结合分子筛的方法纯化出了 Ara h1。首先对花生进行丙酮去脂处理,用 PBS 浸提花生总蛋白,然后采用硫酸分级沉淀花生蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳分析,硫酸铵饱和度达到 100% 时所含 Ara h1 最多。然后用 100% 硫酸铵沉淀出来的花生蛋白依次经过 Speredex200 和 Speredex75 凝胶过

滤层析柱,经 SDS-PAGE 电泳分析和免疫印迹鉴定,最终获得高纯度的 Ara h1 蛋白,并成功应用于 Ara h1 结构分析与低致敏处理的研究上。

5 花生的脱敏方法

在美洲与欧洲等发达国家 70% ~ 80% 的花生被直接食用,调查显示美国、日本有大概 94% 的家庭食用花生酱。中国是世界上最大的花生生产、消费、出口国,最近我国已经把花生列为重点开发的植物蛋白之一。随着花生食品被越来越广泛食用,对花生过敏的可能性也随之增加^[25]。为了减少花生致敏原给人们带来的安全风险,对花生致敏原进行脱敏处理是关键。根据国内外的研究报道,主要从以下几个方面对花生进行脱敏处理。

5.1 加热处理

花生致敏原的成分是蛋白质,由于致敏原有线性表位和空间表位,通过加热处理可以改变蛋白质的空间构象,一定程度地改变花生蛋白的致敏性。Mondoulet 等^[26]研究发现,加热会引起花生致敏蛋白与对花生过敏者血清中 IgE 结合能力的变化,即通过不同的加热方法能降低其致敏性或去除致敏性。他们对花生进行烘烤与水煮处理,并与未处理花生蛋白进行比较,结果表明水煮热处理花生的致敏性相对未处理花生明显降低,其原因是一些致敏原如 Ara h1 进入了水中。然而烘烤热处理花生蛋白的致敏性没有明显改变甚至有所增强。Koshiyama 等^[27]进一步研究表明,烘烤过花生致敏性比生花生更强,原因是蛋白与还原糖之间发生了美拉德反应,形成结构多样的复杂物质导致与 IgE 结合能力增强。烘烤花生加大了对花生过敏者过敏的风险,因此对花生过敏者更应避免烘烤花生的摄入。尽管烘焙加热可增强花生的致敏性,但 Beyer 等^[28]却发现对花生煎炸可以降低花生致敏性,原因是花生主要致敏原之一的 Ara h1 三聚体和单体明显减少,而 Ara h1 占花生蛋白总量的 12% ~ 16%^[29],所以花生的致敏性也随之降低。不同的花生加热处理方法虽能一定程度地改变其致敏性,但加热过程会发生复杂的生化反应,不同的加热方法,其致敏性的变化也不同,同时会有营养成分减少、口感变差、产生新的致敏原等弊端,因此仅靠加热来达到花生的脱敏有一定的局限性。

5.2 高压处理

对食物制品采取高压处理,是较常用的一种食物处理方法。高压处理是利用 100 MPa 以上的压力,在常温或较低温度下,使食品中的蛋白质等生物大分子的构像发生改变,同时能杀灭细菌,达到

灭菌的效果,但是食品的营养价值和风味却不会改变或者改变很小^[30]。因此高压处理技术可能为开发低致敏性花生制品开辟一种新的方法。Beatriz 等^[31]从花生中提取致敏原蛋白,进行时间长短不同的加压处理后,用免疫印迹法和酶联免疫吸附法鉴定其致敏性的变化。结果表明,压力越大、加压时间越长,致敏原蛋白与对花生过敏者血清 IgE 的结合能力越弱,其致敏性也越低。测量花生致敏蛋白处理前后的 CD 光谱,观察其结构的变化,发现 α 螺旋随压力与时间的增大是减少的; β 折叠在 1.18 个大气压下,处理时间越长所占比例越大,压力增加到 2.56 个大气压时, β 折叠反而减少,时间延长变化不大;无规则卷曲的蛋白结构随时间、压力的增大而增大。

5.3 酶解处理

酶解处理法是改变蛋白质结构的常用方法。花生中的致敏成分是蛋白质,在蛋白酶存在的合适条件下,其可以改变蛋白质的构象或者使蛋白质的氨基酸链断裂产生小分子肽段,从而改变致敏原原有的空间表位或者线性表位,导致其致敏性降低。丛艳君等^[32]利用碱性蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶对烘烤花生致敏原蛋白进行酶解反应,发现胃蛋白酶与木瓜蛋白酶的酶解效果没有碱性蛋白酶好,碱性蛋白酶降低花生蛋白致敏性的最佳条件是:温度 55 °C, pH 8.0,底物浓度 3%,加酶量 3 000 U/g 蛋白质,水解 6 h。Jianmei 等^[33]从花生总蛋白中提取主要致敏原 Ara h1 和 Ara h2,然后用糜蛋白酶和胰蛋白酶进行水解,发现两种酶均能有效地降低 Ara h1 和 Ara h2 的致敏性。此外,发现在降低致敏性的同时其溶解度也有所增加。但其局限性是在体外进行试验,体内试验能否降低致敏性还有待进一步研究。

5.4 基因重组

基因工程是生物学研究中的热点课题,通过基因工程改变花生主要致敏原的基因序列,进而改变花生致敏原的氨基酸序列,使得花生致敏原的线性表位与空间表位改变,从根本上改变或去除其抗原表位,从而降低花生致敏原的致敏性。目前已经对花生多种主要致敏原的 cDNA 进行了测序,国内外已经有研究者通过改变花生主要致敏原的基因序列,将突变的致敏原基因重组到表达菌中,然后表达出致敏性比较低的致敏原蛋白。胡纯秋等^[34]利用基因工程的方法成功克隆表达出花生主要致敏原 Ara h2,并且能与对花生过敏者血清中的 IgE 结合,证明了其有高致敏性。易海涛等^[35]对 Ara h2 进行定点突变,并将定点突变合成的基因连接到原核表达载体 pET-32a(+)上,然后

将重组载体转入 BL2 (DE3) 宿主表达菌中诱导表达,成功表达出了定点突变的 Ara h2 蛋白,通过 Western-blotting 和 ELISA 分析,结果表明,经点突变制备的 Ara h2 有很好的构像,能与花生过敏者血清中的 IgE 结合,但致敏性与未突变的 Ara h2 相比明显降低。

6 结语

食物致敏对人们的生活质量和健康造成了严重影响,食物致敏研究已经成为全球食品安全领域的一个重要课题。对花生过敏的人数众多,主要原因是花生致敏原种类繁多,结构复杂。现在研究人员对花生的各种致敏原的结构和抗原表位已经有了比较深入的了解,目前花生致敏原的脱敏研究也取得了很大进展,主要从物理、化学和生物学三大方面对花生致敏原进行低致敏处理。从研究趋势上看,采用生物学的方法将越来越受到重视。花生致敏问题既是食品安全问题也是医疗卫生问题,因此花生致敏问题需要食品研究者和医学研究者的共同协作才能更好地得到解决。

参考文献

- [1] Nowak-wegrzyn A, Sampson H A. Future therapies for food allergies[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011, 127(3):558-573.
- [2] 李宏,张宏誉.花生致敏原致敏组分分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2001,21(21):12-15.
- [3] Rabjohn P, Helm E M, Stanley J S. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut Ara h3 [J]. The Journal of Clinical Investigation, 1999, 103(4):535-542.
- [4] Viquez O M, Konan K N, Dodo H W. Genomic organization of peanut allergen Ara h3[J]. Molecular Immunology, 2004, 41:1235-1240.
- [5] 刘颖慧.食物过敏的诊治及研究进展[J].中国临床医生, 2003, 31(9):14-16.
- [6] Lehmann K, Schweimer K, Reese G, et al. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions[J]. Biochem, 2006, 395(3):463-472.
- [7] 何韶衡, 刘志刚. 基础过敏反应学[M]. 北京: 科学出版社, 2009:8-13.
- [8] 隗啸南, 高金燕, 李欣, 等. 花生致敏原蛋白分离纯化方法研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(12):371-375.
- [9] Chun-Wook P, Gyeong K, Cheol L. A comparison study on allergen components between Korean and American peanut [J]. Korean Med Sci, 2000, 15:387-392.
- [10] Chatel J M, Bernard H, Orson F M. Isolation and characterization of two complete Ara h2. 02 isoforms cDNA [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2003, 131(1):14-18.
- [11] Koppelmans J, Knol E F, Vlooswijk R A, et al. Peanut allergen Ara h3: isolation from peanuts and biochemical characterization [J]. Allergy, 2003, 58(11):1144-1151.
- [12] Roug A P, Culerriera R, Sabatiera V, et al. Mapping and conformational analysis of IgE-binding epitopic regions on the molecular surface of the major Ara h3 legum in allergen of peanut [J]. Mol Immunol, 2009, 46(6):1067-1075.
- [13] Wen H W, Wysocki W B, Decory T R. Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2007, 6(2):47-58.
- [14] Kleber-Janke T, Cramer R, Appenzeller U, et al. Selective cloning of peanut allergens including profilin and 2S albumins by phage display technology [J]. Allergy Immunology, 1999, 119(4):265-274.
- [15] Vanwijk F, Nierkens S, Hassing I, et al. The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens [J]. Toxicological Sciences, 2005, 86(2):333-341.
- [16] Poms R E, Kleinc L, Anklam E A. Methods for allergen analysis in food: areview [J]. Food Addit Contam, 2004, 21(1):1-31.
- [17] 李宏, 张宏誉, 胡鸾雷, 等. 花生过敏原 Ara h1 的基因克隆与原核表达 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(4):7-11.
- [18] 陈家杰, 王海燕, 刘志刚, 等. 两种 PCR 方法检测食品中花生致敏原 Ara h1 成分 [J]. 食品研究与开发, 2011, 9(32):69-74.
- [19] Burks A W. Identification of peanut allergen Ara h1 in patients with a topic dermatitis and positive peanut challenges [J]. Allergy Clin Immunol, 1991, 88:72-177.
- [20] Bruks A W, Wesley A, Helm R M, et al. Major peanut allergen Ara h1 [J]. Biotechnology Advances, 1997, 15(2):445.
- [21] Shin D, Compadre C M, Maleki S J. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h1, an abundant highly allergenic peanut protein [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(22):13753-13759.
- [22] 丛艳君, 宋焕禄, 薛文通, 等. 花生致敏原 Ara h1 免疫显性抗原决定簇的鉴别 [J]. 中国食品学报, 2010, 5(10):223-230.
- [23] Burks A W, Williams L W, Helm R M, et al. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges [J]. Allergy Clin Immunol, 1991, 88(2):172-179.
- [24] 吴序栋, 肖杰, 刘志刚, 等. 花生主要致敏原 Ara h1 的纯化 [J]. 食品科学, 2011. 5(32):12-15.
- [25] Annick B, Jean P B, Pierre R. Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h1 and other homotrimeric allergens of the cup in superfamily: a structural basis for their IgE2 binding cross reactivity [J]. Biochimie, 2005(87):499-506.
- [26] Mondoulet L, Paty E. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins [J]. Agric Food Chem, 2005, 53:4547-4553.
- [27] Maleki S J, CHUNG S Y, Champagne E T, et al. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut protein [J]. Allergy Clin Immunol, 2000, 106(4):763-768.
- [28] Beyer K, Morrow E, Li X M, et al. Effect of cooking methods on peanuts allergenicity [J]. Allergy Clin Immunol, 2001, 107:1077-1081.
- [29] Chun-wook P, Cheol L A. Comparison study on allergen components between Korean (*Arachis faspigiata* Shinpung) and American peanut (*Arachis hypogaea* Runner) [J]. Korean Med Sci, 2000, 15:387-392.
- [30] Mozhaev V, Heremans K, Frank J, et al. Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications [J]. Trends in Biotechnology, 1994, 12(12):493-501.
- [31] Beatriz C, Soheila J, Julia R, et al. Heat and pressure treatments