

## 论著

## BN 大鼠致敏动物模型研究

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

(1. 湖北省疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430079; 2. 武汉大学, 湖北 武汉 430072;

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与  
食品安全所, 北京 100021)

**摘要:**目的 验证 BN 大鼠作为评价转基因食物蛋白致敏性动物模型的可行性。方法 48 只雌性 BN 大鼠随机分为对照组(灭菌水)、马铃薯酸性磷酸酶组(PAP)、鸡蛋清粗提蛋白质组(HEWP)、卵清蛋白低剂量组(OVA-L)、卵清蛋白中剂量组(OVA-M)、卵清蛋白高剂量组(OVA-H), 每组 8 只。各组依次分别每天经口灌胃 1 ml 灭菌水、1 mg/ml PAP、10 mg/ml HEWP、0.1 mg/ml OVA、1 mg/ml OVA、10 mg/ml OVA 溶液, 持续 6 周。分别于第 14、28 和 42 天取血分离血清, 测定特异性抗体 IgG 和血清总 IgE。于第 21 和 35 天取血分离血浆, 测定组胺。测定各组动物的血压变化及胃肠道渗透性。结果 不同浓度致敏原 OVA 均可激发 BN 大鼠过敏反应, 包括特异性 IgG 和血清总 IgE 升高、组胺升高以及血压下降, 其中 1 mg/ml OVA 溶液为致敏最佳剂量。弱致敏原 HEWP 过敏反应较弱; 非致敏原 PAP 无过敏反应; 各组胃肠功能均未发生明显的生理变化。结论 BN 大鼠致敏动物模型是评价转基因食物致敏性较为理想的动物模型。

**关键词:** BN 大鼠; 动物; 模型; 致敏原; 毒理实验

中图分类号: R155; R392; Q95-3; 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)01-0014-04

## Study on allergenicity model of BN rat

CHEN Ru-cheng, LI Na, FAN Bo-lin, TANG Xiao-qiao, LI Shi-yue, LIU Jia-fa,  
JIA Xu-dong, YANG Xiao-guang

(Hubei provincial Center for Disease Control and Prevention, Hubei Wuhan 430079, China)

**Abstract: Objective** To confirm the feasibility of BN rats as the protein allergy animal model. **Methods** 48 female BN rats were randomly divided into 6 groups, control group, PAP group, HEWP group, OVA-low group, OVA-middle group, OVA-high group, 8 rats in each group. The above groups were administrated 1 ml sterilized water, 1 mg/ml PAP, 10 mg/ml HEWP, 0.1 mg/ml OVA, 1 mg/ml OVA or 10 mg/ml OVA solution, respectively daily for 6 weeks by gavage. Blood samples were taken on the 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> and 42<sup>nd</sup> days from the orbital plexus, and centrifuged to obtain serum for analyzing specific IgG and total IgE. On the 21<sup>st</sup> and 35<sup>th</sup> days, blood samples were taken to obtain plasma for analyzing histamine. In addition, the changes of blood pressure and gut permeability were determined. **Results** Different concentrations of allergen OVA could stimulate allergic reaction in BN rats, including elevated specific IgG and total serum IgE, elevated histamine level, decreased blood pressure, where 1 mg/ml OVA was the optimal sensitizing dose. The allergic reactions to Weak allergens (HEWP) was weak, allergic reactions to non allergen (PAP) was negative. Gastrointestinal function had no obvious physiological changes for all groups. **Conclusion** BN rat could be a suitable animal model for evaluation of food protein allergy.

**Key words:** BN rats; animal; model; allergenicity; toxicological experiment

随着转基因食品的不断发展和生产,其安全性问题,特别是潜在致敏性问题越来越受到公众的关

注。2001 年 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, 成为目前国内外应用最为常用的致敏动物模型<sup>[2-3]</sup>, 也是较为理想的致敏模型动物。本研究以经口灌胃 BN 大鼠非致敏原 PAP、弱致原 HEWP 以及不同浓

收稿日期: 2013-09-23

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  
(2011ZX08011-005)

作者简介: 陈如程 男 博士生 研究方向为传染病流行病学

E-mail: cruc686@163.com

通讯作者: 刘家发 男 主任医师 研究方向为公共卫生与预防医学

E-mail: jflionm@sohu.com

度的强致敏原 OVA,观察其免疫反应状况,验证 BN 大鼠作为致敏动物模型的可行性,为转基因食品致敏评价体系标准的建立提供依据,从而更好地应用于转基因蛋白过敏性的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

棕色挪威大鼠(BN 大鼠),雌性,4~6 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。在 SPF 环境中饲养,温度(23±3)℃,湿度 50%~70%,饲料中不含受试蛋白质。

#### 1.1.2 仪器与试剂

$\beta$ -乳球蛋白、卵清蛋白(OVA)、马铃薯酸性磷酸酶(PAP)、辣根过氧化物酶标记兔抗大鼠 IgG 抗体(均购自 Sigma 公司),大鼠血清总 IgE 试剂盒、血清  $\beta$ -乳球蛋白试剂盒、血浆组胺试剂盒(均购自 Elab 公司),BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(碧云天有限公司),鼠仪-智能无创血压计(BP-98A,北京软隆生物技术有限公司)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 鸡蛋清粗提蛋白的制备<sup>[4]</sup>

无菌取鸡蛋清,称取 30 g,再加 270 ml 灭菌水,4℃ 搅拌一夜,4℃ 2 500 r/min 离心 10 min( $r=10$  cm),取上清,4℃ 17 000 r/min 离心 15 min,上清用 0.2  $\mu$ m 滤膜过滤,取滤液,BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白浓度为 18.6 mg/ml,配置 10 mg/ml 的鸡蛋清粗提取蛋白。

#### 1.2.2 动物分组与处理

48 只 BN 大鼠,随机分为 6 组,分别为对照组(灭菌水)、马铃薯酸性磷酸酶组(PAP)、鸡蛋清粗提蛋白质组(HEWP)、卵清蛋白低剂量组(OVA-L)、卵清蛋白中剂量组(OVA-M)、卵清蛋白高剂量组(OVA-H),每组 8 只。各组依次分别每天经口灌胃灭菌水、1 mg/ml 的 PAP 溶液、10 mg/ml 的 HEWP 溶液、0.1 mg/ml 的 OVA 溶液、1 mg/ml 的 OVA 溶液、10 mg/ml 的 OVA 溶液 1 ml/只,持续 6 周。各组大鼠分别于第 2、4 和 6 周内眦静脉取血,4℃ 2 000 r/min 离心 10 min( $r=6.5$  cm),分离血清,用于特异抗体 IgG、总 IgE 测定。于第 3 和 5 周内眦静脉取血,加入肝素钠,2 000 r/min 离心 10 min( $r=6.5$  cm),分离血浆,用于组胺测定。

#### 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 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 nm 酶标仪比色。

#### 1.2.4 血清总 IgE 抗体测定

采用大鼠血清总 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。计算 P/N 值<sup>[5]</sup>。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>。

#### 1.2.5 组胺(His)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 血压测定

每组随机选取 4 只大鼠进行血压测定。试验结束后恢复 7 d,禁食 24 h 后,各组依次分别灌胃灭菌水、5 mg/ml PAP 溶液、50 mg/ml HEWP 溶液、0.5 mg/ml OVA 溶液、5 mg/ml OVA 溶液、50 mg/ml OVA 溶液 2 ml,灌胃后 0、1、3、5、7 h 用鼠仪-智能无创血压计测量大鼠血压,观察血压变化。

#### 1.2.7 胃肠道渗透性测定

每组取 4 只大鼠进行胃肠道渗透性测定。试验结束后,各组大鼠经口灌胃给予 2 ml 50 mg/ml OVA。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 后内眦静脉取血,离心分离血清,用  $\beta$ -乳球蛋白试剂盒测定。

### 1.3 统计 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 血清特异性蛋白 IgG 测定结果

不同时期各组血清特异性蛋白 IgG 的 P/N 值分布见表 1。各组特异性蛋白 IgG 的浓度随着致敏时间延长,IgG 浓度逐步升高。PAP 组 3 次血清均呈阴性;HEWP 组第 6 周中有 42.86% (3/7) 血清呈阳,其余时间均呈阴性;第 2、4、6 周 OVA-L 组的阳性率分别为 42.86% (3/7),75.00% (6/8),100%

(7/7); OVA-M 组阳性率分别为 62.5% (5/8), 62.5% (5/8), 100% (7/7); OVA-H 组阳性率分别为 87.50% (7/8), 100% (8/8), 100% (8/8)。

表 1 不同时间各组血清特异性蛋白 IgG 的 P/N 值分布( $\bar{x} \pm s$ )

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

组别	P/N 值			t 值	P 值
	第 2 周	第 4 周	第 6 周		
PAP 组	0.88 ± 0.281	1.01 ± 0.124	1.37 ± 0.227	10.617	0.001
HEWP 组 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.297	1.16 ± 0.192	1.97 ± 0.436	17.483	0.000
OVA-L 组 <sup>a</sup>	1.75 ± 1.018	2.26 ± 0.840	4.19 ± 0.667	15.841	0.000
OVA-M 组 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.907	2.35 ± 0.724	4.12 ± 0.345	18.104	0.000
OVA-H 组	3.14 ± 1.113	3.27 ± 0.279	4.97 ± 0.356	17.286	0.000

注: P/N 值为各组相对 OD 值(样品 OD 值 - 空白 OD 值)与对照组相对 OD 值的比值, P/N 值 > 2 为阳性; a 表示样品缺失, 各组样品数可能 < 8

### 2.2 血清蛋白总 IgE 测定

不同时间各组血清总 IgE 的 P/N 值分布见表 2。PAP 组、HEWP 组第 4 和 6 周的血样 IgE 浓度比较差异无统计学意义, OVA-L、OVA-M、OVA-H 组第 4 和 6 周的血样 IgE 浓度差异有统计学意义, 第 6 周血清总 IgE 浓度要远远高于第 4 周的血样。第 4 周除 HEWP 组、OVA-L 组、OVA-M 组中各有 1 只大鼠呈阳性, 其余血清总 IgE 均呈阴性; 第 6 周 HEWP 组、OVA-L 组、OVA-M 组、OVA-H 组血清总 IgE 分别有 50%、75%、100%、75% 呈阳性, 其中第 OVA-M 组 IgE 抗体水平最高。

表 2 不同时间各组血清总 IgE 的 P/N 值分布( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The distribution of P/N value of total IgE in serum of groups at different time

组别	P/N 值		t 值	P 值
	第 4 周	第 6 周		
PAP 组	1.45 ± 1.740	1.12 ± 0.603	0.355	0.734
HEWP 组	1.11 ± 0.985	2.40 ± 1.481	0.158	0.880
OVA-L 组	0.88 ± 0.929	2.71 ± 1.078	8.853	0.000
OVA-M 组	0.65 ± 0.830	7.02 ± 1.728	9.411	0.000
OVA-H 组	0.05 ± 0.342	3.82 ± 1.855	3.964	0.001

注: P/N 值为各组相对 OD 值(样品 OD 值 - 空白 OD 值)与对照组相对 OD 值的比值, P/N 值 > 2 为阳性

### 2.3 组胺浓度

由表 3 可知, 对照组、PAP 组、OVA-H 组第 3 和 5 周的血样组胺浓度比较差异无统计学意义, OVA-L、OVA-M 组第 3 和 5 周的血样组胺浓度差异有统计学意义, 第 3 周血样组胺浓度高于第 5 周的浓度值。第 3 周 OVA-L、OVA-M、OVA-H 组血浆浓度高于对照组; 第 5 周 OVA-M、OVA-H 组血浆组胺浓度高于对照组。

### 2.4 血压变化状况

由图 1 血压监测结果显示, 对照组、PAP 组、HEWP 组、OVA-L 组血压无明显变化, OVA-M 组有 1 只大鼠激发 1 h 后出现血压下降, 在之后的 6 h 内血压又慢慢

表 3 不同时间各组血清组胺浓度( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The concentration of histamine of groups at different time

组别	浓度/(ng/ml)		t 值	P 值
	第 3 周	第 5 周		
对照组	27.61 ± 22.074	80.33 ± 67.293	0.165	0.874
PAP 组	132.09 ± 35.950	99.03 ± 70.719	0.909	0.398
HEWP	117.60 ± 22.123	—	—	—
OVA-L	144.50 ± 37.633	84.67 ± 57.339	2.421	0.031
OVA-M	211.62 ± 51.189	125.06 ± 58.100	3.069	0.009
OVA-H	210.00 ± 52.000	168.00 ± 11.341	0.934	0.367

注: — 表示数据缺失

上升; OVA-H 组有 1 只大鼠激发 1 h 后血压逐渐下降, 在激发后 5 h 时下降到最低点, 7 h 时血压略有上升。

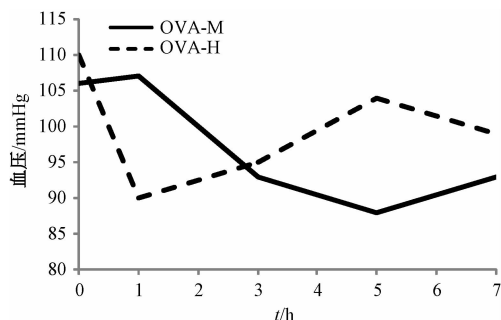


图 1 大鼠血压变化状况

Figure 1 The changes of blood pressure of rat

### 2.5 胃肠渗透性测定

对照组、PAP 组、HEWP、OVA-L、OVA-M、OVA-H 组 ELISA 检测的析光度值均小于空白析光度值, 各组大鼠不同时间段血清中均未测得  $\beta$ -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、IgG 抗体, 具有较强的致敏免疫反应<sup>[6]</sup>。本研究采用经口致敏的方式给予 HEWP 溶液、PAP 溶液及不同浓度的 OVA 溶液研究致敏动物模型, 以特异性 IgG 抗体、血清总 IgE 抗体、组胺、血压及胃肠渗透性为指标, 验证 BN 大鼠致敏模型的可行性。

动物体内的特异性 IgG、总 IgE 水平与其致敏敏感性相关<sup>[7]</sup>。本研究结果显示, 对于非致敏原 PAP, IgG 均呈阴性, 对于弱致敏原 HEWP, 只有第 6 周部分 BN 大鼠 IgG 呈阳性, 而对于强致敏原 OVA, 第 2、4、6 周的特异性 IgG 阳性率均较高。有研究表明, 血清总 IgE 指标是 I 型超敏反应检测体系一项重要指标<sup>[8]</sup>。血清总 IgE 检测结果与特异性 IgG 相似, PAP 组均呈阴性, 1 mg/ml 的 OVA 溶液所产生的 IgE 抗体水平最为强烈, 与贾旭东<sup>[9]</sup>的研究结果一致, 说明 1 mg/ml 的 OVA 溶液是致敏动物模型的最佳致敏剂量。致敏动物发生 I 型超敏反应时, 体内过组胺会大量释放, 导致

血浆组胺浓度升高,继而引发血压升高<sup>[8]</sup>。本研究结果表明,第3周 OVA-L、OVA-M、OVA-H 组血清组胺浓度要高于对照组,与以往研究结果相似<sup>[10]</sup>。第5周 OVA-L、OVA-M 组体内的组胺浓度下降,这可能是因为这两个剂量长时间暴露后产生耐受,从而导致组胺浓度下降。有研究表明血压可以作为致敏评价模型的指标<sup>[11]</sup>。本研究 OVA-M、OVA-H 组各有1只大鼠血压下降,其他大鼠血压下降不明显,说明血压测定灵敏度不高,血压无下降并不能说明没有产生致敏反应,作为致敏评价模型成立指标时易出现假阴性结果。

I 型过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>。本研究通过对 BN 大鼠经口致敏,各组大鼠血清中均未检测到  $\beta$ -乳球蛋白,结果与中国疾病预防控制中心营养与食品安全所研究结果相似,这可能由于经口致敏免疫反应强度不够,且易产生耐受性,所以并未引起胃肠渗透性的生理变化。

本研究结果表明,BN 大鼠暴露于致敏原后会产生相应强度的过敏反应,暴露于无致敏食物后应不产生过敏反应,符合致敏评价动物模型的要求<sup>[10]</sup>。因此 BN 大鼠致敏动物模型是评价食物致敏性较为理想的动物模型。然而 BN 大鼠亲代暴露于某种蛋白是否会对其后代大鼠作为致敏动物模型来评价这种蛋白时产生影响,目前尚不清楚,还需要对其进行进一步研究。

## 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,2007,41:91-98.
- [3] Akiyama H, Teshima R, Sakushima J, et al. Examination of oral sensitization with Ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice[J]. ImmunolLett,2001,78:1-5.
- [4] 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.
- [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 J, penninks A H, Spanhaak S, et al. Oral sensitization to food proteins: a brown Norway rat model[J]. Clin Exp Allergy,1998,28:368-375.
- [7] 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 Agspecific IgE[J]. J Immunol Methods,2004,286(1-2):123-132.
- [8] 李中港,秦慧迪,汪怀山,等. BN 大鼠与 Wistar 大鼠 I 型超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,孙拿拿,杨晓光. 转基因食品致敏性评价——BN 大鼠动物模型研究[R]. 中国毒理学会第三届中青年学者科技论坛暨 2011 年全国前列腺药理毒理学研讨会,中国毒理学会,2011.
- [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] 程芳,刘兆平. 中药注射剂安全性评价与关键技术的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):1052-1054.
- [12] Gonzalez C F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis, The role of mast cell and basophil function[J]. Am J Pathol,1983,112(11):127-135.

## · 公告 ·

# 关于发布《食品微生物检验 副溶血性弧菌检验》(GB 4789.7—2013)等 75 项食品安全国家标准等的公告

2013 年 第 7 号

根据《中华人民共和国食品安全法》和《食品安全国家标准管理办法》规定,经食品安全国家标准审评委员会审查通过,现发布《食品微生物学检验副溶血性弧菌检验》(GB 4789.7—2013)等 75 项食品安全国家标准和《食品添加剂二丁基羧基甲苯(BHT)》(GB 1900—2010)第 1 号修改单。

特此公告。

附件:75 项食品安全国家标准及 BHT 第 1 号修改单.zip(略)

(相关链接:<http://www.moh.gov.cn/sps/s7891/201312/958deb5558b04e3d8e186a81e8462433.shtml>)

国家卫生计生委  
二〇一三年十一月二十九日