

论著

BN 大鼠致敏动物模型研究

向 钱 贾旭东 王 伟 李 宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘 要:目的 研究 BN 大鼠作为评价食物蛋白质过敏性动物模型的可行性。方法 通过经口和腹腔注射 2 种途径给予 BN 大鼠致敏原和非致敏原。(1) 30 只雌性 BN 大鼠,随机分为卵清蛋白(OVA)组、马铃薯酸性磷酸酶(PAP)组和阴性对照组,每组 10 只。OVA 组和 PAP 组分别每日 1 次经口灌胃给予 1 mg/ml OVA、PAP 1 ml,对照组灌同剂量的生理盐水,共 42 d。(2) 40 只雌性 BN 大鼠,随机分为 OVA 组、OVA + Al(OH)₃ (佐剂)组、PAP 组和阴性对照组,每组 10 只。OVA 组、OVA + Al(OH)₃ 组和 PAP 组在试验第 1、5、10 天分别经腹腔注射剂量 0.1 mg/ml 的 OVA 溶液、含 Al(OH)₃ 的 OVA 溶液(OVA + Al(OH)₃ = 1 + 1)、PAP 溶液 1 ml,观察 42 d。对照组腹腔注射同剂量的生理盐水。于第 14、28 和 42 天取血分离血清,测定特异性抗体 IgG 和 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 致敏原 OVA 可激发 BN 大鼠的过敏反应,包括部分大鼠血压的暂时性下降、特异性抗体(尤其是特异性 IgE)升高、组胺升高和部分大鼠的胃肠道通透性增加,而非致敏原 PAP 反应阴性。结论 BN 大鼠致敏动物模型是比较理想的评价食物蛋白质过敏性的动物模型。

关键词:食物过敏;模型;动物;大鼠;近交 BN

Study on Allergenicity Model of BN Rat

XIANG Qian, JIA Xu-dong, WANG Wei, LI Ning

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To study the feasibility of BN rats as the protein allergy animal model. **Method** BN rats were separately administrated allergen and non-allergen by oral gavage and intraperitoneal injection. (1) 30 BN rats were randomly divided into 3 groups, 10 rats in each group. OVA and PAP were daily administrated at the dose of 1 mg/ml OVA or at the dose of 1 ml PAP solution by gavage for 42 days, and rats in the control group were daily administrated with the same dose of saline. (2) 40 BN rats were randomly divided into 4 groups included OVA group, OVA + Al(OH)₃ group, PAP group and the control group, 10 rats in each group. OVA, OVA + Al(OH)₃ or PAP group was intraperitoneally injected 0.1 mg OVA, OVA with the same concentration of Al(OH)₃ which acts as an adjuvant, or PAP solution on the 1st, 5th and 10th days. And the control group rats were administrated with the same dose of saline. All rats were observed for 42 days. Blood samples were taken on the 14th, 28th and 42nd days from the orbital plexus, and centrifuged to obtain sera for analyzing specific IgG and IgE. On the 21st and 35th days, blood samples were taken to obtain plasma for analyzing histamine. In addition, the changes of blood pressure and gut permeability were determined. **Results** Allergen OVA could provoke allergenic response in BN rats, which include temporary blood pressure decrease, increase of specific antibody, increase of histamine in plasma and increase of gut permeability, but non-allergen PAP could not. **Conclusion** BN rat could be a suitable animal model for evaluation on food protein allergy.

Key word: Food Hypersensitivity; Models, Animal; Rats, Inbred BN

近 20 ~ 30 年来,过敏性疾病的发生呈进行性上升趋势,其中 3 %是由食物诱发的,1 % ~ 3 %的成年人以及高达 5 % ~ 8 %的儿童对一种或多种食物过敏^[1-3]。随着国际交流的越来越广泛和便捷,以及

现代生物技术在食品方面的应用,大量的新资源食品尤其是转基因食品的大量生产和食用,其安全性受到公众的广泛关注,潜在致敏性是关注的焦点之一。2001 年 FAO/WHO 致敏性判定树评估法中明确动物模型是食物致敏性评估的重要组成部分^[4]。

致敏性动物模型目前为止仍处于探索阶段,理想的动物模型一般应具有以下 4 个特点:(1)暴露于人类致敏原产生过敏反应,而暴露于非人类致敏原不出现过敏反应;(2)对不同致敏性的致敏原产生过

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAK02A07);国家重点基础研究发展计划项目(2007CB109207)

作者简介:向钱 男 实习研究员

通讯作者:李宁 女 研究员

敏反应的强度与人类相似;(3)与人类胃肠系统相似;(4)产生与人类相似的抗原-抗体反应^[5]。棕色挪威大鼠(BN 大鼠)对免疫球蛋白(特别是 IgE)具有高反应性,在遗传特性上与食物过敏人群非常相似,因此有可能是比较理想的动物模型^[6-8]。

本研究以经口和腹腔注射途径给予 BN 大鼠常见致敏原 OVA 和非致敏原 PAP,观察全身性反应(特异性抗体、血压)和局部反应(胃肠道渗透性),探讨 BN 大鼠作为致敏动物模型的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

卵清蛋白(OVA)、马铃薯酸性磷酸酶(PAP)、Evans 蓝和 β 乳球蛋白(β -LG)均购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠 IgG 抗体购自美国 KPL 公司;辣根过氧化物酶标记小鼠抗大鼠 IgE 抗体购自美国 Biological 公司;大鼠组胺测定试剂盒购自 IBL 公司; $\text{Al}(\text{OH})_3$ 为本实验室自备。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

经口致敏模型 30 只雌性 BN 大鼠,随机分为 3 组:OVA 组、PAP 组和阴性对照组,每组 10 只。OVA 组和 PAP 组分别经口灌胃给予 1 mg/ml OVA、PAP,1 ml/只,每日 1 次,共 42 d。对照组灌同剂量的生理盐水。分别于第 14、28 和 42 天内眦静脉取血,离心分离血清,用于特异抗体 IgG、IgE 测定。于第 21 和 35 天内眦静脉取血,加入 EDTA-2K,离心分离血浆,用于组胺测定。

腹腔注射致敏模型 40 只雌性 BN 大鼠,随机分为 4 组:OVA 组、OVA + $\text{Al}(\text{OH})_3$ 组、PAP 组和阴性对照组,各 10 只。OVA 组、OVA + $\text{Al}(\text{OH})_3$ 组和 PAP 组在试验第 1、5、10 天分别经腹腔注射 0.1 mg/ml OVA 溶液、0.1 mg/ml 含 $\text{Al}(\text{OH})_3$ (作为佐剂)的 OVA 溶液($\text{OVA} + \text{Al}(\text{OH})_3 = 1 + 1$)、0.1 mg/ml PAP 溶液,1 ml/只,观察 42 d。对照组腹腔注射同剂量的生理盐水。分别于第 14、28 和 42 天内眦静脉取血,离心分离血清,用于特异抗体 IgG、IgE 测定。于第 21 和 35 天内眦静脉取血,加入 EDTA-2K,离心分离血浆,用以测定组胺。

1.2.2 血压测定

所有大鼠在处理前 3 d 测一次血压,取平均值作为基准血压值,并以所有大鼠基准血压值均数的 95%可信区间作为正常血压参考范围。每组取 5 只大鼠进行血压测定。试验结束后恢复 7~10 d,禁食 24 h 后分别灌胃予以各组大鼠相应的 5 mg/ml OVA 溶液、PAP 溶液或生理盐水 2 ml,用 RBP-1 大鼠血

压计测 7 h 内的血压变化,每只测 5 次。

1.2.3 特异性抗体 IgG 和 IgE 测定

1.2.3.1 被动皮肤致敏试验(PCA) PCA 方法是经典的特异 IgE 抗体测定方法。取未处理的 BN 大鼠,剃光其背部和两腹侧的毛,皮下注射 0.1 ml 倍比稀释的上述各组的混合血清,64 h 后,分别尾静脉注射 0.5 ml 10 mg/ml OVA 和 2% Evans 蓝以 1:1 混合的溶液、0.5 ml 10 mg/ml PAP 和 2% Evans 蓝以 1:1 混合的混合溶液以及 0.5 ml 生理盐水和 2% Evans 蓝混合溶液,20~30 min 后观察注射皮肤位置染料渗出斑块反应。染料渗出斑块直径 > 3 mm 为 PCA 阳性,得到阳性结果的最大稀释度为特异性 IgE 滴度^[7]。

1.2.3.2 ELISA 法 采用间接 ELISA 法检测特异性 IgG 和 IgE 抗体。在试验前采集 BN 大鼠的血清,并将其合并,以此作为试验的阴性对照,以阴性对照各孔的平均吸光度加上 3 倍标准差作为参考值。将测试血清倍比稀释,高于参考值的最小稀释度即为特异性抗体滴度。96 孔酶标反应板以此经过包被、封闭、孵育、显色后,酶标仪 492 nm 波长测定 A 值。每板均加入阴性对照血清^[9]。

1.2.4 胃肠道渗透性测定

在 42 d 后,分别对各组剩余的 5 只大鼠经口灌胃给予 2 ml 50 mg/ml OVA、PAP。30 min 后,再灌胃给予 100 mg/ml 的 β -LG 1 ml。分别于 0.5、1、2、4 和 8 h 后内眦静脉取血,离心分离血清,分别用直接 ELISA 法和 Western blot 法测定血清中 β -LG^[10]。

1.2.5 血浆中组胺测定

取分离的血浆,按组胺测定试剂盒说明书,测定各组血浆组胺含量。

1.2.6 统计分析

用 Microsoft Excel 及 SPSS 10.0 进行试验数据统计分析。

2 结果

2.1 血压测定结果

血压监测结果显示:OVA + $\text{Al}(\text{OH})_3$ 腹腔注射组有 1 只大鼠在刺激后的第 2 小时出现一过性血压下降,但是很快恢复正常如图 1。

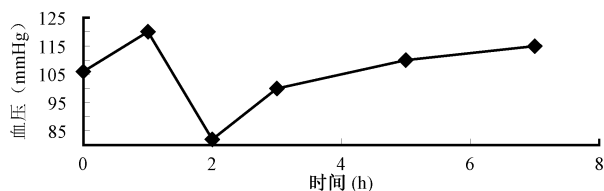


图 1 OVA + $\text{Al}(\text{OH})_3$ 腹腔注射组 3 号大鼠血压监测情况

其余大鼠在监测时间点血压均未见异常。

2.2 特异性抗体 IgG 和 IgE 测定结果

2.2.1 被动皮肤致敏试验 (PCA) 测定特异性 IgE 抗体结果

经口致敏途径 OVA 组第 14、28 和 42 天的混合血清,经 PCA 试验测得的特异性 IgE 抗体滴度分别为 1 2、1 4 和 1 2,而 PAP 组和阴性对照组未测到特异性 IgE 抗体。

腹腔注射致敏途径 OVA 组第 14、28 和 42 天的混合血清经 PCA 试验测得的特异性 IgE 抗体滴度分别为 1 8、1 16 和 1 4,OVA + Al(OH)₃ 组为 1 16、1 64 和 1 16,而 PAP 组和阴性对照组未测得特异性 IgE 抗体。

2.2.2 ELISA 法测定特异性抗体结果

2.2.2.1 特异性 IgG 测定结果

表 1 经口致敏途径特异性 IgG 抗体平均滴度

	第 14 天	第 28 天	第 42 天
OVA 组	10.5 ±0.9	12.3 ±1.2	12.0 ±0.8
PAP 组	4.0 ±0.8	4.3 ±1.3	3.3 ±0.7

注:结果以 ln(特异性 IgG 抗体滴度倒数)表示, $\bar{x} \pm s$, 每组 10 例。

如表 1 所示,经口致敏途径 OVA 组大鼠激发了较高的特异性 IgG 抗体,而 PAP 组大鼠产生的特异性 IgG 抗体较低。

表 2 腹腔注射致敏途径特异性 IgG 抗体平均滴度

	第 14 天	第 28 天	第 42 天
OVA 组	14.8 ±2.2	16.7 ±1.7	17.0 ±2.0
OVA + Al(OH) ₃ 组	17.6 ±1.8	16.1 ±1.3	17.7 ±0.9
PAP 组	4.6 ±1.0	5.0 ±0.7	3.4 ±1.1

注:结果以 ln(特异性 IgG 抗体滴度倒数)表示, $\bar{x} \pm s$, 每组 10 例。

如表 2 所示,腹腔注射致敏途径 OVA 和 OVA + Al(OH)₃ 组大鼠均激发较高的特异性 IgG 抗体,PAP 组大鼠激发的特异性 IgG 抗体较低。

2.2.2.2 特异性 IgE 测定结果

表 3 经口致敏途径特异性 IgE 抗体平均滴度

	第 14 天	第 28 天	第 42 天
OVA 组	2.0 ±0.5	3.1 ±0.8	2.6 ±0.3
PAP 组	ND	ND	ND

注:结果以 ln(特异性 IgE 抗体滴度倒数)表示, $\bar{x} \pm s$, 每组 10 例,ND 表示未检测出。

如表 3 所示,经口致敏途径 OVA 组大鼠激发了一定程度的特异性 IgE 抗体,并在第 28 天到达最高。而 PAP 组未能激发产生特异性 IgE。

如表 4 所示,腹腔致敏途径 OVA 和 OVA + Al(OH)₃ 组大鼠均激发较高特异性 IgE 抗体,并在第 28 天到达最高。而 PAP 组大鼠未能激发特异性 IgE。

2.3 胃肠道渗透性测定结果

表 4 腹腔注射致敏途径特异性 IgE 抗体平均滴度

	第 14 天	第 28 天	第 42 天
OVA 组	4.3 ±0.5	5.1 ±0.4	3.8 ±0.5
OVA + Al(OH) ₃ 组	6.0 ±0.8	7.4 ±1.0	5.6 ±1.5
PAP 组	ND	ND	ND

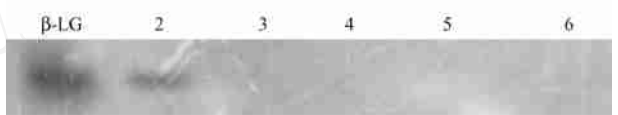
注:结果以 ln(特异性 IgE 抗体滴度倒数)表示, $\bar{x} \pm s$, 每组 10 例,ND 表示未检测出。

2.3.1 血清中的 β -LG ELISA 法检测结果

经口致敏途径各组大鼠血清中均未测得 β -LG 呈阳性。

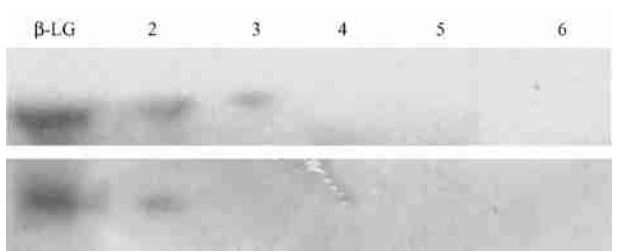
腹腔注射途径,OVA 组有 1 只大鼠在 0.5 h 血清中测得 β -LG;OVA + Al(OH)₃ 组有 1 只大鼠在 0.5 和 1 h 血清中都测得 β -LG,1 只大鼠在 0.5 h 血清中测得 β -LG,其余大鼠血清中均未测得。

2.3.2 血清中 β -LG Western blot 检测结果 见图 2、图 3。



第 1 泳道为标准蛋白 β -LG,2-5 依次为 0.5、1、2、4、8 h 血清中 β -LG

图 2 腹腔注射途径 OVA 组 ELISA 检测结果呈阳性大鼠的血清 Western blot 分析结果



第 1 泳道为标准蛋白 β -LG,2-5 依次为 0.5、1、2、4、8 h 血清中 β -LG

图 3 腹腔注射途径 OVA + Al(OH)₃ 组 2 只 ELISA 检测结果呈阳性大鼠的血清 Western blot 分析结果

BN 大鼠血清 ELISA 和 Western blot 检测结果显示,在经口给予大量致敏原刺激后,经口致敏途径各组大鼠血清中均未测得 β -LG。腹腔注射途径 OVA 组有 1 只大鼠在 0.5 h 血清中测得 β -LG;OVA + Al(OH)₃ 组有 1 只大鼠在 0.5 和 1 h 血清中都测得 β -LG,1 只大鼠在 0.5 h 血清中测得 β -LG。

表 6 经口致敏途径大鼠血浆中

组别	组胺含量 ($\bar{x} \pm s$)		ng/ml
	第 21 天	第 35 天	
OVA 组	50.2 ±9.6 ^a	46.3 ±11.8	
PAP 组	36.2 ±7.0	39.2 ±4.7	
阴性对照组	32.0 ±3.9	41.8 ±11.6	

注:a 与阴性对照组比较, $P < 0.05$, 每组 10 例。

表 7 腹腔注射致敏途径大鼠

组别	血浆中组胺含量($\bar{x} \pm s$)		ng/ml
	第 21 天	第 35 天	
OVA 组	63.7 $\pm$ 11.0 ^a	60.7 $\pm$ 8.7 ^a	
OVA + Al(OH) ₃ 组	64.0 $\pm$ 9.4 ^a	72.0 $\pm$ 14.9 ^a	
PAP 组	46.0 $\pm$ 12.1	43.80 $\pm$ 7.1	
阴性对照组	36.8 $\pm$ 11.0	43.5 $\pm$ 5.3	

注:a 与阴性对照组比较, $P < 0.05$, 每组 10 例。

2.4 组胺测定结果

组胺测定结果显示,经口致敏途径(表 6)的第 21 天,OVA 组血浆中组胺的含量较阴性对照组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 OVA 组第 35 天和 PAP 组较阴性对照组差异无统计学意义。腹腔注射致敏途径中(表 7),OVA 组和 OVA + Al(OH)₃ 组第 21 天和 35 天血浆中组胺含量均较阴性对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);PAP 组较阴性对照组差异无统计学意义。

3 讨论

本研究通过经口和腹腔注射两种致敏途径,给予 BN 大鼠 OVA 和 PAP,以血压、特异性 IgG 和 IgE 抗体、组胺及胃肠道渗透性为指标,研究 BN 大鼠致敏动物模型的可行性。此次研究的结果与 Knippels 等人的研究结果^[10,11]一致。

ELISA 法检测特异性 IgE 抗体较 PCA 法具有更高的灵敏性,并且更易操作,利于进行大量的检测,故在该指标的检测上可优先考虑 ELISA 法。但在 ELISA 法检测过程中,边缘效应较易造成假阳性结果的出现。为避免假阳性结果可在检测过程中避免使用 96 孔板的边缘孔,并且各样品要安排平行两孔并重复测量 2~3 次。

食物过敏以胃肠道症状较为常见,肠道大分子物质渗透性的增加导致胃肠道生理功能异常,出现腹泻等临床症状^[12]。摄入旁观者蛋白 β -LG 后,在腹腔注射致敏途径 OVA 组和 OVA + Al(OH)₃ 组中分别测得 1 只和 2 只大鼠血清中 β -LG 呈阳性,而 PAP 组却未测得;Western blot 结果提示血清中的 β -LG 不仅是含有抗原决定簇的片段,而且是完整的 β -LG,也证明了肠道过敏反应中至少部分 β -LG 是作为大分子物质被吸收的。这些都说明肠上皮大分子物质渗透性增加。经口致敏模型中各组均未测

得 β -LG,可能因为经口途径激发的特异性 IgE 抗体水平较低,并且经口途径较易产生耐受,所以并未引发胃肠道的异常生理效应。

本研究采用的两种致敏途径中,腹腔注射更易激发高滴度特异性 IgE 抗体。免疫佐剂虽然能促进特异抗体的产生,但在不使用佐剂的情况下 OVA 亦能激发过敏反应,故在致敏模型的应用中建议不使用免疫佐剂。总之,本研究结果表明 BN 大鼠致敏动物模型是评价食物致敏性的比较理想的动物模型。

参考文献

[1] ZEIGER R S. Prevention of food allergy in infancy [J]. Ann Allergy, 1990,65: 430-441.

[2] PAUL I M, GUILBERT T W, MAUGER D T, et al. Relationship between parental reports of environmental and food triggers of asthma symptoms and allergic sensitization-The Childhood Asthma Research and Education (CARE) network [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003 (111): 329.

[3] 龙振洲. 医学免疫学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 156-158.

[4] A joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods [EB/OL]. <http://www.who.int/fsf/GMfood/Consultation.jan2001/report20.pdf>. 2001-01-22.

[5] BOB B B. Genetic engineering and the allergy issue [J]. Plant Physiol, 2001, (126): 5-7.

[6] DEARMAN R J, KIMBER I. A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization [J] Methods, 2007, 41: 91-98.

[7] PENNINKS A H, KNIPPELS L M J. Determination of protein allergenicity: studies in rats [J]. Toxicol Lett, 2001, 120: 171-180.

[8] AKIYAMA H, TESHIMA R, SAKUSHIMA J, et al. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice [J]. Immunol Lett, 2001, 78: 1-5.

[9] 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.

[10] KNIPPELS L M J, 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: 161-169.

[11] KNIPPELS L M J, PENNINKS A H. Recent advances using rodent models for predicting human allergenicity [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 207: 157-160.

[12] GONZALEZ-CMSSI 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.

[收稿日期: 2008-04-24]