

酶解作用对牛乳 β -lg抗原性影响的研究

宋 伟,段翠翠,吕剑光,霍贵成*

(乳品科学教育部重点实验室,东北农业大学,黑龙江哈尔滨 150030)

摘 要:牛乳 β -乳球蛋白(β -lg)是胎儿出生后遇到的第一个外来过敏原,并且它是导致牛乳蛋白过敏的主要过敏原。胰蛋白酶对 β -lg的水解作用可以导致其空间三维结构的变化,但是该酶诱导 β -lg蛋白结构变化对其致敏性影响的意义还不清楚。为了探明水解作用对 β -lg致敏性或者抗原性的影响,利用小鼠动物模型从体外(脾淋巴细胞增殖)和体内(IgE水平和组胺水平)两个方面研究了水解作用对 β -lg致敏性的影响。体外细胞增殖实验结果表明,和 β -lg水解物相比, β -lg能够显著刺激脾淋巴细胞增殖($P=0.01$);ELISA方法检测小鼠血清和小肠液IgE(免疫球蛋白E)抗体水平结果表明 β -lg组小鼠血清IgE水平要高于 β -lg水解物刺激组小鼠($P=0.03$),而小肠液中IgE水平和血清IgE水平变化趋势一致,但是整体水平要显著高于血清($P=0.002$)。血浆组胺实验表明 β -lg免疫组小鼠血浆中组胺水平明显高于 β -lg水解物免疫组($P=0.001$)。

关键词: β -乳球蛋白,动物模型,胰蛋白酶

Enzymatic hydrolysis effects on milk β -lactoglobulin antigenicity

SONG Wei, DUAN Cui-cui, LV Jian-guang, HUO Gui-cheng*

(Key Lab of Dairy Science, Northeast Agricultural of University, Harbin 150030, China)

Abstract: β -lactoglobulin(β -lg) is the first alien allergen after the baby births, and it is the main cause of milk protein allergy. Enzymatic hydrolysis of β -lg can lead to changes in β -lg three-dimensional structure of space, but the significance of the enzyme induced changes in the protein structure is unclear. In order to prove the influence of enzyme hydrolysis reactions to β -lg antigenicity or allergenicity, the effect of enzyme hydrolysis reactions to β -lg allergic with mice model from in vitro (spleen lymphocyte proliferation) and in vivo (IgE level and histamine level) was investigate. Spleen lymphocyte proliferation experimental results showed that compared to β -lg hydrolysis, β -lg significantly stimulates spleen lymphocyte proliferation ($P=0.01$); The results of Immunoglobulin E levels in the mouse serum and small intestinal juice determined by ELISA showed that IgE level group of mice immunized β -lg was higher than that immunized β -lg hydrolysates ($P=0.03$), and the IgE level changed in the small intestinal is consist with the IgE level change in the serum, but overall, the IgE level in the small intestinal juice was significantly higher than that in the serum ($P=0.002$). The levels of plasma histamine showed that plasma histamine level of mice immunized β -lg group was significantly higher than that of mice immunized β -lg hydrolysates group ($P=0.001$).

Key words: β -lactoglobulin; mice model; trypsin

中图分类号:TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)02-0393-04

食物过敏是指机体受到某些食物成分刺激后产生的一种以生理功能紊乱和组织损伤为主要表现的病理性免疫反应。牛乳是一种营养非常丰富的流体食品,但属于易引起过敏反应的食物之一。引起牛乳过敏的蛋白质主要是 β -lg、 α -乳白蛋白和酪蛋白,其中作为乳清蛋白主要成分的 β -lg是主要过敏原^[1]。 β -lg是一种分子量很小的蛋白质,可以溶于稀释的盐溶液中,并呈球状,有162个氨基酸残基(Mr18400),折叠成8股,呈反平行的 β -桶状,在外部有3周 α -螺旋,第九个 β -链在侧面与第1个链相连^[2]。Selo等人的研究表明 β -lg分子表面上具有多

个抗原表位,其中最易被识别的氨基酸残基是41-60,103-124及149-162等,由每一片段引起的免疫反应大约占到 β -lg过敏反应的10%~15%^[3]。目前,有许多可以改变蛋白致敏性的方法,例如热处理、酶水解、高压处理、糖基化、乳酸菌发酵等,其中酶水解是降低蛋白致敏性的最有效方法之一,本研究利用胰蛋白酶,在适宜的条件下将 β -lg进行水解,然后利用小鼠动物模型从体外和体内两个方面来研究水解液抗原性质的变化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

balb/c小鼠 平均体重在7.832g,购自哈尔滨医科大学附属肿瘤医院; β -lg、胰蛋白酶、ConA(刀豆蛋白)、牛血清白蛋白、肝素钠 sigma公司;RPMI-1640培养液 hyclone;胎牛血清 TBD公司;MTS

收稿日期:2010-12-27 *通讯联系人

作者简介:宋伟(1985-),男,硕士研究生,研究方向:乳品科学与工程。

基金项目:东北农业大学生物乳业创新团队资助项目(CXT 007-2)。

promega;山羊抗小鼠 IgE AbD serotec;显色液 TMB、红细胞裂解液、弗氏佐剂 索莱宝公司。

96 孔细胞培养板 costar;Delta320 型 pH 计 梅特勒-托利多仪器有限公司;酶标仪 Model 680、洗板机 Model-1575 美国伯乐公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立 balb/c 小鼠被分成三组,每组 8 只,以弗氏佐剂为佐剂分别给小鼠皮下注射 β -lg (20 μ g/g BW), β -lg 水解液 (20 μ g/g BW) 和 PBS 组;免疫方案为 0、7、14d 进行间隔免疫,末次激发后 14d 进行采血,分离血清和血浆备用。

β -lg 水解液的制备:将 13.6g 粉末 β -lg、400mL PBS 溶液中配成 β -lg 溶液,加入 2g 胰蛋白酶,45℃ 水解 2h。

1.2.2 细胞增殖实验

1.2.2.1 脾细胞制备 小鼠颈椎脱臼处死,然后 75% 乙醇浸泡 5min,无菌条件下取出小鼠脾脏,将其放入事先准备好的 RPMI-1640 培养液中,使用 1mL 注射器进行冲脾,然后将冲好的脾细胞悬液用红细胞裂解液去除红细胞 (1000 $\times$ g, 5min),用血球计数板计数,将细胞浓度调至 2×10^6 个/mL。

1.2.2.2 MTS 检测 将用完全 RPMI-1640 培养液稀释好的细胞加入于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ L。阴性对照孔为完全 RPMI-1640 培养液,实验孔分别再加入 50 μ L 已稀释的 β -lg, β -lg 酶解产物。ConA 组每孔均加入终浓度 5 μ g/mL 的 ConA。每个样品设 3 个重复孔。混匀后,将 96 孔细胞培养板放入 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。每孔加 MTS 20 μ L。继续孵育 4h,终止培养。用酶标仪于 490nm 比色。读出 OD 值,根据下述公式,计算刺激指数:

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{样品值} - \text{空白值}}{\text{对照值} - \text{空白值}}$$

1.2.3 IgE 水平的检测 末次激发后,摘眼球采血,分离血清 (2000 $\times$ g 离心),然后离心 (1000 $\times$ g, 5min)。取小鼠小肠,收集小肠液。IgE 水平是通过 ELISA 方法来检测的,步骤如下。

1.2.3.1 包被抗原 用包被缓冲液溶解 β -lg 或 β -lg 水解物 (1mg/mL),然后 100 μ L/孔、4℃、湿盒内包被过夜 (约为 18h),用 PBS-T 洗液洗涤 3 次。

1.2.3.2 封闭 用洗板机洗 4 次后,加 BSA 封闭液进行封闭,200 μ L/孔、37℃、湿盒中 1h,然后洗板机洗涤 4 次。

1.2.3.3 抗原抗体反应 将抗体 (小鼠血清) 以一定浓度稀释,100 μ L/孔加入酶标板,37℃ 反应 2h,反应结束后洗板机洗涤 6 次。

1.2.3.4 加酶标二抗 加入 1:500 稀释的山羊抗小鼠 IgE-HRP 100 μ L/孔,37℃ 孵育 2h,洗板机洗涤 5 次。

1.2.3.5 显色反应 加入 TMB 显色液 100 μ L/孔,37℃,避光 20min。

1.2.3.6 终止反应 加入 1mol/L H₂SO₄, 50 μ L/孔。

1.2.3.7 测吸光值 置 Model550 酶标仪 (Bio-Rad) 测定 450nm 波长的 A 值。

1.2.4 组胺水平的检测 血浆的制备方法同血清,

但是需要和肝素钠抗凝剂混匀,然后离心。组胺水平利用组胺试剂盒进行检测,具体操作步骤按照说明书进行 (Usenlife)。

1.2.5 统计学分析 全部结果均采用 SPSS (13.0 版) 软件分析。组间数据的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异, $P > 0.05$ 无显著差异。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

2.1.1 脾细胞增殖 脾细胞是主要的淋巴细胞,本实验研究了 β -lg 及其水解液对脾细胞体外增殖的影响, ConA 为刺激物。实验结果以刺激指数 (SI) 来表示,实验结果如图 1 所示,在未加 ConA 组中,水解作用显著降低了 β -lg 对脾细胞的刺激作用 ($P = 0.01$),而水解液对脾细胞的刺激作用也显著高于 PBS 组 ($P = 0.001$),加 ConA 组的整体趋势和未加 ConA 组一致,但是整体刺激作用要高于未加 ConA 组。

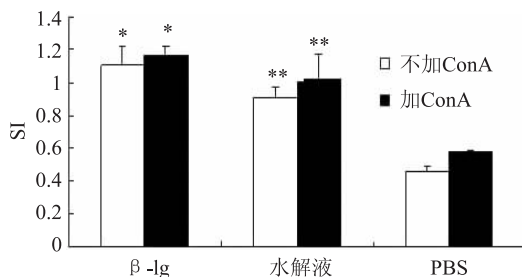


图1 脾细胞 MTS 检测结果

Fig.1 The results of MTS in the spleen cells

注: * 代表 β -lg 组和水解组差别显著,

** 代表水解组和 pbs 组差别显著;图 2、图 3 同。

2.1.2 血清和小肠液 IgE 检测 结果如图 2 所示。为了研究动物模型的系统免疫和粘膜免疫抗体水平,利用 ELISA 方法检测了小鼠血清和小肠液中 IgE 水平。图 2 是血清和小肠液 IgE 检测结果,从图 2 中可以看出皮下注射 β -lg 的小鼠血清和小肠液 IgE 水平显著高于水解液刺激组 (分别为 $P = 0.03$, $P = 0.002$)。水解液注射组的血清和小肠液 IgE 水平也显著高于 PBS 组 (分别为 $P = 0.02$, $P = 0.001$),但是小肠液中的 IgE 水平显著高于水解液中 IgE 水平。

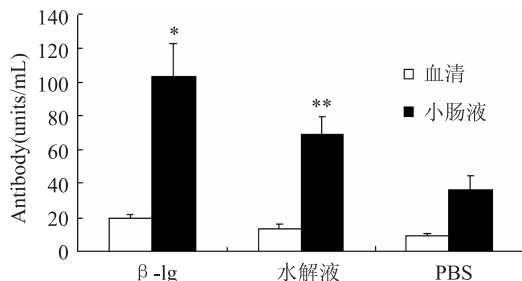


图2 血清和小肠液 IgE 检测结果

Fig.2 Test results of IgE in the serum and the small intestine

2.1.3 血浆组胺检测 结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出 β -lg 刺激组小鼠的血浆水平显著高于水解液刺激组 ($P = 0.001$),水解液刺激组的组胺水平显著高于 PBS 刺激组 ($P = 0.006$)。

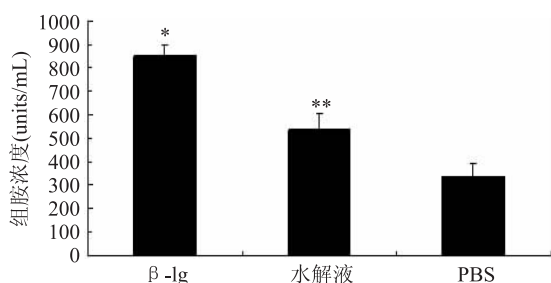


图3 血浆组胺测定结果

Fig.3 The results of histamine level in the plasma

2.2 讨论

目前,很多研究都集中在体外和体内脾淋巴细胞增殖调节方面,研究对象主要是乳清蛋白的某单体成分,例如 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白(α -la)、LF(乳铁蛋白)、乳过氧化物酶(LP)、浓缩乳清蛋白(WPC)和分离乳清蛋白(WPI)。有研究表明微滤过的WPI可以刺激体外小鼠脾淋巴细胞增殖,刺激效果随胰蛋白酶/糜蛋白酶混合物的水解作用而降低。此外,纯化的 β -lg、 α -la都不能够解释对脾细胞增殖的影响,而LF可以抑制细胞增殖;但是他们表明,根据等电点分离的单独肽组分,在很低的浓度就可以表现出和没有分离的水解物对细胞增殖相等的刺激作用^[4]。还有研究表明,纯化的 β -lg,特别是包含A和B变种的商业制剂,可以促进体外小鼠脾细胞增殖。但是,胰蛋白酶的水解作用能明显降低纯化 β -lg对脾细胞的增殖作用^[5]。这些文献还表明, β -lg的刺激作用不是由于细菌脂多糖(LPS)的参与引起的,而是其本身确实具有使得脾细胞增殖的影响。Mahmud等^[6]也发现,纯化后的 β -lg可以诱导小鼠脾细胞增殖,该增殖活性随 β -lg的减少而降低,表明该活性主要依赖于 β -lg。而本研究中的细胞增殖实验表明,水解作用可以显著降低 β -lg对脾细胞的刺激作用,但是和PBS组相比, β -lg水解物对脾细胞还是具有较强的刺激作用,这说明水解作用只能部分地降低 β -lg的刺激作用。

研究已经证明,IgE抗体在人类I型过敏反应中发挥着重要的调节作用^[7-8]。有学者研究了使用来源于双歧杆菌NCC362酵素的胰蛋白酶-糜蛋白酶 β -lg水解物后的产物,并表明B.lactis胰蛋白酶的水解作用降低了IgE和酸性TC多肽的结合能力^[9]。在这项研究中,用ELISA法对血清中的IgE水平进行了评价,结果表明, β -lg能够诱导小鼠产生的IgE水平升高,但是酶解 β -lg可以抑制IgE的产生,这说明和 β -lg相比,酶 β -lg水解物具有较低的敏感性。正如我们所知,更高的IgE水平表明身体处于一种致敏状态,所以根据小鼠模型, β -lg水解物表现出敏感性下降。此结果可能是由于水解作用破坏了 β -lg的三维结构,某些抗原决定簇在水解的作用下被破坏,然后 β -lg的致敏作用降低。

研究已经表明,在过敏性反应中,组胺是一个很重要的调节者,并且研究发现在牛乳致敏/激发的小鼠中血浆组胺水平明显升高^[10]。在本研究中血浆组胺水平是通过ELISA试剂盒检测的,结果与上述研究一致,即和天然 β -lg相比,水解作用降低了小鼠血浆组胺水平,然而组胺水平下降的机制不清楚。

可能的解释是:组胺主要是由肥大细胞产生的,假设 β -lg能够使小鼠致敏,所以本实验组小鼠的肥大细胞数量增加,那么相应的组胺水平提高,然而对于 β -lg水解物组,水解作用破坏了 β -lg的三维结构,导致表面抗原减少,所以该实验组的小鼠肥大细胞水平低,组胺水平相应也比较低。

3 结论

本实验选用胰蛋白酶在适宜的温度、pH和水解时间下获得的水解液,利用balb/c小鼠建立过敏动物模型,从体内和体外两个方面来评价水解液的致敏作用,以期获得致敏性比较低的水解物。综合以上实验结果得出,胰蛋白酶可以破坏 β -lg的三维空间结构,从而消除存在于 β -lg表面的抗原表位,使得其致敏性降低。然而,也有研究表明水解作用一方面可以降低 β -lg的致敏作用,而由于水解后将 β -lg大分子内部的抗原表位暴露出来也可能增强其抗原性,但后者的假设还需进一步的实验来证明。

参考文献

- [1] Cocco RR, Jarvinen KM, Sampson HA, et al. Mutational analysis of major sequential IgE-binding epitopes in α -casein, a major cow's milk allergen [J]. Allergy Clin Immunol, 2003, 112(2): 433-437.
- [2] Kraulis PJ, MOLSCRIPT. A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures [J]. Appl Cryst, 1991, 24: 946-950.
- [3] Selo I, Clement G, Bernard H, et al. Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides [J]. Clin Exp Allergy, 1999, 29(8): 1055-1063.
- [4] Mercier A, Gauthier SF, Fliss I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests [J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 175-183.
- [5] Wong KF, Middleton N, Montgomery M, et al. Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions [J]. Journal of Dairy Science, 1998, 81: 1825-1832.
- [6] Mahmud R, Matn MA, Otani H. Mitogenic effect of bovine b-lactoglobulin and its proteolytic digests on mouse spleen resting cells [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2004, 7(12): 2045-2050.
- [7] Ishizaka T, Tomioka H, Ishizaka K. Degranulation of human basophil leukocytes by anti-g E antibody [J]. Immunol, 1971, 106: 705-710.
- [8] Martin TR, Galli SJ, Katona IM, et al. Role of mast cells in anaphylaxis. Evidence for the importance of mast cells in the cardiopulmonary alterations and death induced by anti-IgE in mice [J]. Clin Invest, 1989, 83: 1375-1383.
- [9] Guénolée Priault, Sophie Pecquet, Ismail Fliss. Stimulation of interleukin-10 production by acidic β -Lactoglobulin-Derived peptides hydrolyzed with Lactobacillus paracasei NCC2461 peptidases [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004, 11(2): 266-271.
- [10] Li XM, Schofield BH, Huang CK, et al. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity [J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 103: 206-214.