

## 益生菌协同小麦水解肽预防幼鼠小麦过敏

曾冰蕙, 刘羽嘉, 杜航, 李博雅, 车会莲\*  
(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

**摘要** 为对比小麦水解肽以及益生菌与其混合物对幼鼠小麦过敏的预防效果, 评估益生菌与小麦水解肽是否存在协同增效作用, 通过建立小麦过敏幼鼠模型, 观察幼鼠体质量、直肠温度、脏器指数、空肠病理切片, 检测其血清特异性免疫球蛋白 E (IgE)、特异性免疫球蛋白 G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>)、特异性免疫球蛋白 G<sub>2a</sub> (IgG<sub>2a</sub>) 水平, 测定其脾脏细胞因子 [白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 5 (IL-5)、白细胞介素 13 (IL-13)、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ )] 水平。结果表明, 早期消化道摄入小麦水解肽可显著提高幼鼠胸腺指数及脾脏指数; 使血清特异性 IgE 水平与特异性 IgG<sub>1</sub> 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 使脾脏 IL-4 水平 ( $P < 0.05$ ) 与 IL-13 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 使脾脏 IFN- $\gamma$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 使幼鼠直肠温度显著回升 ( $P < 0.01$ )。早期消化道摄入益生菌与小麦水解肽混合物, 显著抑制了辅助型 T 细胞 2 (Th2) 型反应偏移, IL-5 水平、Th2/Th1 比值显著降低; 对空肠绒毛断裂、隐窝深度变浅、绒毛高度变低等空肠病理现象缓解效果明显。综上所述, 小麦水解肽与益生菌协同小麦水解肽混合物具有预防幼鼠小麦过敏的潜力, 有望用于开发预防婴幼儿小麦过敏的特殊医学用途配方食品。

**关键词** 小麦过敏; 益生菌; 幼鼠; 预防过敏; 水解肽

**文章编号** 1009-7848(2024)08-0236-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.023

小麦是全球三大粮食作物之一, 也是中国的第二大主食, 其年消费量在我国达 1.2 亿 t<sup>[1]</sup>。然而小麦中含有多种过敏原, 是引起我国最多例过敏性休克的食物, 被联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 列为八大常见过敏食物之一<sup>[2]</sup>。婴儿最早出现的过敏性疾病是皮肤过敏及食物过敏, 在 1 岁之后逐渐耐受, 继而出现哮喘、过敏性鼻炎等病症<sup>[3]</sup>。食物过敏患者中, 有 11%~20% 的儿童被诊断为小麦过敏<sup>[4]</sup>。小麦过敏患儿临床表现多样<sup>[5]</sup>, 21 例患儿中有 95.2% 发生皮肤症状, 28.6% 发生消化道症状, 4.8% 发生神经系统症状, 且超过半数患儿出现严重过敏反应<sup>[6]</sup>。严重过敏反应会对患儿的神经系统发育造成不可逆的伤害, 甚至发生过敏性休克<sup>[7]</sup>。婴幼儿小麦过敏的预防与治疗研究因此受到越来越多的关注。

食物过敏患者的肠道菌群与常人具有显著差异<sup>[8]</sup>, 有研究表明益生菌可以调节免疫应答, 缓解过敏症状。如: Supinda 等<sup>[9]</sup>发现梭状芽胞杆菌和拟杆菌与牛奶过敏有关。嗜酸乳杆菌<sup>[10]</sup>可有效调节免疫系统来抑制食物过敏。早先, 前人对鼠李糖乳杆菌

PB-LR76 的研究仅局限于其抗氧化性<sup>[11]</sup>。近年来, 有学者指出乳双歧杆菌 HHBA68 和鼠李糖乳杆菌 PBLR76 通过增加白介素 12 (Interleukin-12, IL-12)、 $\gamma$ -干扰素 (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 的分泌, 对人体哮喘具有显著改善作用<sup>[12]</sup>。此外, 水解肽有利于温和地提升婴幼儿对该种过敏原的胃肠道耐受性, 降低婴幼儿过敏反应<sup>[13]</sup>。本课题组先前研究发现酶水解可以通过将蛋白质降解成小分子肽段, 从而影响过敏原的线性表位、空间表位以降低其致敏性, 降低血清特异性抗体水平, 抑制过敏症状发生, 这与 Watanabe 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。目前对益生菌协同水解肽预防食物过敏的研究较少。上述混合物的预防效果是否优于水解肽单独作用仍存质疑。

本研究通过建立小麦过敏幼鼠模型, 研究益生菌协同小麦水解肽对幼鼠小麦过敏的预防作用, 并与小麦水解肽的预防作用作对比, 旨在为预防婴幼儿小麦过敏的产品配方优化提供新思路, 为婴幼儿配方奶粉或其它特殊医学用途配方食品的开发提供一定的技术支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物、材料与仪器

SPF 级的 2~3 周龄 (平均体质量 10 g) 雌性

收稿日期: 2023-08-11

第一作者: 曾冰蕙, 女, 硕士生

通信作者: 车会莲 E-mail: chehuilian@cau.edu.cn

BALB/c 小鼠 32 只,北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SCXK(京)2021-0011)提供。饲养于 SPF 级动物房,自由摄食饮水,温度 20~24 °C,湿度 40%~70%,12 h 光照/12 h 黑暗交替。本实验已通过中国农业大学实验动物福利与动物实验伦理审查(批准文号:Aw90302202-4-5)。

小麦粉,沈阳香雪面粉股份有限公司生产,品牌为福临门,面粉精度为特制一等;正己烷,分析纯级,纯度 97%,麦克林生化科技有限公司生产;木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、胃蛋白酶,山东齐鲁生物科技有限公司生产;彩虹 180 广谱蛋白 Marker,北京百瑞极生物科技有限公司生产;PBS 缓冲液(1×,pH 7.2~7.5),武汉赛维尔生物科技有限公司生产;乳双歧杆菌 HH-BA68、鼠李糖乳杆菌 PB-LR76,陕西米先尔生物科技有限公司生产;明矾佐剂,美国 Thermo Fisher 科技公司生产;HRP-大鼠抗小鼠 IgE、HRP-山羊抗小鼠 IgG<sub>1</sub>、HRP-山羊抗小鼠 IgG<sub>2a</sub>,英国 Abcam 公司生产;TMB 双组分显色试剂盒、牛血清白蛋白 V,北京索莱宝科技有限公司生产;SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶试剂盒,深圳达科为生物工程有限公司生产;小鼠 IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  Elisa 试剂盒,上海信帆生物科技有限公司生产。

D-16C 低温高速离心机,德国 Sartorius 公司生产;FreeZone6P 真空冷冻干燥机,美国 Labconco 公司生产;DNM-9602 酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司生产;GenoSens1850 凝胶成像分析仪,上海勤翔科学仪器有限公司生产;RC-4 电子温度计,精创电气股份有限公司生产;N·9548 研磨仪,北京赫得科技有限公司生产;EX20 光学显微镜,宁波舜宇仪器有限公司生产。

## 1.2 方法

### 1.2.1 小麦水解肽的制备

1.2.1.1 小麦蛋白提取 取小麦粉加入正己烷(质量比 1:3),置于 4 °C 环境中浸泡去脂 12~24 h,换液洗涤直至正己烷澄清,弃去上清液。将剩余脱脂小麦粉置于通风橱下 24 h,期间翻动数次,使正己烷充分挥发。取脱脂小麦粉称重,按料液比 1:10 加入 PBS 缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.4),浸泡 12~24 h 后,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为小

麦蛋白粗提液,分装后置于-80 °C 冰箱预冻 12 h,于真空冻干机中冻干成粉。

1.2.1.2 小麦蛋白酶解 取小麦蛋白粗提液,用稀盐酸调 pH 值至 2.0,加入 7% 胃蛋白酶,充分搅拌均匀,加热至 35 °C,酶解 3 h,升温至 90 °C,保温 3 min 灭酶,立即降温至室温,得到小麦水解肽置于-80 °C 冰箱预冻 12 h,于真空冻干机中冻干成粉。

1.2.1.3 小麦蛋白粗蛋白含量的测定 取 0.01 g 小麦蛋白粗提液冻干粉,溶于 1 mL PBS 缓冲液中,分别稀释 2,5,10 倍,以保证样品吸光度值在合理范围内。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定小麦蛋白粗提液中的蛋白浓度,试验步骤按试剂盒说明书所述方法进行。

1.2.1.4 小麦蛋白及水解肽的 SDS-PAGE 凝胶电泳 根据 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳试剂盒说明书配制凝胶,以彩虹 180 广谱蛋白 Marker 为标准,通过凝胶电泳测定小麦蛋白以及水解肽的分子质量。所得凝胶浸泡于考马斯亮蓝染液,染色 1 h 后弃去染色液,浸泡于脱色液( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰乙酸}}:V_{\text{水}}=1:1:8$ )中,换液脱色至蛋白条带清晰。将蛋白电泳凝胶置于凝胶成像分析仪中拍照分析。

1.2.2 益生菌与小麦水解肽混合液(Probiotics with wheat hydrolysate peptides, PWHP)的制备 将 1 mg 小麦水解肽、 $1 \times 10^8$  CFU 乳双歧杆菌、 $1 \times 10^8$  CFU 鼠李糖乳杆菌混合溶解于 PBS 中,振荡使其溶解充分,现配现用。

### 1.2.3 小麦过敏预防作用实验

1.2.3.1 小鼠分组及处理 32 只 2~3 周龄雌性 BALB/c 小鼠适应性喂养 1 周后,按体质量随机分为 4 组( $n=8$ ),分别为:空白组(CK)、小麦蛋白过敏组(MM)、小麦水解肽组(MJ)、益生菌协同小麦水解肽组(PWHP)。

CK 组在实验组相同处理时间以相同处理方式给予小鼠 PBS 溶液。

MM 组在 0~4 d 灌胃 0.2 mL PBS;第 11 和 18 天分别腹腔注射 0.1 mL 小麦蛋白致敏液(1  $\mu$ g 小麦蛋白粗提液冻干粉+ 5% 明矾佐剂);25~39 d 每隔 1 d,根据体质量给予小鼠 0.5 mg/g 的小麦蛋白粗提液冻干粉进行多次激发。

MJ 组在 0~4 d 灌胃 0.2 mL 小麦水解肽溶液

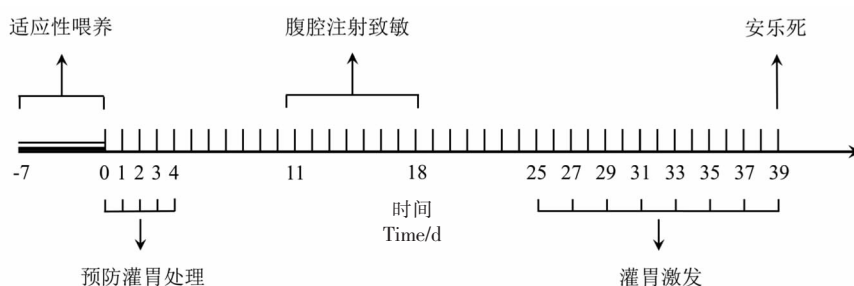


图1 动物实验方案

Fig.1 Animal experimentation strategy

(1 mg 小麦水解肽), 致敏方式与激发方式同 MM 组。

PWHP 组 0~4 d 灌胃 0.2 mL PWHP (具体成分及其含量见 1.2.2 节), 致敏方式与激发方式同 MM 组。

1.2.3.2 测定小鼠体质量 在第 0, 4, 11, 18, 25, 32, 39 天测定小鼠体质量并记录, 重复测定 3 次, 取平均值。

1.2.3.3 测定小鼠直肠温度 在第 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 天激发 1 h 后及第 39 天激发 0, 10, 20, 30, 60 min 后, 用电子温度计测定器测定小鼠直肠温度, 重复测定 3 次, 取平均值。

1.2.3.4 测定小鼠器官指数 第 39 天小鼠取血后处死, 取出小鼠胸腺及脾脏, 置于分析天平上称重, 分别记录小鼠胸腺及脾脏质量, 并且按下式计算胸腺指数、脾脏指数。

小鼠器官指数(%)=(小鼠器官质量/小鼠体质量)×100

1.2.3.5 测定小鼠血清特异性抗体水平 各组小鼠血浆在室温静置 1 h 后, 在 4 °C, 3 500 r/min 条件下离心并分离取血清, 分装后保存于-20 °C 冰箱备用。采用间接 ELISA 法测定血清特异性 IgE、IgG1、IgG<sub>2a</sub> 水平。

血清特异性 IgE 的测定: 96 孔 Costar 板上包被 10 μg/mL 小麦蛋白粗提液冻干粉溶液, 100 μL/孔, 4 °C 过夜后, 使用 PBS-T 洗涤 5 次, 200 μL/孔。每孔加入 150 μL 封闭液(1% BSA/PBS), 在 37 °C 下封闭 1 h 后, 洗涤 3 次。以体积比 1:10 稀释各组血清样品, 加入 100 μL/孔, 在 37 °C 下孵育 2 h 后, 洗涤 6 次。以体积比 1:2 000 稀释 HRP-大鼠抗小鼠 IgE, 加入 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h

后, 洗涤 6 次。每孔加入 100 μL TMB 工作液显色, 37 °C 下避光放置 15 min(底物孵育), 每孔加入 50 μL 的 2 mol/L 硫酸溶液终止显色反应。使用多功能酶标仪测定各孔在波长 450 nm 处的吸光值。每个样品设置 3 个平行孔, 吸光值取平均值。

血清特异性 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub> 的测定: 以体积比 1:800 稀释各组血清样品, 以 1:10 000 稀释 HRP-山羊抗小鼠 IgG<sub>1</sub> 或 HRP-山羊抗小鼠 IgG<sub>2a</sub>。其余试验条件与操作方法同血清特异性 IgE 的测定。

1.2.3.6 测定小鼠脾脏细胞因子水平 第 39 天处死小鼠后, 将脾脏取出并置于 1.8 mL 冻存管中, 放入液氮速冻。随后置于-80 °C 冰箱保存。测定时, 加入适量生理盐水至没过脾脏样本, 于研磨仪中磨碎, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定小鼠脾脏 IL-4、IL-5、IL-13、IFN-γ 水平, 具体操作按 ELISA 检测试剂盒说明书进行。通过 BCA 蛋白测定试剂盒测定各组样品中的总蛋白含量, 各细胞因子含量用测得细胞因子含量占总蛋白含量之比表征, 单位为 pg/mg 总蛋白。

1.2.3.7 观察空肠组织病理结构 第 39 天处死小鼠后, 取一段空肠固定, 交于武汉百仟度生物科技有限公司切片, 以苏木精-伊红染色法(HE 染色法)染色, 在光学显微镜下进行空肠组织病理学观察。

### 1.3 数据处理

每组实验设 3 个平行。实验数据采用 Microsoft Excel 2019 作标准曲线进行分析处理。后续使用 Graphpad prism 8.4.2 软件, 单因素方差分析(one-way ANOVA)数据差异显著性并绘图, 结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示。差异显著指  $P < 0.05$ , 差异极显著指  $P < 0.01$ 。



## 2 结果与分析

### 2.1 小麦粗蛋白含量及小麦水解肽水解程度

为方便后续动物实验中定量小麦水解肽的处理浓度,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定了小麦蛋白粗提液冻干粉中蛋白质量分数为 13%。

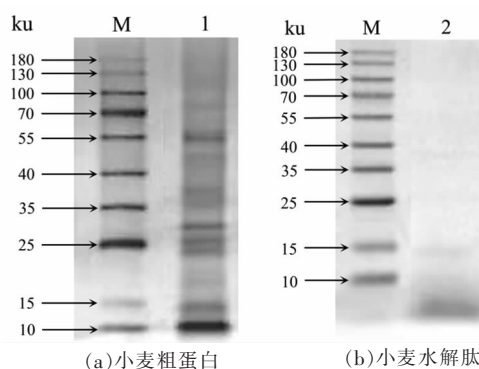
小麦蛋白经过胃蛋白酶酶解后,与小麦蛋白粗提液共同进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳。小麦蛋白粗提液(图 2a)分离出了 9 种蛋白条带,经过与 WHO/IUIS 过敏原数据库比对,在小麦蛋白粗提液中,6 种分子质量约为 90,56,35~38,14,12,9 ku 的蛋白质分别为 Tri a 26、Tri a 17、Tri a 20、Tri a 12、Tri a 37、Tri a 14 过敏原蛋白。这些致敏原已被证明与小麦过敏临床症状有相关性,如 Tri a 26 被认为是引发小麦依赖运动诱发的过敏反应患者发病的主要致敏原<sup>[15]</sup>。其中 12~16 ku 的蛋白质为  $\alpha$ -淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂( $\alpha$ -Amylase/trypsin inhibitor, ATI)<sup>[16]</sup>,24~30 ku 条带为 ATI 亚家族。Ikezawa 等<sup>[17]</sup>和 James 等<sup>[18]</sup>指出小麦盐溶蛋白中的 ATI 可以与特异性皮炎患者血清中的 IgE 结合,这些蛋白被认为是导致面包师哮喘的主要过敏原。

电泳条带灰度可以明显看出,小麦水解肽均为 10 ku 以下的肽段(图 2b),与小麦蛋白粗提液相比,小麦过敏原蛋白含量低。提示了本方法水解程度高,可成功制备低分子质量的小麦水解肽。

### 2.2 PWHP 与小麦水解肽对小麦过敏引起的体温变化的影响

实验全程监测各组小鼠的体质量变化(图 3)。空白组小鼠体质量呈现稳定上升趋势。处理组在预防灌胃处理期间体质量与空白组呈现相同趋势,说明 PWHP 及小麦水解肽的摄入并不会对小鼠体质量造成明显影响,即对幼鼠生长发育无明显影响。在第 39 天时,观察到小麦蛋白过敏组及小麦水解肽组的小鼠体质量均显著低于空白组( $P<0.05$ ),即小麦过敏会引起幼鼠体质量明显下降,且小麦水解肽对体质量下降的预防效果不明显,而 PWHP 组小鼠体质量与空白组、小麦蛋白过敏组均无显著性差异。

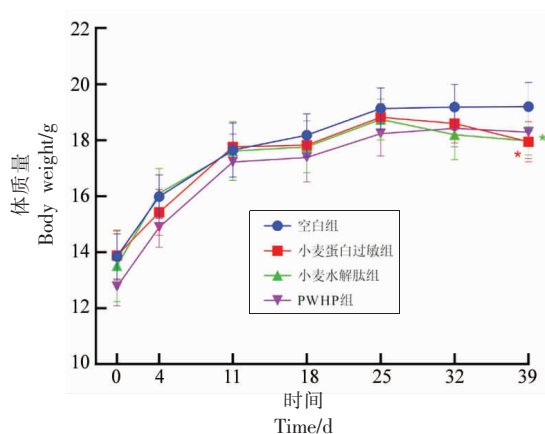
25 d 开始进行大剂量激发,灌胃 1 h 后测定小鼠的直肠温度(图 4)。空白组幼鼠体温大多高



注:M. 标准蛋白 Marker;1. 去脂后的小麦蛋白粗提液;2. 添加胃蛋白酶后的小麦水解肽。

图 2 小麦粗蛋白和小麦水解肽的电泳图

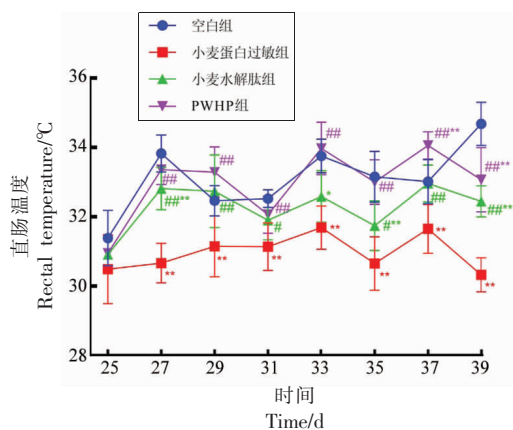
Fig.2 SDS-PAGE patterns of crude protein and hydrolysed protein of wheat



注:与空白组相比,\*. 差异显著( $P<0.05$ )。

图 3 小鼠体质量变化

Fig.3 Body weight change of young mice



注:与空白组比较,\*. 差异显著( $P<0.05$ );\*\*. 差异极显著( $P<0.01$ );与小麦蛋白过敏组比较,#. 差异显著( $P<0.05$ );##. 差异极显著( $P<0.01$ )。

图 4 小鼠体温监测

Fig.4 Temperature monitoring in young mice

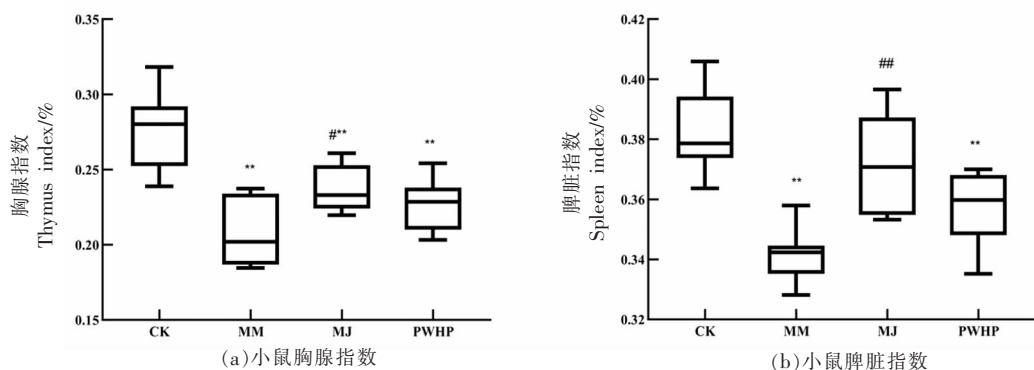
于处理组的体温。小麦蛋白过敏组幼鼠体温始终处于较低水平,且极显著低于空白组幼鼠的体温( $P<0.01$ ),表明小麦过敏与直肠温度下降有强相关性。

两组处理组的体温均显著高于小麦蛋白过敏组的体温( $P<0.01$ ),提示了PWHP及小麦水解肽均可以有效抑制小麦过敏引起的幼鼠体温下降。

### 2.3 小麦水解肽对胸腺、脾脏细胞增生的影响

免疫器官指数可作为重要指标,反应机体的

免疫活力。胸腺指数和脾脏指数的高低可以反应机体免疫功能的好坏,因为胸腺是T淋巴细胞产生和胸腺素分泌的主要场所,参与机体的细胞免疫<sup>[19-21]</sup>和体液免疫;脾脏中有大量的淋巴细胞和巨噬细胞,其中B淋巴细胞的比例较高,主要参与体液免疫<sup>[22]</sup>。小麦过敏属于IgE介导<sup>[23]</sup>的速发型超敏反应,故评估PWHP及小麦水解肽对胸腺指数、脾脏指数的作用十分必要。



注:与空白组比较,\*. 差异显著( $P<0.05$ );\*\*. 差异极显著( $P<0.01$ );与小麦蛋白过敏组比较,#. 差异显著( $P<0.05$ );##. 差异极显著( $P<0.01$ ).

图5 小鼠免疫器官指数

Fig.5 Immune organ index of young mice

MM组的器官指数均显著低于CK组( $P<0.01$ ),表明小麦过敏会明显抑制幼鼠免疫器官生长发育。小麦水解肽组器官指数均显著高于MM组(胸腺指数 $P<0.05$ ,脾脏指数 $P<0.01$ ),提示了小麦水解肽可以通过激活T淋巴细胞、自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)、B淋巴细胞,增强幼鼠的免疫功能,有效避免了小麦过敏对免疫细胞增殖的抑制作用。PWHP处理虽然可以轻微提高器官指数,但不具有统计学意义。

先前报道中,与本研究结果不一致的是,曾松荣等<sup>[24]</sup>认为大豆分离蛋白水解肽对小鼠的胸腺指数、脾脏指数均无显著影响。吴影等<sup>[25]</sup>证明酒糟复合益生菌剂可以显著提高肉鸡的脾脏指数、肝脏指数、胸腺指数;陈璟怡等<sup>[26]</sup>指出干酪乳杆菌、枯草芽孢杆菌可以显著提高肉鸡的脾脏指数。本研究发现乳双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌对胸腺指数、脾脏指数均无显著影响,与聂颖兰等<sup>[27]</sup>、王韵婷等<sup>[28]</sup>的研究结果具有一致性,故益生菌种属和蛋

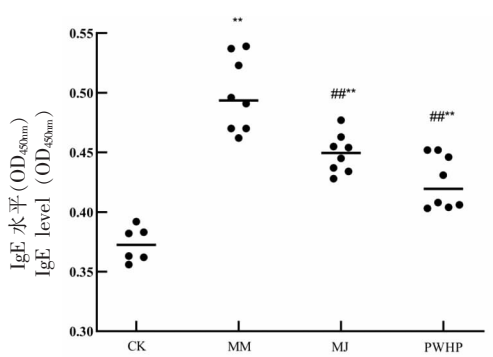
白水解肽种类可能都是食物耐受建立的关键因素。

### 2.4 PWHP对3种白介素分泌量的影响

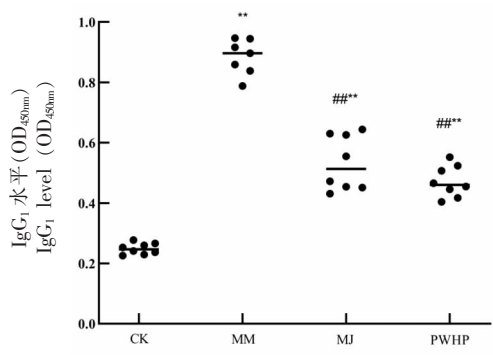
IgE是介导小麦过敏的重要抗体,而IgG<sub>1</sub>是小鼠体内辅助型T细胞2(T helper 2 cell, Th2)型反应产生的另一种重要抗体。B细胞分泌的IgE、IgG<sub>1</sub>进而诱导肥大细胞释放炎性介质,介导I型超敏反应的发生<sup>[29]</sup>。IgE水平可以反映过敏原蛋白质的致敏性,IgG<sub>1</sub>水平可以反映过敏原蛋白质的免疫原性<sup>[30]</sup>。

与CK组相比,MM组的血清特异性IgE水平显著升高( $P<0.01$ ),表明该种造模方法可成功建立小麦过敏幼鼠模型。PWHP与小麦水解肽均可显著降低幼鼠血清特异性IgE水平( $P<0.01$ )和特异性IgG<sub>1</sub>水平( $P<0.01$ ),值得注意的是,虽然PWHP与小麦水解肽间无显著性差异,但是PWHP处理效果略优于小麦水解肽处理效果。

白细胞介素4(Interleukin-4, IL-4)、IL-5、



(a)小鼠血清特异性 IgE 水平



(b)小鼠血清特异性 IgG<sub>1</sub> 水平

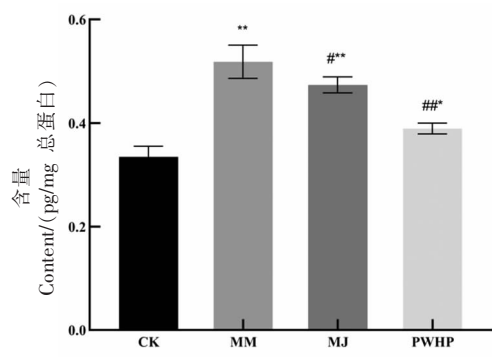
注：与空白组比较，\*，差异显著 ( $P < 0.05$ )；\*\*，差异极显著 ( $P < 0.01$ )；与小麦蛋白过敏组比较，#，差异显著 ( $P < 0.05$ )；##，差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 6 小鼠血清特异性抗体水平

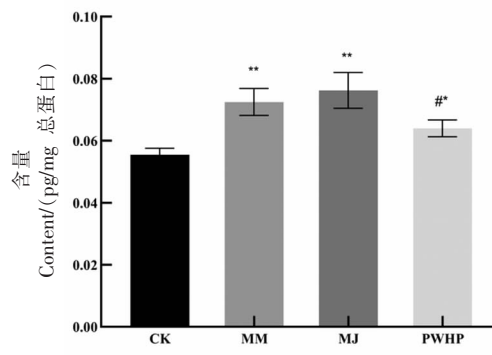
Fig.6 Specific antibody level in the serum of young mice

IL-13 是 Th2 型反应产生的细胞因子，其中 IL-4 是促进 B 细胞分泌 IgE、IgG<sub>1</sub> 的重要因素，IL-5 是嗜酸性粒细胞分化和增殖的关键细胞因子<sup>[31]</sup>，IL-13 能抑制 Th1 细胞产生 IFN- $\gamma$  及 IL-12，间接促进 Th2 型反应<sup>[32]</sup>。为了评估 PWHP 是否是通过抑制细胞因子产生的上游反应来抑制分泌特异性 IgE、IgG<sub>1</sub> 的下游反应，本研究测定了脾脏中上述 3 种细胞因子的水平(图 7)。结果显示，PWHP 能极显著抑制 IL-4、IL-13 水平升高 ( $P < 0.01$ )，显著抑制 IL-5 水平升高 ( $P < 0.05$ )，同时，效果均显著优于小麦水解肽单独作用 ( $P < 0.01$ )，与特异性抗体水平具有一致性。

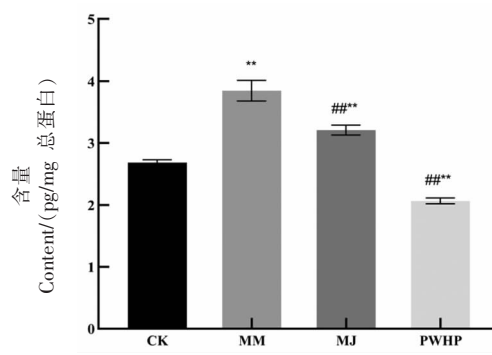
张利等<sup>[33]</sup>的研究同样显示双歧杆菌可以使小鼠血清 IL-4 含量显著降低。双歧杆菌对 Th2 型反应的抑制可能可以归结于双歧杆菌通过增强超氧化物歧化酶等抗氧化物质的表达及活性<sup>[34]</sup>。



(a)小鼠脾脏 IL-4 水平



(b)小鼠脾脏 IL-5 水平



(c)小鼠脾脏 IL-13 水平

注：与空白组比较，\*，差异显著 ( $P < 0.05$ )；\*\*，差异极显著 ( $P < 0.01$ )；与小麦蛋白过敏组比较，#，差异显著 ( $P < 0.05$ )；##，差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 7 小鼠脾脏细胞因子水平

Fig.7 Cytokine level in the spleen of young mice

### 2.5 小麦水解肽对 IFN- $\gamma$ 分泌的影响

Th1 细胞可以特征性地分泌 IFN- $\gamma$  和 IL-2 等细胞因子<sup>[35]</sup>，诱导巨噬细胞活化，介导过敏反应，产生 IgG<sub>2a</sub><sup>[36-37]</sup>。前述发现已证实 PWHP 预处理对 Th2 型反应有直接抑制作用，接下来基于 Th1/Th2 平衡探讨其是否会上调 Th1 型反应以调节机体免疫动态平衡。

本研究发现与MM组相比,PWHP及小麦水解肽处理虽然可轻微提高血清特异性IgG<sub>2a</sub>水平(图8),但其依旧显著低于CK组水平。同时,小麦水解肽可以显著提高脾脏中IFN- $\gamma$ 水平(图9)。PWHP组与MM组无显著差异,表明PWHP预处理对Th1型反应的上调并不明显。

值得注意的是,尽管从概念上而言MM组的Th1型细胞因子IFN- $\gamma$ 水平应低于CK组,然而,最近有证据表明,某些T淋巴细胞会分泌IFN- $\gamma$ 与Th2型细胞因子共同作用,维持组织器官的过敏性炎症反应<sup>[38]</sup>。此外,另一项研究发现哮喘中存在基本的Th2型反应偏移的同时,伴随有Th1样的激活<sup>[39]</sup>。故本研究所建小麦过敏模型是成功的且有研究意义的。综合而言,PWHP对于Th1型反应的调节虽有轻微上调,但并不明显,而小麦水解肽可以促进IFN- $\gamma$ 分泌,上调Th1型反应。

## 2.6 PWHP与小麦水解肽对免疫平衡的影响

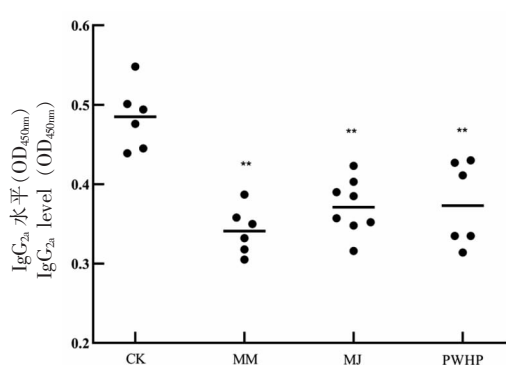
正常生理情况下,Th1与Th2型反应处于动态平衡,而这种平衡在小麦过敏患者体内会被打破,免疫应答向Th2型反应偏移。本研究以IL-4(Th2型典型细胞因子)与IFN- $\gamma$ (Th1型典型细胞因子)的比值表征Th2与Th1间的平衡。结果显示,PWHP与小麦水解肽均可以显著降低比值,即抑制免疫应答向Th2型反应偏移。前人结果同样指出,一些益生菌的抗过敏作用表现为Th2反应向Th1反应或Treg反应转变<sup>[40-41]</sup>。

## 2.7 小麦水解肽对小肠绒毛完整性的影响

CK组小鼠空肠绒毛粗且长,排列整齐,刷状缘清晰,上皮细胞完整呈柱状,而MM组小鼠空肠绒毛大多断裂,隐窝较浅。MJ组小鼠空肠组织结构较MM组有明显改善,保护了部分空肠绒毛结构完整。然而,从绒毛根部可以看出,PWHP的保护作用更为明显,其维持了大多数空肠绒毛长度及上皮细胞形状。该发现提示了PWHP及小麦水解肽可以有效避免因小麦过敏引起的绒毛断裂、隐窝变浅,其中PWHP的预防效果更佳。

## 3 结论

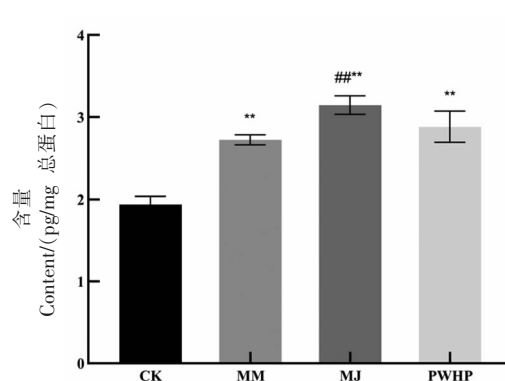
本研究制备益生菌与小麦水解肽混合物,发现益生菌在一定程度上可以协同小麦水解肽预防幼鼠小麦过敏,且与小麦水解肽单独处理时作用



注:与空白组比较,\*. 差异显著( $P<0.05$ );\*\*. 差异极显著( $P<0.01$ );与小麦蛋白过敏组比较,#. 差异显著( $P<0.05$ );##. 差异极显著( $P<0.01$ )。

图8 小鼠血清特异性IgG<sub>2a</sub>水平

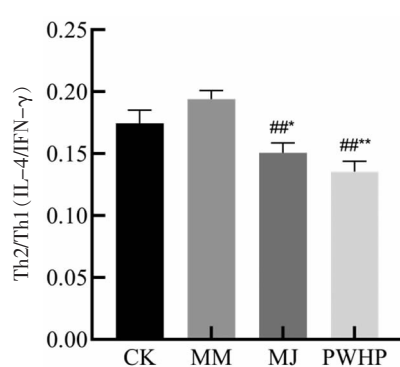
Fig.8 Specific IgG<sub>2a</sub> level in the serum of young mice



注:与空白组比较,\*. 差异显著( $P<0.05$ );\*\*. 差异极显著( $P<0.01$ );与小麦蛋白过敏组比较,#. 差异显著( $P<0.05$ );###. 差异极显著( $P<0.01$ )。

图9 小鼠脾脏IFN- $\gamma$ 水平

Fig.9 IFN- $\gamma$  level in the spleen of young mice



注:与空白组比较,\*. 差异显著( $P<0.05$ );\*\*. 差异极显著( $P<0.01$ );与小麦蛋白过敏组比较,#. 差异显著( $P<0.05$ );###. 差异极显著( $P<0.01$ )。

图10 小鼠Th2与Th1平衡

Fig.10 Balance of young mice between Th2 and Th1



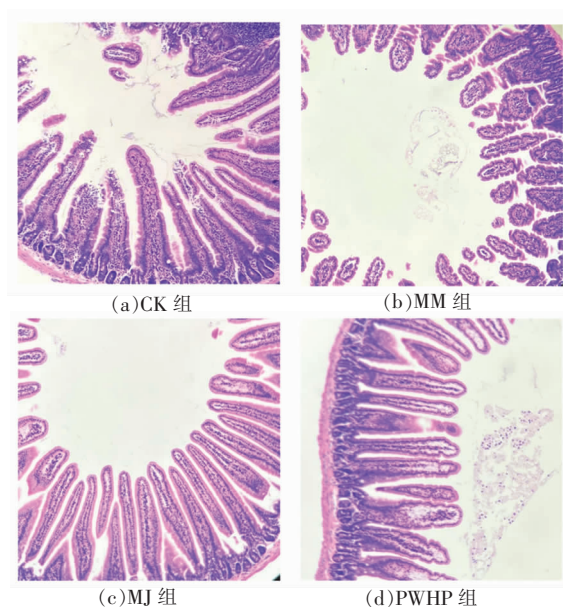


图 11 小鼠空肠染色切片

Fig.11 Stained sections of jejunum of young mice

机制不同。利用小麦过敏幼鼠模型发现,小麦水解肽可以提高免疫器官指数,上调 Th1 型反应,减轻体温下降等过敏症状,其加入乳双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌(数量比 1:1)的混合溶液后能避免肠道屏障受损,且更显著地抑制 Th2/Th1 升高。本研究证明了益生菌协同小麦水解肽、小麦水解肽可以在幼鼠体内通过不同作用诱导小麦耐受,预防幼鼠患小麦过敏,这为抗过敏产品如婴幼儿配方奶粉的创新研发提供了理论依据,也为益生菌及水解肽在预防或治疗食物过敏领域的应用提供了新思路。此外,进一步探究益生菌及水解肽对过敏反应中各信号通路(如氧化应激等)的影响,从分子水平揭示其抗过敏机制也将是未来研究的重点。

## 参 考 文 献

- [1] 王光正,周洋,卢勇莉,等. 小麦过敏原脱敏技术研究进展[J]. 现代面粉工业, 2021, 35(3): 36-39.  
WANG G Z, ZHOU Y, LU Y L, et al. Research progress of wheat allergen desensitization technology [J]. Modern Flour Milling Industry, 2021, 35(3): 36-39.
- [2] JOAN H, CORINNE A. Epidemiology of food allergy[J]. Immunology and Allergy Clinics of North America, 2018, 38(1): 13-25.
- [3] 邵洁. 儿童过敏性疾病的早期预防[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(4): 398-400.  
SHAO J. Early prevention of allergic diseases in children[J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2012, 30(4): 398-400.
- [4] SICHERER S, MORROW E, SAMPSON H. Dose-response in double-blind, placebo-controlled oral food challenges in children with atopic dermatitis[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000, 105(3): 582-586.
- [5] 王晓阳,刘传合. 儿童小麦过敏[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2021, 15(3): 338-342.  
WANG X Y, LIU C H. Wheat allergy in children [J]. Chinese Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2021, 15(3): 338-342.
- [6] 王晓阳,刘传合,邵明军,等. 儿童小麦过敏 21 例临床特征分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(17): 1316-1319.  
WANG X Y, LIU C H, SHAO M J, et al. Clinical features of 21 children with wheat allergy[J]. Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2021, 36(17): 1316-1319.
- [7] SCHERF K, BROCKOW K, BIEDERMANN T, et al. Wheat - dependent exercise - induced anaphylaxis [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2016, 46(1): 10-20.
- [8] 俞晓辉,姚文,朱伟云. 食物过敏及益生菌的预防和治疗作用[J]. 肠外与肠内营养, 2007, 14(5): 305-308, 312.  
YU X H, YAO W, ZHU W Y. Food allergy and the role of probiotics in its prevention and treatment [J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2007, 14(5): 305-308, 312.
- [9] SUPINDA B, NAN S, ALEXANDER G, et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016, 138(4): 1122-1130.
- [10] SHAH M, SAIO M, YAMASHITA H, et al. *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and suppresses allergic contact dermatitis [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2012, 35(4): 612-616.
- [11] 王玉华,王立梅,冯印,等. 鼠李糖乳杆菌菌株 LR12 和 LR76 的抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 177-180.  
WANG Y H, WANG L M, FENG Y, et al. An-



- tioxidant activity of *Lactobacillus rhamnosus* LR12 and LR76[J]. Food Science, 2009, 30(19): 177-180.
- [12] 郑州和合生物工程技术有限公司. 一种具有改善哮喘作用的益生菌组合物及其制备方法: CN202010533522.3[P]. 2020-11-27.  
Zhengzhou H&H Bioengineering Co., Ltd. A probiotic composition with improved asthma effect and its preparation method: CN202010533522.3 [P]. 2020-11-27.
- [13] 韩雪兰, 于景华, 姜中航, 等. 水解蛋白配方奶粉与婴儿过敏及肠道健康[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(1): 25-28.  
HAN X L, YU J H, JIANG Z H, et al. Hydrolyzed protein formula and infant allergy and intestinal health[J]. China Dairy Industry, 2017, 45(1): 25-28.
- [14] WATANABE J, TANABE S, WATANABE M, et al. The production of hypoallergenic wheat flour and the analysis of its allergy suppressive effects[J]. Biofactors, 2004, 22(1/2/3/4): 295-297.
- [15] MATSUO H, KOHNO K, NIIHARA H, et al. Specific IgE determination to epitope peptides of omega-5 gliadin and high molecular weight glutenin subunit is a useful tool for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis[J]. The Journal of Immunology: Official Journal of the American Association of Immunologists, 2005, 175(12): 8116-8122.
- [16] BOUKID F, PRANDI B, SFORZA S, et al. Understanding the effects of genotype, growing year, and breeding on tunisian durum wheat allergenicity. 1. The baker's asthma case[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(28): 5831-5836.
- [17] IKEZAWA Z, TSUBAKI K, YOKOTA S. Effect of hypoallergenic wheat (HAW-A1) on atopic dermatitis (AD) with wheat allergy, and its antigenic analysis using sera from patients with AD[J]. Arerugi, 1994, 43(6): 679-688.
- [18] JAMES J M, SIXBEY J P, HELM R M, et al. Wheat alpha-amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1997, 99(2): 239-244.
- [19] LIU J, CHEN X, YUE C J, et al. Effect of selenylation modification on immune-enhancing activity of *Atractylodes macrocephala* polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 1435-1440.
- [20] SON Y, KOOK S, LEE J. Glycoproteins and polysaccharides are the main class of active constituents required for lymphocyte stimulation and antigen-specific immune response induction by traditional medicinal herbal plants[J]. Journal of Medicinal Food, 2017, 20(10): 1011-1021.
- [21] LAFRENTZ B, SHOEMAKER C, BOOTH N, et al. Spleen index and mannose-binding lectin levels in four channel catfish families exhibiting different susceptibilities to flavobacterium columnare and *Edwardsiella ictaluri* [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2012, 24(3): 141-147.
- [22] 刘美兰, 陈家雪, 陈俊良, 等. 白术多糖对环磷酰胺诱导的南海麻黄鸡免疫抑制的调节作用[J]. 中国家禽, 2022, 44(5): 55-62.  
LIU M L, CHEN J X, CHEN J L, et al. Antagonism of *Atractylodes macrocephala* polysaccharide on immunosuppression caused by cyclophosphamide in Nanhai yellow chicken[J]. China Poultry, 2022, 44(5): 55-62.
- [23] 袁娟丽, 吴双双, 张冉冉, 等. 食用小麦后运动诱发过敏反应的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(8): 1-8.  
YUAN J L, WU S S, ZHANG R R, et al. Research progress on wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(8): 1-8.
- [24] 曾松荣, 庞彦韬, 柯野, 等. 大豆分离蛋白重组蛋白酶水解肽对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(8): 1-8.  
ZENG S R, PANG Y T, KE Y, et al. Effects of soybean peptides from soybean protein isolate hydrolyzed by recombinant *Aspergillus sojae* Alkaline protease on immune function and antioxidation in mice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(8): 1-8.
- [25] 吴影, 崔玉明, 乔香君, 等. 酒糟基复合益生菌剂对肉鸡生长性能及免疫功能的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022, 50(4): 8-16.  
WU Y, CUI Y M, QIAO X J, et al. Effects of compound probiotics from distiller's grains on growth performance and immune function of broilers [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2022, 50(4): 8-16.
- [26] 陈璟怡, 孙弟芬, 徐丹, 等. 三种替抗产品对肉雏

- 鸡生长性能和免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2021, 42(4): 9-14.
- CHEN J Y, SUN D F, XU D, et al. Effects of three alternatives on growth performance and immune function of broilers[J]. Feed Industry, 2021, 42(4): 9-14.
- [27] 聂颖兰, 焦玥, 吴晓霞. 鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响及机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(24): 9461-9466.
- NIE Y L, JIAO Y, WU X X. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on immune function in mice and its mechanism[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(24): 9461-9466.
- [28] 王韵婷, 刘倩, 郭子晨, 等. 双歧杆菌二联制剂对小鼠抗氧化水平及肠道菌群的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(5): 13-20.
- WANG Y T, LIU Q, GUO Z C, et al. Effects of *Bifidobacterium* double preparation on antioxidant levels and intestinal flora of mice[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(5): 13-20.
- [29] NELMS K, KEEGAN A, ZAMORANO J, et al. The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions[J]. Annual Review of Immunology, 1999, 17(17): 701-738.
- [30] GRAVERSEN K, BALLEGAARD A, KRAEMER L, et al. Cow's milk allergy prevention and treatment by heat-treated whey - A study in brown norway rats[J]. Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, 2020, 50(6): 708-721.
- [31] CALDWELL J, COLLINS M, STUCKE E, et al. Histologic eosinophilic gastritis is a systemic disorder associated with blood and extragastric eosinophilia, Th2 immunity, and a unique gastric transcriptome[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014, 134(5): 1114-1124.
- [32] MALEFYT R, FIGDOR C, HUIJBENS R, et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10[J]. The Journal of Immunology, 1993, 151(11): 6370-6381.
- [33] 张利利, 郑鹏远, 王新亭, 等. 双歧杆菌对食物过敏小鼠肠道屏障功能及 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(11): 1091-1097.
- ZHANG L L, ZHENG P Y, WANG X T, et al. Influence of *Bifidobacterium* on gut barrier function and Th1/Th2 cytokine in food allergic mice[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(11): 1091-1097.
- [34] 罗燕. 婴儿双歧杆菌超氧化物歧化酶抑制卵白蛋白诱导过敏反应的探索[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- LUO Y. The exploration of superoxide dismutase from *Bifidobacterium infantis* inhibition of ovalbumin-induced allergy[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.
- [35] 王志刚, 申改青, 黄玉焕. 咳嗽变异性哮喘患儿外周血 miR-138 及 RUNX3 对 Th1/Th2 平衡的调节作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2021, 23(10): 1044-1049.
- WANG Z G, SHEN G Q, HUANG Y H. Regulatory effects of miR-138 and RUNX3 on Th1/Th2 balance in peripheral blood of children with cough variant asthma[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2021, 23(10): 1044-1049.
- [36] SAEED N, SEDIGHEH Z, AKRAM A, et al. Measuring of IgG2c isotype instead of IgG2a in immunized C57BL/6 mice with plasmodium vivax TRAP as a subunit vaccine candidate in order to correct interpretation of Th1 versus Th2 immune response[J]. Experimental Parasitology, 2020, 216: 107944.
- [37] PONCETTE L, BLUHM J, BLANKENSTEIN T. The role of CD4 T cells in rejection of solid tumors[J]. Current Opinion in Immunology, 2022, 74: 18-24.
- [38] CHO S, STANCIU L, HOLGATE S, et al. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2005, 171(3): 224-230.
- [39] BONIFACE S, KOSCHER V, MAMESSIER E, et al. Assessment of T lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: A flow cytometry study[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2003, 33(9): 1238-1243.
- [40] SCHADE R P, VAN IEPEREN-VAN D A, VAN REIJSEN F C, et al. Differences in antigen-specific T-cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy: Relevance of TH2 cytokines[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(6): 1155-1162.

- [41] SHIN H S, EOM J E, SHIN D U, et al. Preventive effects of a probiotic mixture in an ovalbumin-induced food allergy model[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(1): 65–76.

### The Prevention of Wheat Allergy in Young Mice by Probiotics Combined with Wheat Hydrolyzed Peptides

Zeng Binghui, Liu Yujia, Du Hang, Li Boya, Che Huilian\*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

**Abstract** In order to compare the preventive effects of wheat hydrolyzed peptide as well as probiotics and their mixtures on wheat allergy in young mice, and to assess whether there is a synergistic effect between probiotics and wheat hydrolyzed peptide, a wheat allergy model was established by observing the body mass, rectal temperature, visceral index, and jejunum pathological sections of the young mice, and detecting the levels of their serum-specific immunoglobulin E (IgE) and specific immunoglobulin G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>), specific immunoglobulin G<sub>2a</sub> (IgG<sub>2a</sub>) levels, and their spleen cytokine interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5), interleukin 13 (IL-13), and gamma-interferon (IFN- $\gamma$ ) levels were determined. The results showed that early digestive intake of wheat hydrolyzed peptides significantly increased the thymus index and spleen index of young rats; significantly decreased the serum specific IgE level and specific IgG<sub>1</sub> level ( $P < 0.01$ ); significantly decreased the spleen IL-4 level ( $P < 0.05$ ) and IL-13 level ( $P < 0.01$ ); significantly increased the spleen IFN- $\gamma$  level ( $P < 0.01$ ); and significantly rebounded the rectal temperature of young rats ( $P < 0.01$ ); significantly rebound rectal temperature in young rats ( $P < 0.01$ ). Early digestive tract intake of probiotics and wheat hydrolyzed peptide mixture significantly inhibited the shifting of helper T-cell 2 (Th2) type response, with significant reduction of IL-5 level and Th2/Th1 ratio; and had a significant effect on the alleviation of jejunal pathology, such as jejunal villus breakage, shallow depth of crypt, and low height of villi. In conclusion, the synergistic wheat hydrolyzed peptide and probiotic wheat hydrolyzed peptide mixture has the potential to prevent wheat allergy in young mice, and it is expected to be used in the development of formulas for special medical purposes to prevent wheat allergy in infants and young children.

**Keywords** wheat allergy; probiotics; young mice; allergy prevention; hydrolyzed peptides