

脉冲电场辅助碱性蛋白酶处理对卵白蛋白致敏性的影响

李银丽^{1,2}, 丁婕^{1,2}, 董柳^{1,2}, 孙娜^{1,2}, 林松毅^{1,2*}

(¹大连工业大学食品学院 国家海洋食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034

²辽宁省特殊膳食用食品工程研究中心 辽宁省食品工程技术研究中心 辽宁大连 116034)

摘要 卵白蛋白(OVA)是引起鸡蛋过敏的一种主要过敏原。脉冲电场(pulsed-electric field, PEF)是一种对 OVA 诱导的过敏反应有改善作用的非热物理加工新技术。本研究基于 BALB/c 小鼠模型,通过体质量、体成分、过敏症状、组织病理学、抗体水平和炎症介质释放水平系统评价 PEF 辅助碱性蛋白酶(AL)处理对 OVA 诱导的过敏反应的影响。结果表明:PEF 辅助 AL 处理通过改善 OVA 诱导的过敏反应使小鼠机体消瘦,瘦肉和自由水含量下降的问题,显著抑制了 OVA 的致敏性。临床症状的结果表明:PEF 辅助 AL 处理改善因过敏反应引起的脏器肥大和血管渗透性增大的问题,同时显著改善因过敏反应导致的体温下降的问题。组织病理学的结果表明:PEF 辅助 AL 处理显著改善了脾脏和肺部炎症浸润的问题,使其形态更趋近于对照组。血清学结果表明,与 OVA 组相比,HOVA-PP' 组与特异性 IgE 和 IgG1 的结合水平分别降低 68.87% 和 31.20%,说明 PEF 辅助 AL 处理显著降低过敏原与特异性抗体的结合水平。此外,PEF 辅助 AL 处理显著降低组胺和肥大细胞蛋白酶-1(mouse mast cell protease-1, mMCP-1)的浓度至 51.97 ng/mL 和 51.97 pg/mL,调控 IL-4 和 IFN- γ 的释放水平,促进 Th1 和 Th2-型细胞之间的平衡,进而改善 OVA 诱导的过敏反应。

关键词 卵白蛋白; 脉冲电场; 碱性蛋白酶; 动物模型; 过敏反应

文章编号 1009-7848(2024)12-0142-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.12.013

食物过敏是机体对食物中的某种蛋白质产生不良的免疫反应所导致的一系列症状的总称^[1]。在过去的几十年里,食物过敏的发生率以每十年 1.2% 的速度增长,已成为全球关注的食品安全和公共卫生问题^[2]。鸡蛋中的氨基酸组成模式与人体的非常相似,易于人体吸收,其利用率高达 95% 以上,是人类摄入优质蛋白质的主要来源之一^[3-4]。然而,鸡蛋又是联合国粮食与农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 公布的八大过敏原之一,全球约有 2% 的婴幼儿深受鸡蛋过敏的困扰^[4]。过敏患者若长期不摄入鸡蛋及其相关制品,可能会造成机体的营养缺失^[5]。如何降低鸡蛋中致敏蛋白的致敏性成为目前亟待解决的问题。

鸡蛋中的过敏原主要分布在蛋清中,包括卵类黏蛋白(ovomuroid, OVM)、卵白蛋白(ovalbumin, OVA)、卵转铁蛋白(ovotransferrin, OVT)和溶菌酶(lysozyme, LYS),其中 OVA 是蛋清致敏

蛋白中含量最为丰富的过敏原,约占蛋清蛋白总含量的 54%^[5-6]。目前,降低蛋清过敏原的方法主要包括物理加工法^[5,7]、蛋白酶水解^[8-9]和添加抑制剂^[10-11]等。鲜少有关物理加工辅助蛋白酶水解,探讨对蛋清源致敏蛋白致敏性的研究报道。脉冲电场(pulsed electric field, PEF)是一种高效率、低能耗的非热物理加工新技术^[12],其重要通过改变蛋白质的空间构象来达到改善其功能性质的目的^[5,13]。本研究以 OVA 为研究对象,通过 BALB/c 动物模型系统评价 PEF 辅助碱性蛋白酶(alcalase, AL)处理对 OVA 致敏性的影响,拓展鸡蛋在食品工业领域的应用范围。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

卵白蛋白(ovalbumin, OVA)、伊文思蓝染料、苏木精水溶液, Sigma 公司;碱性蛋白酶(alcalase, AL),诺维信生物技术有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;Imject™ Alum Adjuvant, Thermo 公司;乙二胺四乙酸,上海生工生物工程有限公司;甲醛、甲苯胺蓝,上海麦克林生化科技股份有限公司;大鼠单克隆抗体

收稿日期: 2023-12-15

基金项目: 江西省重大科技研发专项(20203ABC28W015)

第一作者: 李银丽,女,博士生

通信作者: 林松毅 E-mail: linsongyi730@163.com

[23G3]抗小鼠 IgE、山羊抗小鼠 IgG1 (HRP) 预吸附二抗、Streptavidin (HRP), Abcam 公司; 小鼠组胺 ELISA 检测试剂盒、小鼠肥大细胞蛋白酶-1 (mMCP-1) ELISA 检测试剂盒、小鼠白细胞介素 4 (IL-4) 试剂盒、小鼠白细胞介素 10 (IL-10) 试剂盒和小鼠干扰素 γ (IFN- γ) 试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司。

1.2 实验动物

雌性 BALB/c 小鼠 (3~4 周龄, 16 g \pm 2 g, SPF 级) 由辽宁长生生物技术股份有限公司 (生产许可证号: SCXK(辽)2020-0001) 提供。所有动物实验都严格按照实验室动物护理和使用协议进行, 并得到大连工业大学实验动物伦理委员会的批准 (许可证号: DLP2020034)。饲养在 SPF 级的动物房中, 在饲养期间小鼠自由的摄食、饮水, 环境温度控制在 (20 \pm 2) $^{\circ}$ C, 湿度控制在 (50 \pm 10)%。

1.3 仪器与设备

核磁共振成像分析仪 (MesoQMR23-060H), 上海纽迈电子科技有限公司; 酶标定量测定仪 (Infinite M200), 帝肯 (上海) 实验器材有限公司; 脉冲电场处理系统 (DMC-200), 大连鼎通科技发展有限公司; 组织研磨器 (BN01860), 上海书培实验设备有限公司; 微量台式离心机 (MICRO 17R), Thermo 公司; 冷冻干燥机 (SCIENTZ-10ND), 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 过敏原水解物的制备 按照 Li 等^[9]的方法制备 OVA 的水解物。简而言之, 将未经脉冲电场 (Pulsed electric field, PEF) 处理或经过 PEF 处理的 5 mg/mL 的 OVA 溶液置于 (37 \pm 1) $^{\circ}$ C 水浴中预热 10 min 后用 50 mmol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 10.0。然后以酶与底物的比例为 1:20 加入未经 PEF 处理或经过 PEF 处理的 0.25 mg/mL 的 AL 溶液, 连续搅拌并保持 pH 值为 10.0。样品水解 120 min 后放入 100 $^{\circ}$ C 沸水浴中 10 min 终止反应, 最后分装放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。其中 OVA 和 AL 的水解样品命名为 HOVA; PEF 处理的 OVA 和 PEF 处理的 AL 的水解样品命名为 HOVA-PP'。

1.4.2 OVA 致敏模型的建立 按照 Liu 等^[10]的方法略作修改进行致敏模型的建立, 具体的如图 1a 所示。小鼠在动物房适应 7 d 后, 按体重随机分为

5 组, 分别为: 对照组、佐剂组、OVA 组、HOVA 组和 HOVA-PP' 组。从第 7 天开始, 实验组每 7 天腹腔注射 1 次过敏原, 共注射 5 次。对照组用 PBS 代替过敏原, Alum 组注射和实验组等量的佐剂。同时每隔 7 d 记录 1 次小鼠的摄食和饮水, 在第 42 天先测定小鼠的体质量, 接着实验组的小鼠通过腹腔注射分别注射 500 μ g 的过敏原进行大剂量刺激, 20 min 后进行眼部内眦采血, 置于含 EDTA-K2 的抗凝剂的 EP 管, 在 4 $^{\circ}$ C 下 5 000 r/min 离心 10 min 得到血浆, 存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。接着进行腹腔液的抽取和眼球采血, 4 $^{\circ}$ C 下 5 000 r/min 离心 10 min 得到血清, 最后采用颈椎脱臼法使小鼠安乐死, 取小鼠的脾脏和肺放入 10% 的甲醛溶液中固定进行组织病理学分析。

1.4.3 体成分的测定 按照 Liu 等^[14]的方法略作修改测定小鼠的体成分。简而言之, 在第 1 次腹腔注射之前, 各组小鼠禁食 6~8 h 后称量小鼠的体质量, 然后把小鼠置于测定体成分测定的圆筒中固定, 测定各组小鼠体内的瘦肉、脂肪和自由水的含量。每 7 天测定 1 次小鼠的体成分变化, 共测定 7 次。最终的数据用去掉最大值和最小值, 取平均值 \pm 标准差表示。

1.4.4 脏器系数的测定 按照 Zhao 等^[15]的方法略作修改测定小鼠的脏器系数。即小鼠禁食 12 h 后, 记录各组小鼠体重, 大剂量刺激后安乐死。取小鼠的脾脏、胸腺和肺, 并立即记录各脏器质量, 脏器系数的计算公式:

$$\text{脏器系数}(\%) = \frac{\text{脏器质量}(\text{g})}{\text{小鼠体质量}(\text{g})} \times 100 \quad (1)$$

1.4.5 血管渗透性的测定 首先是按照 Candreva 等^[16]的方法略作修改进行尾静脉注射, 即大刺激前尾静脉注射 100 μ L 的 0.5% 的伊文思蓝溶液, 然后通过腹腔注射的方式注射过敏原 500 μ g, 40 min 后观察小鼠脚掌渗出物的颜色并拍照记录。按照 Sun 等^[17]的方法测定小鼠腹腔白蛋白的浓度, 即小鼠大刺激后 30 min 左右, 向小鼠的腹腔注射 3.0 mL 含 10 mmol/L 的 EDTA 的 PBS 溶液, 腹部按摩 60 s 后抽出腹腔液。在 4 $^{\circ}$ C 下 600 r/min 离心 5 min 后取上清液于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。上清液中的白蛋白浓度用 BCA 试剂盒的生产商家的说明书进行测定。

1.4.6 耳部温度的测定 按照 Zhang 等^[8]的方法略作修改测定小鼠的体温。简而言之,大刺激之前每只小鼠测定 3 次其耳朵内部的温度,大刺激完成 20 min 后每只小鼠再测定 3 次耳朵内部的温度,结果分析首先取每只小鼠的温度平均值,然后再计算每组小鼠的温度平均值。

1.4.7 组织病理学染色 小鼠的脾脏和肺部分别先用 10%的甲醛溶液固定,然后对固定好的脏器进行透明处理,再用石蜡进行包埋。包埋完成后进行切片,厚度一般为 4~6 μm 。然后对切片进行脱蜡和苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H&E)处理后,进行组织病理学的观察^[8]。

1.4.8 血清中特异性 IgE 和 IgG1 的测定 血清中特异性 IgE 的水平采用间接 ELISA 法进行检测^[9],具体如下:将不同电场强度处理的样品分别用 0.05 mol/L 碳酸钠缓冲液 (pH 9.6) 稀释至 10 mg/L,然后向 96 孔 ELISA 板上每孔加入 100 μL 的样品溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,每个样品做 6 孔平行实验;第二天把 96 孔板内样品溶液倒掉后每孔再依次加入 250 μL PBS/0.1% BSA-Tween 20 洗涤液室温振荡 5 min,倒出并在无尘纸上拍打数次,直至孔内无明显液滴为止,重复 3 次。然后每孔加入 150 μL PBS/1%BSA 封闭液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中封闭 60 min 后倒出封闭液并洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 稀释过后的致敏血清 (1:10, V/V) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中温育 120 min,洗涤 6 次。每孔加入 100 μL 生物素标记的大鼠抗小鼠 IgE (1:2 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,洗涤 6 次。接着每孔加入 100 μL HRP 标记的链霉亲和素 (1:4 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,洗涤 6 次。然后每孔加入 100 μL TMB 显色液后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中显色 15 min,最后每孔加入 50 μL 1.0 mol/L 硫酸终止液终止颜色反应,并在终止显色 30 min 内用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长下的吸光值。特异性 IgG1 的测定:方法与特异性 IgE 测定的方法相似,不同的是在血清样品孵育并洗涤后,每孔加入 100 μL HRP 标记的羊抗小鼠 IgG1 二抗 (1:2 000) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,洗涤 6 次后直接加入 TMB 显色液进行显色反应。

1.4.9 组胺和 mMCP-1 浓度的测定 按照试剂盒生产商提供的说明书测定 PEF 辅助 AL 处理对过

敏原诱导的过敏小鼠体内组胺和 mMCP-1 浓度的影响。

1.4.10 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的测定 按照试剂盒生产商提供的说明书测定 PEF 辅助 AL 处理对过敏原诱导的过敏小鼠体内细胞因子 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 释放水平的影响。

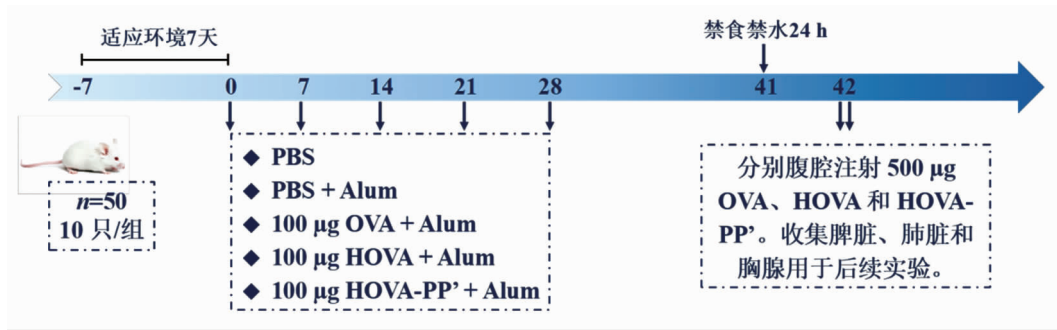
1.5 统计学分析

数据图像的处理通过 Origin Pro 8.5 (Origin Lab, USA) 软件进行;数据分析采用 SPSS 16 数据统计软件的单因素方差进行显著性分析。图中 * 表示两组之间存在显著性差异 ($P>0.05$), ** 表示两组之间存在极显著性差异 ($P>0.01$)。

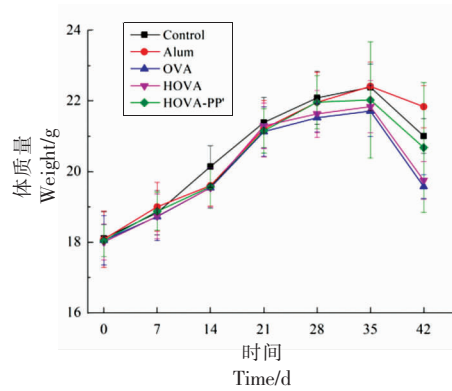
2 结果与讨论

2.1 PEF 辅助 AL 处理对小鼠体质量及其体成分的影响

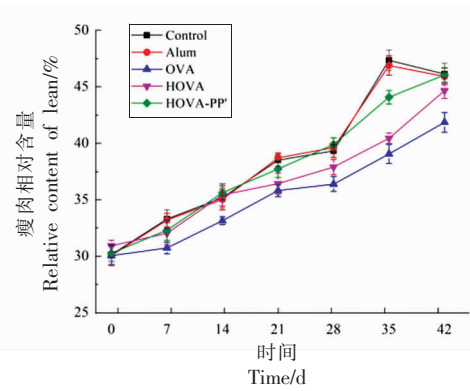
小鼠的体质量是衡量致敏模型是否成功建立的因素之一^[20]。图 1b 显示,在 0~21 d 期间小鼠各个组别之间的体质量没有显著的差异,但是 28~42 d 期间 OVA 组的体质量显著的降低,说明过敏反应使小鼠机体消瘦,而 HOVA-PP' 组的体质量更趋近于对照组和佐剂组,说明 PEF 辅助 AL 处理显著改善因 OVA 诱导的过敏反应使小鼠机体消瘦的问题。过敏反应使小鼠机体消瘦的同时也引起小鼠体成分发生变化。从图 1c~图 1e 可知, OVA 组的小鼠的瘦肉、脂肪和自由水的相对含量都显著低于对照组,说明过敏反应使小鼠机体消瘦的同时使小鼠的体成分发生了显著的变化。小鼠体内的瘦肉含量整体上呈现升高的趋势,说明随着周龄的增长,小鼠体内的瘦肉含量相对增多;而自由水先后对含量则随着周龄的增长呈现下降的趋势,说明随着机体的衰老,机体内的自由水含量降低,即机体呈现衰老的趋势^[14]。而脂肪的含量整体上呈现先增高后降低的趋势,也说明了机体在衰老的过程中脂肪含量的变化趋势^[21]。此外,脂肪相对含量的变化趋势与体质量的变化趋势一致,也说明脂肪相对含量是决定小鼠体质量的关键因素。最后,佐剂组与对照组的体成分变化没有显著的差异,说明佐剂不会引起过敏反应,小鼠体成分的变化都是由于过敏原引起的;且 PEF 辅助 AL 处理通过改善小鼠的体成分,进而说明其显著



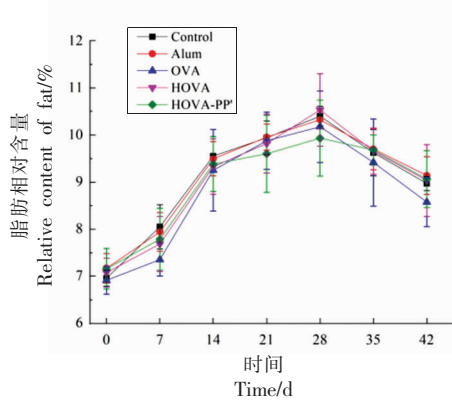
(a) 动物模型的设计



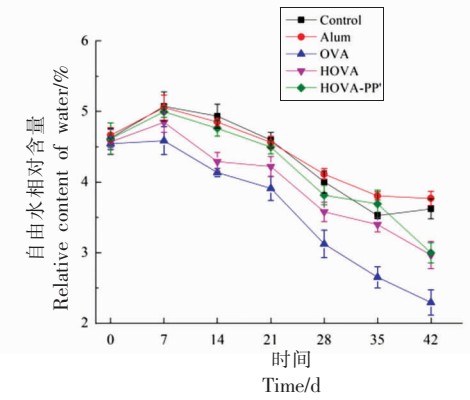
(b) PEF 辅助 AL 处理对小鼠体质量的影响



(c) PEF 辅助 AL 处理对小鼠瘦肉含量的影响



(d) PEF 辅助 AL 处理对小鼠脂肪含量的影响



(e) PEF 辅助 AL 处理对小鼠自由水含量的影响

图 1 PEF 辅助 AL 处理对小鼠体质量及其体成分的影响

Fig.1 Effects of PEF-assisted AL treatment on body weight and body composition of mice

抑制 OVA 诱导的过敏反应。

2.2 PEF 辅助 A 处理对小鼠脏器系数的影响

PEF 辅助 AL 处理对小鼠脏器系数的影响如图 2 所示。与对照组相比, OVA 组的脾脏系数、肺脏系数和胸腺系数从 0.78%, 0.61% 和 0.18% 分别升高到 1.39%, 0.76% 和 0.22%, 说明过敏反应使脾脏、肺部和胸腺出现了肥大问题。与 OVA 组相比, HOVA 组和 HOVA-PP' 组的脾脏系数显著降低, HOVA 组的肺脏系数和胸腺系数没有发生显

著的变化, 而 HOVA-PP' 组的肺脏系数和胸腺系数显著降低, 说明了 PEF 辅助 AL 处理可以显著改善因过敏反应诱导的脏器肥大的问题, 进而说明 PEF 辅助 AL 处理显著改善了 OVA 诱导的过敏反应^[22]。此外, 脏器系数增大说明过敏反应增加了小鼠脏器的占比, 使小鼠机体处于亚健康状态。亚健康的状态会影响小鼠的食欲和消化能力, 进而使小鼠的体质量在饲养后期呈显著下降趋势^[23]。小鼠食欲不振和消化不良导致的机体消瘦, 就会

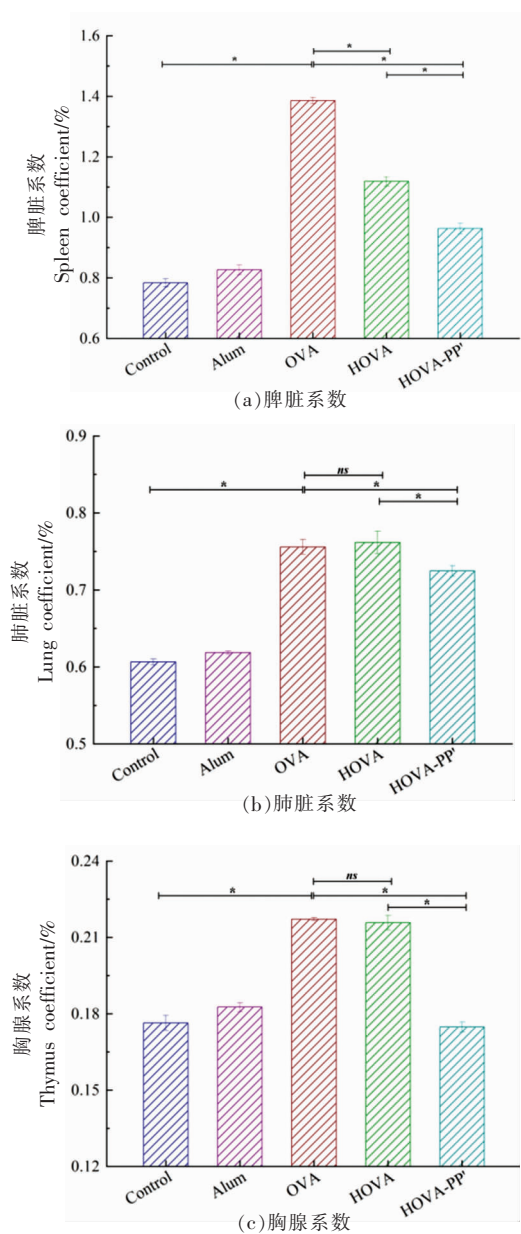


图2 PEF辅助AL处理对小鼠脏器系数的影响

Fig.2 Effect of PEF-assisted AL treatment on organ coefficient in mice

使体内的脂肪和自由水等含量降低,进而影响了小鼠的体成分,脏器系数的结果也佐证了小鼠体成分的结果。

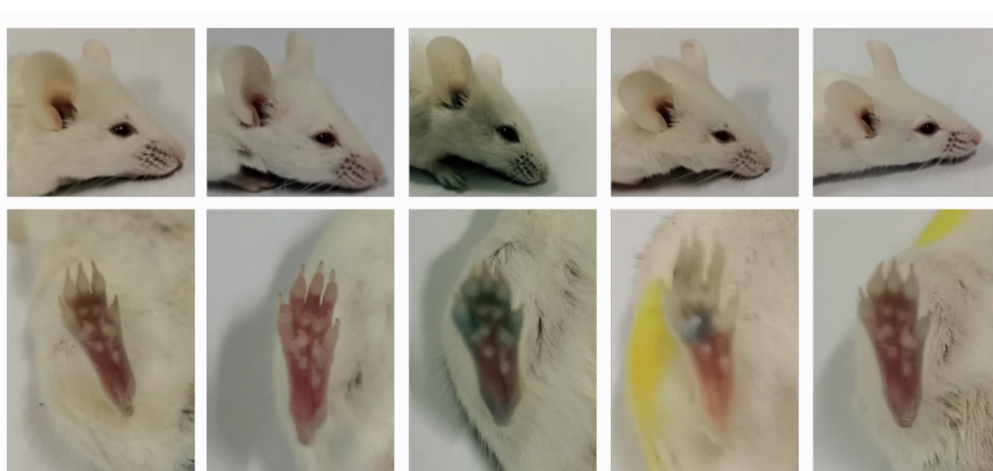
2.3 PEF辅助AL处理对血管渗透性及温度的影响

过敏反应会引起机体的血管渗透性增加,使血液中的活性颗粒释放到体液中进而引起炎症反应^[24-25]。所以,接下来我们通过尾静脉注射伊文思

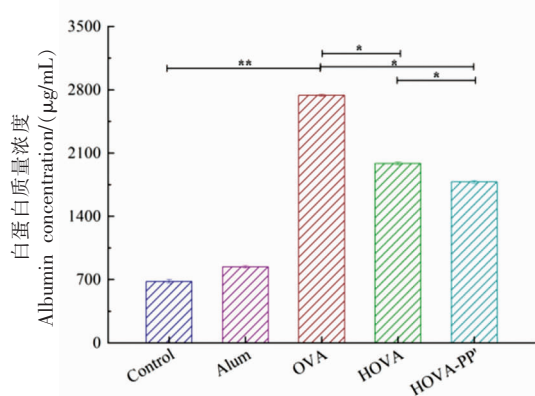
蓝染料和腹腔注射EDTA溶液分别从定性和定量两方面探究了PEF辅助AL处理对小鼠血管渗透性的影响。如图3a所示,对照组和佐剂组小鼠的脚掌没有明显的颜色变化,而OVA组小鼠的整个脚掌呈现为蓝色,说明OVA诱导的过敏反应使小鼠的血管渗透性明显增加。HOVA的小鼠脚掌部分呈现为蓝色,说明AL处理改善OVA诱导的过敏反应;而HOVA-PP'组的小鼠脚掌没有明显的蓝色则说明PEF辅助AL处理进一步改善OVA诱导的过敏反应。

由于肉眼观察无法准确的判断不同组别之间的具体差异,所以接下来通过腹腔液的白蛋白水平定量的判断血管渗透性的变化。从图3b中可知,与对照组相比,OVA组白蛋白水平从679.00 $\mu\text{g/mL}$ 分别增加到2737.96 $\mu\text{g/mL}$,说明OVA诱导的过敏反应使小鼠的血管渗透性成倍的增加。而HOVA组和HOVA-PP'组的白蛋白质量浓度分别为1983.59,1779.52 $\mu\text{g/mL}$,说明AL水解可以显著改善过敏反应引起的血管渗透性增大的问题,而PEF辅助AL处理可以进一步改善OVA诱导的过敏反应使血管渗透性增大的问题^[19]。以上结果说明PEF辅助AL处理显著改善了过敏反应引起的血管渗透性增大的问题,抑制OVA诱导的过敏反应。

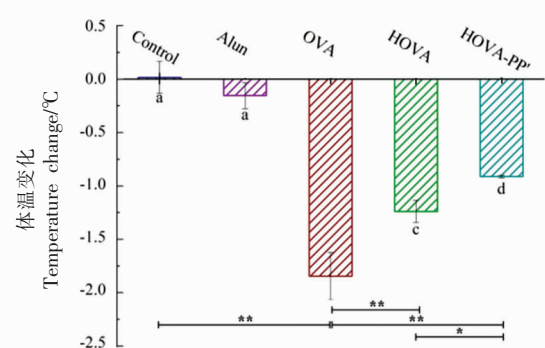
血管渗透性增大引起的炎症反应释放 β -氨基己糖苷酶、白三稀和组胺等颗粒介质进而引起机体血管壁平滑肌舒张、血压下降、体温下降等症状^[26]。PEF辅助AL处理对小鼠机体温度的影响如图3c所示。结果表明对照组的小鼠体温在大刺激前后没有显著的变化,Alum组小鼠的体温虽然有略微降低的趋势,但是与对照组没有显著的差异。OVA组、HOVA组和HOVA-PP'组小鼠的机体的温度分别下降1.87,1.25 $^{\circ}\text{C}$ 和0.92 $^{\circ}\text{C}$ 。Shi等^[27]发现OVA诱导的过敏反应可以显著降低小鼠的直肠温度,当口服芸香柚皮苷时小鼠的过敏症状得到改善,其温度的下降程度也变小。以上结果表明过敏反应会引起机体温度降低,且温度降低程度与过敏反应的程度正相关,而PEF辅助AL处理显著的改善因OVA诱导的过敏反应引起的机体温度降低的现象,说明PEF辅助AL处理显著的抑制了OVA诱导的过敏反应。



(a)伊文思蓝处理后小鼠脚掌渗出物颜色



(b)过敏原大刺激 30 min 后腹腔液白蛋白水平的变化



(c)PEF 辅助 AL 处理对小鼠大刺激前后温度的影响

图 3 PEF 辅助 AL 处理对小鼠血管渗透性及温度的影响

Fig.3 Effect of PEF-assisted AL treatment on vascular permeability and temperature in mice

2.4 PEF 辅助 AL 处理对组织病理学的影响

过敏反应引起的脏器肥大的同时会使小鼠的脏器发生一系列的炎症反应^[29]。所以接下来通过 H&E 染色的方法分析 PEF 辅助 AL 处理对小鼠脾脏和肺部的组织病理学的影响。从图 4a 可知, 对照组和佐剂组脾脏的病理学切片形态正常, 未发生明显的炎症症状; OVA 组的脾脏组织出现淋巴结增生和严重受损的现象, 同时还伴有少量的炎症浸润, 但是 HOVA 组脾脏淋巴结增生和受损的程度明显减轻, 说明 AL 处理使过敏原诱导的过敏反应程度显著降低; HOVA-PP' 组脾脏病理学的淋巴结增生进一步减轻, 其形貌更趋近于对照组, 说明 PEF 辅助 AL 处理进一步改善 OVA 诱导的食物过敏反应。

肺部组织的变化是反应过敏程度的另一个重

要的指标^[28]。图 4b 中对照组和佐剂组是正常的肺部组织的形态, 而 OVA 组的肺部组织出现严重的炎症浸润症状, 肺部支气管内膜上皮增生, 肺部出现严重的充血现象, 同时肺泡间隔增厚, 组织结构遭到严重的破坏, 形状各异。而 HOVA 组肺泡间隔增厚的现象得到明显的改善, 但是肺泡间隙可以观察到明显的炎症症状, 说明 AL 处理显著改善 OVA 诱导的过敏反应。HOVA-PP' 组肺部组织得到进一步的改善, 肺泡结构变得更完整, 肺泡间隙的炎症症状得到显著的改善^[28]。肺部组织病理学切片的结果说明 PEF 辅助 AL 处理进一步改善 OVA 诱导的过敏反应。

2.5 PEF 辅助 AL 处理对过敏原与特异性 IgE 和 IgG1 结合水平的影响

从致敏动物模型中获取的致敏血清是由多种

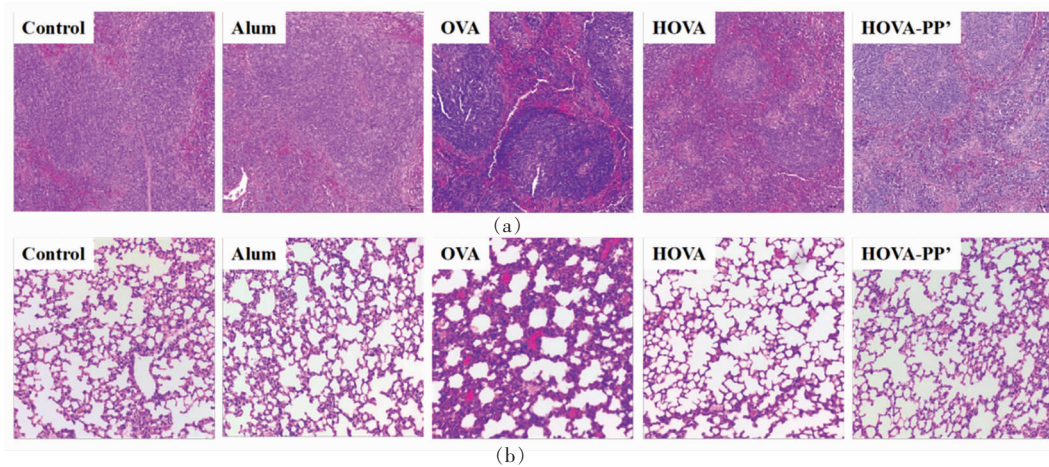


图4 PEF辅助AL处理对小鼠脾脏组织病理学(a)和肺部组织病理学(b)的影响

Fig.4 Effect of PEF-assisted AL treatment on spleen histopathology (a) and lung histopathology (b) in mice

抗体组成的免疫分子的集合, 这些抗体与其对相应的抗原特异性反应^[29]。PEF辅助AL处理对OVA与血清中特异性抗体IgE和IgG1的结合水平的如图5所示。与OVA组相比,HOVA组和HOVA-PP'组与特异性IgE结合水平分别降低了41.62%和68.87%,说明PEF辅助AL处理可以进一步改善OVA诱导的过敏反应,显著降低与特异

性IgE的结合水平。与特异性抗体IgG1结合水平的变化趋势与特异性IgE相似,即与OVA组相比,HOVA组和HOVA-PP'组与特异性IgG1结合水平分别降低了16.26%和31.20%。此外,与特异性IgE结合水平的降低程度显著高于与特异性IgG1结合水平,说明PEF辅助AL处理对特异性IgE分泌水平的影响较为敏感^[30]。

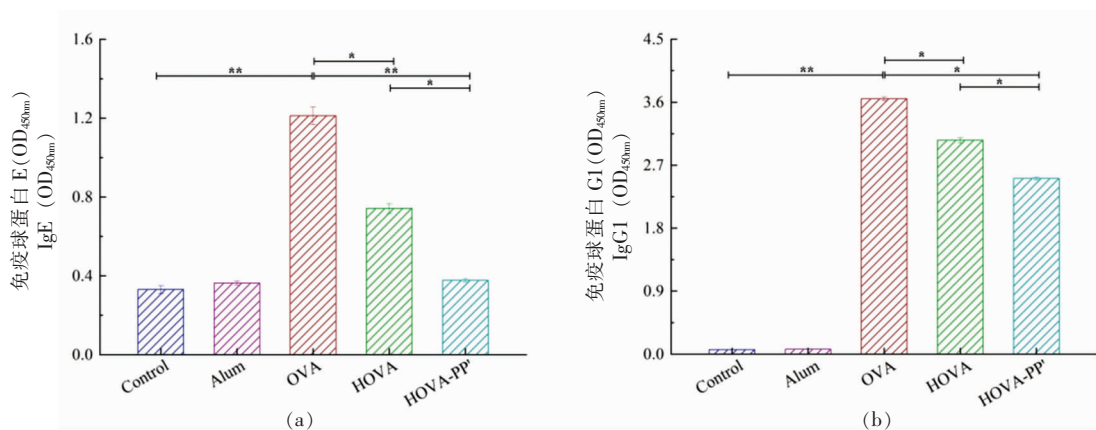


图5 PEF辅助AL处理对过敏原与特异性IgE(a)和IgG1(b)结合水平的影响

Fig.5 Effect of PEF-assisted AL treatment on the binding levels of allergens to specific IgE (a) and specific IgG1(b)

2.6 PEF辅助AL处理对炎症介质释放水平的影响

血浆中的组胺主要由肥大细胞或嗜碱性粒细胞产生的,是表示过敏反应的关键指标^[31]。机体发生过敏反应时,由于血管渗透性的增加导致血浆中组胺水平显著提高。对照组、佐剂组、OVA组、HOVA组和HOVA-PP'组的组胺质量浓度分别为

21.52,31.05,162.82,69.49 ng/mL和51.97 ng/mL, OVA诱导的过敏反应使血浆内的组胺浓度显著提高,而与OVA组相比,HOVA组和HOVA-PP'组的组胺浓度显著降低,说明PEF辅助AL处理进一步降低了OVA诱导的过敏反应,也佐证了血管渗透性的结果。mMCP-1是肠道通透性增加和黏膜肥大细胞增殖的标志,也是过敏小鼠肥大细

胞激活的标志^[32-33]。与对照组(30.89 pg/mL)相比, OVA 组(191.58 pg/mL)的 mMCP-1 浓度显著提高; 而与 OVA 组相比, HOVA-PP' 组(51.97 pg/mL)的 mMCP-1 浓度显著降低, 说明 PEF 辅助 AL 处理显著降低血浆中 mMCP-1 的浓度。Lozano-Ojalvo 等^[34]观察到高压联合胃蛋白酶处理可显著降低乳清蛋白致敏血清中 mMCP-1 的浓度, 还注意到仅通过胃蛋白酶处理或高压处理的乳清蛋白中 mMCP-1 浓度显著高于高压联合胃蛋白酶处理组。以上结果表明两种或者两种以上的加工方式协同处理可以更好的抑制过敏原诱导的过敏反应。

最后, 通过 IL-4 和 IFN- γ 的分泌水平评价 PEF 辅助 AL 处理对 OVA 致敏性的影响^[35]。结果

表明与对照组相比, OVA 组的 IL-4 和 IFN- γ 的分泌水平显著升高, 说明 OVA 诱导的过敏反应使炎症介质释放水平显著提高。与 OVA 组相比, HOVA-PP' 组的 IL-4 释放水平显著降低, 而 IL-4 主要是促进炎症发生的 Th2-型细胞分泌, 所以该结果说明 PEF 辅助 AL 处理可以抑制炎症因子的发生, 降低过敏原诱导的过敏反应^[30]。与 OVA 组相比, HOVA-PP' 组的 IFN- γ 释放水平进一步提高, 而 IFN- γ 主要由调节细胞免疫和介导免疫细胞应答的 Th1-型细胞分泌。以上结果说明 PEF 辅助 AL 处理通过调节 Th1-和 Th2-型细胞之间的平衡, 显著改善了 OVA 诱导的过敏反应, 同时也验证了 Th1-和 Th2-型细胞之间的拮抗关系^[31]。

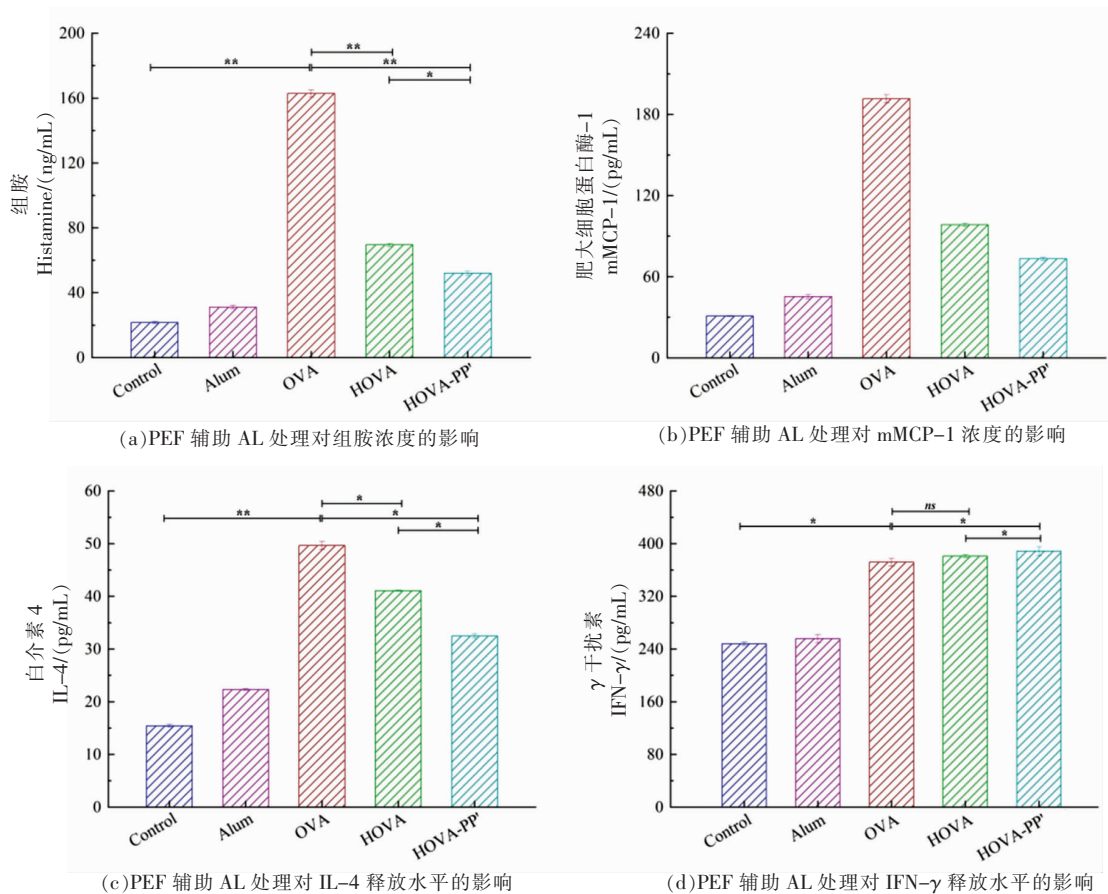


图 6 PEF 辅助 AL 处理对炎症介质释放水平的影响

Fig.6 Effect of PEF-assisted AL treatment on the release level of inflammatory mediators

3 结论

本研究基于 BALB/c 动物实验, 通过体成分、临床症状、组织病理学、抗体水平和炎症介质释放

水平系统地评价了 PEF 辅助 AL 处理对 OVA 致敏性的影响。结果表明, PEF 辅助 AL 处理通过进一步改善小鼠的体成分, 改善因 OVA 诱导的过敏

反应使血管渗透性增大和体温下降的症状,显著抑制了OVA诱导的过敏反应。此外,脾脏和肺部的炎症浸润症状得到显著改善,再次说明PEF辅助AL处理抑制OVA的致敏性。最后,过敏原与特异性抗体结合水平的降低和对炎症介质释放水平的调控作用,从血清学和血浆学的角度说明PEF辅助AL处理显著改善OVA诱导的过敏反应。本研究为生产低致敏性或脱敏性蛋制品提供一定的理论基础,同时也拓宽了PEF技术在食品工业领域的应用范围。

参 考 文 献

- [1] ZHOU F, HE S, SUN H, et al. Advances in epitope mapping technologies for food protein allergens: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 107: 226-239.
- [2] GAZME B, REZAEI K, UDENIGWE C C. Epitope mapping and the effects of various factors on the immunoreactivity of main allergens in egg white[J]. Food & Function, 2022, 13(1): 38-51.
- [3] ZHU Y, VANG S K, WAN J, et al. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 78: 188-196.
- [4] LI Y, DING J, ZHANG S, et al. Pulsed electric field-assisted alcalase treatment reduces the allergenicity and eliminates the antigenic epitopes of ovomucoid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(7): 3424-3432.
- [5] LI Y, DING J, DONG L, et al. Mechanism of targeted regulation of ovalbumin epitopes by pulsed electric field-assisted alcalase treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(27): 10417-10426.
- [6] LESNIEROWSKI G, STANGIERSKI J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 71: 46-51.
- [7] YANG W, TU Z, WANG H, et al. Immunogenic and structural properties of ovalbumin treated by pulsed electric fields[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(sup3): 3164-3176.
- [8] KOVACS-NOLAN J, ZHANG J, HAYAKAWA S, et al. Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(12): 6261-6266.
- [9] YANG A, LONG C, XIA J, et al. Enzymatic characterisation of the immobilised alcalase to hydrolyse egg white protein for potential allergenicity reduction [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(1): 199-206.
- [10] LIU Q, ZHANG Y, GAO Y, et al. Coumarin alleviates ovalbumin-induced food anaphylaxis in a mouse model by affecting mast cell function[J]. Food & Function, 2019, 10(10): 6767-6778.
- [11] HAN J, LIU B, LIU Q M, et al. Red algae sulfated polysaccharides effervescent tablets attenuated ovalbumin-induced anaphylaxis by upregulating regulatory T cells in mouse models [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(43): 11911-11921.
- [12] ZHANG S, SUN L, JU H, et al. Research advances and application of pulsed electric field on proteins and peptides in food[J]. Food Research International, 2021, 139(6): 109914.
- [13] 傅玲琳, 王彦波. 食物过敏:从致敏机理到控制策略 [J]. 食品科学, 2021, 42(19): 1-19.
- [13] FU L L, WANG Y B. Food allergy: From sensitization mechanism to control strategy[J]. Food Science, 2021, 42(19): 1-19.
- [14] LIU Y, MA N, SUN X, et al. Effect of intake pattern of sulfated polysaccharides on its biological activity in high fat diet-fed mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 9-16.
- [15] ZHAO Y, LU Z, XU X, et al. Sea cucumber-derived peptide attenuates scopolamine-induced cognitive impairment by preventing hippocampal cholinergic dysfunction and neuronal cell death[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(2): 567-576.
- [16] CANDREVA A M, SMALDINI P L, CURCIARELLO R, et al. The major soybean allergen Gly m Bd 28K induces hypersensitivity reactions in mice sensitized to cow's milk proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(7): 1590-1599.
- [17] SUN N, TEKUTYEVA L, WANG S, et al. A mod-

- ified weight-of-evidence approach to evaluate the allergenic potential of food proteins[J]. *Toxicology Research*, 2015, 4(2): 476–485.
- [18] ZHANG Z, LI Z, LIN H. Reducing the allergenicity of shrimp tropomyosin and allergy desensitization based on glycation modification[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(49): 14742–14750.
- [19] 孙娜. 细胞模型用于食物蛋白致敏性评价及过敏机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- SUN N. Study on potential allergenicity of food proteins and the mechanism of food allergy using cell model[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [20] 胡昕. 日本沼虾原肌球蛋白致敏对巨噬细胞极化的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- HU X. Effects of sensitization induced by *Macrobrachium nipponense* tropomyosin on macrophage polarization[D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.
- [21] 赵薇. MDM2 通过泛素介导的 STEAP4 降解加剧脂肪组织功能障碍[D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.
- ZHAO W. MDM2 aggravates adipose tissue dysfunction through ubiquitin-mediated STEAP4 degradation [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2022.
- [22] HE S, ZHAO J, ZHANG Y, et al. Effects of low-pH treatment on the allergenicity reduction of black turtle bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lectin and its mechanism[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(4): 1379–1390.
- [23] WANG Y, SUN J, XUE L, et al. L-arabinose attenuates gliadin-induced food allergy via regulation of Th1/Th2 balance and upregulation of regulatory T cells in mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(12): 3638–3646.
- [24] GAO Y, LIU Q, LIU B, et al. Inhibitory activities of compounds from the marine actinomycete *Williamsia* sp. MCCC 1A11233 variant on IgE-mediated mast cells and passive cutaneous anaphylaxis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(49): 10749–10756.
- [25] LIU Q M, XIE C L, GAO Y Y, et al. Deep-sea-derived butyrolactone I suppresses ovalbumin-induced anaphylaxis by regulating mast cell function in a murine model[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(22): 5581–5592.
- [26] 梁肖娜. 酶法脱敏对牛乳主要过敏蛋白致敏性机制影响的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022.
- LIANG X N. Effect of enzymatic desensitization on the sensitization mechanism of major allergenic proteins in cow milk[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2022.
- [27] SHI X, ZHAO L, NIU L, et al. Oral intervention of narirutin ameliorates the allergic response of ovalbumin allergy[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(41): 13313–13326.
- [28] ZHAO L, SHI F, XIE Q, et al. Co-fermented cow milk protein by *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 and *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0386 attenuates its allergic immune response in BALB/c mice[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(9): 7190–7202.
- [29] HIROTA K, KAMASHIMA T, HASHIDA S, et al. Immune complex transfer enzyme immunoassay for anti-ovalbumin IgA in serum[J]. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2002, 39(5): 482–486.
- [30] XU J, YE Y, JI J, et al. Untargeted metabolomic profiling reveals changes in gut microbiota and mechanisms of its regulation of allergy in OVA-sensitive BALB/c mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(10): 3344–3356.
- [31] ZHAO J, ZENG J, LIU Y, et al. Understanding the mechanism of increased IgG/IgE reactivity but decreased immunodetection recovery in thermally induced Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) tropomyosin via multispectroscopic and molecular dynamics simulation techniques[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(7): 3444–3458.
- [32] WU Y, LU Y, HUANG Y, et al. Comparative analysis of glycosylation affecting sensitization by regulating the cross-reactivity of parvalbumins in turbot (*Scophthalmus maximus*), conger eel (*Conger myriaster*) and sea bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(34): 10611–10619.
- [33] XIE Q, MU K, CHEN C, et al. The high dose of inulin exacerbated food allergy through the excess accumulation of short-chain fatty acids in a BALB/c mouse model[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 230: 123234.
- [34] LOZANO-OJALVO D, PÉREZ-RODRÍGUEZ L, PABLOS-TANARRO A, et al. Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoal-

- lergenic hydrolysates[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2017, 43: 154–162.
- [35] QU Q Y, SONG X Y, LIN L, et al. *L*-theanine modulates intestine-specific immunity by regulating

the differentiation of CD4+ T cells in ovalbumin-sensitized mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(47): 14851–14863.

Effect of Pulsed Electric Field-Assisted Alcalase Treatment on Sensitization of Ovalbumin

Li Yinli^{1,2}, Ding Jie^{1,2}, Dong Liu^{1,2}, Sun Na^{1,2}, Lin Songyi^{1,2*}

(¹National Engineering Research Center of Seafood, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

²Engineering Research Center of Food of Liaoning Province, Engineering Research Center of Special Dietary Food of Liaoning Province, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract Ovalbumin (OVA) is one of the main allergens that cause egg allergy, and pulsed electric field (PEF) is an emerging non-thermal physical processing technology that has an ameliorative effect on OVA-induced allergic reactions. Based on the BALB/c mouse model, the effects of PEF-assisted alcalase (AL) treatment on OVA-induced allergic reactions were systematically evaluated by body weight, body composition, allergy symptoms, histopathology, antibody levels, and inflammatory mediators release levels. The results showed that PEF-assisted AL treatment ameliorated the body composition changes caused by OVA-induced allergic reactions by improving body weight, lean content and free water content in mice. The results of clinical symptoms showed that PEF-assisted AL treatment improved the problems of hypertrophy and increased vascular permeability caused by allergic reactions, and significantly improved the problems of body temperature drop caused by allergic reactions. The histopathological results showed that PEF-assisted AL treatment significantly improved the inflammatory infiltration of spleen and lung, and made their morphology more similar to that of the control group. Serological results showed that, compared with OVA group, the binding levels of specific IgE and IgG1 in HOVA-PP' group were decreased by 68.87% and 31.20%, respectively, indicating that PEF-assisted AL treatment significantly reduced the binding levels of allergens and specific antibodies. In addition, PEF-assisted AL treatment significantly reduced the concentration of histamine and mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) to 51.97 ng/mL and 51.97 pg/mL, regulated the release of IL-4 and IFN- γ , and promoted the balance between Th1 and Th2-type cells, thereby improving OVA-induced allergic reactions.

Keywords ovalbumin; pulsed electric field; alcalase; animal model; allergic reactions