

水解乳清蛋白改善牛乳蛋白过敏的功效及机制

储小军^{1,2}, 李归浦², 熊丽娜², 姜艳喜², 郑华艳², 刘东红^{1*}

¹ 浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310058

² 贝因美(杭州)食品研究院有限公司 杭州 310053

摘要 目的:研究部分水解乳清蛋白(pHWP)联合不同剂量低聚果糖(FOS)和动物双歧杆菌 Bb-12(Bb-12)对小鼠牛乳蛋白过敏(CMPA)的改善效果及免疫耐受调节机制。方法:4 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机被分成正常对照组、致敏对照组、pHWP 和 pHWP+FOS+Bb-12 干预组。试验期间,干预组小鼠每天用含 pHWP(15 mg/mL)或 pHWP(15 mg/mL)+FOS(0.4/4.0 mg/mL)+Bb-12($1 \times 10^5/10^6$ CFU/mL)的水溶液替代常规饮用水进行饲喂干预;试验第 7,14,21,28,35 天,致敏对照组和干预组小鼠采用 CMP(20 mg/只)+霍乱毒素($10 \mu\text{g}/\text{只}$)灌胃致敏,正常对照组小鼠灌胃无菌生理盐水;试验第 42 天,对所有小鼠进行 CMP(50 mg/只)灌胃激发,并于激发后 1 h 内完成过敏症状评分,同时检测血清抗体和组胺含量、脾细胞增殖反应及上清液 Th1、Th2 和 Treg 相关细胞因子(INF- γ 、IL-4 和 TGF- β)水平。结果:pHWP+FOS+Bb-12 干预组小鼠过敏症状评分(0~1)、血清总 IgE(169.4~272.7 ng/mL)、CMP 特异性 IgE(sIgE)(0.038~0.414 OD)和 sIgG1(0.252~0.379 OD)、组胺(19.56~27.35 ng/mL)、脾细胞增殖刺激指数(1.48~1.58)及上清液 IL-4(18.48~29.60 pg/mL)均显著低于致敏对照组($P < 0.05$),而 TGF- β (143.1~177.2 pg/mL)、INF- γ (189.5~230.2 pg/mL)和 INF- γ /IL-4(6.46~12.71)均显著高于致敏对照组($P < 0.05$)。相较于 pHWP,pHWP+FOS+Bb-12 对 CMPA 的缓解效果更强,且以使用高剂量 Bb-12(1×10^6 CFU/mL)时最为显著,部分指标包括血清总 IgE、CMP-sIgE、脾细胞上清液 IL-4 和 INF- γ /IL-4 与正常对照组均无显著差异。结论:pHWP 联合 FOS 和 Bb-12 可通过提高 CMP 免疫耐受有效改善小鼠 CMPA 症状,其作用可能与阻断 IgE、CMP-sIgE、sIgG1 和组胺分泌,抑制脾细胞增殖及上调 TGF- β 和 INF- γ /IL-4 相关。

关键词 部分水解乳清蛋白; 低聚果糖; 动物双歧杆菌 Bb-12; 牛乳蛋白过敏; 免疫耐受; 免疫调节

文章编号 1009-7848(2024)03-0046-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.03.005

牛乳蛋白过敏(cow's milk protein allergy, CMPA)是指机体对牛乳蛋白(CMP)产生的一类可反复出现的异常免疫反应,多发于人类生命早期,常累及皮肤、呼吸系统和消化系统,主要症状包括皮肤瘙痒、红肿、荨麻疹、湿疹、流鼻涕、咳嗽、气喘、呕吐、腹痛、腹泻等,严重时甚至可引发过敏性休克和死亡,现已成为婴幼儿时期最主要的食物过敏问题^[1-2]。据报道,CMPA 在全球 0~1 岁婴幼儿中的发生率为 0.5%~7.5%^[3-4]。我国部分城市(重庆、珠海、杭州和广州)的研究调查数据显示 0~2 岁婴幼儿的 CMPA 发病率为 0.83%~3.5%^[5-6]。

牛乳中能引起过敏反应的蛋白质有 30 多种,其中乳清蛋白(β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白和酪蛋白

(α _{s1}-酪蛋白)被认为是最主要的过敏原^[7]。采用蛋白酶解工艺将乳清蛋白和酪蛋白水解成低免疫原性的小分子蛋白、多肽和无免疫原性的氨基酸,被认为是降低 CMP 致敏性的最有效方法,已成为当前国内外应用于婴幼儿 CMPA 预防和治疗的的首选^[4,8-10]。根据酶解后蛋白分子质量分布的不同,水解 CMP 可以分为部分水解(分子质量 < 5 000 u)和深度水解(分子质量 < 3 000 u)两种^[10-11]。国外关于婴幼儿 CMPA 的诊治指南和专家共识均建议 CMPA 确诊婴儿应食用以深度水解 CMP 或氨基酸为蛋白质来源的配方乳粉^[12-15]。我国明确规定,部分水解 CMP 配方乳粉适用于 CMPA 高风险婴儿的过敏预防,而深度水解 CMP 配方或氨基酸配方乳粉适用于 CMPA 确诊婴儿的过敏治疗^[16]。

近年来,随着研究的不断深入,越来越多的专家和学者认为除了对 CMPA 婴幼儿采取“严格回避 CMP 过敏原”的饮食干预措施以外,尽快建立其对 CMP 的免疫耐受,使其早日回归含 CMP 的正

收稿日期: 2023-12-18

基金项目: 杭州市农业和社会发展重点项目(202203A11);
国家重点研发计划项目(2019YFE0103900)

第一作者: 储小军,男,博士生,正高级工程师

通信作者: 刘东红 E-mail: dhliu@zju.edu.cn

常饮食才是预防和治疗 CMPA 的终极目标^[2]。相较于深度水解 CMP 和氨基酸,以小分子蛋白和多肽为主要成分的部分水解 CMP 不仅致敏性大大低于 CMP,还因含有一部分分子质量>3 000 u 的低免疫原性蛋白抗原,已被证实具有诱导机体产生 CMP 部分免疫耐受的功效^[17-19]。新近研究表明,婴幼儿时期的肠道微生态和免疫功能改变与 CMPA 的发生、发展以及 CMP 免疫耐受的获得直接相关^[20-21]。益生菌(双歧杆菌、乳杆菌、乳酸菌)和益生元(功能性低聚糖)通过调节肠道菌群结构,增强肠黏膜屏障功能,纠正 T 细胞免疫失衡等,提高机体对 CMP 的免疫耐受^[22-23]。

鉴于此,本试验采用 BALB/c 小鼠 CMP 致敏模型,研究部分水解乳清蛋白(pHWP)联合不同剂量低聚果糖(FOS)和动物双歧杆菌 Bb-12(Bb-12)对 CMPA 的改善效果及免疫耐受调节机制,旨在为 CMPA 的防治以及兼具低致敏和抗过敏功效的婴幼儿配方食品开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

浓缩 CMP 粉(蛋白含量 $\geq 80\%$),新西兰 Fonterra 公司;pHWP 粉(蛋白含量 $\geq 80\%$,蛋白水解度 17%),新西兰 Tatura 公司;FOS 粉(含量 $\geq 90\%$),中国广东量子高科公司;Bb-12(粉剂,活菌总数 $\geq 3.0 \times 10^{10}$ CFU/g),丹麦 Chr. Hansen 公司;霍乱毒素(CT),德国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养液、羊抗鼠 IgE、IgG1 酶标二抗,美国 R&D 公司;小鼠 IgE、组胺、TGF- β 、IFN- γ 、IL-4 ELISA 检测试剂盒,中国南京建成生物工程研究所。

1.2 试验动物与饲养条件

70 只 3 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠采用无牛乳蛋白小鼠饲料饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心,饲养环境温度 20~25℃,相对湿度 40%~70%。试验前,所有小鼠在动物房环境中进行适应性喂养 1 周。

1.3 试验动物分组与处理

1.3.1 试验动物分组 经适应性喂养的断奶期雌性 BALB/c 小鼠(4 周龄)按体质量随机分成 7 组:正常对照组、致敏对照组、pHWP 干预组和 pHWP+低/高剂量 FOS+低/高剂量 Bb-12 干预组,每

组 10 只。

1.3.2 试验动物干预与致敏 干预:试验期间(第 0~42 天),各干预组小鼠每天分别用含 pHWP(15 mg/mL)或 pHWP(15 mg/mL)+FOS(0.4/4.0 mg/mL)+Bb-12($1 \times 10^5/10^6$ CFU/mL)的水溶液替代饮用水进行饲喂干预,对照组(包括正常对照组和致敏对照组)小鼠按需饲喂正常饮用水。

致敏:致敏对照组和各干预组小鼠于试验第 7,14,21,28,35 天灌胃 CMP (20 mg/只)+CT(10 μ g/只)致敏,正常对照组小鼠灌胃无菌生理盐水;试验第 42 天,所有小鼠进行 CMP(50 mg/只)灌胃激发。

1.3.3 试验动物处死与取材 灌胃激发后 1 h 内,所有小鼠进行过敏症状评分。试验第 43 天(灌胃激发后 18 h),所有小鼠摘眼球取血,用于血清抗体和组胺检测,然后采用颈椎脱臼处死,无菌条件下取脾脏,用于脾细胞增殖反应试验和上清液细胞因子检测。

1.4 指标检测

1.4.1 过敏症状评分 小鼠全身性过敏症状评分采用文献[24]推荐的方法进行,具体评分标准如下:0 分=无症状;1 分=鼻子和头部周围搔抓;2 分=眼睛和嘴巴周围浮肿,毛发竖起,活动减少,呼吸频率增加;3 分=喘鸣,呼吸用力,嘴和尾巴周围青紫;4 分=颤抖、抽搐,刺激后无活动;5 分=死亡。

1.4.2 血清抗体和组胺检测 血清总 IgE 和组胺:采用 ELISA 法严格按照检测试剂盒操作说明书进行检测。

血清 CMP-sIgE 和 sIgG1:采用 ELISA 法进行检测,具体为:1)96 孔酶标板中加入 10 mg/mL CMP 溶液(100 μ L/孔)进行抗原包被,4℃过夜后用含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液冲洗并拍干;2)加入 5%牛血清白蛋白溶液(100 μ L/孔)37℃封闭 1 h,冲洗并拍干;3)加入待测小鼠血清稀释样本(100 μ L/孔)37℃孵育 45 min,冲洗并拍干;4)加入羊抗鼠 IgE 或 IgG1 酶标二抗稀释液(100 μ L/孔)37℃孵育 30 min,冲洗并拍干;5)加入 TMB 底物溶液(100 μ L/孔)37℃显色反应 15 min;6)加入 2 mol/L H₂SO₄ 溶液(50 μ L/孔)终止显色反应,并在 5 min 内用酶标仪于波长 450 nm 处

检测各样品 OD 值。

1.4.3 脾细胞增殖反应试验及上清液细胞因子检测

1.4.3.1 脾细胞悬液制备 取小鼠脾脏置于含 10 mL RPMI 1640 培养液的玻璃平皿中,用无菌玻璃注射器内芯研压并通过 200 目不锈钢网筛得单细胞滤液,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加 RPMI 1640 培养液重复洗涤 2 次,收集脾细胞,用 RPMI 1640 完全培养液(含 10%胎牛血清)混悬,经细胞计数后加 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL,备用。

1.4.3.2 脾细胞增殖反应试验 96 孔细胞培养板中,每孔加入 100 μ L 脾细胞悬液(2×10^6 个/mL)和等体积含 CMP (2 mg/mL) 或不含 CMP 的 RPMI 1640 完全培养液,每个样品各设 3 个重复孔,另设只加 200 μ L RPMI 1640 完全培养液的孔作为空白对照孔。将细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 44 h 后,各孔加入 50 μ L MTT 溶液(2 mg/mL),继续培养 4 h。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,每孔加入 150 μ L 酸性 DMSO 溶液,振荡,于室温暗处放置 15 min,以酶标仪于波长 570 nm 处测定各孔 OD 值,并按下式计算脾细胞增殖刺激指数(SI):

$$SI = (\text{含 CMP 孔 OD 值} - \text{空白对照孔 OD 值}) / (\text{不含 CMP 孔 OD 值} - \text{空白对照孔 OD 值})$$

1.4.3.3 脾细胞上清液细胞因子检测 96 孔细胞培养板每孔加入 100 μ L 脾细胞悬液 (2×10^6 个/mL)和等体积含 CMP(2 mg/mL)的 RPMI 1640 完全培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 48 h,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。采用 ELISA 法严格按照检测试剂盒操作说明书测定各样品的细胞因子 TGF- β 、IL-4 和 IFN- γ 含量。

1.5 数据统计分析

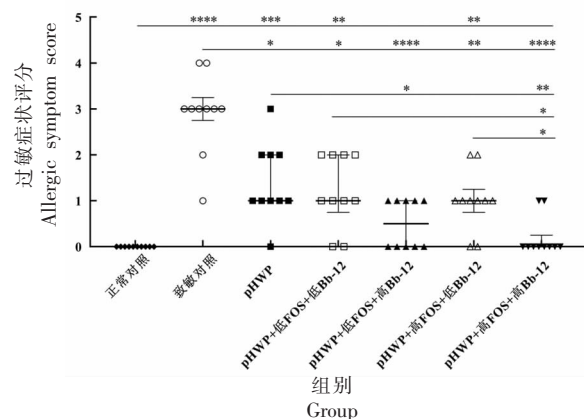
所有数据均使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。非正态分布数据(过敏症状评分、血清 CMP-sIgE 和 sIgG1)用中位数 \pm 四分位数表示,不同组间显著性差异采用非参数 Kruskal-Wallis 检验得出;正态分布数据(血清总 IgE 和组胺、脾细胞增殖刺激指数、脾细胞上清液 TGF- β 、IL-4 和 IFN- γ)用平均值 \pm 标准偏差表示,不同组间显著性差异采用单因素方差分析(One-way ANO-

VA)得出。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果与分析

2.1 pHWP 联合 FOS 和 Bb-12 对 CMP 致敏小鼠过敏症状的影响

不同组别 BALB/c 小鼠过敏症状评分比较如图 1 所示。除正常对照组以外,其余各组均有小鼠出现不同程度的 CMPA 反应,尤其是致敏对照组,所有小鼠均呈现出典型的 CMPA 症状,提示本试验采用 CMP+CT 进行灌胃致敏的方法成功建立了 CMPA 小鼠模型。相比较而言,pHWP 和 pHWP+FOS+Bb-12 干预组小鼠的过敏症状评分均显著低于致敏对照组(0~1 vs 3, $P < 0.05$),而 pHWP+低/高 FOS+高 Bb-12 干预组小鼠的过敏症状评分均显著低于 pHWP 干预组(0~0.5 vs 1, $P < 0.05$),且与正常对照组无统计学差异,表明 pHWP 单独以及与 FOS 和 Bb-12 联合均能有效缓解 BALB/c 小鼠的 CMPA 症状,且该效果以 pHWP 联合 FOS 和高剂量 Bb-12 时最为显著。



注:各组数据正上方横线上带有*,表示该组数据与此横线最左侧正下方对应组别数据具有显著性差异(*, $P < 0.05$;**, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$)。

图 1 不同组别 BALB/c 小鼠过敏症状评分比较

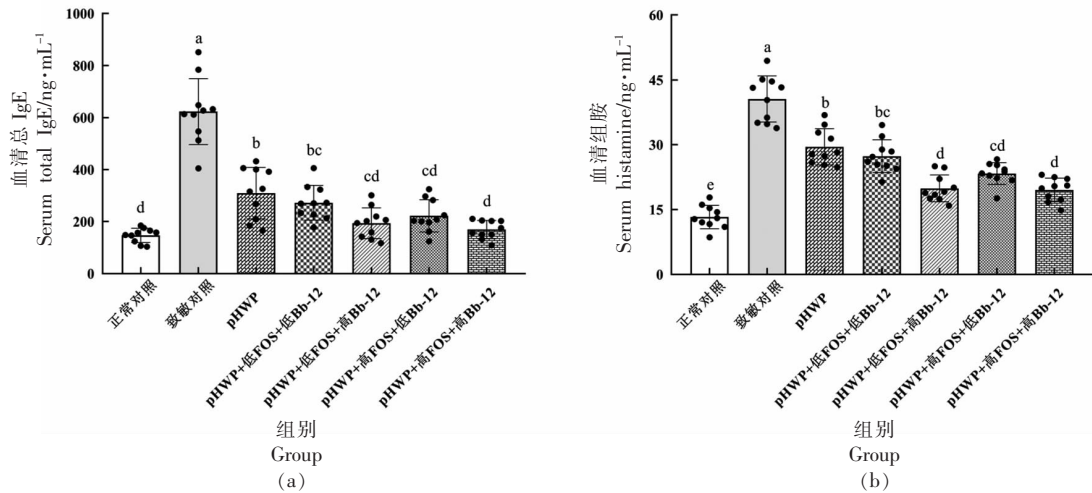
Fig.1 Comparison of allergic symptom scores among different groups of BALB/c mice

2.2 pHWP 联合 FOS 和 Bb-12 对 CMP 致敏小鼠血清抗体和组胺水平的影响

不同组别 BALB/c 小鼠血清总 IgE、组胺和 CMP-sIgE、sIgG1 水平比较分别见图 2 和图 3。相较于正常对照组,致敏对照组小鼠血清总 IgE

(623.1 ng/mL)、组胺 (40.59 ng/mL)、CMP-sIgE (0.820 OD) 和 sIgG1 (0.637 OD) 均显著升高 ($P < 0.05$), 提示 CMP 致敏诱导了 BALB/c 小鼠血清抗体和组胺的分泌。与致敏对照组相比, pHWP 和 pHWP+FOS+Bb-12 干预组小鼠血清总 IgE (169.4~309.7 ng/mL)、组胺 (19.56~29.52 ng/mL) 和 CMP-sIgE (0.038~0.414 OD) 均显著降低 ($P < 0.05$), CMP-sIgG1 也有所下降, 尤其是 pHWP+低/

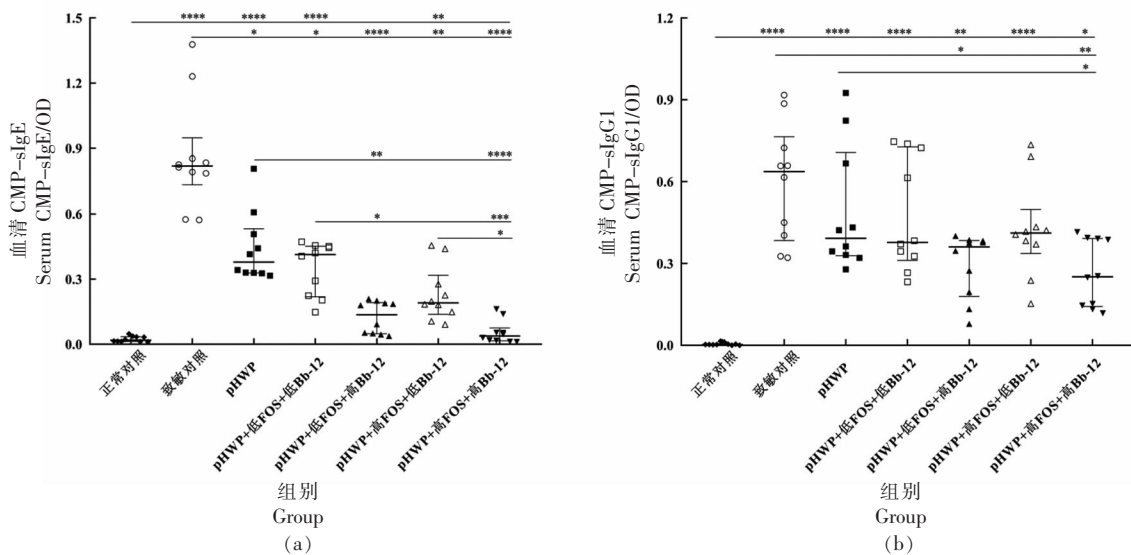
高 FOS+高 Bb-12 干预组, 其血清 CMP-sIgG1 (0.252~0.362 OD) 与致敏对照组具有统计学差异 ($P < 0.05$); pHWP+FOS+Bb-12 干预组小鼠血清总 IgE (169.4~272.7 ng/mL)、组胺 (19.56~27.35 ng/mL)、CMP-sIgE (0.038~0.379 OD) 和 sIgG1 (0.252~0.413 OD) 均低于 pHWP 干预组, 其中 pHWP+高 FOS+高 Bb-12 干预组的血清学指标相比于 pHWP 干预组均显著降低 ($P < 0.05$), 部分指标包括血



注: 不同类型柱上小写字母完全不同表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 2 不同组别 BALB/c 小鼠血清总 IgE 和组胺水平比较

Fig.2 Comparison of serum total IgE and histamine levels among different groups of BALB/c mice



注: 各组数据正上方横线上带有*, 表示该组数据与此横线最左侧正下方对应组别数据具有显著性差异 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)。

图 3 不同组别 BALB/c 小鼠血清 CMP-sIgE 和 sIgG1 水平比较

Fig.3 Comparison of serum CMP-sIgE and sIgG1 levels among different groups of BALB/c mice

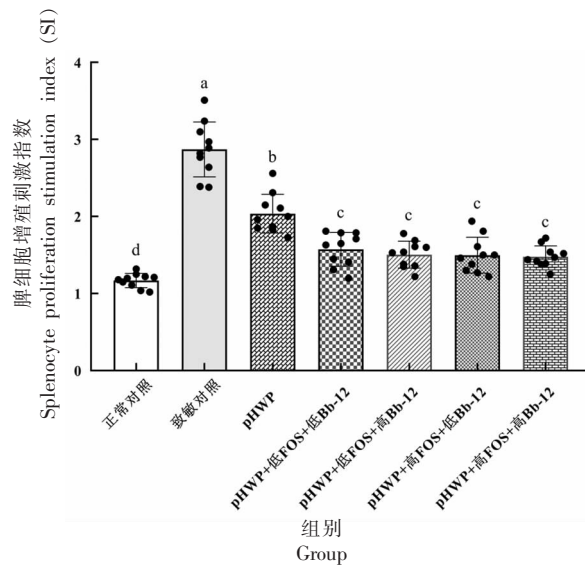
清总 IgE 和 CMP-sIgE 甚至降低至正常对照组水平,表明 pHWP 单独以及与 FOS 和 Bb-12 联合均能有效抑制 CMP 诱导的小鼠血清抗体和组胺分泌,且其抑制效果以 pHWP 联合高剂量 FOS 和高剂量 Bb-12 时最为显著。

2.3 pHWP 联合 FOS 和 Bb-12 对 CMP 致敏小鼠脾细胞增殖的影响

不同组别 BALB/c 小鼠脾细胞增殖刺激指数比较如图 4 所示。致敏对照组和各干预组小鼠脾细胞增殖刺激指数均显著高于正常对照组 ($P<0.05$),提示 CMP 致敏显著刺激了 BALB/c 小鼠的脾细胞增殖反应。相较于致敏对照组,pHWP 和 pHWP+FOS+Bb-12 干预组小鼠脾细胞增殖刺激指数均显著降低 (2.87 vs 1.48~2.04, $P<0.05$); 各 pHWP+FOS+Bb-12 干预组小鼠脾细胞增殖刺激指数组间无统计学差异,但均显著低于 pHWP 干预组 (1.48~1.58 vs 2.04, $P<0.05$),表明 pHWP 单独以及与 FOS 和 Bb-12 联合均能有效抑制 CMP 对小鼠脾细胞增殖的刺激作用,且当 pHWP 与 FOS 和 Bb-12 联合使用时,抑制效果更为显著。

2.4 pHWP 联合 FOS 和 Bb-12 对 CMP 致敏小鼠脾细胞上清液细胞因子水平的影响

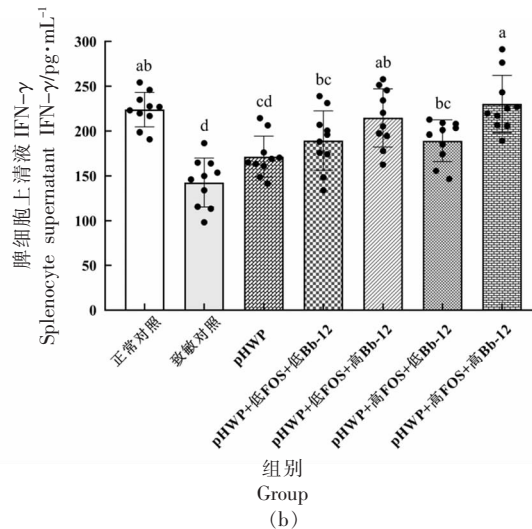
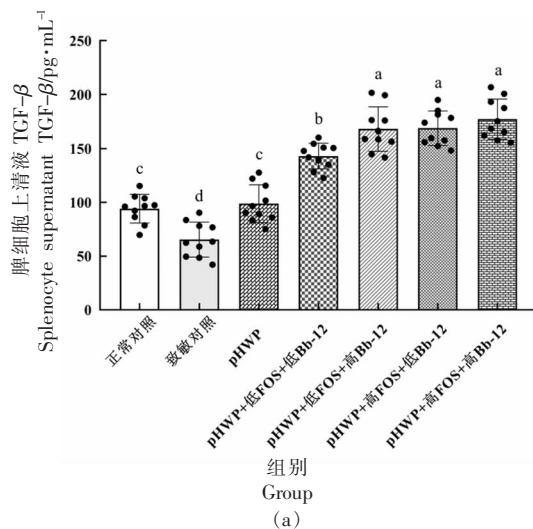
不同组别 BALB/c 小鼠脾细胞上清液细胞因子水平比较如图 5 所示。相较于正常对照组,致敏对照组小鼠脾细胞上清液 TGF- β (65.39 pg/mL)、IFN- γ (142.7 pg/mL) 和 IFN- γ /IL-4 (2.70) 显著降低 ($P<0.05$),而 IL-4 (54.04 pg/mL) 显著升高 ($P<0.05$); pHWP 和 pHWP+FOS+Bb-12 干预组小鼠



注:不同类型柱上小写字母完全不同表示具有显著性差异 ($P<0.05$)。

图 4 不同组别 BALB/c 小鼠脾细胞增殖刺激指数比较
Fig.4 Comparison of splenocyte proliferation stimulation indexes (SI) among different groups of BALB/c mice

TGF- β (98.8~177.2 pg/mL)、IFN- γ (171.7~230.2 pg/mL) 和 IFN- γ /IL-4 (5.07~12.71) 均高于致敏对照组,而 IL-4 (18.48~34.24 pg/mL) 显著低于致敏对照组 ($P<0.05$); 与 pHWP 干预组相比,pHWP+低/高 FOS+高 Bb-12 干预组小鼠 TGF- β (168.0~177.2 pg/mL)、IFN- γ (214.7~230.2 pg/mL) 和 IFN- γ /IL-4 (11.41~12.71) 均显著升高 ($P<0.05$),而 IL-4 (18.48~19.54 pg/mL) 显著降低 ($P<0.05$),且 IFN- γ 、IL-4 和 IFN- γ /IL-4 与正常对照组无统计学差异,表明 pHWP 单独以及与 FOS 和 Bb-12 联合均



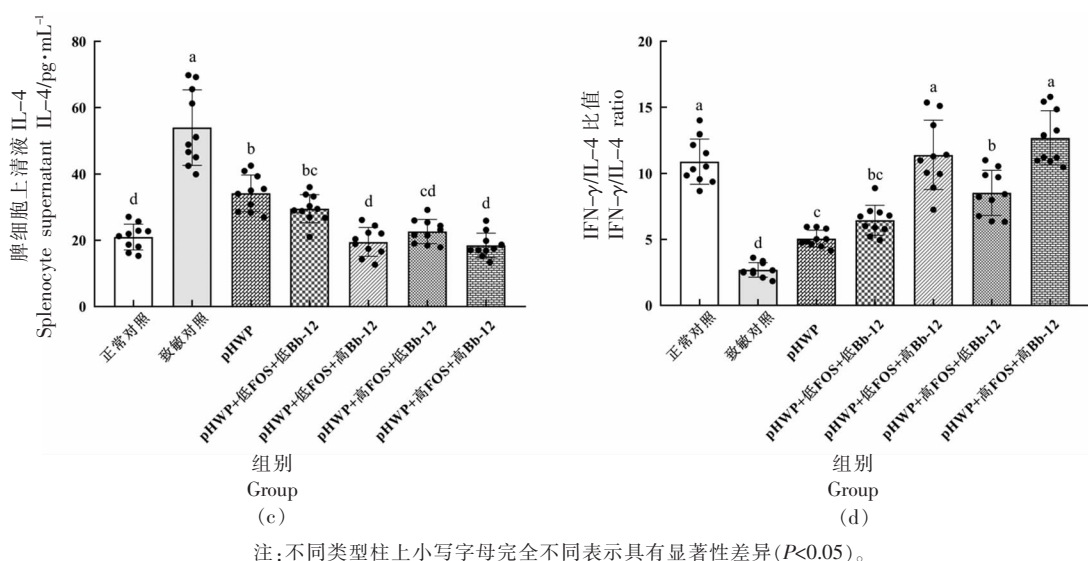


图 5 不同组别 BALB/c 小鼠脾细胞上清液细胞因子水平比较

Fig.5 Comparison of splenocyte supernatant cytokine levels among different groups of BALB/c mice

能有效抑制 CMP 致敏引起的小鼠脾细胞上清液 TGF- β 、IFN- γ 和 IFN- γ /IL-4 降低以及 IL-4 升高,其抑制效果以 pHWP 联合 FOS 和高剂量 Bb-12 最为显著。

3 讨论

CMPA 作为婴幼儿最易发生的食物过敏反应,根据免疫学机制不同,主要可以分为 IgE 介导、非 IgE 介导和 IgE/非 IgE 混合介导 3 种类型,其中 60% 以上的 CMPA 患者为 IgE 介导的速发型过敏反应^[1,3]。该型过敏反应的发展分为致敏和激发两个阶段,其最显著的免疫学特点是机体对 CMP 抗原产生特异性免疫应答,导致 IgE 抗体异常升高,并引发组胺、白三烯等炎性介质过量释放,作用于各个效应器官产生局部或全身性过敏症状^[1,25]。本研究以断乳期 BALB/c 小鼠为对象,采用 CMP 灌胃致敏+激发方式成功建立了 IgE 介导的 CMPA 模型,其致敏对照组小鼠相较于正常对照组,不仅呈现了典型的速发型过敏症状特点,同时血清总 IgE、CMP-sIgE、sIgG1 和组胺含量均显著升高。

CMPA 之所以高发于婴幼儿时期,其根本原因之一是婴幼儿免疫系统不成熟导致其对 CMP 的免疫耐受调节能力相对较弱^[2,26]。目前普遍采用的以深度水解 CMP 或氨基酸替代 CMP 的饮食回

避措施尽管能有效避免婴幼儿 CMPA 的发生,但由于其对 CMP 免疫耐受的调节作用甚微,因此无法在短期内达到使 CMPA 患儿回归含 CMP 正常饮食的效果^[2,27]。以往研究已经表明,部分水解 CMP 和益生菌、益生元对机体建立 CMP 免疫耐受均有促进作用^[28-30]。本研究通过 IgE 介导的 CMPA 动物模型试验发现,给 BALB/c 小鼠口服 pHWP 或 pHWP+FOS+Bb-12 均能有效缓解 CMP 对小鼠的致敏反应,且相比较而言,口服 pHWP+FOS+Bb-12 的缓解效果更为显著,其干预组小鼠的血清抗体(总 IgE、CMP-sIgE、sIgG1)和组胺水平均显著低于致敏对照组,提示 pHWP 联合 FOS 和 Bb-12 可通过阻断 CMP 诱导的小鼠血清抗体和组胺分泌,显著提高小鼠对 CMP 的免疫耐受能力,且该作用比 pHWP 单独使用更为有效。

作为机体对 CMP 产生的特异性异常免疫反应,CMPA 的发生和发展与机体淋巴细胞的免疫失调密切相关。CMP 刺激 T 淋巴细胞异常增殖并向辅助性 T 细胞(Th)2 分化,使机体出现 Th2 免疫反应占优势的 Th1/Th2 免疫失衡已被证实是 CMPA 发病的其中一个最重要因素^[1,25-26]。部分水解 CMP 和益生菌、益生元促进机体形成 CMP 免疫耐受的作用机制与其调节 T 细胞免疫反应,纠正 Th2 免疫过度的 Th1/Th2 细胞及细胞因子失衡直接相关^[30-32]。已有研究显示,口服 pHWP 或含

pHWP 的婴儿配方乳粉能通过抑制 T 细胞增殖、降低 Th2 细胞分化以及 Th2 细胞因子(IL-4、IL-5 和 IL-13)分泌等作用,帮助 BALB/c 小鼠建立针对 β -乳球蛋白和 CMP 的部分免疫耐受^[17,33]。Tian 等^[34]和 Shandilya 等^[35]研究发现,口服动物双歧杆菌 KV9、阴道乳杆菌 FN3 或含嗜酸乳杆菌和双歧杆菌的酸奶能通过提高 Th1 细胞因子(IFN- γ 、IL-12)和降低 Th2 细胞因子(IL-4)分泌,诱导 T 细胞向 Th1 细胞分化,纠正 Th2 细胞偏倚的免疫应答等作用,显著增强 BALB/c 小鼠对 β -乳球蛋白和乳清蛋白的免疫耐受。Fu 等^[36]研究表明,口服植物乳杆菌 ZDY2013 和鼠李糖乳杆菌 GG 能通过提高 Th1 细胞因子(IFN- γ)和调节性细胞因子(TGF- β)分泌,诱导 T 细胞向 Th1 细胞和调节性 T 细胞(Treg)分化,抑制 Th2 免疫反应等作用,显著改善 BALB/c 小鼠对 β -乳球蛋白的抗过敏能力。本研究中,经 pHWP+FOS+Bb-12 口服干预的 BALB/c 小鼠相较于 CMP 致敏对照组,脾细胞增殖刺激指数和上清液 Th2 细胞因子(IL-4)水平显著降低,而 Th1 细胞因子(IFN- γ)和调节性细胞因子(TGF- β)水平以及 Th1/Th2 细胞因子(IFN- γ /IL-4)比值显著升高,表明 pHWP 联合 FOS 和 Bb-12 能有效抑制 CMP 致敏引起的小鼠脾细胞增殖,同时可通过上调上清液 TGF- β 和 IFN- γ /IL-4,纠正 Th2 细胞因子功能亢进的 Th1/Th2 免疫失衡,这可能是其促进 CMP 免疫耐受,改善 CMPA 症状的重要作用机制之一。

4 结论

通过对 pHWP 联合不同剂量 FOS 和 Bb-12 对 BALB/c 小鼠 CMPA 的改善效果及免疫耐受调节机制研究,得出如下结论:1)口服 pHWP 或 pHWP+FOS+Bb-12 均可通过提高 CMP 免疫耐受有效改善小鼠 CMPA 症状;2)相较于 pHWP,pHWP+FOS+Bb-12 对小鼠 CMPA 的改善效果更强,尤其是当 Bb-12 使用高剂量时(1×10^6 CFU/mL)效果最为显著;3)pHWP+FOS+Bb-12 促进小鼠形成 CMP 免疫耐受的作用机制与其阻断 IgE、CMP-sIgE、sIgG1 和组胺分泌,抑制脾细胞增殖及上调 TGF- β 和 INF- γ /IL-4 相关。

参 考 文 献

- [1] DHESI A, ASHTON G, RAPTAKI M, et al. Cow's milk protein allergy[J]. Paediatrics and Child Health, 2020, 30(7): 255-260.
- [2] GIANNETTI A, VESPASIANI G T, RICCI G, et al. Cow's milk protein allergy as a model of food allergies[J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1525.
- [3] FLOM J D, SICHERER S H. Epidemiology of cow's milk allergy[J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1051.
- [4] LUYT D, BALL H, MAKWANA N, et al. BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2014, 44(5): 642-672.
- [5] 陈静, 廖艳, 张红忠, 等. 三城市两岁以下儿童食物过敏现状调查[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(1): 5-9.
CHEN J, LIAO Y, ZHANG H Z, et al. Prevalence of food allergy in children under 2 years of age in three cities in China[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2012, 50(1): 5-9.
- [6] YANG M, TAN M Z, WU J L, et al. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: A population-based survey[J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2019, 43(6): 803-808.
- [7] HOCHWALLNER H, SCHULMEISTER U, SWOBODA I, et al. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention[J]. Methods, 2014, 66(1): 22-33.
- [8] 党慧杰, 郑远荣, 刘振民, 等. 牛乳蛋白过敏及酶水解降低其致敏性的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(8): 29-33, 45.
DANG H J, ZHENG Y R, LIU Z M, et al. Research progress on cow milk allergy and enzymatic hydrolysis to reduce its sensitizing ability[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(8): 29-33, 45.
- [9] EI-SALAM M H A, EI-SHIBINY S. Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(6): 1119-1132.
- [10] GREER F R, SICHERER S H, BURKS A W. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: The role of maternal dietary restriction, breastfeed-

- ing, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas[J]. *Pediatrics*, 2008, 121(1): 183-191.
- [11] NUTTEN S. Proteins, peptides and amino acids: Role in infant nutrition[M]//BHATIA J, SHAMIR R, VANDENPLAS Y. Protein in neonatal and infant nutrition: Recent updates; Nestlé Nutrition Institute Workshop Series, Vol. 86. Basel, Switzerland: S. Karger AG, 2016: 1-10.
- [12] FIOCCHI A, BROZEK J, SCHNEMANN H, et al. World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2010, 21(Suppl 21): 1-125.
- [13] KOLETZKO S, NIGGEMANN B, ARATO A, et al. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children; ESPGHAN GI Committee practical guidelines[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2012, 55(2): 221-229.
- [14] VENTER C, BROWN T, MEYER R, et al. Better recognition, diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in infancy: iMAP—an international interpretation of the MAP (Milk allergy in primary care) guideline[J]. *Clinical and Translational Allergy*, 2017, 7(1): 26.
- [15] MATTHAI J, SATHIASEKHARAN M, PODDAR U, et al. Guidelines on diagnosis and management of cow's milk protein allergy [J]. *Indian Pediatrics*, 2020, 57(8): 723-729.
- [16] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 特殊医学用途婴儿配方食品通则: GB25596-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 8.
Ministry of Health P. R. China. National food safety standard general rules for infant formula food for special medical purposes: GB25596-2010[S]. Beijing: China Standard Press, 2010: 8.
- [17] MATSUBARA T, IWAMOTO H, NAKAZATO Y, et al. Ingestion of partially hydrolyzed whey protein suppresses epicutaneous sensitization to β -lactoglobulin in mice[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2018, 29(4): 433-440.
- [18] KIEWIET M B G, VAN ESCH B C A M, GARSSSEN J, et al. Partially hydrolyzed whey proteins prevent clinical symptoms in a cow's milk allergy mouse model and enhance regulatory T and B cell frequencies[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(11): 1700340.
- [19] IWAMOTO H, MATSUBARA T, OKAMOTO T, et al. Ingestion of casein hydrolysate induces oral tolerance and suppresses subsequent epicutaneous sensitization and development of anaphylaxis reaction to casein in mice[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2019, 179(3): 221-230.
- [20] YANG Y D, LI X Q, YANG Y, et al. Advances in the relationships between cow's milk protein allergy and gut microbiota in infants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 716667.
- [21] MARRS T, SIM K. Demystifying dysbiosis: can the gut microbiome promote oral tolerance over IgE-mediated food allergy? [J]. *Current Pediatric Reviews*, 2018, 14(3): 156-163.
- [22] 曹婷, 赵丽娜, 陈庆学, 等. 益生菌改善牛乳蛋白过敏性的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(23): 11-18.
CAO T, ZHAO L N, CHEN Q X, et al. Research progress of probiotics in improving milk protein allergy[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(23): 11-18.
- [23] VONK M M, DIKS M A P, WAGENAAR L, et al. Improved efficacy of oral immunotherapy using non-digestible oligosaccharides in a murine cow's milk allergy model: A potential role for Foxp3+ regulatory T cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1230.
- [24] GONIPETA B, PARVATANENI S, TEMPELMAN R J, et al. An adjuvant-free mouse model to evaluate the allergenicity of milk whey protein[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 92(10): 4738-4744.
- [25] 李欣, 程剑锋, 文学方, 等. 免疫耐受在牛乳过敏中的研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(5): 1-11.
LI X, CHENG J F, WEN X F, et al. Research advances in immune tolerance in cow's milk allergy [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(5): 1-11.
- [26] 陈镜, 张晓宇, 霍麒文, 等. 婴幼儿牛乳蛋白过敏机制及解决方法研究进展[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 289-298.
CHEN J, ZHANG X Y, HUO Q W, et al. Progress in the mechanism of cow's milk protein allergy in infants and its treatments[J]. *Journal of Chinese In-*

- stitute of Food Science and Technology, 2020, 20 (7): 289–298.
- [27] ORTEGA B Z, GOH A, XEPAPADAKI P, et al. Strategies and future opportunities for the prevention, diagnosis, and management of cow milk allergy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 608372.
- [28] QAMER S, DESHMUKH M, PATOLE S. Probiotics for cow's milk protein allergy: a systematic review of randomized controlled trials[J]. *European Journal of Pediatrics*, 2019, 178(8): 1139–1149.
- [29] D'AURIA E, SALVATORE S, POZZI E, et al. Cow's milk allergy: immunomodulation by dietary intervention[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1399.
- [30] CELA L, BRINDISI G, GRAVINA A, et al. Molecular mechanism and clinical effects of probiotics in the management of cow's milk protein allergy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(12): 9781.
- [31] KERPERIEN J, JEURINK P V, WEHKAMP T, et al. Non-digestible oligosaccharides modulate intestinal immune activation and suppress cow's milk allergic symptoms [J]. *Pediatric Allergy Immunology*, 2014, 25(8): 747–754.
- [32] KOSTADINOVA A I, PABLOS T A, DIKS M A P, et al. Dietary intervention with β -lactoglobulin-derived peptides and a specific mixture of fructo-oligosaccharides and *bifidobacterium breve* M-16V facilitates the prevention of whey-induced allergy in mice by supporting a tolerance-prone immune environment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1303.
- [33] CHIKHI A, ELMECHERFI K E, BERNARD H, et al. Evaluation of the efficiency of hydrolyzed whey formula to prevent cow's milk allergy in the BALB/c mouse model[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2019, 30(3): 370–377.
- [34] TIAN X Y, FAN R B, HE H, et al. *Bifidobacterium animalis* KV9 and *Lactobacillus vaginalis* FN3 alleviated β -lactoglobulin induced allergy by modulating dendritic cells in mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 992605.
- [35] SHANDILYA U K, SHARMA A, KAPILA R, et al. Probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* modulates immunoglobulin levels and cytokines expression in whey proteins sensitised mice[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(9): 3180–3187.
- [36] FU G M, ZHAO K, CHEN H, et al. Effect of 3 *Lactobacilli* on immunoregulation and intestinal microbiota in a β -lactoglobulin-induced allergic mouse model[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(3): 1943–1958.

Efficacy and Mechanism of Hydrolyzed Whey Protein in Ameliorating Cow's Milk Protein Allergy

Chu Xiaojun^{1,2}, Li Guipu², Xiong Lina², Jiang Yanxi², Zheng Huayan², Liu Donghong^{1*}

¹College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058

²Beingmate (Hangzhou) Food Research Institute Co., Ltd., Hangzhou 310053)

Abstract Objective: To investigate the efficacy and immune tolerance regulation mechanism of partially hydrolyzed whey protein (pHWP) combined with different doses of fructooligosaccharides (FOS) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Bb-12) in alleviating cow's milk protein allergy (CMPA) in mice. Methods: The four-week-old female BALB/c mice were randomly assigned into normal control, sensitized control, pHWP and pHWP + FOS + Bb-12 intervention groups. During the experimental period (day 0–42), the mice in the intervention groups were continuously fed with an aqueous solution containing pHWP (15 mg/mL) or pHWP (15 mg/mL), FOS (0.4 or 4.0 mg/mL) and Bb-12 (1×10^5 or 10^6 CFU/mL) instead of drinking water. Mice in the sensitized control group and intervention groups were sensitized by intragastric administration of sterile saline containing 20 mg CMP and 10 μ g cholera toxin on day 7, 14, 21, 28 and 35, while mice in normal control group received only sterile saline. On day 42, all mice were oral challenged with 50 mg CMP, and allergic symptom scoring were conducted within 1 h after challenge. Serum antibody and histamine contents, as well as splenocyte proliferation and supernatant Th1, Th2 and Treg-related cytokine (INF- γ , IL-4 and TGF- β) levels were assessed. Results: The allergic symptom scores (0–1), serum total IgE (169.4–272.7 ng/mL), CMP-specific

IgE (sIgE) (0.038–0.414 OD), sIgG1 (0.252–0.379 OD), and histamine contents (19.56–27.35 ng/mL), splenocyte proliferation stimulation indexes (1.48–1.58) and supernatant IL-4 levels (18.48–29.60 pg/mL) of mice in the pHWP + FOS + Bb-12 intervention groups were significantly lower than those in the sensitized control group ($P < 0.05$), while the splenocyte supernatant TGF- β (143.1–177.2 pg/mL), INF- γ levels (189.5–230.2 pg/mL) and INF- γ /IL-4 ratios (6.46–12.71) were significantly higher than those in the sensitized control group ($P < 0.05$). Compared with pHWP, pHWP + FOS + Bb-12 was more effective in alleviating CMPA, especially when high dose of Bb-12 (1×10^6 CFU/mL) was applied. No significant difference was found in serum total IgE, CMP-sIgE, splenocyte supernatant IL-4 and INF- γ /IL-4 between pHWP + FOS + high dose Bb-12 intervention groups and normal control group mice. Conclusion: PHWP combined with FOS and Bb-12 could effectively ameliorate CMPA symptoms in mice by improving CMP immune tolerance, which may be related to blocking the secretion of IgE, CMP-sIgE, sIgG1 and histamine, inhibiting the proliferation of splenocytes, and upregulating the level of TGF- β and the ratio of INF- γ /IL-4.

Keywords partially hydrolyzed whey protein; fructooligosaccharides; *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12; cow's milk protein allergy; immune tolerance; immune regulation