

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.08.017

论著·实验研究

经口食物过敏大鼠动物模型的建立

朱庆龄 李锋 王俊丽 马静秋 盛晓阳

(上海交通大学医学院附属新华医院儿童与青少年保健科 /
上海市环境与儿童健康重点实验室, 上海 200092)

[摘要] **目的** 采用卵清蛋白(OVA)经口灌胃,在无佐剂条件下激发建立挪威棕色(BN)大鼠食物过敏模型,并对该模型进行评价。**方法** 20只3周龄雄性BN大鼠随机分为过敏组和对照组($n=10$)。过敏组每日给予OVA 1 mg/只灌胃,连续41 d;第42天过敏组给予OVA 100 mg/只灌胃激发;对照组给予等量生理盐水灌胃。测量两组大鼠第7、14、21、28、35和42天身长、体重、进食量的差异;ELISA法检测第42天激发后两组大鼠血清OVA-IgE水平和血浆组胺水平,并观察两组大鼠外观和粪便性状的变化;根据血清OVA-IgE含量 \geq 对照组大鼠血清OVA-IgE含量均数+3标准差判定食物过敏模型建模成功。**结果** 过敏组和对照组大鼠各时间点身长和体重比较差异均无统计学意义($P>0.05$);第21天时对照组大鼠进食量大于过敏组($P<0.05$)。第42天激发后,过敏组大鼠血清OVA-IgE和血浆组胺水平明显高于对照组($P<0.05$),致敏率(建模成功率)为90%。两组大鼠粪便性状未观察到有明显差异。**结论** 采用全程OVA经口灌胃,且不使用佐剂诱导的BN大鼠食物过敏模型建立成功,且成功率较高;OVA所引起的食物过敏短期内有可能会引起进食量的减低,但尚未发现对大鼠的身长和体重增长造成影响。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(8): 757-761]

[关键词] 食物过敏;卵清蛋白;挪威棕色大鼠

Establishment of a rat model of oral food allergy

ZHU Qing-Ling, LI Feng, WANG Jun-Li, MA Jing-Qiu, SHENG Xiao-Yang. Department of Child and Adolescent Healthcare, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine/Shanghai Key Laboratory of Children's Environmental Health, Shanghai 200092, China (Sheng X-Y, Email: shengxiaoyangcn@aliyun.com)

Abstract: Objective To establish a food allergy model in Brown Norway (BN) rats by gavage of ovalbumin (OVA) without any adjuvant, and to evaluate this model. **Methods** A total of 20 male BN rats aged 3 weeks were randomly divided into allergy group and control group ($n=10$ each). BN rats in the allergy group were given OVA 1 mg per day by gavage, and all the rats were treated for 41 days continuously. On day 42, the rats in the allergy group were given OVA 100 mg by gavage for challenge. The rats in the control group were given normal saline of the same volume by gavage. Differences in body length, body weight, and food intake were compared between the two groups on days 7, 14, 21, 28, 35, and 42. ELISA was used to measure the serum OVA-IgE level and plasma histamine level after challenge on day 42, and the changes in rats' appearance and fecal properties were observed. The model of food allergy was considered successful when the serum OVA-IgE level in the allergy group was no less than the mean serum OVA-IgE level + 3 standard deviation in the control group. **Results** There were no significant differences in body length, body weight or food intake between the allergy and control groups at all time points ($P>0.05$). On day 21, the control group had a significantly higher food intake than the allergy group ($P<0.05$). On day 42 after challenge, the allergy group showed significantly higher serum OVA-IgE and plasma histamine levels than the control group ($P<0.05$). The sensitization rate (rate of successful modeling) was 90%. The fecal properties showed no significant differences between the two groups. **Conclusions** OVA by gavage without any adjuvant can successfully establish the model of food allergy in BN rats and has a high success rate. Food allergy induced by OVA may reduce food intake within a short period of time, but no influence on rats' body length or body weight has been observed.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(8): 757-761]

Key words: Food allergy; Ovalbumin; Brown Norway rats

[收稿日期] 2016-05-07; [接受日期] 2016-06-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81172686; 81302446); 上海市儿科学重点学科、上海市医学重点学科资助项目(05 III 002)。

[作者简介] 朱庆龄,女,博士研究生。

[通信作者] 盛晓阳,女,主任医师。

食物过敏 (food allergy, FA) 是机体对食物变应原产生的不良免疫反应, 可累及胃肠道、皮肤和呼吸道等。由于婴幼儿的肠道屏障功能、胃肠道免疫及非免疫功能均未发育成熟, 一旦接触食物抗原, 容易发生食物过敏, 故 FA 的发生在儿童中高于成人。欧美等发达国家儿童食物过敏发生率为 5%~10%, 且主要为 IgE 介导的过敏^[1-2]。鸡蛋蛋白是引起儿童 FA 的重要过敏原之一, 5 岁以内儿童的患病率约为 1.8%~2.0%^[1]。研究发现, 大部分儿童对烘烤或几乎全熟的鸡蛋耐受^[2-3], 而对生的或半熟的鸡蛋均过敏。食物抗原是婴儿出生后最早接触到的过敏原, 随着年龄增长, FA 婴儿发生哮喘等严重过敏性疾病的可能性更大, FA 往往被认为是过敏进程的第一步^[4]。研究表明, 啮齿类动物在免疫调节的许多方面与人类相似^[5-6], 如 Th1 和 Th2 细胞的分化和 IgE 介导的过敏反应等。在多数情况下, 引起人类过敏的食物可导致动物过敏, 因此可以通过建立敏感动物的食物过敏原模型, 研究实验动物对过敏原免疫应答的机制, 为预防和治疗过敏性疾病提供依据。目前虽然没有统一的 FA 模型, 但大鼠和小鼠由于遗传背景使它们对蛋白相关的 FA 反应产生的免疫机制均由 IgE 介导发生; 且相对体积较大的啮齿类动物而言, 大鼠和小鼠的价格较低, 这些优点使它们较广泛被用于 FA 模型中。挪威棕色 (Brown Norway, BN) 大鼠是高免疫球蛋白 (尤其是 IgE) 应答品系, 已作为过敏动物模型被广泛研究。Knippels 等^[7]早在 1999 年已对 FA 模型的建立进行了研究, 近年来, 采用免疫佐剂辅助建立 FA 模型的研究也相继增加^[8-10]。然而, 以上研究采用免疫佐剂和腹腔内注射等方式进行模型制作, 与儿童自然发生的 FA 进程并不完全相同。本研究拟采用全程经口灌胃, 且无免疫佐剂作为致敏的方法, 建立口服致敏模型, 在某种程度上说, 更接近于儿童 FA 发生的途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 周龄清洁级雄性 BN 大鼠 20 只, 身长 27 ± 4 cm, 体重 91 ± 15 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 饲养于上海交通大学医学院附属新

华医院动物实验中心。动物饲料购自江苏省南通特洛菲饲料科技有限公司 (LAD0011 号大鼠小鼠普通饲料), 不含卵清蛋白 (ovalbumin, OVA), 原料组成包括小麦粉、玉米粉、次粉、豆粕、玉米蛋白粉、植物油、啤酒酵母、盐、赖氨酸、蛋氨酸、矿物质、维生素。动物饮用水为实验动物中心提供的纯净水。饲养温度 23 ± 3 °C, 湿度 50%~70%, 12 h:12 h 自动昼夜循环。干预前, 所有动物均适应性喂养 4 d。每两只大鼠于一个笼子中饲养。

1.2 动物分组及模型建立

采用随机分组方法将动物分成过敏组和对照组, 每组各 10 只大鼠。在文献^[7]方法的基础上, 本研究进行了改变, 过敏组给予 1 mg/mL OVA (Sigma 公司) 灌胃 (1 mL/d), 全程不使用免疫佐剂; 对照组给予生理盐水灌胃 (1 mL/d)。过敏组在连续灌胃 41 d 后, 于第 42 天给予 OVA 100 mg/只灌胃激发, 1 h 后经眼内眦静脉取血约 1 mL, 分离血清并置于 -20 °C 冰箱保存待测。造模期间大鼠均可自由进食和饮水, 灌胃时间固定于每天早晨 8:00。分别在第 0、7、14、21、28、35 和 42 天测量大鼠的体重、身长和进食量。第 42 天激发后观察两组大鼠性状和粪便性状的变化。

1.3 身长、体重和进食量的测量

(1) 身长的测量: 将皮尺固定于桌面上, 测量者右手拇指和食指固定大鼠头部, 其余三指固定大鼠背部, 左手托起大鼠尾部及尾巴, 测量从大鼠鼻尖至尾巴末端的距离, 精确至 0.01 cm。

(2) 体重的测量: 将 U 型凹槽置于电子秤上, 调零后, 将大鼠放入槽中, 待大鼠静止时读取测量结果, 精确至 0.01 g。(3) 进食量的测量: 记录大鼠 24 h 前后饲料的重量, 计算差值, 得出平均每两只大鼠前一天的进食量, 精确至 0.01 g。造模期间大鼠身长、体重和进食量的测量时间均固定。

1.4 过敏反应的评估

在大剂量 OVA 激发后, 连续 45 min 观察两组大鼠的状态, 并进行致敏症状评分。评分标准为: 0= 没有症状; 1= 抓鼻子, 挠头; 2= 眼睛、嘴巴周围浮肿, 毛发竖立, 活动减少或呼吸频率升高; 3= 哮喘, 呼吸困难, 嘴和尾巴周围苍白; 4= 刺激后抽搐或静止; 5= 死亡^[11]。

1.5 血清 OVA-IgE 含量和血浆组胺水平测定

采用眼静脉丛采血法将大鼠血标本分别收集于A管(含肝素的抗凝管,用于分离血浆)和B管(不含抗凝剂,用于分离血清)中。A管收集后混匀,以3000转/min离心15min获得血浆,分装后置于-20℃冰箱中备用;B管于37℃水浴静置1h,再以3000转/min离心15min,吸取上清液进行分装,冻存于-20℃备用。采用酶联免疫法(ELISA)检测两组大鼠血清OVA-IgE抗体和血浆组胺水平,OVA-IgE ELISA试剂盒和组胺ELISA试剂盒均购自TaKaRa公司,实验步骤严格按照说明书进行操作。

1.6 FA大鼠模型建立成功的标志

FA模型建立成功的标志^[7]:过敏组大鼠血清OVA-IgE含量≥对照组大鼠血清OVA-IgE含量均数+3标准差($\bar{x} \pm 3s$)。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

两组间比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

造模前,对照组大鼠身长 27.7 ± 3.6 cm,体重 95 ± 18 g,进食量 10.8 ± 3.1 g;过敏组大鼠身长 26.9 ± 3.5 cm,体重 88 ± 12 g,进食量 11.1 ± 2.0 g,两组大鼠身长、体重和进食量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有基线可比性。在第7、14、21、28、35和42天,两组大鼠身长和体重比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1~2)。第21天时,对照组大鼠进食量大于过敏组($P < 0.05$),其他时间点两组大鼠进食量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。在42d激发后,过敏组大鼠出现激惹、活动度减低的表现,但未观察到两组大鼠粪便性状的差异。

表1 对照组和过敏组大鼠各阶段身长比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$, cm)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
对照组	29.6 ± 1.5	31.7 ± 1.8	33.6 ± 1.7	34.9 ± 1.6	36.0 ± 1.6	37.3 ± 1.7
过敏组	29.1 ± 0.8	31.6 ± 1.1	33.5 ± 1.2	35.0 ± 1.2	36.2 ± 1.4	37.2 ± 1.2
t值	0.942	0.148	0.094	-0.13	-0.301	0.217
P值	0.358	0.884	0.926	0.898	0.767	0.83

表2 对照组和过敏组大鼠各阶段体重比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$, g)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
对照组	122 ± 21	147 ± 27	173 ± 33	193 ± 35	203 ± 33	226 ± 62
过敏组	122 ± 14	149 ± 20	177 ± 24	201 ± 30	228 ± 54	229 ± 34
t值	-0.042	-0.185	-0.274	-0.529	-1.252	-0.151
P值	0.967	0.855	0.787	0.603	0.227	0.882

表3 对照组和过敏组大鼠各阶段进食量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$, g)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
对照组	13.9 ± 2.8	11.6 ± 2.2	15.2 ± 2.3	13.9 ± 3.0	13.4 ± 1.8	12.0 ± 2.1
过敏组	13.2 ± 0.8	13.8 ± 3.2	12.8 ± 1.9	15.2 ± 3.4	13.6 ± 1.2	13.8 ± 2.2
t值	0.649	-1.77	2.594	-0.9023	-0.308	-1.868
P值	0.525	0.094	0.018	0.379	0.762	0.078

2.2 两组大鼠过敏反应表现

过敏组 10 只大鼠中, 3 只出现嘴和尾巴周围苍白等评分为 3 分的表现; 5 只出现眼睛或嘴巴周围浮肿、毛发竖立、活动减少等评分为 2 分的表现; 2 只仅出现抓鼻子、挠头等评分为 1 分的表现。对照组 10 只大鼠则没有症状, 过敏症状评分均为 0。

2.3 两组大鼠血清 OVA-IgE 水平检测结果

对照组血清 OVA-IgE 水平为 $0.9 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$,

过敏组为 $5.4 \pm 3.1 \mu\text{g/mL}$, 两组比较差异有统计学意义 ($t=-4.651, P<0.001$)。依照 FA 模型建模的阳性判定公式得, 过敏组大鼠 10 只中共有 9 只 IgE 水平达到 \geq 对照组均数 +3 倍标准差的水平, 致敏率为 90%。

将过敏组中未致敏大鼠剔除, 过敏组和对照组大鼠身长、体重和进食量在不同时间点比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 1。

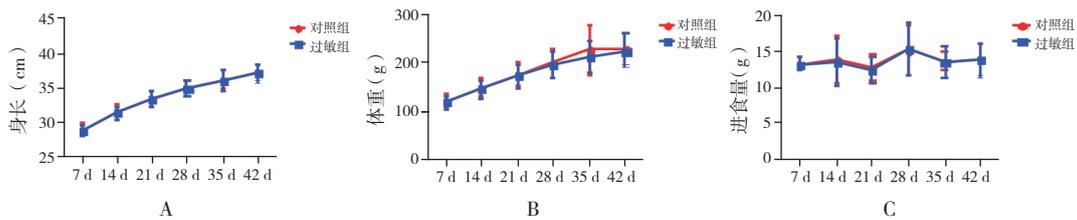


图 1 过敏组大鼠致敏成功后两组大鼠一般情况比较 A: 两组大鼠身长比较; B: 两组大鼠体重比较; C: 两组大鼠进食量比较。对照组 $n=10$; 过敏组 $n=9$ 。

2.4 两组大鼠血浆组胺水平检测

对照组血浆组胺水平为 $0.07 \pm 0.04 \mu\text{g/L}$, 过敏组为 $0.65 \pm 0.58 \mu\text{g/L}$, 两组比较差异有统计学意义 ($t=-3.137, P=0.006$)。

3 讨论

BN 大鼠是高免疫球蛋白 (尤其是 IgE) 应答品系, 已作为过敏动物模型被广泛研究。本研究采用无佐剂、经口致敏的方式给予 BN 大鼠 1 mg/d 的 OVA 研究 FA 的动物模型, 以血清特异性 IgE 抗体为指标, 验证 BN 大鼠 FA 模型的可行性, 以期为 FA 的研究提供可参考的动物模型。

Akiyama 等^[12]将 BN 大鼠与 BALB/c 小鼠、ASK 小鼠及 B10A 小鼠进行口服致敏模型比较, 发现 BN 大鼠和 B10A 小鼠更适合用于 IgE 介导的 FA 研究。Sun 等^[13]将 BN 大鼠和 Wistar 大鼠在口服致敏肠道模型中进行了比较, 两者均产生了显著的 OVA 特异性 IgE 抗体水平的变化, 但 BN 大鼠相比 Wistar 大鼠对 IgE 介导的过敏反应更为敏感。Knippels 等^[14]的研究也证实了 BN 大鼠是一种较理想的口服致敏动物模型。Knippels 等^[15]在免疫印迹实验中, 分别采集口服鸡蛋蛋白和牛奶过敏的人类血清和 BN 大鼠血清检测, 结果提示该大鼠与人类表现出相同的蛋白识别模式; 大鼠过

敏动物模型适于进行血清特异性抗体的动力学分析, 口服致敏且无需佐剂, 可产生与人类相似的过敏症状^[16], 而口服致敏与人类 FA 的致敏途径最相似, 故更适合用于 FA 模型的研究。此外, 有研究发现, 初始干预年龄对 BN 大鼠产生 FA 反应并无影响^[17]。基于以上的研究, Knippels 等^[7]在不使用佐剂的前提下, 连续 42 d 给予 BN 大鼠 OVA (1 mg/d) 灌胃, 结果显示超过 80%BN 大鼠产生 OVA 特异性 IgE, 且致敏大鼠在激发后肠道通透性增加。本研究结果与之相似, 在干预的第 42 天给予每只大鼠 100 mg 的 OVA 的激发剂量, 发现其致敏率达到 90%。

一个纵向研究^[18]发现, 牛奶蛋白过敏的儿童 (1~17 月龄) 身高 (身长) 增长较正常儿童减慢, 且过敏症状发生越早对儿童生长的影响更明显。Christie 等^[19]在一项对儿童 (1 月龄至 10 岁) FA 的横断面研究中指出, FA 对儿童身高增长存在负面影响。然而, 2013 年刘俊红等^[20]在动物研究中发现, 短期内 FA 并未对体重增长造成影响。2014 年, Robbins 等^[21]的临床研究指出, 牛奶蛋白过敏儿童的体重身高和 BMI 百分位数均值相比正常儿童而言, 显著性减低, 而在其他 FA 组 (花生和鸡蛋蛋白) 中均未发现。本研究干预措施为期 6 周, 采用 OVA 为致敏原建立 FA 模型, 并未发现 OVA 过敏对 BN 大鼠的体重和身长产生影响, 与以上研

究者得出结论一致。过敏组在第21天的进食量较对照组减低,但发现两组大鼠体重增长并无差异,由此推断短期进食量减少对体重增长影响不大。

血清特异性IgE水平升高是人类或动物过敏模型发生速发型过敏反应的诊断因素之一。ELISA检测血清特异性IgE最为常用,已逐渐取代被动皮肤试验,并由Birmingham等^[22]证实更具敏感性、特异性和高重复性。故本研究采用ELISA法检测血清OVA-IgE抗体水平,评价BN大鼠FA模型的建立。经口灌胃且不采用佐剂所建立的FA动物模型与人类FA发生过程更为相似。且本研究发现,OVA激发所产生的FA发生率较高,是研究IgE介导的FA较理想的动物模型。然而,本研究未从BN大鼠亲代进行干预,故不能排除亲代暴露于易过敏食物(如蛋白、坚果等)对子代产生食物过敏造成的影响,未来还需对其进行进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Sicherer SH. Epidemiology of food allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 127(3): 594-602.
- [2] Bartnikas LM, Sheehan WJ, Larabee KS, et al. Ovomucoid is not superior to egg white testing in predicting tolerance to baked egg[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2013, 1(4): 354-360.
- [3] Turner PJ, Mehr S, Joshi P, et al. Safety of food challenges to extensively heated egg in egg-allergic children: a prospective cohort study[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2013, 24(5): 450-455.
- [4] Tan RA, Corren J. The relationship of rhinitis and asthma, sinusitis, food allergy, and eczema[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2011, 31(3): 481-491.
- [5] Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, et al. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(2): 309-317.
- [6] Johnston LK, Chien KB, Bryce PJ. The immunology of food allergy[J]. *J Immunol*, 2014, 192(6): 2529-2534.
- [7] Knippels LM, Penninks AH, van Meeteren M, et al. Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin[J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(8): 881-888.
- [8] Liu ZQ, Zheng PY, Yang PC. Hapten facilitates food allergen-related intestinal hypersensitivity[J]. *Am J Med Sci*, 2013, 345(5): 375-379.
- [9] Ahrens B, Quarcoo D, Buhner S, et al. Development of an animal model to evaluate the allergenicity of food allergens[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2014, 164(2): 89-96.
- [10] Claude M, Lupi R, Bouchaud G, et al. The thermal aggregation of ovalbumin as large particles decreases its allergenicity for egg allergic patients and in a murine model[J]. *Food Chem*, 2016, 203: 136-144.
- [11] 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(2 Pt 1): 206-214.
- [12] Akiyama H, Teshima R, Sakushima JI, et al. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice[J]. *Immunol Lett*, 2001, 78(1): 1-5.
- [13] Sun N, Zhou C, Pu Q, et al. Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin[J]. *J Immunotoxicol*, 2013, 10(1): 67-74.
- [14] Knippels LM, Penninks AH. Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111(2): 233-238.
- [15] Knippels LM, van der Kleij HP, Koppelman SJ, et al. Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients[J]. *Allergy*, 2000, 55(3): 251-258.
- [16] Dearman RJ, Kimber I. Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(4): 458-468.
- [17] Pilegaard K, Madsen C. An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation[J]. *Toxicology*, 2004, 196(3): 247-257.
- [18] Isolauri E, Sütas Y, Salo MK, et al. Elimination diet in cow's milk allergy: risk for impaired growth in young children[J]. *J Pediatr*, 1998, 132(6): 1004-1009.
- [19] Christie L, Hine RJ, Parker JG, et al. Food allergies in children affect nutrient intake and growth[J]. *J Am Diet Assoc*, 2002, 102(11): 1648-1651.
- [20] 刘俊红, 吴斌, 赖乾坤, 等. SD 幼鼠食物过敏模型的建立与评价[J]. *临床儿科杂志*, 2013, 31(10): 953-958.
- [21] Robbins KA, Wood RA, Keet CA. Milk allergy is associated with decreased growth in US children[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 134(6): 1466-1468.
- [22] Birmingham N, Payankaulam S, Thanavorakul S, et al. An ELISA-based method for measurement of food-specific IgE antibody in mouse serum: an alternative to the passive cutaneous anaphylaxis assay[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 275(1-2): 89-98.

(本文编辑: 万静)