

两品系小鼠食物过敏模型的比较

赵新风¹, 曾本华², 谭毅³, 魏泓², 程茜¹

(1. 重庆医科大学附属儿童医院, 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014; 2. 第三军医大学基础部实验动物学教研室, 重庆 400038; 3. 重庆医科大学实验动物学中心, 重庆 400016)

【摘要】 目的 比较两种不同品系小鼠食物过敏模型的敏感性和肠道菌群变化的差异, 旨在为食物过敏模型的建立提供依据。**方法** 分别对30只4~5周龄BALB/c和KM雌鼠用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏建立食物过敏模型, ELISA法检测小鼠血清OVA特异性IgE水平; HE染色观察空肠组织形态; 采用DGGE技术检测粪便菌群的变化。**结果** (1) 30只致敏的BALB/c小鼠中有27只血清OVA特异性IgE水平明显升高($P < 0.001$), 而30只致敏的KM小鼠中有21只, 且BALB/c小鼠空肠绒毛炎症细胞浸润、上皮脱落及坏死比KM小鼠明显; (2) 食物过敏造模后, BALB/c小鼠肠道菌群的改变明显($P < 0.001$), 而KM小鼠中仅有均匀度改变显著($P < 0.05$); (3) BALB/c小鼠和KM小鼠对照组肠道菌群的丰富度、Shannon指数及均匀度都有差异。**结论** BALB/c小鼠对OVA的敏感性高于KM小鼠, 不同品系小鼠肠道菌群结构不同, OVA处理后, BALB/c小鼠菌群的改变比KM小鼠更明显。

【关键词】 小鼠; 食物过敏; 模型; 卵蛋白; 敏感性; 肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33, R378 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0035-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.007

Comparison of the BALB/c and Kunming mouse models of food allergy

ZHAO Xin-feng¹, ZENG Ben-hua², TAN Yi³, WEI Hong², CHENG Qian¹

(1. Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; 2. Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038; 3. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

【Abstract】 Objective In order to provide the basis for establishment of food allergy models, we compared the differences of sensitivity and alterations of intestinal flora of food allergy models in two strains of mice. **Methods** Forty 4-5-week old female BALB/c and Kunming mice were divided into control group ($n = 10$) and food allergy group ($n = 30$), respectively. Ovalbumin (OVA) was injected to the mice to establish food allergy models. Serum OVA-specific IgE of the mice was assayed by ELISA. The jejunum tissue was examined by pathology with HE staining. The changes of fecal flora were detected by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Results** (1) Among the sensitized 60 mice, OVA-sIgE levels were significantly increased in 27/30 BALB/c mice and 21/30 KM mice compared with those of control groups ($P < 0.001$). Moreover, there were more evident inflammatory cell infiltration, epithelial cell shedding and cytolysis in the jejunal villi of BALB/c mice than those of KM mice. (2) After food allergy modeling, there were significant changes of intestinal flora in the BALB/c mice ($P < 0.001$), while only significant change of evenness was found in the KM mice

【基金项目】 国家自然科学基金(81370906); "973"计划(2013CB531406)。

【作者简介】 赵新风(1987-), 女, 重庆医科大学附属儿童医院儿童保健科硕士研究生, 从事食物过敏与肠道菌群的研究。

【通讯作者】 程茜。E-mail: chq5@126.com

($P < 0.05$). (3) There were changes of abundance, Shannon index and evenness of intestinal flora in the model groups of BALB/c and KM mice. **Conclusions** BALB/c mice are more sensitive to OVA allergy than KM mice. The composition of intestinal flora is different among different strains of mice. The changes of intestinal flora after OVA challenge in BALB/c mice are more obvious than those in KM mice.

【Key words】 Mice; Food allergy; Models; Ovalbumin; Sensitivity; Intestinal flora

食物过敏已成为威胁人类健康的主要问题,尤其在发达国家,其发病率在成人为 3%、儿童为 6%^[1,2]。然而,食物过敏的发病机制仍不明确,需要合适的食物过敏模型以便于更深入的研究。目前已有的 BALB/c 小鼠、C57 小鼠模型敏感性太高,不符合人群的发病规律,且近交系个体之间相同的遗传组成与人类个体之间的遗传异质性差异很大。因此本实验建立两种不同品系小鼠的食物过敏模型,以评价封闭群 KM 小鼠和近交系 BALB/c 小鼠在食物过敏模型中的敏感性和了解肠道菌群变化的差异性,旨在建立与人发病规律更接近的过敏模型,为食物过敏与肠道菌群关系的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 BALB/c 和 KM 小鼠各 40 只,4~5 周龄,体重 15.5~17 g,由第三军医大学实验动物中心提供【SCXK(渝)2007-0002】,实验地点在第三军医大学实验动物中心【SYXK(渝)2012-0002】。喂饮条件为:温度 20~25℃,12 h/12 h 昼夜规律照明,自由饮水与进食。以特殊饲料(不含鸡蛋)饲养,饲料基本成分均按规定的实验动物营养需要量配制,具体如下:

动物饲料配方(每 50 kg 含量):玉米 12.5 kg、麦麸 5 kg、豆粕 7.5 kg、次粉 10 kg、鱼粉 7 kg、骨粉 1 kg、酵母粉 2.5 kg、植物油 0.75 kg、动物油 0.25 kg、盐 0.5 kg、鱼肝油 0.5 kg、维生素 E 0.25 kg、复合维生素 80 g、水 4 L。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

每品系 40 只雌鼠,随机分成实验组和对照组,实验组 30 只、对照组 10 只。实验组小鼠经肠道激发致敏,对照组给予等量生理盐水,于实验第 28 天末次激发 2 h 内处死小鼠,留取标本。

1.2.2 动物模型的建立

参考文献[3]方法。基础致敏:实验的第 1 天经腹腔注射给予含 10 μg OVA(V 级, Sigma 公司)和 1 mg 氢氧化铝(Sigma 公司)的生理盐水,每只 0.5 mL。

强化致敏:于实验第 15 天经腹腔注射含 10 μg OVA(V 级, Sigma 公司)的生理盐水,每只 0.5 mL。肠道激发:于实验第 20 天起至第 28 天,用 500 mg/L OVA(II 级, Sigma 公司)溶液隔日进行灌胃,每只 0.2 mL。

1.2.3 血清 OVA 特异性 IgE 水平的检测

采用 ELISA 法。血清 OVA 特异性 IgE 水平检测:末次激发后 2 h 内经眼球取血,分离血清,以 10 μg/mL OVA 包板,每孔 100 μL,1% 牛血清白蛋白封闭,每孔 200 μL;加入血清样品(1:1)稀释,每孔 100 μL;加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgE(1:1000 稀释)(Southern Biotechnology Associates),每孔 100 μL;TMB(凯基生物)显色后终止反应,使用全自动酶标仪(BIO-RAD, USA)在波长 450 nm 处检测 A 值。

1.2.4 肠道组织学观察

处死小鼠,取 0.5 cm 空肠固定,苏木素-伊红染色,镜下观察空肠绒毛组织形态。

1.2.5 粪便菌群检测

于末次灌胃前收集小鼠粪便,进行 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)分析。

(1) 粪便菌群总 DNA 的提取:样品置于 2 mL 螺口管(Biospec)中,加入 700 μL 裂解液、250 μL 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和 0.3 g 铅珠,混匀,用 Mini-Beadbeater-16(Biospec, USA)研磨 2 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清,加入 250 μL 10 mol/L 乙酸铵,然后使用 2 次酚/氯仿/异戊醇和氯仿抽提,异丙醇沉淀,70% 的乙醇洗涤,风干后,加入 50 μL 去离子水和 2 μL DNA free-RNAase(生工生物),37℃ 孵育 15 min。取 2 μL 的 DNA 溶液于 NanoDrop ND-1000 核酸定量仪中测定其 DNA 含量和纯度。

(2) PCR 扩增:扩增 16S rRNA 基因 V6-V8 区引物为 U968F(5'-CGCCC GCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGAACCGGAAGAACCCTTA-3'), L1401R(5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3')。扩增体系:25 μL,包括 12.5 μL 2 PCR MasterMix, 0.5 μL 10 mol/L 的引物,1 μL 100 ng/μL 的 DNA 模板,10.5 μL 的 ddH₂O。反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,

30 个循环;72℃ 7 min。

(3) DGGE 分析: PCR 产物用 DGGE 进行分析, 采用 Bio-Rad 公司 DcodeDGGE 系统, 做法参照 Rowan 等方法。DGGE 使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 采用 45% ~ 58% 变形梯度。首先在 220 V 电压下预电泳 10 min, 随后 85 V 电泳 16 h。电泳结束后, 进行硝酸银染色。DGGE 凝胶采用 Quantity One 进行分析。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 One-way ANOVA 方差分析, Student-Newman-Keuls 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 血清 OVA 特异性 IgE 水平

ELISA 法测定血清 OVA 特异性 IgE 水平, 以 $X + 2SD$ 为标准, 大于对照组 $X + 2SD$ 为过敏组, 小于对照组 $X + 2SD$ 为无反应组。结果显示, KM 对照组 OVA-sIgE (0.45 ± 0.12) 和 BALB/c 对照组 (0.69 ± 0.17) 差异无显著性 ($P > 0.05$), 实验组血清中的 OVA-sIgE 与对照组相比, 30 只 BALB/c 中有 27 只 (2.10 ± 0.64) 大于对照组 (0.69 ± 0.17) 两倍的 SD ($P < 0.001$), 而 30 只 KM 中有 21 只 (2.00 ± 0.67) 大于对照组 (0.45 ± 0.12) 两倍的 SD ($P < 0.001$)。

2.2 肠道组织学变化

空肠组织切片 HE 染色 (见图 1, 彩插 4) 可见

BALB/c 小鼠和 KM 小鼠实验组的空肠绒毛上皮细胞局灶坏死、脱落, 炎性细胞浸润, 而 BALB/c 小鼠实验组更严重。

2.3 肠道菌群结构的变化

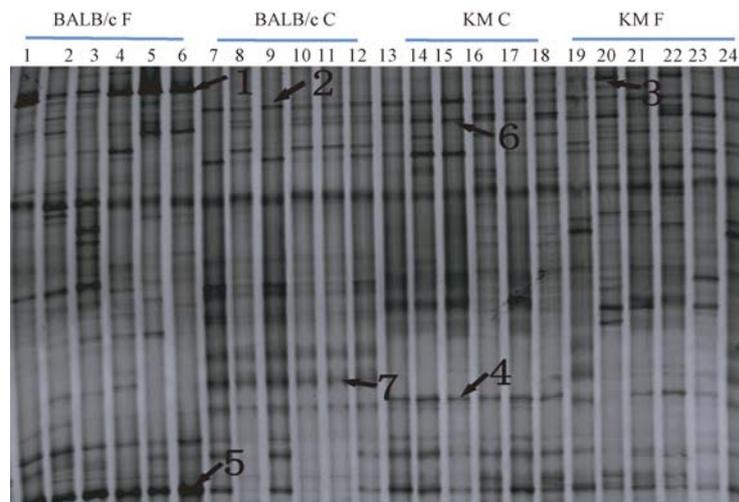
2.3.1 DGGE 图谱

由图 2 可得, BALB/c 和 KM 小鼠各组之间既有共有条带又有差异条带, 即使是同一位置的条带, 明暗程度也各有不同。如条带 2 和 5 在各组中是共有的, 而条带 1 只在 BALB/c 过敏组明显可见, 条带 7 在 BALB/c 对照组中可见, 可见食物过敏造模使肠道菌群的结构发生了改变。条带 6 存在于 KM 小鼠中, 而在 BALB/c 小鼠中不明显, 说明不同品系的小鼠肠道菌群的结构也不同。

2.3.2 16SrRNA 基因 V6-V8 区 PCR-DGGE 指纹图谱的条带分析及相似性 UPGMA 聚类分析

(1) UPGMA 聚类分析: 对 V3-DGGE 指纹图谱进行多样性指数分析 (见表 1), 结果表明: BALB/c 小鼠的过敏组和对照组比较, 丰富度、Shannon 指数和均匀度均有明显差异 ($P < 0.001$); 而 KM 小鼠的过敏组和对照组相比, 只有均匀度差异有显著性 ($P < 0.05$)。BALB/c 小鼠的对照组和 KM 小鼠的对照组比较, 丰富度 ($P < 0.001$)、Shannon 指数 ($P < 0.001$) 和均匀度 ($P < 0.05$) 差异有显著性。

(2) 多样性分析: DGGE 图谱的聚类分析 (图 3) 显示各组之间的总相似度为 13%。BALB/c 过敏组 1-6 聚成一簇, 其余几组也大部分分别独成一簇,



注: 泳道上方数字为泳道编号。1~6 号泳道为 BALB/c 过敏组, 7~12 号泳道为 BALB/c 对照组, 13~18 号泳道为 KM 对照组, 19~24 号泳道为 KM 过敏组。

图 2 BALB/c 和 KM 各组小鼠肠道菌群 V6-V8 区 DGGE 图谱

Note: 1-6: BALB/c food allergy groups, 7-12: BALB/c control groups, 13-18: KM control groups, 19-24: KM food allergy groups

Fig. 2 V6-V8 DGGE profiles of the intestinal flora between the BALB/c and KM mice

说明各组之间的肠道菌群结构存在差异。结果显示,小鼠的聚类与品系和食物过敏造模明显相关。

表 1 BALB/c 和 KM 小鼠对照组与过敏组 V6-DGGE 指纹图谱的多样性指数分析

Tab. 1 Diversity indexes of the V6-DGGE profile between control and FA groups of BALB/c and KM mice

引物类型 Primer types	组别 Mouse groups	丰富度 Abundance	Shannon 指数 Shannon index	均匀度 Evenness
V6-V8 区	BALB/c control	10.75 ± 0.50	1.41 ± 0.16	0.59 ± 0.06
	BALB/c FA	14.13 ± 0.83 ^{***}	2.10 ± 0.23 ^{***}	0.79 ± 0.07 ^{***}
	KM control	15.83 ± 0.41 ^a	1.88 ± 0.12 ^a	0.69 ± 0.05 ^b
	KM FA	15.50 ± 0.55	2.08 ± 0.14	0.76 ± 0.06 [*]

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 KM 对照组相比; ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.05$, 与 BALB/c 对照组相比。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. KM control; ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.05$, vs. BALB/c control

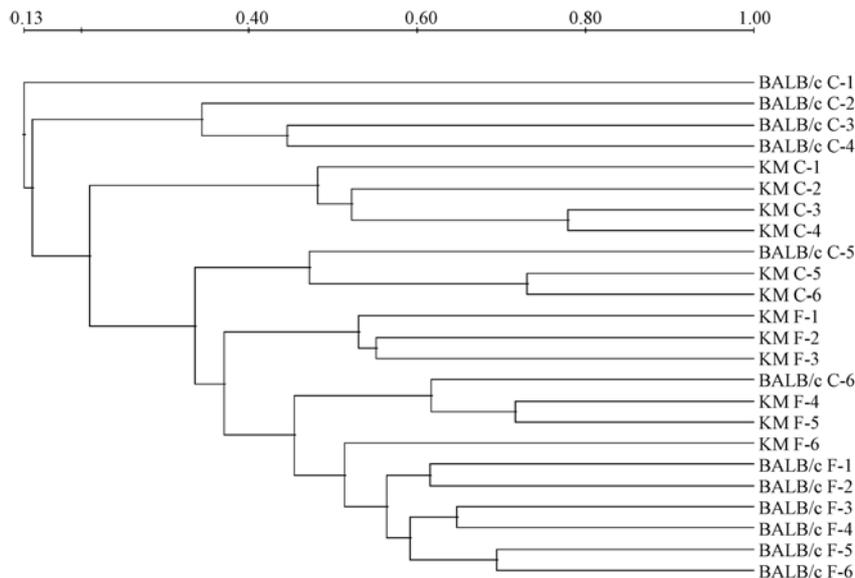


图 3 BALB/c 和 KM 小鼠对照组和过敏组粪便菌群 PCR-DGGE 图谱聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of PCR-DGGE profiles of the microbiota in the control and FA groups of BALB/c and KM mice

2.3.3 DGGE 指纹图谱的 PCA 分析

对各组 DGGE 指纹图谱进行 PCA 分析,根据各样品在第一和第二主成分的分值绘制 PCA 图(图 4)。X 坐标表示第一主成分(48.551%),Y 坐标表示第二主成分(27.306%)。图中可以看出,各组绝大部分在 PCA 分析图中分离,其中 BALB/c 和 KM 过敏组有所聚拢。

3 讨论

国际上目前仍未建立标准的食物过敏模型,常用的动物种类和品种有很多,但国内最常用的是 BALB/c 小鼠。然而 BALB/c 小鼠作为食物过敏动物模型的可行性一直存在争议^[4,5]。Deman 等^[5]认为 BALB/c 是合适的动物模型,吕相征^[6]等研究发现 BALB/c 小鼠对无致敏史的食物也产生过敏反应,与人体过敏反应的情况差异较大,指出 BALB/c 小鼠不适合作为食物过敏动物模型。鸡蛋蛋白是最

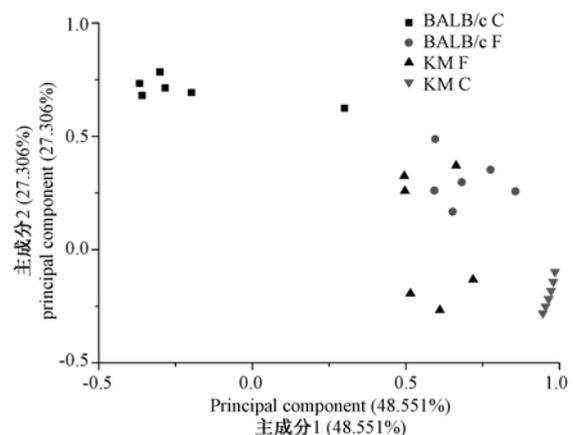


图 4 BALB/c 和 KM 小鼠对照组和过敏组粪便菌群 PCR-DGGE 图谱 PCA 分析

Fig. 4 PCA analysis of the PCR-DGGE profiles in the control and FA groups of BALB/c and KM mice

常见食物过敏原,而 OVA 是鸡蛋蛋白的主要成分,

因此本实验食物过敏模型采用 OVA 激发致敏。OVA 致敏小鼠的食物过敏以 IgE 介导的速发型过敏反应为主,致敏小鼠出现特异性的 IgE 水平升高,空肠绒毛破损、坏死和炎性细胞浸润,证实 IgE 介导的食物过敏动物模型建立成功。本研究中致敏的 30 只 BALB/c 小鼠血清 OVA 特异性 IgE 的水平有 27 只明显高于对照组,而 KM 小鼠中仅有 21 只和对照组有显著差异;并且 BALB/c 小鼠小肠的组织形态学改变要明显严重于 KM 小鼠,说明了 BALB/c 小鼠对 OVA 的敏感性高于 KM 小鼠。这可能与 BALB/c 小鼠是近交系小鼠,其基因背景一致有关。正是因为 BALB/c 小鼠的敏感性高,所以常被用于食物过敏的造模。而 KM 小鼠基因背景可能与人类更相似,各个小鼠间遗传背景差异大,敏感性不可能完全一致,可以更真实地反映 OVA 致敏时所造成的机体过敏反应状态。故我们认为,在建立食物过敏模型时,应根据不同的实验目的选用不同的小鼠品系或品种。人类在接触相同的食物时一小部分人会出现过敏现象,而大部分人正常,这可能是遗传和环境共同作用的结果。通过 OVA 致敏后过敏小鼠和无反应小鼠之间的差异来研究食物过敏与肠道菌群作用,相对敏感性低的小鼠模型比较适合。

通过比较 BALB/c 和 KM 小鼠对照组的肠道菌群结构,可以看出不同品系的小鼠其肠道菌群结构不同。Campbell 等^[7]研究了不同品系小鼠的肠道菌群发现,小鼠的品系与肠道菌群显著相关,与我们的研究结果相似。张晓婧等^[8]的研究也指出不同遗传背景的小鼠对肠道菌群具有选择性的定植效果。BALB/c 小鼠过敏组和对照组肠道菌群的丰富度、Shannon 指数和均匀度均有显著差异,而 KM 小鼠过敏组和对照组肠道菌群也有不同,但仅有均匀度的差异有统计学意义。这说明 OVA 致敏后两种品系小鼠的肠道菌群有所改变,但改变的程度不同, BALB/c 小鼠菌群改变的幅度更大,PCA 分析发现虽然 KM 和 BALB/c 差异很大,但过敏发生时,菌群聚拢,提示菌群的改变相似。食物过敏的发病机制还不明确,许多动物实验都支持食物过敏与肠道菌群相关^[9,10],人群研究也显示食物过敏儿童和正常儿童相比,其肠道菌群不同^[11,12],肠道菌群在食物

过敏中的重要性正在被揭示。KM 与 BALB/c 小鼠在食物过敏状态下所表现的发病差异,以及不同品系间小鼠食物过敏后肠道菌群的不同,将可能对研究食物过敏的机制提供新的思路和动物模型。

(本文图 1 见彩插 4。)

参 考 文 献

- [1] Eigenmann PA, Beyer K, Wesley Burks A, et al. New visions for food allergy: an iPAC summary and future trends [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2008, 19(19):26-39.
- [2] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125:116-125.
- [3] 白枫,黎海芪. 黄褐毛忍冬皂苷对卵清蛋白致敏小鼠的抗过敏作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(15):1395-1398.
- [4] 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.
- [5] Dearman RJ, Kimber I. Determination of protein allergenicity: studies in mice [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 120(1-3):181-186.
- [6] 吕相征,刘秀梅,郭云昌,等. BALB/c 小鼠食物过敏动物模型的实验研究 [J]. *卫生研究*, 2005, 34(2):211-213.
- [7] Campbell JH, Foster CM, Vishnivetskaya T, et al. Host genetic and environmental effects on mouse intestinal microbiota [J]. *ISME J*, 2012, 6(11):2033-2044.
- [8] 张晓婧,曾本华,刘智伟. 两种不同品系小鼠的人源菌群模型的建立与肠道菌群的比较 [J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(4):376-380.
- [9] Sonoyama K, Ogasawara T, Goto H, et al. Comparison of gut microbiota and allergic reactions in BALB/c mice fed different cultivars of rice [J]. *Br J Nutr*, 2010, 103(2):218-226.
- [10] Inoue R, Tsukahara T, Ueno K, et al. Possible link of a compositional change in intestinal microbiota with the anti-allergic effect of fructo-oligosaccharides in NC/jic mice [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(9):1947-1950.
- [11] Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, et al. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(3):587-591.
- [12] Bjorksten B, Sepp E, Julge K, et al. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(4):516-520.

[收稿日期] 2013-11-19