

黄曲霉毒素 B₁ 对卵白蛋白激发人外周血嗜碱性 白血病细胞(KU812)脱颗粒的影响

邓玉珏^{1,2,3}, 武涌^{1,3,4}, 陈红兵^{1,3,4}, 佟平^{1,3}, 高金燕^{3,4*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学食品学院, 南昌 330047;
3. 江西省食物过敏重点实验室, 南昌 330047; 4. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047)

摘要: **目的** 研究黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 暴露对鸡蛋过敏原卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 激发人外周血嗜碱性白血病细胞 (KU812) 脱颗粒的影响, 以阐明 AFB₁ 暴露与食物过敏的相关性。 **方法** 构建 AFB₁ 暴露下 OVA 激发 KU812 细胞脱颗粒模型, 采用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 AFB₁ 对其生物活性介质 β -氨基己糖苷酶 (β -hexosaminidase, β -HEX) 和组胺, 以及细胞因子白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 释放量的影响; 然后采用实时定量荧光聚合酶链反应法分析对 IL-4 和 IL-6 的 mRNA 表达水平的影响。 **结果** OVA 刺激 KU812 细胞后会使其释放更多生物活性介质, 包括 β -HEX、组胺及细胞因子 (IL-4、IL-6、IL-1 β); 当有 AFB₁ 同时暴露, 则会不同程度地加重这些生物活性介质的释放量。其中, AFB₁ 对 β -HEX 和组胺的释放量影响较小; 但能够显著提高细胞因子 IL-4、IL-6 以及 IL-1 β 的分泌量 ($P < 0.01$), 尤其是对 IL-1 β 的影响更显著, 相较于对照组其分泌量提高 84%。同时 IL-4 和 IL-6 的 mRNA 基因的表达水平也被提高。 **结论** OVA 激发 KU812 会导致其脱颗粒并释放与食物过敏相关的一些活性介质和细胞因子。而 AFB₁ 质量浓度为 10000 ng/mL 的同时暴露, 会提高这些相关活性介质和细胞因子的释放量, 从而加重 OVA 所引发的食物过敏反应。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; KU812 细胞; 卵白蛋白; 白细胞介素-4; 白细胞介素-6; 白细胞介素-1 β

Effects of aflatoxin B₁ on the degranulation of ovalbumin-sensitized human peripheral blood basophilic leukemia cells (KU812 cells)

DENG Yu-Jue^{1,2,3}, WU Yong^{1,3,4}, CHEN Hong-Bing^{1,3,4}, TONG Ping^{1,3}, GAO Jin-Yan^{3,4*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. College of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi Province Key Laboratory of Food Allergy, Nanchang 330047, China; 4. Sino-german Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) exposure on the degranulation of human peripheral blood basophilic leukemia cells (KU812) sensitized by ovalbumin (OVA), and clarify the correlation between AFB₁ exposure and food allergy. **Methods** The degranulation model of KU812 cells being sensitized by OVA

基金项目: 江西省中央引导地方科技发展资金项目(20221ZDD02001)、国家自然科学基金项目(32272427)

Fund: Supported by the Central Government Guide Local Special Found Project for Scientific and Technological Development of Jiangxi Province (20221ZDD02001), and the National Natural Science Foundation of China (32272427)

*通信作者: 高金燕, 硕士, 教授, 主要研究方向为食物过敏与食品化学。E-mail: gaojy2013@ncu.edu.cn

*Corresponding author: GAO Jin-Yan, Master, Professor, Nanchang University, 235 Nanjing Eastern Road, Nanchang 330047, China. E-mail: gaojy2013@ncu.edu.cn

meanwhile exposed to AFB₁ was firstly established. The effects of AFB₁ on the release of some bioactive media and cytokines were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), including β -hexosaminidase (β -HEX), histamine, interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β), then real-time quantitative fluorescent polymerase chain reaction method was used to analyze the effects on the expression level of mRNA from IL-4 and IL-6, respectively. **Results** OVA could sensitize KU812 cells to release β -HEX, histamine, and cytokines (IL-4, IL-6, IL-1 β); in the meanwhile exposure to AFB₁ these effects would be variously worsened. Among them, compared with the OVA group, the effect of AFB₁ on release of β -HEX or histamine was relatively less, but the secretion of cytokines IL-4, IL-6 and IL-1 β increased significantly ($P < 0.01$), in particular, the effect of IL-1 β was more significant, with an 84% increase in secretion compared to the control group. Meanwhile, mRNA expression levels of IL-4 and IL-6 were increased. **Conclusion** OVA sensitization can lead to degranulation of KU812 cells and release of some active mediators and cytokines associated with food allergy. When KU812 cells are sensitized by OVA meanwhile exposure to 10000 ng/mL AFB₁, the release and secretion of some active media and cytokines, which associates with food allergy, can be got more increase during degranulation occurring, therefore, the OVA allergic reaction will be aggravated.

KEY WORDS: aflatoxin B₁; KU812 cells; ovalbumin; interleukin-4; interleukin-6; interleukin-1 β

0 引言

食物过敏是暴露于特定食物后免疫系统的异常反应,是世界范围内严重的食品安全和公共卫生问题^[1-2],其临床症状多种多样,严重程度从轻微到危及生命^[3]。特异性免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)在食物过敏的病理生物学起着重要的作用,刺激机体免疫系统而激活引起辅助性 T 细胞反应,导致 IgE 与嗜碱性粒细胞和肥大细胞表面上的 IgE 高亲和力受体(Fc epsilon RI, Fc ϵ RI受体)结合,触发这些效应细胞内一系列信号转导,导致嗜碱性粒细胞和肥大细胞的脱颗粒,致使 β -氨基己糖苷酶(β -hexosaminidase, β -HEX)和组胺等介质的释放,引发产生各种食物过敏反应^[4]。

食物过敏的发生被认为涉及多种因素,历史和当前数据都表明,母体因素、遗传以及环境暴露是食物过敏发生的主要危险因素^[5]。最新研究表明,环境中污染物暴露也是导致食物过敏发生的关键因素之一^[6]。例如,环境中真菌暴露,胶霉毒素(gliotoxin)、展青霉素(patulin)、呕吐毒素(deoxynivalenol)等霉菌毒素已被证实可促进食物过敏的发生^[7-8]。黄曲霉毒素是由黄曲霉、寄生曲霉等真菌所产生的毒素^[9],由于其毒性高且易于污染食品和饲料,是食品安全关注的重点之一。黄曲霉毒素包括黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、AFB₂、AFM₁、AFM₂、AFG₁、AFG₂等^[10]。AFB₁在黄曲霉毒素中表现出最强的诱变致癌活性^[11]。因此,AFB₁被国际癌症研究机构认定为人类I类致癌物^[12]。目前关于黄曲霉毒素与食物过敏之间的关联性还未明确,也鲜少报道。

对于食物过敏评价方法主要有动物体内实验和体外细胞实验等。相对于动物整体实验,体外细胞实验则具有物种特异性、更易于培养、连续操作性强特点。嗜碱性粒细胞和肥大细胞是食品致敏性评价中使用较广泛的细胞模

型,因其表面都具有 IgE 高亲和性的 Fc ϵ RI受体。人外周血嗜碱性白血病细胞(human peripheral blood basophilic leukemia cells, KU812)是研究人类肥大细胞活化与脱颗粒的常用模型^[13-14],致敏机体摄入食物过敏原后,与嗜碱性粒细胞表面的特异性 IgE 受体结合,通过释放白细胞介素(interleukin, IL)等炎症因子而引发过敏性的炎症反应^[14-15]。嗜碱性粒细胞所释放的 IL-4,在诱导 Th2 细胞介导的免疫和炎症反应中起着关键作用^[16-17]。同时,嗜碱性粒细胞产生的促炎症因子在过敏反应的急性期和末期也起着重要作用^[18-20]。卵白蛋白是鸡蛋清中主要过敏原之一,常用于 IgE 介导的食物过敏模型的致敏和激发蛋白^[21-23]。

因此,本研究利用体外细胞实验,采用卵白蛋白(ovalbumin, OVA)作为食物过敏原,研究 AFB₁暴露对卵白蛋白激发 KU812 细胞脱颗粒所释放的一些生物活性介质的影响,主要包括 β -HEX、组胺及细胞因子[白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)]。从细胞水平阐明 AFB₁暴露与 OVA 过敏之间的相关性,从而揭示食品中黄曲霉毒素污染对食物过敏所产生的影响,提高对食物过敏风险因素的科学认识,为食品安全评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

AFB₁ (CAS: 1162-65-8, 纯度 \geq 98%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); KU812(中国科学院生化与细胞研究所); 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 分析纯)、Tween-20、青链霉素混合液(100 \times)、0.4%台盼蓝、无菌无酶水(北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清、磷酸盐缓冲液(10 mmol/L, phospahte-buffered saline, PBS)、RPMI 1640 细胞培养基[赛澳美细胞技术(北京)

有限公司]; 人 IL-4 酶联免疫测定试剂盒(批号 88-7046-88)、人 IL-6 酶联免疫测定试剂盒(批号 88-7066-88)、人 IL-1 β 酶联免疫测定试剂盒(批号 88-7261-77)、TRIzol(总 RNA 抽提试剂)(美国赛默飞世尔科技公司); 人组胺酶联免疫测定试剂盒(批号 A096769-96T)、人 β -HEX 酶联免疫测定试剂盒(批号 A121838-96T)(上海抚生实业有限公司); 反转录试剂盒(批号 RR047A)、实时荧光定量试剂盒(批号 RR820A)(日本 TaKaRa 公司); 氯仿、异丙醇、乙醇等试剂(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Varioskan LUX 多功能酶标仪、Forma™直热式 CO₂ 培养箱、NanoDrop One/OneC 微量核酸蛋白检测仪、Applied Biosystems QuantStudio™ 3 实时荧光定量聚合酶链式反应仪(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR)系统(美国赛默飞世尔科技公司); C10283 细胞计数仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司); TPpersonal PCR 仪(德国 Biometra 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 KU812 细胞的培养

将青链霉素混合液与胎牛血清按比例 1%与 10% (V:V)加入 RPMI 1640 中配制成 RPMI 1640 培养基。KU812 细胞用上述培养基于 37°C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 至其对数生长期。

1.3.2 不同浓度 AFB₁ 对 KU812 细胞增殖的影响

在室温下, 离心并收集 1.3.1 培养完成的 KU812 细胞, 加入 RPMI 1640 培养基并吹打混匀。调整细胞数目为 2 \times 10⁵ 个/mL。在 96 孔细胞培养板上分别设置空白组、对照组及实验组。实验组和对照组分别添加 2 \times 10⁵ 个/mL 细胞 100 μ L, 空白组则添加 RPMI 1640 培养基 100 μ L, 各组培养板外圈每孔同时加 10 mmol/L PBS 100 μ L。将培养板置于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。然后, 实验组每孔加入 AFB₁ 溶液 10 μ L, AFB₁ 溶液终质量浓度分别设定为 10、100、1000、10000 以及 50000 ng/mL; 空白组与对照组则都加入 10 mmol/L PBS 10 μ L。将各组培养板置于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中继续培养 24 h。然后, 各组培养板的每孔分别加入 CCK-8 溶液 10 μ L, 并在 37°C 和 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 4 h, 采用酶标仪测定其在 450 nm 波长的吸光值。AFB₁ 对 KU812 细胞毒性的评价, 依据细胞存活率(%)表示, 细胞存活率按照公式(1)计算。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{(\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})}{(\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.3 构建 AFB₁ 暴露下 OVA 激发的 KU812 细胞脱颗粒模型 (1)构建鸡蛋过敏患者血清池

选取 10 位鸡蛋过敏患者血清, 等体积混合, 构建鸡蛋过敏患者血清池。所有鸡蛋过敏患者的血清样本均由江西省儿童医院(江西南昌)提供, 其可用性得到

了该医院内部伦理委员会的批准。鸡蛋过敏患者的血清信息如表 1 所示。

表 1 鸡蛋过敏患者的血清信息
Table 1 Serum information of egg allergic patients

编号	性别	年龄/岁	特异性 IgE 水平/(kU _A /L)
1	女	2	0.8
2	男	4	0.9
3	男	5	1.1
4	男	2	6.0
5	女	2	3.2
6	男	3	1.0
7	女	3	1.4
8	男	2	12.7
9	男	2	1.8
10	女	1	1.9

(2)OVA 激发 KU812 脱颗粒实验

室温下离心收集 1.3.1 培养完成的 KU812 细胞, 加入含有 10%鸡蛋过敏患者血清池的 RPMI 1640 培养基, 孵育 24 h, 并维持细胞数 2 \times 10⁶ 个/mL; 然后将被致敏 24 h 的 KU812 细胞悬液吹打混匀, 按 1 mL/孔的量接种于 24 孔板中。其中, 阳性对照组和实验组都加入终质量浓度为 500 μ g/mL 的 OVA, 实验组还需加入 1.3.2 中所测得相应浓度 AFB₁ 进行处理, 阴性对照组则只加入等量的 10 mmol/L PBS, 各组都分别激发 4 h。然后, 离心收集各组上清液并分装, -20°C 保存; 各组剩余的细胞部分立即加入 1 mL TRIzol, 吹打混匀后置于 -80°C 保存, 用于 RNA 的提取。

1.3.4 β -HEX 和组胺含量的测定

按照抚生试剂盒操作说明书, 分别测定 AFB₁ 暴露下 OVA 激发 KU812 细胞脱颗粒所释放 β -HEX 和组胺的含量, 具体操作步骤如下。

分别设置空白孔、标准品孔、样品孔 3 个组。其中, 空白孔加入 50 μ L 样品稀释液, 标准品孔中加入不同浓度的标准品各 50 μ L, 样品孔则加入 40 μ L 样品稀释液和 10 μ L 待测样品, 标准品孔和样品孔 2 个组的各孔还需再分别加入 100 μ L 酶标试剂。然后, 各孔都用封板膜封板后于 37°C 温育 1 h; 弃去孔内溶液, 用试剂盒内的洗液洗涤 5 次。各组中, 每孔先加入 50 μ L 的显色剂 A, 再加入 50 μ L 的显色剂 B, 轻轻振荡混匀后于 37°C 避光显色 15 min。最后, 每孔加入终止液 50 μ L, 采用酶标仪于波长 450 nm 测定其吸光度(OD 值)。其中, 根据标准品不同浓度的 OD 值绘制标准曲线, 并分别计算样品中 β -HEX 和组胺的含量。

1.3.5 IL-4、IL-6、IL-1 β 含量的测定

依照 Thermo Fisher 试剂盒说明书, 测定 AFB₁ 暴露下 OVA 激发 KU812 细胞脱颗粒所释放的白介素因子 IL-4、IL-6、IL-1 β 的含量, 具体操作步骤如下。

Capture antibody 按照说明书稀释比例进行稀释, 并加到 Corning™Costar™9018 ELISA 板(100 μ L/孔), 密封后,

在 4°C 下孵育过夜; 然后, 弃去 Capture antibody 液体后用 0.05% PBST 洗涤 3 次, 加入 ELISA/ELISPOT Diluent 溶液 (200 μL/孔) 进行封闭, 室温下孵育 1 h; 弃去封闭液后, 用 PBST (1000 mL PBS 溶液中加入 0.5 mL Tween-20) 洗涤 2 次, 然后分别进行处理。其中, 在标准品孔加入不同浓度的标准品 (100 μL/孔), 在样品孔则加入待测样品 (100 μL/孔), 空白孔则加入 ELISA/ELISPOT Diluent (100 μL/孔), 将各孔用密封板密封并在室温下孵育 2 h; 弃去孔内液体, 用 0.05% PBST 洗涤 5 次, 各孔加入 Detection Antibody 溶液 (100 μL/孔), 密封板并在室温下孵育 1 h; 弃去孔内液体, 用 0.05% PBST 洗涤 5 次, 各孔加入 Avidin-HRP 溶液 (100 μL/孔), 密封板并在室温下孵育 30 min; 弃去孔内液体, 用 0.05% PBST 洗涤 5 次, 各孔加入 1X 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 溶液 (100 μL/孔), 密封板并在室温下孵育 15 min; 最后加入终止液 (100 μL/孔), 于酶标仪 450 nm 测定各孔吸光度 (OD 值)。根据不同浓度标准品的 OD 值绘制标准曲线, 计算样品的含量。

1.3.6 KU812 细胞中 RNA 的提取

KU812 细胞中 RNA 的提取, 参考相关文献 [24]。将 1.3.3 (2) 中收集的 KU812 细胞中加入 200 μL 氯仿, 混匀后涡旋 15 s, 于冰上静置 3 min。然后, 4°C 条件下离心 15 min (12000×g), 吸取其上层清液 400 μL, 再加入等体积异丙醇后吹打混匀, 于冰上静置 10 min。然后, 在 4°C 条件下离心 10 min (12000×g), 弃去上清液, 加入 75% 乙醇 500 μL, 吹打混匀并清洗 RNA 沉淀, 4°C 条件下离心 5 min (7500×g), 弃去上清, 重复此步骤一次; 清洗后的 RNA 沉淀用适量无菌无核酶水溶解, 电泳检测 RNA 质量并测定 RNA 浓度, 置于 -80°C 保存。

1.3.7 KU812 细胞 RNA 反转录

采用 TaKaRa 试剂盒对所提取的 RNA 进行反转录实验, 具体操作步骤如下。根据 RNA 浓度将样品稀释至 100 ng/μL; 去基因组 DNA 溶液按照表 2 进行配制, 加入 0.2 mL 无核酶离心管中充分混匀后, 置于 PCR 仪中反应, 提前设置反应程序 (42°C, 2 min); 然后, 按照表 3 配制反转录溶液, 10 μL 反转录溶液与上一步骤 10 μL 去基因组 DNA 溶液充分混匀后, 置于 PCR 仪中反应, 提前设置反应程序 (37°C, 15 min; 85°C, 5 s; 4°C); 反应全部结束后, 样品保存于 -20°C。

表 2 去除基因组 DNA 反应溶液的组成成分
Table 2 Solution composition of gDNA eraser

试剂	体积/μL
5×g DNA Eraser Buffer	2.0
gDNA Eraser	1.0
RNA	5.0
无酶水	2.0
合计	10.0

表 3 反转录反应溶液

Table 3 Reverse transcription solution

试剂	体积/μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0
RT Primer Mix	1.0
5×PrimeScript Buffer 2	4.0
无酶水	4.0
合计	10.0

1.3.8 实时荧光定量

(1) 合成引物

依据 NCBI 网页查找相应的引物序列, 筛选确定后, 由上海生工生物工程技术有限公司进行合成, 引物序列如表 4 所示。

表 4 Q-PCR 引物序列

Table 4 Q-PCR primers sequences

基因	引物	序列 (5'—3')
GAPDH	Forward	CTCCTCTGTTCGACAGTCA
	Reverse	CGACCAAATCCGTTGACTCC
IL-4	Forward	ACAGCAGTTCCACAGGCACAAG
	Reverse	CGTACTCTGGTTGGCTTCCTTCAC
IL-6	Forward	ACTCACCTCTCAGAACGAATTG
	Reverse	CCATCTTTGGAAGGTTGAGGTTG

(2) 荧光定量

采用 TaKaRa 试剂盒对反转录的 RNA 进行荧光定量, 具体操作步骤如下。

按照表 5 配制荧光定量反应液, 加入 8 连排管中, 混合均匀; 微型离心机离心去除 8 连排管中气泡, 确保所有液体处于 8 连排管底部。提前设置扩增程序, 预变性: 95°C-30 s; PCR 反应: 95°C-5 s, 60°C-34 s, 40 个循环; 溶解曲线分析: 95°C-15 s, 60°C-60 s, 95°C-15 s, 上机。

表 5 Q-PCR 反应溶液

Table 5 Q-PCR solution

试剂	体积/μL
TB Green Premix Ex Taq II (2X)	10.0
PCR Reverse Primer (10 μmol/L)	0.8
PCR Forward Primer (10 μmol/L)	0.8
ROX Reference Dye II (50X)	0.4
灭菌水	6.0
cDNA	2.0

1.4 数据分析

数据分析采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析, 结果表示为平均值±标准偏差, 图表绘制采用 GraphPad Prism 6。其中, 显著性标准为 *P<0.05, **P<0.01。实验处理每组设置 3 个平行样本。

2 结果与分析

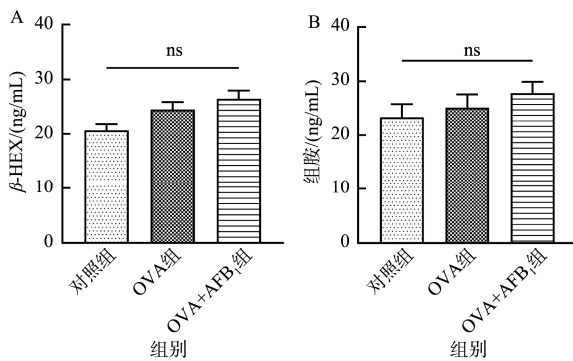
2.1 不同质量浓度 AFB₁ 对 KU812 细胞增殖的影响

AFB₁ 质量浓度分别为 10、100、1000、10000 以及

50000 ng/mL, 不同质量浓度 AFB₁ 对 KU812 细胞的增殖损害程度采用细胞存活率(%)表示。实验结果表明, 当 AFB₁ 质量浓度分别为 10、100、1000 及 10000 ng/mL 时, KU812 细胞的存活率分别为 99.7%、103.3%、100.0%、103.3%, 均都高于 95%, 说明这些浓度范围的 AFB₁ 对 KU812 细胞不会造成增殖毒性^[24-25]; 当 AFB₁ 质量浓度为 50000 ng/mL 时, KU812 细胞的存活率 90.67%, 说明该浓度 AFB₁ 对 KU812 细胞可能具有增殖毒性, 对细胞具有毒害性。因此, 后续研究中 AFB₁ 的质量浓度选定为 10000 ng/mL。

2.2 AFB₁ 对 KU812 细胞脱颗粒释放 β -HEX 和组胺的影响

本研究采用双抗体夹心法 ELISA 试剂盒测定 KU812 细胞脱颗粒所释放的 β -HEX 和组胺的含量, 结果如图 1 所示。与阴性对照组相比, OVA 组的 β -HEX (25.4±1.4) ng/mL 和组胺(25.1±1.2) ng/mL 的释放量均有所上升; 当 AFB₁ 联合 OVA 暴露后, β -HEX 和组胺的释放量上升更多, 分别提高了 30%和 19%, 但差异性不显著($P>0.05$)。说明当 AFB₁ 的暴露量为 10000 ng/mL, 对 KU812 细胞由 OVA 激发脱颗粒释放 β -HEX 和组胺有影响, 但影响程度较小。



注: ns 表示各组间无差异, 下同。

图 1 AFB₁ 对 β -HEX 和组胺释放的影响

Fig.1 Effects of AFB₁ on the release of β -HEX and histamine

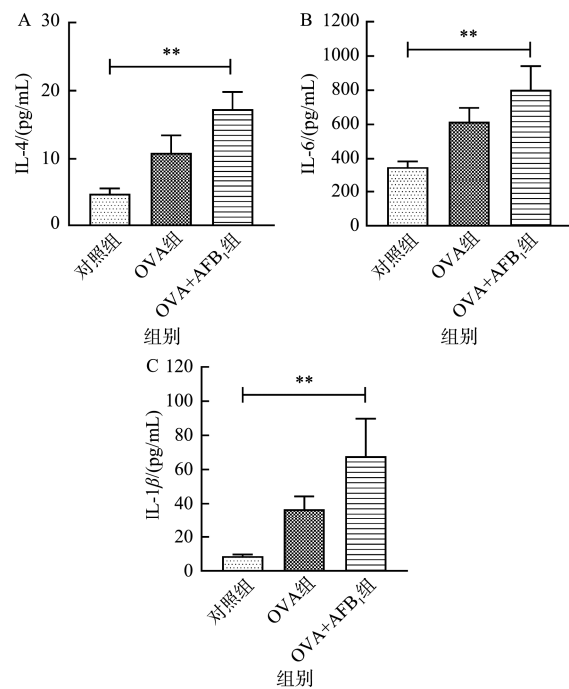
2.3 AFB₁ 对 KU812 细胞脱颗粒释放 IL-4、IL-6 以及 IL-1 β 的影响

本研究采用 ELISA 试剂盒测定 KU812 细胞脱颗粒所释放的 IL-4、IL-6 及 IL-1 β 的含量, 结果如图 2 所示。与阴性对照组相比, OVA 组的 3 种细胞因子释放量均有所上升, IL-4、IL-6 及 IL-1 β 释放量分别提高 134%、76%、324%; 与 OVA 组相比, OVA+AFB₁ 组的 3 种细胞因子释放量均升高, IL-4、IL-6 及 IL-1 β 释放量分别提高 59%、30%及 84%。说明当 AFB₁ 的暴露量为 10000 ng/mL, 能增加由 OVA 激发的 KU812 细胞脱颗粒释放 3 种细胞因子(IL-4、IL-6、IL-1 β)。

2.4 AFB₁ 对 KU812 细胞中 IL-4 和 IL-6 mRNA 水平表达的影响

采用 Q-PCR 法分别分析 KU812 细胞中 IL-4 和 IL-6

因子的 mRNA 表达水平, 结果如图 3 所示。在 3 个组别中, IL-4 因子的 mRNA 表达水平从高到低分别是 OVA+AFB₁ 组、OVA 组、阴性对照组, 其中 OVA+AFB₁ 组的 IL-4 mRNA 表达水平相较于阴性对照组和 OVA 组都显著提高($P<0.01$)。IL-6 因子的 mRNA 表达水平从高到低分别是 OVA+AFB₁ 组、OVA 组、阴性对照组, 与阴性对照组相比, OVA 组的 IL-6 mRNA 表达水平都有所升高; 与 OVA 组相比, OVA+AFB₁ 组的 IL-6 mRNA 表达水平也得到提高。说明当 AFB₁ 的暴露量为 10000 ng/mL, 会升高 KU812 细胞中 IL-4 和 IL-6 的 mRNA 表达水平。



注: **表示 $P<0.01$, 下同。

图 2 AFB₁ 对 IL-4、IL-6、IL-1 β 释放的影响

Fig.2 Effects of AFB₁ on the release of IL-4, IL-6, and IL-1 β

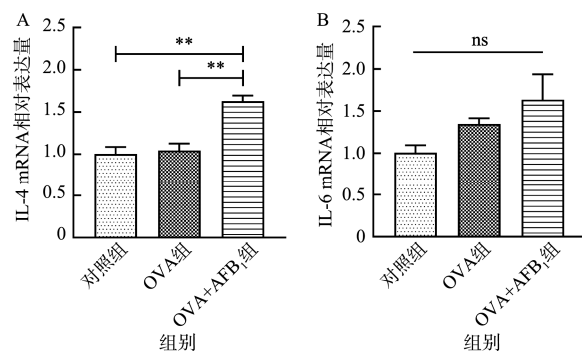


图 3 AFB₁ 对 IL-4、IL-6 基因表达的影响

Fig.3 Effects of AFB₁ on IL-4 and IL-6 gene expression

3 讨论

嗜碱性粒细胞是一种含有嗜碱性颗粒的白细胞, 由

于其可以表达高亲和力 IgE FcεRI受体,从而能够特异性地结合 IgE,在炎症或 I 型超敏反应中,通过脱颗粒而迅速释放炎症介质、细胞因子及趋化因子等活性介质,在过敏性疾病中发挥重要作用^[26-27]。有研究发现,当 KU812 细胞与鸡蛋过敏患者血清共孵育时,血清中特异性 IgE 会与细胞表面受体结合,而使细胞处于致敏状态^[24]。WERNERSSON 等^[28]的研究也表明,当嗜碱性粒细胞被 OVA 致敏发生脱颗粒时,会释放出 β-HEX 和组胺这些生物活性介质,并将 β-HEX 和组胺的释放作为嗜碱性粒细胞脱颗粒的标志。在动物实验中,过敏小鼠体内组胺含量也会显著上升^[29]。在本研究结果中,相较于 OVA 组, OVA+AFB₁ 组的 β-HEX 和组胺含量也呈上升趋势($P>0.05$)。说明 AFB₁ 的暴露量为 10000 ng/mL 会促进 KU812 细胞脱颗粒,并导致 β-HEX 和组胺的释放量有所升高,从而加重 OVA 所引发的过敏反应,但影响程度较轻。

IL 是指在白细胞或免疫细胞间相互作用的细胞因子,它参与激活调节免疫细胞,并在炎症反应及免疫反应中起重要作用^[30]。IL-4 是由过敏反应中 Th2 细胞,嗜碱性粒细胞和肥大细胞等免疫细胞产生的促炎症因子和多效性细胞因子,参与 IgE 的产生、Th 的分化等免疫过程,在过敏性炎症反应中发挥中重要作用^[31]。有研究表明,嗜碱性粒细胞能够分泌大量 IL-4,通过嗜碱性粒细胞-IL-4-肥大细胞轴来促进食物过敏的产生^[17,32-33]。SCHUTZE 等^[7]也研究证明,霉菌毒素暴露后,过敏小鼠体内 IL-4 水平会显著性提高。本研究结果表明, OVA+AFB₁ 组的 IL-4 释放量以及 IL-4 mRNA 表达水平都高于 OVA 组,特别是 IL-4 及其 mRNA 的表达水平显著提高。说明 AFB₁ 可以促进 KU812 细胞脱颗粒释放 IL-4,从而加重过敏反应的程度。

IL-6 是一种具有多效功能的炎性细胞因子,功能范围从造血调节和组织再生到诱导慢性炎症^[34-35],维持自身免疫和肿瘤发生等^[36-37]。IL-6 可由肥大细胞和嗜碱性粒细胞产生,通过增加 IgE 的产生在免疫反应中发挥作用^[38]。KARA 等^[39]的研究表明,在食物过敏患者的血清中 IL-6 显著上升,并将 IL-6 水平的作为食物过敏患者后期随访的检测指标,以作为评估过敏的标志物。TANG 等^[40]也发现,在过敏性哮喘患者肺泡内的巨噬细胞中 IL-6 和 IL-1β 水平异常升高。在本研究中,相比于 OVA 组, AFB₁+OVA 组的 IL-6 含量及其 mRNA 表达水平也都被提升,这一结果与这些研究者的结果相一致。说明 AFB₁ 可以通过促进 KU812 细胞脱颗粒释放 IL-6,从而加重食物过敏反应。

IL-1β 也是一种促炎症细胞因子,可以激活多种炎症细胞因子和免疫细胞^[41],被认为是典型的多功能细胞因子,几乎影响所有类型的细胞。它通过自分泌或旁分泌的方式刺激其他细胞因子的产生,从而在抗原呈递细胞中诱导细胞表面免疫分子的表达,并为 T 淋巴细胞激活提供信号^[38]。IL-1β 还可以通过多种免疫途径引起炎症反应和组织损伤^[41-42]。有研究表明,在 OVA 诱导的过敏性哮喘中,具有 IL-1β 缺陷的小鼠,其体内与 Th2 相关的细胞因子

IL-13、IL-5 表达显著降低^[43]。本研究结果中,相较于 OVA 组, AFB₁+OVA 组的 IL-1β 含量上升趋势。进一步说明 AFB₁ 可以通过促进 KU812 细胞脱颗粒释放 IL-1β 引发炎症反应,并改变免疫信号转导,从而影响过敏反应。

4 结论

AFB₁ 的暴露量低于 10000 ng/mL, KU812 细胞存活率高于 95%,不具有增殖毒性;被 OVA 激发的 KU812 细胞,同时暴露于 AFB₁(质量浓度 10000 ng/mL),对其释放活性介质 β-HEX 和组胺的影响相对较小,但会加重其释放白介素炎症因子 IL-4、IL-6 及 IL-1β。综上, AFB₁ 暴露会对 OVA 激发 KU812 细胞脱颗粒造成影响,通过增加 Th2 型及炎症细胞因子从而加重食物过敏反应。本研究主要从细胞学的角度研究了真菌毒素暴露与食物过敏发生之间的相关性。因此,评估食物过敏不良反应时,也应当关注食物的黄曲霉毒素等真菌毒素对食物的污染,从而全面认识食物过敏的风险因素。本研究仅针对 AFB₁ 暴露对 OVA 激发的 KU812 细胞的影响,后续尚有研究工作需要完善,如动物体内实验及其作用机制、其他真菌毒素与食物过敏的相关性。

参考文献

- [1] LIU Q, LIN S, SUN N. How does food matrix components affect food allergies, food allergens and the detection of food allergens? A systematic review [J]. Trends Food Sci Technol, 2022, 127: 280-290.
- [2] 张自业, 林洪, 李振兴. 食物过敏原检测与调控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 34-42.
- [3] ZHANG ZY, LIN H, LI ZX. Advance in detection and regulation of food allergen [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(2): 34-42.
- [4] MAYORGA C, PALOMARES F, CANAS JA, *et al.* New insights in therapy for food allergy [J]. Foods, 2021, 10(5): 1037
- [5] ANVARI S, MILLER J, YEH CY, *et al.* IgE-mediated food allergy [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2019, 57(2): 244-260.
- [6] SHROBA J, RATH N, BARNES C. Possible role of environmental factors in the development of food allergies [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2019, 57(3): 303-311.
- [7] MORAN TP. The external exposome and food allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2020, 20(8): 37.
- [8] SCHUTZE N, LEHMANN I, BONISCH U, *et al.* Exposure to mycotoxins increases the allergic immune response in a murine asthma model [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(11): 1188-1199.
- [9] BOL-SCHOENMAKERS M, BRABER S, AKBARI P, *et al.* The mycotoxin deoxynivalenol facilitates allergic sensitization to whey in mice [J]. Mucosal Immunol, 2016, 9(6): 1477-1486.
- [10] SHABEER S, ASAD S, JAMAL A, *et al.* Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: An updated review [J]. Toxins, 2022, 14(5): 307.
- [11] 王龔, 管乐, 韩紫怡, 等. 我国花生黄曲霉毒素污染影响因素分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7818-7825.
- [12] WANG Y, GUAN Y, HAN ZY, *et al.* Analysis on the influencing factors of aflatoxin contamination in peanut in China [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(19): 7818-7825.
- [13] MARTINEZ J, HERNANDEZ-RODRIGUEZ M, MENDEZ-ALBORES A, *et al.* Computational studies of aflatoxin B1 (AFB1): A review [J]. Toxins, 2023, 15(2): 135.
- [14] OSTRY V, MALIR F, TOMAN J, *et al.* Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification [J]. Mycotoxin Res,

- 2017, 33(1): 65–73.
- [13] RASHEED Z, AKHTAR N, ANBAZHAGAN AN, *et al.* Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-kappaB in human KU812 cells [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2009, 6: 1–12.
- [14] NIGROVIC PA, LEE DM. Mast cells in inflammatory arthritis [J]. *Arthrit Res Ther*, 2005, 7(1): 1–11.
- [15] KING CA, MARSHALL JS, ALSHURAF A H, *et al.* Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line [J]. *J Virol*, 2000, 74(15): 7146–7150.
- [16] HUSSAIN M, BORCARD L, WALSH KP, *et al.* Basophil-derived IL-4 promotes epicutaneous antigen sensitization concomitant with the development of food allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(1): 223–234.
- [17] KASHIWAKURA JI, ANDO T, KARASUYAMA H, *et al.* The basophil-IL-4-mast cell axis is required for food allergy [J]. *Allergy*, 2019, 74(10): 1992–1996.
- [18] CHOI SJ, TAI BH, CUONG NM, *et al.* Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratogeomys formosum*) [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21: 587–595.
- [19] VRBA J, GAZAK R, KUZMA M, *et al.* A novel semisynthetic flavonoid 7-O-galloyltaxifolin upregulates heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells via MAPK/Nrf2 pathway [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(3): 856–866.
- [20] MAKINO T, KANEMARU M, OKUYAMA S, *et al.* Anti-allergic effects of enzymatically modified isoquercitrin (alpha-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside), quercetin 3-O-glucoside, alpha-oligoglucosyl rutin, and quercetin, when administered orally to mice [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(4): 881–886.
- [21] LUO M, GAN M, YU X, *et al.* Study on the regulatory effects and mechanisms of action of bifidobacterial exopolysaccharides on anaphylaxes in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt A): 1447–1454.
- [22] MAJUMDER K, JIN Y, SHIBATA H, *et al.* Oral intervention of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 attenuates the allergenic responses in a BALB/C mouse model of egg allergy [J]. *Mol Immunol*, 2020, 120: 43–51.
- [23] HAYASHI Y, YOKOMIZO Y, FUJIWARA Y, *et al.* The effect of polyunsaturated fatty acid deficiency on allergic response in ovalbumin-immunized mice [J]. *Prostag Leukotr Ess*, 2021, 164: 102231.
- [24] 钟菁华, 王中亮, 武涌, 等. 高盐刺激嗜碱性粒细胞产生促炎因子及其分子机制 [J]. *食品科学*, 2023: 1–12. <https://www.spkx.net.cn/CN/Y2023/V44/I3/120>
- ZHONG JH, WANG ZL, WU Y, *et al.* Sodium chloride stimulates basophils to produce proinflammatory factors and its molecular mechanism [J]. *Food Sci*, 2023: 1–12. <https://www.spkx.net.cn/CN/Y2023/V44/I3/120>
- [25] 刘珂. 多酚氧化酶催化鸡蛋卵白蛋白交联对其结构与功能性质的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- LIU K. The cross-linking of ovalbumin catalyzed by polyphenol oxidase and the corresponding effect on its structure and function [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [26] MIYAKE K, SHIBATA S, YOSHIKAWA S, *et al.* Basophils and their effector molecules in allergic disorders [J]. *Allergy*, 2021, 76(6): 1693–1706.
- [27] LU Q, ZUO L, WU Z, *et al.* Characterization of the protein structure of soymilk fermented by *Lactobacillus* and evaluation of its potential allergenicity based on the sensitized-cell model [J]. *Food Chem*, 2022, 366: 130569.
- [28] WERNERSSON S, PEJLER G. Mast cell secretory granules: Armed for battle [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(7): 478–494.
- [29] MINE Y, MAJUMDER K, JIN Y, *et al.* Chinese sweet tea (*Rubus suavisissimus*) polyphenols attenuate the allergic responses in a Balb/c mouse model of egg allergy [J]. *J Funct Foods*, 2020, 67: 103827.
- [30] KANY S, VOLLRATH JT, RELJA B. Cytokines in inflammatory disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019. DOI: 10.3390/ijms20236008
- [31] ROMAGNANI S. The role of lymphocytes in allergic disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105(3): 399–408.
- [32] PERRIGOU JG, SAENZ SA, SIRACUSA MC, *et al.* MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(7): 697–705.
- [33] YOSHIMOTO T, YASUDA K, TANAKA H, *et al.* Basophils contribute to T(H)2-IgE responses *in vivo* via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(7): 706–712.
- [34] ROSSI JF, LU ZY, MASSART C, *et al.* Dynamic immune/inflammation precision medicine: The good and the bad inflammation in infection and cancer [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 595722.
- [35] WAAGE A, BRANDTZAEG P, HALSTENSEN A, *et al.* The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome [J]. *J Exp Med*, 1989, 169(1): 333–338.
- [36] DELYON J, LEBBE CJCC. IL-6 blockade in cancer patients treated with immune checkpoint blockade: A win-win strategy [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(5): 450–451.
- [37] ROSE-JOHN SJC. Therapeutic targeting of IL-6 trans-signaling [J]. *Cytokine*, 2021, 144: 155577.
- [38] KRÜGER-KRASAGAKES S, MÖLLER A, KOLDE G, *et al.* Production of interleukin-6 by human mast cells and basophilic cells [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(1): 75–79.
- [39] KARA M, BESER OF, KONUKOGLU D, *et al.* The utility of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in the diagnosis and/or follow-up food allergy [J]. *Allergol Immunopath*, 2020, 48(1): 48–55.
- [40] TANG C, ROLLAND J, WARD C, *et al.* Modulatory effects of alveolar macrophages on CD4+ T-cell IL-5 responses correlate with IL-1beta, IL-6, and IL-12 production [J]. *Eur Respir J*, 1999, 14(1): 106–112.
- [41] MOLINA-HOLGADO E, ORTIZ S, MOLINA-HOLGADO F, *et al.* Induction of COX-2 and PGE2 biosynthesis by IL-1β is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes [J]. *Brit J Pharmacol*, 2000, 131(1): 152–159.
- [42] LEE CW, PARK SM, KIM YS, *et al.* Biomolecular evidence of anti-inflammatory effects by *Clematis mandshurica* Ruprecht root extract in rodent cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1141–1155.
- [43] BESNARD AG, GUILLOU N, TSCHOPP J, *et al.* NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant [J]. *Allergy*, 2011, 66(8): 1047–1057.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



邓玉珏, 硕士研究生, 主要研究方向为食物过敏。

E-mail: dyjsylvia@163.com



高金燕, 硕士, 教授, 主要研究方向为食物过敏与食品化学。

E-mail: gaojy2013@ncu.edu.cn