

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231123004

酪蛋白糖巨肽对花生过敏原免疫反应性的影响

曾冰蕙, 宋若琳, 刘雅利, 孟婷云, 曾令玉, 车会莲*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: **目的** 探究酪蛋白糖巨肽(casein glycomacropeptides, CGMP)与花生过敏原相互作用并降低其免疫反应性的潜力。**方法** 通过蛋白-蛋白分子对接技术探讨 CGMP 与 Ara h1、Ara h2 是否有相互作用的潜力。进一步通过混合水浴加热制备 CGMP 与花生蛋白的混合溶液(mixed solution of casein glycomacropeptides and peanut proteins, MCGP), 建立 MCGP 致敏、花生蛋白激发的 BALB/c 小鼠模型, 研究 MCGP 对花生过敏反应的影响。最后使用圆二色谱法研究酪蛋白糖巨肽与 Ara h1、Ara h2 的相互作用力及对其结构的影响。**结果** CGMP 与 Ara h1、Ara h2 间存在次级键(盐桥、氢键、范德华力), 部分作用于过敏原表位; 与花生蛋白过敏组相比, MCGP 致敏组血清中的花生蛋白特异性免疫球蛋白 E (specific immunoglobulin E, sIgE)、sIgG₁、sIgG_{2a} 含量显著下降, 白介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-5、组胺水平显著下降, 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、 γ 干扰素(interferon-gamma, IFN- γ)水平显著升高, MCGP 中 Ara h2 的 α -螺旋与 β -折叠的比例改变。**结论** CGMP 能够改变 Ara h2 的结构, 遮蔽花生过敏原表位, 抑制 sIgE、sIgG 结合 Ara h1、Ara h2, 降低部分花生过敏原的免疫反应性。

关键词: 酪蛋白糖巨肽; 花生; 过敏原; 免疫反应性; 蛋白质相互作用; 分子对接

Effects of casein glycomacropeptide on the immunoreactivity of peanut allergens

ZENG Bing-Hui, SONG Ruo-Lin, LIU Ya-Li, MENG Ting-Yun, ZENG Ling-Yu, CHE Hui-Lian*

(Food Science and Nutrition Engineering College, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the potential of casein glycomacropeptides (CGMP) to interact with peanut allergens and reduce their immunoreactivity. **Methods** To explore whether CGMP has the potential to interact with Ara h1 and Ara h2 by protein-protein molecular docking technique. Furthermore, a mixed solution of CGMP and peanut proteins (MCGP) was prepared by heating to establish a BALB/c mouse model of MCGP sensitization and peanut proteins challenge. This aimed to study the effects of MCGP on peanut allergic reactions. Additionally, the effect of interaction on the secondary structure of the two allergens was investigated by circular dichroism. **Results** There were secondary bonds (salt bridges, hydrogen bonds, van der Waals forces) between CGMP and Ara h1 and Ara h2, which partially act on allergenic epitopes. Compared with peanut protein allergy group, the serum levels of specific immunoglobulin E (sIgE), sIgG₁, sIgG_{2a} of *Arachis hypogaea* in the MCGP-sensitized group were significantly decreased; the levels of interleukin-4 (IL-4), IL-5, histamine were significantly decreased; the levels of transforming

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972185)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31972185)

*通信作者: 车会莲, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全、食物过敏及营养。E-mail: chehuilian@cau.edu.cn

*Corresponding author: CHE Hui-Lian, Ph.D, Professor, China Agricultural University, No.17, Qinghuadong Road, Haidian District, Beijing 100083, China. E-mail: chehuilian@cau.edu.cn

growth factor- β (TGF- β) and interferon-gamma (IFN- γ) were significantly increased, and the ratio of α -helix to β -folding of Ara h2 in MCGP was altered. **Conclusion** CGMP has the ability to modify the structure of Ara h2, combine peanut allergens epitopes, inhibit sIgE and sIgG binding to both Ara h1 and Ara h2, and reduce the immunoreactivity of some peanut allergens.

KEY WORDS: glycomacropptides; peanut; allergen; immunoreactivity; protein interaction; molecular docking

0 引言

过敏是一种炎症性疾病,近几十年来在全球范围内的发病率逐渐上升^[1],发达国家中的食物过敏发病率高达 7%^[2]。花生是人们日常饮食中常见的食物,被认为是最严重的食物致敏物之一。花生引起的过敏占我国食物过敏的 10%~47%^[3]。花生引起的过敏死亡病例占食物过敏相关死亡病例的 59%^[4],在各类过敏致死率中居首位。目前,主要控制花生过敏的方法为严格避免食用和接触花生^[5]。然而,在食品的生产、运输等过程中,花生过敏原往往防不胜防^[6]。因此,需要开发更有效、安全的食物过敏防治措施。

过敏原数据库(www.allergen.org)中收录了花生的 17 种过敏原,而 Ara h1、Ara h2 和 Ara h3 是最普遍的 3 种过敏原^[7]。其中,Ara h2 是最重要的,其抗体水平可以作为临床诊断花生过敏的最佳指标^[8]。抗原表位是抗原蛋白质分子中特殊的免疫活性序列,能刺激机体产生免疫反应^[9]。2 型 T 辅助细胞(T helper 2, Th2)介导了食物过敏反应,涉及 Th2 细胞、免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)抗体和先天免疫细胞(例如肥大细胞、嗜碱性粒细胞)。当过敏患者过量摄入过敏原时,过敏反应可能致命^[10]。天然物质具有与过敏原结合的潜力,已有众多研究表明植物多酚可以诱导 Ara h1^[11]、Ara h2^[12]结构改变,抑制其与 IgE 结合,脂质与 Ara h1 相互作用后可以抑制树突状细胞对其的摄取^[13]。然而,较少研究着眼于多肽或蛋白质与花生过敏原的相互作用,多肽作为常见的功能因子参与调节人体多种代谢,因此,探究多肽或蛋白质对花生过敏原免疫反应性的影响对防治花生过敏具有非常重要的意义。

牛奶中有 80%的蛋白质为酪蛋白,20%为乳清蛋白。乳清中 β -乳球蛋白含量为 35%, α -乳白蛋白与酪蛋白糖巨肽(casein glycomacropptide, CGMP)的含量均为 12%,为含量最多的 3 种成分^[14]。CGMP 是在奶酪制作过程中,凝乳酶水解 κ -酪蛋白的 Phe-105 和 Met-106 之间的肽键产生的副产物之一^[15]。CGMP 中含有大量糖链,尤其富含唾液酸,这也赋予了 CGMP 参与多种生命活动调节的可能性。CGMP 目前已发现的生理功能有抑制细菌和病毒黏附、结合大肠杆菌毒素及霍乱毒素、促进肠道益生菌的增殖、抑制胃肠道分泌、改善肠道屏障、调节脂肪代谢、抑制糖尿病、抗氧化、抑制炎症等^[16-20]。本研究通过分子对接探讨了 CGMP 与花生蛋白存在相互作用的潜力,建立了花生过

敏 BALB/c 小鼠模型,探究了 CGMP 与花生蛋白的混合溶液(mixed solution of casein glycomacropptides and peanut proteins, MCGP)所制备的特异性抗体与花生蛋白的结合能力,证实了 CGMP 对花生蛋白的免疫反应性的抑制作用。此外,通过圆二色谱技术分析了 CGMP 对 Ara h1、Ara h2 二级结构的影响,旨在为花生过敏的防治手段提出新角度,扩大 CGMP 的应用范围,具有一定的社会经济学意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花生(冀花“4”号,北京市物美超市);酪蛋白糖巨肽(纯度 98.2%,美国 Agropur 公司);牛血清白蛋白 V (bovine serum albumin V, BSAV)、双组分 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色液(纯度 97%,北京素莱宝科技有限公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)速溶颗粒(金普来生物科技有限公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-大鼠抗小鼠 IgE、HRP-山羊抗小鼠 IgG₁、HRP-山羊抗小鼠 IgG_{2a}(英国 Abcam 公司);小鼠白介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-5、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、 γ 干扰素 (interferon-gamma, IFN- γ)、组胺酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(北京冬歌博业生物科技有限公司);双吡啶卡宾酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白质定量试剂盒(北京百瑞极生物科技有限公司);明矾佐剂(铝佐剂,美国赛默飞世尔科技公司);丙酮、碳酸钠、碳酸氢钠、盐酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

FreeZone6P 真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);RC-4 电子温度计(江苏精创电气股份有限公司);Chirascan VX 圆二色谱仪(英国应用光物理公司);Centrisart D-16C 低温高速离心机(德国 Sartorius 公司);S-6 磁力搅拌器(北京北德科学器材公司)。

1.3 Ara h1、Ara h2、Ara h3 与 CGMP 的分子对接

从蛋白质数据库 RCSB Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/>)下载 Ara h1 (ID: 3SMH)和 Ara h3 (ID: 3C3V)的 3D 结构,从 Protein Data Bank in Europe (PDBe, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>)下载 Ara h2 (ID: 8DB4, chains: E,

F)的 3D 结构。其中 Ara h 1 的 3D 结构为 170~587 片段, Ara h 2 的 3D 结构为 31~160 片段, Ara h 3 的 3D 结构为 21~530 片段。从蛋白质数据库 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)获取牛源 κ -酪蛋白序列(ID: P02668), 并得到羧基端 64 个氨基酸残基序列, 为糖巨肽序列。

使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)进行糖巨肽的同源建模, 选择与 κ -酪蛋白同源性最佳的 3D 结构, GMQE 值为 0.72。使用 GRAMM (<https://gramm.compbio.ku.edu/>)分别对花生过敏原与糖巨肽进行分子对接, 取评分最优的为最佳构象, 参数设置均为默认。可视化分析使用 Schrodinger Maestro 13.5 (version 2023.3)将分子与蛋白复合物中蛋白不同链采用不同颜色进行标注, 并增加 Surface, 展示 3D 立体视图。此外, 采用 Ligand Interaction 模块确定分子与蛋白的具体结合位点及结合键, 并同时在 3D 图中绘制相对应的结合位点及结合键。

1.4 MCGP 的制备

提取花生蛋白参考 VAN-WIJK 等^[21]的方法, 并稍作修改。将 50 g 花生磨碎置于烧杯中, 加入 100 mL 预冷的丙酮(4°C), 于 4°C 放置 24 h, 期间换液数次直至上清液澄清。在通风橱中烘干丙酮后, 与 250 mL PBS 混合提取蛋白质。25°C 搅拌 2 h, 离心(3000×g, 30 min)收集上清液, 再次离心(10000×g, 30 min), 取上清液冻干成粉末备用。BCA 法测得样品中蛋白质含量为 44.3%。

分别制备酪蛋白糖巨肽与花生蛋白浓度比为 0:1、0.2:1、1:1、5:1 的 PBS 溶液, 保证总蛋白质量浓度为 1 mg/mL 不变, 于离心管中振荡混匀, 45°C 水浴加热 20 min 即为 MCGP 溶液。

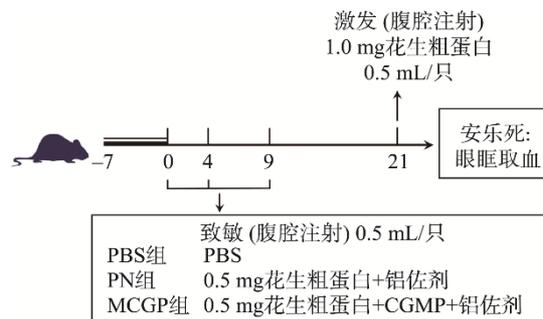
1.5 基于花生过敏 BALB/c 小鼠模型制备 MCGP 特异性抗体

SPF 级的 5 周龄(平均质量 17 g 左右)雌性 BALB/c 小鼠 56 只, 北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号: SCXK(京)2021-0011)提供。饲养于 SPF 级动物房, 自由摄食饮水, 温度 20~24°C, 湿度 40%~70%, 12 h 光照/12 h 黑暗交替。适应性喂养一周后开始实验。本动物实验由中国农业大学实验动物福利与动物实验伦理审查委员会审查并批准(批准文号: Aw61303202-4-1)。

预实验(确定混合浓度比例): 小鼠随机分为 5 组($n=4$): 阴性对照组(PBS)、花生过敏组(PN)、低浓度 CGMP 组(L-MCGP)、中浓度 CGMP 组(M-MCGP)、高浓度 CGMP 组(H-MCGP)。各组处理方式如图 1 所示。PBS 组于 0、4、9 d 给予小鼠腹腔注射 PBS 溶液, 0.5 mL/只, 于 21 d 给予小鼠腹腔注射 PBS, 0.5 mL/只。花生过敏组于 0、4、9 d 给予小鼠腹腔注射 0.5 mL/只的致敏液(0.5 mg 花生粗蛋白+铝佐剂), 于 21 d 给予小鼠腹腔注射 0.5 mL/只的激发液(1.0 mg 花生粗蛋白)。CGMP 组于 0、4、9 d 给予小鼠腹腔注射 0.5 mL/

只的 MCGP 致敏液(0.5 mg 花生粗蛋白+CGMP+铝佐剂), 采血与激发程序同花生过敏组。在 21 d 激发 30 min 后, 于各组小鼠眼眶静脉丛采血至 1.5 mL 离心管中, 在 4°C, 3000 r/min 条件下离心 15 min 并分离血清, 分装后保存于-80°C 备用。

正式实验: 小鼠随机分为 3 组($n=12$): PBS 组、花生过敏组、MCGP 组, 各组处理方式及血清采集同预实验。



注: PBS, 阴性对照组; PN, 花生蛋白过敏组; MCGP, 酪蛋白糖巨肽与花生蛋白的混合溶液处理组。铝佐剂与花生蛋白溶液体积比为 1:3。

图 1 动物实验方案

Fig.1 Mice experimental approach

1.5.1 特异性 IgE 的测定

96 孔 Costar 板上包被 10 μ g/mL 花生蛋白溶液, 100 μ L/孔, 4°C 过夜。使用 PBS-T 溶液洗涤 5 次, 300 μ L/孔。加入 1% 的 BSA PBS 溶液进行封闭, 150 μ L/孔, 在 37°C 下封闭 1 h 后, 洗涤 3 次。以 1:5 (V/V , 下同)稀释各组血清样品, 加入 60 μ L/孔, 在 37°C 下孵育 2 h, 洗涤 6 次。以 1:2000 稀释 HRP-大鼠抗小鼠 IgE, 加入 100 μ L/孔, 37°C 孵育 1 h, 洗涤 6 次。每孔加入 100 μ L TMB 工作液显色, 37°C 下避光放置 15 min, 每孔加入 50 μ L 的 2 mol/L 盐酸溶液终止显色反应。使用多功能酶标仪测定各孔在 450 nm 下的吸光值。每个样品设置 3 个平行孔, 吸光值取平均值。

1.5.2 特异性 IgG₁、IgG_{2a} 的测定

以 1:800 稀释各组血清样品, 以 1:10000 稀释 HRP-山羊抗小鼠 IgG₁ 或 HRP-山羊抗小鼠 IgG_{2a}。其余实验条件与操作方法同 1.5.1。

1.6 测定小鼠过敏反应的指标

1.6.1 血清中细胞因子及组胺的测定

5 倍稀释小鼠血清样品, 使用小鼠 IL-4、IL-5、TGF- β 、IFN- γ 、组胺的 ELISA 试剂盒测定各细胞因子及组胺的水平。

1.6.2 直肠温度的测定

21 d 激发后的 0、10、20、30 min, 分别用电子温度计测定小鼠直肠温度, 每时刻重复测定 3 次, 取平均值。

1.7 圆二色谱分析二级结构

通过圆二色谱仪分析样品中 Ara h1、Ara h2 在与

CGMP 混合前后的二级结构变化。将样品用 PBS 溶液调整至总蛋白质量浓度为 1 mg/mL。仪器参数设置: 扫描波长 190~260 nm, 时间间隔 0.5 s, 狭缝宽度 1.0 nm, 光程 10 mm, 温度 23.81°C, 重复测定 3 次, 数据以毫度(mdeg)值表示。使用 Origin 2021 软件绘制色谱图, Dichroweb 量化各二级结构的比例(<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>)。

1.8 数据处理

每组实验设 3 个平行。实验数据分析使用 Graphpad prism 8.4.2、Origin 2021、Schrodinger Maestro 13.5 软件, 单因素方差分析数据差异显著性并绘图。结果以平均值±标准偏差表示, 同一数据图中不同的小写英文字母表示差异显著($P<0.05$)。

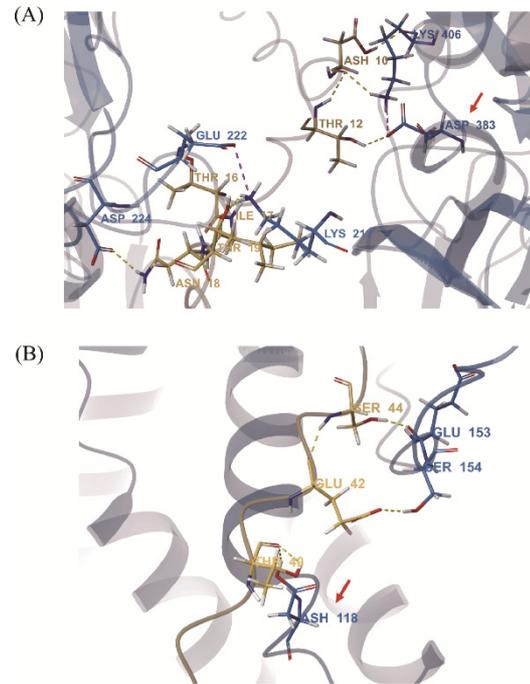
2 结果与分析

2.1 CGMP 与 Ara h1、Ara h2 的相互作用涉及过敏原表位的氨基酸

对 CGMP 分别与 Ara h1、Ara h2 及 Ara h3 分子对接的最佳构象进行可视化分析, 结果如图 2 所示。CGMP 与 Ara h1 的相互作用力包括 10 个氢键、1 个盐桥和 1 个范德华力, 主要涉及 Ara h1 分子中的 Glu、Lys、Asp 和 Ser, 其中, 30% 的氨基酸(LYS578、ASP393、ASP552)参与构成 Ara h1 的过敏原线性表位, ASP552、LYS575 位于 α -螺旋, LYS254 位于 β -折叠。CGMP 与 Ara h2 的相互作用力虽只有 3 个氢键, 主要涉及 Ara h2 分子中的 Glu、Ser 和 Asp, 但 33% 的氨基酸(ASP118)参与构成 Ara h2 的线性表位(Ash 为不带电荷的 Asp 残基)。CGMP 与 Ara h3 的相互作用力包括 4 个氢键、1 个盐桥和 1 个范德华力, 主要涉及 Ara h3 分子中的 Ala、Gln、Arg 和 Tyr, 而这些氨基酸并不参与 Ara h3 线性表位的构成。此前有报道, 超过 95% 的花生过敏患者血清 IgE 可以识别 Ara h1, 超过 90% 可以识别 Ara h2^[22-23]。因此, 本研究认为 CGMP 有潜力通过与 Ara h1、Ara h2 产生相互作用而降低花生蛋白的免疫反应性, 以减轻人群花生过敏反应。

2.2 花生蛋白难以结合 MCGP 特异性抗体

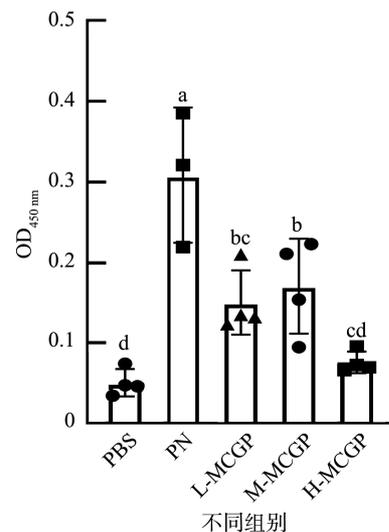
考虑到动物福利, 使用小样本量探究使得 MCGP 免疫反应性降低的最佳 CGMP 添加量(图 3)。通过 MCGP 致敏 BALB/c 小鼠, 获得 MCGP-sIgE, ELISA 检测其与花生蛋白的结合能力。结果显示, PN 组 sIgE 水平显著高于 PBS 组, 本研究成功建立了花生过敏小鼠模型。此外, 各个浓度 CGMP 均可以显著降低花生蛋白的免疫反应性, 当糖巨肽:花生蛋白=0.2:1 时, 免疫反应性下降约 50%; 当糖巨肽:花生蛋白=5:1 时, 免疫反应性下降超过 50%。即 CGMP 可能遮掩了花生蛋白中部分过敏原的 IgE 结合表位, 并且以 5:1 添加时, 遮掩的 IgE 结合表位最多。正式实验采用 H-MCGP 为 MCGP 组的致敏溶液。



注: (A)为 CGMP 与 Ara h1; (B)为 CGMP 与 Ara h2。

图 2 CGMP 与主要花生过敏原的分子对接

Fig.2 Molecular docking between CGMP and major allergen of peanut



注: PBS, 阴性对照组; PN, 花生蛋白过敏组; L-MCGP, 低浓度酪蛋白糖巨肽与花生蛋白的混合溶液处理组(0.2:1); M-MCGP, 中浓度酪蛋白糖巨肽与花生蛋白的混合溶液处理组(1:1); H-MCGP, 高浓度酪蛋白糖巨肽与花生蛋白的混合溶液处理组(5:1)。不同的小写英文字母表示差异显著($P<0.05$), 结果以平均值±标准偏差表示, 下同。

图 3 花生蛋白与 MCGP-sIgE 的 ELISA 实验(预)

Fig.3 ELISA of peanut proteins with MCGP-sIgE (pre-lab)

IgE 是介导小麦过敏的重要抗体, 机体过敏反应的重要指标之一是血清中的总 IgE 水平、过敏原特异性 IgE 水平升高。而 IgG₁ 是小鼠体内 Th2 型反应产生的另一种重要

抗体。B 细胞分泌的 IgE、IgG₁ 进而诱导肥大细胞释放炎性介质, 介导 I 型超敏反应的发生^[24]。IgE 水平可以反映过敏原的致敏性, IgG₁ 水平可以反映过敏原的免疫原性^[25]。抗原表位是指抗原分子表面能刺激机体产生免疫反应的免疫活性序列, 可以在过敏患者非首次服用时与体内的特异性抗体识别并结合, 引发一系列过敏反应。

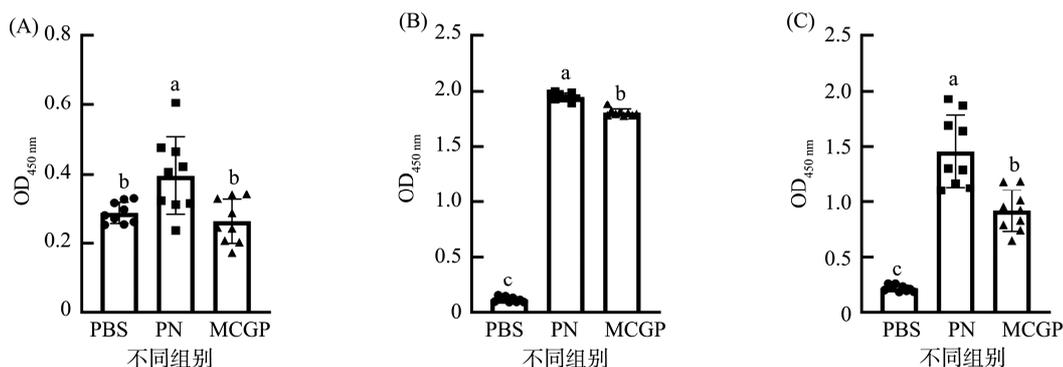
使用大样本量证实了 MCGP 可以降低花生蛋白与的免疫反应性, 进一步发现 MCGP 同时显著抑制了花生蛋白与 IgG₁ 及 IgG_{2a} 的结合(图 4)。总的来说, 花生蛋白难以结合 MCGP 特异性抗体, 可能由于 MCGP 掩蔽了花生过敏原的部分 IgE、IgG 表位, 形成一种可逆或不可逆的复合物, 以此减轻花生过敏反应。

2.3 MCGP 致敏小鼠对花生蛋白表现出更轻的过敏反应

受到过敏原刺激后, 局部的 Th2 细胞会产生 IL-4、IL-5 等细胞因子, IL-4 激活 B 细胞产生过敏原 sIgE, IL-5 募集嗜酸性粒细胞并促进其生长^[26]。sIgE 进一步激活肥大细

胞、嗜碱性粒细胞释放炎性介质, 如组胺、 β -氨基己糖苷酶等, 诱发局部过敏反应。Th1 细胞可以特征性地分泌 IFN- γ 和 IL-2 等细胞因子, 诱导巨噬细胞活化, 介导 I 型超敏反应, 产生 IgG_{2a}^[27-28]。

与王本贞等^[29]的过敏模型组指标相似, PN 组显示出了典型的过敏反应特征(图 5), 血清中的 IL-4、IL-5、组胺水平显著上升, TGF- β 、IFN- γ 水平显著下降。处理组在 MCGP 致敏后使用花生蛋白激发, 本研究发现, 与 PN 组相比, MCGP 显著抑制了 IL-4、IL-5、组胺的产生, 并上调了 TGF- β 、IFN- γ 水平, 甚至达到与 PBS 组一致的水平。结果表明, MCGP 致敏小鼠对花生蛋白表现出更轻的过敏反应, 对 Th2 型反应有显著抑制作用, 同时显著促进 Th1 型反应, 调节 Th1/Th2 平衡, 此外, 还可能促进了 T 调节细胞(regulatory T cell, Treg)的增殖, 其原因可能是 MCGP 复合物掩蔽了花生过敏原表位, 导致 MCGP-sIgE 无法识别花生蛋白, 过敏反应减轻。且 CGMP 本身具有抗炎及免疫调节的作用^[30], 因此促进了 Treg 的增殖。



注: (A) 为 sIgE 水平; (B) 为 sIgG₁ 水平; (C) 为 sIgG_{2a} 水平。PBS, 阴性对照组; PN, 花生蛋白过敏组; MCGP, 酪蛋白糖巨肽与花生蛋白的混合溶液处理组, 下同。

图 4 花生蛋白与 MCGP 特异性抗体的 ELISA 实验(正式)

Fig.4 ELISA of peanut proteins with MCGP-specific antibodies (formal experiment)

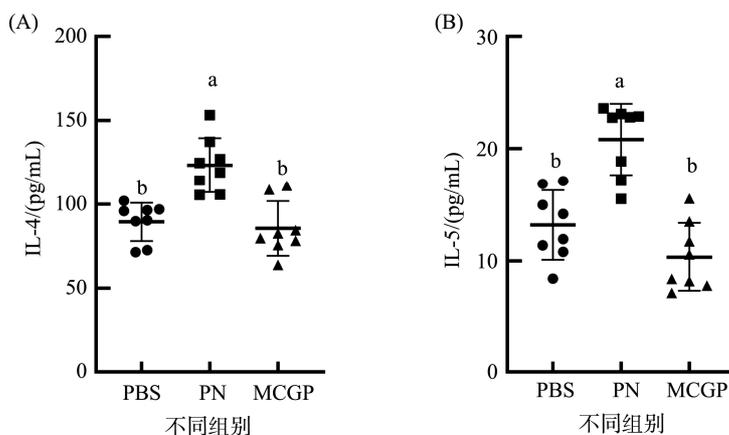


图 5 小鼠血清中的细胞因子与炎性介质水平

Fig.5 Levels of cytokines and inflammatory mediators in serum of mice

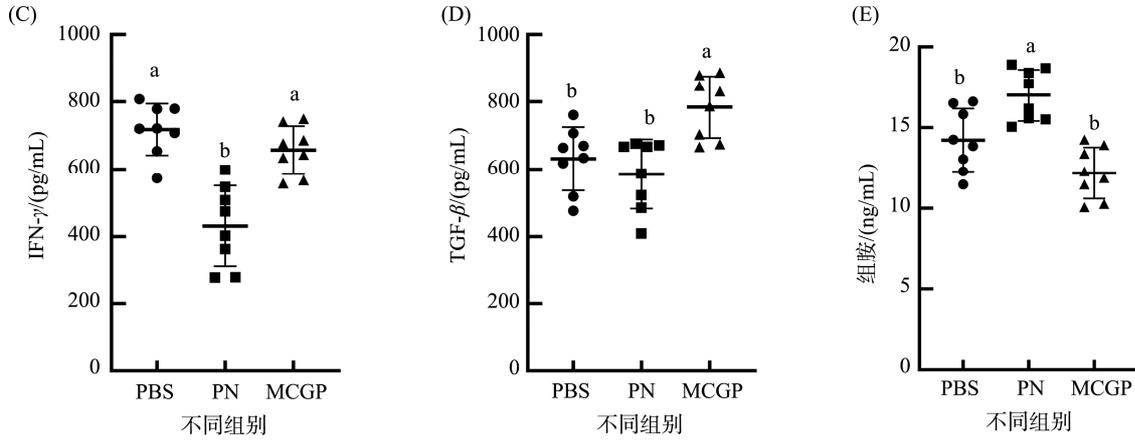


图 5(续) 小鼠血清中的细胞因子与炎性介质水平
Fig.5 Levels of cytokines and inflammatory mediators in serum of mice

过敏反应常常引起机体体温下降, 体温高低也是观测的过敏反应指标之一^[31]。与之前报道一致, PN 组体温相较于 PBS 组出现了显著下降^[32]。研究发现在激发 10 min 内, 虽然 MCGP 组体温与 PBS 组有显著差异, 但是相对于激发前是体温升高的, 相反, PN 组出现了持续的体温下降。在激发 20 min、30 min 后, MCGP 组可以显著抑制体温下降, 激发 30 min 后血清中的组胺水平与 PBS 组一致, MCGP 致敏可以减轻小鼠花生过敏反应(图 6)。

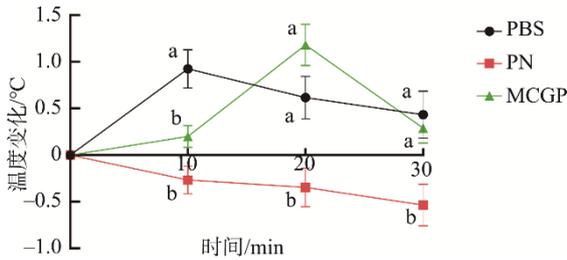
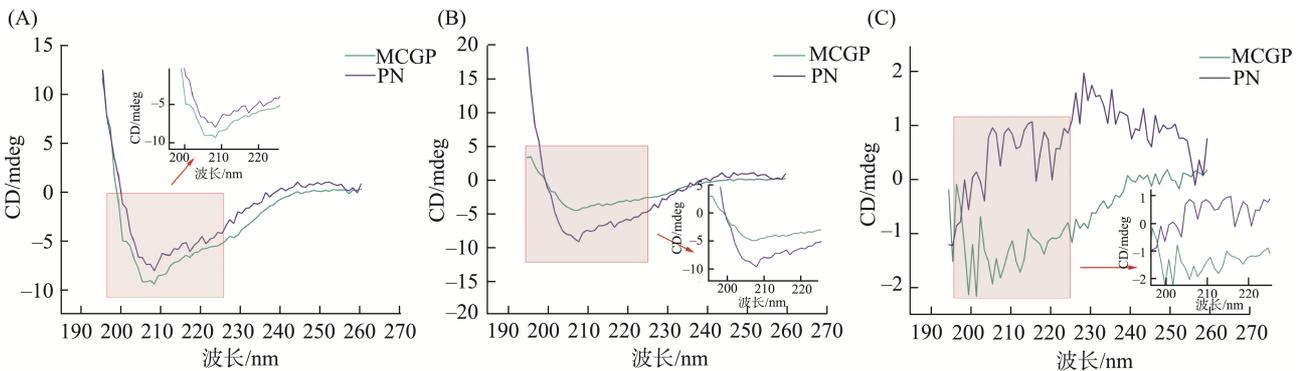


图 6 激发后小鼠直肠温度变化
Fig.6 Rectal temperature changes in mice after challenge

2.4 CGMP 导致 Ara h2 的二级结构发生改变

圆二色谱常用来分析蛋白质二级结构的变化。其中, α -螺旋在图谱中以两个负峰的形式呈现, 222 nm 处的负峰是由 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的, 208 nm 处的负峰是由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的^[33]。 β -折叠在 215 nm 处出现一个负峰, 195~200 nm 处出现一个正峰^[34], 无规卷曲在 198 nm 出现一个负峰。

使用圆二色谱分析了 CGMP 对花生蛋白的二级结构的影响, 以波长为横坐标, 以椭圆度 CD (mdeg)为纵坐标, 绘制 MCGP 与 PN 的圆二色谱图(图 7), 量化二级结构比例(表 1、表 2)。结果显示, 当 CGMP:PN=0.2:1 或 5:1 时, MCGP 中 α -螺旋结构数量增加, β -折叠结构数量减少, 而当 CGMP:PN=1:1 时, 趋势相反, α -螺旋结构数量减少, β -折叠结构数量增加。此趋势与动物预实验结果一致, CGMP:PN=1:1 时, MCGP 免疫反应性下降最少。且 Ara h1 的二级结构几乎不受 CGMP 影响, Ara h2 的二级结构比例受 CGMP 的影响较大。出现上述现象的原因可能与蛋白质溶液的碱性微环境有关^[11]。



注: (A)中 CGMP:PN=0.2:1, (B)中 CGMP:PN=1:1, (C)中 CGMP:PN=5:1。

图 7 花生蛋白与 MCGP 的圆二色谱分析
Fig.7 Circular dichroism analysis of peanut proteins and MCGP

表 1 Ara h1 的二级结构比例
Table 1 Secondary structure ratio of Ara h1

溶液	α -螺旋/%	β -折叠/%	无规卷曲/%
CGMP:PN=0.2:1			
PN	0.05	0.47	0.48
MCGP	0.05	0.47	0.48
CGMP:PN=1:1			
PN	0.07	0.45	0.48
MCGP	0.05	0.47	0.48
CGMP:PN=5:1			
PN	0.04	0.48	0.48
MCGP	0.05	0.47	0.48

表 2 Ara h2 的二级结构比例
Table 2 Secondary structure ratio of Ara h2

溶液	α -螺旋/%	β -折叠/%	无规卷曲/%
CGMP:PN=0.2:1			
PN	0.05	0.47	0.48
MCGP	0.07	0.45	0.48
CGMP:PN=1:1			
PN	0.12	0.40	0.48
MCGP	0.06	0.46	0.48
CGMP:PN=5:1			
PN	0.04	0.48	0.48
MCGP	0.11	0.42	0.47

3 结 论

本研究发现并证实了 CGMP 与花生中的部分过敏原存在相互作用, 作用力包括盐桥、氢键、范德华力, 可能会可逆地形成复合物, 作用位点部分位于过敏原线性表位, 进而改变花生蛋白二级结构, 遮蔽花生蛋白过敏原表位, 最后导致花生蛋白免疫反应性降低, 减轻 BALB/c 小鼠的花生过敏反应。当 CGMP:PN=5:1 时, 对二级结构的影响最大, MCGP 免疫反应性最低。先前的报道多集中于多酚等功能性小分子、脂质过氧化物等大分子与花生蛋白的相互作用, HE 等^[11]发现多酚可以与 Ara h1 发生亲核加成反应, 共价连接后遮蔽 IgE 表位。PLUNDRICH 等^[12]提出多酚诱导 Ara h2 二级结构变化, 抑制其与 IgE 结合^[35], 曲欣等^[36]指出了脂质过氧化物使 Ara h1 的 α -螺旋含量下降, 降低花生过敏蛋白的 IgE 结合能力。本研究提出了功能性多肽 CGMP 与 Ara h1、Ara h2 相互作用的潜力, 扩大了 CGMP 的医学应用领域, 且为花生蛋白的修饰、花生产品的脱敏加工提供了新的思路, 为进一步降低花生蛋白免疫反应性提供数据支撑。

参考文献

[1] FLORSHEIM EB, BACHTEL ND, CULLEN JL, *et al.* Immune sensing of food allergens promotes avoidance behaviour [J]. *Nature*, 2023,

620(7974): 643–650.

- [2] 张雁林, 李晓, 赵怡然, 等. 花生过敏: 除了口服脱敏治疗, 还能怎么办[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2022, 16(6): 663–664.
ZHANG YL, LI X, ZHAO YR, *et al.* Peanut allergy: What to do besides oral desensitization therapy [J]. *Chin J Allergy Clin Immunol*, 2022, 16(6): 663–664.
- [3] 常雪娇. 烘焙加工对花生主要过敏原蛋白 Ara h 2 的结构和致敏性影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
CHANG XJ. Structural and sensitizing effects of roasting processing on Ara h 2, the major allergenic protein of peanuts [J]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [4] 陈献雄, 邬玉兰, 吉琼梅, 等. 花生主要过敏原 Ara h1 单克隆抗体的制备与应用[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(1): 68–72.
CHEN XX, WU YL, JI QM, *et al.* Preparation and application of monoclonal antibodies against allergen Ara h1 from peanut [J]. *Immunol J*, 2017, 33(1): 68–72.
- [5] LOGAN K, BAHNSON HT, YLESCUPIDEZ A, *et al.* Early introduction of peanut reduces peanut allergy across risk groups in pooled and causal inference analyses [J]. *Allergy*, 2023, 78(5): 1307–1318.
- [6] 黄玉霞, 梁金玲, WANG LISA, 等. 食品中花生过敏原及其检测方法的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(22): 314–318.
HUANG YX, LIANG JL, WANG LS, *et al.* Research progress of peanut allergen and its detection methods [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(22): 314–318.
- [7] 范俊燕, 张彩猛, 孔祥珍, 等. 花生品种对水媒法提取分离蛋白质与脂质及内源性蛋白酶活性的影响[J]. *中国油脂*, 2023, 48(1): 20–25, 36.
FAN JY, ZHANG CM, KONG XZ, *et al.* Effects of peanut variety on extraction and separation of protein and lipid by aqueous extraction processing and activity of endogenous protease [J]. *China Oil Fat*, 2023, 48(1): 20–25, 36.
- [8] MAYORGA C, GOMEZ F, ARANDA A, *et al.* Basophil response to peanut allergens in Mediterranean peanut-allergic patients [J]. *Allergy*, 2014, 69(7): 964–968.
- [9] 王俊娟, 李欣芮, 陈成, 等. 花生主要过敏原 Ara h 1 线性 B 细胞表位的预测及鉴定[J]. *食品科学*, 2021, 42(17): 106–112.
WANG JJ, LI XR, CHEN C, *et al.* Prediction and identification of linear B cell epitope on the major peanut allergen Ara h 1 [J]. *Food Sci*, 2021, 42(17): 106–112.
- [10] MONERET-VAUTRIN DA, Morisset M, Flabbee J, *et al.* Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: A review [J]. *Allergy*, 2005, 60(4): 443–445.
- [11] HE WY, ZHANG TT, VELICKOVIC TC, *et al.* Covalent conjugation with (-)-epigallo-catechin 3-gallate and chlorogenic acid changes allergenicity and functional properties of Ara h1 from peanut [J]. *Food Chem*, 2020, 331: 127355.
- [12] PLUNDRICH NJ, COOK BT, MALEKI SJ, *et al.* Binding of peanut allergen Ara h 2 with Vaccinium fruit polyphenols [J]. *Food Chem*, 2019, 284: 287–295.
- [13] WU H, CHEN BH, WU YH, *et al.* New perspectives on food matrix modulation of food allergies: Immunomodulation and component interactions [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(36): 13181–13196.
- [14] OLVERA-ROSALES LB, CRUZ-GUERRERO AE, GARCÍA-GARIBAY JM, *et al.* Bioactive peptides of whey: Obtaining, activity, mechanism

- of action, and further applications [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2022, 63(30): 10351–10381.
- [15] CÓRDOVA-DÁVALOS LE, JIMÉNEZ M, SALINAS E. Glycomacropptide bioactivity and health: A review highlighting action mechanisms and signaling pathways [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 598.
- [16] ARBIZU S, CHEW B, MERTENS-TALCOTT SU, *et al.* Commercial whey products promote intestinal barrier function with glycomacropptide enhanced activity in downregulating bacterial endotoxin lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammation *in vitro* [J]. *Food Funct*, 2020, 11(7): 5842–5852.
- [17] TIAN Q, WANG TT, TANG X, *et al.* Developing a potential probiotic of yogurt: Growth of *Bifidobacterium* and yogurt cultures with addition of glycomacropptide hydrolysate [J]. *INT J Food Sci Technol*, 2015, 50(1): 120–127.
- [18] MACLEOD EL, CLAYTON MK, VAN-CALCAR SC, *et al.* Breakfast with glycomacropptide compared with amino acids suppresses plasma ghrelin levels in individuals with phenylketonuria [J]. *Mol Genet Metab*, 2010, 100(4): 303–308.
- [19] SONG JJ, WANG Q, DU M, *et al.* Casein glycomacropptide-derived peptide IPPKKNQDKTE ameliorates high glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells via activation of AMPK signaling [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(2): 1600301.
- [20] MUÑOZ FC, CERVANTES MM, CERVANTES-GARCÍA D, *et al.* Glycomacropptide attenuates inflammation, pruritus, and Th2 response associated with atopic dermatitis induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in rat [J]. *J Immunol Res*, 2017. DOI: 10.1155/2017/6935402..
- [21] VAN-WIJK F, HOEKS S, NIERKENS S, *et al.* CTLA-4 signaling regulates the intensity of hypersensitivity responses to food antigens, but is not decisive in the induction of sensitization [J]. *J Immunol*, 2005, 174(1): 174–179.
- [22] DE-LEON MP, DREW AC, GLASPOLE C, *et al.* IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and tree nut allergens [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(4): 463–471.
- [23] KOPPELMAN SJ, VLOOSWIJK RAA, KNIPPELS LMJ. *et al.* Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world [J]. *Allergy*, 2001, 56(2): 132–137.
- [24] NELMS K, KEEGAN AD, ZAMORANO J, *et al.* The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions [J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17(1): 701–738.
- [25] GRAVERSEN KB, BALLEGAARD AR, KRÆMER LH, *et al.* Cow's milk allergy prevention and treatment by heat-treated whey-A study in brown norway rats [J]. *Clin Exp Allergy*, 2020, 50(6): 708–721.
- [26] FLORSHEIM EB, SULLIVAN ZA, KHOURY-HANOLD W, *et al.* Food allergy as a biological food quality control system [J]. *Cell*, 2021, 184(4): 1440–1454.
- [27] NAZERI S, ZAKERI S, MEHRIZI AA, *et al.* Measuring of IgG_{2c} isotype instead of IgG_{2a} in immunized C57BL/6 mice with *Plasmodium vivax* TRAP as a subunit vaccine candidate in order to correct interpretation of Th1 versus Th2 immune response [J]. *Exp Parasitol*, 2020, 216: 107944.
- [28] PONCETTE L, BLUHM J, BLANKENSTEIN T. The role of CD4 T cells in rejection of solid tumors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2022, 74: 18–24.
- [29] 王本贞, 郑成中. 非甲基化 CpG-ODN 对卵清蛋白致敏食物过敏幼鼠血清 TGF- β 的影响及免疫调节作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(8): 864–868.
- WANG BZ, ZHENG CZ. Effect of non-methylated CpG-ODN on serum TGF- β and immune regulation in ovalbumin-sensitized young mice [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2015, 17(8): 864–868.
- [30] REYES-PAVÓN D, CERVANTES-GARCÍA D, BERMÚDEZ-HUMARÁN LG, *et al.* Protective effect of glycomacropptide on food allergy with gastrointestinal manifestations in a rat model through down-regulation of type 2 immune response [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2942.
- [31] KAWAKAMI Y, SIELSKI R, KAWAKAMI T. mouse body temperature measurement using infrared thermometer during passive systemic anaphylaxis and food allergy evaluation [J]. *JoVE*, 2018, 139: 58391.
- [32] 满永宏, 包东武. 复方中药 CRFC-2 对小鼠食物过敏模型拮抗作用的实验研究[J]. *中国现代药物应用*, 2012, 6(13): 1–2.
- MAN YH, BAO DW. Herbal formula CRFC-2 blocks peanut-induced anaphylaxis in food allergy model [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2012, 6(13): 1–2.
- [33] LIU XY, WU X, YANG JH. Protein determination using methylene blue in a synchronous fluorescence technique [J]. *Talanta*, 2010, 81(3): 760–765.
- [34] REN BP, LIU YL, ZHANG YX, *et al.* Tanshinones inhibit hIAPP aggregation, disaggregate preformed hIAPP fibrils, and protect cultured cells [J]. *J Mater Chem B*, 2018, 6(1): 56–67.
- [35] WU ZH, LIAN J, HAN YL, *et al.* Crosslinking of peanut allergen Ara h 2 by polyphenol oxidase: Digestibility and potential allergenicity assessment [J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(10): 3567–3574.
- [36] 曲欣, 吕晓静, 刘芸, 等. 脂质过氧化物对花生过敏原致敏性的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1334–1340.
- QU X, LV XJ, LIU Y, *et al.* Effect of lipid peroxides on the allergenicity of peanut allergen [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(4): 1334–1340.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



曾冰蕙, 硕士研究生, 主要研究方向为食物过敏。

E-mail: zengbinghui0831@sina.com



车会莲, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全、食物过敏及营养。

E-mail: chehuijian@cau.edu.cn