

食物致敏性评价 RBL-2H3 细胞模型的研究

陈晨¹, 孙拿拿², 李永宁², 贾旭东²

1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050; 2. 国家食品安全风险评估中心

摘要: **目的** 研究大鼠嗜碱性白血病粒细胞 (rat basophil leukemia cells, RBL-2H3 细胞) 用于食物致敏性评价的可行性。

方法 实验组和对照组动物血清按照不同倍数稀释, 包括 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 和 1:512, 将稀释后的血清分别与 RBL-2H3 细胞孵育 4 h, 然后用 MEM 完全培养基重新培养 24 h。最后, 向细胞分别加入含有 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA 的 MEM 溶液, 孵育 45 min, 测定上清液中 β -氨基己糖苷酶含量和细胞内总的 β -氨基己糖苷酶含量, 计算 β -氨基己糖苷酶释放率。 **结果** 对比不同的蛋白刺激浓度发现: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA 刺激后, 稀释比例为 1:4、1:8、1:16 和 1:32 时, 实验组和对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA 刺激后, 稀释比例仅 1:4、1:8 和 1:16 时, 实验组和对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。对比不同的血清稀释倍数发现, 1:4 倍稀释时实验组 β -氨基己糖苷酶释放率显著高于稀释比例 1:256 实验组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 初步建立了 RBL-2H3 细胞致敏模型, 以期用于食物致敏性评价中。

关键词: 大鼠嗜碱性白血病粒细胞; 卵清蛋白; β -氨基己糖苷酶; 释放率

中图分类号: R151.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)05-0513-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.05.001

A RBL-2H3 cell model for assessing the allergenicity of food proteins

CHEN Chen*, SUN Na-na, LI Yong-ning, JIA Xu-dong

* National Institute for Nutrition and Health, China CDC, Beijing 100050, China

Corresponding author: JIA Xu-dong, E-mail: jiaxudong@cfsa.net.cn

Abstract: **Objective** To study the possibility of using the RBL-2H3 cell as a cell model for assessing the potential allergenicity of food proteins. **Methods** Sera of mice in the experimental group and control group were diluted as follows: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 and 1:512. The RBL-2H3 cells were incubated with diluted sera for 4 hours, and then the cells were re-incubated with MEM complete medium for 24 hours. Lastly, the cells were respectively placed in the incubators with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ovalbumin (OVA) for 45 minutes. The beta-hexosaminidase in the supernatant and total intracellular beta-hexosaminidase were measured, and the release rate of beta-hexosaminidase was calculated. **Results** Comparison of different protein stimulation concentrations revealed that after stimulation with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA, a statistically significant difference in the release rate of beta-hexosaminidase was observed between the experimental group and the control group when the serum dilution ratios were 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After stimulation with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA, a statistically significant difference was found between the experimental group and the control group when the serum dilution ratios were 1:4, 1:8 and 1:16 respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparison of different serum dilution ratios in the experimental group indicated that the release rate of beta-hexosaminidase when the dilution ratio was 1:4 was higher than that when the dilution ratio was 1:256, showing a statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusions** A RBL-2H3 cell model for assessing the allergenicity of food proteins is initially established. It might be a valuable model for food allergy.

Key words: RBL-2H3 cell; ovalbumin; β -hexosaminidase; release rate

食物过敏是指食物进入人体后, 机体对之产生异常免疫反应, 导致机体生理功能紊乱和/或组织损伤, 进而引发一系列临床症状^[1]。2003 年, 食品法典委员

基金项目: 转基因重大专项“转基因生物的食用和饲用安全评价技术”(2016ZX08011005); 营养与健康所青年科学基金项目 (NINH2016005)

作者简介: 陈晨 (1987-), 女, 山东泰安人, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 食品毒理学。

通信作者: 贾旭东, E-mail: jiaxudong@cfsa.net.cn。

会 (Codex Alimentarius Commission, CAC) 第 25 届会议建议结合多因素和多方法全面分析蛋白的致敏性^[2]。动物模型存在检测指标主观性强、变异大、不符合 3R 原则 (减少、替代和优化动物实验) 以及耗费的人力物力多等缺点, 因此, 寻找合适的致敏原检测的体外模型吸引了越来越多研究者的兴趣。欧洲食品安全局在 2009 年建议建立致敏性评价的细胞模型, 全面地评价转基因食品的致敏性^[3]。

目前, 已经有多种致敏性评价细胞模型被开发出

来,其中包括肥大细胞模型^[4-5]、人类嗜碱性粒细胞模型^[6-10]和大鼠嗜碱性粒细胞(rat basophilic leukemia, RBL)模型^[11-13]等。RBL-2H3 细胞是从 Wistar 大鼠保持肿瘤状态的嗜碱性细胞中分离和克隆出来的嗜碱性白血病细胞株。RBL-2H3 细胞具有均一性好、实验变异小、可以无限传代、可操作性强等优点^[14],因此常被用于过敏反应、免疫反应等方面的研究^[15]。然而, Dearman 等^[11]发现 RBL-2H3 细胞模型灵敏度低于 PCA,另外, RBL-2H3 细胞与肥大细胞和嗜碱性粒细胞有诸多不同之处, RBL-2H3 细胞的表型和功能也容易受到培养条件和实验条件的影响,该细胞模型还需要进一步的验证才能用于食品的致敏性评价中。本研究试图使用 BALB/c 小鼠动物模型中卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏血清,分析不同的血清稀释倍数和 OVA 刺激浓度对 RBL-2H3 细胞致敏模型的影响,探讨 RBL-2H3 细胞用于致敏性评价细胞模型的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物血清 BALB/c 小鼠致敏模型 OVA 实验组的血清:10 只 BALB/c 小鼠在第 0、3、6、9、12 d 腹腔注射 0.25 ml 含 0.05 mg OVA 的 PBS 溶液,第 28 d 取血分离得到血清。BALB/c 小鼠致敏模型对照组的血清:10 只 BALB/c 小鼠在第 0、3、6、9、12 d 腹腔注射 0.25 ml PBS,第 28 d 取血分离得到血清。

1.1.2 实验细胞 RBL-2H3 细胞,购自中科院上海生命科学研究院。培养条件:MEM 完全培养基,15% 胎牛血清、1 mM 丙酮酸钠、2 mM L-谷氨酰胺、1.5 g/L 碳酸氢钠和 1% 青链霉素;空气,95%;二氧化碳,5%;温度,37 ℃。

1.1.3 主要试剂和仪器 Triton X-100(购自 Sigma 公司),无菌 100 mM 丙酮酸钠,无菌 200 mM L-谷氨酰胺,碳酸氢钠, MEM 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清,青链霉素(GIBCO 公司),卵清蛋白(OVA)购自 Sigma 公司,胰酶(GIBCO 公司), β -氨基己糖(4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide)(Sigma 公司,批号 N9376),0.09 M 柠檬酸缓冲液(Sigma 公司,货号 C2488), β -氨基己糖苷酶标准品(Sigma 公司,货号 A2264),CO₂ 温箱(Thermo Fisher 公司),酶标仪(Biotek 公司)。

1.1.4 试剂配制 终止液,5 g Na₂CO₃ 加蒸馏水至 118 ml,底物溶液:10 mg β -氨基己糖加 0.09 M 柠檬酸缓冲液 10 ml,混匀,溶解后储存于 4 ℃;无菌 37.5 g/L

碳酸氢钠溶液,取 1.5 g 碳酸氢钠溶于 40 ml MEM 中,用 0.22 μ m 的过滤器过滤除菌。MEM 完全培养基,量取 75 ml 无菌胎牛血清、5 ml 青链霉素、5 ml 100 mM 丙酮酸钠、5 ml 200 mM L-谷氨酰胺和 20 ml 无菌 37.5 g/L 碳酸氢钠溶液加入 390 ml MEM 培养基中。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的处理与培养 从液氮中取 1 支 RBL-2H3 细胞冻存管,迅速放入 37 ℃ 水中,不断摇动,使之迅速融化。移入含有 10 倍体积的培养液的离心管中,吹打均匀。1 000 rpm 离心 5 min,弃去上清。加培养液,吹打均匀,计数。按 2.5×10^5 /ml 接种于培养瓶中,放入温箱中培养。每 2~3 d 传代一次。

1.2.2 RBL-2H3 细胞致敏性评价实验 取对数期生长的 RBL-2H3 细胞按 2.5×10^5 /ml 接种于 96 孔板上,37 ℃,CO₂ 温箱中培养过夜使细胞贴壁。将实验组(含 OVA 特异性 IgE)和对照组的动物血清以 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 和 1:512 比例稀释,取 100 μ l 与 RBL-2H3 细胞在 37 ℃ 的 CO₂ 温箱中培养 4 h。吸去培养上清后,用 200 μ l PBS 洗细胞 2 次。每孔加入 100 μ l MEM 完全培养基(不含 OVA 特异性 IgE),放入 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中孵育 24 h。弃上清后,分别加入含 100 μ l 10 μ g/ml 和 100 μ g/ml OVA 的 MEM 溶液,放入 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中孵育 45 min。收集培养上清,1 000 rpm 离心 5 min,将所得上清贮存于 -20 ℃ 中待测。用 1% Triton X-100 裂解 RBL-2H3 细胞,于 4 ℃ 放置 30 min,吸取培养上清,1 000 g 离心 5 min 后收集离心上清,贮存于 -20 ℃ 待测。

1.2.3 β -氨基己糖苷酶的测定 β -氨基己糖苷酶为肥大细胞释放颗粒中的一种溶酶体酶,是标记肥大细胞脱颗粒的特异性蛋白,与组胺释放平行^[16]。

1.2.3.1 底物法检测 β -氨基己糖苷酶 将 β -氨基己糖苷酶的标准品按 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16 稀释,向 96 孔酶标板中每孔加入 98 μ l 底物,然后吸取 2 μ l 稀释的标准品加入 96 孔板中,37 ℃ 孵育 5~10 min,再加入 200 μ l 碳酸钠缓冲液终止反应,酶标仪检测各个孔 405 nm 处的 OD 值。根据各孔的 OD 值与浓度的相关性,统计出直线方程。

1.2.3.2 检测上清和细胞中的 β -氨基己糖苷酶 设立空白孔和样品孔,样品孔每孔加入 90 μ l 底物溶液,空白孔加入 100 μ l 底物溶液,于 37 ℃ 孵育 5 min。样品孔加入 10 μ l 待测样品,用混匀器水平混合均匀,于 37 ℃ 孵育 30 min。加入 200 μ l 的 Na₂CO₃ 缓冲液终止反应,测量 405 nm 处的吸光度值。 β -氨基己糖苷酶释放率计算公式如下: β -氨基己糖苷酶释放率=(上

清样品中酶活性 OD 值-空白 OD 值)/(细胞中酶活性 OD 值-空白 OD 值)×100%。

1.3 统计分析 全部数据使用统计软件包 SPSS 18.0 进行处理,若两组间数据方差齐,用非配对 t 检验进行分析;若两组间数据方差不齐,用 t' 检验进行分析。三组以上数据比较,若数据方差齐,用 ANOVA 进行检验;若方差不齐,用 Kruskal-Wallis H 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 RBL-2H3 细胞的正常形态 见图 1。在倒置显微镜下观察 RBL-2H3 细胞,细胞贴壁生长良好,细胞形态完整,成纤维状,细胞透亮,折光性好。细胞生长力强,一天一次更换培养生长旺盛。细胞传代接种后,大约 4~5 h 开始贴壁,6~7 h 后贴壁较牢。

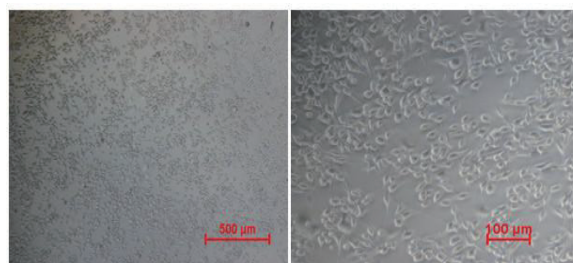


图 1 RBL-2H3 细胞正常形态

2.2 β -氨基己糖苷酶测定的可靠性 见图 2。当 β -氨基己糖苷酶标准品浓度不同时,所得的 OD 值也不同,且 β -氨基己糖苷酶标准品浓度与 OD 值之间呈线性关系,即浓度较高时,所得的 OD 值也较高,反之则较低。以 β -氨基己糖苷酶标准品浓度(稀释倍数为 1:16、1:8、1:4、1:2 和 1:1)为横坐标,OD 值为纵坐标,得到曲线方程为 $y = 1.292x + 0.04648$, $R^2 = 0.9998$ 。

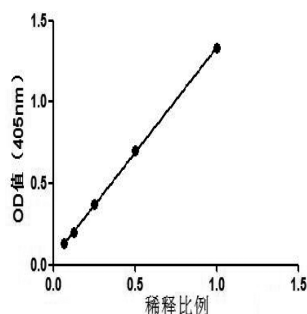


图 2 不同浓度的 β -氨基己糖苷酶与 OD 值的关系

2.3 β -氨基己糖苷酶释放率 100 $\mu\text{g/ml}$ OVA 刺激后,稀释比例为 1:4、1:8、1:16 和 1:32 时,实验组 β -氨基己糖苷酶释放率和对照组差异有统计学意义;稀释比例为 1:4 实验组 β -氨基己糖苷酶释放率显著高于稀释比例 1:256 实验组,见图 3a。10 $\mu\text{g/ml}$ OVA 刺激后,稀释比例为 1:4、1:8 和 1:16 时,实验组和对

照组差异有统计学意义;稀释比例为 1:4 实验组 β -氨基己糖苷酶释放率显著高于稀释比例 1:256 实验组,见图 3b。

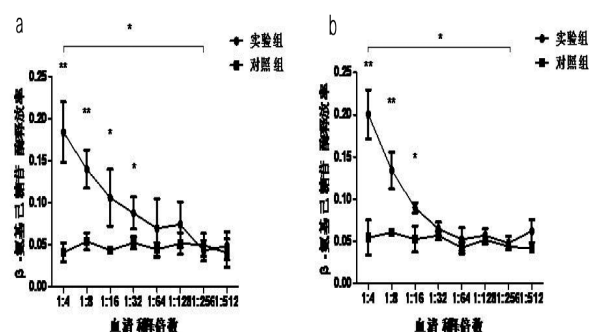


图 3 100 $\mu\text{g/ml}$ OVA(a) 和 10 $\mu\text{g/ml}$ (b) OVA 激发 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷酶释放率

3 讨论

IgE 介导的食物过敏包括致敏阶段和激发阶段。机体摄入某种过敏性食物后在 Th2 细胞释放的 IL-4 和 IL-13 以及 Th1 细胞产生的 IFN- γ 和 IL-2(起拮抗作用)协调作用下诱导产生特异性 IgE 抗体,特异的 IgE 会与胃肠粘膜肥大细胞和嗜碱性细胞表面的高亲和力受体(Fc ϵ RI)结合。这个阶段被称为致敏阶段。当机体再次摄入含相同致敏原的食物时,致敏原就会与吸附在肥大细胞表面的 IgE 发生特异性结合,引起小血管扩张、血管通透性增加、平滑肌收缩、支气管收缩,从而引发过敏临床症状和体征。这个阶段被称为激发阶段。由于这种过敏反应的临床表现时间极短,因此又被称为“速发型”过敏反应。

由食物过敏的机制可以看出,肥大细胞是过敏反应的重要效应细胞。肥大细胞主要存在两种颗粒,在颗粒中储存有大量生物活性介质^[17]:一种是分泌颗粒,含有血管活性胺(如 5-羟色胺和组胺)、溶酶体酶(β -氨基己糖苷酶、羧肽酶和 β -葡萄糖醛苷酶等),以及溶酶体膜蛋白等;另一种是溶酶体,也含有 β -氨基己糖苷酶。因此,检测 β -氨基己糖苷酶是检测上述两种颗粒释放的总标志^[18]。

RBL-2H3 细胞在 IgE 检测方面的作用引起了国内外研究者的兴趣,RBL-2H3 细胞系在食物过敏原特异性 IgE 检测、人源化 RBL 细胞系在食物过敏疾病诊断和食物过敏原的鉴定方面都能起到一定的作用^[19]。RBL-2H3 细胞介质释放实验与经典方法(IgE 结合实验、组胺释放实验)的实验结果表现出很好的一致性^[20]。RBL-2H3 细胞表面与肥大细胞的许多特性和功能类似,表达有大量的高亲和力 IgE 受体(Fc ϵ RI),可以被 IgE/抗原复合物激活而释放组胺、5-羟色胺(5

-HT)、 β -己糖胺酶等炎性介质^[15]。组胺及 β -氨基己糖苷酶的释放量是肥大细胞活化及脱颗粒的重要标志^[21]。组胺不稳定,而 β -氨基己糖苷酶半衰期长,测定方法简单、经济、重复性好^[22-23]。

β -氨基己糖苷酶既与肥大细胞脱颗粒程度一致,也与组胺释放呈正相关。目前检测 β -氨基己糖苷酶的方法有放射免疫法、自动分析法、ELISA 检测法以及底物与结合酶显色法^[16,24]。本实验选用了底物法,测定方法简单、重复性好,本实验对底物法进行了验证。用该方法检测含 β -氨基己糖苷酶的标准溶液,结果发现标准溶液的浓度与检测所得 OD 值呈正相关,即浓度较高时,所得的 OD 值也较高,浓度较低时 OD 值也较低,相关系数为 0.9998。这一实验结果与罗霞^[21]的研究是一致的,表明用酶与底物结合显色法计算 β -己糖胺酶释放率这一方法是可靠的。可以考虑通过检测经 OVA 刺激后的 RBL-2H3 细胞培养上清中 β -氨基己糖苷酶的含量,来评价 OVA 引起的过敏反应。

对比不同的蛋白刺激浓度发现:100 $\mu\text{g/ml}$ OVA 刺激后,稀释比例为 1:4、1:8、1:16 和 1:32 时,实验组和对照组差异有统计学意义;10 $\mu\text{g/ml}$ OVA 刺激后,稀释比例仅 1:4、1:8 和 1:16 时,实验组和对照组差异有统计学意义。100 $\mu\text{g/ml}$ 可选为进一步研究使用的刺激浓度。

对比不同的血清稀释倍数发现,稀释比例为 1:4 实验组 β -氨基己糖苷酶释放率显著高于稀释比例 1:256 实验组。1:4 倍稀释比例可选为进一步研究使用的稀释比例。与 Qin 等^[25]的研究一致,血清稀释倍数的增加,实验组 OVA 特异性 IgE 浓度降低,实验组 β -氨基己糖苷酶释放率下降,实验组与对照组 β -氨基己糖苷酶释放率的差别逐渐缩小。

本研究以 RBL-2H3 细胞为研究载体,通过模拟过敏反应发生的过程,检测 β -氨基己糖苷酶释放率,得出 RBL-2H3 细胞模型进一步研究的方案是:蛋白刺激浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$,血清稀释比例为 1:4。

参考文献

- [1] Brostoff J. Food allergy and intolerance[J]. Clin Exp Allergy, 1991, 21(Suppl 1):325-329.
- [2] 甄宇江. 食物致敏原与食品安全[M]. 北京:中国标准出版社, 2011:421.
- [3] EFSA Panel. Scientific opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed[J]. EFSA J, 2010, 8(7):1700.
- [4] 向军俭, 张在军, 毛露甜, 等. 食品过敏原体外激发小鼠致敏肥大细胞组胺释放[J]. 广东医学, 2005, 26(5):593-595.
- [5] 刘婉莹, 向军俭, 蒋红玲, 等. 肥大细胞组胺体外释放模型在食品过敏原分析中的应用[J]. 食品科学, 2008, 29(8):576-578.
- [6] Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives[J]. Allergy,

2006, 61(9):1028-1039.

- [7] Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children[J]. Clin Exp Allergy, 2009, 39(8):1234-1245.
- [8] Sabato V, van Hengel AJ, De Knop KJ, et al. Human basophils: a unique biological instrument to detect the allergenicity of food[J]. J Invest Allergol Clin Immunol, 2011, 21(3):179-184.
- [9] Kahlert H, Cromwell O, Fiebig H. Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c[J]. Clin Exp Allergy, 2003, 33(9):1266-1272.
- [10] de Leon MP, Drew AC, Glaspole IN, et al. Functional analysis of cross-reactive immunoglobulin E antibodies: peanut-specific immunoglobulin E sensitizes basophils to tree nut allergens[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(8):1056-1064.
- [11] Dearman RJ, Skinner RA, Deakin N, et al. Evaluation of an *in vitro* method for the measurement of specific IgE antibody responses: the rat-basophilic leukemia (RBL) cell assay[J]. Toxicology, 2005, 206(2):195-205.
- [12] King N, Helm R, Stanley JS, et al. Allergenic characteristics of a modified peanut allergen[J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49(10):963-971.
- [13] Taudou G, Varin-Blank N, Jouin H, et al. Expression of the alpha chain of human Fc epsilon RI in transfected rat basophilic leukemia cells: functional activation after sensitization with human mite-specific IgE[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1993, 100(4):344-350.
- [14] Huang F, Yamaki K, Tong X, et al. Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by sinomenine[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(3):502-507.
- [15] Passante E, Frankish N. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell[J]. Inflamm Res, 2009, 58(11):737-745.
- [16] 罗霞. 利用 RBL-2H3 细胞研究双黄连等中药注射液的过敏性[D]. 广州:广州中医药大学, 2009.
- [17] Dvorak AM, Morgan ES, Lichtenstein LM, et al. RNA is closely associated with human mast cell secretory granules, suggesting a role(s) for granules in synthetic processes[J]. J Histochem Cytochem, 2000, 48(1):1-12.
- [18] Hepbilkidire ST, Sandhoff R, Kolzer M, et al. Physiological substrates for human lysosomal beta-hexosaminidase S[J]. J Biol Chem, 2002, 277(4):2562-2572.
- [19] 陈晨, 贾旭东. 转基因食品致敏性评价细胞模型研究进展[J]. 卫生研究, 2012, 41(6):1044-1049.
- [20] Kaul S, Hoffmann A. Mediator release assay of rat basophil leukemia cells as alternative for passive cutaneous anaphylaxis testing (PCA) in laboratory animals[J]. ALTEX, 2001, 18(1):55-58.
- [21] Kondo K, Uchida R, Tokutake S, et al. Polymeric grape-seed procyanidins, but not monomeric catechins and oligomeric procyanidins, impair degranulation and membrane ruffling in RBL-2H3 cells[J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14(3):641-649.
- [22] Narenjkar J, Assemel SK, Wan BY, et al. Effect of cyclosporin and tacrolimus (FK506) on the antigen-induced mediator release, membrane potential and $86\text{Rb}^+/\text{K}^+$ and Ca^{2+} fluxes in the RBL-2H3 cell line[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(5):742-749.
- [23] Jeong HJ, Koo HN, Na HJ, et al. Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by Aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 mast cells[J]. Cytokine, 2002, 18(5):252-259.
- [24] Broide DH, Metcalfe DD, Wasserman SI. Functional and biochemical characterization of rat bone marrow derived mast cells[J]. J Immunol, 1988, 141(12):4298-4305.
- [25] Qin HD, Liu ZH, Liu ZP. A modified RBL-2H3 mediator release assay for the detection of polyclonal IgE antibody[J]. Toxicol Mech Methods, 2012, 22(2):105-110.

收稿日期:2016-12-19