

百合黄酮对鸡蛋卵清蛋白过敏的调节作用

鞠美玲 陆 静

(苏州旅游与财经高等职业技术学校, 江苏 苏州 215000)

摘要: [目的] 研究百合黄酮的抗过敏作用。[方法] 采用鸡蛋过敏原卵清蛋白(OVA)诱导建立小鼠食物过敏模型, 给予不同剂量的百合黄酮干预处理, 通过食物过敏相关性指标的检测, 分析百合黄酮对小鼠 OVA 过敏的调节作用。[结果] 中、高剂量的百合黄酮显著降低了小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG₁ 的抗体水平 ($P < 0.05$); 同时, 显著降低了小鼠组胺释放水平 ($P < 0.05$); 此外, 高剂量的百合总黄酮缓解了小鼠的临床过敏症状, 抑制了小鼠肠道炎症, 进一步研究发现, 高剂量的百合黄酮显著抑制了小鼠脾脏细胞 Th2 型细胞因子 IL-4 的分泌 ($P < 0.05$), 促进了 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的分泌 ($P < 0.05$)。[结论] 百合黄酮有效抑制了小鼠体内 OVA 诱导的食物过敏反应, 这与其抑制 Th2 型反应, 促进 Th1 型反应, 调节 Th1/Th2 型平衡有关。

关键词: 百合黄酮; 食物过敏; 特异性抗体; 组胺; 临床症状; 细胞因子

Effect of lily flavone on OVA induced food allergy

JU Meiling LU Jing

(Suzhou Tourism and Finance Institute, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to explore the anti-allergic effect of lily flavone. [Methods] A mouse food allergy model was induced by egg allergen ovalbumin (OVA), and different doses of lily flavone were given to intervene. The regulatory effect of different doses of lily flavone on OVA-induced food allergy in mice was analyzed by detecting the indexes of food allergy. [Results] The medium and high dose of lily flavone significantly reduced the levels of serum specific IgE and IgG₁ in mice ($P < 0.05$), and also reduced the level of histamine significantly ($P < 0.05$). In addition, high dose of total flavones of lily alleviated clinical allergic symptoms and inhibited intestinal inflammation in mice. Further studies found that high dose of lily flavones significantly inhibited the secretion of Th2 cytokine IL-4 in mouse spleen cells ($P < 0.05$) and promoted the secretion of Th1 cytokine IFN- γ ($P < 0.05$). [Conclusion] A certain dose of lily flavone effectively inhibits OVA-induced food allergy in mice, which is related to inhibiting Th2 type reaction, promoting Th1 type reaction and regulating Th1/Th2 type balance.

Keywords: lily flavone; food allergy; specific antibodies; histamine; clinical symptoms; cytokines

食物过敏是一个严重的公共健康问题, 具有发病率高和临床症状严重的特点^[1]。目前, 食物过敏的治疗药物主要以苯海拉明、扑尔敏这类抗组胺药物为主, 副作用大, 会引起头晕、头痛和恶心等^[2]。因此, 通过开发安全有效的含抗过敏活性成分的药剂或食品来预防或治疗食物过敏具有重要意义。

自然界中存在许多具有潜在抗过敏的天然活性成分^[3-5]。其中, 百合是一种多年生草本植物, 也是一种食物原料, 营养成分丰富, 同时含有大量的生物活性成分, 如糖苷、皂苷、生物碱和黄酮等^[6]。黄酮类化合物作为百

合活性成分中重要的一类, 包括儿茶素、芹菜素、木犀草素和槲皮素等, 具有抗肿瘤、抗氧化和降血糖等作用^[7]。李卫民^[8]研究发现, 给小鼠灌服百合水提液, 一定程度上可以抑制二硝基氯苯所致的迟发型过敏反应; 薛静雯^[9]研究证实, 枳实总黄酮提取物能够有效缓解小鼠的过敏性哮喘反应; Hariri 等^[10-11]研究显示, 黄酮类化合物能够调节细胞免疫, 对于炎症反应具有一定的抑制作用。食物过敏是一种 IgE 介导的速发型炎症反应, 因此, 百合黄酮可能也具有一定的抗食物过敏作用。

研究拟采用鸡蛋过敏原卵清蛋白(OVA)诱导建立

基金项目: 苏州市职业技术教育学会职业教育立项课题(编号: Szzjlx202234)

通信作者: 鞠美玲(1985—), 女, 苏州旅游与财经高等职业技术学校讲师, 硕士。E-mail: 15850230519@163.com

收稿日期: 2023-12-13 改回日期: 2024-07-16

小鼠过敏模型,同时,给予不同剂量的百合黄酮干预处理,通过检测不同处理小鼠食物过敏相关免疫指标,分析百合黄酮对小鼠OVA过敏的调节作用,以期为以百合为原料的抗食物过敏性食品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

SPF级雌性BALB/c小鼠:动物许可证SYXK(苏)2017-0044,5周龄,16~22 g,扬州大学比较医学动物中心;鸡蛋卵清蛋白(OVA)、霍乱毒素(CT):美国Sigma公司;

百合黄酮提取物:纯度为92%,其中黄芩素含量为50 mg/g,槲皮素、芦丁和儿茶素含量均为0,课题组前期从卷丹百合中提取;

生物素标记的大鼠抗小鼠IgE、HRP标记的羊抗小鼠的IgG₁:英国Abcam公司;

小鼠组胺ELISA试剂盒、小鼠细胞因子IL-4检测试剂盒、小鼠细胞因子IFN- γ 检测试剂盒:美国Ebioscience公司。

1.2 动物模型的建立

参照Zhou等^[12]的方法并修改。SPF级雌性BALB/c小鼠按体重随机分成5组,每组8只($n=40$),分别为阴性对照组、OVA组、百合黄酮低、中、高剂量组。OVA组、百合黄酮低、中、高剂量组小鼠分别于第0,7,14,21,28天经口灌胃1 mg OVA致敏,同时吸附10 μ g CT佐剂,阴性对照组小鼠经口灌胃等体积生理盐水。百合黄酮低、中、高剂量组分别于第29~40天,每天灌胃不同剂量的百合黄酮,阴性对照组和OVA组不作处理,其中,低、中、高剂量百合黄酮灌胃量分别为0.5,1.0,2.0 g/kg,第42天各组均进行大剂量刺激,每只小鼠灌胃5 mg OVA。

1.3 指标测定

1.3.1 血清IgE和IgG₁抗体水平 第42天,大剂量刺激40 min后,通过眼窝内眦静脉采血,4 $^{\circ}$ C静置过夜后,于4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min离心10 min,获得小鼠血清,分装后于-20 $^{\circ}$ C保存,采用ELISA法测定各组小鼠血清中OVA特异性IgE和IgG₁水平。

1.3.2 血浆组胺释放水平 将各组小鼠血液样本加入含EDTA K₂的离心管中,轻轻混匀,静置,4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min离心10 min,分离获得小鼠血浆,用ELISA试剂盒测定各组小鼠血浆中组胺水平。

1.3.3 细胞因子水平 第42天,大剂量刺激1 h后处死小鼠,参照Rezende等^[13]的方法,无菌条件下,取各组小鼠脾脏制备单细胞悬液,将各组小鼠的脾脏单细胞悬液加入12孔细胞培养板中,每孔添加OVA刺激,蛋白质量浓度为100 μ g/mL。将细胞培养板放入细胞培养箱中,5% CO₂

下,37 $^{\circ}$ C培养72 h,收集各组细胞上清液,采用ELISA试剂盒测定各组上清液中IL-4和IFN- γ 的分泌水平。

1.3.4 临床症状评分 第42天,大剂量刺激后,观察各组试验动物的状态,连续观察45 min并对过敏症状进行评分。评分标准:0分为无症状或极其轻微症状;1分为小鼠鼻子和头上有挠伤和抓痕;2分为眼睛和嘴巴周围浮肿,毛发直立,活动减少且呼吸频率增加;3分为小鼠有哮喘行为,呼吸急促,嘴和尾巴周围发绀;4分为在小鼠表现出抽搐或抽搐后静止;5分为死亡^[14]。

1.3.5 HE染色 第42天,大剂量刺激1 h后,处死各组小鼠,取出小肠组织,固定脱水后,制备石蜡切片,使用苏木精-伊红染色法染色,显微镜下进行组织病理学观察。

1.3.6 数据分析 采用Excel和GraphPad Prism V8软件整理和分析数据,结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。组间差异比较用方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

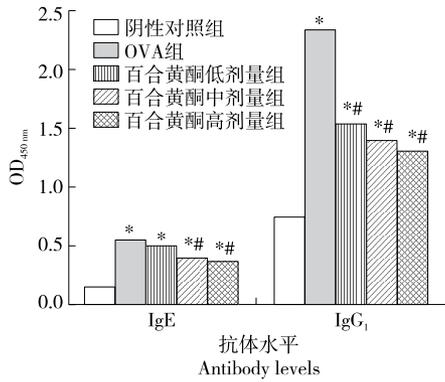
2 结果与讨论

2.1 百合总黄酮对小鼠血清特异性IgE和IgG₁抗体水平的影响

IgE是速发型过敏反应的标志性抗体,IgG₁是过敏小鼠体内一种重要的Th2型反应相关抗体^[15],由图1可知,与阴性对照组相比,OVA组小鼠血清中OVA特异性IgE和IgG₁水平显著升高($P < 0.05$);与OVA相比,百合黄酮中、高剂量组小鼠血清OVA特异性IgE水平显著降低($P < 0.05$),百合黄酮低剂量组小鼠血清OVA特异性IgE水平略有降低,但无显著性差异,而百合黄酮低、中、高剂量组小鼠血清中OVA特异性IgG₁水平显著降低($P < 0.05$)。因此,OVA致敏小鼠后,小鼠体内诱发了显著的体液免疫,分泌了大量的OVA特异性IgE和IgG₁,提示试验诱导的小鼠OVA过敏模型建模成功。Diesner等^[16-17]也采用相似的致敏方案成功建立了小鼠食物过敏模型。同时,不同剂量的百合黄酮一定程度上抑制了IgE和IgG₁抗体反应,说明百合黄酮可能具有一定的抗过敏作用。Medeiros等^[18]研究表明,蜂花粉酚提取物和杨梅素抑制了OVA致敏小鼠体内的IgE和IgG₁抗体产生,从而发挥抗过敏作用。

2.2 百合总黄酮对小鼠组胺释放水平的影响

组胺是肥大细胞脱颗粒的重要标志物之一^[19]。由图2可知,与阴性对照组相比,OVA组小鼠组胺释放水平显著增加($P < 0.05$),说明OVA过敏组小鼠体内发生细胞脱颗粒反应,释放组胺等介质;与OVA组相比,百合黄酮中、高剂量组小鼠血浆中组胺水平显著降低($P < 0.05$),百合黄酮低剂量组小鼠血浆组胺释放水平未表现出明显差异,说明OVA组在大剂量刺激后,小鼠体内发生了肥大细胞脱颗粒反应,释放组胺,而中、高剂量的百合黄酮抑制

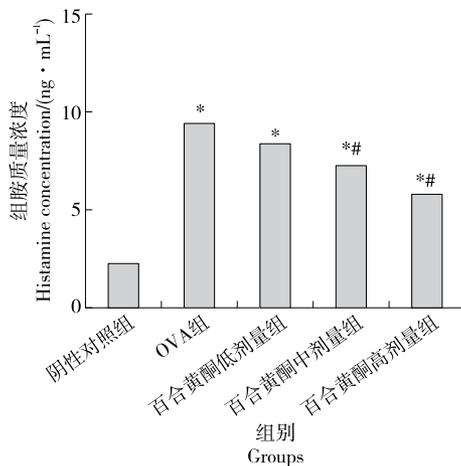


与阴性对照组相比, *为 $P < 0.05$; 与 OVA 组相比, #为 $P < 0.05$

图1 各组小鼠血清特异性 IgE 和 IgG₁ 水平

Figure 1 Serum specific IgE and IgG₁ levels in mice of each group

了小鼠体内的组胺释放。肥大细胞脱颗粒是食物过敏效应阶段的重要进程,脱颗粒释放的组胺等细胞介质进一步作用于相关组织器官,使血管扩张、平滑肌收缩、渗出液增加,最终导致过敏性休克、哮喘、荨麻疹等^[1,19],因此,抑制脱颗粒的发生能够有效缓解食物过敏反应。张亚芬^[20]研究发现,吊石苣苔黄酮能显著降低 OVA 过敏小鼠血清中的组胺含量,从而发挥抗过敏作用,与试验结果一致。



与阴性对照组相比, *为 $P < 0.05$; 与 OVA 组相比, #为 $P < 0.05$

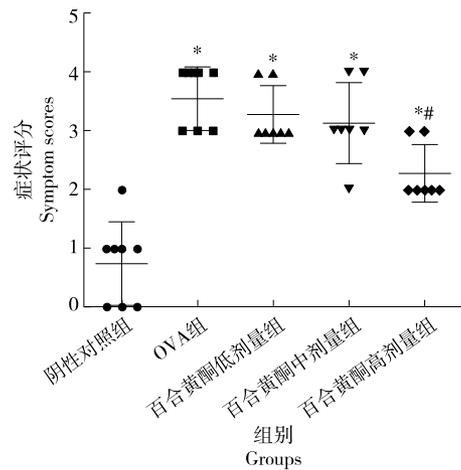
图2 百合黄酮对小鼠组胺释放水平的影响

Figure 2 Effects of lily flavone on histamine release in mice

2.3 百合总黄酮对小鼠临床症状和小肠炎症的影响

由图3可知,阴性对照组小鼠过敏症状评分较低,未表现出过敏症状,OVA组小鼠表现出较严重的过敏临床症状,如哮喘、抽搐等;与OVA组相比,百合黄酮低、中剂量组小鼠的临床症状评分略有降低,而高剂量组小鼠临

床症状评分显著降低($P < 0.05$),说明不同剂量的百合黄酮缓解了小鼠OVA过敏症状,且高剂量的百合黄酮的效果最显著。此外,食物过敏发生后,小肠作为重要的症状发生场所,往往会出现炎症细胞浸润,肠道屏障被破坏等现象^[21]。由图4可知,阴性组小鼠小肠未观察到炎症,而OVA组小鼠小肠出现淋巴细胞浸润、炎细胞浸润等炎症特征,百合黄酮高剂量组小鼠小肠中这种炎症症状得到有效缓解,说明高剂量的百合黄酮可有效缓解小鼠的临床过敏症状。彭君等^[22]研究发现,丽江山荆子表儿茶素能改善辣木叶蛋白过敏小鼠的肠道屏障受损情况,进而发挥抗过敏作用;Bae等^[23]研究证实,黄芩素改善了OVA诱导过敏小鼠的肠道屏障功能,从而缓解了小鼠的过敏反应,与试验结果一致。



与阴性对照组相比, *为 $P < 0.05$; 与 OVA 组相比, #为 $P < 0.05$

图3 百合黄酮对小鼠临床症状评分的影响

Figure 3 Effects of lily flavone on clinical symptom scores of food allergy in mice

2.4 百合总黄酮对小鼠脾细胞悬液 IL-4 和 IFN- γ 分泌的影响

食物过敏是一种 Th2 型免疫反应占主导的变态反应, Th2 型细胞分化和 Th1/Th2 免疫反应失衡是食物过敏发生的关键环节^[1,18,24], IL-4 对于食物过敏致敏阶段 Th2 型细胞分化至关重要^[25-26]。由图5可知,与阴性对照组相比, OVA 组小鼠的 IL-4 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 OVA 组相比, 百合黄酮中、高剂量组小鼠脾细胞 IL-4 分泌水平显著降低 ($P < 0.05$), 百合黄酮低剂量组小鼠脾细胞 IL-4 分泌水平无显著性差异 ($P > 0.05$); 与阴性对照组相比, OVA 组小鼠脾细胞分泌的 IFN- γ 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 OVA 组相比, 百合总黄酮低、中剂量组小鼠脾细胞分泌的 IFN- γ 均无显著性差异, 百合黄酮高剂量组小鼠脾细胞分泌的 IFN- γ 水平显著升高 ($P < 0.05$)。综上, 百合黄酮一定程度上抑制了 Th2 型免疫反应, 促进了 Th1/Th2 型免疫

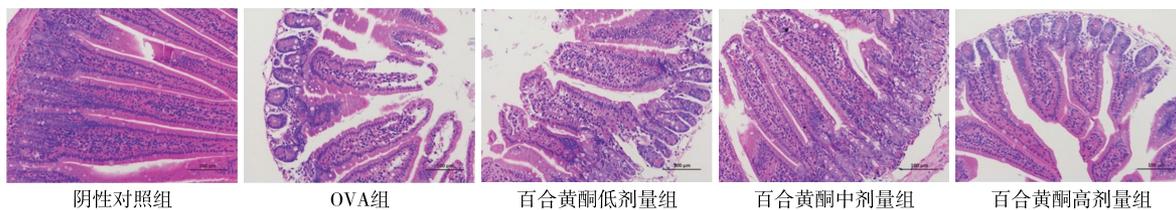
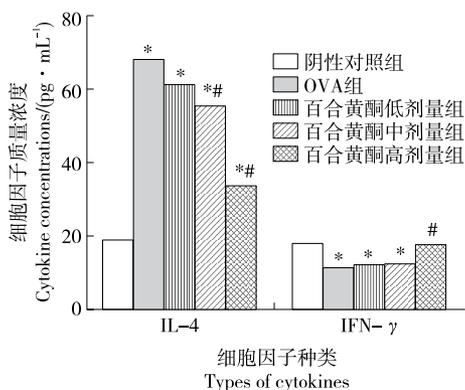


图4 各组小鼠小肠HE染色结果

Figure 4 HE staining results of the small intestine of mice in each group ($\times 200$)

反应平衡。Shao等^[27]研究证实,中药参芪通过调节Th1/Th2型细胞因子的平衡缓解了过敏性鼻炎;Shin等^[28]研究发现,姜黄通过调节Th1/Th2型免疫反应平衡从而缓解了小鼠的食物过敏反应,与试验结果一致。但是,百合黄酮调节Th1/Th2型免疫反应平衡的具体分子机制还需进一步研究。



与阴性对照组相比,*为 $P < 0.05$;与OVA组相比,#为 $P < 0.05$

图5 百合黄酮对小鼠脾脏细胞IL-4和IFN- γ 分泌水平的影响Figure 5 Effects of lily flavone on IL-4 and IFN- γ secretion in mice spleen cells

3 结论

利用鸡蛋过敏原卵清白蛋白诱导建立了小鼠过敏模型来探究百合黄酮对食物过敏的调节作用。结果表明,中、高剂量的百合黄酮显著降低了过敏小鼠血清中卵清白蛋白特异性IgE和IgG₁水平,显著抑制了小鼠体内的组胺释放水平,高剂量的百合黄酮可有效缓解食物过敏的症状,缓解过敏小鼠的肠道炎症反应,此外,中、高剂量的百合黄酮抑制了Th2型细胞因子IL-4的分泌,高剂量的百合黄酮促进了Th1型细胞因子IFN- γ 的分泌,说明一定剂量的百合黄酮能够抑制小鼠体内卵清白蛋白诱导的食物过敏反应,其机制可能与其抑制Th2型反应,调节Th1/Th2型免疫反应平衡有关。后续将采用细胞模型进一步明确百合黄酮的抗过敏作用,如大鼠嗜碱性细胞白血病细胞(RBL-2H3)细胞模型、人肥大细胞(HMC-1)和嗜碱

性粒细胞(KU812)细胞模型;同时,还可以进一步研究百合黄酮的抗过敏作用机制。

参考文献

- [1] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(1): 41-58.
- [2] MOSS A J, CHAIKIN P, GARCIA J D, et al. A review of the cardiac systemic side-effects of antihistamines: ebastine[J]. Clinical & Experimental Allergy, 1999, 29: 200-205.
- [3] 刘光明, 刘庆梅, 徐莎莎, 等. 抗食物过敏的天然活性物质研究进展[J]. 中国食品学报, 2016, 16(3): 13-22.
LIU G M, LIU Q M, XU S S, et al. Research progress of anti-food allergic active substances from natural resource[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(3): 13-22.
- [4] 姜松松, 王恒鹏. 几种常见抗食物过敏的天然活性成分研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 3 754-3 759.
JIANG S S, WANG H P. Research progress of some common natural active constituents with anti-food allergic activity[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(12): 3 754-3 759.
- [5] 陈笛, 姜珂, 周鑫, 等. 腰果寡肽的制备及体外抗过敏效应[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 26-31, 55.
CHEN D, JIANG K, ZHOU X, et al. Preparation and anti-allergic effect inhibition in vitro of cashew oligopeptide[J]. Food & Machinery, 2020, 36(4): 26-31, 55.
- [6] 粟倩, 吴萍, 夏伯候, 等. 百合化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(11): 875-882.
SU Q, WU P, XIA B H, et al. Advance in research on chemical constituents and pharmacological activities of *Lilium*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(11): 875-882.
- [7] WANG P, LI J, ATTIA F A K, et al. A critical review on chemical constituents and pharmacological effects of *Lilium*[J]. Food Science and Human Wellness, 2019, 8(4): 330-336.
- [8] 李卫民. 百合的药理作用的研究[J]. 中药材, 1990, 3(6): 31.
LI W M. Study on pharmacological action of *Lilium*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1990, 3(6): 31.
- [9] 薛静雯. 枳实总黄酮提取物对过敏性哮喘的影响[D]. 吉林: 吉林大学, 2022.

- XUE J W. Effect of flavonoids extracted from *Aurantii Fructus Immaturus* on allergic asthma[D]. Jilin: Jilin University, 2022.
- [10] HARIRI B M, MCMAHON D B, CHEN B, et al. Flavones modulate respiratory epithelial innate immunity: anti-inflammatory effects and activation of the T2R14 receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(20): 8 484-8 497.
- [11] WANG X, CAO Y, CHEN S, et al. Anti-inflammation activity of flavones and their structure-activity relationship[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(26): 7 285-7 302.
- [12] ZHOU C, LUDMILA T, SUN N, et al. BALB/c mice can be used to evaluate allergenicity of different food protein extracts [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2016, 27(5): 589-603.
- [13] REZENDE M M, HASSING I, BOL-SCHOENMAKERS M, et al. CD4+ CD25+ T regulatory cells do not transfer oral tolerance to peanut allergens in a mouse model of peanut allergy[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2011, 41(9): 1 324-1 333.
- [14] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy[J]. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2010, 125(2): S116-S125.
- [15] HJERTNER B, BENGTSSON T, MOREIN B, et al. A novel adjuvant G3 induces both Th1 and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine[J]. *Vaccine*, 2018, 36 (23): 3 340-3 344.
- [16] DIESNER S C, KNITTELFELDER R, KRISHNAMURTHY D, et al. Dose-dependent food allergy induction against ovalbumin under acid-suppression: a murine food allergy model[J]. *Immunology Letters*, 2008, 121(1): 45-51.
- [17] CASTILLO-COURTADE L, HAN S, LEE S, et al. Attenuation of food allergy symptoms following treatment with human milk oligosaccharides in a mouse model[J]. *Allergy*, 2015, 70 (9): 1 091-1 102.
- [18] MEDEIROS K C P, FIGUEIREDO C A V, FIGUEREDO T B, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 119(1): 41-46.
- [19] SAMPSON H A, O'MAHONY L, BURKS A W, et al. Mechanisms of food allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 11-19.
- [20] 张亚芬. 吊石苣苔黄酮抗食物过敏活性及机理分析[D]. 厦门: 集美大学, 2020.
- ZHANG Y F. The anti-food allergic activity and mechanism analysis of flavonoids from *Lysionotus pauciflorus* Maxim[D]. Xiamen: Jimei University, 2020.
- [21] 刘艳艳, 潘礼龙, 孙嘉. 二烯丙基三硫醚通过调节肠道屏障缓解卵清蛋白引起的食物过敏[J]. *食品科学*, 2022, 43(9): 128-135.
- LIU Y Y, PAN L L, SUN J. Diallyl trisulfide relieves food allergy caused by ovalbumin by regulating the intestinal barrier [J]. *Food Science*, 2022, 43(9): 128-135.
- [22] 彭君, 樊莹润, 吴正豪, 等. 丽江山荆子表儿茶素抗辣木叶蛋白过敏作用[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(10): 1-8.
- PENG J, FAN Y R, WU Z H, et al. Anti-allergic effects of *malus rockii* rehder-derived epicatechin against the proteins from *Moringa oleifera* leaves[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2023, 39(10): 1-8.
- [23] BAE M J, SHIN H S, SEE H J, et al. Baicalein induces CD4(+) Foxp3(+) T cells and enhances intestinal barrier function in a mouse model of food allergy[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32225.
- [24] HELM R M, BURKS A W. Mechanisms of food allergy[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2000, 12(6): 647-653.
- [25] EIWEGGER T, HUNG L, SAN DIEGO K E, et al. Recent developments and highlights in food allergy[J]. *Allergy*, 2019, 74(12): 2 355-2 367.
- [26] RIVAS M N, BURTON O T, OETTGEN H C, et al. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 138(3): 801-811.
- [27] SHAO Y Y, ZHOU Y M, HU M, et al. The anti-allergic rhinitis effect of traditional Chinese medicine of Shenqi by regulating mast cell degranulation and Th1/Th2 cytokine balance[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 504.
- [28] SHIN H S, SEE H J, JUNG S Y, et al. Turmeric (*Curcuma longa*) attenuates food allergy symptoms by regulating type 1/ type 2 helper T cells (Th1/Th2) balance in a mouse model of food allergy[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 175: 21-29.