

牛奶脱敏效果评价方法的研究进展

许辰雨^{1,2} 鲁丁强^{1,2} 王倩^{1,2} 李明^{1,2} 吴汶玲^{1,2} 宋青蔚^{1,2}

(1. 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134; 2. 天津商业大学大健康协同创新研究院, 天津 300134)

摘要: 目前食物过敏问题日益严峻, 牛奶作为主要过敏原之一, 严重影响过敏人群的日常生活。文章从蛋白质结构变化、IgE/IgG 结合能力、动物致敏模型、体外消化模型和细胞脱粒测定的角度, 综述了近年来评估消减牛奶致敏性方法的研究进展, 并展望了未来牛奶脱敏效果评价方法的研究方向。

关键词: 牛奶; 过敏原; 脱敏效果; 过敏原检测; 食品安全

Research progress on methods for evaluating the effect of milk desensitization

XU Chenyu^{1,2} LU Dingqiang^{1,2} WANG Qian^{1,2} LI Ming^{1,2} WU Wenling^{1,2} SONG Qingwei^{1,2}

(1. College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 2. Institute of Collaborative Innovation in Great Health, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Food allergies are becoming an increasingly serious issue, and milk, as one of the major allergens, severely affects the daily lives of individuals with allergies. This article reviews the recent research progress on methods for assessing the desensitization of milk allergenicity from the perspectives of protein structural changes, IgE/IgG binding capacity, animal sensitization models, *in vitro* digestion models, and cell degranulation assays. It also looks forward to the future directions of research on methods for evaluating the effectiveness of milk desensitization.

Keywords: milk; allergen; desensitization effect; allergen testing; food safety

目前食物过敏已成为一个日益严重的公共卫生问题。“八大过敏原”被认为是引发食物过敏的主要因素, 牛奶便是其中之一。牛奶中有超过 30 种蛋白有可能引起过敏反应, 其中 α -乳清蛋白(ALA)、 β -乳球蛋白(BLG)、 α -酪蛋白(ACN)和 β -酪蛋白(BCN)最为常见^[1]。据报道^[2-3], 在中国牛奶过敏影响了约 2.69% 的婴儿。

牛奶过敏一般表现为 IgE 介导或非 IgE 介导的免疫反应^[4]。目前, IgE 介导的牛奶过敏作为最常见的类型已被广泛研究, 大约 60% 的患者存在这种过敏反应^[5]。IgE 介导过敏通常包括致敏和诱发两个阶段^[6], 其中致敏的过程如图 1 所示。机体首次接触牛奶, 牛奶中的过敏原蛋白抵达小肠壁中的 Peyer 氏结(Peyer's patches, PP)并被其中的

M 细胞捕获, M 细胞将相关信息传递给树突状细胞(DC)。辅助性 T 细胞(Th)接受 DC 呈递的蛋白片段并识别, 并分化为 Th2 细胞。Th2 细胞可以释放多种细胞因子, 促使附近的 B 细胞发生类别转换, 分泌针对此过敏原的特异性 IgE。这些特异性 IgE 与肥大细胞或嗜碱性粒细胞等细胞结合, 使机体敏感。再次接触这种过敏原后, 肥大细胞和嗜碱性粒细胞均被激活并脱粒, 释放强大的炎症介质, 最终导致涉及皮肤、呼吸道、胃肠道甚至心血管系统的各种症状。而非 IgE 介导的牛奶过敏则会导致肠病、嗜酸性粒细胞性食管炎(EoE)、食物蛋白诱发的小肠结肠炎综合征(FPIES)、直肠结肠炎(FPIAP)和海纳综合征(heiner syndrome)等状况^[7]。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 31901782)

通信作者: 鲁丁强(1984—), 男, 天津商业大学副教授, 硕士生导师, 博士。E-mail: dqlu@tjcu.edu.cn

收稿日期: 2024-09-09 **改回日期:** 2024-12-05

引用格式: 许辰雨, 鲁丁强, 王倩, 等. 牛奶脱敏效果评价方法的研究进展[J]. 食品与机械, 2025, 41(5): 176-183.

Citation: XU Chenyu, LU Dingqiang, WANG Qian, et al. Research progress on methods for evaluating the effect of milk desensitization [J]. Food & Machinery, 2025, 41(5): 176-183.

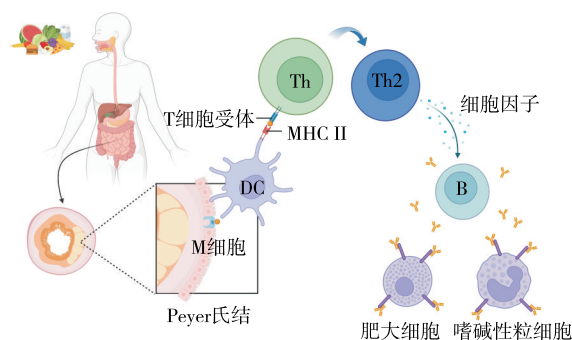


图1 致敏阶段示意图

Figure 1 Schematic representation of the sensitization phase

目前对于牛奶过敏尚无有效的治疗手段,过敏人群只能严格控制日常饮食,但难以完全规避过敏风险。首先,乳品作为加工食品中的一类重要原材料,被广泛应用于糕点和饮品等领域,消费者在日常生活中无法完全避免;其次,不能排除工厂同一加工生产线交叉污染的问题^[8]。因此,研究致敏性评估方法对于深入了解牛奶过敏原致敏性的变化至关重要。体内法和体外法作为评估过敏原致敏性变化的关键试验技术,各自发挥着独特作用。体内试验以其结果的可靠性而受到重视,而体外检测则因其安全性及可行性在研究领域占有一席之地。在致敏性研究中,对牛奶过敏原进行体内外的综合评估具有显著意义。文章综合现有文献和数据,对比分析了不同食品加工技术对牛奶致敏性的影响,旨在为牛奶脱敏研究及致敏性降低技术提供科学指导。文章选取近年来使用较多、较为广泛的方法,从处理后牛奶过敏原蛋白的结构变化、IgE/IgG结合能力、动物致敏模型、体外消化模型以及细胞脱粒测定几个方面对脱敏效果进行评价。

1 基于蛋白质结构变化的评价方法

过敏性食物中只有少数蛋白质具有诱导过敏的生物活性^[9-10],因此降低牛奶过敏性的方法大多着重于改变其致敏蛋白的表位。表位,也称为过敏原决定簇,是过敏原表面的特殊化学基团,能被特异性抗体或抗原受体识别结合^[11]。表位可根据其功能的不同分为两种不同类型:线性表位和构象表位^[12]。线性表位即顺序表位,由线性排列的氨基酸组成,较为稳定,不易受蛋白质加热变性和空间构形改变的影响,但经过美拉德反应或酶解处理可能会导致蛋白质线性表位发生变化^[13]。构象表位由不连续的氨基酸和一种通过蛋白质折叠的空间封闭结构组成,大多数构象表位可以通过加热、剪切、高压处理等加工方法进行修饰^[14],在蛋白质受热或酶解变性后会彻底破坏,不能恢复。对牛奶进行加工可能导致蛋白质结构的改变或造成蛋白质畸变,从而造成原有表位的消除或

新表位(新过敏原)的产生,影响IgE与过敏原表位的结合,并影响过敏反应的机制。因此,改变牛奶致敏蛋白的表位成为人们降低牛奶过敏性的常用手段。检测蛋白质的结构变化可以很好地了解蛋白质表位被修饰的情况,从而判断牛奶是否有效脱敏。

1.1 蛋白质一级结构评价法

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、液相色谱和质谱技术等可用于测定蛋白质一级结构,其中十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)被多数研究者选择。它由Laemmli在1970年建立,如今已被用作全球实验室蛋白质分析的重要工具^[15-16],被广泛用于分离蛋白质亚基并确定其相对分子质量^[17-18]。Du等^[19]从云南传统发酵食品中筛选出3种菌株,探究其对BLG致敏性的影响。SDS-PAGE结果显示,BLG主要在前3h发生降解;反向高效液相色谱结果显示,经过菌株水解后的BLG与未处理的相比,峰的强度降低并出现一些较小的峰,表明产生了具有中等大小和疏水特性降低的肽。水解肽的分析对确定处理后的BLG是否具有显著的过敏特性至关重要,这些结果表明,筛选出的3种菌株对消减BLG的过敏性有巨大潜力。

SDS-PAGE操作简单快捷、试验重复性高,可以用于评估蛋白质的相对分子质量和纯度,但它在评估蛋白质的致敏性方面存在局限性。在过敏原研究中,SDS-PAGE通常需要与其他技术如光谱法结合使用,以提供更全面的信息。

1.2 蛋白质二级结构评价法

蛋白质二级结构是蛋白质一级和三级结构之间的联系,在氨基酸之间的长程相互作用中具有显著的特征,并决定了蛋白质折叠的速度^[20]。蛋白质的二级结构通常利用核磁共振(NMR)、X射线晶体衍射、圆二色(CD)光谱、荧光、红外和紫外(UV)光谱研究^[21-23],其中CD光谱分析蛋白质的优点是快速简便,对构象变化灵敏,所需要的样品量少,分析时间短,所以它是目前大多数研究者选择的方法^[24-26]。圆二色性是一种光学现象,是由左旋和右旋圆偏振光的差异吸收引起^[27]。由于发色团具有固有的手性或处于不对称环境中,所以样品对左旋偏振光和右旋偏振光表现出不同的吸收系数。这种吸收差异也将线性偏振光转换为椭圆偏振光,可以以波长依赖性的方式进行测量,从而产生CD光谱^[28]。Chen等^[29]使用CD光谱研究经过动态高压微射流技术结合糖基化处理后BLG结构的变化,发现其 α -螺旋增加, β -折叠减少,表明BLG二级结构发生改变,一些表位可能被掩盖或破坏,解释了经过处理后其IgE结合能力降低的原因,证明改变蛋白质结构的加工可能会影响其被抗体识别的能力。Shao等^[30]以上

述研究为参考,同样使用了 CD 光谱对 BLG 进行二级结构检测。

CD 光谱能够提供蛋白质二级结构的总体信息,如 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲的含量,且其对蛋白质二级结构的微小变化敏感,可以用来监测蛋白质的折叠状态和稳定性。然而,CD 光谱通常无法提供蛋白质二级结构的精确位置信息,只能给出结构类型的相对比例。所以,为了得到详细的信息,仍需与其他技术相结合。

1.3 蛋白质三级结构评价法

测定蛋白质三级结构的方法主要有紫外吸收光谱和内源荧光光谱等。蛋白质中的色氨酸残基和酪氨酸残基等芳香族氨基酸,可以在特定波长的激发下发出内源荧光,这种荧光的强度及其波峰波长的变动,能够反映出蛋白质三级结构的变化^[31]。而蛋白质的紫外吸收也主要归因于这些发色团,所以紫外吸收光谱可以反映蛋白质三级结构的折叠和展开^[32]。杨庆等^[33]使用迷迭香酸(RA)共价偶联法对 β -乳球蛋白进行处理,内源荧光光谱结果显示,通过自由基法和碱法制备的 BLG-RA 复合物与天然 BLG 相比,其内源荧光强度有所减弱,表明 RA 与 BLG 之间的相互作用导致了 BLG 构象的改变,进而猝灭了蛋白质的内源荧光;紫外吸收光谱结果显示,BLG-RA 的紫外吸收峰明显高于 BLG,且 BLG-RA 复合物的最大吸收峰波长发生了显著的红移。这些变化表明,RA 的共价偶联对 BLG 中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸的微环境产生了显著影响,导致这些氨基酸残基暴露,从而增强了 BLG 的紫外吸收强度。以上结果揭示了 RA 在 BLG 脱敏方面的应用潜力,为研究者提供了新思路。

1.4 表面疏水性评价法

疏水性是指水不溶性的分子在水溶液中具有排除自身周围的水分子而相互聚集在一起的一种现象或性质,是蛋白质的一个重要的物理化学特性。表面疏水性是决定蛋白质功能特性和稳定性的核心要素之一,影响蛋白质构象变化、自组装和聚集^[34-36]。它与技术功能和有价值的生物应用技术基本特性相关,如蛋白质凝胶化、溶解度、乳化和起泡^[37]。蛋白质的表面疏水性作为参与免疫反应的一种非共价分子间力,在协助识别抗体和抗原之间的特殊对位表位方面发挥关键作用,所以对其研究有助于更好地理解 and 预测蛋白质功能性质^[38]。测定蛋白质疏水性的变化可以初步判定蛋白质是否发生变性聚集,从而侧面推断牛奶过敏性是否有效降低。目前几种测定表面疏水性的计算和试验方法有荧光探针、色谱技术和考马斯亮蓝染色探针,其中最常用的方法是荧光探针。杨子滢等^[39]测定了活性氧氧化牛奶 BLG 疏水性的变化,发现活性氧浓度越高,BLG 的疏水性越强,并结合其他光

谱结果表明该处理方法可以改变 BLG 的结构,为食品加工过程中 BLG 致敏性的变化规律提供参考。

通过分析牛奶蛋白的结构,可以预测其可能与人类免疫系统相互作用的方式,从而预测其致敏性。然而,尽管蛋白质的结构对其功能至关重要,但结构并不总是直接决定功能,特别是在免疫学领域。此外,获得高分辨率蛋白质结构需要先进的试验条件及设备,如 X 射线晶体学或冷冻电子显微镜,这些设备具有技术要求和成本限制。综上所述,基于蛋白质结构的评价方法可以提供有价值的信息,但为了获得更全面准确的致敏性评估,最终的判断仍需结合其他试验手段。

2 基于 IgE/IgG 结合能力的评价方法

IgE 在过敏性疾病研究中起关键作用,且 IgE 的结合能力反映了免疫系统对特定抗原的特定应答,因此对其测定在临床诊断和科学研究领域中具有极高的应用价值^[40]。IgG 结合能力代表抗体能够识别抗原的能力,可以反映机体对特定抗原的免疫应答程度,高结合能力表明机体产生了较高水平的特异性 IgG 抗体,这可能意味着较强的免疫反应,所以检测 IgE/IgG 结合能力对于研究牛奶脱敏效果十分重要。酶联免疫吸附试验(ELISA)是检测并分析 IgE 结合能力最常用的技术。由于其成本低,操作简单,特异性强和接受度高,自发明以来就得到了广泛的应用^[41]。基于操作方法和检测原理的不同,ELISA 一般分为直接法、间接法、竞争法、夹心法,其中竞争法和夹心法最为常用^[42]。

Xiong 等^[43]使用间接 ELISA 评估牛奶中酪蛋白水解物的 IgE/IgG 结合能力,发现与单酶水解相比,经过木瓜蛋白酶和胰凝乳蛋白酶组成的复合酶水解处理的酪蛋白 IgE/IgG 结合能力大大降低;复合酶可有效降低酪蛋白的致敏性。为了简单快速地检测母乳中的 BLG,Rodriguez-Camejo 等^[44]从美洲驼对 BLG 免疫产生的纯重链抗体中筛选出高亲和力的 cBL5Bt 和 dBL92HA 纳米抗体,建立了一种基于纳米抗体的夹心 ELISA 法(图 2),结果显示其检出限达到 40 pg/mL,远高于 Hu 等^[45]开发的使用常规抗体和纳米抗体的混合夹心 ELISA 法。与传统抗体相比,纳米抗体具有人源化简单、亲和力高、稳定性高、可微生物表达、免疫原性低、可溶性好、渗透力强、可识别隐藏表位等优势^[46]。未来,研究者可将此方法改进后应用于牛奶致敏性的评估,从而提高检测灵敏度。

目前,ELISA 技术已相对成熟,但不同类型 ELISA 都存在特定的优势和局限性。研究者可以根据不同的试验目标选择合适的 ELISA 方法,并结合其他试验技术,对牛奶过敏原的致敏性进行全面的评估。



图2 基于纳米抗体的夹心ELISA法测定人乳中的BLG^[44]

Figure 2 Determination of BLG in human milk by nano-antibody based sandwich ELISA

3 基于动物致敏模型的评价方法

动物在生物学上与人类相似,并且容易受到许多与人类相同的健康问题的影响,所以使用在受控环境中的动物模型对基础研究、转化研究以及药物和生物测试十分有帮助^[47-48]。将动物模型应用在过敏的研究可以检测牛奶中过敏原的存在、识别可能的过敏机制以及过敏原的致敏强度,这是评价牛奶潜在致敏性最直接的方法。许多动物模型如小鼠、大鼠、猪等在揭示食品过敏机理方面已有较多报道^[49],其中啮齿动物由于相对容易饲养,费用低,试验时间短,便于研究致敏和激发期不同阶段的过敏反应,已被广泛应用于各种IgE介导的过敏性疾病的细胞和分子机制研究。与其他动物模型相比,小鼠模型具有明显的优点,特别体现在高水平IgE反应^[50]、多样的免疫学和分子学反应物。此外,小鼠和人类之间相似的免疫系统整体结构也证明小鼠是用于人类食品过敏研究的有效模型^[51]。在小鼠模型中,关注最多的器官是脾脏。脾作为体内血液循环途径上最大的免疫器官,在抗原的刺激下能产生包括各种免疫球蛋白和效应细胞在内的免疫活性分子,参与免疫反应。当外源抗原出现在血液中时,脾中的巨噬细胞等抗原提呈细胞会吞噬外源抗原,引起免疫反应和脾的形状和质量的变化,因此以脾形状和脾指数的变化作为评价致敏效果的指标^[52-53]。

应用于牛奶致敏性评价的小鼠品系包括C3H/HeNcrI、C57BL/6、BALB/c小鼠等。Huang等^[54]对比了应用于牛奶过敏中C3H/HeNcrI和BALB/c两种品系的小鼠模型,发现口服攻击后BALB/c小鼠比C3H/HeNcrI小鼠具有更强的Th3和体液免疫反应,表明小鼠对牛奶过敏反应的发生与品系有关。BALB/c小鼠目前被研究者广泛应用于牛奶潜在的致敏性评价,因为其可以产生特异性的IgE抗体,与人类产生的抗体相似^[55]。早在2014年,Stojadinovic等^[56]已经引入了IgE介导的BALB/c小鼠模型,目前该模型已被广泛用于评估牛奶的致敏性。Liang

等^[57]采用改进的BALB/c小鼠模型评价酶解牛奶的致敏性,通过对小鼠不同器官的组织进行病理学研究(肺、空肠、脾脏)、检测小鼠脾脏中CD4⁺T和CD8⁺T细胞数量、量化小鼠脾脏B细胞数量并测定小鼠总抗体水平和IgE结合能力,发现酶解牛奶可以减轻小鼠的过敏症状,缓解CD4⁺T/CD8⁺T细胞失衡,抑制B淋巴细胞的表达水平,从而证明酶解可以降低牛奶的致敏性。

基于动物模型的评价方法操作简单,可以通过观察动物症状直接评估牛奶致敏性,而且逐渐开发用于测试新的治疗方法,如基因治疗、细胞治疗和组织工程等。然而,动物和人类并不是完全相似,所以在动物上出现理想预期不一定可以应用于临床;此外,个体差异的存在会导致动物试验的重复性较差,一般需要体内和体外试验来相互证明评估加工工艺对牛奶致敏性的影响。另外,在试验设计中,研究者应综合考虑研究目标、内容以及其他因素,以筛选出最合适的动物模型以及品系,从而更有效地进行致敏性评估。

4 基于静态或动态体外消化模型的评价方法

人体消化是一个复杂的过程,它调节着营养物质和生物活性化合物的物理、化学和功能特性。因此,监测生物活性化合物的消化行为和功能特性十分有必要。研究食物消化的最具生理学意义的方法是使用人体试验,但这种方法昂贵又耗时,而且伦理上存在问题^[58-59]。此外,动物模型也在一定程度上存在缺陷。建立理想的体外消化模型能在短时间内提供准确的结果^[60-61]。此类模型应灵活、准确且可重现^[62],因此,消化稳定性可以作为评估过敏原致敏性的一个间接指标。

静态体外模型因操作简单、价格低廉而广受欢迎。静态模型由一系列生物反应器组成,模拟食物进入胃肠道不同部位(口、胃、小肠)时所遇到的物理化学和酶环境^[63]。在静态模型中,模拟的每一步都需在上一步完成后才会开始,而且消化发生在单个固定生物反应器中,生理参数不会随着时间的推移而变化。在动物科学中,静态体外消化模型已被证明是蛋白质和氨基酸消化率等终点值的可靠预测指标^[64]。但是由于模型过于简化,缺乏生理相关性,它无法重现转运底物—酶比、pH曲线和消化产物的运输,因而也无法估计营养物质和生物活性化合物的消化过程^[65]。

动态体外消化模型重现了食物消化的动态方面,模拟食物在肠道不同区域内的运输。这种模型可获得最接近人体实际生理消化的数据,更适合于研究致敏性食物在胃肠道中的消化过程,评估过敏原对消化的抵抗力,并确定基质和食物成分对其的影响。然而,目前市面上的

模型复杂且价格昂贵,大多数还需要大量的样品、消化酶以及使用实验室中通常无法使用的特定仪器^[66],并且可能与研究纯化的昂贵营养物质或生物活性物质的代谢途径无关。所以对于单一过敏原,使用经过验证的体外静态模型进行初步研究更能提供有价值的信息。

Zhao 等^[67]在进行体外消化模拟试验时发现,与德氏乳杆菌相比,酪丁酸梭菌 Z816 对牛奶中 BLG 的水解效果更强,表明 Z816 菌株的透化细菌可以达到对过敏原的高水解效率,水解的样品更容易被肠胃吸收,从而降低牛奶过敏性。由 INFOGEST 国际联盟开发的静态体外消化模型被广泛用于模拟食物消化过程中人体胃肠道内发生的物理化学过程(图 3),包括监测宏量营养素(脂质、蛋白质和淀粉)的消化、生物活性剂(维生素、矿物质和营养品)的生物可及性以及胃肠道条件下食物结构和物理性质的变化(颗粒大小、电荷和位置)的程序等^[68]。这种方法有助于开发更有营养和更健康的食物,具备应用于研究牛奶致敏性的潜力。

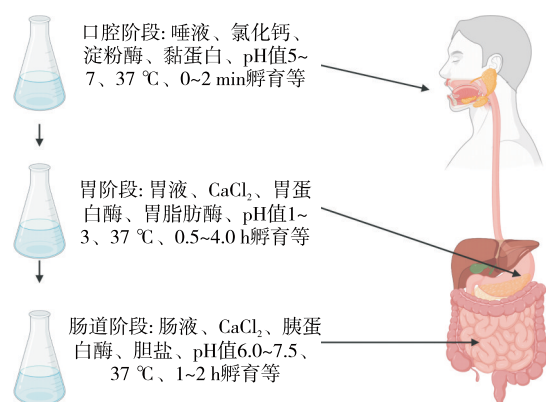


图 3 INFOGEST 静态消化模型^[68]

Figure 3 INFOGEST static digestion model

然而,真实人体胃肠道内部发生的复杂动态过程和反馈机制在此模型中不能很好地实现,而且不同人群(如婴儿、儿童、成人和老年人)胃肠道的差异很难在标准方法中考虑周全。未来开发的方法应该注重上述方面的优化,使模型更加可靠准确,并在后续试验方案中纳入其他致敏模型和评价方法,从而提高数据结果的可靠性和全面性。

5 基于细胞脱粒测定的评价方法

牛奶过敏原在胃肠道消化中的稳定性以及嗜碱性粒细胞和肥大细胞的脱颗粒率是决定过敏原免疫反应性的关键因素。牛奶过敏脱粒过程中释放的主要介质是血管活性胺、细胞因子和蛋白酶。在血管活性胺中,组胺是引起血管舒张和血管通透性增加的过敏反应的早期介质。

前列腺素和白三烯对平滑肌和血管舒张有类似的作用^[69]。KU812 细胞和 RBL-2H3 细胞常用作肥大细胞或嗜碱性粒细胞的互补模型,以评估牛奶过敏性和鉴定过敏原特异性 IgE。KU812 是一种人源细胞,能够在体外环境中稳定培养,其功能更贴近人类生理状态,因此常被用于评估蛋白质样本的致敏潜力。Ge 等^[70]为了进一步评估糖基化中间产物 MGO 对热加工过程中牛奶中 BLG 过敏性的影响,使用了 KU812 细胞脱粒模型以测量炎症因子的释放,结果显示被 MGO 修饰后的 BLG 使得 KU812 细胞释放的炎症因子均减少,证明 MGO 可有效降低 BLG 的致敏性。RBL-2H3 细胞在许多性质和功能上与肥大细胞相似,在其表面表达数十万个高亲和力 FcεRI,并且具有均一性好、不易变异、可以无限生成、可操作性强等优点^[71]。RBL-2H3 细胞在免疫应答中起关键作用,可被 IgE 抗体激活脱颗粒,释放 β-己糖胺酶、组胺、白介素等过敏介质^[72],其中 β-己糖胺酶通常被用作肥大细胞脱颗粒的标记物,因为它不易快速分解,测定方法简单、快速、灵敏^[73-74]。样品的致敏性一般用 EC₅₀ 的倒数表示(即致敏原浓度导致 β-己糖胺酶最大释放率的 50%)。Shao 等^[30]使用 RBL-2H3 细胞研究糖基化结合超声处理对 BLG 的影响,发现其 β-己糖胺酶的释放量低于未处理以及仅经过糖基化处理的试验组,表明这种处理方法是降低牛奶过敏性的有效手段。

选择合适的细胞脱粒测定方法取决于研究目的、试验条件和技术水平。测定组胺和 β-己糖胺酶等炎症因子释放的试验操作简单,易于标准化,可以更好地与人类临床反应相关联,但其无法同时监测其他炎症介质释放的程度。此外,免疫细胞荧光染色法和质谱分析法可以同时检测多种炎症介质的释放,但操作复杂,成本较高。

6 展望

目前,研究者已经建立多种用于评估牛奶致敏性的方法。利用电泳和光谱技术可分析脱敏前后牛奶致敏蛋白结构及表面疏水性的变化;IgE/IgG 结合水平反映了抗原诱导免疫反应和损伤组织的能力;动物致敏模型通过细胞因子水平初步揭示致敏性的降低机制;体外消化模型因成本低、操作简便、接近人体实际情况而常被使用;炎症因子的释放速率可反映细胞脱粒情况。未来对牛奶脱敏方法的评价不应只停留在效果层面,还应分析不同方法的作用机制。此外,开发新型低致敏牛奶时应将多种评估方法相结合,建立完善的评估体系,以更全面、准确地评估其脱敏效果。相信随着科技的不断进步,未来将会有更多有效降低牛奶致敏性的方法问世,为过敏人群带来福音。

参考文献

- [1] SHARMA S, KUMAR P, BETZEL C, et al. Structure and function of proteins involved in milk allergies[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 756(1/2): 183-187.
- [2] NOCERINO R, BEDOGNI G, CARUCCI L, et al. The impact of formula choice for the management of pediatric cow's milk allergy on the occurrence of other allergic manifestations: the atopic march cohort study[J]. The Journal of Pediatrics, 2021, 232: 183-191.
- [3] YANG M, TAN M Z, WU J L, et al. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: a population-based survey[J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2019, 43(6): 803-808.
- [4] REGULA P, AGRESS A, ROSENSTREICH D, et al. Adult-onset IgE-mediated cow's milk allergy-a rare phenotype[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology Global, 2023, 2(4): 100142.
- [5] FLOM J D, SICHERER S H. Epidemiology of cow's milk allergy[J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1 051.
- [6] BALLEGAARD A R, BØGH K L. Intestinal protein uptake and IgE-mediated food allergy[J]. Food Research International, 2023, 163: 112150.
- [7] LOZANO-OJALVO D, LEZMI G, CORTES-PEREZ N, et al. Non-IgE mediated food allergy[J]. Drug Discovery Today: Disease Models, 2015, 17: 45-53.
- [8] PAPE S B. "May contain" labelling: adequate consumer warning or unnecessarily defensive manufacturer behaviour?[J]. Journal of Consumer Policy, 2009, 32(2): 165-188.
- [9] CABANILLAS B, NOVAK N. Effects of daily food processing on allergenicity[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(1): 31-42.
- [10] PAN M F, YANG J Y, LIU K X, et al. Irradiation technology: an effective and promising strategy for eliminating food allergens[J]. Food Research International, 2021, 148: 110578.
- [11] LIU C Q, SATHE S K. Food allergen epitope mapping[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(28): 7 238-7 248.
- [12] YU X X, LIU M Q, LI X Y, et al. Qualitative and quantitative prediction of food allergen epitopes based on machine learning combined with *in vitro* experimental validation[J]. Food Chemistry, 2023, 405: 134796.
- [13] LEPSKI S, BROCKMEYER J. Impact of dietary factors and food processing on food allergy[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2013, 57(1): 145-152.
- [14] ZHOU F L, HE S D, SUN H J, et al. Advances in epitope mapping technologies for food protein allergens: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 107: 226-239.
- [15] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227 (5 259): 680-685.
- [16] HAGIWARA M. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting analyses via colored stacking gels[J]. Analytical Biochemistry, 2022, 652: 114751.
- [17] HAIDER S R, SHARP B L, REID H J. On-line coupling of gel electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011, 30(11): 1 793-1 808.
- [18] PAGANO M. Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes[J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 383(1/2): 119-125.
- [19] DU X, YIN S L, WANG T, et al. Identification of proteolytic bacteria from Yunnan fermented foods and their use to reduce the allergenicity of β -lactoglobulin[J]. Journal of Dairy Science, 2024, 107(11): 8 990-9 004.
- [20] GEETHU S, VIMINA E R. Protein secondary structure prediction using cascaded feature learning model[J]. Applied Soft Computing, 2023, 140: 110242.
- [21] BONDUELLE C. Secondary structures of synthetic polypeptide polymers[J]. Polymer Chemistry, 2018, 9(13): 1 517-1 529.
- [22] WANG K Q, SUN D W, PU H B, et al. Principles and applications of spectroscopic techniques for evaluating food protein conformational changes: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 67: 207-219.
- [23] FEVZIOGLU M, OZTURK O K, HAMAKER B R, et al. Quantitative approach to study secondary structure of proteins by FT-IR spectroscopy, using a model wheat gluten system[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 2 753-2 760.
- [24] CHANG K F, LIU J B, JIANG W, et al. Ferulic acid-ovalbumin protein nanoparticles: structure and foaming behavior[J]. Food Research International, 2020, 136: 109311.
- [25] SILIGARDI G, HUSSAIN R, PATCHING S G, et al. Ligand- and drug-binding studies of membrane proteins revealed through circular dichroism spectroscopy[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2014, 1 838(1): 34-42.
- [26] STASZAK K, WIESZCZYCKA K, MARTURANO V, et al. Lanthanides complexes-chiral sensing of biomolecules[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2019, 397: 76-90.
- [27] ROGERS D M, JASIM S B, DYER N T, et al. Electronic circular dichroism spectroscopy of proteins[J]. Chem, 2019, 5 (11): 2 751-2 774.
- [28] VERDINO P, KELLER W. Circular dichroism analysis of allergens[J]. Methods, 2004, 32(3): 241-248.
- [29] CHEN Y, TU Z C, WANG H, et al. Glycation of β -lactoglobulin under dynamic high pressure microfluidization

- treatment: effects on IgE-binding capacity and conformation [J]. Food Research International, 2016, 89: 882-888.
- [30] SHAO Y H, ZHANG Y, ZHU M F, et al. Glycation of β -lactoglobulin combined by sonication pretreatment reduce its allergenic potential[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1 527-1 535.
- [31] EFTINK M R. Fluorescence techniques for studying protein structure[J]. Methods of Biochemical Analysis, 1991, 35: 127-205.
- [32] ATOLE D M, RAJPUT H H. Ultraviolet spectroscopy and its pharmaceutical applications: a brief review[J]. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2018, 11(2): 59.
- [33] 杨庆, 尚洁丽, 曾浩龙, 等. 迷迭香酸共价偶联对 β -乳球蛋白结构及性质的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(11): 61-67.
- YANG Q, SHANG J L, ZENG H L, et al. Effect of covalent coupling with rosmarinic acid on the structure and properties of β -lactoglobulin[J]. Food Science, 2024, 45(11): 61-67.
- [34] RIDGLEY D M, CLAUNCH E C, LEE P W, et al. The role of protein hydrophobicity in conformation change and self-assembly into large amyloid fibers[J]. Biomacromolecules, 2014, 15(4): 1 240-1 247.
- [35] KHODARAHMI R, SOORI H, AMANI M. Study of cosolvent-induced α -chymotrypsin fibrillogenesis: does protein surface hydrophobicity trigger early stages of aggregation reaction?[J]. The Protein Journal, 2009, 28(7): 349-361.
- [36] DASURI K, EBENEZER P, ZHANG L, et al. Increased protein hydrophobicity in response to aging and Alzheimer disease[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 48(10): 1 330-1 337.
- [37] WITHANA-GAMAGE T S, HEGEDUS D D, MCINTOSH T C, et al. Subunit composition affects formation and stabilization of o/w emulsions by 11S seed storage protein cruciferin[J]. Food Research International, 2020, 137: 109387.
- [38] LIU G X, TU Z C, YANG W H, et al. Investigation into allergenicity reduction and glycation sites of glycated β -lactoglobulin with ultrasound pretreatment by high-resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2018, 252: 99-107.
- [39] 杨子滢, 葛新宇, 闫欣, 等. 活性氧对牛乳 β -乳球蛋白结构、功能特性和致敏性的影响[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(21): 18-25.
- YANG Z Y, GE X Y, YAN X, et al. Effects of reactive oxygen species on structure, functional properties and sensitization of bovine milk β -lactoglobulin[J]. Food Research and Development, 2023, 44(21): 18-25.
- [40] OKAYAMA T, MATSUNO Y, YASUDA N, et al. Establishment of a quantitative ELISA for the measurement of allergen-specific IgE in dogs using anti-IgE antibody cross-reactive to mouse and dog IgE[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 139(2/3/4): 99-106.
- [41] SINGH M M, SATIJA J. Enzyme-assisted metal nanoparticles etching based plasmonic ELISA: progress and insights[J]. Analytical Biochemistry, 2022, 654: 114820.
- [42] TABATABAEI M S, ISLAM R, AHMED M. Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1 143: 250-266.
- [43] XIONG Z Y, CHENG J F, HU Y X, et al. A composite enzyme derived from papain and chymotrypsin reduces the allergenicity of cow's milk allergen casein by targeting T and B cell epitopes[J]. Food Chemistry, 2024, 459: 140315.
- [44] RODRÍGUEZ-CAMEJO C, DELFIN-RIELA T, ROSSOTTI M A, et al. A highly sensitive nanobody-based ELISA for bovine β -lactoglobulin to classified donated human milk destined to susceptible newborns[J]. Food Control, 2023, 153: 109910.
- [45] HU Y Z, WANG Y, NIE L Q, et al. Exploration of specific nanobodies as immunological reagents to detect milk allergen of β -lactoglobulin without interference of hydrolytic peptides [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(48): 15 271-15 282.
- [46] VANLANDSCHOOT P, STORTELERS C, BEIRNAERT E, et al. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses[J]. Antiviral Research, 2011, 92(3): 389-407.
- [47] MACIEJEWSKI E C, BASSO M A, MILLER C T, et al. The ethics of animal research and testing: a US perspective[J]. Drug Discovery Today, 2023, 28(6): 103545.
- [48] MUKHERJEE P, ROY S, GHOSH D, et al. Role of animal models in biomedical research: a review[J]. Laboratory Animal Research, 2022, 38(1): 18.
- [49] LIU C L, CHEN C, YAN X Y, et al. Assessment of immune responses and intestinal flora in BALB/c mice model of wheat food allergy via different sensitization methods[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(3): 871-881.
- [50] HUANG J J, LIU C J, WANG Y B, et al. Application of *in vitro* and *in vivo* models in the study of food allergy[J]. Food Science and Human Wellness, 2018, 7(4): 235-243.
- [51] LIU T G, NAVARRO S, LOPATA A L. Current advances of murine models for food allergy[J]. Molecular Immunology, 2016, 70: 104-117.
- [52] MONMAI C, YOU S G, PARK W J. Immune-enhancing effects of anionic macromolecules extracted from Codium fragile on cyclophosphamide-treated mice[J]. PLoS One, 2019, 14(2): e211570.
- [53] REN H, ZHU X F, ZHAI S Y, et al. Seabuckthorn juice alleviates allergic symptoms in shrimp-induced food allergy mice[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(3): 783-788.
- [54] HUANG M J, SHAO H M, ZHANG X, et al. Comparison of cow's milk allergy models highlighted higher humoral and Th2

- immune responses in BALB/c than C3H/HeNCrI mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2024, 184: 114315.
- [55] HSIEH K Y, HSU C I, LIN J Y, et al. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2003, 33(11): 1 595-1 602.
- [56] STOJADINOVIC M, PIETERS R, SMIT J, et al. Cross-linking of β -lactoglobulin enhances allergic sensitization through changes in cellular uptake and processing[J]. Toxicological Sciences, 2014, 140(1): 224-235.
- [57] LIANG X N, WANG Z Z, YANG H, et al. Evaluation of allergenicity of cow milk treated with enzymatic hydrolysis through a mouse model of allergy[J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(2): 1 039-1 050.
- [58] BOISEN S, EGGUM B O. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals [J]. Nutrition Research Reviews, 1991, 4(1): 141-162.
- [59] MULET-CABERO A I, EGGER L, PORTMANN R, et al. A standardised semi-dynamic *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus[J]. Food & Function, 2020, 11(2): 1 702-1 720.
- [60] COLES L T, MOUGHAN P J, DARRAGH A J. *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals[J]. Animal Feed Science and Technology, 2005, 123: 421-444.
- [61] HUR S J, LIM B O, DECKER E A, et al. *In vitro* human digestion models for food applications[J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 1-12.
- [62] HUR S J, LEE S J, KIM D H, et al. Onion extract structural changes during *in vitro* digestion and its potential antioxidant effect on brain lipids obtained from low- and high-fat-fed mice [J]. Free Radical Research, 2013, 47(12): 1 009-1 015.
- [63] VERHOECKX K, BØGH K L, DUPONT D, et al. The relevance of a digestibility evaluation in the allergenicity risk assessment of novel proteins. Opinion of a joint initiative of COST action ImpARAS and COST action INFOGEST[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 129: 405-423.
- [64] EKMAY R D, COON C N, LADICS G S, et al. Allergenic potential of novel proteins-What can we learn from animal production? [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017, 89: 240-243.
- [65] LI Y W, XU R, XIU H N, et al. Effect of cinnamon on starch hydrolysis of rice pudding: comparing static and dynamic *in vitro* digestion models[J]. Food Research International, 2022, 161: 111813.
- [66] DUPONT D, ALRIC M, BLANQUET-DIOT S, et al. Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(10): 1 546-1 562.
- [67] ZHAO Q R, WANG Y W, ZHU Z M, et al. Efficient reduction of β -lactoglobulin allergenicity in milk using *Clostridium tyrobutyricum* Z816[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(3): 809-816.
- [68] ZHOU H L, TAN Y B, MCCLEMENTS D J. Applications of the INFOGEST *in vitro* digestion model to foods: a review[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2023, 14: 135-156.
- [69] TORDESILLAS L, BERIN M C, SAMPSON H A. Immunology of food allergy[J]. Immunity, 2017, 47(1): 32-50.
- [70] GE X Y, QU X, XIE C X, et al. The influence on the structure and allergenicity of milk β -lactoglobulin by methylglyoxal during thermal processing[J]. Food Research International, 2024, 196: 115043.
- [71] PASSANTE E, FRANKISH N. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell[J]. Inflammation Research, 2009, 58(11): 737-745.
- [72] OKAHASHI N, NAKATA M, HIROSE Y, et al. Streptococcal H₂O₂ inhibits IgE-triggered degranulation of RBL-2H3 mast cell/basophil cell line by inducing cell death[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e231101.
- [73] YAMASHITA S, YOKOYAMA Y, HASHIMOTO T, et al. A novel *in vitro* co-culture model comprised of Caco-2/RBL-2H3 cells to evaluate anti-allergic effects of food factors through the intestine[J]. Journal of Immunological Methods, 2016, 435: 1-6.
- [74] DING J, JU H P, ZHONG L M, et al. Reducing the allergenicity of pea protein based on the enzyme action of alcalase[J]. Food & Function, 2021, 12(13): 5 940-5 948.