

文章编号: 1000-5862(2012)01-0029-06

花生过敏小鼠腹腔肥大细胞 SOC 活性与 ROS 相关性研究

杨成彬¹, 闫浩¹, 刘晓宇¹, 夏立新^{1,2}, 李荔¹, 刘杰², 刘志刚^{1,2*}

(1. 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060; 2. 深圳大学医学院, 广东 深圳 518060)

摘要: 研究花生过敏状态下的 C57BL/6 小鼠腹腔肥大细胞的激活与钙离子通道之间的内在联系, 以及探讨肥大细胞钙离子通道与 ROS(reactive oxygen species)之间的关系。18 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 PBS 组(A 组)、花生过敏模型组(B 组)、vitamin A 和 vitamin E 灌胃治疗组(C 组)。酶联免疫吸附实验检测各组腹腔上清液中特异性的 IgE 和 IgG2a 水平, 以及细胞因子的变化, 另外测定腹腔上清液与血清中的组胺、ROS 含量。腹腔灌洗液中细胞涂片, 进行肥大细胞计数和脱颗粒比例统计, 荧光共聚焦显微镜观察腹腔肥大细胞钙离子通道 SOC(Store operated channel)的活性。腹腔上清液中花生特异性 IgE、IL-4、IL-10、组胺、ROS、血清中的组胺和 ROS、腹腔灌洗液中肥大细胞总数、肥大细胞脱颗粒比例, 都呈现出 A 组 < C 组 < B 组的趋势。腹腔上清液中 IgG2a、IL-6、IL-10 的水平 B 组低于 A 组, 但高于 C 组。共聚焦显微镜观察肥大细胞内部钙离子荧光强度数据表明 B 组小鼠腹腔肥大细胞 SOC 通道有更强的生理活性, 而 C 组肥大细胞 SOC 通道被抑制, 表明 ROS 的水平与肥大细胞 ROS 活性是正相关。花生过敏组肥大细胞 SOC 较 PBS 组活性更高, 抗氧化剂药物可能通过清除 ROS 来抑制肥大细胞 SOC 通道的活性, 进而抑制肥大细胞脱颗粒, 缓解过敏症状。这为进一步研究抗氧化剂治疗花生过敏反应的机理奠定了基础, 同时对临床治疗过敏反应也有一定的指导意义。

关键词: 花生过敏; 肥大细胞; SOC; ROS

中图分类号: Q 785

文献标志码: A

0 引言

食物过敏是一种常见的变态反应性疾病, 且发病率呈现逐渐上升的趋势。世界粮农组织报告, 90% 以上的食物过敏反应是由花生、牛奶、鸡蛋、鱼、贝壳类海产品、大豆、坚果类、小麦 8 大类过敏原所引起的, 花生过敏原是主要食物 8 大过敏原之一^[1]。美国的一项调查显示花生过敏原是引起过敏反应致死率最高的过敏原^[2]。1986 年, 叶世泰^[3]在我国 40 例食品过敏案例中指出, 花生等油料作物位居食品过敏原前列。国内对花生过敏引起过敏反应的发病机理, 以及抗氧化剂对其治疗的实验机理研究至今鲜有报道, 因此对花生过敏发病机理的研究甚为迫切。花生过敏反应是在花生过敏原的作用下, 由肥大细胞介导的 I 型超敏反应^[4]。肥大细胞的脱颗粒和活性的改变受到细胞内钙离子浓度变化的调节, 而 SOC 通道是肥大细胞最主要的钙离子通道^[5], 不同活化

状态的肥大细胞直接决定了过敏症状的严重程度, 而肥大细胞的激活依赖于 SOC 通道的开放, 细胞内质网内钙的释放, 引起细胞内钙离子浓度升高, 从而激活细胞外钙离子的大量内流, 导致细胞内钙离子浓度大幅度升高从而打开 SOC 通道, 引起肥大细胞活化^[6]。高浓度的钙离子浓度对细胞是有毒性的, 当钙离子上升到一定浓度, 细胞就会将多余的钙离子通过 ATPase 泵回收进内质网的钙库内, (Thapsigargin 内毒胡萝卜素, 简称 TG)能够有效地抑制 ATPase 泵, 阻断钙离子浓度的回收, 从而在较短的时间内耗竭钙库, 引起 SOC 通道的开放^[7]。有文献报道 ROS(reactive oxygen species, 活性氧簇)与肥大细胞 SOC 通道紧密相关, 在过敏反应体质下体内的 ROS 水平显著高于非过敏体质, ROS 对肥大细胞的激活和 SOC 通道的活化起着关键性的作用^[8], 但对花生致敏条件下体内 ROS 的水平与 SOC 通道相关性的研究报道比较少见, 其详细的机制还不清楚。目前抗氧化剂已用于过敏反应疾病的治疗, 一般应用

收稿日期: 2011-09-16

基金项目: 国家自然科学基金(30871752)和深圳市科技计划(200929)资助项目。

作者简介: 刘志刚(1959-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, 主要从事过敏性疾病过敏原的生化和分子生物学研究。

的抗氧化剂清除 ROS 的能力较弱,而具有较强抗氧化作用的药物,如稳定的谷胱甘肽激动剂正在临床研究中^[9]。因此研究花生致敏条件下肥大细胞的活性以及肥大细胞 SOC 通道的活性与体内 ROS 变化直接的关系,对于揭示花生过敏反应的发病机理以及后续应用抗氧化剂临床治疗过敏反应性疾病具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

18 只 5 周龄 C57BL/6 雌性小鼠(SPF 级)购于广东省实验动物中心,饲养于深圳市药检所 SPF 级动物房;生物素标记羊抗小鼠 IgE 二抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG2a 二抗购自 Southern Biotech 公司,小鼠组胺检测试剂盒、小鼠 ROS 检测试剂盒购自于武汉伊艾博生物科技有限公司,小鼠 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 细胞因子检测试剂盒购自美国 Biolegend 公司, Thapsigargin 购自美国 sigma 公司, Fluo-4 钙离子染料购自美国 Invitrogen 公司, 甲苯胺蓝购自珠海贝索生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与致敏 建模方法参照文献[10],将 18 只 C57BL/6 雌性小鼠分为 3 组:空白对照组(A 组)、花生过敏模型组(B 组)、vitamin A 和 vitamin E 灌胃治疗组(C 组)。致敏方式如下:A 组、C 组每次注射 100 μ g 花生粗蛋白+1 mg 氢氧化铝,皮下注射致敏 2 次,间隔 3 周,PBS 组用相同体积溶液的 PBS 溶液代替花生粗蛋白,其他与模型组相同,致敏 1 周后 B 组、C 组用烘烤过花生代替鼠粮持续喂养 4 周,A 组继续喂养鼠粮,4 周后 B 组、C 组用鼠粮取代花生继续饲养,PBS 组不变,1 周后 C 组按照每次 vitamin A(38 mg/(kg·day⁻¹))、vitamin E(27 μ g/(kg·day⁻¹))的剂量进行灌胃,每天 1 次,持续 1 周,A 组和 B 组用相同体积的 PBS 溶液代替,1 周后,再次用 200 μ g 花生粗蛋白皮下注射激发各组小鼠,6 h 后进行实验。

1.2.2 眼球取血与腹腔灌洗 将小鼠眼球取血处死,血液滴入经 2%肝素处理的抗凝管中,3 000 r/min 离心 10 min,取血清,然后腹腔注入 3 mL 的 D-hanks 液,进行腹腔灌洗,用注射器吸取灌洗液于离心管中,取 200 μ L 进行细胞计数,取 200 μ L 涂片,自然风干,甲苯胺蓝肥大细胞特异性染色,显微镜下统

计肥大细胞数目以及脱颗粒比例。剩余腹腔灌洗液于 1 000 r/min 下离心 5 min,离心后将上清液倒入离心管中,冻存待用。用 3 mL 的 D-hanks 重悬沉淀细胞,取 3 mL 肥大细胞分离液于一干净离心管中,将 D-hanks 重悬沉淀细胞液小心加在细胞分离液上面,常温 1 500 r/min 下离心 10 min;离心后,离心管内液体分为 3 层,取灌洗液/细胞分离液之间的白膜状细胞层,将白膜层转移至另一干净离心管中,加少量 D-hanks 液于上述细胞液中,常温 1 500 r/min 下离心 10 min;用 RPMI 1640 培养基 500 μ L 重悬离心后的沉淀,取 50 μ L 涂片,自然风干后加上一滴甲苯胺蓝,检测肥大细胞纯度,剩余的细胞接着进行 SOC 通道实验。

1.2.3 小鼠腹腔肥大细胞 SOC 实验 用 RPMI 1640 培养基重悬上述细胞,混匀后小心加入皿中,100 μ L/皿,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养细胞 30 min,待细胞沉淀并半贴壁后,轻轻吸去培养基,避光加入 Fluo-4 染料 50 μ L,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 染色 30 min;染色后,吸去 Fluo-4,用无钙 Tyrode's 液洗一遍,加入 50 μ L 无钙 Tyrode's 液,放入激光共聚焦工作台上进行实验。在 40 倍物镜下,选定细胞和焦距后,运行程序进行时间扫描,每 4 s 一帧,共 400 帧,在第 25 帧(100 s)加入 50 μ L Thapsigargin,耗竭钙池,在第 200 帧(800 s)加入 100 μ L 有钙台式液,直至扫描结束。记录完毕后,用机带软件分析每个细胞荧光时间变化,计算 SOC 开放程度 $\Delta F/F_0$ 。

1.2.4 腹腔上清液 IgE、IgG2a 的测定 将 1 μ g/mL 花生蛋白抗原加入到 96 孔酶标板中,每孔加 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用 PBST 洗版 5 次,加入封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;用 PBST 洗板 5 次,加入用含 5%小牛血清的 PBS 稀释的免疫血清,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;用 PBST 洗板 5 次,每孔加入 100 μ L 已稀释生物素标记的羊抗鼠-IgE(1:2 000)、羊抗鼠 HRP-IgG2a(1:5 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,PBST 洗版 5 次,加入 TMB 底物,测 IgE 需再加入 100 μ L 链霉亲和素稀释液(1:5 000);用 PBST 洗版 5 次后再加入 TMB 底物,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min,加入终止液终止反应,450 nm 读取吸光度值。

1.2.5 血清与腹腔上清液组胺、ROS 以及腹腔上清液细胞因子的测定 参照组胺、ROS 检测试剂盒说明书,酶联免疫吸附法检测血清与腹腔上清液的含量,参照小鼠 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 细胞因子检测试剂盒说明书检测腹腔上清液的含量。

1.2.6 统计学分析 各组之间比较采用 t 检验进行统计分析, $P<0.05$ 代表统计学意义上有显著性差异。

2 结果

2.1 腹腔肥大细胞的总数及脱颗粒比例统计

腹腔灌洗液中肥大细胞甲苯胺蓝特异性染色表明(见图 1), 相对于 A 组, B 组中肥大细胞明显增大, 数目增多(数据见表 1), 活性增强, 细胞膜出现不规则褶皱状, 分泌能力增强, 肥大细胞脱颗粒比例也显著增加。C 组相对于 B 组, 肥大细胞数目显著减少, 大小形态规则, 细胞周围无分泌物存在, 脱颗粒比例明显减少(见表 1)。

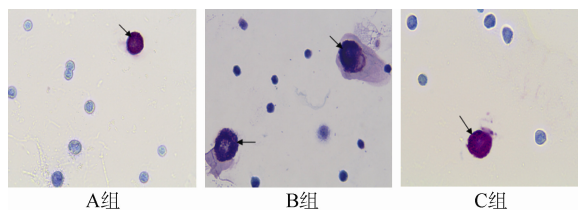


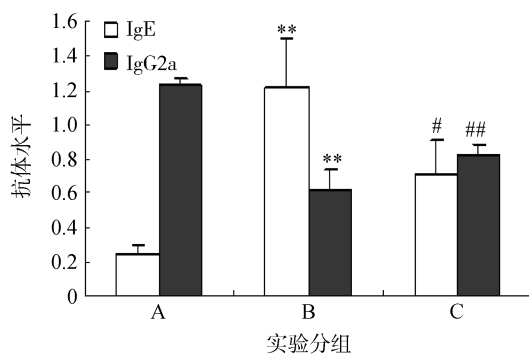
图 1 腹腔灌洗液细胞甲苯胺蓝染色 (100 \times , ↑示肥大细胞)

表 1 腹腔肥大细胞计数和脱颗粒比例统计

	腹腔肥大细胞总数/($\times 10^5$ 个)	肥大细胞脱颗粒比例/%
A 组	4.3 \pm 0.29	9.5 \pm 2.96
B 组	13.1 \pm 0.79	35.5 \pm 6.95
C 组	8.3 \pm 0.53	23.3 \pm 4.60

2.2 腹腔上清液中特异性的 IgE 和 IgG2a 水平的改变

酶联免疫吸附法检测腹腔上清液中的花生过敏原特异性的 IgE 和 IgG2a 的水平, B 组相对于 A 组, 血清中的 IgE 显著上升($P<0.01$), 说明花生过敏原引起体内产生了介导过敏反应的花生特异性 IgE, 而 IgE 是活化肥大细胞介导速发型过敏反应所必须的, 而 IgG2a 的水平明显下降($P<0.01$)。C 组相对于 B 组 IgE 水平明显下降($P<0.05$), IgG2a 显著升高($P<0.01$)(见图 2)。表明 vitamin A 和 vitamin E 影响了体内 Th1/Th2 的平衡。

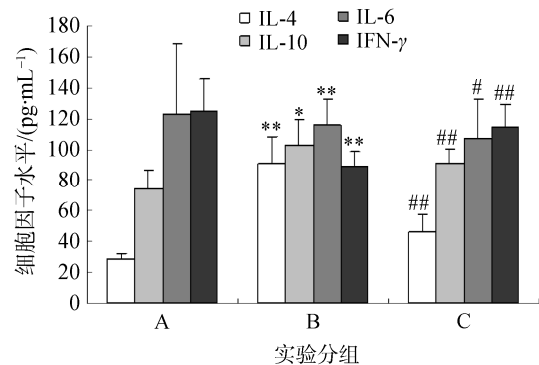


$n=6$, **: 与 A 组比较($P<0.01$), #: 与 B 组比较($P<0.05$), ###: 与 B 组比较($P<0.01$)。

图 2 腹腔上清液中 IgE 和 IgG2a 抗体的水平

2.3 腹腔上清液细胞因子的变化

B 组中的 Th2 型的细胞因子 IL-4 与 IL-10 相对于 A 组出现明显上升($P<0.05$), Th1 型的细胞因子 IL-6 与 IFN- γ 明显下降($P<0.01$)。而 C 组相对于 B 组 IL-4、IL-10 的水平明显下降($P<0.01$), IL-6 与 IFN- γ 水平显著上升($P<0.01$), 实验结果如图 3 所示。

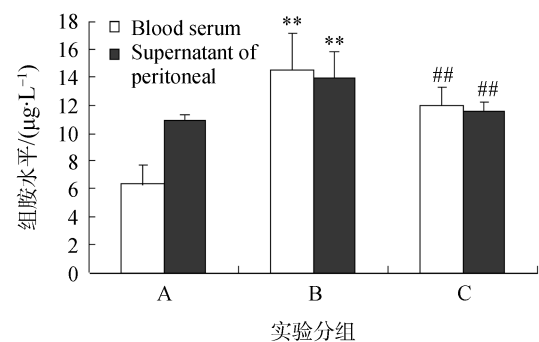


$n=6$, *: 与 A 组比较($P<0.05$), **: 与 A 组比较($P<0.01$), #: 与 B 组比较($P<0.05$), ###: 与 B 组比较($P<0.01$)。

图 3 腹腔上清液中细胞因子的变化

2.4 血清与腹腔灌洗液组胺的水平

B 组相对于 A 组, 血清和腹腔灌洗液中的组胺含量都明显要高($P<0.01$), 说明 B 组体内的肥大细胞的活化释放了组胺, 而 C 组相对于 B 组, 血清与腹腔灌洗液上中的组胺水平都明显下降($P<0.01$)(见图 4)。表明通过 vitamin A 和 vitamin E 抑制了肥大细胞的活性, 影响了组胺的释放。

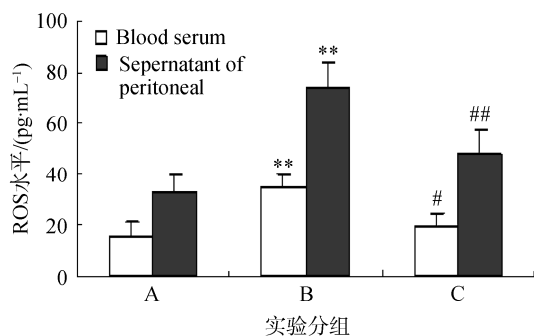


$n=6$, **: 与 A 组比较($P<0.01$), ###: 与 B 组比较($P<0.01$)。

图 4 血清与腹腔灌洗液中的组胺水平

2.5 血清与腹腔上清液组胺 ROS 的水平

通过酶联免疫吸附法检测血清与腹腔灌洗液中的 ROS 水平, 结果显示, B 组相对于 A 组, 血清和腹腔灌洗液中的 ROS 水平明显上升($P<0.01$), 而 C 组与 B 组相比较, 前者血清与腹腔灌洗液中 ROS 水平显著降低($P<0.05$)(见图 5), 表明花生过敏原引起小鼠体内产生了大量 ROS, 小鼠已处于氧化应激状态, 而



$n=6$, **: 与 A 组比较($P<0.01$), #: 与 B 组比较($P<0.05$), ##: 与 B 组比较($P<0.01$).

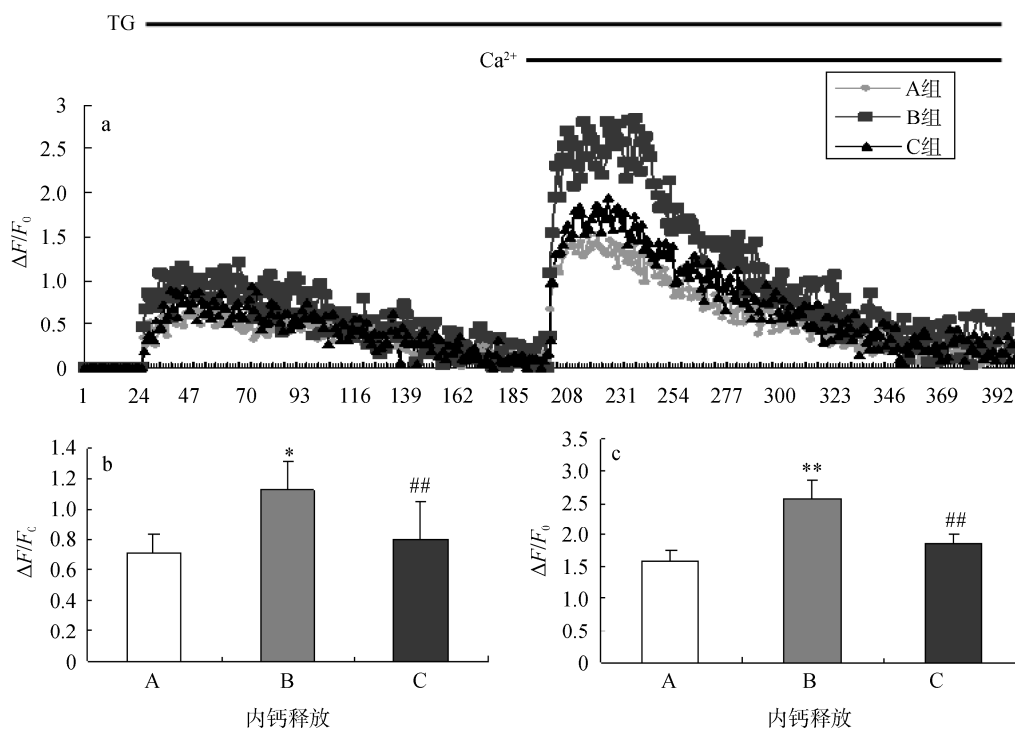
图 5 血清与腹腔灌洗液中的 ROS 水平

vitamin A 和 vitamin E 灌胃治疗清除了体内的 ROS, 使小鼠处于低氧化应激状态.

2.6 腹腔肥大细胞 SOC 实验结果

体内活化的肥大细胞通过脱颗粒, 释放多种炎症介质, 引起一系列的过敏症状, 急性分离激发后

各组小鼠腹腔肥大细胞 SOC 通道实验(见图6), 细胞在平衡 25 帧(每帧 4 s)后无钙的条件下, 加入 Thapsigargin 耗竭钙库, 引起内质网钙离子释放到细胞浆内, 钙离子浓度快速上升, 到达最大值后逐渐下降, 待钙离子浓度回到基值稳定后加入有钙台式液, 细胞内钙离子浓度又迅速上升, 到达最大峰值后逐渐回落. 实验数据表明: 相对于 A 组, B 组内钙释放和外钙内流都显著地上升($P<0.05$), 这表明在花生过敏原诱发的肠道过敏体质中, 腹腔肥大细胞已经活化, SOC 通道对钙离子的运输能力已显著增强; 而 C 组相对于 B 组, 内钙释放、外钙内流都出现显著的下降趋势($P<0.01$), 这说明过敏体质中通过灌胃 vitamin A 和 vitamin E 肥大细胞的 SOC 通道的活性得到很好地抑制, vitamin A 和 vitamin E 是 ROS 极其有效的清除剂, 表明 ROS 在肥大细胞的 SOC 通道的活化中起着关键性的作用.



a: Thapsigargin 和外钙打开 SOC 通道, 分别引起内钙释放和外钙内流; b: 内钙释放幅度的变化; c: 外钙内流的幅度变化. $n=18$, *: 与 A 组比较($P<0.05$), **: 与 A 组比较($P<0.01$), ##: 与 B 组比较($P<0.01$).

图 6 腹腔肥大细胞 SOC 通道的活性

注: F/F_0 值反映细胞内钙离子荧光相对强度, 间接反映细胞内钙离子浓度的高低, 计算方法: $\Delta F/F_0 = (\text{实时细胞内钙离子荧光度值} - \text{初始钙离子荧光度基值}) / \text{初始钙离子荧光度基值}$.

3 讨论

食物过敏是一种严重危害人类健康的速发型变应性疾病, 对人类的生活和生命造成了很大的威胁,

其中花生是最主要的过敏原之一. 灌胃 vitamin A 和 vitamin E 是效果极好的 ROS 清除剂, ROS 在过敏反应中起着重要的作用, 它直接影响肥大细胞的活化^[11-12], 本次实验表明花生过敏模型组中 ROS 含量显著增

加, vitamin A 和 vitamin E 后可以显著地降低体内的 ROS 水平, 表明过敏模型机体处于氧化应激状态, ROS 的清除是抗氧化剂治疗过敏的关键。花生过敏可以影响全身许多脏器, 如口腔、消化道、心血管、皮肤等引起临床各种表现^[13-14], 而 Mosmann 等发现按照细胞产生的细胞因子的种类和量的不同, 提出了 Th1/Th2 平衡理论, 可以将细胞因子的产生分为 2 种类型: Th1 型和 Th2 型。Th1 型是介导炎症反应和迟发型的变态反应速发型过敏反应及 I 型超敏反应, Th2 介导速发型超敏反应。本次实验表明花生过敏引起了偏向 Th2 的反应, 而灌胃 vitamin A 和 vitamin E 组调节了 Th1/Th2 的平衡, 抑制了 Th2, 上调了 Th1 型的细胞因子。对花生过敏的人群初次食入花生过敏, 不会引起过敏反应, 但体内会产生花生过敏原特异性的抗体 IgE, 以及记忆性 B 细胞, 当患者再次接触花生过敏原后, 已存在的 IgE 就会识别并结合花生过敏原, 并通过 FcεRI 受体与肥大细胞相结合, 并激活肥大细胞, 肥大细胞是一类胞质内富含嗜碱性颗粒的细胞, 颗粒中含组胺、5-羟色胺、白三烯和各种酶类, 激活的肥大细胞发生胞吐作用释放颗粒, 将组胺、白三烯等过敏反应介质释放到体内, 引起 I 型速发型超敏反应, 导致患者出现荨麻疹、腹泻、咽喉水肿、休克, 严重者导致死亡^[15-16]。本次实验检测了腹腔上清液中 IgE 和 IgG2a 的水平, 发现花生过敏引起特异性 IgE 的上升和 IgG2a 的下调, 而灌胃 vitamin A 和 vitamin E 组出现相反的现象, 表明灌胃 vitamin A 和 vitamin E 可调节抗体免疫应答的转化, 从而起到治疗作用。向军俭等^[17]报道脱颗粒肥大细胞的体积较正常肥大细胞大, 胞内有很多致密小颗粒。正常肥大细胞呈圆球形, 轮廓清楚完整; 脱颗粒细胞形态变得不规则, 表面出现一些空洞, 轮廓模糊不清。本次实验中对腹腔灌洗液中的肥大细胞进行甲苯胺蓝染色结果显示, 在花生致敏组的腹腔肥大细胞出现明显增大, 脱颗粒比例也明显增多, 显示肥大细胞呈活化状态, 而 vitamin A 和 vitamin E 灌胃组的肥大细胞形态完整, 脱颗粒比例显著减少, 表明清除 ROS 后肥大细胞活性降低, 释放介质能力下降。先前研究^[5]表明, 细胞内钙离子浓度变化影响肥大细胞的脱颗粒和活性的改变。SOC 通道是肥大细胞最主要的钙离子通道, SOC 通道理论于 1986 年由 Putney 提出, 该理论的主要内容指细胞内质网 Ca^{2+} 库中 Ca^{2+} 的含量决定了外部 Ca^{2+} 是否进入细胞, 内质网 Ca^{2+} 库中的 Ca^{2+} 释放到胞质中, 当内质网 Ca^{2+} 浓度降到一定的程度时会激活细胞膜的 Ca^{2+} 通道, 引起外钙内流从而填补内质网中

的 Ca^{2+} ; 当 Ca^{2+} 库的 Ca^{2+} 浓度回到基态时, Ca^{2+} 通道会自动关闭^[18]。肥大细胞膜上存在大量的 FcεR 受体, 与 IgE 特异性结合后能够致敏细胞, 从而引起一系列的信号转导, 磷脂酰肌醇 PIP_2 会被磷脂酶 PLC 水解成肌醇三磷酸 InsP_3 , InsP_3 与内质网上的受体结合诱导 Ca^{2+} 释放, 钙池内 Ca^{2+} 被耗竭到一定程度时会引起外钙内流, 从而开启 SOC, 激活肥大细胞脱颗粒, 释放组胺、5-羟色胺等过敏反应介质^[4,18-20]。本次实验在无钙的环境下, 用 Thapsigargin 刺激肥大细胞, 引起肥大细胞的内钙释放, 出现最大峰值, 即内钙释放的最大峰值, 待细胞钙离子浓度回到基值后再添加钙离子, 细胞通过细胞质膜将钙离子急速转运到细胞内, 细胞内钙离子浓度再次升高, 再次出现最高峰值, 此时为外钙内流的最大值。越来越多的证据显示, 氧化应激反应和 ROS 参与了过敏反应性疾病, ROS 在过敏物质导致肥大细胞活化过程中起重要的作用。氧化应激反应是 ROS 和抗氧化剂之间失衡的结果, 体内主要细胞内抗氧化剂有接触酶素、SOD 和谷胱甘肽, 细胞外抗氧化剂有维生素 A、维生素 C、维生素 E、尿酸、乳酸, 目前抗氧化剂治疗过敏反应已处于临床研究阶段^[9,21]。实验数据表明花生过敏组的内钙释放和外钙内流都显著增强, SOC 通道活性及转运钙离子的能力显著增强, 表明肥大细胞已经处于极易活化的状态, 而灌胃 vitamin A 和 vitamin E 组较致敏组内钙释放和外钙内流都明显下降, 表明通过抗氧化剂的治疗, 肥大细胞已处于比较稳定的状态, ROS 对肥大细胞 SOC 通道活化起着主导性作用, 通过抑制体内的 ROS 能够有效缓解过敏症状, 这与先前的研究报道理论是一致的。总之, 本次实验证实了花生过敏体质内是处于氧化应激状态, ROS 对肥大细胞 SOC 通道的活化起着重要的作用, 抗氧化剂通过清除体内的 ROS, 能够抑制肥大细胞的活化, 从而有效地缓解过敏症状, 这为临床用抗氧化剂药物治疗花生过敏反应提供了重要理论依据。

4 参考文献

- [1] Jansen J J, Kardinaal A F M, Huijber G, et al. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population [J]. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93(2): 446-456.
- [2] Keet C A, Wood R A. Food allergy and anaphylaxis [J]. Immunol Allergy Clin N Am, 2007, 27(2): 193-212.
- [3] 叶世泰. 我国常用食品致喘 40 例分析 [J]. 临床荟萃, 1986(12): 12-13.
- [4] Janet Kalesnikoff, Stephen J Galli. New developments in mast cell biology [J]. Nature Immunology, 2008, 9(11): 1215-1223.

- [5] Yoshihiro Baba, Keigo Nishida, Yoko Fujii, et al. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses [J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(1): 81-88.
- [6] Chan Young Park, Paul J Hoover, Franklin M, et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to orai1 [J]. *Cell*, 2009, 136(5): 876-890.
- [7] Christine Peinelt, Monika Vig, Dana L Koomoa, et al. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1) [J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(7): 771-773.
- [8] Hye Sun Kuehn, Emily J Swindle, Mi-Sun Kim, et al. The phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Btk is required for optimal eicosanoid production and generation of reactive oxygen species in antigen-stimulated mast cell [J]. *J Immunol*, 2008, 181(11): 7706-7712.
- [9] 何韶衡, 刘志刚, 林小平. 基础过敏反应学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 221-222.
- [10] Li X M, Serebrisky D, Lee S Y, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T-and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106(1): 150-158.
- [11] Laura M Sly, Janet Kalesnikoff, Vivian Lam, et al. IgE-induced mast cell survival requires the prolonged generation of reactive oxygen species [J]. *J Immunol*, 2008, 181(6): 3850-3860.
- [12] Swindle E J, Metcalfe D D. Rodent and human mast cells produce functionally significant intracellular reactive oxygen species but not nitric oxide [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48751-48759.
- [13] Mills E N C, Breiteneder H, Fodd allergy and its relevance to industrial food proteins [J]. *Biotechnology Advances*, 2005, 23(6): 409-414.
- [14] Kay A B. Allergy and allergic diseases [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(1): 30-37.
- [15] Bischoff S, Crowe S S. Gastrointestinal food allergy: New insights into pathophysiology and clinical perspectives [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4): 1089-1113.
- [16] Mosmann T R, Coffman R L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties [J]. *Annu Rev Immunol*, 1989(7): 145-173.
- [17] 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.
- [18] Putney J W Jr. A model for receptor-regulated calcium entry [J]. *Cell Calcium*, 1986, 7(1): 1-12.
- [19] Dean D Metcalfe, Richard D Peavy, Alasdair M Gilfillan, et al. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(4): 639-646.
- [20] Tarik Smani, Sergey I Zakharov, Peter Csutora, et al. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway [J]. *Nature Cell Biology*, 2004, 6(2): 113-120.
- [21] Suzuki Y. Role of oxidants in mast cell activation [J]. *Chem Immunol Allergy*, 2005(87): 32-42.

The Experiment Study of Peritoneal Mast Cell SOC Activity of Mice That Have Been Therapied by Antioxidant

YANG Cheng-bin¹, YAN Hao¹, LIU Xiao-yu¹, XIA Li-xin^{1,2}, LI Li¹, LIU Jie², LIU Zhi-gang^{1,2*}

(1. Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China;

2. Medical School of Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China)

Abstract: By establish mice peanut allergy and antioxidant therapy allergy mice model, to investigated correlation activation of mast cell with SOC channel, and further to study the relationship between mast cell SOC and ROS. 18 female C57BL/6 mice were divided into three groups that one is treated by PBS and the other is treated by lavaging crude peanut protein, another is peanut allergy mice that been therapied by lavaging vitamin A and vitamin E. Peanut protein specific IgE and IgG2a, cytokines, histamin and ROS in supernatant of peritoneal lavaging were assayed by enzyme-linked immunoassay(ELISA). In addition, histamin and ROS in blood serum were also assayed by ELISA. By peritoneal lavaging, inflammatory cells and mast cell were analyzed. Confocal was used to detect SOC activity of peritoneal mast cell. In peritoneal lavaging experiment, the total numbers of cells, eosinophil, mast cell of B group were greatly increased than A group, but these numbers of C groups were lower than B group. The levels of IgE, IL-4, IL-10 in supernatant of peritoneal lavaging liquid were presented a tendency, which C group were lower than B group, but higher than A group. But the levels of IgG2a, IL-6, IL-10 were differences, which C group were lower than A group, but higher than B group. The levels of histamin and ROS presented a tendency, which C group were lower than B group, but higher than A group. Confocal recorded the fluorescence intensity of intracellular calcium changes. The datas of confocal recorded show that SOC activity of B groups mast cells were increased, but contrast to B group, SOC activity of C group were inhibited. Vitamin A and vitamin C can relieve allergy induced by peanut crud protein. However antioxidant can inhibit SOC activity of mast cell by scavenge ROS. Accordingly antioxidant depressed mast cell degranulation and then relieve anaphylactic response. This study laid the foundation for further research in the mechanism of antioxidants treatment of peanut allergy, while it has some significance for the clinical treatment of anaphylaxis.

Key words: peanut allergy; mast cell; SOC; ROS

(责任编辑: 刘显亮)