发生和结石复发[3-5]。所以术中如何更好的解除胆管狭窄,整形胆管是治疗胆管结石疾病的重要步骤。本组有胆道手术史者占68.8%,说明大多数病例在第一次手术时狭窄的解除相对不够。我们体会是:大多数患者将左右肝管剖开后,肝门部的狭窄能够解除,部分患者存在右后叶开口,即二级胆管开口处狭窄,操作方法是沿右胆管前壁向上剖开至右后叶开口处,如前方的肝方叶较肥厚不便操作者,可切除部分肝方叶;二级胆管开口狭窄者,由于解剖原因,左肝切除操作较安全,并发症少。所以左肝结石较多而伴有左肝管狭窄者,建议行左肝叶切除术[6]。张永杰[7]提出对BISMOTH Ⅲ型胆管癌患者在基本情况佳时可顺利切除肿瘤,提示仅距肝门部左右胆管分叉处约1.0 cm的二级胆管开口的整形操作是完全可行的,这与医院设备和术者技术有很大关系。本组结果表明,患者手术整形胆管狭窄1年后复查疗效较好。

绝大部分肝门部胆管狭窄和二级胆管开口狭窄的病人都能通过手术整形解除,但有部分二级胆管开口狭窄者通过单纯的手术方式很难达到矫正。我们采用胆道镜直视下放置球囊扩张装置,术后渐进扩张方法治疗24例,2个月后经胆道镜检查,狭窄部位胆管有明显扩大,引流效果好,疗效满意。但值得注意的是:球囊支撑后,因狭窄部位胆管逐渐得以扩张,球囊往往容易滑脱和移位,应每周B超复查,即时调整位置,球囊引流管较细,每1~2天冲洗1次,以免堵塞。

参考文献:

[1] 田伏洲,汤礼军,罗浩. 球囊渐进扩张法治疗医源性胆管狭窄修复术后再狭窄[J]. 外科理论与实践,2009,14(2):159-161.
[2] 李玉林. 病理学[M]. 第6版. 北京:人民卫生出版社,2006.
[3] 王雨,田伏洲,蔡忠红,等. 胆道球囊扩张术在胆管损伤后再狭窄中的应用[J]. 四川医学,2005,26(3):266-268.
[4] 陈安平,鲁美丽,高珂,等. 腹腔镜下胆管扩张术的临床应用[J]. 中国实用外科杂志,2003,23(2):102-103.
[5] 金辉. 经T管窦道胆道镜球囊扩张术治疗胆管狭窄及残余结石21例分析[J]. 中国医疗前沿,2009,4(23):39-40.
[6] 田伏洲,骆助林,汤礼军,等. 限量肝切除加球囊扩张治疗复杂性肝胆管结石并狭窄疗效分析[J]. 中国实用外科杂志,2009,29(7):571-573.
[7] 张永杰. 肝门部胆管癌可切除性的术中判断技巧[J]. 中国实用外科学杂志,2007,27(1):93-95.

(收稿:2010-03-18 修回:2010-06-21)
(编辑 邓强庭)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)18-2030-03

以特异性IgE为探针的鸡蛋过敏原成分分析

陈 寅[1],李会强[1],王 萍[1,2],李韶深[3],孙 静[4] (300203 天津,天津医科大学检验学院免疫学教研室[1];241002 安徽 芜湖,皖南医学院微生物免疫学教研室[2];300120 天津,天津中医药研究院附属医院检验科[3];300121 天津,天津市人民医院检验科[4])

【摘要】 **目的** 分析并确定鸡蛋中引起过敏的主要蛋白成分。**方法** 制备蛋清、蛋黄的蛋白粗提液,从临床收集鸡蛋过敏患者血清,Western blot分析并确定鸡蛋中的过敏原组分。**结果** 鸡蛋清中的蛋白条带主要有4条,而其中76×10^3和15×10^3附近的2个蛋白条带与血清有阳性反应,蛋黄中蛋白条带较多,与患者血清的反应存在假阳性。**结论** 蛋清中卵清转铁蛋白和溶菌酶为主要过敏原,蛋黄中有些蛋白组分与人IgE具有相同表位,可能是引起交叉反应的主要原因。

【关键词】 蛋类过敏;免疫球蛋白E
【中图法分类号】 R392-33;R392.7;R446.62 **【文献标志码】** A

鸡蛋是FAO/WHO认定的导致人类食物过敏的八大类食物之一,美国以及欧盟新食品标签法中规定必须将其作为过敏原成分标示出来。早在1912年,体内外实验[1]均发现鸡蛋清中的多种蛋白质与鸡蛋过敏症有关,据估计鸡蛋过敏的发生率甚至超过了牛奶过敏[2],是美国和欧洲国家儿童中最常见的速发型食物过敏反应性疾病[3]。

食物过敏原是食物中真正引起过敏反应的成分[4],它是食物过敏研究、检测和防治的中心环节。获得高纯度且免疫活性良好的过敏原,是深入研究过敏原的生化特性,建立高特异性的食物过敏实验室诊断方法,开发低过敏或无过敏组分的食物制品的必要前提。本研究主要以患者血清特异性IgE(sIgE)为探针或识别抗体,应用蛋白印记技术,分析并鉴定鸡蛋中过敏原组分,为进一步纯化过敏原,建立鸡蛋过敏原IgE检测方法,提高鸡蛋过敏原检测水平提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜鸡蛋购自天津市世纪华联超市;鸡蛋过敏患者血清及正常对照血清由天津市人民医院检验学部、天津市中医药研究院附属医院检验科提供,其中阳性血清22例,男性13例,女性9例,年龄2~65岁,平均32.3岁,取自所在医院的消化、皮肤

【基金项目】 天津医科大学科学重点学科发展基金资助项目(2009XK11)
【通信作者】 李会强,电话:(022)60357292,E-mail:lihuiqiang1965@163.com

等科室 2009 年 2 月至 2010 年 1 月期间的住院患者；对照血清 10 例从健康体检人员中获得，并经病史和体外诊断排除食物过敏，所有标本经美国 ASI 公司 IVT 过敏原体外检测试剂盒确诊。蛋白分子量标准（SM0617，MBI Fermentas），AP-抗 IgE 抗体、BCIP/NBT 底物（美国 DPC 生物公司）；二喹林甲酸（bicinchoninic acid，BCA）法蛋白检测试剂盒（碧云天生物技术研究所），电泳及转印试剂原料、考马斯亮蓝 G250（Sigma 公司），聚乙烯醇（PVA）（美国 DPC 生物公司），硝酸纤维素薄膜（Whatman and S&S），Mini p-4 垂直凝胶电泳槽（北京凯元信瑞仪器有限公司），电泳仪及转膜电泳槽（美国 Bio-Rad 公司），低温冷冻高速离心机（美国 Sigma 公司），全自动化学发光凝胶成像系统（北京赛智创业科技有限公司），核酸蛋白检测仪（美国 Bio-Rad 公司）。

1.2　方法

1.2.1　鸡蛋蛋白组分提取　　蛋清和蛋黄的提取方法相同。取鸡蛋 2 枚，分离蛋清和蛋黄，于冰上用玻璃棒搅匀后，分别按 1∶5 的体积比加入 -20 ℃预冷丙酮，于 4 ℃环境中浸泡去脂 24 h，搅拌 2 次，换液数次至丙酮澄清。而后 3 000 r/min 离心 25 min，弃去丙酮，沉淀于低温环境通风挥干丙酮后称量，按 8 ml/g 的比例溶于 PBS 缓冲液（0.01 mol/L，pH = 7.4），于 4 ℃环境中提取 24 h，期间搅拌数次。最后以 12 000 r/min 低温冷冻离心 20 min，收集上清即为蛋清/蛋黄过敏原粗提液。分装后于 -20 ℃保存。

1.2.2　蛋白浓度测定　　利用 BCA 法检测粗提液中蛋白浓度，操作按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书中步骤进行，用核酸蛋白检测仪于 562 nm 波长下测定光密度值[*D*(562)]，根据标准曲线得出蛋白浓度。

1.2.3　SDS-PAGE 分离过敏原粗提液中的蛋白条带　　选择堆积胶浓度为 5%，分离胶浓度考虑用 15% 或 18%，蛋白浓度调整为约 5 μg/μl，每孔上样量约 30 μg。经处理后进行 SDS-PAGE 电泳，选择恒压条件，初始电压 90 V，约 30 min 后加压至 140 V。电泳结束后取出凝胶，先用固定液（含甲醇 45.6%、乙酸 4.6% 的水溶液）固定 1 h，再用考马斯亮蓝染液染色 1.5 h，最后用脱色液（含甲醇 10%、乙酸 10% 的水溶液）脱色至条带清晰，于凝胶成像仪上拍照分析。

1.2.4　Western blot 鉴定粗提液中的过敏蛋白区带　　粗提液经处理后先进行 SDS-PAGE，条件同上，电泳结束后再通过湿转印将蛋白从凝胶转移至 NC 膜上（转印条件恒压 80 V，90 min）。而后 NC 膜经 TBS 缓冲液处理、5% 聚乙烯醇（PVA）封闭液封闭后，以含有鸡蛋过敏特异性 IgE 的阳性血清为一抗，以碱磷酶标记的抗 IgE 抗体为二抗，进行免疫印迹反应，同时以正常人血清为对照，观察阳性（显色）条带。

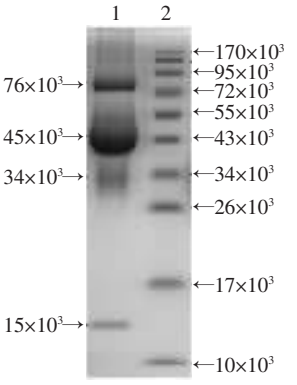
2　结果

2.1　粗提液中蛋白浓度测定结果

根据本研究选取的粗提方法得到的蛋清、蛋黄总蛋白粗提液的浓度分别为 17.6、8.66 mg/ml。

2.2　SDS-PAGE 结果

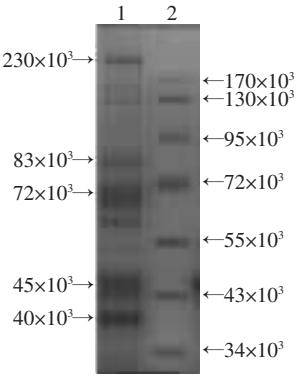
2.2.1　蛋清粗提液　　蛋清粗提液经 SDS-PAGE 后显示有 4 个主要条带，相对分子质量分别为 76×10^3、45×10^3、34×10^3、15×10^3，按相对分子质量估计，初步判断分别对应的是卵清转铁蛋白、卵白蛋白、卵类粘蛋白和溶菌酶。其中 45×10^3 附近蛋白浓度最高，见图 1。



1：蛋清粗提液　2：标准（18% 分离胶）

图 1　蛋清粗提液 SDS-PAGE 结果

2.2.2　蛋黄粗提液　　蛋黄粗提液经 SDS-PAGE 后显示的条带较多。主要条带约有 9 条，相对分子量分别为 230×10^3、150×10^3、130×10^3、83×10^3、72×10^3、60×10^3、48×10^3、45×10^3、40×10^3 左右。其中 230×10^3、83×10^3、72×10^3、45×10^3、40×10^3 附近蛋白浓度较高。同蛋清相比，蛋黄的蛋白成分多而分散。见图 2。

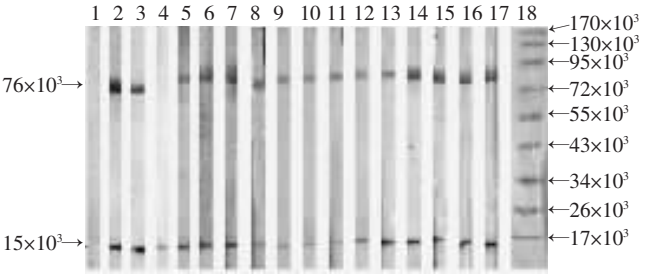


1：蛋黄粗提液　2：标准（15% 分离胶）

图 2　蛋黄粗提液 SDS-PAGE 结果

2.3　Western blot 结果

2.3.1　蛋清粗提液　　应用单例鸡蛋过敏患者血清（sIgE）为识别探针，对提取蛋清中的过敏原进行鉴别。结果显示，本研究提取的蛋清粗提液中有 2 个条带同血清发生反应，分别在 76×10^3 和 15×10^3 附近出现较为明显的显色条带。见图 3。

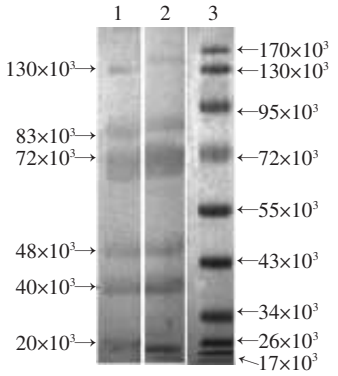


1：健康人血清阴性对照　2～17：蛋清过敏原与单例过敏血清的反应结果　18：标准（15% 分离胶）

图 3　蛋清粗提液 Western blot 结果

2.3.2　蛋黄粗提液　　蛋黄过敏原粗提液经过免疫印迹后也出现了显色反应，相对于蛋清，蛋黄粗提液中的的显色条带更

多,分布范围广,对应的相对分子质量分别约为130×10^3、83×10^3、72×10^3、48×10^3、40×10^3、20×10^3。然而,正常血清的对照组也发现了相似的显色条带。见图4。



1:蛋黄过敏原与过敏血清的反应结果;2:健康人血清阴性对照;3:标准(15%分离胶)

图4 蛋黄粗提液 Western blot 检测结果

3 讨论

食物过敏又称食物变态反应(food allergy),是指食物进入人体后,机体对之产生异常免疫应答,产生相应的抗体或致敏淋巴细胞,当再次接触同一种过敏原后在体内引起体液或细胞免疫反应,由此导致组织损伤或机体生理机能障碍,进而引发一系列临床症状。如果机体对某种食物成分过敏,则大多会在体内产生能与这一成分特异结合的 IgE 抗体,因而特异性 IgE 检测是诊断食物过敏非常有效的方法。作为包被抗原,过敏原的纯度对检测方法的性能有很大影响,如果包被的抗原中含有大量的无关蛋白,不但对结合患者血清中的特异性抗体毫无帮助,还会占据有限的反应空间,降低灵敏度,甚至带来假阳性等干扰因素。在此我们选择了同人们生活密切相关、尤其是对婴幼儿有较大影响的鸡蛋过敏为研究对象,通过制备含有过敏原的蛋白粗提液进行 SDS-PAGE,结合相对分子质量大小查看过敏原的含量和分布,再进一步通过免疫印迹验证可疑蛋白的过敏原性,找到真正的过敏条带,为下一步纯化过敏原提供依据,旨在建立有很强针对性的基于检测特异性抗体的食物过敏检测方法。

本研究在蛋清中鉴定出了两种过敏蛋白成分,相对分子质量大约为76×10^3和15×10^3,根据相关文献报道[5],推测分别为卵清转铁蛋白和溶菌酶,二者是公认的蛋清中的主要过敏原。文献[6]报道在蛋清中主要过敏原有4种,除了此次实验推测的这两种以外,还有相对分子质量为44.5×10^3的卵白蛋白和28×10^3的卵类黏蛋白,据报道它们的过敏原性强于卵清转铁蛋白和溶菌酶[6],但在本研究中,SDS-PAGE 的染色结果证实在相应分子量附近有蛋白条带存在,但免疫印迹后相应位置却没有显色条带。由于此次实验收集的血清病例数有限,是否因为没有提取到相关蛋白或是收集的过敏血清中没有针对这两种过敏原蛋白的特异抗体或是其他原因还有待进一步研究。另外,在蛋黄过敏原的鉴定中我们发现较多的显色条带,这与文献报道出入较大[7],大部分研究认为蛋黄中过敏原较少或几乎没有。因而我们推测实验结果有假阳性存在,通过设立对照实验,排除了底物等原因后,我们发现蛋黄中大量蛋白成分能够和抗 IgE 的抗体(二抗)直接结合。后来我们将蛋黄粗提液稀释后,将其作为含 IgE 的标本送医院检验科进行 IgE 测定,测定结果高于正常值(人血清正常值 < 160 U/ml),提示蛋黄中存在与 IgE 结构类似、能和抗 IgE 抗体结合的物质。进一步查阅文献[8]发现蛋黄中可能含有禽类特有抗体类型 IgY,有一篇报道指出其结构与 IgE 有一定的相似性[9],则可能是它带来的干扰,但 IgY 相对分子质量180×10^3,且含量较低,而反应中较多的显色条带不可能都由 IgY 造成。具体的原因仍有待进一步研究。假阳性情况如果进一步被证实,将对提高鸡蛋过敏的检测水平有积极意义,我们可以进一步通过测定更多的阳性血清,尽可能地将鸡蛋中的过敏原找全,同时鉴别出引发假阳性的条带而将其剔除,只保留真正同特异性 IgE 反应的过敏原,用其为已知抗原建立的检测血清 sIgE,可进一步提高鸡蛋过敏原检测的准确度。

参考文献:

[1] Walsh B J, Hill D J, Macoun P, *et al*. Detection of four distinct groups of hen egg allergens binding IgE in the sera of children with egg allergy [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2005, 33(4): 183-191.

[2] Heine R G, Laske N, Hill D J. The diagnosis and management of egg allergy[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2006, 6(2): 145-152.

[3] Jean A C, Leonard B, Rufus E L. Food allergy: a practice parameter [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2006, 96(3 Suppl 2): S1-S68.

[4] Tanabe S. Analysis of food allergen structures and development of foods for allergic patients [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(3): 649-659.

[5] Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(13): 4874-4900.

[6] 佟平, 高金燕, 陈红兵. 鸡蛋清中主要过敏原的研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 565-568.

[7] 吴序栎, 杨志华, 刘志刚, 等. 鸡蛋过敏原分离、鉴定与纯化[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(1): 127-128.

[8] Taylor A I, Gould H J, Sutton B J, *et al*. Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure[J]. J Biol Chem, 2008, 283(24): 16384-16390.

[9] Taylor A I, Sutton B J, Calvert R A. Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(2): 97-101.

(收稿:2010-05-17 修回:2010-07-05)

(编辑 栾 嘉)