

· 论 著 ·

体检人群小麦不耐受阳性率及其组分分析研究^{*}

戈立秀¹, 张 丽², 张 伟¹, 韩 煦¹, 常艳敏^{1△}

(1. 天津市南开医院检验科 300100; 2. 天津医科大学检验学院, 天津 300203)

摘要:目的 分析体检人群小麦免疫球蛋白 G(IgG) 抗体水平, 探讨体检人群小麦不耐受的阳性率与性别、年龄间的关系, 分析其不耐受组分。方法 采用乙醇-丙酮法对小麦蛋白进行提取, 用粗提小麦蛋白包被 96 微孔板, 酶联免疫吸附试验检测 122 例体检者小麦蛋白 IgG 水平, SDS-PAGE 电泳分析其蛋白组分, 并用酶免疫印迹方法分析提取液中与 IgG 特异度结合的主要蛋白组分。结果 该地区体检人群小麦不耐受抗体阳性率为 21.3%, 其中男(18.52%)、女(23.53%) 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$); 少年组阳性率为 26.47%, 中年组 17.24%, 老年组为 18.64%, 其中少年组与中年组、老年组的差异均有统计学意义($P<0.05$), 而老年组和中间组之间差异无统计学意义($P>0.05$); 酶免疫印迹结果显示, 小麦蛋白不耐受组分主要有 4 种, 主要为麦谷蛋白, 且个体间所针对的抗原差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 体检人群中部分存在小麦蛋白 IgG 抗体; 且小麦蛋白不耐受与性别无相关性, 而与年龄有一定相关性; 不同个体间小麦主要不耐受组分差异无相关性。

关键词: 食物不耐受; 小麦蛋白; 免疫球蛋白 G; 体检人群

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.19.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)19-2827-03

Analysis and study on wheat intolerance positive rate and its components in physical examination population^{*}

GE Lixiu¹, ZHANG Li², ZHANG Wei¹, HAN Xu¹, CHANG Yanmin^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Municipal Nankai Hospital, Tianjin 300100, China;

2. Inspection Institute, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract: **Objective** To analyze the wheat-specific IgG level in physical examination population, and to investigate the relation between the wheat intolerance of physical examination population with the age and gender, and to analyze its intolerance components. **Methods** The wheat protein was extracted by using ethanol and acetone extraction method, and the 96 microplates were coated with the crudely extracted wheat protein. The wheat-specific IgG level was detected by using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in 122 persons undergoing physical examination. The components of crude protein were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and the main protein ingredients in the extraction solution were identified by Western-blotting. **Results** The positive rate of wheat intolerance antibody among the physical examination population in local area was 21.3%, in which the positive rate was 23.53% for females and 18.52% for males, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$); the positive rate was 26.47% in the teenager group, 17.24% in the middle-aged group, 18.64% in the elderly group, the difference between the teenager group with middle-age group and elderly group were statistically significant ($P<0.05$), while the difference between the elderly group and middle-aged group was not statistically significant ($P>0.05$); Western-blot results showed that there were four main intolerance components in the wheat, in which glutenin was predominant, moreover the antigen difference among different individuals had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** The wheat-specific IgG antibodies exist in partial physical examination population; moreover the wheat protein intolerance has no correlation with gender and has a certain correlation with the age; the difference in main components of wheat intolerance among different individuals has no statistical significance ($P>0.05$).

Key words: food intolerance; wheat; IgG; physical examination population

食物不耐受是机体对某种特定食物或食物成分所产生的不良反应, 由食物特异性免疫球蛋白 G(IgG) 介导的复杂的免疫反应, 可发生在各年龄段。据报道, IgG 介导的食物不耐受在人群中的阳性率高达 45%, 其中不同年龄的阳性率存在差异^[1-2]。目前其诊断标准还尚未明确, 临床上多采用对症治疗, 但由于长期反复发作, 缺乏正确的治疗可引发器质性疾病变^[3]。不耐受原是食物中能引发不耐受的关键蛋白, 检测患者外周血中的特异性 IgG 进而推测不耐受原是诊断食物不耐受重要而有效的体外试验方法。引发不耐受的各种成分中, 以蛋白种类居多, 因此, 鉴别不耐受食物蛋白提取液中的不耐受组

分和探索不耐受原的纯化方法具有重要理论价值和临床应用价值。

本文以小麦蛋白提取液为抗原, 通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对 122 例天津市南开医院体检人群血清中特异性 IgG 进行分析, 并选取特异性 IgG 水平较高的体检人群中阳性血清, 调查小麦不耐受的阳性率并以酶免疫印迹技术分析小麦不耐受的蛋白组分, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 6—7 月在天津市南开医院体检的 122 例体检者 (静脉血 2 mL), 离心收集血清标本, 其中男 54

^{*} 基金项目: 天津市卫生和计划生育委员会科技基金资助项目 (2010Ky12)。

作者简介: 戈立秀, 女, 检验技师, 主要从事微生物免疫方面的研究。△ 通信作者, E-mail: changyanmin1@126.com。

例(44.26%),女 68 例(55.74%),根据年龄分为少年组(<25 岁)、中年组(25~50 岁)、老年组(>50 岁)。

1.2 仪器与试剂 96 孔酶标反应板(美国 Costar 公司),EXL-800 型酶标分析仪(美国 Biotek 公司),Allegra 64R 型低温高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),垂直电泳槽及转印槽(美国 BioRad 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人 IgG 抗体(美国 SBA 公司),碱性磷酸酶(AP)标记的抗人 IgG 抗体(美国 Jackson 公司),蛋白包被液[0.01 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)],标本稀释液(0.01 mol/L pH7.4 PBS),胎牛血清(Gibco)。

1.3 方法

1.3.1 小麦蛋白提取物的制备 称取 300 mg 小麦,洗净粉碎,将得到的面粉置于 50 mL 离心管后加 15 mL 的 70%乙醇,室温下不断摇动充分混匀 30 min,以 4 000 r/min 速度离心 5 min(0℃),收集上清液加入丙酮提取后,置于-20℃冰箱冻存,备用。

1.3.2 小麦蛋白质组分的分析 将提取的小麦蛋白液分别按 1:4、1:8、1:12、1:16 的比例稀释,每孔上样 15 μL。堆积胶电压 8 V/cm,分离胶电压 15 V/cm,电泳 1.5 h,0.25%考马斯亮蓝染色 3 h 后,充分脱色。用凝胶成像系统对 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图进行分析,依据 Marker 条带对应的相对分子质量测定小麦不耐受蛋白条带的相对分子质量。

1.3.3 酶标反应板的制备 用蛋白包被缓冲液按 1:750 稀释小麦蛋白提取物,包被 96 孔板,每孔 150 μL,室温过夜。次日用标本稀释液洗涤 3 次。每孔加 250 μL 封闭液(含 10%小牛血清),室温过夜。次日洗涤 3 次,密封置 4℃备用。

1.3.4 体检人群血清特异性 IgG 检测 将体检人群的血清按 1:25 稀释,加入已包被好小麦蛋白抗原的微孔板中,每孔加样 100 μL,37℃孵育 1 h,弃反应液,充分洗涤 5 次后拍干。每孔加入 HRP-抗人 IgG 抗体工作液 100 μL,37℃孵育 30 min,弃反应液,洗涤 5 次后拍干。每孔加入底物 A(过氧化氢)、B(四甲基联苯胺,TMB)各 50 μL,37℃孵育 10 min。每孔加 50 μL 终止液终止反应。用 Biotek EXL-800 酶标仪测定各微孔板在 450 nm 处的吸光度值(A450)。

1.3.5 临界值的确定 测定来自天津市南开医院体检 40 例无任何食物不良反应史和过敏史,且近 3 个月身体无过敏及消化系统症状的人群的血清 A450 值,并取平均值。依据文献[4]报道依据 A450 平均值的 3 倍为临界值(cut off)。A450 大于 cut off 值为阳性,A450 大于平均值的 5 倍为强阳性。

1.3.6 小麦蛋白不耐受组分检测 小麦蛋白提取液电泳后,将条带干转到 PVDF 膜上,采用半干转膜仪 15 V 电压 30 min,用 5%脱脂奶封闭过夜。将已筛选出的 9 例阳性血清和 1 例阴性血清按 1:25 稀释,依次加到 PVDF 膜上,4℃孵育过夜。用标本稀释液洗膜 3 次,加入 AP 标记的抗人 IgG 抗体,孵育 1.5 h。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行分析。计数资料以[n(%)]表示,组间比较采用χ²检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小麦蛋白提取液成分分析 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后图谱,见图 1。小麦蛋白提取液主要有 7 条蛋白条带,相对分子质量分别为 50×10³、43×10³、40×10³、34×10³、20×

10³、17×10³、10×10³,其中以相对分子质量(Mr)43×10³ 蛋白质水平较高。

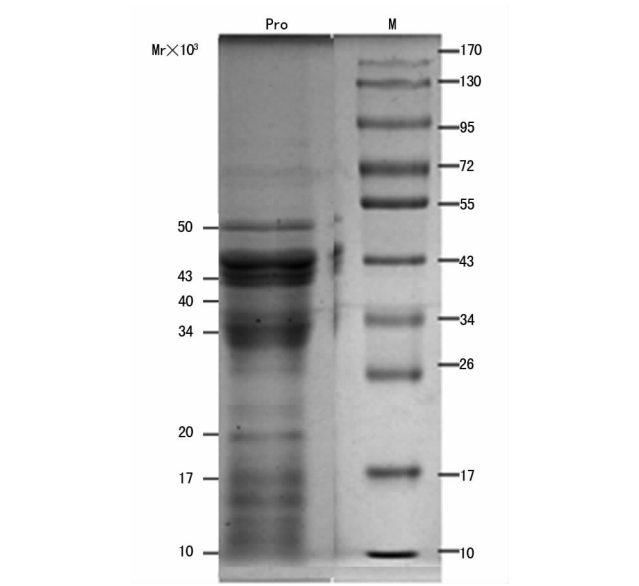


图 1 小麦蛋白提取液 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

2.2 体检人群血清中小麦特异性 IgG 检测 小麦蛋白不耐受特异性 IgG 抗体阳性率为 21.3%。小麦不耐受的发生与性别无相关性,女性小麦蛋白不耐受的阳性率为 23.53%,男性为 18.52%,二者差异无统计学意义(χ²=0.45,P>0.05),见表 1。少年组、中年组、老年组的小麦蛋白不耐受阳性率分别为 26.47%(9/34)、17.24%(5/29)、18.64%(11/60),其中少年组与中年组、老年组的差异均有统计学意义(P<0.05),而老年组和中年组之间差别无统计学意义(P>0.05)。

表 1 小麦蛋白不耐受的性别分布[n(%)]				
性别	阴性	弱阳性	强阳性	合计
男性	44(0.82)	7(0.11)	3(0.07)	54(0.44)
女性	52(0.76)	10(0.15)	6(0.09)	68(0.56)
合计	96(0.79)	16(0.13)	9(0.08)	122(1.00)

2.3 小麦蛋白不耐受组分分析 采用酶免疫印迹法检测 1 例阴性对照和 9 例在 A450 较高的单例血清标本,分析小麦蛋白中的不耐受组分。在 A450 高的 9 例体检人血清,可见反应条带主要有 4 条,分别在 Mr 为 40×10³、34×10³、20×10³、10×10³ 处。而阴性对照未见条带。

3 讨 论

自 1905 年以来食物不耐受的研究一直受到国内外学者关注[5]。随着社会不断发展,人们生活方式的改变,以及食品生产工艺和各种添加剂等发展使食物多样性发生迁移,人类饮食结构发生变化,导致了人群中食物不耐受的阳性率具有了逐年升高的趋势特点。据英国过敏协会统计,人群中对某些食物产生不耐受的阳性率可达 45%,儿童发生率高于成人。Hui 等[6]对中国地区健康人群进行 14 种常见食物不耐受原调查,发现不同食物不耐受的阳性率为 0.4%~49.5%。食物不耐受为一种复杂的变态反应性疾病,机体的免疫系统把进入体内的某种或多种食物当成有害物质,针对这些物质产生食物特异性 IgG 抗体。通过检测机体是否具有这种 IgG 抗体,可以判断机体是否对特定的食物蛋白不耐受,能够为诊断和治疗提供

依据^[7]。

国外对小麦不耐受的研究已有相当长的时间,并取得深入进展。同发达国家相比,我国对其研究和关注还存在一定差距。小麦是我国居民的主要且重要的食物来源,也是较常见的引起人群食物不耐受的食物。目前国内对于食物不耐受的研究方法一种是通过使用检测多种食物不耐受的试剂盒进行检测。而另一种方法是直接用食物某种蛋白包被微孔板,再用 ELISA 检测血清中特异性 IgG 抗体水平,该方法主要用于单一蛋白的研究。本研究采用乙醇丙酮提取法提取小麦蛋白,并用小麦蛋白包被微孔板,用 ELISA 检测天津市南开医院 122 例体检人群的小麦特异性 IgG 抗体水平。研究结果显示小麦不耐受阳性率为 21.30%,表明健康人群中有部分人对小麦有不同程度的不耐受。此结果高于河南地区小麦不耐受阳性率(12.00%)^[8],也高于广州地区的小麦不耐受阳性率(1.20%)^[9]。这表明我国不同地区小麦不耐受阳性率不同,这可能与不同地区饮食习惯和膳食结构有关^[10],也可能是由于分析样本量不足而使结果产生差异。

本文研究小麦不耐受与性别的关系,试验结果用统计学方法分析,小麦不耐受与性别无相关性,其中女性小麦蛋白不耐受阳性率为 23.53%,男性为 18.52%,差异无统计学意义($P>0.05$),与高楠楠等^[11]的研究结果一致,由此可以表明性别不是小麦不耐受的相关因素。在年龄组分析过程中发现,年龄 <25 岁的少年组小麦不耐受阳性率较高,且与中年组和老年组存在一定的差异。

本研究应用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小麦蛋白的组成成分,图 1 显示主要有 7 种蛋白,其 Mr 分别为 50×10^3 、 43×10^3 、 40×10^3 、 34×10^3 、 20×10^3 、 17×10^3 、 10×10^3 ,根据文献^[12]推测,Mr 43×10^3 的蛋白可能为麦谷蛋白。利用 9 例筛选出的 A450 较高的血清,采用酶免疫印迹方法初步鉴定小麦粗提物中的不耐受组分。结果显示,主要有 4 种蛋白组分与小麦不耐受有关,其 Mr 分别为 40×10^3 、 34×10^3 、 20×10^3 、 10×10^3 ,小麦蛋白中主要引起食物不耐受的组分为 Mr 为 40×10^3 的蛋白,即麦谷蛋白。本研究中 9 例血清所针对的小麦抗原组分相似,无异质性。此外,正常血清中几乎不存在小麦 IgG 抗体。

总结本研究得出结论:体检人群中小麦不耐受的人群占较大比例,小麦不耐受与性别无相关性,小麦蛋白抗原组分无异质性。小麦蛋白抗原集中在中低分子区,可通过蛋白纯化保留低分子区蛋白,从而制备小麦不耐受诊断试剂盒。通过检测个体血清中小麦特异性 IgG 抗体,可初步判断该个体是否对小麦不耐受,调整其饮食结构,为预防和治疗因小麦不耐受引起的疾病提供理论依据,从而可改善该个体健康状况,同时也为实

验室和医院提供一种检测方法。

参考文献

- [1] 韩煦,常艳敏.食物不耐受的研究进展[J].医学综述,2012,18(7):1043-1045.
- [2] 庄贤文,罗海玲,许自雯,等.ELISA 法检测 IgG 介导的食物不耐受应用于健康体检者中的作用分析[J].实验与检验医学,2015,33(1):40-42.
- [3] 李正川,曹建彪.食物不耐受的诊治进展[J].北京医学,2015,37(3):266-268.
- [4] 相平,王瑞,周宇捷,等.体检人群血清 IgG 抗体检测不耐受组分分析[J].免疫学杂志,2014,30(4):359-362.
- [5] Fischer R,Mcghee JR,Vu HL,et al.Oral and nasal sensitization promote distinct immune responses and lung reactivity in a mouse model of peanut allergy[J].Am J Pathol,2005,167(6):1621-1630.
- [6] Zhang P,Ma G,Wang C,et al.Effect of irrigation and nitrogen application on grain amino acid composition and protein quality in winter wheat[J].PLoS One,2017,12(6):e0178494.
- [7] Pietschmann N.Food intolerance;immune activation through diet-associated stimuli in chronic disease[J].Altern Ther Health Med,2015,21(4):42-52.
- [8] 刘素玲,候铁英,陈慧敏,等.3 744 例食物不耐受患者 90 项食物不耐受分析[J].国际检验医学杂志,2015,36(11):1552-1556.
- [9] 孙荣,王永红.健康体检者 14 种食物过敏原特异性 IgG 检测及健康管理方案探讨[J].重庆医学,2010,39(15):2029-2030.
- [10] Ma X,Chen Y,Huang F,et al.Food intolerance prevalence in active ulcerative colitis in southwest China[J].Asia Pac J Clin Nutr,2016,25(3):529-533.
- [11] 高楠楠,胡坤,谢燕,等.健康体检者食物不耐受情况分析 & 健康管理方案浅谈[J].中国疗养医学,2011,20(8):684-686.
- [12] Skoczowski A,Obtułowicz K,Czarnobilska E,et al.Antibody reactivity in patients with IgE-mediated wheat allergy to various subunits and fractions of gluten and non-gluten proteins from ω -gliadin-free wheat genotypes[J].Ann Agric Environ Med,2017,24(2):229-236.

(收稿日期:2017-02-04 修回日期:2017-04-04)

(上接第 2826 页)

- [7] 刘建,李友芸,刘琦.慢性肾功能衰竭患者 C 反应蛋白测定的意义[J].临床肾脏病杂志,2004,4(3):115-116.
- [8] 田春娟,程春瑞,熊奕,等.川芎嗪治疗糖尿病肾病的系统评价[J].中国药房,2012,23(19):1794-1795.
- [9] 姚冰,曹春宇.贝前列素钠与前列地尔对老年糖尿病肾病患者肾功能、血脂及血黏度的影响[J].中国老年学杂志,

2015,35(20):5804-5805.

- [10] 朱虹,段晓宇.贝前列素钠对老年糖尿病肾病患者肾功能及凝血功能的影响[J].中国全科医学,2012,15(8B):2693-2694.

(收稿日期:2017-02-01 修回日期:2017-04-01)