无佐剂卵清蛋白致敏 BALB/c 小鼠的肠道菌群变化

孟 潇， 刘成龙， 陈 晨， 谢 强， 付文慧， 薛文通 *

（中国农业大学 食品科学与营养工程学院，北京 100083）

摘要： 研究无佐剂条件下卵清蛋白（ovalbumin，OVA）致敏 BALB/c 小鼠的肠道菌群变化，挖掘与 OVA 过敏关联的特征肠道菌群。构建 OVA 致敏小鼠模型，采用过敏症状评分、血清免疫球蛋白 E（immunoglobulin E，IgE）水平检测及结肠组织形态学观察评估小鼠过敏反应。通过 16S rRNA 扩增子测序法进行肠道菌群分析，包括多样性分析、物种组成分析和功能预测。结果表明，OVA 致敏组过敏症状评分、血清总 IgE、OVA 特异性 IgE 及结肠组织 HE 染色结果均出现显著变化，表明模型构建成功。肠道菌群分析结果显示：致敏组菌科水平的 Pseudomonadaceae 丰度显著上升，Lachnospirales-Lachnospiraceae 与 Desulfovibrionales-Desulfovibrionaceae 丰度显著下降；菌属水平的 *Pseudomonas* 丰度显著上升，Lachnospiraceae NK4A136 group 丰度显著下降，推测 Bacteroidales 可作为 OVA 过敏的特征菌群。

关键词： 食物过敏；卵清蛋白；16S rRNA 测序；肠道菌群

中图分类号：TS 201.3　**文章编号：**1673-1689(2024)03-0014-12　**DOI：**10.12441/spyswjs.20211202001

Exploration of Gut Microbiota Changes in BALB/c Mice Sensitized with Ovalbumin Without Immunologic Adjuvant

MENG Xiao, *LIU Chenglong*, *CHEN Chen*, *XIE Qiang*, *FU Wenhui*, *XUE Wentong**

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: This study aimed to investigate the alterations in the gut microbiota of mice sensitized with ovalbumin (OVA) without immunologic adjuvant treatment, and to explore the characteristic gut microbiota associated with OVA allergy. An OVA-sensitized mouse model was constructed, and the allergic reactions of the mice were evaluated by the allergic symptom score, detection of serum immunoglobulin E (IgE) level, and observation of colon histological morphology. Gut microbiota analysis was performed using 16S rRNA amplicon sequencing, including diversity analysis, species composition analysis, and functional prediction. The results showed that there were significant changes in the allergic symptom score, total serum IgE, OVA-specific IgE, and HE staining results of colon tissue in the OVA-sensitized group, indicating the success of model construction. The gut microbiota analysis revealed a significant increase in the abundance of Pseudomonadaceae at the

收稿日期： 2021-12-02　**修回日期：** 2022-01-04

基金项目： 国家“十三五”重点研发计划项目(2019YFC160500)；国家自然科学基金项目(31872904)。

* **通信作者：** 薛文通(1962—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食物过敏及肠道菌群研究。E-mail：xwt@cau.edu.cn

family level, a significant decrease in the abundance of Lachnospirales-Lachnospiraceae and Desulfovibrionales-Desulfovibrionaceae, and a significant increase in the abundance of *Pseudomonas* at the genus level, together with a significant decrease in the abundance of Lachnospiraceae NK4A136 group in the sensitized group. *Bacteroidales* could be speculated as a characteristic microbiota of OVA allergy.

Keywords: food allergy, ovalbumin, 16S rRNA sequencing, gut microbiota

近年来,食物过敏发病率在全球范围内逐步上升,已成为重要的公共健康问题。鸡蛋是典型的食物致敏原[1],可诱发 IgE 介导的过敏反应,其患病率在儿童中高达 9%[2]。鸡蛋中含 6 种致敏原[3],其中卵清蛋白(ovalbumin,OVA)质量分数最高(约占 54%)且致敏性强,因而研究最广泛[4]。

虽然食物过敏与遗传有关,但由于基因短时间内无法发生显著改变,人们越来越关注食物过敏相关的环境因素,如肠道菌群[5]。许多研究表明,食物过敏与肠道菌群密切相关。Fazlollahi 等探究了生命早期肠道微生物群与鸡蛋过敏之间的关联,发现对鸡蛋过敏的儿童有着独特的肠道微生物群,*Ruminococcus*、*Lactococcus* 和 *Leuconostoc* 的含量显著不同[6];通过菌群移植实验发现,肠道微生物可传递宿主对 OVA 过敏的敏感性或抵抗力,相比于接受正常小鼠菌群移植的个体,接受 OVA 过敏小鼠菌群的个体在 OVA 刺激下表现出更严重的过敏反应[7]。这些研究均表明肠道菌群在食物过敏中的重要性。

目前,在以小鼠为模型进行的食物过敏研究中,多依赖免疫佐剂(immunologic adjuvant)辅助进行致敏[8],佐剂能增强免疫激活作用,有助于食物过敏小鼠模型的成功建立。但是佐剂的使用有可能影响免疫反应的类型,Th2 偏斜佐剂(如霍乱毒素、氢氧化铝或葡萄球菌肠毒素 B)会导致非过敏性蛋白诱导 Th2 反应,可能造成假阳性 IgE 反应,无法确定固有的特定致敏原诱发过敏的可能性[9-10];并且佐剂本身也是一种消化道刺激物,会增大肠道渗透性,引起动物肠道局部的免疫反应,这与人体摄入致敏蛋白后产生的过敏反应有所区别。无佐剂的致敏更接近人类食物过敏的方式,能更真实地反映致敏效果。因此,作者用 BALB/c 小鼠建立无佐剂 OVA 致敏小鼠模型,对过敏症状、血清 IgE 水平及结肠组织形态学进行研究,通过 16S rRNA 测序法,从物种组成、种群数量、菌群结构和功能预测等多个方面分析肠道菌群变化,探究 OVA 食物过敏关联特征肠道微生物及其功能变化,为卵清蛋白过敏与肠道菌群之间的关联研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 健康雌性小鼠 20 只,6 周龄,体质量 17~19 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。全部小鼠饲养于谱尼测试集团股份有限公司 SPF 级实验动物中心,饲养条件为温度(25±2) ℃,湿度(50±5)%,光暗周期 12 h/12 h,独立通气笼饲养,每盒 5 只,所有小鼠自由走动、进食和饮水。动物实验遵循中国实验动物科学协会实验动物福利与伦理委员会的规定(NO. SYXK 2010-0036)。

1.2 实验器材

1.2.1 材料与试剂 卵清蛋白(OVA):上海源叶生物科技有限公司;氯化钠注射液:山东华鲁制药有限公司;无水乙醇:北京化工厂;小鼠免疫球蛋白 E(IgE)ELISA 试剂盒、抗卵白蛋白特异性 IgE(OVA-IgE)ELISA 试剂盒:江苏晶美生物科技有限公司;PBS 缓冲液、细菌基因组 DNA 提取试剂盒:北京索莱宝科技有限公司。

1.2.2 仪器 Multiskan MK3 酶标仪:赛默飞世尔科技(中国)有限公司;AR2140 电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;光学显微镜:北京福凯仪器有限公司;电子恒温水浴锅:林茂科技(北京)有限公司;台式高速离心机(2-16R):上海托莫斯科仪器有限公司;旋涡混合器(MX-S):美国 Scilogex 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 OVA 致敏处理 将 BALB/c 小鼠适应性饲养 5 d 后,随机分成对照组(Crtl)和致敏组(Model),每组10 只。OVA 致敏模型的具体构建方法如下:在第

0、7、14、21 天，致敏组小鼠腹腔注射 200 μL 含 50 μg 的 OVA 的生理盐水。在第 28 天，经口灌胃 200 μL 含 0.5 mg OVA 的生理盐水，即以 10 倍的致敏剂量经口大剂量的激发。对照组每次均注射等量的生理盐水。在口服激发后的 60 min 内，观察小鼠症状并进行过敏症状评分。第 2 天处死小鼠，取血并分离血清、解剖、分离结肠并收集结肠内容物。

1.3.2 小鼠过敏症状评分 根据表 1 对小鼠过敏症状进行评分。

表 1 小鼠过敏症状评分标准

Table 1 Scoring criteria for allergic symptoms in mice

评分	过敏症状
0	无临床症状
1	小鼠反复抓挠嘴巴/鼻子/耳朵
2	活动减少、开始有单独活动；耳朵/眼睛红肿；鼻翼翕动；腹泻
3	静止时间超过 1 min；呼吸速率增加、哮喘、呼吸困难；嘴鼻脱毛、红肿；嘴部/尾部发紫
4	眼球突出；结膜充血；对刺激无反应；颤抖、肌肉抽搐
5	震颤、惊厥、休克、死亡

1.3.3 血清总 IgE、OVA 特异性 IgE 的测定 小鼠血清中总 IgE、OVA 特异性 IgE 的测定均采用 ELISA 试剂盒进行测定，方法为双抗原夹心法。按照试剂盒说明书的步骤进行，具体操作如下：在微孔酶标板中加入 5 倍稀释的小鼠血清，用封板膜封板后于 37 ℃孵育 30 min；洗涤后加入酶标试剂重复孵育和洗涤操作；随后加入显色剂于 37 ℃避光显色 10 min；加入终止液，用酶标仪在 450 nm 测定各孔的 OD 值，以表征小鼠血清中总 IgE 和 OVA 特异性抗体 IgE(OVA-IgE)的水平。

1.3.4 结肠组织苏木精-伊红(HE)染色 剪取一段 1 cm 左右的结肠组织，用 4 g/dL 多聚甲醛固定。经石蜡包埋、切片、展片、烤片后，对病理切片进行 HE 染色，最后用光学显微镜在 100 倍下观察。

1.3.5 肠道内容物 16S 扩增子测序 小鼠处死后在无菌条件下取一定量结肠内容物，加入 1 mL PBS 缓冲液，涡旋混匀。以 1 500 r/min 离心 5 min，取上清液，重复上述操作 2 次。所得上清液采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 的提取：先离心并尽量吸除上清液得到菌体；向菌体中加入溶液 A 和 RNase A，室温放置 30 min 后加入蛋白酶 K，55 ℃消化 60 min，直至菌液呈清亮黏稠状；加入溶液 B 充分混匀，若出现白色沉淀则于 75 ℃放置 15~30 min 直至沉淀消失；加入无水乙醇后全部转移至吸附柱中静置 2 min，离心后弃去废液；再加入漂洗液，离心后弃去废液并重复此操作；离心后将吸附柱敞口置于 50 ℃温箱放置数分钟，去除残余的漂洗液；将吸附柱转移至干净的离心管中，加入预热后的洗脱液，室温放置并离心；所得洗脱液再加入吸附柱中，再次室温放置离心后即为结肠内容物的 DNA。

将所得 DNA 进行测序分析，用 Agilent 5400 检测基因组 DNA 浓度及纯度，琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。检测合格后用 QIIME1 进行分析，微生物扩增子文库为 16s V3-V4，测序平台为 Nova-PE250。

1.3.6 数据处理与分析 采用 GraphPad Prism 9 软件进行独立样本 t 检验和单因素方差分析，实验结果以平均值±标准差表示，$P<0.05$ 表示组间具有显著差异(* 为 $P<0.05$；** 为 $P<0.01$；*** 为 $P<0.001$；**** 为 $P<0.000\ 1$)。

2 结果与分析

2.1 小鼠过敏症状评分结果

机体发生食物过敏后会产生一系列的过敏症状，通过症状评分可直观显示小鼠的致敏状况。由图 1 可看出，与对照组相比，致敏组的小鼠过敏症状更为显著，具体表现为：对照组小鼠状态活跃，毛发顺滑有光泽，无不良反应；而致敏组小鼠则出现反复抓挠鼻子、耳朵等部位，活动减少并开始有单独活动、鼻翼翕动等过敏表现。

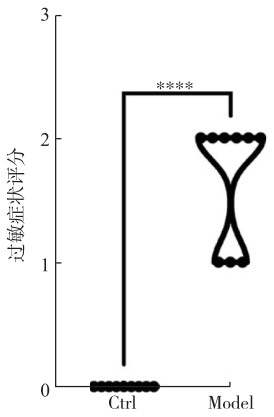
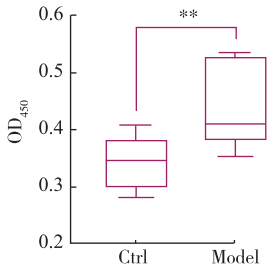


图 1 OVA 致敏小鼠过敏症状评分

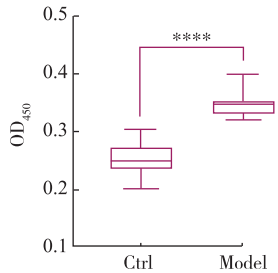
Fig. 1 Anaphylaxis scores in OVA-sensitized mice

2.2　血清中总 IgE 和 OVA–IgE 水平分析

基于食物过敏的发病机制，建立小鼠食物过敏动物模型，首先需要确定小鼠体内是否产生高含量的致敏原特异性 IgE，其产生是评估食物过敏的重要指标[11]。目前诸多研究表明，食物致敏原的反应风险与机体内其特异性 IgE 的水平呈正相关[12–15]。由图 2 可知，与对照组相比，致敏组总 IgE 水平和 OVA 特异性 IgE 水平显著上升，其中，OVA 特异性 IgE 水平变化最显著，表明致敏效果显著。



（a）血清中总IgE水平



（b）血清中OVA–IgE水平

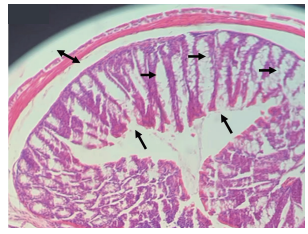
图 2　OVA 致敏小鼠血清 IgE 和 OVA–IgE 水平

Fig. 2　Serum IgE and OVA–IgE levels in OVA–sensitized mice

2.3　结肠组织形态分析

对各组小鼠的结肠组织进行 HE 染色，通过染色结果评价小鼠结肠是否有炎症反应以及炎症反应的强弱，并观察炎症细胞的存在情况，从而判断小鼠的肠黏膜免疫系统受损状况。光学显微镜下观察两组小鼠结肠的病理形态，结果见图 3。对照组的上皮组织完整、结构清晰，上皮细胞排列整齐且腺体完整，无任何组织病变；致敏组的肌层厚度明显变薄，黏膜下层间隙扩大，上皮组织完整性被破坏，黏膜上皮细胞部分脱落至肠腔，出现糜烂现象且腺体结构紊乱，杯状细胞结构受损、排列发生变化。此外，致敏组出现明显的炎症细胞浸润现象，主要为淋巴细胞浸润，部分出现折光性强的鲜红色颗粒，推测可能为嗜酸性粒细胞颗粒。图 4 表明，与对照组相比，致敏组出现明显的炎症反应。

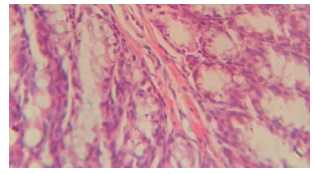

（a）对照组

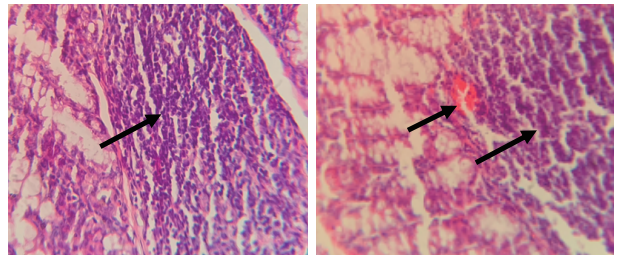

（b）致敏组

双向箭头表示肌层厚度；单向箭头表示致敏组中杯状细胞及黏膜上皮细胞受损。

图 3　两组小鼠 HE 染色结肠组织切片图（×100）

Fig. 3　HE stained colon tissue sections of two groups of mice（×100）


（a）对照组


（b）致敏组

单向箭头表示致敏组中淋巴细胞浸润及折光性强的鲜红色颗粒。

图 4　致敏组中炎症细胞存在情况（×100）

Fig. 4　Presence of inflammatory cells in the sensitized group（×100）

综上，过敏症状评分、血清 IgE 和 OVA–IgE 水平以及结肠组织切片情况均表示 OVA 致敏模型构建成功，致敏组小鼠发生了过敏反应。

2.4 肠道菌群分析

2.4.1 OTU 分析及测序质量评估 以 97%的一致性将序列聚类成为 OTUs (operational taxonomic units),共得到 1 640 个 OTUs,根据聚类得到 OTUs 结果，分析对照组和致敏组之间共有和特有的 OTUs。由图 5 可知,两组共有 904 个 OTUs,对照组特有的 OTUs 数为 464 个，致敏组特有的 OTUs 数为 272 个,初步判断两组在 OTU 构成上存在不同。

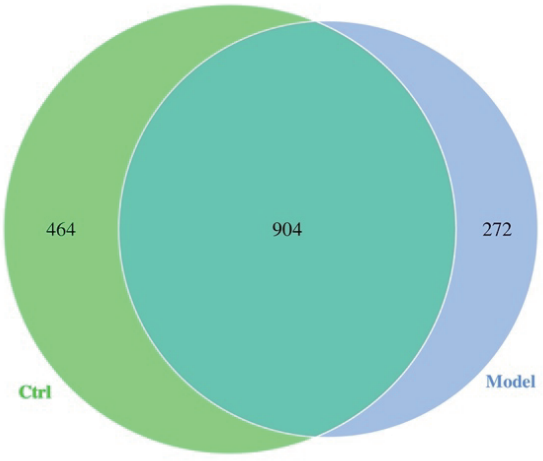


图 5 在不同组中基于 OTU 的韦恩图

Fig. 5 OTU-based Venn diagram in different groups

稀释曲线(rarefaction curve)和物种累积箱形图(species accumulation boxplot)可以反映样本中物种的丰富程度及测序数据量的合理性。由图 6(a)和 6(b) 可以看出，随着抽样量的增加,OTU 数量和新 OTU 出现的速率先增加后趋于平缓。等级聚类曲线(rank abundance) 可直观反映样品中物种的丰富度和均匀度,图 6(c)中两组曲线的平滑程度较好,仅末端有部分曲折,整体趋势平缓,说明物种分布均匀。3 种分析均表明测序数据量合理,测序深度满足实验要求。由稀释曲线和等级聚类曲线可知,与对照组相比,致敏组的物种丰富度和均匀度略有下降。

2.4.2 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性分析可反映各组肠道菌群的丰富度和多样性，用 Observed Spieces、Chao1、ACE、Shannon、Goods Coverage、Simpson 等指数表示,指数越大,表明样品复杂度越高,菌群多样性越丰富。由图 7 可知,两组 Alpha 相关指数均无显著性差异,这与 Song 等的研究结果一致[16],表明 OVA 致敏虽然造成肠道菌群的丰富度和均匀度略有下降,但并未对种群数量产生显著影响。

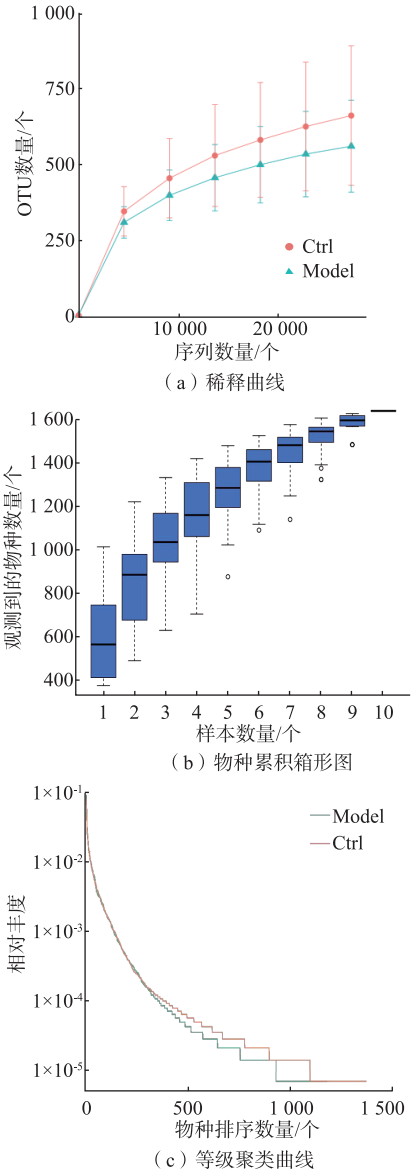


图 6 肠道菌群测序质量评估结果

Fig. 6 Quality assessment results of gut microbiota sequencing

2.4.3 组间差异性分析

1)Beta 多样性分析 Beta 多样性分析是对样本间的微生物群落构成进行比较分析,包括主坐标分析(principal coordinate analysis,PCoA)、主成分分析(principal component analysis,PCA)和无度量多维标定分析 (nonmetric multidimensional scaling, NMDS)。在 3 种分析图中,点与点的距离远近均与样本间的菌群构成差异程度成正相关。由图 8 可以看出,对照组和致敏组各自构成的聚类圈存在一定距离且分离明显,表示两组菌群构成存在差异。

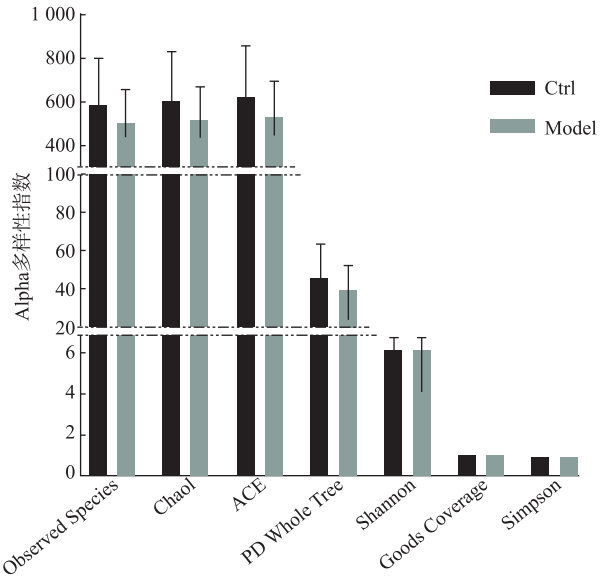


图 7　各组小鼠肠道菌群的 Alpha 多样性指数

Fig. 7　Alpha diversity index of gut microbiota in each group of mice

2)组间菌群结构差异显著性检验　用 4 种方法(Anosim 检验、MRPP 检验、Adonis 检验和 Amova 检验)进行组间差异显著性检验,其结果均表示对照组和致敏组的组间差异显著性大于其各自的组内差异,见表 2。结合 Beta 多样性分析结果可知,OVA 致敏显著影响了小鼠肠道菌群组成。

2.4.4　*物种组成分析*　根据 OTU 物种注释结果,进一步比较和分析对照组和致敏组在门、科和属分类水平上的差异。

门分类水平上,小鼠肠道内容物中的优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidota),分别占对照组和致敏组总菌门的 72.03% 和 87.61%,见图 9。进一步分析不同菌门相对丰度差异发现,相比于对照组,致敏组的拟杆菌门(Bacteroidota)丰度增加,由 40.48%升至 66.00%;而厚壁菌门(Firmicutes)的丰度显著下降,由 31.55% 降至 21.60%;拟杆菌门/厚壁菌门(Bacteroidota/Firmicutes)比值略有上升,但并未产生显著性变化(P=0.06)。此外,其他丰度在前 10 名的菌门丰度没有发生显著性变化,这与 Liu 等的研究结果一致,即 OVA 致敏会导致拟杆菌门(Bacteroidota)增加而厚壁菌门(Firmicutes)减少[17]。目前研究表明,肠道菌群中二者的丰度水平与过敏性疾病有关,在相关患者的肠道中发现拟杆菌门(Bacteroidota)增加和厚壁菌门(Firmicutes)减少的现象[18-19]。

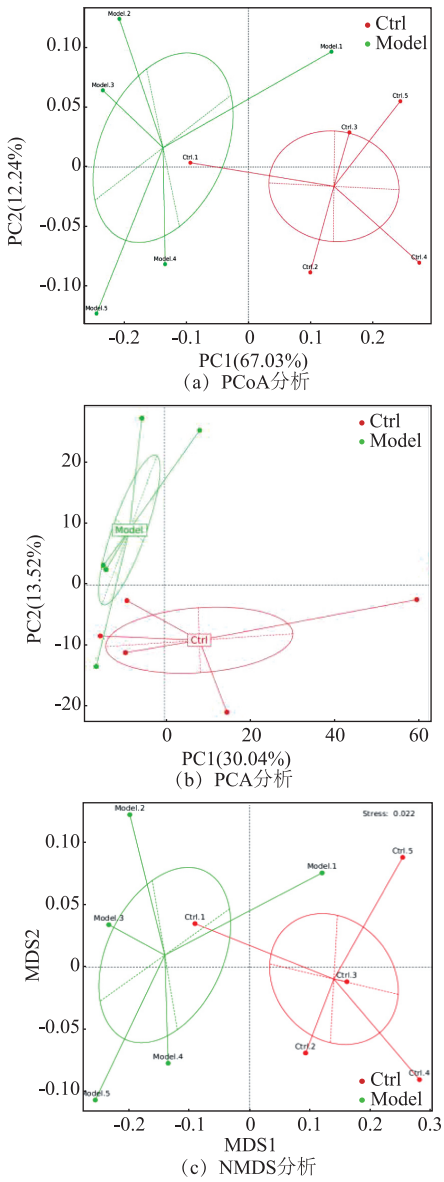


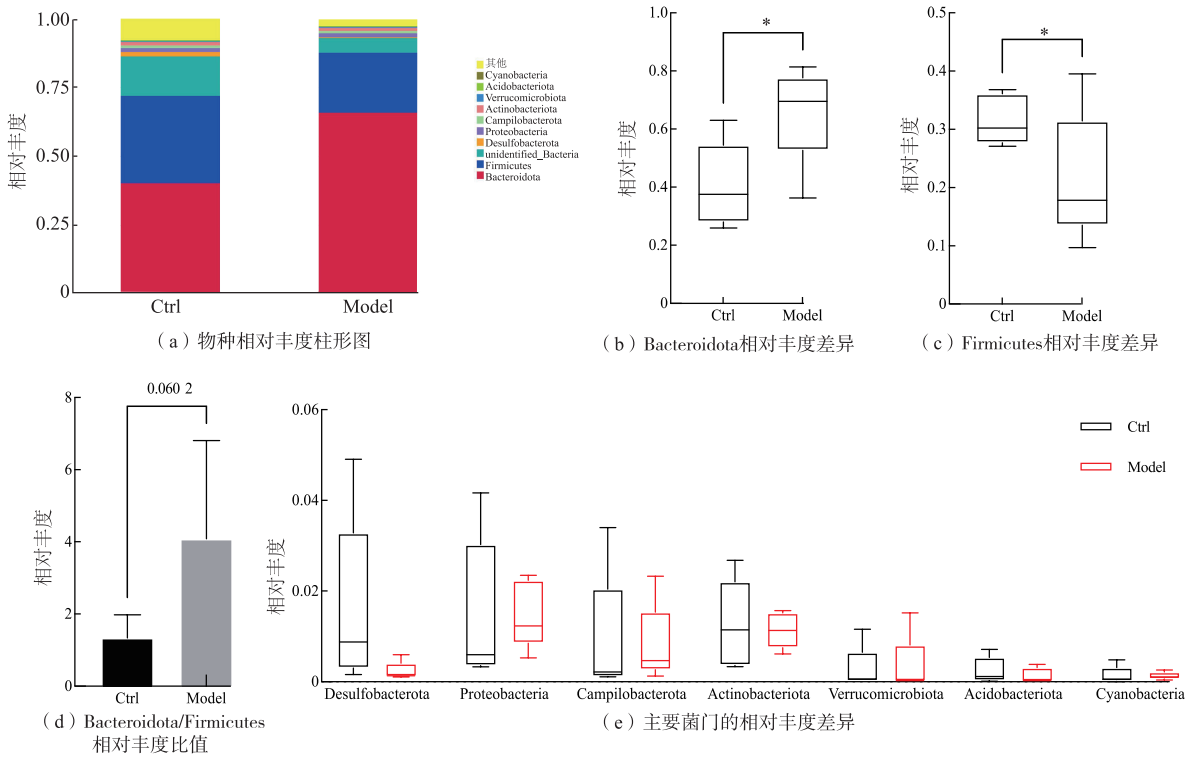
图 8　各组小鼠肠道菌群的 Beta 多样性分析结果

Fig. 8　Beta diversity analysis results of gut microbiota in each group of mice

表 2　组间菌群结构差异显著性检验结果

Table 2　Significant test results of bacterial community structure differences among groups

分析方法	分析数值	P 值
Anosim	0.55	0.02
MRPP	0.07	0.02
Adonis	4.54	0.03
Amova	4.53	0.03



（a）物种相对丰度柱形图　（b）Bacteroidota相对丰度差异　（c）Firmicutes相对丰度差异

（d）Bacteroidota/Firmicutes 相对丰度比值　（e）主要菌门的相对丰度差异

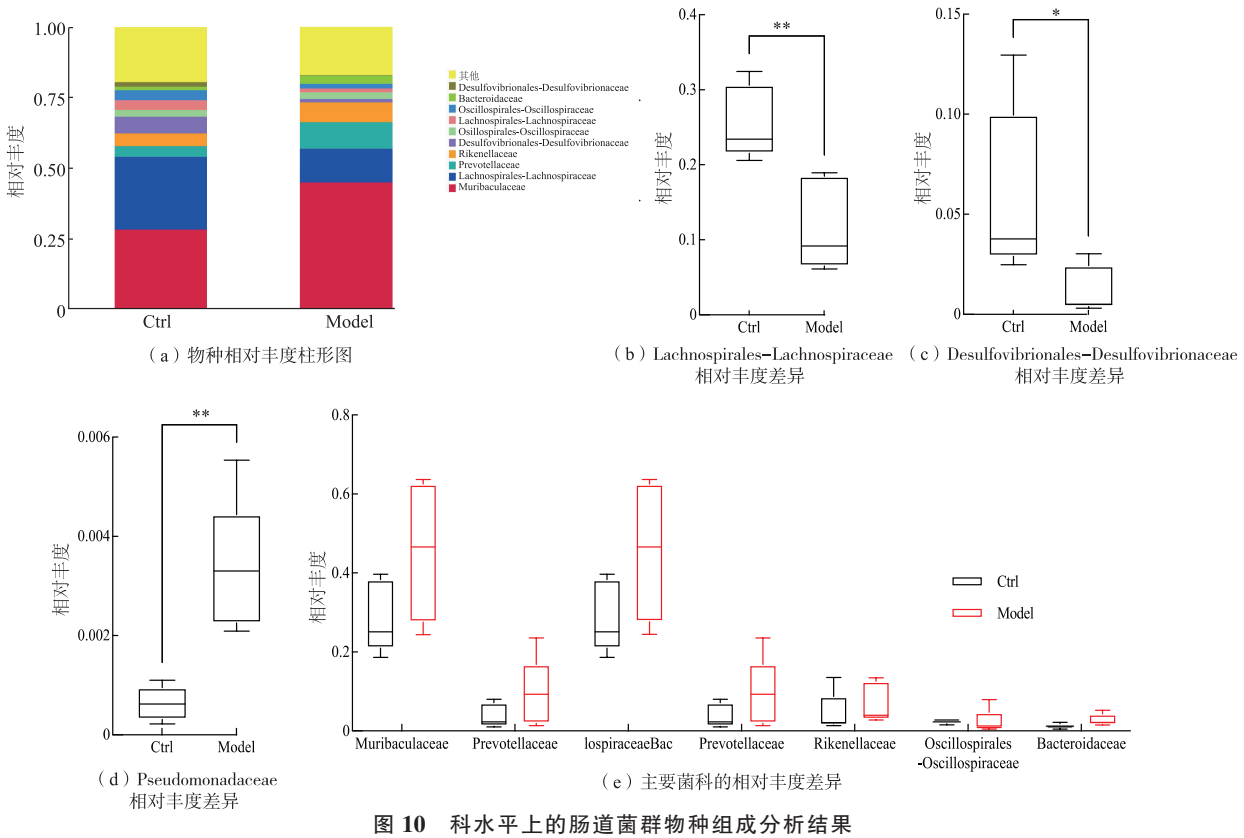
图 9　门水平上的肠道菌群物种组成分析结果

Fig. 9　Analysis results of gut microbiota species composition at the phylum level

如图 10(a)所示，在科水平上 Muribaculaceae 的相对丰度最高，其次为 Lachnospirales–Lachnospiraceae，二者占小鼠总菌科的 55%左右。两组相对丰度比较中表现出显著性差异的共有 3 种菌科，见图 10（b）~(e)。其中，Lachnospirales–Lachnospiraceae 和 Desulfovibrionales–Desulfovibrionaceae 在致敏组中相对丰度显著下降，而 Pseudomonadaceae 在致敏组中表现为显著上升，且 Lachnospirales–Lachnospiraceae 和 Pseudomonadaceae 变化最为显著（P<0.01）。其中，毛螺菌科(Lachnospiraceae)能将多糖降解为短链脂肪酸[20]，为肠上皮细胞提供能量[21]并影响细胞因子的产生，进而调节免疫系统，在炎症反应中发挥作用[22]，致敏组中 Lachnospiraceae 水平的显著减少说明 OVA 致敏可能通过影响 Lachnospiraceae 相对丰度从而影响免疫系统的功能，进而诱发食物过敏反应。

如图 11(a)所示，在属水平上 Lachnospiraceae NK4A136 group 和 *Alloprevotella* 为优势菌属，占小鼠总菌属的 15%左右。图 11（b）~(d) 显示，Lachnospiraceae NK4A136 group 在致敏组小鼠中相对丰度水平显著下降，而 *Pseudomonas* 相对丰度显著上升且变化最显著（P<0.01），其余菌属均未发生显著变化。假单胞菌属(*Pseudomonas*)是一种常见的条件性致病菌，研究显示 *Pseudomonas* 可能在致癌中发挥作用[23]，该菌属在致敏组中显著升高，说明该菌属可能参与了过敏反应。毛螺菌科 NK4A136 组(Lachnospiraceae NK4A136 group）属于厚壁菌门，是一种有益菌，能够产生丁酸，并且是肠道屏障保护因子，对肠道黏膜损伤有一定的修复作用[24]，在肠道相关病变中表现为含量下降。王亚楠等研究发现 Lachnospiraceae NK4A136 group 在结肠炎小鼠肠道内水平显著降低[25]，致敏组中其水平的显著降低提示 OVA 可能通过降低 Lachnospiraceae NK4A136 group 的丰度影响肠道屏障功能，进而产生食物过敏。

2.4.5　LEfSe 分析　为进一步分析 OVA 致敏小鼠肠道菌群的差异性，寻找具有统计学差异的特征菌群，采用 LEfSe(LDA effect size)进行分析，见图 12。图 12 展示了从门至科水平的 LDA 值大于 4，即两组中丰度差异显著的物种，对照组和致敏组分别有 9 个和 3 个 OTU 存在显著性差异。进化分枝图中不同颜色的节点表示在其组别中起到重要作用的微

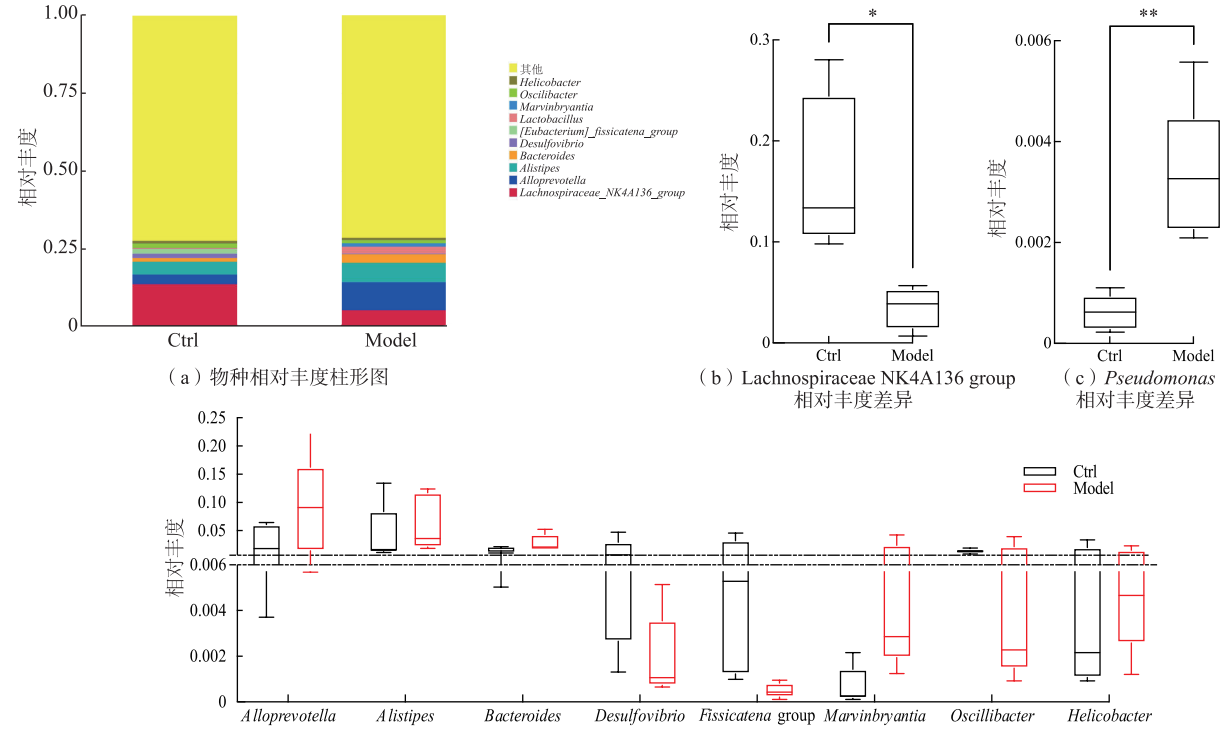


（a）物种相对丰度柱形图　（b）Lachnospirales–Lachnospiraceae 相对丰度差异　（c）Desulfovibrionales–Desulfovibrionaceae 相对丰度差异

（d）Pseudomonadaceae 相对丰度差异　（e）主要菌科的相对丰度差异

图 10　科水平上的肠道菌群物种组成分析结果

Fig. 10　Analysis results of gut microbiota species composition at the family level

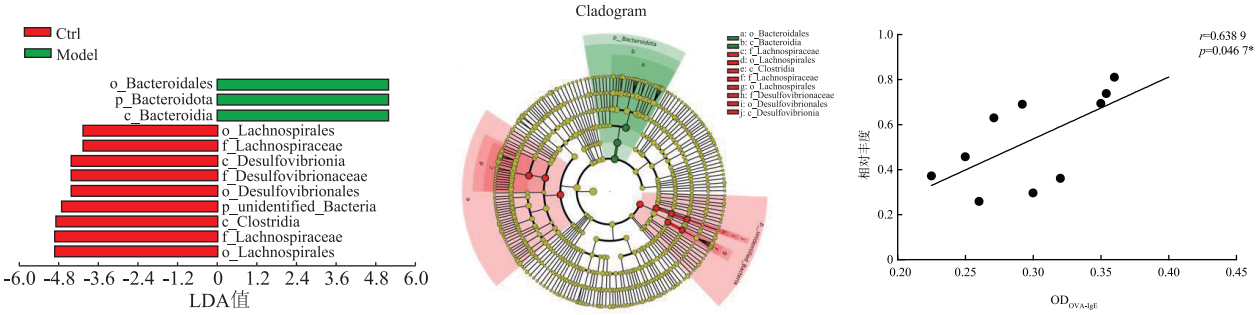


（a）物种相对丰度柱形图　（b）Lachnospiraceae NK4A136 group 相对丰度差异　（c）*Pseudomonas* 相对丰度差异

（d）主要菌属的相对丰度差异

图 11　属水平上的肠道菌群物种组成分析结果

Fig. 11　Analysis results of gut microbiota species composition at the genus level



（a）LDA值分布　（b）进化分支图　（c）相关性分析

图 12　LEfSe 分析及相关性分析结果

Fig. 12　LEfSe analysis and correlation analysis results

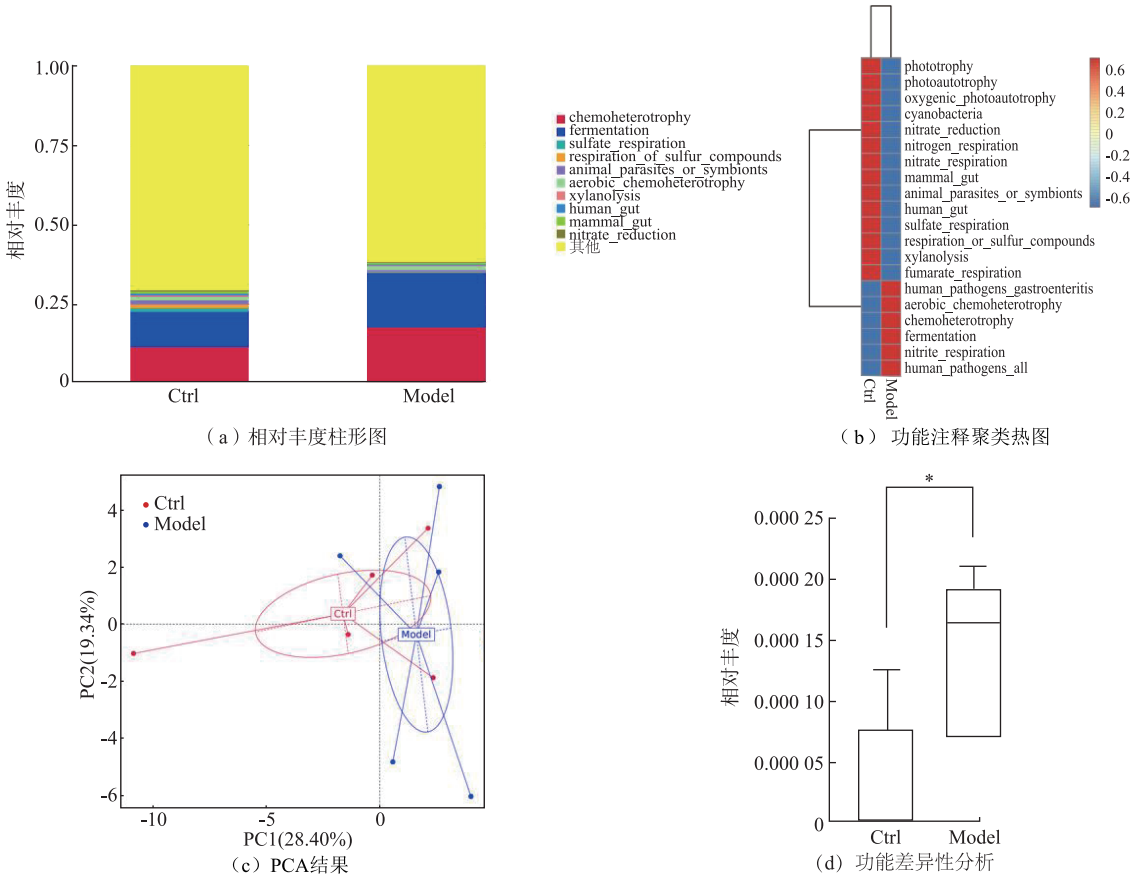
生物类群。在对照组中，起重要作用的是 Lachnospirales、Desulfovibrionales，在致敏组中起重要作用的是 Bacteroidales，这与 Li 等的研究结果类似[14]。将 Bacteroidales 的相对丰度变化与 OVA-IgE 指标进行相关性分析，结果表明二者具有相关性（P<0.05），且相关性系数为 0.638 9，表明二者存在较强的正相关关系，推测 Bacteroidales 可作为 OVA 过敏的特征菌群。

2.4.6　功能预测　进一步利用 Tax4Fun 对不同组的小鼠肠道菌群进行功能注释，探究其在功能上的改变。由图 13(a)可知，两组菌群的主要功能为化能异养（chemoheterotrophy）和发酵（fermentation）。功能注释聚类热图见图 13(b)，显示对照组和致敏组的功能存在不同，对照组中光养（phototrophy）、光能自养（photoautotrophy）、需氧光能自养（oxygenic photoautotrophy）等功能相对丰度较高，而致敏组中有氧化能异养（aerobic chemoheterotrophy）、化能异养（chemoheterotrophy）、发酵（fermentation）等相对丰度较高。从图 13(c)的 PCA 结果可以看出，对照组和致敏组的聚类圈存在分离现象，但分离不明显，部分重叠，表示二者在菌群功能上存在一定的差距。对功能注释结果进行差异性分析发现，暗氢氧化（dark hydrogen oxidation）在两组间存在显著差异，在致敏组中显著升高，见图 13(d)。氢分子具有抗氧化作用，气体形式或溶解在水中的氢气可以抑制氧化应激引起的组织损伤[26-27]。有研究者探究了氢气对肠道微生物群的调节作用[28-30]，但对食物过敏肠道菌群的研究较少。动物实验发现，富氢水可以缓解葡聚糖硫酸钠（dextran sulphate sodium，DSS）诱导的慢性溃疡性结肠炎小鼠的炎症、氧化应激和肠道菌群失调[31-33]，因此推测致敏组中暗氢氧化功能的增强可能是由于氢气含量降低对肠道菌群产生了影响[34-35]。

3　结　语

使用无佐剂的 OVA 致敏 BALB/c 小鼠，发现小鼠表观症状、血清 IgE 水平及结肠组织形态上出现明显的过敏变化。进一步对肠道菌群进行分析，发现虽然菌群物种丰富度和均匀度没有明显变化，但其结构发生显著改变，门水平上 Bacteroidota 丰度显著上升而 Firmicutes 丰度显著下降；科水平上 Pseudomonadaceae 丰度显著上升，Lachnospirales-Lachnospiraceae 和 Desulfovibrionales-Desulfovibrionaceae 丰度显著下降；属水平上 *Pseudomonas* 丰度显著上升，而 Lachnospiraceae NK4A136 group 丰度显著下降。其中，Lachnospiraceae NK4A136 group 属于 Lachnospiraceae，推测 Lachnospiraceae 的显著下降主要是由其属水平上的 Lachnospiraceae NK4A136 group 显著下降引起的，Lachnospiraceae NK4A136 group 作为一种有益菌，在肠道屏障保护功能上发挥着重要作用，且其水平的显著下降说明该菌对食物过敏反应具有一定的抑制作用，推测该菌可能成为未来益生菌治疗食物过敏的新方向。

应用 LEfSe 软件分析并推测 OVA 过敏的特征菌群，数据显示 Bacteroidales 可作为 OVA 过敏的标志菌群，即 OVA 过敏前后最显著的差异是 Bacteroidales 水平的上升，这为临床中通过肠道菌群测定来判断 OVA 过敏的发生提供依据。此外，利用 Tax4Fun 进行肠道微生物功能预测，发现 OVA 过敏的菌群功能存在一定变化，特别是暗氢氧化功



（a）相对丰度柱形图　（b） 功能注释聚类热图

（c）PCA结果　（d）功能差异性分析

图 13　肠道菌群功能预测结果

Fig. 13　Prediction results of gut microbiota function

能,但此功能与食物过敏的关联尚不明确,还需进一步研究。

目前关于 OVA 致敏小鼠的研究，大多都以其作为模式致敏模型，以各类干预物质作为研究对象,通过不同方式的干预,探究各类干预物质对食物过敏的影响及相应变化,但针对模型自身的菌群变化探讨不多,所选动物品种也各有不同,并且模型的构造通常伴有佐剂的辅助致敏。作者深入探索 OVA 致敏 BALB/c 小鼠造成的菌群变化，排除了佐剂使用带来的影响,并挖掘其特征肠道菌群,为此致敏模型及基于此致敏模型进行的研究提供更多依据。

参考文献:

[1] WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants:fifty-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives[M]. Geneva:World Health Organization,2000.

[2] TAN J W L,VALERIO C,BARNES E H,et al. A randomized trial of egg introduction from 4 months of age in infants at risk for egg allergy[J]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**,2017,139(5):1621-1628.

[3] 宁亚维,杨正,马梦戈,等. 食品中常见过敏原及检测技术研究进展[J]. 食品科学,2021,42(15):319-328.
NING Y W,YANG Z,MA M G,et al. Progress in common food allergens and technologies for their detection[J]. **Food Science**,2021,42(15):319-328. (in Chinese)

[4] DONA D W,SUPHIOGLU C. Egg allergy:diagnosis and immunotherapy[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2020,21(14):5010.

[5] 傅玲琳,王彦波. 食物过敏:从致敏机理到控制策略[J]. 食品科学,2021,42(19):1-19.
FU L L, WANG Y B. Food allergy: from sensitization mechanism to control strategy[J]. **Food Science**, 2021, 42(19): 1-19. (in Chinese)

[6] FAZLOLLAHI M, CHUN Y, GRISHIN A, et al. Early-life gut microbiome and egg allergy[J]. **Allergy**, 2018, 73(7): 1515-1524.

[7] 郑爽,赵新凤,曾本华,等. 肠道菌群影响无菌小鼠对卵清蛋白的敏感性[J]. 第三军医大学学报,2016,38(16):1831-1836.
ZHENG S, ZHAO X F, ZENG B H, et al. Influence of intestinal microbiota on sensitivity in germ-free mice to ovalbumin[J]. **Journal of Third Military Medical University**, 2016, 38(16): 1831-1836. (in Chinese)

[8] 王峥,李秀敏,苗晋鑫. 食物过敏小鼠模型研究进展[J]. 中国实验动物学报,2020,28(4):570-577.
WANG Z, LI X M, MIAO J X. Advances in murine models for food allergies[J]. **Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica**, 2020, 28(4): 570-577. (in Chinese)

[9] 王泽茜,汪小毅,曹明卓等. 花生过敏动物模型研究的应用特点分析[J]. 中药药理与临床, 2023, 39 (8): 93-96.
WANG Z Q, WANG X Y, CAO M Z, et al. Analysis of application characteristics of peanut allergy animal model research[J]. **Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica**, 2023, 39(8): 93-96. (in Chinese)

[10] GONIPETA B, KIM E, GANGUR V. Mouse models of food allergy: how well do they simulate the human disorder?[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015, 55(3): 437-452.

[11] 傅玲琳,谢梦华,王翀,等. 对虾原肌球蛋白不同致敏途径对 BALB/c 小鼠致敏性的影响[J]. 食品科学,2018,39(13):166-175.
FU L L, XIE M H, WANG C, et al. Allergenicity of shrimp tropomyosin from different sensitization approaches on BALB/c mice [J]. **Food Science**, 2018, 39(13): 166-175. (in Chinese)

[12] CHEN C, LU L H, SUN N N, et al. Development of a BALB/c mouse model for food allergy: comparison of allergy-related responses to peanut agglutinin, β-lactoglobulin and potato acid phosphatase[J]. **Toxicology Research**, 2017, 6(2): 251-261.

[13] TAN J, MCKENZIE C, VUILLERMIN P J, et al. Dietary fiber and bacterial SCFA enhance oral tolerance and protect against food allergy through diverse cellular pathways[J]. **Cell Reports**, 2016, 15(12): 2809-2824.

[14] LI N, YU Y, CHEN X H, et al. *Bifidobacterium breve* M-16V alters the gut microbiota to alleviate OVA-induced food allergy through IL-33/ST2 signal pathway[J]. **Journal of Cellular Physiology**, 2020, 235(12): 9464-9473.

[15] TSUDA M, ARAKAWA H, ISHII N, et al. Dietary fructo-oligosaccharides attenuate early activation of $CD4^+$ T cells which produce both Th1 and Th2 cytokines in the intestinal lymphoid tissues of a murine food allergy model[J]. **International Archives of Allergy and Immunology**, 2017, 174(3/4): 121-132.

[16] SONG J J, LI Y, LI J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* 2016SWU. 05. 0601 regulates immune balance in ovalbumin-sensitized mice by modulating expression of the immune-related transcription factors and gut microbiota[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2020, 100(13): 4930-4939.

[17] LIU Q M, ZHANG Y F, SHU Z D, et al. Sulfated oligosaccharide of *Gracilaria lemaneiformis* protect against food allergic response in mice by up-regulating immunosuppression[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2020, 230: 115567.

[18] BAMOLA V D, GHOSH A, KAPARDAR R K, et al. Gut microbial diversity in health and disease: experience of healthy Indian subjects, and colon carcinoma and inflammatory bowel disease patients[J]. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 2017, 28 (1): 1322447.

[19] LOO E X L, CHEW L J M, ZULKIFLI A B, et al. Comparison of microbiota and allergen profile in house dust from homes of allergic and non-allergic subjects- results from the GUSTO study[J]. **World Allergy Organization Journal**, 2018, 11: 37.

[20] DRENNAN D M, ALMSTRAND R, LEE I, et al. Organoheterotrophic bacterial abundance associates with zinc removal in lignocellulose-based sulfate-reducing systems[J]. **Environmental Science & Technology**, 2016, 50(1): 378-387.

[21] CORREA-OLIVEIRA R, FACHI J L, VIEIRA A, et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids[J]. **Clinical & Translational Immunology**, 2016, 5(4): e73.

[22] MORRISON D J, PRESTON T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [J]. **Gut Microbes**, 2016, 7(3): 189-200.

[23] BORCHMANN S. An atlas of the tissue and blood metagenome in cancer reveals novel links between bacteria，viruses and cancer [J]. **Microbiome**，2021，9(1)：94.

[24] HU S W，YANG H C，GAO X，et al. Egg oil from *Portunus trituberculatus* alleviated obesity and regulated gut microbiota in mice [J]. **Scientific Reports**，2020，10：8454.

[25] 王亚楠. 益生元、益生菌对小鼠结肠炎的影响及抑制炎症癌变相关机制研究[D]. 北京：北京协和医学院，2018.

[26] OHSAWA I，ISHIKAWA M，TAKAHASHI K，et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. **Nature Medicine**，2007，13：688-694.

[27] HAYASHIDA K，SANO M，OHSAWA I，et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**，2008，373(1)：30-35.

[28] LIAN N Q，SHEN M X，ZHANG K，et al. Drinking hydrogen-rich water alleviates chemotherapy-induced neuropathic pain through the regulation of gut microbiota[J]. **Journal of Pain Research**，2021，14：681-691.

[29] LIN Y T，SHI Q Q，ZHANG L，et al. Hydrogen-rich water ameliorates neuropathological impairments in a mouse model of Alzheimer's disease through reducing neuroinflammation and modulating intestinal microbiota [J]. **Neural Regeneration Research**，2022，17(2)：409-417.

[30] JIN Z K，SUN Y，YANG T，et al. Nanocapsule-mediated sustained H2 release in the gut ameliorates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease[J]. **Biomaterials**，2021，276：121030.

[31] SONG L H，ZHANG Y，ZHU C，et al. Hydrogen-rich water partially alleviate inflammation，oxidative stress and intestinal flora dysbiosis in DSS-induced chronic ulcerative colitis mice[J]. **Advances in Medical Sciences**，2022，67(1)：29-38.

[32] 杨晰茗，徐红艳，刘巳齐，等. 食用菌多糖调节炎症性肠病研究进展[J]. 食品与机械，2021，37(9)：211-217.
YANG X M，XU H Y，LIU S Q，et al. Recent progress on regulation of inflammatory bowel disease by polysaccharides from edible fungi[J]. **Food and Machinery**，2021，37(9)：211-217.(in Chinese)

[33] 杨景，罗绪刚，任发政. 长双歧杆菌 BBMN68 诱导的树突状细胞对小鼠牛乳 β- 乳球蛋白过敏的缓解作用[J]. 现代食品科技，2016，32(7)：6-11.
YANG J，LUO X G，REN F Z. Reduction of bovine β-lactoglobulin allergenicity via *Bifidobacterium longum* BBMN68 modulated-dendritic cells in mice[J]. **Modern Food Science and Technology**，2016，32(7)：6-11.(in Chinese)

[34] 张宁，李东尧，张秋香，等. 柠檬酸钠对小鼠生理及肠道菌群的影响[J]. 食品与机械，2016，32(5)：24-29.
ZHANG N，LI D Y，ZHANG Q X，et al. Effect of sodium citrate on physiological properties and composition of intestinal microbiota of mice[J]. **Food & Machinery**，2016，32(5)：24-29.(in Chinese)

[35] 孔钰婷，何洪，安凤平，等. 太子参醇提物的肠道益生及增强抗氧化作用[J]. 现代食品科技，2021，37(5)：9-16.
KONG Y T，HE H，AN F P，et al. Intestinal probiotic function and antioxidant capacity-enhancing effect of an ethanolic extract of *Radix pseudostellariae*[J]. **Modern Food Science and Technology**，2021，37(5)：9-16.(in Chinese)