

doi:10.12301/spxb202200320

文章编号:2095-6002(2023)02-0057-13

引用格式:田岭含,张倩倩,丛艳君,等.具有T细胞口服免疫耐受作用的 β -乳球蛋白水解物的制备及鉴定[J].食品科学技术学报,2023,41(2):57-69.



TIAN Linghan, ZHANG Qianqian, CONG Yanjun, et al. Preparation and identification of β -lactoglobulin hydrolysates with T-cell oral immunotolerance[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(2):57-69.

具有 T 细胞口服免疫耐受作用的 β -乳球蛋白水解物的制备及鉴定

田岭含¹, 张倩倩¹, 丛艳君^{1,*}, 闫文杰²

(1.北京工商大学食品与健康学院/北京市食品营养与人类健康高精尖创新中心/
北京市食品添加剂工程技术研究中心,北京 100048;
2.北京联合大学生物化学工程学院,北京 100023)

摘要:以牛乳中主要过敏原 β -乳球蛋白为研究对象,制备和鉴定具有T细胞表位和口服免疫耐受性的水解物,旨在为牛乳过敏患者口服免疫治疗方法提供理论依据。采用生物信息学方法预测 β -乳球蛋白的T细胞表位,通过质谱分析6种蛋白酶水解 β -乳球蛋白水解物的氨基酸序列,用T细胞增殖实验鉴定水解物中多肽免疫耐受作用,体内实验测定小鼠血清特异性抗体(IgE、IgG₁、IgG_{2a})、Th1细胞因子(IFN- γ 、IL-17)、Th2细胞因子(IL-4、IL-5、IL-13)、组胺、几丁质酶-3样蛋白1的水平及小鼠脾脏细胞亚群的变化水平,验证 β -乳球蛋白水解物的口服免疫治疗活性。研究结果表明:胰蛋白酶、复合蛋白酶和木瓜蛋白酶水解物具有口服耐受性,其中复合蛋白酶和木瓜蛋白酶水解物具有口服耐受性是创新性发现。中性蛋白酶水解物虽然含有T细胞表位,但是仍然具有致敏性。因此含有T细胞表位的水解物不一定具有口服免疫耐受性,需要体内实验验证。研究结论以期作为新型抗过敏乳基料的开发和临床治疗牛乳过敏提供参考数据。

关键词:牛乳过敏; β -乳球蛋白; 多肽; 口服耐受; T细胞表位

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

食物过敏严重危害人群的健康,探究有效的防治食物过敏的方法一直是过敏性疾病研究的热点,目前主要有避免疗法、食品加工处理法和特异性免疫疗法等^[1]。避免疗法是指避免摄入含有食物过敏原的食物;食品加工处理法是采用某些加工方法,如热处理、辐照或糖基化,使食物过敏原的结构发生变化或失去活性,但这些方法不能完全消除其致敏性;特异性免疫疗法依据给药途径,分为皮下免疫治

疗(subcutaneous immunotherapy, SCIT)、口服免疫治疗(oral immunotherapy, OIT)、舌下免疫治疗(sublingual immunotherapy, SLIT),其中在食物过敏中OIT方面的研究较多^[2]。特异性免疫疗法的治疗原理都是通过诱导机体相关淋巴组织,刺激调节性T细胞(Treg)增殖,抑制免疫应答,增强机体对过敏原产生免疫耐受^[3]。据有关牛奶OIT方面的研究,其脱敏效果达到37%~57%^[4-6]。而口服耐受性是

收稿日期:2022-03-20

基金项目:国家重点研发计划项目子课题(2019YFC1605002);国家自然科学基金资助项目(31872886)。

Foundation: State Key Development Program of China (2019YFC1605002); National Natural Science Foundation of China (31872886)。

第一作者:田岭含,女,硕士研究生,研究方向为食物过敏原结构和功能。

*通信作者:丛艳君,女,教授,博士,主要从事食物过敏原结构和功能方面的研究。

一个抗原依赖过程,因此食用过敏原是不可避免的。食用完整食物过敏原蛋白的 OIT 在控制花生和牛奶等主要食物过敏方面取得了重要进展^[7-8]。然而这种治疗也可能导致过敏者产生严重的过敏反应,而不是耐受性^[2]。因为完整的过敏原同时含有 T 细胞表位和 B 细胞表位,后者被认为是 OIT 副作用的致病因素^[9]。为了避免发生潜在的过敏症状,可以食用含有 T 细胞表位的过敏原或其特定序列衍生肽,当肠道中的抗原呈递细胞接受时,这些表位可能会涉及耐受性的发生^[10]。

β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -LG)是牛乳中的主要过敏原,约占乳清蛋白质量的 50%,占牛乳总蛋白的 10%,并且约有 82% 的牛乳过敏患者对 β -LG 过敏^[11]。绝大多数牛乳过敏反应属于 IgE 介导的 I 型超敏反应,人体会在摄入牛乳后出现速发型(1 h 内)或迟发型(1 h 后)过敏症状。发生这种过敏反应的患者通常会出现一系列临床症状:大部分患者至少有 2 种器官系统会出现过敏症状,约 50% ~ 70% 患者出现皮肤过敏症状,50% ~ 60% 患者出现胃肠道过敏症状以及 20% ~ 30% 患者出现呼吸道过敏症状^[12]。关于 β -LG 的 B 细胞表位研究报道较多,而 β -LG 的 T 细胞表位改善过敏患者口服免疫耐受的机制有待研究。因此制备和鉴定具有 T 细胞表位和口服免疫耐受作用的 β -LG 水解物对于保障牛乳过敏人群的安全饮食具有重要意义。

本研究以牛乳主要过敏原 β -LG 为研究对象,通过生物信息学预测 β -LG 的 T 细胞表位,并通过质谱鉴定 β -LG 水解物多肽氨基酸序列。体外 T 细胞增殖实验和体内口服耐受性实验筛选能释放 β -LG T 细胞表位的蛋白酶,制备富含 T 细胞表位和口服免疫治疗作用的 β -LG 水解物。研究旨在揭示 β -LG 的 T 细胞表位增强口服免疫耐受性的作用机制,以期新型抗过敏乳基料的开发和临床治疗牛乳过敏提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

β -LG、霍乱毒素,美国 Sigma 公司;L-亮氨酸、邻苯二甲醛,上海源叶生物技术公司;N-乙酰半胱氨酸,北京 Biotopped 公司;乙醇,美国 Mreda 公司;碱性蛋白酶(alcalase)、复合蛋白酶(protamex)、中性

蛋白酶(neutrase)、木瓜蛋白酶(papain)、胰蛋白酶(trypsin),丹麦诺维信公司;蛋白酶(protease M),日本天野公司;60 只 3 ~ 4 周龄 SPF 级雌性 BALBc 小鼠,北京维通利华公司;IL-4、IL-5、IL-13、IL-17、IFN- γ 、组胺、几丁质酶-3 样 1 (CHI-3L1) ELISA 试剂盒,英国 Abcam 公司;MTT Assay 试剂盒,北京百奥莱博科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LAMBDA 750 型紫外分光光度计,日本 Hitachi 公司;PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器有限公司;SHZ-C 型水浴恒温振荡器,上海龙跃仪器设备有限公司;SH-2 型磁力搅拌器,北京东方开物科学器材公司;Q Exactive HF-X 型质谱仪,赛默飞科学仪器有限公司;3-30K 型低温高速离心机,美国 Sigma 公司;KHB ST-360 型酶标仪,上海科华实验系统公司;MDF-382E 型超低温冰箱,日本三洋公司。

1.3 实验方法

1.3.1 β -LG 的 T 细胞表位预测

从 GenBank 中获取 β -LG 的氨基酸序列。通过免疫表位数据库 IEDB (<http://www.iedb.org/>) 和 NetMHC (II)/pan4.0 数据集 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan4.0>) 预测 T 细胞表位。基于 HLA-DRB1、HLA-DQB1 等位基因,即 DRB1 * 08:01、DRB1 * 08:02、DRB1 * 08:03、DRB1 * 08:04、DRB1 * 08:09、DQB1 * 04:01、DQB1 * 04:02,预测 β -LG 可能的 T 细胞表位。结果中调整等级越小,则说明越可能为 β -LG 的 T 细胞表位。在 NetMHC (II)/pan4.0 输入 β -LG 氨基酸序列获得预测结果,分数越高则越可能为 β -LG 的 T 细胞表位。

1.3.2 β -LG 水解物的制备

将 β -LG 配制成质量浓度为 30 mg/mL 的水溶液,蛋白酶最适作用温度和 pH 值见表 1。按 β -LG 质量,蛋白酶分别添加 3 000 U/g,用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节反应体系的 pH 值至相应蛋白酶适宜水解 pH 值,水解时间为 3 h。在蛋白水解过程中,需要保持反应体系的温度和 pH 值恒定,水解结束后需立即 85 °C 水浴灭酶活 10 min,一部分样品冷却至常温后放置 -20 °C 冰箱中保存待测定水解度。一部分样品冷冻干燥后保存待质谱分析。

1.3.3 水解度的测定

利用 OPA 法测定酶解物的水解度^[13]。将 50 mmol/L 的 OPA 甲醇溶液 10 mL、50 mmol/L 的

表1 蛋白酶水解 β -LG的优化条件Tab. 1 Optimal conditions for hydrolysis of β -LG by proteases

蛋白酶	ρ (底物)/(mg·mL ⁻¹)	pH	t (水解)/°C
protamex	30	7.0	60
neutrased	30	7.0	50
papain	30	7.0	60
trypsin	30	8.0	50
alcalase	30	8.0	60
protease M	30	7.0	50

N-乙酰半胱氨酸的水溶液 10 mL、5 mL 质量浓度为 200 mg/mL 的 SDS 和 75 mL 硼酸盐缓冲液 (0.1 mol/L、pH 值 9.5) 混合制备 OPA 试剂。OPA 试剂避光保存,并在使用前避光持续搅拌 60 min。取 3.2 mL 新鲜配制的 OPA 试剂于试管中,加入 400 μ L 的 β -LG 水解物溶液或 L-亮氨酸标准品,混合均匀。在室温下放置 10 min 后,使用紫外分光光度计在 340 nm 波长处测量样品或标准品的吸光值。

以 L-亮氨酸为标准品绘制标准曲线。用电子天平准确称量 0.3279 g 的 L-亮氨酸,于 100 mL 容量瓶中用超纯水定容,再分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 上述容量瓶中溶液至 6 支 25 mL 棕色容量瓶中定容至 25 mL。

β -LG 游离氨基的总含量测定:盐酸水解 β -LG 后用氨基酸分析仪测定;参考 GB5009.124—2016 《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》中方法进行测定。根据式(1)计算水解度(DH)。

$$DH = \frac{c(T_x) - c(T_o)}{c(NH_2) - c(T_o)} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, $c(T_x)$ 为酶解产物的游离氨基浓度, μ mol/mL; $c(T_o)$ 为未水解 β -LG的游离氨基浓度, μ mol/mL; $c(NH_2)$ 为 β -LG样品中游离氨基的浓度, μ mol/mL。

1.3.4 β -LG水解物多肽的氨基酸序列分析及免疫耐受作用鉴定

使用 Q Exactive HF-X 型质谱仪和 Nanospray Flex (ESI) 离子源,设定离子喷雾电压为 2.3 kV,离子传输管温度为 320 °C,质谱采用 FULL SCAN 采集模式,质谱全扫描范围 m/z 为 300 ~ 1700,一级质谱分辨率设为 70 000, C-trap 最大容量为 1×10^6 , C-trap 最大注入时间为 50 ms;选取全扫描中离子强

度 TOP 20 的母离子使用高能碰撞裂解 (HCD) 方式破裂,进行二级质谱检测,二级质谱分辨率定为 17 500, C-trap 最大容量为 2×10^5 , C-trap 最大注入时间为 50 ms,肽段碎裂碰撞能量设为 28%,阈强度设为 2.0×10^4 ,动态排阻范围设为 30 ms。质谱分析时,所用蛋白酶水解位点见表 2。

表2 蛋白酶水解位点

Tab. 2 Protease hydrolysis sites

蛋白酶	酶切位点
protamex	S
alcalase	S、G、Y、F、W
protease M	D、Q
neutrased	W、F、V、L
papain	L、G、K、R
trypsin	R、K

通过质谱确定 β -LG 水解物中多肽的氨基酸序列后,与预测的 T 细胞表位进行比对,对部分或全部重复的多肽通过固相合成法合成^[14]。通过 T 细胞增殖法鉴定合成多肽的免疫耐受性,参考 Hou 等^[15]和 Joost 等^[16]的方法,取 6 只 β -LG 致敏 BALB/c 小鼠外周血 T 淋巴细胞,体外培养。用合成的多肽分别孵育细胞 48 h, MTT 法检测增殖细胞数,并计算其增殖指数 (stimulation index, SI),即加入多肽引起 T 细胞增殖数量与未加多肽 T 细胞增殖数量的比值。SI ≥ 2 为阳性反应,即多肽具有免疫耐受作用,为 T 细胞表位肽。

1.3.5 β -LG 水解物的口服耐受性实验

1.3.5.1 动物实验方案

BALB/c 小鼠在 SPF 标准的动物房内适应性喂养 3 ~ 4 d,其间自由摄食和饮水(不含过敏原),环境温度(23 \pm 3) °C、湿度 40% ~ 70%、昼夜 12 h。小鼠随机分成 6 组,每组 10 只。阴性对照 (NC) 组和阳性对照 (PC) 组在 0、7、14、21、28 d,各灌胃 1 次,灌胃剂量按体质量分别为 10 μ g/kg 霍乱毒素 (cholera toxin, CT,溶于 0.3 mL 生理盐水) 或 5 mg/kg β -LG 和 10 μ g/kg CT,第 35 天用 5 ~ 10 倍剂量生理盐水或 β -LG 激发(不含 CT)。

预防组分别为 Trypsin 水解物处理 (TH) 组、Papain 水解物处理 (PH) 组、Protamex 水解物处理 (PM) 组和 Neutrased 水解物处理 (NPH) 组。小鼠适应性喂养 3 ~ 4 d 后,致敏前 7 天每天分别灌胃 4 种蛋白酶的水解物,每次灌胃 20 mg (溶于生理盐水),

连续灌胃7 d,之后0、7、14、21、28、35 d按照PC组的致敏激发方式灌胃 β -LG。

实验过程中,每周观察小鼠的生长状况(包括小鼠的体貌特征、饮食以及精神状态等)。大剂量刺激后,观察各组动物的状态,连续观察45 min左右并进行致敏症状评分。评分标准:0分,没有异常症状;1分,抓鼻子或挠头;2分,眼睛或嘴巴周围浮肿,毛发竖立,活动减少或呼吸频率增加;3分,哮喘,呼吸困难;4分,抽搐或静止;5分,死亡。每组得分为各组小鼠只数与症状对应分数乘积之和。

大剂量激发后,小鼠眼部内眦静脉采血,加入含有或不含有EDTA_{K2}的离心管中,轻轻混匀,4℃静置过夜,在4℃以5 000 r/min离心10 min,分离出血清或血浆。血清分装存于-20℃,用于特异性抗体、细胞因子、CHI-3L1和组胺的测定。血浆用于测定脾脏细胞亚群水平。

1.3.5.2 特异性抗体IgE、IgG₁、IgG_{2a}的测定

特异性抗体IgE是表征过敏模型是否成功的重要指标,采用ELISA方法并在文献[17]的基础上进行完善,测定特异性抗体IgE、IgG₁、IgG_{2a}。

1) 抗原包被。以 β -LG作为包被抗原,用pH值为9.6的50 mmol/L碳酸盐缓冲溶液将 β -LG稀释至质量浓度为10 μ g/mL,以100 μ L/孔加入酶标板中,4℃冷藏过夜。

2) 洗涤。次日倾去酶标板孔内的液体,用250 μ L/孔的PBST(pH值为7.5、0.02 mol/L磷酸盐缓冲液、含有体积分数为0.1%的吐温-20)恒温震荡洗板3次,每次3 min,甩净洗涤液,在吸水纸上拍打数次,至孔内无明显液滴。

3) 封闭。每孔加封闭液(含质量浓度为10 mg/mL的牛血清白蛋白的PBST溶液)150 μ L进行封闭,37℃恒温培育1 h后去除,用250 μ L/孔的PBST洗板3次,每次3 min,甩净洗涤液,在吸水纸上拍打数次,至孔内无明显液滴。

4) 一抗孵育。加入小鼠血清,用抗体稀释液(含质量浓度10 mg/mL的牛血清白蛋白的PBST溶液)以体积比1:1 000稀释血清,每孔加入100 μ L,37℃恒温培育2 h。用PBST洗板6次,250 μ L/孔,每次3 min,甩净洗涤液,在吸水纸上拍打数次,至孔内无明显液滴。

5) 二抗孵育。用抗体稀释液将HRP-羊抗鼠IgE或HRP-羊抗鼠IgG₁或HRP-羊抗鼠IgG_{2a}按体积

比1:4 000稀释,以100 μ L/孔加入孔内,加盖37℃恒温培育1.5 h。用250 μ L/孔的PBST洗板6次,每次3 min,甩净洗涤液,在吸水纸上拍打数次,至孔内无明显液滴。

6) 显色。加TMB溶液(0.1 mol/L,pH值为6.0的磷酸盐缓冲液10 mL,质量浓度为6 mg/mL的TMB应用液100 μ L,体积分数为30%的过氧化氢15 μ L配置而成)100 μ L/孔,常温避光反应20 min,显示蓝色。

7) 终止反应。加2 mol/L的硫酸50 μ L/孔终止反应,颜色由蓝变黄。

8) 测定。30 min内在450 nm波长处测定吸光值。

1.3.5.3 Th1和Th2细胞因子的测定

IL-4、IL-5、IL-13、IL-17和IFN- γ 分别使用ELISA试剂盒测定。

1.3.5.4 组胺的测定

使用组胺ELISA试剂盒测定。

1.3.5.5 CHI-3L1含量测定

使用CHI-3L1 ELISA试剂盒测定。

1.3.5.6 细胞亚群的测定

根据参考文献[18]进行细胞亚群的测定。脾淋巴细胞的获取:在大剂量刺激之后,将小鼠颈椎脱臼处死,置于体积分数为75%的酒精中浸泡2 min,转移到超净台剖开腹腔,取脾脏组织,剪碎并置于200目的滤网研磨,向组织上滴加2 mL的RPMI 1640无血清培养基,至组织内绝大部分细胞被分离。将细胞收集于15 mL离心管中,以500 g离心5 min,弃掉上清后,在脾细胞沉淀中加入2 mL红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,室温裂解2 min至红细胞完全破碎,500 g离心,弃掉上清,加入2 mL的RPMI 1640无血清培养基重悬细胞沉淀,500 g离心5 min洗涤1次,弃上清,加入1 mL的RPMI 1640无血清培养基重悬,取出15 μ L进行细胞计数。

取50 μ L细胞悬液,加入FITC-anti mouse CD4单抗和PE-anti mouse CD25单抗或其同型对照抗体,避光孵育30 min后,使用流式缓冲液洗涤1次,加入破膜剂孵育30 min后离心。加入APC-anti mouse Foxp3单抗,孵育30 min后洗涤1次,加入100 μ L流式缓冲液重悬细胞,使用流式细胞仪测定Treg细胞(CD25⁺Foxp3⁺)分群表达水平。

取50 μ L细胞悬液,加入PE-anti mouse CD69单抗和FITC anti-mouse CD183/CXCR3单抗或其同

型对照单抗,孵育 30 min 后,使用流式细胞仪测定效应 Th1 (CD69⁺ CD183/CXCR3⁺) 细胞分群表达水平。

取 50 μ L 细胞悬液,加入 FITC-anti mouse CD69 单抗和 PE-anti mouse T1/ST2 单抗或其同型对照,流式细胞仪检测效应 Th2 (CD69⁺ T1/ST2⁺) 细胞分群表达水平。

1.4 数据处理

实验数据采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 13.0 进行统计分析,结果以平均值 \pm 标准差(SD)表示。各组数据进行方差分析(One-way ANOVA),比较均值使用 Duncan's 极差检验, $P < 0.05$ 认为存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 β -LG 的 T 细胞表位预测结果

利用 IEDB 得出 β -LG 的 T 细胞表位(表 3),其主要集中在 3 段氨基酸序列上,即 AA26 ~ 46、AA110 ~ 128、AA154 ~ 173。NetMHC(II)/pan4.0 预测的 β -LG 可能的 T 细胞表位见表 4,由表 4 可知 β -LG 可能的 T 细胞表位集中在 5 段氨基酸序列上,即 AA13 ~ 29、AA32 ~ 46、AA55 ~ 69、AA83 ~ 108、AA160 ~ 174。结合二者的预测结果,可以得出 β -LG 可能的 T 细胞表位区可能在 6 段氨基酸序列,分别为 AA13 ~ 29、AA26 ~ 46、AA55 ~ 69、AA83 ~ 108、AA110 ~ 128、AA154 ~ 174。

表 3 IEDB 预测 β -LG 的 T 细胞表位

Tab. 3 Prediction of T cell epitope of β -LG by IEDB

等位基因	氨基酸起始位置	优势表位	表位存在可能性/%
HLA-DRB1 * 08:01	110	VLDTDYKKYLLFCMENSEAE	4.52
HLA-DRB1 * 08:02	26	LDIQKVAQTWYSLAMAASDIS	11.84
HLA-DRB1 * 08:09	154	KALKALPMHIRLSFNPTQLE	1.62

表 4 NetMHC(II)/Pan 4.0 预测 β -LG 的 T 细胞表位

Tab. 4 Prediction of T cell epitope of β -LG by NetMHC(II)/Pan 4.0

等位基因	氨基酸起始位置	优势表位	优势表位核心	分数	结合水平
	32	ACTWYSLAMAASDIS	YSLAMAASD	0.30	WB
	83	AQKKHIAEKTKIPAVFKIDALNENKV	IAEKTKIPA	0.48	WB
HLA-DRB1 * 08:01	13	GAQALIVTQTMKGLDIQ	LIVTQTMKG	0.43	WB
	55	LRVYVEELKPTPEGD	YVEELKPTP	0.33	WB
	160	PMHIRLSFNPTQLEE	IRLSFNPTQ	0.26	WB

WB 表示结合水平为弱结合。

2.2 蛋白酶酶解 β -LG 水解物的水解度

采用 OPA 法测定各蛋白酶酶解 β -LG 水解物的水解度,结果如图 1。由图 1 可知,Protease M 和 Alcalase 酶解 β -LG 的水解物水解度较高,分别为

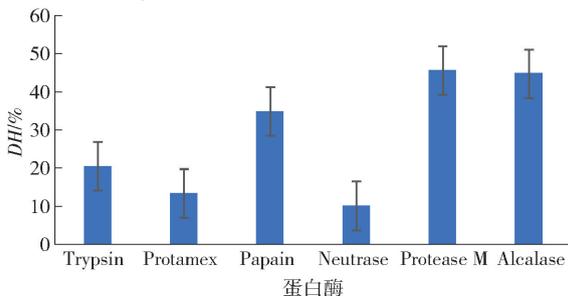


图 1 β -LG 水解物的水解度

Fig. 1 Degree of hydrolysis of β -LG hydrolysate

45.66% 和 44.81%, Neutrase 和 Protamex 酶解 β -LG 的水解物水解度较低,分别为 10.19% 和 13.44%, Papain 酶解 β -LG 的水解物水解度为 34.95%, Trypsin 酶解 β -LG 的水解物水解度为 20.61%。

2.3 不同 β -LG 水解物多肽氨基酸序列分析及免疫耐受作用鉴定

不同 β -LG 水解物肽段 AA 序列见表 5。由表 5 可知,6 种蛋白酶中,Trypsin 酶解 β -LG 的水解物 10 条肽段与预测的 T 细胞表位部分或全部重叠,Protamex 酶解 β -LG 的水解物 5 条肽段与预测表位部分或全部重叠,Neutrase 酶解 β -LG 的水解物 4 条肽段与预测表位部分重叠,Papain 酶解 β -LG 的水解物 1 条肽段与预测表位部分重叠,而 Alcalase 和 Protease

表5 β -LG 水解物氨基酸序列
Tab. 5 Amino acid sequence of β -LG hydrolysate

蛋白酶名称	质谱测定肽段氨基酸序列	与预测 T 细胞表位部分或全部重复序列	SI
Trypsin	ALKALPMMHIR	LKALPMMHIR	2.52 ± 0.02
	ALPMMHIR	ALPMMHIR	2.71 ± 0.01
	IDALNENK	IDALNENK	2.27 ± 0.03
	IIAEKTKIPAVFK	KTKIPAVFK	2.53 ± 0.01
	TKIPAVFK	TKIPAVFK	2.41 ± 0.02
	TKIPAVFKIDALNENK	IPAVFKIDALNENK	3.12 ± 0.03
	TPEVDDEALEK		
	TPEVDDEALEKFDK		
	TPEVDDEALEKFDKALK		
	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	VAGTWYSLAMAASDIS	2.64 ± 0.02
	VLVLDTDYK	DTDYK	2.12 ± 0.01
	VLVLDTDYKK	DTDYKK	2.04 ± 0.02
	VYVEELKPTPEGDLEILLQK	VYVEELKPTPE	2.68 ± 0.02
Protamex	DEALEKFDKALKALPMHIRLS	KALKALPMHIRLS	2.81 ± 0.02
	DISLLDAQSAPLR		
	DISSLLDAQSAPLRVY		
	KALPMHIRLS	IRLS	0.57 ± 0.01
	KVAGTWYS	KVAGTWYS	2.31 ± 0.02
	LDIQKVAGTWYS	KVAGTWYS	2.31 ± 0.02
	LLDAQSAPLR		
	LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYS	LIVTQTMKGLDIQ	2.59 ± 0.03
LVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLS	PMMHIRLS	2.49 ± 0.01	
Papain	LDAQSAPLR		
	NENKVLVL	NENKV	2.05 ± 0.02
Neutrase	DTDYKKYL	DTDYKKYL	2.12 ± 0.01
	KPTPEGDLEILL	KPTPEGD	2.34 ± 0.02
	LDAQSAPLRV		
	LDTDYKKYL	LDTDYKKYL	2.65 ± 0.02
	VLDTDYKKYL	VLDTDYKKYL	2.56 ± 0.01
	VRTPEVDDEAL		
Alcalase	—	—	—
Protease M	—	—	—

—表示未检出 T 细胞表位。

M 酶解 β -LG 的水解物在表 2 水解位点下未检测出多肽序列。与预测 T 细胞表位部分或全部重复的多肽通过 T 细胞增殖实验鉴定免疫耐受作用,结果见表 5。由表 5 可知除了多肽 IRLS,其他多肽都具有免疫耐受性。附上 DEALEKFDKALKALPMHIRLS 多肽的一级质谱图,见图 2。所以选取 Trypsin、Pro-

tamex、Neutrase、Papain 4 种蛋白酶酶解 β -LG 的水解物进行口服免疫耐受实验。

2.4 不同 β -LG 水解物的口服耐受性

2.4.1 实验小鼠的临床症状

小鼠临床症状见表 6。由表 6 可知,NC 组 10 只小鼠都没有过敏症状;PC 组 6 只小鼠有呼吸急

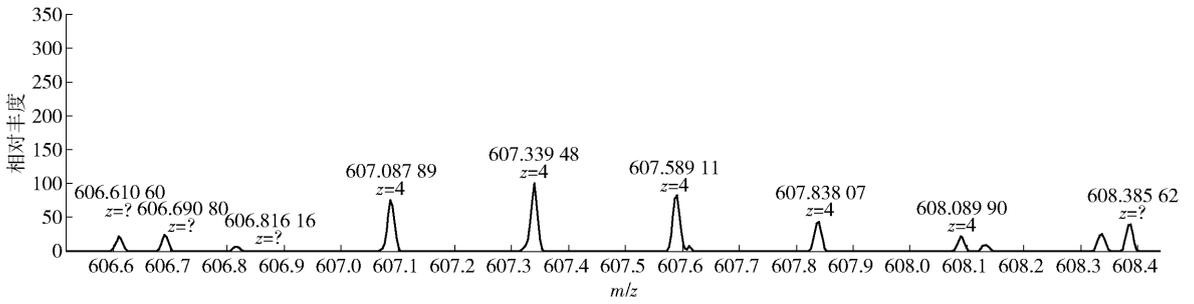


图2 DEALEKFDKALKALPMHIRLS 多肽的一级质谱

Fig. 2 Primary mass spectra of DEALEKFDKALKALPMHIRLS peptide

表6 小鼠临床症状及得分

Tab. 6 Clinical symptoms and scores of mice

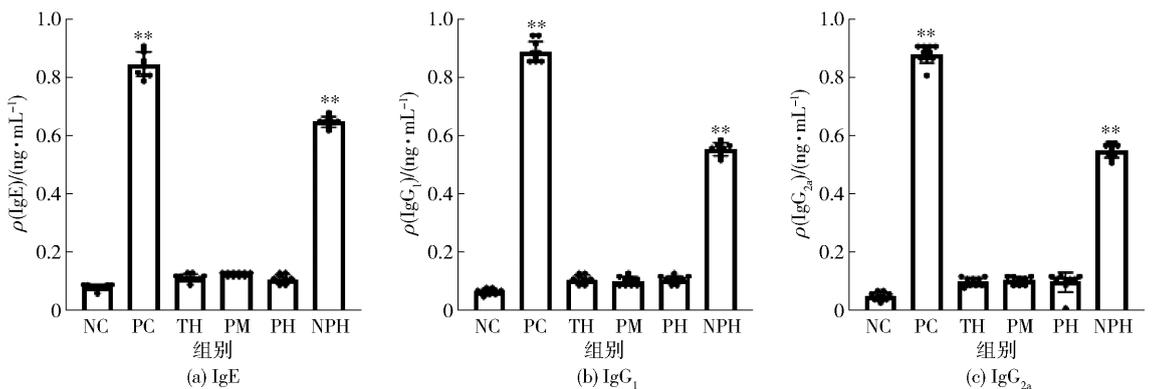
评分	症状	NC 组	PC 组	TH 组	PM 组	PH 组	NPH 组
0	无症状	10	0	9	8	8	0
1	抓挠鼻子和嘴巴	0	0	1	2	2	0
2	眼睛和嘴周围肿胀、活动减少、呼吸频率高	0	0	0	0	0	2
3	呼吸急促、嘴巴和尾巴周围出现皮疹、呼吸频率加快	0	6	0	0	0	6
4	刺激后无活动、颤抖和肌肉收缩	0	3	0	0	0	2
5	休克死亡	0	1	0	0	0	0
得分		0	35	1	2	2	30

促、嘴巴和尾巴周围出现皮疹、呼吸频率加快的症状,3只小鼠刺激后静止不活动,产生颤抖和肌肉收缩的症状,1只小鼠死亡;TH组9只小鼠无症状,1只小鼠抓挠鼻子和嘴巴,产生较轻微过敏现象;PM组8只小鼠无症状,2只小鼠抓挠鼻子和嘴巴,产生较轻微过敏现象;PH组8只小鼠无症状,2只小鼠抓挠鼻子和嘴巴,产生较轻微过敏现象;NPH组2只小鼠眼睛和嘴巴周围肿胀、活动减少、呼吸频率高,6只小鼠产生呼吸急促、嘴巴和尾巴周围出现皮疹、呼吸频率加快,2只小鼠在刺激后无活动,产生

颤抖和肌肉收缩的症状。

2.4.2 小鼠血清特异性抗体水平

小鼠血清特异性抗体 IgE、IgG₁、IgG_{2a} 水平测定结果见图3。由图3可知,PC组、NPH组小鼠血清中特异性抗体 IgE、IgG₁、IgG_{2a} 水平均显著高于 NC 组 ($P < 0.05$),而 TH 组、PM 组、PH 组与 NC 组均无显著差异 ($P > 0.05$)。这说明 Trypsin、Protamex、Papain 酶解 β-LG 的水解物显著地改善了小鼠的致敏反应,连续灌胃 7 d 使小鼠产生了口服耐受性,而中性蛋白酶水解物未显著降低小鼠的致敏反应。



** 表示与 NC 组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

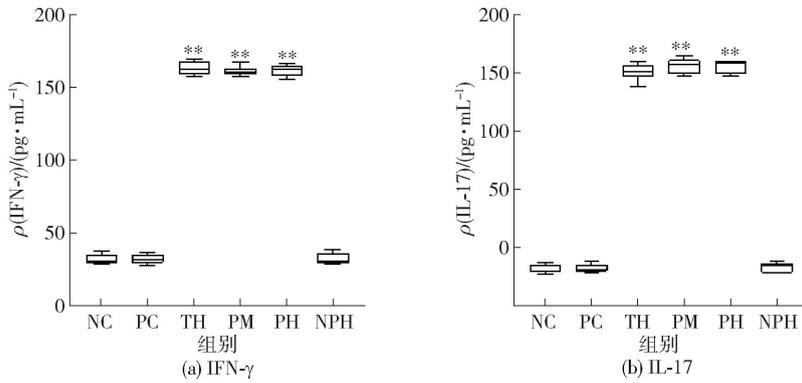
图3 各组小鼠血清中特异性抗体水平

Fig. 3 Specific antibody levels were detected in mice serum of each group

2.4.3 小鼠血清 Th1 相关细胞因子水平

血清 Th1 相关细胞因子水平结果见图 4。由图 4 可知,TH 组、PM 组、PH 组血清 IFN- γ 和 IL-17 水平均显著高于 PC 组 ($P < 0.05$),说明 Trypsin、

Protamex、Papain 酶解 β -LG 水解物显著抑制了小鼠过敏的发生,具有免疫耐受作用。NPH 组与 NC 组、PC 组无显著性差异 ($P > 0.05$),则说明 Neutrased 酶解 β -LG 水解物未使小鼠发生免疫耐受作用。



** 表示与 PC 组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

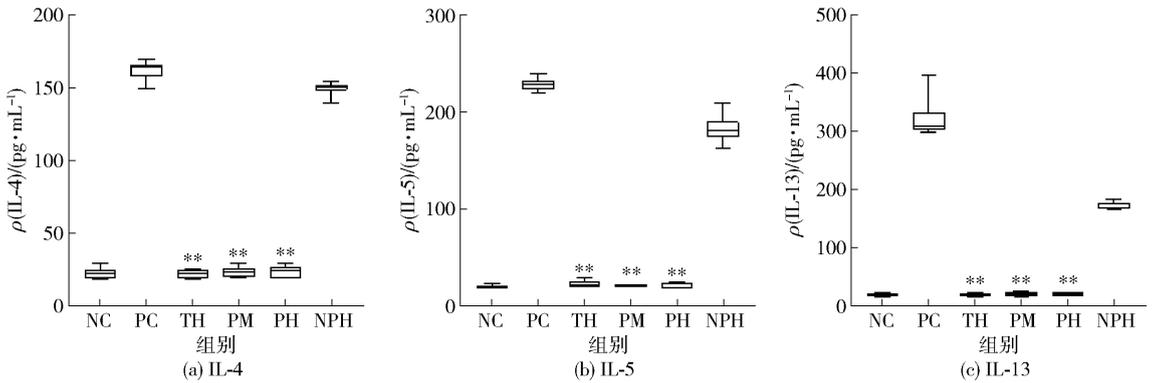
图 4 小鼠血清 IFN- γ 和 IL-17 细胞因子水平

Fig. 4 Levels of IFN- γ and IL-17 cytokines in mice serum

2.4.4 小鼠血清 Th2 相关细胞因子水平

小鼠血清 Th2 相关细胞因子水平结果见图 5。由图 5 可知,TH 组、PM 组、PH 组血清 IL-4、IL-5、IL-13 水平均显著低于 PC 组 ($P < 0.05$),NPH 组与 PC

组无显著差异 ($P > 0.05$)。说明 Trypsin、Protamex、Papain 酶解 β -LG 的水解物显著抑制了小鼠过敏的发生,Neutrased 酶解 β -LG 水解物未使小鼠发生免疫耐受作用。



** 表示与 PC 组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 5 各组小鼠血清 IL-4、IL-5、IL-13 因子水平

Fig. 5 Levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in each group in mice serum

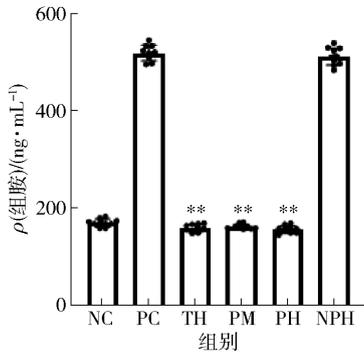
2.4.5 小鼠血清组胺水平

组胺存在于机体组织的肥大细胞或嗜碱性粒细胞中。当机体发生过敏反应时,这些细胞会释放大量的组胺。血清组胺水平检测结果见图 6。由图 6 可知,TH 组、PM 组、PH 组 3 组小鼠的组胺水平与 NC 组小鼠无显著差异 ($P > 0.05$),与 PC 组小鼠有显著差异 ($P < 0.05$)。这说明 Trypsin、Protamex、Papain 酶解 β -LG 的水解物对过敏小鼠组胺的释放有抑制作用,成功增强了小鼠免疫耐受。但 NPH 组与 PC

组并无显著差异 ($P > 0.05$),说明 Neutrased 酶解 β -LG 的水解物没有成功提升小鼠免疫耐受性。

2.4.6 CHI-3L1 测定结果

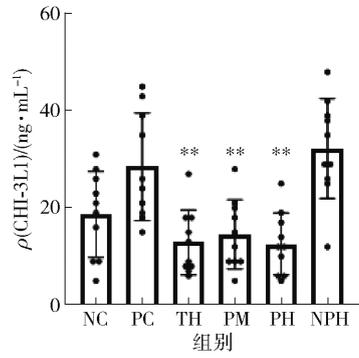
在过敏反应中,几丁质酶可以通过调节 TGF- β 的表达和 Foxp3⁺ Treg 细胞的数量发挥作用,可以减轻过敏炎症。血清 CHI-3L1 水平检测结果见图 7。由图 7 可知,TH 组、PM 组、PH 组小鼠血清 CHI-3L1 水平与 NC 组无显著差异 ($P > 0.05$),但却显著低于 PC 组 ($P < 0.05$),这说明 Trypsin、Prota-



** 表示与 PC 组相比具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

图6 小鼠血清中组胺含量

Fig. 6 Histamine content in serum of mice



** 表示与 PC 组相比具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

图7 小鼠血清中 CHI-3L1 含量

Fig. 7 Level of CHI-3L1 in serum of mice

mex、Papain 3 组的 β-LG 水解物对过敏小鼠血清 CHI-3L1 水平升高具有抑制作用, 成功提升了小鼠免疫耐受性。但 NPH 组与 PC 组并无显著差异 ($P > 0.05$), 说明 Neutrase 的 β-LG 水解物没有成功提高小鼠的免疫耐受性。

2.4.7 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群变化

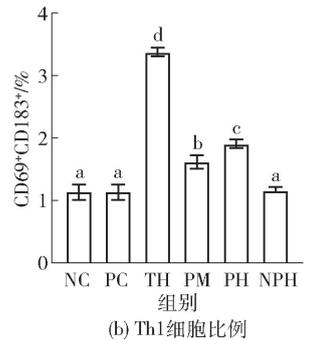
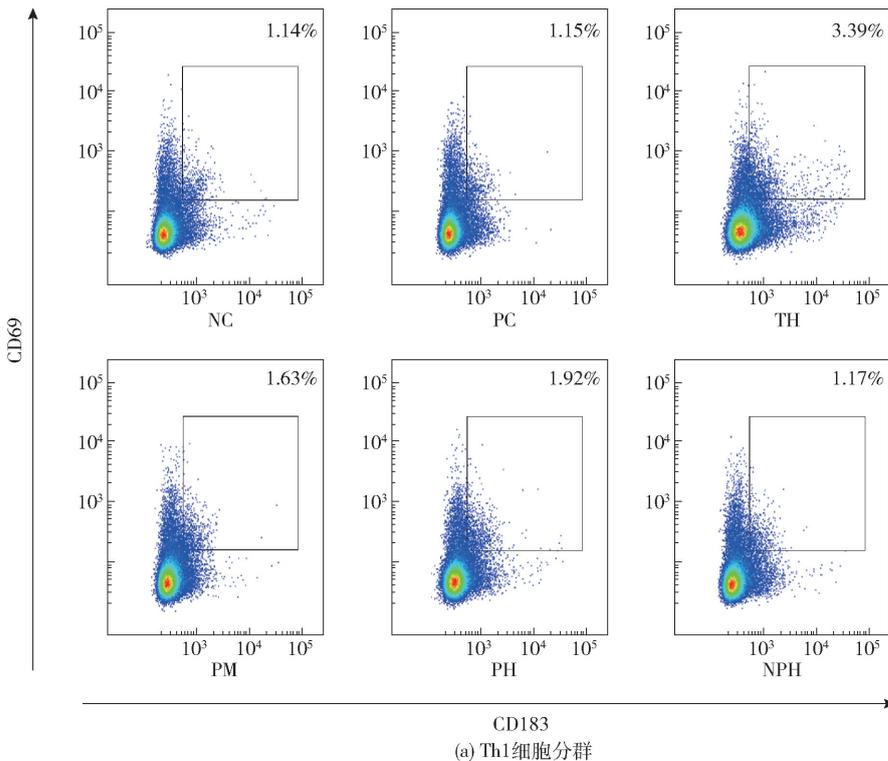
2.4.7.1 Th1 细胞亚群水平

小鼠脾脏 Th1 细胞亚群水平见图 8。由图 8 可知, 与 NC 组比较, PC 组、NPH 组小鼠脾脏 Th1 细胞

亚群水平差异不显著, TH 组、PH 组和 PM 组小鼠脾脏 Th1 细胞亚群水平显著高于 NC 组, 说明这 3 组小鼠脾脏的 Th1 细胞数量显著增加。

2.4.7.2 Th2 细胞亚群水平

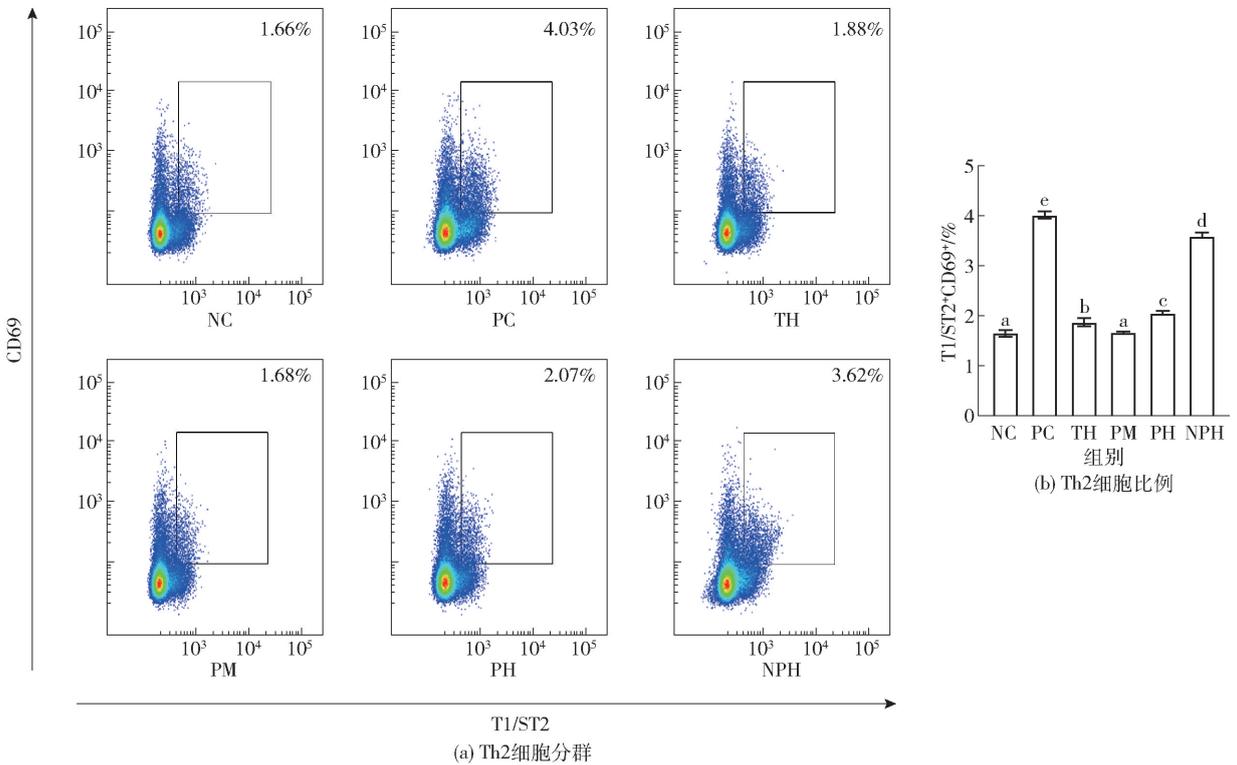
速发型食物过敏又称为 Th2 型过敏反应, 小鼠脾脏 Th2 细胞亚群水平见图 9。由图 9 可知, PC 组小鼠产生了最强的 Th2 型免疫反应。PM 组与 NC 组小鼠脾脏 Th2 细胞亚群水平差异不显著。TH 组、PH 组和 NPH 组显著高于 NC 组, 但显著低于 PC 组。



不同字母表示组间数据具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图8 β-LG 水解物对 BALB/c 小鼠脾脏 Th1 细胞分化水平的影响

Fig. 8 Effect of β-LG hydrolysates on level of Th1-cell differentiation of BALB/c mice splenocyte



不同字母表示组间数据具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图9 β -LG水解物对BALB/c小鼠脾脏Th2细胞分化水平影响

Fig. 9 Effect of β -LG hydrolysates on level of Th2-cell differentiation of BALB/c mice splenocyte

2.4.7.3 小鼠脾脏 Treg 细胞亚群水平

小鼠脾脏 Treg 细胞亚群的水平检测结果见图 10。由图 10 可知,与 PC 组致敏小鼠相比,TH 组、PM 组、PH 组小鼠脾脏 Treg 细胞亚群水平显著增加,说明致敏前口服这 3 种蛋白酶的 β -LG 水解物可显著增加 Treg 细胞 ($CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$) 的相对数量。PC 组和 NPH 组小鼠 Treg 细胞数量没有显著增加。

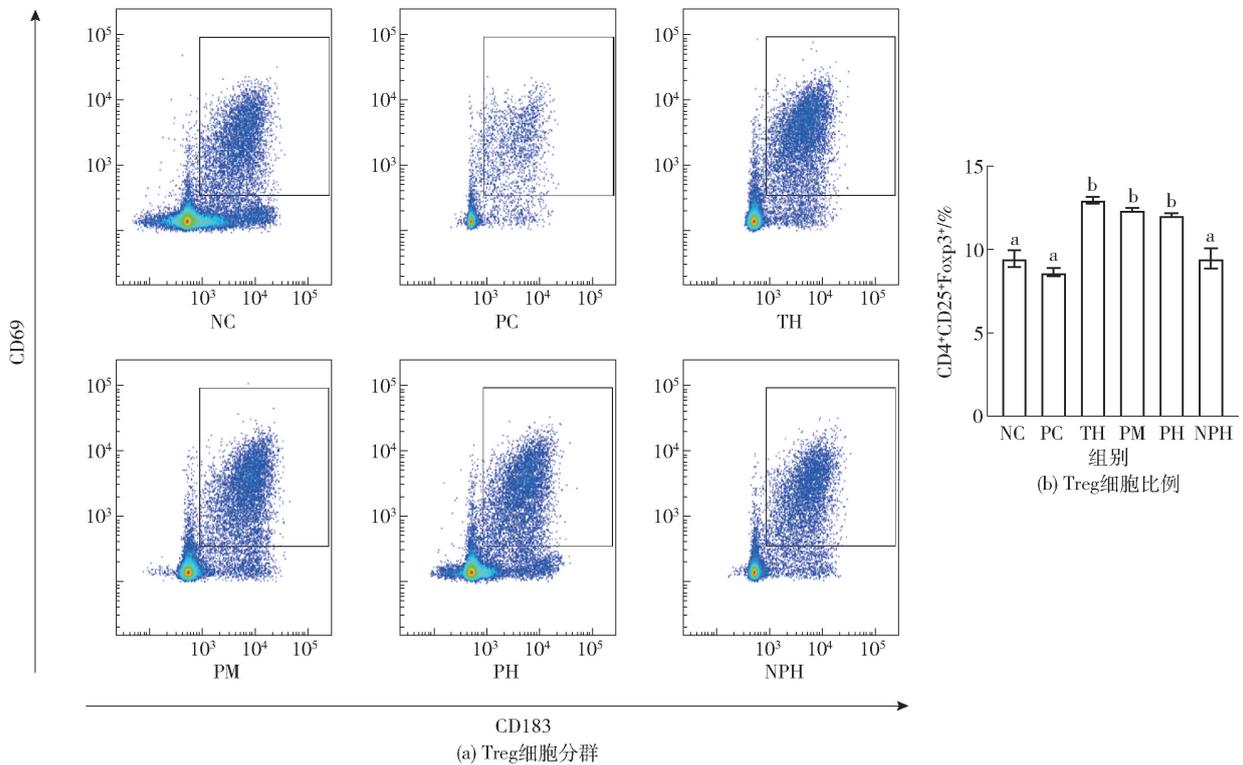
3 讨论

蛋白质水解产生的多肽在功能和生物活性上优于蛋白质本身^[19]。已有研究发现,许多来自动物蛋白质的具有生物活性潜力的肽,其中大多数是从牛奶产品中分离或者水解牛奶蛋白质释放出来的^[20]。酶促水解通常是在温和的条件下进行的反应,是最常见的制备口服耐受肽的方法^[21]。酶具有很高的特异性,并且不会残留有机溶剂和有毒化学物质,使得酶水解蛋白质成为食品和制药行业生产活性肽的最优选方法。目前使用食品级蛋白酶制备活性肽是被认为最安全的方式,因此本研究采用酶法水解 β -LG 制备具有 T 细胞表位

和口服耐受作用的多肽。

Joost 等^[16]的研究证明,含有 T 细胞表位的乳清蛋白水解物成功增强了小鼠的免疫耐受性,从而有助于预防牛乳 β -LG 过敏。Koko 等^[22]对 AA42 ~ 56、AA62 ~ 76、AA139 ~ 154 多肽的口服耐受性进行分析,研究结果表明:这 3 段肽段都成功地抑制了 T 细胞的增殖,并且 AA139 ~ 154 显著抑制了 β -LG 抗体的产生,即特异性 IgE、IgG₁ 抗体水平降低,并且 AA139 ~ 154 有效降低了 Th2 亚群水平。但是并非所有的 T 细胞表位肽都可以改善免疫耐受性,如 Laura 等^[23]发现,T 细胞表位肽 AA92 ~ 100、AA91 ~ 108 并没有显示出牛乳 β -LG 过敏耐受性。本研究先鉴定 β -LG 水解物中多肽的氨基酸序列,通过体外实验鉴定具有 T 细胞表位的多肽的免疫耐受活性,通过体内实验筛选出具有口服免疫耐受性的 β -LG 水解物。

食物过敏机制主要是由食物过敏原刺激 $CD4^+$ T 细胞,使 $CD4^+$ T 细胞主要分化为 Th2 细胞。Th2 细胞产生细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13,这些细胞因子诱导 B 细胞产生抗原特异性 IgE 抗体。特异性 IgE 抗体与肥大细胞或嗜碱性粒细胞结合,刺激肥大细



不同字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 10 β -LG 水解物对 BALB/c 小鼠脾脏 Treg 细胞分化水平影响

Fig. 10 Effect of β -LG hydrolysates on level of Treg-cell differentiation of BALB/c mice splenocyte

胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒,并释放组胺,发生过敏症状^[24]。另外,在食物过敏反应中,CHI-3L1 通过蛋白激酶 B 磷酸化在 Th2 细胞参与的有关炎症中起主要作用^[25]。另外,Th1 细胞分泌的细胞因子有 IFN- γ 和 IL-17,可以抑制 Th2 细胞的分化,减轻过敏症状^[26]。诱导过敏原特异性 IgG₁ 产生是过敏性 Th2 反应的标志之一,该反应有助于 Th2 细胞因子产生^[27-28]。目前已有研究证实,IL-4、IL-5 的表达水平较高是婴幼儿患过敏性疾病的信号^[29]。活化的 Th1 细胞、CD8⁺ T 细胞可产生 IFN- γ ,促进未分化的 T 细胞向 Th1 细胞分化,并抑制 Th2 细胞增殖^[16]。研究数据显示,Treg 细胞与过敏耐受性相关,口服耐受诱导很可能是由于抗原特异性 Th2 细胞的缺失以及产生的 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞及细胞因子 TGF- β 、IL-10 的主动抑制所致^[14,30]。本研究中 Trypsin、Papain 和 Protamex 酶解 β -LG 的水解物诱导小鼠 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞数量显著增加,部分验证了前人的研究结论。本研究测定 Th1 细胞相关因子 IL-17、IFN- γ 和 Th2 相关因子 IL-4、IL-5、IL-13 及与过敏症状相关的组胺、CHI-3L1、特异性抗体 (IgE、IgG₁、IgG_{2a}) 来判断小

鼠是产生了 β -LG 过敏还是 β -LG 耐受性。研究结果表明,Trypsin、Protamex、Papain 酶解 β -LG 的水解物使小鼠产生了口服耐受性,尤其 Protamex、Papain 水解物是首次发现;而 Neutrase 水解物并没有使小鼠获得口服耐受性。关于 Neutrase 水解物没有使小鼠获得耐受性的原因,未来建议从小鼠肠道致敏机制开展研究。Joost 等^[16]的研究证明含有 T 细胞表位的乳清蛋白水解物可使小鼠获得口服耐受性。本研究发现,含有 T 细胞表位的水解物不一定会诱导口服耐受,需要通过动物实验验证,食物抗原诱导口服免疫耐受的机制有待深入研究。

4 结论

β -LG 的 Trypsin 酶解水解物含多段 T 细胞表位,展现出显著的口服耐受作用,未来可以用于预防过敏疾病的应用研究。研究发现,Papain、Protamex 制备的 β -LG 水解物虽然含有较少的 T 细胞表位肽,但是却具有较好的口服耐受活性,建议进一步优化水解条件调控 T 细胞表位肽的释放。Neutrase 水解物虽然含有较多的 T 细胞表位肽,但是没有提高

小鼠的免疫耐受性,食物抗原诱导口服免疫耐受的机制有待深入研究。从T细胞表位预测,到水解物肽段序列分析、T细胞增殖实验,再到动物实验测定体液因子、细胞群分化水平,多方面逐步揭示了 β -LG水解物中多肽诱导小鼠口服耐受性的作用机制。

参考文献:

- [1] LORELLA P, GIANLUCA P, CRISTINA B, et al. Tolerogenic effect elicited by protein fraction derived from different formulas for dietary treatment of cow's milk allergy in human cells [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 11: 1 - 10.
- [2] MUTHUKUMAR J, SELVASEKARAN P, LOKANADHAM M, et al. Food and food products associated with food allergy and food intolerance: an overview [J]. *Food Research International*, 2020, 138: 109780.
- [3] PARK K S, PARK M J, CHO M L, et al. Type II collagen oral tolerance; mechanism and role in collagen-induced arthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Modern Rheumatology*, 2009, 19(6): 581 - 589.
- [4] SUSANNA S, MATTI K, MIKA J M, et al. Milk oral immunotherapy is effective in school-aged children [J]. *Acta Paediatrica*, 2013, 102(2): 172 - 176.
- [5] ANTONIO M, BELEN D, MARIA D I, et al. Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy [J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2011, 41(9): 1297 - 1304.
- [6] JUSTIN M S, SCOTT D N, HANNAH R, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 122(6): 1154 - 1160.
- [7] KATHERINE A, SABITA I, YVONNE K, et al. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (stop II): a phase 2 randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2014, 383(9925): 1297 - 1304.
- [8] THANG C L, JOYCE I B, ZHAO X. Low doses of allergen and probiotic supplementation separately or in combination alleviate allergic reactions to cow beta-lactoglobulin in mice [J]. *Journal of Nutrition*, 2013, 143(2): 136 - 141.
- [9] FEMKE H, WENDY W J U, JOHAN G, et al. Functional CD25(-) and CD25(+) mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application [J]. *European Journal of Immunology*, 2003, 33(10): 2801 - 2810.
- [10] ATANASKA I K, JIM M, MICHELE C, et al. PLGA nanoparticles loaded with beta-lactoglobulin-derived peptides modulate mucosal immunity and may facilitate cow's milk allergy prevention [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2018, 818: 211 - 220.
- [11] JO S Y, LEE C. A case of an infant diagnosed with cow's milk allergy and concurrent meat allergy via immunocAP ISAC [J]. *Kosin Medical Journal*, 2019, 34(1): 72 - 77.
- [12] ARNE H, SUSANNE H. Cow's milk allergy: where have we come from and where are we going [J]. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 2014, 14(1): 2 - 8.
- [13] FU Y, LIU J, ERIK T H, et al. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma [J]. *Food Chemistry*, 2018, 257: 163 - 171.
- [14] KARINE A, SOPHIE N, HERVE B, et al. Immunomodulatory potential of partially hydrolyzed beta-lactoglobulin and large synthetic peptides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(43): 10858 - 10866.
- [15] HOU C Y, LI N, LIU M Y, et al. Therapeutic effect of Nile tilapia type II collagen on rigidity in CD8(+) cells by alleviating inflammation and rheumatoid arthritis in rats by oral tolerance [J]. *Polymers*, 2022, 14(7): 1284.
- [16] JOOST W G, JUANDY J, LAURA P M M, et al. Identification of peptides with tolerogenic potential in a hydrolysed whey-based infant formula [J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2018, 48(10): 1345 - 1353.
- [17] MARI T, AKEMI S, NORIYUKI Y, et al. Cross-reactivity of each fraction among cereals in children with wheat allergy [J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2022, 33(7): 1 - 8.
- [18] BETTY C A M V E, BARBARA C S, SANDER D K, et al. Oral tolerance induction by partially hydrolyzed whey protein in mice is associated with enhanced numbers of Foxp3+ regulatory T-cells in the mesenteric lymph nodes [J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2011, 22(8): 820 - 826.
- [19] RAINER H, HANS M. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 163 - 169.
- [20] SERONEI C C, MEIKE S, ELENA L, et al. Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of beta-lactoglobulin: analysis by LC-ESI-TOF/MS [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(2): 457 - 467.
- [21] ALEKSANDRA Z, MONIKA T, ANTONI P, et al. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity [J]. *Amino Acids*, 2013, 44(2): 315 - 320.
- [22] KOKO M, NORIKO M T, JUN-LCHI K. Suppression of immune responses to beta-lactoglobulin in mice by the oral administration of peptides representing dominant T cell epitopes [J]. *Journal of the Science of Food and*

- Agriculture, 2008, 88(3): 542–549.
- [23] LAURA A P M M, BETTY C A M V E, GERARD A H, et al. Oral treatment with beta-lactoglobulin peptides prevents clinical symptoms in a mouse model for cow's milk allergy [J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2013, 24(7): 656–664.
- [24] LAMIA E, MARWA K I, RONALD S. Th2 related markers in milk allergic inflammatory mice model, versus OVA [J]. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 2017, 15(2): 453–461.
- [25] FU G, ZHAO K, CHEN H, et al. Effect of 3 lactobacilli on immunoregulation and intestinal microbiota in a beta-lactoglobulin-induced allergic mouse model [J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(3): 1943–1958.
- [26] KIM E G, KIM M N, HONG J Y, et al. Chitinase 3-like 1 contributes to food allergy via M2 macrophage polarization [J]. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2020, 12(6): 1012–1028.
- [27] PIRKKA V K, EFFIE A, SEPPO J S, et al. New aspects of probiotics: a novel approach in the management of food allergy [J]. *Allergy*, 1999, 54(9): 909–915.
- [28] MANOJ K P. Molecular basis for downregulation of C5A-mediated inflammation by IgG₁ immune complexes in allergy and asthma [J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2013, 13(6): 596–606.
- [29] NICHOLAS W L, M. MICHAEL G, PATRICK A W. Complement-dependent immune complex-induced bronchial inflammation and hyperreactivity [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2001, 280(3): 512–518.
- [30] VALERIE V, JON G, JESSICA R M, et al. Ovalbumin in breast milk is associated with a decreased risk of IgE-mediated egg allergy in children [J]. *Allergy*, 2020, 75(6): 1463–1466.

Preparation and Identification of β -Lactoglobulin Hydrolysates with T-Cell Oral Immunotolerance

TIAN Linghan¹, ZHANG Qianqian¹, CONG Yanjun^{1,*}, YAN Wenjie²

(1. School of Food and Health/Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health/Beijing Research Center for Food Additive Engineering Technology, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. School of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Abstract: β -Lactoglobulin, one of major allergens in cow milk, was studied in this paper, and the T cell immune tolerance hydrolysates of β -lactoglobulin were prepared and identified to provide a theoretical basis for oral immunotherapy for patients with cow milk allergy. Firstly, the bioinformatics method was used to predict the possible β -lactoglobulin T-cell epitopes, and then, β -lactoglobulin was respectively hydrolyzed by six kinds of protease. The amino acid sequences of polypeptide of β -lactoglobulin hydrolysates were analyzed by mass spectrometry, and these peptides were synthesized by solid phase synthesis. The immune tolerance of the peptides were identified by T cell proliferation test. Therefore, trypsin, protamex, papain and neutrase hydrolysates were initially screened for T cell immune tolerance. Furthermore, the immune tolerance of β -lactoglobulin hydrolysates were evaluated by animal experiments. The levels of specific antibody (IgE, IgG₁, IgG_{2a}), Th1 cytokine (IFN- γ , IL-17), Th2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-13), histamine, chitinase-3-like protein 1 in mice serum and the differentiation of mice spleen cell subsets were measured *in vivo*. The results showed that trypsin, protamex and papain hydrolysates had oral tolerance, among which protamex and papain hydrolysates had been reported innovatively. Although neutrase protease hydrolysates contained T cell epitopes, they were still allergenic. Therefore, the hydrolysates containing T cell epitopes did not necessarily have oral immune tolerance and need to be verified *in vivo*. The conclusion of this study could provide an important theoretical basis for the development of new anti-allergy milk-based materials and clinical treatment of milk allergy.

Keywords: cow's milk allergy; β -lactoglobulin; polypeptide; oral tolerance; T cell epitope

(责任编辑:郝一铭)