

## 技术与方法

## 悬铃木花粉微颗粒(SPPs)释放的快速有效观察

沈家慧<sup>1</sup> 李瑞沙<sup>1</sup> 赵慧<sup>2</sup> 李扬<sup>1</sup> 张卫<sup>1</sup> 吕森林<sup>2</sup> 周树敏<sup>1\*</sup><sup>1</sup>上海大学生命科学学院,上海市能源作物重点实验室,上海 200444; <sup>2</sup>上海大学环境与化学工程学院,上海 200444)

**摘要** 悬铃木的风媒花粉是春季主要的上呼吸道过敏病症的诱发因素之一。已被鉴定出的致敏原蛋白包括Pla a1(*Platanus* allergen 1)、Pla a2和Pla a3三种。和其他花粉蛋白一样,悬铃木花粉变应原蛋白能够吸附于细颗粒物上,并通过呼吸道进入人体而引发过敏反应。但是,对于悬铃木花粉细胞内部的这些致敏原蛋白的释放方式和过程却缺乏相应的细致观测和研究。因此,该研究主要通过建立快速简便的检测方法和分析不同处理方式对悬铃木花粉中内容物释放的影响,以确定悬铃木花粉致敏原的释放方式和条件,为花粉过敏机制的相关研究积累数据。

**关键词** SPPs; 花粉致敏; 悬铃木; 水合

## Rapid and Effective Observation of Subpollen Particles (SPPs) Released from *Platanus* Pollen

Shen Jiahui<sup>1</sup>, Li Ruisha<sup>1</sup>, Zhao Hui<sup>2</sup>, Li Yang<sup>1</sup>, Zhang Wei<sup>1</sup>, Lü Senlin<sup>2</sup>, Zhou Shumin<sup>1\*</sup><sup>1</sup>School of Life Sciences, Shanghai Key Laboratory of Bio-energy Crops, Shanghai University, Shanghai 200444, China;<sup>2</sup>School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**Abstract** *Platanus hispanica* anemophilous pollen is one of the important factors inducing upper respiratory allergic diseases in the spring. The Pla a1 (*Platanus* allergen 1), Pla a2 and Pla a3 are three main allergen proteins, which have been identified in *Platanus*. Like other pollen proteins, *Platanus* pollen allergen can cause allergic effects, by adhering to the fine particles and entering the body through the respiratory tract. But there is a lack of detailed observation and research on the mode and pathway of release of allergens in the interior of the pollen grains. This research mainly established rapid and simple detection method, and analyzed the influence of different treatments on the release of the contents from pollen grains. Furthermore, it would determine the method and condition of *Platanus* pollen allergen release and accumulate date for the study of pollen allergy mechanisms.

**Keywords** SPPs; pollen allergy; *Platanus*; hydration

二球悬铃木(*Platanus hispanica*)属于风媒花被子植物,其花粉成熟后通过风力吹散后飘浮于空气中,成为空气中主要的致敏原之一<sup>[1-4]</sup>。在对豚草花粉致敏原释放的研究中发现,花粉中的致敏原蛋白主要通过微小直径的膜包裹形成花粉微颗粒(subpollen particles, SPPs)的形式释放<sup>[5-6]</sup>。在潮湿的空气条件

下或下雨时,花粉中的内容物释放量会显著增加,从而增加进入空气中的花粉致敏原的数量<sup>[7-8]</sup>。此外,大气中的污染物也被报道能影响花粉变应原的致敏特性<sup>[9-11]</sup>。为了解悬铃木花粉中是否也存在类似的过程,我们通过对花粉水合处理后,进行显微观察和微颗粒粒径分析,并对不同条件处理的花粉中SPPs

收稿日期: 2017-03-17 接受日期: 2017-07-07

国家自然科学基金(批准号: 21477073)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-66132344, E-mail: zsm79@shu.edu.cn

Received: March 17, 2017 Accepted: July 7, 2017

These work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.21477073)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-66132344, E-mail: zsm79@shu.edu.cn

网络出版时间: 2017-08-16 16:48:28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170816.1648.010.html>

的释放进行比较,以期建立悬铃木花粉SPPs释放观察与分析的快速简便方法,为后续的研究提供技术支持和数据积累。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

悬铃木花前3~5 d收集球形花序,室温条件下放置在锡箔纸上,待花粉释放时将其抖落,并收集到50 mL的离心管中,−20 °C冻存。

### 1.2 方法

**1.2.1 SPPs的释放和收集** 称取30 mg花粉并等分成3份,分别用5 mL不同的溶液(ddH<sub>2</sub>O、0.05 mol/L pH8.2的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>及1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)浸泡处理花粉,室温下放置1.5 h后,1 600 ×g离心5 min。收集上清液,13 000 ×g离心15 min。弃上清,沉淀用pH7.2的PBS(0.14 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.056 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)溶解,4 °C存放备用。

**1.2.2 SPPs颗粒粒径检测** 先用ddH<sub>2</sub>O和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.05 mol/L pH8.2)及1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分别浸泡处理悬铃木花粉2 h,利用移液器吹打成均匀悬浮液,然后吸取1 mL样品悬浮液,加入到1 L体积的ddH<sub>2</sub>O中,利用Mastersizer 3000激光衍射粒度分析仪进行颗粒粒径的检测,同时对粒径检测结果图中的峰图面积进行计算和比较分析SPPs的释放率。

**1.2.3 SPPs释放的观察以及花粉计数** ddH<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.05 mol/L pH8.2)及1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡处理2 h的

悬铃木花粉,加入FAA固定液(30%乙醇:冰醋酸:甲醛=8:1:1)固定15 min,轻柔吹吸悬浮后,制成临时水封片,利用莱卡DM2500显微镜进行观察和拍照,并对破裂释放SPPs的花粉数量进行计数和统计。

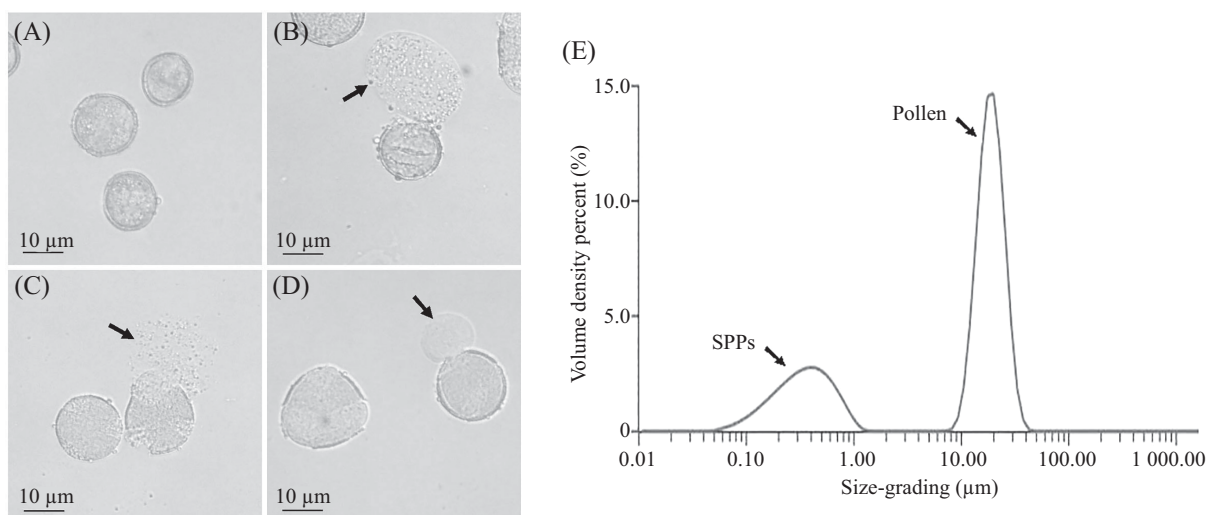
**1.2.4 SPPs中蛋白的检测** 利用植物蛋白抽提试剂盒[Plant Total Protein Extraction Kit, 生工生物工程(上海)股份有限公司]抽提悬铃木花粉以及所收集到的SPPs样品中的总蛋白,利用SDS-PAGE凝胶电泳比较分析蛋白的含量和种类。

**1.2.5 统计分析** 每个样品在10倍显微镜下随机选取50个视野,对其中释放SPPs的花粉数量进行统计。所得数据均以平均值±标准差(S.D.)的方式表示,每组实验取5个样本进行统计,每个实验作3次独立重复。并通过STATISTICA 7软件(Stasoft公司,美国)进行单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 悬铃木花粉水合破裂后主要以粒径为0.1~1 μm的SPPs形式被释放

对处理后花粉样品的光学显微观察发现,花粉被水合处理2 h后,许多花粉颗粒开始破裂并释放出大量的微小球状颗粒。这种破裂的方式不仅包括膜的破裂,还伴随不同程度花粉壁的破碎,这与正常的花粉管生长有着显著的差别(图1A~图1D)。在花粉释放SPPs的过程中,SPPs是以一种膜包裹的小泡结

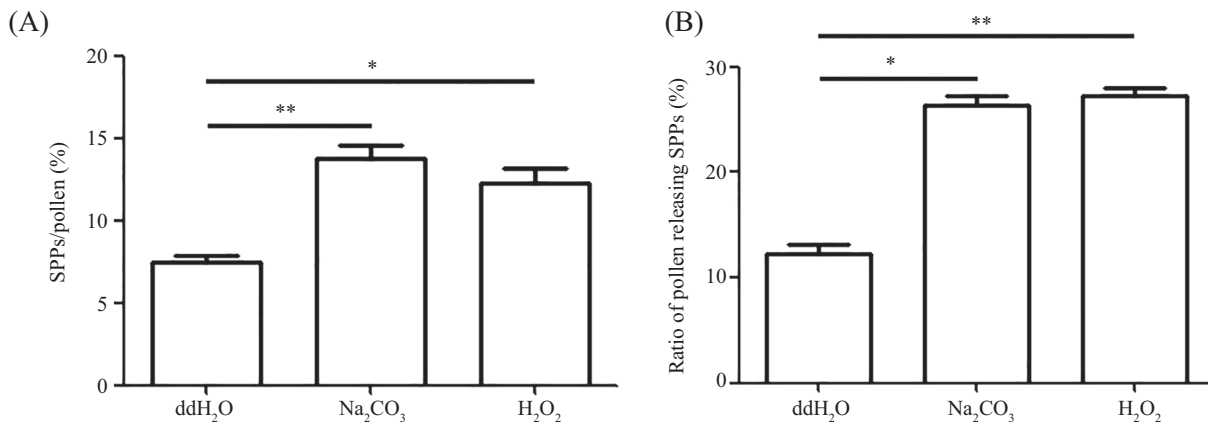


A: 完整花粉; B: 箭头表示ddH<sub>2</sub>O处理花粉释放SPPs; C: 箭头表示Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>处理花粉释放SPPs; D: 箭头表示H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理花粉释放SPPs; E: SPPs和花粉粒径的测量。

A: intact pollen; B: the arrow indicated that SPPs released from ddH<sub>2</sub>O treated pollen; C: the arrow indicated that SPPs released from Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> treated pollen; D: the arrow indicated that SPPs released from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated pollen; E: measurement of SPPs and pollen grain size.

图1 花粉中SPPs释放的观察以及粒径检测

Fig.1 Observation of SPPs releases and particle size measurement



A: SPPs颗粒数量与花粉颗粒数量的比率分析; B: 释放SPPs的花粉的比率。n=15, \*P<0.05, \*\*P<0.01。

A: the ratio of the number of SPPs to the number of pollen grains; B: ratio of pollen release SPPs. n=15, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

图2 不同处理对SPPs释放的影响

Fig.2 Effects of different treatments on SPPs release

构存在的, 直径大小在0.1~1 μm之间, 而花粉的直径大小在8~50 μm之间(图1E)。

## 2.2 环境pH值及氧化剂会影响SPPs的释放

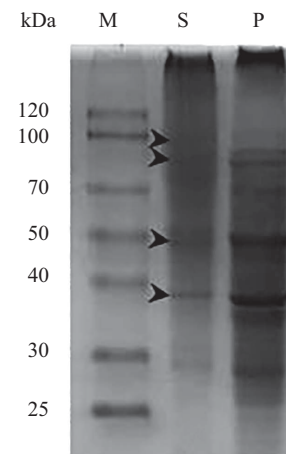
统计SPPs的释放数量显示, 经ddH<sub>2</sub>O、1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.05 mol/L pH8.2)水溶液处理过的花粉中SPPs的释放量确有增加, SPPs颗粒在被检总样品中的含量分别达到了7%、14%和12%(图2A)。考虑到花粉中SPPs的释放以及后续的回收和处理中可能因SPPs颗粒的破损会使统计测量的结果产生误差, 因此, 我们又对破裂花粉数量或比例进行了统计分析。在显微镜下对破裂花粉数量进行计数, 结果发现, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.05 mol/L pH8.2)水溶液处理后的花粉中释放SPPs的比率从ddH<sub>2</sub>O处理中的12.2%分别上升到了26.4%和27.3%(图2B)。这说明, 在对花粉水合处理过程中, 偏碱的pH值和较强的氧化性对SPPs的释放存在促进效应。

## 2.3 SPPs中包含了花粉内的部分蛋白

SPPs作为花粉中释放出来的微小颗粒, 其内部是否含有蛋白, 这种蛋白与花粉之间到底存在怎样的联系?为了弄清这一问题, 我们又将SPPs和花粉进行了总蛋白的抽提和电泳分析。结果发现, SPPs中含有花粉中绝大部分的蛋白成分, 其中一些高分子量的蛋白以及含量较多的蛋白尤其明显(图3)。这说明花粉的内容物(主要是细胞内的胞质蛋白)主要是通过SPPs的形式得以从花粉中被释放出来的。

## 3 讨论

花粉致敏原蛋白在草本植物和木本植物中都



M: 蛋白标记; S: SPPs中抽提的蛋白样品; P: 花粉中抽提的蛋白样品。箭头用于标注SPPs和花粉中都存在的主要蛋白条带。

M: protein marker; S: protein sample extracted from SPPs; P: protein sample extracted from pollens. The arrowheads were used to mark the major protein bands found in SPPs and pollens.

图3 SPPs及花粉的蛋白SDS-PAGE电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis analysis of protein extracted from SPPs and pollens

有广泛的报道, 例如, 葎草中的profilin蛋白、豚草中的Amb-1(Ambrosia allergen 1)蛋白以及悬铃木中的Pla a1/2/3蛋白<sup>[12-14]</sup>, 这些致敏原蛋白都无一例外存在于花粉细胞胞质中。因此, 在引起花粉过敏症时, 上述的致敏原蛋白就必须要从花粉中被释放出来才能引发相应的过敏反应。在对豚草的研究中人们已经证实了花粉通过SPPs实现致敏原的释放。本研究对水合处理的花粉进行观察, 结果证实悬铃木中也存在花粉释放SPPs的过程。将SPPs与花粉中所含的蛋白进行比较分析发现, SPPs中含有花粉中的主要

蛋白种类, 因此可推测, 悬铃木花粉致敏蛋白可以通过SPPs释放到环境中去, 成为引发花粉致敏的诱因。此外, 通过改变水合处理溶液的pH值和氧化性, 发现花粉释放SPPs的过程受到了显著影响, 高pH值和氧化性都能不同程度地促进花粉释放SPPs。环境污染常常会带来大气和雨水中pH值以及氧化物质的变化, 而这些变化很可能会通过增加花粉释放SPPs从而加剧花粉过敏病症的爆发。

另外, 在我们的研究过程中发现, 通过低浓度的FAA固定液对水合处理后的花粉进行固定, 能使花粉释放SPPs的过程被较好地保存下来, 对于后续的观察和计数也十分方便。

### 参考文献 (References)

- Alcazar P, Carinanos P, de Castro C, Guerra F, Moreno C, Dominguez-Vilches E, *et al.* Airborne plane-tree (*Platanus hispanica*) pollen distribution in the city of Cordoba, South-western Spain, and possible implications on pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004; 14(3): 238-43.
- 孙秀珍, 刘 昀, 周 玎, 李东繁. 悬铃木属花粉的纯化及免疫活性分析. *中国现代医学杂志*(Sun Xiouzhen, Liu Yun, Zhou Ding, Li Dongfan. Purification and immunocompetence analysis of *Platanus acerifoloid* of wild pollen allergen. *China Journal of Modern Medicine*) 2005; 15(20): 3050-3.
- 孙立英, 郭胤士, 王怡玮, 何海娟, 乔秉善, 王良录, 等. 上海中心城区气传花粉调查. *中华临床免疫和变态反应杂志*(Sun Liying, Guo Yinshi, Wang Yiwei, He Haijuan, Qiao Bingshan, Wang Lianglu, *et al.* Analysis of airborne pollens in Shanghai downtown area. *Chinese Journal of Allergy & Clinical Immunology*) 2012; 6(3): 186-90.
- Farnaz S, Mojtaba S, Maliheh M, Abdol-Reza V. Quantification of Pla or 3, a *Platanus orientalis* allergen, grown under different environmental conditions, by sandwich ELISA. *Rep Biochem Mol Biol* 2016; 5(1): 40-5.
- Bacsi A, Choudhury BK, Dharajiya N, Sur S, Boldogh I. Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(4): 844-50.
- Pazmandi K, Kumar BV, Szabo K, Boldogh I, Szoor A, Vereb G, *et al.* Ragweed subpollen particles of respirable size activate human dendritic cells. *PLoS One* 2012; 7(12): e52085.
- Behrendt H, Becker WM. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Curr Opin Immunol* 2001; 13(6): 709-15.
- Ghani A, Ciappetta S, Gentili R, Asero R, Citterio S. Is ragweed pollen allergenicity governed by environmental conditions during plant growth and flowering? *Sci Rep* 2016; 6: 30438.
- Behrendt H, Becker WM, Fritzsche C, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Friedrichs KH, *et al.* Air pollution and allergy: Experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113(1/2/3): 69-74.
- Pasqualini S, Tedeschini E, Frenguelli G, Wopfner N, Ferreira F, D'Amato G, *et al.* Ozone affects pollen viability and NAD(P)H oxidase release from *Ambrosia artemisiifolia* pollen. *Environ Pollut* 2011; 159(10): 2823-30.
- D'Amato G, Pawankar R, Vitale C, Lanza M, Molino A, Stanzola A, *et al.* Climate change and air pollution: Effects on respiratory allergy. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016; 8(5): 391-5.
- Jeong KY, Han IS, Choi SY, Lee JH, Lee JS, Hong CS, *et al.* Allergenicity of recombinant profilins from Japanese hop, *Humulus japonicus*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013; 23(5): 345-50.
- Kim JH, Choi HJ, Oh CH, Oh JW, Han JS. PLD1 activation mediates Amb a1-induced Th2-associated cytokine expression via the JNK/ATF-2 pathway in BEAS-2B cells. *Cell Immunol* 2015; 298(1/2): 9-17.
- Fernandez-Gonzalez M, Guedes A, Abreu I, Rodriguez-Rajo FJ. Pla a<sub>1</sub> aeroallergen immunodetection related to the airborne *Platanus* pollen content. *Sci Total Environ* 2013; 463-464: 855-60.