南京农业大学学报 2026,49(4):910-919
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202503026

郭欣冉,卢晓翠,陆琦缘,等.乳酸菌发酵及添加益生元对大豆蛋白调控肠道屏障和诱导口服耐受的影响[J]. 南京农业大学学报,2026,49(4):910-919.
Guo X R,Lu X C,Lu Q Y,et al. Effects of lactic acid bacteria fermentation and prebiotic supplementation on soy protein's regulation of intestinal barrier and induction of oral tolerance[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(4):910-919.

乳酸菌发酵及添加益生元对大豆蛋白调控肠道屏障和诱导口服耐受的影响

郭欣冉,卢晓翠,陆琦缘,李伟,芮昕*

(南京农业大学食品科学技术学院,江苏 南京 211800)

摘要:[**目的**]本文旨在研究乳酸菌发酵及益生元添加对大豆蛋白影响肠道屏障稳态及调控免疫耐受的作用。[**方法**]采用乳酸菌发酵大豆分离蛋白(SPI)制备发酵大豆蛋白(FSPI),分别添加 5 种益生元:低聚果糖(FOS)、低聚木糖(XOS)、水苏糖(SOS)、低聚半乳糖(GOS)和低聚异麦芽糖(IMO),共发酵制备益生元组样品。通过体内动物试验比较不同样品对肠道屏障稳态的维持作用以及口服免疫耐受的诱导作用。试验分为空白对照组(PBS-)、致敏组(PBS+)和 7 个耐受处理组(SPI、FSPI、F-FOS、F-XOS、F-SOS、F-GOS 和 F-IMO)。通过测定组胺、小鼠肥大细胞蛋白酶-1(mMCP-1)以及辅助型 T 细胞 Th1、Th2、Th17 型细胞因子评价小鼠的免疫反应性;通过测定肠道组织学、紧密连接(TJ)蛋白表达水平评价小鼠肠道屏障完整性;通过测定调节性 T 细胞(T_{reg})、树突状细胞表面标志物(CD103、CD80 和 CD86)以及白细胞介素 10(IL-10)、转化生长因子 β(TGF-β)和视黄酸(RA)等免疫耐受相关因子的表达水平评价不同样品的耐受诱导作用。[**结果**]与 PBS+组和 SPI 组相比,FSPI 与益生元处理均可显著下调组胺、mMCP-1、Th2 和 Th17 型细胞因子的表达水平($P<0.05$),从而降低小鼠的免疫反应性;益生元处理可显著上调 Th1 型细胞因子的表达($P<0.05$),有效恢复大豆蛋白引发的 Th1/Th2 向 Th2 方向偏移的失衡现象;FSPI 与益生元处理组的肠绒毛损伤程度均减轻,肠绒毛高度和隐窝深度显著增加($P<0.05$),有效缓解了食物过敏导致的肠道绒毛损伤现象,但 FSPI 处理上调 TJ 蛋白和诱导免疫耐受的作用较弱;F-XOS 处理可显著上调 *Claudin 1*、*ZO-1* 和 *Occludin* mRNA 的表达水平($P<0.05$)。此外,F-FOS 和 F-XOS 可通过上调耐受细胞因子(IL-10、TGF-β 和 RA)和 CD103 的表达,下调 CD80 和 CD86 的表达,促进 T_{reg} 细胞的生成,从而诱导口服耐受。[**结论**]FSPI 可降低小鼠对大豆蛋白的免疫反应性,维持小鼠肠道屏障完整性;添加益生元共发酵物后可进一步诱导口服耐受,F-FOS 和 F-XOS 的效果最佳。

关键词:大豆蛋白;乳酸菌发酵;益生元;肠道屏障;口服耐受
中图分类号:TS214.2 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-2030(2026)04-0910-10

Effects of lactic acid bacteria fermentation and prebiotic supplementation on soy protein's regulation of intestinal barrier and induction of oral tolerance

GUO Xinran,LU Xiaocui,LU Qiyuan,LI Wei,RUI Xin*

(College of Food Science and Technology,Nanjing Agricultural University,Nanjing 211800,China)

Abstract:[**Objectives**]This study aimed to investigate the effects of lactic acid bacteria(LAB)fermentation and prebiotic addition on soy protein in maintaining intestinal barrier homeostasis and regulating immune tolerance. [**Methods**]Fermented soy protein(FSPI)was prepared by fermenting soy protein isolate(SPI)with LAB. Additionally,five different prebiotics,including fructooligosaccharides(FOS),xylooligosaccharides(XOS),stachyose(SOS),galactooligosaccharides(GOS),and isomaltooligosaccharides(IMO),were co-fermented with FSPI to create prebiotic-treated samples. *In vivo* animal experiment was conducted to compare the effects of different samples on intestinal barrier homeostasis and the induction of oral immune tolerance. The experiment included a negative control group(PBS-),an allergen-sensitized group(PBS+),and seven tolerance treatment groups,namely SPI,FSPI,F-FOS,F-XOS,F-SOS,F-GOS,and F-IMO groups. Immune responsiveness in mice was evaluated based on histamine level,mouse mast cell protease-1(mMCP-1),and the expression of cytokines associated with T-helper Th1,Th2 and Th17 cells. The intestinal barrier integrity was assessed through histological analysis and the expression of tight junction(TJ)proteins. The induction of immune tolerance was comprehensively evaluated by measuring regulatory T cells(T_{reg}),dendritic cell surface markers(CD103,CD80,and CD86),and immune tolerance-related factors,including interleukin-10(IL-10),transforming growth factor-β(TGF-β),and retinoic acid(RA).

收稿日期:2025-03-18
基金项目:国家自然科学基金项目(32372440);江苏省农业科技自主创新项目[CX(24)3121]
作者简介:郭欣冉,硕士研究生。* 通信作者:芮昕,教授,研究方向为植物基蛋白、食品微生物,E-mail:ruix@njau.edu.cn。

[**Results**] Compared to the PBS + and SPI groups, FSPI and prebiotic treatments significantly reduced the expression levels of histamine, mMCP-1, Th2 and Th17 cytokines ($P < 0.05$), thereby reducing immune reactivity in mice. The prebiotic treatments significantly upregulated Th1 cytokines ($P<0.05$), effectively restoring the Th1/Th2 imbalance caused by soy protein allergy, which tends to shift towards the Th2 response. The FSPI and prebiotic-treated groups reduced intestinal villus damage, with significant increase in villus height and crypt depth ($P<0.05$), mitigating food allergy-induced intestinal villus injury. However, the FSPI group showed weaker effects in upregulating TJ proteins and inducing immune tolerance compared to prebiotic treatments. Notably, F-XOS significantly upregulated the mRNA expressions of *Claudin-1*, *ZO-1*, and *Occludin* ($P<0.05$). Furthermore, F-FOS and F-XOS promoted oral tolerance induction by increasing the expressions of tolerance-related cytokines (IL-10, TGF-β, and RA) and CD103, while downregulating CD80 and CD86, thereby facilitating the differentiation of T_{reg} cells. [**Conclusions**] FSPI could reduce the immune reactivity of mice to soy protein and maintain intestinal barrier integrity. The addition of prebiotics during co-fermentation further enhanced oral tolerance induction, with F-FOS and F-XOS demonstrating the most significant effects.

Keywords: soy protein; lactic acid bacteria fermentation; prebiotic; intestinal barrier; oral tolerance

大豆蛋白是全球八大食品过敏原之一,由此引发的过敏反应已成为重要的公共卫生问题。统计数据显示,约 0.5%的普通人群及 12.9%的过敏儿童对大豆蛋白过敏[1-3]。近年来,大豆蛋白过敏的发病率持续上升。因此,加强对大豆蛋白过敏机制的研究以及探索有效的防治策略至关重要。乳酸菌发酵是一种有效降低大豆蛋白过敏性的方法。发酵处理导致大豆蛋白二级结构 α-螺旋丧失、三级结构展开以及聚集体的形成,促进了 α-螺旋和 β-折叠结构中过敏原表位的降解,从而减轻大豆过敏[4-5]。乳酸菌发酵大豆蛋白的抗原性可降低 83.8%~94.8%[6];添加益生元可降低乳酸菌发酵大豆蛋白抗原性与 IgE 免疫反应性[7]。这些研究表明,乳酸菌发酵与益生元添加可有效降低大豆蛋白的致敏性,在低敏大豆食品加工中具有重要潜力。

大豆蛋白过敏机制与肠道屏障的损伤密切相关。健康的小肠屏障具有完整的外层物理层和内部免疫层,不仅能够有效预防过敏原的侵入和过敏反应的发生,还能通过诱导调节性 T 细胞(T_{reg})的分化和免疫抑制性细胞因子(如 IL-10 和 TGF-β)的分泌,促进口服耐受的建立,从而在限制致敏原进入固有层与建立耐受之间保持微妙的平衡。研究发现,大豆蛋白过敏的小鼠表现出典型的肠道屏障损伤特征,如绒毛高度降低、隐窝深度和黏液层厚度减少等[8-9]。Zhao 等[10]利用猪肠上皮细胞(IPEC-J2)模型,发现经大豆蛋白处理后的 IPEC-J2 细胞中 Claudin-3、Occludin 和 ZO-1 等紧密连接蛋白的表达量显著降低。Xu 等[11]使用小鼠肠上皮细胞观察到了类似的结果。这些结果表明,大豆蛋白会破坏肠道屏障的完整性并增加其通透性,使致敏原更易进入固有层并引发过敏反应。因此,维持肠道屏障的完整性对于大豆蛋白过敏的控制及诱导口服耐受具有重要的意义。目前,尚未见乳酸菌发酵与益生元添加缓解大豆蛋白引发肠道屏障损伤、重建过敏与耐受平衡的相关报道。

因此,本研究针对乳酸菌发酵及益生元添加的大豆蛋白对肠道屏障及口服耐受的影响展开研究,并构建小鼠耐受模型,评估小鼠的免疫反应性、肠道屏障完整性以及不同样品的口服耐受诱导作用,为低致敏性大豆蛋白食品、功能性植物蛋白食品及肠道健康相关产品的开发提供理论基础和技术参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

大豆购自黑龙江省大豆生产基地。植物乳植杆菌 B1-6(*Lactiplantibacillus plantarum* B1-6)分离自中国新疆维吾尔自治区的传统谷物饮品 Boza。氯化钠、葡萄糖、正己烷为分析纯,购自南京寿德生物科技有限公司;低聚果糖(FOS)、低聚木糖(XOS)、水苏糖(SOS)、低聚半乳糖(GOS)和低聚异麦芽糖(IMO)的纯度均 ≥ 99%,购自北京索莱宝科技有限公司。3~4 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,体重(15±0.5)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物的护理和使用遵循国家实验动物福利伦理的相关规定,试验方案获南京农业大学实验动物福利与伦理中心批准(批准号:NJAU.No20240313042)。AIN-93G 饲料购自上海书玉生物科技有限公司;组胺、mMCP-1、白细胞介素 17A(IL-17A)、IL-4、IFN-γ、IL-10、TGF-β、RA ELISA 试剂盒购自美国 Thermo 公司;MHC Ⅱ-FITC、CD11c-APC、CD80-PE-Cyanine7、CD86-PE、CD103-PE 购自美国 eBioscience 公司;HiScript Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Low ROX Premixed)试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;GAPDH、Claudin-1、ZO-1 和 Occludin 购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 大豆分离蛋白(SPI)、发酵大豆蛋白(FSPI)和添加益生元的发酵大豆蛋白的制备

SPI、FSPI 和添加益生元的发酵大豆蛋白的制备采用文献[12-14]的方法。SPI 溶液的浓度为 30 g·L^{-1}，*L. plantarum* B1-6 的接种量为 3.0%(体积分数)，添加的无菌葡萄糖溶液为 2.0%(体积分数)。益生元浓度的设定参考 Guo 等[7]的方法。通过比较不同益生元添加量(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%和 2.5%，体积分数)，发现益生元添加量为 1.0%时菌株发酵特性最佳，因此本研究选取 1.0%作为益生元的添加量。SPI、FSPI 和添加益生元的发酵大豆蛋白的具体制备流程如图 1 所示。

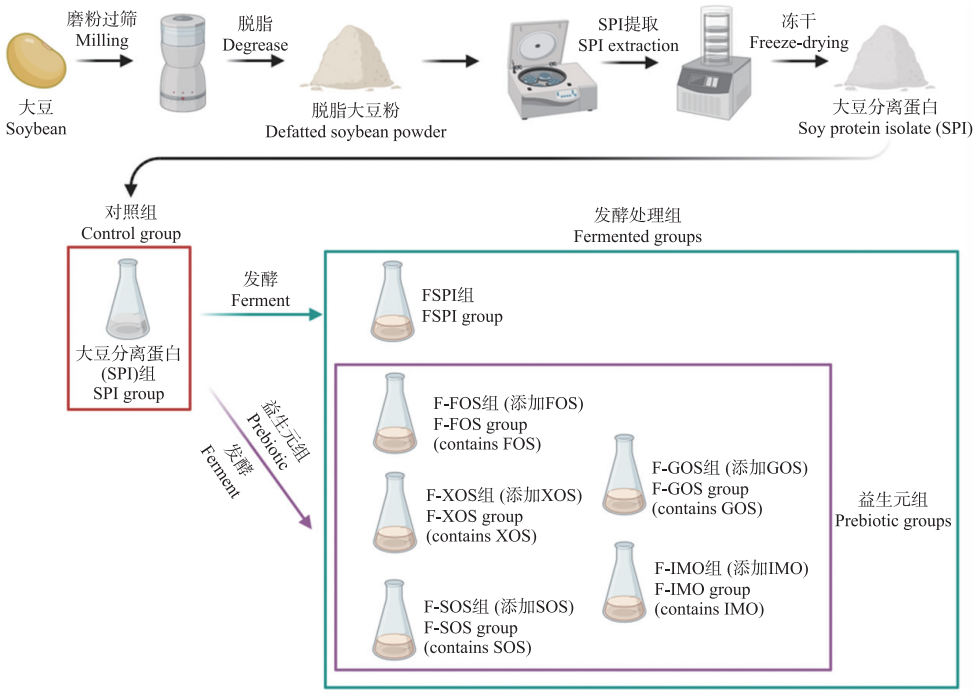


图 1 SPI、FSPI 及添加益生元的发酵大豆蛋白的制备过程

Fig. 1 Preparation process of SPI, FSPI and fermented soy protein added with prebiotics

FSPI：发酵大豆蛋白 Fermented soy protein；FOS：低聚果糖 Fructooligosaccharides；XOS：低聚木糖 Xylooligosaccharides；GOS：低聚半乳糖 Galactooligosaccharides；SOS：水苏糖 Stachyose；IMO：低聚异麦芽糖 Isomaltooligosaccharides. 下同 The same as follows.

1.3 小鼠耐受模型构建

BALB/c 小鼠随机分为 9 组，每组 6 只，饲养于南京农业大学实验动物中心的屏障设施中。室温控制在(25±1)℃，相对湿度为(40±10)%，并维持 12 h 光照/12 h 黑暗的循环。小鼠自由摄食不含大豆的纯化饲料 AIN-93G。小鼠耐受模型基于 Liu 等[15]的方法构建，并根据试验条件进行了适当调整，如图 2 所示。54 只 BALB/c 小鼠在无病原体条件下适应 1 周。耐受阶段：在 1、2、3、8、9 和 10 d 分别灌胃不同样品：

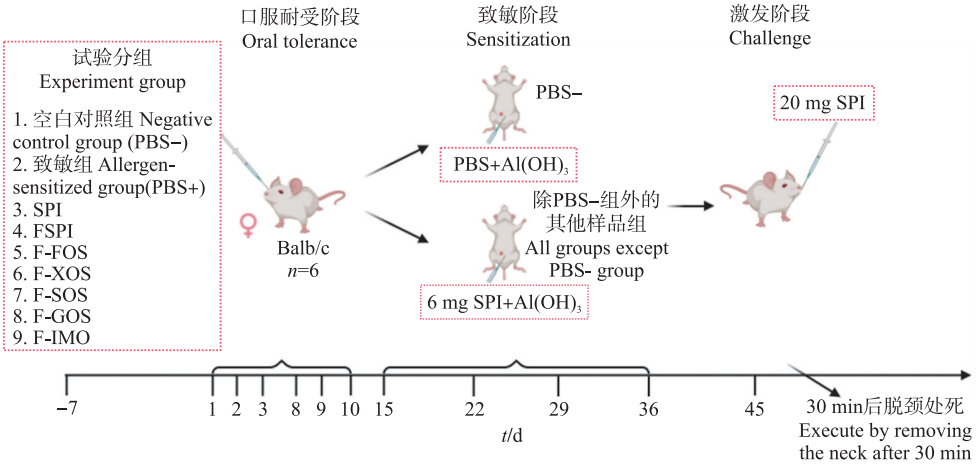


图 2 小鼠耐受模型分组和构建

Fig. 2 Grouping and construction of mice tolerance model

0.2 mL PBS(PBS-空白对照组和 PBS+致敏组);0.2 mL 含有 6 mg SPI 的 PBS(SPI 组);均为 0.2 mL 的 FSPI(FSPI 组)、F-FOS(F-FOS 组)、F-XOS(F-XOS 组)、F-SOS(F-SOS 组)、F-GOS(F-GOS 组)和 F-IMO(F-IMO 组)。致敏阶段:在试验 15、22、29 和 36 d,除 PBS-组(腹腔注射溶解在 0.2 mL PBS 中的 1 mg 氢氧化铝佐剂)外,其他组均通过腹腔注射 0.2 mL 含有 1 mg 氢氧化铝佐剂和 6 mg SPI 的 PBS 溶液。激发阶段:在试验 45 d,所有小鼠均被灌胃 20 mg SPI。30 min 后对小鼠进行眼球取血。脱颈处死后解剖,取空肠、肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes,MLN)和脾脏进行后续试验。

1.4　致敏性及肠道屏障完整性评估

1.4.1　血清组胺和 mMCP-1 测定　根据 Meng 等[16]的方法,使用 ELISA 试剂盒测定组胺和 mMCP-1 水平。

1.4.2　脾脏细胞因子测定　根据 Shao 等[17]的方法,取脾脏组织制备匀浆液,使用 ELISA 试剂盒测定 IL-4、IL-17A 和 IFN-γ 的水平。

1.4.3　空肠组织病理学观察　取约 1 cm 的空肠组织,经 4%(体积分数)的福尔马林溶液固定、脱水、石蜡包埋后,制成 4 μm 厚的组织切片并使用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色。在显微镜下随机选择 5 个视野进行观察分析,以评估空肠绒毛的完整性、绒毛高度和隐窝深度。

1.4.4　紧密连接蛋白 mRNA 测定　采用 Xiao 等[18]的方法进行。从 25~30 mg 空肠组织中提取总 RNA,并使用 HiScript Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录合成 cDNA。使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix(Low ROX Premixed)试剂盒进行逆转录定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)。目的基因的相对 mRNA 表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。以 *GAPDH* 作为内参基因。使用的引物如表 1 所示。

表 1　RT-qPCR 的引物序列

Table 1　Primer sequences used for RT-qPCR

基因 Gene	正向引物序列 Forward primer sequence(5′→3′)	反向引物序列 Reverse primer sequence(5′→3′)	产物大小/bp Product size	基因登录号 GenBank accession No.
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123	NM_001289726.2
Claudin-1	TGCCCCAGTGGAAGATTTACT	CTTTGCGAAACGCAGGACAT	107	NM_016674.4
ZO-1	GCGGATGGTGCTACAAGTGATG	GCCTTCTGTATCTGTGTCTTCATAGTC	138	XM_006540779.5
Occludin	GGCGGCTATGGAGGCTATGG	CTAAGGAAGCGATGAAGCAGAAGG	106	NM_008756.2

1.5　口服耐受性评估

1.5.1　MLN 细胞中细胞因子和代谢物测定　取 MLN 制备匀浆液,使用 ELISA 试剂盒测定 IL-10、TGF-β 和 RA 的水平。

1.5.2　MLN 中 T_{reg} 和树突状细胞(DC)表面标志物分析　从 MLN 中获得单细胞悬液,并在黑暗中用 CD4-FITC 和 CD25-APC 抗体孵育 30 min,检测 T_{reg} 表达量。孵育后,细胞用缓冲液洗涤 3 次。使用 Foxp3 染色缓冲液试剂盒固定和渗透细胞,随后进行 Foxp3-PE 的细胞内染色。将 MLN 细胞悬液与 MHC Ⅱ-FITC、CD11c-APC、CD80-PE-Cyanine7、CD86-PE 和 CD103-PE 孵育 30 min,测量 DC 细胞表面标志物,并使用流式细胞仪(CytoFLECX 型,美国 Beckman Coulter 公司)进行分析。

1.6　数据处理与分析

所有试验均重复 3 次,数据均以平均值±标准误表示。采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),Duncan's 检验用于显著性分析。使用 GraphPad Prism 10.0 软件绘制图表。

2　结果与分析

2.1　乳酸菌发酵及添加益生元的大豆蛋白对小鼠免疫反应的影响

2.1.1　对小鼠血清组胺和 mMCP-1 水平的影响　由图 3 可知,与 PBS-组相比,PBS+和 SPI 组的小鼠血清组胺和 mMCP-1 水平显著升高($P<0.01$)。与 SPI 组相比,所有发酵样品处理组小鼠血清组胺和 mMCP-1 水平均显著下调($P<0.01$)。其中,FSPI 组的小鼠血清组胺和 mMCP-1 水平分别下调 49.6%和 33.3%。益生元处理组对组胺和 mMCP-1 水平的下调作用较 FSPI 组更为显著($P<0.01$),其中,F-XOS 组的组胺和 mMCP-1 水平的下调幅度最大,分别为 75.8%和 68.1%,与 PBS-组的水平相当($P>0.05$);其次为 F-FOS 组,mMCP-1 下调幅度为 62.6%($P<0.05$);F-SOS、F-GOS 和 F-IMO 组的组胺和 mMCP-1 水平相当($P>0.05$),

下调幅度均为 53.3%~56.5%。试验结果证实,益生元添加可显著下调过敏小鼠血清组胺和 mMCP-1 水平,其中 F-FOS 和 F-XOS 的效果最好。

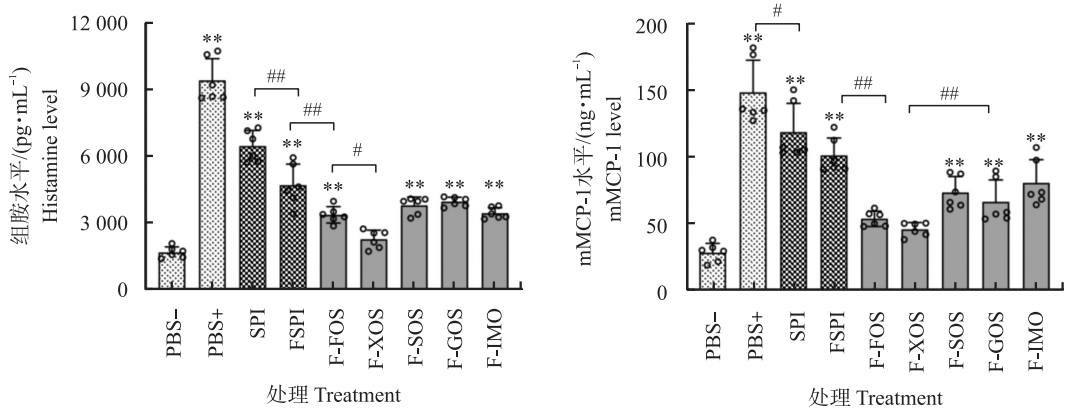


图 3 小鼠组胺和 mMCP-1 水平

Fig. 3 Histamine and mMCP-1 levels in mice

*、** 表示与 PBS−组相比存在显著差异($P<0.05$,$P<0.01$);#、## 表示样本之间存在显著差异($P<0.05$,$P<0.01$)。下同。

*, ** indicate significant differences compared to the PBS− group($P<0.05$, $P<0.01$); #, ## indicate significant differences between samples($P<0.05$, $P<0.01$). The same below.

2.1.2 对小鼠脾细胞中 Th1/Th2/Th17 型细胞因子水平的影响 由图 4 可知,与 PBS−组相比,PBS+与 SPI 组 Th1 型 IFN-γ 水平显著降低($P<0.01$),Th2 型 IL-4 和 Th17 型 IL-17A 水平显著升高($P<0.01$)。与 SPI 组相比,FSPI 处理对 IFN-γ 的上调作用不显著,但显著抑制了 IL-4 和 IL-17A 的水平($P<0.01$),而各益生元处理组对 IFN-γ 的水平上调更为显著($P<0.01$),同时较 FSPI 组显著下调了 IL-4 和 IL-17A 的水平($P<0.01$)。其中,F-FOS 和 F-XOS 组的 IFN-γ 水平显著升高 40.1%($P<0.01$),IL-4 和 IL-17A 的水平显著降低(58.9%)至与 PBS−组相当($P>0.05$),表现出最为显著的免疫调节效应。结合 2.1.1 节的结果可知,F-FOS 和 F-XOS 能够显著下调过敏小鼠组胺、mMCP-1、IL-4 和 IL-17A 水平,并上调 IFN-γ 的水平,表明其可有效减轻小鼠的免疫反应性。

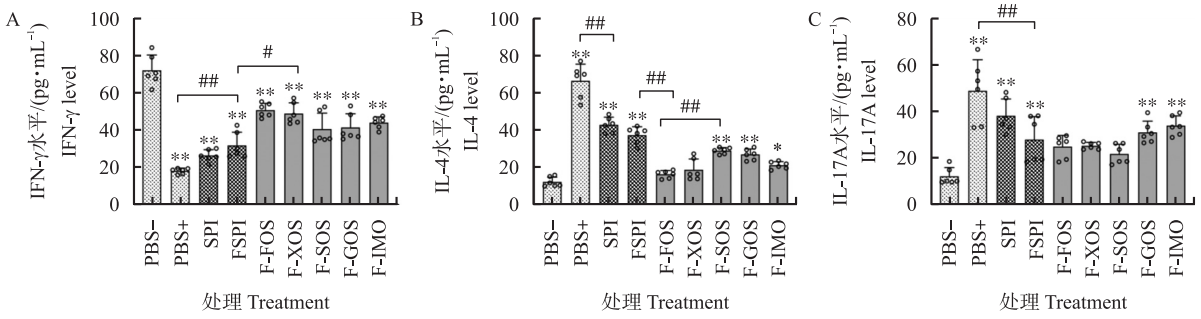


图 4 小鼠脾脏中 IFN-γ(A)、IL-4(B)和 IL-17A(C)的水平

Fig. 4 Levels of IFN-γ(A), IL-4(B) and IL-17A(C) in mice spleen

2.2 乳酸菌发酵及添加益生元的大豆蛋白对小鼠肠道屏障完整性的影响

2.2.1 对小鼠空肠组织形态的影响 由图 5 可见,PBS−组的小鼠空肠绒毛排列整齐、绒毛高度和隐窝深度较高。PBS+与 SPI 组肠绒毛损伤严重,其绒毛高度和隐窝深度也显著降低($P<0.01$)。与 SPI 组相比,FSPI 处理组较好地改善了肠绒毛损伤程度,但绒毛高度和隐窝深度无显著差异($P>0.05$)。益生元处理组(F-FOS、F-XOS、F-SOS、F-GOS 和 F-IMO)表现出完整的肠道屏障,绒毛高度和隐窝深度显著增加($P<0.01$)。其中,F-XOS 和 F-FOS 组绒毛高度和隐窝深度最高($P<0.01$),隐窝深度与 PBS−组无显著差异。

2.2.2 对小鼠肠道紧密连接蛋白 mRNA 表达的影响 由图 6 可知,与 PBS−组相比,PBS+和 SPI 组显著下调了 *Claudin 1*、*ZO-1* 和 *Occludin* mRNA 的表达($P<0.01$)。与 SPI 组相比,FSPI 组的 *Claudin 1* mRNA 表达量显著提高 86.2%($P<0.05$),但 ZO-1 和 *Occludin* mRNA 的表达无显著差异($P>0.05$)。F-XOS 和 F-GOS 组对 3 种紧密连接蛋白 mRNA 的表达水平均显著上调($P<0.05$)。其中,F-XOS 的 *ZO-1* 和 *Occludin* mRNA 水平升高至与 PBS−组无显著差异($P>0.05$)。F-FOS、F-SOS 和 F-IMO 组的紧密连接蛋白表达量较

低,样品之间的差异不显著(P>0.05)。这说明益生元处理组的上调作用与益生元的类型有关。

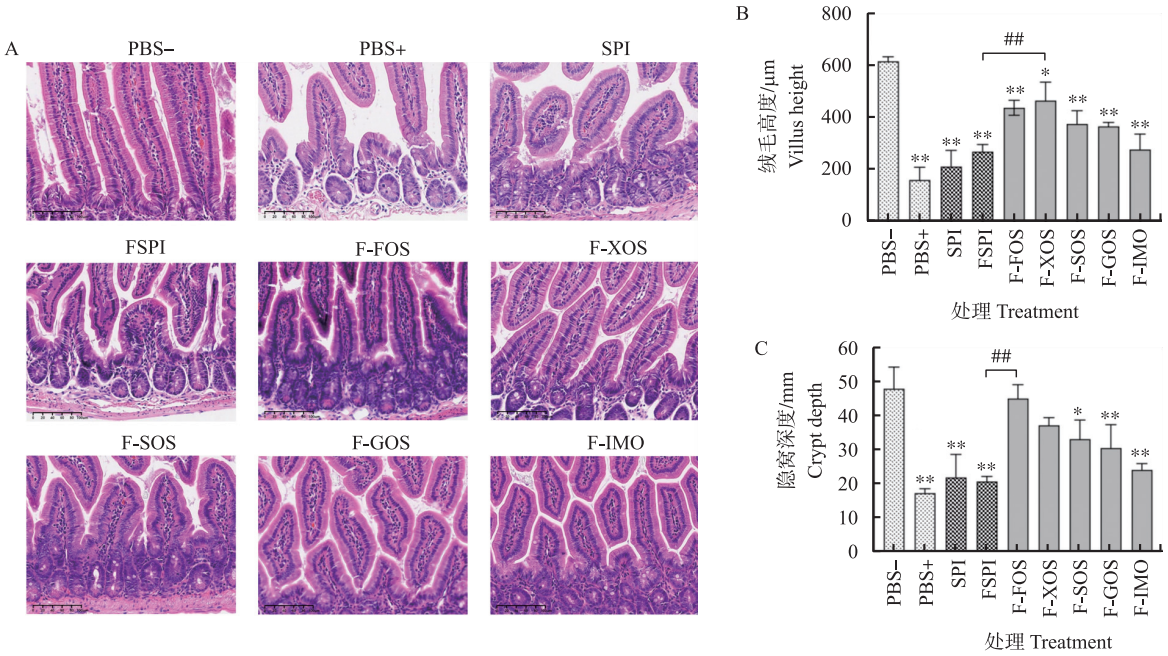


图 5　小鼠空肠组织(A)、绒毛高度(B)及隐窝深度(C)

Fig. 5　Jejunal tissue(A), villus height(B) and crypt depth(C) in mice

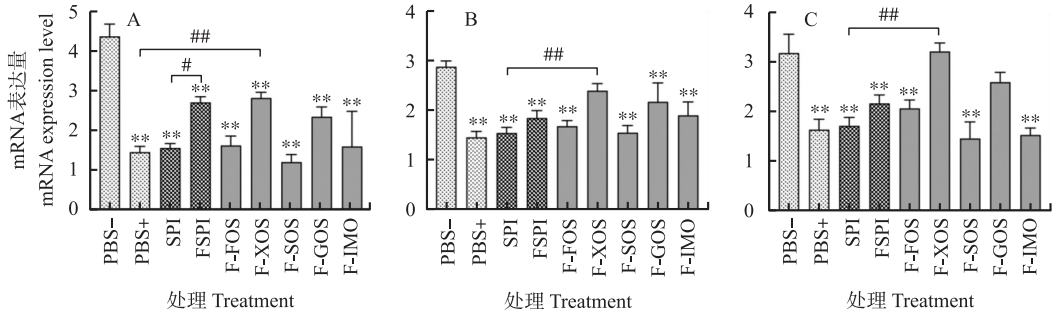


图 6　小鼠肠道紧密连接蛋白 *Claudin 1*(A)、*ZO-1*(B)及 *Occludin*(C)的 mRNA 表达量

Fig. 6　mRNA expression levels of intestinal tight junction proteins *Claudin 1*(A), *ZO-1*(B) and *Occludin*(C) in mice

2.3　乳酸菌发酵及添加益生元的大豆蛋白对口服耐受的诱导作用

2.3.1　对小鼠 MLN 中 T_{reg} 细胞表达水平的影响　由图 7 可知,与 PBS−组相比,PBS+和 SPI 组 MLN 中的 T_{reg} 细胞表达量显著降低(P<0.01)。与 SPI 组相比,FSPI 组的 T_{reg} 表达量无显著差异(P>0.05)。除 F-IMO 组外,其余益生元处理组的 T_{reg} 表达量显著增加(P<0.01)。其中,F-FOS 组的 T_{reg} 表达量显著提高了 41.8%(P<0.01);其次是 F-XOS、F-SOS 和 F-GOS 组,分别提高了 39.1%、34.5%和 38.2%(P<0.01)。

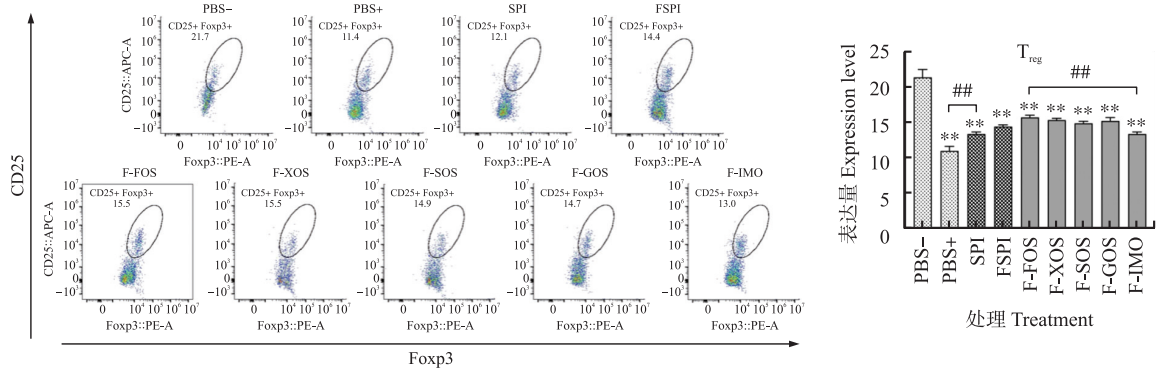


图 7　小鼠肠系膜淋巴结(MLN)中 T_{reg} 细胞表达水平

Fig. 7　Expression levels of T_{reg} cells in mice mesenteric lymph nodes(MLN)

2.3.2 对小鼠 MLN 中 DC 细胞表面标志物表达的影响 由图 8 可知，与 PBS−组相比，PBS+和 SPI 组的 DC 细胞表面标志物 CD103 的表达量显著降低(P<0.01)，而 CD80 和 CD86 的表达量显著增高(P<0.01)。与 SPI 组相比，各发酵处理组均显著上调了 CD103 的表达量(P<0.01)，同时显著下调了 CD80 和 CD86 的表达量(P<0.01)。其中，FSPI 处理组的 CD103 表达量上调 47.5%，CD80 和 CD86 的表达量分别下调 24.5%和 46.1%。F-FOS 和 F-XOS 组对 CD103 的上调作用较 FSPI 更显著(P<0.01)，分别上调 59.3%和 70.2%，且与 PBS−组无显著差异(P>0.05)；F-FOS、F-XOS 和 F-GOS 组的 CD80 和 CD86 表达量也显著降低至与 PBS−组相当(P>0.05)；其次是 F-SOS 和 F-IMO 组，但其 DC 细胞表面标志物表达量较 FSPI 组无显著差异(P>0.05)。

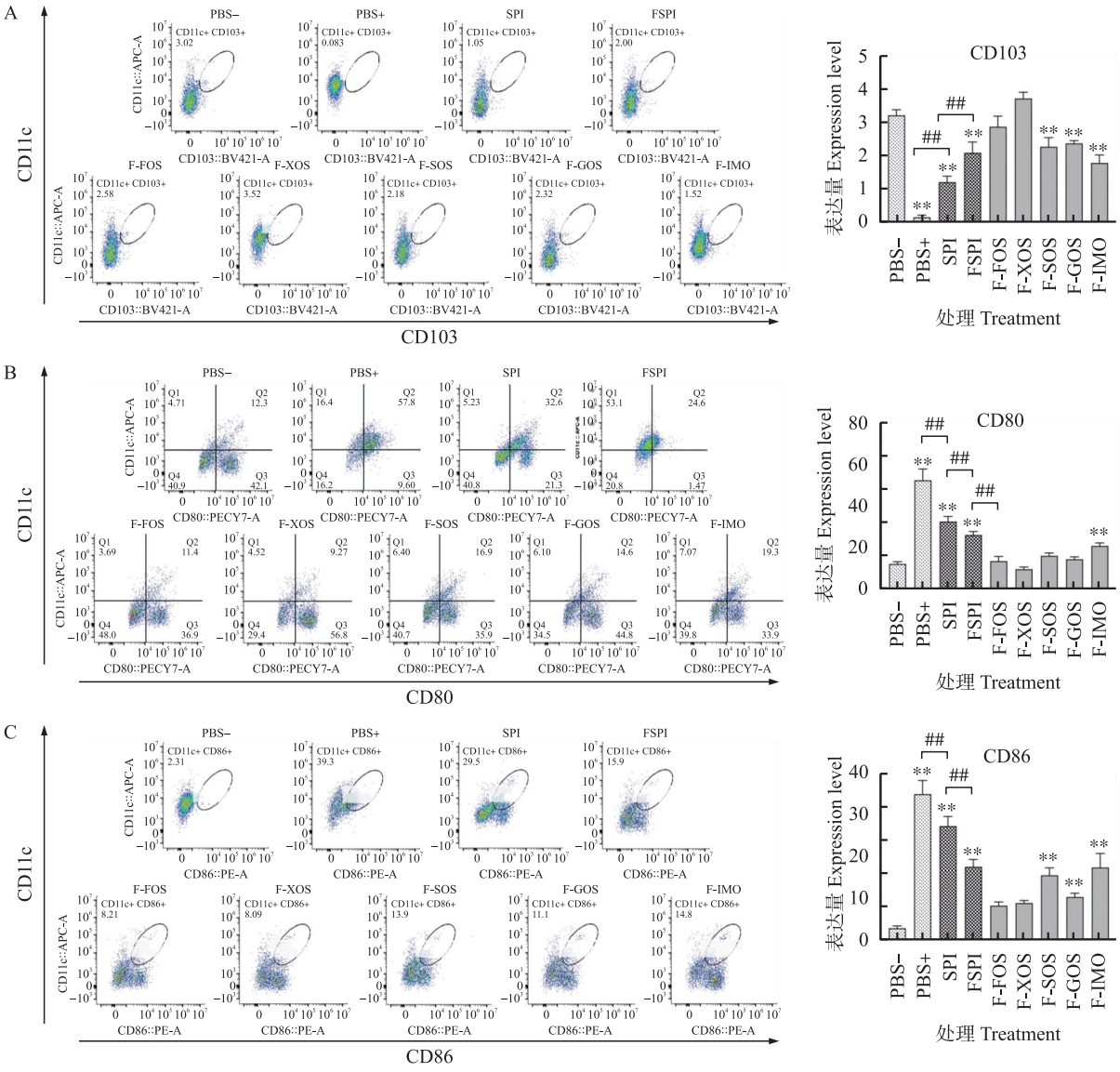


图 8 小鼠 MLN 中 CD103(A)、CD80(B)和 CD86(C)的表达量

Fig. 8 Expression levels of CD103(A), CD80(B) and CD86(C) in mice MLN

2.3.3 对小鼠 MLN 中 IL-10、TGF-β 和 RA 水平的影响 由图 9−A 可知，与 PBS−组相比，PBS+与 SPI 组 MLN 中 IL-10 水平显著降低至 18.2 和 26.7 pg·mL^{-1}(P<0.01)。与 SPI 组相比，FSPI 处理组的 IL-10 水平有所提升，但无明显差异(P>0.05)。各益生元处理组均显著上调了 IL-10 的水平(P<0.01)。其中 F-FOS 和 F-XOS 的上调作用最显著(P<0.01)，其次是 F-GOS、F-SOS 和 F-IMO(P<0.01)。

由图 9−B 可知，PBS+组 MLN 中 TGF-β 水平最低，其次是 SPI 组。与 SPI 组相比，各发酵处理组显著上调了 TGF-β 的水平(P<0.01)。其中，FSPI 组显著上调了 37.8%，F-FOS 和 F-XOS 的 TGF-β 水平较 FSPI 更高(P<0.01)，且 F-XOS 的 TGF-β 水平甚至高于 PBS−组。F-GOS 组的 TGF-β 水平也显著升高(P<0.01)，但与 FSPI 组无显著差异(P>0.05)。F-SOS 和 F-IMO 组的上调作用不明显(P>0.05)。

由图 9-C 可知,与 PBS-组相比,PBS+和 SPI 组 MLN 中 RA 的水平显著降低(P<0.01)。与 SPI 组相比,FSPI 组的 RA 水平显著提升(P<0.05)。而在益生元处理组中,除 F-SOS 外,其他组的 RA 水平较 FSPI 组更高(P<0.01)。其中,F-FOS 和 F-XOS 对 RA 的上调作用更显著(P<0.01),其水平甚至远超过 PBS-组(P<0.01)。此外,F-GOS 和 F-IMO 的 RA 水平上升至与 PBS-组保持一致(P>0.05)。

以上试验结果说明,与 SPI 组相比,FSPI 组对 IL-10 无明显上调作用,但对 TGF-β 和 RA 的上调作用较显著(P<0.05);而与 FSPI 组相比,益生元组中的 F-FOS 和 F-XOS 对 IL-10、TGF-β 和 RA 的水平均有更显著的上调作用(P<0.01)。

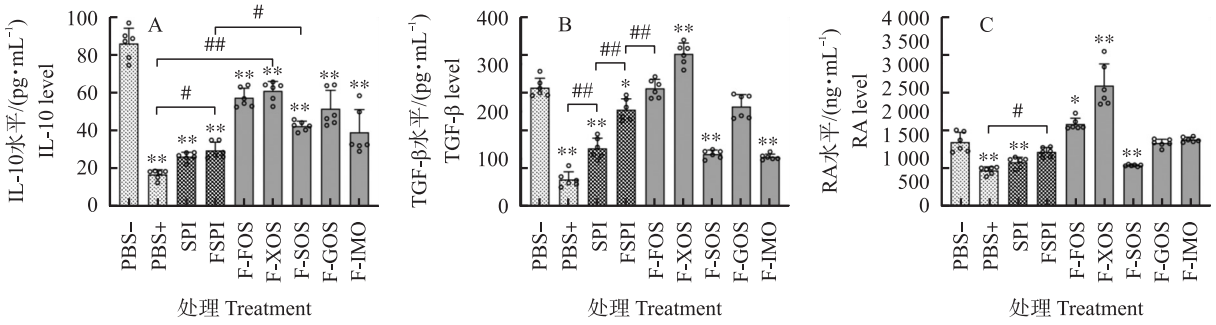


图 9　小鼠 IL-10(A)、TGF-β(B)和 RA(C)的水平

Fig. 9　Levels of IL-10(A), TGF-β(B) and RA(C) in mice

3　讨论与结论

3.1　乳酸菌发酵及添加益生元的大豆蛋白对小鼠免疫反应的影响

研究表明,当食物致敏原首次进入机体时,通过激活 Th2 淋巴细胞,促使 B 细胞产生特异性 IgE 抗体,这些抗体与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的 FcεRI 受体结合,使机体进入致敏状态;当相同过敏原再次进入与 IgE 抗体交联,将触发肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放组胺、mMCP-1 等炎症介质,引发过敏反应[19]。正常情况下,Th1 细胞通过分泌 IFN-γ 等细胞因子抑制 Th2 细胞功能以维持免疫平衡,但在食物过敏反应中,Th17 细胞分泌促炎性细胞因子,增强 Th2 细胞介导的炎症反应,导致过敏反应持续并加重。本研究发现,与未发酵组相比,乳酸菌发酵显著下调了组胺、mMCP-1、IL-4 以及 IL-17A 的表达水平。这可能与乳酸菌发酵导致的大豆蛋白致敏原表位破坏,最终导致大豆蛋白致敏性降低有关[20-21]。与 FSPI 相比,添加益生元处理可进一步下调组胺、mMCP-1、Th2 和 Th17 型细胞因子水平,同时上调 Th1 型细胞因子。其中,添加 FOS 和 XOS 的发酵蛋白组作用最为显著,这可能与 FOS 和 XOS 对大豆蛋白致敏原表位的进一步瓦解作用有关[14]。以上研究结果表明,与 SPI 组相比,乳酸菌发酵处理和添加益生元的发酵蛋白处理均可有效降低组胺、mMCP-1 等炎症因子以及 Th2 和 Th17 型细胞因子表达量,添加益生元可进一步显著上调 Th1 型细胞因子表达量,使 Th1/Th2 免疫平衡向 Th1 方向偏移,表现出更全面的降致敏作用。

3.2　乳酸菌发酵及添加益生元的大豆蛋白对小鼠肠道屏障完整性的影响

小肠屏障是阻止食物致敏原入侵血液循环的关键。肠道屏障作用受损,包括肠道完整性破坏、通透性增加、上皮细胞间紧密连接蛋白表达降低是诱发食物过敏产生的关键因素[22]。本研究发现,大豆蛋白摄入后小鼠空肠绒毛受到损伤,肠道屏障紧密连接蛋白的表达显著减少,这与 Gao 等[23]的研究结果一致。与大豆过敏组相比,乳酸菌发酵组的小鼠绒毛排列较为整齐,且显著上调了小鼠肠上皮细胞 Claudin 1 的蛋白表达水平,这表明乳酸菌发酵在缓解大豆蛋白诱导的小鼠肠道屏障损伤方面具有较好的作用。研究发现,嗜热链球菌、酿酒酵母和枯草芽胞杆菌的复合菌种发酵对豆粕过敏的断奶仔猪肠道屏障损伤具有相似的保护作用[24]。这些研究证实了发酵法在缓解食物过敏导致的肠道屏障损伤方面的重要性。本研究发现,添加益生元有助于肠道屏障损伤的恢复,这些处理组的小鼠肠绒毛损伤程度更低,绒毛高度和隐窝深度更高,其中 F-XOS 和 F-GOS 还能显著提升 *Claudin 1*、*ZO-1* 和 *Occludin* mRNA 的表达水平。这可能与益生元对大豆蛋白结构的影响有关。上述研究结果表明,乳酸菌发酵及添加益生元的大豆蛋白能够有效缓解肠道屏障损伤,增强屏障功能,从而减轻食物过敏症状。

3.3　乳酸菌发酵及添加益生元的大豆蛋白对口服耐受的诱导

研究表明,对免疫系统适当诱导最终使人体形成对食物致敏原的免疫耐受性,是根治食物过敏的最优

方式[25]。T_{reg}细胞在诱导口服耐受反应中发挥关键作用[26],它的形成与 DC 细胞表面标志物和耐受过程中相关细胞因子表达水平密切相关。一方面,表达 CD103 的 DC 细胞(CD103$^+$DC)可将抗原呈递给 MLN 中的 CD4$^+$T 细胞,促使 CD4$^+$T 细胞转化为 T_{reg}细胞[27],同时 DC 细胞在未成熟状态下低表达 CD80 和 CD86,为 T_{reg}细胞的生成提供了适宜的微环境。另一方面,DC 细胞释放的 TGF-β 和 RA 因子与巨噬细胞分泌的 IL-10 因子协同作用,以激活和诱导 T_{reg}的增殖[28-30]。本研究发现,添加 FSPI 和益生元处理具有上调 CD103 以及下调 CD80 和 CD86 的作用,其中 F-FOS 和 F-XOS 的作用效果最显著,同时它们还能显著上调耐受相关细胞因子(IL-10、TGF-β 和 RA)的表达,从而促进 T_{reg}细胞的生成。此外,F-SOS 和 F-GOS 组的 T_{reg}表达水平也较 FSPI 更高,这可能与其较高的 IL-10 表达水平以及较低的 CD80 表达水平有关。F-IMO 对 DC 细胞表面标志物以及耐受相关因子的调节作用不明显,因此其 T_{reg}细胞表达量较低。

综上,本研究结果表明,与大豆蛋白过敏组相比,乳酸菌发酵处理能够有效降低小鼠免疫反应性,同时在一定程度上维持肠道屏障完整性,但对口服耐受的诱导作用较弱。添加益生元 FOS 和 XOS 的发酵大豆蛋白进一步增强了免疫调节能力,不仅有效调控 Th 细胞因子平衡,还通过上调紧密连接蛋白表达和调节 T_{reg}相关信号通路,显著促进肠道屏障稳态与口服耐受的建立。本研究结果为开发新的低致敏食物策略提供了理论依据和试验支撑。

参考文献 References:

[1] Wiederstein M, Baumgartner S, Lauter K. Soybean (*Glycine max*) allergens: a review on an outstanding plant food with allergenic potential[J]. ACS Food Science & Technology, 2023, 3(3): 363-378.

[2] Saeed H, Gagnon C, Cober E, et al. Using patient serum to epitope map soybean glycinins reveals common epitopes shared with many legumes and tree nuts[J]. Molecular Immunology, 2016, 70: 125-133.

[3] Xia J H, Zu Q Q, Yang A S, et al. Allergenicity reduction and rheology property of *Lactobacillus*-fermented soymilk[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(15): 6841-6849.

[4] Wang Y Q, Fu Y M, Azarpazhooh E, et al. Assessment of *in vitro* digestive behavior of lactic-acid-bacteria fermented soy proteins: a study comparing colloidal solutions and curds[J]. Molecules, 2022, 27(21): 7652.

[5] Liu Z, Wang Y Q, Liu Y F, et al. The conformational structural change of soy glycinin *via* lactic acid bacteria fermentation reduced immunoglobulin E reactivity[J]. Foods, 2021, 10(12): 2969.

[6] Rui X, Huang J, Xing G L, et al. Changes in soy protein immunoglobulin E reactivity, protein degradation, and conformation through fermentation with *Lactobacillus plantarum* strains[J]. LWT: Food Science and Technology, 2019, 99: 156-165.

[7] Guo X R, Luo Y, Fan X, et al. Effects of polysaccharide supplementation on lactic acid bacteria-fermented soy protein gel: structural characteristics, allergenicity, and epitope analysis[J]. Foods, 2025, 14(4): 701.

[8] Peng C L, Cao C M, He M C, et al. Soybean glycinin- and β-conglycinin-induced intestinal damage in piglets via the p38/JNK/NF-κB signaling pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(36): 9534-9541.

[9] Wu J J, Cao C M, Meng T T, et al. Induction of immune responses and allergic reactions in piglets by injecting glycinin[J]. Italian Journal of Animal Science, 2016, 15(1): 166-173.

[10] Zhao Y, Liu D D, Han R, et al. Soybean allergen glycinin induced the destruction of the mechanical barrier function in IPEC-J2[J]. Food and Agricultural Immunology, 2015, 26(4): 601-609.

[11] Xu J, Zhou A, Wang Z, et al. Effect of glycinin and β-conglycinin on integrity and immune responses of mouse intestinal epithelial cells[J]. The Journal of Animal and Plant Sciences, 2010, 20(3): 1-12.

[12] L'Hocine L, Boye J I, Arcand Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3): C137-C145.

[13] Wang Y Q, Sun W J, Zhang Y, et al. Assessment of dynamic digestion fate of soy protein gel induced by lactic acid bacteria: a protein digestomics research[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 136: 108309.

[14] Guo X R, Lu X C, Yu D, et al. Assessment of the effects of oligosaccharide supplementation on the structure of lactic-fermented soy protein gel and its allergenic epitopes[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 167: 111406.

[15] Liu M S, Thijssen S, Hennink W E, et al. Oral pretreatment with β-lactoglobulin derived peptide and CpG co-encapsulated in PLGA nanoparticles prior to sensitizations attenuates cow's milk allergy development in mice[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 13: 1053107.

[16] Meng X Y, Li X, Gao J Y, et al. Characterization of the potential allergenicity of irradiated bovine α-lactalbumin in a BALB/c mouse model[J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 97: 402-410.

[17] Shao H M, Huang M J, Bai T L, et al. Evaluation of the suitability of β-lactoglobulin and whey protein in a BALB/c mouse model of cow's milk allergy[J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104783.

[18] Xiao L Y, Zhang C L, Zhang X L, et al. Effects of *Lacticaseibacillus paracasei* SNB-derived postbiotic components on intestinal barrier dysfunction and composition of gut microbiota[J]. Food Research International, 2024, 175: 113773.

[19] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(1): 41-58.

[20] Wang Y Q, Fu Y M, Li W, et al. Modulation of soy protein immunoreactivity by different matrix structures of lactic acid bacterium-induced soy protein gels: epitope destruction during *in vitro* gastroduodenal digestion and absorption[J]. Food Research International, 2023, 173: 113281.

[21] Fu Y M, Guo X R, Li W, et al. Construction of hypoallergenic microgel by soy major allergen β-conglycinin through enzymatic hydrolysis and lactic acid bacteria fermentation[J]. Food Research International, 2024, 175: 113733.

[22] Grozdanovic M M, Čavić M, Nešić A, et al. Kiwifruit cysteine protease actinidin compromises the intestinal barrier by disrupting tight junctions[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects, 2016, 1860(3): 516-526.

[23] Gao J X, Li T G, Liang D, et al. Maternal obesity exacerbates the responsiveness of offspring BALB/c mice to cow's milk protein-induced food allergy[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(3): 920-928.

[24] 王文文. 发酵豆粕对断奶仔猪肠道屏障的保护作用及机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
Wang W W. Protective effect and mechanism of fermented soybean meal on gut barrier in weaned piglets[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023(in Chinese with English abstract).

[25] Krawiec M, Fisher H R, Du Toit G, et al. Overview of oral tolerance induction for prevention of food allergy: where are we now? [J]. Allergy, 2021, 76(9): 2684-2698.

[26] Fleischer D M, Chan E S, Venter C, et al. A consensus approach to the primary prevention of food allergy through nutrition: guidance from the American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology; American College of Allergy, Asthma, and Immunology; and the Canadian Society for Allergy and Clinical Immunology[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice, 2021, 9(1): 22-43.e4.

[27] Corazza N, Kaufmann T. Novel insights into mechanisms of food allergy and allergic airway inflammation using experimental mouse models[J]. Allergy, 2012, 67(12): 1483-1490.

[28] Edner N M, Carlesso G, Rush J S, et al. Targeting co-stimulatory molecules in autoimmune disease[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2020, 19(12): 860-883.

[29] Esterházy D, Loschko J, London M, et al. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T_{reg} cells and tolerance[J]. Nature Immunology, 2016, 17(5): 545-555.

[30] Kim M, Galan C, Hill A A, et al. Critical role for the microbiota in $CX3CR1^{+}$ intestinal mononuclear phagocyte regulation of intestinal T cell responses[J]. Immunity, 2018, 49(1): 151-163.e5.

责任编辑:范雪梅