

黑豆-乳清双蛋白膳食对大鼠体内免疫的调节作用

梁得福¹, 孟维洪¹, 舒欣¹, 庄柯瑾^{1,2*}, 张东杰^{1,3*}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319)

(2. 农业农村部农产品及加工质量监督检验测试中心, 黑龙江大庆 163319)

(3. 黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 国家杂粮工程研究技术中心, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 黑豆蛋白和乳清蛋白分别是两种优质的植物源和动物源蛋白质原料, 食用后均可改善机体的免疫特性, 但双蛋白对机体免疫调节作用的研究相对较少。该实验利用标准膳食 (CP)、乳清蛋白膳食 (WP)、黑豆蛋白膳食 (BSP) 和黑豆-乳清双蛋白膳食 (BS-WP) 对 4 组大鼠进行为期 60 d 的喂养, 喂养周期结束后对各组大鼠的血清生化指标、免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) IgM、IgA 和 IgG 质量浓度、脾淋巴细胞增殖指数、自然杀伤细胞活力、脾脏指数和胸腺指数进行测定, 探究黑豆乳清双蛋白对大鼠体内免疫的调节作用。结果表明, 与单一蛋白源相比, BS-WP 组大鼠的血清免疫生化指标总蛋白、白蛋白、球蛋白、尿素氮、和谷丙转氨酶显著提升 ($P<0.05$); IgG、IgA 和 IgM 的质量浓度均有显著增加 ($P<0.05$), 且 IgG 增加最为显著, 与单一 WP 组和 BSP 组相比, BS-WP 组大鼠的 IgG 分别增加了 38.23% 和 41.02%, 此外, 脾脏和胸腺指数也均有显著增加 ($P<0.05$), 脾脏指数分别增加了 35.33% 和 35.91%, 胸腺指数分别增加了 31.51% 和 34.26%。由此可知, 黑豆-乳清双蛋白膳食可显著提升机体免疫能力。

关键词: 黑豆蛋白; 乳清蛋白; 黑豆-乳清双蛋白; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2024)01-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.1601

Effects of Black Soybean-whey Protein Blend on Immune Regulation in Rats

LIANG Defu¹, MENG Weihong¹, SHU Xin¹, ZHUANG Kejin^{1,2*}, ZHANG Dongjie^{1,3*}

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, College of Food Science and Technology, Daqing 163319, China)

(2. Quality Supervision, Inspection and Testing Center of Agricultural Products and Processed Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Daqing 163319, China) (3. Heilongjiang Key Laboratory of Agricultural Products Processing and Quality Safety, National Coarse Grain Engineering Research and Technology Center, Daqing 163319, China)

Abstract: Black soybean protein and whey protein are two kinds of high-quality plant or animal protein materials. Their consumption can improve the immune characteristics of the body. However, there are relatively few studies on the immunomodulatory effect of the black soybean-whey protein blend. In this study, four groups of rats were fed with a standard diet (CP), whey protein diet (WP), black bean protein diet (BSP) and black soybean-whey protein blend diet (BS-WP) for 60 days. At the end of the feeding cycle, serum biochemical indicators, IgM, IgA and IgG mass concentrations, spleen

引文格式:

梁得福, 孟维洪, 舒欣, 等. 黑豆-乳清双蛋白膳食对大鼠体内免疫的调节作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(1):1-9.

LIANG Defu, MENG Weihong, SHU Xin, et al. Effects of black soybean-whey protein blend on immune regulation in rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1):1-9.

收稿日期: 2022-12-21

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YEE0206300); 黑龙江省博士后面资助项目 (LBH-Z20205); 黑龙江八一农垦大学“三纵”基础培育计划 (ZRCPY202004)

作者简介: 梁得福 (1995-), 男, 硕士, 研究方向: 食品营养与质量安全, E-mail: liangdefuxs206227@163.com

通讯作者: 庄柯瑾 (1991-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与质量安全, zhuangkejin@126.com; 共同通讯作者: 张东杰 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, byndzdj@126.com

lymphocyte proliferation index, natural killer cell activity, spleen index and thymus index were measured to explore the regulatory effect of black soybean-whey protein blend on the immune system of rats. Results showed that compared with the single protein source group, the serum immune biochemical indexes (total protein, albumin, globulin, urea nitrogen, alanine transaminase levels) of the black soybean-whey protein blend group significantly increased ($P<0.05$). The mass concentrations of IgG, IgA and IgM increased significantly ($P<0.05$), with the increase of IgG content being the most significant. Compared with the groups treated whey protein or black soybean protein singly, the IgG content of the protein blend group increased by 38.23% and 41.02%, respectively. In addition, the spleen and thymus indexes significantly increased ($P<0.05$), with the increase of the spleen index being 35.33% and 35.91%, respectively, and the increase of the thymus index being 31.51% and 34.26%, respectively. Therefore, black soybean-whey blended protein blend diet can significantly improve the body immunity capacities of rats.

Key words: black soybean protein; whey protein; black soybean-whey blended protein; immune regulation

长期坚持合理的膳食是提高机体免疫力的重要方式,膳食摄入机体后,不同营养成分可调节机体的免疫器官,从而使得机体的免疫力增强^[1]。机体必需的营养成分包括蛋白质、脂类、碳水化合物、维生素和矿物质^[2],其中蛋白质不仅是构成机体免疫反应的基础物质,还是免疫器官、免疫细胞和免疫因子的主要成分^[3]。目前常用于膳食的蛋白主要为植物源蛋白和动物源蛋白,植物源蛋白主要源于粮食作物,如豆类、谷物类、坚果类等,动物源蛋白主要源于畜禽,如肉、蛋、奶^[4,5]。

牛奶中的乳清蛋白(Whey Protein, WP)种类丰富,主要含有 β -乳球蛋白、 α -乳球蛋白、免疫球蛋白、乳铁蛋白和牛血清白蛋白(Albumin, ALB)等多种蛋白质^[6]。在饮食中添加乳清蛋白可促进体内胰岛素的释放,从而降低机体在进食后血液中的血糖水平^[7]。乳清蛋白可通过增加机体内的谷胱甘肽(GSH)含量,提高机体的免疫应答能力,从而抑制病原的入侵和调节机体免疫功能祛除病原体^[8]。研究表明乳清蛋白可巩固小鼠的体液免疫和细胞免疫^[9]。但牛乳中含有 β -乳球蛋白过敏源,且国内市场对乳清蛋白质需求量过大,而我国乳清蛋白资源相对短缺,只能大量依赖进口。豆科植物中的黑豆(Black Soybeans, BS)蛋白质含量丰富^[10],可高达36%~50%,植物源蛋白往往由于某一种必需氨基酸的水平较低,限制了机体对蛋白质的利用率,而动物源蛋白具有更高水平的必需氨基酸。此外,黑豆蛋白可帮助患有急性结肠炎的小鼠更快恢复健康,并降低机体炎症因子的释放^[11]。黑豆多肽能显著提高亚急性衰老小鼠机体的免疫能力,延缓小鼠衰老^[12]。综上,食用黑豆蛋白和乳清蛋白均可改善机体的免疫特性,虽然两者都有利于机体,但对机体都有着局限性,而双来源的蛋白质能更好解决膳

食中单一蛋白源的不足^[13]。两种蛋白质的精准互作,对调节控制饮食结构具有重要的支持作用。豆类-乳清双蛋白还可缓解机体对某单一蛋白的不耐受和过敏等生理反应,可以促进人体对Ca和VD的吸收,豆类蛋白质还可以减少乳清蛋白乳糖的不耐症,两者相结合可满足必需氨基酸的互补性,改善人体的饮食结构。

乳清蛋白易溶于酸性溶液,在胃部酸性环境下能够快速消化降解,在较短的时间内释放出大量必需氨基酸,尤其是以亮氨酸为代表的支链氨基酸,进而促进肌肉蛋白合成。相较于乳清蛋白,豆类分离蛋白和酪蛋白具有较慢的消化吸收效率,摄入后能够长期保持血液中必需氨基酸的有效供给。牛乳蛋白与大豆分离蛋白协同摄入能保证必需氨基酸的持续性供给^[14]。双蛋白混合使用可提高动植物蛋白的利用率,植物源蛋白可避免纯摄取动物源蛋白的缺陷,如胆固醇的升高;动物源蛋白可避免纯摄取植物源蛋白引起的过敏反应等^[15]。最新研究发现,大豆与牛乳混合蛋白较单一乳清蛋白能够持续性的激活mTORC1信号通路,从而促进运动后肌肉蛋白的合成^[16,17]。双蛋白干预可显著提高白血病患者血清白蛋白、球蛋白和总蛋白含量,明显缓解患者蛋白质营养不良状况,提高肌肉水平,缩短平均植活时间,降低移植后感染发生率。经造血干细胞移植的白血病患者服用双蛋白营养补充剂后,结果表明,双蛋白能够促进患者造血植入,提高患者血清中蛋白含量,具有降低患者感染的趋势^[18]。但双蛋白对机体免疫调节作用的研究相对较少。

本研究使用不同蛋白源的饲料,连续饲喂SD大鼠60d后,通过测评SD大鼠的免疫学指标,评估膳食中添加黑豆-乳清蛋白对SD大鼠免疫状况的调节作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

清洁级雌性 Sprague Dawley 大鼠 (3 周龄) 32 只, 体质量 50~70 g, 购于长春市亿斯实验动物技术有限责任公司。实验大鼠在温度为 (22±1) °C、相对湿度 50%~60%、光照昼夜 12 h 试验环境下循环适应性饲养一周后用于试验, 生产许可证编号: SCXK (吉) 2020-0002, 质量合格证编号: 01021670386083521, 该动物试验遵守动物保护道德准则和黑龙江八一农垦大学动物饲养使用规则。

试验饲料: 试验用标准饲料为 AIN-93G 大鼠纯合日粮标准饲料, 购于南通特洛菲饲料科技有限公司; WP 饲料、BSP 饲料和黑豆-乳清“双蛋白”(BS-WP) 饲料等氮等能, 结合蛋白粉的营养水平, 参照 AIN-93G 标准, 委托南通特洛菲饲料科技有限公司制作, 生产许可证编号: 苏饲证 (2019) 06092, 质量合格证编号: TP20210812002。

大鼠免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM, 编号 BPE20033)、免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA, 编号 BPE20307)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG, 编号 BPE20885) 检测试剂盒均购自上海朗顿。血清生化指标 16 项试剂盒: 尿酸 (UA, 编号 C012-1-1) 测试盒、葡萄糖 (GLU, 编号 F006-1-1) 含量测试盒、总胆固醇 (TC, 编号 A111-2-1) 含量测试盒、甘油三酯 (TG, 编号 A110-2-1) 含量测试盒、总蛋白 (TP, 编号 A045-2-1) 测试盒、高密度脂蛋白 (HDL, 编号 112-2-1) 测试盒、低密度脂蛋白 (LDL 编号 A113-1-1) 测试盒、谷丙转氨酶 (ALT, 编号 C009-3-1) 活力测试盒、总胆汁酸 (TBA, 编号 E006-2-1) 测试盒、尿素氮 (BUN, 编号 C013-2-1) 测试盒、乳酸脱氢酶 (LDH, 编号 A020-1) 测试盒、肌酸激酶同工酶 (CK-MB, 编号 E006-1-1) 测试盒、谷草转氨酶 (AST, 编号 C010-1-1) 测试盒、白蛋白 (ALB, 编号 A028-2-1) 测试盒、总胆红素 (TBIL, 编号 C019-1) 测试盒、肌酐 (CRE, 编号 C011-2-1) 测试盒, 均购自南京建成生物工程研究所。

小鼠淋巴瘤 YAC-1 细胞, 中国科学院细胞库; 刀豆蛋白 (Concanavalin A, ConA), 美国 Sigma 公司; 台盼蓝, 美国 Amresco 公司; RPMI-1640 培养液, 美国 HyClone 公司; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 加拿大 Wisent 公司; CCK-8 (Cell

Counting Kit-8) 检测试剂盒, 日本 Dojindo 公司; 胰蛋白酶 (比酶活力 120 kU/g), 北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

HF-90 型 CO₂ 细胞培养箱, 美国康力公司; Model 680 型酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司; DK-98-1 型电热恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司; 高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; HVD-1320 洁净工作台, 北京东联哈尔滨仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 大鼠的分组与饲料的制备

SD 大鼠 32 只, 进行一周的适应性饲养后随机分为 4 组: 标准组 (CP)、乳清蛋白组 (WP)、黑豆蛋白组 (BSP) 和黑豆-乳清双蛋白组 (BS-WP), 每组 8 只, 实验大鼠采取自由摄食的方式, 根据每日摄入量与剩余量计算下一天饲料投喂量, 控制蛋白摄入水平相同, 每组大鼠按照饲喂标准饲喂不同组分的饲料, 饲料详细配方及分组见表 1, 连续饲喂 60 d, 并监测其体质量变化。

表 1 不同蛋白来源饲料的配方组成

Table 1 Compositions of the different protein source diet groups (g/kg)

成分	CP 组	BSP 组	WP 组	BS-WP 组
酪蛋白	200.00	—	—	—
BSP	—	199.30	—	66.30
WP	—	—	198.50	132.5
玉米淀粉	397.50	393.00	388.50	390.00
玉米糊精	132.00	132.00	132.00	132.00
蔗糖	100.00	100.00	100.00	100.00
大豆油	70.00	64.80	63.10	63.70
纤维素	50.00	50.00	50.00	50.00
矿物质	35.00	35.00	35.00	35.00
维生素	10.00	10.00	10.00	10.00
L-胱氨酸	3.00	3.00	3.00	3.00
氯化胆碱	2.50	2.50	2.50	2.50
特丁基对苯二酚	0.01	0.01	0.01	0.01

注: CP 组蛋白含量 90.00%, BSP 组蛋白含量 90.30%, WP 组蛋白含量 90.66%, BS-WP 组蛋白含量 90.50%。

1.3.2 血清生化指标和免疫球蛋白分析

对 SD 大鼠饲喂 60 d 后称量体质量, 麻醉后

采取腹主动脉收集血液。血液样品静置 30 min 后，于 4 000 r/min 离心 10 min，按照 16 项生化指标及 IgM、IgA、IgG 试剂盒说明书分别检测各项指标，本文球蛋白（GLOB）含量为总蛋白（TP）含量减去白蛋白（ALB）含量所得。

1.3.3 免疫器官指数的测定

各组大鼠收取血液后处死，分别取出脾脏和胸腺，使用滤纸去除剩余血液，将其置于无菌平皿中分别称质量并记录，分别按照公式（1）和（2）计算脾脏和胸腺指数^[19]。

$$D_1 = \frac{M_1}{M_3} \times 100\% \quad (1)$$

$$D_2 = \frac{M_2}{M_3} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

M_1 ——脾脏质量，mg；

M_2 ——胸腺质量，mg；

M_3 ——大鼠体质量，g；

D_1 ——脾脏指数，%；

D_2 ——胸腺指数，%。

1.3.4 脾淋巴细胞增殖实验

无菌条件下将各组 SD 大鼠剖腹，取出脾脏置于盛有 Hank's 溶液中无菌培养皿中，使用眼科镊将其剪碎。取无菌注射芯，对置于细胞筛网上的脾脏组织进行碾压研磨，将上述制备的脾脏匀浆使用 200 目的细胞筛网进行过滤，加入 2 mL 的 Hank's 液将细胞筛网中组织吹洗掉，将收集的脾脏组织悬浮液收集于离心管内，4 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液。加入 2 mL Hank's 液重悬脾细胞，再加 3 倍体积的红细胞裂解液混匀细胞，静置 3 min，4 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液。加入 5 mL 的 RPMI-1640 细胞培养液将沉淀重悬成单细胞悬液，吸取适量的细胞悬液与台盼蓝试剂混合计量细胞浓度，使活细胞比例大于 95%，并调整细胞浓度为每毫升 2×10^5 个。

将上述调整浓度后的细胞悬液分别按照每孔 200 μ L 的体积接种于 96 孔细胞培养板，然后每孔加入 20 μ L 的 ConA（终质量浓度为 5 μ g/mL），混匀每孔内的细胞后，将其置于体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h，再加入 21 μ L 的 CCK-8 溶液，继续放置于细胞培养箱中孵育 4 h，然后取出置于酶标仪中，测定 450 nm 波长处的光密度值。脾淋巴细胞增殖指数按照公式（3）计算^[20]。

$$D_3 = \frac{OD_{\text{实验孔}} - OD_{\text{空白孔}}}{OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{空白孔}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

$OD_{\text{空白孔}}$ ——以不添加脾细胞悬液的 RPMI-1640 培养液作为空白孔；

D_3 ——脾淋巴细胞增殖指数，%。

1.3.5 NK 细胞活性分析

靶细胞制备：将稳定传代的靶细胞（YAC-1 细胞）培养至对数生长期，重悬靶细胞调整浓度为每毫升 1×10^4 个。效应细胞制备：将 1.3.4 制备的脾细胞悬液调整浓度为每毫升 5×10^5 个。将上述的靶细胞和脾细胞悬液分别吸取每孔 50 μ L 接种于 96 孔细胞培养板内，混匀每孔内的细胞，于细胞培养箱孵育 24 h，然后每孔添加 10 μ L 的 CCK-8 试剂，继续孵育 4 h，取出置于酶标仪中测定 450 nm 波长处各孔的光密度值。NK 细胞活力按照公式（4）计算^[21]。

$$D_4 = \left(1 - \frac{OD_{\text{实验孔}} - OD_{\text{效应细胞孔}}}{OD_{\text{靶细胞孔}}}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中：

D_4 ——NK 细胞活力，%。

1.3.6 统计分析

每组 8 只大鼠测定各数值后，计算各指标的平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)，应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析，多组间数据比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）的 Tukey's 进行事后检验，以组间方差分析 $P < 0.05$ 为显著性差异， $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 各组蛋白对大鼠体质量的影响

试验期间，大鼠行为、精神状态正常，粪便正常，无腹泻等异常情况，饲养期间未有大鼠死亡，饲喂期间大鼠照片如图 1 所示。适应性喂养一周后，四组大鼠的初始体质量无显著差异 ($P \geq 0.05$)，随后，大鼠体质量变化如图 2 所示，可以看出饲养第 5 周时大鼠体质量较初始体质量显著增长 ($P < 0.05$)，增长率较大，5~9 周时大鼠体质量增长率减小，且饲养结束时 BSP 组和 BS-WP 组大鼠体质量较 WP 组低，与 CP 组间无显著差异 ($P \geq 0.05$)，其中，与 WP 组相比，BS-WP 组大鼠体质量显著降低 11.78%，WP 组大鼠体质量增长程度与其他蛋白组相比差异显著 ($P < 0.05$)，可能与蛋白质源的适口性有关。

乳清蛋白粉分子较小,质地细腻,口感更好^[22]。乳清蛋白属于快速消化蛋白,易溶于酸性溶液,因此乳清蛋白在胃部强酸环境下能够快速溶解和消化,随即进入小肠完成后续消化过程,这可能是导致 WP 组大鼠体质量增重显著高于其他组的主要原因^[23]。试验结果说明 BSP 组饲料的加入有效控制了大鼠体质量的生长。

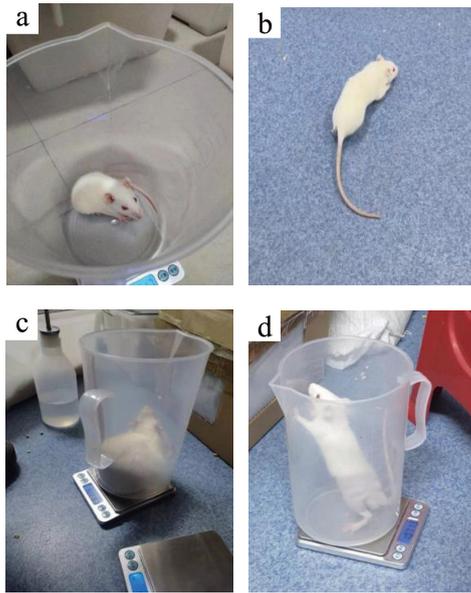


图1 饲喂不同膳食蛋白组饲料的 SD 大鼠

Fig.1 SD rats fed diets with different dietary protein groups

注:(a) CP 组大鼠;(b) WP 组大鼠;(c) BSP 组大鼠;
(d) BS-WP 组大鼠。

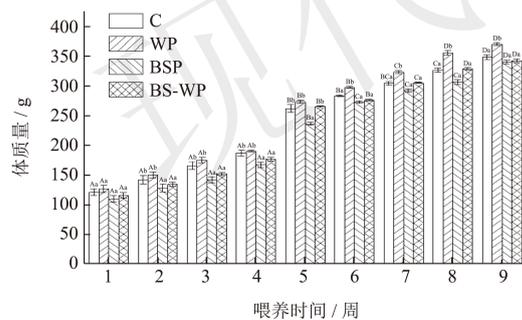


图2 饲喂不同组别饲料对 SD 大鼠体质量的影响

Fig.2 Effects of feeding different groups of diets on body weight of SD rats

注:图中标注小写字母不同表示同一周期内不同组间有显著性差异 ($P < 0.05$); 大写字母不同表示同一组内不同饲养时间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 血清生化指标的分析

为评估 BS-WP 对大鼠机体健康的影响,参照陈艳勤等^[24]的方法,测定大鼠血清的 17 项生化指

标,检测结果如表 2 所示。与 CP、WP、BSP 组相比,BS-WP 组大鼠血清中的 TP 质量浓度分别增长了 27.24%、21.00% 和 30.71%,TP 在维持血管内胶体渗透压、运输养分等功能中具有重要作用,可反映机体本身的营养状况和对蛋白质的消化吸收情况。由于机体对动物蛋白和植物蛋白的吸收程度不同,可能是因为机体对植物蛋白的吸收程度较好,这可能是导致 BS-WP 组大鼠血清中的 TP 质量浓度增加的原因^[25]。

血清 TP 主要由血清球蛋白 (GLOB) 和血清 ALB 构成,TP 含量越高,表明机体合成蛋白质能力越强,即动物营养状况良好^[26]。试验结果表明,BS-WP 组大鼠具有更好的代谢能力。

有研究表明,大鼠进食乳清蛋白后,血清中的 ALB 提高了 14%~16%,TP 质量浓度提高了 15%~17%,GLOB 质量浓度分别增长了 23.44%、18.33% 和 29.54%,结果表明乳清蛋白可提高机体的免疫力^[27]。本试验中,BS-WP 组与 CP、WP、BSP 组相比,ALB 质量浓度分别增长了 55.08%、29.56% 和 27.92%,说明 BS-WP 对大鼠免疫有调节作用。膳食中补充赖氨酸可通过影响白蛋白含量调控机体免疫功能,随着赖氨酸的添加量增加,白蛋白含量也有所增加^[28]。

ALT 是检测肝功能的重要指标,CP、BSP 各组与 BS-WP 各组大鼠血清的 ALT 活力显著低于 WP 组,可能是因为 WP 的摄入影响了消化道的正常功能,增加了肝脏的负担。血清 BUN 为机体蛋白质和氨基酸等组分的代谢产物,是反映动物体内蛋白质代谢和氨基酸平衡状况的指标。各组大鼠血清的 BUN 含量无显著差异,说明各蛋白组的氨基酸组成合理,有利于机体蛋白质的合成代谢。

BS-WP、WP、BSP 与 CP 组大鼠相比,血清 TC 含量有所降低。张宇等^[29]对小鼠补饲乳清蛋白肽水溶液,测定血清生化指标,结果表明乳清蛋白水解得到的活性肽显著降低了小鼠血清总胆固醇水平,降低率达 36.3%,具有显著降胆固醇的生理功效。李思锦等^[30]通过构建高脂性肝损伤小鼠后在膳食中添加黑豆肽,黑豆肽剂量组小鼠体内 AST、ALT、TG、TC、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、LDL 水平显著下降。血清 TG 含量的降低这种结果可能与机体肝脏脂质合成能力降低有关,也可能与机体血清 TG 清除能力增强有关。

综上,本试验的大鼠摄食 BS-WP 后,大鼠血清生化指标与 WP 组和 BSP 组相比均有所改善,因此,摄食 BS-WP 更能提高大鼠机体的免疫能力。

表 2 饲喂不同组分饲料对SD大鼠血清生化指标的影响

Table 2 Effects of feeding different components of feed on serum biochemical indexes of SD rats

生化指标	CP 组	WP 组	BSP 组	BS-WP 组
TP/(g/L)	37.61 ± 1.29 ^{Bbc}	39.52 ± 1.18 ^{Bb}	36.66 ± 1.83 ^{Bc}	47.85 ± 1.94 ^{Aa}
ALB/(g/L)	3.25 ± 0.11 ^{Cc}	3.89 ± 0.15 ^{Bb}	3.94 ± 0.14 ^{Bb}	5.04 ± 0.10 ^{Aa}
GLOB/(g/L)	32.47 ± 3.23 ^{Bb}	33.87 ± 3.35 ^{Bb}	30.94 ± 3.16 ^{Bb}	40.08 ± 3.78 ^{Aa}
ALT/(U/L)	28.46 ± 1.56 ^{Dd}	35.61 ± 1.93 ^{BCbc}	32.83 ± 2.41 ^{Cc}	30.36 ± 2.04 ^{Aa}
BUN/(mmol/L)	5.18 ± 0.16 ^{Aa}	5.96 ± 0.42 ^{Aa}	5.68 ± 0.23 ^{Aa}	5.99 ± 0.19 ^{Aa}
GLU/(mmol/L)	5.58 ± 0.21 ^{Aa}	5.33 ± 0.26 ^{Aa}	4.30 ± 0.27 ^{Bb}	3.23 ± 0.44 ^{Cc}
TC/(mmol/L)	4.09 ± 0.12 ^{Aa}	3.64 ± 0.66 ^{Aa}	3.04 ± 0.23 ^{ABa}	2.66 ± 0.54 ^{Bb}
TG/(mmol/L)	1.80 ± 0.28 ^{Aa}	1.60 ± 0.34 ^{ABa}	1.57 ± 0.20 ^{ABa}	1.23 ± 0.21 ^{Bb}
HDL/(mmol/L)	0.57 ± 0.08 ^{Bc}	0.86 ± 0.04 ^{Aa}	0.79 ± 0.02 ^{Bb}	0.68 ± 0.06 ^{Aa}
LDL/(mmol/L)	1.44 ± 0.17 ^{Bb}	1.28 ± 0.18 ^{Cc}	1.62 ± 0.16 ^{Bb}	1.37 ± 0.09 ^{Aa}
TBA/(μmol/L)	1.48 ± 0.19 ^{Bb}	1.67 ± 0.22 ^{Bb}	1.74 ± 0.29 ^{Bb}	2.45 ± 0.14 ^{Aa}
UA/(mg/L)	62.07 ± 5.47 ^{Ab}	69.47 ± 3.90 ^{Aa}	66.02 ± 3.08 ^{Aab}	47.38 ± 3.56 ^{Bc}
LDH	3 006.74 ± 66.68 ^{Cc}	3 560.67 ± 26.37 ^{Bb}	2 551.69 ± 96.01 ^{Dd}	3 762.26 ± 79.37 ^{Aa}
CK-MB	30.65 ± 2.13 ^{Aa}	19.51 ± 2.65 ^{BCbc}	22.29 ± 1.65 ^{Bb}	13.93 ± 1.83 ^{Cc}
AST	63.25 ± 2.67 ^{Aa}	47.75 ± 3.44 ^{BCbc}	39.25 ± 4.57 ^{Bb}	36.50 ± 2.07 ^{Cc}
TBIL/(μmol/L)	13.80 ± 1.25 ^{Aa}	14.31 ± 1.32 ^{Aa}	13.12 ± 1.99 ^{Ab}	15.12 ± 1.30 ^{Aa}
CRE/(μmol/L)	84.92 ± 6.18 ^{Aa}	74.63 ± 6.23 ^{Ab}	79.34 ± 7.30 ^{Aab}	85.12 ± 7.34 ^{Aa}

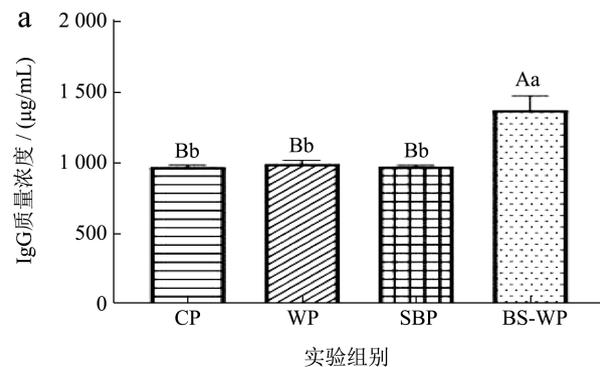
注：有相同字母者表示组间差异不显著，无相同字母者表示组间差异显著，其中大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)，小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 血清中免疫球蛋白分泌的分析

为评估 BS-WP 组蛋白对大鼠免疫球蛋白分泌的影响，测定了 BS-WP 组免疫球蛋白结果如图 3 所示，饲喂 CP、WP、BSP 的膳食后，三者免疫球蛋白之间无显著性差异，但 BS-WP 组大鼠血清中血清的 IgG、IgA 和 IgM 与其他三组相比差异显著，由图 3 可知，饲喂 BS-WP 组大鼠相比饲喂单一蛋白组大鼠的血清 IgG 含量增加了 38.23%~41.23%；同理，血清 IgA 含量增加了 11.74%~16.48%，血清 IgM 含量增加了 11.74%~16.48%。由以上结果可知，BS-WP 膳食可促进大鼠血清中免疫球蛋白含量的增加。

Ig 是机体免疫系统的主要效应分子，由动物机体的免疫细胞激活后，B 细胞分化成熟为浆细胞后所形成，其含量大小直接反映了机体的免疫应答能力^[31]。IgG 含量在动物体中最高，是直接反映机体免疫力的重要指标；IgA 主要参与机体抗感染；IgM 具有激活补体的功能。Moriya 等^[32]通过灌胃直接给予小鼠含有乳清蛋白的膳食后测定 Ig 的

水平，结果表明乳清蛋白可显著性提升 Ig 的水平，Bumrungpert 等^[33]将乳清蛋白分离物以口服零食的方式用于癌症患者，在口服 6 周和 12 周时，与未服用的相比，乳清蛋白在口服 6 周后无显著性增加，口服 12 周后显著增加了患者体内 Ig 和 ALB 的水平。本实验 WP 和 BSP 在喂食 60 d，与 CP 组相比，无显著性差异，可能是由于采用的自由进食的方式，或者喂食时间还较短，但是 BS-WP 组大鼠血清中的 Ig 水平高于 CP、WP、BSP，因此，可知 BS-WP 促进大鼠血清中 Ig 水平的升高。



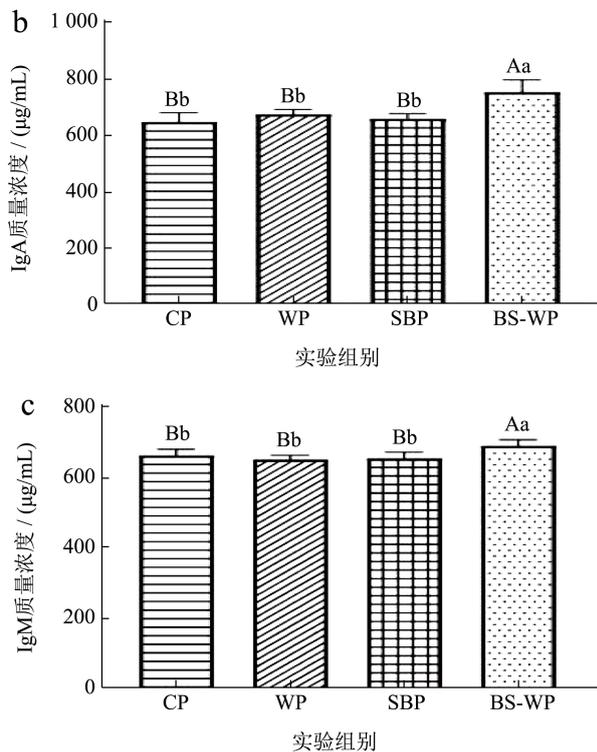


图3 饲喂不同组别饲料对SD大鼠血清Ig分泌的影响

Fig.3 Effects of feeding different groups of feeds on the secretion of serum Ig in SD rats

注：有相同字母者表示组间差异不显著，无相同字母者表示组间差异显著，其中大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)，小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)，下图同。

2.4 免疫器官指数的测定

免疫器官指数的变化可指示机体的免疫能力，脾脏是动物的外周免疫器官，富含T淋巴细胞、B淋巴细胞和巨噬细胞，是体液和细胞免疫的中心。胸腺是动物的一级免疫器官，对T细胞成熟和分化起重要作用^[34]。各组大鼠解剖后器官如图4所示，各组器官组织形态均无明显病变。

从图5a可知，与CP组相比，WP和BSP组的脾脏指数分别增长了24.98%和24.45%。而BS-WP组大鼠的脾脏指数显著高于其余三组，与其余三组相比，脾脏指数分别增长了69.14%、35.33%和35.91%。由图5b可知，饲喂WP和BSP大鼠的胸腺指数显著高于CP组，WP和BSP的胸腺指数分别增加52.47%和49.35%。而BS-WP大鼠的胸腺指数均显著高于CP、WP和BSP，BS-WP大鼠的胸腺指数对比CP、WP和BSP分别增加91.33%、31.51%和34.26%。

由以上结果可知，WP和BSP可促进大鼠免疫器官指数的增加，但是BS-WP增加免疫器官指数

更为显著。Shiro等^[35]将含有5%的乳清蛋白人工饲喂仔鼠，通过评估仔鼠脾脏和胸腺的重量并对免疫器官进行蛋白质组学分析，结果表明乳清蛋白可增加仔鼠脾脏和胸腺的重量并促进免疫器官的免疫活性。李昱锟等^[36]研究表明黑豆肽可增加小鼠脾脏指数和胸腺指数。上述两试验结果均与本实验结果相似，本试验中CP组和WP组也可增加免疫器官指数，且BS-WP组大鼠的免疫器官指数增加更为显著，由此表明BS-WP更能提高机体的免疫力。

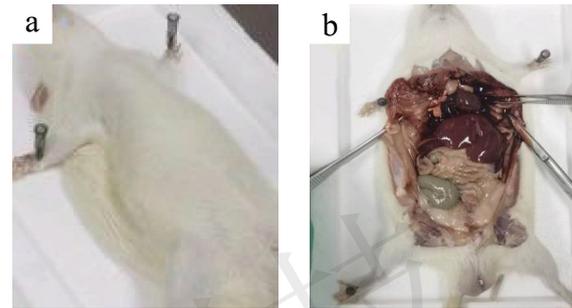


图4 SD大鼠解剖过程中状态图

Fig.4 State of SD rats during anatomy

注：(a)麻醉状态大鼠图片；(b)解剖状态大鼠图片。

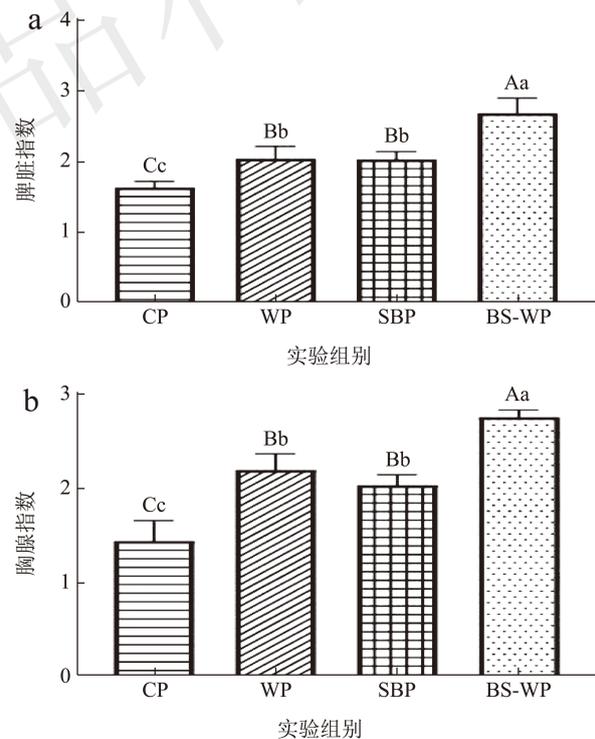


图5 饲喂不同组别饲料对SD大鼠免疫器官指数的影响

Fig.5 Effect of feeding different groups of feeds on immune organ index of SD rats

2.5 脾淋巴细胞增殖实验和NK细胞活力的分析

为了更全面的评价BS-WP对大鼠免疫的影响，

对脾脏淋巴细胞和NK细胞的活力进行测定。结果如图6所示,脾淋巴细胞增殖指数由图6a可知,WP和BSP组大鼠的脾淋巴细胞增殖指数均高于CP组,且WP和BSP组较于CP组增加了15.00%和29.67%,BS-WP组显著高于CP、WP和BSP组,BS-WP组的脾脏淋巴增殖指数比CP、WP和BSP组的多加66.33%、44.64%和28.28%。NK细胞活力结果如图6b所示,CP、WP和BSP组大鼠的NK细胞活力之间无显著性差异,而BS-WP组大鼠的NK细胞活力显著高于其他组,与其余三组相比,BS-WP组的NK细胞活力分别增长了21.25%、34.72%和25.97%。已有研究表明,采用黑豆蛋白对小鼠进行灌胃后,

可增加淋巴细胞增殖指数和NK细胞活力,该结果与本试验BSP组脾淋巴细胞增殖指数变化情况一致,但是BSP组的NK细胞活力与CP相比无显著性差异,可能是由于本试验的进食方式与文献不同所导致^[37]。冯学轩等^[38]采用乳清蛋白与葡聚糖组合对小鼠进行灌胃,测定脾淋巴细胞增殖指数增加了5%~30%,NK细胞活力增加了7%~20%,结果表明高剂量组的混合物可显著性提高脾淋巴细胞增殖指数和NK细胞活力,这一结果与本实验WP和BS-WP组大鼠的脾淋巴细胞增殖指数和NK细胞活力是一致的。通过以上结果可知,BS-WP可提升的SD大鼠的脾淋巴细胞增殖和NK细胞活力。

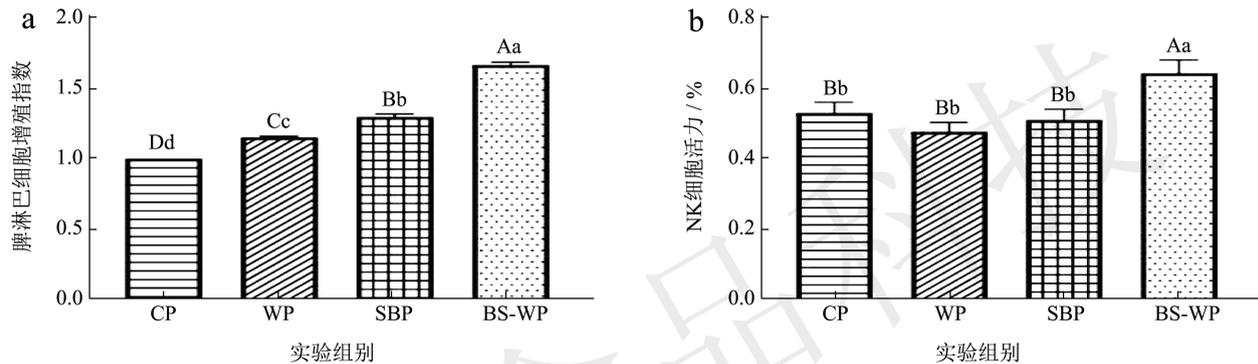


图6 饲喂不同组分饲料对SD大鼠淋巴细胞增殖和NK细胞活力的影响

Fig.6 Effects of feeding different feed components on lymphocyte proliferation and NK cell activity in SD rats

3 结论

试验使用酪蛋白、黑豆蛋白、乳清蛋白、“黑豆-乳清双蛋白”对SD大鼠进行60d的饲喂,检测血清生化指标、免疫球蛋白、免疫器官指数、脾淋巴细胞增殖指数、NK细胞活力等免疫学指标,探究“黑豆-乳清双蛋白”膳食对机体免疫性能的影响。试验结果表明,“黑豆-乳清双蛋白”膳食可提高大鼠血液中TP、ALB等血清生化指标的含量,显著提升大鼠血清中IgA、IgG、IgM的分泌水平,提高免疫器官(脾脏和胸腺)指数,促进脾脏淋巴细胞增殖并使NK细胞活力显著提升。因此,BS-WP组双蛋白膳食可显著提升SD大鼠的机体免疫性能。

参考文献

- [1] LEE A H, DIXIT V D. Dietary regulation of immunity [J]. *Immunity*, 2020, 53(3): 510-523.
- [2] NIE C, XIE F, MA N, et al. Nutrients mediate bioavailability and turnover of proteins in mammals [J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2019, 20(7): 661-

665.

- [3] DISKIN C, RYAN T, O'NEILL L. Modification of proteins by metabolites in immunity [J]. *Immunity*, 2020, 54(1): 19-31.
- [4] QAMAR S, MANRIQUE Y J, PATEKH H, et al. Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 60(4): 1-21.
- [5] MARINANGELI C, FABEK H, AHMED M, et al. The effect of increasing intakes of plant protein on the protein quality of canadian diets [J]. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 2021, 46(7): 771-780.
- [6] JB A, IJJA B. Food-grade strategies to increase stability of whey protein particles: Particle hardening through aldehyde treatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105353.
- [7] FRIDA H, MIKAEL N, JUUL H J, et al. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 1: 69-75.
- [8] JAKUBOUICZ D, FROY O. Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat

- obesity and Type 2 diabetes [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, 24(1): 1-5.
- [9] LEE J H, PAEK S H, SHIN H W, et al. Effect of fermented soybean products intake on the overall immune safety and function in mice [J]. *Journal of Veterinary Science (Suwŏn-si, Korea)*, 2016, 18(1): 25-32.
- [10] 王丽芳. 黑豆的补血抗衰作用[J]. *湖南农业*, 2002, 22: 44.
- [11] MONKJ M, WU W, HUTCHINSON A L, et al. Navy and black bean supplementation attenuates colitis-associated inflammation and colonic epithelial damage [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2018, 56: 215-223.
- [12] 王常青, 任海伟, 王海凤, 等. 黑豆多肽对D-半乳糖衰老小鼠抗氧化能力的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(3): 262-266.
- [13] 都阳. 双蛋白营养代餐粉研制与功效评价[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [14] REIDY P T, WALKER D K, DICKINSON J M, et al. Soy-dairy protein blend and whey protein ingestion after resistance exercise increases amino acid transport and transporter expression in human skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2014, 116(11): 1353-1364.
- [15] 任广旭, 伊素芹, 卢林纲, 等. “牛乳与大豆”双蛋白运动营养功能的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2015, 15: 154-161.
- [16] REIDY PT, WALKER DK, DICKINSON JM, et al. Protein blend ingestion following resistance exercise promotes human muscle protein synthesis [J]. *J Nutr*, 2013, 143(4): 410-416.
- [17] 王靖, 张婧婕, 韩迪, 等. 双蛋白营养干预促进肠-肝-脾轴免疫互作[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 1-9.
- [18] REN G, ZHANG J, LI M, et al. Protein blend ingestion before allogeneic stem cell transplantation improves protein-energy malnutrition in patients with leukemia [J]. *Nutrition Research*, 2017, 46: 68-77.
- [19] 时佳, 赵新淮. 糖基化酪蛋白消化物对正常小鼠免疫调节作用的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 140-145.
- [20] WANG M C, JIANG C X, MA L P, et al. Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *hovenia dulcis* [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 41-47.
- [21] YUAN C F, WANG C D, BU Y Q, et al. Antioxidative and immunoprotective effects of *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) lipopolysaccharides in mice [J]. *Immunology Letters*, 2010, 133(1): 14-18.
- [22] WARWICK ZS, HALL WG, PAPPAS TN, et al. Taste and smell sensations enhance the satiating effect of both a high-carbohydrate and a high-fat meal in humans [J]. *Physiol Behav*, 1993, 53 (3): 553-563.
- [23] BILLEAUD C, GUILLET J, SANDLER B. Gastric emptying in infants with or without gastro-oesophageal reflux according to the type of milk [J]. *Eur J Clin Nutr*, 1990, 44(8): 577-583.
- [24] 陈燕勤, 余增才, 刘芷君, 等. 不同周龄不同性别SD大鼠主要生化指标的比较分析[C]//北京: 中国毒理学会, 2019: 90.
- [25] FARNFIELD MM, TRENNERY C, CAREY KA, et al. Plasma amino acid response after ingestion of different whey protein fractions [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2009, 60 (6): 476-486.
- [26] ISHIBASHI T, YONEMOCHI C. Amino acid nutrition in egg production industry [J]. *Animal Science Journal*, 2015, 74(6): 457-469.
- [27] 曹翔, 周金花, 蔡东联, 等. 高乳清蛋白的肠内营养对大鼠伤口愈合的影响[J]. *氨基酸和生物资源*, 2013, 35(3): 68-70.
- [28] 王建红, 刁其玉, 许先查, 等. 赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸对犊牛生长性能和血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报* 2011, 23(2): 226-233.
- [29] 张宇, 李晓东, 刘璐, 等. 乳清蛋白降胆固醇肽的制备及活性研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(3): 14-20.
- [30] 李思锦, 宋春丽, 王欣卉, 等. 黑豆肽对高脂性肝损伤小鼠的保护作用[J]. *食品科学*, 2022, 43(5): 127-132.
- [31] HAN L, ZHANG X Z, WANG C, et al. IgD-Fc-Ig fusion protein, a new biological agent, inhibits T cell function in CIA rats by inhibiting IgD-IgDR-Lck-NF- κ B signaling pathways[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 41(6): 800-812.
- [32] MORIYA T, FUKATSU K, NOGUCHI M, et al. Effects of semielemental diet containing whey peptides on peyer's patch lymphocyte number, immunoglobulin a levels, and intestinal morphology in mice[J]. *Journal of Surgical Research*, 2018, 222: 153-159.
- [33] BUMRUNGPET A, PAVADHGL P, NUNTHANAWANICH P, et al. Whey protein supplementation improves nutritional status, glutathione levels, and immune function in cancer patients: a randomized, Double-Blind controlled trial [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2018, 21(6): 612-616.
- [34] OH M J, CHOI H D, HA S K, et al. Immunomodulatory effects of polysaccharide fraction isolated from *Fagopyrum esculentum* on innate immune system [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 496(4): 1210-1216.
- [35] TAKEDA S, HARAUMA A, OKAMOTO M, et al. Effects of whey protein hydrolysate on growth promotion and immunomodulation in mouse pups in artificial rearing system [J]. *Animal Science Journal*, 2020, 91(1): 13395.
- [36] 李昱锟, 宋春丽, 任健. 黑豆肽对正常小鼠免疫调节功能的影响[J]. *农产品加工*, 2021, 23: 1-5, 10.
- [37] 吕苏成, 蒙昌金, 莫炳强, 等. 小鼠限量对小鼠免疫功能、肠道菌群及寿命的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 1999, 3: 18-19.
- [38] 冯学轩, 王弋, 严家荣, 等. 天然蛋白与酵母 β -葡聚糖组合增强免疫力功能研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(16): 1938-1942.