



(2003)量认(国)字(S1802)号

中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

检 验 报 告

样品受理编号: 200607025

第 1 页 / 共 8 页

样品名称:	活绿美牌小球藻片		
送检单位:	光壁企业股份有限公司		
生产单位:	光壁企业股份有限公司		
样品批号:	2006年5月24日		
标示保质期:	保存时间: 24个月	保存条件: 常温	
样品性状:	剂型: 片剂	颜色: 绿色	
样品数量:	0.2g/片×1200片/罐×2罐+3000g粉剂		
收样日期:	2006年7月18日		
检验项目:	增强免疫力功能		
检验依据:	《保健食品检验与评价技术规范-2003》		

检验结果:

本实验结果表明, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片, 低剂量能提高小鼠的脾脏/体重比值、迟发型变态反应、淋巴细胞增殖能力、抗体生成细胞数 ($P<0.05$, $P<0.01$); 低、高剂量能提高小鼠的血清溶血素半数溶血值 (HC50) ($P<0.01$); 高剂量能提高免疫三组小鼠的体重增长值 ($P<0.01$)。活绿美牌小球藻片对小鼠的胸腺/体重比值、单核-巨噬细胞碳廓清能力、Nk 细胞活性本次实验未见到有影响。依据《保健食品检验与评价技术规范-2003》中增强免疫力功能的结果判定, 认为活绿美牌小球藻片有增强免疫力功能。(以下空白)

签发人:

签发日期 2007年2月1日



活绿美牌小球藻片增强免疫力功能动物实验报告

1 材料与方法

1.1 样品:

由光壁企业股份有限公司提供活绿美牌小球藻片, 样品为罐装绿色片剂, 0.2g/片, 1200 片/罐, 常温保存。

1.2 实验动物:

选用中国医学科学院实验动物研究所(许可证编号为 SCXK(京)2004-0001 号)繁殖的清洁级小鼠, 在中国医学科学院药物研究所动物实验中心(许可证编号: SYXK(京)2004-0001)饲养。其中 BalB/c 雌性小鼠 48 只, 体重 18~22g, 分为 4 组, 每组 12 只, 作为免疫一组, 进行脏器/体重比值、迟发型变态反应、半数溶血值(HC50)的测定、抗体生成细胞检测; 昆明雌性小鼠 60 只, 体重 18~22g, 分为 4 组, 每组 15 只, 作为免疫二组, 进行碳廓清实验; BalB/c 雌性小鼠 48 只, 体重 18~22g, 分为 4 组, 每组 12 只, 作为免疫三组, 进行 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验和 NK 细胞活性测定实验。

1.3 剂量选择:

活绿美牌小球藻片人体推荐量为每人(成人)每日 45 片, 总量为 9g/60kg. BW。本实验设计了高、中、低三个剂量组, 即小鼠每只经口灌胃分别给予活绿美牌小球藻片 4.5g/kg. BW、1.5g/kg. BW 和 0.45g/kg. BW, 分别相当于人体推荐用量的 30 倍、10 倍和 3 倍。将活绿美牌小球藻片按比例用蒸馏水稀释配制高、中、低剂量浓度, 对照组直接以蒸馏水灌胃, 灌胃量均为 0.4mL/20g. BW。连续给予受试物 30 天后活杀小鼠并测定各项免疫指标。

1.4 仪器与试剂:

动物天平、分析天平、洁净工作台、二氧化碳培养箱、离心机、恒温水浴、酶标仪、显微镜等。

无菌手术器械、游标卡尺(精密度 0.01mm)、微量注射器(25 μ l)、细胞计数器、24 孔和 96 孔平底细胞培养板、96 孔 U 型细胞培养板、玻璃平皿、纱布、试管、玻片架、200 目筛网、计时器、血色素吸管、载玻片等。

绵羊红细胞(SRBC)、鸡红细胞、生理盐水、Hank's 液(pH7.2)、RPMI1640 培养液、小牛血清、青链霉素、刀豆蛋白 A(ConA)、1%冰醋酸、1mol/L 的 HCL 溶液、酸性异丙醇(96ml 异丙醇加 4ml 1mol/L 的 HCL 溶液)、MTT、PBS 缓冲液(pH7.2-7.4)、补体(豚鼠血清)、SA 缓冲液、琼脂糖、YAC-1 细胞、乳酸钠、硝基氯化四氮唑、吩嗪二甲酯硫酸盐、氧化型辅酶 I、0.2mol/L 的 Tris-HCL 缓冲液(pH8.2)、1%NP40、印度墨汁、0.1%Na₂CO₃、Giemsa 染液等。

1.5 实验方法:

1.5.1 脏器/体重比值测定

小鼠称重后脱臼处死,取脾脏和胸腺,去尽筋膜,用滤纸吸干脏器表面血污,称重,计算脾脏/体重比值和胸腺/体重比值。

1.5.2 迟发型变态反应(足趾增厚法)(DTH)

取羊血,生理盐水洗涤 3 次,每只鼠经腹腔注射 2%(v/v,用生理盐水配制)压积 SRBC(2000rpm,10 分钟)0.2ml,致敏后 4 天,测量左后足趾部厚度,同一部位测量两次,取平均值。然后在测量部位皮下注射 20%(v/v,用生理盐水配制)压积 SRBC20 μ l,于注射后 24 小时测量左后足趾部厚度,以攻击前后足趾厚度的差值(足趾肿胀度)来表示 DTH 的程度。

1.5.3 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验(MTT 法)

将小鼠处死,在 75%酒精的烧杯中灭菌 10 分钟后,无菌取脾,置于高压灭菌后装有 3cm \times 3cm 四层纱布的小平皿中,加入适量无菌 Hank's 液,用纱布将脾包住,用弯头镊子轻轻将脾磨碎,制成单细胞悬液,用 Hank's 液洗三次,每次 1000rpm 离心 10 分钟。然后将细胞悬浮于 2ml 的完全培养液中,计数活细胞数,调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml。再将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中,每孔 1ml,在其中一孔加 75 μ l ConA 液(相当于 7.5 μ g/ml),另一孔作为对照,置 5%CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养 72 小时。培养结束前 4 小时,每孔轻轻吸去上清液 0.7ml,加入 0.7ml 不含小牛血清的 RPMI 1640 培养液,同时加入 MTT(5mg/ml)50 μ l/孔,继续培养 4 小时。培养结束后,每孔加入 1ml 酸性异丙醇,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解。然后移入比色杯中,在 721 分光光度计上比色测定,波长为 570nm。淋巴细胞的增值能力用加 ConA 孔的光密度值减去不加 ConA 孔的光密度值表示。

1.5.4 抗体生成细胞检测(Jerme 改良玻片法)

取羊血,生理盐水洗涤 3 次,每只鼠经腹腔注射 2%(v/v,用生理盐水配制)压积 SRBC 0.2ml。将 SRBC 免疫 4 天后的小鼠处死,取脾,制成细胞悬液。将琼脂糖加热溶解后,与等量双倍 Hank's 液混合,分装小试管,每管 0.5ml,再向管内加 10%(v/v,用 SA 液配制)压积 SRBC 50 μ l,脾细胞悬液 20 μ l,迅速混匀后,倾倒在已刷琼脂糖薄层的玻片上,待琼脂凝固后,将玻片水平扣放在片架上,放入二氧化碳培养箱中孵育 1.5 小时,然后用 SA 缓冲液稀释的补体(1:10)加入到玻片架凹槽内,继续孵育 1.5 小时,计数溶血空斑数。

1.5.5 血清溶血素半数溶血值(HC50)的测定

取羊血,生理盐水洗涤 3 次,每只鼠经腹腔注射 2%(v/v,用生理盐水配制)压积 SRBC 0.2ml。4 天后,摘除眼球取血于 1.5ml 离心管内,放置约 1 小时,使血清充分析出,2000rpm 离心 10 分钟,收集血清。用 SA 缓冲液将血清稀释为 200 倍,取 1ml 于试管内,依次加入 10%(v/v,用 SA 液配制)压积 SRBC0.5ml,补体 1ml(用 SA 液按 1:7 稀释)。另设不加血清的对照管(用 SA 液替代)。置 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温 30 分钟后,冰浴终止反应。2000 rpm 离心 10 分钟,取上清 1ml,加都氏试剂 3ml。同时取 10%(v/v,用 SA 液配制)压积 SRBC0.25ml,加都氏试剂至 4ml 于另一个试管中。充分混匀,放置 10 分钟后,于 540nm 处以对照管作空白,在 721 分光光度计上分别测定各管光密度值。溶血素的量以半数溶血值(HC50)表示,按下式计算。

样品 HC50=样品光密度值/SRBC 半数溶血时的光密度值 \times 稀释倍数

1.5.6 小鼠碳廓清实验

小鼠尾静脉注射 1:4 稀释的印度墨汁,待墨汁注入,立即计时。注入墨汁后和注入墨汁 10 分钟后,分别从内眦静脉丛取血 20ul,并将其加到 2mL 的 Na_2CO_3 溶液中,用 721 分光光度计在 600nm 波长处测光密度值(OD),以 Na_2CO_3 溶液作为空白对照。将小鼠处死,取肝脏和脾脏称重。按下式计算吞噬指数 a:

$$k = (\lg OD_1 - \lg OD_2) / (t_2 - t_1) \quad a = \text{体重} \div (\text{肝脏} + \text{脾脏}) \times \sqrt[3]{k}$$

1.5.7 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶 LDH 测定法)

实验前 24 小时将靶细胞 YAC-1 进行传代培养,应用前以 Hank's 液洗 3 次,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL。受试小鼠拉颈处死,无菌取脾,制成脾细胞悬液,用 Hank's 液洗 3 次,1500rpm 离心 10 分钟,在用 2mL 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液重悬,用台酚兰染色计数(活细胞数应在 95% 以上),调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL,使效靶比为 50:1。取靶细胞和效应细胞各 100ul,加入 U 形 96 孔培养板中,靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100ul,靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1% NP40 各 100ul,上述各项均设三个平行孔,37°C,5% CO_2 培养箱中培养 4 小时,将 96 孔以 1500rpm 离心 5 分钟,每孔吸取上清 100ul 置酶标板中,加入 LDH 基质液 100ul,反应 10 分钟,然后每孔加入 1mol 的 HCl 溶液 30ul 终止反应,在酶标仪 490nm 处测 OD 值, NK 活性按下式计算:

$$\text{NK 细胞活性} \% = \frac{\text{反应孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}}{\text{最大释放孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}} \times 100$$

LDH 基质液的配制: 乳酸钠 5×10^{-2} mol/L

硝基氯化四氮唑 6.6×10^{-4} mol/L

吩嗪二甲酯硫酸盐 2.8×10^{-4} mol/L

氧化型辅酶 I 1.3×10^{-3} mol/L

将上述试剂溶于 0.2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中 (Ph8.2)

1.6 实验数据输入计算机,用 SPSS11.5 软件进行方差分析。

1.7 结果判定

1.7.1 增强免疫力功能判定:在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK 细胞活性四个方面任两个方面结果阳性,可判定该受试样品具有增强免疫力功能作用。

其中,细胞免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性,或任一个实验的两个剂量组结果阳性,可判定细胞免疫功能测定结果阳性。体液免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性,或任一个实验的两个剂量组结果阳性,可判定体液免疫功能测定结果阳性。单核-巨噬细胞功能测定项目中的两个实验结果均为阳性,或任一个实验的两个剂量组结果阳性,可判定单核-巨噬细胞功能结果阳性。NK 细胞活性测定实验的一个以上剂量组结果阳性,可判定 NK 细胞活性结果阳性。

2 结果

2.1 活绿美牌小球藻片对小鼠体重的影响

表 1 各组小鼠的初始体重 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	免疫一组		免疫二组		免疫三组	
	体重(g)	P 值	体重(g)	P 值	体重(g)	P 值
0.00	18.7±0.32		21.2±0.74		19.0±0.52	
0.45	18.8±0.49	0.734	21.5±0.71	0.312	18.9±0.38	0.878
1.50	18.8±0.50	0.671	21.3±0.69	0.769	18.7±0.51	0.322
4.50	18.8±0.56	0.932	21.1±1.03	0.804	19.0±0.66	1.000

注: P 为与空白对照组比较

由表 1 可见, 经统计学处理, 小鼠的初始体重在各剂量组与对照组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 2 活绿美牌小球藻片对小鼠体重的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	免 疫 一 组			
	动物数(只)	体 重(g)	增长值	P 值
0.00	12	21.0±0.81	2.30±0.88	
0.45	12	21.1±0.63	2.27±0.59	0.933
1.50	12	21.2±0.94	2.42±0.58	0.673
4.50	12	21.3±0.69	2.53±0.78	0.432

剂量浓度 (g/kg. BW)	免 疫 二 组			
	动物数(只)	体 重(g)	增长值	P 值
0.00	15	36.1±2.98	14.9±2.97	
0.45	15	35.9±2.52	14.4±2.58	0.607
1.50	15	35.4±1.94	14.2±2.05	0.464
4.50	15	35.4±2.96	14.3±2.89	0.533

剂量浓度 (g/kg. BW)	免 疫 三 组			
	动物数(只)	体 重(g)	增长值	P 值
0.00	12	21.8±1.08	2.83±1.07	
0.45	12	22.3±0.92	3.37±0.88	0.122
1.50	12	22.2±0.77	3.49±0.59	0.058
4.50	12	22.9±0.64	3.92±0.69**	0.003

与对照组比较: ** $P < 0.01$

由表 2 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 小鼠的体重增长值在免疫三组高剂量组与对照组间比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.2 活绿美牌小球藻片对小鼠脏器/体重比值的影响

表 3 活绿美牌小球藻片对小鼠脏器/体重比值的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	动物数 (只)	脾脏/体重 比值(mg/g)	P 值	胸腺/体重 比值(mg/g)	P 值
0.00	12	5.95±0.71		2.31±0.40	
0.45	12	6.75±0.58**	0.005	2.08±0.54	0.201
1.50	12	5.85±0.61	0.698	2.30±0.37	0.985
4.50	12	5.69±0.75	0.337	2.12±0.39	0.288

与对照组比较: ** P<0.01

由表 3 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 其脾脏/体重比值在低剂量组与对照组间比较有显著性差异(P<0.01); 胸腺/体重比值在各剂量组与对照组间比较无显著性差异(P>0.05)。

2.3 活绿美牌小球藻片对小鼠细胞免疫功能的影响

2.3.1 活绿美牌小球藻片对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响

表 4 活绿美牌小球藻片对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	动物数(只)	足趾肿胀度(mm)	P 值
0.00	12	0.38±0.052	
0.45	12	0.46±0.091*	0.025
1.50	12	0.44±0.097	0.070
4.50	12	0.44±0.091	0.063

与对照组比较: * P<0.05

由表 4 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 其足趾肿胀度在低剂量组与对照组间比较有显著性差异(P<0.05)。

2.3.2 活绿美牌小球藻片对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验的影响

表 5 活绿美牌小球藻片对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验的影响
($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	动物数(只)	淋巴细胞增值能力(OD 差值)	P 值
0.00	12	0.245±0.039	
0.45	12	0.317±0.109*	0.041
1.50	12	0.248±0.086	0.938
4.50	12	0.281±0.087	0.305

与对照组比较: * P<0.05

由表 5 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 其淋巴细胞的增殖能力在低剂量组与对照组间比较有显著性差异(P<0.05)。

2.4 活绿美牌小球藻片对小鼠体液免疫的影响

2.4.1 活绿美牌小球藻片对小鼠抗体生成细胞数的影响

表 6 活绿美牌小球藻片对小鼠抗体生成细胞数的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	动物数(只)	溶血空斑数($\times 10^3$ 全脾)	P 值
0.00	10	7.42 \pm 2.57	
0.45	11	9.66 \pm 2.55*	0.030
1.50	10	8.25 \pm 2.01	0.421
4.50	11	8.54 \pm 1.86	0.265

与对照组比较: * P<0.05

由表 6 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 其抗体生成细胞数在低剂量组与对照组间比较有显著性差异(P<0.05)。

2.4.2 活绿美牌小球藻片对小鼠半数溶血值 (HC50) 的影响

表 7 活绿美牌小球藻片对小鼠半数溶血值 (HC50) 的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	动物数(只)	HC50	P 值
0.00	10	67.28 \pm 17.86	
0.45	12	116.3 \pm 26.06**	0.000
1.50	10	72.68 \pm 26.93	0.624
4.50	12	95.86 \pm 25.38**	0.009

与对照组比较: ** P<0.01

由表 7 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 其半数溶血值 (HC50) 在低、高剂量组与对照组间比较有显著性差异(P<0.01)。

2.5 活绿美牌小球藻片对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

2.5.1 活绿美牌小球藻片对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的影响

表 8 活绿美牌小球藻片对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清能力的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	动物数(只)	吞噬指数(a)	P 值
0.00	15	6.17 \pm 1.35	
0.45	15	6.16 \pm 1.40	0.985
1.50	15	6.35 \pm 1.20	0.702
4.50	15	6.92 \pm 1.08	0.111

由表 8 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 其碳廓清功能在各剂量组与对照组间比较无显著性差异(P>0.05)。

2.6 活绿美牌小球藻片对小鼠 Nk 细胞活性的影响

表 9 活绿美牌小球藻片对小鼠 Nk 细胞活性的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

剂量浓度 (g/kg. BW)	动物数(只)	NK 细胞活性(%)	P 值
0.00	12	4.88±2.44	
0.45	12	4.27±2.24	0.495
1.50	12	4.57±1.32	0.726
4.50	12	5.04±2.40	0.853

由表 9 可见, 经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 其 Nk 细胞活性在各剂量组与对照组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 小结

经口给予小鼠不同剂量的活绿美牌小球藻片 30 天, 经统计学处理, 脾脏/体重比值、抗体生成细胞数、迟发型变态反应、淋巴细胞的增殖能力在低剂量组与对照组间比较有显著性提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 血清溶血素半数溶血值 (HC50) 在低、高剂量组与对照组间比较有显著性提高 ($P < 0.01$); 体重增长值在免疫三组高剂量组与对照组间比较有显著性提高 ($P < 0.01$)。本次实验未见到活绿美牌小球藻片对小鼠的胸腺/体重比值、单核-巨噬细胞碳廓清能力、Nk 细胞活性的影响。依据《保健食品检验与评价技术规范-2003》中增强免疫力功能的结果判定, 认为活绿美牌小球藻片有增强免疫力功能。根据全国防控高致病性禽流感指挥部的要求, 北京市暂停活禽交易活动, 无法购买到活鸡取血; 经过多方查询, 目前市场上也无商品化新鲜鸡血出售; 鉴于这种状况, 本次实验未进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验。特此说明。(以下空白)

