

杨辉, 章晋武, 李广焱, 等. 一种抗氧化膳食补充剂的增强免疫作用和毒理学评价 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 300–307. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080146

YANG Hui, ZHANG Jinwu, LI Guangyan, et al. Study on Immune Enhancement and Toxicological Evaluation of an Antioxidant Supplement[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 300–307. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080146

· 营养与保健 ·

一种抗氧化膳食补充剂的增强免疫作用和毒理学评价

杨 辉¹, 章晋武¹, 李广焱², 邓泽元^{2,*}

(1.南昌同心紫巢生物工程有限公司, 江西南昌 330200;

2.食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌大学, 江西南昌 330047)

摘 要: 研究以雨生红球藻为主要原料复配富硒酵母、蜂花粉提取物和维生素 E 组成的抗氧化膳食补充剂的免疫作用 and 安全性。采用低、中、高三个剂量 (0.1、0.2、0.4 g/kg bw) 每天一次灌胃, 连续 30 d, 观察对小鼠脾脏、胸腺指数、脾淋巴细胞转化活性、迟发型变态反应、抗体生成细胞水平、半数溶血值 (HC₅₀)、碳粒廓清速率、巨噬细胞的吞噬作用和自然杀伤细胞活性等指标的影响; 通过 Ames 试验、骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验分别评估受试物的致癌潜力, 以及对细胞和生殖系统的遗传毒性情况; 通过 30 d 喂养试验考察受试物亚急性毒性。结果发现, 与对照组相比, 中、高剂量组 OD 差值分别提高了 10.32% ($P<0.05$) 和 14.29% ($P<0.01$), 说明该膳食补充剂可以促进小鼠的脾淋巴细胞增殖转化能力; 高剂量组左右耳肿胀度差增加了 8.02% ($P<0.05$), 抗体积数增加了 22.12% ($P<0.05$), 说明该膳食补充剂可以显著提升迟发型变态反应能力和抗体生成细胞能力; 无急性毒性、遗传毒性和亚急性毒性。实验证明, 雨生红球藻、富硒酵母、蜂花粉提取物和维生素 E 复配的抗氧化膳食补充剂食用安全, 具有增强免疫力的功能。

关键词: 抗氧化膳食补充剂, 虾青素, 蜂花粉提取物, 富硒酵母, 免疫, 毒理学评价

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)13-0300-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080146

本文网刊:



Study on Immune Enhancement and Toxicological Evaluation of an Antioxidant Supplement

YANG Hui¹, ZHANG Jinwu¹, LI Guangyan², DENG Zeyuan^{2,*}

(1.Nanchang Tongxin Zichao Bioengineering Co., Ltd., Nanchang 330200, China;

2.State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: To study the immunomodulatory effects and safety of an antioxidant supplement composed primarily of *Haematococcus pluvialis*, selenium-enriched yeast, bee pollen extract, and vitamin E. Three different dosages (0.1, 0.2, and 0.4 g/kg bw) were administered via gavage once daily for 30 days in mice. The impact of this antioxidant supplement was observed on various parameters, including spleen index, thymus index, splenic lymphocyte transformation activity, delayed-type hypersensitivity, antibody-producing cell levels, hemolytic complement 50 (HC₅₀), carbon clearance rate, phagocytic activity of macrophages, and natural killer cell activity. The potential carcinogenicity of the test materials, and their genotoxic effects on cells and the reproductive system were assessed through the Ames test, bone marrow micronucleus assay, and mouse sperm abnormality test, respectively. Subacute toxicity was investigated through a 30 day feeding trial. Results showed that compared to the control group, the middle and high-dosage groups exhibited significant increase in OD difference by 10.32% ($P<0.05$) and 14.29% ($P<0.01$), respectively. It indicated that the antioxidant supplement promoted

收稿日期: 2023-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872890); 食品科学与资源挖掘全国重点实验室目标导向课题项目 (SKLF-ZZA-202210)。

作者简介: 杨辉 (1987-), 男, 硕士, 研究方向: 功能性食品, E-mail: 3137977708@qq.com。

* 通信作者: 邓泽元 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品开发, E-mail: 273736939@qq.com。

splenic lymphocyte proliferation and transformation capacity in mice. In the high-dosage group, the difference in ear swelling between the left and right ears increased by 8.02% ($P<0.05$), and the number of antibody volumes increased by 22.12% ($P<0.05$). It suggested that the antioxidant supplement significantly improved delayed-type hypersensitivity and antibody-producing cell capacity. Importantly, no acute toxicity, genotoxicity, or subacute toxicity were observed. It is demonstrated that the antioxidant supplement is safe for consumption and significantly enhances immunity.

Key words: antioxidant supplement; astaxanthin; bee pollen extract; selenium-enriched yeast; immunity; toxicological evaluation

雨生红球藻已批准为新食品原料,其主要功效成分是虾青素(Astaxanthin),是天然虾青素最好的来源^[1]。根据批准雨生红球藻新资源食品的公告规定,雨生红球藻中虾青素食用量 ≤ 12 mg/d。虾青素有多种生理功能,目前关于虾青素的抗氧化作用研究较多,是目前发现抗氧化作用最强的天然产物之一^[2-3]。虾青素对机体免疫也具有调节作用,能增加血清抗体水平^[4],能增加免疫相关基因的表达水平^[5],减少肝脏脂质的氧化从而改善肝脏炎症^[6]以及提升亲虾生殖能力^[7-8]等。将雨生红球藻来源的虾青素复配其他原料作为膳食补充剂,完善其功能作用及其机制,对拓展雨生红球藻的应用具有重要意义。

复配抗氧化剂的抗氧化文献报道较多,但增强免疫力功能文献报道较少^[9]。研究表明,雨生红球藻添加维生素 E 可以显著提高虾青素的稳定性^[10]。但以雨生红球藻为主要原料,同时复配富硒酵母、维生素 E 和蜂花粉提取物等物质尚未见报道,因此其功能性和安全性有必要进一步进行研究。本研究通过小鼠的免疫功能性试验考察该复配抗氧化膳食补充剂的免疫功能,并通过急性毒性、遗传毒性和亚急性毒性试验评估该抗氧化膳食补充剂的毒理安全性,为雨生红球藻相关产品开发和应用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雨生红球藻 昆明白鸥微藻技术有限公司;富硒酵母 安琪酵母股份有限公司;蜂花粉提取物 西安三江生物工程有限公司;维生素 E 浙江新和成药业有限公司;大豆油 中粮粮油工业(九江)有限公司;蜂蜡 抚州市临川区玉茗养蜂专业合作社;Ames 测试菌株 美国 Moltox 公司;生化试剂盒、血细胞分析试剂盒、环磷酰胺、叠氮化钠、1,8-二羟基蒽醌、2-氨基苄 武汉艾美捷科技有限公司;清洁级健康 ICR 小鼠、SD 大鼠 广西医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(桂)2014-0002,实验动物合格证号:45000300000634,动物实验室使用许可证号:SCXK(桂)2016-0002。

D180 二氧化碳培养箱、M1324R 离心机 深圳市瑞沃德生命科技有限公司;Triathler 液体闪烁计数器 美国 BIOSCAN 公司;ZT-III 型多头细胞样品收集器 上海新诺仪器设备有限公司;MD FlexStation 3 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司;721

分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;BC-30 全自动血液分析仪、BS-200 全自动生化分析仪 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗氧化膳食补充剂的制备 该抗氧化膳食补充剂以雨生红球藻来源的虾青素为主要原料,复配富硒酵母、蜂花粉提取物(油菜花粉用 80% 食用酒精回流提取、浓缩、干燥制得,提取率为 10%)和维生素 E 并以大豆油为辅料混合制成,其中雨生红球藻 20%,富硒酵母 2.5%,蜂花粉提取物 16.7%,大豆油 56.8%,维生素 E 0.5%,蜂蜡 4%。使每 100 g 产品中含虾青素 667 mg、硒 5.83 mg、蜂花粉提取物 16.7 g、维生素 E 417 mg。根据中华人民共和国卫生部发布的雨生红球藻新资源食品公告(虾青素食用量 ≤ 12 mg/d)以及本研究结果,确定虾青素食用量为 8 mg/d,即该抗氧化膳食补充剂食用量为 1.2 g/d。

1.2.2 免疫功能试验 按成人日推荐用量的 5、10、20 倍分别设 0.1、0.2、0.4 g/kg bw 3 个剂量组和溶剂(大豆油)对照组,每组 10 只 ICR 小鼠,雌雄各半,分别进行 5 次不同项目试验,每次 40 只。每天按 10 mL/kg bw 连续灌胃 30 d 后检测免疫指标。称量并记录小鼠体重、胸腺和脾脏重量,其中 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化试验、迟发型变态反应(DTH)试验、血清溶血素试验、抗体生成细胞、碳廓清试验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验(半体内法)和小鼠 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶 LDH 测定法):按原卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)进行。

1.2.3 急性毒性试验 急性毒性试验按原卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)进行。采用 20 g/kg bw 剂量,相当于成人日推荐量的 1000 倍,设雌雄 2 个试验组,每组 10 只 ICR 小鼠。将小鼠隔夜禁食 16 h,不禁水。膳食补充剂样品用大豆油稀释(10 g 至 20 mL),搅拌均匀,经口灌胃,每天灌胃 2 次,2 次间隔 4 h,连续 14 d,灌胃容量为 20 mL/kg bw。观察并记录灌胃后小鼠中毒表现和死亡情况。

1.2.4 遗传毒性试验 遗传毒性试验包括 Ames 试验、骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验,均按原卫生部颁布的《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)进行。其中骨髓细胞微核试验设 3 个剂量组为 2.5、5.0、10.0 g/kg bw,相当于成人日推荐量 125、250、500 倍,另设溶剂对照组(大豆油)和阳性

对照组(环磷酰胺, 40 mg/kg bw), 每组 10 只 ICR 小鼠, 雌雄各半, 均采用经口灌胃, 采用 30 h 给样法。小鼠精子畸形试验设 3 个剂量组为 2.5、5.0、10.0 g/kg bw, 相当于成人推荐量 125、250、500 倍, 另设溶剂对照组(大豆油)和阳性对照组(环磷酰胺, 40 mg/kg bw), 每组 5 只 ICR 小鼠, 均为雄性, 经口灌胃, 连续灌胃 5 d, 每日一次。

1.2.5 亚急性毒性试验(30 d 喂养试验) 亚急性毒性试验按原卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)进行。采用清洁级 SD 大鼠接受试物人日推荐量的 25、50 和 100 倍喂养 30 d, 设 3 个剂量组为 0.5、1.0、2.0 g/kg bw, 另设溶剂(大豆油)对照组, 每组 20 只, 雌雄各半。每只单笼独立放置, 样品按 5 mL/kg bw 经口灌胃, 每日一次, 其他饮食饮水自由。每天观察并记录动物形态和称重饲料洒漏量, 每周记录体重一次、食物摄入量两次。喂养 30 d 禁食过夜后动物称重, 采血作血常规及生化指标测定, 取出肝、肾、脾、睾丸称重, 并对肝、肾、脾、胃肠、睾丸、卵巢作病理学检查。

1.3 数据处理

用 SPSS 软件进行单因素方差分析。根据方差分析结果, 其中方差齐的实验数据采用 LSD 法进行统计分析, 方差不齐的实验数据采用 Tambane 法进行统计分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 免疫功能试验

2.1.1 脏器/体重比值的测定 胸腺指数和脾指数是评估小鼠免疫器官大小的指标, 能够反映出免疫器官的发育和功能状态。本膳食补充剂各剂量组胸腺指数、脾指数与对照组比较, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 结果见图 1。说明本品对胸腺指数和脾指数无明显影响。

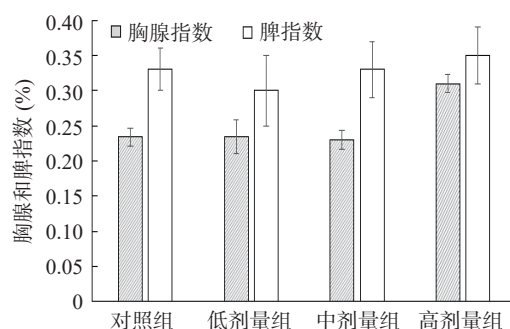


图 1 抗氧化膳食补充剂对胸腺指数、脾指数的影响

Fig.1 Effects of antioxidant supplement on the thymus and spleen index

2.1.2 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验

ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化试验是一种评估小鼠淋巴细胞免疫功能的方法, 通过观察 ConA 对小鼠淋巴细胞的刺激和增殖作用, 评估其细胞免疫功能。结果见图 2, 本品各剂量组的 OD 差随着剂量增加而

增加, 中、高剂量组小鼠淋转 OD 差值比对照组显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 表明该中、高剂量能促进小鼠的淋巴细胞转化。

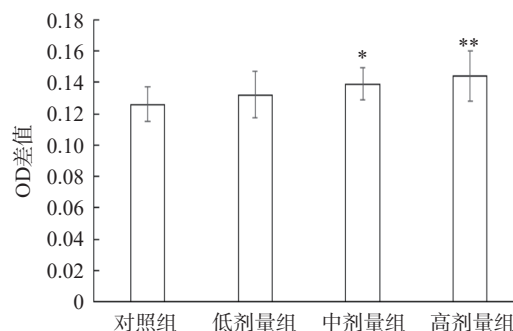


图 2 抗氧化膳食补充剂对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验的影响

Fig.2 Effects of antioxidant supplement on cellular immunity test of ConA-induced mouse splenic lymphocyte transformation 注: *表示与对照组相比, $P < 0.05$; **表示与对照组相比, $P < 0.01$; 图 3、图 5 同。

2.1.3 迟发型变态反应试验 迟发型变态反应(DTH)

检测是一种评估细胞免疫功能的方法, 通过皮下注射抗原物质, 观察小鼠是否产生皮肤变态反应, 以评估其细胞免疫功能。本品高剂量组小鼠左右耳肿胀度差明显比对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见图 3。表明该产品高剂量能促进小鼠的 DTH, 提高细胞免疫功能。

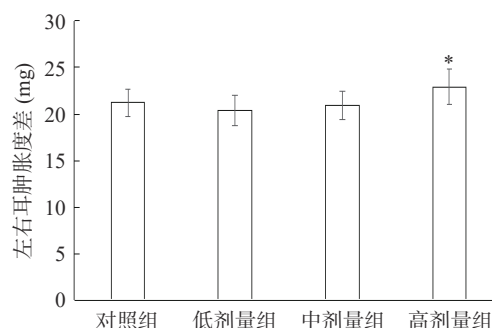


图 3 抗氧化膳食补充剂对迟发型变态反应试验的影响

Fig.3 Effects of antioxidant supplement on cellular immunity test of DNFB-induced delayed type hypersensitivity

2.1.4 血清溶血素试验 血清溶血素测定用于评估

小鼠对抗原物质的免疫反应。实验中通过注射抗原物质, 观察小鼠是否产生溶血素, 以评估其免疫反应。本品中、高剂量组小鼠溶血空斑数与对照组比较, 能增加血清溶血素, 但两组溶血空斑数相当, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见图 4。说明本品对体液免疫功能的血清溶血素指标无明显影响。

2.1.5 抗体生成细胞检测试验 抗体生成细胞检测

是一种测定小鼠免疫反应的方法, 通过观察小鼠的脾细胞或骨髓细胞是否产生抗体生成细胞, 以评估其免疫反应。本品高剂量组小鼠抗体积数对照组相比显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见图 5。可以证明高剂量水平可有效改善小鼠抗体生成细胞功能。

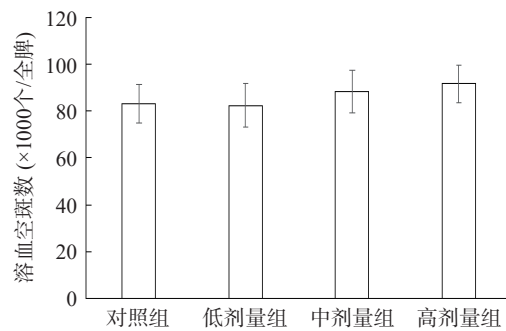


图 4 抗氧化膳食补充剂对血清溶血素试验的影响
Fig.4 Effects of antioxidant supplement on humoral immunity tests of serum haemolysin analysis

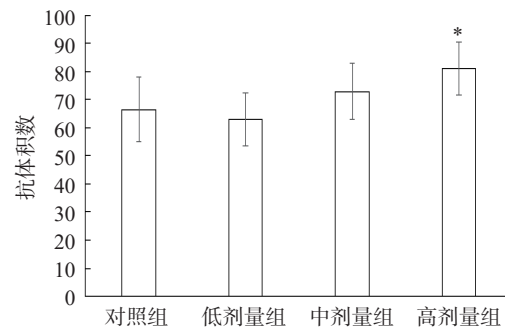


图 5 抗氧化膳食补充剂对抗体生成细胞检测试验的影响
Fig.5 Effects of antioxidant supplement on humoral immunity tests of antibody-producing cell assay

2.1.6 小鼠碳廓清试验 碳廓清试验是一种血清免疫学试验,用于评估小鼠非特异性免疫指标—巨噬细胞的吞噬功能。试验中将小鼠注射 10 mL/kg bw 的碳粉,随后观察血液中的碳粉清除率,以评估小鼠巨噬细胞的吞噬能力。本品各剂量组小鼠碳廓清吞噬指数 a 与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见图 6。本研究表明本品非特异性免疫作用不明显。

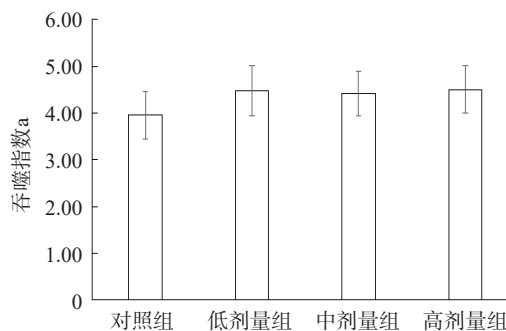


图 6 抗氧化膳食补充剂对碳廓清试验的影响
Fig.6 Effects of antioxidant supplement on mononuclear-macrophages phagocytic index a of carbon clearance test

2.1.7 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞功能是非特异性免疫指标。该试验通过小鼠腹腔巨噬细胞是否能够吞噬鸡红细胞以及吞噬能力大小来评估其吞噬功能。本品各剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表 1。表明本品非特异性免疫作用不明显。

表 1 抗氧化膳食补充剂对巨噬细胞吞噬试验的影响
Table 1 Effects of antioxidant supplement on phagocytosis of peritoneal macrophages

组别	动物数(只)	吞噬率(%)	转换值X	P	吞噬指数	P
对照组	10	8.75±0.72	0.09±0.01		0.119±0.007	
低剂量组	10	9.00±0.67	0.09±0.01	0.533	0.122±0.009	0.981
中剂量组	10	8.90±0.66	0.09±0.01	0.708	0.120±0.006	0.996
高剂量组	10	8.60±1.33	0.09±0.01	0.708	0.114±0.020	0.979

2.1.8 NK 细胞活性测定 NK 细胞免疫功能通过观察小鼠 NK 细胞对靶细胞的杀伤能力来评估其免疫反应。与对照组相比,各剂量组 NK 细胞活性均有提高,且低、中、高剂量组 NK 细胞活性依次增高,但均无显著性差异($P>0.05$),结果见图 7。说明本品在 0.1~0.4 g/kg bw 剂量范围内对 NK 细胞活性无明显影响。

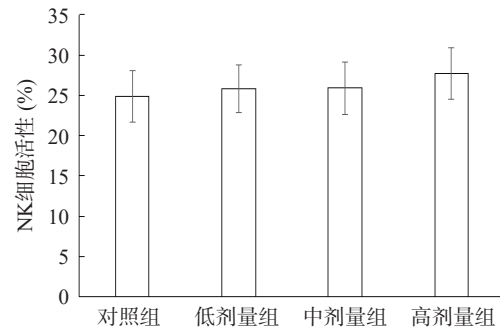


图 7 抗氧化膳食补充剂对 NK 细胞活性测定的影响
Fig.7 Effects of antioxidant supplement on the NK cell activity

2.2 急性毒性试验

抗氧化膳食补充剂急性毒性试验小鼠存活情况见表 2。小鼠在观察期内动物活动、进食、行为等未见异常,急性毒性试验结果为最大耐受量 MTD>20 g/kg bw(相当于成人日推荐量的 1000 倍),根据急性毒性分级属无毒级。

2.3 遗传毒性试验

各试验使用的生物体和测量的终点是不同的,Ames 试验使用细菌主要评估受试物的致癌潜力,骨

表 2 抗氧化膳食补充剂急性毒性试验结果
Table 2 Acute toxicity test results of antioxidant supplement on mice

性别	剂量(g/kg bw)	动物数(只)	初体重(g)	末体重(g)	死亡数(只)	MTD(g/kg bw)	相当于人推荐量的倍数
雄	20	10	19.8±1.3	32.8±1.6	0	>20	1000
雌	20	10	19.5±1.1	26.2±1.0	0	>20	1000

髓细胞微核试验使用小鼠骨髓细胞主要评估受试物对细胞的影响,小鼠精子畸形试验使用小鼠精子主要评估受试物对生殖系统的影响。

2.3.1 Ames 试验 Ames 试验是一种细菌遗传毒性试验,通过观察受试物对细菌的诱变作用,评估其致癌潜力。抗氧化膳食补充剂 Ames 试验结果见表 3 和表 4。从表中可以发现各浓度下,无论是否加入 S₉ 混合液,回变菌落数均未大于自发回变数的 2 倍,且未见剂量-反应关系。而各阳性对照组均显示强烈的诱变作用。根据 Ames 试验结果判断标准,本次试验测试的抗氧化膳食补充剂未见致突变作用。

2.3.2 骨髓细胞微核试验 骨髓细胞微核试验通过观察受试物对小鼠骨髓细胞的微核形成率,评估其对细胞的影响,检测出致畸和致癌物质。PCE/NCE 是指嗜多染红细胞与正染红细胞的比值。由表 5 可见,该样品各剂量组 PCE/NCE 未少于溶剂对照组的 20%,提示骨髓红细胞系统的增殖并无明显抑制,对嗜多染红细胞微核的观察无明显影响。与溶剂对照组相比,各样品剂量组微核发生率无显著性差异

($P>0.05$),而阳性对照组微核发生率明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$),说明该样品未表现出使小鼠骨髓 PCE 微核率上升的致突变效应。根据该试验结果,本次试验测试的抗氧化膳食补充剂在 2.5、5.0 和 10.0 g/kg bw 剂量下未见致突变作用。

2.3.3 小鼠精子畸形试验 小鼠精子畸形试验通过观察受试物对小鼠精子的形态和数量的影响,评估对雄性生育系统的毒性,尤其是精子质量的影响。由表 6 可见,该样品各剂量组与溶剂对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),阳性对照组与溶剂对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。试验组样品对小鼠精子畸形发生率未产生明显影响,表明该样品对小鼠精子不产生畸变作用。说明 10.0 g/kg bw 未见抗氧化膳食补充剂对小鼠精子有遗传毒性。

2.4 亚急性毒性试验 (30 d 喂养试验)

整个试验期间,动物毛色正常,未见行为异常,无死亡发生。各剂量组(0.5、1.0、2.0 g/kg bw)动物增重与对照组经单因素方差分析比较差异无显著性($P>0.05$)。试验末期血常规指标(血红蛋白、红细

表 3 抗氧化膳食补充剂第一次 Ames 试验结果

Table 3 Ames test results of antioxidant supplement (first time)

	剂量(μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
抗氧化膳食补充剂	5000	115±13	121±14	31±1	32±3	132±11	139±14	267±16	276±15
	1000	119±10	121±17	31±2	32±1	134±12	139±13	269±17	274±17
	200	119±15	123±14	32±1	32±2	135±10	142±14	270±15	277±16
	40	120±15	122±18	32±2	32±1	137±11	145±12	270±18	273±21
	8	118±19	125±12	32±2	32±2	138±11	142±14	272±17	277±17
自发回变		120±17	128±13	31±2	32±1	136±14	143±12	269±19	273±18
溶剂对照		119±12	129±10	32±2	31±1	139±10	146±12	271±17	274±19
阳性对照	(μg/皿)								
2,4,7-TNFOne	0.2	1166±138		1134±143					
NaN ₃	1.5					1162±143			
MMC	2.5							1181±133	
2-AF	10.0	1149±82		1158±92		1210±114			
1,8-二羟基蒽醌	50.0							1172±94	

表 4 抗氧化膳食补充剂第二次 Ames 试验结果

Table 4 Ames test results of antioxidant supplement (second time)

	剂量(μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
抗氧化膳食补充剂	5000	119±16	128±11	31±2	32±3	131±11	139±12	265±14	272±17
	1000	123±11	128±14	32±1	32±1	134±11	140±12	269±14	270±17
	200	118±17	130±13	32±2	31±2	135±12	139±14	269±18	273±19
	40	121±14	127±10	31±1	32±2	137±11	142±16	268±16	277±16
	8	124±11	129±13	33±1	32±1	135±12	144±11	270±18	275±17
自发回变		124±13	129±10	32±3	31±2	136±11	140±13	269±17	276±12
溶剂对照		128±13	133±10	31±1	32±2	133±12	143±16	271±12	275±16
阳性对照	(μg/皿)								
2,4,7-TNFone	0.2	1144±88		1155±91					
NaN ₃	1.5					1144±129			
MMC	2.5							1155±139	
2-AF	10.0	1173±99		1152±117		1170±115			
1,8-二羟基蒽醌	50.0							1137±87	

表 5 抗氧化膳食补充剂小鼠骨髓细胞微核试验结果
Table 5 Results of the micronucleus test of antioxidant supplement on mouse bone marrow cells

性别	剂量 (g/kg bw)	动物数 (只)	观察PCE数 (个)	PCE/NCE		含微核PCE率		
				观察NCE数(个)	PCE/NCE	观察PCE数(个)	含微核PCE数(个)	含微核PCE率(‰)
雄	溶剂对照	5	1000	1010	0.99±0.04	5000	3	0.6±0.5
	2.5	5	1000	1010	0.99±0.04	5000	2	0.4±0.5
	5.0	5	1000	1014	0.99±0.05	5000	4	0.8±0.4
	10.0	5	1000	1061	0.94±0.02	5000	3	0.6±0.9
	阳性对照	5	1000	1047	0.96±0.04	5000	116*	23.2±1.5*
雌	溶剂对照	5	1000	1004	1.00±0.02	5000	4	0.8±0.4
	2.5	5	1000	1006	1.00±0.05	5000	4	0.8±0.4
	5.0	5	1000	1027	0.97±0.03	5000	5	1.0±0.7
	10.0	5	1000	1021	0.98±0.05	5000	2	0.4±0.5
	阳性对照	5	1000	1037	0.96±0.02	5000	110*	22.0±2.4*

注: *表示与溶剂对照组相比, $P<0.01$ 。

表 6 抗氧化膳食补充剂对小鼠精子畸形率的影响
Table 6 Effect of antioxidant supplement on mouse sperm deformity

组别	剂量(g/kg bw)	动物数(只)	受检精子数	畸形率(%)
试验组	2.5	5	5000	1.62±0.03
	5.0	5	5000	1.78±0.19
	10.0	5	5000	1.62±0.15
溶剂对照		5	5000	1.76±0.23
阳性对照		5	5000	7.48±0.33*

注: *表示与溶剂对照组相比, $P<0.01$ 。

胞、白细胞、血小板、网织红细胞)测定结果与对照组比较,均未见异常。血液生化学检查所测各剂量组大鼠的血清指标(谷丙转氨酶、谷草转氨酶、尿素、肌酐、总胆固醇、甘油三酯、血糖、总蛋白、白蛋白)与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。各剂量组大鼠组织病理学检查结果正常,各剂量组与对照组比较未见明显生物学差异,提示试验样品对肝、肾、脾、胃、十二指肠、卵巢、睾丸无明显损伤作用。

3 讨论与结论

雨生红球藻是我国食品级虾青素主要来源,本研究为以雨生红球藻(虾青素)为主的抗氧化膳食补充剂增强免疫力用量制定提供试验依据。根据文献报道,雨生红球藻来源的虾青素人体推荐用量为 2 mg/d 以上^[11],我国雨生红球藻新资源食品的公告规定虾青素食用量≤12 mg/d,二者关注点不同,但都没有准确的作用剂量。研究表明,本品中、高剂量组明显增强小鼠脾淋巴细胞增殖能力,高剂量组明显增强 DNFB 诱导的小鼠迟发型变态反应和小鼠抗体生成能力,说明雨生红球藻来源的抗氧化膳食补充剂对小鼠的免疫功能有显著的提高作用。本实验表明,小鼠低、中、高三个剂量组剂量分别为 0.1、0.2、0.4 g/kg bw,抗氧化膳食补充剂提高免疫功能能力随剂量增加而增强,低剂量组没有明显作用,中、高剂量组能明显提高免疫功能作用,按小鼠与人体推荐量 10 倍系数换算,建议成人(60 kg)食用量为每人每天 8 mg。

雨生红球藻增强免疫力的机制推测可能与虾青素的抗氧化活性密切相关。单线态氧是氧分子的一

种特殊存在形式,具有很强的生物活性,对动物的免疫系统有细胞毒性作用,它有助于产生导致巨噬细胞膜降解的自由基,导致吞噬效率和抗原呈递能力降低^[12-13]。该自由基也会攻击 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞。T 淋巴细胞介导细胞免疫后的激活和增殖反应是免疫应答的核心^[14],T 淋巴细胞被攻击后刺激免疫反应清除抗原。B 淋巴细胞受到刺激后,IgA、IgE 和 IgM 会与抗原结合并清除自由基^[15]。当这两种免疫细胞受到自由基攻击时,整个免疫系统会受到影响。研究表明,虾青素可以淬灭单线态氧,直接清除氧自由基,稳定免疫细胞膜结构,通过保护各种免疫系统的完整性增强细胞免疫力^[16-17]。

毒理研究证明了雨生红球藻粉的食用安全性。陈东方等^[18]分别给予 1.8、3.6、7.2 g/kg bw 的雨生红球藻粉,连续喂养大鼠 90 d,未观察到雨生红球藻粉有明显的毒性反应。王彦武等^[19]、刘颖芬等^[20]采用不同剂量的雨生红球藻进行小鼠急性经口毒性试验、遗传毒性试验和大鼠 30 d 喂养试验,急性毒性试验结果表明受试物最大耐受量为无毒级;遗传毒性结果均为阴性;30 d 喂养试验未发现受试物有损伤作用。因此,雨生红球藻单独食用安全性较高。

维生素 E 作为营养素补充剂,《中国居民膳食营养推荐摄入量》中成人用量为 5~150 mg/d,添加了维生素 E 的雨生红球藻安全性较高,并具有增强免疫力作用^[10]。维生素 E 可能通过影响免疫细胞的细胞因子、趋化因子和活性氧的水平,在机体免疫反应中发挥重要作用^[21-22]。

富硒酵母能使机体的非特异性免疫、细胞免疫及体液免疫功能得到改善^[23-24],能增加肝脏抗氧化能力和改善肝损伤^[25]。王玉娥等^[26]研究了酵母硒对小鼠肿瘤生长和机体非特异性免疫功能的影响,证明酵母硒对荷瘤 EAC 小鼠 NK 细胞活性和碳廓清吞噬功能有增强作用。小鼠硒剂量分别为 3.2 和 6.4 μg/kg bw·d,折合 60 kg 人体硒摄入量为 19.2、38.4 μg/d。姜典镇等^[27]按照一定的含量(硒:0.2 mg/g;维生素 E:8 mg/g)按比例混合成胶体硒环状糊精包接复合物

粉剂与维生素 E 微胶囊化粉剂,通过小鼠灌胃进行免疫功能试验。结果显示该产品对小鼠抗体生成细胞数、NK 细胞活性、ConA 诱导小鼠淋巴细胞转化、巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力有显著作用。表明硒、维生素 E 对小鼠免疫功能具有调节作用。该文中剂量组 42 mg/kg bw,折合 60 kg 人体 Se 50 $\mu\text{g}/\text{d}$ 。本品硒用量为每人 70 $\mu\text{g}/\text{d}$,高于上述用量,具有增强免疫力功能。富硒酵母属于食品营养强化剂,是通过酵母菌种发酵而成,酵母菌种可以将培养基终毒性较大的亚硒酸钠转化为有机态硒,再经分离、干燥等工艺制成富硒酵母,可以提高补硒的安全性。辛成龙^[28]研究富硒酵母的急性毒性、遗传毒性和亚急性毒性,表明富硒酵母为无毒级物质,未见有遗传毒性和亚急性毒性作用。

蜂花粉是指蜜蜂采蜜时带回的花粉团,为普通食品原料。人体食用蜂花粉 1~2 g/d 具有增强免疫力功能^[29-31]。黄酮类化合物是植物抗氧化剂主要来源,具有增强免疫力功能。由于黄酮类化合物易溶于乙醇,本品采用 80% 食用酒精回流提取,能较好地提取出蜂花粉黄酮,为本品增强免疫力功能提供了功效成分。

本抗氧化膳食补充剂是在证明了由雨生红球藻虾青素和维生素 E 配方的安全性和功能性基础上^[20],添加富硒酵母和蜂花粉,增加硒和黄酮含量,这四种都是公认的抗氧化剂。根据急性毒性试验结果,表明该抗氧化膳食补充剂属于无毒级,遗传毒性试验(Ames 试验、骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验)阴性表明无遗传毒性,大鼠 30 d 喂养试验结果也表明食用的安全性。因此,该抗氧化膳食补充剂的用量符合安全食用剂量的要求,并具有增强免疫功能。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] PANIS G, CARREON J R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line[J]. *Algal Research*, 2016, 18: 175-190.
- [2] 郑鑫鑫,黄青.天然虾青素清除超氧阴离子的抗氧化能力[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(14): 8-12, 162. [ZHENG X X, HUANG Q. Antioxidant activity of natural astaxanthin for scavenging superoxide anion[J]. *Food Research and Development*, 2023, 44(14): 8-12, 162.]
- [3] 冯铭镭,王磊,龙晓文,等.不同来源虾青素对虹鲫红肌抗氧化和脂质代谢的影响[J]. *中国饲料*, 2023(1): 82-88. [FENG M L, WANG L, LONG X W, et al. Effects of astaxanthin from different sources on antioxidation and lipid metabolism in red muscle of rainbow trout[J]. *Chinese Feed*, 2023(1): 82-88.]
- [4] 张梦麒,赵道强,柴琇琰,等.复合虾青素增强免疫力功能评价[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 103-109. [ZHANG M Q, ZHAO D Q, CHAI X Y, et al. Evaluation of compound astaxanthin

to enhance immunity function[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(5): 103-109.]

- [5] MANSOUR A T, ASHOUR M, ABBAS E M, et al. Growth performance, immune-related and antioxidant genes expression, and gut bacterial abundance of pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, dietary supplemented with natural astaxanthin[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 874172-874172.
- [6] NI Y H, NAGASHIMADA M, FEN Z G, et al. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E[J]. *Scientific Reports*, 2015(5): 17192.
- [7] 毛欢欢,宣雄智.不同含量虾青素饲料对秀丽白虾亲虾抗氧化、繁殖及免疫能力的影响[J]. *中国饲料*, 2023(14): 78-81. [MAO H H, XUAN X Z. Effects of astaxanthin feed with different contents on antioxidant reproductive and immune capacity of parent shrimp[J]. *Chinese Feed*, 2023(14): 78-81.]
- [8] 吴亚顺,徐斌,刘嘉欣,等.饲料中虾青素对凡纳滨对虾雌虾肝胰腺脂代谢和卵巢发育的影响[J]. *水生生物学报*, 2024, 48(1): 99-108. [WU Y S, XU B, LIU J X, et al. Dietary astaxanthin on hepatopancreas lipid metabolism and ovarian development of female *Litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(1): 99-108.]
- [9] NAJAFI H, CHANGZI A S, SAYEDZADEH S A, et al. Therapeutic effects of curcumin on the functional disturbances and oxidative stress induced by renal ischemia/reperfusion in rats[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2015, 5: 576-586.
- [10] 张潮,王利平,邓泽元,等.添加维生素E的雨生红球藻亚急性毒性评价及增强免疫作用研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(6): 263-269. [ZHANG C, WANG L P, DENG Z Y, et al. Study on subacute toxicity evaluation and immune enhancement of *Haematococcus pluvialis* added with vitamin E[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(6): 263-269.]
- [11] CHEW B P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans[J]. *Nutrition & Metabolism (Lond)*, 2010, 7(1): 18-25.
- [12] 刘昊,陈超超, YU Xin, 等.抗氧化剂通过调节细胞自噬降低 polyQ 突变蛋白细胞毒性[J]. *应用与环境生物学报*, 2022, 28(1): 215-221. [LIU H, CHEN C C, YU X, et al. Antioxidants inhibit cytotoxicity induced by polyQ mutant protein through the regulation of autophagy[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2022, 28(1): 215-221.]
- [13] MUNOZ M, CEDENO R, RODRIGUEZ J, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 89-107.
- [14] VALKO, M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39: 44-84.
- [15] KAMATH B S, SRIKANTA B M, DHARMESH S M, et al. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 590: 387-395.
- [16] FAKHRI S, ABBASZADEH F, DARGAHI L, et al. Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 136: 1-20.
- [17] 邢海亮,余旭亚,耿树香,等.核桃虾青素复合油体外抗氧化活性研究[J]. *中国油脂*, 2021, 46(5): 48-52. [XING H L, YU X

- Y, GENG S X, et al. *In vitro* antioxidant activity of walnut astaxanthin oil blend[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(5): 48–52.]
- [18] 陈东方,王海玉,张聪恪,等.雨生红球藻粉 90 d 喂养试验研究[J].*中国卫生检验杂志*, 2015, 25(13): 2096–2098,2101. [CHEN D F, WANG H Y, ZHANG C K, et al. Study on the 90 days feeding test of *Haematococcus pluvialis* meal[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2015, 25(13): 2096–2098,2101.]
- [19] 王彦武,覃光球,何励,等.雨生红球藻软胶囊安全性毒理学评价[J].*中国当代医药*, 2018, 25(29): 11–14. [WANG Y W, QIN G Q, HE L, et al. Toxicological evaluation of *Haematococcus pluvialis* soft capsule[J]. *China Modern Medicine*, 2018, 25(29): 11–14.]
- [20] 刘颖芬,李炳乾,张秋颖,等.天然雨生红球藻虾青软胶囊的毒理安全性评价[J].*盐科学与化工*, 2018, 47(6): 16–23. [LIU Y F, LI B Q, ZHANG Q Y, et al. Toxicological safety evaluation of *Haematococcus pluvialis* astaxanthin soft capsule[J]. *Journal of Salt Science and Chemical Industry*, 2018, 47(6): 16–23.]
- [21] 周赤青,孙儒泳.维生素 E 对免疫功能的影响[J].*生理科学进展*, 2000, 31(2): 163–165. [ZHOU C Q, SUN R Y. Effects of vitamin E on immune function[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2000, 31(2): 163–165.]
- [22] 徐建平,周显青.维生素 E 对机体免疫、生殖和发育功能影响的研究进展[J].*中国比较医学杂志*, 2006, 16(8): 506–509. [XU J P, ZHOU X Q. Advances in research on the effects of vitamin E on immunity, reproduction and development[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2006, 16(8): 506–509.]
- [23] 王茜,方荣,邓娟娟,等.富硒酵母功能作用研究进展及法规现状中国食品添加剂[J].*中国食品添加剂*, 2023, 34(2): 327–335. [WANG Q, FANG R, DENG J J, et al. Research progress on the functions and regulations status of selenium-enriched yeast[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(2): 327–335.]
- [24] HAWKES W C, HWANG A, ALKAN Z. The effect of selenium supplementation on DTH skin responses in healthy north American men[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2009, 23(4): 272–280.]
- [25] 江宝瑞.富硒酵母的筛选、抗氧化活性检测及硒检测的方法学优化[D].宜春:宜春学院,2022. [JIANG B R. Screening of selenium-rich yeast, detection of antioxidant activity and methodological optimization of selenium detection[D]. Yichun: Yichun University, 2022.]
- [26] 王玉娥,龚晨睿,田洁.酵母硒对小鼠肿瘤生长和机体非特异性免疫功能的影响[J].*公共卫生与预防医学*, 2006, 17(4): 91–92. [WANG Y E, GONG C R, TIAN J. Effects of yeast selenium on tumor growth and non-specific immune function in mice[J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2006, 17(4): 91–92.]
- [27] 姜典镇,李永利.硒维生素 E 对小鼠免疫功能的调节作用[J].*微量元素与健康研究*, 2005(1): 7–8. [JIANG D Z, LI Y L. Regulatory effect of selenium and vitamin E on immune function in mice[J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2005(1): 7–8.]
- [28] 辛成龙.富硒酵母破壁灵芝孢子粉的功能及安全性研究[J].*生物化工*, 2020, 6(6): 1–5. [XIN C L. Study on the function and safety of selenium enriched yeast broken ganoderma lucidum spore powder[J]. *Biological Chemical Engineering*, 2020, 6(6): 1–5.]
- [29] 张荣标,何聆,陈润,等.油菜蜂花粉对正常小鼠免疫功能的影响[J].*实用预防医学*, 2005, 12(1): 44–46. [ZHANG R B, HE L, CHEN R, et al. The Effect on immunological function by bee pollen of brassica in mice[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2005, 12(1): 44–46.]
- [30] 杨义雄,洪华炜,王瑾.玉容素胶囊调节小鼠细胞免疫功能的实验研究[J].*海峡药学*, 2011, 23(12): 42–43. [YANG Y X, HONG H W, WANG J. Experimental study of yurongsu capsule on the regulation of cellular immune function in mice[J]. *Strait Pharmaceutical J*, 2011, 23(12): 42–43.]
- [31] 李震,刘志勇,李龙雪,等.天然蜂粮和蜂花粉对小鼠免疫功能的调节作用[J].*动物营养学报*, 2020, 32(1): 397–404. [LI Z, LIU Z Y, LI L X, et al. Regulating effect of natural bee bread and bee pollen on immune function of mice[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(1): 397–404.]