

大豆异黄酮复合软胶囊的免疫增强作用及安全性评价

刘灵¹, 王萌², 宋自娟², 单媛媛^{1*}

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

(2. 陕西华州医药生物工程有限公司, 陕西西安 710054)

摘要: 为观察大豆异黄酮复合软胶囊(SIC)的增强免疫力效果及安全性。按照人体推荐用量的30、20、10倍,经口给予小鼠340、670、1000 mg/kg·bw剂量的SIC干预。通过测定脏器/体重比值、细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞吞噬功能指标和NK细胞活性,评估SIC对免疫功能的影响,结果发现:高剂量SIC干预小鼠的足跖肿胀度、淋巴细胞增殖OD差值、溶血空斑数分别比对照组提高了34.87% ($p<0.05$)、36.07% ($p<0.05$)、15.85% ($p<0.05$),血清溶血素值比对照组升高了12.66% ($p<0.01$)。说明SIC具有增强细胞免疫和体液免疫的功能。通过急性毒性试验、Ames试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验评价SIC的安全性,结果表明:在30 d观察期内,各剂量组的SIC对实验鼠体重、进食量、食物利用率、血液生化学指标、脏器系数均无影响,其大鼠急性毒性MTD大于19.76 g/kg·bw, NOAEL大于3.33 g/kg·bw。以上结果表明,SIC无急性毒性和遗传毒性,具有增强免疫力的功能。

关键词: 大豆异黄酮; 复合胶囊; 免疫功能; 安全性评价

文章编号: 1673-9078(2022)02-56-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0639

Immune Function and Food Safety Evaluation of Soybean Isoflavone Composite Capsule

LIU Ling¹, WANG Meng², SONG Zijuan², SHAN Yuanyuan^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. Shaanxi Huazhou Medical Biological Engineering Co. Ltd., Xi'an 710054, China)

Abstract: The immune enhancement effect and safety of soybean isoflavone compound capsules (SIC) were evaluated. Mice were intragastrically administered SIC at doses of 340, 670 and 1000 mg/kg·bw for 30 days, in accordance with 30-, 20-, and 10-fold the recommended dosage for humans, respectively. Immune function was evaluated by measuring the organ/body weight ratio, cellular immunity, humoral immunity, mononuclear macrophage phagocytosis index, and natural killer cell activity. The degree of paw swelling, optical density difference of lymphocyte proliferation, and number of hemolytic plaques in the high-dose SIC intervention group were suppressed by 34.87% ($p<0.05$), 36.07% ($p<0.05$), and 15.85% ($p<0.05$), respectively, compared to the control group, and serum hemolysin levels were increased by 12.66% ($p<0.01$). Cellular and humoral immune functions were enhanced by SIC. The safety of SIC was evaluated through acute toxicity testing, the Ames test, mouse bone marrow cell micronucleus testing, and mouse sperm abnormality testing. During the 30-day observation period, there were no effects on the body weight, food intake, food utilization rate, hematological indexes, hematological biochemical indices, or organ coefficient in the experimental rats treated with the different doses of SIC. The acute toxicity in rats was greater than 19.76 g/kg·bw, and

引文格式:

刘灵,王萌,宋自娟,等.大豆异黄酮复合软胶囊的免疫增强作用及安全性评价[J].现代食品科技,2022,38(2):56-63

LIU Ling, WANG Meng, SONG Zijuan, et al. Immune function and food safety evaluation of soybean isoflavone composite capsule [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 56-63

收稿日期: 2021-06-18

基金项目: 大学生创新创业训练项目(S202010712132)

作者简介: 刘灵(1999-),女,本科在读,研究方向:食品功能化加工, E-mail: 1265851358@qq.com

通讯作者: 单媛媛(1984-),女,博士,副教授,研究方向:食品功能化加工, E-mail: shanyuanyuan@nwafu.edu.cn

the no-observed-adverse-effect level was greater than 3.33 g/kg·bw. These results demonstrate that SIC has no acute toxicity or genotoxicity and effectively enhances immunity.

Key words: soy isoflavone, compound capsule, immune function, safety evaluation

大豆异黄酮是大豆自然生长过程中生成的一种与雌激素结构相似的多酚类次生物, 营养价值丰富, 对机体蛋白质代谢、激素合成、细胞生长等方面都能产生一定程度的影响^[1]。大豆异黄酮具有抗氧化损伤^[2,3]、抗炎^[4]、免疫调节^[5]等作用, 在食品、医疗、饲料等领域均有十分广阔的研究及应用前景^[6]。例如, 大豆异黄酮可用于改善心血管疾病^[7]、骨质疏松^[8]、阿尔兹海默症^[9], 以及烦躁、失眠等妇女更年期综合征^[10], 还可以预防子宫内膜癌^[11]、乳腺癌^[12]、肝癌^[13]等癌症的发生。此外, 在快节奏的现代生活中, 免疫力低下的亚健康人群逐渐增多, 大豆异黄酮在提高机体免疫功能方面的活性也逐渐受到研究者的关注, 已有文献证明, 大豆异黄酮可以促进细胞因子、特异性抗原等免疫分子的释放^[14,15], 增强淋巴细胞等免疫细胞的活性^[16], 调节胸腺等免疫器官的功能^[17]。

但是, 作为一种多酚类化合物, 大豆异黄酮对环境较为敏感, 在光照、高温等条件下极易发生氧化、聚合等反应, 从而丧失生物活性^[18]。采用软胶囊对多酚类物质进行包埋是提高其稳定性和加工适用性的重要手段。本研究团队前期以明胶和甘油为主要壁材, 对苷元型大豆异黄酮进行了有效的包埋, 制备了大豆异黄酮苷元复合软胶囊。目前, 有关大豆异黄酮的免疫性能评价已经比较全面, 但是关于胶囊化后的大豆异黄酮的研究更多集中在医疗功能上^[19,20], 对于其是否保留了增强免疫力的能力尚不清楚。同时, 袁根良等^[21]、李力^[22]等研究的大豆异黄酮复合胶囊虽已被证明无毒, 但本研究所制备的大豆异黄酮复合软胶囊的有效成分及含量均有所不同, 其潜在的安全性仍需进行系统的试验分析。因此, 本研究依据《保健食品检验与评价技术规范》^[23], 对以大豆异黄酮、大豆油、蜂蜡为芯材, 以明胶、甘油、纯化水、焦糖色、二氧化钛为壁材制备的大豆异黄酮复合软胶囊进行系统的提高免疫功能研究及安全性评价, 以期为大豆异黄酮复合软胶囊的合理安全应用提供科学的数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料

大豆异黄酮复合软胶囊, 自制, 其标志性成分及含量为: 大豆异黄酮 2.20%、大豆苷 0.55%、染料木

苷 0.70%、大豆苷元 0.35%、染料木素 0.60%。

1.1.2 实验动物

SPF 级 SD 大鼠和昆明种小鼠(200 只雌性小鼠用于免疫功能评价试验, 其余均用于安全性试验), 由西安交通大学医学院实验动物中心提供, 生产许可证号为: SCXK(陕)2018-001, 动物饲料、垫料均由西安交通大学医学院实验动物中心提供。试验动物房为屏障系统, 使用许可证号为 SYXK(陕)2018-009, 温度 20~25 °C, 相对湿度 45%~65%。

1.1.3 主要试剂

生化试剂盒, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 血细胞分析试剂盒、环磷酰胺、敌克松、叠氮化钠、1,8-二羟基蒽醌、2-氨基苄, 上海一基实业有限公司; TA97、TA98、TA100、TA102 四种菌株, 上海北诺生物科技有限公司购自 Molecular Toxicology 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫功能评价试验

(1) 动物分组与给药

将 200 只雌性小鼠随机分为五大组, 每组 40 只, 每一大组再随机分为 4 小组, 每小组 10 只。第 1 大组用于 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验、NK 细胞活性测定; 第 2 大组用于迟发型变态反应 (DTH) 测定、淋巴器官/体重比值测定; 第 3 大组用于抗体生成细胞 (PFC) 检测、血清溶血素测定; 第 4 大组用于碳廓清试验; 第 5 大组用于腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验。设置 1000、670、340 mg/kg·bw 三个高、中、低剂量组, 分别相当于人体推荐用量的 30、20、10 倍。大豆异黄酮复合软胶囊各所需浓度均用大豆油进行配置, 受试鼠每日经口灌胃一次, 连续 30 d, 阴性对照组给予等量大豆油。试验完成后称重并处死小鼠, 取出胸腺和脾脏, 称重并计算脏器/体重比。

(2) 细胞免疫试验

DTH 测定: 于第 26 d, 先后用 0.2 mL、20 μL 2% (V/V) SRBC 间隔 4 d 对小鼠进行致敏和攻击。于攻击前、后 24 h 分别测量每只动物左后足跖部厚度, 每个部位测三次, 计算足跖厚度差值。

ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验 (MTT 法): 取出脾脏, 研磨、洗涤, 用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 3×10^6 cells/mL, 参照刘颖芬等^[24]的试验方法将其加入 24 孔培养板中, 之后将其置于 37 °C 孵

育箱(5% CO₂)中孵育72 h,于第68 h时,从每孔中吸出上清液0.7 mL,随即加入与吸出上清液同体积的RPMI1640培养液和50 μL MTT(5 mg/mL),继续孵育至结束,每孔加入1 mL酸性(CH₃)₂CHOH,溶解混匀,在570 nm波长下测定光密度值。

(3) 体液免疫实验

PFC检测:将0.2 mL 2% (V/V)的SRBC注射进每只小鼠的腹腔内,免疫4 d后处死取脾,研磨、洗涤,同小鼠脾淋巴细胞转化试验中的方法调整细胞浓度为5×10⁶个/mL。参照刘颖芬等^[24]的PFC检测方法处理细胞液,最后取得溶血空斑数数值。

血清溶血素的测定:第26 d,四天的免疫方法同PFC检测中所用的方法,之后摘眼球取血,分离血清并倍比稀释,将100 μL不同稀释度的血清、100 μL 0.5% (V/V)的SRBC悬液先后置于微量血凝板的每孔内,充分混合均匀,置于平盘内,放入37℃恒温箱中培养3 h后进行血清溶血素的测定。

(4) 单核-巨噬细胞功能测定

小鼠碳廓清试验:给各组受试动物尾静脉注射印度墨汁10 mL/kg·bw,分别于第2、10 min采取20 μL静脉血,随后将其与2 mL 0.1% NaHCO₃溶液充分混合均匀,空白对照组采用NaHCO₃溶液。设置紫外分光光度计波长为600 nm,测定并记录光密度值(OD),将处死小鼠后所取的肝脏和脾脏别称重,按照公式计算吞噬指数。

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{\frac{\lg \text{OD}_1 - \lg \text{OD}_2}{10 - 2}}$$

式中:

OD₁——血样在2 min时测定的光密度;

OD₂——血样在10 min时测定的光密度。

小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验:每只小鼠腹腔注射1 mL 20% (V/V)鸡红细胞悬液,间隔30 min处死,腹腔注射2 mL生理盐水。吸腹腔洗液涂片,37℃下培养30 min,固定,Giemsa染色。记录100个巨噬细胞中吞噬鸡红细胞数和巨噬细胞吞噬的鸡红细胞总数及其被消化的程度。

(5) NK细胞活性测定

按照刘颖芬等^[24]的研究中的NK细胞活性测定方法进行测定大部分处理,最后在490 nm处测定光密度值(OD)。NK细胞活性计算公式如下:

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

1.2.2 安全性评价试验

(1) 大鼠急性毒性试验

参照《保健食品检验与评价技术规范》的试验方

法^[23]。取雌雄各半的SD大鼠20只,以最大耐受剂量(MTD)19.76 g/kg·bw(相当于人体推荐量的593.4倍)的剂量经口灌胃,记录14 d内受试大鼠出现的表现、行为异常等中毒症状和死亡情况,分别在1 d、7 d、14 d给受试动物称重,随后处死动物并进行大致解剖,观察肝、肾、脾、心、肺等脏器的变化情况。

(2) 遗传毒性试验

Ames试验:采用平板掺入法,体外代谢活化系统选用多氯联苯诱导的大鼠肝微粒体酶(S-9),菌株为TA97、TA98、TA100、TA102四种,大豆异黄酮复合软胶囊试验时用DMSO配制所需浓度。设置5000、1000、200、40、8 μg/皿五个剂量组,另外设置溶剂对照组(DMSO)、自发回变组、阳性对照组。计数回变菌落数。

小鼠骨髓细胞微核试验:采用30 h给样品法,设置10.0、5.0、2.5 g/kg·bw三个剂量组,另设溶剂对照组(大豆油)及环磷酰胺阳性对照组(CP, 40 mg/kg·bw)。经口灌胃,第一次灌胃24 h后再次给样,6 h后处死动物并取股骨骨髓制片。每只动物统计1000个嗜多染红细胞(PCE)中的微核细胞数,计算干分率,计数200个嗜多染红细胞,计算嗜多染红细胞/成熟红细胞(PCE/NCE)的值。

小鼠精子畸形试验:设置10.0、5.0、2.5 g/kg·bw三个剂量组,另设溶剂对照组及CP(40 mg/kg·bw)阳性对照组,连续经口灌胃5 d,每日一次,对照组给样等量大豆油。初次灌胃35 d后,处死小鼠并取双侧附睾制片,记录1000条完整精子的畸形数、畸形类型,计算畸形率。

(3) 常规临床指标测定

设3.33、1.67、0.84 g/kg·bw(分别相当于人体推荐用量100、50、25倍)三个剂量组,另设溶剂对照组。连续灌胃30 d,每日观察动物的生长发育状况,注重观察中毒症状,每周称量一次受试鼠体重和记录一次二次食物摄入量。试验末期,将大鼠禁食16 h,空腹称重后采血并处死,测定血液学指标、血液生化学指标,解剖动物观察内脏,称肝、肾、脾、睾丸(卵巢)湿重值并做组织病理学检查,计算脏器/体重比值。

1.3 数据处理与结果判定

免疫力评价实验均采用方差分析,小鼠骨髓细胞微核试验采用卡方检验,小鼠精子畸形试验采用秩和检验。依据文献^[23]中的标准判断,细胞免疫功能检测、体液免疫功能检测、单核-巨噬细胞功能检测、NK细胞活性检测4个方面任何2个方面的结果为阳性,即可判定该受试样品能够增强免疫力。

表 1 受试物对小鼠体重的影响

Table 1 Effect of test substance on body weight of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (g/kg·bw)	动物数/只	初始重/g	中期重/g	末期重/g	增重/g	胸腺/体重 ($\times 10^{-3}$)	p 值	脾脏/体重 ($\times 10^{-3}$)	p 值
高剂量	1.00	10	19.90±1.40	26.20±2.00	34.00±2.40	14.10±2.60	2.40±0.50	0.91	3.88±0.60	0.38
中剂量	0.67	10	19.40±1.30	27.90±2.10	34.20±2.70	14.80±2.80	2.15±0.52	0.88	3.61±0.46	1.00
低剂量	0.34	10	19.40±1.10	27.90±2.20	34.50±3.40	15.10±3.30	2.24±0.36	1.00	3.51±0.32	0.93
阴性对照	-	10	20.00±1.60	27.50±2.10	34.90±2.70	14.90±3.00	2.28±0.52	-	3.60±0.37	-

注：与阴性对照组比较 $p>0.05$ 。表 2 同。

2 结果与讨论

2.1 大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠免疫功能的影响

2.1.1 大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠体重和脏器比值的影响

胸腺和脾脏在机体免疫中贡献了免疫场所和免疫细胞，发挥了十分重要的免疫作用，免疫学中常用其重量变化来评价受试物对动物免疫功能造成的影响 [16,25]。大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠体重和脏器比值的影响如表 1 所示，各剂量组的小鼠各时期体重及增重与阴性对照组相比，差异不显著 ($p>0.05$)，各剂量组与阴性对照组的小鼠脏器/体重比值维持在同一水平，差异无统计学意义 ($p>0.05$)。表明大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠体重、脏器/体重比值无显著影响，不能通过增加免疫器官重量来增强免疫力。

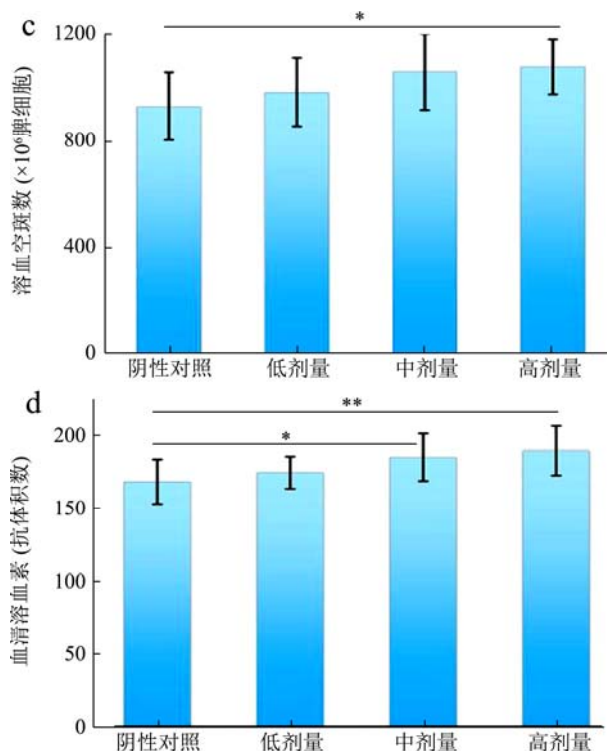
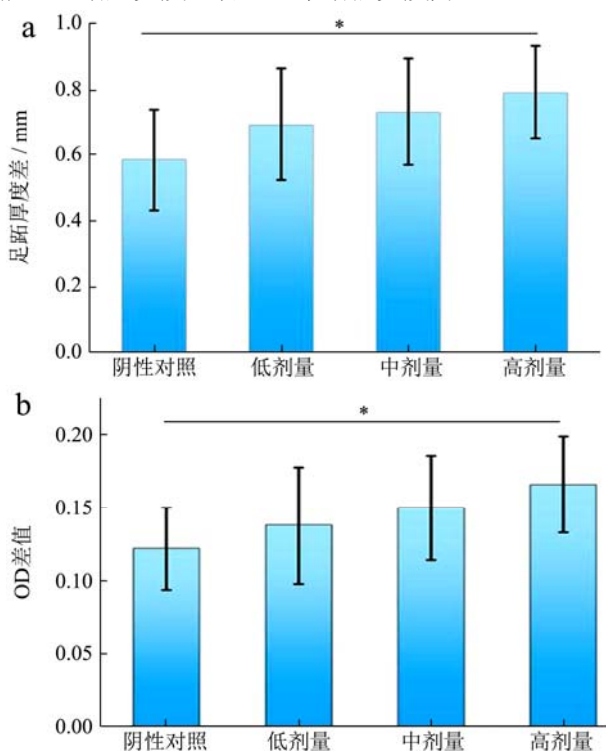


图 1 大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠迟发型变态反应 (a)、ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力 (b)、抗体生成细胞功能 (c) 和小鼠溶血素水平 (d) 的影响

Fig.1 Effect of soybean isoflavone compound capsule on delayed type hypersensitivity (a), ConA-induced splenic lymphocyte transformation (b), the function of antibody-producing cells (c) and the molnysin level (d) in mice

注：与阴性对照组比较，*表示 $p<0.05$ ，**表示 $p<0.01$ 。

2.1.2 大豆异黄酮复合软胶囊对细胞免疫和体液免疫功能影响

以 DTH 和 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力试验为指标，评价大豆异黄酮复合软胶囊对细胞免疫功能的影响；以 PFC 和血清溶血素水平为指标评估大豆异黄酮复合软胶囊对体液免疫功能的影响，结果如图 1 所示。如图 1a 所示，高剂量组 SRBC 诱导 DTH 左后足跖厚度差为 0.79 mm，相对于对照组，提升了 34.87%，提升效果显著 ($p<0.05$)。如图 1b 所示，高剂量组的淋巴细胞增殖 OD 差达到 0.17，相对于对照组，增长了

36.07%，增长效果显著 ($p<0.05$)。说明大豆异黄酮复合软胶囊可以显著诱发 DTH、提高小鼠脾淋巴细胞转化能力，增强小鼠细胞免疫功能，结果与郭智慧^[16]的研究结果一致。如图 1c 所示，与阴性对照组相比，高剂量组溶血空斑数显著增长 ($p<0.05$)，增长效果为 15.85%。如

图 1d 所示，相对于阴性对照组，中剂量组小鼠的血清溶血素水平有显著提升 ($p<0.05$)，高剂量组有极显著提升 ($p<0.01$)，提升效果分别为 9.98%、12.66%。表明大豆异黄酮复合软胶囊能显著增加小鼠 PFC 数量、提高小鼠血清溶血素水平，增强小鼠体液免疫功能。

表 2 受试物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及 NK 细胞活性的影响

Table 2 Effect of test substance on phagocytosis and NK cell activity of peritoneal macrophages in mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g/kg·bw)	吞噬指数 a	p 值	吞噬百率/%	p 值	吞噬指数 b	p 值	NK 细胞活性/%	p 值
高剂量	1.00	5.60±1.02	0.56	34.10±6.20	0.70	0.82±0.08	0.59	30.49±7.61	0.86
中剂量	0.67	5.48±1.11	0.76	33.80±5.30	0.78	0.82±0.70	0.53	30.30±5.98	0.90
低剂量	0.34	5.29±0.95	0.97	33.70±3.80	0.81	0.80±0.07	0.84	30.80±6.61	0.80
阴性对照	-	5.15±0.52	-	32.00±5.20	-	0.78±0.07	-	28.62±5.87	-

表 3 大鼠急性毒性试验结果

Table 3 Results of acute toxicity test in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	动物数/只	剂量(MTD)/(g/kg·bw)	初始体重/g	第 7 d 体重/g	第 14 d 体重/g	出现中毒症状动物数/只	死亡数/只
雌性	10	19.76	195.90±10.60	227.10±12.70	247.70±13.50	0	0
雄性	10	19.76	199.20±10.80	242.10±13.90	272.70±15.00	0	0

表 4 Ames 试验结果

Table 4 Results of Ames test ($\bar{x}\pm s$)

剂量/($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA97		TA98	
	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
5000	138.00±7.90	135.00±11.40	34.30±2.10	32.00±1.70
1000	134.30±10.10	135.00±9.80	36.70±2.50	35.30±1.50
200	137.70±9.00	137.70±11.20	35.00±3.60	36.30±1.50
40	137.00±10.80	135.00±8.00	35.30±3.50	34.70±2.50
8	139.30±8.60	135.30±9.00	34.30±2.50	36.00±3.00
溶剂对照	135.30±9.10	138.70±11.00	34.70±2.10	34.30±3.10
自发回变	134.30±8.60	142.00±7.90	36.00±2.00	37.30±1.50
阳性照	2401.30±265.90	1758.70±143.40	1049.30±67.70	5588.00±330.60
	敌克松	2-AF	敌克松	2-AF
	50.00 $\mu\text{g}/\text{皿}$	10.00 $\mu\text{g}/\text{皿}$	50.00 $\mu\text{g}/\text{皿}$	10.00 $\mu\text{g}/\text{皿}$
剂量/($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA100		TA102	
	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
5000	181.30±11.90	177.00±12.50	283.00±17.10	288.30±15.70
1000	188.70±11.00	183.70±13.70	281.70±16.000	285.70±15.40
200	182.30±14.20	191.70±13.70	276.3±12.70	276.30±17.80
40	186.30±12.10	179.30±13.80	291.00±16.70	286.30±16.10
8	190.00±12.10	182.70±11.00	289.70±12.30	286.70±17.60
溶剂对照	179.00±14.20	186.30±14.40	285.70±16.00	288.30±13.70
自发回变	180.00±13.70	181.30±11.00	286.70±15.30	283.70±17.20
阳性照	2618.70±251.70	2678.70±221.60	833.30±66.30	909.30±86.20
	NaN3	2-AF	敌克松	1,8-二羟基蒽酮
	1.50 $\mu\text{g}/\text{皿}$	10.00 $\mu\text{g}/\text{皿}$	50.00 $\mu\text{g}/\text{皿}$	50.00 $\mu\text{g}/\text{皿}$

注：以上结果为 3 个平皿的均值±标准差。

表5 小鼠骨髓细胞微核试验结果

Table 5 Result of micronucleus test in mouse bone marrow cell ($\bar{x}\pm s$)

性别	剂量/(g/kg·bw)	检查 PCE 数/个	微核数/个	微核率/% ($\bar{x}\pm s$)	PCE/NCE	比值($\bar{x}\pm s$)
雌	10.0	5000	7	1.40±0.55	1000/926	1.08±0.07
	5.0	5000	5	1.00±0.71	1000/928	1.08±0.08
	2.5	5000	5	1.00±1.00	1000/919	1.09±0.06
	0.0	5000	8	1.60±0.55	1000/918	1.10±0.09
	CP(40 mg/kg·bw)	5000	108	21.60±2.61**	1000/1041	0.96±0.03
雄	10.0	5000	6	1.20±0.84	1000/930	1.08±0.04
	5.0	5000	8	1.60±0.89	1000/938	1.07±0.08
	2.5	5000	6	1.20±1.10	1000/926	1.09±0.09
	0.0	5000	7	1.40±1.14	1000/929	1.08±0.07
	CP(40 mg/kg·bw)	5000	112	22.40±2.70**	1000/1036	0.97±0.03

注: 与溶剂对照组比较, **表示 $p<0.01$ 。

表6 小鼠精子畸形试验结果

Table 6 Results of sperm malformation test in mice ($\bar{x}\pm s$)

剂量/(g/kg·bw)	动物数/只	受检精子数/条	精子畸形类型							精子畸形数/条	精子畸形率/% ($\bar{x}\pm s$)
			无钩	香蕉形	无定形	胖头	尾折叠	双头	双尾		
10.0	10	10000	19	21	118	5	0	0	0	163	1.63±0.32
5.0	10	10000	17	24	112	7	0	0	0	160	1.60±0.27
2.5	10	10000	17	23	109	5	0	0	0	154	1.54±0.23
0.0	10	10000	15	23	121	6	1	0	0	166	1.66±0.31
CP/(40 mg/kg·bw)	10	10000	64	107	375	47	3	0	2	598	5.98±0.66**

注: 与溶剂对照组比较, **表示 $p<0.01$ 。

2.1.3 大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠单核-巨噬细胞功能和NK细胞活性的影响

碳廓清试验、受试物腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验和NK细胞活性试验的结果如表2所示。巨噬细胞和NK细胞均是非特异性免疫细胞,前者主要发挥吞噬作用,后者直接杀伤靶细胞,因此前者的吞噬能力及后者的活性可以评价机体的免疫功能^[16,26,27]。由表2可见,相较于与阴性对照组,各剂量组小鼠的吞噬指数、鸡红细胞吞噬率及吞噬指数有一定程度的提升,但提升效果无统计学意义($p>0.05$)。说明大豆异黄酮复合软胶囊不能显著提高小鼠的碳廓清能力,无法增强小鼠的巨噬细胞吞噬功能。各剂量组小鼠NK细胞活性与阴性对照组相比较,均无显著差异($p>0.05$)。表明大豆异黄酮复合软胶囊不能显著提高小鼠NK细胞活性。

2.2 大豆异黄酮复合软胶囊安全性评价结果

2.2.1 大鼠急性毒性试验结果

大豆异黄酮复合软胶囊对大鼠急性毒性试验结果如表3所示。以19.76 g/kg·bw的剂量经口灌胃,14 d内,雌、雄大鼠体重均有所增长,未观察到急性中毒

症状及死亡现象。解剖后,观察到小鼠肝、肾、脾、心、肺、胃、肠等主要脏器的均呈正常状态。表明大豆异黄酮复合软胶囊对大鼠急性毒性(MTD)大于19.76 g/kg·bw,参照急性毒性分级标准,急性毒性属于无毒性等级。

2.2.2 遗传毒性试验

Ames试验结果如表4所示,大豆异黄酮复合软胶囊各剂量组在有、无S-9存在的条件下,回变菌落数均未超过自发回变菌落数的两倍,且无剂量-反应关系,表明大豆异黄酮复合软胶囊不会诱发菌株突变。

小鼠骨髓细胞微核试验结果如表5所示,CP阳性对照组的微核率显著高于溶剂对照组($p<0.01$);各剂量组微核率与溶剂对照组相比较,均无显著性差异($p>0.05$);各剂量组的PCE/NCE值均在正常值范围内,且各剂量组PCE值占红细胞总数的比例均不少于溶剂对照组的20%。表明大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠骨髓细胞没有致突变作用。

小鼠精子畸形试验如表6所示,CP阳性对照组精子畸形率极显著高于溶剂对照组($p<0.01$),各剂量组小鼠的精子畸形率与溶剂对照组比较,均无显著性差异($p>0.05$)。实验中的精子畸形主要表现类型为无钩、

香蕉形、无定形。表明大豆异黄酮复合软胶囊对小鼠精子无致畸性作用。

此外, 30 d 试验期间, 大鼠生长情况良好, 与溶剂对照组比较, 各剂量组的体重、进食量、食物利用率、血液学指标、血液生化学指标的变化均无统计学意义 ($p>0.05$); 解剖观察和组织病理学检查也并未发现异常。在试验剂量下, 大豆异黄酮复合软胶囊对大鼠各项观测指标未产生可见毒副作用, 未观察到有害作用剂量 (NOAEL) 大于 3.33 g/kg·bw。

3 结论

3.1 本研究对大豆异黄酮复合软胶囊的免疫功能进行了评价。结果显示, 与对照组相比, 高剂量组增强 DTH 能力、小鼠脾淋巴细胞转化能力的效果分别为 34.87% ($p<0.05$)、36.07% ($p<0.05$), 说明大豆异黄酮复合软胶囊具有提升细胞免疫的功能; 高剂量组 PFC 增值效果为 15.85% ($p<0.05$), 中、高剂量组分别提升小鼠血清溶血素水平 9.98% ($p<0.05$)、12.66% ($p<0.01$), 说明大豆异黄酮复合软胶囊具有提升体液免疫的功能。综上, 大豆异黄酮复合软胶囊具有增强免疫功能的作用, 这一结论为大豆异黄酮复合软胶囊在保健品方面的合理应用提供了理论支持。

3.2 对大豆异黄酮复合软胶囊的安全性进行了评价。大豆异黄酮复合软胶囊大鼠急性毒性 MTD 大于 19.76 g/kg·bw, 相当于人体推荐量的 593.4 倍, NOAEL 大于 3.33 g/kg·bw, 属无毒级。Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验均为阴性, 说明大豆异黄酮复合软胶囊无致突变和损害生殖系统作用。在本试验剂量范围内及相应环境条件下, 大豆异黄酮复合软胶囊口服无明显毒副作用, 食用安全性较高。

参考文献

[1] 段雪梅.大豆 GmMYB12B2 转基因株系的鉴定与分析[D]. 长春:吉林大学,2020
DUAN Xuemei. Identification and analysis of soybean GmMYB12B2 transgenic strains [D]. Changchun: Jilin University, 2020

[2] 郑峰,金芳多,金梅花,等.大豆异黄酮对 H₂O₂ 致 L02 细胞损伤的保护作用[J].大豆科学,2020,39(3):458-463
ZHENG Feng, JIN Fangduo, JIN Meihua, et al. Protective effect of soybean isoflavone on L02 cell damage from H₂O₂ [J]. Soybean Science, 2020, 39(3): 458-463

[3] Luo Q, Li Y, Huang C, et al. Soy isoflavones improve the spermatogenic defects in diet-induced obesity rats through Nrf2/HO-1 pathway [J]. Molecules, 2019, 24(16): 2966

[4] 李伟,杜洁,张小英,等.不同来源酱油渣中大豆异黄酮苷元成分分析及抗炎活性研究[J].现代食品科技,2019,35(5):52-58,309
LI Wei, DU Jie, ZHANG Xiaoying, et al. Composition analysis and anti-inflammatory activity of soybean isoflavone aglycones in soy sauce residue from different sources [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(5): 52-58, 309

[5] 余强,郭传勇.大豆异黄酮药理作用及其临床应用[J].世界临床药物,2018,39(9):643-646
YU Qiang, GUO Chuanyong. Pharmacological effects and clinical application of soybean isoflavones [J]. World Clinical Drugs, 2018, 39(9): 643-646

[6] 陈嘉序,陈如扬,连媛,等.大豆异黄酮的生物转化及功能性研究进展[J].食品研究与开发,2021,42(9):176-182
CHEN Jiayu, CHEN Ruyang, LIAN Yuan, et al. Research progress in the biological transformation and functional activity of soybean isoflavone [J]. Food Research and Development, 2021, 42(9): 176-182

[7] Im Jihyun, Park Kyong. Association between soy food and dietary soy isoflavone intake and the risk of cardiovascular disease in women: a prospective cohort study in Korea [J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1407

[8] Yu F, Liu Z, Tong Z, et al. Soybean isoflavone treatment induces osteoblast differentiation and proliferation by regulating analysis of Wnt/ β -catenin pathway [J]. Gene, 2015, 573(2): 273-277

[9] Gleason C E, Fischer B L, Dowling N M, et al. Cognitive effects of soy isoflavones in patients with Alzheimer's disease [J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2015, 47(4): 1009-1019

[10] 刘鹿,吕春健,张新胜,等.大豆异黄酮干预对围绝经期女性综合征及性激素水平的影响研究[J].中国食物与营养,2020, 26(11):60-63
LIU Lu, LYU Chunjian, ZHANG Xinsheng, et al. Effects of soybean isoflavone intervention on perimenopausal female syndrome and sex hormone levels [J]. China Food and Nutrition, 2020, 26(11): 60-63

[11] Wang K, Li F, Chen L, et al. Change in risk of breast cancer after receiving hormone replacement therapy by considering effect-modifiers: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies [J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 81109

[12] Yang Z, Hu Y, Zhang J, et al. Estradiol therapy and breast cancer risk in perimenopausal and postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis [J]. Gynecological

- Endocrinology, 2017, 33(2): 87-92
- [13] Wang Yameng, Guo Jiaping, Yu Fei, et al. The association between soy-based food and soy isoflavone intake and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 4(5): 5314-5324
- [14] Yu Y, Xing Y, Zhang Q, et al. Soy isoflavone genistein inhibits has_circ_0031250/miR-873-5p/FOXMI axis to suppress non-small-cell lung cancer progression [J]. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 2020, 73(1): 72-107
- [15] Sakai T, Furoku S, Nakamoto M, et al. The soy isoflavone equol enhances antigen-specific IgE production in ovalbumin-immunized BALB/c mice [J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 2010, 56(1): 72-76
- [16] 郭智慧.大豆异黄酮增强免疫作用的实验研究[J].临床医药文献电子杂志,2020,7(68):170-171
GUO Zhihui. Experimental study on the immune enhancement of soy isoflavone [J]. Electronic Journal of Clinical Medicine Literature, 2020, 7(68): 170-171
- [17] 陈静,林源,牛焕义,等.大豆异黄酮对 HepG2 荷瘤小鼠非特异免疫调节作用的影响[J].时珍国医国药,2011,22(8):2040-2041
CHEN Jing, LIN Yuan, NIU Huanyi, et al. Effect of soybean isoflavone on non-specific immunomodulation in HepG2 holoma mice [J]. Shizhen TCM, 2011, 22(8): 2040-2041
- [18] Chalida, Niamnuy, Mali, et al. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 899-906
- [19] Yu Q J, Kong P Y, Zeng D F, et al. Effect of soyaisoflavones on serum haemoglobin level in high altitude population: a multicenter clinical study of 198 cases [J]. Journal of the Third Military Medical University, 2015, 37(7): 666-671
- [20] 张新容,张晓雁,赖坚.大豆异黄酮维 E 软胶囊治疗围绝经期综合症 80 例[J].海峡药学,2016,28(2):104-105
ZHANG Xinrong, ZHANG Xiaoyan, LAI Jian. The treatment of soybean isoflavone vitamin E soft capsule with perimenopausal syndrome [J]. Straits Pharmacy, 2016, 28(2): 104-105
- [21] 袁根良,蒋丽,殷光玲,等.大豆异黄酮复合胶囊的毒理学安全评价[J].现代食品科技,2013,29(2):388-392
YUAN Genliang, JIANG Li, YIN Guangling, et al. Toxicology safety evaluation of soybean ioflavone composite capsules [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 388-392
- [22] 李立,王亚东,张焱,等.大豆异黄酮复合胶囊毒理学安全性评价[J].河南预防医学杂志,2010,21(1):38-41,50
LI Li, WANG Yadong, ZHANG Yan, et al. Evaluation on the toxicology safety of soybean isoflavone composite capsule [J]. Henan Journal of Preventive Medicine, 2010, 21(1): 38-41, 50
- [23] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范:2003 版[M].北京:化学工业出版社,2005
Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical Specification for Inspection and Evaluation of Health Food: 2003 Edition [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005
- [24] 刘颖芬,辛乃宏,李炳乾,等.雨生红球藻虾青素对小鼠免疫调节的研究[J].食品研究与开发,2017,38(20):183-187
LIU Yingfen, XIN Naihong, LI Bingqian, et al. Study on the immunomodulation of rainforest eryastaxanthin in mice [J]. Food Research and Development, 2017, 38(20): 183-187
- [25] 杨迪,李丽杰,张曾亮,等.南极磷虾油灵芝孢子油纳米乳复合物提高小鼠的免疫功能[J].现代食品科技,2020,36(5):14-21,50
YANG Di, LI Lijie, ZHANG Zengliang, et al. Antarctic krill oil *Ganoderma* spore oil nano milk complex improves immune function in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 14-21, 50
- [26] Singh R, Belchamber K B R, Fenwick P S, et al. Defective monocyte-derived macrophage phagocytosis is associated with exacerbation frequency in COPD [J]. Respiratory Research, 2021, 22(1): 113
- [27] Boo Yang Liang, Koh Liang Piu. Hematopoietic stem cell transplantation in T cell and natural killer cell lymphomas: update on recent advances [J]. Transplantation and Cellular Therapy, 2021, 27(7): 571-588