

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

杨迪¹, 李丽杰¹, 张曾亮², 王敏¹, 王鲁慧¹, 卢赛¹, 邹圣灿¹

(1. 颐海产业控股有限公司, 山东青岛 266100) (2. 内蒙古医科大学中医学院, 内蒙古呼和浩特 010110)

摘要: 本文研究了乳化溶剂蒸发法制备的南极磷虾油与灵芝孢子油纳米乳复合物对小鼠免疫功能的作用效果。将 350 只健康雌性小鼠随机分为 5 批 (N=70), 每批随机分为 7 组 (n=10), 阴性对照组、纳米乳复合物与非纳米乳复合物低 (0.25 g/kg·bw)、中 (0.50 g/kg·bw)、高 (1.50 g/kg·bw) 剂量组, 分别相当于人体推荐摄入量的 5、10、30 倍。经口灌胃 30 d, 每日 1 次。检测受试物对小鼠各项免疫指标的影响。结果表明, 与阴性对照组相比, 纳米乳复合物低、中剂量组提高小鼠脾淋巴细胞转化能力分别为 35.72% ($p<0.05$)、157.13% ($p<0.01$), 高剂量组增强小鼠迟发性变态反应效果为 32.41% ($p<0.05$); 中剂量组促进小鼠抗体生成细胞增殖效果为 21.12% ($p<0.05$), 低、中、高剂量增强小鼠产生血清溶血素的效果依次为: 63.22% ($p<0.01$)、77.64% ($p<0.01$)、55.31% ($p<0.01$); 中、高剂量组增强小鼠 NK 细胞的活性效果分别为 58.92% ($p<0.01$) 和 134.83% ($p<0.01$), 且经纳米乳化后效果优于单纯的复合物。南极磷虾油与灵芝孢子油纳米乳复合物对小鼠具有提高免疫力的作用。

关键词: 南极磷虾油; 灵芝孢子油; 纳米乳复合物; 小鼠; 免疫功能

文章编号: 1673-9078(2020)05-14-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.003

Nanoemulsion Complex of *Euphausia superba* (Antarctic Krill) Oil and *Ganoderma lucidum* Spore Oil Enhances the Immunity of Mice

YANG Di¹, LI Li-jie¹, ZHANG Zeng-liang², WANG Min¹, WANG Lu-hui¹, LU Sai¹, ZOU Sheng-can¹

(1.R & D Center, Yihai Industry Holding Co., Ltd., Qingdao 266100, China)

(2.College of Traditinal Chinese Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

Abstract: The effect of the nanoemulsion complex of *Euphausia superba* oil and *Ganoderma lucidum* spore oil on immune function in mice was investigated. Compared with the negative control group, the nanoemulsion complex in the low and medium dose groups improved the splenic lymphocyte transformation capacity by 35.72% ($p<0.05$) and 157.13% ($p<0.01$), respectively; in the high dose group, the effect of DNFB-induced delayed allergic reaction in mice was enhanced by 32.41% ($p<0.05$). The proliferation of mouse antibody-generating cells in the medium dose group was promoted by 21.12% ($p<0.05$), and the productions of serum hemolysin in mice at low, medium and high doses were enhanced by 63.22% ($p<0.01$), 77.64% ($p<0.01$), and 55.31% ($p<0.01$), respectively. The NK cell activities of mice in the medium and high dose groups were 58.29% ($p<0.01$) and 134.83% ($p<0.01$), respectively. Cellular immune function, humoral immune function and NK cell activity were all positive. The nanoemulsion complex of *Euphausia superba* oil and *Ganoderma lucidum* spore oil enhanced the immunity of mice.

Key words: *Euphausia superba* oil; *Ganoderma* spore oil; compound nanoemulsion; mice; immune function

引文格式:

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

YANG Di, LI Li-jie, ZHANG Zeng-liang, et al. Nanoemulsion complex of *Euphausia superba* (antarctic krill) oil and *Ganoderma lucidum* spore oil enhances the immunity of mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 14-21

收稿日期: 2019-12-12

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC0311203)

作者简介: 杨迪 (1989-), 女, 工程师, 研究方向: 食品科学与工程

通讯作者: 李丽杰 (1982-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 天然活性物质的开发

南极磷虾 (*Euphausia superba*) 是目前地球上数量最大的单种生物资源之一。Atkinson 等^[1]结合南极磷虾生长模型和声学方法, 对南极磷虾的最新生物储藏量估计在 3.79 亿吨, 年成虾产量为 3.42~5.36 亿吨。利用超临界 CO₂ 萃取法从南极磷虾中提取的南极磷虾油, 富集了丰富的虾青素、磷脂、类黄酮等多种活性成分, 具有降血脂、降血糖、预防心血管疾病及抗炎活性等功能^[2], 其不饱和脂肪酸是目前自然界中唯一以磷脂型态结合 Omega-3 (EPA、DHA) 和多样性超强抗氧化物(磷脂型虾青素 *Astaxanthin*) 的分子结构, 磷脂含量可达 48.37%~51.0%^[7], 总虾青素含量高于 3 mg/100 g^[8]。此外, 南极磷虾油含有的 Omega-3 必需脂肪酸、二十碳五稀酸 (EPA) 和二十二碳六稀酸 (DHA) 可能与免疫功能相关^[9]。周大勇^[10]等研究发现, 南极磷虾油对小鼠免疫功能具有增强作用。Kolakowska^[11]等研究发现, 将南极磷虾在 3 °C 储藏 72 h, 提取的南极磷虾油中磷脂成分的含量由最初的 80% 下降到 20%, 而游离脂肪酸含量增加到 6%。南极磷虾油极易受光照和温度等外界环境因素的影响, 严重影响了其功效作用及食用安全性。

灵芝孢子是灵芝的生殖细胞, 功效是灵芝子实体的 60~70 倍。灵芝孢子油是采用超临界 CO₂ 流体萃取技术, 从破壁灵芝孢子中萃取, 经浓缩得到的油状脂质物, 富集了灵芝孢子中的三萜类、多糖类、核苷类等活性成份, 具有抗肿瘤^[12]、抑制肿瘤细胞增生^[13]及增强免疫等作用^[14]。易有金^[17]等通过给昆明种小鼠隔天皮下注射环磷酰胺建立免疫功能低下模型, 研究结果显示, 灵芝孢子油能提高免疫低下小鼠的体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫功能, 对机体特异性及非特异性免疫功能均具有显著的调节作用。蒋丽^[18]等研究灵芝孢子油对小鼠免疫功能的调节作用, 对小鼠进行低中高剂量连续灌胃 30 d 后, 测定各项功能指标, 结果表明灵芝孢子油具有增强免疫力的作用。

当今世界, 纳米微胶囊已经受到研究人员越来越多的关注。Zhu^[19]等人采用高压均质法制备南极磷虾油纳米乳, 发现对南极磷虾油进行包埋可以有效的减少或抑制外界环境对南极磷虾油的影响。金栋^[20]等人制备的不同粒径的灵芝孢子油自微乳稳定性均良好可控。李学民^[21]发现将维生素 A 与牛至油大蒜素制备成复合纳米乳可以提高肉鸡养殖的综合效益, 生物利用度提升。张文娟^[22]制备禽用复合维生素纳米乳与普通复合维生素相比, 结果显示复合纳米乳可提高白蛋白分泌、促进体外培养鸡胚肝细胞增殖。

南极磷虾油和灵芝孢子油营养价值非常高, 近年来关于其各自免疫活性的研究较多, 而在纳米微胶囊

方向的应用研究极少, 对两者的纳米乳化复合物的免疫作用的研究至今尚未见相关报道。因此, 本实验对南极磷虾油灵芝孢子油复合物进行纳米微胶囊处理形成纳米乳后, 与非纳米乳复合物进行比较, 进而探究其对小鼠免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用 350 只上海西普尔-必凯实验动物有限公司繁殖的 SPF 级 CI/FI 代健康雌性小鼠, 体重为 18.2~21.9 g。实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2013-0016, 合格证号: 2008001662627。

实验动物在温度为 20~26 °C、相对湿度为 40%~70% 的屏障环境中饲养。实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2015-0009。

1.2 受试物

南极磷虾油购自北京嘉信恒联国际贸易有限公司 (批号 U196/005/A16); 灵芝孢子油购自盐城神农保健食品有限公司 (批号 180923);

非纳米乳复合物: 按照南极磷虾油与灵芝孢子油 1:1.5 比例混合均匀, 即得非纳米乳复合物。

纳米乳复合物: 按照南极磷虾油与灵芝孢子油 1:1.5 的比例配制, 利用乳化-溶剂蒸发法, 以酪蛋白酸钠、阿拉伯胶和吐温-20 为壁材制备南极磷虾油灵芝孢子油纳米乳复合物液, 将 3% 稳定剂 (其中, 65% 酪蛋白酸钠、28% 吐温-20、7% 阿拉伯胶) 溶于 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH=7), 将 1 g 南极磷虾油和灵芝孢子油复合油溶于 30 mL 的二氯甲烷与丙酮 (1:2, V/V) 的混合溶液中。将油相缓慢倒入水相中, 其比例为 1:9, 在 40 °C 下搅拌 1.5 h, 得到粗复合纳米乳液, 将粗复合纳米乳液在 600~1000 r/min 转速下匀浆 5~10 min, 随后对其进行高压均质, 在 0 kPa、300 kPa、600 kPa 压力下分别均质 1 次, 随后在 800 kPa 压力下循环均质 3 次, 最后在真空状态下除去乳液中的有机溶剂, 即得纳米乳复合物。

通过冷场发射扫描电镜观察, 纳米乳复合物颗粒表面光滑呈球状, 粒径为 141.92±3.38 nm, Zeta 电位为 22.65±3.32 mV, 表面油含量较低, 经过长期留样试验证实, 经包埋后的纳米乳液稳定性较好。

1.3 主要仪器与试剂

仪器: 打孔器、SPECTRAMAX plus 酶标仪, 北京龙跃生物科技有限公司; PL203 型电子天平, 上海

速展机电有限公司; CO₂-80A-IR CO₂ 培养箱, 上海丙林电子科技有限公司; SG-603 生物安全柜, 北京仪诺科兴科技发展有限公司; 等。

试剂: 二硝基氟苯 (DNFB), 上海澄绍生物科技有限公司; SRBC, 北京博尔西科技有限公司; 豚鼠血清, 北京博尔西科技有限公司; Hank's 液, 武汉卡诺斯科技有限公司; SA 缓冲液, 上海晶抗生物工程有限公司; 印度墨汁, 南京杜莱生物技术有限公司; 都氏试剂, 上海羽朵生物科技; YAC-1 细胞, 南京科佰生物科技有限公司; RPMI1640 完全培养液, 上海圻明生物科技有限公司; Giemsa 染色液, 上海哥凡生物科技有限公司; LDH 基质液, 安徽经科生物技术有限公司; 等。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组及受试物给予方式

小鼠按体重随机分为 I、II、III、IV、V 五批, 每批 70 只, 分成 7 组 (阴性对照组、纳米乳复合物低、中、高剂量组; 非纳米乳复合物低、中、高剂量组), 每组 10 只。其中 I 批小鼠进行脏器/体重比实验、ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化、NK 细胞活性试验; II 批小鼠进行耳廓肿胀试验; III 批小鼠进行抗体生成细胞检测和半数溶血值 HC₅₀ 的测定; IV 批小鼠进行碳廓清试验; V 批小鼠进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验。

受试物人体推荐剂量为 3.0 g/(人·日) (以 60 kg 体重计), 设纳米乳复合物低 (0.25 g/kg·bw)、中 (0.50 g/kg·bw)、高 (1.50 g/kg·bw) 剂量组; 非纳米乳复合物低 (0.25 g/kg·bw)、中 (0.50 g/kg·bw)、高 (1.50 g/kg·bw) 剂量组 (分别相当于受试物人体推荐摄入量的 5、10、30 倍), 另设 0 g/kg·bw 以玉米油代替受试物为阴性对照组。受试样品用玉米油配制, 低、中、高剂量配制浓度分别为 25 mg/mL、50 mg/mL、150 mg/mL, 小鼠灌胃量为 0.1 mL/10 g·bw 经口每日一次给予小鼠相应剂量的受试物, 连续灌胃 30 d 后, 测定各项免疫功能指标。

1.4.2 体重及脏器/体重比值测定

小鼠在初始 (灌胃前)、中期 (灌胃 15 d)、末期 (灌胃 30 d) 分别称重, 记录各组体重的平均值。

各剂量组小鼠连续灌胃 30 d 后, 颈椎脱臼法处死后, 取胸腺、脾准确称重, 计算胸腺/体重比、脾/体重比。

1.4.3 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验-MTT 法

各剂量组小鼠连续灌胃 30 d 后, 颈椎脱臼法处死

小鼠, 无菌取脾, 置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中, 研磨脾脏, 制成单个细胞悬液, 经 200 目筛网过滤, 用 Hank's 液洗 2 次, 每次离心 10 min (1000 r/min), 然后将细胞悬浮于 1 mL RPMI1640 完全培养液中, 台酚兰染色计数活细胞数 (均在 95% 以上), 用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL。将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 一孔加 75 μ L ConA 液 (100 μ g/mL), 另一孔作为对照, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h, 每孔轻轻吸取上清液 0.7 mL, 加入 0.7 mL 不含小牛血清的 RPMI1640 完全培养液, 同时加入 MTT (5 mg/mL) 50 μ L/孔, 继续培养 4 h。培养结束后, 每孔加入 1 mL 酸性异丙醇, 吹打均匀, 使紫色结晶完全溶解。将溶解液移入 96 孔培养板中, 每孔做三个平行孔, 用酶标仪在波长 570 nm 处测定各孔吸光值。淋巴细胞的增殖能力以加 ConA 孔的光密度值与不加 ConA 的光密度值的差值来表示。

1.4.4 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应 (DTH) -耳肿胀法

各剂量组小鼠连续灌胃 30 d 后, 每鼠用剃毛机将腹部毛剃去, 范围约 3 cm×3 cm, 用 10 mg/mL DNFB 溶液 50 μ L 均匀涂抹致敏。5 d 后用 10 μ L 10 mg/mL DNFB 溶液均匀涂抹于小鼠右耳 (两面) 进行攻击, 攻击后 24 h 颈椎脱臼处死, 剪下左右耳壳, 用打孔器取下直径 8 mm 耳片, 称重。用左右耳重量之差表示 DTH 的程度。

耳重差/mg=右耳重/mg-左耳重/mg

1.4.5 抗体生成细胞检测-Jerne 改良玻片法

各剂量组小鼠连续灌胃 30 d 后, 每只鼠腹腔注射 0.2 mL 2% (V/V) SRBC 悬液进行免疫, 4 d 后小鼠颈椎脱臼处死, 取出脾脏, 置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中, 研磨脾脏, 制成细胞悬液, 经 200 目筛网过滤, 离心 10 min (1000 r/min), 用 Hank's 液洗 2 遍, 最后将细胞悬浮于 8 mL Hank's 液中。将表皮培养基加热溶解后, 45 °C 水浴保温, 与等量 pH 7.2~7.4 两倍浓度的 Hank's 液混合, 分装小试管, 每管 0.5 mL, 再向管内加 50 μ L 10% SRBC (V/V, 用 SA 缓冲液配制), 25 μ L 脾细胞悬液, 迅速混匀, 倾倒在已刷琼脂糖薄层的玻片上, 做两个平行片, 待琼脂凝固后, 将玻片水平扣放在玻片架上, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1.5 h, 然后将制备好的补体 1:8 稀释后加入到玻片架凹槽内, 继续孵育 1.5 h 后, 计数溶血空斑数。

1.4.6 血清溶血素测定-半数溶血值 (HC₅₀)

各剂量组小鼠连续灌胃 30 d 后, 制备 2% (V/V) 的 SRBC 悬液, 每只鼠腹腔注射 0.2 mL 进行免疫, 4 d

后于小鼠眼底静脉丛取血,离心管内放置 1 h, 2000 r/min 离心 10 min, 分离并收集血清。200 倍稀释后,按检验方法测定样品管及 SRBC 半数溶血时的光密度值。溶血素的量以半数溶血值 (HC₅₀) 表示。

$$HC_{50} = \frac{\text{样品光密度值}}{\text{SRBC 半数溶血时的光密度值}} \times \text{稀释倍数}$$

1.4.7 小鼠碳廓清试验

各剂量组小鼠连续灌胃 30 d 后,每鼠尾静脉注入 4 倍稀释的印度墨汁 (0.1 mL/10 g·bw)。待墨汁注入,立即计时。注入墨汁后 2 min 及 10 min, 分别从眼内眦静脉丛取血 20 μL, 并将其加到 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中,用酶标仪在 600 nm 波长处测定光密度值,胸腺、肝、脾称重,利用光密度值、肝重和脾重计算吞噬指数 *a*。另计算胸腺/体重比、脾/体重比。

$$K = \frac{\log OD_{\text{注入墨汁 2 min 后}} - \log OD_{\text{注入墨汁 10 min 后}}}{t_2 - t_1}$$

$$\text{吞噬指数 } a = \frac{\text{体重} \times K^{\frac{1}{3}}}{\text{肝重} + \text{脾重}}$$

1.4.8 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验-滴片法

小鼠巨噬细胞的激活:实验前 4 d 给每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 2% 压积羊红细胞。用颈椎脱臼法处死小鼠,腹腔注射加小牛血清的 Hank's 液 4 mL/只,轻轻按揉腹部 20 次,以充分洗出腹腔巨噬细胞,然后将腹壁剪开一个小口,用胶头吸管吸取腹腔洗液 2 mL 于试管内 (或用注射器)。用 1 mL 加样器吸取腹腔洗液 0.5 mL 加入盛有 0.5 mL 1% 鸡红细胞悬液的试管内,混匀。用注射器吸取 0.5 mL 混合液,加入玻片的琼脂圈内。放置孵箱内 37 °C 孵育 15~20 min。孵育结束后迅速用生理盐水将未贴壁细胞冲掉,于甲醇液中固定 1 min, Giemsa 液染色 15 min。用蒸馏水冲洗干净,晾干,用 40× 显微镜计数吞噬率和吞噬指数。

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}}$$

1.4.9 NK 细胞活性测定-乳酸脱氢酶测定法

各剂量组小鼠连续灌胃 30 d 后,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌取脾,置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中,研磨脾脏,制成单细胞悬液,经 200 目筛网过滤,用 Hank's 液洗 2 次,每次离心 10 min (1000 r/min),弃上清将细胞浆弹起,加入 0.5 mL 灭菌水 20 s,裂解红细胞后再加入 0.5 mL 2 倍 Hank's 液及 8 mL Hank's 液,离心 10 min (1000 r/min),用含 10% 小牛血清

RPMI1640 完全培养液重悬,1% 冰乙酸稀释后计数,台盼兰染色计数活细胞数 (均在 95% 以上),用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 2×10^7 个/mL。

实验前 24 h 将靶细胞 (YAC-1 细胞) 传代培养,应用前以 Hank's 液洗 3 次,用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL。取 YAC-1 细胞和脾细胞各 100 μL (效靶比 50:1) 于 U 型 96 孔培养板中, YAC-1 细胞自然释放孔加 YAC-1 细胞和培养液各 100 μL, YAC-1 细胞最大释放孔加 YAC-1 细胞和 2.5% Triton 各 100 μL, 上述各项均设三个平行孔,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h,然后将 96 孔培养板以 1500 r/min 离心 5 min, 每孔吸取上清液 100 μL 于平底 96 孔培养板中,同时加入 LDH 基质液 100 μL, 反应 10 min, 每孔加入 30 μL 1 mol/L HCL, 在酶标仪 490 nm 处测定光密度值。

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

1.5 统计学处理

用 SPSS (25.0) 软件对各试验原始数据进行方差齐性检验,满足方差齐要求的数据资料,用单因素方差分析方法中多个试验组与一个对照组间均数的两两比较方法进行统计处理;对非正态分布或方差不齐的数据资料用秩和检验进行统计处理。

2 结果与讨论

2.1 对小鼠体重的影响

由表 1 结果可知,各组小鼠生长发育良好,体重稳定增加,各剂量组与阴性对照组比较,小鼠体重均未见显著差异 ($p > 0.05$),表明受试物对小鼠体重增长影响不显著。

2.2 对小鼠胸腺、脾脏器官的影响

胸腺是 T 细胞分化和成熟的主要场所,胸腺的损伤和退化可导致免疫细胞减少,脾脏是机体最大的外围免疫器官,参与机体多种免疫反应。经口给予小鼠不同剂量的受试物 30 d 后,取小鼠的胸腺和脾脏称重,计算脏体比,并进行统计学处理。由表 2 结果可知,各剂量组与阴性对照组比较,胸腺指数、脾指数差异无统计学意义 ($p > 0.05$),表明受试物均对小鼠胸腺、脾脏器官的影响不显著,对机体无明显毒性作用,对免疫器官无明显损伤作用。

表 1 对小鼠体重的影响

Table 1 Effects on body weight in mice ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	初始体重/g	终末体重/g	增长值/g	<i>p</i>
阴性对照组	20.18±1.00	24.61±1.47	4.43±1.81	
纳米乳低剂量组	20.15±1.01	24.64±0.99	4.49±0.97	<i>p</i> >0.05
非纳米乳低剂量组	20.17±0.96	24.72±1.03	4.55±1.32	<i>p</i> >0.05
纳米乳中剂量组	20.18±1.00	25.01±0.80	4.83±1.34	<i>p</i> >0.05
非纳米乳中剂量组	20.18±0.89	25.03±0.95	4.85±1.20	<i>p</i> >0.05
纳米乳高剂量组	20.19±0.98	24.80±1.22	4.61±1.22	<i>p</i> >0.05
非纳米乳高剂量组	20.20±1.09	24.79±1.36	4.59±1.09	<i>p</i> >0.05

表 2 对小鼠胸腺、脾脏器官的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effects on thymus and spleen of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	(胸腺/体重)%	(脾脏/体重)%	<i>p</i>
阴性对照组	10	0.20±0.02	0.41±0.02	
纳米乳低剂量组	10	0.22±0.03	0.41±0.05	<i>p</i> >0.05
非纳米乳低剂量组	10	0.21±0.02	0.41±0.03	<i>p</i> >0.05
纳米乳中剂量组	10	0.21±0.03	0.42±0.06	<i>p</i> >0.05
非纳米乳中剂量组	10	0.21±0.03	0.41±0.04	<i>p</i> >0.05
纳米乳高剂量组	10	0.22±0.03	0.38±0.03	<i>p</i> >0.05
非纳米乳高剂量组	10	0.22±0.02	0.39±0.04	<i>p</i> >0.05

2.3 对细胞免疫功能的影响

2.3.1 对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化的影响

表 3 对小鼠脾淋巴细胞转化的影响

Table 3 Effect on transformation of spleen lymphocytes in mice

组别	动物数/只	加与不加 ConA 孔吸光度的差值	<i>p</i>
阴性对照组	10	0.14±0.05	
纳米乳低剂量组	10	0.19±0.03	<i>p</i> <0.05
非纳米乳低剂量组	10	0.18±0.02	<i>p</i> <0.05
纳米乳中剂量组	10	0.36±0.09	<i>p</i> <0.05
非纳米乳中剂量组	10	0.27±0.05	<i>p</i> <0.05
纳米乳高剂量组	10	0.19±0.06	<i>p</i> >0.05
非纳米乳高剂量组	10	0.15±0.07	<i>p</i> >0.05

淋巴细胞的转化可以在体外检测淋巴细胞的应答能力。经口给予小鼠不同剂量的受试物 30 d 后, 用 MTT 法进行 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验, 计算加 ConA 孔与不加 ConA 孔吸光度的差值, 并进行统计学处理。由表 3 结果可见, 与阴性对照组相比, 高剂量组均无显著差异 (*p*>0.05), 低、中剂量组均有显著性差异 (*p*<0.05)。其中, 低剂量组对小鼠脾淋巴细胞的转化能力为: 纳米乳 35.72%、非纳米乳 28.57%; 中剂量组对脾淋巴细胞转化能力为: 纳米乳 157.13%、非纳米乳 92.86%, 中剂量纳米乳组与非纳米乳组之间

差异性显著 (*p*<0.05)。由此可推测, 复合物经纳米乳化对小鼠脾淋巴细胞的转化能力显著提高。另外, 纳米乳低、中剂量组之间差异性极显著 (*p*<0.01), 中、高剂量组之间差异性也极显著 (*p*<0.01), 而低、高剂量组之间无显著性差异 (*p*>0.05), 表明纳米乳中剂量组是最优剂量组, 对促进小鼠脾淋巴细胞转化的作用最显著。

2.3.2 对 DNFB 诱导小鼠 DTH 的影响

表 4 对 DNFB 诱导小鼠 DTH 的影响

Table 4 Effect of DNFB-induced DTH in mice

组别	动物数/只	耳壳增重/mg	<i>p</i>
阴性对照组	10	9.21±1.86	
纳米乳低剂量组	10	9.83±1.88	<i>p</i> >0.05
非纳米乳低剂量组	10	9.72±1.83	<i>p</i> >0.05
纳米乳中剂量组	10	11.14±2.17	<i>p</i> >0.05
非纳米乳中剂量组	10	10.98±2.01	<i>p</i> >0.05
纳米乳高剂量组	10	12.19±1.91	<i>p</i> <0.05
非纳米乳高剂量组	10	12.07±1.95	<i>p</i> <0.05

迟发型变态反应是当机体接受再次抗原刺激 24-48 h 后发生的组织损伤情况, 因此可直接反映机体细胞免疫功能的强弱。经口给予小鼠不同剂量的受试物 30 d 后, 用耳肿胀法进行 DNFB 诱导小鼠 DTH 实验, 计算耳壳增重, 并进行统计学分析。由表 4 结果可见, 与阴性对照组相比, 高剂量组耳壳增重均高于阴性对照组, 差异有统计学意义 (*p*<0.05), 对小鼠

迟发性变态反应的影响为：纳米乳 32.36%、非纳米乳 31.05%，说明纳米乳诱导小鼠迟发性变态反应的能力高于非纳米乳，但高剂量纳米乳组与非纳米乳组之间无显著性差异 ($p>0.05$)。另外，纳米乳低、中剂量组之间与低、高剂量组之间差异性均较显著 ($p<0.05$)，而中、高剂量组之间无显著性差异 ($p>0.05$)。说明迟发型变态反应需要在更高剂量下才能发生，但对细胞免疫方向整体是呈增强的，纳米乳低、中、高剂量组的增强效果依次为：6.70%、20.92%、32.41%。

2.4 对体液免疫功能的影响

2.4.1 对小鼠溶血空斑数的影响

小鼠血清溶血素抗体生成实验是衡量机体体液免疫的一种测定方法，通过溶血空斑的数量可以反映机体的体液免疫能力。经口给予小鼠不同剂量的受试物 30 d 后，用 Jerne 改良玻片法进行小鼠抗体生成细胞实验，计算溶血空斑数，并进行统计学分析。由表 5 结果可见，对阴性对照组相比，低、高剂量组均无显著差异 ($p>0.05$)；中剂量组差异均有统计学意义 ($p<0.05$)，且提高小鼠抗体生成细胞数效果为：纳米乳 20.73%、非纳米乳 19.30%，中剂量纳米乳组与非纳米乳组之间差异性显著 ($p<0.05$)，说明复合物经纳米乳乳化后可显著促抗体生成细胞增殖。另外，提高效果未随剂量的增加而正向增强，纳米乳低、中、高剂量组的影响效果分别为：6.62%、21.12%、17.94%，说明纳米乳中剂量组是最优剂量组，对小鼠溶血空斑数的影响最大，促进抗体生成细胞增殖的效果最强。

表 5 对小鼠溶血空斑数的影响

Table 5 Effect on the number of hemolytic plaque in mice

组别	动物数/只	溶血空斑数 (10^3 个/全脾细胞)	p
阴性对照组	10	12.54±2.54	
纳米乳低剂量组	10	13.37±1.98	$p>0.05$
非纳米乳低剂量组	10	12.68±2.20	$p>0.05$
纳米乳中剂量组	10	15.14±2.21	$p<0.05$
非纳米乳中剂量组	10	14.96±1.99	$p<0.05$
纳米乳高剂量组	10	14.79±1.93	$p>0.05$
非纳米乳高剂量组	10	13.89±1.45	$p>0.05$

2.4.2 对小鼠血清半数溶血值 (HC_{50}) 的影响

经口给予小鼠不同剂量的受试物 30 d 后，用半数溶血值法测定小鼠的血清半数溶血值 (HC_{50})，并进行统计学分析。由表 6 结果可见，各低、中、高剂量组小鼠血清半数溶血值 (HC_{50}) 均高于阴性对照组，差异有统计学意义 ($p<0.01$)，且纳米乳低、中、高剂

量组增强小鼠产生血清溶血素的能力为 63.22%、77.64%、55.31%，而非纳米乳增强小鼠产生血清溶血素的能力为：55.26%、69.74%、40.79%，纳米乳各剂量组的增强效果均高于非纳米乳，且低、中、高剂量纳米乳组与非纳米乳组均存在显著性差异 ($p<0.05$)。其中，纳米乳低、高剂量组之间无显著性差异 ($p>0.05$)，低、中剂量组之间与中、高剂量组之间差异性均显著 ($p<0.05$)，与对小鼠溶血空斑数的影响结果表现一致，仍然是纳米乳中剂量组是最优剂量组。表明在增强小鼠体液免疫功能方面，影响作用并不随剂量增大而增强，中剂量组效果最佳，可能与剂量过大对机体产生其他作用而影响体液免疫功能，具体原因有待进一步研究证实。

表 6 对小鼠 HC_{50} 的影响

Table 6 Effect on the half hemolytic value (HC_{50}) of mice serum

组别	动物数/只	HC_{50}	p
阴性对照组	10	76±16	
纳米乳低剂量组	10	124±20	$p<0.01$
非纳米乳低剂量组	10	118±18	$p<0.01$
纳米乳中剂量组	10	135±13	$p<0.01$
非纳米乳中剂量组	10	129±15	$p<0.01$
纳米乳高剂量组	10	118±23	$p<0.01$
非纳米乳高剂量组	10	107±25	$p<0.01$

2.5 对单核-巨噬细胞功能的影响

2.5.1 对小鼠碳廓清能力的影响

表 7 对小鼠碳廓清能力的影响

Table 7 Effect on carbon clearance capacity of mice

组别	动物数/只	吞噬指数 a	p
阴性对照组	10	4.84±1.60	
纳米乳低剂量组	10	5.43±0.74	$p>0.05$
非纳米乳低剂量组	10	5.32±0.84	$p>0.05$
纳米乳中剂量组	10	5.40±0.65	$p>0.05$
非纳米乳中剂量组	10	5.12±0.63	$p>0.05$
纳米乳高剂量组	10	5.05±1.23	$p>0.05$
非纳米乳高剂量组	10	4.98±1.10	$p>0.05$

经口给予小鼠不同剂量的受试物 30 d 后，进行小鼠碳廓清实验，计算吞噬指数 a，并进行统计学分析。由表 7 结果可见，各剂量组小鼠碳廓清吞噬指数 a 与阴性对照组比较，差异均无统计学意义 ($p>0.05$)。表明受试物对提高小鼠的单核细胞吞噬能力效果不显著。但纳米乳各剂量组均比非纳米乳各剂量组的吞噬指数 a 偏高一点，说明复合物经纳米乳乳化后对小鼠的单核细胞的吞噬能力是增强的。

2.5.2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬百分率及吞噬指数的影响

巨噬细胞是除淋巴细胞外免疫系统中第二大主要的细胞群,其吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一。经口给予小鼠不同剂量的受试物30 d后,用滴片法进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验,计算吞噬指数及吞噬百分率,并进行统计学分析。由表8结果可见,各剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红

细胞的吞噬百分率及吞噬指数与阴性对照组比较,差异均无统计学意义($p>0.05$),表明受试物增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力效果不显著。这与周大勇^[10]对单一南极磷虾油对小鼠免疫功能的研究结果不一致,但与蒋丽^[18]对单一灵芝孢子油在小鼠免疫功能方向的研究结果相一致,这可能与复合物中南极磷虾油与灵芝孢子油的比例有关,有待进一步研究证实。

表8 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率及吞噬指数的影响

Table 8 Effect on phagocytosis rate and phagocytosis indicator of mouse peritoneal macrophage phagocytic chicken erythrocytes

(n=10)				
组别	吞噬百分率/%	<i>p</i>	吞噬指数	<i>p</i>
阴性对照组	22.74±2.91		0.28±0.03	
纳米乳低剂量组	24.53±3.88	$p>0.05$	0.31±0.05	$p>0.05$
非纳米乳低剂量组	23.78±3.68	$p>0.05$	0.29±0.04	$p>0.05$
纳米乳中剂量组	23.68±3.74	$p>0.05$	0.32±0.05	$p>0.05$
非纳米乳中剂量组	23.40±3.25	$p>0.05$	0.30±0.03	$p>0.05$
纳米乳高剂量组	24.53±2.33	$p>0.05$	0.31±0.04	$p>0.05$
非纳米乳高剂量组	23.98±2.10	$p>0.05$	0.29±0.03	$p>0.05$

2.6 对小鼠NK细胞活性的影响

表9 对小鼠NK细胞活性的影响

Table 9 Effect on the activity of NK cells in mice

组别	动物数/只	NK细胞活性/%	<i>p</i>
阴性对照组	10	18.53±4.48	
纳米乳低剂量组	10	20.78±4.51	$p>0.05$
非纳米乳低剂量组	10	20.20±4.30	$p>0.05$
纳米乳中剂量组	10	29.44±7.04	$p<0.01$
非纳米乳中剂量组	10	27.32±6.58	$p<0.01$
纳米乳高剂量组	10	43.50±5.41	$p<0.01$
非纳米乳高剂量组	10	37.85±5.20	$p<0.01$

NK细胞不需抗原事先刺激和抗体的存在就能对靶细胞产生直接杀伤作用,其活性的高低常用于反应机体的免疫功能状况。经口给予小鼠不同剂量的受试物30 d后,用乳酸脱氢酶测定法进行小鼠NK细胞活性测定,并进行统计学分析。由表9结果可见,低剂量组均无显著性差异($p>0.05$);中剂量组增强小鼠NK细胞活性的能力:纳米乳58.92%、非纳米乳47.43%;高剂量组增强小鼠NK细胞活性的能力为:134.83%、104.26%,低剂量纳米乳组与非纳米乳组之间无显著性差异($p>0.05$),但高剂量纳米乳组与非纳米乳组之间差异性显著($p<0.05$)。说明复合物经纳米乳化后不会降低对小鼠NK细胞的活性,且比非纳米复合物的增强效果更显著。另外,影响作用随剂量增

大而显著增强,纳米乳低、中剂量组之间无显著性差异($p>0.05$),但低、高剂量组之间差异性极显著($p<0.01$),中、高剂量组之间差异性显著($p<0.05$),说明纳米乳高剂量组是最优剂量组。

3 结论

本研究灌胃给予小鼠不同剂量的不同受试物,结果表明,与阴性对照组相比,纳米乳复合物低、中剂量组提高小鼠脾淋巴细胞转化能力分别为35.72% ($p<0.05$)和157.13% ($p<0.01$);高剂量组增强DNFB引起的小鼠迟发性变态反应效果为32.41% ($p<0.05$);中剂量组促进小鼠抗体生成细胞增殖效果为21.12% ($p<0.05$);低、中、高剂量增强小鼠产生血清溶血素的效果依次为:63.22% ($p<0.01$)、77.64% ($p<0.01$)、55.31% ($p<0.01$);中、高剂量组增强小鼠NK细胞的活性效果分别为58.92% ($p<0.01$)和134.83% ($p<0.01$)。研究结果表明,纳米乳复合物与非纳米乳复合物均有不同程度增强免疫力的作用,且纳米乳在细胞免疫功能、体液免疫功能和NK细胞活性方面的作用效果均优于非纳米乳,说明复合物经纳米乳化后提高了其功效性,但并不都是随剂量增加而逐渐增强,关于纳米乳复合物协同作用的机理还需进一步研究。同时,通过对纳米乳低、中、高剂量组之间的均数差异性分析可知,各剂量组之间也会存在显著性差异,但在细胞免疫、体液免疫等不同方向结果不一致。

参考文献

- [1] Atkinson A, Siegel V, Pakhomov A, et al. A reappraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill [J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2009, 56(5): 727-740
- [2] 刘勤,刘志东,陆亚男,等. 南极磷虾产品研究及发展趋势[J]. 渔业信息与战略,2014,29(2):115-121
- LIU Qin, LIU Zhi-dong, LU Ya-nan, et al. Research and development trend of Antarctic krill products [J]. Fishery Information and Strategy, 2014, 29(2): 115-121
- [3] 徐恺. 南极磷虾肽抗疲劳、耐缺氧以及抗衰老、提高免疫力实验研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2012
- XU Kai. Experimental study on anti-fatigue, anti-hypoxia, anti-aging and immunity enhancement of krill peptide from Antarctica [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012
- [4] Kwantes J M, Grundmann O. A brief review of krill oil history, research, and the commercial market [J]. Journal of Dietary Supplement, 2015, 12(1): 23-35
- [5] Ulven S M, Holven K B. Comparison of bio availability of krill oil versus fish oil and health effect [J]. Vasc Health and Risk Management, 2015, 11: 511-524
- [6] Gabriel A, Bonaterra, David Driscoll, et al. Krill oil-in-water emulsion protects against lipopolysaccharide-induced proinflammatory activation of macrophages *in vitro* [J]. Mar Drugs, 2017, 15(3): 74-85
- [7] Manuela C, Vincenzo C, Enrica P, et al. Krill oil reduces intestinal inflammation by improving epithelial integrity and impairing adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity [J]. Digestive and Liver Disease, 2016, 48: 34-42
- [8] TIAN Xiao-qing, FAN Cheng-qi, LIU Zhi-dong, et al. An effective extract method of phospholipids from Antarctic krill *Euphausia superba* [J]. Open Journal of Marine Science, 2018, 8: 293-299
- [9] Da BM, Mastalurova I, Brazaitė G, et al. The effect of krill oil supplementation on exercise performance and markers of immune function [J]. Plos One, 2015, 10(9): 14
- [10] 周大勇,王君妍,刘满阳,等. 南极磷虾油对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 大连工业大学学报,2015,3(34):97-100
- ZHOU Da-yong, WANG Jun-yan, LIU Xiao-yang, et al. Regulation of Antarctic prawn oil on immune function of mice [J]. Journal of Dalian University of Technology, 2015, 3(34): 97-100
- [11] Kołakowska A, Changes in lipids during the storage of krill (*Euphausia superba* Dana) at 3 degrees C [J]. Lebensm Unters Forsch, 1988, 6: 519-523
- [12] 郭原,周亚杰,冯鹏,等. 灵芝孢子油抗肿瘤活性机制研究进展[J]. 智慧健康,2018,4(27):49-51
- GUO Yuan, ZHOU Ya-jie, FENG Peng, et al. Research progress in antitumor mechanism of *Ganoderma lucidum* spore oil [J]. Wisdom and Health, 2018, 4(27): 49-51
- [13] 孟飞,李素波,张伟伟,等. 灵芝孢子油抑制小鼠乳腺癌细胞生长作用研究[J]. 广州医药,2016,47(5):4-7
- MENG Fei, LI Su-bo, ZHANG Wei-wei, et al. Study on the inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* spore oil on the growth of mouse breast cancer cells [J]. Guangzhou medicine, 2016, 47(5): 4-7
- [14] 陈新滔,吴东,龚明. 灵芝孢子粉咀嚼片对小鼠免疫功能的影响[J]. 江西中医药大学学报,2016,28(3):73-75
- Chen Xin-tao, WU Dong, GONG Ming. Effect of *Ganoderma lucidum* spore powder chewing tablet on immune function of mice [J]. Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2016, 28(3): 73-75
- [15] 孙青,王淑娥,吴海寰. 灵芝孢子油对老龄小鼠免疫保护作用[J]. 营养学报,2017,39(3):261-264
- SUN Qing, WANG Shu-e, WU Hai-huan. The protective effect of *Ganoderma* spore oil on the immunity of aged mice [J]. Journal of Nutrition, 2017, 39(3): 261-264
- [16] 袁诚,罗爱勤,李菁,等. 灵芝孢子油口服乳的免疫作用研究[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志,2016,3(2):104-107
- YUAN Cheng, LUO Ai-qin, LI Jing, et al. Study on the immune effect of *Ganoderma* spore oil oral milk [J]. Electronic Journal of Tumor Metabolism and Nutrition, 2016, 3(2): 104-107
- [17] 易有金,胡瞬,熊兴耀,等. 灵芝孢子油对免疫低下模型小鼠的免疫调节作用[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2012,39(2):161-166
- YI You-jin, HU Shun, XIONG Xing-yao, et al. Immunomodulatory effect of *Ganoderma* spore oil on immunocompromised mice [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2012, 39(2): 161-166
- [18] 蒋丽,黄远英,殷光玲,等. 灵芝孢子油免疫调节作用的研究[J]. 现代食品科技,2013,29(3):531-533
- JIANG Li, HUANG Yuan-ying, YIN Guang-ling, et al. Study on the immunoregulation of *Ganoderma* spore oil [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(3): 531-533

(下转第 50 页)