

技术研究进展[J]. 环境与健康杂志,2013,30(4):366-370.

[14] 李煜,敬海明,高珊,等. 秀丽隐杆线虫在毒理学研究中的应用进展[J]. 毒理学杂志,2012,26(6):466-469.

[15] 李煜,敬海明,李国君. 秀丽隐杆线虫神经毒理学研究进展[J]. 中国公共卫生,2013,29(4):622-624.

[16] Boyd W A, McBride S J, Rice J R, et al. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2010,245(2):153-159.

[17] Sprando R L, Olejnik N, Cinar H N, et al. A method to rank order water soluble compounds according to their toxicity using *Caenorhabditis elegans*, a complex object parametric analyzer and sorter, and axenic liquid media[J]. Food Chem Toxicol,2009,47(4):722-728.

研究报告

纳豆粉对小鼠免疫调节作用的试验研究

彭亮,王彦武,傅伟忠,何励,覃辉艳,姚思宇
(广西壮族自治区疾病预防控制中心,广西南宁 530028)

摘要:目的 探讨纳豆粉对小鼠的免疫调节作用。方法 以不同剂量的纳豆粉连续经口给予小鼠 30 d,然后通过细胞免疫、体液免疫、吞噬系统功能、自然杀伤细胞活性 4 个方面的试验结果评价纳豆粉对小鼠免疫系统的作用。结果 纳豆粉能够增强小鼠的脾淋巴细胞增殖、转化作用,提高小鼠的迟发型变态反应程度,促进小鼠的抗体生成细胞增殖,提高小鼠的血清溶血素水平,增强小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清能力和腹腔巨噬细胞吞噬能力,对自然杀伤细胞活性无明显影响。结论 纳豆粉可提高小鼠的免疫力。

关键词:纳豆;免疫调节;小鼠;毒理学试验

中图分类号:R155;R151.2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)04-0336-04
DOI:10.13590/j.cjfh.2014.04.008

Experimental study on effect of natto powder on immunological function of mice

PENG Liang, WANG Yan-wu, FU Wei-zhong, HE Li, QIN Hui-yan, YAO Si-yu

(Guangxi Autonomous Regional Center for Disease Control and Prevention, Guangxi Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To explore the effect of natto powder on the immunological function in mice. **Methods** Natto powder were consecutively orally administered to mice with different dosage for 30 d. Humoral immunity, cellular immunity, phagocytic system function and activity of natural killer cell were used to access the effect of natto powder on immunological function. **Results** Natto powder could stimulate proliferation and transformation of mice's spleen lymphocytes, promote delayed hypersensitivity, increase the quantity of antibody producing cells, enhance the level of serum hemolysin, accelerate the carbon clearance and intensify the peritoneal macrophage, and had no significant effect on activity of natural killer cell in mice. **Conclusion** It suggested that natto powder could enhance the immune function in mice.

Key words: Natto; immune regulation; mice; toxicological experiment

纳豆是由大豆接种纳豆芽孢杆菌发酵后制成的食品,风味独特,营养丰富,在日本有近千年的食用历史。近年来也开始受到我国消费者的青睐。现代医学研究发现,纳豆具有多种保健功效,如调节血脂血糖、抗衰老、增强免疫力、预防骨质疏松等^[1-2]。纳豆可加工制成咀嚼片、调味料、饼干、粉

剂等。但有专家提出,纳豆的保健功能功效因子(如纳豆激酶、纳豆异黄酮等),多存在于新鲜纳豆外表层的黏液中,若将纳豆制成干品,其保健功效就会降低。为验证纳豆干品的保健功效,本研究拟以纳豆粉为受试物,小鼠为受试对象,观察纳豆粉对小鼠免疫功能的影响,为其开发利用提供试验依据。

收稿日期:2013-09-10
基金项目:广西科技基础条件平台建设项目(12-97-18)
作者简介:彭亮 男 副主任医师 研究方向为保健食品的毒理和
功能学研究 E-mail: Pengliang_79@sohu.com

1 材料与方法
1.1 材料
1.1.1 样品
纳豆粉(上海诺金科生物科技有限公司),基本

制作工艺是先将大豆经传统方法制成纳豆,然后经真空冷冻干燥,物理方法粉碎制成。经检测,每100 g纳豆粉中,含蛋白质30 g,总异黄酮120 mg,总皂甙360 mg。人口服推荐用量为每人(成人)每日1 200 mg,成人体重按60 kg计算,折合剂量为20 mg/kg BW。

1. 1. 2 主要仪器与试剂

离心机、细胞培养箱、恒温水浴箱、显微镜、半自动生化仪、酶标仪等。绵羊红细胞(SRBC)、Hank’s液、RPMI1640培养液、小牛血清、刀豆蛋白(ConA)、噻唑蓝(MTT)、二硝基氟苯(DNFB)、PBS缓冲液、补体(豚鼠血清)、SA缓冲液、琼脂糖、YAC-1细胞、Tris-HCL缓冲液、印度墨汁、鸡红细胞、Gimsa染液等。

1. 1. 3 实验动物

取SPF级健康KM种雄性小鼠240只,体重18~22 g,购自广东省医学实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2008-0002,实验动物质量合格证号:0116944]。动物实验室为屏障系统[许可证号:SYXK(桂)2011-0005],SPF级,温度22~25℃,相对湿度55%~70%。由于纳豆中的活性因子异黄酮具有弱雌激素类作用,若其与相应的受体结合,可能成为试验的混杂因素,故选择单一性别(雄性)动物进行试验。

1. 2 方法

将小鼠分为6批,每批40只。第1和2批,进行细胞免疫试验,包括刀豆蛋白诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖转化试验和迟发型变态反应试验;第3批,进行体液免疫试验,包括抗体生成细胞空斑计数和

血清溶血素测定;第4和5批,进行吞噬系统功能测定,包括腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验和碳廓清试验;第6批,进行自然杀伤(natural killer,NK)细胞活性测定。

末次给样后1 h称小鼠体重,然后参照《保健食品检验与评价技术规范(2003年版)》^[3]免疫功能检测的程序,分别测定下列各项免疫指标:ConA诱导的小鼠淋巴细胞增殖转化功能、小鼠的迟发型变态反应、小鼠抗体生成细胞数、小鼠血清溶血素水平、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力、碳廓清能力以及NK细胞活性。

根据人口服推荐用量,每批小鼠均设高、中、低剂量组,各组剂量分别为400、200、100 mg/kg BW(相当于人体推荐量的20、10、5倍),另设1个阴性对照组,每组10只动物。以去离子水为溶剂将样品配成20.0、10.0、5.0 mg/ml浓度溶液,按0.2 ml/10 g BW的体积给予相应剂量组动物灌胃,阴性对照组给予等体积的去离子水,灌胃1次/d,连续灌胃30 d。每周称1次体重,按照体重调整灌胃量。

1. 3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件的方差分析和均数比较模块对试验数据进行统计分析。

2 结果

2. 1 纳豆粉对小鼠体重和免疫器官脏体比的影响

由表1可知,各剂量组小鼠的体重、增重、胸腺体重比和脾脏体重比的值与阴性对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),说明纳豆粉对小鼠体重和免疫器官重无影响。

表1 小鼠体重和脏体比($\bar{x}\pm s,n=60$)

Table 1 Weight and organ coefficient of mice

剂量组/(mg/kg)	初始体重/g	15 d 体重/g	30 d 体重/g	增重/g	胸腺/体重/%	脾脏/体重/%
400	20.6±1.2	30.9±1.6	39.1±2.6	18.5±2.7	0.239±0.018	0.368±0.021
200	20.5±1.2	30.5±1.8	38.5±2.6	17.9±2.0	0.236±0.019	0.374±0.028
100	20.6±1.1	30.8±1.7	38.8±2.8	18.2±2.6	0.236±0.017	0.372±0.026
0	20.6±1.2	30.7±1.8	38.8±2.7	18.2±2.3	0.241±0.017	0.371±0.026

2. 2 纳豆粉对小鼠细胞免疫功能的影响

由表2可知,各剂量组小鼠的脾淋巴细胞增殖转化能力均高于阴性对照组,高剂量组与阴性对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),说明纳豆粉可刺激小鼠脾淋巴细胞的增殖和转化。迟发变态反应试验结果显示,高、中剂量组小鼠的左右耳片重量差值大于阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明该纳豆粉具有促进小鼠迟发型变态反应的作用。试验结果表明纳豆粉可提高小鼠的细胞免疫水平。

表2 小鼠脾淋巴细胞增殖转化和迟发变态反应试验

($\bar{x}\pm s,n=10$)

Table 2 Results of spleen lymphocytes multiplication and transformation and delayed hypersensitivity test

剂量组/(mg/kg)	脾淋巴细胞 光密度值差 (OD值)	P值	左右耳片 重量差值/mg	P值
400	0.296±0.019	0.008	17.09±1.99	0.001
200	0.272±0.038	0.171	16.28±2.18	0.006
100	0.275±0.044	0.123	13.93±2.34	0.426
0	0.249±0.038	—	13.14±2.71	—

注:P值为各剂量组与阴性对照组比较;—为无统计数据

2.3 纳豆粉对小鼠体液免疫功能的影响

由表 3 可见,高、中剂量组小鼠的溶血空斑数和抗体积数均高于阴性对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),表明该纳豆粉可增加小鼠抗体生成细胞数,提高小鼠血清溶血素水平。

2.4 纳豆粉对小鼠吞噬系统功能的影响

由表 4 可知,各剂量组小鼠的腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬指数均大于阴性对照组 ($P < 0.05$),表明该纳豆粉可增强小鼠的腹腔巨噬细胞的吞噬功能;高剂量组小鼠碳廓清试验的吞噬指数大于阴性对照组 ($P < 0.05$),表明该纳豆粉具有促

表 3 小鼠抗体生成细胞和溶血素水平检测 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Results of antibody-producing and serum hemolysin level test				
剂量组 /(mg/kg)	溶血空斑数 /个	P 值	抗体积数	P 值
400	189.0 ± 23.3	0.006	158.7 ± 20.7	0.017
200	184.4 ± 19.6	0.018	162.0 ± 15.9	0.007
100	171.3 ± 22.9	0.220	137.3 ± 19.0	0.645
0	158.2 ± 24.4	—	134.9 ± 24.5	—

注: P 值为各剂量组与阴性对照组比较;—为无统计数据
进小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清功能的作用。试验结果表明纳豆粉可增强小鼠的吞噬系统功能。

表 4 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验和碳廓清试验 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 4 Results of carbon clearance and peritoneal macrophage phagocytizing chicken red blood

剂量组/(mg/kg)	吞噬率/% (吞噬鸡红细胞试验)	吞噬指数 (吞噬鸡红细胞试验)	P 值	吞噬指数 (碳廓清试验)	P 值
400	27.2 ± 3.7	0.55 ± 0.09	0.025	9.022 ± 0.962	0.018
200	26.2 ± 5.4	0.56 ± 0.12	0.029	8.725 ± 0.924	0.108
100	24.6 ± 3.3	0.50 ± 0.13	0.044	8.782 ± 0.493	0.080
0	21.8 ± 4.7	0.42 ± 0.11	—	8.119 ± 0.649	—

注: P 值为各剂量组与阴性对照组比较;—为无统计数据

2.5 纳豆粉对小鼠 NK 细胞活性的影响

由表 5 可见,各剂量组小鼠 NK 细胞活性与阴性对照组的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),表明该纳豆粉对小鼠 NK 细胞活性无作用。

表 5 小鼠 NK 细胞活性

Table 5 Activity of natural killer cell ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量组 /(mg/kg)	NK 细胞 活性/%	NK 细胞活性 转换数据	P 值
400	27.12 ± 6.88	0.545 ± 0.077	0.512
200	27.08 ± 10.60	0.540 ± 0.121	0.553
100	28.27 ± 9.27	0.556 ± 0.105	0.416
0	25.21 ± 11.35	0.517 ± 0.134	—

注: P 值为各剂量组与阴性对照组比较;—为无统计数据

3 讨论

纳豆起源于中国,发展和盛行于日本,常吃纳豆可促进身体健康,延年益寿。纳豆的原料大豆,营养丰富,经过发酵后,可产生或激活多种活性物质,如益生菌、纳豆激酶、维生素 K2、异黄酮、皂甙等。这些活性物质,构成了纳豆一系列保健功能机理的药理学基础,例如调节血脂血糖、润肠通便、改善骨质疏松、抗氧化和增强免疫力等,本试验旨在研究干品纳豆(纳豆粉)对免疫系统的作用。

机体的免疫功能有两方面,特异性和非特异免疫,前者又分为细胞免疫和体液免疫,后者早期以吞噬系统功能为主要判断指标,近年来加入了 NK 细胞功能指标。参与细胞免疫的主要是 T 淋巴细胞,其受到抗原刺激后,会转化为致敏淋巴细胞,并表现出特异性免疫应答。在本研究的脾淋巴细胞

转化试验中,小鼠的 T 淋巴细胞受刀豆蛋白刺激,发生增殖反应,新生的 T 细胞中的线粒体水解酶通过分解 MTT 产生蓝紫色结晶,表现为培养孔光密度值增加。纳豆粉高剂量组小鼠脾淋巴细胞光密度明显高于阴性对照组 ($P < 0.01$),中、低剂量组也表现出升高趋势,提示摄入纳豆粉可以促进小鼠 T 淋巴细胞增殖。在迟发变态反应试验中, DNFB 与小鼠的腹壁蛋白结合成为完整抗原,将 T 细胞致敏后, DNFB 再攻击小鼠耳部使其肿胀,其程度可以反映免疫应答水平,即 T 细胞的活性强弱。纳豆粉高、中剂量组的耳肿胀程度明显大于阴性对照组 ($P < 0.01$)。这些结果表明纳豆粉可增强小鼠的 T 淋巴细胞免疫功能。

体液免疫是一种特异性免疫,主要由 B 淋巴细胞介导。抗体生成细胞和血清溶血素测定是经典的体液免疫试验,在本研究中,小鼠经过 SRBC 免疫,由 B 淋巴细胞产生特异性抗体,这些抗体可以在玻片上溶解 SRBC,形成空斑,也可以在培养孔中导致绵羊血凝集,故溶血空斑数和血清凝集度(以抗体积数计)均可以作为 B 细胞免疫功能强弱的反映。纳豆粉的高、中剂量组,其空斑数和抗体积数均大于阴性对照组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),提示纳豆粉对 B 淋巴细胞的免疫功能有促进作用。

机体参与非特异性免疫主要是吞噬细胞和 NK 细胞,它们不需要对抗原进行识别,即可直接发挥免疫作用。本研究通过小鼠的吞噬细胞对体内碳颗粒的清除率(碳廓清试验)以及对鸡红细胞的吞噬率,来分析纳豆粉对小鼠吞噬系统的作用,结果

显示,各剂量组小鼠对鸡红细胞的吞噬指数,均明显大于阴性对照组 ($P < 0.01$),高剂量组的碳粒清除率高于阴性对照组 ($P < 0.05$),这说明纳豆粉对小鼠的吞噬系统功能有促进作用。本研究中 NK 细胞活性未见明显改变,提示纳豆粉可能对 NK 细胞无直接作用。

综上所述,以 200 mg/kg BW 的纳豆粉给小鼠灌胃 30 d,就可以增强小鼠的免疫系统功能,并且其促进作用是多方面的,包括细胞免疫、体液免疫和吞噬系统功能都得到了加强,这和国内方少琳等^[4]的研究结果一致。对纳豆免疫调节作用的细胞分子机理,国内外也有一定的研究,纳豆中含有的大豆异黄酮和大豆皂甙,均有较强的细胞活性,可以通过抗氧化、激素调节、促进抗体合成等多途径增强机体免疫力,而纳豆中丰富的大豆蛋白,为抗体合成以及机体的氮循环提供了足够的营养物^[5-6]。这种免疫因子加免疫蛋白的组合,使得纳豆的免疫调节作用优于很多保健食品。大豆中的异黄酮主要为糖苷型,活性较低,经过纳豆杆菌的发酵作用,可以转换为活性更高的苷元型异黄酮,这也是纳豆的免疫调节作用优于大豆的重要原因之一^[7]。结合本研究结果和文献分析,推断纳豆的免疫调节作用不依赖于新鲜纳豆表层的黏性物质,纳豆干品即具有明显的增强机体免疫力作用。纳豆的其他保健功效因子,是否来自于其表层黏液,尚须进一步的研究。对于纳豆类食品的安全性,2002 年的卫生

部文件,卫法监发[2002]308 号文已经明确表述“纳豆在我国已有一定的食用历史,以枯草芽孢杆菌发酵生产的纳豆应按普通食品进行管理”,对纳豆的食用安全性给予了肯定。我国食品药品监督管理局也已批准以纳豆为功效成分,申报增强免疫力类保健食品。相信随着研究的不断深入,纳豆的功能机理会愈发明晰,纳豆将会得到更客观的评价和更成熟的消费市场。

参考文献

[1] Taniguchi-Fukatsu A,Yamanaka-Okumura H,Naniwa-Kuroki Y, et al. Natto and viscous vegetables in a Japanese-style breakfast improved insulin sensitivity, lipid metabolism and oxidative stress in overweight subjects with impaired glucose tolerance[J]. Br J Nutr,2012,107(8):1184-1191.

[2] 刘振杰,郭伟鹏,张菊梅,等. 纳豆的保健功效及开发应用[J]. 热带农业工程,2010,34(3):25-29.

[3] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[4] 方少琳,侯振清. 纳豆冻干粉对小鼠免疫功能作用的研究[J]. 海峡药学,2009,21(7):51-53.

[5] Sakai T, Kogiso M. Soy isoflavones and immunity[J]. J Med Invest,2008,55(3-4):167-173.

[6] KUO L C, CHENG W Y, WU R Y, et al. Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis natto*[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2006,73(2):314-320.

[7] 李长彪,赵秀红,刘长江,等. 大豆异黄酮糖苷及其苷元调节免疫功能的比较研究[J]. 食品科学,2007,28(5):320-323.

· 公 告 ·

关于批准塔格糖等 6 种新食品原料的公告

2014 年第 10 号

根据《中华人民共和国食品安全法》和《新食品原料安全性审查管理办法》有关规定,现批准塔格糖、奇亚籽、圆苞车前子壳为新食品原料;同意罗伊氏乳杆菌(菌株号 DSM17938)用于婴幼儿食品;变更原卫生部 2009 年第 3 号公告批准蛹虫草的食用量、质量指标要求和使用范围;增加塔罗油为原卫生部 2008 年第 20 号公告批准植物甾烷醇酯的原料,并扩大植物甾烷醇酯使用范围。生产经营上述食品应当符合有关法律、法规、标准规定。

特此公告。
附件:塔格糖等 6 种新食品原料.doc
(相关链接:<http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201406/8268613682e44b1cb2098e0b9c9143d7.shtml>)

国家卫生计生委
二〇一四年五月三十日