

研究报告

壳寡糖牛磺酸水溶液食用安全性及对小鼠免疫功能增强作用研究

乔长晟¹,王蕊¹,牛思思²,黄丹³(1. 天津科技大学生物工程学院,天津 300457;2. 天津北洋百川生物技术有限公司,天津 300453;
3. 蔻诗美(天津)生物科技有限公司,天津 300385)

摘要:目的 本研究旨在评估壳寡糖牛磺酸水溶液食用安全性及其对小鼠免疫功能的影响。方法 通过急性毒性实验、28 d 喂养毒性实验和遗传毒性实验评价壳寡糖牛磺酸水溶液的安全性。通过测定小鼠 DTH 程度、淋巴细胞增殖能力、溶血空斑数、血清溶血素、单核-巨噬细胞功能及 NK 细胞活性确定壳寡糖牛磺酸水溶液是否具有影响小鼠免疫力的功能。结果 急性毒性实验结果显示服用壳寡糖牛磺酸水溶液 3 倍浓缩液的雌、雄大鼠急性经口毒性试验 $LD_{50} > 30\,000\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$ (以水溶液量计算),根据急性毒性剂量分级标准,该样品属实际无毒级。28 d 喂养毒性实验结果显示壳寡糖牛磺酸水溶液各剂量组受试动物一般情况良好,体质量、食物利用率、脏器质量、脏器系数均无异常改变;眼部检查未发现异常变化;尿液指标、血液学指标及生化指标结果显示,各项指标均在正常范围;各脏器病理组织学检查均未见与受试样品有关的病理改变。遗传毒性实验结果显示 Ames 实验、哺乳动物红细胞微核实验和小鼠精母细胞染色体畸变实验结果均为阴性,未见致畸变作用。功能学研究结果显示壳寡糖牛磺酸水溶液以 2.5、5.0、10.0 mL/(kg·BW·d) 3 个剂量经口给予小鼠 30 d 后,对实验动物的体质量、脏器/体质量比值无明显影响;中、高剂量组与阴性对照组相比,小鼠足趾肿胀度及溶血空斑数均有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明小鼠细胞免疫与体液免疫试验结果均为阳性;单核-巨噬细胞功能及 NK 细胞活性结果均为阴性。结论 壳寡糖牛磺酸水溶液食用安全且具有增强小鼠免疫力的功能。

关键词:壳寡糖牛磺酸水溶液;安全性评价;免疫功能

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2025)08-0707-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.08.003

Study on the edible safety and immunomodulatory effects of chitosan oligosaccharide taurine
aqueous solution in mice

QIAO Changsheng¹, WANG Rui¹, NIU Sisi², HUANG Dan³(1. Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin Beiyang Baichuan
Biotechnology Co., Ltd, Tianjin 300453, China; 3. COSMAKER (Tianjin) Biological Science Co., Ltd,
Tianjin 300385, China)

Abstract: Objective This study aimed to evaluate the safety of chitosan oligosaccharide-taurine aqueous solution for consumption and its effect on the immune function of mice. **Methods** Safety was evaluated through acute toxicity tests, a 28-day feeding toxicity study, and genotoxicity experiments. The immunomodulatory effects were determined by measuring delayed-type hypersensitivity (DTH), lymphocyte proliferation capacity, hemolytic plaque count, serum hemolysin levels, monocyte-macrophage function, and NK cell activity. **Results** The acute toxicity test demonstrated that the LD_{50} of a 3× concentrated chitosan oligosaccharide-taurine aqueous solution was greater than 30 000 mg/(kg·BW) (calculated by the amount of oral solution) in both female and male rat. According to acute toxicity classification standards, the sample is considered practically non-toxic. The 28-day feeding study revealed no adverse effects on general condition, body weight, food utilization, organ weight, or organ coefficients in any dose group. No abnormal ocular changes were observed. Urinalysis, hematological, and biochemical indicators all fell within normal ranges. Histopathological examination of organs showed no abnormalities related to the test substance. Genotoxicity tests, including the Ames test, mammalian erythrocyte micronucleus assay, and mouse spermatocyte chromosomal aberration test, all yielded negative results, indicating no mutagenic or teratogenic effects. The functional study results showed that after 30 days of oral

收稿日期:2025-09-10

作者简介:乔长晟 男 教授 研究方向为微生物发酵、合成生物学、成果转化 E-mail: qiaochangsheng@tust.edu.cn

通信作者:黄丹 女 工程师 研究方向为生物医药及日化产品的研究与开发 E-mail: 1249365510@qq.com

administration at doses of 2.5, 5.0, and 10.0 mL/(kg·BW·d), the chitosan oligosaccharide-aurine aqueous solution had no significant effects on mouse body weight or organ/body weight ratios. Compared with the negative control group, there were significant differences ($P<0.05$ or $P<0.01$) in the degree of toe swelling and the number of hemolytic plaques in the medium and high dose groups of mice, indicating that both the cellular and humoral immune test results of mice were positive; The results for monocyte-macrophage function and NK cell activity were negative. **Conclusion** This study demonstrates that the chitosan oligosaccharide-aurine aqueous solution exhibits a good safety profile and can modulate immune function in mice. **Objective** This study aimed to evaluate the safety of chitosan oligosaccharide-aurine aqueous solution for consumption and its effect on the immune function of mice.

Key words: Chitosan oligosaccharide-aurine aqueous solution; safety evaluation; immune function

壳寡糖(Chitosan oligosaccharide, COS)又称几丁寡糖,壳聚寡糖,低聚壳聚糖,主要是由 N-乙酰-D 葡萄糖胺通过 B-1,4 糖苷键连接而成,分子量(Molecular weight, MW) ≤ 3.9 KD,聚合度(Degree of polymerization, DP)为 2~20^[1]。壳寡糖是虾、蟹等甲壳类动物的外壳中提取的天然高分子物质,是自然界中唯一带正电荷的阳离子碱性多糖^[2]。研究报道, COS 具有抗菌消炎^[3]、抗氧化^[4]、改善肠道菌群结构^[5]、调节免疫^[6]等生物活性,其中调节免疫的作用越来越受到重视。牛磺酸是一种游离氨基酸形式的非蛋白质 β -磺酸氨基酸,主要由蛋氨酸和半胱氨酸经过一系列的酶促反应合成^[7]。现代研究^[8]表明牛磺酸作为人体的条件必需氨基酸,具有增强免疫力、缓解疲劳、保护神经系统、改善记忆等多种生物学功能。壳寡糖牛磺酸水溶液(30 mL/瓶,每瓶含牛磺酸 0.8 g、壳寡糖 0.5 g)以牛磺酸、壳寡糖为原料,木糖醇、柠檬酸等为辅料经溶解、配制、过滤、灌装、灭菌(121 °C, 15 min)等主要工艺制成。上述 2 种原料复配之后的安全性评价以及其对小鼠免疫功能影响的研究目前尚无文献报道。本研究通过动物试验研究壳寡糖牛磺酸水溶液的食用安全性以及对免疫功能的影响,以评估壳寡糖牛磺酸水溶液配方配伍及用量的食用安全性和保健功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级、ICR 小鼠 235 只,雌鼠 25 只,雄鼠 210 只,购自上海杰思捷实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2023-0004。SPF 级健康离乳大鼠 80 只及成年 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,分别由上海必凯科翼生物科技有限公司[生产许可证号:SCXK(沪)2023-0009]和南京医科大学[生产许可证号:SCXK(苏)2021-0001]提供。小鼠伦理审查报告,由天津科技大学出具[伦理审查批号:LLSC 20240310001]。

1.1.2 主要仪器与试剂

电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司,北京);离心机(上海安亭科学仪器厂,上海);OLYMPUS 显微镜(上海斌瑞检测技术服务有限公司,上海);SIEMENSADVIA2120i 血液分析仪(西门子 Siemens, 美国);日立 7100 型全自动生化分析仪(日立分析仪器上海有限公司,上海);全自动血凝仪 STA Compact (Stago, 成都);长春迪瑞 H-300 尿液分析仪(迪瑞医疗科技股份有限公司,长春);生物安全柜(苏信环境科技有限公司,苏州);电热恒温培养箱(江苏新春蓝科学仪器有限公司,常州);LMQ.C 高压灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司,淄博);数显恒温水浴锅(菲斯福仪器有限公司,河北);密理博纯水仪(西格玛奥德里奇贸易有限公司,上海)。

鼠伤寒沙门菌突变菌株(TA97a、TA98、TA100、TA102)、S-9(Molecular Toxicology, Inc. 公司,北卡罗来纳州);2-氨基苄(阿拉丁公司,批号:J2116394,上海);1,8-二羟基总配(阿拉丁公司,批号:G2208134,上海);2,4,7-三硝基苄酮(北京中科质检生物技术有限公司,批号:1380705CY,北京);甲基磺酸甲酯(阿拉丁公司,批号:K2216288,上海);叠氮钠(北京中科质检生物技术有限公司,批号:87Q2,北京);环磷酰胺(Baxter Oncology GmbH,批号:2D542A,德国);SRBC(博尔西,北京);Hank's 液(北京索莱宝科技有限公司,北京);DNFB(西格玛奥德里奇贸易有限公司,上海);SA 缓冲液(上海源叶生物科技有限公司,上海);琼脂糖(Med ChemExpress,上海);印度墨汁(大连美仑生物技术有限公司,大连);RPMI1640(西格玛奥德里奇贸易有限公司,上海);秋水仙素(西格玛奥德里奇贸易有限公司,上海)。

1.2 方法

1.2.1 受试物

壳寡糖牛磺酸水溶液是以壳寡糖、牛磺酸为原料,木糖醇、柠檬酸等为辅料制成,每 100 mL 含 2.67 g 牛磺酸,1.67 g 壳寡糖。

1.2.2 安全性评价

1.2.2.1 急性经口毒性试验

选取已成年的健康 SPF 级 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,经动物检疫 3 d 开始实验。试验前动物禁食 16 h,可自由饮水,同时取样品 160 g,将样品溶液浓缩至 3 倍,比重为 1.5 g/L。对大鼠予以单次灌胃给药[剂量:30 000 mg/(kg·BW);体积:20 mL/(kg·BW)]。随后连续观察 14 d,密切监测并记录大鼠的中毒症状及死亡率。在第 0 天、第 7 天、第 14 天称体质量 1 次。观察期结束动物大体进行解剖检查,若大体解剖病理改变,则需进行病理组织学检查。

1.2.2.2 28 d 喂养毒性实验

人体推荐剂量为 3 倍浓缩液 10 mL/人/d,以 60 kg 体质量计算,按人体推荐剂量的 25、50 和 100 倍,设 4.2、8.3、16.7 mL/(kg·BW·d)共 3 个剂量组,另设溶剂对照组 0 mL/(kg·BW·d)。采用灌胃方式给予。采用纯化水作为溶剂,高剂量组为 83.5%(v/v)3 倍浓缩液,中剂量组为 41.5%(v/v)3 倍浓缩液,低剂量组为 21%(v/v)3 倍浓缩液。各剂量组灌胃容量均为 20 mL/kg,每日 1 次,连续 28 d,动物自由进食饮水。各组动物灌胃给予各剂量组样品连续喂养 28 d 后,实验前使动物禁食过夜,并逐只称质量记录。采用 10% 水合氯醛腹腔注射实施麻醉,动物进入麻醉状态后,通过腹主动脉处穿刺采集血液,测定所获血液样品的血液学指标和血液生化指标。

1.2.2.3 Ames 试验(平板渗入法)

基于毒性测定结果,设立 5 个剂量组(5 000.00, 1 000.00, 200.00, 40.00, 8.00 μ g/皿),同时为确保实验系统的可靠性,设立溶剂对照(二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、自发回变对照(阴性对照)及阳性对照。阳性对照中选用 2,4,7-三硝基苊铜、甲基磺酸甲酯、叠氮钠、2-氨基苊、1-8 二羟基蒽醌和环磷酰胺,设置试剂的剂量分别为 0.2、1、1.5、10、50.00、200 μ g/皿。在加和不加鼠肝 S9 活化系统条件下,用已被生物学鉴定合格的 Ames 试验标准菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535,分别对受试物采用平板渗入法进行 Ames 试验。将各菌株每个剂量组设置 3 个平行皿,于 37℃ 培养 48 h 后,计算各皿的平均回变菌落数。在加或不加 S9 活化系统条件下,若受试物的回变菌落数是自发回变菌落数的 2 倍以上,同时有剂量-反应关系者则定为阳性。依据规范,阴性与阳性结果分别需经至少 2 次和 3 次独立实验重复验证。

1.2.2.4 哺乳动物红细胞微核试验

购买 50 只体质量为 25~35 g ICR 种小鼠,适应

3 d 环境后进行试验。将小鼠依照体重随机分成 5 组,每组 10 只且雌雄各半^[16]。使用壳寡糖牛磺酸水溶液 3 倍浓缩液进行本试验,高、中、低剂量组分别设为 20、10、5 mL/(kg·BW),同时设溶剂对照组(纯化水),配制浓度分别为:100%(v/v)、50%(v/v)、25%(v/v),灌胃量为 20 mL/(kg·BW);阳性对照组采用环磷酰胺,以 40 mg/kg·BW 进行腹腔注射。采用 30 h 给受试物法,隔 24 h 给一次受试样品,共给样 2 次,第 2 次给受试样品后 6 h 处死动物,取胸骨常规制片、镜检。每鼠以 2 000 个骨髓多染红细胞(PCE)计数,观察含微核的多染红细胞数,并以千分率计算微核发生率。观察多染红细胞时,每鼠计数 200 个成熟红细胞数(NCE),并计算嗜多染红细胞与总红细胞的比值(PCE/(PCE+NCE))^[17-19]。

1.2.2.5 小鼠精母细胞染色体畸变试验

使用壳寡糖牛磺酸水溶液 3 倍浓缩液进行本试验,高、中、低剂量组分别设为 20、10、5 mL/(kg·BW),同时设溶剂对照组(纯化水),配制浓度分别为:100%(v/v)、50%(v/v)、25%(v/v),按照朱雪峰^[20]等人的方法,以 20 mL/kg·BW 灌胃;阳性对照组采用环磷酰胺,以 40 mg/(kg·BW)腹腔注射,选用所购买的 25 只体质量 7~12w ICR 种雄性小鼠,动物适应环境 3 d 后进行试验。将小鼠根据体重随机分成 5 个组^[16],每组 5 只雄性小鼠,灌胃给予受试样品,每天 1 次,连续 5 d。动物处死前 4 h 腹腔注射秋水仙素 4 mg/(kg·BW)。第一次给予受试样品后的第 14 天采样,取睾丸常规制片、镜检。每个动物计数 100 个中期分裂相细胞观察染色体裂隙、断片、微小体、易位、X-Y 和常染色体的单价体。

1.2.3 免疫功能评价实验

1.2.3.1 实验分组与处理

以小鼠为试验动物,设 3 个剂量组和一个阴性对照组,受试物分别以(低)2.5 mL/kg、(中)5.0 mL/kg、(高)10.0 mL/kg 三个剂量组并分别以人体推荐摄入量的 5 倍、10 倍、20 倍灌胃小鼠,阴性对照组(0 mL/kg)为纯化水^[21]。经口给予小鼠相应剂量,每日一次,连续灌胃 30 d 后测定各项指标。

每组 40 只动物,分为免疫一组、二组、三组、四组,一组小鼠用于腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验;二组小鼠用于 NK 细胞活性测定实验以及淋巴细胞转化实验;三组小鼠用于抗体生成细胞实验、血清溶血素测定实验和迟发型变态反应实验;四组小鼠用于小鼠碳廓清实验^[22]。

1.2.3.2 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化试验(MTT 法)

末次给药 1 h 后处死小鼠,于无菌条件下迅速

摘取脾脏。将脾脏置于盛有无菌 Hanks 液的平皿中,用镊子轻轻研磨使其通过 200 目筛网,制备成单细胞悬液。该悬液经 200 目过滤后,用 Hanks 液洗涤 2 次(离心条件:1 000 r/min, 10 min)。弃上清,将沉淀细胞重悬于 1 mL 完全培养液中,并将细胞浓度调整至 3×10^6 个/mL。最后采用台盼蓝拒染法检测细胞活力,确认活细胞比例高于 95%,然后以每孔 1 mL 的添加量将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中,一孔加 75 μ L ConA 液,另一孔为对照组,放置在 5% 二氧化碳孵箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h。在培养结束前 4 h,每孔轻轻吸去 0.7 mL 上清液后加入不含胎牛血清的 RPMT1640 培养液 0.7 mL,同时加入 50 μ L/孔 MTT(55 mg/mL)继续培养 4 h,培养结束后,每孔加入酸性异丙醇 1 mL,紫色结晶完全溶解后分装到 96 孔培养板,每孔做 3 个平行孔,用酶标仪于 570 nm 波长处测定光密度值^[23]。

1.2.3.3 迟发型变态反应(Delayed Type Hypersensitivity, DTH)

给小鼠腹腔注射 2% 的压积 SRBC(0.2 mL/每鼠)致敏,4 d 后测量左后足跖厚度,然后在测量部位用 20% (v/v) SRBC (20 μ L/每鼠)皮下注射,在注射后的 24 h 测量左后足跖厚度,同一部位测量三次并取平均值,DTH 的程度由攻击前后足跖厚度差值(足距肿胀度)来表示^[23]。

1.2.3.4 抗体生成细胞检测(改良法)

按照王磊等^[21]的检测方法,小鼠给予受试物 30 d 后,用 0.20 mL 的 2.00% 体积分数的压积绵羊红细胞(SRBC)悬液腹腔注射,免疫 4 d 后颈椎脱臼处死小鼠,取脾脏经研磨制备成单细胞悬液,将细胞密度调整为 5×10^6 个/mL。混匀 10.00% 体积分数的 SRBC 50.00 μ L、脾细胞悬液 20.00 μ L 与 0.50% 质量分数的琼脂糖溶液 500.00 μ L,于琼脂糖玻片上凝固后放入恒温培养箱中孵育 1.5 h,然后加入 SA 缓冲液稀释 10 倍的补体 500.00 μ L 孵育 1.5 h,计数溶血空斑数。结果用空斑数/ 10^6 脾细胞表示。

1.2.3.5 血清溶血素测定(血凝法)

所有小鼠均经腹腔注射 2% SRBC 悬液 0.2 mL 进行免疫。连续灌胃 5 d 后,通过眼球摘除术采集血液。血液样本于离心管中室温静置 1 h,剥离后以 2 000 r/min 离心 10 min,收集血清。随后,用生理盐水对血清进行倍比稀释,每个稀释度设 12 个复孔。分别取不同稀释度的血清 100 μ L 加入血凝板孔中,再加入等体积的 0.5% 绵羊红细胞悬液。混匀后,将血凝板置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 3 h,观察并记录各孔的凝集程度。最终通过抗体效价计算以评估抗体水平。

1.2.3.6 小鼠碳廓清试验

小鼠经尾静脉按 0.1 mL/10 g 体重的剂量注射经 5 倍生理盐水稀释的印度墨汁,并立即开始计时。于注射后 2 min 与 10 min,分别自每只小鼠的内眦静脉丛采集 20 μ L 血液样本,并迅速加入 2 mL 碳酸钠溶液中混匀。以碳酸钠溶液作为空白对照,并于 600 nm 波长处测定各样品的吸光度值。全部采血完成后处死动物,分离其肝脏与脾脏并精确称重,以计算吞噬指数。

1.2.3.7 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验(半体内法)

所有小鼠均经腹腔注射 1 mL 20% 鸡红细胞(CRBC)悬液,该悬液已用生理盐水(NS)洗涤 3 次。注射后 30 min,采用颈椎脱臼法处死小鼠并固定于鼠板上。沿腹部中线切开皮肤,向腹腔内注入 2 mL 生理盐水,转动鼠板 1 min 以确保充分冲洗,随后收集 1 mL 腹腔灌洗液。将收集的灌洗液分别滴加至两张载玻片上,置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 30 min,取出载玻片用生理盐水冲洗、晾干并固定。之后用 4% 吉姆萨 PBS 染液对载玻片染色 3 min,蒸馏水冲洗、晾干后进行显微镜检查,根据观察结果计算吞噬百分率和吞噬指数。

1.2.3.8 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶 LDH 测定法)

采用颈椎脱臼法处死小鼠后,无菌剥离脾脏,研磨后过 200 目筛。所得悬液用汉克氏液洗涤 3 次(离心条件:1 000 r/min, 10 min),收集细胞沉淀。用无菌水裂解红细胞,经台盼蓝染色计数(存活率需高于 95%)后,用完全 RPMI 1640 培养基将细胞悬液调整至 2×10^7 个/mL。每只小鼠的细胞悬液共取 300 μ L,以每孔 100 μ L 的量分装至 96 孔培养板中,随后向每孔加入 100 μ L 靶细胞(YAC-1 细胞, 4×10^5 个/mL)悬液。同时设置靶细胞自发释放孔(100 μ L 靶细胞+100 μ L 培养基)和最大释放孔(100 μ L 靶细胞+100 μ L 2.5% 曲拉通)作为对照,每组设 3 个复孔。将培养板于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下共培养 4 h,随后以 1 500 r/min 离心 5 min。分别吸取各孔上清 100 μ L 转移至新 96 孔板中,每孔加入 100 μ L LDH 基质液,反应 10 min 后加 30 μ L 1 mol/L HCl 终止反应。最后在 490 nm 波长下测定吸光度值并计算 NK 细胞活性^[22]。

1.2.4 数据处理

采用 SPSS 10.0 for Windows 软件包进行数据处理和统计分析。首先对对照组和各剂量组的数据进行方差齐性检验,方差齐性的数据采用单因素方差分析(ANOVA),当 $P < 0.05$ 时,用 Dunnett 法进

行两两比较。若方差不齐,则先进行数据转换;若转换后仍未达到方差齐性,改用 Kruskal-Wallis 秩和检验,当 $P<0.05$ 时,用 Dunnett's T3 法进行两两比较^[22]。

2 结果

2.1 急性经口毒性试验

在实验期间,壳寡糖牛磺酸水溶液 3 倍浓缩液未观察到对大鼠体重质量有显著影响,所有组别动物其饮食、饮水、行为活动均为正常,生长良好,未见任何中毒体征,且无动物死亡。经试验结果表明,该受试物对雌、雄大鼠的半数致死量 $LD_{50}>30\,000\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{BW})$,可判定该样品属实际无毒级。

2.2 28 d 经口毒性试验

壳寡糖牛磺酸水溶液 3 倍浓缩液以 $16.7、8.3、4.2\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{BW}\cdot\text{d})$ 的剂量给予大鼠 28 d,体质量、食物利用率、脏器质量、脏器系数均无异常改变,受试动物情况均良好;受试动物眼科检查未见异常;尿液、血液学及血生化指标均处于正常值范围;主要脏器组织病理学检查亦未见特异性病理改变。

2.3 Ames 实验

如表 1 所示,壳寡糖牛磺酸水溶液各剂量组的回变菌落数均未超过阴性对照的 2 倍,且无剂量-反应关系。该受试物对 5 株鼠伤寒沙门菌(TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535),在加与不加 S-9 溶液条件下,均未引起致基因突变作用。

表 1 细菌回复突变试验回变菌落数计数结果

		Table 1 Bacterial reverse mutation test results										
组别		剂量 μg/皿	回变菌落数									
			+S9					-S9				
			TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535
阴性	未处理对照	0	142±13	39±3	142±32	201±20	15±1	136±6	34±4	120±15	190±32	13±2
	溶剂(H ₂ O)	0.1 mL	155±10	38±6	148±21	194±35	13±2	144±11	37±5	151±15	186±43	12±3
	溶剂(DMSO)	0.1 mL	134±10	38±2	151±17	195±13	14±3	149±22	38±4	130±24	201±19	12±3
		50	158±3	34±3	149±19	191±19	13±2	135±8	34±7	138±16	184±22	12±3
		158.1	161±3	40±2	162±15	209±39	13±3	149±22	34±5	148±34	208±49	13±4
受试样品		500	129±18	38±3	133±7	204±33	10±1	150±16	40±1	147±33	215±44	13±2
		1 581	132±22	37±4	144±16	190±29	14±3	132±10	36±5	163±23	209±27	12±2
		5 000	141±3	28±1	137±15	200±31	11±2	162±8	33±6	156±34	209±43	11±2
	2-氨基芴	10	1 562±16 ^a	3 416±104 ^a	3 064±335 ^a							
	环磷酸胺	200					385±84 ^a					
阳性	1,8-二羟基蒽醌	50				895±50 ^a						
	2,4,7-三硝基芴酮	0.2					3 159±196 ^a	3 439±565 ^a				
	甲基磺酸甲酯	1.0 μL							2612±330 ^a	3 691±201 ^a		
	叠氮钠	1.5									1 435±70 ^a	

注:^a表示超过未处理对照组菌落数 2 倍

2.4 哺乳动物红细胞微核试验

由表 2 可见,与阴性对照组相比,受试样品的各剂量组微核率无显著性差异($P>0.05$),而阳性对照组则有显著性差异($P<0.05$)。同时,各剂量组受试物的 PCE/(PCENCE)比值均在阴性对照组的 20% 以内,表明受试物对骨髓细胞增殖无抑制作用。壳寡糖牛磺

酸水溶液 3 倍浓缩液未见影响小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成,也未对嗜多染红细胞与总红细胞比值 PCE/(PCE+NCE)产生影响,因此壳寡糖牛磺酸水溶液 3 倍浓缩液的哺乳动物红细胞微核试验结果为阴性。

2.5 小鼠精母细胞染色体畸变试验

各组精母细胞染色体畸变发生率见表 3,受试

表 2 受试样品对小鼠骨髓细胞微核发生率和嗜多染红细胞与总红细胞比值的影响

Table 2 The effects of the test samples on the incidence of micronucleus in mouse bone marrow cells and the ratio of polychromatic red blood cells to total red blood cells							
性别	剂量(mL/kg·BW)	动物数	PCE 数	含微核的 PCE 数	微核率(% $\bar{X}\pm S$)	PCE 数/总红细胞数	PCE/总红细胞($\bar{X}\pm S$)
雌	0(纯化水)	5	10 000	9	0.9±0.5	1 000/1 922	0.52±0.02
	5	5	10 000	4	0.4±0.4	1 000/1 874	0.53±0.02
	10	5	10 000	6	0.6±0.7	1 000/1 943	0.51±0.01
	20	5	10 000	7	0.7±0.4	1 000/1 969	0.51±0.01
	环磷酸胺	5	10 000	199	19.9±1.6*	1 000/74	0.48±0.01
	0(纯化水)	5	10 000	8	0.8±0.6	1 000/1 932	0.52±0.01
雄	5	5	10 000	5	0.5±0.4	1 000/1 923	0.52±0.01
	10	5	10 000	8	0.8±0.4	1 000/1 896	0.53±0.01
	20	5	10 000	7	0.7±0.6	1 000/1 933	0.52±0.02
	环磷酸胺	5	10 000	205	20.5±3.8*	1 000/2 037	0.49±0.02

注: *表示与阴性对照组比较, $P<0.05$

样品各个剂量组染色体畸变率、性染色体单价体率及常染色体单价体率与阴性对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$), 而阳性对照组则明显高于阴性对照组 ($P<0.05$), 因此壳寡糖牛磺酸水溶液 3 倍浓缩液的小鼠精母细胞染色体畸变试验结果为阴性。

表 3 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠精母细胞染色体畸变的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 3 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral liquid on chromosomal aberrations in mouse spermatocytes ($\bar{X}\pm S$)

剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	镜检精母细胞数/个	总畸形数/个	畸变率/%
0	5	500	3	0.6±0.9
5	5	500	4	0.8±0.8
10	5	500	3	0.6±0.9
20	5	500	2	0.4±0.5
40mg/kg·BW(环磷酰胺)	5	500	118	23.6±5.6*

注: *表示与阴性对照组比较, $P<0.05$

2.6 对体质量的影响

小鼠经口给予不同剂量壳寡糖牛磺酸水溶液 30 d 后, 各剂量组小鼠平均终末体重、体质量增重、胸腺与脾脏的脏/体质量比与阴性对照组相比, 均无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.7 壳寡糖牛磺酸对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化试验的影响

由表 4 见, 连续灌胃小鼠 30 d 后, 3 个剂量组动物的淋巴细胞增殖能力与阴性对照组相比, 均无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 4 壳寡糖牛磺酸水溶液对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化试验的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 4 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral liquid on CONA-induced lymphocyte transformation test in mice ($\bar{X}\pm S$)

剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	细胞增殖能力(OD 差值)
0	10	0.209±0.045
2.5	10	0.229±0.034
5	10	0.235±0.034
10	10	0.202±0.032

2.8 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响

由表 5 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的足趾肿胀与阴性对照组相比, 中、高剂量组动物有显著性差异 ($P<0.05, P<0.01$)。

表 5 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 5 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral liquid on delayed-type hypersensitivity (DTH) in mice ($\bar{X}\pm S$)

剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	细胞增殖能力(OD 差值)
0	10	1.12±0.26
2.5	10	1.35±0.31
5	10	1.55±0.36*
10	10	1.63±0.45**

注: *与阴性对照组比较, $P<0.05$; **与阴性对照组比较, $P<0.01$

2.9 壳寡糖牛磺酸水溶液对抗体生成细胞的影响

由表 6 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的溶血空斑数与阴性对照组相比, 中、高剂量组动物有显著性差异 ($P<0.05, P<0.05$)。

表 6 壳寡糖牛磺酸水溶液对抗体生成细胞的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 6 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral liquid on antibody-producing cells ($\bar{X}\pm S$)

剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	溶血空斑数/10 ⁶ 脾细胞
0	10	314.0±36.65
2.5	10	333.5±38.16
5	10	349.5±27.02*
10	10	355.5±22.17*

注: *与阴性对照组比较, $P<0.05$

2.10 壳寡糖牛磺酸水溶液对血清溶血素的影响

由表 7 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的抗体积数与阴性对照组相比, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 7 壳寡糖牛磺酸水溶液对血清溶血素的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 7 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral liquid on serum hemolysin ($\bar{X}\pm S$)

剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	抗体积数
0	10	124.30±19.17
2.5	10	122.90±11.52
5	10	130.10±20.25
10	10	132.10±18.16

2.11 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

2.11.1 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清功能的影响

由表 8 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的碳廓清能力与阴性对照组相比, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.11.2 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响

由表 9 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的吞噬率和吞噬指数与阴性对照组相比, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.12 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清功能的影响

由表 10 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的单核-巨噬细胞碳廓清能力与阴性对照组相比, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

表8 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清功能的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 8 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral solution on the carbon clearance function of mononuclear macrophages in mice ($\bar{X}\pm S$)		
剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	吞噬指数(a)
0	10	4.91±0.69
2.5	10	5.59±0.85
5	10	5.63±1.02
10	10	5.19±0.66

表9 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 9 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral solution on the phagocytic ability of mouse macrophages to engulf chicken red blood cells ($\bar{X}\pm S$)			
剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	吞噬率	吞噬指数(a)
0	10	22.95±2.13	0.85±0.02
2.5	10	23.60±1.93	0.85±0.03
5	10	25.30±3.49	0.86±0.03
10	10	25.70±2.57	0.87±0.02

表10 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清功能的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 10 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral solution on the carbon clearance function of mononuclear macrophages in mice ($\bar{X}\pm S$)		
剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	吞噬指数(a)
0	10	4.91±0.69
2.5	10	5.59±0.85
5	10	5.63±1.02
10	10	5.19±0.66

2.13 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠NK细胞活性的影响

由表11可见,连续灌胃30 d后,3个剂量组动物的NK细胞活性与阴性对照组相比,无显著性差异($P>0.05$)。

表11 壳寡糖牛磺酸水溶液对小鼠NK细胞活性的影响($\bar{X}\pm S$)

Table 11 The effect of chitosan oligosaccharide taurine oral liquid on NK cell activity in mice ($\bar{X}\pm S$)		
剂量 mL/(kg·BW·d)	动物数/只	NK细胞活性/%
0	10	27.22±4.99
2.5	10	28.46±5.76
5	10	27.86±5.38
10	10	27.16±3.16

3 结论与讨论

食品安全性评价结果显示,服用壳寡糖牛磺酸水溶液3倍浓缩液的雌、雄大鼠急性经口毒性试验LD₅₀>30 000 mg/(kg·BW)。根据急性毒性剂量分级标准,该样品属实际无毒级;28 d喂养毒性实验结果显示壳寡糖牛磺酸水溶液各剂量组受试动物一般情况良好,体重、食物利用率、脏器重量、脏器系

数均无异常改变;眼部检查未发现异常变化;尿液指标、血液学指标及生化指标结果显示,各项指标均在正常范围;各脏器病理组织学检查均未见与受试样品有关的病理改变。遗传毒性实验结果显示Ames实验、哺乳动物红细胞微核实验和小鼠精母细胞染色体畸变实验结果均为阴性,未见致畸变作用。

功能学研究结果显示,壳寡糖牛磺酸水溶液以2.5、5.0、10.0 mL/(kg·BW·d)3个剂量经口给予小鼠30 d后,对实验动物的体重、脏器/体重比值无明显影响;与阴性对照组比较,中、高剂量组小鼠的足趾肿胀度有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$),小鼠细胞免疫试验结果阳性;与阴性对照组比较,中、高剂量组小鼠的溶血空斑数有显著性差异($P<0.05$, $P<0.05$),小鼠体液免疫试验结果阳性;单核-巨噬细胞功能及NK细胞活性结果均为阴性。结果表明,在本实验条件下壳寡糖牛磺酸水溶液具有增强小鼠免疫力功能作用。

壳寡糖和牛磺酸均已被报道具有免疫调节活性。杨玉菊等^[9]总结壳寡糖可增强小鼠的免疫应答,具体表现为抗体生成细胞增多、血清溶血素活性增强、淋巴细胞增殖加速及脾脏体重比优化。相关研究表明^[10],在妊娠母猪的日粮中添加100 mg/kg壳寡糖,可显著提高血清中IgG、IgM和IgA的浓度。此外,壳寡糖还具有一定的免疫刺激作用,YU等^[11]研究发现证明壳寡糖可能通过激活NF-κB导致的NO、TNF-α的变化。除此之外,壳寡糖还能促进胸腺淋巴细胞的发育与分化,并调节脾脏B淋巴细胞与淋巴结T淋巴细胞数量^[12]。牛磺酸在免疫细胞中的含量占游离氨基酸的50%以上^[13]。牛磺酸可促进T淋巴细胞和B淋巴细胞的增殖,增加细胞质内的Ca²⁺浓度,增强免疫能力^[14]。KIM等^[15]研究表明,牛磺酸可诱导小鼠巨噬细胞产生IL-1,促进小鼠胸腺细胞的增殖,增强巨噬细胞在抗体产生中的作用,缓解炎症反应。综上所述,壳寡糖和牛磺酸都具有免疫调节能力。本研究证实将壳寡糖与牛磺酸复配后具有增强免疫的效应。食品安全是功能性食品开发的基石。本研究的毒理学评价遵循国家标准,结果表明该产品属于“实际无毒”级,长期服用未观察到任何毒副作用。这为其从实验室研究走向实际应用奠定了坚实的基础,为食用安全性提供科学依据。

综上,壳寡糖牛磺酸水溶液是一种安全、有效,具有增强免疫功能的食品,本研究为其作为一种具有潜力的增强免疫功能性食品的开发及应用提供了一定的依据。

参考文献

- [1] CRISTIANE F D A, NATHALIA K A, MARIA G B P, et al. Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae* [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, 33 (7): 893-899.
- [2] BELLICH B, D'AGOSTINO I, SEMERARO S, et al. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14 (5): 99.
- [3] LI Y, XU Q, WEI P, et al. Chitosan oligosaccharides downregulate the expression of E-selectin and ICAM-1 induced by LPS in endothelial cells by inhibiting MAP kinase signaling[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, 33(2): 392-400.
- [4] LI Q, SHI W R, HUANG Y L. Comparison of the protective effects of chitosan oligosaccharides and chitin oligosaccharide on apoptosis, inflammation and oxidative stress [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2024, 28(2): 310.
- [5] BALLAN R, BATTISTINI C, XAVIER-SANTOS D, et al. Interactions of probiotics and prebiotics with the gut microbiota [J]. *Progress in Molecular Biology and Translational science*, 2020, 171: 265-300.
- [6] LIU L, ZHOU Y, ZHAO X, et al. Oligochitosan stimulated phagocytic activity of macrophages from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) associated with respiratory burst coupled with nitric oxide production [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 47(1): 17-24.
- [7] 李淑怡, 冀晓雨, 邵天娇, 等. 牛磺酸在水产养殖中的应用研究进展[J]. *饲料研究*, 2024, 47(18): 173-177.
- LI S Y, JI X Y, SHAO T J, et al. Research progress on application of taurine in aquaculture[J]. *Feed Research*, 2024, 47(18): 173-177.
- [8] ZHAO H, GAO X, LIU Z, et al. Sodium alginate prevents non-alcoholic fatty liver disease by modulating the gut-liver axis in high-fat diet-fed rats[J]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4846.
- [9] 杨玉菊, 沙珊珊, 潘男. 壳寡糖的生物学功能及其作用机制的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2025(1): 20-24.
- YANG Y J, SHA S S, PAN N. Research progress on the biological function of chitooligosaccharides and its mechanism of action[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2025(1): 20-24.
- [10] WAN J, YANG K, XU Q, et al. Dietary chitosan oligosaccharide supplementation improves foetal survival and reproductive performance in multiparous sows[J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(74): 70715-70722.
- [11] YU Z J, ZHAO L H, KE H P. Potential role of nuclear factor-kappaB in the induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by oligochitosan in macrophages [J]. *International Immunopharmacology*, 2004, 4(2): 193-200.
- [12] OBMIŃSKA-MRUKOWICZ B, SZCZYPKA M, GAWEDA B. Modulatory effects of chitosan adipate on the T and B lymphocyte subsets in mice[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2006, 7(2): 157-160.
- [13] 王玉婷. 长白猪组织中牛磺酸合成关键酶及转运体的表达研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- WANG Y T. Expression of key enzymes of taurine biosynthesis and their transporter in tissues of Landrace [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.
- [14] NISHIO S, NEGORO S, HOSOKAWA T, et al. The effect of taurine on age-related immune decline in mice: the effect of taurine on T cell and B cell proliferative response under costimulation with ionomycin and phorbol myristate acetate[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1990, 52(2-3): 125-139.
- [15] KIM C, CHA Y N. Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(1): 89-100.
- [16] 于添, 杨雪珍, 刘燊, 等. 重组人乳铁蛋白致突变性研究[J]. *毒理学杂志*, 2017, 31(6): 483-486.
- YU T, YANG X Z, LIU S, et al. Study on the mutagenicity of recombinant human lactoferrin[J]. *Journal of Toxicology*, 2017, 31(6): 483-486.
- [17] 环飞, 许娟华, 吴静, 等. 栲精的毒性和致突变作用[J]. *毒理学杂志*, 2006(3): 195-197.
- HUAN F, XU J H, WU J, et al. Toxicity and mutagenicity of quercetin[J]. *Journal of Toxicology*, 2006(3): 195-197.
- [18] 云琦, 马小华, 冯崑, 等. 番茄红素和大豆异黄酮组合物的毒理学评价[J]. *癌变. 畸变. 突变*, 2009, 21(4): 313-315, 319.
- YUN Q, MA X H, FENG W, et al. Toxicology assessment of lycopene and soybean Isoflavone Compound[J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2009, 21(4): 313-315, 319.
- [19] 马征. 冬凌草免疫调节作用研究及安全性评价[D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- MA Z. Study on immune regulation of *rabdosia rubescens* and its safety assessment[D]. Changsha: Central South University, 2010.
- [20] 朱雪峰, 严婷, 李世芬, 等. 石斛西洋参景天姜胶囊安全性及缓解体力疲劳功能研究[J]. *农产品加工*, 2019(24): 24-27.
- ZHU X F, YAN T, LI S F, et al. Study on safety and relieving physical fatigue of dendrobium americaniseng rhodiola rosea and ginger capsule[J]. *Agricultural Products Processing*, 2019 (24): 24-27.
- [21] 王磊, 梁峰, 赵宏伟, 等. 含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能及安全性评价[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(21): 338-349.
- WANG L, LIANG F, ZHAO H W, et al. Unomodulatory function and safety evaluation of compound preparation containing ganoderma lucidum polysaccharides [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(21): 338-349.
- [22] 田玉琼, 蒋中仁, 田嘉军, 等. 针叶樱桃提取物片剂对小鼠增强免疫力的研究[J]. *预防医学情报杂志*, 2015, 31(7): 535-540.
- TIAN Y Q, JIANG Z R, TIAN J J, et al. Effects of tablets of acerola cherry extract on immunity of mice [J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2015, 31(7): 535-540.
- [23] 邹思颖, 郑华, 黄聘和, 等. 铁皮石斛西洋参灵芝膏的免疫功能研究[J]. *医学动物防制*, 2018, 34(6): 527-530.
- ZHOU S Y, ZHENG H, HUANG P H, et al. The study on the immunity function of dendrobium and ginseng and ganoderma ointment [J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2018, 34(6): 527-530.