

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

张 潮¹, 王利平², 邓泽元³, 范青生^{1*}

(1. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047; 2. 江西省美德食品医药技术发展有限公司, 南昌 330029;
3. 南昌大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

摘 要: **目的** 研究添加维生素 E 的雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* added with vitamin E, HPE)对大鼠亚急性毒性和增强小鼠免疫功能作用。**方法** 以 1670、835、418、0 mg/(kg·bw) 4 个剂量的 HPE 给大鼠连续灌胃 30 d 进行亚急性毒性试验; 以 334、167、84、0 mg/(kg·bw) 4 个剂量给小鼠连续灌胃 30 d 进行免疫功能试验。**结果** 在亚急性毒性试验期间, 各组动物的体重、增重量和总食物利用率无显著性差异, 所检测的血常规与血生化指标及脏器重量均无显著性差异; 大鼠大体解剖观察和组织病理学检查结果中, 未发现与 HPE 相关的病变。未见 HPE 对大鼠指标产生毒副作用。与对照组相比, 中、高剂量组显著促进小鼠的脾淋巴细胞增殖转化能力, 提高小鼠的血清溶血素水平; 高剂量组显著提升了迟发型变态反应能力和小鼠碳廓清吞噬指数, 明显增强抗体生成细胞能力。**结论** HPE 安全性高, 具有增强免疫功能。

关键词: 雨生红球藻; 维生素 E; 亚急性毒性试验; 细胞免疫; 体液免疫

Study on subacute toxicity evaluation and immune enhancement of *Haematococcus pluvialis* added with vitamin E

ZHANG Chao¹, WANG Li-Ping², DENG Ze-Yuan³, FAN Qing-Sheng^{1*}

(1. Jiangxi-OAI Joint Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Jiangxi Meide Food and Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Nanchang 330029, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of *Haematococcus pluvialis* added with vitamin E (HPE) on subacute toxicity evaluation in rats and immune function in mice. **Methods** In the subacute toxicity test, the rats were administered at dosages of 1670, 835, 418, 0 mg/(kg·bw) by gavage once a day for 30 consecutive days. In immune function tests, the mice were administered at dosages of 334, 167, 84, 0 mg/(kg·bw) by gavage once a day for 30 consecutive days. **Results** In the subacute toxicity test of rats, compared with the control group, three groups HPE did not show toxicity. The animals grew well, and there was no significant difference between the control group and each dose group in terms of animal weight, weight gain, food intake, food utilization rate, blood routine indicators, blood biochemical indicators, organ weight; no abnormal changes related to HPE were found in gross

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872890)、食品科学与技术国家重点实验室目标导向课题项目(SKLF-ZZA-202210)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872890), and the Target-oriented Project of the State Key Laboratory of Food Science and Technology (SKLF-ZZA-202210)

***通信作者:** 范青生, 硕士, 研究员, 主要研究方向为功能食品开发。E-mail: cnfoods@163.com

***Corresponding author:** FAN Qing-Sheng, Master, Professor, Jiangxi-OAI Joint Institute, Nanchang University, No.235, Nanjingdong Road, Qingshanhu District, Nanchang 330047, China. E-mail: cnfoods@163.com

anatomical observation and histopathological examination. In immune function tests, compared with the control group, the medium and high dose groups significantly promoted the proliferation and transformation of splenic lymphocytes, and increased the level of serum hemolysin in mice; the high dose group significantly enhanced the delayed type hypersensitivity and the carbon clearance phagocytic index of mice, and significantly enhanced the antibody producing cell capacity. **Conclusion** It is confirmed that HPE treatments significantly improve cellular and humoral immune functions without subacute toxicity.

KEY WORDS: *Haematococcus pluvialis*; vitamin E; subacute toxicity test; cellular immunity; humoral immunity

0 引言

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)为绿藻门、团藻目、红球藻科、红球藻属单细胞淡水绿藻,是虾青素含量最高的水产品,其含量可达 2%~5%,雨生红球藻虾青素的分子结构中含有多个共轭双键,使其具有很强的抗氧化能力^[1],其抗氧化作用及其机制研究是近 10 年研究焦点领域之一^[2-4]。雨生红球藻还具有延缓衰老、抗炎^[5]、预防心血管疾病^[6]等作用,可通过抑制脂质过氧化和 DNA 损伤保护神经系统^[7-8];通过影响肿瘤细胞生成、生长、凋亡等过程起到抗肿瘤作用^[9-10]。此外,雨生红球藻还具有增强机体免疫功能、抗幽门螺杆菌、预防白内障等作用^[11]。

雨生红球藻已被广泛用于食品、化妆品和饲料行业^[12-13],食用雨生红球藻粉是选育优良雨生红球藻藻种人工养殖,采收孢子,再经破壁、干燥等工艺制成。破壁处理可以破坏藻细胞较厚的细胞壁,便于虾青素提取和利用^[14];干燥能降低水分含量便于藻粉的贮藏和运输^[15]。由于雨生红球藻中的虾青素在生产、加工和储存过程稳定性差,极易被氧化,通过加入适量的抗氧化剂,可制成油液、乳液、脂质体、微囊化和纳米颗粒等来提高虾青素在食品中的稳定性和生物利用度^[16-19]。但是,由于这些过程中配料带入和工艺改变,有可能带来新的食品安全问题^[20-22]。

前期研究表明,在 37℃/75%湿度条件下放置 3 个月,未添加维生素 E 的雨生红球藻的虾青素下降 10.2%,添加维生素 E 的雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* added with vitamin E, HPE)仅下降 2.4%,说明雨生红球藻添加维生素 E 可以增加产品中虾青素的稳定性。但尚未见二者合用对其安全性和免疫功能影响的文献报道,进一步对其进行研究很有必要。前期急性经口毒性试验结果显示, HPE 对小鼠的急性经口毒性最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)大于 20 g/(kg·bw),属无毒级,3 项遗传毒性试验(沙门氏菌回复突变试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验)结果均为阴性。本研究采用大鼠 30 d 喂养试验对 HPE 的亚急性毒性进行研究,采用小鼠 30 d 喂养试验对 HPE 的增强免疫功能进行探究,以期对 HPE 产品的开发和应用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品及试验动物

HPE: 雨生红球藻粉来源于云南爱尔发生物技术有限公司。将雨生红球藻粉加入大豆油,再添加维生素 E 混合均匀,制备成含虾青素 0.8%、维生素 E 5%的 HPE。由于每天食用虾青素 8 mg 为人常用推荐剂量,设计成人 HPE 每日推荐用量为 1.0 g,每天食用虾青素 8 mg、维生素 E 50 mg。以成人 60 kg 计,相当于每天 16.7 [mg/(kg·bw)] HPE。

SPF 级昆明种雌性小鼠(体重 18~22 g)、SPF 级健康 SD 种大鼠(体重 60~80 g),来源于广西医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号为 SCXK(桂)2014-0002。动物饲养室温度为 20~25℃,湿度为 55%~70%。

1.2 试验方法

1.2.1 大鼠亚急性毒性试验

(1) 剂量选择与给予方式

体重 60~80 g 的 SD 大鼠 80 只,随机分为 4 组,每组 20 只(雌、雄各 10 只)。根据该 HPE 的人体推荐用量,3 个试验组剂量设为 1670、835、418 mg/(kg·bw),分别相当于人体推荐剂量的 100、50、25 倍。分别称取 66.8、33.4、16.7 g HPE,各加食用油至 200 mL,混匀,配制成 334.0、167.0、83.5 mg/mL 质量浓度的混悬液,按 0.5 mL/100 (g·bw)给相应剂量组 SD 大鼠灌胃;对照组灌胃等体积的食用油。4 组大鼠每天一次,连续灌胃 30 d。

(2) 试验方法

按原卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)进行。

1.2.2 小鼠免疫功能试验

(1) 剂量选择与给予方式

根据成人口服推荐用量,设高、中、低 3 个剂量组,分别为 HPE 334、167、84 mg/(kg·bw),分别相当于人体推荐剂量的 20、10、5 倍,并设置阴性对照组,每组 10 只动物。分别称取 HPE 内容物 3.34、1.67、0.84 g,各加食用油至 200 mL,分别配制成 16.70、8.35、4.20 mg/mL 质量浓度的混悬液,分别给予相应剂量组动物灌胃,灌胃体积为 0.2 mL/10 (g·bw),对照组灌胃等量食用油,每天 1 次,连续 30 d。

(2)试验方法

胸腺和脾指数测定试验、刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A)诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验、迟发型变态反应试验、血清溶血素测定试验、抗体生成细胞数测定试验和碳廓清试验等按原卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)进行。

1.3 数据处理

应用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析。先对数据进行方差齐性检验, 方差齐时采用单因素方差分析进行总体比较, 有差异再用 Dunnett 检验进行多个剂量组与对照组间的比较。若方差不齐则对数据进行变量转换, 满足方差齐性检验后用转换后的数据进行统计。

2 结果与分析

2.1 大鼠亚急性毒性试验

2.1.1 动物一般表现

在 30 d 喂养试验期间, 4 组动物生长发育正常, 均无死亡, 也未见动物有异常行为和中毒表现。可初步判断 HPE 具有一定的安全性。

2.1.2 HPE 对大鼠体重及食物利用率的影响

以 1670、835、418 mg/(kg·bw)剂量的 HPE 给大鼠灌

胃 30 d, 大鼠体重及食物利用率结果见表 1。

表 1 的结果显示, HPE 各剂量组雌、雄鼠每周的体重、总增重量、总进食量及总食物利用率与对照组比较无明显变化, 差异均无显著性($P>0.05$)。高剂量组雌、雄大鼠的实际摄入剂量相当于成人日推荐摄入量的 100 倍, 结果表明 HPE 各剂量组对雌、雄大鼠摄食、食物利用率和生长无明显影响, 不影响机体对食物摄取和利用。HPE 由雨生红球藻粉、维生素 E 原料与辅料食用油等混合制成, 雨生红球藻粉、维生素 E 原料占比少且无明显异味, 配方大部分为食用油, 对照组也灌胃等体积的食用油, 这可能是 HPE 不影响各组大鼠对食物摄取的原因, 导致 30 d 后各组大鼠食物利用率和生长情况差别较小。

2.1.3 HPE 对大鼠血常规指标的影响

对大鼠血常规指标的影响见表 2。

血液有形成分包括红细胞、白细胞及血小板, 它们参与机体代谢和所有功能活动, 因此血液对保证机体的新陈代谢、功能和机体内外环境的平衡起着重要作用。如果血液中的有形成分发生病变就会影响全身的组织器官。反之, 组织器官的病变也可引起血液成分发生变化。因此, 血液学有形成分指标对了解 HPE 对大鼠是否导致疾病的发生有很大的作用。表 2 的结果可见, HPE 各剂量组雌、雄性大鼠的血红蛋白、红细胞总数、血小板数、白细胞总数及

表 1 HPE 对大鼠体重及总食物利用率的影响(n=10)
Table 1 Effects of HPE on body weight and total food utilization in rats (n=10)

性别	剂量组	动物数/只	初重/g	第 1 周/g	第 2 周/g	第 3 周/g	终末重/g	总增重/g	总进食量/g	总食物利用率/%
雄	高剂量	10	71.5±6.1	142.3±7.1	208.5±11.9	270.3±16.7	333.3±22.5	261.8±24.3	813.6±45.3	32.1±1.7
	中剂量	10	71.8±5.2	142.4±7.5	208.4±11.9	270.5±16.0	329.9±19.9	258.1±19.6	807.9±46.9	31.9±1.2
	低剂量	10	71.4±4.6	139.5±5.8	202.6±10.7	261.2±15.2	320.5±19.3	249.1±21.0	817.4±42.5	30.4±1.4
	对照组	10	71.8±6.4	140.5±8.1	206.0±15.0	268.3±20.8	325.8±26.2	254.0±28.3	807.8±56.8	31.4±2.1
雌	高剂量	10	69.1±4.6	115.4±8.1	157.1±12.6	194.6±16.7	225.8±19.2	156.7±18.8	542.0±40.6	28.8±1.8
	中剂量	10	69.2±4.3	114.1±6.2	154.7±8.9	190.4±11.5	221.5±15.2	152.3±13.4	538.7±35.1	28.2±1.6
	低剂量	10	69.3±4.5	111.1±5.7	149.5±7.9	183.4±10.4	212.6±13.2	143.3±12.9	532.8±30.6	26.9±1.6
	对照组	10	69.6±3.7	113.6±6.8	153.6±10.2	188.3±12.8	218.4±15.2	148.8±14.1	532.4±34.3	27.9±1.2

注: 各剂量组与对照组比较, 均无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 大鼠血常规指标结果(n=10)
Table 2 Results of blood examination in rats (n=10)

性别	剂量组	动物数/只	血红蛋白/(g/L)	红细胞/(10^{12} /L)	血小板/(10^9 /L)	白细胞总数/(10^9 /L)	淋巴细胞/(10^9 /L)	中性粒细胞/(10^9 /L)	单核细胞/(10^9 /L)	嗜酸性细胞/(10^9 /L)	嗜碱性细胞/(10^9 /L)
雄	高剂量	10	154.4±5.9	7.82±0.42	964.4±83.8	7.38±0.65	83.4±3.6	11.0±3.8	4.63±0.83	0.86±0.24	0.11±0.13
	中剂量	10	153.2±5.5	7.88±0.52	916.6±88.4	7.18±0.58	84.0±2.2	10.1±1.7	4.90±1.28	0.88±0.25	0.12±0.15
	低剂量	10	152.6±4.8	7.67±0.51	944.6±90.2	7.39±0.79	82.7±3.6	11.3±3.8	5.09±0.70	0.81±0.49	0.10±0.08
	对照组	10	152.4±6.2	7.57±0.47	927.4±87.7	7.30±0.91	83.1±2.3	11.3±2.9	4.74±1.28	0.84±0.23	0.12±0.13
雌	高剂量	10	157.4±6.7	7.74±0.44	965.6±80.4	7.45±0.75	84.1±2.9	10.1±2.9	4.87±1.03	0.83±0.31	0.12±0.10
	中剂量	10	155.0±6.5	7.87±0.67	926.6±92.6	7.35±0.85	83.5±3.3	10.7±3.2	4.85±0.65	0.84±0.22	0.16±0.14
	低剂量	10	155.1±6.1	7.75±0.53	935.4±59.1	7.24±0.50	82.5±2.2	11.8±2.2	4.72±0.86	0.87±0.27	0.13±0.13
	对照组	10	156.6±6.4	7.64±0.42	967.0±83.1	7.41±0.64	83.7±2.2	10.2±2.5	5.05±1.06	0.86±0.28	0.14±0.12

其分类与对照组比较均无显著性差异($P>0.05$),表明该剂量 HPE 对大鼠的血常规指标无明显影响。由于各组数值在本实验室历史正常值范围内,无剂量-反应关系,因此,HPE 对大鼠血液有形成分常规指标无明显影响,可进一步判断 HPE 具有一定的安全性。

2.1.4 HPE 对大鼠血液生化指标的影响

对大鼠血液生化指标的影响结果见表 3。

在血液中除了有形成分外,还有许多不同的物质。检测存在于血液中的各种糖类、脂类、蛋白质、酶和机体的多种代谢产物的含量,能帮助监测机体的健康状况。血生化检查包含了非常多的项目,最重要的有肝功能、肾功能、血糖、血脂、蛋白质等多种指标。血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶是肝功能指标,尿素氮、肌酐是肾功能指标,总蛋白、白蛋白是肝肾功能和血液系统重要指标,胆固醇、甘油三酯、血糖反映血糖血脂代谢,这些敏感指标可以作为机体健康状况的表征指标。表 3 结果显示,HPE 各剂量组雌、雄性大鼠的血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶、尿素氮、肌酐、胆固醇、甘油三酯、总蛋白、白蛋白、血糖与对照组比较均无显著性差异($P>0.05$),表明该剂量 HPE 对大鼠血生化指标无明显影响,各组正常且无显著性变化,说明 HPE 安全性高。

2.1.5 HPE 对大鼠脏器重量的影响

对大鼠脏器重量的影响结果见表 4。

表 4 结果显示,大鼠灌胃 30 d,HPE 各剂量组大鼠的肝、肾、脾、雄鼠睾丸重量与对照组比较,差异均无显著性($P>0.05$)。大鼠的脏器重量及其各组变化趋势是评判食品和药品毒性反应重要指标之一,HPE 对大鼠的脏器重量无明显影响,各脏器重量在正常参考值范围。

2.1.6 解剖大体观察及组织学检查结果

动物解剖大体观察结果,各组大鼠均未发现明显病变,故只选高剂量组和阴性对照组动物的主要脏器进行组织病理切片检查。对 HPE 高剂量组和对照组全部大鼠的肝、肾、脾、胃、十二指肠、卵巢(雌)或睾丸(雄)进行组织病理学检查,结果显示,高剂量组和对照组均有 4 只有大鼠的肝小叶组织可见肝细胞轻度脂肪变性,高剂量组和对照组均有 3 只大鼠的肝小叶可见肝细胞点状坏死,高剂量组和对照组均有 2 只大鼠的肝脏汇管区可见少量炎细胞浸润;高剂量组有 2 只、对照组有 3 只大鼠的肾脏皮质部间质可见少量炎细胞浸润。但这些组织病变程度在两组动物相似,仅存在一些轻度自发性病变,可以排除是 HPE 所致,表明该剂量 HPE 对大鼠脏器组织无损害作用,无需对中、低剂量组大鼠进行组织病理学检查。

表 3 大鼠血液生化指标结果($n=10$)
Table 3 Results of blood biochemical index in rats ($n=10$)

性别	剂量组	动物数 /只	谷草转氨酶 /(U/L)	谷丙转氨酶 /(U/L)	尿素氮 /(mmol/L)	肌酐 /(μ mol/L)	胆固醇 /(mmol/L)	甘油三酯 /(mmol/L)	总蛋白 /(g/L)	白蛋白 /(g/L)	血糖 /(mmol/L)
雄	高剂量	10	137.3 $\pm$ 8.0	58.9 $\pm$ 7.9	6.54 $\pm$ 0.79	55.3 $\pm$ 2.5	2.04 $\pm$ 0.27	1.08 $\pm$ 0.33	67.3 $\pm$ 3.2	33.9 $\pm$ 1.6	5.39 $\pm$ 0.61
	中剂量	10	139.1 $\pm$ 9.9	57.3 $\pm$ 4.8	6.48 $\pm$ 0.53	54.3 $\pm$ 2.1	2.06 $\pm$ 0.16	1.09 $\pm$ 0.26	67.6 $\pm$ 4.2	34.7 $\pm$ 2.4	5.49 $\pm$ 0.56
	低剂量	10	136.0 $\pm$ 7.0	58.0 $\pm$ 6.1	6.67 $\pm$ 0.56	53.8 $\pm$ 6.4	2.03 $\pm$ 0.46	1.06 $\pm$ 0.31	68.5 $\pm$ 3.4	34.5 $\pm$ 1.6	5.54 $\pm$ 0.44
	对照组	10	138.0 $\pm$ 8.7	56.4 $\pm$ 6.3	6.50 $\pm$ 0.75	55.5 $\pm$ 4.4	2.05 $\pm$ 0.24	1.02 $\pm$ 0.32	67.0 $\pm$ 3.1	33.9 $\pm$ 1.4	5.37 $\pm$ 0.66
雌	高剂量	10	139.2 $\pm$ 5.4	57.0 $\pm$ 4.2	6.58 $\pm$ 0.61	53.3 $\pm$ 3.4	2.07 $\pm$ 0.26	1.04 $\pm$ 0.31	68.3 $\pm$ 3.7	34.5 $\pm$ 1.6	5.37 $\pm$ 0.45
	中剂量	10	139.0 $\pm$ 8.4	55.2 $\pm$ 8.7	6.75 $\pm$ 0.54	55.0 $\pm$ 5.2	2.05 $\pm$ 0.24	1.07 $\pm$ 0.56	68.3 $\pm$ 3.7	34.9 $\pm$ 2.3	5.43 $\pm$ 0.34
	低剂量	10	133.8 $\pm$ 8.8	56.6 $\pm$ 7.3	6.56 $\pm$ 0.59	54.1 $\pm$ 7.8	2.08 $\pm$ 0.15	1.09 $\pm$ 0.36	67.4 $\pm$ 3.0	33.9 $\pm$ 1.7	5.52 $\pm$ 0.40
	对照组	10	136.1 $\pm$ 7.6	56.2 $\pm$ 5.6	6.47 $\pm$ 0.58	53.7 $\pm$ 6.3	2.06 $\pm$ 0.23	1.06 $\pm$ 0.23	68.4 $\pm$ 4.8	34.3 $\pm$ 2.3	5.42 $\pm$ 0.58

表 4 大鼠脏器重量结果($n=10$)
Table 4 Results of organ weights in rats ($n=10$)

性别	剂量组	动物数/只	空腹体重/g	肝脏/g	肾脏/g	脾脏/g	睾丸/g
雄	高剂量	10	319.7 $\pm$ 22.3	9.838 $\pm$ 0.709	2.637 $\pm$ 0.263	0.815 $\pm$ 0.129	3.361 $\pm$ 0.315
	中剂量	10	316.8 $\pm$ 20.2	9.636 $\pm$ 1.034	2.639 $\pm$ 0.228	0.820 $\pm$ 0.125	3.298 $\pm$ 0.188
	低剂量	10	307.5 $\pm$ 18.3	9.436 $\pm$ 0.661	2.563 $\pm$ 0.123	0.788 $\pm$ 0.065	3.203 $\pm$ 0.081
	对照组	10	313.1 $\pm$ 27.0	9.518 $\pm$ 1.277	2.601 $\pm$ 0.206	0.794 $\pm$ 0.122	3.257 $\pm$ 0.259
雌	高剂量	10	214.3 $\pm$ 18.5	6.402 $\pm$ 0.640	1.729 $\pm$ 0.111	0.540 $\pm$ 0.065	-
	中剂量	10	209.6 $\pm$ 15.3	6.315 $\pm$ 0.735	1.729 $\pm$ 0.178	0.522 $\pm$ 0.140	-
	低剂量	10	201.9 $\pm$ 14.2	6.131 $\pm$ 0.449	1.677 $\pm$ 0.083	0.515 $\pm$ 0.038	-
	对照组	10	207.8 $\pm$ 15.4	6.287 $\pm$ 0.444	1.712 $\pm$ 0.094	0.524 $\pm$ 0.065	-

注:-表示无此项,表 5~7 同。

2.2 免疫功能试验

2.2.1 HPE 对小鼠胸腺指数、脾指数的影响

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官, 其脏器指数可在一定程度上反映机体免疫功能的强弱, 其中胸腺尤为重要, 它是 T 淋巴细胞成熟发育的场所, 为中枢免疫器官。表 5 结果显示, 与对照组比较, 虽然随着剂量增加胸腺指数有一定增加, 但没有统计学差异, HPE 3 个剂量组胸腺指数、脾指数与对照组比较差异均无显著性($P>0.05$)。说明 HPE 3 个剂量对胸腺指数和脾指数无明显影响。考虑到胸腺指数的重要性, 应该考虑适当增加食用量, 来提高胸腺指数这一重要免疫指标。

2.2.2 HPE 对小鼠细胞免疫的影响

(1) HPE 对 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力的影响

Con A 是一种植物血凝素, 具有强力的促有丝分

裂作用, 有较好的促淋巴细胞转化反应的作用, 能选择性激活抑制性 T 细胞, 起到调节机体细胞免疫作用。HPE 对 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力的影响见表 6。

从表 6 结果可知, HPE 高、中剂量组对 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化能力明显高于对照组, 差异具有显著性[高剂量组($P<0.01$), 中剂量组($P<0.05$)], 表明高、中剂量 HPE 具有促进小鼠的脾淋巴细胞增殖作用。

(2) HPE 对小鼠迟发型变态反应的影响

小鼠迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)主要由 T 细胞介导的免疫损伤所致, 病理学特征表现为以单个核细胞浸润和细胞变性、坏死为特征的局部超敏反应性炎症, 是体内致敏 T 细胞再次与相应抗原接触而被激活并产生淋巴因子, 其发生与抗体和补体无关, 是细胞免疫指标。HPE 对小鼠 DTH 的影响见表 7。

表 5 HPE 对小鼠胸腺指数、脾指数的影响($n=10$)
Table 5 Effects of HPE on the spleen and thymus index in mice ($n=10$)

剂量组/[mg/(kg·bw)]	动物数/只	胸腺指数/%	<i>P</i>	脾指数/%	<i>P</i>
334(高)	10	0.233±0.021	0.884	0.378±0.041	0.833
167(中)	10	0.226±0.026	1.000	0.387±0.027	0.803
84(低)	10	0.225±0.011	0.999	0.383±0.028	0.413
阴性对照	10	0.219±0.017	-	0.383±0.038	-

表 6 HPE 对 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验影响($n=10$)
Table 6 Effects of HPE on Con A-induced splenic lymphocyte transformation test in mice ($n=10$)

剂量组/[mg/(kg·bw)]	动物数/只	淋巴细胞增殖能力(OD 值)	<i>P</i>
334(高)	10	0.209±0.064**	0.000
167(中)	10	0.173±0.046*	0.045
84(低)	10	0.139±0.031	0.809
阴性对照	10	0.124±0.021	-

注: *与阴性对照组比较, 有显著性差异($P<0.05$), 表 7 同; **与阴性对照组比较, 有极显著性差异($P<0.01$)。

表 7 HPE 对小鼠 DTH 影响($n=10$)
Table 7 Effects of HPE on DTH in mice ($n=10$)

剂量组/[mg/(kg·bw)]	动物数/只	左右耳片重量差值/mg	<i>P</i>
334(高)	10	17.27±1.19*	0.020
167(中)	10	16.52±2.37	0.124
84(低)	10	15.52±2.27	0.664
阴性对照	10	14.64±2.23	-

从表 7 结果可知, HPE 高剂量的小鼠左右耳片重量差值高于对照组, 具有显著性差异($P<0.05$), 表明该高剂量 HPE 能促进小鼠的 DTH。

2.2.3 HPE 对小鼠体液免疫的影响

溶血空斑试验和血清溶血素水平试验是反映机体体液免疫功能的常用方法。HPE 对小鼠的体液免疫的影响进行了溶血空斑试验和血清溶血素水平试验。

抗体形成细胞是抗原刺激机体后, B 细胞转化为浆细胞, 合成并分泌抗体。抗体形成细胞的检测可以通过溶血空斑试验进行。溶血空斑试验结果发现, 对照组与低、中、高剂量组的溶血空斑数分别为 1707±298、1796±299、1965±245、2066±282 ($\times 10^6$ 个脾细胞), HPE 各剂量组的小鼠溶血空斑数随着剂量增加而增加, 但仅高剂量组与对照组的差异具有显著性($P<0.05$), 说明高剂量 HPE 具有促进小鼠抗体生成细胞增殖作用, 起到增强体液免疫功能作用。

血清溶血素水平试验结果得到, 对照组与低、中、高剂量组的抗体积数分别为 124.7±13.2、128.2±10.9、143.1±11.1、154.7±18.0, HPE 各剂量组小鼠的抗体积数随着剂量增加而增加, 高、中剂量组与对照组的差异具有显著性[高剂量组($P<0.01$), 中剂量组($P<0.05$)], 表明 HPE 能提高小鼠血清溶血素水平。血清溶血素水平反映了 B 细胞的增殖、分化以及与补体结合向体液中分泌溶血素的能力。因此, 可以证明 HPE 中、高剂量水平可有效改善小鼠体液免疫功能。

2.2.4 HPE 对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

吞噬功能是一个重要的免疫功能, 可分为体内和体

外。本研究采用体内法进行小鼠碳廓清试验,观察 HPE 对小鼠的单核-巨噬细胞吞噬功能的影响,吞噬指数越大表示颗粒异物的吞噬活性越强。小鼠碳廓清试验结果得到,对照组与低、中、高剂量组的吞噬指数分别为 8.24 ± 0.93 、 8.74 ± 0.87 、 9.19 ± 1.07 、 9.41 ± 0.89 。各剂量组小鼠的吞噬指数随着剂量增加也一定程度增加,其中高剂量组能明显增加对小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清功能($P < 0.05$)。单核-巨噬细胞碳廓清功能为非特异性免疫指标,本研究表明 HPE 可激活巨噬细胞能力,加强机体巨噬细胞吞噬异物能力,发挥非特异性免疫作用。

3 结论与讨论

本研究探究了 HPE 的亚急性毒性和免疫调节作用。大鼠 30 d 喂养试验结果中,动物的一般情况、食物利用率、血液指标及病理组织学检查均未见异常,得出 HPE 安全性较高的结论。对小鼠 30 d 喂养进行细胞免疫和体液免疫功能试验结果证明 HPE 具有增强机体的免疫功能。

雨生红球藻是自然界中虾青素含量最丰富的生物,通过微生物含量、重金属含量和初步毒性试验,可以初步判定雨生红球藻的安全性^[20-22]。对其加入维生素 E 作为稳定剂后进一步作亚急性毒性试验,可进一步为其提供食用安全数据。

前期研究表明,雨生红球藻添加维生素 E 可以增加产品中虾青素的稳定性。添加后产品急性毒性试验结果为无毒级,Ames 试验、精子畸形试验、骨髓微核试验等安全性试验为阴性;本次亚急性毒性试验结果表明,与对照组比较,HPE 3 个剂量组大鼠的一般情况、体重、食物利用率、血液学、血液生化学、脏器比及病理组织学检查均未见异常,说明具有食用安全性。由于维生素 E 为营养素补充剂,建议雨生红球藻添加维生素 E 合用。

现有研究表明,雨生红球藻能增强机体免疫力^[23-25],因此本研究未设置单独雨生红球藻组,重点考虑不同剂量 HPE 的效果。对 3 个不同剂量 HPE 的免疫功能进行了评价,研究表明,与对照组相比,中、高剂量组显著促进小鼠的脾淋巴细胞增殖转化能力,提高小鼠的血清溶血素水平;高剂量组显著提升了 DTH 能力和小鼠碳廓清吞噬指数,明显增强抗体生成细胞能力;对胸腺和脾指数、NK 细胞活性等免疫指标无显著影响,根据保健食品功能评价技术规范,可认定 HPE 对小鼠的免疫功能有显著的提高作用,表明成人推荐虾青素 8 mg 的雨生红球藻和维生素 E 50 mg 可以增强机体免疫力,有待人体试食试验进一步验证。

维生素 E 可以调节体液免疫和细胞免疫细胞的增殖与分化,通过影响免疫细胞的活性氧水平、影响细胞因子和趋化因子起到调节免疫功能的作用^[26-27]。雨生红球藻具有增强免疫力和抗肿瘤作用,其作用机制可能与虾青素的抗氧化活性密切相关^[28-30]。虾青素可以降低衰老小鼠脑组

织中丙二醛的含量,升高谷胱甘肽的含量,提高超氧化物歧化酶的活性^[31],能够高效淬灭单线态氧,通过直接清除氧自由基达到稳定免疫细胞膜结构的目的,保护免疫系统的完整性和功能性^[29,32]。维生素 E 因具有良好的抗氧化活性,能防止功效成分虾青素氧化,增加产品稳定性。因此,雨生红球藻和维生素 E 两种常用抗氧化剂联合复配,产品稳定性和食用安全性较高,并具有增强免疫力功能,值得推广应用。

参考文献

- [1] HUSSEIN G, SANKAWA U, GOTO H, *et al.* Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 443-449.
- [2] KAMATH BS, SRIKANTA BM, DHARMESH SM, *et al.* Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Europ J Pharmacol*, 2008, 590: 387-395.
- [3] 黄浦俊, 朱巧巧, 颜美秋, 等. 破壁、未破壁雨生红球藻粉体外抗氧化活性及体内抗衰老作用及比较研究[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(2): 83-87.
- [4] HUANG PJ, ZHU QQ, YAN MQ, *et al.* Study on and comparison antioxidant activities *in vitro* and anti-aging effects *in vivo* between *Haematococcus pluvialis* powders and broken *Haematococcus pluvialis* powders [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2018, 34(2): 83-87.
- [5] 江红霞, 雷梦云, 林雄平, 等. 光照胁迫对雨生红球藻虾青素积累和抗氧化活性的影响[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(10): 215-221, 233.
- [6] JIANG HX, LEI MY, LIN XP, *et al.* Effects of light stress on astaxanthin accumulation and antioxidant activities in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31(10): 215-221, 233.
- [7] PARK JS, CHYUN JH, KIM YK, *et al.* Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans [J]. *Nutr Metab*, 2010, 7: 18.
- [8] PEREIRA CPM, SOUZA ACR, VASCONCELOS AR, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases [J]. *Int J Molecul Med*, 2021, 47(1): 37-48.
- [9] GALASSO C, OREFICE I, PELLONE P, *et al.* On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives? [J]. *Marin Drugs*, 2018, 16: 1-16.
- [10] HONG CL, WANG YT, WANG TJ, *et al.* The effect of astaxanthin treatment on the rat model of fetal alcohol spectrum disorders (FASD) [J]. *Brain Res Bull*, 2022, 183: 57-72.
- [11] SHIN J, SAINI RK, OH JW. Low dose astaxanthin treatments trigger the hormesis of human astrogloma cells by up-regulating the cyclin-dependent kinase and down-regulated the tumor suppressor protein [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(10): 434.
- [12] NI X, YU H, WANG S, *et al.* Astaxanthin inhibits PC-3 xenograft prostate tumor growth in nude mice [J]. *Marin Drugs*, 2017, 15(3): 66.
- [13] HIGUERA-CLAPARA I, FELIX-VALENZUELA, GOYCOOLEA FM. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006, 46(2): 185-196.
- [14] AMBATI RR, PHANG SM, RAVI S, *et al.* Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-A review [J]. *Mar Drug*, 2014, 12: 128-152.
- [15] MOTA GCP, MORAES LBS, OLIVEIRA CYB, *et al.* Astaxanthin from

- Haematococcus pluvialis*: Processes, applications, and market [J]. *Preparat Biochem Biotechnol*, 2022, 52(5): 598–609.
- [14] 袁巧月, 吴梵, 王孝治, 等. 雨生红球藻虾青素纳米颗粒的制备及稳定性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(16): 98–104.
- YUAN QY, WU F, WANG XZ, *et al.* Preparation and stability of nanoparticles containing astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(16): 98–104.
- [15] 费忠南, 万民熙, 樊飞, 等. 雨生红球藻喷雾干燥工艺的建立与放大[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(5): 209–216.
- FEI ZN, WAN MX, FAN F, *et al.* Establishment and scale-up of spray drying technology for *Haematococcus pluvialis* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(5): 209–216.
- [16] YANG J, HUA S, HUANG Z, *et al.* Comparison of bioaccessibility of astaxanthin encapsulated in starch-based double emulsion with different structures [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 272: 118475.
- [17] PAN L, LI H, HOU L, *et al.* Gastrointestinal digestive fate of whey protein isolate coated liposomes loading astaxanthin: Lipolysis, release, and bioaccessibility [J]. *Food Biosci*, 2022, 45: 101464.
- [18] ZHOU Q, YANG L, XU J, *et al.* Evaluation of the physicochemical stability and digestibility of microencapsulated esterified astaxanthins using *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Food Chem*, 2018, 260: 73–81.
- [19] CHEN Y, TIE S, ZHANG X, *et al.* Preparation and characterization of glycosylated protein nanoparticles for astaxanthin mitochondria targeting delivery [J]. *Food Funct*, 2021, 12(17): 7718–7727.
- [20] PITACCO W, SAMORI C, PEZZOLESI L, *et al.* Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with hydrophobic deep eutectic solvents based on oleic acid [J]. *Food Chem*, 2022, 379: 132156.
- [21] LIM KC, YUSOFF FM, SHARIFF M. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals [J]. *Rev Aquac*, 2018, 10: 738–773.
- [22] 张晓丽, 刘建国, 林伟, 等. 国产雨生红球藻藻粉质量安全性评价[J]. *饲料工业*, 2007, 28(2): 51–53.
- ZHANG XL, LIU JG, LIN W, *et al.* Quality and safety evaluation of domestic *Haematococcus pluvialis* powder [J]. *Feed Ind*, 2007, 28(2): 51–53.
- [23] PARK JS, MATHISON BD, HAYEK MG, *et al.* Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 144: 455–461.
- [24] 海璇隽, 凌雪萍, 卢英华. 虾青素对正常小鼠与衰老模型大鼠免疫指标的影响[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2013, 52(5): 703–709.
- HAI XJ, LING XP, LU YH. Effect of astaxanthin on immunological indexes of normal mice and aging model rats [J]. *J Xiamen Univ (Nat Sci Ed)*, 2013, 52(5): 703–709.
- [25] 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 YF, XIN NH, LI BQ, *et al.* Study of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* on immune regulation function in mice [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(20): 183–187.
- [26] 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 CQ, SUN RY. Effects of vitamin E on immune function [J]. *Prog Physiol Sci*, 2000, 31(2): 163–165.
- [27] 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 JP, ZHOU XQ. Advances in research on the effects of vitamin E on immunity, reproduction and development [J]. *Chin J Comp Med*, 2006, 16(8): 506–509.
- [28] JYONOUCHI H, SUN S, IJIMA K, *et al.* Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action [J]. *Nutr Cancer*, 2000, 36(1): 59–65.
- [29] FAKHRI S, ABBASZADEH F, DARGAHI L, *et al.* Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 136: 1–20.
- [30] KAMATH BS, SRIKANTA BM, DHARMESH SM, *et al.* Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 590: 387–395.
- [31] 张景正, 许晨新, 陈娟. 虾青素对D-半乳糖致衰老小鼠认知功能障碍的改善作用及机制研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(22): 7461–7468.
- ZHANG JZ, XU CX, CHEN X. Ameliorating effects and mechanism of astaxanthin on D-galactose-induced cognitive dysfunction in aging mice [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(22): 7461–7468.
- [32] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 44–84.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



张 潮, 硕士研究生, 主要研究方向为功能食品开发。
E-mail: 1214048469@qq.com



范青生, 硕士, 研究员, 主要研究方向为功能食品开发。
E-mail: cnfoods@163.com