

第二部分 功能学检验方法

一、有助于增强免疫力检验方法

1. 实验动物

推荐用近交系小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

2. 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。

受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。免疫模型动物实验时间可适当延长。

3. 实验方法

3.1 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

可任选下列方法之一

3.1.1 MTT 法

3.1.1.1 原理

当 T 淋巴细胞受 ConA 刺激后发生母细胞发生增殖反应，活细胞特别是增殖细胞中的线粒体水解酶可将 MTT（一种淡黄色的唑氮盐）分解为兰紫色结晶，其光密度值能反映细胞的增殖情况。

3.1.1.2 仪器和材料

RPMI1640 细胞培养液、小牛血清、2-巯基乙醇（2-ME）、青霉素、链霉素、刀豆蛋白 A（ConA）、盐酸、异丙醇、MTT、Hank's 液、PBS 缓冲液（pH7.2-7.4）

纱布或 200 目筛网、24 孔培养板，96 孔培养板（平底），手术器械、二氧化碳培养箱、酶标仪、721 分光光度计、超净工作台、高压灭菌器、无菌滤器。

3.1.1.3 实验步骤

3.1.1.3.1 试剂配制

完全培养液 RPMI1640 培养液过滤除菌，用前加入 10%小牛血清，1%谷氨酰胺（200mmol/L），青霉素（100U/mL），链霉素（100μg/L）及 5×10^{-5} mol/L 的 2-巯基乙醇，用无菌的 1mol/L 的 HCl 或 1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0-7.2，即完全培养液。

ConA 液 用双蒸水配制成 100μg/mL 的溶液，过滤除菌，在低温冰箱（-20℃）保存。

无菌 Hank's 液 用前以 3.5%的无菌 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2-7.4。

MTT 液 将 5mg MTT 溶于 1mL pH7.2 的 PBS 中，现配现用。

酸性异丙醇溶液 96mL 异丙醇中加入 4mL 1mol/L 的 HCl，临用前配制。

3.1.1.3.2 脾细胞悬液制备

无菌取脾，置于盛有适量无菌 Hank's 液平皿中，用镊子轻轻将脾磨碎，制成单个细胞悬液。经 200 目筛

网过滤，或用4层纱布将脾磨碎，用Hank's液洗2次，每次离心10min（1000r/min）。然后将细胞悬浮于1mL的完全培养液中，用台酚兰染色计数活细胞数（应在95%以上），调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL。

3.1.1.3.3 淋巴细胞增殖反应

将每一份脾细胞悬液分两孔加入24孔培养板中，每孔1mL，一孔加75 μ L ConA液（相当于7.5 μ g/mL），另一孔作为对照，置5%CO₂，37 $^{\circ}$ C CO₂孵箱中培养72h。培养结束前4h，每孔轻轻吸去上清液0.7mL，加入0.7mL不含小牛血清的RPMI1640培养液，同时加入MTT（5mg/mL）50 μ L/孔，继续培养4h。培养结束后，每孔加入1mL酸性异丙醇，吹打混匀，使紫色结晶完全溶解。然后分装到96孔培养板中，每个孔作3个平行孔，用酶标仪，以570nm波长测定光密度值。也可将溶解液直接移入2mL比色杯中，721分光光度计上在波长570nm测定OD值。

3.1.1.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算F值，F值 $<F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性；F值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

用加ConA孔的光密度值减去不加ConA孔的光密度值代表淋巴细胞的增殖能力，受试样品组的光密度差值显著高于对照组的光密度差值，可判定该项实验结果阳性。

3.1.1.5 注意事项

本实验中ConA的浓度很重要，过低不能刺激足够的细胞增殖，过高会抑制细胞增殖，不同批号的ConA在实验前要进行预试，以找到最佳浓度。

3.1.2 同位素掺入法

3.1.2.1 原理

T淋巴细胞在有丝分裂原PHA、ConA等的刺激下，产生增殖反应，DNA和RNA合成明显增加，如在培养液中加入³H-胸腺嘧啶核苷（³H-TdR），则可被转化中的细胞摄入。测定标记淋巴细胞的放射强度可反映淋巴细胞增殖的程度。

3.1.2.2 仪器和材料

RPMI1640细胞培养液、小牛血清、2-巯基乙醇（2-ME）、青霉素、链霉素、刀豆蛋白A（ConA）、Hank's液、PBS缓冲液（pH7.2-7.4）、³H-TdR、闪烁液[2,5-二苯基恶唑（PPO）0.5g、1,4-双-(5-苯基恶唑基)-苯（POPOP）0.25g、二甲苯500mL混匀]

200目筛网，96孔培养板（平底），手术器械、二氧化碳培养箱、超净工作台、液体闪烁仪、多头细胞收集器、49型玻璃纤维滤纸。

3.1.2.3 实验步骤

3.1.2.3.1 脾细胞悬液制备

无菌取脾，置于盛有适量无菌Hank's液的小平皿中，用镊子轻轻将脾撕碎，制成单细胞悬液。经200目筛网过滤，用Hank's液洗3次，每次离心10min（1000r/min）。然后将细胞悬浮于2mL的完全培养液中，用台酚兰染色计数活细胞数（应在95%以上），最后用RPMI1640完全培养液将细胞数调成 5×10^6 个/mL。

3.1.2.3.2 淋巴细胞增殖反应

将脾细胞悬液加入到 96 孔培养板中，200 μ L/孔，每一份脾细胞悬液分装 6 个孔，3 孔加 ConA (5 μ g/mL)，另 3 个孔不加 ConA 作为对照。置 5% CO₂，37 $^{\circ}$ C 培养 72h，培养结束前 6h，每孔加入 ³H-TdR 20 μ L，使其终浓度为 (3.7-18.5) $\times 10^4$ Bq/mL。用多头细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤纸上。滤纸片充分干燥后置测量瓶中，加入 7mL 闪烁液，用液闪仪测定每分钟脉冲数 (cpm)。

3.1.2.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

以每分钟脉冲数 (cpm) 表示增殖程度，用刺激指数 (SI) 来表示

$$SI = \frac{\text{实验孔 cpm}}{\text{对照孔 cpm}}$$

受试样品组的 SI 值显著高于对照组的 SI 值，即可判定该项实验结果阳性。

3.2 迟发型变态反应 (DTH)

可任选下列方法之一

3.2.1 二硝基氟苯诱导小鼠 DTH (耳肿胀法)

3.2.1.1 原理

二硝基氟苯 (DNFB) 稀释液可与腹壁皮肤蛋白结合成完全抗原，由此刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞。4~7 天后再将其涂抹于耳部进行抗原攻击，使局部肿胀，一般在抗原攻击后 24~48h 达高峰，其肿胀程度可以反应迟发型变态反应程度。

3.2.1.2 材料

DNFB、丙酮、麻油、硫化钡、打孔器。

3.2.1.3 实验步骤

3.2.1.3.1 试剂配制

DNFB 溶液 DNFB 溶液应新鲜配制，称取 DNFB50mg，置清洁干燥小瓶中，将预先配好的 5mL 丙酮麻油溶液 (丙酮：麻油=1：1)，倒入小瓶，盖好瓶塞并用胶布密封。混匀后，用 250 μ L 注射器通过瓶盖取用。

3.2.1.3.2 致敏 每鼠腹部皮肤用硫化钡脱毛或剃毛，范围约 3cm \times 3cm，用 DNFB 溶液 50 μ L 均匀涂抹致敏。

3.2.1.3.3 DTH 的产生与测定 5 天后，用 DNFB 溶液 10 μ L 均匀涂抹于小鼠右耳 (两面) 进行攻击。攻击后 24h 颈椎脱臼处死小鼠，剪下左右耳壳。用打孔器取下直径 8mm 的耳片，称重。

3.2.1.4 数据处理与结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

用左右耳重量之差表示 DTH 的程度。受试样品组的重量差值显著高于与对照组的重量差值，可判定该项实验结果阳性。

3.2.1.5 注意事项

操作时应避免 DNFB 与皮肤接触。

3.2.2 绵羊红细胞 (SRBC) 诱导小鼠 DTH (足跖增厚法)

3.2.2.1 原理

SRBC 可刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞, 4 天后, 当再以 SRBC 攻击时, 攻击部位出现肿胀, 其肿胀程度可反映迟发型变态反应程度。

3.2.2.2 材料

游标卡尺 (精密度 0.02mm)、SRBC、微量注射器 (50 μ L)。

3.2.2.3 实验步骤

3.2.2.3.1 致敏 小鼠用 2% (v/v) SRBC 腹腔或静脉免疫, 每只鼠注射 0.2mL (约 1×10^8 个 SRBC)。

3.2.2.3.2 DTH 的产生与测定 免疫后 4 天, 测量左后足跖部厚度, 然后在测量部位皮下注射 20% (v/v) SRBC, 每只鼠 20 μ L (约 1×10^8 个 SRBC), 注射后于 24h 测量左后足跖部厚度, 同一部位测量三次, 取平均值。

3.2.2.4 数据处理和结果判定

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

以攻击前后足跖厚度的差值来表示 DTH 的程度。受试样品组的差值显著高于对照组的差值, 可判定该项实验结果阳性。

3.2.2.5 注意事项

测量足跖厚度时, 最好由专人来进行。卡尺紧贴足跖部, 但不要加压, 否则会影响测量结果。

攻击时所用的 SRBC 要新鲜 (4 $^{\circ}$ C 保存期不超过 1 周)。

3.3 抗体生成细胞检测 (Jerne 改良玻片法)

3.3.1 原理

经过绵羊红细胞 (SRBC) 免疫的小鼠脾细胞悬液与一定量的 SRBC 混合, 在补体参与下, 使分泌抗体的脾细胞周围的 SRBC 溶解, 形成肉眼可见的空斑。溶血空斑数可反映抗体生成细胞数。

3.3.2 仪器和材料

二氧化碳培养箱、恒温水浴、离心机、手术器械、玻片架、200 目筛网、SRBC、补体 (豚鼠血清)、Hank's 液、RPMI1640 培养液、SA 缓冲液、琼脂糖。

3.3.3 实验步骤

3.3.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血, 将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中, 朝一个方向摇动, 以脱纤维, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用, 可保存 2 周。

3.3.3.2 制备补体 采集豚鼠血, 分离出血清 (至少 5 只豚鼠的混合血清), 将 1mL 压积 SRBC 加入到 5mL 豚鼠血清中, 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 30min, 经常振荡, 离心取上清, 分装, -70 $^{\circ}$ C 保存。用时以 SA 缓冲液按 1: 8—15 稀释。

3.3.3.3 玻片涂膜 在清洁玻片上刷上一薄层琼脂糖 (0.5g 琼脂糖加双蒸水至 100mL, 加热溶解), 干后可长

期保存备用。

3.3.3.4 免疫动物 取脱纤维的羊血，用生理盐水洗涤3次，每次离心（2000r/min）10min，计数细胞，每只鼠经腹腔或静脉注射 SRBC $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 个。也可将压积 SRBC 用生理盐水配成 2%（v/v）的细胞悬液，每只鼠腹腔注射 0.2mL。

3.3.3.5 脾细胞悬液制备

将 SRBC 免疫 4~5 天后的小鼠颈椎脱臼处死，取出脾脏，放在盛有 Hank's 液的小平皿内，轻轻磨碎脾脏，制成细胞悬液，经 200 目筛网过滤，或用 4 层纱布将脾磨碎，离心（1000r/min）10min，用 Hank's 液洗 2 遍，最后将细胞悬浮在 5mL RPMI1640 培养液中，计数细胞，并将细胞浓度调整为 5×10^6 个/mL。也可将细胞悬浮在 8mL Hank's 液。

3.3.3.6 空斑的测定

将表层培养基（1g 琼脂糖加双蒸水至 100mL）加热溶解后，放 45~50℃ 水浴保温，与等量 pH7.2~7.4、2 倍浓度的 Hank's 液混合，分装小试管，每管 0.5mL，再向管内加 50μL 10% SRBC（v/v，用 SA 缓冲液配制），20μL 脾细胞悬液（ 5×10^6 个/mL）或 25μL 脾细胞悬液，迅速混匀，倾倒入已刷琼脂糖薄层的玻片上，做平行片，待琼脂凝固后，将玻片水平扣放在片架上，放入二氧化碳培养箱中孵育 1~1.5h，然后用 SA 缓冲液稀释的补体（1：8）加入到玻片架凹槽内，继续温育 1~1.5h 后，计数溶血空斑数。

3.3.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

用空斑数/ 10^5 脾细胞或空斑数/全脾细胞来表示，受试样品组的空斑数显著高于对照组的空斑数，可判定该项实验结果阳性。

3.4 血清溶血素的测定

可任选下列方法之一。

3.4.1 血凝法

3.4.1.1 原理

用 SRBC 免疫动物后，产生抗 SRBC 抗体（溶血素），利用其凝集 SRBC 的程度来检测溶血素的水平。

3.4.1.2 仪器和材料

SRBC、生理盐水、微量血凝实验板、离心机

3.4.1.3 实验步骤

3.4.1.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血，将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中，朝一个方向摇动，以脱纤维，放入 4℃ 冰箱保存备用，可保存 2 周。

3.4.1.3.2 免疫动物及血清分离 取羊血，用生理盐水洗涤 3 次，每次离心（2000r/min）10min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2%（v/v）的细胞悬液，每只鼠腹腔注射 0.2mL 进行免疫。4~5 天后，摘除眼球取血于离心管内，放置约 1h，将凝固血与管壁剥离，使血清充分析出，2000r/min 离心 10min，收集血清。

3.4.1.3.3 凝集反应 用生理盐水将血清倍比稀释，将不同稀释度的血清分别置于微量血凝实验板内，每孔

100 μ L, 再加入 100 μ L 0.5% (v/v) 的 SRBC 悬液, 混匀, 装入湿润的平盘内加盖, 于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 3h, 观察血球凝集程度。

3.4.1.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

血清凝集程度一般分为 5 级 (0—IV) 记录, 按下式计算抗体积数, 受试样品组的抗体积数显著高于对照组的抗体水平, 可判定该项实验结果阳性。

$$\text{抗体水平} = (S_1 + 2S_2 + 3S_3 + \dots + nS_n)$$

式中 1、2、3…… n 代表对倍稀释的指数, S 代表凝集程度的级别, 抗体积数越大, 表示血清抗体越高。

0 级 红细胞全部下沉, 集中在孔底部形成致密的圆点状, 四周液体清晰。

I 级 红细胞大部分沉集在孔底成园点状, 四周有少量凝集的红细胞。

II 级 凝集的红细胞在孔底形成薄层, 中心可以明显见到一个疏松的红点。

III 级 凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层, 中心隐约可见一个小红点。

IV 级 凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层, 凝块有时成卷折状。

3.4.1.5 注意事项

血清稀释时要充分混匀。最后一个稀释度应不出现凝集现象。

3.4.2 半数溶血值 (HC_{50}) 的测定

3.4.2.1 原理

用 SRBC 免疫动物后, 血清中出现 SRBC 抗体 (溶血素), 在补体参与下, 与 SRBC 一起孵育, 可发生溶血反应, 释放血红蛋白, 通过测定血红蛋白含量反映动物血清中溶血素的含量。

3.4.2.2 仪器和材料

721 分光光度计、离心机、恒温水浴、SRBC、补体 (豚鼠血清)、SA 缓冲液、都氏试剂 (碳酸氢钠 1.0g、高铁氰化钾 0.2g、氰化钾 0.05g, 加蒸馏水至 1000mL)

3.4.2.3 实验步骤

3.4.2.3.1 SRBC 绵羊颈静脉取血, 将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中朝一个方向摇动, 以脱纤维, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用, 可保存 2 周。

3.4.2.3.2 制备补体 采集豚鼠血, 分离出血清 (至少 5 只豚鼠的混合血清), 将 1mL 压积 SRBC 加入到 5mL 豚鼠血清中, 放 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30min, 经常振荡, 离心取上清, 分装, -70 $^{\circ}$ C 保存。用时以 SA 液按 1: 8 稀释。

3.4.2.3.3 免疫动物及血清分离 取羊血, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次离心 (2000r/min) 10min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2% (v/v) 的细胞悬液, 每只鼠腹腔注射 0.2mL 进行免疫。4~5 天后, 摘除眼球取血于离心管内, 放置约 1h, 使血清充分析出, 2000r/min 离心 10min, 或 6000r/min, 4min, 收集血清。

3.4.2.3.4 溶血反应

3.4.2.3.4.1 分光光度计法 取血清用 SA 缓冲液稀释 (一般为 200~500 倍)。将稀释后的血清 1mL 置试管内, 依次加入 10% (v/v) SRBC 0.5mL, 补体 1mL (用 SA 液按 1:8 稀释)。另设不加血清的对照管 (以 SA 缓冲

液代替)。置 37℃ 恒温水浴中保温 15~30min 后, 冰浴终止反应。2000r/min 离心 10min。取上清液 1mL, 加都氏试剂 3mL, 同时取 10% (v/v) SRBC 0.25mL 加都氏试剂至 4mL, 充分混匀, 放置 10min 后, 于 540nm 处以对照管作空白, 分别测定各管光密度值。

3.4.2.3.4.2 酶标仪法 设样品孔和空白对照孔, 样品孔: 取血清用 SA 缓冲液稀释 (一般 200~500 倍); 每孔加入稀释后的血清 50 μ L; 空白对照孔: 每孔加入 50 μ L SA 缓冲液, 再依次加入 10% (v/v) SRBC 25 μ L, 补体 50 μ L (用 SA 溶液按 1:8 稀释), 置 37℃ 恒温培养箱中保温 30min, 冰浴终止反应, 1500r/min 水平离心 10min, 然后样品孔和空白对照孔各取上清液 50 μ L 加入另一个 96 孔培养板内, 加都氏试剂 150 μ L。同时设半数溶血孔, 加入 10% (v/v) SRBC 12.5 μ L 再加都氏试剂至 200 μ L。用震荡器充分混匀, 放置 10min 后, 于 540nm 处用全自动酶标仪测定各孔光密度值。

3.4.2.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

溶血素的量以半数溶血值 (HC_{50}) 表示, 按下列公式计算, 受试样品组的 HC_{50} 显著高于对照组的 HC_{50} , 可判定该项实验结果阳性。

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

3.5 小鼠碳廓清实验

3.5.1 原理

在一定范围内, 体内碳颗粒被清除速率与血碳浓度呈指数函数关系。

以血碳浓度对数值为纵坐标, 时间为横坐标, 两者呈直线关系。此直线斜率 (K) 可表示吞噬速率。动物肝、脾重量影响吞噬速率, 一般以校正吞噬指数 a 表示。

3.5.2 仪器和试剂

721 分光光度计、计时器、血色素吸管、印度墨汁、 Na_2CO_3

3.5.3 实验步骤

3.5.3.1 溶液配制

注射用墨汁 将印度墨汁原液用生理盐水稀释 3~4 倍。

Na_2CO_3 溶液 取 0.1g Na_2CO_3 , 加蒸馏水至 100mL。

3.5.3.2 注射墨汁 按体重从小鼠尾静脉注入稀释的印度墨汁 (10ml/kg), 待墨汁注入, 立即计时。

3.5.3.3 测定

注入墨汁后 2、10min, 分别从内眦静脉丛取血 20 μ L, 并立即将其加到 2mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中。用 721 分光光度计在 600nm 波长处测光密度值 (OD), 以 Na_2CO_3 溶液作空白对照, 也可用酶标仪在 600nm 波长处测光密度值 (OD)。

将小鼠处死, 取肝脏和脾脏, 用滤纸吸干脏器表面血污, 分别称重。

以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力。按下式计算吞噬指数 a 。受试样品组的吞噬指数显著高于对照组的

吞噬指数，可判定该项实验结果阳性。

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1}$$

$$\text{吞噬指数 } a = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{k}$$

3.5.4 数据处理及结果判定

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

3.5.5 注意事项

静脉注入碳粒的量、取血时间、取血量一定要准确。

墨汁放置中，碳粒可沉于瓶底，临用前应摇匀。

使用新的墨汁时，应在实验前摸索一个最适墨汁注入量，即正常小鼠在 20min 内不易廓清。

3.6 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

可任选下列方法之一。

3.6.1 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验（滴片法）

3.6.1.1 原理

利用巨噬细胞对光滑表面如玻璃表面具有粘附的特性，将含有巨噬细胞的腹腔液滴于载玻片上，加入鸡红细胞，孵育一定时间后，冲洗掉未粘附的细胞，固定染色，在显微镜下计数吞噬鸡红细胞的巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数，据此判定巨噬细胞的吞噬能力。

3.6.1.2 仪器和材料：

显微镜、37℃孵箱、计数器、手术器械一套、注射器、滴管、胶头吸管、吸耳球、载玻片、染色槽、试管

3.6.1.2.1 玻片处理

重复使用的载玻片要经洗液浸泡、洗净晾干后，经酒精浸泡过夜。用前以纱布拭干或晾干，否则会影响巨噬细胞粘附和镜检。在玻片上标号，用 3%琼脂（配方见试剂部分）每个玻片上划两个圆圈（圆圈必须全封闭，否则液体会流出），晾干备用。

3.6.1.2.2 搪瓷或塑料盒：内垫半湿纱布（用温水湿透，置于孵箱内备用），纱布一定要平整。

3.6.1.2.3 试剂配制方法

3.6.1.2.3.1 3%琼脂的配制：

取琼脂 3g，加水 100mL，加热煮沸至透明，加入 1%的溴甲酚紫指示剂 1—2 滴。

3.6.1.2.3.2 PBS 缓冲液的配制方法：

KH_2PO_4 6.66g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.38g, 将上述试剂溶于 1000mL 蒸馏水中调 pH 值至 7.2 即成。

3.6.1.2.3.3 1%鸡红细胞悬液:

实验前取鸡颈静脉或动脉血, 置于盛有玻璃珠(20个左右)的三角瓶内, 连续顺一个方向充分摇动 5~10min, 除去纤维蛋白, 4℃冰箱保存。实验前用生理盐水洗涤 3 次, 1500r/min, 离心 10min, 弃去上清, 按血球压积用 Hank's 液配制成 1%的红细胞悬液。

3.6.1.2.3.4 Giemsa 染液:

a.取 Giemsa 染料 0.5g, 中性甘油 33mL, 甲醇 33mL。先将 Giemsa 染料置清洁研钵中, 加甘油后, 研磨片刻, 倒入棕色瓶内, 放置 55~60℃水浴箱内 2 小时, 不断摇匀, 再加入甲醇摇匀, 保存备用。

b.稀释姬姆萨氏染色液: 使用时, 用 pH6.8 的缓冲液 8 份, 加姬姆萨氏染色液原液 1 份, 即成应用液。

3.6.1.2.3.5 Giemsa 染液脱色液: 配制方法: 甲醇 20mL, 蒸馏水 80mL。混合后加 2N HCl_2 滴即成。

3.6.1.3 实验步骤

小鼠巨噬细胞的激活:实验前 4 天给每只小鼠腹腔注射 2%压积羊红细胞 0.2mL。用颈椎脱臼法处死小鼠, 腹腔注射加小牛血清的 Hank's 液 4mL/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 2mL 于试管内(或用注射器)。用 1mL 加样器吸取腹腔洗液 0.5mL 加入盛有 0.5mL 1%鸡红细胞悬液的试管内, 混匀。用注射器(装大针头)吸取 0.5mL 混合液, 加入玻片的琼脂圈内。放置孵箱内 37℃孵育 15—20 分钟。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 分钟, Giemsa 液染色 15 分钟。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。吞噬率为每 100 个巨噬细胞中, 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞所占的百分率; 吞噬指数为平均每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的个数。

3.6.1.4 数据处理及结果判定

见 3.6.2.4.

3.6.1.5 注意事项

颈椎脱臼处死小鼠勿用力过大, 防止腹腔内血管和内脏破裂出血影响实验结果。

放滴片的搪瓷盘内应保持一定的湿度, 以防液体干燥。

孵育后的标本冲洗次数的差别不宜太大, 更不要直接冲在有细胞的部分。

实验操作过程中应严格掌握时间。

在镜下计数细胞时要数完一个视野后再换另一个视野。

3.6.2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)

3.6.2.1 原理

在体内腹腔巨噬细胞能吞噬鸡红细胞。据此判断巨噬细胞的吞噬功能。

3.6.2.2 仪器和材料

显微镜、鸡红细胞、丙酮、甲醇、生理盐水、Giemsa 染液。

3.6.2.3 实验步骤

3.6.2.3.1 鸡红细胞悬液制备 取鸡血置于有玻璃珠的锥形瓶中, 朝一个方向充分摇动, 以脱纤维。用生理盐水洗涤 2~3 次, 离心(2000r/min, 10min), 去上清, 用生理盐水配成 20% (v/v) 的鸡红细胞悬液。

3.6.2.3.2 吞噬功能测定 每鼠腹腔注射 20% 鸡红细胞悬液 1mL。间隔 30min-1.5h, 颈椎脱臼处死动物, 将

其仰位固定于鼠板上，正中剪开腹壁皮肤，经腹腔注入生理盐水 2mL，转动鼠板 1min。然后吸出腹腔洗液 1mL，平均分滴于 2 片载玻片上，放入垫有湿沙布的搪瓷盒内，移置 37℃ 孵箱温育 30min。孵毕，于生理盐水中漂洗，以除去未贴片细胞。晾干，以 1:1 丙酮甲醇溶液固定，4% (v/v) Giemsa-磷酸缓冲液染色 3min，再用蒸馏水漂洗晾干。

油镜下计数巨噬细胞，每张片计数 100 个，按下式计算吞噬百分率和吞噬指数。

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

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

在计数时，应同时观察鸡红细胞被消化的程度。借以判定巨噬细胞吞噬与消化功能，通常分为 4 级：

I 级：未消化。被吞噬的鸡红细胞完整，胞质浅红或浅黄带绿色，胞核浅紫色。

II 级：轻度消化。胞质浅黄绿色、胞核固缩呈紫蓝色。

III 级：重度消化。胞质淡染，胞核淡浅灰色。

IV 级：完全消化。巨噬细胞内仅见形态类似鸡红细胞大小的空泡，边缘整齐，胞核隐约可见。

3.6.2.4 数据处理及结果判定

以吞噬百分率或吞噬指数表示小鼠巨噬细胞的吞噬能力。吞噬百分率需进行数据转换， $X = \text{Sin}^{-1} \sqrt{p}$ ，式中 P 为吞噬百分率，用小数表示。在进行方差分析时，需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

受试样品组的吞噬百分率或吞噬指数与对照组比较，差异均有显著性，方可判定该项实验结果阳性。

3.7 NK 细胞活性测定

可任选下列方法之一

3.7.1 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定法

3.7.1.1 原理

正常情况下，活细胞胞浆内的含有 LDH 不能透过细胞膜，当细胞受到 NK 细胞的杀伤后，LDH 释放到细胞外。LDH 可使乳酸锂脱氢，进而使 NAD 还原成 NADH，后者再经递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 还原碘硝基氯化四氮唑蓝 (INT)，INT 接受 H^+ 被还原成紫红色甲臞类化合物。在酶标仪上用 490nm 比色测定。

3.7.1.2 仪器和材料

酶标仪、YAC-1 细胞、Hank's 液 (pH7.2~7.4)、RPMI1640 完全培养液、乳酸锂或乳酸钠、碘硝基氯化

四氮唑蓝(INT)、吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)、NAD、0.2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)、1%NP40 或 2.5%Triton

3.7.1.3 实验步骤

3.7.1.3.1 LDH 基质液的配制

乳酸锂 5×10^{-2} mol/L

碘硝基氯化四氮唑蓝 (INT) 6.6×10^{-4} mol/L

吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 2.8×10^{-4} mol/L

氧化型辅酶 I (NAD) 1.3×10^{-3} mol/L

将上述试剂溶于 0.2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中 (pH8.2)

3.7.1.3.2 靶细胞的传代 (YAC-1 细胞)

实验前 24h 将靶细胞进行传代培养。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。

3.7.1.3.3 脾细胞悬液的制备 (效应细胞)

无菌取脾, 置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中, 用镊子轻轻将脾磨碎, 制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤, 或用 4 层纱布将脾磨碎, 或用 Hank's 液洗 2 次, 每次离心 10min (1000r/min)。弃上清将细胞浆弹起, 加入 0.5mL 灭菌水 20 秒, 裂解红细胞后再加入 0.5mL 2 倍 Hank's 液及 8mL Hank's 液, 1000r/min, 10min 离心; 或采用 NH_4Cl -Tris 红细胞裂解液裂解红细胞, 离心 10min (1000r/min), 弃红色上清。用 1mL 含 10%小牛血清的 RPMI1640 完全培养液重悬, 用 1%冰醋酸稀释后计数 (活细胞数应在 95%以上), 用台盼兰染色计数活细胞数 (应在 95%以上), 最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 2×10^7 个/mL。

3.7.1.3.4 NK 细胞活性检测

取靶细胞和效应细胞各 100 μL (效靶比 50:1), 加入 U 型 96 孔培养板中; 靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100 μL , 靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1%NP40 或 2.5%Triton 各 100 μL ; 上述各项均设三个平行孔, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4h, 然后将 96 孔培养板以 1500r/min 离心 5min, 每孔吸取上清 100 μL 置平底 96 孔培养板中, 同时加入 LDH 基质液 100 μL , 根据室温不同反应 3~10min, 每孔加入 1mol/L 的 HCl 30 μL , 在酶标仪 490nm 处测定光密度值 (OD)。

按下式计算 NK 细胞活性, 受试样品组的 NK 细胞活性显著高于对照组的 NK 细胞活性, 即可判定该项实验结果阳性。

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

3.7.1.4 数据处理及结果判定

NK 细胞活性需进行数据转换, $X = \text{Sin}^{-1} \sqrt{p}$, 式中 P 为 NK 细胞活性, 用小数表示, 然后再进行方差分析, 需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, $F \text{ 值} < F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; $F \text{ 值} \geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

受试样品组的 NK 细胞活性显著高于对照组的 NK 细胞活性, 可判定该项实验结果阳性。

3.7.1.5 注意事项

靶细胞和效应细胞必须新鲜，细胞存活率应大于 95%。

反应时环境温度应保持恒定。

LDH 基质液应临用前配制。

在一定范围内，NK 细胞活性与效靶比值成正比。一般效靶比值不应超过 100。

3.7.2 同位素 $^3\text{H-TdR}$ 测定法

1.3.7.2.1 原理

将用同位素 $^3\text{H-TdR}$ 标记的靶细胞与淋巴细胞共同培养时，靶细胞可被 NK 细胞杀伤。同位素便从被杀伤的靶细胞中释放出来，其释放的量与 NK 细胞活性成正比。通过测定靶细胞 $^3\text{H-TdR}$ 的释放率即可反应 NK 细胞的活性。

3.7.2.2 仪器和材料

液体闪烁仪、多头细胞收集器、二氧化碳培养箱、 $^3\text{H-TdR}$ 、RPMI1640 完全培养液、Hank's 液 (pH7.2~7.4)、YAC-1 细胞、Triton X-100

3.7.2.3. 实验步骤

3.7.2.3.1 靶细胞的标记

取传代后 24h 生长良好的 YAC-1 细胞 (存活率>95%) 按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ YAC-1 细胞悬液加 $^3\text{H-TdR}$ 10uCi 进行标记，于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 2h，每 30min 振荡 1 次。标记后的细胞用培养液洗涤 3 次，重悬于培养液中，使细胞浓度为 1×10^5 个/mL。

3.7.2.3.2 脾细胞悬液的制备 (效应细胞)

无菌取脾，置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中，用镊子轻轻将脾撕碎，制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤，用 Hank's 液洗 3 次，每次离心 10min (1000r/min)。然后将细胞悬浮于 2mL 的完全培养液中，用台盼兰染色计数活细胞数 (应在 95%以上)，最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL。

3.7.2.3.3 NK 细胞活性测定

在 96 孔培养板中每孔加 100 μL 标记的靶细胞，实验孔加 100 μL 效应细胞，空白对照孔加 100 μL 培养液，最大释放孔加 100 μL 2.5% Triton X-100。每个样品设 3 个复孔，置 5% CO_2 、 37°C 培养箱内温育 4h，用多头细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤纸上，用液体闪烁仪进行测量。

按下式计算 NK 细胞活性：

$$\text{NK 细胞活性(\%)} = \left(1 - \frac{\text{实验孔 cpm}}{\text{空白对照孔 cpm} - \text{最大释放孔 cpm}} \right) \times 100\%$$

3.7.2.4 数据处理及结果判定

NK 细胞活性需进行数据转换， $X = \text{Sin}^{-1} \sqrt{p}$ ，式中 P 为 NK 细胞活性，用小数表示。在进行方差分析时，需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值，F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性；F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

受试样品组的 NK 细胞活性显著高于对照组的 NK 细胞活性，可判定该项实验结果阳性。

4. 有助于增强免疫力结果判定

有助于增强免疫力判定：在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核—巨噬细胞功能、NK 细胞活性四个方面任两个方面结果阳性，可判定该受试样品具有有助于增强免疫力作用。

其中细胞免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定细胞免疫功能测定结果阳性。体液免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定体液免疫功能测定结果阳性。单核—巨噬细胞功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定单核—巨噬细胞功能结果阳性。NK 细胞活性测定实验的一个以上剂量组结果阳性，可判定 NK 细胞活性结果阳性。