

健康食品之免疫調節功能評估方法

壹、前言

健康食品的免疫調節功能評估，是針對包括非特異性及特異性免疫功能之評估。所謂非特異性免疫力主要包括如中性白血球(neutrophils)及單核球(monocytes)的吞噬能力或是自然殺手細胞的活性(natural killer activity)。而特異性免疫力主要是針對一些特定的抗原作進一步的評估，在老鼠身上可以利用外加注射一些特定的抗原，再進行抗原特異性免疫反應的評估，其中可以包括如特異性抗體的測定或是抗原特異性的 T 細胞增殖反應和細胞激素的研究。至於人體的抗原特異性免疫力的評估，則可能必須與疫苗注射來合併進行。同時，如果要評估免疫細胞的功能時，應該分別由質與量兩方面來加以分析。量方面主要是測定各種免疫細胞的數目，目前利用螢光流體計數儀可以容易地將免疫細胞正確地計算出。由於免疫功能在正常人或是為數不少的疾病都扮演著一個重要的關係，未來如果要更正確地評估健康食品在這些免疫疾病上的可能調節功能，也許需要另外建立動物模式或是經由人體的臨床試驗來加以評估這些功能。

貳、實驗方法

一、動物實驗

實驗動物：建議選用小鼠，常用的 Balb/c 或是 B6 小鼠皆可，6-8 週大，雄鼠或雌鼠皆可，每組隻數為單一性別至少 10 隻。

(一) 非特異性免疫反應：

1. 脾臟或是淋巴結細胞增殖反應：

- T 細胞建議使用如 Con A 或是 Phytohaemagglutinin(PHA)的裂殖素(mitogen)，或是利用交叉連結(cross-linking)抗 CD3 抗體來刺激。
- B 細胞建議使用 Lipopolysaccharide (LPS)來刺激。

進行步驟：

(1) ³H-thymidine incorporation 法：

方法較靈敏，將脾臟細胞 2×10^6 /ml 置於 96-well plate, 再加入 Rosewell Park Memorial Institute 培養基(RPMI)或添加有 LPS, Con A, PHA 等細胞裂殖素的培養基。於 37°C CO₂ 培養兩天後，加入 1 μCi/well ³H-thymidine，繼續培養 20 小時後，以 cell harvester 收集細胞於濾紙上，濾紙風乾後以閃爍計數儀測 ³H-thymidine 含量，計算細胞增生能力。

(2) MTT 法：

MTT 的測定方法基本上是利用細胞本身的酵素對受質的作用，產生顏色的變化，再進一步測定其吸光值。如果細胞受到細胞裂殖素的刺激，增生越多，則活的細胞愈多，酵素的活性就會較高，可以測到較高的吸光值。利用此一原理，也可以來測定細胞的增殖反應，但是此種測定方法通常對附著性細胞的準確度較高，對懸浮性細胞則較不理想，進行本實驗時應特別注意。

(3) 螢光流體計數儀來測定 DNA 的染色：

利用螢光染色的方法來分析細胞是否受到刺激，細胞核內的 DNA 是否有任何變化，可以利用 Propidium iodide (PI) 及 bromodeoxyuridine (BrdU) 的方法來染色。PI 可以在染色後直接利用螢光流體計數儀加以分析，但是 BrdU 的方法則需要再加上一個抗 BrdU 的單株抗體加上螢光，才能利用螢光流體計數儀來加以分析。為了進一步分析是那些細胞的 DNA 有增加的變化，可以同時對這些細胞進行表面標記的分析。如利用抗 CD3 及抗 B220 抗體先行染色，再將細胞加以固定，然後進行 DNA 的染色。對細胞的表面標記及細胞內的 DNA 螢光使用不同波長的螢光，以便能夠在儀器上能對這兩群不同的細胞進行分析。如果能夠達到此一目的，便能夠不需要將細胞分離出就可以知道是那些細胞受到活化。

2. 抗體分泌實驗

血液中免疫球蛋白濃度：目前測定血清內免疫球蛋白的濃度，最常利用到的方法為 Radio immunodiffusion (RID) 法，此種方法在使用上較為方便，只要將血清放入培養孔中，靜置 24 至 48 小時後，再測量其直徑大小，與標準值對照，便可以算出免疫球蛋白濃度。除此外，也可以利用 sandwich-ELISA，或是生化的方法將免疫球蛋白的濃度計算出來，但是生化的方法可能必須在較具規模的醫學中心才能作得到。

3. 細胞激素分泌實驗

將分離出的淋巴球以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的濃度置於 24-well 的 Plate 中，利用已經定量過的 Con A 或抗 CD3 抗體來刺激這些淋巴球。經過 24 到 48 小時的培養後，將上層液離心下來，以測定其淋巴介質製造的量。在取得足夠檢體以前，可將其它檢體先保存在 -70°C ，等到檢體足夠時再一起測試。淋巴介質的測定是利用 sandwich-ELISA 法。先利用一個抗淋巴介質的抗體先覆蓋在 ELISA plate 上，在 4°C 靜置一晚。在進行實驗前以 1% PBS-BSA 處理後清洗之。再將要處理的檢體加到 plate 上，置於室溫 2 小時後加入 biotin 聯結的抗淋巴介質抗體。兩小時的室溫靜置後，加入 avidin 聯結過氧化酵素 (avidin-linked peroxidase)，再靜置二個小時後加入受質以呈色。上述的裂殖素的濃度及刺激時間在實驗進行之前都應先測定其最適當的濃度，並以已知濃度的淋巴介質作為對照。

4. 分離脾臟細胞及表面標記分析：

利用頸椎脫臼法分別犧牲老鼠，將脾臟取出並製備成單一細胞懸浮液，更進一步利用 Tris-Ammonium chloride 緩衝液將紅血球懸浮，而白血球則利用 Hank's 溶液清洗三次後再進行下一步的實驗。將單一白血球分離出後，利用 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 Phycoerythrin (PE) 染色的單株抗體來計算不同表面標記的比例及數目。這些細胞表面標記的測定將利用於 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) 分析法。

5. 自然殺手細胞活性:

為要測定實驗動物之自然殺手細胞的活性，可以先培養自然殺手細胞的標的細胞（YAC-1 細胞株）。原則上也是將 YAC-1 細胞與 ^{51}Cr 先在一起培養約 4 小時，再將殘餘在試管中而未移除的 ^{51}Cr 除去。此時再加入不同數目的單核球（monocyte）與已經與 ^{51}Cr 培養過的標的細胞一起培養，在培養一段時間後取出上清液，放入 γ -counter 內計算其放射強度。在實驗的過程中，利用 NP-40 或是 HCl 將細胞破壞，以取得 ^{51}Cr 的最高釋放值。

$$\text{計算公式} = \frac{\text{實驗值} - \text{背景值}}{\text{最高釋放值} - \text{背景值}} \times 100\%$$

6. 吞噬細胞活性：

吞噬細胞可以分別測定單核球(monocyte)或是中性白血球的吞噬能力，目前可以分別利用吞噬細菌如 E. coli、yeast 等方法來加以測定，也可以利用已標記好的 E. coli(如螢光)，在細胞吞噬後利用螢光流體計數儀來加以分析。

(二)特異性免疫反應

以卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) (或其他抗原如羊紅血球)對老鼠行腹腔注射，以得到抗體生成的曲線圖及時間表。老鼠在餵食一個月的飲食後，先採血，以作為整個實驗過程的基本值。開始注射卵白蛋白 OVA 致敏老鼠，以得到 OVA 特異性 IgG 及 IgM 的產生。每隻老鼠注射 $2\mu\text{l}$ Complete Freund's Adjuvant 入腹腔內，兩週後再腹腔注射 $6\mu\text{l}$ Incomplete Freund's Adjuvant 為追加致敏。定期採血以追蹤血清中 OVA 特異性 IgG 及 IgM 的濃度。

光值。

1. OVA 誘發的特異性抗體產生

首先以 $100\mu\text{l}$ 的 $10\mu\text{g/ml}$ OVA 覆蓋在 ELISA plate 上置放在 4°C 過夜。翌日將抗原沖洗乾淨後加上 $200\mu\text{l}$ 1% BSA-PBS 來當阻斷性溶液，置於室溫 2 小時或 4°C 過夜。將 1% BSA-PBS 沖洗乾淨後加入欲測的血清樣本，置於室溫 2 小時。再加入 biotin-聯結性兔子對抗老鼠 IgG 或 IgM 抗體，再靜置 2 小時。沖洗乾淨後再加入 avidin-linked peroxidase，靜置 2 小時。最後加入 ABTS 顯色劑呈色約 30 分鐘，以 5% SDS 停止反應後判讀其吸光值。

2. OVA-特異性的 T 細胞增殖反應

將脾臟細胞 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 置於 96-well plate, 再加入 RPMI 培養基或添加有 OVA 的培養基。於 37°C 的 CO_2 培養箱兩天後，加入 $1\mu\text{Ci/well}$ ^3H -thymidine，繼續培養 20 小時後，以 cell harvester 收集細胞於濾紙上，濾紙風乾後，以閃爍計數儀測 ^3H -thymidine 含量，以計算細胞增生能力。

3. OVA-特異性的細胞激素製造

將分離出的淋巴球以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的濃度置於 24-well 的 Plate 中，以已知濃度的 OVA 抗原共同培養來刺激淋巴球。經過 24 到 48 小時的培養後，取上層液以測定其淋巴介質分泌量。淋巴介質的測定基本上是利用 sandwich-ELISA 法。簡言之，是先利用一個抗淋巴介質的抗體先覆蓋在 ELISA plate 上，在 4°C 靜置一晚。在進行實驗前先以 1% PBS-BSA 處理，再加以清洗。然後將欲測定之上清液加到 ELISA plate 上，置於室溫兩小時後再加入 biotin 聯結的抗淋巴介質抗體。室溫靜置 2 小時後再加入 avidin-linked peroxidase，靜置 2 小時後，加入受質呈色。

4. 遲發性過敏反應 (delayed-type hypersensitivity) 檢測：

先將卵蛋白或是綿羊紅血球 (SRBC) 以皮下注射方式注入小鼠左後肢，經 4 天後測量其足蹠腫脹厚度。再將卵蛋白或是 SRBC 以皮下注射方式注入小鼠右後肢，經 24 小時後測量其足蹠腫脹厚度。比較對照組與實驗組小鼠之足蹠厚度增加數值，作為遲發性過敏反應之分析依據。

二. 人體的臨床試驗：

人體試驗的免疫功能評估，原則上與動物的評估近似，惟進行人體的臨床試驗之前應經過各醫院的人體試驗委員會通過才能加以進行。

(一) 非特異性免疫反應：

1. 周邊血液單核球(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)的反應：

- T細胞建議使用如 Con A 或是 PHA 的裂殖素(mitogen)，或是利用交叉連結抗 CD3 抗體來刺激
- B細胞建議使用 Pokeweed mitogen(PWM)來刺激

進行步驟：

(1) ^3H -thymidine incorporation 法：

方法較靈敏，將 PBMC $2 \times 10^6/\text{ml}$ 置於 96-well plate，再加入 RPMI 培養基或添加有 LPS (lipopolysaccharide)，Con A, PHA, PWM 等細胞裂殖素的培養基。於 37°C CO_2 培養箱兩天後，加入 $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ ^3H -thymidine，繼續培養 20 小時後，以 cell harvester 收集細胞於濾紙上，濾紙風乾後以閃爍計數儀測 ^3H -thymidine 含量，計算細胞增生能力。

(2) MTT 法：

MTT 的測定方法基本上是利用細胞本身的酵素對受質的作用，產生顏色的變化，再進一步測定其吸光值。如果細胞受到細胞裂殖素的刺激，增生越多，活的細胞愈多，則酵素的活性就會較高，可以測到較高的吸光值。利用此一原理，也可以來測定細

胞的增殖反應，但是此種測定方法通常對附著性細胞的準確度較高，對懸浮性細胞則較不理想，進行本實驗時應特別注意。

(3) 螢光流體計數儀來測定 DNA 的染色：

利用螢光染色的方法來分析細胞是否受到刺激，細胞核內的 DNA 是否有任何變化，可以分別利用 Propidium iodide (PI) 及 bromodeoxyuridine (BrdU) 的方法來染色。PI 可以在染色後直接利用螢光流體計數儀加以分析，但是 BrdU 的方法則需要再加上一個抗 BrdU 的單株抗體加上螢光，才能利用螢光流體計數儀來加以分析。為了進一步分析是那些細胞的 DNA 有增加的變化，同時對這些細胞進行表面標記的分析。如利用抗 CD3 及抗 B220 抗體先行染色，再將細胞加以固定，然後進行 DNA 的染色。可以對細胞的表面標記及細胞內的 DNA 螢光使用不同波長的螢光，以便能夠在儀器上能對這兩群不同的細胞進行分析。如果能夠達到此一目的，便能夠不需要將細胞分離出就可以知道是那些細胞受到活化。

2. 抗體分泌實驗

血液中免疫球蛋白濃度：目前測定血清內免疫球蛋白的濃度，最常利用到的方法為 radio immunodiffusion (RID) 法，此種方法在使用上較為方便，只要將血清放入培養孔中，靜置 24 至 48 小時後，再測量其直徑大小，與標準值對照，便可以算出免疫球蛋白濃度。除此外，也可以利用 sandwich-ELISA，或是生化的方法將免疫球蛋白的濃度計算出來，但是生化的方法可能必須在較具規模的醫學中心才能作得到。

3. 細胞激素分泌實驗

將分離出的淋巴球以 2×10^6 /ml 的濃度置於 24-well 的 Plate 中，利用已經定量過的 Con A 或抗 CD3 抗體來刺激這些淋巴球。經過 24 到 48 小時的培養後，將上層液離心下來，以測定其淋巴介質製造的量。在取得足夠檢體以前，可將其它檢體先保存在 -70°C ，等到檢體足夠時再一起測試。淋巴介質的測定是利用 sandwich-ELISA 法。先利用一個抗淋巴介質的抗體先覆蓋在 ELISA plate 上，在 4°C 靜置一晚。在進行實驗前先以 1% PBS-BSA 處理後清洗之。再將要處理的檢體加到 plate 上，置於室溫 2 小時後加入 biotin 聯結的抗淋巴介質抗體。兩小時的室溫靜置後，加入 avidin 聯結過氧化酵素 (avidin-linked peroxidase)，再靜置二個小時後加入受質以呈色。上述的裂殖素的濃度及刺激時間在實驗進行之前都應先測定其最適當的濃度，並以已知濃度的淋巴介質作為對照。

4. 自然殺手細胞活性

為要測定實驗動物之自然殺手細胞的活性，我們先培養自然殺手細胞的標的細胞 (K-562 細胞株)。原則上也是將 K-562 細胞與 ^{51}Cr 先在一起培養約 4 小時，再將殘餘在試管中而未移除的 ^{51}Cr 除去。

此時再加入不同數目的單核球與已經與 ^{51}Cr 培養過的標的細胞一起培養，在培養一段時間後取出上清液，放入 γ -counter 內計算其放射線強度。在實驗的過程中，利用 NP-40 或是 HCl 將細胞破壞，以取得 ^{51}Cr 的最高釋放值。

$$\text{計算公式} = \frac{\text{實驗值} - \text{背景值}}{\text{最高釋放值} - \text{背景值}} \times 100\%$$

5. 吞噬細胞活性：

吞噬細胞可以分別測定單核球或是中性白血球的吞噬能力，目前可以分別利用吞噬細菌如 *E. coli*、yeast 等方法來加以測定，也可以利用已標記好的 *E. coli*(如螢光)，在細胞吞噬後利用螢光流體計數儀來加以分析。

6. 周邊血液單核球的表面標記分析：

人類的周邊血液單核球的表面標記分析，利用含有 sodium citrate 的試管來收集檢體，再利用 FITC 及 PE 染色的單株抗體來計算不同表面標記的比例及數目。這些細胞表面標記的測定將利用於 FACS 分析法。

(二)特異性免疫反應

人體的特異性免疫反應的評估主要是利用疫苗的接種，來評估其反應。建議的疫苗為破傷風類毒素(tetanus toxoid, TT)，由於破傷風經常使用到，而且得到的結果顯示也可以達到相當理想的免疫反應，所以可以利用 TT 來進行此類的評估。其他的疫苗也可以加以考慮，可以配合人體試驗時是否正在注射相關的疫苗來加以考量。

1. TT 誘發的特異性抗體產生

將 100 μl 的 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TT 覆蓋在 ELISA plate 上，置放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 過夜。翌日將抗原沖洗乾淨後加上 200 μl 1% BSA-PBS 來當阻斷性溶液，置於室溫 2 小時或 4 $^{\circ}\text{C}$ 過夜。將 1% BSA-PBS 沖洗乾淨後加入欲測的血清樣本，置於室溫 2 小時。再加入 biotin-聯結性兔子對抗人類 IgG 或 IgM 抗體，再靜置 2 小時。沖洗乾淨後再加入 avidin-linked peroxidase，靜置 2 小時。最後加入 ABTS 顯色劑呈色約 30 分鐘，以 5% SDS 停止反應後判讀其吸光值。

2. TT-特異性的 T 細胞增殖反應

將 PBMC 2x 10 6 /ml 置於 96-well plate，再加入 RPMI 培養基或添加有 OVA 的培養基。於 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO $_2$ 培養箱兩天後，加入 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ^3H -thymidine，繼續培養 20 小時後，以 cell harvester 收集細胞於濾紙上，濾紙風乾後，以閃爍計數儀測 ^3H -thymidine 含量，以計算細胞增生能力。

3. TT-特異性的細胞激素製造

將分離出的淋巴球以 2×10^6 /ml 的濃度置於 24-well 的 Plate 中，以已知濃度的 TT 抗原共同培養來刺激淋巴球。經過 24 到 48 小時的培養後，取上層液以測定其淋巴介質分泌量。淋巴介質的測定基本上是利用 sandwich-ELISA 法。簡言之，是先利用一個抗淋巴介質的抗體先覆蓋在 ELISA plate 上，在 4°C 靜置一晚。在進行實驗前先以 1% PBS-BSA 處理，再加以清洗。然後將欲測定之上清液加到 ELISA plate 上，置於室溫 2 小時後再加入 biotin 聯結的抗淋巴介質抗體。室溫靜置 2 小時後再加入 avidin-linked peroxidase，再靜置 2 小時後，加入受質呈色。

4. 遲發性過敏反應 (delayed-type hypersensitivity, DTH) 檢測：

人體的延遲性過敏反應是利用已經製成商業製劑的套組來進行，這些製劑中的常用抗原包括 TT、白色念珠菌等抗原。要測定這些抗原的 DTH，係將這些抗原注射入皮內，再分別經過 24 及 48 小時，分別記錄皮膚的紅腫直徑範圍。其結果也應該與正常人的反應作一個比較。

上述的免疫評估是指一般免疫功能的評估，如果要進一步探討如對病毒感染、過敏疾病、風溼病或是腫瘤的免疫功能，應該另外建立動物模式或是進行相關的人體臨床試驗來加以評估。

參、評估方法之原則要求

建議依照上述實驗項目及方法，可以分別針對非特異性及特異性免疫功能的評估而決定其實驗項目。

肆、結果判定之基準

判定的基準原則上依據上述實驗項目及方法進行相關研究，統計分析有意義者判定其功能。