

自制酸奶乳脂中 $c9,t11$ - 共轭亚油酸对小鼠免疫调节作用的影响

王璇琳¹, 檀英霞¹, 郁成雨¹, 李素波¹, 贺敏¹, 李伟静¹, 陈炳卿², 于群^{1,*}

(1.北京军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850; 2.哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:应用乳酸菌发酵法, 添加适当底物和营养物质, 实验室自制含共轭亚油酸(CLA)的酸奶, 经过提取乳脂、气相色谱检测并对 CLA 定量后, 确定给予小鼠受试物剂量组, 进行共轭亚油酸酸奶的免疫调节功能实验。结果表明: 灌胃给予小鼠含 0.05g/(kg bw · d) $c9,t11$ -CLA 的乳脂, 30d 后可增强小鼠的免疫调节功能, 说明酸奶中的 $c9,t11$ -CLA 能够显著增加小鼠免疫调节能力。

关键词:乳酸菌发酵; 共轭亚油酸; 乳脂; 免疫调节

Immunoregulatory Effect of Laboratory Prepared Yogurt containing $c9, t11$ - Conjugated Linoleic Acid in Mice

WANG Xuan-lin¹, TAN Ying-xia¹, YU Cheng-yu¹, LI Su-bo¹, HE Min¹, LI Wei-jing¹, CHEN Bing-qing², YU Qun^{1,*}

(1. Beijing Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: A yogurt with $c9, t11$ -conjugated linoleic acid (CLA) was prepared by adding suitable substrate and nutrients to milk for Lactobacillus fermentation. Milk fat was extracted and CLA was quantitatively determined by gas chromatography to design the administration dosage and study the immunoregulatory function of CLA in mice. Results indicated that the administration of CLA at a dose of 0.05 g/kg bw · d for 30 consecutive days could significantly enhance immunoregulatory function in mice. This fact demonstrates an excellent immunoregulatory effect of CLA in mice.

Key words: Lactobacillus fermentation; $c9, t11$ -conjugated linoleic acid (CLA); milk fat; immunoregulation

中图分类号: O547

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0288-05

共轭亚油酸(CLA)主要存在于反刍动物的肉和乳制品中, 由于瘤胃中的溶纤维丁酸弧菌能使亚油酸(LA)异构为 CLA, 因此采用微生物发酵法产生富含 CLA 的食品应该是有效、可行的方法。乳酸菌中含有 LA 异构酶, 作用于 LA 的 C12 双键将 LA 转化为 $c9,t11$ -CLA, 这也为研究提供了理论基础。本研究在前期实验室工作基础上, 按照酸奶的制作工艺, 自制含有 CLA 的酸奶, 并经过提取乳脂肪、气相色谱对 CLA 定量, 确定小鼠免疫调节实验研究的给予剂量, 进行共轭亚油酸酸奶的免疫调节功能实验。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

提取原料牛奶中的脂肪, 经气相色谱检测不含 $c9,t11$ -CLA, 即不含 $c9,t11$ -CLA 的乳脂肪; 提取自制酸奶脂肪, 经气相色谱检测含有 $c9,t11$ -CLA, 并进行准确定量为实验受试物。

都氏试剂: 碳酸氢钠 1.0g、高铁氰化钾 0.2g、氰化钾 0.05g、蒸馏水 1000mL。

补体的制备: 将采集后的豚鼠血以 2000r/min 离心 5min, 抽取上清液, 再次以 3000r/min 离心 5min, 用绵羊红细胞(SRBC)与豚鼠血清按体积比 1:5 混合, 放入 4℃ 冰箱中, 经常温振荡 30min, 取出后再次离心, 取上清。分装, 于 -70℃ 保存备用, 即成补体, 用时以补体与 SA 液按体积比 1:8 稀释。

SA 储备液的配制: MgCl₂ · 6H₂O 0.5g、巴比妥

收稿日期: 2009-04-21

作者简介: 王璇琳(1973—), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事具有抗肿瘤作用植物化学物的筛选及其作用机制研究。

E-mail: wxl-ss@163.com

* 通信作者: 于群(1970—), 男, 副研究员, 博士, 主要从事免疫学研究。E-mail: yuq@nic.bmi.ac.cn

酸 2.3g、氯化钙 0.74g、氯化钠 41.9g、碳酸氢钠 1.26g、巴比妥 1.5g, 将上述试剂按顺序溶于 800mL 高纯水中, 加热溶解, 待冷却后定容至 1000mL, 4℃ 保存。

SA 应用液的配制: 将储备液用高纯水作 5 倍稀释, 即 1 份储备液加入 4 份高纯水。

Giemsa 染液(原液)配制: 取 Giemsa 染料 0.5g 放入清洁的研钵中, 加入中性甘油 33mL, 研磨片刻, 倒入棕色瓶内, 55~60℃ 水浴 2h, 不断摇匀, 取出后加入 33mL 甲醇, 备用。

Giemsa 染液(应用液)配制: 1 份 Giemsa 原液加入 8 份 pH6.8 的缓冲液, 即可。

1.2 实验动物与剂量分组

昆明种雄性小鼠, 体质量 18~22g, 购自哈尔滨医科大学公共卫生学院动物中心, 每组 10 只, 在整个实验过程中, 每周称 1 次体质量。剂量组如下:

空白对照组: 按小鼠体质量 1% 灌胃给予不含 $c9,t11$ -CLA 的乳脂肪; 0.05g/(kg bw · d) $c9,t11$ -CLA 剂量组: 取研制的酸奶乳脂肪, 准确定量为 10mg $c9,t11$ -CLA/g 脂肪, 取 10g 乳脂, 按小鼠体质量 1% 灌胃; 0.1g/(kg bw · d) $c9,t11$ -CLA 剂量组: 取研制的酸奶乳脂肪, 准确定量为 10mg $c9,t11$ -CLA/g 脂肪, 取 20g 乳脂, 按小鼠体质量 1% 灌胃。

1.3 仪器与设备

722 光栅分光光度计 山东高密分析仪器厂; 电子动物天平 日本岛津公司; AllegraTM64R 型低温高速离心机 美国 Bechman 公司; XW-80A 型漩涡混合器 上海医科大学仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 原料牛奶抗生素的检测及原料牛奶脂肪的提取

采用 2,3,5- 氯化三苯基四氮唑(TTC)实验方法, 取原料乳 9mL 置于试管中, 在 95℃ 水浴中杀菌 5min 后冷却至 37℃, 加入发酵剂菌液 1mL 搅拌均匀, 于 37℃ 水浴培养 2h, 加入 0.3mL TTC 液, 再于 37℃ 水浴继续培养, 此时进行观察, 如果原料奶呈红色则表明不含抗生素(阴性); 若原料奶不变色, 再于 37℃ 水浴中培养 0.5h, 第 2 次观察, 若不变色, 则说明原料乳中含有抗生素(阳性)。经检测不含抗生素的牛奶, 室温下 18000 × g 离心 30min, 取上层固体, 通过以下几个步骤进行脂肪提取: 1) 取 1g 样品加入具塞的 25mL 玻璃瓶中, 加入 18mL 正己烷-异丙醇(2:3, V/V) 混合溶液, 振摇 30s。2) 将 2mL 丙酮缓慢加入, 混合搅拌成乳浊液。3) 加入 Na_2SO_4 水溶液, 振摇 30s, 静止分层。4) 分离上层有机相, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 每 10mL 加入 1g Na_2SO_4 。5) 用定量分析滤纸过滤后, 在 40℃ 水浴上充氮气干燥。6) 将脂肪转移入玻璃小瓶, 充氮气后于 -40℃ 保存。

1.4.2 酸奶中脂肪的提取

样品与乙醚以体积比 1:1 混合, 于室温条件 18000 × g 离心 30min, 上层为乙醚层, 于 30℃ 减压回收乙醚, 脂肪移入玻璃瓶于 -40℃ 保存。

1.4.3 脂肪酸的甲酯化

提取的样品脂肪 1mL 加入 5mL 0.5mol/L 的 $\text{NaOH}-\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液中, 充氮气 1min。放入 60℃ 水浴中 1h, 进行皂化。取出放冷, 加入 5mL 体积分数 10% $\text{BF}_3-\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液, 充氮气 1min。放入 60℃ 水浴中 1h, 进行甲酯化。取出试管放至室温, 移至分液漏斗中, 加入正己烷萃取 3 次, 每次萃取充分振荡 5min, 萃取后 2000r/min 离心 10min。合并正己烷层, 用 4% NaHCO_3 水溶液洗 2 遍。正己烷用无水 Na_2SO_4 干燥 2h, 用定量滤纸过滤, 充氮气将溶剂吹干。精确称量内标物十七烷酸甲酯, 加入 1mL 处理的样品中, 等待上机检测。

1.4.4 样品中 $c9,t11$ -CLA 的含量检测

本实验采用气相色谱法进行原料牛奶及自制酸奶中 $c9,t11$ -CLA 的检测, 采用内标法进行 $c9,t11$ -CLA 的准确定量, 以十七烷酸甲酯作为内标物, 纯度为 98% $c9,t11$ -CLA 作为标准品。样品经过脂肪的提取、脂肪酸的甲酯化、上机检测, 并与 $c9,t11$ -CLA 标准品气相色谱图对照, 检测样品中的 $c9,t11$ -CLA, 计算所研制酸奶中 $c9,t11$ -CLA 的含量。

小鼠分别给予不含 $c9,t11$ -CLA 的乳脂与含有 $c9,t11$ -CLA 的乳脂, 连续灌胃 30d 后, 进行下面的实验内容。

1.4.5 绵羊红细胞(SRBC)诱导小鼠 DHT

SRBC 可刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞, 4d 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。

用体积分数 2% SRBC 腹腔免疫, 每只鼠注射 0.2mL (约 1×10^8 个 SRBC)。免疫 4d 后, 测量左后足跖部厚度, 然后在测量部位皮下注射体积分数 20% SRBC, 每只鼠 20 μL (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 3 次, 取平均值。

1.4.6 半数溶血值(HC_{50})的测定

用 SRBC 免疫动物后, 血清中出现 SRBC 抗体(溶血素), 在补体的参与下, 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。

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。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℃ 冰箱 30min, 经常振荡, 离心取上清, 分装, -70℃ 保存。用时以 SA 液按体积比 1:8 稀释。取

羊血,用生理盐水洗涤3次,2000r/min离心10min。将积压SRBC用生理盐水配成体积分数2%的细胞悬液,每只鼠腹腔注射0.2mL进行免疫。4~5d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离心4min,收集血清。取血清用SA缓冲液稀释250倍。将稀释后的血清1mL置试管内,依次加入体积分数10%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30min后,冰浴终止反应。2000r/min离心10min,取上清1mL,加都氏试剂3mL,同时取体积分数10%SRBC 0.25mL加都氏试剂至4mL,充分混匀,放置40min后,于540nm处以对照管作空白,分别测定各管光密度值。

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

1.4.7 小鼠碳廓清实验

在一定范围内,体内碳颗粒被消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、脾质量影响吞噬速率,一般以校正吞噬指数 a 表示。

小鼠尾静脉注射稀释的印度墨汁,按每10g体质量0.1mL计算。待墨汁注入,立即计时,注入墨汁后2、10min,分别从内眦静脉丛取血20 μ L,并将其加到2mL Na₂CO₃溶液中。用722分光光度计在600nm波长处测光密度值(OD_{600nm}),以Na₂CO₃溶液作空白对照。将小鼠处死,取肝脏和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,称质量。

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1} \quad \text{吞噬指数} = \frac{\text{体质量}}{\text{肝质量} + \text{脾质量}} \times K^{1/3}$$

式中: OD_1 和 OD_2 分别为反应10、20min时的光密度值; t_2 、 t_1 分别为10、2min。

1.4.8 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

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。

取鸡血置于有玻璃珠的锥形瓶中,朝一个方向摇动,以脱纤维,用生理盐水洗涤2~3次,2000r/min离心10min,去上清,用生理盐水配成体积分数20%的鸡红细胞悬液。每只鼠腹腔注射20%鸡红细胞悬液1mL,间隔30min,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,放入垫有湿纱布的搪瓷盒内,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,以体积比1:1的丙酮-甲醇溶液固定,4%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。

$$\text{吞噬率}/\% = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100$$

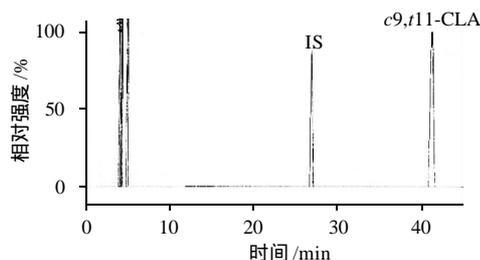
$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}}$$

1.4.9 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度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 $> F_{0.05}$, $P < 0.05$,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。

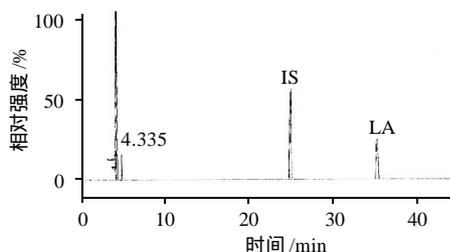
2 结果与分析

2.1 气相色谱检测酸奶中 $c_9,t11$ -共轭亚油酸的含量



IS峰:C_{17:0}脂肪酸甲酯;c_{9,t11}-CLA峰:c_{9,t11}-CLA甲酯。
图1 c_{9,t11}-CLA气相色谱图

Fig.1 Gas chromatogram of c_{9,t11}-CLA standard



IS峰:C_{17:0}脂肪酸甲酯;LA峰:LA甲酯。
图2 LA气相色谱图

Fig.2 Gas chromatogram of LA standard

经过脂肪提取，脂肪酸甲酯化，上机检测 3 个步骤，分别检测了 98% 的 *c9,t11*-CLA 标准品、亚油酸标准品、底物、原料牛奶(含有 *c9,t11*-CLA 和不含 *c9,t11*-CLA)、没有添加底物的研制酸奶、添加底物的研制酸奶中 *c9,t11*-CLA 的检测及含量测定，结果见图 1~7 和表 1。

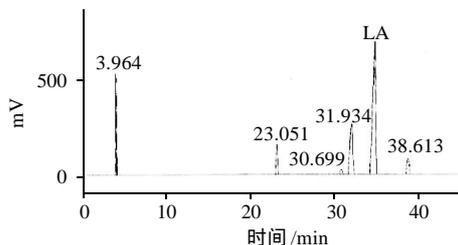


图3 底物甲酯气相色谱图

Fig.3 Gas chromatogram of methyl-esterified substrate

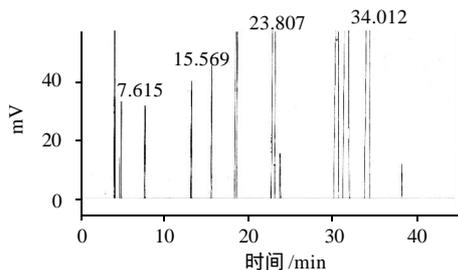


图4 无CLA的牛奶乳脂气相色谱图

Fig.4 Gas chromatogram of CLA-free milk

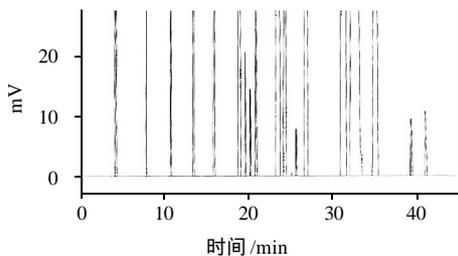


图5 含有CLA的牛奶乳脂气相色谱图

Fig.5 Gas chromatogram of milk with CLA

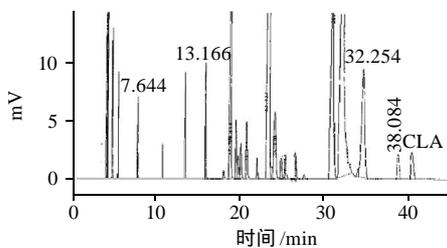


图6 无底物添加的酸奶乳脂气相色谱图

Fig.6 Gas chromatogram of yogurt without the addition of substrate

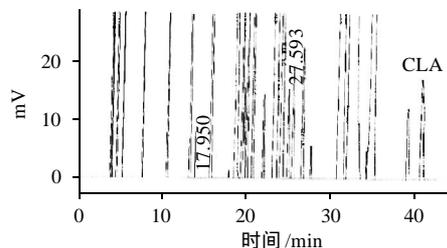


图7 添加底物的酸奶乳脂气相色谱图

Fig.7 Gas chromatogram of yogurt with the addition of substrate

表1 各种牛奶中 *c9,t11*-CLA 的含量

Table 1 Contents of total fat and *c9,t11*-CLA in whole milk and yogurt with and without CLA

样品	脂肪总量/(g/500mL)	<i>c9,t11</i> -CLA/(mg/g 脂肪)
全奶	13.5 ± 0.72	1.06 ± 0.25
无底物酸奶	12.5 ± 0.87	5.43 ± 0.70
添加底物酸奶	14.1 ± 1.25	10.4 ± 0.73

由图 1~7 和表 1 可知，与 98% *c9,t11*-CLA 标准品气相色谱图对照，原料牛奶中的 *c9,t11*-CLA 含量范围为：0~1.31mg/g 脂肪；未添加底物的酸奶 *c9,t11*-CLA 的含量平均为 5.43mg/g 脂肪；添加底物的酸奶 *c9,t11*-CLA 含量平均为 10.4 mg/g 脂肪；同时从气相色谱图上可以看出：添加的底物主要脂肪酸是牛奶乳脂中脂肪酸组成的一部分，说明添加的底物对人体是安全的。

2.2 免疫调节实验结果

2.2.1 *c9,t11*-CLA 对绵羊红细胞(SRBC)诱导小鼠DHT的影响

表2 DHT 检测结果

Table 2 Determination of DHT in mice orally administered CLA-containing yoghurt

实验组	样本数	0h小鼠足跖厚度/mm	24h小鼠足跖厚度/mm	24h与0h小鼠足跖厚度差值/mm
对照组	10	1.952 ± 0.0486	2.180 ± 0.1133	0.2286 ± 0.098
0.05g/(kg bw · d)	10	1.937 ± 0.0545	2.262 ± 0.0728	0.3256 ± 0.057*
0.1g/(kg bw · d)	10	1.922 ± 0.0506	2.310 ± 0.1206	0.3873 ± 0.1100**

注：*与对照组相比， $P < 0.05$ ；**与对照组相比， $P < 0.01$ 。表 5 同。

由表 2 可知，乳脂中含 *c9,t11*-CLA 0.05g/(kg bw · d) 剂量组与对照组相比，足跖增厚值高于对照组，具有显著性差异($P < 0.05$)；乳脂中 *c9,t11*-CLA 剂量为 0.1 g/(kg bw · d) 组与对照组相比，足跖增厚值高于对照组，具有极显著性差异($P < 0.01$)。

2.2.2 *c9,t11*-CLA 对半数溶血值(HC₅₀)的影响

由表 3 可知，乳脂中含 *c9,t11*-CLA 0.05g/(kg bw · d) 剂量组和乳脂中 *c9,t11*-CLA 0.1g/(kg bw · d) 剂量组与对照组相比，半数溶血值均高于对照组，具有极显著性差异($P < 0.01$)。

表3 半数溶血值实验结果

Table 3 Determination of half hemolytic value in mice orally administered CLA-containing yoghurt

组别	样本数	HC ₅₀
对照组	10	17.2 ± 5.28
0.05g/(kg bw · d)	10	33.7 ± 7.94**
0.1g/(kg bw · d)	10	37.9 ± 7.95**

注：**.与对照组相比， $P < 0.01$ 。

2.2.3 *c9,t11*-CLA 对小鼠碳廓清的影响

表4 小鼠碳廓清实验结果

Table 4 Determination of carbon expurgation in mice orally administered CLA-containing yoghurt

组别	样本数	吞噬指数
对照组	10	5.567 ± 0.7746
0.05g/(kg bw · d)	10	6.62 ± 0.9964*
0.1g/(kg bw · d)	10	6.82 ± 0.7997*

注：*.与对照组相比， $P < 0.05$ 。

由表4可知，乳脂中含 *c9,t11*-CLA 0.05g/(kg bw · d) 剂量组和乳脂中 *c9,t11*-CLA 0.1g/(kg bw · d) 剂量组与对照组相比，吞噬指数均高于对照组，具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2.4 *c9,t11*-CLA 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响

表5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验结果

Table 5 Determination of peritoneal macrophage phagocytosis in mice orally administered CLA-containing yoghurt towards chicken red blood cells

组别	样本数	吞噬指数	吞噬百分率/%
对照组	10	1.085 ± 0.2403	57.8 ± 7.51
0.05g/(kg bw · d)	10	1.593 ± 0.4937*	76.9 ± 6.38**
0.1g/(kg bw · d)	10	1.682 ± 0.5716*	81.4 ± 3.84**

由表5可知，乳脂中含 *c9,t11*-CLA 0.05g/(kg · d bw) 剂量组和乳脂中 *c9,t11*-CLA 0.1g/(kg bw · d) 剂量组与对照组相比，吞噬指数均高于对照组，具有显著性差异 ($P < 0.05$)；吞噬百分率均高于对照组，具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 酸奶中 *c9,t11*-CLA 的定量分析

气相色谱法是最佳的准确定量分析 CLA 的方法。气相色谱分析首先涉及到脂肪酸的甲酯化，这是一个非常关键的步骤。脂肪酸的甲酯化方法可分为两大类：酸催化法和碱催化法。本课题组曾经使用硫酸作为催化剂进行了脂肪酸甲酯的制备，发现脂肪酸的甲酯率较低，因此本实验改用了三氯化硼-甲醇甲酯化方法进行替代硫酸催化法，达到了较为理想的甲酯化效果。郑玉梅等^[1]曾采

用了程序升温法作为共轭亚油酸分析的气相色谱条件，由于奶及奶制品中 *c9,t11*-CLA 异构体占 90% 以上，因此本实验改用了 100 保持 5min，220 保持 40min 的气相色谱条件，将 *c9,t11*-CLA 出峰时间缩短了 2min。

反刍动物组织的奶中 CLA 含量的影响因素相当复杂，食用新鲜牧草的奶牛奶中 CLA 含量高于食用储存饲料的奶牛奶中的含量^[2]，CLA 的含量也随季节的变化而改变，夏季奶中 CLA 含量为冬季含量的 2 倍^[3]。原料奶中的 *c9,t11*-CLA 含量相当低，并且还有未检出的情况出现。经发酵后 CLA 的含量比原料奶中 CLA 含量提高了 4 倍，加入底物和添加剂后，CLA 含量又提高了 2 倍。说明这种方法可以显著提高奶中 CLA 含量，而且，添加底物的方式可以稳定的提高奶中 CLA 含量，解决了奶及奶制品中 CLA 含量不稳定的问题。同时从气相色谱图上可以看出，未检出 CLA 的原料奶中含有丰富的 LA，因此，菌株在发酵过程中将奶中 LA 自然转化为 CLA，这也是酸奶中 CLA 含量高于牛奶的原因。

3.2 酸奶中 *c9,t11*-CLA 免疫调节作用

CLA 生物学功能的研究已经涉及到抗癌、降低血脂、增强免疫、促进生长、抑制脂肪沉积等诸多方面。因此，有人提出 CLA 可能是以前未被认识的人体必需营养素之一^[4]。其中 CLA 的抗癌作用研究的最为深入，具有抗癌活性的主要是 *c9,t11*-CLA 异构体。研究发现^[5]，动物饲料中添加 1% 以下的 CLA，其抑制肿瘤的能力与剂量多少成正相关，而当含量超过 1% 的时候，其抑制肿瘤的功能将不再增加，能够抑制乳腺癌的 CLA 最低剂量为每日膳食量的 0.1%。文献报道^[6]中，CLA 的免疫调节实验研究应用剂量多为小鼠日膳食量的 1%，受试物为 CLA 的混合物。本动物实验设立了 1 个对照组和 2 个剂量组：灌胃给予小鼠含 0.05g/(kg bw · d) *c9,t11*-CLA 乳脂组和 0.1g/(kg bw · d) *c9,t11*-CLA 乳脂组，以探讨酸奶中 *c9,t11*-CLA 发挥免疫调节作用的剂量，结果表明：灌胃给予小鼠含 0.05g/(kg bw · d) *c9,t11*-CLA 的乳脂，30d 即可增强小鼠免疫功能。而且，含 *c9,t11*-CLA 的乳脂能增强细胞免疫功能、体液免疫功能和单核-巨噬细胞功能。

参考文献：

- [1] 郑玉梅, 陈炳卿, 杨艳梅, 等. 气相色谱分析法测定奶油中 *c9,t11*-共轭亚油酸的含量[J]. 中华预防医学杂志, 2002, 36(4): 264-266.
- [2] SHANTHA N C, DECKER E A, USTUNOL Z. Conjugated linoleic acid concentrations in processed cheese[J]. J Am Oil Chem Soc, 1992, 69: 425-428.
- [3] STANTON C, LAWLESS G, KJELLMER D, et al. Dietary influence on bovine milk *cis-9,trans-11*-conjugated linoleic acid content[J]. J Food Sci, 1997, 62: 1083-1086.
- [4] LIN T Y. Linoleic acid concentration as affected by lactis cultures and additives[J]. Food Chem, 2000, 69: 27-31.
- [5] IP C, CHIN S F, SCIMECA J A, et al. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid[J]. Cancer Res, 1991, 51(22): 6118-6124.
- [6] HAYEK M G, HAN S N, WU D, et al. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCR1BR mice[J]. J Nutr, 1999, 129(1): 32-38.