

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

灵芝三萜与灵芝多糖对人体免疫系统的双 效协同效果评价方法

Evaluation method for the dual synergistic effect of ganoderma triterpenes and
ganoderma polysaccharides on the human immune system

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

1	范围	1
2	规范性引用文件	1
3	术语和定义	1
4	基本原则	1
5	评价方法	2
6	数据处理与分析	6
7	结果判定	7
8	评价报告	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

灵芝三萜与灵芝多糖对人体免疫系统的双效协同效果评价方法

1 范围

本文件给出了灵芝多糖和灵芝三萜类化合物（以下简称“两种成分”）对人体免疫系统双效协同机制评价的基本原则、评价方法、数据处理与分析、结果判定及评价报告等方面的建议。

本文件适用于指导含灵芝多糖和灵芝三萜类化合物的食品、保健食品及相关研发样品的免疫协同机制评价。**不适用于药品范畴的评价。**

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 29344 灵芝孢子粉采收及加工技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

灵芝多糖 ganoderma polysaccharides

从灵芝子实体、菌丝体或孢子粉中提取分离得到的多糖类化合物，主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖等单糖通过糖苷键连接而成，具有多种活性。

3.2

灵芝三萜类化合物 triterpenoids

一类具有30个碳原子的萜类化合物，在灵芝中广泛存在，具有多种结构类型，如四环三萜、五环三萜等。

3.3

协同指数 combination index; CI

基于中效原理（Chou-Talalay 法）计算的定量指标，用于评价两种成分联合对免疫功能的相互作用， $CI < 1$ 表示协同作用， $CI = 1$ 表示相加作用， $CI > 1$ 表示拮抗作用。

3.4

免疫细胞活性 immune cell activity

免疫细胞执行免疫功能的能力，包括免疫细胞增殖能力、吞噬能力（巨噬细胞）、细胞毒性（NK 细胞、CD8+T 细胞）及细胞因子分泌能力（如 IL-2、IFN- γ ）。

4 基本原则

4.1 科学性原则

基于分子免疫学、细胞免疫学理论，采用经验证的实验技术（如流式细胞术、酶联免疫吸附测定法（ELISA）、四甲基偶氮唑盐比色法（MTT 法）），确保免疫指标检测结果可重复、可追溯；协同机制分析需结合“靶点互补性”（固有免疫 + 适应性免疫），避免单一指标判定偏差。

4.2 实用性原则

实验方法、操作流程及判定规则需具备可操作性，实验周期（细胞实验 ≤ 14 天，动物实验 ≤ 30 天）、试剂成本可控，适用于常规实验室及第三方检测机构。

4.3 安全性原则

评价协同机制时，需同步检测两种成分联合体系的安全性，细胞实验需检测对正常免疫细胞（如人外周血单个核细胞（PBMC））的毒性；动物实验需检测肝肾功能及是否引发过度免疫反应。

5 评价方法

5.1 体外细胞实验

5.1.1 试验材料及设备

5.1.1.1 样品

选用符合 GB/T 29344 要求的灵芝子实体，样品来源清晰可追溯。采用水提醇沉法，制备灵芝多糖；采用醇提萃取法，制备灵芝三萜类化合物。

5.1.1.2 试剂

5.1.1.2.1 蒸馏水：符合 GB/T 6682 中一级水要求。

5.1.1.2.2 胎牛血清（FBS）：无支原体、病毒污染，经 γ 射线灭活。

5.1.1.2.3 培养基：RPMI1640 培养基（用于免疫细胞培养）、DMEM 培养基（用于辅助细胞培养），添加 1% 双抗（青霉素 - 链霉素）。

5.1.1.2.4 免疫相关试剂：淋巴细胞分离液（密度 1.077 ± 0.001 g/mL）、CCK-8 试剂（检测细胞增殖）、免疫细胞表型检测试剂盒（抗人 CD3-PE、CD4-FITC、CD8-APC、CD56-PE-Cy7 抗体）、细胞因子检测试剂盒（ELISA 法，检测 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10）、中性红染液（0.4%，检测巨噬细胞吞噬功能）、植物血凝素（PHA，阳性对照，浓度 10 μ g/mL）。

5.1.1.2.5 其他试剂：磷酸缓冲盐溶液（PBS, pH7.2-7.4）、4% 多聚甲醛、0.22 μ m 滤膜，均为分析纯及以上级别，在有效期内使用。

5.1.1.3 仪器设备

5.1.1.3.1 超净工作台（生物安全二级）。

5.1.1.3.2 CO₂ 培养箱（温度控制精度 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ，CO₂ 浓度控制精度 $\pm 0.1\%$ ）。

5.1.1.3.3 流式细胞仪（配备 488 nm、633 nm 激光器，检测通道 ≥ 4 个）。

5.1.1.3.4 酶标仪（波长范围 400 nm~750 nm，精度 $\pm 1\%$ ）。

5.1.1.3.5 离心机（转速范围 0 r/min~ 15000 r/min，配备水平转子）。

5.1.1.3.6 移液器（量程 1 μ L~1000 μ L，精度 $\pm 2\%$ ）。

5.1.1.3.7 倒置显微镜（配备 10 \times 、20 \times 物镜）。

5.1.1.3.8 血细胞计数板（Neubauer 计数室）。

5.1.1.3.9 冰箱（4 $^\circ\text{C}$ 、-20 $^\circ\text{C}$ 、-80 $^\circ\text{C}$ ）。

5.1.2 预实验

5.1.2.1 试验目的

通过检测两种成分对免疫细胞的毒性作用，确定正式实验的安全浓度范围。

5.1.2.2 浓度梯度设置

5.1.2.2.1 灵芝多糖：设 8 个浓度梯度（12.5 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL、800 μ g/mL、1600 μ g/mL）。

5.1.2.2.2 灵芝三萜：设 8 个浓度梯度（6.25 μ M、12.5 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M、400 μ M、800 μ M）。

5.1.2.3 操作步骤

取对数生长期的外周血单个核细胞（PBMC），调整浓度为 1×10^5 个/mL，接种于 96 孔板（100 μ L/孔）分别加入等体积不同浓度的灵芝多糖或三萜溶液，使终浓度达到上述梯度。空白对照组加入等量培

培养基，每组设 5 个复孔，37℃、5% CO₂培养箱孵育 24 h、48 h、72 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，继续孵育 2 h，酶标仪测定 450 nm 处 OD 值，计算细胞存活率。

5.1.2.4 结果判定

绘制浓度-存活率曲线，计算半数毒性浓度 (TC₅₀)，选择存活率≥80% 的最高浓度作为正式实验的上限浓度，按等比稀释法设置 4 个浓度梯度。

5.1.3 试验步骤

5.1.3.1 溶液配制

5.1.3.1.1 单成分储备液：根据预实验确定的安全浓度范围，精确称取适量的灵芝多糖和灵芝三萜粉末，灵芝多糖用无菌蒸馏水溶解，灵芝三萜若难溶可先加少量 DMSO 助溶，用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基稀释配制，分别设置 4 个浓度梯度，低、中、高、极高，具体浓度根据预实验结果确定。

5.1.3.1.2 联合用药储备液：按预设比例 (2:1、1:1、1:2) 混合两种单成分，确保各浓度均在预实验确定的安全范围内。

5.1.3.2 免疫细胞制备与培养

采集健康人外周血 (经伦理审批)，用淋巴细胞分离液密度梯度离心 (2000 r/min, 20 min)，收集中间白膜层，用 PBS 洗涤 2 次 (1500 r/min, 10 min)，调整细胞浓度为 1×10⁶个 /mL，接种于培养板，置于 37℃、5% CO₂培养箱培养 24 h。

5.1.3.3 实验分组

实验分组包括：

- 空白对照组：仅加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基，6 孔板每孔 2 mL，96 孔板每孔 200 μL；
- 阳性对照组：加入 10 μg/mL PHA 溶液 (6 孔板每孔 2 mL，96 孔板每孔 200 μL，激活免疫细胞增殖)；
- 灵芝多糖单独组：加入上述梯度浓度的多糖溶液 (6 孔板每孔 2 mL，96 孔板每孔 200 μL)；
- 灵芝三萜单独组：加入上述梯度浓度的三萜溶液 (6 孔板每孔 2 mL，96 孔板每孔 200 μL)；
- 联合处理组：加入上述梯度比例的联合溶液 (6 孔板每孔 2 mL，96 孔板每孔 200 μL)；
- 溶剂对照组 (若使用 DMSO 助溶)：加入含等量 DMSO 的培养基 (DMSO 浓度与给药组一致)。

每组设置 3 个复孔，重复 3 次实验。以保证实验结果的可靠性和重复性。加药后轻轻摇晃培养板，使药物与培养基充分混合，避免细胞聚集成团。

5.1.4 指标检测

5.1.4.1 免疫细胞增殖检测

向 96 孔板中每孔加入 1×10⁵个 PBMC，按分组加入药物，置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养 48 h；培养结束后，向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，轻轻拍打培养板边缘使试剂均匀分布，避免产生气泡，继续置于培养箱中孵育 2 h；将 96 孔板放入酶标仪，酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度 (OD 值)，增殖率按公式 (1) 计算：

$$P = \left(\frac{E-C}{C} \right) \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- P——增殖率，单位为百分比 (%)；
- E——实验组 OD 值；
- C——空白对照组 OD 值。

5.1.4.2 免疫细胞表型分析

向 6 孔板中每孔加入 1×10⁶个 PBMC，按分组给药后，置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养 48 h；收集细胞，用 PBS 重复洗涤 2 次 (1000 r/min, 5 min)，弃去上清液，去除残留的培养基和药物成分。

向洗涤后的细胞中加入 200 μL PBS 重悬，调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL，分别加入 5 μL 抗人 CD3-PE、CD4-FITC、CD8-APC、CD56-PE-Cy7 抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min；孵育期间每隔 10 min 轻轻颠倒 EP 管一次，确保抗体与细胞充分结合。采用流式细胞仪检测，分析 CD3 $^+$ T 细胞比例、CD4 $^+$ /CD8 $^+$ T 细胞比值、CD56 $^+$ NK 细胞比例。

5.1.4.3 细胞因子分泌检测

收集上述 6 孔板中的细胞上清液（1500 r/min，10 min 离心取上清液）；按 ELISA 试剂盒说明书操作，每孔加入 100 μL 上清液（或标准品），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min；洗涤 5 次后加入检测抗体，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min；加入底物液显色，酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值，计算血清中 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 的浓度。

5.1.4.4 巨噬细胞吞噬功能检测

取小鼠腹腔巨噬细胞（或人 THP-1 细胞诱导分化的巨噬细胞），将制备好的巨噬细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬，通过血细胞计数板计数，调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL，接种于 96 孔板，每孔 100 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，使巨噬细胞贴壁。接种于 96 孔板；按分组给药培养 24 h，加入 0.4% 中性红染液（100 μL /孔），继续培养 2 h；弃去上清液，用 PBS 洗涤 3 次，加入 100 μL 细胞裂解液（乙酸：乙醇 = 1:1），振荡 10 min；酶标仪在 540 nm 波长处测定 OD 值。

5.2 体内动物实验

5.2.1 试验材料及设备

5.2.1.1 样品

同 5.1.1.1 中的灵芝多糖和灵芝三萜类化合物。

5.2.1.2 试剂

- 5.2.1.2.1 生理盐水（0.9% 氯化钠注射液，符合药典要求）。
- 5.2.1.2.2 环磷酰胺（CY，免疫抑制模型诱导剂，浓度 20 mg/mL）。
- 5.2.1.2.3 左旋咪唑（LMS，免疫增强阳性对照药，浓度 50 mg/mL）。
- 5.2.1.2.4 细胞因子检测试剂盒（同 5.1.1.2，检测小鼠 IL-2、TNF- α 、IFN- γ ）。
- 5.2.1.2.5 组织染色试剂：苏木素-伊红（HE）染液、中性树脂。
- 5.2.1.2.6 其他试剂：75% 酒精、4% 多聚甲醛、10% 中性福尔马林，均为分析纯及以上级别。

5.2.1.3 仪器设备

- 5.2.1.3.1 屏障环境动物饲养箱（温度 22 $^{\circ}\text{C}$ -25 $^{\circ}\text{C}$ ，湿度 40%-60%，光照 12 h/12 h）。
- 5.2.1.3.2 电子天平（精度 0.001 g，用于动物体重及器官称重）。
- 5.2.1.3.3 流式细胞仪（同 5.1.1.3）。
- 5.2.1.3.4 酶标仪（同 5.1.1.3）。
- 5.2.1.3.5 病理切片机、烤片机、光学显微镜（配备 10 \times 、20 \times 、40 \times 物镜）。
- 5.2.1.3.6 采血管（含抗凝剂 EDTA-K2）、无菌手术器械（剪刀、镊子）。

5.2.2 预实验

5.2.2.1 急性毒性预实验

取 SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只，随机分为 8 组（每组 5 只）。灵芝多糖设 4 个灌胃剂量（200 mg/kg、400 mg/kg、800 mg/kg、1600 mg/kg），灵芝三萜设 4 个灌胃剂量（100 mg/kg、200 mg/kg、400 mg/kg、800 mg/kg），每日 1 次，连续 7 天，观察小鼠行为状态、体重变化及死亡率，计算最大耐受剂量（MTD），以未出现死亡及明显毒性反应为最高剂量。正式实验剂量设为 MTD 的 1/2、1/4、1/8。

5.2.2.2 免疫抑制模型预实验

取 SPF 级 BALB/c 小鼠 30 只，随机分为 5 组（每组 6 只），环磷酰胺（CY）设 5 个腹腔注射剂量（20 mg/kg、40 mg/kg、60 mg/kg、80 mg/kg、100 mg/kg），连续 2 天，空白对照组注射等量生理盐水，第 7 天检测脾淋巴细胞增殖率和免疫器官指数。选择使免疫功能指标较空白组降低 50%~60% 的剂量作为造模剂量。最终的造模剂量应能使小鼠脾脏达到如下状态：脾脏指数显著降低；脾脏组织切片在镜下可见骨髓区域缩小、淋巴细胞密度降低、脾小体结构模糊等典型的免疫抑制病理改变；同时，脾脏淋巴细胞增殖能力受到显著抑制。

5.2.3 试验步骤

5.2.3.1 溶液配制

单成分组根据急性毒性预实验结果确定剂量梯度，联合组按 2:1、1:1、1:2 比例混合，确保各剂量在安全范围内。

5.2.3.2 实验动物选择与模型建立

按预实验确定的剂量腹腔注射环磷酰胺，连续 2 天。造模后第3天随机取3只小鼠检测，脾淋巴细胞增殖率较空白组降低 $\geq 50\%$ 判定为模型成功。

5.2.3.3 实验分组

实验分组包括：

- 空白对照组：正常小鼠，每日灌胃 0.2 mL 生理盐水，连续 21 天；
- 模型对照组：免疫抑制小鼠，每日灌胃 0.2 mL 生理盐水，连续 21 天；
- 阳性对照组：免疫抑制小鼠，每日灌胃左旋咪唑（50 mg/kg），连续 21 天；
- 灵芝多糖单独组：免疫抑制小鼠，每日灌胃上述梯度剂量的灵芝多糖溶液（0.2 mL/只），连续 21 天；
- 灵芝三萜单独组：免疫抑制小鼠，每日灌胃上述梯度剂量的灵芝三萜溶液（0.2 mL/只），连续 21 天；
- 联合处理组：免疫抑制小鼠，每日灌胃上述梯度比例的联合溶液（0.2 mL/只），连续 21 天。每组 10 只小鼠，重复 2 次实验。

5.2.4 指标检测

5.2.4.1 免疫器官指数测定

小鼠称重后脱颈椎处死，75% 酒精体表消毒；快速取出胸腺、脾脏，用预冷 PBS 洗涤 2 次，无菌滤纸吸干表面水分；电子天平称重（精确至 0.001 g），胸腺指数按公式（2）计算，脾脏指数按照公式（3）计算：

$$T = \frac{W_t}{W} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- T——胸腺指数，单位为毫克/克（mg/g）；
- W_t ——胸腺重量，单位为毫克（mg）；
- W——小鼠体重，单位为克（g）。

$$S = \frac{W_s}{W} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- W——脾脏指数，单位为毫克/克（mg/g）；
- W_s ——脾脏重量，单位为毫克（mg）；
- W——小鼠体重，单位为克（g）。

5.2.4.2 外周血免疫细胞表型检测

在无菌条件下，对实验小鼠采用眼眶静脉丛采血法采集外周血，采血量为 0.5 mL，将采集的血液立即移入含 EDTA-K2 抗凝剂的专用采血管中，轻轻颠倒混匀 3~5 次，确保血液与抗凝剂充分接触，避

免凝血。用流式细胞术检测小鼠外周血中 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞 (CD3-CD161⁺) 比例, 计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

5.2.4.3 血清细胞因子检测

按照5.2.4.2的要求采血后, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 将分离后的血清立即分装至无菌冻存管中, 迅速置于-80℃ 超低温冰箱中密封保存; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA 法), 严格按照试剂盒说明书操作, 检测血清样本中IL-2、TNF- α 、IFN- γ 浓度。

5.2.4.4 脾淋巴细胞增殖检测

采用颈椎脱臼法处死小鼠, 开腹取出脾脏, 放入含 2 mL 无菌 PBS 的15 mL 离心管中, 反复漂洗 2 次以去除血污。将漂洗后的脾脏转移至铺有 200 目细胞筛的无菌培养皿中, 加入 3 mL~5 mL RPMI-1640 完全培养基; 用无菌研磨棒轻轻研磨脾脏, 直至筛网上仅残留结缔组织碎片, 收集滤液至 15mL 离心管。向滤液中加入 2 mL~3mL 红细胞裂解液, 轻轻颠倒混匀, 室温孵育 3min~5min; 加入 5mL 完全培养基终止裂解, 轻轻吹打混匀。将细胞裂解液在4℃、1500r/min 离心 5min, 弃上清; 加入 8 mL~10mL 完全培养基重悬细胞, 吹打至无明显细胞团块, 再次重复离心2次, 弃上清。用 1mL 完全培养基重悬细胞沉淀, 取 10 μ L 细胞悬液与 10 μ L 台盼蓝染液 (0.4%) 混匀, 滴加至血球计数板, 显微镜下计数活细胞 (蓝染细胞为死细胞); 要求活细胞率 \geq 90%, 否则需重新制备。根据计数结果, 用完全培养基调整细胞浓度至 1×10^6 个 /mL, 轻轻吹打混匀, 置于冰上备用 (30min 内完成接种, 避免细胞沉降)。采用CCK-8 法检测增殖率。

5.2.4.5 组织病理学观察

取小鼠胸腺、脾脏组织, 快速剥离并去除结缔组织、脂肪等非目标组织; 每只样本的胸腺取胸腺小叶核心区 (约1mm \times 0.5mm \times 0.3mm), 脾脏取脾门外侧外周功能区 (约0.8mm \times 0.8mm \times 0.2mm)。将取样后的组织立即放入10% 中性福尔马林固定液中, 固定液体积为组织体积的 5~10 倍; 室温下固定 24h, 期间每隔 8h 更换 1 次固定液, 避免组织自溶或固定不充分。固定后的组织依次进行石蜡包埋, 切片 (厚度 4 μ m), 将切片漂附于多聚赖氨酸包被的载玻片上 (防止脱片), 在60℃~65℃恒温温箱中烘烤30min~60min, 备用。对切片进行HE 染色后, 采用光学显微镜观察胸腺皮质厚度、髓质比例, 计数皮质区淋巴细胞密度; 脾脏观察脾小结数量、生发中心大小, 计数脾小结内淋巴细胞数量。

6 数据处理与分析

6.1 数据记录

详细记录实验条件 (如细胞批次、动物编号、试剂批号)、原始数据 (OD 值、细胞数量、器官重量、细胞因子浓度) 及异常现象 (如细胞污染、动物死亡), 确保数据可追溯。

6.2 统计学分析

采用统计学软件对实验数据进行处理。计量资料以 “平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)” 表示, 首先进行正态性检验和方差齐性检验。若数据符合正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行组间比较, 两两比较采用 LSD 法或 SNK 法; 若数据不符合正态分布或方差不齐, 采用非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

6.3 协同效应计算

6.3.1 对于双效协同作用的分析, 可采用协同指数 (Combination Index, CI) 法, 通过计算 CI 值判断协同作用强度。CI 计算需满足以下条件

- 实验设计需包含单药组、联合用药组及空白对照组, 每组设置 3~6 个平行重复样本, 确保数据的可靠性;
- 用于计算的原始数据需先经过正态性检验, 符合正态分布且方差齐性, 若不符合需进行数据转换或采用非参数法辅助验证;
- 明确效应指标及评价标准, 设定效应水平, 可根据实验需求调整;

d) 药物浓度设置需覆盖亚抑制浓度至最大抑制浓度范围，确保浓度-效应曲线完整，满足中效方程拟合要求。

6.3.2 $CI < 1$ 为协同作用， $CI = 1$ 为相加作用， $CI > 1$ 为拮抗作用。 CI 值的计算可采用 CompuSyn 软件或基于相关公式（如 Chou-Talalay 法公式）进行。

7 结果判定

7.1 体外细胞实验结果判定

体外细胞实验结果判定标准见表1。

表1 体外细胞实验结果判定标准

指标类型	单独成分有效判定（与空白对照组比）	协同效应判定（联合组与单独组比）
免疫细胞增殖	增殖率显著升高 ($P < 0.05$)，且随浓度升高呈上升趋势	联合处理组增殖率显著高于同浓度下两单独成分单独组 ($P < 0.05$)， $CI < 1$
免疫细胞表型	$CD4^+/CD8^+$ 比值 ≥ 1.2 、NK 细胞比例 $\geq 15\%$ ($P < 0.05$)	联合组同时满足“ $CD3^+$ T 细胞比例、 $CD56^+$ NK 细胞比例、 $CD4^+/CD8^+$ 比值均显著高于两单独组 ($P < 0.05$)， $CI < 1$ ”
细胞因子分泌	IL-2、TNF- α 、IFN- γ 浓度显著升高 ($P < 0.05$)，IL-10 正常；	联合组满足“IL-2、TNF- α 、IFN- γ 浓度显著高于两单独成分组 ($P < 0.05$)，且 IL-10 浓度维持在平衡范围， $CI < 1$ ”
巨噬细胞吞噬功能	吞噬率显著升高 ($P < 0.05$)	联合组 OD 值显著高于两单独组 ($P < 0.05$)，且呈剂量依赖性升高

7.2 体内动物实验结果判定

体内动物实验结果判定标准见表2。

表2 体内动物实验结果判定标准

指标类型	单独成分有效判定（与空白对照组比）	协同效应判定（联合组与单独组比）
免疫器官指数	胸腺 / 脾脏指数显著升高 ($P < 0.05$)，恢复至空白组 70% 以上	联合组胸腺指数、脾脏指数显著高于两单独成分组 ($P < 0.05$)，且恢复至空白组 80% 以上， $CI < 1$
外周血免疫细胞	$CD4^+/CD8^+$ 比值 ≥ 1.0 、NK 细胞比例 $\geq 10\%$ ($P < 0.05$)	联合组指标显著高于两单独成分组 ($P < 0.05$)，且接近空白对照组水平（差异 $< 10\%$ ）， $CI < 1$
血清细胞因子	IL-2、TNF- α 、IFN- γ 浓度显著高于模型对照组 ($P < 0.05$)，且呈剂量依赖性升高	联合组 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 浓度显著高于两单独成分组 ($P < 0.05$)，且恢复至空白对照组的 70% 以上， $CI < 1$
脾淋巴细胞增殖	增殖率显著升高 ($P < 0.05$)，恢复至空白组 60% 以上	联合组增殖率显著高于两单独成分组 ($P < 0.05$)，恢复至空白组 75% 以上， $CI < 1$
组织病理学	胸腺皮质增厚、脾小结数量增加 ($P < 0.05$)	联合组胸腺皮质增厚、脾小结数量显著高于两单独成分组 ($P < 0.05$)， $CI < 1$

7.3 综合判定

7.3.1 细胞实验中至少 1 项指标显著有效 ($P < 0.05$)；动物实验中至少 1 项指标显著有效 ($P < 0.05$)；联合成分组满足上述有效条件，且 $CI < 1$ 时，判定为具有协同增效作用。联合组无安全性风险（细胞存活率 $\geq 80\%$ ，动物肝肾功能正常，无过度免疫反应）。

7.3.2 细胞试验中，所有检测指标与空白对照组无显著差异 ($P \geq 0.05$)；动物实验中，所有指标与模型对照组无显著差异 ($P \geq 0.05$)；联合成分组 $CI > 1$ 且各项指标未优于单独成分组，判定为拮抗或无协同功效。

8 评价报告

评价报告宜完整、规范，至少包含以下内容：

- e) 封面：标题、编号、日期及参与单位；
 - f) 摘要：简述评价目的、方法、主要结果及结论；
 - c) 正文：
 - 1) 引言：背景、意义及评价目标；
 - 2) 试验起止时间；
 - 3) 方法：详细描述评价流程、指标及方法；
 - 4) 结果：数据表格、图表及统计分析结果；
 - 5) 判定：明确判定结果；
 - 6) 试验者、校核人和技术负责人分别的签字以及试验单位公章。
-