

橘红多糖增强小鼠免疫功能及抗疲劳作用

王可^{1*}, 尤良震¹, 胡静波², 李悌聪²

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230038; 2. 上海同昌生物医药科技有限公司, 上海 201512)

[摘要] 目的:观察橘红多糖对小鼠免疫功能的影响及抗疲劳作用。方法:小鼠分为空白组、模型组、阳性药对照组(10 g·kg⁻¹剂量 *ig* 贞芪扶正颗粒混悬液)、橘红多糖低、中、高剂量(23,46,92 mg·kg⁻¹),各组每日按10 mL·kg⁻¹ *ig* 给药1次,空白和模型组 *ig* 给予等体积蒸馏水,持续30 d。第26日,除空白组外以不含2,4-二硝基氟苯(DNFB)的溶剂处理,其余各组以DNFB致敏,耳廓激发的方法建立迟发型超敏反应模型,计算激发后各组小鼠左右耳廓增重值;于第3周后除空白组外给予免疫抑制剂(氢化可的松40 mg·kg⁻¹,肌注,隔天1次),共5次,建立免疫功能低下小鼠模型。计算末次给药1 h后小鼠胸腺、脾脏指数,观测橘红多糖对小鼠免疫功能的影响。采用小鼠负重游泳及耐缺氧试验,观察抗疲劳作用。结果:采用5% DNFB溶液致敏,1% DNFB诱发,制成迟发型超敏反应模型,造模后,小鼠耳显著肿胀,贞芪扶正颗粒组、橘红多糖46, 92 mg·kg⁻¹组能够增强迟发超敏效应($P < 0.01$, $P < 0.05$),小鼠耳肿胀度分别达到(6.57 ± 1.67), (8.29 ± 2.41) mg。采用免疫抑制剂氢化可的松造免疫抑制小鼠模型,造模后小鼠胸腺指数、脾指数下降,贞芪扶正颗粒组、橘红多糖92 mg·kg⁻¹组能显著提高免疫抑制小鼠脾脏及胸腺指数($P < 0.01$, $P < 0.05$)。贞芪扶正颗粒组、橘红多糖(23,46,92 mg·kg⁻¹)组能够显著延长小鼠负重游泳时间,游泳时间分别为(286 ± 46), (188 ± 34), (227 ± 28), (291 ± 48) s。贞芪扶正颗粒组、橘红多糖3个剂量组均能够显著延长小鼠耐缺氧时间($P < 0.01$, $P < 0.05$),橘红多糖对增强小鼠免疫和抗疲劳作用均呈现剂量依赖性趋势。结论:橘红多糖具有增强免疫、抗疲劳的作用,多糖是橘红抗炎、增强免疫的有效部位。

[关键词] 橘红; 多糖; 增强免疫; 抗疲劳

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0180-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210180

Anti Fatigue Effect and Enhancing Immune by *Exocarpium citri* Polysaccharide Function

WANG Ke^{1*}, YOU Liang-zhen¹, HU Jing-bo², LI Ti-cong²

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Shanghai Twisun Bio-pharm Co. Ltd, Shanghai 201512, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the immune promotion and anti-fatigue of effect of *Exocarpium citri* polysaccharide in mice. **Method:** KM mice were randomly divided into control group, model group, Zhenqi Fuzheng granule group (10 g·kg⁻¹), *E. citri* polysaccharide low dose group (23 mg·kg⁻¹), middle dose group (46 mg·kg⁻¹), high dose group (92 mg·kg⁻¹). The groups were gavaged (*ig*) with drug daily for 30 consecutive days, at dose of 10 mL·kg⁻¹. On 26th day, the delayed-type hypersensitivity animal model in mice was established by sensation of 2, 4-dinitro fluoro benzene (DNFB), the control group was treated with the solvent without DNFB, the weight of right and left ears was measured at 24 h after challenged. Since the third week, dexamethasone was injected to all the groups except for control group every two days to establish immunosuppressed mice model, 40 mg·kg⁻¹ dose, five times. Observed spleen index, thymus index at 1 h after last objection. Using swimming and anti hypoxia experiment to observe the anti fatigue effect. **Result:** The effect of Zhenqi Fuzheng granules group, the polysaccharide groups at 46, 92 mg·kg⁻¹ could enhance the delayed type hypersensitivity ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the difference of mouse ear swelling was (6.57 ± 1.67), (8.29 ±

[收稿日期] 20140410(019)

[通讯作者] *王可, 硕士, 讲师, 从事中药活性成分研究, Tel:0551-65169193, E-mail:kerrwong@163.com

2.41) mg, respectively. Zhenqi Fuzheng granule group, polysaccharide group at 92 mg·kg⁻¹ could significantly increase the immune suppression of thymus and spleen index in mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Zhenqi Fuzheng granules group, polysaccharide groups at 23, 46, 92 mg·kg⁻¹ could significantly prolong the swimming time, swimming time was (286 ± 46), (188 ± 34), (227 ± 28), (291 ± 48) s. Zhenqi Fuzheng granule group, polysaccharide groups at 23, 46, 92 mg·kg⁻¹ could significantly prolong the hypoxia tolerance time of mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The effect of enhancement of immune function and anti fatigue action showed a manner of dose depend. **Conclusion:** *E. citri* polysaccharide can enhance immunity, and have anti-fatigue effect. Polysaccharide is the effective chemical fraction of *E. citri*.

[**Key words**] *Exocarpium citri*; polysaccharide; immune promotion function; anti fatigue effect

橘红,芸香科植物橘及其栽培变种的干燥外层果皮,性温,味苦、辛,具消痰利气、宽中散结之功效^[1]。橘红善理肺气,是治疗肺寒咳嗽的常用中药,橘红丸、橘红片、橘红枇杷胶囊等中成药,橘红均用作君药。现代研究表明,肺寒咳嗽主要系免疫力低下引起,常发生在呼吸道感染后^[2-3]。多糖是橘红的主要成分之一,现代研究多集中于橘红多糖的提取分离研究,但是对其的免疫调节功能至今未见报道。本文通过小鼠迟发型超敏反应及小鼠免疫器官质量测定,对橘红多糖增强免疫功能进行观察,旨在为开发新型的橘红多糖免疫增强药物提供技术支持和理论依据。

1 材料

1.1 药物 橘红 *Exocarpium citri*,产地广西,由安徽归然药业有限公司提供,批号 20130708。贞芪扶正颗粒,甘肃扶正药业股份有限公司,批号 130709,15 g/袋。

1.2 动物 昆明种小鼠,SPF级,动物合格证号 SCXK(皖)2011-002,安徽医科大学安徽省实验动物中心。

1.3 试剂与仪器 硫化钠(天津大茂化学试剂厂,批号 20120708),丙酮(广州市化学试剂厂,批号 20121005-2),注射用氢化可的松(上海西亚试剂有限公司,批号 02573),氯化钠注射液(太极集团西南药业有限公司生产,批号 12060010),2,4-二硝基氯苯(DNFB,上海西亚试剂有限公司产品,批号 20130506)。JM-B1003型电子天平(诸暨超泽衡器设备有限公司),SH-Q4型耳肿打孔器(上海嘉适科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 橘红多糖的制备 取橘红药材,50℃烘干,剪碎,95%乙醇冷浸提取3次,每次12h。药渣于室温通风处晾干,加水热提取3次,合并滤液,浓缩成稠浸膏(1.20~1.25,80℃)后,加无水乙醇调醇至

80%后,静置过夜。滤过,收集沉淀物,即得橘红粗多糖。将粗多糖用5%三氯醋酸溶解,离心(3000 r·min⁻¹),上清液浓缩成稠浸膏(1.20~1.25,80℃),依次用无水乙醇、95%乙醇洗涤,上清液离心(3000 r·min⁻¹),留沉淀物。沉淀物减压干燥,即得精制多糖。按苯酚-硫酸法测定多糖纯度^[4],含量(57.2 ± 1.8)% ($n = 3$),平均得率(2.3 ± 0.7)% ($n = 3$)。

2.2 对小鼠迟发型超敏反应(DTH)的影响^[5] 小鼠随机分为空白组、模型组、橘红多糖低、中、高剂量(23,46,92 mg·kg⁻¹)、阳性对照组(10 g·kg⁻¹剂量 *ig* 贞芪扶正颗粒混悬液),每组12只,按10 mL·kg⁻¹ *ig* 给药,空白及模型组给予等体积蒸馏水。各组每日 *ig* 给药1次,连续30日。第25日,在小鼠右侧背中部擦涂6% Na₂S 水溶液脱毛。第26日,橘红多糖低、中、高剂量、模型组分别用微量加样器在脱毛部位滴涂5% DNFB 溶液20 μL致敏。第30日,以1% DNFB 溶液20 μL滴涂小鼠左耳两面作为攻击;右耳滴涂丙酮、麻油混合液20 μL作为对照。攻击后24 h,称量体重,将小鼠颈椎脱臼法处死。剪下左右耳廓,用打孔器取下直径8 mm的耳片,立即称重。以两耳片质量差(mg)作为耳肿胀度。

2.3 对免疫抑制小鼠免疫器官质量的影响^[6] 小鼠分组、剂量及给药天数同2.2。第3周后开始给予免疫抑制剂(氢化可的松40 mg·kg⁻¹, *im*,隔天1次),共5次,进行免疫功能抑制的实验模型制备。末次给药后1 h处死动物,称量体重,取小鼠胸腺、脾脏,称重,以每10 g小鼠的脾脏和胸腺湿重(mg)作为脾脏指数和胸腺指数。

2.4 负重游泳试验 分组与给药同2.2。末次给药后30 min,称量体重,将小鼠置于自制游泳箱[水温(25 ± 0.5)℃,水深30 cm]中游泳,小鼠尾根部负重5%体重的沙袋,记录小鼠自游泳开始至死亡的时间(min),以小鼠沉入水中后未有张口呼吸判为死亡。

2.5 小鼠耐缺氧试验 分组与给药同 2.2。末次给药后 2 h,将小鼠放入 500 mL 磨口瓶中,内放一支燃烧的蜡烛,用凡士林密闭瓶盖,待蜡烛缺氧熄灭后立即计时,记录自蜡烛熄灭至小鼠停止呼吸的时间。

2.6 统计方法 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析及组间检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠迟发型超敏反应 结果显示橘红多糖中、高剂量组均能显著增加小鼠耳廓肿胀度,具有剂量依赖性趋势,见表 1。

表 1 橘红多糖对小鼠迟发型超敏反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	耳廓肿胀度 /mg
正常	-	0.05 ± 1.33
橘红多糖	23	4.59 ± 2.07 ¹⁾
	46	6.57 ± 1.67 ²⁾
	92	8.29 ± 2.41 ²⁾
模型	-	4.38 ± 1.50
贞芪扶正颗粒	1 × 10 ⁴	5.41 ± 1.95 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对免疫抑制小鼠免疫器官质量的影响 与正常对照组比较,橘红多糖组、模型组和贞芪扶正颗粒组胸腺指数,脾脏指数显著降低,给药后,橘红多糖中、高剂量组可显著提高免疫抑制小鼠的胸腺指数、脾脏指数($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。

表 2 橘红多糖对免疫抑制小鼠免疫器官质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	脾脏指数 /%	胸腺指数 /%
正常	-	3.07 ± 0.70 ²⁾	3.28 ± 0.49 ²⁾
橘红多糖	23	1.74 ± 0.22	1.51 ± 0.23
	46	2.08 ± 0.46 ¹⁾	1.84 ± 0.41
	92	2.87 ± 0.49 ²⁾	1.91 ± 0.49 ¹⁾
模型	-	1.64 ± 0.31	1.62 ± 0.37
贞芪扶正颗粒	1 × 10 ⁴	2.53 ± 0.68 ²⁾	2.18 ± 0.91 ²⁾

3.3 对负重游泳、耐缺氧的影响 橘红多糖低、中、高 3 个剂量组均能显著显著延长小鼠的游泳时间,具有剂量依赖性趋势且能显著延长抗缺氧时间。见表 3。

4 讨论

《本草逢源》中阐述橘红专攻肺寒咳嗽多痰,“虚损方多用之,然久嗽气泄,又非所宜”;《医林纂要》中则说“橘红专入于肺,兼以发表,去皮内之白,更轻虚上浮,亦去肺邪耳”,历代医家擅用橘红清热

表 3 橘红多糖对小鼠负重游泳、耐缺氧时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	游泳时间 /min	耐缺氧存 活时间/min
正常对照	-	132.0 ± 19.9	47.8 ± 3.5
橘红多糖	23	188.6 ± 34.6 ¹⁾	67.0 ± 2.9 ¹⁾
	46	227.2 ± 28.3 ²⁾	88.0 ± 32.8 ¹⁾
	92	291.2 ± 48.7 ²⁾	142.8 ± 21.8 ²⁾
贞芪扶正颗粒	1 × 10 ⁴	286.2 ± 46.2 ²⁾	140.6 ± 19.8 ²⁾

注:与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

止咳,但其物质基础有待深入探究^[7]。天然多糖类成分已被证明具有抗肿瘤和免疫增强的作用,但中药复方药效,靠整体作用,中药中的皂苷、生物碱、有机酸等成分往往起协同或辅助增强免疫作用^[8-9]。

橘红多糖灌胃给药,能提高小鼠游泳能力,减缓疲劳,可能与其提高机体中枢神经系统(CNS)兴奋有关。本实验研究发现,橘红多糖能够显著增强小鼠 DTH,增加免疫抑制小鼠脾脏指数和胸腺指数。提示橘红多糖可以通过增强细胞免疫功能、增加免疫器官的质量,提高机体免疫功能;同时,橘红多糖还具有抗疲劳的作用。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:318.
- [2] 刘娟. 治疗肺热咳嗽临床体会[J]. 中医儿科杂志, 2012,8(6):32.
- [3] 闫国良,熊旭东,李越华,等. 泻肺化痰活血方对慢性阻塞性肺疾病急性加重期(痰热壅肺证)患者免疫功能的影响[J]. 中国中医急症,2010,19(4):10.
- [4] 时军,马方励,王晓燕,等. 党参药材中党参炔苷与总多糖、总皂苷含量的相关性研究[J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2779.
- [5] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1420.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:777.
- [7] 董杨,季光,施建蓉,等. 橘红素上调 Cyclin B1 和抑制 ERK 磷酸化诱导人胃癌 AGS 细胞周期阻滞[J]. 中国药理学通报,2012,28(6):823.
- [8] 董宏坡,江明树,朱伟杰. 化橘红多糖对小鼠的免疫调节作用[J]. 中成药,2010,32(3):491.
- [9] Ruan Z, Su J, Dai H, et al. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes* [J]. Int J Immun Opharmacol, 2005, (5):811.

【责任编辑 聂淑琴】