

野菊花多糖对小鼠免疫功能低下的保护作用

李厚兵¹, 任爱农^{2*}, 彭蕴茹², 陆颖³, 黄厚才², 曹鹏²

(1. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028;
3. 南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] **目的:**研究野菊花多糖对环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下的保护作用。**方法:**将小鼠随机分为正常对照组、模型组及野菊花多糖高、低剂量组, 每组10只。野菊花多糖高、低剂量组分别ig给药400, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续14 d; 于ig的第10天开始, 模型组及野菊花多糖高、低剂量组分别经腹腔注射环磷酰胺100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续4 d, 制备免疫功能低下小鼠模型。观察野菊花多糖对免疫功能低下小鼠碳廓清试验的影响; 测定小鼠体重及胸腺、脾脏质量, 计算胸腺、脾指数; 采用二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应法(耳肿胀法)测定细胞免疫功能; 检测血清溶血素含量。**结果:**与正常对照组比较, 模型组小鼠的各项指标均显著降低($P < 0.01$)。野菊花多糖高、低剂量组的碳廓清指数分别为 0.0278 ± 0.0059 , 0.0199 ± 0.0047 , 吞噬指数分别为 5.3970 ± 0.7356 , 4.8278 ± 0.4801 , 耳肿胀度分别为 (5.23 ± 0.98) , (4.89 ± 1.10) mg, 血清溶血素分别为 (0.410 ± 0.063) , (0.357 ± 0.058) 。模型组的碳廓清指数为 0.0134 ± 0.0038 , 吞噬指数为 4.2316 ± 0.3672 , 耳肿胀度为 (3.21 ± 0.91) mg, 血清溶血素吸光度(A)为 0.299 ± 0.032 。各指标与模型组比较, 均具有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:**野菊花多糖可增强环磷酰胺所致免疫功能低下小鼠的免疫功能。

[关键词] 野菊花多糖; 环磷酰胺; 免疫功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0223-04

Regulatory Effect of *Chrysanthemum indicum* Polysaccharide on Immune Function in Mice with Hypoimmunity

LI Hou-bing¹, REN Ai-nong^{2*}, PENG Yun-ru², LU Ying³, HUANG Hou-cai², CAO Peng²

(1. Pharmacy of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;
2. Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;
3. Pharmacy of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of the *Chrysanthemum indicum* polysaccharide (CIP) on immunosuppressed mice caused by cyclophosphamide. **Method:** The mice were randomly divided into four groups (10 in each group): normal control group, model group and CIP groups (high and low dosage). CIP high and low dosage groups were administered intragastrically with CIP at dose of 400, 200 mg·kg⁻¹, respectively once daily for fourteen days. At the tenth day model group and CIP groups were administered with cyclophosphamide by peritoneal injection for four days to induce an immunosuppressed mouse model. The effect on carbon clearance was observed. The weight of the mice, thymus and spleen was measured; the thymus index and spleen index were calculated. The cell immune function was assessed by delayed type hypersensitivity induced by dinitrofluorobenzene in normal mice. The serum level of hemolysin was determined. **Result:** All the indexes in the model group were reduced ($P < 0.01$). The carbon clearance rate in CIP high and low dosage groups was 0.0278 ± 0.0059 and 0.0199 ± 0.0047 respectively, the phagocytic exponent was 5.3970 ± 0.7356 and 4.8278 ± 0.4801 , ear edema was (5.23 ± 0.98) mg and (4.89 ± 1.10) mg, the serum level of hemolysin was

[收稿日期] 20120112(004)

[第一作者] 李厚兵, 硕士研究生, 从事天然药物研究, Tel: 18652994575, E-mail: advance-li@163.com

[通讯作者] *任爱农, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 从事天然药物研究, Tel: 025-85639647, E-mail: lyy-0@126.com

0.410 ± 0.063 and 0.357 ± 0.058. The carbon clearance rate in model group was 0.013 4 ± 0.003 8, the phagocytic exponent was 4.231 6 ± 0.367 2, ear edema was (3.21 ± 0.91) mg, the serum level of hemolysin was 0.299 ± 0.032. Compared with model group, all was significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$).
Conclusion: CIP can improve the non-specific, humoral and cellular immune functions in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice.

[Key words] *Chrysanthemum indicum* polysaccharide; cyclophosphamide; immune function

近年的研究发现中药多糖具有广泛的生物活性,文献报道多糖具有抗肿瘤、抗氧化、抗糖尿病、抗病毒、抗辐射、调节性功能、调血脂等药理作用^[1-3]。研究多糖的免疫调节作用是日前中药多糖药理研究的热点,对中药多糖的深入研究,为寻找新型免疫调节剂及抗肿瘤药物提供了广阔的前景^[4]。野菊花为菊科植物野菊的干燥头状花序,又称疟疾草、苦蕒、山菊花等。其性凉,味苦、辛,微寒,归肝、心经,具有清热解毒、疏风平肝之功效^[5]。现代药理研究表明^[6],野菊花具有广谱抗菌、抗炎、解热、抗血小板凝集、降压、抗氧化的药理作用。近年来有文献报道,野菊花多糖(*Chrysanthemum indicum* polysaccharide, CIP)具有抗衰老和清除活性氧自由基等方面作用^[7-8],但对其免疫调节作用的研究尚未见详细的文献报道,因此本文利用环磷酰胺腹腔注射制备小鼠免疫功能低下模型,探讨野菊花多糖的免疫功能调节作用,旨在为野菊花的开发应用提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,雄性,体重 18 ~ 22 g,由江苏省中医药研究院实验动物中心提供,实验动物合格证号 SCXK(苏)2007-0001。

1.2 药物 野菊花多糖制备:取干燥的野菊花药材 500 g,以水为提取剂,按料液比 1:32,于 90 °C 水浴中浸提 1 h,连续提取 3 次,过滤,合并水提液,浓缩后加入 5 倍量的 95% 乙醇静置 24 h。醇沉后的沉淀抽滤后依次用无水乙醇、丙酮、乙醚进行洗涤,干燥后得野菊花粗多糖粉末。而后利用 LSA-21 大孔吸附树脂,于温度 40 °C, pH 5,流速 3 BV/h 对其进行纯化,接收液按前述醇沉方法,得较纯的野菊花多糖粉末,蒽酮-硫酸法检测多糖含量为 81.29%。ig 时分别用生理盐水配成 40, 20 g·L⁻¹ 的野菊花多糖溶液。

1.3 试剂 注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 11061421),氯化钠注射液(南京小营药业集团有限公司,批号 2011081805),野菊花(江苏南京药业股份有限公司中药饮片厂,经江苏

省中医药研究院任爱农教授鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序)。二硝基氟苯(DNFB)溶液:称取 DNFB 50 mg 置于干燥洁净的具塞小瓶中,将预先配好的 5 mL 丙酮麻油溶液(1:1),倒入小瓶并用胶布密封,混匀后使用,新鲜配制。补体(豚鼠血清):抽取 4 只豚鼠心脏血,雌雄各半,分离新鲜血清,混合后备用,临用时生理盐水稀释 1:10。鸡红细胞(5% CRBC):取新鲜鸡血,除去纤维蛋白,离心得压积红细胞,临用时用生理盐水洗涤 3 次,配成 5% 混悬液即可。

1.4 仪器 Spectrumlab 752S 紫外-可见分光光度计(上海棱光技术有限公司),梅特勒 1/万电子天平(瑞士),梅特勒 1/10 万电子天平(瑞士),HH-6 型数显恒温水浴锅(金坛市奥瑞电器厂),TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂),Microfuge 16 型离心机(德国 Beckman Coulter)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将 ICR 雄性小鼠随机分为 4 组:正常对照组、模型组及野菊花多糖高、低剂量组,每组 10 只。各组小鼠每天 ig 1 次,连续 ig 14 d,正常对照组和模型组分别 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,野菊花多糖高、低剂量组分别 ig 等体积的野菊花多糖溶液 400, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹。于 ig 的第 10 天开始,正常对照组 ip 生理盐水 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,连续 4 d,模型组及野菊花多糖高、低剂量组分别 ip 等体积的环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,连续 4 d。

2.2 对免疫功能低下小鼠廓清能力影响的检测 给药第 14 天,ig 2 h 后尾静脉注射印度墨汁 10 mL·kg⁻¹,于 1(t_1)和 5(t_2) min 后分别经眼眶静脉采血 20 μL,加至 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 中,于紫外-可见分光光度计 680 nm 处测定吸光度(A),采血后将小鼠脱颈处死,摘取肝、脾及胸腺称质量,按下式计算廓清指数(K)和吞噬指数(α),并计算脏器指数。^[9]

$$K = (\log A_1 - \log A_5) / (t_2 - t_1) = \log(A_1/A_5) / 4$$

$$\alpha = \text{体重} / (\text{肝质量} + \text{脾质量}) \times K^{1/3}$$

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量}(\text{mg}) / \text{小鼠体重}(\text{g})$$

2.3 对免疫功能低下小鼠迟发型变态反应影响的检测 给药第9天用5%硫化钠溶液给每只小鼠腹部脱毛,面积约3 cm × 3 cm。第10天,给每只小鼠腹部涂抹DNFB溶液致敏,进行初次免疫(致敏)。致敏后4 d,用DNFB溶液均匀涂抹小鼠右耳廓内外两面进行攻击。攻击24 h后颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳,用打孔器取下直径8 mm的耳片,称。小鼠的耳肿胀度(右耳片质量 - 左耳片质量的差值)表示迟发型变态反应的程度^[10]。

2.4 对免疫功能低下小鼠血清溶血素影响的检测 给药第7天时,每鼠腹腔注射5%的鸡红细胞生理盐水混悬液0.2 mL进行免疫。免疫7 d后,摘眼球取血,离心,取血清用生理盐水稀释100倍,取稀释血清1 mL,与5%鸡红细胞悬液0.5 mL、10%补

体0.5 mL混合,另设不加血清的空白管作对照,在37℃恒温水浴锅保温30 min后,冰水浴终止反应。离心,取上清液于紫外-可见分光光度计540 nm处测定A^[11]。

2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 19.0对数据进行方差分析,采用t检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对免疫功能低下小鼠碳廓清能力的影响 与正常对照组相比,模型组各指数均显著下降($P < 0.01$);与模型组相比,野菊花多糖高、低剂量组小鼠的碳廓清指数、吞噬指数以及脾指数与胸腺指数均升高,差异呈现显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见表1。

表1 野菊花多糖对免疫功能低下小鼠碳廓清能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	K	α	脾指数/mg·g ⁻¹	胸腺指数/mg·g ⁻¹
正常对照	-	0.033 5 ± 0.006 5	5.743 2 ± 0.870 6	4.95 ± 0.91	2.15 ± 0.62
模型	-	0.013 4 ± 0.003 8 ¹⁾	4.231 6 ± 0.367 2 ¹⁾	3.22 ± 0.73 ¹⁾	0.87 ± 0.32 ¹⁾
野菊花多糖	400	0.027 8 ± 0.005 9 ³⁾	5.397 0 ± 0.735 6 ³⁾	4.55 ± 0.82 ³⁾	1.67 ± 0.72 ³⁾
	200	0.019 9 ± 0.004 7 ²⁾	4.827 8 ± 0.480 1 ²⁾	3.78 ± 0.77 ²⁾	1.02 ± 0.59 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表2~3同)。

3.2 对免疫功能低下小鼠迟发型变态反应及血清溶血素的影响 与正常对照组相比,模型组耳肿胀度显著减少($P < 0.01$);与模型组相比,野菊花多糖高、低剂量组小鼠的耳肿胀度均显著增加($P < 0.01$)。见表2。与正常对照组相比,模型组血清溶血素显著下降($P < 0.01$);与模型组相比,野菊花多糖高、低剂量组小鼠的血清溶血素含量均增加,差异具有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表2。

表2 野菊花多糖对免疫功能低下小鼠迟发型变态反应及血清溶血素的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	耳肿胀度/mg	血清溶血素/A
正常对照	-	5.67 ± 1.23	0.452 ± 0.059
模型	-	3.21 ± 0.91 ¹⁾	0.299 ± 0.032 ¹⁾
野菊花多糖	400	5.23 ± 0.98 ³⁾	0.410 ± 0.063 ³⁾
	200	4.89 ± 1.10 ³⁾	0.357 ± 0.058 ²⁾

4 讨论

本实验利用环磷酰胺腹腔注射制备免疫功能低下的小鼠模型,以评价野菊花多糖的免疫调节作用。

本实验结果显示,野菊花多糖在碳廓清试验中,可提高廓清指数,提高小鼠单核吞噬细胞的吞噬指数,说明野菊花多糖对网状内皮系统吞噬功能具有

明显的激活、增强作用,提示野菊花多糖对小鼠非特异性免疫功能具有增强作用。野菊花多糖还可明显提高免疫低下小鼠的脾指数和胸腺指数,表明野菊花多糖能刺激机体免疫器官相关指数的升高,增加机体的免疫能力。此外,野菊花多糖高、低剂量组均能显著增强免疫低下小鼠的迟发型变态反应强度,并可明显改善环磷酰胺所致的小鼠血清溶血素含量降低现象,促进小鼠溶血素抗体生成,对环磷酰胺所致免疫抑制有拮抗作用,说明野菊花多糖可提高小鼠特异性体液免疫和细胞免疫功能。

野菊花多糖对环磷酰胺所致免疫功能低下小鼠具有免疫增强作用,尽管其增强免疫功能的分子机制仍有待进一步研究揭示,但已显示出野菊花多糖在用作预防免疫功能低下、增强免疫功能的药物或保健食品方面有着广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] 刁波,唐瑛,王晓琨,等. 中药多糖研究新进展[J]. 中国医药导报,2008,5(3):21.
- [2] 梁雷,边宝林,王宏洁. 中药降血糖活性成分研究近况[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):227.
- [3] 陈燕,李世刚. 中药多糖防治类风湿性关节炎的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):202.

不同滋阴中药对小鼠诱发性肺肿瘤发生及抗肿瘤免疫功能的影响

郭慧君*, 朱金华, 刘春花, 杜人塘, 魏娜, 王彪, 程一琳
(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:研究六味地黄丸和二冬膏对乌拉坦诱发性肺肿瘤小鼠的肿瘤发生情况和抗肿瘤免疫功能的影响。方法:雌性昆明种小鼠33只,使用乌拉坦($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)注射诱发小鼠肺肿瘤,随机分为对照组、六味地黄丸组($1.56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和二冬膏组($0.78\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续给药100d后肉眼及病理切片和苏木精-伊红染色观察药物对小鼠肺肿瘤发生的影响,测定脾指数、胸腺指数、巨噬细胞吞噬功能以及测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。结果:与对照组比较,六味地黄丸和二冬膏给药组小鼠肺肿瘤诱发率明显降低,诱发率分别是63.6%,18.2%,36.4%。与对照组比较,六味地黄丸和二冬膏给药组小鼠脾指数、巨噬细胞活性明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),小鼠血清中TNF- α 含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:六味地黄丸和二冬膏均能通过提高小鼠的抗肿瘤免疫功能和减少炎症因子产生来延缓乌拉坦诱发肺肿瘤的发生发展。

[关键词] 乌拉坦;诱发性肺肿瘤;六味地黄丸;二冬膏;抗肿瘤免疫;肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0226-04

Effect of Different Traditional Chinese Medicine for Nourishing Yin on Lung Chemical Carcinogenesis and Antitumor Immune Function in Mice

GUO Hui-jun*, ZHU Jin-hua, LIU Chun-hua, DU Ren-tang, WEI Na, WANG Biao, CHENG Yi-lin
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** The effect of Liuwei Dihuang Wan (LWDH) and Erdong Gao (ED) on the tumorigenesis and the antitumor immune function were studied in a model of chemical carcinogenesis in the mouse lung. **Method:** Thirty three female Kunming mice with urethane subcutaneous injection ($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) were randomized into three groups: the control group, the group treated with LWDH ($1.56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and the group treated with ED ($0.78\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The mice were sacrificed after 100 days to investigate the rate of tumor formation by naked eye, pathological section and hematoxylin-eosin staining. The spleen index, thymus

[收稿日期] 20110829(004)

[通讯作者] *郭慧君,硕士研究生,讲师,从事中药抗肿瘤免疫与分子机制研究, Tel: 15979171845, 0791-7118931, E-mail: guohuijun_81@126.com

- [4] 张磊,孟林.植物多糖的免疫调节作用研究进展[J].天津医科大学学报,2007,13(4):615.
- [5] 中国药典.一部[S].2010:295.
- [6] 高学敏,钟赣生.实用中药学[M].北京:中国中医药出版社,2006:190.
- [7] 李贵荣.野菊花多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J].中国公共卫生,2002,18(3):269.
- [8] Hisashi Matsuda. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity[J]. Chem Pharm Bull,2002,50(6):788.
- [9] 母海成,金在久,施溯筠.玉米粗多糖对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):227.
- [10] 石娟,邓兴安,周玲,等.黄精粗多糖对正常小鼠免疫功能的影响[J].中国现代应用药学,2011,28(1):19.
- [11] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991:159.

[责任编辑 聂淑琴]