

槟榔提取物对小鼠免疫功能及肝脏抗氧化酶的影响

谭树华 刘琼 谢志 秦明珍 贾亚飞 符和杰
(湖南科技大学生命科学学院 湖南湘潭 411201)

摘要:以三种品牌槟榔水提取液和稀磷酸提取液为对象,测定提取物对小白鼠体重、免疫功能及抗氧化酶活性的影响。免疫评价指标包括脾脏指数、胸腺指数以及免疫球蛋白 IgA、IgG 和 IgM 含量,抗氧化酶指标包括 SOD 和 CAT 活性。结果表明,三种槟榔均能显著提高小白鼠体重($p < 0.01$),对胸腺指数、免疫球蛋白影响不显著,仅一个品牌槟榔稀磷酸提取液 90 d 时显著降低脾脏指数($p < 0.05$)和 CAT 活性($p < 0.05$)。槟榔提取液 90 d 内对小鼠具有促进食欲、增加体重的作用,对其免疫功能和抗氧化酶活性总体没有明显影响。

关键词: 槟榔提取物,免疫球蛋白,抗氧化酶

Effect of *Areca catechu* extracts on immunity functions and antioxidant activities in mice

TAN Shu-hua LIU Qiong XIE Zhi QIN Ming-zhen JIA Ya-fei FU He-jie

(School of life sciences, Hunan university of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract: To study the effect of *Areca catechu* on growth, antioxidant enzymes and immune function in mice, the water extract and dilute phosphoric acid extract of three kinds of *Areca catechu* were used as the raw material, immune indexes including spleen index, thymus index and immunoglobulin IgA, IgG and IgM contents, antioxidant enzymes indexes including SOD and CAT activities were determined. The results showed that three kinds of *Areca catechu* extracts increased the body weight of mice significantly ($p < 0.01$), but had no significant effect on thymus index and immune globulin, only the dilute phosphoric extract of one brand *Areca catechu* significantly reduced the spleen index ($p < 0.05$) and CAT activity ($p < 0.05$) at 90 d. Thus *Areca catechu* extracts could promote appetite, growth and do not have obvious influence on immune function and antioxidant enzyme level in mice.

Key words: *Areca catechu* extracts; immunoglobulin; antioxidant enzyme

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)17-0343-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.17.062

槟榔是棕榈科植物槟榔(*Areca catechu* Linn)的干燥种子,在我国主要产于云南、海南及台湾等热带地区。槟榔含有多种人体所需的营养元素和有益物质,同时也含有多种药理活性成分,主要包括生物碱、酚类化合物、脂肪油以及多种氨基酸和各种矿物质^[1-2]。槟榔临床上具有健胃消食、行气利水、杀虫泻下、利湿除疳的功效^[3]。近年来,槟榔产业发展迅速,嚼食人数逐渐增多;同时,围绕槟榔产品安全性的争议不断增多,一些报道指出槟榔能引起口腔黏膜炎症,具有致癌、致突变作用,对生殖系统、神经系统和免疫系统等方面均可能产生毒性作用^[4]。因此,食用槟榔的安全性已引起了国内外学者的重视,对其安全性评价、毒副作用机理、新产品开发等方面均进行了一定研究^[5-7]。但目前槟榔毒性机理研究内容较零星和分

散,现有研究以鲜果槟榔提取物为多,而以市场定型产品为研究对象的研究尚少。因此,本实验以市场定型产品为对象,研究槟榔提取液对小白鼠免疫功能及抗氧化酶的影响,拟为槟榔的药理及毒性作用评价提供资料,为槟榔食用安全提供参考作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

槟榔 购买三种品牌独立包装槟榔产品,编号为 B、C 和 D 号,槟榔提取物分为水提取和稀磷酸提取。槟榔水提液:称取带干卤水的品牌槟榔干重各 7.5 g,分别加 500 mL 蒸馏水,于 25 °C 恒温水浴中浸提 12 h,过滤得到的滤液于 4 °C 保存。稀磷酸提取液采用 0.001 mol/L 的稀磷酸提取^[8],方法同水提取液。

收稿日期:2014-11-15

作者简介:谭树华(1972-)男,博士,副教授,研究方向:食品及环境毒理学, E-mail: hstan@126.com。

基金项目:湖南省自然科学基金(2014JJ9058);湖南科技大学大学生研究性学习和创新性实验计划项目(143128)。

表1 槟榔提取液对小白鼠体重的影响

Table 1 Effect of Areca catechu extracts on the weight in mice

组别	数量	体重(g)			p(两种不同的提取方法比较)		
		天数(d)			天数(d)		
		30	60	90	30	60	90
A	12	30.15 ± 2.81	32.85 ± 1.49	35.03 ± 1.65			
B1	12	35.52 ± 2.94*	41.00 ± 3.54**	45.90 ± 5.86**	0.877	0.29	0.249
B2	12	35.52 ± 2.95*	38.90 ± 3.53*	42.48 ± 1.02**			
C1	12	34.52 ± 2.96	38.20 ± 2.62*	46.77 ± 2.51**			
C2	12	34.82 ± 2.97	39.17 ± 1.26*	42.00 ± 2.95*	0.836	0.36	0.103
D1	12	35.02 ± 2.98	40.10 ± 1.56**	44.83 ± 4.30*			
D2	12	35.42 ± 2.99	39.26 ± 1.77*	43.50 ± 3.58**			

注:与A组(对照组)比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 表2、表3同。

实验动物 为洁净级昆明小白鼠, 2月龄, 购于湖南一阁制药有限公司实验动物中心。雌雄各半, 雌性未产, 无孕, 体重18~20 g。

752 紫外可见分光光度计 上海佑科仪器仪表有限公司; TE412 电子分析天平 德国赛多利斯 Sartorius 集团公司; Hitachi 7180 全自动生化分析仪 日立公司; CT15RT 台式高速冷冻离心机 德国 eppendorf 公司。

1.2 实验方法

实验设计 小白鼠雌雄分开, 共分为7组, 每组12只, 其中A为对照组, B1、C1和D1为B、C和D号槟榔的水提物, B2、C2和D2为B、C和D号槟榔的稀磷酸提取物。实验组小鼠实验期间自由食用槟榔提取液, 浓度为1.5% (含生药0.015 g/mL), A组用纯净水代替。各组早晚喂食基础饲料, 饲喂量以饲喂后2 h内吃完为准。

1.3 结果测定

1.3.1 脾脏指数和胸腺指数测定 喂养90 d时, 先称量小白鼠体重, 颈椎脱臼处死小白鼠, 取脾脏, 胸腺和肝脏适量, 吸取其表面水分, 用电子天平分别称重。测量小白鼠脾脏指数(脾脏重/体重), 胸腺指数(胸腺重/体重)。

1.3.2 免疫球蛋白的测定 90 d时, 用眼球摘除法取血于离心管中, 4℃冰箱过夜后于3500 r/min 离心15 min, IgA、IgG、IgM 测定试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司生产, 用全自动生化分析仪进行免疫比浊法测定。

1.3.3 小白鼠肝脏酶活性测定 饲喂30 d和90 d时采样分析, 每组12只, 将所取肝脏按肝:生理盐水=1:9混合于玻璃匀浆管中研磨, 匀浆液于高速冷冻离心机在10000 r/min下离心12 min, 得上清液用于分析。SOD酶测定采用邻苯三酚自氧化法^[9]、CAT酶采用紫外分光光度法^[10]。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法测定^[11], 单位为 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.4 数据处理方法

实验数据以平均值 ± 标准差表示, 数据分析采用独立样本t检验, 采用SPSS13.0统计软件处理。

2 结果与分析

2.1 对小鼠体重的影响

由实验观察可得, 饲喂槟榔提取液可以提高小白鼠的活跃程度。由表1可知, 饲喂槟榔提取液组小白鼠体重增长明显快于对照组。在第60 d时, 两种槟榔(B1、D1)的水提液处理小鼠体重极显著增加($p < 0.01$), 其余组小鼠体重显著增加($p < 0.05$)、90 d时, 除C2和D1组槟榔提取物显著提高了小鼠体重($p < 0.05$), 其余组体重增加均达到了极显著水平($p < 0.01$), 饲喂90 d时, B、C、D三种槟榔的水提液处理组小白鼠分别较对照组增加了31.03%、33.51%和27.98%。稀磷酸提取组较对照组分别增加了21.27%、19.90%和24.17%。两种不同提取方法相比较, 其对小白鼠体重增加无显著差异。

2.2 对脾脏指数和胸腺指数的影响

如表2所示。与对照组相比, 三个处理组在喂养90 d时, 槟榔提取液对小白鼠的胸腺指数均未产生显著影响。脾脏指数除D1组较对照组降低20.75% ($p < 0.05$)外, 差异均不显著。此外, 两种不同提取方法对小白鼠肝脏和脾脏指数亦无显著影响。

表2 槟榔提取液对小白鼠脾脏指数的影响

Table 2 Effect of Areca catechu extracts on the spleen index in mice

组别	小鼠数(只)	脾脏指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)
A	5	5.06 ± 0.82	2.60 ± 0.61
B1	5	4.27 ± 0.84	1.90 ± 0.62
B2	5	4.30 ± 1.12	2.33 ± 0.52
C1	5	4.32 ± 0.74	2.35 ± 0.54
C2	5	5.22 ± 0.92	2.16 ± 0.49
D1	5	4.01 ± 0.96*	2.37 ± 0.53
D2	5	4.47 ± 1.23	2.19 ± 0.50

2.3 小白鼠免疫球蛋白测定

从表3可以看出, 与对照组相比, 除D2组IgM含量显著下降外($p < 0.05$), 其余各组槟榔提取物对IgA、IgG和IgM含量影响均不显著, 且两种不同提取方法对小白鼠免疫球蛋白含量亦不产生显著影响。

2.4 槟榔对小白鼠SOD酶活性的影响

由图1可知, 槟榔提取液在饲喂30 d和90 d时

表3 槟榔提取液对小白鼠免疫球蛋白含量的影响

Table 3 Effect of *Areca catechu* extracts on the content of immune globulin in mice

组别	小鼠数 (只)	IgA 含量 (g/L)	p (提取方法比较)	IgG 含量 (g/L)	p (提取方法比较)	IgM 含量 (g/L)	p (提取方法比较)
A	12	0.0067 ± 0.006		0.21 ± 0.10		0.23 ± 0.06	
B1	12	0.01 ± 0.000		0.42 ± 0.06	0.683	0.18 ± 0.10	0.925
B2	12	0.01 ± 0.000		0.48 ± 0.23		0.19 ± 0.06	
C1	12	0.01 ± 0.000	0.423	0.50 ± 0.11	0.486	0.15 ± 0.07	0.912
C2	12	0.0067 ± 0.006		0.32 ± 0.39		0.19 ± 0.10	
D1	12	0.0067 ± 0.006	0.495	0.43 ± 0.23	0.721	0.14 ± 0.10	0.615
D2	12	0.0067 ± 0.006		0.32 ± 0.21		0.10 ± 0.01*	

对小白鼠 SOD 酶活性影响均不显著。同时,在槟榔的两种不同的提取方法比较中,30、90 d 处理后的 p 都大于 0.05,故其不同的提取方法对小白鼠 SOD 活性影响也无显著差别。

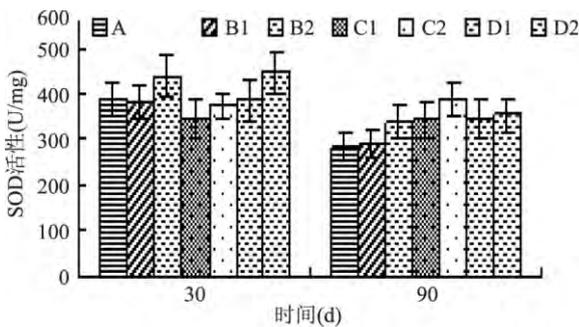


图1 槟榔提取物对小白鼠 SOD 酶活性的影响
Fig.1 Effect of *Areca catechu* extracts on SOD activities of liver of mice

2.5 槟榔对小白鼠 CAT 酶活性的影响

由图 2 可知,实验过程中,除 D2 组在 30 d 和 90 d 时 CAT 活性显著低于对照组外 ($p < 0.05$),其余组 CAT 活性与对照组不存在显著差异。同时,饲喂时间延长,两种不同的提取方法均未对小白鼠 CAT 酶活性变化产生显著影响,两种提取方法中,仅 D 组中稀磷酸提取液组较水提取液组活性出现显著下降 ($p < 0.05$),在 30、90 d 时稀磷酸提取分别较水提取组下降 31.37% 和 31.31%。

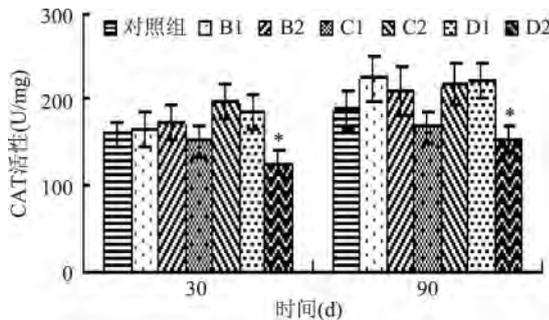


图2 槟榔提取物对小白鼠 CAT 酶活性的影响
Fig.2 Effect of *Areca catechu* extracts on CAT activities of liver of mice

3 讨论

3.1 槟榔对小白鼠体重的影响

体重是动物健康状况最直观的指标,槟榔对消

化和吸收的促进作用已有不少研究。袁烈江等^[12]报道了 10、30、50 mg/kg 3 个剂量槟榔提取物对胃肠功能的影响,发现槟榔提取物可显著改善小白鼠的胃肠功能促进小白鼠胃肠蠕动及增强其小肠吸收功能。本次实验中,槟榔剂量要高,为 0.015 g/mL 提取物,在用槟榔提取物饲喂 90 d 时,与对照组相比小白鼠体重显著增加,喂养过程中,添加槟榔提取液组小鼠活动能力明显更强,生长更快,食量要大于对照组。说明槟榔在很宽的剂量范围内对肠道功能、小肠吸收等具有促进作用。其他一些研究亦表明槟榔能促进胃运动,消毒杀菌、帮助消化和增强食欲^[13-14]。何双等^[15]报道海南产槟榔提取物和小龙王槟榔提取物能延长小鼠负重游泳时间,增加小鼠肝糖原含量,降低血清乳酸水平,显著降低小鼠血尿素氮含量,具有较强缓解动物体力疲劳的作用。原因可能是槟榔中含有槟榔碱,槟榔碱能兴奋乙酰胆碱受体,刺激神经冲动,提高肌肉收缩能力。此外,本次实验中两种不同方法提取的槟榔液对小白鼠体重影响差异不显著,说明水和稀磷酸对槟榔有效物质的提取差异可能并不显著。

3.2 槟榔对小白鼠脾脏指数和胸腺指数的影响

胸腺和脾脏是重要的免疫器官,其脏器指数反应免疫器官的发育和免疫细胞的功能状况,可在一定程度上间接反映了机体的免疫水平。本次实验表明,仅 D2 组槟榔提取液对小白鼠脾脏指数出现显著降低作用,其余组脾脏指数和胸腺指数的影响均未见明显变化。与胡怡秀等报道^[6]以槟榔水提取液灌胃受试小鼠 90 d,发现未对小白鼠细胞免疫、单核-巨噬细胞功能、胸腺/体重比值产生影响,但在 7.50、3.75 g/kg 剂量时,受试小鼠出现溶血空斑数减少,脾/体比值降低的结果相似。但赵成莹^[16]等报道小白鼠槟榔碱的急性毒性作用时的 LD₅₀ 为 174.71 mg/kg,中毒主要病理变化表现在胃肠道,死亡动物均胃肠道出血,肝脏、脾脏变色,体积增大,肺脏出血,最终因呼吸麻痹死亡。此次实验中解剖未发现肝脏和脾脏的相关病理变化,可能与槟榔提取液其有效成分比急性毒性浓度低有关,同时也表明低剂量槟榔液 90 d 对小白鼠免疫器官不会产生明显影响。

3.3 槟榔对小白鼠免疫球蛋白活性的影响

免疫球蛋白具有抗体活性的动物蛋白,它在体液免疫中发挥着重要作用。本实验中,3 种槟榔提取

液对小白鼠免疫球蛋白 IgA、IgG 和 IgM 活性的影响均不显著,同时两种不同提取方法对这 3 种免疫球蛋白含量影响亦无显著差异。与其他一些研究结果不尽一致:高华北等^[17]报道了槟榔加工者免疫功能受到一定程度的损害,槟榔作业组血清 IgA、IgG 含量降低,并明显低于对照组($p < 0.05$),并且槟榔加工者免疫功能有随环境变差而降低,随工龄增长而降低,尤其是 IgA 降低较显著。胡怡秀等^[6]对槟榔进行亚慢性毒性研究发现在 90 d 的实验期内 15 g/kg 体重重组小鼠死亡率达 25%,与长期给予较高剂量的槟榔提取物导致机体免疫力下降发生感染有关。本次实验未发现对免疫球蛋白有显著影响,其原因可能与饲喂剂量低,接触时间短以及具体环境有关。研究结果表明低剂量槟榔短时间不会对人体产生明显的免疫功能损害。

3.4 槟榔对小白鼠抗氧化酶的影响

SOD 是重要的抗氧化酶,其主要功能是清除机体产生的活性氧自由基。据报道,活性氧族(ROS)的产生导致口腔黏膜病变可能是槟榔毒副作用的重要原因。有研究指出服用 β -胡萝卜素(180 mg/周)和维生素 A(10 万 u/周)6 个月可显著减轻口腔黏膜白斑症并抑制新的口腔黏膜白斑产生,从而认为咀嚼烟草或槟榔造成的口腔黏膜病变可能是 ROS 产生所致^[18]。本实验中,槟榔对小白鼠 SOD 酶活性并不存在显著影响,同时仅一个组的稀磷酸提取液 90 d 时对 CAT 活性产生明显抑制作用,说明适量槟榔并没有导致明显的氧化胁迫和自由基的增加。这与 Chang 等^[19]报道槟榔碱不会增加细胞的脂质过氧化反应,用甘露醇、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶(SOD)也不能预防槟榔碱对口腔黏膜成纤维细胞的损伤作用结果一致。但与袁烈江等^[20]等报道槟榔鲜果处理 30 d 后能显著提高小白鼠的血清 SOD 水平,槟榔提取物在小白鼠体内具有良好的抗氧化活性作用不一致。原因可能与槟榔鲜果和加工产品之间存在一定差异,处理时间不同,以及槟榔提取物的低浓度有关。因此,要想验证槟榔对 ROS 产生的影响,则需要更多浓度和更长时间的时间来进行验证。

4 结论

槟榔具有促进小鼠摄食、生长和活动的功能。

3 个月内槟榔提取物对胸腺指数和脾脏指数没有显著影响。

槟榔提取物对免疫球蛋白不产生显著影响,其中 IgA 含量最稳定,受影响最小,有一个品牌槟榔的稀磷酸提取物显著降低 IgM 含量。

槟榔提取物对抗氧化酶 SOD 没有显著影响,但一个品牌槟榔的稀磷酸提取物降低了 CAT 活性。

因此,短时间内(90 d),食用槟榔对小鼠的消化和吸收功能具有良好促进作用,且对免疫功能好抗氧化功能不产生明显影响,但长期影响仍需要进一步扩大槟榔剂量范围和延长处理时间进行研究。

参考文献

- [1] Wang C K, Lee W H, Peng C H. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn during maturation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(4): 1185-1188.
- [2] 中国医学百科全书编辑委员会. 中药学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988: 375-376.
- [3] 梁宁霞. 槟榔药理作用研究进展 [J]. *江苏中医药*, 2004, 25(8): 55-57.
- [4] Jayant K, Balakrishnan V, Sanghvi LD, et al. Quantification of the role of smoking and chewing habits in oral, pharynx, and esophageal cancer [J]. *British of Journal Cancer*, 1977, (35): 232-235.
- [5] 高义军, 凌天胤, 尹晓敏, 等. 槟榔碱诱导口腔角质形成细胞凋亡研究 [J]. *口腔医学研究*, 2007, 23(6): 624-628.
- [6] 胡怡秀, 臧雪冰, 丘丰, 等. 槟榔对小鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. *中国医师杂志*, 1999(10): 21-22.
- [7] Chu N S. Effects of betel chewing on the central and autonomic nervous systems [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2001(8): 229-236.
- [8] Huang JL, Meleish ML. High performance liquid chromatographic determination of the alkaloids in betel nut [J]. *Journal of Chromatography*, 1989, 47(5): 447-450.
- [9] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法邻苯三酚自氧化法的改进 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1985, 13(4): 71-73.
- [10] 蒋传葵. 工具酶活性测定 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 36-37.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [12] 袁烈江, 李忠海, 郑锦星. 槟榔提取物对小白鼠胃肠功能的影响研究 [J]. *中国食品学报*, 2009, 9(4): 38-43.
- [13] 郭喜军, 郑陇军. 槟榔对大鼠胃运动的影响及机制研究 [J]. *山东中医杂志*, 2008, 27(12): 834-835.
- [14] 李忠海, 钟海燕, 郑锦星, 等. 槟榔提取物在小白鼠体内的抑菌作用 [J]. *食品与机械*, 2007, 23(5): 81-83.
- [15] 何双, 李忠海, 钟海燕, 等. 槟榔提取物对小鼠抗疲劳作用的研究 [J]. *食品与机械*, 2009, 25(2): 67-70.
- [16] 赵成莹, 张继瑜, 周绪正, 等. 槟榔碱、氢溴酸槟榔碱的急性毒性研究 [J]. *中国兽医杂志*, 2007(1): 33-34.
- [17] 高华北, 张花玲, 黄曦, 等. 槟榔加工作业对机体免疫功能的影响 [J]. *中国热带医学*, 2009, 9(2): 306-307.
- [18] Stich H F, Anders F. The involvement of reactive oxygen species in oral cancers of betel quid tobacco chewers [J]. *Mutation Research*, 1989, 214(1): 47-61.
- [19] Chang YC, Hu CC, Fseung T H, et al. Synergistic effects of nicotine on arecoline-induced cytotoxicity in human buccal mucosal fibroblasts [J]. *J Oral Pathol Med*, 2001, 30(8): 458-464.
- [20] 袁烈江, 李忠海, 郑锦星. 槟榔提取物对小白鼠体内抗氧化作用的研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30(7): 225-228.