

· 实验研究 ·

补肾化瘀方药调整免疫衰老的机理研究*

蒋文跃 李顺成 王传社 王玉明 王虹

内容提要 本实验从三方面研究八味丹坤汤调整免疫衰老与改善自由基代谢的关系。结果表明老年小鼠白细胞介素 2(IL-2)产生降低, 过氧化脂质(LPO)含量增加、过氧化氢酶(CAT)活性下降。给药后上述指标均得到调整。臭氧吸入小鼠的上述指标出现类似衰老的变化。给药后, LPO 含量降低, 同时 CAT 和 IL-2 活性得到增强, 且两者呈线性相关。在脾淋巴细胞培养液中加入过氧化氢(H_2O_2), 发现可使淋巴细胞 IL-2 产生明显减少, 同时加入该方提取物, IL-2 产生又恢复到未加 H_2O_2 的对照组水平。研究提示补肾化瘀方药调整免疫衰老与改善自由基代谢密切相关, 且为“正虚夹瘀是衰老的主要机制”的观点提供了部分依据。

关键词 补肾化瘀 延缓衰老 免疫功能 自由基代谢

Mechanism of Tonifying Kidney and Removing Blood Stasis Recipe in Modulation of Immune Senescence Jiang Wen-yue, Li Shun-cheng, Wang Chuan-she, et al *Beijing Medical University, Beijing (100083)*

This experiment was from 3 aspects to study the relationship between modulating immune senescence and the improvement of free radical metabolism by the recipe of Baweidankun decoction (BWDKD). The results showed that the production of IL-2 decreased, the content of LPO increased and the activity of catalase (CAT) declined in old mice. After medication of BWDKD the above-mentioned indices were modulated. The ozone inhaled mice revealed similar changes of aging in the above indices. After BWDKD administration, the content of LPO decreased, meanwhile, the activity of CAT and IL-2 were strengthened and showed linear correlation. It was discovered that the production of IL-2 decreased significantly after adding H_2O_2 into the culture of splenic lymphocytes, but when BWDKD was added simultaneously, the IL-2 production was restored to the level of control group, in which no H_2O_2 was added. The results suggested that the modulating effect of BWDKD on immune senescence was closely related with the improvement of free radical metabolism, and it provided a partial evidence for the viewpoint of "Vitality deficiency with blood stasis is the principal mechanism of senescence"

Key words Tonifying Kidney and removing blood stasis, anti-aging, immune function, free radical metabolism

中医认为脏腑虚损尤其肾虚是衰老的主要原因, 延缓衰老多以补肾或健脾为主。但虚久必瘀, 因此我们提出“正虚夹瘀是衰老的主要机制”的观点⁽¹⁾。肾气虚衰是正虚的主要矛盾方面, 也是导致血瘀的重要原因, 故我们首先从补肾化瘀入手验证上述理论。实验选用经典补肾复方八味地黄汤与活血化瘀药丹参、益母草配伍(名为八味丹坤汤), 探讨补肾化瘀调整免疫

衰老与改善自由基代谢的关系。

材料与方法

1 动物 C₅₇BL/6 青年小鼠(3 月龄), 雌雄均用, 体重 20~30 g。由本校实验动物部提供, 本室饲养至老年(24 月龄)。

2 分组 (1)设青年对照组(9 只), 老年对照组(9 只), 老年给药组(8 只)。(2)将青年小鼠 15 只随

*国家自然科学基金资助课题

北京医科大学中西医结合研究所(北京 100083)

机分为正常对照组, 臭氧衰老模型组, 模型给药组, 每组 5 只。后两组一同放入臭氧箱(浓度 1.3 ppm), 每天放置 12 h, 连续 2 周。(3)用成年(11 月龄)小鼠, 取脾淋巴细胞用作体外培养。

3 药物及给药方法 中药购自北京医科大学附属第三临床医学院中药房并经鉴定。八味丹坤汤由熟地 24 g 山药 12 g 山萸肉 12 g 茯苓 9 g 泽泻 9 g 丹皮 9 g 附子 5 g 肉桂 5 g 丹参 10 g 益母草 10 g 组成。水煎 2 次, 合并滤液浓缩成 160%(含生药 1.6 g/ml)。(1)老年给药组小鼠每日灌服 1 次, 每次 0.6 ml, 连续 4 周, 青年及老年对照组依同法给等量自来水; (2)模型给药组小鼠每日灌服八味丹坤汤 1 次, 每次 0.6 ml, 连续 2 周, 模型对照组及正常对照组依同法给等量自来水; (3)将水煎剂离心, 过滤除菌, 用完全 RPMI-1640 液配成 10 mg/ml 粗提物, 稀释成所需浓度用于体外培养。

4 试剂 RPMI-1640 液临用前加 10% 新生小牛血清, 青霉素、链霉素各 1 万 u%; 200 mmol/L 谷氨酰胺 1% 及 5×10^{-6} 二巯基乙醇。ConA: (Sigma 产品, 批号 81039)称量后按 1 mg/ml 溶于 RPMI-1640 液中, 过滤除菌, -20°C 保存。 ^3H -TdR(北京中国原子能科学研究院产品, 批号: 910321); 用生理盐水配成 $10 \mu\text{Ci/ml}$, 4°C 保存。闪烁液: 称取 PPO(美国 MERK 药厂产品, 批号: 826 L-543746)2.5 g、POPOP(上海试剂一厂产品, 批号: 814801)0.25 g 溶于二甲苯内。

5 白细胞介素 2(IL-2)上清液制备及其活性检测 无菌取脾, 研磨后过滤。用 Hank's 液制成单细胞悬液, 洗 2 次。计数后, 用完全 RPMI-1640 液配成 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液, 放入 24 孔板中, 同时加 ConA(终浓度 $5 \mu\text{g/ml}$), 置 37°C , 5% CO_2 培养箱内, 孵育 48 h, 离心收集上清。 -30°C 冰箱内保存待测。IL-2 活性检测用 CTLL-2 依赖株为靶细胞测定 IL-2 活性。参考 Gillis 等方法略加改进⁽²⁾。

6 肝、脑、脾淋巴细胞过氧化脂质(LPO)含量测定 肝、脑采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定⁽³⁾。脾淋巴细胞 LPO 测定, 先制成脾淋巴细胞悬液, 用 $\text{Tris-NH}_4\text{Cl}$ 溶解红细胞, 然后计数调整细胞浓度为 $8 \times 10^7/\text{ml}$, 用 TBA 比色法测定 LPO 含量。

7 血过氧化氢酶(CAT)活性测定 采用过硼酸钠滴定法⁽⁴⁾。

结 果

1 八味丹坤汤对老年小鼠脾淋巴细胞 IL-2 产生

的影响 见表 1。 ^3H -TdR 掺入量在 1:2、1:4、1:8 稀释度时, 青年对照组明显高于老年对照组(约为其 3 倍), 连续给药 4 周后, 老年给药组数值可见明显上升, 并接近青年对照组水平。说明老年小鼠 IL-2 产生能力明显降低, 而八味丹坤汤可明显促进老年小鼠 IL-2 的产生。

表 1 3 组小鼠 IL-2 产生的比较 (cpm, $\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	^3H -TdR 掺入量		
		1:2	1:4	1:8
青年对照	9	16960 $\pm$ 1528*	7069 $\pm$ 706*	2426 $\pm$ 353*
老年对照	9	5220 $\pm$ 754	2163 $\pm$ 173	1664 $\pm$ 401
老年给药	8	13041 $\pm$ 1174*	6765 $\pm$ 1213*	3521 $\pm$ 836*

注: 与老年对照组比较, * $P < 0.001$; 细胞对照: 114 $\pm$ 4 cpm

2 八味丹坤汤对老年小鼠肝、脑 LPO 含量及血 CAT 活性的影响 见表 2。与青年对照组相比, 老年对照组肝、脑 LPO 含量明显增加, 血 CAT 活性明显降低。老年给药组与老年对照组相比, 肝、脑 LPO 含量明显降低, 甚至明显低于青年对照组水平, 血 CAT 活性明显恢复。说明自由基代谢产物及其产物对机体损伤随增龄而增加, 自由基清除酶活性随增龄而降低, 八味丹坤汤有提高老年机体自由基清除酶活性和抑制过氧化脂质形成的作用。

表 2 3 组小鼠肝、脑 LPO 含量及 CAT 活性的比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	LPO(nmol/g)		CAT(u)
		肝	脑	
青年对照	9	145.3 $\pm$ 16.1*	163.8 $\pm$ 13.7*	1.58 $\pm$ 0.05*
老年对照	9	175.8 $\pm$ 9.6	199.5 $\pm$ 7.5	1.39 $\pm$ 0.06
老年给药	8	63.9 $\pm$ 7.1*	94.7 $\pm$ 15.5*	1.63 $\pm$ 0.09*

注: 与老年对照组比较, * $P < 0.001$

3 八味丹坤汤对臭氧(O_3)吸入鼠 IL-2 产生的影响 见表 3。3 月龄青年小鼠吸入 O_3 后, 其脾淋巴细胞 IL-2 产生能力明显受损。 ^3H -TdR 掺入量在 1:2、1:4、1:8 时模型组的值均低于青年对照组。吸入 O_3 同时

表 3 3 组小鼠 IL-2 产生的比较 (cpm, $\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	^3H -TdR 掺入量		
		1:2	1:4	1:8
青年对照	5	10622 $\pm$ 1568**	5556 $\pm$ 1471*	2069 $\pm$ 699*
模型对照	5	3892 $\pm$ 1786	1357 $\pm$ 822	463 $\pm$ 178
模型给药	5	7334 $\pm$ 1014**	3290 $\pm$ 889*	1360 $\pm$ 677*

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$; 细胞对照: 123 $\pm$ 15 cpm

灌服八味丹坤汤组小鼠其 IL-2 产生又有显著改善。

4 八味丹坤汤对 O_3 吸入鼠脾淋巴细胞 LPO 含量及血 CAT 活性的影响 见表 4。衰老模型对照组血中 CAT 活性与青年对照组相比, 有明显降低。模型给药组与模型对照组相比, 其 CAT 活性得到明显增强, 并接近青年对照组水平。衰老模型对照组脾淋巴细胞 LPO 含量比青年对照组有所增加, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。模型给药组脾淋巴细胞 LPO 含量比模型对照组明显下降。表明八味丹坤汤可直接提高衰老模型小鼠自由基清除酶活性和降低其脾淋巴细胞 LPO 含量的作用。

表 4 3 组小鼠 CAT 活性及 LPO 含量的比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	CAT (u)	LPO (nmol/ 8×10^7 cell)
青年对照	5	$2.60 \pm 0.143^{**}$	24.88 ± 1.10
模型对照	5	2.35 ± 0.104	26.69 ± 2.14
模型给药	5	$2.58 \pm 0.093^*$	$21.22 \pm 2.12^{**}$

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

5 八味丹坤汤对过氧化氢(H_2O_2)作用下的脾淋巴细胞 IL-2 产生的影响 体外培养的成年(11 个月)鼠脾淋巴细胞, 当加入不同浓度(12.0、6.0、3.0 $\mu\text{mol/L}$) H_2O_2 后, 其 IL-2 活性(cpm, $\bar{x} \pm S$)分别为 7489 ± 80 、 7707 ± 375 、 8783 ± 674 , 与未加 H_2O_2 组(9622 ± 612)相比, 有明显降低(分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。加入上述浓度 H_2O_2 的同时, 再加入八味丹坤汤提取物(0.1 mg/ml), 各组 IL-2 活性分别为 10777 ± 501 、 11800 ± 166 、 12210 ± 1269 。与单纯加 H_2O_2 组相比, IL-2 活性均有显著升高(分别为 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$), 说明 H_2O_2 可损伤淋巴细胞产生 IL-2 的功能, 而八味丹坤汤对此有明显的调整作用。

讨 论

肾虚与衰老的关系已得到广泛重视与印证^[5]。肾虚日久必然致瘀, 虚与瘀相互影响促进衰老进程。补肾化瘀可能是较为理想的抗衰老途径。近年研究认为, 伴随增龄, IL-2 产生减少、自由基代谢紊乱均与肾虚和血瘀两者有密切关系。这一点在我们以往的工作中也得到了证实: 即补肾化瘀在调整免疫衰老、提高淋巴因子产生及改善自由基代谢方面较单纯补肾或化瘀显示出更佳的效果。本实验从正常老年、衰老模型以及体外实验三方面研究表明补肾化瘀在调整免疫衰老和改善自由基代谢方面均有着明显的作用。

自由基通过膜脂质过氧化和破坏细胞 DNA 结构

完整性等导致老年机体免疫功能的损伤。Hendricks 等发现小鼠 T 淋巴细胞过氧化脂质随增龄而增加。有人证明异丙基苯氢过氧化物能使老年人外周血 T 细胞 DNA 解螺旋和断裂较青年人更为严重^[6]。小鼠不断吸入 O_3 可使羟自由基等在体内堆积, 超出清除酶清除能力, 导致许多类似衰老的变化^[7]。对免疫细胞的损害是其作用之一。本研究结果显示, 吸入臭氧后生成的自由基(主要为羟自由基)可使淋巴细胞产生 IL-2 的能力明显受损。体外实验进一步证实 H_2O_2 (主要生成羟自由基)作用下的脾细胞产生 IL-2 明显下降。对衰老模型实验组的 IL-2 产生及 CAT 活性作相关分析发现, 两者呈显著的线性正相关($\gamma = 0.59$, $P < 0.05$)。说明自由基清除酶活性与 IL-2 产生有直接关系。八味丹坤汤使衰老模型小鼠低下的 CAT 活性恢复及淋巴细胞 LPO 含量降低同时, 也调整了 IL-2 的产生。以往我们的研究也证实补肾化瘀可明显提高脾淋巴细胞 DNA 的抗损伤能力。因此, 补肾化瘀延缓衰老促进 IL-2 产生的重要途径之一可能与其增强防御酶系统特别是 CAT 活性, 进而增强清除自由基能力, 减少自由基对 T 细胞的过氧化损伤及 DNA 的破坏有关。详细机制有待进一步探讨。本研究为“正虚夹瘀是衰老的主要机制”提供了部分实验依据。

参 考 文 献

1. 李顺成, 蒋文跃, 王传社, 等. 正虚夹瘀是衰老的主要机制. 中国医药学报 1992; 7(6): 4.
2. Gillis S, Ferm MM, Ou W, et al. T cell growth Factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. J. Immunol. 1978; 120(6):2027.
3. Asokawa T, Matsushita S. Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. Lipids 1979; (4): 401.
4. 白秀起, 戴工禾, 夏兆奇. 过硼酸盐作底物滴定法测定红细胞及心肌组织中过氧化氢酶活力. 白求恩医科大学学报 1989; 15(1): 34.
5. 姚培发, 褚秋萍, 丁一谭, 等. 祖国医学抗老延龄问题初探. 上海中医药杂志 1982; (6): 2.
6. Liu Bai-qing, Cornwell DG, Whisler RL. Age-related changes in DNA of human T cells. Aging: Immunology and Infectious Diseases 1992; 3(3): 101.
7. 刘晓青, 卢咏才, 郭肇铮, 等. 臭氧对小鼠的损伤. 中华劳动卫生职业病杂志 1990; 8(6): 365.

(收稿: 1994-10-07 修回: 1995-02-14)