

## · 实验研究 ·

# 补肾、健脾、活血类中药复方对老龄小鼠免疫功能作用的对比研究\*

张新民 沈自尹 王文健 陈素珍 陈伟华

**内容提要** 本研究以老龄(18月龄)小鼠为实验对象,对补肾的右归饮、健脾的四君子汤、活血的桃红四物汤对免疫功能的影响作对比研究。结果表明:老年对照组 T、B 淋巴细胞转化(淋转)、OKT<sub>3</sub> 细胞均明显低于成年(3月龄小鼠)对照组。经喂中药 4 周后,活血化瘀组、健脾益气组 T、B 淋转明显高于老年对照组;补肾益精组 T、B 淋转没有明显变化,OKT<sub>3</sub> 细胞明显低于老年对照组。这一结果提示:补肾益精方对衰老或肾虚状态下的免疫机能似乎与活血化瘀方、健脾益气方有不同的作用。

**关键词** 衰老 中药复方 比较研究

**Comparative Study on Immunologic Effect of Composite Prescriptions of Tonifying Kidney, Invigorating Spleen and Promoting Blood Circulation Drugs in Mice** ZHANG Xin-min, SHEN Zi-yin, WANG Wen-jian, et al *The Institute of Integration of TCM-WM, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

Comparative study on effect of Youguiyin (prescription for tonifying Kidney), Sijunzi Decoction (for invigorating Spleen) and Taohong Siwu Decoction (for promoting blood circulation) was conducted in mice aged 18 months divided into 4 groups. Above-mentioned prescriptions were given to group I ~ III respectively and group IV untreated for aged control. Another group of 3 months mice was selected as adult control. The results showed that T-, B-lymphocyte transformation rate and OKT<sub>3</sub> lymphocyte subset in the aged control group were distinctly lower than those in the adult control group. After 4 weeks treatment with different composite prescriptions, the T-, B-lymphocyte transformation rate of group II and III were evidently higher than those of aged control group and OKT<sub>3</sub> lymphocyte subset was distinctly lowered in group I than that group IV. This results suggested that the prescription of tonifying Kidney acted on immune function of aged animals in a way different from that of prescriptions for invigorating Spleen or for promoting blood circulation.

**Key words** aging, composite prescription, comparative study

中医虚证模型是研究中医虚证本质,研究补虚中药疗效及其作用机理的关键一环。如何选择虚证模型直接关系到实验结果的实际意义。而中医“虚证”本身是一个尚没有明确的病理特征、模糊的抽象概念,这就给虚证模型的制作带来极大困难。本实验选择 18 月龄小鼠为实验对象,以求更接近中医临床,旨在探讨

在衰老或肾虚状态下机体免疫机能的状况和补肾、健脾及活血类中药复方对这一免疫状况的作用。

## 资料与方法

1 实验动物、分组及用药 采用 18 月龄昆明种小鼠,体重 40~50 g,由上海医科大学动物中心提供,雌雄各半,随机分为活血化瘀组(11 只),健脾益气组(10 只)、补肾益精组(11 只)和老年对照组(12 只)。另取 3 月龄昆明种小鼠,雌雄各半作为成年对

\*国家自然科学基金重点项目(39230370)

上海医科大学中西医结合研究所(上海 200040)

照组(12只)。在以上3个用药组的饮水中分别加入桃红四物汤、四君子汤和右归饮浓缩煎剂,每毫升含生药量分别为0.6g、0.33g和0.62g,为成年人每公斤体重计量的10倍,任其自饮。两个对照组的饮水中不加任何药物。用药4周后,所有实验动物分批处死取材作各种免疫指标测定。

2 药物及试剂 桃红四物汤由桃仁10g 红花10g 当归10g 熟地10g 白芍10g 川芎10g 组成。四君子汤由党参10g 白术10g 茯苓10g 甘草3g 组成。右归饮由熟地10g 山药10g 山萸肉10g 仙灵脾10g 枸杞子10g 附子6g 肉桂3g 炙甘草3g 组成。Con A和美洲商陆均由Sigma公司进口。OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>、OKT<sub>8</sub>全套试剂由北京医科大学免疫教研室提供。

### 3 测定指标及方法

3.1 腹腔巨噬细胞吞噬功能测定 实验动物在处死前12h腹腔注射鸡红细胞悬液。动物处死后打开腹腔,用生理盐水洗涤腹腔后吸出,滴于玻片,置37℃温箱中1h,再置4℃冰箱中1h,用生理盐水冲洗弃未吸附细胞,待玻片吹干后作姬姆萨-瑞士快速染色,光镜下计数并算出百分率。

3.2 腹腔巨噬细胞Fc受体测定 实验动物处死后打开腹腔,用生理盐水洗涤腹腔后吸出,滴于玻片上,置37℃温箱中1h,用生理盐水冲洗弃未吸附细胞,用致敏红细胞覆盖玻片,再置37℃温箱1h,置4℃冰箱中1h,用生理盐水冲洗弃未吸附细胞,待玻片吹干后作姬姆萨-瑞士快速染色,光镜下计数,算出百分率。

3.3 T、B淋巴细胞转化(淋转)率测定 实验动物处死后取脾脏制成淋巴细胞悬液,加于96孔培养板,每孔 $5 \times 10^5$ 细胞,分别加入Con A和美洲商陆后置37℃、CO<sub>2</sub>培养箱中24h,加入<sup>3</sup>H-TdR 1μCi,再置CO<sub>2</sub>培养箱中18h,收集细胞,LKB液闪仪测定cpm值。

3.4 淋巴细胞亚群测定 实验动物处死后取脾脏制成 $2 \times 10^6$ /ml淋巴细胞悬液,每管50μl,分别

加入OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>、OKT<sub>8</sub>特异性抗体20μl,置37℃培养箱30min后,加补体20μl,再置37℃培养箱60min,每孔加1%伊红15μl和0.8%戊二醛15μl,混匀后滴在玻片上,显微镜下数100个细胞,着色细胞为阳性细胞,算出百分率。

3.5 淋巴因子激活杀伤(LAK)细胞测定 实验动物处死后取脾脏制成 $10^6$ /ml细胞悬液,与<sup>125</sup>I-UdR标记LAK细胞以100:1混合后置CO<sub>2</sub>培养箱中18h,弃上清液,经双酶处理后终止反应,分别用Beckmen γ计数器测定cpm值。

## 结 果

1 补肾、健脾及活血类中药复方对巨噬细胞吞噬数、吞噬百分率及Fc受体的影响 见表1。老年对照组的巨噬细胞吞噬数、吞噬百分率与成年对照组相比没有明显差异;活血化瘀组、健脾益气组的巨噬细胞吞噬百分率不同程度地高于老年对照组,其中活血化瘀组有统计学意义( $P < 0.05$ );补肾益精组却无明显变化。老年对照组的巨噬细胞Fc受体略低于成年对照组,但没有明显差异( $P > 0.05$ );活血化瘀组、健脾益气组巨噬细胞Fc受体有进一步下降的趋势,而补肾益精组却有回升趋势。

表1 补肾、健脾及活血类中药复方对巨噬细胞吞噬功能、Fc受体的影响 ( $\bar{x} \pm S$ )

| 组别   | 鼠数 | 巨噬细胞     |            | 鼠数 | Fc受体(%)     |
|------|----|----------|------------|----|-------------|
|      |    | 吞噬数      | 吞噬率(%)     |    |             |
| 成年对照 | 12 | 27.3±5.5 | 0.42±0.11  | 12 | 33.58±12.54 |
| 老年对照 | 12 | 26.4±7.1 | 0.36±0.11  | 7  | 28.29±8.12  |
| 活血化瘀 | 11 | 29.1±7.7 | 0.51±0.14* | 7  | 21.00±9.76  |
| 健脾益气 | 10 | 28.8±5.3 | 0.46±0.14  | 8  | 22.63±8.23  |
| 补肾益精 | 11 | 25.3±4.9 | 0.37±0.08  | 10 | 34.40±15.71 |

注:与老年对照组比较,\* $P < 0.05$

2 补肾、健脾及活血类中药复方对T、B淋转的影响 见表2。老年对照组T淋转率、B淋转率与成年对照组比较均明显下降( $P < 0.05$ )。活血化瘀组、健脾益气组较老年对照组T、B淋转率均明显升高;补肾益精组T、B淋转率均没有明显变化。

表2 补肾、健脾及活血类中药复方对T、B淋转率的影响 ( $\bar{x} \pm S$ )

| 组别   | 鼠数 | T淋转        |              | 鼠数 | B淋转        |              |
|------|----|------------|--------------|----|------------|--------------|
|      |    | 比值         | 百分率(%)       |    | 比值         | 百分率(%)       |
| 成年对照 | 12 | 6.08±3.57  | 79.87±8.11   | 11 | 3.42±1.45  | 66.06±10.89  |
| 老年对照 | 12 | 3.80±1.55* | 65.12±19.84* | 10 | 2.06±0.69* | 46.74±17.01* |
| 活血化瘀 | 11 | 9.52±6.69△ | 83.90±9.29△  | 11 | 3.42±2.12  | 62.43±16.80△ |
| 健脾益气 | 9  | 7.01±3.96△ | 78.48±18.18  | 7  | 3.09±0.84△ | 64.02±9.51△  |
| 补肾益精 | 11 | 4.03±1.71  | 68.56±21.37  | 10 | 2.09±0.65  | 46.01±21.58  |

注:与成年对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与老年对照组比较,△ $P < 0.05$

3 补肾、健脾及活血类中药复方对 T 淋巴细胞分类、LAK 细胞的影响 见表 3。老年对照组 OKT<sub>3</sub> 细胞明显高于成年对照组, OKT<sub>4</sub>、OKT<sub>8</sub> 细胞没有变化; 活血化瘀组 OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>、OKT<sub>8</sub> 细胞与老年对照组比较有明显上升趋势, 但没有明显差异; 健脾益气组 OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>、OKT<sub>8</sub> 细胞均没有变化; 补肾益精组 OKT<sub>3</sub> 细胞低于老年对照组,

OKT<sub>4</sub>、OKT<sub>8</sub> 细胞没有明显变化。老年对照组 LAK 细胞与成年对照组比较有所下降趋势, 但没有明显差异; 活血化瘀组、健脾益气组 LAK 细胞与老年对照组比较没有变化; 补肾益精组 LAK 细胞与老年对照组比较有进一步下降的趋势, 但没有明显差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3 补肾、健脾及活血类中药复方对淋巴细胞分类、LAK 细胞的影响 (% ,  $\bar{x} \pm S$ )

| 组 别  | 鼠数 | OKT <sub>3</sub> | OKT <sub>4</sub> | OKT <sub>8</sub> | LAK 细胞    |
|------|----|------------------|------------------|------------------|-----------|
| 成年对照 | 12 | 21.92±3.37       | 22.09±3.67       | 21.25±2.80       | 33.9±15.9 |
| 老年对照 | 12 | 25.75±3.82*      | 22.50±3.00       | 21.33±3.31       | 27.7±15.9 |
| 活血化瘀 | 11 | 27.18±2.60       | 25.27±4.61       | 24.18±4.36       | 28.5±21.6 |
| 健脾益气 | 10 | 23.20±3.08       | 22.10±4.18       | 23.00±2.98       | 28.1±15.5 |
| 补肾益精 | 11 | 22.70±3.00△      | 22.50±3.00       | 20.90±1.81       | 21.5±10.4 |

注: 与成年对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与老年对照组比较, △ $P < 0.05$

## 讨 论

动物和人一样都有生长、发育和衰老的生命过程, 只是寿限长短不一。用衰老动物作肾虚模型不仅有理论根据, 而且有临床实践的支持。如《内经》中“女子七七, 男子八八”的论述就已形象地描述了人的生长、发育、衰老与肾气盛衰的关系。历代医家用补肾为主的方药来延年益寿也为世人所接受。衰老动物作为肾虚模型还可以从年龄来推断。如妇女 45~55 岁出现更年期, 60 岁以上被称为老年人, 平均寿命在 70 岁左右。而一般实验用大、小鼠在 15 月龄前动情周期完全消失<sup>(1)</sup>, 18 月龄左右的大鼠可称为初老, 24 月龄左右可称为老龄, 平均寿限在 28 月龄左右。小鼠平均寿命较大鼠短 3~6 个月。从中医的角度看, 随年龄的增长, 肾虚的症状日益明显、典型。从现代医学的角度看, 增龄将带来全身的机能减退, 年龄越大, 机能下降就越明显。为此用自然衰老动物来研究虚证的本质, 探讨补虚药的药作用, 想必较用手术、药物等手段制作的动物模型, 特别在机体内环境改变方面更接近中医临床虚证的一种模拟。

一般认为小白鼠的免疫机能相对比较稳定, 本实验用 18 月龄小鼠来研究肾虚时机体免疫机能的状况和补肾、健脾及活血类中药复方对肾虚时免疫机能的作用。结果表明: 18 月龄小鼠 T、B 淋巴细胞转化

率明显下降, OKT<sub>3</sub> 明显下降, 巨噬细胞吞噬率、Fc 受体, LAK 细胞均有下降趋势。说明衰老时或肾虚时, 机体的免疫机能与神经内分泌机能一样随增龄而下降<sup>(2)</sup>。服用 4 周中药的活血化瘀组、健脾益气组 T、B 淋巴细胞转化率都明显高于老年对照组, 与成年对照组接近。表明活血化瘀方、健脾益气方对衰老或肾虚状态下的免疫机能具有一定的促进作用或延缓衰老的作用。活血化瘀方对这一状态下的巨噬细胞吞噬功能、OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>、OKT<sub>8</sub> 似乎也有一定的促进作用。而补肾益精方对 OKT<sub>3</sub> 具有降低作用, LAK 细胞也有降低的趋势; 巨噬细胞 Fc 受体有上升趋势; 对 T、B 淋巴细胞转化功能、巨噬细胞吞噬功能没有影响。这一结果提示: 补肾益精方对衰老或肾虚状态下免疫机能的下降具有与活血化瘀方、健脾益气方不同的作用。这与我们过去观察补肾益精与健脾益气对神经内分泌机能的不同作用相类似。其机理有待进一步探讨。

## 参 考 文 献

1. Meites J. Neuroendocrine biomarkers of aging in the rat. *Experimental Gerontology* 1988; 23: 349-358.
2. 张新民, 沈自尹, 王文健, 等. 补肾对神经内分泌老化调节作用研究(1). *中医杂志* 1991; 32(11): 43-46.

(收稿: 1995-11-07 修回: 1996-06-25)