

补肾化瘀复方对老年人淋巴细胞白细胞介素-2 分泌及白细胞介素-2 受体表达的影响*

王蓉蓉 刘素宾

内容提要 目的:研究补肾化瘀复方对老年人淋巴细胞白细胞介素-2(IL-2)分泌及 IL-2 受体(IL-2R)表达的影响。方法:用 MTT 法和依赖细胞株法检测 IL-2 活性,用 FACS-间接免疫荧光法检测(IL-2R)阳性细胞数,将老年组与青年组及老年组用药前后进行比较。结果:老年组 IL-2 分泌较青年组明显降低($P < 0.01$), IL-2R 阳性细胞数较青年组明显减少($P < 0.01$)。补肾化瘀复方可使老年人低下的 IL-2 活性得到提高($P < 0.01$),使减少的 IL-2R 阳性细胞数得到增加($P < 0.05$)。结论:补肾化瘀复方可使老年人减退的淋巴细胞免疫功能得到改善。

关键词 补肾化瘀复方 老年人 淋巴细胞 白细胞介素-2 白细胞介素-2 受体

Effect of Bushen Huayu Composite on Secretion of Lymphocytic Interleukin-2 and Interleukin-2 Receptor Expression in the Aged WANG Rong-rong, LIU Su-bin *Department of Integrated Traditional and Western Medicine, The First Hospital of Peking University, Beijing (100034)*

Objective: To study the effect of Bushen Huayu Composite (BSHY) on interleukin-2 (IL-2) secretion and IL-2 receptor expression in the aged. **Methods:** IL-2 was examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method and IL-2 dependent cellular stains, IL-2 receptor expression was examined by FACS-indirect immunofluorescence. **Results:** Aging could result in the decrease in lymphocytic IL-2 secretion and IL-2 receptor expression ($P < 0.01$, $P < 0.05$), which could be improved by BSHY ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** BSHY has significant up-regulatory effect on immune function of lymphocytes in the aged.

Key words Bushen Huayu Composite, the aged, lymphocyte, interleukin-2, interleukin-2 receptor

关于机体免疫功能的老化性改变,近 20 年来受到高度重视,对免疫老化的机理也进行了深入的研究。就其防治问题,中医药的优势日益受到国内外学者的注目,尤其是近年来中药免疫活性的研究已深入到分子水平。现代中医学研究延缓衰老多从益肾填精着手,这符合中医学“肾为先天之本”的理论。同时,流行病学调查发现随增龄血瘀证也增加,老年人血液粘稠度高,心脑血管病及癌症发病率高,都与中医学的血瘀证相吻合。免疫功能衰退属于中医学虚证范畴。而许多中药具有免疫药理活性,尤其补益中药大多有增强免疫的作用,有的有双向调节作用。根据以上理论和临床经验,我们设计了符合一般老年人的补肾化瘀复方,从细胞和分子水平观察其对老年人淋巴细胞功能的影响,以期为老年人的防病治病及中药延缓衰老提供依据。

资料与方法

1 临床资料 老年人(老年组)共 18 名,男 14 名,女 4 名,年龄 60~78 岁;排除感染、肿瘤、自身免疫性疾病等,符合 1982 年中华医学会老年医学学会规定的健康“五条标准”。青年人(青年组)共 12 名,男 9 名,女 3 名,年龄 20~40 岁,为健康献血员,作为对照组。

2 药品和试剂 植物血凝素(PHA)为广州工业研究所产品。重组白细胞介素-2(rIL-2)由北京大学医学部分子免疫教研室提供。IL-2 依赖细胞株为中国军事科学院赠予。MTT 为美国 Sigma 公司产品。

3 补肾化瘀复方 方药组成:枸杞子 12g 淫羊藿 6g 黄芪 12g 丹参 12g 益母草 12g 柴胡 6g 丹皮 10g 甘草 6g。水煎服,每日 1 剂,老年组连续服用 1 个月。

4 观察指标及方法

4.1 IL-2 的诱生和活性测定

4.1.1 IL-2 的诱生 参照文献^[1],将人外周血单

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39270731)

北京大学第一医院中西医结合科(北京 100034)

核细胞(PBMC)悬液($2 \times 10^6/\text{ml}$)用植物血凝素(PHA, 终浓度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$)刺激, 加入 24 孔培养板中, 培养体积为 1ml。将培养板置 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养 48h, 收获上清, 置 -20°C 冻存待测。

4.1.2 细胞培养上清中 IL-2 活性的生物学检测采用 MTT 法⁽²⁾。取对数生长期的 IL-2 依赖株(CTLL-2)细胞, 用 ic-1640 液洗 2 次后, 以 C-1640 培养液调整细胞浓度为 $4 \times 10^5/\text{ml}$, 96 孔板中每孔加入 $100 \mu\text{l}$ CTLL-2 细胞悬液, 每孔再加入标准 rIL-2 (从 100U 开始稀释 16 个梯度)和待测上清(1:2~1:16) $100 \mu\text{l}$, 每个样品设 3 个平行孔并设对照孔, 对照孔加 $100 \mu\text{l}$ C-1640。将 96 孔细胞培养板置于 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养 24~48h (视细胞死亡梯度而定)。每孔吸出 $100 \mu\text{l}$ 上清, 加 MTT $10 \mu\text{l}$, 继续培养 2h, 加 10% SDS 溶液 $100 \mu\text{l}$ 。置 37°C 过夜, 在酶联免疫检测仪上测波长 570nm 的 OD 值。

4.1.3 IL-2 活性单位计算 以标准 IL-2 活性单位为横坐标, 以 OD 570nm 值为纵坐标做标准曲线。待测上清 OD 值划横线, 与标准曲线相交点所对应的 IL-2 单位为待测上清 IL-2 活性单位。

4.2 IL-2 受体(IL-2R)检测 采用免疫荧光法。经 PHA 刺激(PHA $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C , 5% CO_2 培养箱培养 48h, 标记 IL-2R)的人 PBMC, 样品取 1×10^6 细胞设实验及对照管。实验管加入 anti-IL-2RmAb $50 \mu\text{l}$, 4°C 反应 30min, 加 FACS 洗液洗 2 次, 实验及对照管再加入 FITC-IgG $50 \mu\text{l}$, 4°C 避光反应 30min, 每管加 FACS 洗液洗 2 次, 70% 冷乙醇固定。 4°C 避光保存, 上机前洗去冷乙醇, 悬于 FACS 液中, FACS 分析。

5 统计学方法 采用方差分析和 t 检验。

结 果

1 IL-2 分泌及 IL-2R 表达的改变 PBMC 经 PHA 刺激 48h, 用 IL-2 依赖细胞株法测培养上清 IL-2 活性, FACS-间接免疫荧光法测 IL-2R 阳性细胞数。结果显示(见图 1, 2), 青年组 IL-2 活性为 $1.08 \text{u}/\text{ml}$, 老年组 IL-2 活性为 $0.56 \text{u}/\text{ml}$, 老年组比青年组下降 48.0%。青年组 IL-2R 阳性细胞数为 23.8%, 老年组 IL-2R 阳性细胞数为 17.0%, 比青年组下降 28.6%。

2 补肾化瘀复方对老年人淋巴细胞 IL-2 分泌及 IL-2R 表达的影响 老年人服药后 PBMC 经 PHA 刺激 48h, 培养上清 IL-2 活性为 $0.79 \text{u}/\text{ml}$, 比治疗前提高 41.0% (见图 1), 治疗前后比较差异有显著性($P < 0.01$); IL-2R 阳性细胞数为 24.9%, 比治疗前提高 46.6%, 治疗前后比较差异有显著性($P < 0.05$)。并

且老年组治疗后 IL-2R 阳性细胞数比青年组(23.8%)略提高(见图 2)。结果表明补肾化瘀复方能明显提高老年人淋巴细胞 IL-2 分泌及 IL-2R 表达。

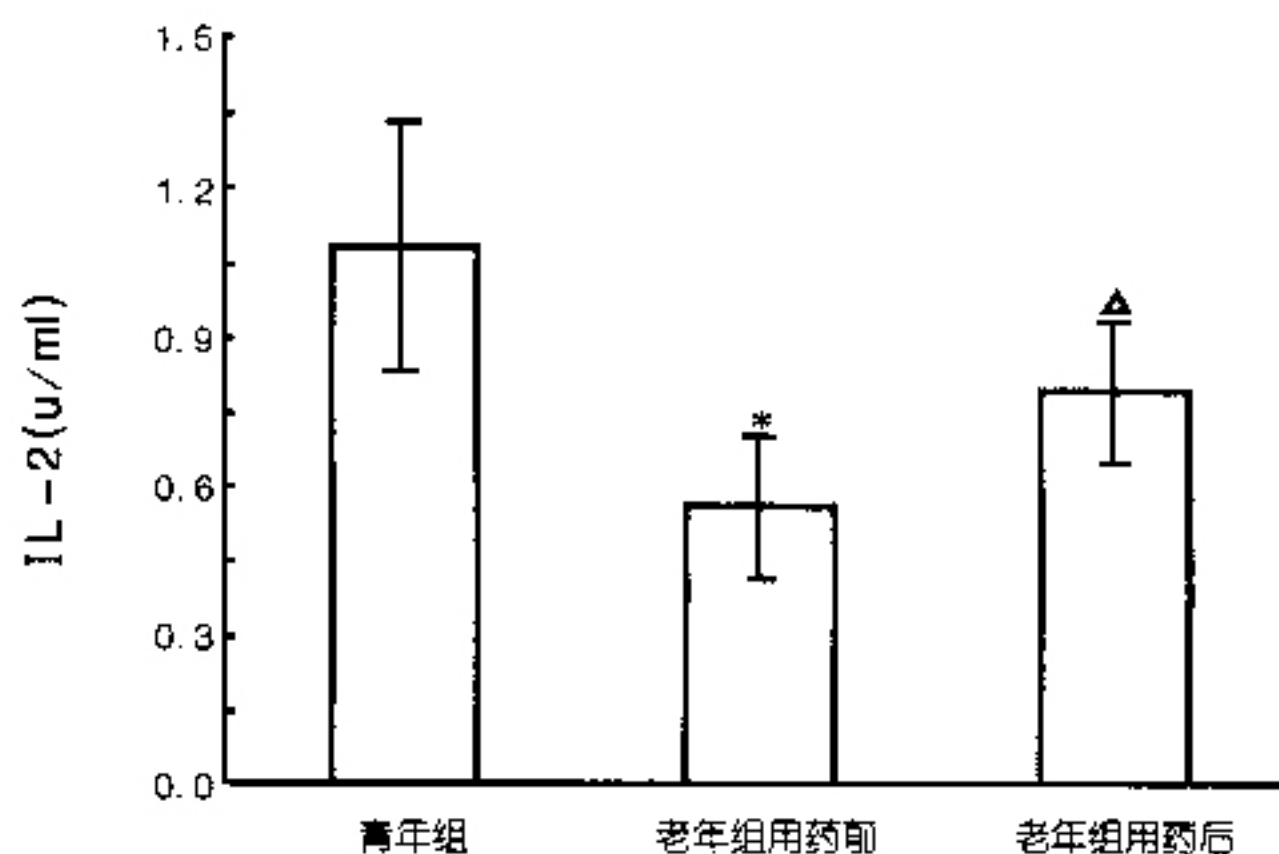


图 1 老年人淋巴细胞 IL-2 分泌的改变和补肾化瘀复方对其影响

注:与青年组比较, * $P < 0.01$; 与老年组用药前比较, $\Delta P < 0.01$

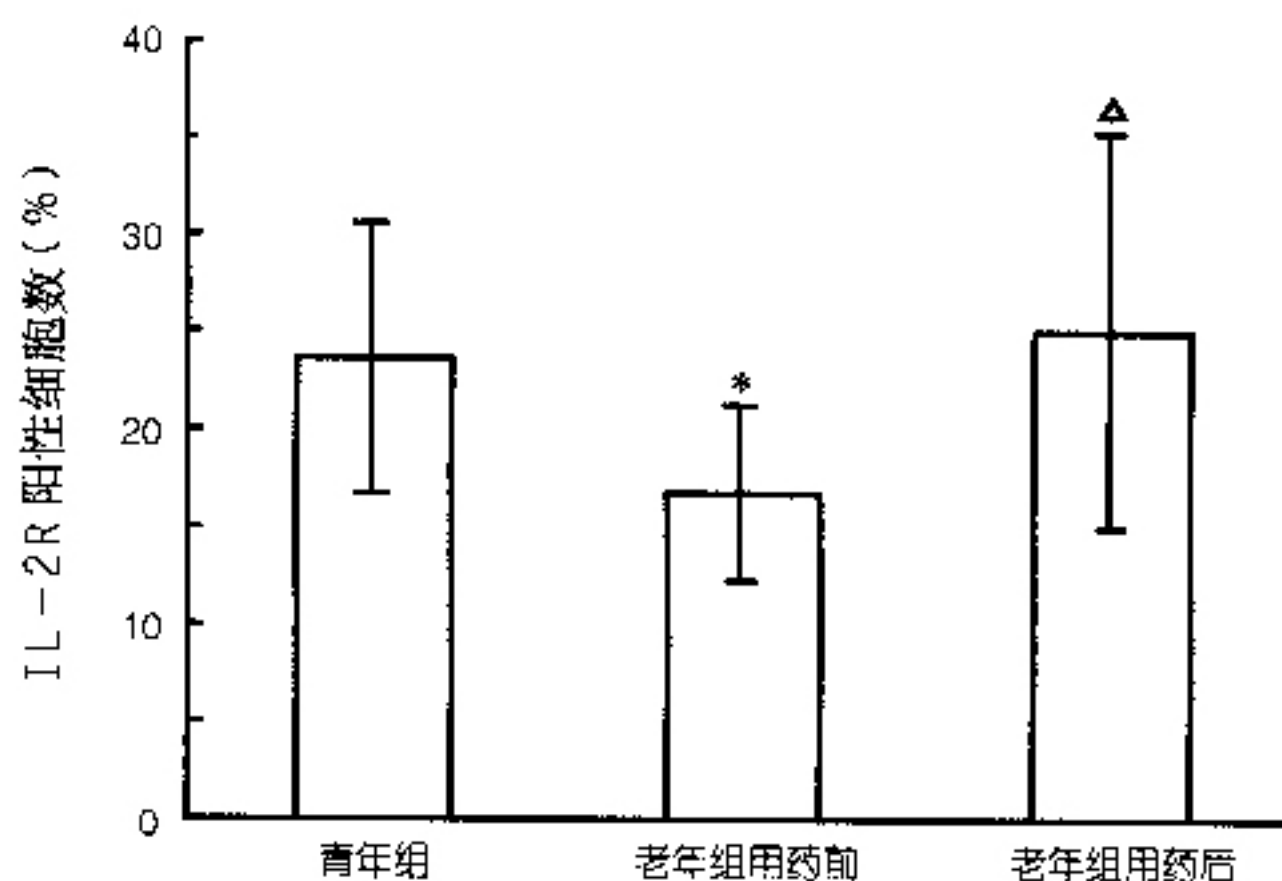


图 2 老年人淋巴细胞 IL-2R 表达的改变和补肾化瘀复方对其影响

注:与青年组比较, * $P < 0.01$; 与老年组用药前比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

进入老年期后机体免疫系统尤其是 T 淋巴细胞功能下降, 易患感染、肿瘤和自身免疫性疾病。免疫老化可表现在整体、细胞、分子和基因水平上。IL-2 主要是由活化的 Th 细胞分泌的一种重要的细胞因子,

也是机体最强有力的 T 细胞生长因子,能调节淋巴细胞的生长与分化,促进 T 细胞生长及克隆性扩增,增强细胞毒性细胞的杀伤效应,增强活化的 T 细胞产生干扰素和集落刺激因子,并可协同 B 细胞增殖及分泌 Ig。而 IL-2 是通过与 IL-2R 特异性结合发挥其重要生物学作用的。本研究结果显示老年人淋巴细胞免疫功能减退,IL-2 分泌水平降低,IL-2R 表达下降。表明老年人对外源性免疫应答降低,细胞免疫功能减退。中医学理论认为,肾为先天之本,肾虚是衰老及抗病能力低下的主要原因。近年来的中医证候流行病学调查发现,伴随增龄不但肾虚比例增高,血瘀证也增加^(3,4),因此北京医科大学中西医结合教研室首先提出了“肾虚夹瘀是致衰的主要机制”的观点⁽⁵⁾。肾虚日久必然致瘀,虚与瘀相互影响促进衰老进程。根据中医学理论结合现代医学研究以及我们的临床经验,组建补肾化瘀复方,在观察了老年人与青年人免疫功能差异的基础上,选择了 IL-2 和 IL-2R 作为观察指标,进一步研究其对老年人免疫功能的影响。结果显示,老年人服用补肾化瘀复方后,IL-2 分泌及 IL-2R 表达均有不同程度增高。提示补肾化瘀复方从细胞和分子水平对老年人减退的免疫功能具有改善作用。方中枸杞子滋肾阴,淫羊藿补肾阳,丹参活血化瘀,3 味共为君药。黄芪益气,益母草活血。气为血帅,气行血行,黄芪既能益气行血,又能温补老年机体阳气之不足。有报道黄芪能恢复老年人低下的 IL-2 水平,提高老年机体淋巴细胞转化功能⁽⁶⁾。益母草体外作用能增加 ConA 活

化小鼠的脾细胞增殖功能,两药合用能增强补肾化瘀药调节老年机体免疫功能的作用。方中柴胡调理肝气,丹皮凉血活血。3 药能辅佐和调和君药补肾化瘀的作用。诸药合用,以调整老年机体的免疫功能。临床上老年人服用后腰酸腿软、神疲乏力等症状得到不同程度改善,未见不适反应。今后拟在此基础上加深研究探索中医药延缓衰老的途径。

参 考 文 献

1. Ahmed K, Abdul Hamied TA, Turk JL. Inhibition of release of interleukin-2 by vincristine and vinblastine. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1987;9(4):391—407.
2. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986;93(2):157—165.
3. 俞征宙, 陈文发, 俞宜年, 等. 从增龄对本虚标实证的影响探讨中医衰老机理. *中国中西医结合杂志* 1992;12(2):80—82.
4. 梁民里道, 吕联煌, 张学敏, 等. 健康老年人血瘀证的调查及血浆 t-PA、PAI 活性的研究. *中国中西医结合杂志* 1994;14(2):721—723.
5. 蒋文跃, 李顺成, 王玉明. 补肾、化瘀及补肾化瘀法延缓免疫衰老的对比研究. *中华老年医学杂志* 1997;16(3):178—180.
6. 宋 涛. 黄芪、当归的植物及免疫药理研究. 见周金黄主编. *中医药免疫药理学*. 北京:人民军医出版社, 1994:364.

(收稿:2001-02-01 修回:2001-06-17)

全国中西医结合耳鼻咽喉科学学术会议征文通知

中国中西医结合学会耳鼻咽喉科专业委员会拟于 2002 年 8 月在银川市召开全国中西医结合耳鼻咽喉科学学术会议,届时将进行中青年论文评奖活动,现将征文有关事宜通知如下。

1 征文内容 (1)有关耳鼻咽喉解剖、胚胎、组织学、病理生理学等方面中西医结合基础研究成果及信息。(2)耳鼻咽喉科疾病中西医结合、中医、西医临床研究、经验、验案、疗效分析、新技术、新器械、新药、新疗法等。(3)耳鼻咽喉科疑难病的治疗及研究。(4)20 世纪中西医结合耳鼻咽喉科学的回顾。(5)中药单方、复方在耳鼻咽喉科疾病中的基础研究和临床应用。(6)有关嗓音产生机理、声学评估、疾病防治经验、艺术嗓音、言语医学方面成果及相关学科等方面新理论。(7)鼾症及头颈外科新动向及发展。(8)耳鼻咽喉科肿瘤中西医结合、中医西医诊治的临床经验、实验研究、预防研究、诊治新技术,肿瘤病人的康复经验等。(9)21 世纪中西医结合耳鼻咽喉科展望。

2 征文要求 (1)论文应书写清楚,未在杂志公开发表。每稿附有 400~600 字摘要 1 份。(2)中青年作者请注明年龄。(3)会议交流论文,颁发论文证书及国家级继续教育学分。(4)会议期间将请专家进行讲座。(5)截稿日期:2002 年 5 月 30 日。(6)寄稿地址:100013 北京市和平里医院 侯志良收。(7)会议具体日期、地点另行通知。