· 基础研究 ·

含红芪、黄芪的益气养血汤与补中益气汤含药血清对 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞免疫功能影响的比较研究

杨思霞[1] 李 纬[1] 孙美花[1] 张文君[2] 张高林[3] 程卫东[1]

摘要 目的 比较分别含红芪、黄芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清对 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞免疫功能影响差别。**方法** 50 只青龄昆明种小鼠随机分为益气养血汤红芪组、益气养血汤黄芪组、补中益气汤红芪组、补中益气汤黄芪组、空白组,每组 10 只,连续灌胃 14 天,制备含药血清和空白血清。提取 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞,分为益气养血汤红芪含药血清组、益气养血汤黄芪含药血清组、补中益气汤红芪含药血清组、补中益气汤黄芪含药血清组和空白血清组,以相应含药血清和空白血清培养;SAMP8 鼠组和青龄鼠组以完全培养液分别培养 SAMP8 小鼠和青龄小鼠脾淋巴细胞。不同质量分数(20%、40%、80%)含药血清和空白血清培养 SAMP8 小鼠脾淋巴细 24、48、72 h,MTT 法检测各组脾淋巴细胞增殖功能,确定最佳含药血清质量分数和作用时间。另取 SAMP8 和青龄小鼠脾淋巴细胞,4 个含药血清组和空白血清组以最佳质量分数血清培养 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞至最佳作用时间,SAMP8 鼠组和青龄鼠组以完全培养液分别培养 SAMP8 小鼠和青龄小鼠脾淋巴细胞 48 h,流式细胞仪检测脾 T 淋巴细胞表面 $CD28^+$、$CD152^+$ 分子的表达,ELISA 法检测培养上清液中 TNF-α 的表达,实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测脾 T 淋巴细胞 PI3K mRNA 和蛋白的表达。**结果** MTT 结果显示,当分别含红芪和黄芪的益气养血汤含药血清质量分数为 40% 培养 48 h,分别含红芪和黄芪的补中益气汤含药血清质量分数为 40% 培养 72 h 时,SAMP8 小鼠脾淋巴细胞增殖效果最佳。与青龄鼠组比较,SAMP8 鼠组小鼠脾 T 淋巴细胞表面 $CD28^+$ 分子表达下降,$CD152^+$ 分子表达增高($P<0.05$),TNF-α 表达及 PI3K mRNA 和蛋白表达降低($P<0.05$)。与空白血清组比较,分别含红芪和黄芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清组小鼠脾 T 淋巴细胞表面 $CD28^+$ 分子表达升高,$CD152^+$ 分子表达降低($P<0.05$),TNF-α 表达及 PI3K mRNA 和蛋白表达均升高($P<0.05$)。益气养血汤红芪含药血清组和益气养血汤黄芪含药血清组 $CD28^+$ 分子表达分别高于补中益气汤红芪含药血清组和补中益气汤黄芪含药血清组($P<0.05$)。与益气养血汤黄芪含药血清组比较,益气养血汤红芪含药血清组及补中益气黄芪含药血清组 PI3K mRNA 表达增高($P<0.05$);与补中益气汤红芪含药血清组比较,益气养血汤红芪含药血清组及补中益气汤黄芪含药血清组 PI3K mRNA 表达降低($P<0.05$)。**结论** 含红芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清在上调 SAMP8 小鼠脾 T 淋巴细胞 PI3K mRNA 表达上更具优势;含红芪和黄芪的益气养血汤含药血清在上调 $CD28^+$ 分子表达上优于含红芪和黄芪的补中益气汤含药血清,但在调节 PI3K mRNA 表达上,含红芪和黄芪的补中益气汤含药血清更具优势。

关键词 免疫衰老; SAMP8 小鼠; 脾淋巴细胞; 益气养血汤; 补中益气汤

Comparative Studty on Effects of Yiqi Yangxue Decoction and Buzhong Yiqi Decoction Containing Serums with *Radix Hedysari* or *Radix Astragali* on Immunologic Function of SAMP8 Mice Splenic Lymphocytes

YANG Si-xia[1], LI Wei[1], SUN Mei-hua[1], ZHANG Wen-jun[2], ZHANG Gao-lin[3], and CHENG Wei-dong[1] *1 College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515); 2 Oncology Department of Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou*

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No.81373806)

作者单位:1.南方医科大学中医药学院(广州 510515);2.甘肃省中医院肿瘤科(兰州 730050);3.甘肃省中医学校中医系(兰州 730050)
通讯作者: 程卫东, Tel: 18665000116, E-mail: chengweidong888@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180630.242

中国中西医结合杂志

(730050); 3 Department of Traditional Chinese Medicine, Gansu traditional Chinese Medicine School, Lanzhou (730050)

ABSTRACT　Objective　To compare the different effects between Yiqi Yangxue and Buzhong Yiqi Decoction Containing Serums with *Radix Hedysari* or *Radix Astragali* on immunologic function of SAMP8 mice splenic lymphocytes. Methods　Fifty young Kunming mice were randomly divided into 5 groups: Yiqi Yangxue Decoction with *Radix Hedysari* (YYDRH) group, Yiqi Yangxue Decoction with *Radix Astragali* (YYDRA) group, Buzhong Yiqi Decoction with *Radix Hedysari* (BYDRH) group, Buzhong Yiqi Decoction with *Radix Astragali* (BYDRA) group and blank group, 10 in each group. Normal saline and medicine were continuous intragastric administrated for 14 days to prepare drug-containing serums and blank serum. Splenic lymphocytes were divided into 5 groups: YYDRH containing serum group, YYDRA containing serum group, BYDRH containing serum group, BYDRA containing serum group and blank serum group, and were cultured with serums accordingly. The splenic lymphocytes of SAMP8 mice group and young mice group were cultivated with complete medium. To determine the optimal serum concentration and culture time on promoting proliferation of SAMP8 mice splenic lymphocytes, MTT assay was performed after culturing 24 h, 48 h and 72 h with 20%, 40%, 80% concentration of medicated serums and blank serum respectively. SAMP8 mice splenic lymphocytes were exposed with the best concentration of medicated serums and blank serum to optimal culture time. SAMP8 mice group and young mice group were cultured with complete medium for 48 h. Expressions of $CD28^+$ and $CD152^+$ molecules on the surface of splenic T lymphocytes were measured by flow cytometry. The level of TNF-α in lymphocytes culture supernatant was tested by ELISA. Real time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to detect expression of PI3K mRNA and its protein. Results　MTT results showed that YYDRH/YYDRA and BYDRH/BYDRA containing serums could enhance the proliferation of SAMP8 mice splenic lymphocytes, and the effect was time and dosage dependent. The best efficacy in enhancing lymphocytes proliferation were obtained by cultivating with 40% YYDRH/YYDRA containing serums for 48 h or with 40% BYDRH/BYDRA containing serums for 72 h. Compared with young mice group, $CD152^+$ level of SAMP8 mice increased, and expressions of $CD28^+$, TNF-α, PI3K mRNA and its protein decreased ($P < 0.05$). Compared with blank serum group, $CD152^+$ level of containing serums groups down-regulated, while expressions of $CD28^+$, TNF-α, PI3K mRNA and its protein up-regulated ($P < 0.05$). The expression of $CD28^+$ in YYDRH/YYDRA containing serum group was higher than that in BYDRH/BYDRA containing serum group respectively ($P < 0.05$). Compared with YYDRA drug serum group, more expression of PI3K mRNA in YYDRH and BYDRA containing serum group was detected ($P < 0.05$). Besides, it showed fewer expression in YYDRH and BYDRA containing serum group than in BYDRH containing serum group ($P < 0.05$). Conclusions　YYD and BYD with *Radix Hedysari* containing serums are more advantageous in up-regulating the expression of PI3K mRNA in the splenic T lymphocytes of SAMP8 mice. YYDRH and YYDRA containing serums are superior to BYDRH and BYDRA containing serums in increasing the expression of $CD28^+$ molecule, while this advantage is reversed in regulation the PI3K mRNA.

KEYWORDS　immunosenescence; SAMP8 mice; splenic lymphocyte; Yiqi Yangxue Decoction; Buzhong Yiqi Decoction

补中益气汤出自李东垣《脾胃论》:“以辛甘温之剂,补其中而升其阳,甘寒以泻其火则愈矣。经曰:劳者温之,损者益之。盖温能除大热,大忌苦寒之药,损其脾胃。脾胃之证,始得则热中,今立治势得之证。”用于脾胃气虚、气虚下陷证。益气养血汤出自《中华人民共和国药典》[1]:“功效益气养血。用于气血不足所致的气短心悸、面色不华、体虚乏力。”两方均是以黄芪为君药的补益方剂。黄芪(*Radix Astragali*)和红芪(*Radix Hedysari*)为豆科植物不同种属,均具有益气固表、扶正固本等功效[1]。前期研究显示,含红芪和黄芪的补中益气汤和益气养血汤具有调节免疫[2-5],抗免疫衰老[6,7]和抗氧化[8]的作用。快速老化小鼠 8(senescence accelerated mouse prone 8 mice, SAMP8)以学习记忆功能呈增龄性加速衰退

为主要特征,因其快速生长周期及稳定的遗传表型,越来越多地被应用于老化相关的研究[9]。本研究选择黄芪为君药的补中益气汤和益气养血汤,以其含药血清作用于 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞,在复方层面上进一步比较分别含黄芪和红芪复方含药血清调节衰老个体免疫功能的差别,并探讨同为补益方剂,分别含红芪和黄芪的补中益气汤和益气养血汤含药血清在免疫调节的作用差异。

材料与方法

1 实验动物 清洁级昆明种青龄小鼠,18 ~ 22 g, 8 周龄,60 只,雌雄各半,由兰州大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(甘)2013 - 0002;SPF 级 SAMP8 小鼠,25 ~ 30 g,5 ~ 6 月龄,10 只,雄性,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2014 - 0004。本研究中所有涉及动物的实验均经兰州大学动物伦理委员会的批准,具体实验方法和实验过程均符合兰州大学动物实验伦理管理规范。

2 实验药物 根据《中华人民共和国药典》[1],含黄芪补中益气汤方剂组成:炙黄芪 200 g、党参 60 g、炙甘草 100 g、炒白术 60 g、当归 60 g、升麻 60 g、柴胡 60 g、陈皮 60 g。含红芪补中益气汤方剂以炙红芪 200 g 替换炙黄芪。含黄芪益气养血汤方剂组成:人参 8.3 g、黄芪 83.4 g、党参 75 g、麦冬 50 g、当归 33.3 g、炒白术 33.3 g、地黄 33.3 g、制何首乌 30 g、五味子 25 g、陈皮 33.3 g、地骨皮 25 g、鹿茸 1.7 g、淫羊藿 50 g。含红芪益气养血汤方剂以红芪 83.4 g 替换黄芪。上述药材均购于兰州市药材市场,经甘肃农业大学蔺海明教授鉴定合格。根据体表面积换算得出小鼠的灌胃剂量[10]。补中益气汤为 4 g(生药)/(kg · d),益气养血汤为 6 g(生药)/(kg · d)。将各组药物加入适量的水浸泡 0.5 ~ 1 h,水煎 2 次,第 1 次 1 h,第 2 次 0.5 h,充分混合 2 次药液,浓缩过滤至每毫升含 1 g 生药, 4 ℃冷藏备用。

3 试剂与仪器 RPMI Medium 1640 basic (1X)培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,批号:NAH1461);胎牛血清(美国海克隆公司,批号:0908162);EZ-Sep MOMSE IX 淋巴细胞分离液(深圳达科为生物技术有限公司,批号:33R021406);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号:20140102418);PEA-抗小鼠 CD28、APCA-抗小鼠 CD152 (CTLA-4,美国 Biolegend 公司,批号分别是 B183389、B185445);小鼠肿瘤坏死因子-α 酶联免疫吸附测定试剂盒(TNF-α ELISA 试剂盒,深圳达科为生物技术有限公司);总 RNA 提取试剂盒(上海 Promega 生物技术有限公司,批号:20130601);反转录试剂盒,聚合酶链反应扩增试剂盒,BCA 蛋白定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别是 R211 - 02, Q111 - 02, 213051);磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase,PI3K)引物(上海生工生物工程股份有限公司,批号:9406088031);CD28 抗体(美国 Immunoway 公司,批号:SCA-1623);RIPA 裂解液,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,电泳液和电转液,封闭洗液(北京索来宝公司,批号分别是 R0026, 20141104,20150413,20150403);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国 Immunoway 公司,批号:B9901)。CX23 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);CO_2 培养箱、低温冰箱(日本 Sanyo 公司);TDL-40B 型和 TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂);A06061422 超净工作台(苏净集团安泰公司);680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);FACS Universal Loader 流式细胞仪(美 BD 公司);Lightcycler 480 PCR 仪(美国 Roche 公司);NanoVue 分光光度计、ImageQuant350 凝胶成像系统分析仪(美国 GE 公司);三恒多电泳仪 DYY-7C 型(北京六一仪器厂)。

4 方法

4.1 含药血清制备 取 50 只青龄昆明种小鼠按随机数字表法分为 5 组,分别是益气养血汤红芪组、益气养血汤黄芪组、补中益气汤红芪组、补中益气汤黄芪组、空白组,每组 10 只,分别以红芪益气养血汤、黄芪益气养血汤 6 g(生药)/(kg · d),红芪补中益气汤、黄芪补中益气汤 4 g(生药)/(kg · d),空白组以等体积生理盐水灌胃,每天 1 次,连续给药 14 天,末次灌胃 2 h 后眼球摘除取血,收集血清,将同组血清混合吹匀后,56 ℃水浴 30 min 灭活,用 0.22 μm 微孔过滤器过滤除菌分装, -80 ℃储存备用。

4.2 小鼠脾脏淋巴细胞悬液的制备 将 SAMP8 小鼠和青龄小鼠脱颈处死后浸泡在 75% 酒精中 5 min,超净台下,平衡达到室温,刻度吸管吸取 4 mL小鼠淋巴细胞分离液,加入在直径为 35 mm 的培养皿中,将无菌 200 目尼龙网放置于培养皿上,无菌取出小鼠脾脏,放置于尼龙网上,研磨脾脏,使脾淋巴细胞经尼龙网过滤后浸入淋巴细胞分离液中,随后将培养皿内液体转移至 15 mL 离心管中,加入 400 μL RPMI-1640 培养液形成界面,2 000 r/min 离心 40 min,离心后可见上层为 RPMI-1640 培养液,中层为絮状分布的淋巴细胞,下层为红细胞沉淀,吸取淋

巴细胞,转移至另一个 15 mL 离心管中,并加入 10 mL RPMI-1640 培养液,吹打均匀,1 500 r/min 离心 10 min。离心后,可见白色沉淀即为淋巴细胞,弃上清液,加入 1 mL RPMI-1640 培养液吹匀重悬,细胞计数,调整细胞浓度。

4.3　含药血清时效量效关系的测定　将 SAMP8 小鼠和青龄小鼠脾淋巴细胞悬液的细胞数目调整为 5×10^7 个/mL,将制备好的含药血清和空白血清用完全 RPMI Medium 1640 培养液配置为浓度 20%、40%、80%。将 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞悬液与 5 个组的不同浓度含药血清各 100 μL,加入 96 孔细胞培养板中,每个浓度设 5 个重复培养孔。同时设 SAMP8 鼠组和青龄鼠组。SAMP8 鼠组和青龄鼠组分别以 SAMP8 小鼠和青龄小鼠脾淋巴细胞与含 10%胎牛血清完全 RPMI Medium 1640 培养液各 100 μL 共同培养。以含 10% 胎牛血清完全 RPMI Medium 1640 培养液 200 μL 孔为调零组。分别培养 24 h、48 h、72 h 后,加入质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续 CO_2 培养箱培养 4 h,加入 10% SDS 100 μL,吹打至充分混匀,置于 CO_2 培养箱中继续培养,37 ℃恒温过夜,酶标仪 570 nm 测 OD 值,以空白孔校正调零,得到结果以 OD 值表示。依据 MTT 实验结果得到最适含药血清浓度及最佳培养时间,进行后续实验。

4.4　脾脏 T 淋巴细胞表面分子 $CD28^+$、$CD152^+$(CTLA-4)表达检测　补中益气汤红芪含药血清组、补中益气汤黄芪含药血清组、益气养血汤红芪含药血清组、益气养血汤黄芪含药血清组、空白血清组分别以制备的最佳浓度含药血清与 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞共培养,青龄鼠组和 SAMP8 鼠组以含 10%胎牛血清完全 RPMI Medium 1640 培养液分别与青龄鼠和 SAMP8 鼠脾淋巴细胞共培养。取 24 孔板,加入含 10%胎牛血清完全 RPMI Medium 1640 培养液、10%空白血清、40%含红芪和含黄芪的益气养血汤含药血清,另取 24 孔板,加入 40%含红芪和含黄芪的补中益气汤含药血清,每孔 500 μL,每组设 3 个复孔,根据分组加入细胞浓度为 2×10^7 个/mL 的青龄鼠脾淋巴细胞和 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞 500 μL。将有益气养血汤黄芪含药血清组和益气养血汤红芪含药血清组的 24 孔板放入 CO_2 培养箱培养 48 h,将有补中益气汤黄芪含药血清组和补中益气汤红芪含药血清组的 24 孔板放入 CO_2 培养箱培养 72 h 后,分别标记收集于 2 mL 离心管中,2 500 r/min 离心 5 min,收集上清液,−20 ℃保存备用。用 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞沉淀后用 1 mL PBS 重悬,调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL。取各组细胞悬液 200 μL,加入 2 个 1.5 mL 离心管中,每管 100 μL,其中一管加 PEA-抗小鼠 $CD28^+$,另一管加 APCA-抗小鼠 $CD152^+$。4 ℃避光孵育 30 min 后,PBS 洗细胞 1 次,2 500 r/min离心 5 min,弃上清液,500 μL PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测。

4.5　检测培养上清液中 TNF-α 的表达　酶联免疫吸附法检测。取上述 4.4 项中培养所得上清液,严格按照检测 TNF-α ELISA 试剂盒说明书操作,于酶标仪 450 nm 波长处测定 OD 值,并根据试剂盒中提供的标准品浓度绘制标准曲线,计算其质量浓度,单位用 pg/mL 表示。

4.6　检测脾 T 淋巴细胞中 PI3K mRNA 的表达　采用实时荧光定量 PCR 法检测。取 4.4 项中培养好的细胞悬液 100 μL,细胞浓度为 1×10^7 个/mL,严格按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,紫外分光光度仪检测 mRNA 水平及纯度。RNA 纯度 $=A_{260}/A_{280}$,比值范围在 1.8 ~2.1。反转录总反应体系为 20 μL,反应条件:25 ℃ 5 min,42 ℃ 15 min,85 ℃ 5 min。取 1 μL cDNA 在 20 μL PCR 体系中扩增。反应条件:预变性 95 ℃ 5 min,退火延伸 95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s,共 40 个循环。测出△Ct 值并分析溶解曲线,以 β-actin 为内参,用比较△△Ct 值法计算出 mRNA 的相对表达量:△△Ct =(实验组目的基因 Ct 值 − 实验组内参基因 Ct 值) −(对照组目的基因 Ct 值 − 对照组内参基因 Ct 值)。引物序列见表 1。

表 1　各基因引物序列及产物长度

引物	序列(5′−3′)	长度(bp)
PI3K	上游:AATCAGCCAACAGCACACAG	20
	下游:CGAGACAAGGGTAAGGGAAA	
β-actin	上游:ACCACAGTCCATGCCATCAC	174
	下游:TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

4.7　检测 SAMP8 鼠脾脏淋巴细胞 PI3K 蛋白的表达　蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测。取 4.4 项中培养好的细胞悬液并调整浓度为 1×10^7 个/mL,取 100 μL,加入 RIPA 裂解液,提取脾淋巴细胞总蛋白,BCA 法检测各组蛋白浓度,调整浓度后加上样缓冲液,混匀后 100 ℃煮沸 5 min。按照 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书配胶,进行电泳、湿转。5%脱脂奶粉溶液室温封闭 1.5 h,加 PI3K 一抗,4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤 10 min ×3 次,加二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗涤 10 min ×3 次,加 ECL 显色剂入暗室进行手动曝光。

中国中西医结合杂志

表 2 含黄芪和含红芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清对鼠脾淋巴细胞增殖的时效量效关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	含药血清浓度(%)	n	脾 T 淋巴细胞增殖活性		
			24 h	48 h	72 h
青龄鼠	—	5	0.593 ±0.030	0.673 ±0.061	0.668 ±0.018
SAMP8 鼠	—	5	0.149 ±0.008 *	0.668 ±0.125	0.608 ±0.040 *
空白血清	20	5	0.210 ±0.007 *	0.366 ±0.012 *△	0.231 ±0.004 *△
	40	5	0.250 ±0.014 *	1.447 ±0.081 *	0.833 ±0.070
	80	5	0.273 ±0.042 *△	0.815 ±0.260△	0.485 ±0.106 *△
益气养血汤红芪	20	5	0.242 ±0.004 *	0.289 ±0.004 *△	0.248 ±0.004 *△
	40	5	0.300 ±0.016 *△	1.941 ±0.268 *△	1.035 ±0.102
	80	5	0.368 ±0.006 *△	1.439 ±0.127 *	0.829 ±0.054 *
益气养血汤黄芪	20	5	0.240 ±0.005 *	0.274 ±0.005 *△	0.257 ±0.003 *△
	40	5	0.246 ±0.010 *	1.866 ±0.350 *△	0.920 ±0.111
	80	5	0.289 ±0.013 *	1.061 ±0.122 *△	0.833 ±0.099 *
补中益气汤红芪	20	5	0.237 ±0.004 *	0.270 ±0.003 *△	0.314 ±0.012 *△
	40	5	0.290 ±0.008 *	1.704 ±0.020 *△	2.049 ±0.123 *
	80	5	0.366 ±0.002 *△	1.367 ±0.081 *	1.692 ±0.119 *△
补中益气汤黄芪	20	5	0.232 ±0.007 *	0.266 ±0.003 *△	0.303 ±0.012 *△
	40	5	0.278 ±0.007 *△	1.632 ±0.063 *	2.001 ±0.112 *△
	80	5	0.360 ±0.002 *△	1.378 ±0.045 *	1.599 ±0.035 *△

注:与青龄鼠组比较,*$P<0.05$;与 40% 空白血清组比较,△$P<0.05$

4.8 统计学方法 应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验后采用单因素方差分析,若满足方差齐性,则多重比较用 *LSD-t* 检验,若不满足方差齐性,多重比较用*Dunnett T3* 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组脾 T 淋巴细胞增殖的时效量效关系(表 2) 40% 分别含红芪和黄芪的益气养血汤含药血清培养 48 h,40% 分别含红芪和黄芪的补中益气汤含药血清培养 72 h 对 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞增殖效果最佳,以此作为后续实验研究条件。

2 各组脾 T 淋巴细胞 $CD28^+$、$CD152^+$(CTLA-4)表达比较(表 3) 与青龄鼠组比较,SAMP8 鼠组及空白血清组小鼠脾 T 淋巴细胞表面 $CD28^+$ 分子表达下降,$CD152^+$ 分子表达增高($P<0.05$);与空白血清组比较,分别含红芪和黄芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清组小鼠脾 T 淋巴细胞表面 $CD28^+$ 分子表达升高,$CD152^+$ 分子表达降低($P<0.05$),补中益气汤红芪含药血清组和补中益气汤黄芪含药血清组之间,益气养血汤红芪含药血清组和益气养血汤黄芪含药血清组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。益气养血汤红芪含药血清组和益气养血汤黄芪含药血清组 $CD28^+$ 分子表达分别高于补中益气汤红芪含药血清组和补中益气汤黄芪含药血清组($P<0.05$)。

表 3 含黄芪和红芪的益气养血汤和补中益气汤对 SAMP8 鼠脾 T 淋巴细胞表面分子表达比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	$CD28^+$	$CD152^+$ (CTLA-4)
青龄鼠	3	20.12 ±0.71	1.15 ±0.11
SAMP8 鼠	3	3.74 ±0.64 *	3.06 ±0.27 *
空白血清	3	4.21 ±0.79 *	2.36 ±0.45 *
益气养血汤红芪含药血清	3	10.87 ±1.48△	1.52 ±0.15△
益气养血汤黄芪含药血清	3	10.82 ±1.47△▲	1.80 ±0.13△
补中益气汤红芪含药血清	3	9.04 ±0.59△○	1.50 ±0.13△
补中益气汤黄芪含药血清	3	9.07 ±0.36△	1.69 ±0.25△

注:与青龄鼠比较,*$P<0.05$;与空白血清比较,△$P<0.05$;与补中益气汤黄芪含药血清组比较,▲$P<0.05$;与益气养血汤红芪含药血清组比较,○$P<0.05$

表 4 各组培养上清液中 TNF-α 表达比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

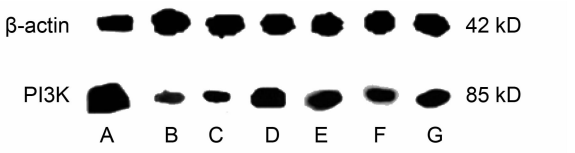
组别	n	TNF-α
青龄鼠	10	18.34 ±1.70
SAMP8 鼠	10	4.50 ±0.52 *
空白血清	10	4.84 ±0.10
益气养血汤红芪含药血清	10	10.04 ±0.57△
益气养血汤黄芪含药血清	10	9.81 ±0.51△
补中益气汤红芪含药血清	10	9.58 ±0.57△
补中益气汤黄芪含药血清	10	8.85 ±0.72△

注:与青龄鼠组比较,*$P<0.05$;与空白血清组比较,△$P<0.05$

3 各组培养上清液中 TNF-α 表达比较(表 4) 与青龄鼠组比较,SAMP8 鼠组脾 T 淋巴细胞培养上清液中 TNF-α 表达降低($P<0.05$)。与空白血清组比较,分别含红芪和黄芪的益气养血汤及补中益气汤含药血清组脾 T 淋巴细胞培养上清液中 TNF-α 表达增高($P<0.05$)。其余各组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 各组 PI3K mRNA 及蛋白的表达比较(图 1,表 5) 与青龄鼠组比较,SAMP8 鼠组脾 T 淋巴细胞

PI3K mRNA 和 PI3K 蛋白的表达降低($P<0.05$);与空白血清组比较,分别含红芪和黄芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清组 SAMP8 小鼠脾 T 淋巴细胞 PI3K mRNA 和蛋白表达均升高($P<0.05$)。与益气养血汤黄芪含药血清组比较,益气养血汤红芪含药血清组及补中益气黄芪含药血清组 PI3K mRNA 表达增高($P<0.05$);与补中益气汤红芪含药血清组比较,益气养血汤红芪含药血清组及补中益气汤黄芪含药血清组 PI3K mRNA 表达降低($P<0.05$)。益气养血汤红芪含药血清组 PI3K mRNA 和蛋白表达高于补中益气汤黄芪含药血清组($P<0.05$),其余各组 PI3K 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:A 为青龄鼠组;B 为 SAMP8 鼠组;C 为空白血清组;D 为益气养血汤红芪含药血清组;E 为益气养血汤黄芪含药血清组;F 为补中益气汤红芪含药血清组;G 为补中益气汤黄芪含药血清组

图 1　各组小鼠脾 T 淋巴细胞 PI3K 蛋白表达

表 5　各组 SAMP8 小鼠脾 T 淋巴细胞 PI3K mRNA、PI3K 蛋白表达比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PI3K mRNA ($^{\triangle\triangle}$Ct 值)	PI3K 蛋白/β-actin
青龄鼠	10	8.77 ±0.07	0.76 ±0.04
SAMP8 鼠	10	0 *	0.05 ±0.02 *
空白血清	10	2.04 ±0.04	0.08 ±0.01
益气养血汤红芪含药血清	10	7.11 ±0.21 △▲	0.27 ±0.03 △▲
益气养血汤黄芪含药血清	10	3.07 ±0.06 △▲○	0.19 ±0.01 △
补中益气汤红芪含药血清	10	8.35 ±0.08 △▲○	0.19 ±0.03 △
补中益气汤黄芪含药血清	10	6.74 ±0.13 △	0.18 ±0.02 △

注:与青龄鼠组比较,*$P<0.05$;与空白血清组比较,△$P<0.05$;与补中益气汤黄芪含药血清组比较,▲$P<0.05$;与益气养血汤红芪含药血清组比较,○$P<0.05$

讨　论

中医学关于衰老的认识早有记载,《素问·上古天真论》中说"女子七岁肾气盛,齿更发长……而无子耳。"强调了肾主藏精在人体生长和衰老中的作用。脾胃为气血生化之源,气血旺盛而神采奕奕,气血不足,阳衰于外,阴虚于内,必然形萎神衰[11]。人体衰老时,气血失和,肾之精气渐衰,水谷精微补充不足,补中益气汤和益气养血汤均是以黄芪为君药的补益方剂,具有补中益气养血功效[1]。红芪是豆科植物多序岩黄芪的干燥根,与黄芪同科异属,均具有益气固表、扶正固本等功效[1]。长期以来,红芪被看做黄芪的正品来源之一,在西北地区,常以红芪替代黄芪使用,二者在外形和成分上有差别[12],红芪水提取物促进 T 淋巴细胞增殖力、NK 细胞活性和促进细胞因子 IL-2 和 IL-4 的分泌能力优于黄芪[13]。以君、臣、佐、使组方的复方是中医治疗疾病的主要应用形式,因此本研究选择黄芪为君药的补中益气汤和益气养血汤,在复方层面上进一步比较黄芪和红芪调节衰老个体免疫功能的差别,为红芪的开发利用提供理论依据,并探讨同为补益方剂,补中益气汤和益气养血汤在免疫调节的作用差异。

免疫衰老是免疫系统随年龄的增长发生相关结构和功能的进行性退变,特征是体液免疫和细胞免疫应答下降[14,15]。免疫衰老的一个主要表现是 T 淋巴细胞功能降低和数量改变[16]。$CD28^+$ 分子是 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞表面的协同刺激分子,随着年龄增长,$CD28^+$ 分子表达缺失的 T 细胞逐渐增多,$CD28^+$ 分子表达的缺失是免疫衰老的重要标志之一[17]。T 细胞活化过程中,首先 T 细胞抗原受体(T cell receptor,TCR)与抗原提呈细胞(antigen presenting cell,APC)表面主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MCH)-抗原肽结合,提供第一信号[18],$CD28^+$ 与 B7 分子结合,提供第二信号,同时刺激 IL-2、TNF-α 等细胞因子产生[14]。细胞毒性 T 细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4,CTLA-4),亦称 $CD152^+$ 分子,与 $CD28^+$ 有共同配基 B7 分子,其与 B7 分子结合后,胞质区免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif,ITIM)的酪氨酸被磷酸化,与含有 SH2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶-1(src-homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatasEA-1,SHP-1)和含 SH2 结构域的 5′肌醇磷酸酶(src-homology 2 domain-containing inositol5′-phosphatase,SHIP)结合,抑制 T 细胞活化信号的转导[14]。Th1 主要辅助细胞免疫,可分泌 TNF-α,T 细胞活化过程中,$CD28^+$ 与 B7 分子结合,提供第二信号,刺激 TNF-α 产生。TNF-α 是重要的促炎因子,具有细胞毒性、抗病毒、免疫调节等功能[19]。

PI3K 存在于细胞质中,以酪氨酸磷酸化依赖形式与 $CD28^+$ 胞浆面尾结合后,参与调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号途径以及 $CD28^+$ 分子协同刺激信号,使 T 细胞活化后产生的一系列生物学效应,如促 T 细胞增殖、细胞因

子分泌和加强 T 细胞抗病毒能力等[20-23]。在 T 细胞活化中,PI3K-AKT-mTOR 信号通路的激活可加速细胞周期进行、抑制细胞凋亡[23]。

本实验研究结果表明,含红芪和黄芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清通过增加 T 淋巴细胞活化过程中 $CD28^+$ 分子表达以及信号转导的重要激酶 PI3K 表达,调节 SAMP8 小鼠淋巴细胞免疫功能。在上调 $CD28^+$ 分子表达上,含红芪和黄芪的益气养血汤含药血清优于含红芪和黄芪的补中益气汤含药血清。但在增加 T 细胞活化信号转导过程中 PI3K 表达上,含红芪和黄芪的补中益气汤含药血清较含红芪和黄芪的益气养血汤含药血清更具优势。复方中含红芪与含黄芪对比发现,含红芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清在上调 PI3K 表达上优于含黄芪的益气养血汤和补中益气汤含药血清,这对红芪填补黄芪来源不足等开发利用提供了依据。

利益冲突:本文无任何个人、商业、学术或财务利益冲突。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 993-995.

[2] 马芹颖, 王彦永, 马晓伟, 等. 快速老化小鼠 SAMP8 的增龄性老化特征研究[J]. 新医学, 2013, 44(6): 415-419.

[3] 邢文婷, 张李峰, 卫东锋, 等. 红芪替代补中益气汤中的黄芪对老龄小鼠脾 T 淋巴细胞的影响[J]. 中成药, 2014, 36(3): 450-456.

[4] 张高林, 程卫东, 张文君, 等. 比较含红芪和含黄芪的补中益气汤含药血清对 SAMP8 鼠脾淋巴细胞抗免疫老化的作用[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2888-2894.

[5] 桂曼曼, 张李峰, 李雪嫣, 等. 比较含黄芪和含红芪的补中益气汤对小鼠免疫功能的影响[J]. 中医杂志, 2012, 53(2): 145-147.

[6] 李纬, 程卫东, 张文君, 等. 含红芪和含黄芪的益气养血汤含药血清对 SAMP8 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的影响对比分析[J]. 中医杂志, 2016, 57(14): 1237-1241.

[7] 李纬, 程卫东, 张文君, 等. 含红芪、黄芪的益气养血汤对 SAMP8 小鼠免疫衰老及 p38MAPK 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 105-110.

[8] 郭菊梅, 杨光, 陈慧昱, 等. 红芪替换黄芪后益气养血汤对老龄鼠抗氧化损伤及抗免疫衰老作用的比较研究[J]. 西部中医药, 2014, 27(8): 7-10.

[9] 杨光, 程卫东, 张李峰, 等. 以红芪替换黄芪的益气养血复方含药血清对老龄小鼠脾淋巴细胞增殖和抗氧化的影响比较[J]. 中药材, 2014, 37(8): 1410-1414.

[10] 徐叔云主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 178-179.

[11] 田满荣, 杨凤爱. 从中医角度浅释衰老的病因[J]. 陕西中医, 2007, 28(10): 1447-1448.

[12] 张李峰, 蒲建中, 鲍英存, 等. 比较同一复方中用红芪与用黄芪对免疫抑制小鼠淋巴细胞和 Th1/Th2 型细胞因子的影响[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(3): 212-216.

[13] 胡燕, 程卫东, 刘欣, 等. 红芪和黄芪水提物对小鼠免疫功能影响的差异[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(9): 623-626.

[14] 李彦红, 刘颖, 秦川. 免疫衰老与 T、B 细胞改变的相关研究[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(6): 65-71.

[15] 许化溪. 前言——免疫衰老与老年疾病[J]. 实用老年医学, 2010, 24(3): 179-180.

[16] 张文君, 程卫东, 李纬, 等. 红芪替换玉屏风散中黄芪对 SAMP8 小鼠抗免疫老化作用的比较[J]. 中成药, 2016, 38(4): 920-924.

[17] 张高林, 程卫东, 张文君, 等. 比较含红芪和含黄芪的补中益气汤含药血清对 SAMP8 鼠脾淋巴细胞抗免疫老化的作用[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2888-2894.

[18] 蔡瑞琨. 高免疫原性 T 细胞抗原表位预测方法的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.

[19] 王文珊, 傅冷西, 叶君健. TNF-α 信号传导通路的研究进展[J]. 福建医科大学学报, 2005, 39(S1): 27-31.

[20] 聂颖, 李昌崇. PI3K 信号通路对 T 细胞发育、活化、增殖、分化及支气管哮喘的作用[J]. 中华哮喘杂志(电子版), 2011, 5(5): 348-352.

[21] 蒋龙翔, 俞康. CD28/PI3K 在 T 细胞增殖、活化信号传递中的作用机制[J]. 现代实用医学, 2006, 18(3): 206-209.

[22] 朱光旭, 朱利民. PI-3K/Akt 信号传递途径与 T 细胞反应[J]. 国外医学(免疫学分册), 2004, 27(2): 97-100.

[23] 尹承龙, 劳学军. PI3K-AKT-mTOR 信号通路的研究进展[J]. 中国医学创新, 2016, 13(1): 145-148.

(收稿: 2017-04-21 在线: 2018-08-29)

责任编辑: 汤 静

中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志