

# 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

李纬<sup>1</sup>, 程卫东<sup>1,2\*</sup>, 张文君<sup>2</sup>, 徐静汶<sup>2</sup>, 张高林<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515;

2. 兰州大学 基础医学院, 兰州 730000)

**[摘要]** **目的:**比较含红芪和含黄芪的益气养血汤对快速老化小鼠 P8 (SAMP8) 小鼠免疫功能的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法:**取昆明种青龄小鼠 10 只为青龄鼠组, SAMP8 小鼠 40 只随机分为 4 组,分别为胸腺肽组、生理盐水组、益气养血红芪组和益气养血黄芪组。分别以生理盐水,胸腺肽每日 4.6 mg·kg<sup>-1</sup>,含红芪、黄芪的益气养血汤每日 6 g·kg<sup>-1</sup>剂量 ig 小鼠,每日 1 次,连续 ig 15 次,末次 ig 后 2 h 眼球摘除取血及脾脏。酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测其血清白细胞介素-2 (IL-2),  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 含量,流式细胞术检测脾脏淋巴细胞表面 CD3, CD4, CD8, CD28 及 CD152 分子的表达情况,实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 p38 MAPK mRNA 的表达情况,蛋白质免疫印迹 (Western blot) 及免疫组化法检测其 p38MAPK 蛋白表达。**结果:**与青龄小鼠比较,生理盐水组 SAMP8 小鼠 IL-2, IFN- $\gamma$  含量降低, CD8, CD28 分子表达降低, CD4 分子表达及 CD28CD152 分子双阳性表达增高, p38 MAPK mRNA 及蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。与生理盐水组比较,胸腺肽组及中药组均能提高 SAMP8 小鼠血清中 IL-2, IFN- $\gamma$  含量,胸腺肽组含量高于中药组,红芪组 IL-2 含量高于黄芪组;胸腺肽组及中药组均能提高 CD28 分子表达,降低 CD28CD152 双阳性分子表达,胸腺肽组及黄芪组双阳性表达率低于红芪组;中药组能提高 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞表面 CD8 分子表达,且黄芪组 CD8 表达高于红芪组;胸腺肽组及黄芪组能降低 CD4 分子表达;胸腺肽组及中药组均能提高 p38 MAPK mRNA 表达,且胸腺肽组 mRNA 表达高于中药组,黄芪组高于红芪组;胸腺肽组及中药组均能提高 p38MAPK 蛋白含量及蛋白阳性率,且胸腺肽组优于中药组 ( $P < 0.05$ )。**结论:**含红芪、黄芪的益气养血汤均能改善 SAMP8 小鼠的免疫衰老现象,增加 p38MAPK 的表达。

**[关键词]** 益气养血汤; 红芪; 黄芪; SAMP8 小鼠; p38 MAPK; 免疫衰老

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2016) 24-0105-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240105

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0932.032.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-29 9:32

## Effects of Yiqi Yangxue Tang Containing Radix Astragali or Radix Hedyseri on Immunosenescence and p38MAPK Expression of SAMP8 Mice

LI Wei<sup>1</sup>, CHENG Wei-dong<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Wen-jun<sup>2</sup>, XU Jing-wen<sup>2</sup>, ZHANG Gao-lin<sup>2</sup>

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the effects of Yiqi Yangxue Tang containing Radix Astragali or Radix Hedyseri on the immune function of Senescence accelerated mouse P8 (SAMP8) mice. **Method:** Ten Kunming

**[收稿日期]** 20160616(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81373806);甘肃省中医药科学技术研究课题(GZK-2012-43);中央高校基本科研业务费专项(223000-862107)

**[第一作者]** 李纬,在读博士,从事中西医结合临床研究, Tel:18719785967, E-mail:liweidyx89@163.com

**[通讯作者]** \*程卫东,教授,博士生导师,从事中西医结合防治常见病研究, Tel:13909482629, E-mail:chengweidong888@sina.com

mice were taken as normal group. 40 SAMP8 mice were randomly divided into normal saline group, thymosins group, Yiqi Yangxue Astragali Radix group and Yiqi Yangxue Hedyseri Radix group. The normal saline and thymosins were intragastrically administrated at  $4.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  daily, and the mice in the Yiqi Yangxue Astragali Radix group and the Yiqi Yangxue Hedyseri Radix group received treatment at the dose of  $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  by *ig*, once a day for fifteen times. Eyeball was taken for blood 2 h after the last *ig* administration; then spleen was also taken. The contents of interleukins-2 (IL-2) and  $\gamma$ -interferon (IFN- $\gamma$ ) in the serum were detected by ELISA; the expression levels of CD3, CD4, CD8, CD28 and CD152 on splenic lymphocyte surface were detected by using flow cytometry; mRNA and protein expression levels of p38MAPK were detected by Real-time PCR and Western blot respectively. **Result:** As compared with the normal group, the contents of IL-2 and IFN- $\gamma$  were reduced; the expression of CD8 and CD28 molecules were decreased; CD4 molecule expression and CD28CD152 molecular double positive expression were increased; p38MAPK mRNA and protein expression levels were decreased in the normal saline group ( $P < 0.05$ ). As compared with the normal saline group, IL-2 and IFN- $\gamma$  contents in the serum of SAMP8 mice were increased in thymosins group and Yiqi Yangxue groups; the contents in the thymosins group were higher than those in Yiqi Yangxue groups; the level of IL-2 in Hedyseri Radix group was higher than that in the Astragali Radix group; the expression level of CD28 was increased and the double positive expression level of CD28, CD152 was reduced in both thymosins group and Yiqi Yangxue groups; the double positive expression rate in the thymosins group and Astragali Radix group was lower than that in Hedyseri Radix group. Yiqi Yangxue groups increased the expression levels of CD8 molecules and the expression in Astragali Radix group was higher than that in Hedyseri Radix group. The expression level of CD4 was decreased in both thymosins group and Astragali Radix group. The p38MAPK mRNA expression level was increased in both thymosins group and Yiqi Yangxue groups, and the level in thymosins group was higher than that in Yiqi Yangxue groups; the level in Astragali Radix group was higher than that in Hedyseri Radix. p38MAPK protein content and protein positive rate were increased in both thymosins group and Yiqi Yangxue groups groups, and the effect in thymosins group was higher than that in Yiqi Yangxue groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The Yiqi Yangxue Tang containing Astragali Radix or Hedyseri Radix could improve the immunosenescence performances of SAMP8 mice, which may be associated with up-regulating p38MAPK expression levels.

[ **Key words** ] Yiqi Yangxue Tang; Hedyseri Radix; Astragali Radix; SAMP8 mouse; p38MAPK; immunosenescence

《黄帝内经》中记载道“正气存内,邪不可干”,可见中医学认为“正气”为人体抵御疾病的能力,而血为气之母,血能生气,故益气养血为中医临床常用补益法之一。益气养血汤以黄芪为君药,具有益气养血之功效,用于气血不足所致体虚乏力、面色无华之证,为 2010 年版《中国药典》所收载<sup>[1]</sup>。红芪为豆科植物多序岩黄芪的干燥根,与黄芪一样具有扶正固本,补中益气的功效,且被证实在调节免疫及抗衰老等方面与黄芪有相似的功效<sup>[2]</sup>。前期研究表明含红、黄芪的益气养血汤对自然衰老小鼠有一定的抗氧化损伤和抗免疫衰老作用<sup>[3]</sup>,其含药血清对老龄小鼠脾细胞有一定的促进增殖和抗氧化衰老作用<sup>[4]</sup>。为进一步研究红、黄芪在经典复方益气养血汤中的抗免疫衰老作用差异及其机制,本实验选用快速衰老模型小鼠为研究对象,比较含红、黄芪益气

养血对其脾淋巴细胞表面分子、血清细胞因子及 p38 促分裂素原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) mRNA、蛋白表达的影响。快速老化小鼠 P8 (SAMP8) 小鼠为常用快速衰老模型小鼠,多用于增龄性神经病变的研究<sup>[5]</sup>。实验选择临床常用的,具有增强细胞免疫的作用免疫调节剂胸腺肽作为阳性药物。胸腺肽常用于各类免疫缺陷病及自身免疫性疾病等,具有诱导 T 细胞分化、成熟,促进 T 细胞活化,调节 T 细胞亚群,增加白细胞介素-2 (IL-2) 受体表达等作用<sup>[6]</sup>。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级昆明种青龄小鼠,体重 20 ~ 25 g,雌雄各半,由兰州大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(甘)2013-0002; SPF 级 SAMP8 小鼠(雄),体重 25 ~ 30 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司

司提供,合格证号 SCXK(京)2014-0004。

**1.2 药物及试剂** 黄芪、红芪、党参、人参、白术(炒)、当归、地黄、五味子、制何首乌、陈皮、地骨皮、鹿茸、淫羊藿。以上药材均购自于兰州市药材市场,由甘肃农业大学蔺海明教授鉴定合格。参照 2010 年版《中国药典》<sup>[1]</sup> 药物剂量,以相同剂量的红芪替换黄芪,配伍为含红芪的益气养血汤。根据体表面积换算得出小鼠的 *ig* 生药量每日  $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[7]</sup>。将药材在清水中浸泡 0.5 ~ 1 h,煎取 2 次,第 1 次为 1 h,第 2 次为 0.5 h,混合 2 次药液,浓缩过滤至含  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,冷藏备用。胸腺肽(上海维塔化学试剂有限公司,批号 65-71-4),根据体表面积换算得出小鼠的剂量为  $4.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,将胸腺肽溶于 0.9% 的生理盐水中,冷藏备用。EZ-SepTMMOMSE IX 淋巴细胞分离液(深圳达科为生物技术有限公司,批号 33R021406),SDS(天津化学试剂一厂);PE-抗小鼠 CD3, FITC-抗小鼠 CD4, Percp/cy5.5-抗小鼠 CD8, FITC-抗小鼠 CD3, PE-抗小鼠 CD28, APC-抗小鼠 CD152(美国 Biolegend 公司,批号分别为 B180419, B179194, B182145, B184712, B183389, B185445); IL-2 及  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(深圳达科为生物技术有限公司,批号分别为 E2020-1506, 20140801A);总 RNA 提取试剂盒(上海 Promega 公司,批号 20130601);反转录试剂盒,PCR 扩增及 BCA 蛋白定量试剂盒(南京诺唯赞公司,批号分别为 R211-02, Q111-02, 213051);RIPA 裂解液,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,电泳液和电转液,封闭液(北京索来宝公司,批号分别为 R0026, 20141104, 20150413, 20150403);p38MAPK 及  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 Immunoway 公司,批号分别为 B1301, B9901);山羊抗兔 IgG(中杉金桥公司,批号 112586),p38 上游、下游引物(上海生工生物工程股份有限公司,批号 9406088037, 9406088036)。

**1.3 仪器** CX23 型显微镜(日本 Olympus 公司), TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂),680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),FACSTMUniversal Loader 型流式细胞仪(美国 BD 公司),Lightcycler 480 型 PCR 仪(美国 Roche 公司),DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 实验取昆明种青龄小鼠 10 只, SAMP8 小鼠 40 只适应性饲养 1 周,将 SAMP8 小鼠随机分为 4 组,分别为生理盐水组、胸腺肽组、益气

养血红芪组、益气养血黄芪组,每组 10 只。青龄鼠及模型组用等体积的 0.9% 的生理盐水 *ig*,胸腺肽组以胸腺肽溶液 *ig*,每日剂量为  $4.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,另外组分别以含红芪和含黄芪的益气养血汤 *ig*,每日剂量为  $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,1 次/日,连续 *ig* 15 次。于末次 *ig* 2 h 后摘除眼球取血,收集血清,56 °C 水浴 30 min 灭活后备用,并摘除脾脏备用。

**2.2 ELISA 检测 SAMP8 小鼠血清中 IL-2, IFN- $\gamma$  含量** 按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作,检测血清中 IL-2, IFN- $\gamma$  含量。

**2.3 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞细胞悬液的制备** 按照小鼠淋巴细胞分离液说明书提取青龄鼠和 SAMP8 鼠脾淋巴细胞,细胞计数后调整密度为所需。

**2.4 流式细胞术检测脾脏淋巴细胞表面分子表达** 按照 2.3 项方法制备 SAMP8 小鼠脾淋巴细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/mL。取各组淋巴细胞悬液 200  $\mu\text{L}$ ,分装到 2 个 1.5 mL 的离心管中,每管 100  $\mu\text{L}$ (含  $1 \times 10^6$  个细胞),分别加入 PE-抗小鼠 CD3, FITC-抗小鼠 CD4, Percp/cy5.5-抗小鼠 CD8, FITC-抗小鼠 CD3, PE-抗小鼠 CD28, APC-抗小鼠 CD152。4 °C 避光孵育 30 min 后以  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 洗涤细胞 1 次,2 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,弃上清液。以 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测。

**2.5 荧光定量 PCR 检测脾脏淋巴细胞中 p38MAPK mRNA 的表达量** 取 2.3 项制备好的细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ,细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/mL,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 浓度及纯度。RNA 溶液的吸光度  $A_{260}/A_{280}$  即为 RNA 纯度,比值在 1.8 ~ 2.1。反转录总反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,反应条件:25 °C 5 min,42 °C 15 min,85 °C 5 min 后结束反应。取 1  $\mu\text{L}$  cDNA 在 20  $\mu\text{L}$  PCR 体系中扩增。反应条件:95 °C 预变性 5 min,60 °C 退火 30 s,95 °C 延伸 10 s,共 40 个循环。测出  $\Delta C_t$  值并分析溶解曲线,以  $\beta$ -actin 为内参,用比较  $\Delta\Delta C_t$  值法计算出 mRNA 的相对表达量,  $\Delta\Delta C_t = (\text{实验组目的基因 } C_t \text{ 值} - \text{实验组内参基因 } C_t \text{ 值}) - (\text{对照组目的基因 } C_t \text{ 值} - \text{对照组内参基因 } C_t \text{ 值})$ 。PCR 所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。p38MAPK 上游引物 5'-CGTAGCC TGTTCATCTCATCATC-3',下游引物 5'-TCCAACG ACCCGAAATCCAG-3'; $\beta$ -actin 上游引物 5'-ACCAC AGTCCATGCCATCAC-3',下游引物 5'-TCCACCACC CTGTTGCTGTA-3'。

**2.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 p38 蛋白含量** 取 2.3 项制备的细胞悬液, 调整细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/mL,  $2\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清液, 用滤纸吸干细胞沉淀表面液体, 向细胞沉淀中滴加适量裂解液, 吹匀, 冰上裂解 30 min,  $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 收集上清液, BCA 法测定各组蛋白浓度, 调整浓度后加上样缓冲液  $100\ ^\circ\text{C}$  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% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, 加入 p38MAPK 一抗  $4\ ^\circ\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次后加荧光显色剂进行曝光。

**2.7 免疫组化法检测 p38MAPK 蛋白表达** 脾脏标本以 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片, 脱水修复后 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育 10 min, 山羊血清封闭 30 min 后滴加一抗,  $37\ ^\circ\text{C}$  孵育 1.5 h。洗去一抗后滴加二抗及 SABC 试剂, 分别  $37\ ^\circ\text{C}$  孵育 20 min, DAB 显示 1 min ~ 3 min, 苏木素复染、脱水、透明、树胶封片。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 21 统计软件进行处理, 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较在检验方差齐性后采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 SAMP8 小鼠血清中 IL-2, IFN- $\gamma$  含量影响** 与青龄小鼠比较, 模型组小鼠血清中 IL-2 及 IFN- $\gamma$  含量明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 给药组小鼠血清中 IL-2 及 IFN- $\gamma$  含量明显增高 ( $P < 0.05$ );

益气养血红芪组小鼠血清中 IL-2 含量高于黄芪组, 益气养血汤组的效果不及胸腺肽组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 益气养血汤对 SAMP8 小鼠血清中细胞因子含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-2	IFN- $\gamma$
青龄小鼠	-	$19.58 \pm 0.52$	$30.14 \pm 6.81$
模型	-	$6.31 \pm 1.25^{1)}$	$3.86 \pm 0.66^{1)}$
胸腺肽	0.004 6	$17.08 \pm 1.42^{2)}$	$15.14 \pm 0.90^{2)}$
益气养血红芪	6	$13.26 \pm 0.46^{2,3,4)}$	$7.87 \pm 1.16^{2,4)}$
益气养血黄芪	6	$11.45 \pm 0.12^{2,4)}$	$6.29 \pm 0.59^{2,4)}$

注: 与青龄鼠组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与黄芪组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ; 与胸腺肽组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 ~ 5 同)。

**3.2 对 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞表面分子的表达影响** 与青龄小鼠比较, 模型组小鼠脾脏淋巴细胞 CD4 分子表达增多, CD8 分子表达减少, CD28 分子表达降低, CD28 及 CD152 双阳性表达增高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 益气养血汤组 CD8 分子表达增高 ( $P < 0.05$ ), 且黄芪组高于红芪组, 胸腺肽对于 CD8 分子表达无影响; 与模型组比较, 黄芪组及胸腺肽组 CD4 分子表达降低 ( $P < 0.05$ ), 且效果相近; 与模型组比较, 益气养血汤组及胸腺肽组 CD28 分子表达均增高 ( $P < 0.05$ ), 且效果相近; 与模型组比较, 益气养血汤组及胸腺肽组 CD28 及 CD152 双阳性表达均下降 ( $P < 0.05$ ), 但红芪组作用不及黄芪组和胸腺肽组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 益气养血汤对 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞表面分子的表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CD8	CD4	CD28	CD28CD152
青龄小鼠	-	$33.40 \pm 2.47$	$62.20 \pm 3.36$	$26.94 \pm 3.08$	$1.20 \pm 0.25$
模型	-	$16.99 \pm 1.22^{1)}$	$73.61 \pm 5.22^{1)}$	$4.67 \pm 0.28^{1)}$	$14.02 \pm 1.00^{1)}$
胸腺肽	0.004 6	$15.99 \pm 3.38$	$66.18 \pm 2.64^{2)}$	$15.92 \pm 1.28^{2)}$	$1.00 \pm 0.27^{2)}$
益气养血红芪	6	$27.14 \pm 1.84^{2,3,4)}$	$71.32 \pm 3.19^{2,4)}$	$15.55 \pm 1.38^{2)}$	$4.26 \pm 0.88^{2,3,4)}$
益气养血黄芪	6	$33.79 \pm 3.65^{2,4)}$	$66.78 \pm 1.50^{2)}$	$14.49 \pm 1.50^{2)}$	$1.86 \pm 0.29^{2)}$

**3.3 对 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞中 p38MAPK mRNA 表达的影响** 与青龄小鼠组比较, 模型组小鼠脾脏淋巴细胞中 p38MAPK mRNA 表达量下调 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 益气养血汤组和胸腺肽组 p38MAPK mRNA 表达量均上调 ( $P < 0.05$ ), 但中药组效果不及胸腺肽组, 黄芪组优于红芪组。见表 3。

**3.4 对 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞中 p38MAPK 蛋白含量影响** 与青龄小鼠比较, 模型组 p38MAPK 蛋白含量减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 给药组

表 3 益气养血汤对 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞中 p38MAPK mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Yiqi Yangxue Tang on expression of p38MAPK mRNA in spleen lymphocytes of SAMP8 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p38MAPK
青龄小鼠	-	0
模型	-	$8.52 \pm 0.25^{1)}$
胸腺肽	0.004 6	$1.09 \pm 0.30^{2)}$
益气养血红芪	6	$5.48 \pm 0.41^{2,3,4)}$
益气养血黄芪	6	$4.72 \pm 0.28^{2,4)}$

p38MAPK 蛋白含量增加 ( $P < 0.05$ ), 但中药组效果不及胸腺肽组。见图 1 及表 4。

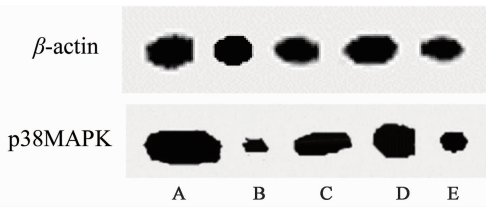


图 1 各组小鼠脾淋巴细胞 p38MAPK 蛋白表达  
A. 青龄小鼠组; B. 模型组; C. 胸腺肽组; D. 益气养血红芪组; E. 益气养血黄芪组(图 2 同)

图 1 各组小鼠脾淋巴细胞 p38MAPK 蛋白表达  
Fig. 1 Expression of p38MAPK protein in spleen lymphocytes of each group

表 4 益气养血汤对 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞中 p38MAPK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Yiqi Yangxue Tang on expression of p38MAPK protein in spleen lymphocytes of SAMP8 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p38MAPK/ $\beta$ -actin
青龄小鼠	-	6.02 $\pm$ 0.12
模型	-	0.49 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>
胸腺肽	0.004 6	3.18 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>
益气养血红芪	6	2.19 $\pm$ 0.08 <sup>2,4)</sup>
益气养血黄芪	6	2.00 $\pm$ 0.07 <sup>2,4)</sup>

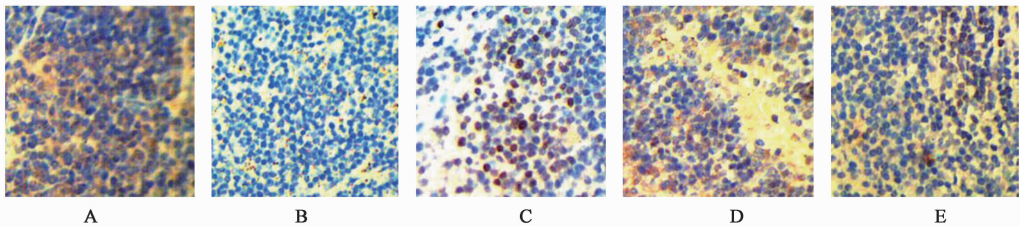


图 2 各组小鼠脾脏组织 p38MAPK 蛋白表达(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 2 Expression of p38MAPK protein in spleen tissue of each group(IHC,  $\times 400$ )

发挥免疫功能, CD4<sup>+</sup> T 细胞又称为辅助性 T 细胞, 分泌多种细胞因子辅助免疫系统发挥功能。CD4<sup>+</sup> T 细胞又根据其功能不同分为 Th1, Th2, Th17 及调节性 T 细胞, 其中 Th1 主要辅助细胞免疫, 分泌 IL-2 及 IFN- $\gamma$ , Th2 则主要辅助体液免疫, 分泌 IL-4 及 IL-13<sup>[10]</sup>。IL-2 及 IFN- $\gamma$  主要由活化的 CD4<sup>+</sup> Th1 细胞分泌, 前者能促进 T 细胞的增殖分化, 激活细胞毒性淋巴细胞、巨噬细胞和 NK 细胞, 后者可激活巨噬细胞, 促进 Th1 细胞分化, 抑制 Th2 细胞反应<sup>[11]</sup>。CD28 分子表达于近二分之一的 CD8<sup>+</sup> T 细胞和几乎所有的 CD4<sup>+</sup> T 细胞上, 其主要作用为结合抗原提呈细胞表面的 B7 分子以产生 T 细胞活化的第二信号。而 CD152 分子(即 CTLA-4)可与 CD28 竞争

3.5 对 SAMP8 小鼠脾脏 p38MAPK 蛋白表达的影响 与青龄小鼠比较, 模型组脾脏切片中 p38MAPK 蛋白表达量明显减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 给药组的 p38MAPK 蛋白表达量明显增高 ( $P < 0.05$ ), 但中药组效果不及胸腺肽组。见图 2 及表 5。

表 5 益气养血汤对 SAMP8 小鼠脾脏淋巴细胞中 p38MAPK 蛋白(IA)表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of Yiqi Yangxue Tang on expression of p38MAPK protein(IA) in spleen lymphocytes of SAMP8 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p38MAPK
青龄小鼠	-	33.61 $\pm$ 1.09
模型	-	17.80 $\pm$ 1.34 <sup>1)</sup>
胸腺肽	0.004 6	25.94 $\pm$ 1.57 <sup>2)</sup>
益气养血红芪	6	22.17 $\pm$ 0.65 <sup>2,4)</sup>
益气养血黄芪	6	22.51 $\pm$ 0.62 <sup>2,4)</sup>

#### 4 讨论

免疫系统随机体年龄的增长而出现的功能衰退会与多种增龄性疾病相关<sup>[8]</sup>, 而 T 细胞表面分子表达的改变以及细胞因子分泌的减少是免疫衰老的重要表现。T 细胞在胸腺中分化发育, TCR 和 CD3 分子是 T 细胞表面的主要标志, 而选择性表达 CD4 或 CD8 分子阳性是成熟的 T 淋巴细胞表面的标志<sup>[9]</sup>。CD8<sup>+</sup> T 细胞为细胞毒性 T 细胞, 能直接杀伤靶细胞

性结合 B7 分子, 抑制 T 细胞活化, 但其仅在 CD28<sup>+</sup> T 细胞上发挥作用<sup>[12]</sup>。p38 促 MAPK 主要被认为与炎症、应激反应, 组织缺血再灌注, 肿瘤的增殖与凋亡等多种生物过程相关, 是众多信号通路的中转站。其与免疫系统相关的作用包括了参与调节干扰素等多种细胞因子的分泌, 胸腺细胞的分化与发育<sup>[13]</sup>, 调节 Th1 及 Th2 细胞的平衡, 促进 T 细胞增殖, 介导 TCR/CD28 信号的整合<sup>[14]</sup>等。p38MAPK 的表达量过高会导致免疫功能亢进而引起炎症反应, 自身免疫性疾病等多种疾病<sup>[15]</sup>, 其表达低于正常水平也会影响免疫及其他生理功能。

本实验中中药组能增加 CD8 分子表达, 而胸腺肽对于 CD8 分子表达无明显影响<sup>[16]</sup>, 在增加 CD28

分子表达上作用与胸腺肽相近,黄芪组在降低 CD4 分子表达,降低 CD28CD152 双表达方面作用也与胸腺肽相近。在促进 IL-2、IFN- $\gamma$  分泌,提高 p38MAPK 蛋白表达等方面的效果不及胸腺肽,但中药有着多靶点,毒副作用较低,价格较低等优势<sup>[17]</sup>。含红、黄芪的益气养血汤均能改善由免疫衰老引起的 CD8, CD28 分子表达减少<sup>[18]</sup>, CD152, CD28 分子双阳性表达增多, IL-2 及 IFN- $\gamma$  分泌减少, p38MAPK 表达下降,在细胞免疫方面起到延缓免疫衰老的作用。在促进 IL-2 分泌方面红芪益气养血汤作用优于黄芪益气养血汤。而黄芪益气养血汤可降低 CD4 分子表达,在提高 CD8 分子表达、降低 CD152, CD28 分子双阳性表达及上调 p38MAPK mRNA 表达方面优于红芪益气养血汤。关于免疫衰老时表面分子及其细胞因子变化的研究尚未有定论<sup>[19]</sup>,而本实验中 SAMP8 小鼠免疫衰老时 CD4<sup>+</sup> T 细胞增多, IL-2 及 IFN- $\gamma$  的含量降低, Th1/Th2 细胞因子平衡偏向 Th2 方向。其 CD4<sup>+</sup> T 细胞增多可能是由 Th2 及其他调节性 T 细胞增多引起的。Th1 细胞因子的减少说明了 SAMP8 小鼠细胞免疫力降低,而黄芪益气养血汤可能通过减少 Th2 细胞从而使减少其细胞因子对 Th1 细胞分化的印制作用,提高 SAMP8 小鼠的细胞免疫力。说明黄芪益气养血汤可能改善由衰老导致的 Th1/Th2 细胞失衡。红芪作为单味药与黄芪比较在调节细胞免疫,抗衰老等方面有着相似的作用,但其在复方中的作用仍会产生差异,其机制仍待进一步研究证实。

【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, 2010: 616-927.  
[ 2 ] 崔芬芬, 丁婷婷, 蒙礼娟, 等. 红芪和黄芪对老龄小鼠免疫调节的比较研究[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(4): 12-13.  
[ 3 ] 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.  
[ 4 ] 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.

[ 5 ] Ito K. Frontiers of model animals for neuroscience: two prospero $\mu$ saging model animals for promoting neuroscience research[J]. Exp Anim, 2013, 62(4): 275-280.  
[ 6 ] 张梅, 王惠, 关萍, 等. 胸腺肽生物学功能的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18): 8510-8511.  
[ 7 ] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010, 5: 52-53.  
[ 8 ] 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.  
[ 9 ] 钟国成, 李小红, 朱波. microRNA 和 T 细胞发育研究进展[J]. 重庆医学, 2012, 41(6): 612-614.  
[ 10 ] Castellino F, Germain R N. Cooperation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells: when, where, and how[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24(5): 19-40.  
[ 11 ] 姚金晶, 陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(13): 2597-2600.  
[ 12 ] 任亚琳. B7-CD28 家族成员的免疫调节功能及其最新研究进展[J]. 国外医学: 免疫学分册, 2005, 28(6): 324-328.  
[ 13 ] 张奇, 白晓东, 付小兵. p38MAPK 信号通路研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2005, 6(2): 121-123.  
[ 14 ] 汤鲁明, 卢中秋, 姚永鸣. 丝裂原活化蛋白激酶 p38 在调节 T 淋巴细胞增生和分化中的作用[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(2): 9-13.  
[ 15 ] 王国军, 刘亚伟, 李玉花, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(3): 399-403.  
[ 16 ] 杨玲媛, 谢青梅, 毕英佐. 胸腺肽研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(10): 57-60.  
[ 17 ] 何伟. 浅谈中医药优势[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 3-4.  
[ 18 ] Chen J, Flurkey K, Harris D E. A reduced peripheral blood CD4(+) lymphocyte proportion is a consistent ageing phenotype[J]. Mech Ageing Dev, 2002, 123(2/3): 145-153.  
[ 19 ] 邓洪斌. 衰老小鼠 t 淋巴细胞凋亡抗性机理与枸杞多糖对其调控的研究以及 t 淋巴细胞死亡方式的探讨[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.

【责任编辑 周冰冰】