

基于免疫-炎症-衰老探讨八子补肾胶囊对自然衰老小鼠老化过程的延缓作用

宋亚辉¹, 马坤¹, 张雅萍¹, 王丹东², 毛昕菁^{3,4}, 张少兰^{1,5}, 魏聪^{1,6*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050091; 2. 河北医科大学, 石家庄 050017;

3. 南京中医药大学, 南京 210046;

4. 络病研究与创新中药国家重点实验室, 石家庄 050035;

5. 河北省络病重点实验室, 石家庄 050035;

6. 国家中医药管理局中医络病学重点学科, 石家庄 050035)

[摘要] 目的:探讨八子补肾胶囊延缓自然衰老小鼠老化过程的功效作用及作用机制。方法:以13月龄自然衰老小鼠为实验研究对象,将其按体质量随机分为4组,即自然衰老组,八子补肾低、高剂量组(1、2 g·kg⁻¹),雷帕霉素组(0.002 g·kg⁻¹)。通过行为学实验检测小鼠的衰弱表征并测定其虚弱指数;流式细胞术检测小鼠脾脏T和B淋巴细胞、效应性T细胞(TE)、记忆性T细胞(TM)、幼稚性T细胞(TN)、辅助性T细胞(Th)、细胞毒性T细胞(Tc)、Th1细胞、Th2细胞和调节性T细胞(Treg)比例;细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒检测小鼠淋巴细胞的增殖能力;苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠脾脏组织病理学变化;免疫组化法(IHC)检测细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A(p16)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)的表达情况;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测衰老相关蛋白p16和p21的mRNA表达情况;Luminex检测小鼠外周血清炎症因子:肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-12 p70水平。结果:与自然衰老组比较,八子补肾组和雷帕霉素组小鼠的衰弱表征明显改善,虚弱指数评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);脾脏中T细胞、TN细胞、Tc细胞、Th2细胞和Treg细胞比例升高,TE细胞、TM细胞、Th细胞和Th1细胞比例下降($P<0.05$, $P<0.01$);脾淋巴细胞增殖能力增强($P<0.05$, $P<0.01$);脾脏红髓和白髓边缘区结构清晰,白髓面积增大,红髓面积相应减小;脾脏中衰老相关蛋白p16和p21蛋白表达量减少($P<0.01$);p16和p21的mRNA表达量降低($P<0.01$);血清中促炎细胞因子IL-1 β 、IL-2、IL-12 p70、IFN- γ 和TNF- α 水平降低,抗炎因子IL-4和IL-10水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:八子补肾胶囊具有调节自然衰老小鼠衰弱表征,调节机体免疫稳态及炎症水平,减少免疫细胞衰老的作用,起到了延缓衰老的作用功效。

[关键词] 八子补肾胶囊; 炎症; 免疫; 衰老; 淋巴细胞亚群; 衰老相关蛋白

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R339.3+8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0146-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230242

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230209.1720.003.html>

[网络出版日期] 2023-02-10 10:53:14

Effect of Bazi Bushen Capsules on Delaying Aging Process of Naturally Aging Mice Based on Immune-inflammation-aging

SONG Yahui¹, MA Kun¹, ZHANG Yaping¹, WANG Dandong², MAO Xinjing^{3,4},
ZHANG Shaolan^{1,5}, WEI Cong^{1,6*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China;

2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

[收稿日期] 2022-12-30

[基金项目] 中国工程院战略咨询项目——中医药抗衰老战略研究项目(2022-XY-45);河北省自然科学基金项目(H2022106065);河北省络病实验室绩效后补助经费项目(20567627H);河北省中医药管理局科研计划项目(2023172)

[第一作者] 宋亚辉,在读硕士,从事中医药抗衰老理论与实验研究,E-mail:syh19950502@163.com

[通信作者] *魏聪,博士,主任医师,硕士生导师,从事络病学及其应用研究,E-mail:weitem@163.com

4. National Key Laboratory of Luobing Research and Innovative Chinese Medicine, Shijiazhuang 050035, China; 5. Hebei Provincial Key Laboratory of Luobing, Shijiazhuang 050035, China; 6. Key Disciplines of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Luobing, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Bazi Bushen capsules on delaying the aging process of naturally aging mice and its mechanism. **Method:** The mice were randomly divided into four groups according to their body weight, namely, aging group, low-dose Bazi Bushen capsules group ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), high-dose Bazi Bushen capsules group ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and rapamycin group ($0.002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The debilitating signs were detected by behavioral tests and the weakness index was measured. The percentages of spleen T and B lymphocytes, effector T cells (TE), memory T cells (TM), naive T cells (TN), helper T cells (Th), cytotoxic T cells (Tc), Th1 cells, Th2 cells, and regulatory T cells (Treg) were determined by flow cytometry. Cell proliferation and the cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the proliferation of lymphocytes in mice. The hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes in the mouse spleen. The expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) was detected by immunohistochemistry (IHC). The mRNA expression of senescence-related proteins p16 and p21 was determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, and IL-12 p70, in peripheral blood of mice were detected by Luminex. **Result:** As compared with the aging group, mice in the Bazi Bushen capsules and rapamycin groups showed significantly improved debilitating signs and reduced weakness index scores ($P < 0.05$, $P < 0.01$), increased proportions of T cells, TN cells, Tc cells, Th2 cells, and Treg cells in the spleen, decreased proportions of TE cells, TM cells, Th cells, Th1 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and increased proliferation of splenic lymphocytes ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the Bazi Bushen capsules and rapamycin groups, clear structure of the red and white marrow marginal zone was observed in the spleen of mice, the area of the white marrow was increased, and the area of the red marrow was correspondingly decreased. The protein and mRNA expression of aging-related proteins p16 and p21 in the spleen was decreased ($P < 0.01$), the levels of serum pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-2, IL-12 p70, IFN- γ , and TNF- α levels were decreased, and the levels of IL-4 and IL-10 were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the Bazi Bushen capsules and rapamycin groups as compared with the aging group. **Conclusion:** Bazi Bushen capsules have the effect of regulating the debilitating signs of natural aging mice, regulating the immune homeostasis and inflammation level of the body, and reducing cell aging.

[Keywords] Bazi Bushen capsules; inflammation; immunity; aging; lymphocyte subsets; aging-related proteins

我国人口老龄化程度不断加重,国家统计局公布的全国第7次人口普查数据显示,我国60岁及以上人口约为2.6亿人,65岁及以上老年人口约为1.9亿人,与2010年第六次全国人口普查相比,分别上升了5.44%和4.63%。世界卫生组织公布的《世界卫生统计报告2020》显示,我国人均寿命在2020年达到了76.1岁,与2000年71.4岁相比提升了约6.58%,但与日本等发达国家人均寿命83.7岁相比仍有很大差距。我国面临着众多人口老龄化带来的社会和经济问题,迫切需要进行抗衰老研究。

免疫、炎症与衰老密切相关,是抗衰老研究的重要方向之一。免疫系统随着年龄的增长逐渐老化,免疫老化具有多种表现,包括皮肤和黏膜随着年龄的增长而失去其保护功能、机体慢性炎症、对病原体的免疫反应降低、幼稚淋巴细胞减少、淋巴细胞亚群多样性受损等^[1]。此外,免疫细胞也随着年龄的增长而逐渐衰老,增殖分化能力降低,并表达高水平的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A(p16)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)等衰老相关蛋白及衰老相关分泌表型(SASP)^[2],导

致免疫反应调节受损,机体慢性炎症加剧,加速衰老^[3]。

关于衰老的学说众多,在气络学说中认为肾精虚衰是衰老根本、元气亏虚是衰老关键、形神耗损是衰老表现^[4]。八子补肾胶囊是在气络学说指导下通过对历代补肾名方的整理研究,结合人用经验创制的治疗肾精亏虚、精不化气、气不化神的代表性方药,能起到补肾填精、燮理阴阳、温扶元气、充养形神的抗衰老功效。气络承载元宗卫气、脏腑络脉之气,发挥着络属调节、温煦充养、防御卫护的作用,八子补肾胶囊补肾填精、温扶元气,调节气络功能,从而发挥其抗衰作用,这与现代医学中免疫衰老学说相呼应。前期实验证实,八子补肾胶囊具有改善衰老过程中认知缺陷^[5-6],改善生殖老化^[7],改善绝经后的动脉粥样硬化^[8],改善骨骼老化^[9]的抗衰作用。此外,在对乙酰苯肼导致贫血小鼠模型的研究中发现,八子补肾胶囊还具有改善造血,调节免疫的功能^[10],但围绕调节免疫和炎症发挥抗衰老作用研究缺乏系统深入的探讨。故本研究采用更加符合人体老化情况的自然衰老小鼠,系统探究八子补肾胶囊对自然衰老小鼠的作用。

1 材料

1.1 动物 60只13月龄SPF级C57BL/6J小鼠,体质量30~35g,购买自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于河北省中西医结合医药研究院新药安全评价研究中心[许可证号SYXK(冀)2020-003]。在室温(23±2)℃,湿度(50±10)%,12h明暗交替条件下自由进食和饮水。本研究经河北以岭医药研究院动物伦理委员会批准(批准编号N2020107)。

1.2 药物与试剂 八子补肾胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号XB2103001,由菟丝子、枸杞子、五味子、蛇床子、金樱子、覆盆子、韭菜子、川楝子、淫羊藿、巴戟天、肉苁蓉、地黄、川牛膝、人参、鹿茸、海马组成),各中药剂量详情见参考文献[8];雷帕霉素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号S115842);CD45 VioBlue[®]、CD3 FITC、CD4 PE-Vio[®] 615、CD8a APC-Vio[®] 770、CD62L PE、CD44 APC、CD3 APC-Vio[®] 770、CD4 Vio[®] Bright FITC、白细胞介素-4(IL-4)PE、 γ 干扰素(IFN- γ)APC、CD25 APC、叉头框蛋白P3(FoxP3)PE、CD19 FITC小鼠流式抗体、膜内染色试剂盒、FoxP3染色辅助液(德国美天旎公司,批号分别为130-110-802、130-119-798、130-118-455、130-120-806、130-112-836、130-119-121、

130-119-793、130-118-692、130-103-016、130-123-283、130-120-767、130-111-678、130-119-800、130-090-477、130-093-142);佛波酯/离子霉素混合物(250 \times)、布雷非德菌素A/莫能霉素混合物(250 \times)(杭州联科生物科技有限公司,批号分别为A10841、A10723);小鼠淋巴细胞分离液(达科为生物技术股份有限公司,批号7211011);苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号BA4025);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国MCE公司,批号HY-K0301);p16、p21抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab189034、ab188224);免疫组化小鼠二步法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号PV-6002);RNA提取试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司,批号ER501-01);反转录试剂盒(美国Promega公司,批号A5001);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(中国莫纳生物科技有限公司,批号MQ00401)。

1.3 仪器 DB303型动物跑步机(北京智鼠多宝生物技术有限公司);IITC755型大小鼠转棒疲劳仪(美国IITC公司);EthoVision XT动物运动轨迹跟踪系统(荷兰Noldus公司);LW-030巴恩斯迷宫(上海洛维生物技术有限公司);ME104E型分析天平(美国梅特勒托力多公司);BD FACSAria III型流式细胞仪、T100型热循环PCR扩增仪(美国BD公司);Synergy4型多功能酶标仪(美国BioTek公司);X-200型多因子检测仪(美国Luminex公司);NanoDrop One型微量分光光度计(美国Thermo公司);LightCycler96型PCR仪(瑞士Roche公司)。

2 方法

2.1 动物模型及分组 本实验研究目的为探究八子补肾胶囊是否具有延缓自然衰老小鼠老化过程的功效作用及其作用机制,重点研究八子补肾胶囊对衰老状况下衰老表型、炎症及免疫的影响,故只设立自然衰老组、八子补肾低、高剂量组和雷帕霉素组,进行不同组别之间的分析。本实验选择了C57BL/6J自然衰老小鼠为模型,而非D-半乳糖诱导的亚急性衰老小鼠模型,原因在于C57BL/6J小鼠性状稳定,且常用于老龄化研究,自然衰老的C57BL/6J小鼠在衰老方面的指标更接近衰老状态,行为学方面更真实,本研究模型选择来源于参考文献[11-12],造模成功标准为在12~24月龄衰老期间内出现多种衰老表征和生存曲线下降,确认为自然衰老模型造模成功。本实验选用13月龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠60只,并按体质量随机分为自然衰

老组、八子补肾低剂量组($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、八子补肾高剂量组($2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和雷帕霉素组($0.002\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组15只,灌胃给药12周。药物剂量来源于前期实验研究,在研究中发现八子补肾低剂量组($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和八子补肾高剂量组($2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)都对亚急性衰老小鼠认知缺陷和细胞衰老具有改善作用,且作用效果成剂量依赖性^[6]。

2.2 行为学实验和临床虚弱指数评分

2.2.1 悬挂实验 使小鼠悬挂于铁丝上,记录小鼠从悬挂开始到掉落的时间,测试3次,取3次测试的平均值。

2.2.2 转棒疲劳实验 使用IITC755型大小鼠转棒疲劳仪,设定参数,持续时间(Run limit)为300 s,通道个数(Lanes)为5个,初始转速(Start Rpm)为 $4\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,最高转速(Top Rpm)为 $40\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,加速时间(Ramp time)为30 s,开始前先将小鼠放置在转棒上适应5 min,记录小鼠从旋转开始到掉落时间,测试3次,取3次测试的平均值。

2.2.3 强制跑步实验 使用DB030型动物跑步机,设定跑步时长30 min,电刺激强度0.8 mA,刺激频率5次/8 s,力竭标准连续电刺激5次后小鼠未继续跑动,记录小鼠快速跑步至力竭的时间。

2.2.4 巴恩斯迷宫实验 使用巴恩斯迷宫,记录小鼠从开始到进入暗箱期间探索的路程和所用时间,正式测试前训练3次,每次间隔24 h,如至实验结束小鼠仍未寻找到暗箱,则按最高时长记录。

2.2.5 三箱社交实验 使用动物运动轨迹跟踪系统,在左侧箱体束缚笼中放入1只与测试小鼠非同笼的小鼠,划定束缚笼周围2 cm内为目标区域,适应5 min,记录10 min内测试小鼠鼻尖进入目标区发生社交的次数及社交持续总时长,在右侧束缚笼再放入1只非同笼小鼠,重复上述实验。2次社交实验分别记录为实验1、实验2。

2.2.6 虚弱指数评分 已有研究表明,虚弱指数评分与衰弱程度呈正相关性^[13-14],通过测定虚弱指数评分能够量化小鼠的衰弱程度,检测包括视力、听力、被毛程度、被毛色泽、胡须、脊柱后凸、腹胀等多项指标,每项指标分为0、0.5、1分3个不同级别。

2.3 样本采集 末次给药后,禁食不禁水12 h,腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉,摘眼球取血,静置2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径2.05 cm,下同),分离血清。将小鼠浸泡在75%乙醇10 min,在无菌操作台上摘取小鼠脾脏,称质量,计算脾脏指数[脾脏指数=脾脏湿重(mg)/体质量(g)]。

2.4 脾脏淋巴细胞亚群检测 按淋巴细胞提取液说明书提取小鼠脾脏淋巴细胞,加入磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL, $300\times g$ 离心5 min洗涤,弃上清,1%的BSA重悬细胞后将细胞密度调至为 1×10^7 个/mL,设置空白管(不加抗体),单阳管(抗体单染),样品管(抗体混染),加入对应抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育20 min,膜内和核内染色按试剂盒使用说明书进行破膜、破核处理后再加入对应抗体,加入BSA 1 mL离心洗涤,弃上清,加入BSA重悬细胞500 μL ,上机检测。

2.5 淋巴细胞增殖功能检测 离心收集脾脏淋巴细胞,接种于96孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,共分为5个组,空白组(只加培养基和ConA)、自然衰老组、八子补肾低、高剂量组、雷帕霉素组,每组设置6个复孔。ConA $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 刺激24 h,每孔加入CCK-8溶液10 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育4 h,酶标仪测量每孔在450 nm发射波长下的吸光度A。

2.6 HE染色观察小鼠脾脏组织病理学变化 脾脏组织经10%甲醛缓冲液固定,常规石蜡包埋,制备成5 μm 厚的切片,HE染色,显微镜下观察脾脏组织病理大体形态。

2.7 免疫组化法检测p16和p21蛋白表达 脾脏组织经10%甲醛缓冲液固定,脱水处理,常规石蜡包埋,制备成5 μm 厚的切片,脱蜡处理后枸橼酸修复30 min;PBS洗3次,每次3~5 min;滴加一抗(1:100), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h;PBS洗3次,每次3~5 min;滴加二抗(1:200), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min;PBS洗3次,每次3~5 min,DAB显色,苏木素复染3~5 min,盐酸乙醇分化,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,晾干,中性树脂封片。利用数字病理扫描仪进行玻片扫描,在选取3个视野,利用Image J软件进行积分吸光度IA计算,取均数进行统计学分析。

2.8 Real-time PCR检测小鼠衰老相关蛋白p16和p21的mRNA表达情况 用TRIzol试剂采取离心柱法从脾脏中提取总RNA,NanoDrop One型微量分光光度计测定RNA纯度和浓度。按照说明书使用反转录试剂盒在T100 Thermal Cycler上将RNA逆转录合成第一链cDNA。使用Real-time PCR试剂盒在LightCycler 96仪器上进行PCR扩增,PCR反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s,共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达水平。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表1。

2.9 Luminex检测外周血血清炎症因子水平 将

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
p16	上游 GCGAGGACCCACTACCTTCTC	22
	下游 CACAAAGACCACCCAGCGGAAC	
p21	上游 ACAGGAGCAAAGTGTGCCGTTG	22
	下游 GCTCAGACACCAGAGTGCAAGAC	
GAPDH	上游 TGTCGTGGAGTCTACTGGTGTCTTC	23
	下游 GATGACCTTGCCACAGCCTTG	

血清进行4倍稀释,每孔加入微粒混合物 50 μL ,静置 1 min,每孔加入清洗液 100 μL ,磁力架上洗 2 次,加入标准品和样本 50 μL ,室温摇床上 30 min,洗 3 次,加入生物素-抗体复合物 25 μL ,摇床 30 min,

洗 3 次,加链霉亲和素-PE 溶液 50 μL ,摇床 30 min,洗 3 次,用缓冲液 125 μL 重悬微粒混合物,摇床上孵育 30 s,上机检测。

2.10 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计学分析,数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对自然衰老小鼠悬挂、转棒和跑步时长的影响 与自然衰老组比较,八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠悬挂时长明显增加($P < 0.05, P < 0.01$);八子补肾高剂量组和雷帕霉素组小鼠转棒时长明显增加($P < 0.05, P < 0.01$);八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠跑步时长显著增加($P < 0.05$)。见表 2。

表2 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠衰弱表征的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Bazi Bushen capsules on debilitating phenotypes of naturally aging mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	悬挂时长	转棒时长	跑步时长
自然衰老组		61.23 \pm 21.01	23.50 \pm 5.91	114.97 \pm 21.25
八子补肾低剂量组	1	88.10 \pm 26.19 ¹⁾	26.43 \pm 5.71	172.61 \pm 45.28 ¹⁾
八子补肾高剂量组	2	111.67 \pm 25.18 ²⁾	37.30 \pm 5.77 ²⁾	165.81 \pm 45.94 ¹⁾
雷帕霉素组	0.002	125.07 \pm 33.72 ²⁾	29.63 \pm 5.69 ¹⁾	213.95 \pm 73.59 ¹⁾

注:与自然衰老组比较¹⁾ $P < 0.05, ^2)$ $P < 0.01$ (表 3-表 9 同)

3.2 对自然衰老小鼠记忆力的影响 与自然衰老组比较,八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠记忆力明

显提升,进入暗箱这期间探索的路程和所用时间显著缩短($P < 0.01$)。见表 3。

表3 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠记忆力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Bazi Bushen capsules on memory of naturally aging mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	时间/s	路程/mm
自然衰老组		150.67 \pm 44.84	6 577.78 \pm 2 059.00
八子补肾低剂量组	1	32.33 \pm 13.12 ²⁾	1 293.36 \pm 533.72 ²⁾
八子补肾高剂量组	2	30.22 \pm 14.98 ²⁾	1 184.58 \pm 770.82 ²⁾
雷帕霉素组	0.002	36.22 \pm 12.29 ²⁾	1 629.45 \pm 639.87 ²⁾

3.3 对自然衰老小鼠社交探索能力的影响 与自然衰老组比较,热量分布图显示八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠实验 1 中在左侧束缚笼周围探索停留时间更长,实验 2 中在右侧束缚笼周围探索停留时

间也明显增长,两次实验中都表现出对新同类更高的探索性和社交性,社交探索次数和持续时间都明显提升,差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表4 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠社交探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Bazi Bushen capsules on social exploration ability of naturally aging mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	实验 1 社交次数	实验 1 社交时间/s	实验 2 社交次数	实验 2 社交时间/s
自然衰老组		28.20 \pm 5.76	68.52 \pm 7.91	29.71 \pm 6.21	60.49 \pm 9.41
八子补肾低剂量组	1	47.40 \pm 3.85 ²⁾	94.23 \pm 5.09 ²⁾	42.57 \pm 5.38 ²⁾	88.99 \pm 9.02 ²⁾
八子补肾高剂量组	2	60.20 \pm 8.79 ²⁾	109.23 \pm 21.58 ¹⁾	51.00 \pm 9.61 ²⁾	100.47 \pm 21.13 ¹⁾
雷帕霉素组	0.002	58.20 \pm 3.70 ²⁾	106.04 \pm 13.25 ²⁾	47.08 \pm 10.88 ²⁾	97.89 \pm 12.15 ²⁾

3.4 对自然衰老小鼠虚弱指数的影响 与自然衰老组虚弱指数评分(7.06±0.81)分比较,八子补肾低剂量组(5.28±0.36)分、八子补肾高剂量组(5.22±0.26)分和雷帕霉素组(5.67±0.75)分虚弱指数评分均显著降低($P<0.01$)。

3.5 对自然衰老小鼠脾脏指数的影响 与自然衰老组小鼠脾脏指数(1.85±0.41) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 比较,八子补肾低剂量组(2.53±0.23) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、八子补肾高剂量组(2.56±0.28) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和雷帕霉素组(2.39±0.17) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 脾脏指数均明显提升($P<0.05, P<0.01$)。

3.6 对自然衰老小鼠淋巴细胞亚群的影响 与自然衰老组比较,八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠脾

脏中T细胞($\text{CD45}^+\text{CD3}^+$)比例升高,其中效应T细胞(TE)($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD62L}^-\text{CD44}^+$)和记忆T细胞(TM)($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD62L}^+\text{CD44}^+$)比例下降、幼稚T细胞(TN)($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD62L}^+\text{CD44}^-$)比例升高,辅助性T细胞(Th)($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+$)比例下降,细胞毒性T细胞(Tc)($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD8}^+$)比例升高,Th细胞中Th1细胞($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$)比例下降,Th2细胞($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{IL-4}^+$)比例升高,调节性T细胞(Treg)($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+\text{CD25}^+$)比例升高,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),B细胞($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD19}^+$)各组之间差异无统计学意义。见表5。

表5 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠淋巴细胞亚群的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	B	T	TE	TM	TN	%
自然衰老组		48.41±3.63	32.32±2.55	32.43±4.21	39.15±2.38	14.15±1.87	
八子补肾低剂量组	1	50.73±4.43	41.97±6.03 ²⁾	28.35±4.06 ¹⁾	36.15±4.86	27.15±1.77 ²⁾	
八子补肾高剂量组	2	51.80±3.24	45.80±4.08 ²⁾	23.70±2.68 ²⁾	24.68±2.30 ²⁾	31.93±1.61 ²⁾	
雷帕霉素组	0.002	50.44±3.81	43.20±4.89 ²⁾	19.95±2.54 ²⁾	31.73±3.44 ¹⁾	30.33±2.69 ²⁾	
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Tc	Th	Th1	Th2	Treg	%
自然衰老组		27.90±4.34	56.00±6.66	1.36±0.32	0.47±0.16	4.41±0.84	
八子补肾低剂量组	1	33.46±3.39	51.25±7.38	1.02±0.18 ¹⁾	0.86±0.15 ¹⁾	7.10±1.09 ²⁾	
八子补肾高剂量组	2	40.96±6.38 ²⁾	46.11±3.54 ²⁾	0.57±0.18 ²⁾	1.34±0.16 ²⁾	7.75±1.33 ²⁾	
雷帕霉素组	0.002	35.92±3.28 ¹⁾	48.53±5.70 ¹⁾	0.60±0.22 ²⁾	1.01±0.27 ²⁾	8.32±1.59 ²⁾	

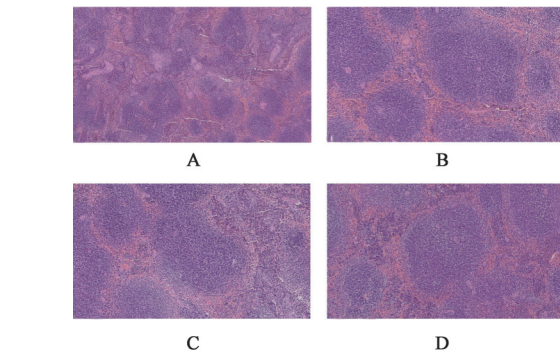
3.7 对自然衰老小鼠淋巴细胞增殖能力的影响 与自然衰老组淋巴细胞A(0.13±0.04)比较,八子补肾低剂量组(0.20±0.05)、八子补肾高剂量组(0.21±0.06)和雷帕霉素组A(0.18±0.04)明显提升,差异均具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。

3.8 对自然衰老小鼠脾脏组织病理形态的影响 与自然衰老组比较,八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠脾脏红、白髓边缘区结构清晰,白髓面积增大,红髓面积相应减小。见图1。

3.9 对自然衰老小鼠脾脏中p16和p21蛋白的影响 与自然衰老组比较,八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠脾脏中p16和p21蛋白表达显著减少($P<0.01$)。见图2和图3、表6。

3.10 对自然衰老小鼠脾脏中p16和p21 mRNA表达量的影响 与自然衰老组比较,八子补肾各组 and 雷帕霉素组小鼠脾脏中p16和p21 mRNA表达量减少($P<0.01$)。见表7。

3.11 对自然衰老小鼠外周血血清炎症因子的影响 与自然衰老组比较,八子补肾各组 and 雷帕霉素组



注:A.自然衰老组;B.八子补肾低剂量组;C.八子补肾高剂量组;D.雷帕霉素组

图1 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠脾脏组织病理形态的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Bazi Bushen capsules on histopathological morphology of spleen of naturally aging mice (HE,×100)

小鼠外周血血清中炎症因子IL-1 β 、IL-2、IL-12 p70、TNF- α 和IFN- γ 水平降低,IL-4、IL-10水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表8、表9。

4 讨论

衰老是指机体对环境的生理和心理适应能力

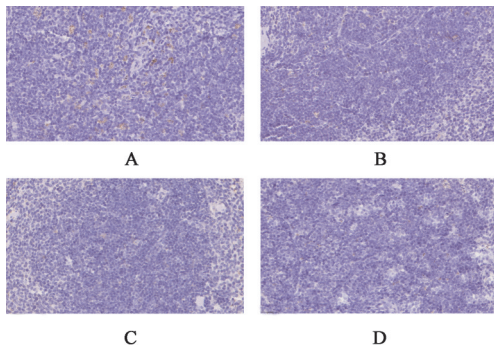


图2 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠脾脏中p16蛋白表达量的影响(IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of Bazi Bushen capsules on expression of p16 proteins in spleen of naturally aging mice (IHC, ×400)

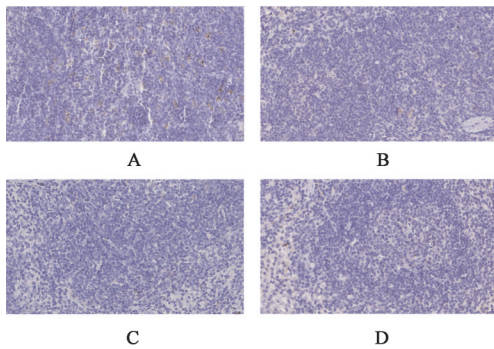


图3 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠脾脏中p21蛋白表达量的影响(IHC, ×400)

Fig. 3 Effect of Bazi Bushen capsules on expression of p21 proteins in spleen of naturally aging mice (IHC, ×400)

逐渐降低,各组织器官逐渐老化,趋向死亡的过程。衰老可分为生理性衰老和病理性衰老,其中,生理性衰老表现为老当益壮,甚至老而不衰,病理性衰老则表现为须发早白、骨质疏松、萎废无力、孤僻冷

表6 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠脾脏中p16和p21蛋白表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Bazi Bushen capsules on expression of p16 and p21 proteins in spleen of naturally aging mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p16	p21
自然衰老组		0.66±0.03	0.91±0.13
八子补肾低剂量组	1	0.38±0.04 ²⁾	0.41±0.09 ²⁾
八子补肾高剂量组	2	0.22±0.02 ²⁾	0.26±0.03 ²⁾
雷帕霉素组	0.002	0.32±0.03 ²⁾	0.32±0.06 ²⁾

表7 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠脾脏中p16和p21 mRNA表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Bazi Bushen capsules on expression of p16 and p21 mRNA in spleen of naturally aging mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p16	p21
自然衰老组		1.54±0.29	2.71±0.19
八子补肾低剂量组	1	0.95±0.07 ²⁾	1.69±0.44 ²⁾
八子补肾高剂量组	2	0.82±0.31 ²⁾	1.36±0.28 ²⁾
雷帕霉素组	0.002	0.94±0.19 ²⁾	0.95±0.40 ²⁾

漠、健忘易忘、慢性疾病多发等种种早衰之象。2019年柳叶刀杂志发表导致中国人死亡的疾病种类的前10位中有8位,如卒中、缺血性心脏病、肺癌、阿尔茨海默症等都是与衰老相关的疾病^[15]。因此,延缓衰老已成为亟待解决的重要科学问题。雷帕霉素是目前在研的最有前途的抗衰老药物之一,已有研究表明雷帕霉素具有良好的改善衰老的作用效果,对衰老的多种表型、免疫状况及炎症水平都具有调节作用^[16],因此本研究以雷帕霉素作为阳性药物。

表8 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠外周血清炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 8 Effect of Bazi Bushen capsules on serum inflammation factors in peripheral blood of naturally aging mice ($\bar{x}\pm s, n=8$) ng·g⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	IL-2	IL-4
自然衰老组		8.47±1.66	3.42±0.80	3.30±0.74
八子补肾低剂量组	1	5.72±2.35 ¹⁾	2.70±1.02	5.02±1.15 ¹⁾
八子补肾高剂量组	2	5.22±2.39 ²⁾	2.01±0.52 ²⁾	6.07±1.30 ²⁾
雷帕霉素组	0.002	3.48±1.35 ²⁾	1.99±0.60 ²⁾	5.73±1.69 ²⁾

表9 八子补肾胶囊对自然衰老小鼠外周血清炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 9 Effect of Bazi Bushen capsules on serum inflammation factors in peripheral blood of naturally aging mice ($\bar{x}\pm s, n=8$) ng·g⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-10	IL-12 p70	IFN-γ	TNF-α
自然衰老组		19.24±4.67	1 380.25±189.55	48.14±15.34	365.14±101.97
八子补肾低剂量组	1	22.12±9.18	987.69±241.65 ¹⁾	37.12±15.10	139.97±42.00 ²⁾
八子补肾高剂量组	2	34.14±8.11 ²⁾	798.19±307.01 ²⁾	19.14±6.65 ²⁾	103.84±60.57 ²⁾
雷帕霉素组	0.002	29.18±4.91 ²⁾	657.57±380.41 ²⁾	20.48±5.75 ²⁾	124.50±46.52 ²⁾

基于气络学说构建的精气神理论提出“精是生命起源、气是生命动力、神是生命体现”，提出肾精虚衰、元气亏虚、形神耗损是衰老的关键病机，并强调生命的寿夭取决于精气神的盛衰，精元亏虚累及五脏是肾精元气虚衰导致系统衰老及相关疾病发生的共性病机，确立了补肾填精、燮理阴阳、温扶元气、充养形神的治法^[17]。八子补肾胶囊作为气络学说精气神理论指导研制的治疗肾精亏虚、精不化气、气不化神，具有抗衰老作用的代表性方药，其以人参为君药补肾益气，配以枸杞子、菟丝子补肾益精，五味子、覆盆子、金樱子补肾固精，蛇床子、韭菜子兴阳益精，川楝子理气行气，鹿茸、海马补肾填精，地黄滋肾阴，淫羊藿、巴戟天、肉苁蓉助肾阳，牛膝补肝肾，引诸药下行，诸药合用，补肾填精、燮理阴阳、温扶元气以充养形神，有补精化气、补气化神、充养形神的抗衰老功效。

随着年龄的增长，人的形体及各项身体机能逐渐衰退，出现乏力、疲劳、记忆力下降、孤僻等多种衰老相关表征。本实验行为学实验结果显示，八子补肾胶囊具有改善自然衰老小鼠衰弱表征的作用，其提高了自然衰老小鼠的肌力、抗疲劳能力，记忆力和社交探索能力，同时可降低其虚弱指数评分。本团队前期研究发现八子补肾胶囊能够通过抑制小胶质细胞活化和细胞衰老来减轻认知缺陷^[6]；能够通过G蛋白偶联雌激素受体1(GPER1)依赖性抗炎和抗凋亡作用缓解绝经后动脉粥样硬化^[8]；能够改善小鼠外观状态，提高性激素水平，改善心功能，改善神经功能，改善骨质疏松和肌肉功能，提高精子数量和质量^[17]。国内外同行也有报道八子补肾胶囊能够通过调节Sirt6/核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)和Sirt6/p53-过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)-TERT信号通路改善认知缺陷^[5]；能够通过调节Sirt6/p53和Sirt6/核转录因子- κ B(NF- κ B)途径缓解睾丸和精子衰老改变^[7]，众多实验研究结论均支持八子补肾胶囊具有延缓改善衰老作用。

近年研究显示导致衰老的原因众多，其中免疫系统的老化与其关系极为密切。免疫衰老导致机体感染能力下降、对疫苗接种反应减弱、癌症发病率增加、自身免疫性疾病发病率较高和慢性炎症等，加速衰老^[18]。淋巴细胞水平是一个反映免疫状态的重要指标^[19]。T淋巴细胞是调控机体免疫功能的主要效应细胞，其介导的细胞免疫在机体免疫方面起着核心作用。随着机体的老化，T淋巴细胞数

量和功能都发生了明显改变，其中一个标志性特征就是TN细胞的数量和比例显著减少，而TM增多^[20]。胸腺是T淋巴细胞发育成熟的主要场地，有研究表明，随着年龄的增长胸腺逐渐萎缩，向外输出的成熟TN细胞数量逐渐减少^[21]，这可能是造成老年人TN细胞减少的主要原因。CD4是Th的一种标记，Th细胞能够分泌多种炎症因子从而发挥功能。CD8则是Tc的一种标记，具有直接杀死靶细胞的作用。随着年龄的增长，Tc细胞的损失非常明显，是免疫衰老的重要标志之一^[22]。本实验研究中流式细胞术实验结果显示，八子补肾胶囊具有调节自然衰老小鼠免疫稳态的作用，其提高了自然衰老小鼠T细胞比例，提高了TN比例，降低了TE细胞和TM细胞比例，提高了Tc细胞比例，降低Th细胞比例，提高了Th2细胞比例，降低了Th1细胞比例，提高了Treg细胞比例，调节了Th和Tc，Th1和Th2细胞之间的平衡性。CCK-8实验结果显示，八子补肾胶囊提高了自然衰老小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力，调节了机体免疫功能，这些结果都表明八子补肾胶囊在对自然衰老小鼠免疫状况的调节中发挥着重要作用。

衰老也与慢性炎症密切相关。与年龄相关性的慢性、无菌性、低度炎症状态被称为炎性衰老，其不仅仅是年龄增长的标志，而且也是生物老化、慢性病多发和死亡风险的标志^[23]，慢性炎症水平升高会降低健康状况并且增加死亡的风险，也成为抗衰老领域关注的焦点之一。有研究表明细胞因子中促炎细胞因子和抗炎细胞因子平衡对延缓老化过程起着关键作用^[24]。随着年龄的增长，IL-1 β 、IL-2、IFN- γ 和TNF- α 等促炎细胞因子逐渐增加^[25]，IL-4和IL-10等抗炎细胞因子则显著降低^[26]，炎症网络失衡。维持机体正常的内环境有赖于细胞因子的动态平衡状态，IFN- γ 和IL-4分别作为Th1和Th2的特征性细胞因子，其状态平衡有赖于Th1和Th2型细胞间的相互作用和抑制。有研究认为机体老化导致Th1和Th2细胞数量发生变化，Th1/Th2值失去稳态平衡^[27-28]，在慢性炎症状态下，出现Th1比例升高，Th2比例降低^[29]，这导致其分泌的细胞因子失去动态平衡，引起机体内环境紊乱，加速老化过程。本实验研究中Luminex实验结果显示，八子补肾胶囊降低了自然衰老小鼠外周血中促炎细胞因子IL-1 β 、IL-2、IL-12 p70、IFN- γ 和TNF- α 水平，增加抗炎细胞因子IL-4和IL-10水平，调节了机体炎症水平。本团队前期研究发现八子补肾胶囊对D-半乳

糖诱导的亚急性衰老小鼠的衰老相关分泌表型(SASP): IL-1 β 、IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α 、趋化因子3(CCL3)、细胞集落刺激因子(GM-CSF)、内分泌素、细胞黏附分子-1(ICAM)-1和金属蛋白激酶(MMP)-9等细胞因子都具有调节作用^[6];国内外同行报道八子补肾胶囊通过抑制TNF- α 分泌,逆转炎症通路NF- κ B p65的核表达从而减轻精子细胞衰老和睾丸萎缩^[7]。这些研究结果均说明八子补肾胶囊延缓改善衰老作用与调节慢性炎症有着密切关联。

脾脏是主要的次级淋巴器官之一,内有大量的淋巴细胞分布。在老年小鼠中,脾脏发生结构性变化,这些结构变化会影响内部免疫细胞的功能,最终可能导致免疫紊乱^[30]。衰老相关蛋白p16和p21是细胞周期蛋白家族的重要成员,也是细胞衰老的重要标志物,高表达的p16和p21蛋白抑制细胞增殖分化,导致细胞衰老,有研究表明衰老的免疫细胞分泌高水平的SASP,会导致周围组织器官的衰老,加速衰老,而清除这些衰老的免疫细胞能起到延缓衰老的功效作用^[20]。本实验研究中HE染色结果显示八子补肾胶囊对小鼠脾脏的组织病理学状态具有改善作用;免疫组化和Real-time PCR实验结果显示,八子补肾胶囊降低了脾脏中衰老相关蛋白p16和p21的表达,具有减少免疫细胞衰老的作用,这表明八子补肾胶囊抗衰老作用可能与其减少细胞衰老相关。

综上,八子补肾胶囊具有延缓自然衰老小鼠老化过程的作用,通过本研究佐证其作用机制可能与调节免疫稳态,调节机体炎症水平,减轻细胞衰老相关,但八子补肾胶囊抗衰老作用途径多样,靶点丰富,对免疫与炎症的调节途径众多,仍需进一步的探索,后续将进一步在细胞方面展开深入研究。衰老及衰老相关重大疾病作为当下老龄化社会需要迫切关注的科学问题之一,具有理论创新、临床特色突出的中医药显示出了确切的作用,在与现代医学衰老机制研究进展相结合的过程中,免疫衰老与炎症均是呈现机体整体衰老的重要方面,深入研究有望揭示中医药抗衰、防衰的作用优势及科学内涵。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] GROBKOPF A, SIMM A. Aging of the immune system [J]. Z Gerontol Geriatr, 2022, 55(7): 553-557.
[2] VICENTE R, MAUSSET-BONNEFONT A L,

JORGENSEN C, et al. Cellular senescence impact on immune cell fate and function[J]. Aging Cell, 2016, 15(3): 400-406.

[3] BIEDUNKIEWICZ B, DEBSKA-ŚLIZIEN A, TYLICKI L. COVID-19 in patients requiring renal replacement therapy: An overview of current data and future challenges [J]. Pol Arch Intern Med, 2022, 132(9): 16336.
[4] 李红蓉,魏聪,贾振华,等. 气络学说指导抗衰老研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1): 7-15.
[5] LI L, ZHANG H, CHEN B, et al. Bazi Bushen capsules alleviates cognitive deficits and regulates Sirt6/Nrf2/HO-1 and Sirt6/P53-PGC-1 α -TERT signaling pathways in aging mice [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 282: 114653.
[6] JI C, WEI C, LI M, et al. Bazi Bushen capsule attenuates cognitive deficits by inhibiting microglia activation and cellular senescence [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 2025-2039.
[7] LI L, CHEN B, AN T, et al. Bazi Bushen capsules alleviates altered testicular morphology and spermatogenesis and modulates Sirt6/p53 and Sirt6/NF- κ B pathways in aging mice induced by D-galactose and NaNO [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271: 113810.
[8] HUANG D, WANG X, ZHU Y, et al. Bazi Bushen capsules alleviates post-menopausal atherosclerosis via GPER1-dependent anti-inflammatory and anti-apoptotic effects [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 658998.
[9] 李蕊,李琳,田怿森,等. 八子补肾胶囊对衰老小鼠骨质量的保护作用及其对SIRT6/NF- κ B/cathepsin K通路的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 313-318, 328.
[10] 吴以岭. 气络论[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2018: 1350-1354
[11] WANG S, LAI X, DENG Y, et al. Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment [J]. Life Sci, 2020, 242: 117242.
[12] KITANI K, OSAWA T, YOKOZAWA T. The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice [J]. Biogerontology, 2007, 8(5): 567-573.
[13] WHITEHEAD J C, HILDEBRAND B A, SUN M, et al. A clinical frailty index in aging mice: Comparisons with frailty index data in humans [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014, 69(6): 621-632.

- [14] ROCKWOOD K, BLODGETT J M, THEOU O, et al. A frailty index based on deficit accumulation quantifies mortality risk in humans and in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:43068.
- [15] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: A systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [16] YOUSEFZADEH M J, FLORES R R, ZHU Y, et al. An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs [J]. *Nature*, 2021, 594(7861): 100-105.
- [17] 李红蓉, 魏聪, 集川原, 等. 八子补肾胶囊的抗衰老研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 239-246.
- [18] SADIGHI AKHA A A. Aging and the immune system: An overview [J]. *J Immunol Methods*, 2018, 463: 21-26.
- [19] SHIN G, JANG K, KIM M, et al. Inflammatory markers and plasma fatty acids in predicting WBC level alterations in association with glucose-related markers: A cross-sectional study [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 629.
- [20] BEKTAS A, SCHURMAN S H, SEN R, et al. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(4): 977-988.
- [21] KWAK T K, JANG H S, LEE M G, et al. Effect of orally administered *Atractylodes macrocephala* koidz water extract on macrophage and T cell inflammatory response in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, doi: 10.1155/2018/4041873.
- [22] LIU W, XU J, PU Q, et al. The reference ranges and characteristics of lymphocyte parameters and the correlation between lymphocyte parameters and routine health indicators in adults from China [J]. *Immun Ageing*, 2022, 19(1): 42.
- [23] TEISSIER T, BOULANGER E, COX L. Interconnections between inflammageing and immunosenescence during ageing [J]. *Cells*, 2022, 11(3): 359.
- [24] RICHARTZ-SALZBURGER E, BATRA A, STRANSKY E, et al. Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease [J]. *J Psychiatr Res*, 2007, 41(1/2): 174-178.
- [25] WATSON R R, ZIBADI S, VAZQUEZ R, et al. Nutritional regulation of immunosenescence for heart health [J]. *J Nutr Biochem*, 2005, 16(2): 85-87.
- [26] WANG J, CHENG X, ZHANG X, et al. The anti-aging effects of LW-AFC via correcting immune dysfunctions in senescence accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) strain [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 26949-26965.
- [27] HUANG J, LI Z, YAO X, et al. Altered Th1/Th2 commitment contributes to lung senescence in CXCR3-deficient mice [J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48(8): 717-726.
- [28] DI BENEDETTO S, MÜLLER L, WENGER E, et al. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 75: 114-128.
- [29] GRIEVINK H W, SMIT V, HUISMAN B W, et al. Cardiovascular risk factors: The effects of ageing and smoking on the immune system, an observational clinical study [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 968815.
- [30] TURNER V, MABBOTT N. Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes [J]. *Biogerontology*, 2017, 18(5): 723-738.

[责任编辑 孙丛丛]