

延衰合剂对 *D*-半乳糖衰老小鼠脾脏病理及血清 IL-2 的影响

栾增强, 曹文富*, 黄和贤

(重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331)

[摘要] 目的: 研究延衰合剂(Yanshuai Mixture, YSM)对 *D*-半乳糖所致亚急性衰老小鼠脾脏组织结构及血清白介素-2(IL-2)水平的影响。方法: 用 *D*-半乳糖(*D*-galactose, *D*-gal 120 mg·kg⁻¹·d⁻¹)连续 sc 8 周建立衰老模型小鼠, 造模同时用 YSM ig, 观察衰老小鼠脾脏指数、脾脏病理改变、酶联免疫分析法(ELISA)检测血清 IL-2 的变化。结果: 与正常对照组脾脏指数(0.38 ± 0.03)% 比较, 衰老模型小鼠脾脏指数(0.25 ± 0.05)% 降低, 脾脏组织结构退化明显, IL-2 水平(0.90 ± 0.17) μg·L⁻¹ 明显降低(*P* < 0.05); 用药后, 延衰合剂高剂量组小鼠脾脏组织结构明显改善, 脾脏指数(0.37 ± 0.04)% 增加, IL-2 水平(2.47 ± 0.77) μg·L⁻¹ 增加(*P* < 0.05)。YSM 高剂量组作用优于补肾益寿胶囊组及 YSM 低、中剂量组(*P* < 0.05)。结论: YSM 可改善衰老小鼠脾脏病理结构, 抑制 IL-2 水平的下降, 提高免疫功能, 可能具有良好的延缓衰老的作用。

[关键词] 延衰合剂; 衰老; 脾脏; 白细胞介素-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0188-04

Effect of Yanshuai Mixture on Spleen Histopathology and IL-2 in *D*-galactose induced Aging Mice

LUAN Zeng-qiang, CAO Wen-fu*, HUANG He-xian

(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Yanshuai mixture (YSM) on the spleen tissue structure and serum interleukin 2 (IL-2) levels in *D*-galactose induced sub-acute aging mice. **Method:** The aging mice were established by *D*-galactose (120 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and administered continuously with YSM for 8 weeks. The spleen index and changes in spleen endoscopic biopsy morphology were observed, IL-2 levels in serum were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The spleen index of aging model mice was decreased (0.25 ± 0.05)%, histopathological changes in spleen were degraded significantly, and IL-2 level (0.90 ± 0.17) μg·L⁻¹ was significantly reduced compared with those in normal control group (*P* < 0.05). After the treatment with YSM, spleen histomorphological changes were ameliorated, the spleen index of high-dose YSM mice (0.37 ± 0.04) was increased and level of IL-2 in the serum (2.47 ± 0.77) μg·L⁻¹ was increased (*P* < 0.05). High-dose YSM group was superior to Bushen Yishou capsule (BSYS) group, low and middle-dose YSM group (*P* < 0.05). **Conclusion:** YSM can improve the spleen histopathological changes, inhibit the decline of IL-2 level in serum, and improve immune function, so it may have a good anti-aging effect.

[Key words] Yanshuai mixture; aging; spleen; interleukin 2

衰老是生物体在生命过程中随年龄增长而在形态结构和生理功能上出现一系列进行性、退化性变

[收稿日期] 20110120(006)

[第一作者] 栾增强, 硕士研究生, 主要从事中西医结合内分泌代谢病及肾病研究, E-mail: haidijinlong@126.com

[通讯作者] * 曹文富, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中西医结合肾病及内分泌代谢病研究与中药新药研发, E-mail: caowenfu9316@163.com

化的过程。免疫衰老是机体衰老的重要组成部分,免疫器官如胸腺、脾脏等在衰老过程中表现出不同程度的退化。研究表明,免疫功能低下是导致衰老及多种老年病的重要原因之一,IL-2 水平下降是免疫衰老的重要标志之一。延衰合剂(Yanshuai Mixture, YSM)在长期的临床应用中显示出明显的提高患者免疫力的疗效。本实验采用 *D*-gal 建立亚急性衰老小鼠模型,应用光镜及酶联免疫分析法,观察 YSM 对衰老小鼠脾脏组织病理及血清 IL-2 的影响,探讨 YSM 延缓免疫衰老作用的可能机制。

1 材料

1.1 动物 昆明小鼠 60 只,雌雄各半,SPF 级,2~3 月龄,(20±2) g,由重庆医科大学动物实验中心提供,合格证 SCXK(渝)20090001。

1.2 药物与试剂 YSM 由红参、制首乌、熟地黄、肉苁蓉、丹参等 12 味中药组成,中药饮片由重庆医科大学附属第一医院中西医结合科提供,常规制成含生药浓度 2 g·mL⁻¹ 的水煎剂,高压蒸气灭菌后置 4℃ 冰箱中保存备用。补肾益寿胶囊(Bushen Yishou capsule, BSYS)(太极集团重庆涪陵制药厂生产,批号 09090093,规格为每粒 0.3 g),根据人和小鼠的剂量转换用生理盐(NS)配成 18 g·kg⁻¹ 的水溶剂;*D*-半乳糖(美国 Amersco 公司)用 NS 配成 6% 的浓度;小鼠白介素 2(IL-2)酶联免疫吸附测定试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器 煎药包装机(北京东华原)、光学显微镜(日本 OLYMPUS),酶标仪(美国 MD),低温高速离心机(美国 Sigma),电子天枰(岛津 Shimadzu),隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),以上仪器由重庆医科大学眼科实验室提供。

2 方法

2.1 分组、造模与取材 60 只昆明小鼠随机分为正常对照组(N)、衰老模型组(M)、补肾益寿胶囊组(BSYS)、延衰合剂低(YSM-L)、中(YSM-M)、高(YSM-H)剂量组($n=10$)。各组小鼠在相同条件下分笼喂养,自由进食饮水。除 N 组每日颈背部 sc 等量 NS 外,其余各组小鼠均每日颈背部 sc *D*-gal(120 mg·kg⁻¹·d⁻¹)连续 8 周,形成亚急性衰老模型。造模同时分别 ig 等体积的 YSM 水煎剂(9, 18, 36 g·kg⁻¹),BSYS 组 ig 等体积的 BSYS 水溶剂,N 组 ig 等体积 NS,每日 1 次。

于末次给药后 1 h 称量小鼠体重后,用 10% 水合氯醛(0.1 mL·kg⁻¹) ip 麻醉后摘眼球取血,颈椎脱臼处死取脾脏。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 一般情况观察 造模过程中观察各组小鼠的精神状态、毛发、活动力、体重等情况。

2.2.2 脾脏指数及组织病理结构的观察 脾脏称重后置于 4% 多聚甲醛中固定,常规组织切片,HE 染色,观察脾脏组织形态学变化。

2.2.3 血清 IL-2 的检测 将取出的血液室温自然凝固 20 min 后 3 000 r·min⁻¹ 低温离心分离血清,置 4℃ 冰箱中保存,用 ELISA 方法测定样品中 IL-2 水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.3 统计学方法 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS18.0 统计分析软件处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 与正常对照组比较衰老模型组小鼠精神差,活力下降,毛发无光泽,部分还可见毛发脱落。体重减轻(表 1)。BSYS 组及 YSM 各剂量组较模型组精神状态好,活力强,毛发光泽,体重增加,其中以 YSM-H 组改善最明显。

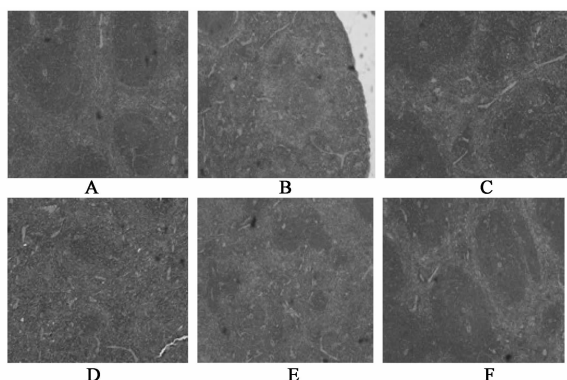
3.2 脾脏指数及组织形态结构的变化 与正常对照组相比,衰老模型组小鼠脾脏指数降低($P < 0.05$);与衰老模型组小鼠相比,用药后 YSM 低、中、高剂量组及 BSYS 组脾脏指数均有增加($P < 0.05$)。YSM-H 组作用明显优于 BSYS 组及 YSM 低、中剂量组($P < 0.05$)(表 1)。脾脏组织病理结构变化如下:正常对照组脾脏白、红髓分界清楚,淋巴细胞发达且排列紧密,动脉周围淋巴鞘较厚;衰老模型组脾脏白、红髓分界不清,白髓缩小,动脉周围淋巴鞘减小,淋巴细胞稀疏紊乱;YSM 各剂量组及 BSYS 组脾脏组织形态均有不同程度的改善,如红、白髓分界较清楚,白髓区较大,动脉周围淋巴鞘明显,脾小体数量较多,以 YSM-H 组及 BSYS 组改善最明显。见图 1。

3.3 各组小鼠血清 IL-2 的变化 与正常对照组相比,衰老模型组血清 IL-2 水平明显降低($P < 0.05$);与衰老模型组小鼠相比,用药后 YSM 各剂量组及 BSYS 组均可明显抑制衰老小鼠血清 IL-2 的下降($P < 0.05$)。YSM-H 组作用较 BSYS 组及 YSM 低、中剂量组明显($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 延衰合剂对衰老小鼠体重,脾脏指数及 IL-2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 体重/g | 脾脏质量/mg | 脾脏指数/% | IL-2/μg·L ⁻¹ |
|--------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 45.28 ± 3.12 ¹⁾ | 159.90 ± 5.04 ¹⁾ | 0.38 ± 0.03 ¹⁾ | 2.78 ± 0.76 ¹⁾ |
| 模型 | - | 38.00 ± 1.22 | 100.20 ± 7.15 | 0.25 ± 0.05 | 0.90 ± 0.17 |
| 补肾益寿胶囊 | 18 | 43.95 ± 3.61 ¹⁾ | 152.70 ± 5.89 ¹⁾ | 0.35 ± 0.04 ¹⁾ | 1.99 ± 0.48 |
| 延衰合剂-L | 9 | 41.17 ± 2.43 ¹⁾ | 123.50 ± 4.50 ¹⁾ | 0.31 ± 0.03 ¹⁾ | 1.69 ± 0.38 ^{1,2)} |
| | 18 | 41.80 ± 3.17 ¹⁾ | 144.20 ± 5.25 ¹⁾ | 0.34 ± 0.03 ¹⁾ | 1.76 ± 0.31 ^{1,2)} |
| | 36 | 44.55 ± 4.66 ¹⁾ | 154.82 ± 5.07 ¹⁾ | 0.37 ± 0.04 ¹⁾ | 2.47 ± 0.77 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05;与延衰合剂 36 g·kg⁻¹组比较²⁾ P < 0.05。



A. 正常对照组; B. 衰老模型组; C. BSYS 组; D. YSM 9 g·kg⁻¹组;
E. YSM 18g·kg⁻¹组; F. YSM 36 g·kg⁻¹组
图 1 各组小鼠脾脏组织结构(HE, ×100)

4 讨论

衰老是生命科学研究的重大学科之一, 中医学对衰老机制及延缓衰老的研究各有特点, 开发经济有效的延缓衰老药物有广阔的应用前景。目前衰老研究的模型中, D-半乳糖连续 sc 诱导的亚急性衰老小鼠模型较为公认, 可以基于整体水平上用于行为学、抗氧化以及免疫等方面的抗衰老药物药效的研究^[1-3], 故采用此模型。补肾益寿胶囊已广泛应用于临床, 确有延缓免疫衰老作用, 故选为对照^[4]。

机体在衰老的过程中, 天然免疫和特异性免疫功能减退^[5]。脾脏是人体最大的外周免疫器官, 由骨髓、红髓和边缘区构成, 骨髓由密集的淋巴细胞构成, 可分为动脉周围淋巴鞘和脾小体两部, 而动脉周围淋巴鞘是围绕在中央动脉周围的以 T 细胞为主的厚层淋巴组织, 红髓有脾索和脾血窦构成。脾脏是对血源性抗原产生免疫应答的主要场所, 在机体免疫功能中起重要的作用, 伴随着机体衰老进程, 免疫器官也发生明显的退行性改变, 如脾脏骨髓区缩小, 红骨髓界限不清楚, 脾小体不明显, 免疫功能也下降^[6]。本实验观察到衰老模型小鼠脾脏指数明显减小, 且脾白、红髓分界不清, 骨髓缩小, 动脉周围淋巴

鞘减小, 淋巴细胞稀疏紊乱。给予 YSM 和 BSYSig 后, 脾脏指数增加, 骨髓区扩大, 动脉周围淋巴鞘增厚, 说明 YSM 有抑制脾脏组织结构退化的作用。IL-2 是由活化的 T 淋巴细胞产生的细胞因子, 具有促进 T 细胞增殖分化, 增强 T 细胞、NK 细胞活性, 诱导干扰素生成的作用。本实验结果显示, YSM 能显著提高衰老小鼠血清的 IL-2 水平。

YSM 由红参、制首乌、熟地黄、肉苁蓉、黄精、丹参等 12 味中药组成, 其中单味中药及其单体成分或活性提取物的抗免疫衰老作用已有较多研究, 如红参中的人参皂苷和人参多糖可明显增强机体的免疫功能。熟地黄有效成分地黄多糖, 在体内外实验中能明显提高小鼠 T 淋巴细胞的增殖反应能力, 促进 IL-2 的分泌, 显示明显的免疫增强作用^[7]。制首乌能增强小鼠 T、B 淋巴细胞功能, 使机体的特异性免疫功能增强^[8]。肉苁蓉提取物松果菊苷提高衰老小鼠血清 IL-2 含量、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能和淋巴细胞增殖反应, 降低 IL-6 和肝细胞线粒体 DNA 相对含量^[9]等等。YSM 组方符合中医衰老理论与现代医学的免疫衰老理论, 根据衰老正虚邪实的基本病机而立法, 其正虚以脾肾虚损为主, 邪实以血瘀痰凝多见^[10], 从而配伍成具有健脾补肾、益精填髓、益气养血、活血散结等功效的合剂。采取扶正祛邪之法, 标本兼治, 既能补气血阴阳之虚, 又可祛除痰湿血瘀等实邪。

本实验结果显示 YSM 可改善亚急性衰老模型小鼠脾脏病理形态, 提高血清 IL-2 水平, 提示能增强衰老模型小鼠的免疫功能, 可能是 YSM 延缓衰老的机制之一。YSM 为中药复方制剂, 而中药及中药复方的作用有多方面、多层次等特点, 尚需深入研究以揭示其细胞及分子机制。

[致谢] 重庆市眼科学重点实验室在试验中给予的帮助。

[参考文献]

[1] 秦红兵, 杨朝, 范忆江, 等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模

活血散瘀颗粒的活血化瘀作用研究

郑楚,唐金良*,杨冬业,徐勤
(桂林医学院,广西 桂林 541001)

[摘要] **目的:**观察活血散瘀颗粒的活血化瘀作用。**方法:**将 Wistar 大鼠随机分成 6 组:对照组、急性血瘀模型组、活血散瘀颗粒高、中、低剂量组(16,8,4 g·kg⁻¹)和复方丹参片组(5 g·kg⁻¹)。ig 给药,每日 1 次,连续 9 d。d 9 时,sc 肾上腺素 10 μg·kg⁻¹,2 h 后置 0~4 ℃水中游泳 5 min,2 h 后,sc 肾上腺素 1 次(10 μg·kg⁻¹),制造急性血瘀模型,测定各组给药 9 d 后对高切黏度、低切黏度、红细胞压积、血浆黏度及对血栓形成的影响;用肾上腺素制造大鼠肠系膜急性微循环障碍模型,观察活血散瘀颗粒对循环障碍的改善作用。**结果:**活血散瘀颗粒高剂量组和模型组比较,大鼠全血高、低切、血浆黏度和红细胞积压显著降低($P < 0.05$);血栓的长度、湿重、干重显著减少,凝血时间显著延长($P < 0.05$);可显著抑制肾上腺素引起的大鼠肠系膜微循环细动脉管径缩小、流速减慢、毛细血管开放量减少,并改善这些现象($P < 0.05$)。**结论:**活血散瘀颗粒可改善血液流变性 & 微循环障碍。

[关键词] 活血散瘀颗粒;血液流变性;微循环障碍

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0191-04

Promoting Blood Circulation by Removing Blood Stasis of Huoxue Sanyu Granule

ZHENG Chu, TANG Jin-liang*, YANG Dong-ye, XU Qin
(Guilin Medical College, Guilin 541001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe promoting blood circulation by removing blood stasis of Huoxue Sanyu granule. **Method:** Sixty Wistar rats ($n = 10/\text{group}$) were randomly divided into six group, the normal group, the

[收稿日期] 20110214(001)

[第一作者] 郑楚,副主任医师,副教授,主要从事心血管方面的研究, Tel:13768439393, E-mail: Zhengchu999@163.com

[通讯作者] *唐金良,副主任医师,主要从事心血管方面的研究, Tel:13768439393, E-mail: tjlxzdhubib@yahoo.com.cn

- 型的建立与评价 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7):1275.
- [2] 刘洋,程清洲,彭超华,等. D-半乳糖致小鼠衰老模型的制作及效果评价 [J]. 武汉工业学院学报, 2009, 28(1):32.
- [3] 朱亚珍,朱虹光. D-半乳糖致衰老动物模型的建立及其检测方法 [J]. 复旦学报:医学版, 2007, 34(4):617.
- [4] 吴周强,陈淑冰,胡国让,等. 补肾益寿胶囊的抗应激作用和对免疫功能影响的实验和临床研究 [J]. 中药药理与临床, 1997, 13(3):41.
- [5] Eugenio Mocchegiani, Marco Malavolta. NK and NKT cell functions in immunosenescence [J]. Aging Cell, 2004, 3(4):177.
- [6] 鄢泽然,冯丽莉,乔庆彬,等. 益寿饮抗 D-半乳糖所致衰老作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5):1117.
- [7] 侯家玉. 中药药理学 [M]. 北京:中国中医药出版社, 2006:206,223.
- [8] 孙桂波,郭宝江,李续娥,等. 何首乌蒺藜苷对小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(6):30.
- [9] 李媛,宋媛媛,张洪泉. 松果菊苷对衰老小鼠免疫功能和线粒体 DNA 相对含量的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6):810.
- [10] 侯俊林. 对中医衰老学说的再认识 [J]. 江苏中医药, 2009, 41(9):4.

[责任编辑 聂淑琴]