

## 四君子汤对衰老模型大鼠免疫功能的影响

吴正平<sup>1\*</sup>, 周智兴<sup>2</sup>, 雷波<sup>1</sup>

(1. 宜春学院美容医学院, 江西 宜春 336000; 2. 宜春学院医学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的: 观察四君子汤对 *D*-半乳糖所致亚急性衰老大鼠免疫功能的影响, 探讨四君子汤抗衰老作用。方法: 雄性 Wistar 大鼠分成 5 组, 制备 *D*-半乳糖亚急性衰老大鼠模型, 以不同剂量的四君子汤或生理盐水 ig; 6 周后, 测定胸腺、脾脏指数, MTT 法检测淋巴细胞转化刺激指数, ELISA 法测定血清转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 干扰素(IFN- $\gamma$ )含量。结果: 模型大鼠与正常大鼠比较, 脾脏、胸腺指数明显降低, T, B 淋巴细胞增殖活性下降, TGF- $\beta$  含量升高而 IFN- $\gamma$  含量下降; 四君子汤可明显提高亚急性衰老大鼠脾脏、胸腺指数及 T, B 淋巴细胞增殖能力, 降低 TGF- $\beta$  含量并使 IFN- $\gamma$  含量升高。结论: 四君子汤可增强衰老大鼠免疫功能, 具有延缓衰老作用。

[关键词] 四君子汤; 衰老; 免疫功能

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0128-02

在历代医家对衰老机制的论述中, 肾、脾虚证是中医学衰老理论的支柱<sup>[1-2]</sup>。而免疫衰老学说则受到现代医学研究者的普遍认同<sup>[3-4]</sup>。本研究采用 *D*-半乳糖(*D*-gal)衰老大鼠模型, 观察四君子汤对其免疫功能的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物与分组** 选用清洁级 6 周龄 wistar 大鼠 100 只(南昌大学实验动物科学部提供, 合格证号赣医动字第 02196-02), 体重 180 ~200 g, 雄性, 随机分为 5 组: 正常组, 模型组, 四君子汤低、中、高剂量治疗组, 每组 20 只。

**1.1.2 药物与试剂** 四君子汤(由人参、茯苓、白术、甘草按 3 3 3 2 的比例按传统方法煎煮过滤, 并于恒温水浴锅中浓缩成含生药 2.0 g·mL<sup>-1</sup>); ConA (Sigma 公司, 批号 C2840); LPS (Sigma 公司, 批号 L2960); MTT (Sigma 公司, 批号 M2248); *D*-半乳糖 (Sigma 公司, 批号 081016); 细胞因子试剂盒(晶美公司, 批号 2008-06); RPMI1640 粉(美国 Gibco 公司, 批号 1182699)。

**1.1.3 仪器** 酶标仪(美国伯乐, 型号 680 型)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 造模与给药** 取清洁级 wistar 大鼠, 体重

180 ~200 g 颈背部 sc *D*-半乳糖 100 mg·kg<sup>-1</sup>, 1 次/d, 连续 42 d, 造成大鼠衰老模型, 正常对照组颈背部 sc 生理盐水。在造模的同时, 模型给药组分别 ig 相应剂量的药物, 正常对照组、模型组 ig 生理盐水。42 d 后检测各项指标。

**1.2.2 胸腺、脾脏指数测定** 动物称重后, 颈椎脱臼处死, 无菌条件下剖取胸腺和脾脏称重, 计算指数。

**1.2.3 MTT 法检测淋巴细胞增殖** 无菌制备大鼠脾细胞悬液, RPMI1640 培养液调整细胞密度为  $2 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每鼠设实验孔和对照孔, 均设 3 个复孔。取 100  $\mu\text{L}$  脾细胞悬液加入 96 孔板, 实验孔加入 100  $\mu\text{L}$  含 ConA (T 淋巴细胞增殖反应) 或 LPS (B 淋巴细胞增殖反应) 的 RPMI1640 培养液, 使终浓度为 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对照孔只加等量的 RPMI1640 培养液, 将培养板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 吸弃上清 50  $\mu\text{L}$ , 加入 MTT 溶液 50  $\mu\text{L}$  (终浓度为 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>), 振荡 1 min, 置培养箱中继续孵育 4 h, 吸弃上清, 每孔加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 振荡 30 s, 酶标仪于 490 nm 波长处读取吸光值 (*A*), 并计算刺激指数 SI,  $SI = (\text{实验孔 } A - \text{对照孔 } A) / \text{对照孔 } A$ 。

**1.2.4 细胞因子 TGF- $\beta$  和 IFN- $\gamma$  含量检测** 眼球后静脉丛取血, 静置后离心取血清, ELISA 法测定。

**1.2.5 统计学方法** 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS11.5 软件进行数据分析, 采用 *t* 检验或单因素方差分析, 组间两两比较采用 *q* 检验。

### 2 结果

**2.1 大鼠一般状态** 正常组大鼠精神和一般状态良好。模型组大鼠体重明显下降、消瘦; 倦怠、嗜卧;

[收稿日期] 2009-10-26

[基金项目] 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ08411)

[通讯作者] \* 吴正平, Tel: (0795) 3205522; Email: wzp\_yy@

163.com

大便溏泻, 肛周有污物; 大鼠蜷缩、聚堆; 食欲明显下降; 毛色干枯。其余治疗组大鼠上述表现较模型组有良性逆转。四君子汤高剂量组大鼠一般状态基本如常, 中、低剂量组大鼠毛色较暗, 反应略显迟缓, 摄食尚可, 部分大便稀。

**2.2 四君子汤对大鼠脾脏、胸腺指数的影响** 四君子汤 3 个剂量组均可使大鼠胸腺指数明显升高, 中、高剂量组可升高脾脏指数 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 其中高剂量组胸腺指数和脾脏指数均明显高于低剂量组(分别  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 四君子汤对衰老大鼠胸腺指数和脾脏指数的影响 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺指数	脾脏指数
正常	—	1.742 $\pm$ 0.179 <sup>2)</sup>	1.953 $\pm$ 0.164 <sup>2)</sup>
模型	—	1.330 $\pm$ 0.214	1.696 $\pm$ 0.211
四君子汤	4.0	1.498 $\pm$ 0.246 <sup>1)</sup>	1.717 $\pm$ 0.235
	6.0	1.625 $\pm$ 0.219 <sup>2)</sup>	1.838 $\pm$ 0.190 <sup>1)</sup>
	8.0	1.755 $\pm$ 0.285 <sup>2,3)</sup>	1.940 $\pm$ 0.265 <sup>2,4)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与低剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (下同)。

**2.3 四君子汤对大鼠淋巴细胞增殖的影响** 与正常组比较, 模型组脾 T、B 淋巴细胞刺激指数均显著降低 ( $P < 0.01$ )。3 个治疗组与模型组相比, 脾 T、B 淋巴细胞刺激指数均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 其中高剂量组脾 T、B 淋巴细胞刺激指数显著高于中、低剂量组 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 四君子汤对衰老大鼠 T、B 淋巴细胞增殖刺激指数 (SI) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	T 淋巴细胞	B 淋巴细胞
正常	—	2.594 $\pm$ 0.264 <sup>2)</sup>	3.403 $\pm$ 0.270 <sup>2)</sup>
模型	—	1.354 $\pm$ 0.221	1.576 $\pm$ 0.283
四君子汤	4.0	1.760 $\pm$ 0.225 <sup>2)</sup>	3.081 $\pm$ 0.217 <sup>2)</sup>
	6.0	1.888 $\pm$ 0.237 <sup>2,4)</sup>	3.075 $\pm$ 0.213 <sup>2,4)</sup>
	8.0	2.090 $\pm$ 0.207 <sup>2)</sup>	3.320 $\pm$ 0.257 <sup>2)</sup>

**2.4 四君子汤对大鼠 TGF- $\beta$  和 IFN- $\gamma$  含量的影响** 模型组 TGF- $\beta$  含量与正常组相比显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 高剂量组明显降低 ( $P < 0.05$ )。模型组与正常组比 IFN- $\gamma$  明显降低, ( $P < 0.01$ ) 四君子汤 3 剂量组 IFN- $\gamma$  含量均显著高于模型组 ( $P < 0.01$ ), 但 3 组之间无差异。见表 3。

### 3 讨论

在现代医学众多衰老的学说中, 衰老的免疫学理论占有重要地位。本实验研究结果表明, D-半乳

表 3 四君子汤对衰老大鼠 TGF- $\beta$  和 IFN- $\gamma$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TGF- $\beta$ / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	IFN- $\gamma$ / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常	—	8.493 $\pm$ 1.085 <sup>2)</sup>	57.45 $\pm$ 11.04 <sup>2)</sup>
模型	—	11.231 $\pm$ 1.350	41.53 $\pm$ 10.62
四君子汤	4.0	11.053 $\pm$ 1.466	53.55 $\pm$ 11.08 <sup>2)</sup>
	6.0	10.844 $\pm$ 1.622	55.81 $\pm$ 10.79 <sup>2)</sup>
	8.0	10.303 $\pm$ 1.127 <sup>1)</sup>	54.38 $\pm$ 11.01 <sup>2)</sup>

糖所致亚急性衰老大鼠与正常大鼠比较, 脾脏、胸腺指数明显降低, T、B 淋巴细胞增殖活性下降, TGF- $\beta$  含量升高而 IFN- $\gamma$  含量下降, 证明造模成功。在衰老过程中, 中枢免疫器官胸腺不断萎缩, 胸腺细胞发育受到阻碍, 导致衰老个体 T 细胞活化受限, 对抗原刺激的反应性减弱, 抑制性细胞因子增多, 对细胞具活化作用的细胞因子含量减少, 并可能影响到 B 细胞活化, 影响到体液免疫功能, 当免疫功能生理性衰退发展到一定程度, 机体就会出现病理性衰老。

中医认为脾虚证为衰老的主要原因/机制<sup>[5]</sup>。四君子汤(《太平惠民和剂局方》)功能益气健脾, 主治脾胃气虚, 为补气的基本方。方中以人参为君甘温大补元气, 健脾养胃。以白术为臣, 苦温健脾燥湿。佐以茯苓, 甘淡渗湿健脾; 苓、术合用, 健脾除湿之功更强, 促其运化。使以炙甘草, 甘温调中。全方配合, 共奏益气健脾之功。实验表明, 四君子汤可影响 D-半乳糖所致亚急性衰老大鼠的多项免疫指标, 明显提高其脾脏、胸腺指数、及 T、B 淋巴细胞增殖能力, 降低抑制性细胞因子 TGF- $\beta$  含量并使 IFN- $\gamma$  含量升高, 从增强衰老大鼠免疫功能方面发挥了延缓衰老的功效。

### [参考文献]

- [1] 闫润红, 李瑞. 试论肾虚与衰老[J]. 山西中医学院学报, 2006, 17(5): 8.
- [2] 邱泽计, 李献平, 王旭丹, 等. 补肾法对老龄大鼠脾脏免疫细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(2): 46.
- [3] 史进方, 顾国浩. 免疫衰老及其免疫学预警指标[J]. 现代免疫学, 2005, 25(4): 347.
- [4] Brink T C, Regenbrecht C, Demetrius L, et al. Activation of the immune response is a key feature of aging in mice[J]. Biogerontology, 2009, 10(6): 721.
- [5] 汪运富. 脾虚致衰老浅探[J]. 辽宁中医杂志, 2001, 28(5): 265.

[责任编辑 何伟]