

养血调肝方对初老雌性大鼠神经内分泌免疫影响的实验研究

袁 静, 陈全珠, 侯正明, 刘先华, 章复清
(安徽中医学院, 安徽 合肥 230038)

摘要: 目的: 探讨养血调肝方对初老雌性大鼠神经内分泌免疫方面的影响。方法: 选用自然衰老雌性大鼠, 观察给予养血调肝方后用放射免疫分析法检测血浆促肾上腺皮质激素 (ACTH), β -内啡肽 (β -END), 血清雌二醇 (E_2), 睾酮 (T), 促卵泡激素 (FSH), 三碘甲状腺原氨酸 (T_3) 甲状腺素 (T_4) 促甲状腺素 (TSH) 白细胞介素-II (IL-2), 肿瘤坏死因子 (TNF) 的含量, 并观察肾上腺、卵巢和胸腺脏器指数的变化。结果: 与初老对照组比, 养血调肝方组的上述指标均有明显改善, 且与六味地黄汤组比无显著差异。结论: 养血调肝方具有调节神经、内分泌、免疫的作用。

关键词: 养血调肝方; 初老期; 雌性大鼠; 神经内分泌免疫

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)06-0034-03

Experimental Research of Yangxue Tiaogan Fang on Neuroendocrino-Immunological Effect of First Aging Female Rats

YUAN Jing, CHEN Quan-zhu, HOU Zheng-ming, LIU Xian-hua, ZHANG Fu-qing
(Anhui College of TCM, Hefei 230038, China)

Abstract: AIM: To study the effect of Yangxue Tiaogan Fang (YXTGF) on neuroendocrino-Immunological in first aging female rats. METHODS: In the first aging female rats with YXTGF and the same aged control, the following determinations, including adrenocorticotropine (ACTH), β -endorphin (β -END), estradiol (E_2), testosterone (T), follicle stimulating hormone (FSH), triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), thyroid stimulating hormone (TSH), interleukin-II (IL-2), tumour necrosis factor (TNF) in the blood, were carried out by radioimmunoassay and the weight indexes of adrenal, ovary and thymus were examined. RESULTS: The indexes of YXTGF group were improved respectively, and there was no significant difference between YXTGF group and Liuwei Dihuang Tang (Positive drug) group. CONCLUSION: It is suggested that YXTGF may regulate neuroendocrino-Immunological function.

Key words: Yangxue Tiaogan Fang; first aging; female rat; neuroendocrino-Immunological effect

神经内分泌免疫调节网络在机体衰老发生和发展的过程中具有重要的作用。我们以往的研究证

实, 养血调肝方对雌性小鼠具有一定的延寿及抗自由基等作用。本实验进一步观察了该方对初老雌性大鼠神经内分泌免疫系统的影响, 并对其机理进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雌性 Wistar 大鼠, 15 月龄 30

收稿日期: 2003-12-09

基金项目: 安徽省重点科研项目 (00022033) 及安徽省教委自然科学基金项目 (99-122)。

通讯作者: 袁静, Tel: (0551) 5169003

只; 3 月龄 10 只, 由安徽医科大学实验动物中心提供 (合格证号: 皖医实动准第 01 号)。

1.2 药物及试剂 养血调肝方由当归、白芍、熟地等药组成; 阳性对照药六味地黄汤按古方药味和剂量组方。全部中药由安徽中医学院附属医院中药房提供。

FSH 放免试剂盒由天津 DPC 公司提供; T₃、T₄、TSH、T、E₂、IL-2、TNF 均有北京华英生物技术研究所提供; ACTH、β-END 放免试剂盒由第二军医大学神经生物学教研室提供。

1.3 实验仪器 GC-911 r 放射免疫计数器为中佳光电科大创新股份有限公司中佳分公司。

1.4 实验方法 将 15 月龄初老大鼠分成三组: 初老对照组, 六味地黄汤组和养血调肝方组。3 月龄大鼠作为青龄对照组。其中给药组是将中药汤剂拌入饲料喂养, 六味地黄汤组以 7g/kg, 养血调肝方组以 7.5g/kg 的剂量, 均相当于人用量的 6 倍。两个对照组用同体积的自来水拌入饲料喂养。连续给药 33d, 饲养在自然室温 20~26℃环境中。

1.5 指标检测 末次给药 1h 后, 在尽可能安静的情况下, 迅速断头, 取躯干血, 分别按试剂盒要求取样, ACTH、β-END 为血浆含量, FSH、T₃、T₄、TSH、T、E₂、IL-2、TNF 均为血清含量, -20℃保存, 按试剂盒说明书操作。另, 摘取大鼠肾上腺、胸腺和卵巢, 在相同条件下取湿重。

1.6 统计方法 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间显著性差异采用两样本均数比较的 *t* 检验。

2 结果

2.1 养血调肝方对初老雌性大鼠垂体肽类物质的影响 初老对照组大鼠外周血浆 ACTH 和 β-END 含量显著低于青龄对照组。与初老对照组比较, 六味地黄汤和养血调肝方组 ACTH 和 β-END 含量显著增高, 且两给药组比较, 无显著性差异, 见表 1。

表 1 各组大鼠血浆 ACTH 和 β-END 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	ACTH (pg/mL)	β-END (pg/mL)
青龄对照	—	323.59 ± 40.45 ²⁾	342.45 ± 106.14 ²⁾
初老对照	—	168.25 ± 38.43	128.12 ± 76.97
六味地黄	7.0	282.36 ± 58.67 ²⁾	186.28 ± 111.80 ¹⁾
养血调肝	7.5	290.47 ± 63.72 ²⁾	192.63 ± 94.09 ¹⁾

注: 与初老对照组比¹⁾ *P* < 0.05; ²⁾ *P* < 0.01; 与六味地黄组比³⁾ *P* < 0.05。下同。

2.2 养血调肝方对初老雌性大鼠垂体-性腺轴的影响 初老对照组血清 E₂ 含量显著低于青龄对照组; FSH 含量显著高于青龄对照组; T 含量无明显变化。与初老对照组比, 六味地黄汤和养血调肝方组 E₂ 含量显著增高; FSH 含量显著降低, 且两给药组无显著差异; T 含量无明显变化, 见表 2。

表 2 各组大鼠血清 E₂、T、FSH 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	E ₂ (pg/mL)	T (ng/mL)	FSH (mlu/mL)
青龄对照	—	21.81 ± 6.17 ²⁾	29.98 ± 6.44	1.51 ± 0.45 ²⁾
初老对照	—	13.69 ± 3.23	27.01 ± 2.89	2.83 ± 0.86
六味地黄	7.0	23.84 ± 6.32 ²⁾	29.05 ± 6.41	1.86 ± 0.54 ¹⁾
养血调肝	7.5	21.86 ± 4.10 ²⁾	28.89 ± 5.42	1.47 ± 0.43 ¹⁾

2.3 养血调肝方对初老雌性大鼠垂体-甲状腺轴的影响 初老对照组大鼠血清 T₃ 含量显著低于青龄对照组; TSH 含量高于青龄对照组, 而 T₄ 含量无明显变化。与初老对照组比, 六味地黄汤和养血调肝方组 T₃ 含量显著增高, TSH 含量显著降低, 且两给药组比较无显著差异, T₄ 含量亦无明显变化, 见表 3。

表 3 各组大鼠血清 T₃、T₄、TSH 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	T ₃ (ng/mL)	T ₄ (ng/mL)	TSH (uIU/mL)
青龄对照	—	0.86 ± 0.12 ¹⁾	27.59 ± 5.12	2.30 ± 0.21 ²⁾
初老对照	—	0.65 ± 0.09	25.05 ± 4.61	3.95 ± 0.50
六味地黄	7.0	0.91 ± 0.24 ²⁾	24.78 ± 3.56	2.16 ± 0.41 ²⁾
养血调肝	7.5	0.92 ± 0.11 ²⁾	26.75 ± 4.89	2.31 ± 0.19 ²⁾

2.4 养血调肝方对初老雌性大鼠免疫系统的影响 初老对照组血清 IL-2 和 TNF 含量显著低于青龄对照组。与初老对照组比, 六味地黄汤和养血调肝方组 IL-2 和 TNF 含量显著增加, 且两给药组无明显差异, 见表 4。

表 4 各组大鼠血清 IL-2、TNF 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	IL-2 (ng/mL)	TNF (ng/mL)
青龄对照	—	5.43 ± 0.97 ¹⁾	3.36 ± 0.89 ²⁾
初老对照	—	3.91 ± 0.45	1.74 ± 0.37
六味地黄	7.0	5.27 ± 0.89 ¹⁾	3.19 ± 1.01 ¹⁾
养血调肝	7.5	5.46 ± 1.25 ¹⁾	3.25 ± 0.98 ¹⁾

2.5 养血调肝方对初老雌性大鼠脏器指数的影响 初老对照组的肾上腺、卵巢、胸腺指数显著低于青龄对照组; 与初老对照组比, 六味地黄汤和养血调肝

方组肾上腺指数显著增加; 卵巢指数养血调肝方组显著增加, 六味地黄汤组增加但无显著性, 两给药组比有显著差异; 胸腺指数养血调肝方组显著增加, 六味地黄汤组增加亦无显著性, 两给药组未见显著差异, 见表 5。

表 5 各组大鼠肾上腺、卵巢、胸腺指数的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	肾上腺 (mg/100g)	卵巢 (mg/100g)	胸腺 (mg/100g)
青龄对照	—	26.24 ± 2.61 ²⁾	57.40 ± 11.37 ¹⁾	297.86 ± 38.91 ²⁾
初老对照	—	15.80 ± 3.22	45.51 ± 7.72	250.90 ± 25.41
六味地黄	7.0	21.05 ± 3.45 ²⁾	47.20 ± 8.31	278.45 ± 41.35
养血调肝	7.5	24.03 ± 6.04 ²⁾	60.14 ± 11.00 ^{1,3)}	287.78 ± 44.69 ¹⁾

3 讨论

本课题着重研讨雌性初老阶段的延缓衰老措施。考虑到本地区大鼠的实际寿命和生育年限, 选用 15 月龄作为雌性大鼠自然初老模型, 实验结果表明这一时期大鼠的神经内分泌免疫功能方面存在着一定的紊乱, 说明选用此阶段大鼠作为模型是可行的。

ACTH 和 β -END 是垂体肽类物质, 也是神经内分泌系统与免疫系统共有的生物活性物质。ACTH 在下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能调节中起重要作用。当 ACTH 分泌增加时, 肾上腺皮质的功能活动增强, 即肾上腺皮质增生, 合成和分泌皮质类固醇, 促进肾上腺素、生长激素合成, 并出现肥大和重量增加; 反之则肾上腺的功能活动减弱, 并出现萎缩和重量减轻。养血调肝方能够增加初老大鼠肾上腺重量, 粗略地说明其可以促进肾上腺皮质功能。血浆 ACTH 含量测定也证明了此点。 β -END 在所有参与调节性腺激素分泌的阿片类肽中是最重要的一种, 它可通过多种途径影响促性腺激素释放激素 (GnRH) 神经元的活动^[1,3]。众所周知, 在衰老过程中, 内分泌系统的老化表现最为突出, 而性激素分泌的减少又是其中最早最突出的变化之一。本实验雌鼠初老期虽然 T 无明显变化, 但由于 E₂ 分泌的减少, 解除了其对垂体的负反馈, 从而导致了 FSH 水平的升高; 性腺的重量减轻, 也是由于性激素的降低而影响其生长发育所致。养血调肝方可以通过提高 E₂ 分泌量, 反馈地抑制 FSH 的释放, 这与其它的养血调肝方药的疗效报道基本一致^[4]; 并且该方提高了血浆 β -END 含量, 有专家认为下丘脑弓状核 β -

END 神经元内有 ER 存在, 成为雌激素在下丘脑的靶细胞之一, 以致在雌激素对 GnRH 进行反馈调节中, β -END 起主要作用^[5]。机体衰老时, 垂体-甲状腺轴也出现功能减退, 由于 T₃、T₄ 水平下降, 反馈性地引起垂体 TSH 的增加, 本实验 T₄ 无明显差别, 可能与其降解速率减慢有关。养血调肝方可以使初老雌性大鼠异常的 T₃、TSH 水平恢复正常。另, 随增龄而来的胸腺萎缩必然会导致 T 细胞因子减少, IL-2 是 T 细胞分泌的主要因子, 它可和 T 细胞、B 细胞等细胞表面的 IL-2R 结合, 引起这些细胞的增殖分化, 同时增强 NK 细胞、单核细胞杀伤活性。TNF 是由单核巨噬细胞和活化的 T 细胞产生的一种重要的细胞因子, 其生物活性较为复杂, 除了参与抗感染、凝血、发热多功能衰竭等多种病理生理过程, 还对白细胞、内皮细胞等多种细胞的功能及细胞的生长与分化有激素样作用, 同时对肿瘤坏死退化产生积极作用。由此, IL-2 和 TNF 在免疫应答、免疫调节和抗肿瘤免疫中具有重要作用。初老雌性大鼠的 IL-2 和 TNF 含量降低, 提示其免疫功能尤其是免疫监视及防御功能降低, 经服用养血调肝方后, 上述指标明显回升, 说明该方能提高机体的免疫功能。

综上所述, 调节、干预神经内分泌免疫网络的变化是养血调肝方延缓初老雌性大鼠机体衰老发生和发展的主要机理之一。

参考文献:

[1] Contijoch AM, Malamed S, Sarkear DK, et al. β -endorphin regulation of LHRH release at the median eminence level, immunocytochemical and physiological evidence in hens [J]. Neuroendocrinology, 1993, 57(2): 365-373.

[2] Khan IA, Thomas P. GABA stimulatory and inhibitory influence on gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) [J]. Neuroendocrinology, 1999, 69(4): 261-268.

[3] Sagrillo CA, Grattan DR, McCarthy MM, et al. Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH [J]. Behave Genet, 1996, 26(3): 241-277.

[4] 夏桂成. 实用妇科方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 162.

[5] Gruenewald DA, Masumoto AM. Age-regulated decrease in proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the arcuate nucleus (ARC) of the female rat [J]. Proc Soc Neurosci Mtg, 1993, 15: 343-351.