

补肾法对老龄大鼠脾脏免疫细胞功能的影响

邱泽计, 李献平, 王旭丹

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

摘要: 实验根据中医补肾为延缓衰老的治则, 探讨并对比补肾阴代表方药六味地黄汤、补肾阳代表方药金匮肾气汤对老龄大鼠免疫细胞功能的影响。以自然衰老大鼠为受试对象, 长期给药后, 检测大鼠脾脏免疫细胞功能的变化。结果表明, 六味地黄汤和金匮肾气汤, 可以明显改善自然衰老机体状态; 显著提高 ConA 诱导的 T 淋巴细胞的增殖能力和 MΦ 的吞噬能力; 对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应, 六味地黄汤具有明显的促进作用, 而金匮肾气汤则是明显抑制和降低。提示补肾阴和补肾阳方药可以提高免疫功能, 延缓衰老, 但在影响 B 淋巴细胞功能上存在差异, 在作用机理上还有待于进一步探讨。

关键词: 衰老; 补肾; 六味地黄汤; 金匮肾气汤; 免疫细胞

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)02-0046-02

现代生命科学已证明免疫功能衰退是衰老的最明显的特征之一^[1,2], 而在各种中医衰老学说中肾虚占有重要的地位^[3,4]。补肾阴方药六味地黄汤^[5]及补肾阳方药金匮肾气汤^[5]均为延缓衰老的名方, 国内外对这两方药及拆方研究很多, 但少见补肾阴和补肾阳抗衰老对比研究。本实验根据补肾为中医延缓衰老的主要治则^[3], 初步探讨并对比六味地黄汤和金匮肾气汤对自然衰老机体免疫功能的影响。

1 材料及方法

1.1 实验动物 7 月龄 Wistar ♂大鼠, 体重 420~540g, 由中医药大学动物室提供。

1.2 药物 六味地黄汤(1.25g/100g 体重)按《小儿药证直诀》、金匮肾气汤(1.25g/100g 体重)按《金匮要略》成方为准, 制成汤剂并浓缩为 2g/ml, 置 4℃冰箱备用。由本校方药系提供。

1.3 主要试剂及仪器 ①试剂: RPMI1640 为 GIBCO 产品; 小牛血清、青霉素(100μ/ml)、链霉素(100μ/ml)、PBS、ConA、LPS、SDS 为 Sigma 产品; MTT(噻唑兰)为 Bebcos 产品; 0.075% 中性红溶液、Tris 缓冲氯化铵溶 RBC 液、MΦ 溶解液由本室提供。②仪器: 超净工作台, 北京半导体设备一厂、低温离心机, HITACHI SCR20BA 型, 日本产、CO₂ 培养箱, BINDER, CB150 型, 德国产、酶标测定仪, BIO-RAD, 500 型, 美国产。

1.4 动物分组 将 7 月龄大鼠随机分为六味地黄组、金匮肾气组和老年对照组, 各组大鼠体重均值为

512±13g。购进大鼠 1 个月后开始持续灌胃 5 个月, 给药时, 以室温(20±2℃)为准。

1.5 免疫学方法

1.5.1 脾脏 T、B 淋巴细胞增殖能力的测定 采用 MTT 法测定^[6] 将上述大鼠断头处死, 无菌摘取脾脏, 常规制备脾细胞悬液, 用完全 RPMI1640 培养基调节细胞浓度至 5×10⁶/ml, 加至两块 96 孔板中, 100μ/孔。一块再加入 ConA 溶液 100μ/孔(终浓度 5μg/ml), 测 T 淋巴细胞增殖反应; 另一块再加入 LPS 溶液 100μ/孔(终浓度 10μg/ml), 测 B 淋巴细胞增殖反应。两板均置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 68h, 各孔吸出 100μ 上清, 加入 MTT 10μ/孔(终浓度 0.5mg/ml), 继续孵育 4h, 加入 0.01NHCL-10% SDS 100μ 孔, 振荡, 37℃过夜, 次日酶标仪 530nm 下测定各孔 A 值。

1.5.2 脾脏 MΦ 吞噬功能的测定 采用中性红比色法^[7] 将上述大鼠断头处死, 无菌摘取脾脏, 常规制备脾细胞悬液, 用完全 RPMI1640 培养基调节细胞浓度至 5×10⁶/ml, 加至 96 孔板中, 200μ/孔, 置 5% CO₂ 培养 4h, 去上清, 用温 PBS 洗 1 遍, 加入 0.075% 中性红溶液 200μ/孔, 继续孵育 30min, 弃去上清, 以温 PBS 洗 2 次, 加入 MΦ 溶解液(50% 无水乙醇+50% 0.1M 醋酸) 200μ/孔, 置 4℃冰箱过夜, 次日置酶标仪 530nm 下测定各孔 A 值。

2 结果

2.1 大鼠体重变化及一般状态 本实验持续给药 5 个月, 老年对照组大鼠毛发逐渐变黄, 有脱毛现象, 其中一只患有眼疾; 六味地黄组毛发光泽变化不大

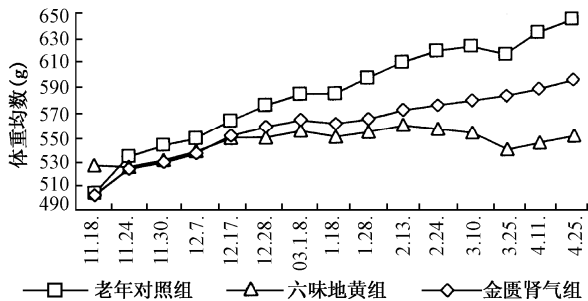
但松散,消瘦;金匱肾气组毛色及精神状态好于六味地黄组。体重增量上,金匱肾气组和六味地黄组与老年对照组均有非常显著的差异,两个方药组间也有显著性差异。老年对照组、六味地黄组在一次室温达到 28℃时(见表 2-3.25.),大鼠体重明显下降,行动迟缓,老年对照组一只大鼠死亡。但金匱肾气组大鼠体重及状态受高温影响较小。见表 1 2。

表 1 各组大鼠实验前后体重差对比

	n	灌胃药量 ml/100g 体重	$\bar{x} \pm s$
老年对照组	9		124.6 ± 24.6
六味地黄组	9	0.62	24.0 ± 28.4 [#]
金匱肾气组	10	0.62	76.6 ± 35.6 ^{#*}

注:与老年组比较[#] P < 0.01, [#] P < 0.001, 方药组间比较^{*} P < 0.01

表 2 大鼠体重均数变化



2.2 补肾药物对脾脏 T 细胞增殖能力的影响 六味地黄组、金匱肾气组老龄大鼠脾脏 T 细胞增殖能力均有显著性的提高,金匱肾气组稍好于六味地黄组,但两者无显著性差异。见表 3。

2.3 补肾药物对脾脏 B 细胞增殖能力的影响 六味地黄组 B 细胞增殖能力高于老年对照组,具有显著性差异。金匱肾气组则显著性低于老年对照组及六味地黄组,两方药组显著性差异最大。见表 3。

2.4 补肾药物对脾脏 MΦ 吞噬功能的影响 六味地黄组、金匱肾气组老龄大鼠 MΦ 吞噬能力均有显著性的提高,两个方药组间无显著性差异。见表 3。

表 3 补肾药物对老龄大鼠脾脏免疫细胞功能的影响

组别	T 细胞增殖能力 ConA(5μg/ml)	B 细胞增殖能力 LPS(10μg/ml)	MΦ 吞噬能力 0.075% 中性红
老年对照 n = 9	0.3157 ± 0.0359	0.1971 ± 0.0193	0.1251 ± 0.0083
六味地黄 n = 9	0.3468 ± 0.0214 [*]	0.2158 ± 0.0171 [*]	0.1333 ± 0.0072 [*]
金匱肾气 n = 10	0.3512 ± 0.0230 [*]	0.1760 ± 0.0153 ^{*△}	0.1335 ± 0.0075 [*]

注:与老年组比较^{*} P < 0.05, 方药组间比较[△] P < 0.001

3 讨论

现有文献报道^[3,8],随增龄衰老的人及实验动物

表现出免疫组织结构的变化和功能紊乱,免疫细胞功能下降,细胞免疫、体液免疫减弱。同时大量的实验研究表明^[2],中医补肾方药可以改善衰老机体免疫系统,提高免疫细胞的功能,延缓衰老。本实验采用大鼠自然衰老模型。所用六味地黄汤出自《小儿药证直诀》,滋补肝肾,治肝肾阴虚,滋阴降火;金匱肾气汤出自《金匱要略》,温补肾阳,治肾阳不足。

根据观察,老年对照组大鼠具有毛色变黄、脱毛、肥胖等衰老体征。长期灌服补肾方药可以明显改善自然衰老机体的状态,对环境因素(如高温)的影响,金匱肾气汤较六味地黄汤对衰老机体有更好的稳定作用;在控制体重的增加上,两个方药均有显著性作用,而六味地黄汤作用更强,这可能与方中的三泄药(茯苓、泽泻、丹皮)作用有关。大量实验表明,伴随增龄机体免疫以 T 淋巴细胞功能低下最为显著^[8],金匱肾气汤和六味地黄汤均能显著提高 ConA 所诱导的 T 淋巴细胞增殖,但两者未见显著性意义。对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖,六味地黄汤具有显著增强作用,而金匱肾气汤为显著性抑制和降低,这是否说明两种方药对 B 淋巴细胞所介导的体液免疫的影响存在差异,有待于实验进一步证明。对老龄大鼠脾脏 MΦ 的吞噬能力,两种方药增强作用显著且接近。实验统计结果说明,六味地黄汤、金匱肾气汤均可以增强免疫细胞的活力,但在作用机理上存在差异。

参考文献:

- [1] 周金黄. 衰老·抗衰老·老年医学[M]. 中国科学技术出版社, 1993. 54, 181.
- [2] 刘俊达. 衰老的免疫功能变化及抗衰老药物的研究. 中国药理学杂志[J]. 1994, (7): 387, 388.
- [3] 陈可冀. 抗衰老中药学[M]. 中医古籍出版社, 1989. 18, 57.
- [4] 林永淼, 周如倩. 中医论衰老机理[J]. 上海中医药杂志, 1994, (12): 14.
- [5] 李经纬, 邓铁涛, 蔡景峰, 等. 中医大辞典[M]. 人民卫生出版社, 1995. 326, 906.
- [6] 彭桂英, 顾立刚, 王庆国, 等. 肝郁脾虚因素刺激对 DEN 诱发肝癌大鼠免疫功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 11(6): 35.
- [7] 闻平, 何艳, 叶庆林, 等. 中性红比色法检测细胞增殖活性, 镇江医学院学报[J]. 2000, 10(1): 161.
- [8] 王传社, 李顺成. 补肾阴与补肾阳法延缓衰老的对比研究[J]. 北京医科大学学报, 1997, (6): 559.