

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.14.016

含红芪和含黄芪的益气养血汤含药血清对 SAMP8 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的影响对比分析

李伟¹, 程卫东^{2,*}, 张文君³, 孙美花², 徐静汶³, 张培⁴

(1. 甘肃中医药大学中西医结合学院, 甘肃省兰州市城关区定西东路 35 号, 730000; 2. 南方医科大学中医药学院; 3. 兰州大学基础医学院; 4. 兰州大学药学院)

[摘要] **目的** 探讨含红芪和含黄芪的益气养血汤抗免疫衰老的可能作用机制并比较两者的作用效果。 **方法** 30 只青龄昆明种小鼠随机分成红芪益气养血汤组、黄芪益气养血汤组、空白组, 每组 10 只, 红芪益气养血汤组及黄芪益气养血汤组分别给予相应生药 6 g/(kg·d), 灌胃量为 0.4 ml/(20 g·d), 空白组灌胃相同体积生理盐水, 连续灌胃 14 天, 末次灌胃 2 h 后眼球摘除取血, 制备益气养血汤含药血清和空白血清。调整 SAMP8 小鼠脾脏 T 淋巴细胞浓度为所需浓度, 分为红芪益气养血汤组 (含药血清)、黄芪益气养血汤组 (含药血清)、空白血清组 (空白血清)、青龄鼠组 (完全培养液)、SAMP8 组 (完全培养液)。培养 72 h 后, 检测各组细胞增殖能力, T 淋巴细胞表面分子包括 CD8⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD28⁺ CD152⁺ 表达情况, 以及细胞培养上清液中白细胞介素 2 (IL-2) 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 水平和细胞中 PI-3K mRNA 表达、 β -半乳糖苷酶染色细胞阳性率。 **结果** 与青龄鼠组比较, SAMP8 组小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力、细胞表面 CD8⁺ 分子表达、培养上清液 IL-2 和 IFN- γ 水平、细胞中 PI3K mRNA 表达明显降低, CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD28⁺ CD152⁺ 双阳性表达及 β -半乳糖苷酶衰老细胞阳性率均明显升高 ($P < 0.05$)。与空白血清组比较, 红芪益气养血汤组和黄芪益气养血汤组均能提高 T 淋巴细胞的增殖能力、培养上清液中 IL-2 和 INF- γ 水平和细胞中 PI3K mRNA 表达, 减少 β -半乳糖苷酶染色细胞阳性率 ($P < 0.05$), 并且在改善细胞增殖能力、提高 IL-2 水平及 PI3K mRNA 表达方面红芪益气养血汤组优于黄芪益气养血汤组 ($P < 0.05$)。 **结论** 含红芪和含黄芪的益气养血汤含药血清均能增强 SAMP8 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的体外增殖能力, 可能通过促进 IL-2 及 IFN- γ 分泌、上调 PI3K mRNA 表达量、降低 β -半乳糖苷酶表达, 从而改善 T 淋巴细胞的免疫衰老状态, 并且含红芪的益气养血汤作用效果优于含黄芪的益气养血汤。

[关键词] 免疫衰老; 益气养血汤; 红芪; 黄芪; T 淋巴细胞; 细胞增殖

红芪与黄芪同属于豆科植物的不同种属, 均具有扶正固本、补中益气之效, 且在调节免疫、抗衰老等方面被证实有相似效果^[1]。有研究显示, 对于免疫缺陷的小鼠在促进 T 细胞增殖和白细胞介素 2 (IL-2) 的分泌方面红芪优于黄芪^[2], 而含红芪与黄芪的复方含药血清对抗自然衰老小鼠脾脏淋巴细胞氧化损伤方面具有一定的相似性^[3]。益气养血汤为补益气血之方, 出自《中华人民共和国药典 (一部)》^[4], 用于治疗气血不足所致的气

短、心悸、面色不华、体虚乏力。前期研究显示, 含红芪和含黄芪的益气养血汤对衰老小鼠具有抗氧化损伤及抗衰老作用^[5]。为进一步研究红芪、黄芪在复方中抗免疫衰老作用的差异, 探讨相关作用机制, 本实验分别选用含黄芪和含红芪的益气养血汤含药血清作用于 SAMP8 小鼠脾 T 淋巴细胞, 比较二者的异同。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级昆明种青龄小鼠 30 只, 雌雄各半, 20 ~ 25 g, 8 周龄, 由兰州大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (甘) 2013-0002; SPF 级 SAMP8 小鼠, 雄性, 25 ~ 30 g, 5 ~ 6 月龄, 由北京

基金项目: 国家自然科学基金 (81373806); 甘肃省中医药科学技术研究课题 (GZK-2012-43); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (223000-862107)

* 通讯作者: chengweidong888@sina.com

华阜康生物科技股份有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2014-0004。

1.2 实验药物

益气养血汤组成: 黄芪/红芪 83.4 g, 党参 75 g, 人参 8.3 g, 当归 33.3 g, 麸炒白术 33.3 g, 熟地黄 33.3 g, 制何首乌 30 g, 五味子 25 g, 陈皮 33.3 g, 地骨皮 25 g, 鹿茸 1.7 g, 淫羊藿 50 g。将药物在清水中浸泡 0.5~1 h, 煎取 2 次, 第 1 次为 1 h, 第 2 次为 0.5 h, 混合两次药液, 浓缩过滤至每毫升含 1 g 生药, 冷藏备用。

1.3 主要试剂

改良型 RPMI-1640 培养基 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司, 批号 NAH1461); 胎牛血清 (美国海克隆公司, 批号 0908162); 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司, 批号 20140102418); 刀豆蛋白 (ConA, 美国 Sigma 公司, 批号 201405162161); EZ-Sep 淋巴细胞分离液 (深圳达科为生物技术有限公司, 批号 33R021406); PE-抗小鼠 CD3 (批号 B180419)、FITC-抗小鼠 CD4 (批号 B179194)、Percp/cy5.5-抗小鼠 CD8 (批号 B182145)、FITC-抗小鼠 CD3 (批号 B184712)、PE-抗小鼠 CD28 (批号 B183389)、APC-抗小鼠 CD152 (批号 B185445) 均为美国 Biolegend 公司产品; IL-2 (批号 E2020-1506)、 γ 干扰素 (IFN- γ , 批号 20140801A) ELISA 检测试剂盒均购自深圳达科为生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (上海 Promega 公司, 批号 20130601); 反转录试剂盒 (批号 R211-02)、PCR 扩增试剂盒 (批号 Q111-02) 购自南京诺唯赞公司; β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (碧云天生物技术研究公司, 批号 C0602)。

1.4 主要仪器

倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); CO₂ 培养箱 (日本 Sanyo 公司); TDL-40B 型和 TGL-16G 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); A06061422 超净工作台 (苏净集团安泰公司); 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); FACS Universal Loader 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Lightcycler 480 PCR 仪 (美国 Roche 公司); NanoVue 分光光度计 (美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

30 只青龄昆明种小鼠按照随机数字表法分成红芪益气养血汤组、黄芪益气养血汤组、空白组, 每组 10 只。红芪益气养血汤组及黄芪益气养血

汤组分别给予相应生药 6 g/(kg·d) 灌胃, 灌胃量为 0.4 ml/(20 g·d), 每日 1 次, 空白组灌胃相同体积的生理盐水, 各组连续灌胃 14 天。末次灌胃 2 h 后眼球摘除取血, 收集血清, 56℃ 水浴 30 min 灭活后用 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌分装, -80℃ 保存备用。

2.2 脾脏 T 淋巴细胞悬液的制备

按照 EZ-Sep 小鼠淋巴细胞分离液说明书提取青龄鼠和 SAMP8 鼠脾脏 T 淋巴细胞, 细胞计数后调整浓度为所需。

2.3 含药血清对脾脏 T 淋巴细胞增殖能力的影响

采用 MTT 法检测。红芪益气养血汤组、黄芪益气养血汤组及空白血清组分别以 2.1 中制备的各组血清与 SAMP8 小鼠脾 T 淋巴细胞共培养, 青龄鼠组与 SAMP8 组以完全培养液分别与青龄鼠及 SAMP8 鼠脾 T 淋巴细胞共培养。向 96 孔板中加入浓度为 5×10^6 个/ml 脾 T 淋巴细胞悬液每孔 100 μ l, 血清或完全培养液每孔 100 μ l。每组设 10 个复孔, 其中 5 个复孔加 ConA (浓度为 20 μ g/ml) 诱导增殖, 5 个复孔不加 ConA (自身增殖)。另设只加完全培养液的调零孔 5 个。将 96 孔板放入 CO₂ 培养箱中培养 72 h^[3], 培养结束前 4 h 向各孔中加入 20 μ l MTT (浓度为 5 mg/ml), 继续孵育 4 h。后每孔加入 10% 十二烷基硫酸钠 100 μ l 吹匀, 37℃ 过夜。第 2 天于酶标仪 570 nm 处检测吸光度值 (OD 值), 刺激指数 = ConA 实验孔 OD 值/无 ConA 对照孔 OD 值, 各组 OD 值均减去调零孔 OD 值。重复实验 1 次。

2.4 含药血清对脾脏 T 淋巴细胞表面分子表达的影响

采用流式细胞术检测。红芪益气养血汤组、黄芪益气养血汤组及空白血清组分别以 2.1 中制备的各组血清与 SAMP8 小鼠脾 T 淋巴细胞共培养, 青龄鼠组与 SAMP8 组以完全培养液分别与青龄鼠及 SAMP8 鼠脾淋巴细胞共培养。向 24 孔板中加入细胞浓度为 2×10^7 个/ml 的脾淋巴细胞悬液每孔 500 μ l, 各组血清或完全培养液每孔 500 μ l, 每组设 6 个复孔。将 24 孔板放入 CO₂ 培养箱培养 72 h 后^[3], 分别标记收集于 2 ml 离心管中, 2500 r/min 离心 5 min, 保留培养上清液, -20℃ 保存备用。用 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞沉淀后用 1 ml PBS 重悬, 调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。取各组细胞悬液 200 μ l, 分装到 2 个 1.5 ml 离心管中, 每管

100 μ l (含 1×10^6 个细胞), 其中一管加 PE-抗小鼠 CD3、FITC-抗小鼠 CD4、Percp/cy5.5-抗小鼠 CD8; 另一管加 FITC-抗小鼠 CD3、PE-抗小鼠 CD28、APC-抗小鼠 CD152。4℃, 避光孵育 30 min 后 PBS 洗细胞 1 次, 2500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 500 μ l PBS 重悬细胞, 上流式细胞仪检测。

2.5 培养上清液中 IL-2、IFN- γ 含量检测

收集 2.4 中上清液, 检测培养上清液中 IL-2、IFN- γ 含量, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作。

2.6 脾脏 T 淋巴细胞中 PI3K mRNA 表达量检测

取 2.4 中培养好的细胞 100 μ l, 细胞浓度为 1×10^7 个/ml, 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA。分光光度仪检测 mRNA 浓度及纯度。RNA 溶液的 A260/A280 的比值即为 RNA 纯度, 比值范围在 1.8 ~ 2.1。反转录总反应体系为 20 μ l, 反应条件: 25℃ 5 min, 42℃ 15 min, 85℃ 5 min 后结束反应。取 1 μ l cDNA 在 20 μ l PCR 体系中扩增。反应条件: 预变性 95℃ 5 min; 退火延伸 95℃ 10 s、60℃ 30 s, 共 40 个循环。测出 Δ Ct 值并分析溶解曲线, 以 β -actin 为内参, 用比较 $\Delta\Delta$ Ct 值法计算出 mRNA 的相对表达量: $\Delta\Delta$ Ct = (实验组目的基因 Ct 值 - 实验组内参基因 Ct 值) - (对照组目的基因 Ct 值 - 对照组内参基因 Ct 值)。PCR 所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。PI3K: 上游 5'-AATCAGCCAACAGCACACAG-3', 下游 5'-CGAGACAAGGGTAAGGGAAA-3'; β -actin: 上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

2.7 β -半乳糖苷酶衰老细胞染色

取 2.4 中培养好的各组脾淋巴细胞, 按照细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书操作, 在显微镜下随机选取 10 个视野计算阳性率。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较在检验方差齐性后采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组脾脏 T 淋巴细胞增殖能力比较

表 1 示, 与青龄鼠组比较, SAMP8 组小鼠脾脏 T 淋巴细胞自身增殖、ConA 诱导增殖能力和刺激指数明显下降 ($P < 0.05$); 与空白血清组比较, 红芪益气养血汤组和黄芪益气养血汤组自身增殖和 ConA 诱导增殖能力均有提升 ($P < 0.05$), 且红芪益气养血汤组刺激指数亦明显提高 ($P < 0.05$), 而黄芪益气养血汤组刺激指数与空白血清组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。红芪益气养血汤组在提升 T 淋巴细胞自身增殖及 ConA 诱导增殖方面优于黄芪益气养血汤组 ($P < 0.05$)。

3.2 各组脾脏 T 淋巴细胞表面分子表达比较

表 2 示, 与青龄鼠组比较, SAMP8 组小鼠脾脏 T 淋巴细胞表面 CD8⁺ 分子表达明显降低, CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD28⁺ CD152⁺ 双阳性表达均明显升高 ($P < 0.05$)。与空白血清组比较, 红芪益气养血汤组和黄芪益气养血汤组 CD28⁺ CD152⁺ 双阳性表达明显降低 ($P < 0.05$), 而 CD8⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组脾脏 T 淋巴细胞增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	自身增殖 (OD 值)	刀豆蛋白诱导增殖 (OD 值)	刺激指数
青龄鼠组	10	0.75 $\pm$ 0.043	1.16 $\pm$ 0.026	1.55 $\pm$ 0.087
SAMP8 组	10	0.23 $\pm$ 0.041 [△]	0.26 $\pm$ 0.017 [△]	1.13 $\pm$ 0.181 [△]
空白血清组	10	0.34 $\pm$ 0.007	0.40 $\pm$ 0.014	1.17 $\pm$ 0.036
红芪益气养血汤组	10	0.49 $\pm$ 0.020 ^{*▲}	0.70 $\pm$ 0.136 ^{*▲}	1.42 $\pm$ 0.230 [*]
黄芪益气养血汤组	10	0.43 $\pm$ 0.023 [*]	0.58 $\pm$ 0.075 [*]	1.35 $\pm$ 0.247

注: 与空白血清组比较, * $P < 0.05$; 与青龄鼠组比较, Δ $P < 0.05$; 与黄芪益气养血汤组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$

表 2 各组脾脏 T 淋巴细胞表面分子表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD28 ⁺ CD152 ⁺ (%)
青龄鼠组	6	37.70 $\pm$ 0.96	64.49 $\pm$ 1.36	1.70 $\pm$ 0.55	0.17 $\pm$ 0.05
SAMP8 组	6	21.13 $\pm$ 0.98 [△]	77.08 $\pm$ 4.68 [△]	3.65 $\pm$ 0.29 [△]	2.62 $\pm$ 0.10 [△]
空白血清组	6	22.45 $\pm$ 2.08	75.79 $\pm$ 8.34	3.38 $\pm$ 0.30	0.82 $\pm$ 0.01
红芪益气养血汤组	6	22.95 $\pm$ 1.29	72.76 $\pm$ 6.22	3.19 $\pm$ 0.46	0.48 $\pm$ 0.10 [*]
黄芪益气养血汤组	6	26.07 $\pm$ 0.98	69.84 $\pm$ 6.70	3.00 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.10 [*]

注: 与空白血清组比较, * $P < 0.05$; 与青龄鼠组比较, Δ $P < 0.05$

3.3 各组脾脏 T 淋巴细胞培养上清液中 IL-2、IFN- γ 含量比较

表 3 示, 与青龄鼠组比较, SAMP8 组上清液 IL-2 和 IFN- γ 分泌量明显降低 ($P < 0.05$); 与空白血清组比较, 红芪益气养血汤组和黄芪益气养血汤组培养上清液中 IL-2 和 IFN- γ 含量均明显升高 ($P < 0.05$), 且红芪益气养血汤组 IL-2 含量高于黄芪益气养血汤组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组脾脏 T 淋巴细胞培养上清液中 IL-2、IFN- γ 含量比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-2	IFN- γ
青龄鼠组	10	18.25 $\pm$ 1.09	17.02 $\pm$ 0.76
SAMP8 组	10	4.95 $\pm$ 0.41 $^{\Delta}$	4.10 $\pm$ 0.48 $^{\Delta}$
空白血清组	10	6.30 $\pm$ 0.23	6.11 $\pm$ 0.31
红芪益气养血汤组	10	13.40 $\pm$ 0.30 $^{*\Delta}$	13.69 $\pm$ 1.04 *
黄芪益气养血汤组	10	11.27 $\pm$ 0.68 *	11.70 $\pm$ 1.24 *

注: IL-2, 白细胞介素 2; IFN- γ , γ 干扰素; 与空白血清组比较, $^{*} P < 0.05$; 与青龄鼠组比较, $^{\Delta} P < 0.05$; 与黄芪益气养血汤组比较, $^{\Delta\Delta} P < 0.05$

3.4 各组脾脏 T 淋巴细胞 PI3K mRNA 表达及 β -半乳糖苷酶衰老细胞阳性率比较

表 4 示, 与青龄鼠组比较, SAMP8 组小鼠脾脏 T 淋巴细胞中 PI3K mRNA 表达明显降低, β -半乳糖苷酶衰老细胞阳性率明显升高 ($P < 0.05$); 与空白血清组比较, 黄芪益气养血汤组和红芪益气养血汤组 PI3K mRNA 表达明显升高、 β -半乳糖苷酶衰老细胞阳性率降低, 且红芪益气养血汤组升高 PI3K mRNA 表达和降低 β -半乳糖苷酶衰老细胞阳性率较黄芪益气养血汤组更明显 ($P < 0.05$)。

表 4 各组脾脏 T 淋巴细胞中 PI3K mRNA 表达及 β -半乳糖苷酶衰老细胞阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	PI3K mRNA ($-\Delta\Delta Ct$ 值)	衰老细胞阳性率 (%)
青龄鼠组	10	0	1.96 $\pm$ 0.23
SAMP8 组	10	-8.73 $\pm$ 0.30 $^{\Delta}$	27.42 $\pm$ 0.53 $^{\Delta}$
空白血清组	10	-6.59 $\pm$ 0.20	25.22 $\pm$ 0.49
红芪益气养血汤组	10	-1.62 $\pm$ 0.21 $^{*\Delta}$	15.68 $\pm$ 0.31 *
黄芪益气养血汤组	10	-5.66 $\pm$ 0.06 *	17.19 $\pm$ 0.76 *

注: 与空白血清组比较, $^{*} P < 0.05$; 与青龄鼠组比较, $^{\Delta} P < 0.05$; 与黄芪益气养血汤组比较, $^{\Delta\Delta} P < 0.05$

4 讨论

本实验中 SAMP8 小鼠作为快速老化模型小鼠被广泛应用于阿尔兹海默病等增龄性脑神经病变研究^[6], 有文献显示, SAMP8 小鼠的老化改变并不局限于脑组织^[7], 而 6 个月以上的 SAMP8 小鼠其脾脏淋巴细胞分泌的白细胞介素等细胞因子均有明显改变^[8], 故本研究选用 SAMP8 小鼠进行研究。

本研究结果显示, SAMP8 组小鼠 T 淋巴细胞增殖能力明显弱于青龄鼠组, CD4 $^{+}$ 表达增多, 而由 Th1 细胞分泌的 IL-2 及 IFN- γ 减少, 说明增多的 CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞主要为与体液免疫相关的 Th2 细胞和部分调节性 T 淋巴细胞^[9]。Th2 细胞和部分调节性 T 淋巴细胞的增多导致了 CD4/CD8 的升高。CD28 分子表达于几乎所有的 CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞和一半 CD8 $^{+}$ T 细胞上^[10], 而 CD152 分子表达于 CD28 $^{+}$ T 淋巴细胞上与 CD28 分子竞争性结合 B7 分子^[11], 抑制 T 细胞的活化导致了 SAMP8 小鼠 T 淋巴细胞表面 CD28 $^{+}$ CD152 $^{+}$ 双阳性表达高于青龄小鼠。与细胞免疫相关的 Th1 细胞及 CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞减少, 说明 SAMP8 小鼠的免疫衰老在细胞免疫方面较为明显, 而 CD28 $^{+}$ CD152 $^{+}$ 双阳性表达增高表明其 T 细胞活化被抑制。含红芪和含黄芪益气养血汤含药血清在提高 SAMP8 小鼠 T 淋巴细胞表面 CD8 $^{+}$ 表达上的作用不显著, 但能显著降低 CD28 $^{+}$ CD152 $^{+}$ 双阳性表达。在 CD28 协同刺激 T 淋巴细胞活化的第二信号传导中 PI3K 起着重要的作用, CD28 与 B7 分子结合后 PI3K 迅速活化直接参与调节包括 ERK 和 JNK 途径在内的 MAP 激酶信号途径^[12]。细胞衰老时 β -半乳糖苷酶表达增多^[13], 本实验中含红芪和含黄芪益气养血汤含药血清均能减少 β -半乳糖苷酶表达增多的衰老细胞, 而在促进淋巴细胞体外增殖能力、促进 IL-2 的分泌及上调 PI3K mRNA 表达量方面含红芪益气养血汤含药血清的作用要优于含黄芪的益气养血汤含药血清。

综上所述, 含红芪和含黄芪的益气养血汤含药血清均能增强 SAMP8 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的体外增殖能力, 可能通过减少 CD28 $^{+}$ CD152 $^{+}$ 双阳性表达、促进 IL-2 及 IFN- γ 分泌、上调 PI3K mRNA 表达量、降低 β -半乳糖苷酶表达, 从而促进 T 淋巴细胞活化, 改善 SAMP8 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的免疫衰老状态, 并且红芪的改善效果优于黄芪。

参考文献

- [1] 崔芬芬, 丁婷婷, 蒙礼娟, 等. 红芪和黄芪对老龄小鼠免疫调节的比较研究 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(4): 12-13.
- [2] 胡燕, 程卫东, 刘欣, 等. 红芪和黄芪水提物对小鼠免疫功能影响的差异 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(9): 623-626.
- [3] 杨光, 程卫东, 张李峰, 等. 以红芪替换黄芪的益气养血复方含药血清对老龄小鼠脾 T 淋巴细胞增殖和抗氧化的影响比较 [J]. 中药材, 2014, 37(8): 1410-1413.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M].

- 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 616.
- [5] 郭菊梅, 杨光, 陈慧昱, 等. 红芪替换黄芪后益气养血汤对老龄鼠抗氧化损伤及抗免疫衰老作用的比较研究[J]. 西部中医药, 2014, 27(8): 7-10.
- [6] ITO K. Frontiers of model animals for neuroscience: two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research [J]. Exp Anim, 2013, 62(4): 275-280.
- [7] SHIMADA A, HASEGAWA-ISHII S. Senescence-accelerated mice (SAMs) as a model for brain aging and immunosenescence [J]. Aging Dis, 2011, 2(5): 414-436.
- [8] CHAN YC, WU CC, CHAN KC, et al. Nanonized black soybean enhances immune response in senescence-accelerated mice [J]. Int J Nanomedicine, 2009, 4: 27-35. PMID: 19421368.
- [9] CASTELLINO F, GERMAIN RN. Cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells: when, where, and how [J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24(5): 19-40.
- [10] 任亚琳. B7-CD28 家族成员的免疫调节功能及其最新研究进展 [J]. 国外医学免疫学分册, 2005, 28(6): 324-328.
- [11] TAYLOR JC, GOUGH SC, HUNT PJ, et al. A genome-wide screen in 1119 relative pairs with autoimmune thyroid disease [J]. Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(2): 646-653.
- [12] 郝秀丽, 张逢春. CD28 分子的研究进展 [J]. 北华大学学报(自然科学版), 2004, 5(2): 133-137.
- [13] 高学军, 蔡霞, 张鹏, 等. 成纤维细胞体外培养过程中 β-半乳糖苷酶的变化 [J]. 潍坊医学院学报, 2004, 26(2): 87-89.

Comparison of Effect of Serum Containing Yiqi Yangxue Decoction (益气养血汤) with Hongqi (Radix Hedysari 红芪) and the Same Serum with Huangqi (Radix Astragali, 黄芪) on T-Lymphocytes in Spleen of SAMP8 Mice
LI Wei¹, CHENG Weidong^{2,3}, ZHANG Wenjun³, SUN Meihua², XU Jingwen³, ZHANG Pei⁴

(1. School of Integrative Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Gansu, 730000; 2. Chinese Medicine School, Southern Medical University; 3. Basic Medical School, Lanzhou University; 4. School of pharmacy, Lanzhou University)

ABSTRACT Objective To discuss and explore possible mechanism of Yiqi Yangxue Decoction (益气养血汤) containing Hongqi (Radix Hedysari 红芪) or containing Huangqi (Radix Astragali, 黄芪) against immunosenescence, and to compare the effect of both. **Methods** Randomly divided 30 Kunming mice of young age into the Hongqi Yiqi Yangxue Decoction group, the Huangqi Yiqi Yangxue Decoction group and the blank group, with 10 mice in each. The Hongqi Yiqi Yangxue Decoction group and the Huangqi Yiqi Yangxue Decoction group were both given 6 g/(kg · d) of corresponding crude drugs, with 0.4 ml/(20 g · d) of gastric volume. The blank group was given with equivalent saline in gavage, continuing for 14 days. Mouse eyeballs were removed to draw blood 2 hours after the last gavage to prepare serum containing Yiqi Yangxue Decoction and blank serum. Density of T-lymphocytes in spleen of SAMP8 mice were regulated to the density needed, and a Hongqi Yiqi Yangxue Decoction group (drug serum), a Huangqi Yiqi Yangxue Decoction group (drug serum), a blank group (blank serum), a young age mice group (absolute nutrient solution) and a SAMP8 group (absolute nutrient solution) were set up for T-lymphocytes culture. Proliferation ability of each cell, the expression of T-lymphocytes surface molecule including CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and CD28⁺ CD152⁺, levels of Interleukin 2 (IL-2) and gamma interferon (IFN-γ) in cell culture supernatant, the expression of PI-3K mRNA and positive rate of β-galactose glucoside enzyme staining in cells were examined after cultivating for 72 hours. **Results** Compared with those in the young age group, cell proliferation ability, the expression of CD8⁺ molecule on the cellular surface, level of IL-2 and IFN-γ in cell culture supernatant and the expression of PI3K mRNA in cells of T-lymphocytes in spleen of mice remarkably decreased, while double positive expression of CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD28⁺ CD152⁺ and positive rate of β-galactose glucoside enzyme aging cells remarkably increased in the SAMP8 group ($P < 0.05$). Compared with in the blank serum group, the proliferation ability of T-lymphocytes, level of IL-2 and IFN-γ in cell culture supernatant, and the expression of PI3K mRNA in cells increase, but positive rate of β-galactose glucoside enzyme staining cells decrease in both the Hongqi Yiqi Yangxue Decoction and the Huangqi Yiqi Yangxue Decoction groups ($P < 0.05$). And in the aspects of improving cellular proliferation ability and increasing IL-2 level and expression of PI3K mRNA, the Hongqi Yiqi Yangxue Decoction group was superior to the Huangqi Yiqi Yangxue Decoction group ($P < 0.05$). **Conclusion** Yiqi Yangxue Decoction containing Hongqi or Huangqi can both increase proliferation ability of T-lymphocytes in spleen of SAMP8 mice in vitro. The possible mechanism may be improving secretion of IL-2 and IFN-γ, up-regulating expression quantity of PI3K mRNA, decreasing expression of β-galactose glucoside enzyme to improve immunosenescence state of T-lymphocytes. The effect of Yiqi Yangxue Decoction containing Hongqi is superior to Yiqi Yangxue Decoction containing Huangqi.

Keywords immunosenescence; Yiqi Yangxue Decoction; Radix Astragali; Radix Hedysari; T-lymphocytes; cell proliferation

(收稿日期: 2015-11-10; 修回日期: 2016-03-17)

[编辑: 邓媛]