

益气养阴法及其组方延缓衰老的实验研究*

★ 曾庆明 (广东省深圳市罗湖区中医院 深圳 518001)

摘要:目的:探讨益气养阴法及其组方对D-半乳糖衰老模型小鼠HSP70、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6表达的影响。方法:将60只昆明小鼠,随机分为正常组、模型对照组、治疗组。跳台法测定小鼠学习记忆能力。免疫组化法、ELISA法检测HSP70、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6表达水平。结果:跳台法表明,与对照组比较,治疗组可使小鼠错误次数明显减少,潜伏期明显延长($P < 0.05$)。与正常组相比,对照组、治疗组HSP70、TNF- α 蛋白表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组血清IL-1 β 较正常组含量显著增高($P < 0.05$),治疗组较模型组显著降低($P < 0.05$)。模型组血清IL-2活性较正常组明显降低,具有显著性差异($P < 0.01$),治疗组较模型组血清IL-2的活性明显升高($P < 0.01$)。模型组血清IL-6水平较正常组比明显升高,具有显著性差异($P < 0.01$),治疗组较对照组血清IL-6水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:益气养阴口服液能够改善衰老模型小鼠学习记忆能力,同时能够改善HSP70蛋白、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6的表达,改善失衡的促-抗炎性反应体系,这可能是益气养阴口服液抗衰老的机制之一。

关键词:益气养阴;D-半乳糖衰老模型;热休克蛋白70;延缓衰老

中图分类号:R 695 **文献标识码:**A

Study on the effects of Yiqi Yangyin decoction in Senile mice model induced by D-Galactos

ZENG Qing-ming

Luohu hospital of TCM, Shenzhen City Guangdong Province, Shenzhen 518001

Abstract: Objective: To observe the effect of Yiqi Yangyin decoction on HSP70, TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 in Senile mice model induced by D-Galactos. Methods: Six - week old mice were assigned randomly into three groups: Norm group, Model group and Treatment group (fed with Yiqi Yangyin decoction). HSP70, TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 were detected by immunohistochemistry, ELISA. Results: After treatment, compare with Norm group, IL-1 β , IL-2, IL-6, HSP70 and TNF- α increased both in Model group and Treatment group, there are significant differences ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), but the Treatment group is better than Model group, there are significant differences ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion: Yiqi Yangyin decoction has steady and tried effect on Senile mice model induced by D-Galactos. The possible mechanism of Yiqi Yangyin decoction is upregulated Expressions of anti-inflammatory cytokine and receptor genes.

Key words: Yiqi Yangyin; Senile model induced by D-Galactos; HSP70; TNF- α ; IL-1 β ; IL-2; IL-6

当前,随着老龄人口的比率越来越高,抗衰老研究已经成为21世纪国际医学研究中的热点前沿之一。目前有许多研究认为,衰老进程中机体内存在着增龄性慢性低度促性反应状态,Franceschi等在

2000年首次将这种现象命名为炎性衰老(inflammaging),它被视为机体衰老进程速率和寿命的一个决定因素,与老年相关疾病密切相关^[1~3]。中医学认为五脏的虚衰是衰老的根本原因,我们以调补五

* 广东省中医药局科研课题(编号166.151)

脏、益气养阴延缓衰老为治则,临床运用益气养阴口服液抗衰老,先期临床与实验研究表明该方能明显延长果蝇寿命、增强小鼠记忆力、抑制小鼠脑、肝组织过氧化脂质生成等作用^[4],本实验拟通过益气养阴口服液对D-半乳糖衰老模型小鼠IL-1 β 、IL-2、IL-6、HSP70、TNF- α 等炎症因子的影响,进一步探讨益气养阴益气养阴法及其组方抗氧化、延缓衰老的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:采用2~3月龄纯系昆明种小鼠,雌雄各半,体重18~22g,由广东省医学实验动物中心提供。(2)药品与试剂:益气养阴口服液(由我院中药制剂室提供),HSP70、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,其余均为市售国产分析纯。

1.2 方法 (1)衰老模型建立:60只小鼠,随机分为正常组、模型对照组、治疗组。模型对照组和治疗组给予皮下注射5% D-半乳糖0.25 ml/10g,正常组皮下注射等体积的生理盐水,同时对照组用生理盐水灌胃2 ml/次(按体表面积换算),1次/d。治疗组给予益气养阴口服液2 ml/次,1次/d。均连续6周。最后1天灌胃和注射D-半乳糖2 h后,进行学习记忆训练实验,次日测定记忆成绩。然后处死动物测定各项衰老指标。(2)标本取材:第13周测定小鼠记忆能力,由腹腔静脉取血,离心分离血清,放入-20℃冰箱保存。实验结束时,断头取脑,制成石蜡切片。(3)衰老模型小鼠学习记忆能力测定(跳台法):将动物放入跳台箱内适应3 min,然后立即通36 V交流电。动物受到电击,其正常反应是跳回

平台以躲避伤害性刺激,如此训练5 min。24 h后重做测验,此即记忆保持测验。记录小鼠第1次跳下平台的潜伏期和5 min内的错误次数^[5]。(4)衰老模型小鼠HSP70、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6检测:免疫组织化学检测小鼠脑组织中HSP70蛋白的表达,具体步骤按试剂盒说明严格操作。DAB显色光镜下观测,免疫组化染色结果判定:胞浆或胞核呈棕黄色为阳性细胞。ELISA法检测小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6,具体步骤按试剂盒说明严格操作。

1.3 统计学方法 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本比较用 t 检验,组间采用方差分析,各组均数采用 q 检验。检验水准 $\alpha = 0.01$ 或 0.05 ,统计软件采用SPSS11.0。

2 结果

2.1 益气养阴口服液对衰老模型小鼠学习记忆的影响 见表1。

表1 益气养阴口服液对衰老模型小鼠学习记忆的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	潜伏期(s)	错误次数(次)
正常组	20	232.4 ± 112.5	0.854 ± 1.036
对照组	20	134.9 ± 106.7 Δ	2.341 ± 1.527 Δ
治疗组	20	242.6 ± 117.4* Δ	1.524 ± 1.325* Δ

注:经统计学处理,与对照组比较:* $P < 0.05$ 与正常组比较: $\Delta P < 0.01$ 。

与正常组相比,对照组小鼠记忆明显衰退,表现为错误次数增加,潜伏期缩短($P < 0.01$)。与对照组比较,治疗组可使小鼠错误次数明显减少,潜伏期明显延长($P < 0.05$)。

2.2 益气养阴口服液对衰老模型小鼠脑组织HSP70蛋白表达的影响 见表2。

表2 益气养阴口服液对衰老模型小鼠脑组织HSP70蛋白、血清TNF- α 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HSP70蛋白 阳性细胞数	TNF- α /pg·ml ⁻¹	IL-1 β /pg·ml ⁻¹	IL-2 /pg·ml ⁻¹	IL-6 /pg·ml ⁻¹
正常组	20	0.17 ± 0.01	10.24 ± 1.08	5.68 ± 0.481	6.93 ± 0.71	123.37 ± 10.57
对照组	20	0.22 ± 0.04*	13.79 ± 1.65 Δ	7.389 ± 0.894* Δ	6.14 ± 0.68	140.99 ± 16.73 Δ
治疗组	20	0.27 ± 0.02*	11.35 ± 1.12* Δ	6.103 ± 0.729 Δ	6.82 ± 0.39	129.12 ± 16.48* Δ

注:经统计学处理,与对照组比较:* $P < 0.05$ 与正常组比较: $\Delta P < 0.01$ 。

与正常组相比,对照组、治疗组HSP70蛋白表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对照组升高幅度小于治疗组($P < 0.05$)。与正常组相比,对照组、治疗组血清TNF- α 表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对照组升高幅度大于治疗组。与正常组比较,模型组血清IL-1 β 含量显著增高($P < 0.05$),治疗组小鼠血清IL-1 β 较模型组显著降低($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组小鼠血清IL-2活性明显降低,

具有显著性差异($P < 0.01$)。治疗组较模型组血清IL-2的活性明显升高($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组血清IL-6水平明显升高,具有显著性差异($P < 0.01$)。治疗组较对照组血清IL-6水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

中医学认为五脏虚衰是衰老的根本原因。如《灵枢·天年篇》指出“五脏坚固”则寿命“故能久

矣”,“其不能终寿而死者”,乃因“其五脏皆不坚”。此外还指出,人体五十岁以后逐渐出现各脏腑虚衰症状,如“五十岁,肝气始弱,肝叶始薄,胆汁始灭,目始不明。六十岁,心气始衰,若忧悲,血气懈惰,故好卧。七十岁,脾气虚,皮肤枯。八十岁,肺气衰,魄离,故言善误。九十岁,肾气焦,四肢经脉空虚。百岁,五脏皆虚,形骸独居而终矣。”说明人体进入中老年后,逐渐出现视力下降、皮肤枯燥、忧郁、疲乏、记忆力减退等各种衰老变化及生理功能衰退现象。因此,针对五脏的虚衰,我们以调补五脏、益气养阴延缓衰老为治则,采用补益五脏气阴的药物制成“益气养阴口服液”。方中主要药物有:人参大补元气、补益五脏之气;麦冬补心肺之阴、益胃生津;首乌、枸杞滋肝肾之阴;茯苓健脾宁心等。全方功能益气养阴、调补五脏,使五脏精气充盛,本固邪去,健康延年。

现代研究发现热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)与衰老关系密切,HSP表达的改变不仅是判断细胞生理状态和应激能力的指标,而且可作为机体衰老或细胞老化的一个重要因素。其中尤以诱导型 HSP70 为 HSPs 中最受关注,研究最深入的一种。目前大量体内、外实验表明,随着机体衰老的进程,诱导型 HSP70 的表达呈下降趋势^[6~8],国外研究发现通过转 HSP70 基因,能够延长果蝇、美丽线虫的寿命^[9,10],由于 HSPs 参与了蛋白质的折叠、聚集、信号转导、基因表达及细胞凋亡的调节等多个环节,因此可以认为,HSPs 水平下降促进了衰老的发生。同时,HSF 和 HSPs 活性的减弱可以导致细胞内氧化还原作用失衡,清除变性损伤蛋白的能力降低,对衰老引起的一系列病理改变起到了促进作用。同时有研究表明 HSP70 与 SOD 关系密切,诱导型 HSP70 的显著增高可增强人细胞内源性抗氧化自由基能力,可提高抗氧化酶的活性,防止自由基对机体的危害,对延缓衰老过程有积极的作用。促炎性反应细胞因子 TNF- α 有“广谱炎症介质”之称,是目前研究和衡量炎症反应程度通用的有效指标,可能是炎症衰老的炎性细胞因子调控机制的核心。TNF- α 蛋白表达上升,说明在炎症衰老进程中促炎性细胞因子蛋白高表达,使机体处于高促炎性反应状态,机体促炎和抗炎反应平衡失调,从而加重衰老过程。有研究表明,IL-1 β 升高,抗氧化酶活性下降,IL-1 β 升高可能引起衰老^[11]。IL-2 主要由活化的 CD₄⁺ 和 CD₈⁺ T 细胞产生,其主要生物学活性是促使 TH 细胞增生及产生 CK,诱导 LAK 细胞增生;可促使活化的 B 细胞

增生及产生抗体。IL-2 还是参与免疫应答的重要细胞因子。IL-6 是由单核巨噬细胞、T 细胞(主要是 TH₂)、B 细胞等多种细胞产生的细胞因子。IL-6 的异常表达和失调是某些疾病的典型特征,从而使 IL-6 成为可能与发病机制直接相关的第一个细胞因子。大量研究表明,在衰老和许多老年疾病发生过程中,IL-6 水平均有不同程度的升高,使血清 IL-6 水平可作为老年人炎性衰老的预测指标。

本实验研究发现,益气养阴口服液能够改善衰老模型小鼠学习记忆能力,使小鼠错误次数明显减少,潜伏期明显延长($P < 0.05$)。同时,益气养阴口服液能够改善 HSP70 蛋白、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6 的表达,改善失衡的促-抗炎性反应体系,这可能是益气养阴口服液抗衰老的机制之一。

参考文献

- [1] Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 908: 244 - 254.
- [2] De Martinis M, Franceschi C, Monti D, et al. Inflammaging and life long antigenic load as major determinants of ageing rare and longevity [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(10): 2035 - 2039.
- [3] Franceschi C, Valensin S, Lescai F, et al. Neuroinflammation and the genetics of Alzheimer's disease: the search for a pro-inflammatory phenotype [J]. *Aging (Milano)*, 2001, 13(3): 163 - 170.
- [4] 张崇泉, 金幼兰, 刘礼意等. 益气养阴口服液延缓衰老的临床和实验研究 [J]. *湖南中医杂志*, 1994, 10(4): 45 - 47.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 826 - 827.
- [6] Blake MJ, Fargnoli J, Gershon D, et al. Concomitant decline in heat-induced hyperthermia and HSP70 mRNA expression in aged rats [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260(4 Pt 2): R663 - 7.
- [7] Muramatsu T, Hatoko M, Tada H, et al. Age-related decrease in the inducibility of heat shock protein 72 in normal human skin [J]. *Bri J Dermatol*, 1996, 134(6): 1035 - 8.
- [8] Gutsmann-Conrad A, Heydari AR, You S, et al. The expression of heat shock protein 70 decreases with cellular senescence in vitro and in cells derived from young and old human subjects [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 241(2): 404 - 13.
- [9] Marc T, Aziza, Khazaali A, et al. Chaperoning extending life [J]. *Nature*, 1997, 390(11): 30 - 1.
- [10] Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T, et al. Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin) / mthsp70/Grp75 [J]. *FEBS Lett*, 2002, 516(1-3): 53 - 7.
- [11] 夏世金, 沈自尹, 董竞成, 等. 老年大鼠海马炎性衰老相关基因表达及淫羊藿苷对其影响 [J]. *老年医学与保健*, 2008, 14(6): 340 - 344.

(收稿日期: 2009-08-12)