归脾丸对D-半乳糖致衰老小鼠的免疫调节作用研究Δ

李思晓*，苑广信#，马　月，王宇桐（北华大学药学院，吉林 吉林　132013）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）12-1426-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.04

摘　要　目的　研究归脾丸对D-半乳糖（D-gal）致衰老小鼠的免疫调节作用。**方法**　运用网络药理学方法筛选归脾丸发挥免疫作用的相关靶点和相关通路，并通过药效学实验进行验证。将105只雄性ICR小鼠随机分为空白对照（CON）组、模型对照（MOD）组、阳性对照（POS）组、归脾丸低剂量（GD）组和归脾丸高剂量（GG）组，除CON组皮下注射生理盐水外，其余各组小鼠皮下注射400 mg/kg D-gal以复制衰老模型；CON组与MOD组灌胃蒸馏水，POS组灌胃300 mg/kg匹多莫德口服溶液，GD组和GG组分别灌胃300 mg/kg和600 mg/kg的归脾丸水溶液，每日1次，共计8周。给药结束后，采集血清及脾脏组织，检测小鼠血清中白细胞介素2（IL-2）、IL-4、IL-6、肿瘤坏死因子α（TNF-α）的含量以及免疫球蛋白G（IgG）、IgM和IgA含量；计算脾脏指数并观察脾脏组织病理学改变；检测小鼠脾脏组织中超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、丙二醛（MDA）活性和8-羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）含量；检测除POS组外小鼠脾脏组织中TNF/磷酸肌醇-3-激酶-蛋白激酶B（PI3k-Akt）途径中相关蛋白的表达情况。**结果**　网络药理学分析结果显示，TNF、IL-6、Akt1为核心靶点。药效学研究结果显示，与MOD组比较，归脾丸各剂量组小鼠血清中IL-2、IL-4、IgG、IgM、IgA含量均显著升高，TNF-α、IL-6含量均显著降低，脾脏指数均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；淋巴细胞弥漫性增生的现象改善，脾细胞紧密排列，白髓和红髓之间界线清晰；脾脏组织中SOD、GSH-Px活性均显著升高，MDA活性和8-OHdG含量均显著降低，TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　归脾丸能够调节D-gal致衰老小鼠的免疫功能，其作用可能与调控TNF/PI3k-Akt途径进而减轻小鼠脾脏组织氧化应激损伤以及调节TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白水平的表达有关。

关键词　归脾丸；免疫调节；网络药理学；药效学；肿瘤坏死因子；磷酸肌醇-3-激酶；蛋白激酶B

Study on immunomodulatory effect of Guipi pills on D-galactose-induced aging mice

LI Sixiao, YUAN Guangxin, MA Yue, WANG Yutong (School of Pharmacy, Beihua University, Jilin Jilin 132013, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the immunomodulatory effect of Guipi pills on D-galactose (D-gal)-induced aging mice. **METHODS** The immune-related targets and related pathways for Guipi pills to exert immune effects were screened by network pharmacology and verified through pharmacodynamic experiments. Totally 105 male ICR mice were randomly divided into blank control (CON) group, model control (MOD) group, positive control (POS) group, Guipi pills low-dose (GD) group and Guipi pills high-dose (GG) group. Except for the CON group, other groups were subcutaneously injected with 400 mg/kg D-gal to induce the aging model; CON group and MOD group were given distilled water, POS group was given 300 mg/kg pidotimod oral solution intragastrically, GD group and GG group were given Guipi pills 300, 600 mg/kg intragastrically, once a day, for 8 weeks. After medication, the serum and spleen were collected, and the contents of interleukin 2 (IL-2), IL-4, IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF-α), and the contents of immunoglobulin G (IgG), IgM and IgA were detected. The spleen index was calculated and the histopathological changes in the spleen were observed. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA), and the content of 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) in spleen were detected; the expression of TNF/phosphoinositide-3-kinase-threonine protein kinase (PI3k-Akt)-related proteins in spleen was detected except for POS group. **RESULTS** The results of network pharmacology showed that TNF, IL-6 and Akt1 were core targets. The results of pharmacodynamic study showed that compared with MOD group, the contents of IL-2, IL-4, IgG, IgM and IgA were increased significantly in Guipi pills groups, while the contents of TNF-α and IL-6 were decreased significantly; the spleen index was increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The phenomenon of diffuse proliferation of lymphocytes was improved, the spleen cells were closely arranged, and the line between the white pulp and red pulp was clear. The activities of SOD and GSH-Px in spleen were increased significantly, while the activity of MDA, the content of 8-OHdG, and the protein expressions of TNF-α, PI3K and p-Akt were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Guipi pills can regulate the immune function of D-gal-induced aging mice, which is related to regulating the TNF/PI3k-Akt pathway, thereby reducing oxidative stress damage in spleen tissue of mice, and regulating protein expressions of TNF-α, PI3K and p-Akt.

KEYWORDS　Guipi pills; immuno-modulatory; network pharmacology; pharmacodynamics; tumor necrosis factor; phosphoinositide-3-kinase; threonine protein kinase

Δ**基金项目** 吉林省科技发展计划项目（No.YDZJ202201ZYTS197）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：药物分析。E-mail：1073085922@qq.com

\# **通信作者** 教授，硕士生导师，博士。研究方向：药品质量控制。E-mail：17287598@qq.com

正常的机体免疫系统可以有效地防止病原体入侵，能够维持生命体的正常运转和生理平衡，而衰老则会导致机体结构和功能逐步发生退行性变化[1]。美国病理学家Walford提出的免疫衰老学说认为，机体衰老是由于机体的免疫功能衰退所致，免疫系统从根本上决定了机体的衰老[2]；衰老还会导致促炎因子的亚临床积聚，表现为不断增加的慢性炎症，而这种炎症会导致免疫系统功能障碍[3-4]。服用传统中药可以提升自身的免疫力，使上述情况有所改善。

归脾丸最早出自宋代严用所著《济生方》中的“归脾汤”，是中医补益方剂，从1985年开始被《中国药典》收载。归脾丸处方中共有11味药，分别是党参、炒白术、炙黄芪、炙甘草、当归、茯苓、制远志、炒酸枣仁、龙眼肉、木香、大枣（去核）。全方有益气补血、养心健脾之功效，主要用于治疗心脾两虚和脾不统血诸证，在临床中对甲状腺功能亢进、高血脂也有较好的疗效。现代临床常用于治疗白细胞减少症[5]、早搏[6]、胃食管反流病[7]等。网络药理学可研究药物、靶点之间的相互作用网络，以及其在疾病发生和进展中的作用机制[8]。因此，本研究运用网络药理学方法预测归脾丸调节免疫的作用靶点，并通过药效学实验对预测结果进行验证，以期为揭示归脾丸的免疫调节机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有F50型全自动酶标仪（瑞士Tecan公司），JA型精密电子天平（沈阳科瑞永兴化玻仪器有限公司），LD5-10B型高速离心机（北京京立离心机有限公司），HS-B7126-A型石蜡包埋机和HS-S7120-A型石蜡切片机（沈阳恒松科技有限公司），IX73型倒置显微镜（日本Olympus公司）等。

1.2 主要药品与试剂

归脾丸（国药准字Z51020459）购自太极集团四川绵阳制药有限公司；D-半乳糖（D-gal，批号20200902）购自美国Sigma公司；匹多莫德口服溶液（阳性对照药，国药准字H20030463）购自江苏吴中医药集团有限公司苏州制药厂；白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、IL-2、IL-4酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号均为12/2021）均购自上海酶联生物科技有限公司；免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）、IgM、IgA ELISA试剂盒（批号分别为G20220318LF、G20220318UF、G20220318LI）均购自上海朗顿生物科技有限公司；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、8-羟基脱氧鸟苷（8-hydroxy-2 deoxyguanosine，8-OHdG）试剂盒（批号均为20211224）均购自南京建成生物工程研究所有限公司；TNF-α、磷酸肌醇-3-激酶（phosphoinositide-3-kinase，PI3K）、蛋白激酶B（threonine protein kinase，Akt）、磷酸化的Akt（p-Akt）单克隆抗体（批号均为20230315）均购自美国ABclonal公司。

1.3 实验动物

清洁级健康雄性ICR小鼠105只，体质量（20±2）g，由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供，实验动物生产许可证号为SCXK（吉）-2020-0002。将小鼠于标准实验室分笼饲养，自由饮食。实验经北华大学机构动物护理与使用委员会批准，审批号为20200915P005。

2 方法与结果

2.1 网络药理学研究

2.1.1 归脾丸靶点预测 以归脾丸方中各药材名为关键词，运用TCMSP数据库（https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）查找其有效成分及作用靶点。通过UniProt数据库（https://www.uniprot.org/）将筛选所得靶点转化为基因名，种属为*Homo sapiens*（Human）。在口服生物利用度≥30%、药物相似性≥0.18的筛选条件下[9]，共获得142个成分，去重后得到125个药物成分。经UniProt数据库转换后得267个药物成分靶点。

2.1.2 免疫相关靶点预测 在OMIM数据库（https://www.omim.org/）和GeneCard数据库（https://www.genecards.org/）中搜索关键词“immunity”，获得免疫相关靶蛋白基因。其中，通过OMIM数据库查得疾病相关靶点901个，筛选有“*”标注的靶点后得166个疾病相关靶点，又经GeneCard数据库筛选后得1 088个相关靶点，合并去重后得疾病靶点1 119个。将归脾丸的作用靶点和免疫相关靶点分别输入Draw Venn Diagram在线工具（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/），得87个归脾丸调节免疫的潜在作用靶点。

2.1.3 蛋白相互作用网络的构建 将上述潜在作用靶点输入到STRING数据库（https://cn.string-db.org/）中，以“Homo sapiens”作为限定属性，绘制交集靶点的相互作用网络，将结果导入Cytoscape 3.7.1软件，分别利用cytoNCA和cytoHub插件进行度值分析，对度值结果进行排序，筛选出归脾丸调节免疫的重要靶点。结果显示，TNF、IL-6、Akt1的节点面积大、颜色深，表明这3个靶点之间的联系紧密，故下一步将通过药效学实验进一步验证这3个靶点在归脾丸调节免疫中的作用机制。

2.1.4 KEGG富集分析 采用DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）对87个潜在作用靶点进行KEGG通路富集分析，共得到157条归脾丸调节免疫相关的信号通路，显著性差异排名前15位的信号通路如图1所示。其中，TNF信号通路和PI3K-Akt信号通路是免疫炎症相关通路，这两条通路均与炎症、免疫、细胞增殖凋亡等进程密切相关[10-11]，因此下文在药效学实验中选择TNF/PI3K-Akt途径进行验证。

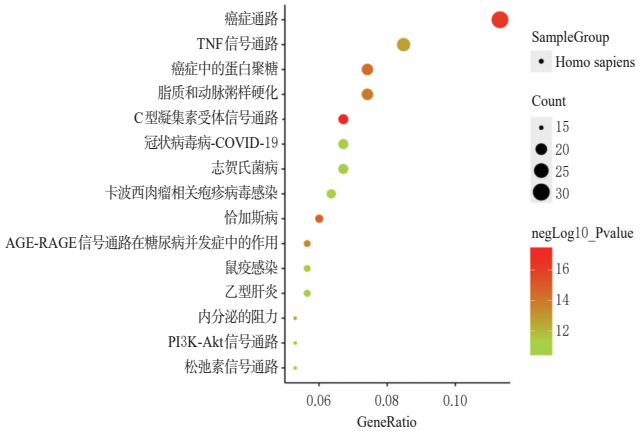


图1　KEGG富集分析结果图

2.2　动物药效学实验

2.2.1　统计学处理　实验数据使用SPSS 19.0软件进行数据分析，以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析；两组间比较，方差齐时采用LSD-t检验，方差不齐时采用Dunnett's $T3$检验。检验水准$\alpha=0.05$。

2.2.2　动物分组、给药及取材　将105只健康雄性ICR小鼠随机分为5组，分别为空白对照（CON）组、模型对照（MOD）组、阳性对照（POS）组、低浓度归脾丸（GD）组和高浓度归脾丸（GG）组，每组21只。各组小鼠适应性喂养1周后，除CON组皮下注射生理盐水外，其余各组小鼠皮下注射400 mg/kg D-gal以复制衰老模型[12]。与CON组小鼠相比，MOD组小鼠在造模后期逐渐出现不活泼，体形消瘦，皮肤松弛，食欲不振，毛发稀疏、竖起时失去光泽等一系列衰老体征，表明本实验衰老模型造模成功。给药浓度经前期急性毒性实验及预实验筛选得到，其中CON组与MOD组灌胃蒸馏水，POS组按300 mg/kg灌胃匹多莫德口服溶液，GD组按300 mg/kg灌胃归脾丸水溶液，GG组按600 mg/kg灌胃归脾丸水溶液，每日1次，每次10 mL/kg，共计8周。末次给药30 min后，用乙醚麻醉小鼠，每组18只小鼠摘除眼球采血用于检测血清中细胞因子含量和免疫球蛋白含量、脾脏指数、脾脏组织氧化相关因子活性/含量及相关蛋白表达。每组剩余3只小鼠处死后取脾脏组织用于脾脏组织病理学观察。

2.2.3　小鼠血清中细胞因子含量检测　通过眼球取血法收集小鼠血液，以3 500 r/min离心10 min，取上清液进行检测，通过ELISA法检测小鼠血清中IL-2、IL-4、IL-6、TNF-α的含量。具体方法参照各试剂盒说明书，结果如表1所示。与CON组比较，MOD组小鼠血清中IL-2、IL-4含量均显著降低（$P<0.01$），而IL-6、TNF-α含量均显著升高（$P<0.01$）；与MOD组比较，POS组、GD组、GG组小鼠血清中IL-2、IL-4含量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），IL-6、TNF-α含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。

表1　归脾丸对小鼠血清中IL-2、IL-4、IL-6、TNF-α含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=18$，pg/mL）

组别	IL-2	IL-4	IL-6	TNF-α
CON组	56.21±1.54	20.17±0.47	9.06±0.37	67.53±1.89
MOD组	43.34±1.09[a]	11.92±0.69[a]	12.25±0.45[a]	101.75±3.15[a]
POS组	52.23±0.80[b]	18.03±0.32[b]	9.64±0.90[b]	75.08±3.59[b]
GD组	46.04±0.62[c]	14.08±0.44[c]	11.48±0.22[c]	91.08±3.09[c]
GG组	49.64±0.61[b]	15.98±0.33[b]	10.11±0.26[b]	81.26±3.32[b]

a：与CON组比较，$P<0.01$；b：与MOD组比较，$P<0.01$；c：与MOD组比较，$P<0.05$

2.2.4　小鼠血清中免疫球蛋白含量检测　取"2.2.3"项下方法处理后的血清样品，采用ELISA法检测血清中IgG、IgM、IgA的含量。具体实验方法参考各试剂盒说明书，结果如表2所示。与CON组比较，MOD组小鼠血清中IgG、IgM和IgA含量均显著降低（$P<0.01$）；与MOD组比较，POS组、GD组、GG组小鼠血清中IgG、IgM和IgA含量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。

表2　归脾丸对小鼠血清中IgG、IgM、IgA含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=18$，pg/mL）

组别	IgG	IgM	IgA
CON组	1.64±0.02	355.67±48.38	47.49±9.04
MOD组	0.85±0.19[a]	187.33±60.17[a]	17.49±1.17[a]
POS组	1.49±0.29[b]	313.33±31.12[b]	44.42±0.93[b]
GD组	1.01±0.17[c]	248.05±16.18[c]	34.38±4.03[c]
GG组	1.36±0.22[b]	277.33±56.85[b]	41.40±1.09[b]

a：与CON组比较，$P<0.01$；b：与MOD组比较，$P<0.01$；c：与MOD组比较，$P<0.05$

2.2.5　小鼠脾脏指数检测　末次给药前称量小鼠体质量，眼球采血后处死小鼠，取其脾脏，去除周围结缔组织后用生理盐水洗涤、滤纸吸干，称质量。根据以下公式计算脾脏指数：脾脏指数＝脾脏质量（mg）/体质量（g）×100%。结果显示，与CON组小鼠脾脏指数[（3.07±0.15）%]比较，MOD组小鼠脾脏指数[（2.05±0.16）%]显著降低（$P<0.01$）；与MOD组比较，POS组小鼠脾脏指数[（2.63±0.04）%]、GD组小鼠脾脏指数[（2.25±0.02）%]和GG组小鼠脾脏指数[（2.46±0.07）%]均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。

2.2.6　小鼠脾脏组织病理学观察　在各组剩余的3只小鼠中，取其脾脏组织进行石蜡包埋；将包埋好的组织蜡块切成5～10 μm厚的切片，展片后进行HE染色，在光学显微镜下进行观察，结果如图2所示。在CON组中，小鼠脾细胞排列良好，白髓和红髓界限清晰，脾小结明显；MOD组小鼠脾细胞排列紊乱，白髓和红髓之间界限不清晰，且红髓内有严重的淋巴细胞弥漫性增生和浸润现象，脾小结模糊，脾脏中脾小体的生发中心全部消失；POS组、GD组和GG组的脾脏淋巴细胞弥漫性增生和浸润现象较MOD组明显缓解，且GG组较GD组效果更优。

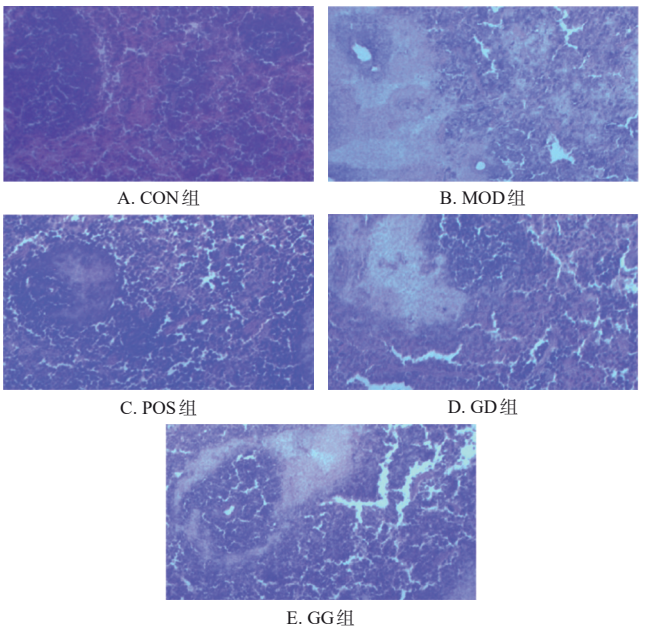


图2　归脾丸对小鼠脾脏组织病理学的影响（HE，×200）

2.2.7　小鼠脾脏组织中氧化相关因子活性/含量检测　取各组小鼠的脾脏组织，用生理盐水制成10%的匀浆，检测匀浆中SOD、MDA、GSH-Px的活性和8-OHdG的含量。具体方法参照各试剂盒说明书，结果如表3所示。与CON组比较，MOD组的SOD和GSH-Px活性均显著降低（$P<0.01$），而MDA活性和8-OHdG含量均显著升高（$P<0.01$）；与MOD组比较，POS组、GD组、GG组小鼠脾脏组织中SOD和GSH-Px活性均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），MDA活性和8-OHdG含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。

表3　归脾丸对小鼠脾脏组织中氧化相关因子活性/含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=18$）

组别	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)	MDA/(U/mL)	8-OHdG/(ng/mL)
CON组	11.83±0.19	1 146.90±98.61	2.55±0.04	0.30±0.07
MOD组	8.94±0.35[a]	661.40±124.60[a]	5.98±0.14[a]	0.50±0.01[a]
POS组	11.32±0.03[b]	1 028.65±47.64[b]	3.35±0.50[b]	0.35±0.06[b]
GD组	10.02±0.06[c]	785.38±18.01[c]	4.80±0.05[c]	0.46±0.03[c]
GG组	10.69±0.03[b]	878.36±9.00[b]	4.14±0.06[b]	0.41±0.01[b]

a：与CON组比较，$P<0.01$；b：与MOD组比较，$P<0.01$；c：与MOD组比较，$P<0.05$

2.2.8　小鼠脾脏组织中相关蛋白表达情况检测　采用Western blot法进行测定。分别称取各组（POS组除外）小鼠脾脏组织，各加入1 mL RIPA蛋白裂解液和10 μL磷酸酶抑制剂，制成10%的匀浆。冰上静置裂解30 min后，放入高速离心机以12 000 r/min离心20 min，取上清液，以BCA法测定各组脾脏组织上清液中蛋白含量。加入含有β-巯基乙醇的上样缓冲液，将样品放入沸水中煮沸20 min变性，调整浓度至每组蛋白上样量为30 μg，使用微量上样器于每孔加入15 μL蛋白待测样品，以10%聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白进行浓缩和分离。在冰浴中将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上，于封闭液（含5%脱脂奶粉）中室温封闭2 h；用TBST缓冲液洗膜后加入一抗[β-actin（稀释比例为1∶50 000），TNF-α、PI3K、Akt、p-Akt（稀释比例均为1∶1 000）]，置于摇床上，于4 ℃孵育过夜。用TBST缓冲液洗膜5 min×4次，加入HRP-山羊抗兔IgG二抗（稀释比例为1∶1 000），置于摇床上室温孵育1 h；用TBST缓冲液洗膜5 min×4次，避光添加显影液，在化学发光系统中拍照成像。用Image J软件分析蛋白条带的灰度值，以TNF-α、PI3K蛋白与内参蛋白β-actin条带灰度值的比值表示TNF-α、PI3K蛋白的表达水平，以p-Akt蛋白与Akt蛋白条带灰度值的比值表示p-Akt蛋白的表达水平。结果如图3、表4所示。相较于CON组，MOD组小鼠脾脏组织中TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）；与MOD组比较，各给药剂量组小鼠脾脏组织中TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。

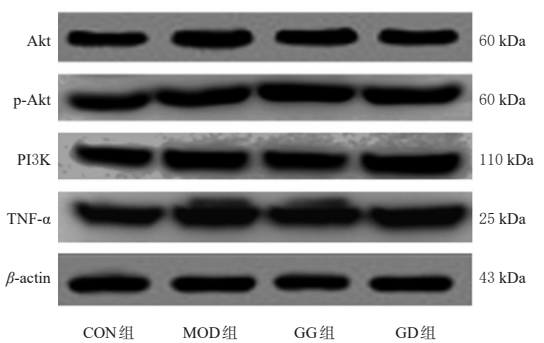


图3　归脾丸对小鼠脾脏组织中TNF-α、PI3K和p-Akt蛋白表达影响的电泳图

表4　归脾丸对小鼠脾脏组织中TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=18$）

组别	TNF-α	PI3K	p-Akt/Akt
CON组	0.38±0.05	0.37±0.06	0.33±0.06
MOD组	0.99±0.05[a]	1.06±0.11[a]	1.09±0.06[a]
GD组	0.83±0.03[b]	0.91±0.05[b]	0.83±0.06[b]
GG组	0.61±0.06[c]	0.75±0.10[c]	0.68±0.06[c]

a：与CON组比较，$P<0.01$；b：与MOD组比较，$P<0.05$；c：与MOD组比较，$P<0.01$

3　讨论

本研究通过网络药理学方法筛选归脾丸调节衰老小鼠免疫功能的作用靶点，结果发现Akt1、TNF、IL-6等为核心靶点；分析KEGG通路富集结果得出，TNF信号通路和PI3K-Akt信号通路上富集的靶点较多，是与免疫相关的通路。之后，采用Western blot法检测小鼠脾脏组织中TNF/PI3K-Akt途径中关键蛋白的表达，结果表明，衰老模型小鼠脾脏组织中TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白表达水平均显著升高，而归脾丸可降低免疫衰老模型小鼠脾脏组织中TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白的表达水平，表明归脾丸可能通过调控TNF/PI3K-Akt途径发挥免疫调节的作用。

已有研究表明，D-gal诱导的衰老动物血清中IL-2、IL-4含量减少，IL-6和TNF-α含量增多[13]，这与本研究中D-gal处理的小鼠血清检测结果一致。在给予归脾丸后，小鼠血清中IL-2、IL-4含量升高，IL-6和TNF-α含量降低，提示归脾丸可能通过调节小鼠体内上述细胞因子的水平，进而调节机体免疫功能。

本研究还检测了反映机体体液免疫水平的IgG、IgM和IgA的含量。有研究表明，D-gal致衰老动物血清中IgG、IgM和IgA的含量降低，体液免疫应答水平下降[14]。本研究中，MOD组小鼠血清免疫球蛋白水平变化与上述报道一致。在给予归脾丸后，小鼠血清中IgG、IgM和IgA的含量升高，表明归脾丸能够调节机体免疫球蛋白水平，从而发挥对衰老小鼠的免疫调节功能。

根据免疫衰老理论，免疫器官的损伤和功能衰退是衰老的原因之一[15]。脾脏是机体最大的免疫器官，脾脏组织中含有大量的免疫细胞，可以产生免疫球蛋白、补体等免疫物质参与机体免疫应答，对机体的免疫功能至关重要[16]。在免疫激活过程中，脾脏淋巴细胞的增殖增加了脾脏的质量，而随着衰老程度的不断进展，脾脏指数下降，脾脏结构受到损伤，脾脏淋巴细胞增殖能力减退，最终导致免疫功能下降[17]。本研究结果显示，归脾丸能够明显改善D-gal诱导的衰老小鼠脾脏萎缩，升高脾脏指数，对D-gal诱导的衰老小鼠脾脏具有明显的保护作用。

随着机体的逐步衰老，自由基的产生逐步增多，但机体的清除能力却逐步减弱，自由基堆积导致SOD、GSH-Px的活性下降，引起脂质过氧化反应，使8-OHdG含量增加，同时使DNA结构改变，造成DNA损伤，故保持体内自由基的平衡对延缓衰老至关重要[18]。本研究检测了脾脏组织中的氧化相关因子SOD、GSH-Px、MDA的活性和8-OHdG的含量，结果显示，归脾丸能够升高SOD、GSH-Px的活性，降低MDA的活性和8-OHdG的含量，表明归脾丸能通过发挥抗氧化作用从而调节小鼠的免疫功能。

综上所述，归脾丸能够调节血清中细胞因子水平并提高免疫球蛋白含量，清除体内自由基，调控TNF/PI3k-Akt途径进而调节TNF-α、PI3K、p-Akt蛋白水平的表达，从而发挥调节免疫的作用。

参考文献

[1] 孙晓康，张艳艳，张晓元，等. 衰老机制及抗衰老治疗的研究进展[J]. 食品与药品，2022，24(1)：74-80.

[2] GUBBELS BUPP M R，POTLURI T，FINK A L，et al. The confluence of sex hormones and aging on immunity [J]. Front Immunol，2018，9：1269.

[3] 何源，王露露，张晶. 多糖抗衰老作用机制的研究进展[J]. 中成药，2022，44(2)：528-531.

[4] VALLET H，FALI T，SAUCE D. Aging of the immune system：from fundamental to clinical data[J]. Rev Med Interne，2019，40(2)：105-111.

[5] 王世宏，孙永明. 归脾丸、复方阿胶浆治疗白细胞减少症27例临床观察[J]. 中成药，1999，21(8)：414-415.

[6] 高晓英. 人参归脾丸治疗室性早搏临床分析[J]. 中外医疗，2009，28(14)：107.

[7] 勇晓，李美香. 归脾丸佐治内镜阴性胃食管反流病30例分析[J]. 中华临床新医学，2004，4(1)：86.

[8] 孟瑶. 基于网络药理学和分子对接探讨茵陈四逆汤治疗肝损伤的潜在作用机制[D]. 长春：吉林大学，2022.

[9] RU J L，LI P，WANG J N，et al. TCMSP：a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform，2014，6：13.

[10] DING F，LUO X，TU Y T，et al. Alpk1 sensitizes pancreatic beta cells to cytokine-induced apoptosis via upregulating TNF-α signaling pathway[J]. Front Immunol，2021，12：705751.

[11] HE J，ZHANG N H，ZHU Y，et al. MSC spheroids-loaded collagen hydrogels simultaneously promote neuronal differentiation and suppress inflammatory reaction through PI3K-Akt signaling pathway[J]. Biomaterials，2021，265：120448.

[12] SCHULTE W，BERNHAGEN J，BUCALA R. Cytokines in sepsis：potent immunoregulators and potential therapeutic targets：an updated view[J]. Mediators Inflamm，2013，2013：165974.

[13] WU Y N，YAN F F，HU J Y，et al. The effect of chronic ammonia exposure on acute-phase proteins，immunoglobulin，and cytokines in laying hens[J]. Poult Sci，2017，96(6)：1524-1530.

[14] DE LA FUENTE M，MIQUEL J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging：the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging[J]. Curr Pharm Des，2009，15(26)：3003-3026.

[15] LEE S，KIM M S，LEE D，et al. The comparative immunotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica nanoparticles in mice[J]. Int J Nanomedicine，2013，8：147-158.

[16] STRAUB R H. Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen[J]. Trends Pharmacol Sci，2004，25(12)：640-646.

[17] GUO X J，ZHANG J Y，LIU M，et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on attenuating anti-GBM glomerular nephritis by activating NRF2 signalling[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol，2019，47(1)：2972-2979.

[18] ZHAO Y B，XIAO Y，XIE Y M. Clinical study on changes of serum levels of immunoglobulin and cytokines in anaphylaxis patients induced by Qingkailing injection [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi，2011，36(10)：1382-1385.

（收稿日期：2022-11-13　修回日期：2023-05-10）
（编辑：曾海蓉）