

补肾生血方对 β -地中海贫血基因水平的影响

吴志奎¹ 蔡辉国² 陈佩贞² 姜葆华¹ 崔京华¹ 王荣新³ 黄有文³ 纪新军¹ 黄霞珍¹

摘要 本文用电聚焦电泳法分析血红蛋白组分,采用PCR-SSCP分析结合直接测序法(DNA序列分析)检验珠蛋白基因突变型,采用RT-PCR方法等测定珠蛋白mRNA的转录水平。结果发现,补肾生血药能明显提高 β -地中海贫血患者血红蛋白(Hb)和抗碱血红蛋白(HbF),提高血红蛋白的珠蛋白链比。该药对杂合子基因突变型患者效果明显,对纯合子型或异源双重杂合子基因突变型患者疗效不佳。其作用机理可能是补肾生血药能提高珠蛋白链 $\gamma/\beta+\gamma$ 比值,促进 γ -珠蛋白基因的转录和表达,诱导HbF合成,从而代偿了 β -珠蛋白基因功能的缺陷。

主题词 β -地中海贫血/遗传学 β -地中海贫血/中医药疗法 @ 补肾生血方

β -地中海贫血症(简称 β -地贫)是一种严重危害人类健康的顽症之一,它广泛地分布在地中海沿岸、中东、东南亚各国,在我国南方发病率较高。 β -地贫是一种遗传性溶血性贫血,其分子基础是 β -基因缺少或功能缺乏, β -基因突变使 β -珠蛋白不能合成,导致早期造血障碍。对该病的治疗是世界上没有解决的难题。我们根据中医肾生髓的理论和中医理法方药相统一的原则,用补肾生血药治疗 β -地贫,取得了可喜的疗效^[1]。本文从血红蛋白珠蛋白链比、基因突变和疗效关系及mRNA转录和表达水平上,通过对该药作用机理的研究,从一个侧面探讨了中医肾生髓理论的分子基础。

1 一般资料

11例 β -地中海贫血症患者,由中国人民

解放军第303医院确诊。女5例,男6例。年龄5~14岁。

2 治疗及观察方法

2.1 治疗方法:补肾生血胶囊由山萸肉、熟地、龟板胶、阿胶等组成。由中国中医研究院广安门医院制剂室提供。所有病例均用补肾生血胶囊治疗两个月,日服3次,每次3~4粒。在治疗期间未作输血等其他治疗。治疗前后取静脉血,ACD抗凝,按常规作血红蛋白等检查。

2.2 检测方法:

2.2.1 α -珠蛋白链比测定:采用变性聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法,用LKB公司生产的ultrosan XL激光光密度计扫描凝胶。

2.2.2 DNA提取:按文献^[2]介绍的方法进行。

2.2.3 RNA提取:抗凝血用生理盐水洗3次,离心取红细胞层,加入8倍体积的4mol/L GTC(为含有柠檬酸钠、十二烷基肌酸钠、异硫氰酸胍的水溶液),制备GTC-溶血液。每次实验取0.4ml GTC-溶血液,依次加入1 μ l 10mg/ml 酵母tRNA, 40 μ l 2mol/L NaAC, pH4.0, 0.4ml水饱和酚及80 μ l 氯仿/异戊醇(49:1)。激烈振荡5分钟后,静置20分钟。10000转/分离心15分钟,小心吸出上清液,向上清液中加入400 μ l 异丙醇,混合后-20℃置4小时。10000转/分离心15分钟,然后加入无水乙醇310 μ l, -20℃过夜。次日离心,再用80%乙醇洗一次,弃上清,风干后用30 μ l RNase (40u/ μ l)溶解沉淀物,立即进行逆转录(RT)反应。

2.2.4 PCR-SSCP分析:我们设计两对引物,以染色体DNA为模板,按文献^[2]方法分段扩增 β -珠蛋白基因片段。反应体系为20 μ l, 掺入0.5 μ ci α -³²P-dATP/dCTP。进行35个循环的扩增,扩增产物用30%DMSO, 95℃变性

1 中国中医研究院广安门医院,北京宣武区北线阁(100053)

2 中国医学科学院血液病研究所

3 中国人民解放军第三〇三医院

收稿日期:1996-08-29;修回日期:1996-09-28

10 分钟后,立即放入冰水浴中。电泳在 10~12%PAGE 4℃进行,凝胶在 80℃抽气干燥后进行放射自显影。

2.2.5 PCR-直接测序:对在 SSCP 分析中发现的异常扩增片段,经低熔点琼脂糖法^[2]纯化后作为测序模板,以上述引物经 HPLC 纯化后作为测序引物,采用 Gibco 公司双链 DNA 循环测序试剂盒,按说明书介绍的方法测序。

2.2.6 RT-PCR:参考文献^[3]设计 RT-PCR3 对引物,分别扩增 α -珠蛋白 cDNA 片段 260bp;扩增 β -珠蛋白 cDNA 片段 315bp;扩增 γ -珠蛋白 cDNA 片段 489bp。以 RNA 为模板,以混合引物为 RT 引物合成 cDNA 片段^[3]。然后以 cDNA 为模板,用两组混合引物,分别扩增 α 、 β -珠蛋白 cDNA 片段和 α 、 γ -珠蛋白 cDNA 片段。除循环次数改为 29,扩增产物直接电泳,曝光时间限定为 5 小时外,PCR、PAGE 及放射自显影的其他条件均与 PCR-SSCP 分析相同。用计光密度计扫描底片,根据扫描值分别计算 α : β 和 α : γ 值,并用扩增片段碱基对数校正,换算出 $\gamma/\beta+\gamma$ 珠蛋白 mRNA 克分子比值。

3 结果与分析

3.1 治疗结果:11 例 β -地中海贫血症患者经补肾生血胶囊治疗两个月后,患者血红蛋白(Hb)水平,疗前为 58.2 ± 18.0 g/L,疗后为 70.2 ± 18.4 g/L ($P < 0.05$);抗碱血红蛋白(HbF)疗前为 $42.39 \pm 24.02\%$,疗后为 $59.25 \pm 24.18\%$ ($P < 0.05$);血红蛋白珠蛋白链 $\gamma/\beta+\gamma$ 比值(%)也有明显的提高,疗前为 $0.54 \pm 0.15\%$,疗后为 $0.64 \pm 0.14\%$ ($P < 0.05$),按张之南教授制定的疗效标准^[4],11 例中 1 例显效,6 例有效,4 例无效。

3.2 基因型测定结果:经 SSCP 分析共检出 3 种突变,经直接测序,确定为 CD17(A→T)、CD41-42(-4bP)和 -28(A→G)。在有治疗前后基因型分析的 10 例患者中,CD17(A→T)杂合子突变型 4 例;CD41-42(-4bP)杂合子突变型 3 例,纯合子突变型 1 例;CD17(A→T)/-28(A→G)和 CD17(A→T)/CD41-42

(-4bP)异源双重杂合子突变型各 1 例。

在 7 例单纯杂合子突变型患者中,1 例显效,5 例有效和 1 例无效。对 3 例异源双重杂合子或纯合子突变型患者均无疗效。

3.3 珠蛋白 mRNA 比值测定:我们测定了 4 例杂合子突变型患者治疗前后 $\gamma/\beta+\gamma$ 珠蛋白 mRNA 克分子比值的变化,其中 3 例明显升高,1 例基本不变,见附表。

附表 患者治疗前后 $\gamma/\beta+\gamma$ 珠蛋白 mRNA 克分子比值的变化

病 例	治疗前(%)	治疗后(%)
正常人	1.2	
龙某某	12.8	25.2
唐某某	12.9	24.5
唐某某	21.4	30.7
黄某某	26.5	23.4

4 讨论

至今为止,对 β -地贫的治疗尚无理想的办法,西方医学^[5,6]多采用 5-氮胞苷、马利兰和羟基脲等几种化疗药物治疗,虽有一定疗效,但毒副作用较大,限制了在临床上的应用。近年,也有人试图把正常的 β -基因导入含有突变的基因细胞内进行基因治疗,但因同源重组率很低,很难进行。目前基因治疗存在严重问题,无法在临床上应用。我们根据中医肾生髓的理论,在广西南宁 β -地中海贫血高发区,用补肾生血药治疗 β -地贫取得了明显的疗效,患者外周血网织红细胞、血红蛋白的升高与临床症状的改善有很好的一致性。同时与马利兰的疗效进行了比较,发现补肾生血药治疗优于马利兰,而无后者的毒副作用。

从本文观察的结果来看,经补肾生血药治疗后,患者 HbF 相对百分含量,血红蛋白珠蛋白链比增加, γ -珠蛋白 mRNA 基因转录水平相应升高,说明补肾生血药具有促进 γ -珠蛋白转录和表达,诱导 HbF 合成,从而代偿了 β -珠蛋白基因缺陷。

本文在对治疗前后 10 例患者进行了较系

统的基因型分析,结果发现:补肾生血药治疗 β -地中海贫血,对杂合子基因突变型有明显疗效,而对纯合子型或异源双重杂合子基因突变型患者疗效不佳。进一步分析表明,杂合子突变型患者 β -珠蛋白的两个等位基因中有一个是正常的,所以疗效好;而对于纯合子或异源双重杂合子突变型患者 β -珠蛋白的两个等位基因都是异常的,所以疗效不佳。但与此同时,治疗后患者HbF含量明显升高。结果提示,补肾生血药治疗 β -地中海贫血虽不能改变患者的基因遗传型,但也能像羟基脲等烷化剂一样,能促进 γ -珠蛋白的基因表达,以代偿 β -珠蛋白的合成量的不足。研究结果表明,中药治疗不改变基因突变型,但能促进珠蛋白mRNA的表达,并为选型治疗从基因水平提供了客观依据。对指导临床实践具有重要意义。

中医肾藏精生髓的理论,是中医经典的理论基础之一,两千多年来,它一直指导着临床实践。自80年代初,我们就对这一经典理论的物质基础进行了比较系统的研究,通过多种动物模型的相互验证,从整体到细胞分子水平阐述了中医肾藏精,精生髓,髓生血理论的客观性。近年来,我们把中医肾生髓的理论思维与现代分子生物学发展最前沿技术相结合,从基因修饰的DNA甲基化水平^[7]、细胞CT水平^[8]、从

晶体蛋白修饰等几个方面,研究了中医肾生髓理论的分子基础。本文又从基因突变与疗效关系,血红蛋白mRNA转录表达水平,通过对补肾生血药治疗 β -地中海贫血作用的分子机理研究,从另一侧面揭示了中医肾生髓理论的分子基础。研究结果不仅为中医治疗 β -地中海贫血症提供了理论依据,也使中医肾生髓理论的现代研究达到了一个新的水平。

5 参考文献

- 1 黄有文,等. 儿童 β -地中海贫血的分子基础和临床. 实用儿科临床杂志 1994; 9: 1.
- 2 金冬雁,等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 科学出版社, 1992.
- 3 Huang SZ, et al. Diagnosis of thalassemia using cDNA amplification of circulating erythroid cell mRNA with the polymerase chain reaction. Blood 1991; 78: 2433.
- 4 张之南主编. 血液病诊断及疗效标准. 第一版. 天津科学技术出版社, 1990.
- 5 陈文杰主编. 血液分子细胞生物学. 第一版. 中国医药科技出版社, 1993.
- 6 Nienhuis AW, et al. Advances in thalassemia research. Blood 1984; 63: 738.
- 7 吴志奎,等. 肾生髓理论分子基础的研究. 中医杂志 1996; 37(2): 109.
- 8 吴志奎,等. 采用细胞CT分析技术研究补肾生血药保护骨髓作用的分子基础. 中药药理与临床 1995; 11(3): 21.

注:本课题系国家自然科学基金资助项目(39270857)

全国常见病中医辨证施治及验方应用研讨会 征文通知

由中国中医药学会和中医杂志社联合主办的“全国常见病中医辨证施治及验方应用研讨会”将于1997年10月在北京举行。现将有关事项通知如下:

征文内容:(1)名老中医治疗常见病的经验总结;(2)临床辨证施治常见病的经验;(3)临床用单方、验方治疗常见病的体会;(4)中医和中西医结合治疗常见病的新成果、新技术、新经验介绍;(5)常见病的基础研究及理论探讨;(6)针灸和推拿治疗常见病的经验;(7)单味中药治疗常见病的经验;(8)常见病的预防与康复。

征文要求:(1)征文截止日期为1997年5月5日;(2)文稿要求字迹工整,字数在2000~3000字,请自留底稿,字迹潦草者不予审阅,尽量不用表格;(3)每位作者只限投一篇;(4)文稿中的计量单位均须采用法定计量单位,如“克”应为“g”,“毫升”应为“ml”,“白细胞5000/mm³”应为“白细胞5×10⁹/L”等等;(5)文题下署作者姓名、作者单位名称、地址、邮政编码请写在稿纸首页末尾;(6)文稿务请加盖单位公章;(7)征文经专家评审,符合《中医杂志》入选要求者,收入《中医杂志》1997年增刊中,并由中国中医药学会和中医杂志社联合颁发论文证书。会议具体时间、地点另行通知。

联系地址:北京东直门内北新仓18号,中医杂志社科技服务中心,邮政编码:100700,联系人:牛易。

(广告编号:970209)