

综 述

再生障碍性贫血中医药实验研究概况

梁 毅* 陈志雄* 指导:丘和明*

主题词 贫血,再生障碍性/中医药疗法

再生障碍性贫血(简称“再障”)是临床较常见的一种难治性血液病,属中医学“虚劳”、“血证”等范畴。近10年来有关中医中药与再障的实验研究业已广泛开展,现综述如下。

1 在骨髓造血细胞分化、增殖方面的研究

再障发病的主要因素之一在于造血干(祖)细胞内在的增殖缺陷,而体外培养骨髓造血祖细胞(CFU-GM、CFU-E、BFU-E等)直接反映了机体骨髓的造血状况,尽管近年来较之以往在此方面的研究并无大的进展,但用于反映机体的造血能力,该方面的变化仍然具有很大的意义。

中医认为“肾主骨生髓、藏精”、“精血互生”,而再障发病的关键在于“肾虚、髓枯”,因此“补肾填精”已被认为是治疗再障的基本法则,并在此基础上兼以益气、养血、活血化瘀等治法。研究表明以“补肾”为核心组成的中药复方可促进骨髓有核细胞的增殖和骨髓细胞体外培养CFU-S、CFU-GM、CFU-E、BFU-E的形成^[1-7],但不同的治法及不同的中药配伍有着一定的差异,其中温补肾阳法(红人参、鹿茸、补骨脂、鹿角霜等)较之滋补肾阴法(西洋参、天冬、生地黄等)具有明显的优势^[8];补肾兼益气、养血的复方较之单纯补血的复方,效果更为显著^[6];填精补血方(熟地黄、枸杞子、淫羊藿、黄芪、当归等)在提高药物急、慢性致损小鼠骨髓细胞的CFU-E、CFU-D、CFU-S增殖分化作用方面,其效果明显优于活血生血方(赤芍、桃仁、牡丹皮、生地黄、当归等);并提出同一“血虚证”由于证情不同要求有不同的治法方药,体现了不同血虚证情的不同补血治法^[9]。临床观察到再障肾阳虚型患者的骨髓细胞体外培养CFU-GM、CFU-E和BFU-E的产率明显高于阴虚型;中药复方治疗的效果也显示出对肾阳虚者疗效显著,而对肾阴虚者较差;体现了中医理论“阳虚易治,阴虚难调”客观实际^[10]。另外,单味中药如黄芪、白术药液可直接作用于患者骨髓培养细胞而促进造血干、祖细胞的增殖和分化而具有补血作用^[11]。

2 与调节免疫功能及细胞因子关系的研究

细胞免疫功能的紊乱与造血功能衰竭有着密切的关系,再生障碍性贫血普遍表现为T淋巴细胞亚群失衡与紊乱,异常激活的CD₈细胞及造血负调控因子的过度表达,均能抑制骨髓的造血。因此在中医药治疗再障的疗效机理研究方面,免疫学领域的研究十分活跃。临床观察到再障患者血清中NK、CD₃、

CD₄、CD₄/CD₈水平显著低于正常,而IL-2、CD₈则明显升高,其中以脾肾阴虚型尤为明显;脾肾阳虚型和脾肾阴虚型之间区别比较明显的是NK、CD₄、CD₈和CD₄/CD₈等,中药健脾补肾活血复方(黄芪、党参、白术、当归、熟地黄、女贞子、何首乌、补骨脂、菟丝子、丹参、三七、鸡血藤、甘草等)可以增强免疫调节细胞的活性,减少造血负调控因子的产生,从而减轻对骨髓造血的抑制;从治疗效果比较,健脾补肾活血方对脾肾阳虚型再障的效果优于脾肾阴虚型^[12]。但孙伟正则认为补肾中药并不能降低IL-2水平^[8],这是否与复方的配伍有关有待进一步地探讨。sIL-2R是来自细胞膜上的低亲和力受体P55蛋白,它可与细胞膜IL-2受体竞争结合IL-2,作用类似于封闭因子;它可以中和活化T细胞周围的IL-2,减弱机体的自分泌效应,发挥免疫调节和免疫抑制作用。研究观察到再障患者治疗前的血清sIL-2R水平显著低于正常值,而应用补肾泻肝方治疗的早、中、后不同时期其血清中的sIL-2R水平则有很大的差别,且不同程度地高于无效治疗组,结合以往的研究^[13],提出中药补肾泻肝方是通过降低IL-2,升高血清sIL-2R水平,同时减弱IL-2的效应而起作用的^[14]。

动物实验表明,中药补肾生血复方可不同程度地提高再障小鼠的Th细胞、降低Ts细胞,使Th/Ts比值升高;减少IFN- γ 等造血负调控因子释放^[15,16];促进IL-3、IL-6样活性物质的分泌等^[6];提示中药补肾生血方药能减轻免疫异常对骨髓造血细胞的抑制和损伤,促进再障骨髓造血功能的修复和重建。周霁祥等^[2]研究提出益肾生血片(熟地黄、补骨脂、当归、黄芪、旱莲草、仙鹤草等)能提高机体的非特异性免疫力、提高机体抵抗感染和抗低血红蛋白时的缺氧状态。

再障病人还表现出红细胞免疫功能的低下,如红细胞C3b受体花环数量明显减少,红细胞免疫复合物花环率(RICR)增高等;其原因可能在于骨髓造血功能障碍,生成的红细胞数量少、质量低,使附着于膜上的C3b受体减少,从而导致与之发生粘附作用的RICR的下降,血液循环中过多的CIC不能及时清除而升高。而中药生血复方则可提高红细胞免疫功能^[17]。

3 骨髓细胞抗原表达和细胞周期的研究

有研究采用流式细胞仪技术检测出再障患者和免疫介导再障小鼠模型的CD₃₄抗原表达量低于正常人或正常小鼠;而经中药治疗后其CD₃₄阳性率则显著提高。同样,治疗后再障病人的CD₁₀抗原分子表达水平也有明显的区别。提示中药补髓生血复方(生地黄、熟地黄、山茱萸、枸杞子、桑椹子、五味子、何首乌、当归、麦冬、阿胶、人参、菟丝子、淫羊藿、补骨脂、巴戟天、附子、黄芪、鹿角胶等)或川芎嗪可以促进骨髓造血细胞的分化、增殖^[18,19]。研究还提出川芎嗪可能是通过促进骨髓微血管

* 广州中医药大学第一附属医院内二科,广州市机场路12号(510407)

收稿日期:2000-05-30;修回日期:2000-09-01

的修复,增加骨髓供氧,促进基质细胞生长及其粘附功能,改善骨髓微环境,增加免疫介导再障小鼠骨髓细胞 CD₃₄ 抗原表达^[18]。对小鼠再障模型的研究表现出其骨髓细胞 CD_{49d}、CD_{49e} 及 VCAM-1 的表达水平明显低下,细胞周期蛋白 D₂ 的表达显著降低,处于 G₀+G₁ 期的细胞数明显高于正常;在应用中药复方活血汤(丹参、当归、川芎、赤芍按 2:2:1:1 比例组成)及川芎嗪治疗后上述状况则明显改善;研究提出复方活血汤及川芎嗪能增强再障小鼠骨髓造血细胞粘附分子配体的表达,促进细胞的增殖,加强基质细胞与造血细胞相互作用,从而促进骨髓造血细胞的增生^[20,21]。在多组对照研究中,显示出补肾活血方可以促进骨髓抑制小鼠骨髓细胞 DNA 的合成,保护骨髓并促进骨髓细胞由 G₁ 期进入 S 期;而健脾复方则无此作用^[22]。

4 骨髓超微结构及造血微环境的研究

造血微环境是支持和调节造血细胞生长发育的内环境,主要由血窦系统、窦间基质细胞和细胞外基质组成。它们通过与造血细胞密切接触和分泌细胞因子调节造血,其结构和功能完整性对于快速更新的造血细胞的增殖、分化十分重要。再障发病与骨髓造血微环境的损伤有着密切的关系,通过大量的、尤其是在动物方面的研究,已经证实中药复方对于再障动物模型的骨髓造血微环境具有显著的改善作用。研究报告了再障小鼠模型的骨髓造血细胞和基质细胞的线粒体肿胀变性,骨髓网状纤维减少,血窦舒张、渗出、瘀血、出血,血窦壁菲薄甚则断裂和结构等多种改变;中药补肾活血方可改善小鼠的骨髓微环境,促进网状纤维、微血管的增生^[15,23,24]。其中补肾益气活血方(淫羊藿、仙茅、鸡血藤、肉苁蓉、黄芪、党参、白术等)的效果优于补肾养血活血方(菟丝子、巴戟天、当归、丹参、熟地黄、何首乌、补骨脂、阿胶等)^[23],填精补血方的效果优于活血生血方^[25],体现出不同治法的疗效区别。

骨髓基质细胞是构成骨髓造血微环境的主要组成部分,在调节造血细胞的增生和分化中起活性作用。研究表明,再障小鼠模型的骨髓细胞体外培养的成纤维细胞集落形成较正常小鼠明显减少,其基质细胞层对正常小鼠骨髓细胞的粘附能力也显著下降;中药复方活血汤则可促进小鼠骨髓培养基质细胞集落的形成和对正常小鼠骨髓细胞的粘附能力;表明该复方通过改善再障小鼠模型的骨髓造血微环境而具有增强造血的功能^[26,27]。另外骨髓生血胶囊也可以通过增加骨髓细胞 CFU-F 集落的形成,改善骨髓造血微环境,而促进骨髓造血功能^[1]。

5 其他方面的研究

朱跃岚等^[24]报道了 38 例慢性再障患者的全血超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活力明显低于正常人,而骨髓生血胶囊则可以显著改善这种状况,表明该方是通过提高慢性再障患者全血 SOD 及 GSH-PX 活力,起到清除体内自由基,减轻细胞内膜系统损伤,从而促进骨髓组织结构恢复的作用。

许多研究表明,人体内生物氧化酶代谢紊乱、骨髓细胞嗜银蛋白(AgNORs)含量及颗粒减少与再障发病密切相关,这些因素促进了细胞的衰老、凋亡,导致骨髓基质细胞微环境的障

碍,阻碍了造血干细胞的增殖、分化。王树庆等^[28,29]采用计算机图像分析技术,测定出再障患者的骨髓细胞内细胞色素氧化酶(CCO)、琥珀酸脱氢酶(SDH)及骨髓有核细胞 AgNORs 含量与颗粒总数明显减低,中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)含量明显增高。经补肾化痰汤治疗后,CCO、SDH、AgNORs 含量及颗粒总数显著增高,NAP 含量有所降低,比治疗前有明显改善。据此推论补肾化痰汤(熟地黄、丹参、鸡血藤、山茱萸、枸杞子、菟丝子、补骨脂、旱莲草、红花、桃仁、当归、川芎、牛膝等)可能通过上述作用而使微血管扩张、血流加速,刺激骨髓基质细胞造血细胞内酶及 AgNORs 含量的变化,减少慢性再障致病因子对 rDNA 转录水平的抑制,改善了骨髓缺血、缺氧状态,促进造血干细胞的增殖分化;或者是直接作用于造血干细胞(CFU-S),导致 CFU-S 核中 AgNORs 含量和颗粒总数增加,启动了 rDNA 的转录和蛋白合成活性,使造血细胞的增殖、分化加速,进而使骨髓造血功能得到恢复重建。

6 再障动物模型

近年来,关于再障动物模型的制作已有了很大的发展,研究人员采取注射化学药物、射线照射以及免疫介导等方法模拟出再障动物模型,分别从骨髓造血干(祖)细胞、免疫学、微循环、微量元素、血细胞化学、血液生化及分子生物学等方面对它们进行了广泛的研究,尤其在方药作用机理的研究方面,发挥着重要作用。

用化学药物制作再障动物模型,因其方法操作简便、效果稳定,目前仍广泛地应用于中医药实验研究中,复制出的动物模型表现出骨髓造血干细胞增殖分化抑制、骨髓有核细胞增生减少等,具备了再障的典型特征。如采用小鼠连续灌服马利兰^[2]及腹腔注射马利兰^[9,23]等,或环磷酰胺小鼠和大鼠腹腔、尾静脉注射法制再障模型^[4,9,22,25],用于研究观察各种不同中药复方对模型鼠在骨髓造血增殖功能、骨髓造血微环境、细胞增殖周期、细胞凋亡及骨髓超微结构等多种方面的影响。⁶⁰Co 照射动物可以直接破坏其骨髓造血系统,形成类似于再障的动物模型,在中医中药的实验研究中仍在应用^[3,8,26]。但因化学药物和辐射对模型的作用表现为骨髓短暂的抑制反应,有一定的自我恢复性,因此使研究的结论受到部分影响。

免疫介导型再障小鼠模型的建立首创于 1967 年。其机理在于 Balb/c 小鼠经亚致死量照射后,机体的免疫功能严重受损,再输入基因 H-2 相同,但 MLS 抗原不同的 DBA/2 小鼠的胸腺、淋巴结混合细胞,这些免疫活性细胞在宿主体内生存,并产生造血抑制细胞和血浆 CFU-GM 抑制活性,从而导致造血干细胞数量明显减少并出现缺陷,使自身复制的速率低于分化率,最终引起全血细胞减少。实验表明^[30],采用免疫介导法复制的小鼠再障模型,其发生率为 96.7%,发生时间稳定,实验重复性好,推迟了死亡的时间,为开展再障机制及方药作用机理的研究提供了又一种良好的模型。因此免疫介导再障动物模型被广泛用于诸如骨髓细胞培养、细胞免疫、细胞因子、细胞抗原表达、细胞周期、骨髓造血微环境等方面的研究^[6,15,16,18,20,21,23,27],在揭示再障的现代分子生物学机制及中药复方的作用机理方面,发挥着重要的作用。

7 述评与展望

特点:(1)以再生障碍性贫血为专题进行的中医药方面的研究至今已有数十年的经历,比较主要的研究成果,可以看出其发展趋势为由临床证候分型研究为主逐步过渡到再障中医药治疗临床疗效的观察,治则治法的比较性研究,以至近年来广泛开展的以实验为基础的临床及动物实验研究。(2)围绕再障的中医药实验方面的研究从普通的外周血细胞计数、骨髓细胞计数、祖细胞培养、骨髓超微结构、自由基、基质细胞、细胞免疫功能、细胞因子到细胞周期、蛋白表达等,广泛研究了中医药对再障病人及动物模型的作用及影响,为临床治疗、预后提供了可靠的指导。(3)动物模型的建立为药物的筛选和药效机理的探讨提供了不可替代的实验对象,造模方法也经历了由单纯化学药物应用、射线照射等发展到采用复合因素如免疫介导法制模,使模型的稳定性、可靠性进一步提高。

存在问题及设想:(1)对再障中医病因病机研究的不足。以往对再障病因病机的讨论一直限于“虚劳”范畴中,对其病因病机的系统的中医理论方面的探讨和归纳不尽全面,从而使其具有区别于其他“虚劳”证候的病因病机基础和辨证体系。因此,尚须通过临床和动物实验加强系统化的观察和探讨。(2)尽管再障动物模型在实验研究中起主导作用,且造模方法也在不断改善,但由于致模因素的片面性,难以概括再障的全部。所以应一方面探索更客观实际的模型制作手段,另一方面加强临床方面的观察研究,结合两个方面优势。(3)在实验水平上,再障的中医药疗效机理的研究在近3年发展较快一些,部分研究已达到分子细胞生物水平,客观地阐明了中医药治疗再障的作用机理,但仍须不断借鉴中医药学和现代医学最新的研究方法和思路,如在细胞凋亡、细胞周期、蛋白表达和中药血清药理学等方面进行结合研究。(4)以再障为前提,结合现代医学有关的临床及基础研究,广泛深入地筛选治疗再障的药物,并在研究中医复方基础上进行拆方研究,优化组合,形成更合理有效的复方。

参考文献

- 赵新广,王祥麒,朱跃岚,等.补髓生血胶囊对慢性再障患者造血干/祖细胞作用的实验研究.中医药信息,1998,15(3):53-55.
- 周蔼祥,王天恩,杨经敏,等.益肾生血片治疗再生障碍性贫血的实验研究.中国中西医结合杂志,1999,19(3):170-173.
- 曹克俭,俞亚琴,曹慧演,等.中药补髓生血I、II号冲剂对小鼠骨髓造血干(祖)细胞CFU-S、CFU-D、CFU-E的影响.天津中医学院学报,1996,(2):40-42.
- 王炯,杨贵贞.“秘灵王”对骨髓受抑模型鼠的免疫调整作用.中国免疫学杂志,1997,13(6):358-360.
- 孙伟正,曲佳丽,姚洪义,等.慢性再生障碍性贫血中医辨证治疗和免疫、骨髓造血祖细胞关系的研究.中医药信息,1994,11(3):39-43.
- 梁毅,鲁新华,陈如泉.中药复方对免疫介导小鼠再生障碍性贫血造血祖细胞的影响.中国中医基础医学杂志,1999,5(6):13-15.
- 王苏,杨吉成,吴葆德,等.中药复方制剂对再障红系造血细胞体外增殖的实验研究.中国实验临床免疫学杂志,1997,9(5):51-61.
- 刘爱华,毕鸿雁,崔树岭,等.温肾阳与滋肾阴方治疗再生障碍性贫血实验研究.山东中医杂志,1998,17(4):176-177.
- 谢鸣,王绵之,谢仁敷.中医补血法的实验研究——填精补血方和活

血生血方对小鼠骨髓造血的影响.北京中医学院学报,1992,15(4):23-26.

- 虞荣喜,罗秀素,高瑞兰,等.69例再生障碍性贫血分型和中西医结合治疗的研究.中国中西医结合杂志,1994,14(1):14-17.
- 后盾,吴正翔,黄茂,白术对再生障碍性贫血骨髓红系造血祖细胞促增殖作用的实验研究.江西中医学院学报,1999,11(1):28.
- 周永明,黄振翘,薛志忠,等.健脾补肾活血方对再生障碍性贫血有关免疫学指标的影响.上海中医药杂志,1998,(12):12-14.
- 黄韬,黄振翘,周永明,等.补肾泻肝方对再生障碍性贫血造血与免疫失调治疗的实验研究.中国中西医结合杂志,1998,(18)增刊:189.
- 黄韬,黄振翘,周永明.补肾泻肝方对再生障碍性贫血的疗效与血清sIL-2R关系的研究.上海中医药杂志,1999,(5):47-48.
- 周永明,黄韬,薛志忠,等.生血合剂对免疫介导再生障碍性贫血小鼠作用的实验研究.中医药研究,1998,14(5):43-46.
- 史仪谦,汤金土,陈瑜.中药对免疫介导性再生障碍性贫血T淋巴细胞的实验研究.中国中医急症,1998,7(3):128-130.
- 薄红,刘传瑞,范东明.补髓生血冲剂对慢性再生障碍性贫血患者红细胞免疫功能、血清CIC、补体C3的作用.中国中医药科技,1999,6(2):101.
- 舒砚君,孙汉英,董凌莉,等.川芎嗪对免疫介导再生障碍性贫血小鼠骨髓细胞CD34抗原表达的影响.中国中西医结合杂志,1998,18(2):107-108.
- 孙伟正,王祥琪,袁斌华,等.应用“补髓生血冲剂”治疗24例慢性再生障碍性贫血骨髓CD34、CD10变化规律的分析.中医药信息,1994,11(2):28-30.
- 孙汉英,董凌莉,刘文励,等.复方活血汤对再生障碍性贫血小鼠骨髓造血细胞粘附分子及细胞周期蛋白表达作用.中国中西医结合杂志,1999,19(2):100-102.
- 董凌莉,刘文励,孙汉英,等.川芎嗪对再生障碍性贫血小鼠骨髓细胞粘附分子作用研究.中华血液学杂志,1999,20(4):178-179.
- 陈志雄,曹克俭,薛恺睿,等.活髓片对环磷酸胺造模小鼠骨髓细胞DNA含量及细胞周期的影响.中医杂志,1999,40(11):686-687.
- 王运津,吴正祥.补肾活血方对慢性骨髓障碍小鼠的实验研究.天津中医,1995,12(6):32-33.
- 朱跃岚,孙伟正.补髓生血胶囊治疗慢性再生障碍性贫血临床研究.北京中医药大学学报,1998,21(5):48-49.
- 谢鸣,黄启福,王绵之.中医补血法的实验研究——填精补血方和活血生血方对环磷酸胺损伤小鼠骨髓作用的电镜观察.北京中医学院学报,1991,14(4):36-38.
- 刘文励,黄伟,何美冬,等.复方活血汤对辐射损伤小鼠骨髓基质细胞粘附功能的影响.中国中西医结合杂志,1997,17(6):354-355.
- 舒砚君,孙汉英,刘文励,等.复方活血汤对免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓造血微环境作用的研究.中国中西医结合杂志,1998,18(6):359-361.
- 王树庆,刘捷,李建华,等.补肾化痰法对再生障碍性贫血骨髓细胞酶学指标的影响.中医杂志,1998,39(2):88-89.
- 王树庆,李建华,张圣明,等.补肾化痰法对再生障碍性贫血骨髓细胞核仁组成区嗜银蛋白的影响.中国医药学报,1997,12(1):16-18.
- 周永明,黄韬,薛志忠,等.免疫介导再生障碍性贫血的实验研究.中国实验血液学杂志,1998,6(1):59-62.