

愈障汤治疗慢性再生障碍性贫血 40 例临床研究

王树庆¹ 魏学礼¹ 解丽君¹ 刘捷¹ 李建华¹ 张圣明² 陈红霞³ 李公宝¹

摘要 目的:探讨愈障汤治疗慢性再生障碍性贫血(CAA)的临床疗效及其对骨髓 CD₃₄ 细胞凋亡的调控作用。方法:79 例 CAA 患者随机分为西药常规加愈障汤组 40 例(治疗组)和西药常规组 39 例(对照组),观察临床疗效,并采用磁式细胞分选器(MACS)分离纯化骨髓 CD₃₄ 细胞;采用 SABC 亲和细胞法和 CMAS 系列多功能真彩图像分析仪检测骨髓 CD₃₄ 细胞 bc1-2 的表达。结果:治疗组、对照组的总有效率分别为 87.50% 和 61.54%。治疗组疗效明显优于对照组($P < 0.01$),治疗组治疗后骨髓 CD₃₄ 细胞 bc1-2 的表达阳性率和 OD 值均显著高于对照组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。结论:愈障汤治疗 CAA 疗效可靠,安全无毒。其作用机制可能是通过上调凋亡抑制基因 bc1-2 的表达,从而阻碍了骨髓 CD₃₄ 细胞的过度凋亡。

关键词 贫血,再生障碍性/中医药疗法 @ 愈障汤

新近研究表明,再生障碍性贫血(AA)的发病与骨髓 CD₃₄ 细胞过度凋亡密切相关^[1],而补肾活血中药能抑制 CD₃₄ 细胞凋亡^[2]。为进一步探讨其作用机制,本课题组于 1996 年 1 月~2001 年 1 月对 40 例慢性再生障碍性贫血(CAA)患者用补肾活血通络为主的经验方愈障汤治疗,并于治疗前后分别检测了骨髓 CD₃₄ 细胞抑凋亡基因 bc1-2 的表达,以期为本方从抗凋亡角度治疗 CAA 提供更客观的理论依据。现报道如下。

1 临床资料

1.1 诊断标准:所有病例的诊断均符合 1987 年中华血液学会第四届全国再生障碍性贫血学术会议制定的诊断标准^[3]。

1.2 病例资料:所有病例来源于潍坊医学院附属医院及潍坊市人民医院的住院患者,采用单盲法随机分为愈障汤加西药常规治疗组(治疗组)和西药常规治疗组(对照组)。治疗组 40 例,男 23 例,女 17 例;年龄 6~70 岁,平均 28.55 ± 14.65 岁;原发性 22 例,继发 18 例;初诊者 16 例,复诊者 24 例;病程 0.5~250 个月,平均 36.0 ± 50.4 个月;血红蛋白 $12.5 \sim 98.5$ g/L,平均 50.63 ± 18.77 g/L;白细胞 $(1.3 \sim 4.05) \times 10^9$ /L,平

均 $(2.47 \pm 0.68) \times 10^9$ /L;血小板 $(12.5 \sim 74) \times 10^9$ /L,平均 $(38.32 \pm 16.33) \times 10^9$ /L;网织红细胞 0.01%~1.35%,平均 $(0.59 \pm 0.35)\%$;骨髓增生重度减低 17 例,增生减低 15 例,增生活跃 8 例。对照组 39 例,男 24 例,女 15 例;年龄 9~67 岁,平均 30.46 ± 17.56 岁;原发性 22 例,继发 17 例;初诊者 16 例,复诊者 23 例;病程 0.6~240 个月,平均 38.6 ± 48.9 个月;血红蛋白 $27.5 \sim 90.5$ g/L,平均 51.71 ± 12.81 g/L;白细胞 $(1.45 \sim 3.4) \times 10^9$ /L,平均 $(2.4 \pm 0.52) \times 10^9$ /L;血小板 $(18.9 \sim 76) \times 10^9$ /L,平均 $(37.76 \pm 16.61) \times 10^9$ /L;网织红细胞 0.03%~1.3%,平均 $(0.55 \pm 0.36)\%$;骨髓增生重度减低 17 例,增生减低 13 例,增生活跃 9 例。两组资料数据经统计学处理,差异无显著性($P > 0.05$),具有可比性。另设健康对照组 26 例,其中男 18 例,女 8 例;年龄 19~48 岁,平均 33.3 ± 8.6 岁,均系健康的患者家属或志愿者。

2 治疗及观察方法

2.1 治疗方法:治疗组用愈障汤加西药常规治疗。愈障汤方药组成:生地黄 40g,菟丝子 30g,枸杞子 30g,鸡血藤 30g,女贞子 20g,旱莲草 20g,当归 10g,制马钱子 3~6g。常规煎法,每日 1 剂,每剂分 2 次服,每周服 5 剂,休息 2 天。儿童酌情减量,马钱子从小量开始,根据耐受性逐渐加量。西药常规治疗:康力龙,每次 2~4mg,每日服 3 次;硝酸一叶萩碱 16mg,肌肉注射,每日 1 次;辅酶 Q₁₀,每次 10mg,每日服 3 次。对照组除不用愈障汤外,其他治疗同治疗组。合并感染、发热者用抗生素;血红蛋白量低于 50g/L 者,酌情输浓缩红细胞;出血倾向明显,血小板数低于 10×10^9 /L 者,可酌情输注血小板。两组均以 3 个月为 1 个疗程,治疗两个疗程后判定疗效。

2.2 样品制备:无菌采集患者及健康对照者骨髓 2~3ml,肝素抗凝,以 PBS 2 倍稀释后,加入淋巴细胞分离液(相对密度 1.077), $400 \times g$ 梯度离心 20min,收集单个核细胞(MNC),以 PBS 洗涤 2 次后备用。

2.3 骨髓 CD₃₄ 细胞的分离纯化:采用单克隆抗体免疫磁珠分选器(MACS)分离骨髓 CD₃₄ 细胞(MACS 分选器及试剂盒购自德国 Miltenyi Biotec 公司,批号 567-01),分离步骤按说明书操作。将分离的细胞涂于多聚赖氨酸处理的印孔载玻片上,纯丙酮固定 30min,干

基金项目:国家中医药管理局资助项目(00-01LP37),山东省科委资助项目(971226209)

1 潍坊医学院附属医院中医科,山东省潍坊市奎文区虞河路 465 号(261031)

2 潍坊医学院组织胚胎教研室

3 山东大学齐鲁医院

收稿日期:2002-04-12;修回日期:2002-05-27

燥后置于-20℃冰箱中保存备用。CD₃₄细胞纯度鉴定采用酶联免疫法(试剂盒购自中国人民解放军军事医学科学院)。

2.4 bcl-2 蛋白表达的检测:采用 SABC 亲和细胞化学法(bcl-2 试剂盒由武汉博士德公司提供),以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

2.5 吸光度(OD)值测定:采用 CAMIAS 系列多功能真彩图像分析仪(北京航空航天大学生产),在 20 倍物镜下,每张涂片随机选 50 个 bcl-2 阳性细胞,经确定灰度后,测定阳性细胞的 OD 值。

2.6 统计学处理:计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验;临床分级资料采用 *Ridit* 分析。

3 治疗结果

3.1 疗效标准:参照 1987 年第四届全国再生障碍性贫血学术会议制定的疗效标准^[3]。

3.2 治疗结果:治疗组 40 例,基本治愈 15 例,缓解 10 例,明显进步 10 例,无效 5 例,总有效率 87.50%;对照组 39 例,基本治愈 8 例,缓解 7 例,明显进步 9 例,无效 15 例,总有效率 61.54%。经 *Ridit* 分析,两组总有效率差异有显著性($P < 0.05$),治疗组优于对照组,见表 1。临床用药起效时间,治疗组有效的 35 例中,最短 87 天,最长 390 天,平均 192.14 ± 73.65 天;对照组有效的 24 例中,最短 110 天,最长 405 天,平均 239.92 ± 82.72 天。治疗组起效时间明显短于对照组,两组起效时间差异有显著性($P < 0.01$)。两组治疗前后均常规检查肝肾功能、心电图等。对照组有 4 例丙氨酸转氨酶(ALT)升高,15 例出现不同程度的痤疮、多毛等,治疗组无一例出现肝肾功能损害。说明愈障汤毒副作用较少。

3.3 骨髓 CD₃₄ 细胞纯度鉴定、bcl-2 蛋白表达及 OD 值分析:骨髓 CD₃₄ 细胞纯度达 90%~95%。bcl-2 蛋白阳性产物多数在 CD₃₄ 细胞胞浆中呈弥散状分布,部分呈团块状或颗粒状,有的出现于细胞膜及核膜上。阴性对照样品中未见阳性细胞。两组患者 bcl-2 蛋白阳性产物阳性率和 OD 值治疗前均较健康组显著降低($P < 0.01$),治疗后显著升高($P < 0.01$),但两组阳性率与健康对照组比较仍有一定差距($P < 0.01$),而 OD 值与健康对照组差异无显著性($P > 0.05$)。治疗组升高幅度明显高于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 2。

3.4 bcl-2 蛋白表达与临床疗效的相关性:治疗前骨髓 CD₃₄ 细胞 bcl-2 蛋白表达越低者,疗程越长,预后越差;反之预后越好。治疗后两组治愈、缓解病例的 bcl-2 蛋白表达已接近或达到健康对照组水平,表明 bcl-2

表 1 两组临床疗效比较[例(%)]

组别	例数	基本治愈	缓解	明显进步	无效	总有效
治疗组	40	15(37.50)	10(25.00)	10(25.00)	5(12.50)	35(87.50)
对照组	39	8(20.51)	7(17.95)	9(23.08)	15(38.46)	24(61.54)

表 2 两组治疗前后骨髓 CD₃₄ 细胞 bcl-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	阳性率(%)	OD 值
健康对照组	26	89.85 ± 6.87	0.0974 ± 0.0150
对照组	治疗前	39 25.85 ± 7.78*	0.0619 ± 0.0156*
	治疗后	39 50.92 ± 17.14*△	0.0837 ± 0.0190△
治疗组	治疗前	40 28.03 ± 9.76*	0.0605 ± 0.0166*
	治疗后	40 65.10 ± 14.79*△▲	0.0937 ± 0.0160△▲

与健康对照组比较,* $P < 0.01$;与本组治疗前比较,△ $P < 0.01$;与对照组治疗后比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

蛋白表达与临床疗效呈正相关。

4 讨论

AA 的主要发病环节是原发性或继发性骨髓 CD₃₄ 细胞量或质的异常。近年研究发现^[4],AA 患者骨髓 CD₃₄ 细胞过度凋亡是其数量减少的原因之一。原癌基因 bcl-2 在细胞凋亡调控过程中具有重要作用,可抑制细胞凋亡,延长细胞寿命。我们前期的研究亦证实,CAA 患者骨髓 CD₃₄ 细胞 bcl-2 蛋白表达明显低于正常人,或几乎不表达。这为我们能否通过药物上调 bcl-2 蛋白表达,抑制 CD₃₄ 细胞过度凋亡,从而实现靶向性治疗 CAA 提供了启示。CAA 属中医“虚劳”、“血证”等证范畴。“肾主骨、生髓、藏精”,“血为精所化”,“久虚必瘀”,“肾精亏虚、髓海瘀阻”发为虚劳。实验研究表明,补肾活血药可改善骨髓微环境,提高机体免疫功能,对造血细胞分化、增殖和自我复制有促进作用,并能提高骨髓细胞 DNA 含量^[5]。活血药可增加 AA 小鼠骨髓 CD₃₄ 细胞抗原分子表达^[6]。愈障汤宗补肾活血通络之治则组方,通过对 40 例 CAA 患者临床观察表明,本方组方合理,疗效可靠。与西药常规治法配伍应用,相得益彰,取得了总有效率为 86.7% 的较高疗效。且起效快,毒副作用少,未发现明显的肝肾功能损害及心电图等改变。治疗后,骨髓 CD₃₄ 细胞 bcl-2 蛋白表达的阳性率和 OD 值均较治疗前显著增高,且增高幅度显著高于对照组($P < 0.01$),表明骨髓 CD₃₄ 细胞 bcl-2 蛋白表达与临床疗效呈正相关。这对 CAA 的诊断、治疗和预后具有重要的临床指导意义。其作用机制可能是通过补肾活血通络,改善骨髓微环境,调节免疫功能,或直接作用于骨髓 CD₃₄ 细胞,上调 bcl-2 的表达,从而抑制了 CD₃₄ 细胞的过度凋亡,促进了

(下转第 118 页)

表2 两组患者治疗前后血清HA、LN、PCⅢ、N-C测定结果比较($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HA	LN	PC Ⅲ	N-C
治疗组	治疗前	52 490.2±253.5	153.7±54.2	240.1±105.8	110±53.8
	治疗后	52 210.3±179.6*·△	116.3±37.8*·	150.3±99.2*·	57.0±48.7*·
对照组	治疗前	48 461.1±262.3	158.3±60.7	247.1±110.4	101.5±54.7
	治疗后	48 343.5±205.0*	140.2±48.1	192.7±102.3	87.0±53.2

与本组治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.05$

两组比较, 差异有显著性($P < 0.05$)。

3.3 两组治疗前后血清肝纤维化指标测定结果比较: 表2示, 治疗组治疗后血清肝纤维化指标HA、LN、PCⅢ、N-C均较治疗前显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而对照组仅有HA治疗后有显著降低($P < 0.05$), 此项指标两组治疗后比较差异有显著性($P < 0.05$), 治疗组优于对照组。

3.4 药物不良反应: 经补阳还五汤治疗3个月, 所有患者血、尿、大便常规及血清BUN、Cr治疗前后无变化, 也无明显不良反应。

4 讨论

肝纤维化是慢性肝病共有的病理特征, 是各种病因导致肝硬化的病理基础, 肝纤维化是可逆性病变, 肝硬化则不可逆^[4], 因此阻断及逆转肝纤维化是治疗肝硬化乃至减少肝癌发生的关键, 而西药对肝纤维化的治疗尚缺乏理想的药物和方法, 目前认为有一定疗效的药物如干扰素等, 副作用大, 费用高, 疗效尚不确切。为此在本研究中以临床的常规治疗作为对照来观察补阳还五汤抗肝纤维化的作用。中医学认为, 肝硬化属中医“症瘕”、“臌胀”之范畴, 从中医辨证来看, 早期肝硬化往往是以气虚血瘀或其他证型兼有血瘀为常见。因此, 我们采用益气活血之法, 选用经典方补阳还五汤治疗。该方出自于《医林改错》, 为清代王清任所创, 原为治疗中风及中风后遗症的要方, 但依据其益气活血的原理, 取其“补”、“通”兼施之功, 我们将其用于抗肝纤维化的治疗, 也取得了良好的疗效。方中黄芪健脾益气, 当归补血活血, 川芎、赤芍、桃仁、红花、地龙活血化瘀。而现代研究亦表明, 黄芪中的黄芪皂甙具有抗肝损

伤的作用, 能减轻肝中毒引起的病变^[5], 且黄芪尚有防治肝纤维化的作用, 可抑制体外培养的成纤维细胞, 并可激活胶原蛋白的降解^[6], 当归的有效成分阿魏酸钠的作用, 是使TXA₂/PGI₂水平趋于正常, 减轻了TXA₂对低温保存肝脏的损伤作用, 增强了PGI₂的保护作用^[7]。赤芍的有效成分芍药甙能改善肝脏微循环, 降低门脉压力, 促进肝纤维化组织学改变^[8]。诸药合用, 共奏益气活血之功效。本研究表明, 补阳还五汤可较好地改善临床症状及肝功能, 并对血清肝纤维化4项指标均有显著的降低作用, 且安全无明显副作用。提示其在阻断和逆转肝纤维化方面有重要的临床意义。

参考文献

- 1 段钟平, 王宝恩, 王泰岭, 等. 复方861冲剂治疗乙型肝炎肝纤维化. 中华肝病杂志, 1999, 7(1): 38-40.
- 2 病毒性肝炎防治方案(试行). 中华内科杂志, 1995, 34(11): 788-791.
- 3 中华医学会传染病寄生虫病学术会议. 病毒性肝炎防治方案. 病毒性肝炎诊断标准. 中华传染病杂志, 1995, 13(4): 241-247.
- 4 安永, 江正辉. 肝纤维化防治研究现状及展望. 中西医结合肝病杂志, 2001, 10(6): 1-2.
- 5 徐银娣. 黄芪皂甙抗实验性肝损伤的作用. 药理学, 1992, 27(6): 401-403.
- 6 吴晶新, 朱小新, 王智辉, 等. 活血化瘀中药对肝硬化患者血清Ⅲ型前胶原肽的影响. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(4): 298-300.
- 7 赵伟, 程颖, 刘永峰, 等. 当归对大鼠肝脏低温保存影响的实验研究. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(6): 347-349.
- 8 程明亮, 吴亚云, 黄科夫, 等. 基因工程干扰素与中药制剂并用抗乙型肝炎肝纤维化的临床研究. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(8): 453-455.

(上接第116页)

骨髓造血功能的恢复重建。

参考文献

- 1 Maciejewski JP, Salleri C, Sato T, et al. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34 cells of patients with aplastic anaemia. Br J Haematol, 1995, 91(1): 245-252.
- 2 孙伟正, 罗梅宏, 李海霞, 等. 补髓生血冲剂对慢性再生障碍性贫血患者血清可溶性Fas、肿瘤坏死因子、白细胞介素-2表达作用的影响. 中医杂志, 2001, 42(9): 546-547.

- 3 张之南, 沈悌主编. 血液病诊断及疗效标准. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998: 34-36.
- 4 Scopes J, Bagnara M, Gordon-Smith EC, et al. Haemopoietic progenitor cells are reduced in aplastic anaemia. Br J Haematol, 1994, 86(2): 427-430.
- 5 王树庆, 张圣明, 李建华, 等. 中西医结合治疗对慢性再生障碍性贫血患者红细胞寿命及膜蛋白的影响. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(5): 262-264.
- 6 舒晓君, 孙汉英, 董凌莉, 等. 川芎嗪对免疫再障小鼠骨髓细胞CD34抗原表达的影响. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(2): 87-89.