

补肾益髓法治疗 β -地中海贫血 92 例临床研究

吴志奎¹ 张新华² 柴立民¹ 李 敏¹ 蔡辉国³ 王 蕾¹
方素萍¹ 陈玉英¹ 吕鑫霞¹ 黄有文² 王荣新² 陈佩珍³

摘要 目的:研究中药益髓生血颗粒治疗 β -地中海贫血(β -地贫)的临床效果及其疗效特点的分子机制。方法:用补肾益髓法代表方益髓生血颗粒在广西高发区治疗 β -地贫 92 例,疗程 3 个月,观察治疗前后临床症状,血红蛋白(Hb)、抗碱血红蛋白(HbF)、红细胞(RBC)、网织红细胞(Ret)等血液参数变化及停药后随访观察,采用 PAGE、PCR-SSCP、RT-PCR、DNA 序列分析、mRNA 基因表达、DDRT-PCR 等技术研究疗效的分子机制。结果:经 3 个月治疗后,患者临床症状明显改善,Hb、HbF、RBC、Ret 等血液指标明显提高,停药后疗效平均维持 3~6 个月,92 例中 85 例有效,有效率 92.39%;中药治疗对各类基因型患者均有一定疗效,可明显提高血红蛋白珠蛋白 mRNA 表达和造血刺激因子 GM-CSF mRNA 表达,诱导 HbF 合成增加;降低铁蛋白基因表达,减少体内铁的蓄积。结论:益髓生血颗粒治疗 β -地中海贫血效果显著;中药治疗不改变患者基因突变型,可明显调节功能基因表达。疗效特点为多靶点的整体效应。

主题词 β -地中海贫血/中医药疗法 @ 补肾益髓

Clinical Study on the Method for Tonifying Kidney and Supplementing Marrow for Treatment of 92 Cases of β -Mediterranean Anemia

Wu Zhikui¹, Zhang Xinhua², Chai Limin¹, et al.

(Guang'anmen Hospital, China Academy of TCM, Beijing 100053; 2. No. 303 Hospital of PLA)

Objective: To study clinical effect and molecular mechanisms of Yisui Shengxue Granules for treatment of β -Mediterranean anemia. **Methods:** 92 cases of β -Mediterranean anemia in high morbidity regions of Guangxi were treated with Yisui Shengxue Granules, a representative recipe of the method for tonifying kidney and supplementing marrow, for 3 months. Clinical symptoms and signs, hemoglobin (Hb), alkali-resistant hemoglobin (HbF), red blood cell (RBC), reticulocytes (Ret) etc. before and after treatment were observed and followed up. The molecular mechanisms were studied with PAGE, PCR-SSCP, RT-PCR, DNA sequential analysis, mRNA gene expression, DDRT-PCR and so on. **Results:** After treatment for 3 months, the symptoms improved significantly, Hb, HbF, RBC, Ret increased significantly, and the therapeutic effects lasted for 3~6 months after ceasing the treatment. Of the 92 cases, 85 cases were effective, the effective rate being 92.39%. The medical treatment had a certain therapeutic effect for the patients of various gene types, and could significantly increase hemoglobin and globin mRNA and GM-CSF mRNA expressions, increase synthesis of HbF, decrease iron protein gene expression and accumulation of iron in the body. **Conclusion:** Yisui Shengxue Granules has a significant effect on β -Mediterranean anemia, and it does not change gene mutation type of patients and can significantly regulate expression of functional genes, with the characteristic of whole effect of multiple targets.

Key Words β -Mediterranean anemia/TCM therapy; @Tonifying kidney and supplementing marrow

β -地中海贫血(β -地贫)是一种以慢性溶血为特征的遗传性溶血性贫血,又称珠蛋白生成障碍性贫血。它广泛分布于地中海沿岸及东南亚各国,我国南方各省发病率较高,其中广西、云南贵州发病率最高(2%~4.5%)。我们根据中医肾生髓的理论和临床实践,用补肾益髓法的代表方益髓生血颗粒在广西高发区治疗 β -地贫 92 例,取得了肯定的临床疗效;并对疗效的分子

机理进行了深入研究,现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料:自 1991 年 1 月~2002 年 7 月,在广西南宁及周边地区收集符合条件可评估病例 92 例,男 59 例,女 33 例,中位年龄 11.6(2~31)岁。广西籍 87 例,广东籍 5 例;壮族 67 例,汉族 21 例,瑶族 4 例。患者均来自边远山区,重型患者只在状况极差时才输血,无规律,均未应用去铁剂治疗,1 年内均未应用过任何抗贫血药物,自愿按条件接受治疗。

1.2 症状和体征:自幼即有不同程度贫血,常伴随呼吸消化系统感染性疾病;重型 β -地贫患者有进行性贫血、苍白、食欲减退、轻度黄疸,发育不良,症状随年龄增长加重,呈现明显的地贫面容,52 例重型 β -地贫患

基金项目:国家自然科学基金(30171199)和广西自然科学基金(014402C),国家自然科学基金重大研究计划(90409003)

1 中国中医研究院广安门医院分子生物学研究室,北京市宣武区北线阁 5 号(100053)

2 中国人民解放军第三〇三医院

3 中国医学科学院血液学研究所

收稿日期:2004-07-30;修回日期:2004-09-28

者均有肝脾肿大(9例已切脾),肝肿大在肋缘下1~8cm,平均3.3cm,脾肿大在肋缘下2.5~18cm,平均5.5cm,质硬。中间型 β -地贫患者平时工作学习精力差,头晕乏力,轻度发育不良,轻度地贫面容,皮肤稍白,40例中间型 β -地贫患者中34例肝肿大,在肋缘下1~5cm,平均1.5cm,除4例切脾外,还有30例脾肿大,在肋缘下1~8cm,平均1~5cm,质硬。

1.3 实验室检查:抽取外周血,进行血常规及血红蛋白电泳,主要指标:血红蛋白(Hb):23~101g/L;红细胞(RBC): $1.15 \sim 4.84 \times 10^{12}/L$;网织红细胞(Ret):0.02~0.38;抗碱血红蛋白(HbF):0.03~0.85。

1.4 诊断标准:根据张之南主编《血液病诊断及疗效标准》^[1]中对 β -珠蛋白生成障碍性贫血的诊断标准,选择重型和中间型 β -地贫患者。符合重型 β -地贫者52例(17例为 β -地贫复合血红蛋白E型),中间型 β -地贫40例(19例为 β -地贫复合血红蛋白E型)。中医辨证参照《中西医临床血液病学》标准^[2],证型以肾精不足、气血亏虚为主,部分患者兼夹湿热内阻。

1.5 病例排除标准:(1)输血频繁者;(2)近两个月服用其它治疗贫血的药物者;(3)具有免疫缺陷或血液系统其它原发性疾病者;(4)未按规定服药或资料不全等影响疗效判定者。

2 治疗及观察方法

2.1 给药方法:益髓生血颗粒由山茱萸、制何首乌、熟地黄、炙黄芪等11味中药组成,用中药传统制作方法和现代制药工艺提纯有效成分技术制成颗粒冲剂,由广安门医院制剂厂生产,批准文号:2004京药制试字(058)第F-2298号。每次10g/袋(相当于2.368g生药),6岁以下儿童每日2次,6岁以上每日3次,3个月为1个疗程。纳入病例要求在治疗观察期间不输血,坚持用药。

2.3 观察指标:每月查Hb、RBC、Ret、HbF1次,疗程结束后停药随访,每月检查1次Hb、RBC、Ret、HbF,自停药日起至Hb或RBC降至接近治疗前水平为疗效维持时间,若检查时已降至等于低于治疗前水平,则以上次复查日为有效截止时间,以月为计算单位。

2.4 疗效分子机理研究:采用PAGE、PCR、PCR-SSCP、RT-PCR、DNA序列分析、mRNA基因表达、DDRT-PCR等技术,研究中药治疗 β -地贫的分子机理。

2.5 统计学方法:采用Stata/SE8.0软件,以原始数据建立数据库,进行配对 t 检验统计分析。

3 治疗结果

3.1 疗效判定标准:根据张之南主编《血液病诊断及

疗效标准》,并参考第四届国际血红蛋白基因会议提出的标准^[3];凡Hb、RBC、HbF增加者为有效,Ret上升作为参考指标,单纯HbF和Ret增加不作为有效病例,凡在治疗过程中输过血者即为无效病例。停药后随访检查,以Hb高于给药前为有效。

3.2 临床表现及疗后随访:患者服用益髓生血颗粒后,精神振奋,活动增加,食欲改善,头晕、乏力、心悸症状好转,不易出现感冒腹泻,部分患儿治疗后身高体重增加程度明显好于治疗前。表1示,按Hb和HbF均上升为有效标准,重型 β -地贫35例中30例有效,重型 β -地贫复合血红蛋白E患者17例中16例有效,中间型 β -地贫21例中20例有效,中间型 β -地贫复合血红蛋白E19例全部有效。部分患者临床手扪肝脾肿大程度略有缩小,肝肿大缩小者33例,分别缩小0.5~3.0cm,平均缩小1.1cm,脾肿大缩小者31例,分别缩小0.5~4.0cm,平均缩小1.3cm。对85例有效病例进行了停药后随访及Hb追踪观察,疗效维持1个月者3例,2个月者15例,3个月者20例,4个月者12例,5个月者11例,6个月者9例,7个月以上者13例,平均疗效维持3~6个月,显示本药物后效应良好。7例无效患者由于治疗期间未输血,Hb和RBC下降,但服药后精神状况改善、食欲增加、不易罹患感染性疾病。本药治疗病例均未出现副作用,而且服用方便,患者易于接受。

表1 益髓生血颗粒治疗92例 β -地贫患者疗效统计

	重型		中间型	
	重型	重型+HbE	中间型	中间型+HbE
有效例数	30/35	16/17	20/21	19/19
有效率	85.7%	94.1%	95.2%	100%

3.3 血液学检查结果:表2示,益髓生血颗粒治疗3个月后,Hb、RBC、Ret和HbF水平均有不同程度的提高,与治疗前比较差异有显著性。治疗后有效病例Hb增加5~30g/L,增加 $\leq 10g/L$ 21例,11~20g/L47例,21~30g/L17例;RBC增加 $(0.21 \sim 1.46) \times 10^{12}/L$;Ret增加0.015~0.2;HbF增加0.015~0.69。显示患者血液学指标的改善与临床症状的缓解具有一致性。

3.4 疗效分子基础研究

3.4.1 益髓生血颗粒治疗 β -地贫疗效与基因突变型的动态分析:在取得明显疗效基础上,我们对其中41例观察病例进行了基因突变型的动态检测。在有治疗前后系统基因型分析的35例患者中,杂合子基因突变型23例,纯合子基因突变型4例,异源双重杂合子基因突变型8例。提示中药治疗不改变基因突变型,对不同基因突变型患者均有一定疗效,但疗效差异显著。

表 2 β -地贫治疗前后 Hb、RBC、Ret 和 HbF 比较($\bar{x} \pm s$)

分型	时间	例数	Hb(g/L)	RBC($\times 10^{12}/L$)	Ret(%)	HbF(%)
重型	治疗前	52	51.14 $\pm$ 12.96	2.57 $\pm$ 0.68	0.095 $\pm$ 0.059	0.422 $\pm$ 0.235
	治疗后	52	62.78 $\pm$ 16.71*	3.23 $\pm$ 0.84**	0.134 $\pm$ 0.073**	0.562 $\pm$ 0.261**
中间型	治疗前	40	79.00 $\pm$ 12.15	3.78 $\pm$ 0.56	0.089 $\pm$ 0.079	0.392 $\pm$ 0.236
	治疗后	40	94.75 $\pm$ 14.58**	4.41 $\pm$ 0.53**	0.145 $\pm$ 0.109*	0.476 $\pm$ 0.265**

与本型治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4.2 益髓生血颗粒治疗 β -地贫对珠蛋白 mRNA 转录水平影响的研究:人工合成三对引物,采用两两对引物共扩增法分析 α 、 β 、 γ mRNA 基因片段,将患者治疗前后的溶血液样品配对同步实验,提取 RNA 经 RT-PCR 扩增→PAGE→干胶→放射自显影→激光光密度扫描,计算 $\gamma/\beta + \gamma$ mRNA 克分子比值。结果表明,经益髓生血颗粒治疗 3 个月后,28 例患者中血红蛋白珠蛋白 $\gamma/\beta + \gamma$ mRNA 克分子比值明显升高者 23 例,不变者 2 例,稍有降低者 3 例,与治疗前比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。提示中药益髓生血颗粒治疗 β -地贫能促进 γ 珠蛋白基因转录和表达,诱导 HbF 合成增加,从而代偿 β -珠蛋白基因功能缺陷。

3.4.3 益髓生血颗粒治疗 β -地贫对患者外周血 GM-CSFmRNA 表达影响的研究:人工合成引物,将患者治疗前后溶血液样品配对同步试验,从红细胞裂解液中提取 RNA,经逆转录(RT-反应)→RT-PCR 扩增→电泳→放射自显影→激光光密度扫描,并以 α -globin 作为内标准,以 GM-CSF 与 α -globin 之相对比值的改变作为 GM-CSFmRNA 转录水平变化的指标。结果表明,益髓生血颗粒能明显促进 β -地贫患者外周血 GM-CSFmRNA 表达 ($P < 0.01$)。

3.4.4 采用 DDRT-PCR 技术检测中药治疗前后患者骨髓血细胞的基因表达差异:经过 DDRT-PCR 实验发现,中药益髓生血颗粒治疗后,患者骨髓有核细胞中铁蛋白基因表达明显降低,进而减少了铁在体内的蓄积,改善了患者的临床症状。

4 讨论

β -地贫和其它遗传性疾病一样,至目前为止临床上仍无有效的治疗方法。对于 β -地中海贫血症的治疗,国内外仍以输血为主,也有少数采用化疗药物如 5-氮胞苷、阿糖胞苷和羟基脲等^[3]。我们根据中医肾生髓的理论,用补肾益髓法在广西高发区治疗 β -地中海贫血,经过 10 余年的临床实践证明,补肾益髓法是治疗 β -地中海贫血的有效治法。该法是根据中医肾生髓藏精,精血同源之理,按滋肾养阴、益髓生血、健脾补气、消痞退黄的治则,以山茱萸、制何首乌、熟地黄、鳖甲等组成代表方益髓生血颗粒,针对 β -地中海贫血的临床

特点——虚劳、血虚、肾精亏损、脾肾两虚,方中以补肾益髓为主,意在补肾中真阴,使真阴得养,髓海充盈,血有生源。临床观察结果显示,益髓生血颗粒治疗 β -地中海贫血症疗效确切,患者临床症状的改善与外周血象的提高具有一致性。

本课题组用补肾益髓法治 65 例 β -地中海贫血并与以往用西药马利兰治疗的 13 例比较分析。马利兰治疗的 13 例,8 例有效,5 例无效,所有病例均伴有血小板、白细胞下降,并伴有发热,有 3 例由于骨髓抑制没有完成 1 个疗程^[4~6]。而用益髓生血法治 β -地中海贫血 65 例,59 例有效,6 例无效,无明显副作用,显示出中药治疗 β -地中海贫血的前景和优势。

本课题组还在临床研究的基础上,对其中大部分治疗病例进行了系统的基因型分析和珠蛋白 mRNA 转录水平的动态观察。基因突变型动态分析结果表明,中药治疗不改变患者的基因突变型,益髓生血颗粒对各种基因突变型患者都有一定疗效。其中对杂合子基因突变型患者疗效优于纯合子型和异源双重杂合子型。益髓生血颗粒治疗 3 个月后, β -地贫患者外周血红蛋白珠蛋白 $\gamma/\beta + \gamma$ mRNA 转录水平明显升高 ($P < 0.01$)。提示该药可明显提高 γ -珠蛋白 mRNA 表达。益髓生血颗粒明显提高 β -地贫患者外周血 GM-CSFmRNA 表达水平 ($P < 0.01$);DDRT-PCR 研究结果显示,中药治疗可以明显降低患者骨髓血细胞铁蛋白基因的表达,有效缓解因未成熟红细胞破碎所导致的体内铁蓄积,明显缓解临床症状。

参考文献

- 1 张之南主编.血液病诊断及疗效标准.天津:天津科学技术出版社,1991;48~49.
- 2 Cao A, Calanella R, Rosatelli MC, et al. Clinical Experience of Management of β -Thalassemia: The Sardinian Experience. Semin Hematol, 1996, 33(1): 66~75.
- 3 黄淑贞,任兆瑞,陈美玉,等.羟基脲(HU)治疗 β -地中海贫血的研究:HU 对珠蛋白表达的影响.中国科学(B辑),1994,22(2):171~173.
- 4 刘德培,梁植权,敖朝晖,等.马利兰增加恒河猴胎儿血红蛋白的合成.中国医学科学院学报,1986,(8):419~420.
- 5 Liu DP, Liang CC, Ao ZH, et al. Treatment of Severe β -Thalassemia (patient) with myleran. Am J Hematol, 1990, 33(1): 50~55.
- 6 王荣新,黄有文,吴志奎,等.中西医结合“益髓生血颗粒”治疗 β -地中海贫血进一步的临床研究.中国优生与遗传杂志,1998,6(2):28~29.