

血虚证患者凋亡相关基因的表达及中药的影响

何东初¹ 吴江平¹ 陈如泉²

摘要 目的:探讨血虚证患者凋亡相关基因的表达及地甘口服液治疗血虚证的作用机理。方法:用原位杂交法检测 30 例服用地甘口服液后的血虚证患者及 10 例正常人骨髓单核细胞周期素(CyclinD1)及凋亡相关基因(bax/bcl-2)mRNA 和细胞凋亡的表达。结果:血虚证患者细胞周期明显受阻,CyclinD1 mRNA 表达下降,凋亡抑制基因 bcl-2 mRNA 的表达降低,促凋亡基因 bax mRNA 的表达增加,细胞凋亡率升高;经地甘口服液治疗后,骨髓细胞周期素基因转录的表达增加,细胞成熟过程中的分化增殖加速,从而减少了骨髓细胞的凋亡,降低了细胞凋亡率。结论:血虚证的发生可能与细胞周期素及凋亡相关基因有关,地甘口服液能减少造血细胞凋亡,加速细胞分化成熟,使外周血不断得到更新,从而达到治疗血虚证的目的。

主题词 基因表达 血虚/中医药疗法 @ 凋亡相关基因表达

Expression of Apoptosis-related Genes in the Patient of Blood Deficiency and Effects of Chinese Drugs

He Dongchu¹, Wu Jiangping¹, Chen Ruquan²

(1. Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, Wuhan 430070; 2. Affiliated Hospital of Hubei TCM College)

Objective: To explore expression of apoptosis-related genes in the patient of blood deficiency and the mechanism of Digan Oral Liquid for treatment of blood deficiency. **Methods:** Expressions of marrow monocyte cyclin D1, apoptosis-related gene(bax/bcl-2) mRNA and apoptosis were detected with in situ hybridization in 30 cases of blood deficiency treated by Digan Oral Liquid and 10 healthy persons. **Results:** In the patient of blood deficiency, cell cycle was significantly inhibited, and the expressions of cyclin D1 mRNA and apoptosis-inhibiting gene bcl-2 mRNA decreased and the expression of apoptosis-promoting gene bax mRNA and the apoptosis rate increased. After treatment of Digan Oral Liquid, the expression of marrow monocyte cyclin D1 gene transcription increased, and differentiation and proliferation of cells were accelerated, so as to reduce apoptosis of marrow cells, decreasing the apoptosis rate. **Conclusion:** Genesis of blood deficiency may be related with cyclin and the apoptosis-related genes, and Digan Oral Liquid can decrease apoptosis of hematopoietic cells and accelerate differentiation and mature of cells, and make peripheral blood cells discontinuously renew, so as to cure blood deficiency.

Key Words Gene expression; Blood deficiency/TCM therapy; @ apoptosis-related gene expression

血虚证是临床常见证候,包括了现代医学的缺铁性贫血、巨幼细胞性贫血、再生障碍性贫血和放化疗所致的虚弱证候等。我们在以往的研究中发现^[1],血虚证存在时,淋巴细胞和红细胞免疫功能下降,自由基清除能力减低,脂质过氧化物水平上升,加重细胞损伤。但与造血及免疫功能和自由基损害相关的骨髓细胞周期素及凋亡相关基因鲜见报道。为进一步揭示血虚证的发病机理,阐明地甘口服液的作用,我们观察了 30 例服用地甘口服液后的血虚证患者和 10 例正常人骨髓单核细胞周期素(CyclinD1)及凋亡相关基因(bax/bcl-2)mRNA 的表达和细胞凋亡率,现报告如下。

1 临床资料

血虚证的诊断标准参考《血虚证辨治与研究》^[2]和第 5 版高等医药院校教材《中医内科学》^[3]。血虚证临床表现为:头晕,面色苍白无华或萎黄,神疲乏力,心悸

气短,健忘失眠,月经不调,腰膝疲软,形寒肢冷,食少便溏等。血虚证的实验室检查为血红蛋白(Hb)及红细胞(RBC)偏低。所有病例均来自 1999 年 3 月~2000 年 7 月广州军区武汉总医院和湖北中医学院附属医院血液科及中西医结合科门诊及住院患者。其中男性 14 例,女性 16 例;年龄 20~75 岁;涉及中医病证有:虚劳 17 例,眩晕 8 例,月经病 4 例,血淋 5 例,心悸 1 例;西医病种有:缺铁性贫血 13 例,巨幼细胞性贫血 9 例,慢性再生障碍性贫血 8 例。并随机选取 10 例正常人作为正常组进行对照研究,其中男性 4 例,女性 6 例,骨髓象提示正常。

2 治疗及观察方法

2.1 主要试剂及药物:可检测人 CyclinD1、bax 和 bcl-2 mRNA 的原位杂交成套试剂盒及凋亡试剂盒(Boster 公司提供);地甘口服液由熟地黄、炙甘草、黄芪、泽泻、陈皮组成,用量比为 3:2:2:1:1,经过清水煎煮、过滤、浓缩配制成 100% 浓度,100ml 瓶装灭菌备用(生药 1g/ml)。质控指标参照薄层色谱法试验,最后溶液 pH 值为 5.0~6.0,相对密度不低于 1.05。

1 广州军区武汉总医院中西医结合科,湖北省武汉市武昌区武珞路 627 号(430070)

2 湖北中医学院附属医院

收稿日期:2004-09-27;修回日期:2004-12-28

2.2 给药方法:将血虚证患者 30 例作为血虚组,给予 100%地甘口服液 20ml 口服,每日 3 次;正常组给予生理盐水 20ml 口服,每日 3 次,时间均为 2 周。

2.3 观察方法:于治疗第 15 天取外周静脉血 2ml 和骨髓 2ml 分别测 Hb 含量及 RBC 数量,骨髓单核细胞 CyclinD1、bax 和 bcl-2 基因 mRNA 的表达及细胞凋亡率。

单个核细胞制备:取抗凝骨髓 2ml,用 Ficoll 分离液分离出单个核细胞,制成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液备用。

检测主要步骤:(1)暴露 mRNA 核酸片段:切片上滴加 3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,37℃消化 30~120 分钟。(2)杂交:按每张切片加 20 μl 杂交液,恒温箱 40~42℃杂交过夜。(3)滴加生物素化鼠抗人地高辛,37℃60 分钟或 20℃左右 120 分钟。0.5mol/L PBS 洗 5 分钟 $\times$ 4 次。(4)DBA 显色,使用 DBA 显色试剂盒 1ml 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各 1 滴,混匀加至标本上。一般显色 20~30 分钟。CyclinD1、bax/bcl-2 基因 mRNA 的表达和凋亡细胞的检测方法均按文献[4]检测。

图像分析系统:HV-720 日立电视摄像机, HPIAS-1000 图像分析软件包(华中科技大学同济医学院编制)。阳性区域 CyclinD1、bax/bcl-2 胞浆显棕黄色;凋亡细胞胞核显棕色或棕褐色。以阳性细胞百分率表示 CyclinD1、bax/bcl-2 基因 mRNA 及细胞凋亡的表达情况。

2.4 统计学方法:数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 统计软件中的 t 检验和 F 检验。

3 结果

3.1 血虚证患者临床症状改善情况(根据临床症状积分情况进行评估):血虚组总有效率为 96.72%,表明地甘口服液能明显改善患者面色、肌肤萎黄或苍白、乏力、眩晕、心悸及舌淡脉弱等异常表现。

3.2 血虚证患者血红蛋白及红细胞改善情况:表 1 示,经地甘口服液治疗后,血虚组患者 RBC 数目及 Hb 含量明显上升,与正常组水平接近,两组比较差异无显著性($P>0.05$)。

3.3 两组患者治疗前后骨髓单核细胞 CyclinD1

mRNA 表达情况:表 2 示,血虚证患者造血细胞周期受阻,与正常组相比,CyclinD1 基因表达明显降低($P<0.01$)。细胞阻滞在 G_0+G_1 期,DNA 合成受损,地甘口服液能促进细胞周期的 G_1 期向 S 期转化,有利于骨髓细胞的分化、增殖和成熟。

表 1 血虚证患者 RBC 及 Hb 的改善情况($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	RBC($\times 10^{12}/\text{L}$)	Hb(g/L)
血虚组	30	4.1 ± 0.1	11.2 ± 0.2
正常组	10	4.5 ± 0.2	11.5 ± 0.3

表 2 两组患者治疗前后骨髓单核细胞 CyclinD1 mRNA 表达情况($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后
血虚组	30	$13.00 \pm 3.7^\Delta$	$23.51 \pm 4.8^*$
正常组	10	23.91 ± 5.1	24.20 ± 5.4

与本组治疗前比较,* $P<0.01$;与正常组比较, $\Delta P<0.01$

3.4 两组患者治疗前后骨髓单核细胞 bax 和 bcl-2 mRNA 表达情况:表 3 示,血虚证患者促凋亡基因 bax 的转录水平和细胞凋亡率明显升高($P<0.01$),凋亡抑制基因 bcl-2 的表达明显下降($P<0.01$),经地甘口服液治疗后,bcl-2 表达显著升高,bax 表达显著下降,细胞凋亡率显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明地甘口服液能使过多表达的促凋亡基因 bax 表达下降,抑制了细胞的凋亡,影响着骨髓细胞的分化成熟。

4 讨论

在血虚证的系列研究过程中,我们曾从血液流变学、淋巴细胞功能、红细胞酶学、骨髓造血功能、细胞因子、胸腺及脾细胞凋亡等多方面来揭示血虚证的实质,但对临床患者骨髓凋亡相关基因的探讨尚属首次。地甘口服液对血虚小鼠的治疗作用已见报道[5]。我们观察了调节骨髓造血细胞分化、增殖的周期和凋亡相关基因 bax/bcl-2mRNA 的表达。结果表明,血虚证患者细胞周期明显受阻,CyclinD1 mRNA 表达下降;地甘口服液能促进周期素基因转录的表达,加速细胞的分化增殖,增加凋亡抑制基因 bcl-2 的表达,降低促凋亡基因 bax 的表达,因而减少了骨髓细胞的凋亡,故骨髓的凋亡率降低。

CyclinD1 主要调控细胞周期的 G_1 期向 S 期转化。我们认为,血虚证患者骨髓中幼红细胞增加的机制可

表 3 两组患者治疗前后骨髓单核细胞 bax 和 bcl-2 mRNA 表达情况($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	bax		bcl-2		细胞凋亡率	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
血虚组	30	$20.42 \pm 4.3^{\Delta\Delta}$	$16.40 \pm 3.9^{*\Delta\Delta}$	$8.71 \pm 2.6^{\Delta\Delta}$	$13.10 \pm 3.4^{*\Delta\Delta}$	$5.60 \pm 0.8^{\Delta\Delta}$	$1.90 \pm 0.3^{*\Delta}$
正常组	10	12.54 ± 3.7	12.54 ± 3.7	11.36 ± 3.8	11.36 ± 3.8	1.20 ± 0.1	1.20 ± 0.1

与本组治疗前比较,* $P<0.01$;与正常组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

能与血虚患者造血原料缺乏、DNA 合成障碍及细胞阻滞在 G₁ 期有关。

bcl-2 是最重要的抗凋亡基因之一, bax 基因与 bcl-2 有相反的生物效应, 它能促进细胞凋亡^[6]。本结果证实, 血虚证患者骨髓单核细胞 bcl-2 表达下调, bax mRNA 上升, 凋亡百分率上升, 造血细胞凋亡。给予补肾健脾、益气补血的地甘口服液治疗后, bcl-2 上调, bax 表达下降, 促进了骨髓造血功能的恢复。血虚证主要表现为血液亏虚, 全身虚弱。“血主濡之”, 若机体处于血虚状态, 则营的营养和滋润作用减弱。中医认为骨生髓、髓生血。故考察患者骨髓有核细胞的功能对血虚证来说, 意义较为重要。地甘口服液治疗血虚证的作用机理, 可能与调节细胞周期素与凋亡相关基因(bax/bcl-2) mRNA 的表达, 有利于骨髓的造血密切相关。

造血细胞的凋亡减少, 使骨髓中血细胞不断地成熟更新, 释放到外周血中, 起到滋润濡养机体的作用, 从而使血虚证的临床症状得到改善, 达到治疗目的。

参考文献

- 1 陈如泉, 梁毅, 欧敏, 等. 血虚证红细胞免疫功能和变形性、淋巴细胞转化功能及自由基代谢的研究. 中西医结合实用临床急救, 1999, 6(10): 151~153.
- 2 陈如泉. 血虚证辨治与研究. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 36~44.
- 3 董建华. 中医内科学. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 283~284.
- 4 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000: 258.
- 5 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祖细胞的影响. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(6): 13~15.
- 6 Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell, 1993, 74(4): 609~619.

通经汤配合耳针治疗肥胖型闭经 56 例

宋国忠* 王燕芬*

闭经是妇科疾病中常见的一种症状, 可以由各种不同的原因引起。我们在长期的临床实践中, 以化痰活血补肾中药配合耳针治疗肥胖型闭经, 取得满意疗效, 现报道如下。

1 临床资料

1.1 诊断标准: 参照《中药新药治疗闭经的临床研究指导原则》, 并且符合 3 年内体重增加 5kg 以上这一必要条件。

1.2 一般资料: 观察病例共 103 例, 均为我院门诊病例, 随机分为两组。治疗组 56 例, 年龄 18~41 岁, 平均 25.5 岁; 病程 0.5~6 年, 平均 1.8 年; 体重 50~60kg 35 例, 60kg 以上 21 例, 平均 56.3kg。对照组 47 例, 年龄 18~40 岁, 平均 24.8 岁; 病程 0.5~6 年, 平均 1.9 年; 体重 50~60kg 28 例, 60kg 以上 19 例, 平均 55.6kg。103 例均为继发性闭经且黄体酮撤退试验阳性的 I 度闭经患者。两组一般资料具有可比性。

2 治疗方法

治疗组采用通经汤口服配合耳针治疗, 对照组单用通经汤口服治疗。

通经汤基本方: 苍术 10g, 白芥子 10g, 胆南星 6g, 半夏 10g, 茯苓 10g, 当归 10g, 生山楂 20g, 陈皮 6g, 川芎 5g, 菟丝子 10g, 淫羊藿 15g, 香附 10g。加减: 大便秘结加全瓜蒌; 伴痤疮加黄芩、桑叶; 阴道干涩, 无白带, 加黄精、玉竹; 口干, 苔黄腻, 加黄连、夏枯草。每日 1 剂, 水煎 2 次, 早晚分服, 如果月经来潮, 则经期停服, 经净后续服, 连续服用 3 个月为 1 个疗程。观察 1~2 个疗程。

耳针: 服中药开始配合耳针治疗。取子宫、内分泌、肾、卵巢、皮质下、屏间, 每次在双侧分别选取以上 2~3 穴, 毫针中、

强度刺激, 留针 15~20 分钟, 隔日 1 次。经期停用。也可选用埋针, 选穴方法同上。留埋期间每天用手指按压揪针 2~3 次, 每次 1~3 分钟。出针后用消毒干棉球按压针孔防止出血, 或涂酒精或碘酒预防感染。

3 治疗结果

3.1 疗效标准: 参照《中药新药治疗闭经的临床研究指导原则》。痊愈: 月经恢复正常周期, 其他症状基本消失, 停药后维持 3 个月经周期以上。显效: 经治疗月经接近正常周期(40 天以内), 停药后 3 个月内自动来潮 1 次, 其他症状减轻, 有效: 经治疗 3 个月内月经来潮 1 次以上, 其他症状减轻, 或 II 度闭经虽未来月经, 但检查卵巢功能有显著改善。无效: 经连续治疗 3~6 个月, 月经未来潮, 其他症状及有关实验室等检查均无改善。

3.2 结果: 治疗组 56 例, 痊愈 23 例, 显效 26 例, 有效 2 例, 无效 5 例。痊愈率 41.1%, 显效率 87.5%, 有效率 91.1%。对照组 47 例, 痊愈 12 例, 显效 10 例, 有效 12 例, 无效 13 例。痊愈率 25.5%, 显效率 46.8%, 有效率 72.3%。两组疗效差异有显著性($P < 0.05$)。

4 讨论

朱丹溪指出: “经不行者, 非无血也, 为痰所凝而不行也。”《女科切要》云: “肥白妇人, 经闭而不通者, 必是痰湿与脂膜壅塞之故也。”《景岳全书·痰饮》云: “盖脾主水湿, 湿动则为痰。肾主水, 水泛则亦为痰, 故痰之化无不在脾, 而痰之本无不在肾。”故肥胖型闭经当责之脾、肾两脏。在化痰的基础上加入补肾调冲之品, 以填精养血, 化痰通经。通经汤中苍术燥湿醒脾; 香附理气散结化痰; 胆南星祛痰宣壅通闭; 白芥子辛散利湿, 温通豁痰, 兼搜皮里膜外之痰湿; 菟丝子、淫羊藿益肾固本调冲, 全方具有化痰通络, 补肾调冲之效。针刺能疏通经脉, 行气活血, 调理冲任, 配合中药使用, 使气血下行而提高通经疗效。

* 浙江省舟山市中医骨伤联合医院, 舟山市定海区西大街 46 号(316000)

收稿日期: 2005-04-14