

凉血解毒汤治疗急性再生障碍性贫血的机制探讨

杨淑莲 张文艺 王东侠 侯伟 乔子剑 张广舫 李松坡

(河北省廊坊市中医医院血液内科、血液病中心实验室, 廊坊市银河北路 108 号, 065000)

[摘要] **目的** 探讨凉血解毒汤治疗急性再生障碍性贫血的机制。 **方法** 采用酶联免疫法检测急性再生障碍性贫血患者及正常对照者骨髓上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、可溶性白细胞介素 2 受体 (sIL-2R) 的含量, 并观察凉血解毒汤在体外对骨髓单个核细胞经植物血球凝集素诱生的造血负调控因子的调变作用。 **结果** 急性再生障碍性贫血患者骨髓上清液中 TNF- α 、IFN- γ 、sIL-2R 的含量明显高于正常对照者, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$) ; 体外试验显示, 在多数急性再生障碍性贫血患者中凉血解毒汤可明显抑制 IFN- γ 、sIL-2R 的分泌 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) , 而对 TNF- α 无明显影响 ($P > 0.05$) 。 **结论** 急性再生障碍性贫血的发病机制与造血负调控因子 (TNF- α 、IFN- γ 、sIL-2R) 的异常增多有关; 凉血解毒汤在凉血止血、清热解毒的同时, 也可能通过下调 IFN- γ 、sIL-2R 的含量而促进造血功能恢复, 起到治疗急性再生障碍性贫血的作用。

[关键词] 急性再生障碍性贫血; 肿瘤坏死因子 α 干扰素; 凉血解毒汤

Mechanism of Liangxue Jiedu Decoction for Acute Aplastic Anemia

YANG Shu-lian, ZHANG Wen-yi, WANG Dong-xia, et al.

(Chinese Medical Center for Haematology, Hebei 065000)

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of Liangxue Jiedu Decoction for acute aplastic anemia. **Methods** Enzymelinked immunosorbent assay was used to detect TNF- α , IFN- γ and sIL-2R in myeloid supernatant of acute aplastic anemia patients and normal controllers. Modulation of Liangxue Jiedu Decoction on myelomonocytic TNF- α , IFN- γ and sIL-2R induced by plant hemagglutinin was observed in vitro test. **Results** TNF- α , IFN- γ and sIL-2R in myeloid supernatant of acute aplastic anemia patients were higher than those of normal controllers with significant differences ($P < 0.05$). Vitro test showed that Liangxue Jiedu Decoction inhibited the secretion of IFN- γ and sIL-2R significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and had no effect on TNF- α ($P > 0.05$). **Conclusion** The pathogenesis of acute aplastic anemia is relevant to abnormal increasing of TNF- α , IFN- γ and sIL-2R. Liangxue Jiedu Decoction can cool the blood, stanch bleeding, clear heat and resolve toxin to cure acute aplastic anemia, which may be concerned with its decreasing IFN- γ and sIL-2R and improving haematopoiesis as well.

Key Words Acute aplastic anemia; Tumor necrosis factor- α ; Interferon; Liangxue Jiedu Decoction

急性再生障碍性贫血(简称急性再障)是一组多因素引起的异质性较强的综合征,以发病急、进展快、骨髓造血衰竭、全血细胞减少、出血和严重感染为特征。临床上治疗效果不甚理想。我院中医血液病专家根据中医辨证自拟凉血解毒汤配合西药治疗急性再障,经 30 多年的临床实践取得了很好的疗效^[1,2]。为进一步探讨凉血解毒汤的治疗机制,我们观察了体外凉血解毒汤对造血负调控因子的调变作用,现报告如下。

1 研究对象

选择 1999 年 1 月~2004 年 11 月在我院治疗的 17 例初诊急性再障患者,其中男 11 例,女 6 例,病程 7~25 天,平均 15 天,年龄 7~49 岁,平均 27 岁。17 例均经临床及实验室检查确诊,诊断符合全国统一标准^[3]。临床表现:发病急,贫血呈进行性加剧,常伴严重感染,内脏出血。血象:除血红蛋白下降较快外,须具备下列诸项中的两项:(1)网织红细胞 $< 1\%$, 绝对值 $< 15 \times 10^9/L$; (2)白细胞明显减少,中性粒细胞绝对值 $< 0.5 \times 10^9/L$; (3)血小板 $< 20 \times 10^9/L$ 。骨髓象:(1)多部位增生减

低,三系造血细胞明显减少,非造血细胞增多。如增生活跃须有淋巴细胞增多;(2)骨髓小粒中非造血细胞及脂肪细胞增多。正常对照组为 9 例健康志愿者,多数为患者亲属。其中男 7 例,女 2 例,年龄 29~48 岁,平均 40 岁。

2 方法

2.1 试剂及药物制备

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、可溶性白细胞介素 2 受体 (sIL-2R)、酶联免疫吸附实验 (ELISA) 试剂盒均购自 Immunotech 公司; 1640 培养液为 Gibco 公司产品; 胎牛血清为中国医学科学院血液病研究所产品; 植物血球凝集素 (PHA) 为广州市医药研究所产品; 凉血解毒汤为本院制剂室协助制备。方药组成: 羚羊角粉、琥珀粉、生地黄、牡丹皮、玄参、麦门冬、贯众、金银花、连翘、板蓝根、栀子、三七粉, 经水煎浓缩(个别药物由不经水煎而经特殊处理), 最终浓度为 1g 生药/ml, pH 值 6.0, 无菌分装保存。

无菌取患者及正常对照组骨髓液 5ml, 肝素抗凝,

先离心取上清液 1ml, -20℃ 保存备用, 用于检测骨髓液中 TNF- α IFN- γ sIL-2R 含量。然后用淋巴细胞分层液分离骨髓单个核细胞(BMMNC), 用 PBS 缓冲液洗 2 遍, 配成细胞悬液备用。

2.3 细胞培养上清液的制备

17 例患者中 10 例做了细胞培养上清液的制备。细胞培养采用液体培养法, 共分 3 个体系:(1) 中药组: 中药 10 μ l (终浓度 5mg/ml) + BMMNC (终浓度 2×10^5 /ml); (2) PHA 组: PHA (终浓度 100 μ g/ml) + BMMNC (终浓度 2×10^5 /ml); (3) 中药+PHA 组: 中药 10 μ l (终浓度 5mg/ml) + PHA (终浓度 100 μ g/ml) + BMMNC (终浓度 2×10^5 /ml)。3 组培养体系均用含 20% 胎牛血清的 1640 培养液做培养基, 总体积 2ml, 在 37℃、5% CO₂ 和 100% 湿度的 CO₂ 培养箱中培养 72 小时后, 离心取上清液 1ml, -20℃ 保存备用, 用于检测 TNF- α IFN- γ sIL-2R 含量。

2.4 检测指标及方法

TNF- α IFN- γ sIL-2R 采用 ELISA 法, 严格按照说明书操作, 用自动酶标分析仪测定。

2.5 统计学方法

数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。骨髓上清液组间比较采用独立样本 *t* 检验; 细胞培养上清液组间比较采用配对 *t* 检验。借助 SPSS 10.0 统计软件完成。

3 结果

3.1 两组骨髓上清液中 3 种细胞因子含量比较

表 1 示, 骨髓上清液中, 急性再障患者的造血负调控因子 TNF- α IFN- γ sIL-2R 的含量明显高于正常对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。表明急性再障患者存在严重的免疫异常。

表 1 急性再障组与正常对照组患者骨髓上清液中 3 种细胞因子含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF- α pg/ml	IFN- γ IU/ml	sIL-2R(μ g/ml)
急性再障组	17	41.28 $\pm$ 10.35 *	1.49 $\pm$ 0.68 *	3.18 $\pm$ 0.89 *
正常对照组	9	30.49 $\pm$ 12.99	0.72 $\pm$ 0.45	2.65 $\pm$ 0.56

与正常对照组比较, * $P < 0.05$

3.2 不同培养细胞上清液中细胞因子含量比较

表 2 示, 各组 TNF- α 含量差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。PHA 组 IFN- γ sIL-2R 含量明显高于中药组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。中药+PHA 组 10 例检测标本中有 8 例 IFN- γ 明显低于相应的 PHA 组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 而另 2 例无明显改变 ($P > 0.05$); 有 7 例 sIL-2R 明显低于相应的 PHA 组 ($P < 0.01$), 其余 3 例无明显改变 ($P > 0.05$)。提示中药在体外可以抑制或中和多数急性再障患者的部分造血负调

控因子(IFN- γ sIL-2R)。

表 2 不同培养细胞上清液中细胞因子含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF- α (pg/ml)	IFN- γ IU/ml	sIL-2R(μ g/ml)
中药组	10	11.12 $\pm$ 1.01	0.77 $\pm$ 0.12 *	1.22 $\pm$ 0.14 *
PHA 组	10	13.71 $\pm$ 3.31	2.11 $\pm$ 1.36	1.65 $\pm$ 0.17
中药+PHA 组	10	16.36 $\pm$ 1.39	1.01 $\pm$ 0.26 *	1.35 $\pm$ 0.17 * *

与 PHA 组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

4 讨论

急性再障的发病机制主要与免疫异常有关, 多数由于细胞毒性 T 淋巴细胞的异常活化, 产生大量的造血负调控因子(主要是 TNF- α IFN- γ sIL-2R), 抑制造血干/祖细胞并诱导其凋亡^[4~6]。我们检测了 17 例急性再障患者骨髓中 TNF- α IFN- γ sIL-2R 的含量, 结果明显高于正常对照者, 与国内外报道基本一致。急性再障初期往往表现为反复高热、严重出血、贫血症状明显, 并呈进行性加重, 中医认为由温热毒邪耗精伤髓所致, 故以凉血止血以减轻出血症状, 清热解毒以解除毒邪之扰, 方用凉血解毒汤。

我们观察了凉血解毒汤在体外直接对 BMMNC (主要为淋巴细胞) 的作用, 发现凉血解毒汤可以抑制多数患者 IFN- γ sIL-2R 的分泌, 即在凉血、止血、清热、解毒的同时, 还可以通过下调造血负调控因子而起到治疗急性再障的作用, 其机制可能与中药中某些成分(或经体内代谢后的成分)对产生 IFN- γ sIL-2R 的细胞进行调解而减少 IFN- γ sIL-2R 的分泌或中和了产生的 IFN- γ sIL-2R 而使其减少有关。由于中药复方作用机制复杂, 我们的结论只是初步的, 对造血负调控因子的确切调变机制尚需进一步研究。

参考文献

[1]梁冰·治疗再生障碍性贫血的思路·中医杂志, 1995, 36 (12): 749~751.
[2]杨淑莲, 梁冰·中药并雄激素治疗急性再生障碍性贫血 45 例临床分析·实用中西医结合杂志, 1994, 7(11): 650~651.
[3]张之南, 沈悌主编·血液病诊断及疗效标准——再生障碍性贫血·2 版·北京: 科学出版社, 1998: 33~39.
[4]Young NS·Autoimmunity and treatment in aplastic anemia·Ann Intern Med, 1996, 124(2): 166~169.
[5]Killick SB, Cox CV, Marsh JC, et al·Mechanisms of bone marrow progenitor cell apoptosis in aplastic anemia and the effect of anti-thymocyte globulin: examination of the role of the Fas-Fas-L interaction·Br J Haematol, 2000, 111(4): 1164~1169.
[6]和虹, 邵家鸿, 何广胜, 等·Th1 细胞在再生障碍性贫血发病机制中的作用·中华血液学杂志, 2002, 23(11): 574~577.

(收稿日期: 2006-01-10; 修回日期: 2006-05-20)