

补肾颗粒对慢性再生障碍性贫血患者 CD28、CD95 表达的影响

王运律 韩惠杰 刘 敏 胡 琦 夏乐敏 张晓峰

(上海市中医医院血液科, 上海市芷江中路 274 号, 200071)

[摘要] 目的 探讨补肾颗粒治疗慢性再生障碍性贫血(CAA)的作用机制。方法 将 CAA 患者分为中药组(60 例)和环孢菌素 A 组(CsA 组, 16 例);中药组以补肾颗粒为主辨证治疗, CsA 组以环孢菌素 A 为主治疗, 疗程 6 个月, 另设健康对照组 20 名, 比较健康对照组与 CAA 各组治疗前后 CD3⁺、CD3⁺CD28⁺、CD3⁺CD95⁺的表达水平。结果 CAA 各组治疗前 CD3⁺、CD3⁺CD28⁺、CD3⁺CD95⁺的表达均较健康对照组高($P < 0.05$), 以肾阴虚型表达异常更甚。各组治疗后 CD28 表达下调, CD95 表达上调。结论 CAA 患者 T 细胞 CD28 及 CD95 表达异常;补肾颗粒可能通过调节 CD28 及 CD95 水平调控 CAA 患者 T 细胞的异常激活和凋亡, 从而促进造血功能恢复。

[关键词] 补肾颗粒;慢性再生障碍性贫血;CD28;CD95

Effect of Bushen Granule on the Expressions of CD28 and CD95 in Chronic Aplastic Anemia Patients

WANG Yunlü, HAN Huijie, LIU Min, HU Qi, XIA Lemin, ZHANG Xiaofeng

(Shanghai TCM Hospital, Shanghai 200071)

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of Bushen Granule (Granule for reinforcing the kidney) for the treatment of chronic aplastic anemia (CAA). **Methods** The CAA patients were divided into the herbal group (60 cases) treated mainly by Bushen Granule with syndrome differentiation and the Cyclosporin A group (16 cases) treated mainly by Cyclosporin A for 6 months. The healthy control group consisting of 20 healthy subjects was set up. The expressions of CD3⁺, CD3⁺CD28⁺, and CD3⁺CD95⁺ of the healthy control groups were compared with the herbal group and the Cyclosporin A group. **Results** The expressions of CD3⁺, CD3⁺CD28⁺, and CD3⁺CD95⁺ of the CAA groups were higher than those of the healthy control group ($P < 0.05$), especially in those who were of kidney yin deficiency syndrome. In the treated groups, the expression of CD28 was down-regulated while that of CD95⁺ was up-regulated. **Conclusion** Bushen Granule is able to regulate the abnormally activated T cells and their apoptosis through regulating the expressions of CD28 and CD95, thus the hematopoietic function is restored.

Key Words Bushen Granule (Granule for reinforcing the kidney); Chronic aplastic anemia (CAA); CD28; CD95

慢性再生障碍性贫血(CAA)是一组以全血细胞减少为特征的综合病症,属难治性血液病之一。目前认为,免疫介导的造血抑制为 CAA 的主要发病机制,多种因素参与其免疫功能紊乱,尤其是 T 细胞功能的异常^[1]。细胞免疫的中心环节是 T 细胞的有效活化, T 细胞的活化和凋亡,与共刺激分子 CD28 和凋亡受体 CD95 的表达密切相关。我们应用中药复方补肾颗粒为主治疗 CAA,观察比较了 CAA 患者 CD28 和 CD95 的表达水平及治疗前后的变化,以探讨中医药治疗的 CAA 的疗效机制。现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

全部病例为上海市中医医院血液科 2005 年 3 月~2009 年 1 月住院及门诊确诊的 CAA 患者共 76 例。CAA 患者分为中药组和环孢菌素组 A(CsA 组)。中药组 60 例,男 26 例,女 34 例;年龄 11~69 岁;病程

1~34 年。CsA 组 16 例,男 6 例,女 10 例;年龄 12~65 岁,平均 33.7 岁;病程 1~18 年,平均 5.6 年。

中药组 60 例,根据辨证分型标准^[2]分为肾阳虚型 29 例,平均年龄 35.2 岁;平均病程 6.2 年;肾阴虚型 31 例,平均年龄 37.3 岁,平均病程 7.9 年。

健康对照组:20 例均来自门诊体检健康者。男性 10 例,女性 10 例;年龄 14~60 岁。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准:符合 CAA 国内西医诊断标准^[3];符合中医肾阳虚证或肾阴虚证辨证分型标准^[2]。

排除标准:妊娠或准备妊娠、哺乳期妇女;合并有严重的心、肝、肾、内分泌及其他系统原发性疾病者;合并有精神病患者;对本药成分有过敏史者。

2 方法

2.1 治疗方法

中药组:以中药复方补肾颗粒治疗为主,肾阳虚型治以温肾益髓,方取温阳补肾颗粒(组成:红参 5g,黄芪 15g,鹿角胶 10g,补骨脂 10g,阿胶 10g,陈皮 6g

等);肾阴虚型治以滋阴补肾,方取滋阴补肾颗粒(组成:女贞子 15g,黄芪 15g,熟地黄 15g,龟甲 15g,阿胶 10g 等)。每天 40~60g,共治疗 6 个月,早晚两次冲服。本颗粒参照《中华人民共和国药典》(2000 版)^[4]中药颗粒剂制法,由上海市中医医院制成院内制剂,批号为 050122,规格为 20g/袋。

CsA 组:给予 CsA $3\sim 5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,共治疗 6 个月,分两次口服,定期随访血压、肝肾功能 and 血药浓度等。治疗观察期间,两组患者酌情给予维生素治疗,合并感染时使用抗生素,不能耐受贫血或有明显出血倾向者给予红细胞悬液或单采血小板输注。

2.2 观察指标和方法

采用 Coulter-Maxm 型全自动血液分析仪常规方法检测患者外周血象;CAA 患者及健康对照组外周血 T 细胞 CD3⁺、CD3⁺CD28⁺、CD3⁺CD95⁺ 采用美国 Beckman-Coulter 公司的 EPICS-XL 流式细胞仪检测,PC5-CD3、PE-CD28、PE-CD95 及相应的同型对照试剂及溶血素 OptilyseC 购自法国 Immunotech 公司;Isoton Ⅲ 稀释液(PBS)购自美国 Beckman-Coulter 公司。

2.3 疗效标准

参照中华血液学会第四届全国再生障碍性贫血学术会议纪要制定的国内疗效标准^[3]:①基本治愈:贫血和出血症状消失。血红蛋白(Hb)达 120g/L(男)或 100g/L(女),白细胞(WBC)达 $4\times 10^9/\text{L}$,血小板(PLT)达 $80\times 10^9/\text{L}$,随访 1 年以上未复发。②缓解:贫血和出血症状消失,Hb 男性达 120g/L,女性达 100g/L,WBC 达 $3.5\times 10^9/\text{L}$ 左右,PLT 也有一定程度增加,随访 3 个月病情稳定或继续进步。③明显进步:贫

血和出血症状明显好转,不输血,Hb 较治疗前 1 个月内常见值增长 30g/L 以上,并能维持 3 个月。判定以上 3 项疗效,均应 3 个月内未输血为准。④无效:经充分治疗后,症状、血象未达明显进步。注:①+②+③计为有效,④为无效。

2.4 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,治疗前后比较采用配对 t 检验,两组间比较采用独立样本的 t 检验,计数资料、率的比较采用卡方检验。

3 结果

3.1 各组患者治疗前后外周血象比较

表 1 示,CAA 各组治疗前后自身比较,外周血 WBC 和 Hb 均明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);治疗后外周血 Hb 和 PLT 肾阳虚型与肾阴虚型比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2 各组患者临床疗效比较

表 2 示,CsA 组总有效率为 62.50%,中药组总有效率为 75.00%,经卡方检验,两组间疗效无统计学意义($P>0.05$)。肾阳虚型有效率为 89.66%,肾阴虚型有效率为 61.29%,经卡方检验,两证型间疗效差异有统计学意义($P<0.05$),肾阳虚型优于肾阴虚型。

3.3 各组患者治疗前后及健康对照组外周血 T 细胞、CD3、CD28 和 CD95 表达的比较

表 3 示,与健康对照组比较,治疗前 CAA 各组的 CD3⁺CD28⁺均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);治疗后 CAA 各组的 CD3⁺CD28⁺均有所降低,与健康对照组比较,差异无统计学意义($P>$

表 1 各组患者治疗前后外周血象比较($\bar{x}\pm s$)

组别	证型	时间	例数	WBC($\times 10^9/\text{L}$)	Hb(g/L)	PLT($\times 10^9/\text{L}$)
CsA 组		治疗前	16	2.75 ± 1.14	61.41 ± 16.41	32.72 ± 35.34
		治疗后	16	$3.49\pm 1.67^{**}$	$86.07\pm 25.20^{**}$	$53.04\pm 63.25^{*}$
中药组		治疗前	60	2.71 ± 1.36	70.57 ± 29.99	37.78 ± 30.34
		治疗后	60	$3.50\pm 1.62^{**}$	$92.25\pm 27.64^{**}$	$53.68\pm 45.87^{**}$
	肾阳虚型	治疗前	29	2.97 ± 1.39	73.07 ± 29.40	43.68 ± 31.14
		治疗后	29	$3.78\pm 1.68^{**}$	$99.48\pm 22.17^{**\Delta}$	$70.18\pm 49.83^{**\Delta\Delta}$
	肾阴虚型	治疗前	31	2.38 ± 1.27	67.27 ± 31.12	30.27 ± 28.20
		治疗后	31	$3.14\pm 1.49^{**}$	$82.73\pm 31.57^{**}$	32.68 ± 29.87

注:与本组治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与肾阴虚型治疗后比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表 2 各组患者临床疗效比较[例(%)]

组别	证型	例数	基本治愈	部分缓解	明显进步	无效	总有效
CsA 组		16	2(12.50)	3(18.75)	5(31.25)	6(37.50)	10(62.50)
中药组		60	10(16.67)	16(26.67)	18(30.00)	16(25.00)	44(75.00)
	肾阳虚型	29	8(27.59)	7(24.14)	11(37.93)	3(10.34)	26(89.66)*
	肾阴虚型	31	2(6.45)	9(29.03)	8(25.81)	12(38.71)	19(61.29)

注:与肾阴虚型比较,* $P<0.05$

表 3 各组患者治疗前后及健康对照组外周血 T 细胞、CD3、CD28 和 CD95 表达的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	证型	时间	例数	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD28 ⁺	CD3 ⁺ CD95 ⁺
健康对照组			20	66.96 $\pm$ 10.29	48.05 $\pm$ 11.26	1.08 $\pm$ 1.02
CsA 组		治疗前	16	78.76 $\pm$ 12.02 ^{**}	57.27 $\pm$ 14.14 ^{**}	0.42 $\pm$ 0.45 ^{**}
		治疗后	16	75.27 $\pm$ 9.59 ^{**}	52.07 $\pm$ 12.65 Δ	1.18 $\pm$ 0.89 $\Delta\Delta$
中药组		治疗前	60	79.73 $\pm$ 6.41 ^{**}	56.02 $\pm$ 13.24 [*]	0.44 $\pm$ 0.46 ^{**}
		治疗后	60	78.11 $\pm$ 5.60 [*]	51.21 $\pm$ 14.49	1.09 $\pm$ 0.81 Δ
	肾阳虚	治疗前	29	74.53 $\pm$ 12.65	55.16 $\pm$ 14.00 [*]	0.43 $\pm$ 0.53 [*]
		治疗后	29	77.21 $\pm$ 6.56 ^{**}	48.90 $\pm$ 16.14	1.08 $\pm$ 0.87 Δ
	肾阴虚	治疗前	31	82.00 $\pm$ 5.44 ^{**}	65.77 $\pm$ 5.33 ^{**▲}	0.41 $\pm$ 0.37 [*]
		治疗后	31	78.41 $\pm$ 4.78 ^{**}	55.29 $\pm$ 11.89 Δ	1.29 $\pm$ 0.95 $\Delta\Delta$

注:与健康对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与本组治疗前比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与肾阳虚型治疗前比较, $\Delta P < 0.05$

0.05);其中,治疗前中药组肾阴虚型的 CD3⁺CD28⁺较肾阳虚型明显升高($P < 0.01$)。

与健康对照组比较,治疗前 CAA 各组的 CD3⁺CD95⁺均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);治疗后各组的 CD3⁺CD95⁺均有所上升,与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);CAA 各组自身治疗前后比较,CD3⁺CD95⁺均明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

近年研究表明^[1],T 细胞介导的细胞免疫是 CAA 重要发病机制,CAA 患者活化状态 T 细胞的增加是 CAA 免疫病理机制的生物学基础。其中 T 细胞共刺激信号的改变,与 T 细胞的免疫异常活化密切相关。共刺激信号是激活必需的双信号之一,而 CD28 是最早被证实的共刺激分子。CD28 在参与 T 细胞的激活与增殖的同时,可通过产生抗凋亡蛋白延缓 T 细胞凋亡的启动^[5]。

CD95 (Fas/APO-1)属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)及神经生长因子受体(NGFR)家族成员,具有诱导凋亡的能力。CD95 分子主要以膜受体形式存在,还可通过转录水平不同拼接产生可溶性 CD95 分子,在细胞凋亡中发挥作用。因此,T 细胞活化和凋亡与 CD28 和 CD95 的表达密切相关。本研究结果表明,与健康对照组比较,治疗前 CAA 各组 CD3⁺、CD3⁺CD28⁺的表达明显增加($P < 0.05$);CD3⁺CD95⁺的表达明显减少($P < 0.05$);其中与肾阳虚型比较以肾阴虚型 CAA 患者的 CD3⁺CD28⁺表达异常更甚。

本研究通过对中药组 CAA 患者辨证论治,属肾阳虚型给予温阳补肾颗粒,属肾阴虚型给予滋阴补肾颗粒;西药对照组给予 CsA 治疗。结果表明,治疗后各组 CAA 患者 CD3⁺CD28⁺T 细胞较治疗前均明显下降,CD3⁺CD95⁺T 细胞较治疗前均明显上升,虽然与健康对照组比较无统计学差异,但治疗前后比较有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示补肾颗粒可能

通过下调共刺激分子 CD28 的表达而抑制 T 细胞的过度活化,同时又上调 Fas 的表达而诱导 T 淋巴细胞的凋亡,从而使 CAA 患者亢进的 T 细胞免疫趋向平衡,进而促进骨髓造血功能的恢复。

本研究结果表明,中药组总有效率优于 CsA 组。肾阳虚型的有效率优于肾阴虚型($P < 0.05$),肾阴虚组的免疫异常更甚,且不易纠正,体现了中医学的“阳虚易治,阴虚难调”理论。

参考文献

- [1]邵宗鸿,袁烨.再生障碍性生贫血免疫发病机制及免疫治疗[J].中国实用内科杂志,2006,26(4):252-254.
- [2]郑筱萸.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2002:179.
- [3]张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].2版.北京:科学出版社,1998:33-35.
- [4]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2000:490.
- [5]杜丽华.免疫突触与 T 细胞活化[J].免疫学杂志,2006,S1,117-119,122.

(收稿日期:2009-07-24;修回日期:2009-09-16)

[编辑:叶晨]

全国特色医疗名医学术研讨会征文通知

为挖掘、研究我国特色医疗名家的特色疗法和诊治经验,拟于 2010 年 8 月在北京召开“2010 年全国特色医疗名医学术研讨会”。现面向全国征稿,运用中医、针灸、推拿、按摩、刮痧、熏蒸、药浴、穴位埋线、小针刀、脊柱疗法等传统特色疗法治疗各种常见病、多发病、疑难杂症等方面的临床经验与创新研究。截稿日期:2010 年 5 月 28 日。请注明“名医会”字样。

为研究、推广治疗危急重病的新技术、新成果,拟于 2010 年 9 月在中国无锡市举行“2010 年全国治疗危急重病学术研讨会”。征稿内容:各科危急重病的诊断和治疗、及基础研究;各类中毒、休克、烧伤、急腹症、高热的诊断与治疗;各种新技术、新疗法在危急重病、疑难病诊疗中的成功应用或相关的论述。截稿日期:2010 年 6 月 16 日。请注明“危急重病”字样。来稿经评审后,将为符合要求的稿件作者颁发“特色医疗名医”或“治疗疑难病专家”奖牌。以上文稿请挂号寄至:江苏省南京市鼓楼邮局 389 信箱,南京聚杰医药科技研究中心汪文和收,邮编:210008。电子邮箱投稿:tg@huaxia120.com。电话:(025)86054929、86054939。