

• 临床研究 •

益髓生血颗粒对 α -血红蛋白 H 病患者
造血细胞因子活性与表达的影响刘 莉¹ 张新华² 王文娟³ 方素萍¹ 邹 阳¹ 李俊丽¹ 程艳玲¹ 吴志奎^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区广安门内大街北线阁 5 号, 100053;

2. 中国人民解放军第三〇三医院; 3. 首都医科大学中药学院)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2010CB530406);

国家自然科学基金资助项目(81173167); 新药专项基金资助项目(2009ZX09301-005-2-7)

* 通讯作者: gamwuzhikui@sina.com, (010)88001149

[摘要] 目的 观察益髓生血颗粒治疗 α -血红蛋白 H(α -HbH) 病的疗效并探讨其分子机制。方法 采用益髓生血颗粒治疗 α -HbH 病患者 25 例, 治疗 3 个月后观察临床疗效, 并检测治疗前后患者中医证候评分、外周血血红蛋白(Hb)、血小板(PLT)、网织红细胞(Ret)、血红蛋白 H(HbH) 水平, 及外周血中造血细胞因子干细胞因子(SCF)、白细胞介素 3(IL-3)、集落刺激因子(GM-CSF)活性与表达的变化。结果 患者潮热盗汗、心悸气短、咽干治疗后 1、2、3 个月与治疗前比较均有明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。咽干治疗后 3 个月与治疗前 1、2 个月比较也有明显改善($P < 0.01$)。面色萎黄、腰膝酸软、眩晕、耳鸣与治疗前比较无明显改善($P > 0.05$)。患者 Hb、HbH 水平在治疗后 2、3 个月与治疗前比较均有提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Hb 治疗后 2、3 个月与治疗前 1 个月比较也有明显提高($P < 0.01$)。RBC、PLT 水平治疗后无明显上升($P > 0.05$)。治疗后 3 个月, SCF 和 GM-CSF 活性与表达较治疗后无明显增强($P > 0.05$); IL-3 活性与表达治疗后比治疗前则明显减弱($P < 0.05$)。结论 益髓生血颗粒治疗 α -HbH 病疗效肯定, 其疗效的分子机制可能与调节患者外周血造血细胞因子 IL-3 的活性与表达有关。

[关键词] α -血红蛋白病; 益髓生血颗粒; 造血细胞因子

Effect of Yisui Shengxue Granules on the Activity and Expression of Hematopoietic Factors in α -Hemoglobin H Disease Patients

LIU Li¹, ZHANG Xinhua², WANG Wenjuan³, FANG Suping¹, ZOU Yang¹, LI Junli¹, CHENG Yanling¹, WU Zhikui¹

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053; 2. 303 Hospital of People's Liberation Army; 3. Capital Medical University)

ABSTRACT **Objective** To observe the therapeutic effect and molecular mechanism of Yisui Shengxue Granules (granules to boost marrow and engender blood) on α -hemoglobin H (α -HbH) disease. **Methods** Totally 25 patients with α -HbH disease in Guangxi Zhuang Autonomous Region were treated with Yisui Shengxue Granules. The therapeutic effect was observed after 3 months of treatment. The levels of hemoglobin (Hb), platelet (PLT), reticulocyte (Ret) and HbH were detected before and after treatment. The activity and expression of stem cell factor (SCF), interleukin 3 (IL-3) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was observed before and after treatment. **Results** There were 24 effective patients and the symptoms such as hot flushes, night sweats, palpitations, shortness of breath and dry throat were significantly relieved after 1, 2 and 3 months of treatment ($P < 0.05$). Comparing with after 1-month or 2-month treatment, dry throat was significantly relieved after 3-month treatment ($P < 0.01$). There was no significant change after treatment in pale complexion, limp aching lumbus and knees, dizziness and tinnitus ($P > 0.05$). The levels of Hb and HbH were significantly increased after 2 or 3 months of treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with 1 month after treatment, the levels of Hb and HbH were significantly increased after 2 or 3 months of treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant change after treatment in the levels of red blood cell (RBC) and PLT ($P > 0.05$). The activity and expression of SCF and GM-CSF was not increased after treatment in t ($P > 0.05$). The activity and expression of IL-3 was significantly decreased after treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Yisui Shengxue Granules is effective for α -HbH disease and its molecular mechanism maybe relevant to regulating the activity and expression of SCF, GM-CSF and IL-3.

Keywords α -HbH disease; Yisui Shengxue Granules; hematopoietic factors

血红蛋白 H(HbH) 病是临床常见的中间型 α -地中海贫血, 在我国南方尤其是广西壮族自治区、广东等省等地发病率较高^[1]。对该病的治疗尚无有效的办法。我们根据中医肾藏精生髓理论, 在广西壮族

自治区高发区采用益髓生血颗粒治疗 α -血红蛋白 H(α -HbH)病患者,通过观察临床整体效应和造血相关细胞因子的活性与表达,初步探讨益髓生血颗粒治疗 α -HbH 病的分子机制,报道如下。

1 临床资料

1.1 诊断标准

西医诊断标准参照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》^[2]。

中医辨证标准参照《中医临床诊疗术语·证候部分》^[3]和《中药新药临床研究指导原则》^[4]。中医辨证属肝肾阴虚,精血不足证。

1.2 纳入标准

符合上述诊断标准者;血红蛋白(Hb)浓度 $<120\text{ g/L}$;近半年未输血或未服用任何抗贫血药物;签署知情同意书,自愿接受治疗。

1.3 排除标准

有免疫缺陷,肝、肾及血液系统等其他原发性疾病者。

1.4 一般资料

25 例 α -HbH 病患者来源于 2012 年 1—4 月中国人民解放军第三〇三医院门诊,其中男 16 例,女 9 例;年龄 6~44 岁,平均 22 岁;治疗前 Hb $71\sim109\text{ g/L}$,平均为 $(89.57\pm10.22)\text{ g/L}$;红细胞(RBC) $3.62\times10^{12}/\text{L}\sim5.33\times10^{12}/\text{L}$,平均为 $(4.60\pm0.58)\times10^{12}/\text{L}$;网织红细胞(Ret) $2.3\%\sim9\%$,平均为 $(6.31\pm2.24)\%$;HbH $5.6\%\sim23.2\%$,平均为 $(14.15\pm4.63)\%$;血小板(PLT) $252\times10^9/\text{L}\sim538\times10^9/\text{L}$,平均为 $(386.86\pm87.86)\times10^9/\text{L}$ 。

2 方法

2.1 治疗方法

患者均给予益髓生血颗粒治疗。益髓生血颗粒由山萸肉、制何首乌、熟地黄、黄芪、党参、当归、补骨脂、鸡血藤、阿胶、砂仁、鳖甲组成,由中国中医科学院广安门医院大兴制剂中心生产,批号 20110506,每盒 10 袋,每袋 12 g,相当于含生药量 23.68 g。

用法:2~6 岁每次 0.5 袋,每日 2 次;7~10 岁每次 1 袋,每日 2 次;10 岁以上每次 1 袋,每日 3 次,温开水冲服,疗程为 3 个月。

要求纳入病例在观察期间不输血,坚持服药,无合并其他治疗方法,药物每月发放 1 次,每月记录其用量。

2.2 观察指标与方法

2.2.1 中医证候量化评分 观察治疗前及治疗后

1、2、3 个月患者临床中医证候,按课题组制定的《中医证候量化评分表》^[5]进行中医证候量化评分。

2.2.2 主要血液学参数的变化 于治疗前及治疗后 1、2、3 个月 4 个时间节点,取外周血动态观察患者外周血 Hb、RBC、Ret、PLT、HbH 等主要血液学参数的改变。

2.2.3 外周血细胞因子活性检测 检测治疗前后患者血清中造血细胞因子包括干细胞因子(SCF)、白细胞介素-3(IL-3)、集落刺激因子(GM-CSF)的含量。采用北京华英生物技术研究所放射免疫试剂盒[SCF(HY-10125)批号 20120910;IL-3(HY-102019)批号:20120901;GM-CSF(HY-10114)批号:20120905]。

2.2.4 SCF、IL-3、GM-CSF 的表达检测 实时定量 PCR 检测治疗前后造血细胞因子 SCF、IL-3、GM-CSF 的表达差异;用 RNeasy Mini kit(50)试剂盒(lot. Na 139315390)提取单核细胞中的 mRNA,经反转录成 cDNA,以 GAPDH 为内参,引物由北京赛百盛生物科技有限公司合成,PCR 引物序列为:GAPDH:上游:5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3',下游:5'-CCATGGAGAAGGCTGGG-3';SCF 上游:5'-GGATGGATGTTTTGCCAAGT-3',下游:5'-GGTTCTGGGCTCTTGAATGA-3';IL-3 上游:5'-ACGCGACATCCAATCCATA-3',下游:5'-CCGCAGGAAAAGGTGAAAT-3';GM-CSF 上游:5'-TTCTGCTTGTCATCCCCCTT-3',下游:5'-CT-TCTGCCATGCCTGTATCA-3'。

2.2.5 PCR 扩增产物检测 琼脂糖电泳:1.5%的琼脂糖,溴化乙锭(EB)染色法检测。检测条件:电压 80 V,电泳时间 35 min,扩增产物在紫外灯下观察,呈红棕色荧光带。

2.3 疗效判定标准

参考文献^[2]:以 Hb、RBC、Ret 水平上升并且 Hb 上升大于 5 g/L 为有效,单纯 Ret 上升则视为无效。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,比较用配对 t 检验。

3 结果

25 例中有效 24 例,无效 1 例。

3.1 患者治疗前及治疗后不同时间中医证候评分比较

表 1 示,患者潮热盗汗、心悸气短、咽干治疗后 1、2、3 个月与治疗前比较均有明显改善,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。咽干治疗后 3 个月与

表 1 患者治疗前及治疗后不同时间中医证候评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

时间	例数	面色萎黄	腰膝酸软	潮热盗汗	眩晕	耳鸣	心悸气短	咽干
治疗前	25	5.00±2.11	0.75±2.03	2.25±2.54	0.38±0.49	0.29±0.55	0.79±0.83	1.71±1.08
治疗后 1 个月	24	4.75±1.51	0.38±1.01	0.50±1.44**	0.25±0.44	0.17±0.48	0.41±0.65*	1.21±1.14*
治疗后 2 个月	24	4.75±1.51	0.37±1.01	1.00±1.91**	0.17±0.38	0.21±0.59	0.29±0.46**	0.95±1.04**
治疗后 3 个月	24	4.75±1.51	0.25±0.85	1.38±1.00**	0.17±0.38	0.13±0.45	0.25±0.46**	0.50±0.78**△▲

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与治疗 1 个月比较,△ $P<0.01$;与治疗 2 个月比较,▲ $P<0.01$

表 2 患者治疗前及治疗后不同时间主要血液学指数比较($\bar{x} \pm s$)

时间	Hb(g/L)	RBC($\times 10^{12}/L$)	Ret(%)	HbH(%)	PLT($\times 10^9/L$)
治疗前	89.57±10.22	4.60±0.58	6.31±2.24	14.15±4.63	386.86±87.86
治疗后 1 个月	92.91±9.01	4.66±0.47	6.64±2.56	14.25±4.33	366.77±106.76
治疗后 2 个月	97.65±11.53**△	4.71±0.64	6.74±3.28	14.96±4.19*	395.05±91.98
治疗后 3 个月	97.04±10.81**△	4.71±0.63	8.40±3.76*	15.11±3.99*	415.50±82.22

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与治疗 1 个月比较,△ $P<0.01$ (Hb、RBC 检测 23 例,Ret、PLT、HbH 检测 22 例)

治疗后 1、2 个月也有明显改善,差异有统计学意义($P<0.01$)。面色萎黄、腰膝酸软、眩晕、耳鸣与治疗前比较有所改善,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 患者治疗前及治疗后不同时间主要血液学参数的比较

表 2 示,患者 Hb、HbH 水平在治疗后 2、3 个月和 Ret 在治疗后 3 个月与治疗前比较均有提高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Hb 治疗后 2、3 个月与治疗后 1 个月比较也有明显提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。患者 RBC、PLT 水平治疗后有上升的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.3 患者治疗前及治疗后 3 个月外周造血细胞因子 SCF、IL-3、GM-CSF 水平比较

表 3 示,治疗后 3 个月,患者外周造血细胞因子 SCF、GM-CSF 水平上升,但差异无统计学意义($P>0.05$);IL-3 水平与治疗前比较明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3.4 患者治疗前及治疗后 3 个月外周血 SCF、IL-3、GM-CSF mRNA 表达的比较

表 4 示,治疗后 3 个月,患者造血细胞因子 SCF 和 GM-CSF mRNA 表达治疗后较治疗前增强,但差异无统计学意义($P>0.05$);IL-3 mRNA 表达治疗后较治疗前则明显减弱,具有统计学意义($P<0.05$)。

3.5 患者 SCF、IL-3、GM-CSF mRNA PCR 扩增产物琼脂糖电泳图谱

图 1 示,Ct 值为荧光检测的域值代表的基因表达量,与 SCF、IL-3、GM-CSF 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱相一致,结果表明,治疗后 α -HbH 病患者外周血 SCF 表达增加,IL-3 表达减少。

表 3 患者治疗前及治疗后 3 个月外周造血细胞因子 SCF、IL-3、GM-CSF 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时间	SCF($\mu g/L$)	GM-CSF(pg/ml)	IL-3(pg/ml)
治疗前	1.46±0.62	108.59±26.36	14.44±3.34
治疗后 3 个月	1.75±1.03	115.92±36.23	10.69±2.27*

注:与治疗前比较,* $P<0.01$ (SCF、IL-3 检测 20 例,GM-CSF 检测 18 例)

表 4 患者治疗前及治疗后 3 个月外周 SCF、IL-3、GM-CSF mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

时间	SCF	GM-CSF	IL-3
治疗前	1.386±0.097	1.341±0.081	1.247±0.079
治疗后 3 个月	1.332±0.094	1.335±0.085	1.336±0.099*

注:与治疗前比较,* $P<0.05$ (Ct 值为荧光检测的域值,与基因的表达量成反比。结果以目的基因 Ct/GAPDH Ct 表示;共检测 20 例)

4 讨论

α -HbH 病属于中医学“童子劳”、“虚劳”等范畴,多因先天禀赋不足、精血不充所致,病理基础为肾精亏虚、脾肾两虚、精血不足,黄疸、积聚和本虚标实是该病的特点。益髓生血颗粒宗《黄帝内经》“精不足者,补之以味”的原则,根据中医肾藏精生髓,精血同源之理论组方而成,以滋肾养阴,益髓生血,健脾补气,消痞退黄为治疗原则,方中山茱萸、何首乌为君药,配熟地黄、补骨脂、黄芪、鳖甲等各药共奏补肾填精、益气补血之功,意在填补肾中真阴,使真阴得养,髓海充盈,血有生源^[6]。

本次用益髓生血颗粒治疗 25 例 α -HbH 病 3 个月,患者外周血 Hb、RBC、Ret、PLT、HbH 水平均有不同程度的提高,主要疗效性指标 Hb 和 HbH 水平与治疗前相比差异有统计学意义($P<0.05$)。显示患者血液学指标的改善与临床症状的缓解具有

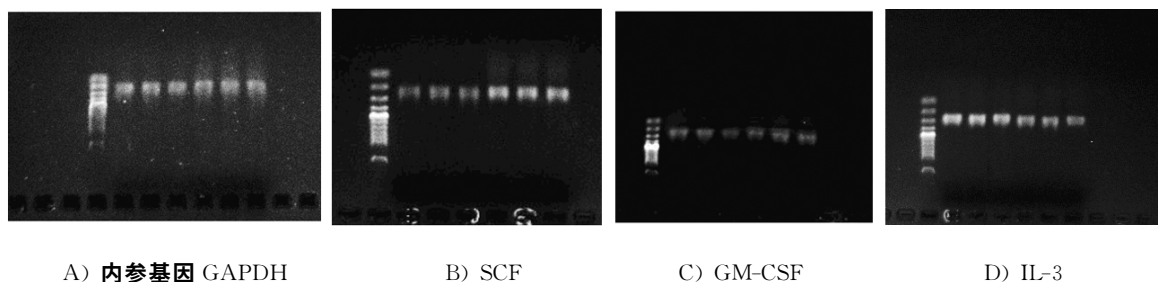


图 1 患者治疗前后造血细胞因子 mRNA PCR 扩增产物琼脂糖电泳图谱
注:前 3 个样品为治疗前,后 3 个为治疗后

一致性。研究表明,益髓生血颗粒治疗 α -HbH 病取得了肯定的临床疗效。

本次对 24 例 α -HbH 病患者治疗前后造血细胞因子的活性与表达情况的检测发现,治疗后外周血,IL-3 活性与表达则降低。正常造血过程包括造血干细胞或祖细胞不断地增殖和分化,该过程在多种细胞因子的调节下进行^[7]。SCF 主要由正常基质细胞产生的一类刺激早期造血干细胞及祖细胞增殖和定居的造血生长因子,可协同多种造血生长因子等促进早期祖细胞生成定向祖细胞,使其集落数增加,体积增大。研究发现 GM-CSF 具有多种生物学特性,对早期祖细胞具有多项潜能,也对红系和巨核细胞的起始分裂具有刺激作用,影响造血细胞的生命过程,激活他们的功能^[8]。本研究 SCF、GM-CSF 的活性与表达的提高趋势提示,益髓生血颗粒治疗 α -HbH 病可以通过调节造血刺激因子的表达,调节红系祖细胞和多种造血细胞在增殖和分化过程,来达到治疗目的。

地中海贫血患者由于无效造血、溶血,致使骨髓增生异常^[2],常伴随造血相关调控因子如 IL-3 等活性代偿性增强。而本研究发现,经益髓生血颗粒治疗后, α -HbH 患者体内 IL-3 的活性与表达在治疗后均有明显的降低,这与临床报道的对再生障碍性贫血患者 IL-3 水平检查结果一致^[9],这可能是由于 α -HbH 患者造血干/祖细胞严重缺乏,因而基质细胞代偿性分泌 IL-3 以促进造血,有些学者^[10]发现再生障碍性贫血患者活化 T 细胞产生的 IL-3 与正常无差异,他们同时认为造血抑制因子产生过量而非刺激因子产生不足是部分再生障碍性贫血发病的主要原因。鉴于地中海贫血属基因缺失或突变致使患者骨髓增生异常导致溶血性贫血的临床特点,推测 α -HbH 患者 IL-3 水平升高,除代偿机制外,还可能

本研究为补肾益髓治疗 α -HbH 病的有效性提供部分依据。但要探讨其治疗 α -HbH 病的分子疗效机理,仍需要作更深入的研究。

参考文献

- [1]Cao A,Calanella R,Rosatelli MC,et al. Clinical Experience of Management of β -thalassemia: the sardinian experience[J]. Semin Hematol,1996,33(1):66-75.
- [2]张之南. 血液病诊断及疗效标准[S]. 北京: 科学出版社,1998:48-59.
- [3]国家技术监督局. 中医临床诊疗术语·证候部分[S]. 北京: 中国标准出版社,1997:2-3,33-35,37-40.
- [4]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,2002:173-184,263-266.
- [5]王文娟,刘文军,吴志奎,等. 中间型地中海贫血患者中医证候分布规律研究[J]. 中医杂志,2007,48(8):726-729.
- [6]张俊武,龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 2 版. 南宁: 广西科学技术出版社,2003:156-215.
- [7]王文娟,吴志奎,张新华,等. 益髓生血颗粒治疗血红蛋白 H 病 25 例临床观察[J]. 中西医结合学报,2008,6(2):153-156.
- [8]傅晋翔,虞斐,张学光. 再生障碍性贫血患者造血细胞生长因子的测定及其意义[J]. 新医学,2001,32(5):274-276.
- [9]李北兵,白明,杨莹. 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的研究进展综述[J]. 黑龙江医药,2010,23(3):407-408.
- [10]傅晋翔,虞斐,张学光. 重症贫血患者血清白细胞介素-3 检测的意义[J]. 齐鲁医学检验,2003,14(2):27-28.
- [11]Hsu HC,Tsni WH,Chen LY,et al. Production of hematopoietic regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells in patients with aplastic anemia[J]. EXP Hematol,1996,24(1):31-36.
- [12]Cao A,Calanella R,Rosatelli MC,et al. Clinical Experience of Management of β -thalassemia: the sardinian experience[J]. Semin Hematol,1996,33(1):66-75.
- [13]张新华,黄有文,王荣新,等. 益髓生血灵对小鼠骨髓造血干/祖细胞的影响[J]. 浙江中医杂志,2002,25(10):448-449.

(收稿日期:2013-01-16;修回日期:2013-02-22)

[编辑:叶 晨]