

· 临床 ·

补肾活血方药对 CAA 患者骨髓单个核细胞 C-met SF 基因表达的影响

衣春光^{1*}, 李方莲²

(1. 长春中医药大学, 长春 130021; 2. 吉林大学第二医院, 长春 130041)

[摘要] **目的:**探讨补肾活血方药对慢性再生障碍性贫血(CAA)患者骨髓造血细胞 C-met SF 基因表达的影响。**方法:**60 例 CAA 病人随机分为治疗组和对照组, 治疗组给予补肾活血中药汤剂, 每日 1 剂, 分 2 次口服; 对照组给予再障生血片, 5 片, 每日 3 次, 口服, 疗程为 3 个月, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 CAA 患者治疗前后骨髓单个核细胞 C-met SF mRNA 基因含量的变化。**结果:**CAA 患者骨髓单个核细胞 C-met SF mRNA 表达水平高于正常对照组, 治疗后 C-met SF mRNA 表达水平有不同程度下降, 并且补肾活血方药对 C-met SF 表达水平的下调程度优于再障生血片组 ($P < 0.05$)。**结论:**CAA 患者骨髓 C-met SF 的基因表达存在异常; 补肾活血方药可能通过调节骨髓 C-met SF 基因的表达而改善 CAA 的骨髓造血功能, 促进骨髓造血功能恢复。

[关键词] 补肾活血方药; 再生障碍性贫血; 基因; C-met SF

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0231-03

Effect of Bushen Huoxue Decoction on Expression of Bone Marrow Mononuclear Cell C-met SF Gene in Patients with Chronic Aplastic Anemia

Yi Chun-guang^{1*}, Li Fang-lian²

(1. Changchun College of Chinese Medicine, Changchun 130021, China;

2. The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical effect of Bushen Huoxue Decoction on chronic aplastic anemia (CAA) patients, and observe the effect on expression level of myelo-cytokine C-met SF. **Method:** Sixty CAA cases were randomly divided into treatment group and control group. Treatment group: the patients were given Bushen Huoxue Decoction, and one dose divided into 2 times daily. Control group: the patients were given Zaizhang Shengxue tablet and each took 5 pills 3 times daily. The course of treatment was three months. This experiment employed reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) method to exam the change of expression level of bone marrow mononuclear cell (BMMC) C-met SF receptor mRNA. **Result:** The expression level of BMMC C-met SF receptor mRNA in CAA patients was higher than that in normal control group. And in both treatment groups the expression levels were descended in different degree. Moreover, the descent in Bushen Huoxue Decoction group was superior to that in Zaizhang Shengxue tablet group. **Conclusion:** There was abnormal expression of bone marrow SCF receptor C-met SF in CAA patients; Bushen Huoxue Decoction can improve the hematopoietic function of bone marrow to promote restoration by regulating the bone marrow C-met SF mRNA.

[收稿日期] 2011-02-28

[基金项目] 吉林省中医药管理局科学技术研究项目(2004-BZZ16)

[通讯作者] * 衣春光, 副教授, 从事中医临床研究, Tel:0431-86172566, E-mail:ycg6570@163.com

[Key words] Bushen Huoxue Decoction; aplastic anemia; gene; C-met SF

慢性再生障碍性贫血 (chronic aplastic anemia, CAA) 以全血细胞减少为特征, 中医属“虚劳”, “血证”范畴。近年来人们越来越重视肾虚血瘀在本病发病机制中的作用, 对补肾活血法治疗 CAA 机制的研究逐渐增多, 我们采用补肾活血中药治疗 CAA 取得了显著的临床疗效, 并采用 RT-PCR 技术检测 CAA 患者治疗前后骨髓单个核细胞 C-met SF 基因水平的变化, 以期阐明补肾活血中药治疗 CAA 的疗效机制, 为本疗法治疗 CAA 提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 一般资料 60 例 CAA 患者均为 2005 年 5 月至 2007 年 10 月长春中医药大学附属医院门诊及住院患者。其中男性 28 例, 女性 32 例; 年龄 15 ~ 65 岁, 平均 26.6 岁。随机分为治疗组和对照组各 30 例, 两组患者年龄、性别、病程、血象、骨髓象分级大致相同。所有病例均符合 1987 年第四届全国再生障碍性贫血会议修订的 CAA 诊断标准。正常对照组 10 例, 男 4 例, 女 6 例, 年龄 16 ~ 63.5 岁, 均为健康献血者。

1.2 诊断及疗效判定标准 参照张之南《血液病诊断及疗效标准》^[1]。

1.2.1 诊断标准 ①全血细胞减少, 网织红细胞绝对值减少; ②一般无肝脾肿大; ③骨髓至少有一个部位增生减低或重度减低, 骨髓小粒非造血细胞增多; ④除外引起全血细胞减少的其他疾病; ⑤一般抗贫血药物治疗无效。

1.2.2 疗效评定标准 ①基本治愈: 贫血和出血症状消失, 血红蛋白男 $> 120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 女 $> 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 白细胞 $4.0 \times 10^9/\text{L}$, 血小板达 $80 \times 10^9/\text{L}$, 随访 1 年以上未复发者; ②缓解: 贫血和出血症状消失, 血红蛋白男 $> 120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 女 $> 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 白细胞 $3.5 \times 10^9/\text{L}$, 血小板有一定程度的增长; ③明显进步: 贫血和出血症状明显好转, 不输血, 血红蛋白较治疗前一个月内常见值增长 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 并能维持 3 个月以上; ④无效: 经充分治疗后症状, 血象未达明显进步者。

1.3 试剂及仪器 C-met SF 引物序列参照文献 [2] 设计, β -actin (GAPDH) 引物参照文献 [3], C-met SF 655 bp, 上游引物序列 5'-ACAGTGGCATGTCAACATCGCT-3', 下游引物序列 5'-GCTCGGTACTCTACAGATTC-3'; β -actin 500 bp, 上游引物序列为

5'-GGTGAAGGTCGGTGTCAACG-3', 下游引物序列为 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3', 上述引物由上海生物工程 (上海) 有限公司合成; Trizol、逆转录试剂盒均购自美国 Promega 公司。GS-15R 低温高速离心机, 美国 Beckman 公司; PTC-200 型 PCR 扩增仪, 美国 MJ Research 公司; 美国 VILBER LOURMAT 型成像仪。

1.4 治疗方法 治疗组给予补肾活血方药 (熟地黄、何首乌、补骨脂、丹参、坤草、白花蛇舌草、泽泻等药物组成), 常规水煎取汁 300 mL, 每次 150 mL, 2 次/d 口服, 由长春中医药大学附属医院制剂室制备。对照组投以再障生血片 (吉林省辽源亚东制药厂生产), 5 片/次, 3 次/d。疗程均为 3 个月, 治疗前后分别行骨髓穿刺检查。治疗期间停用其他治疗 CAA 药物, 如合并出血和感染则住院给予对症治疗或支持治疗。正常对照组不给予任何干预。

1.5 骨髓单个核细胞 C-met SF mRNA 检测

1.5.1 标本制备 每个人选者取髂前或髂后上棘行骨髓穿刺, 取骨髓 6 mL, 分别装入配有 EDTA-K₂ 的 2 个试管, 轻轻摇匀以防凝固备用。

1.5.2 RT-PCR 法检测骨髓单个核细胞 C-met SF mRNA 水平 采用 Trizol 法提取骨髓单个核细胞总 RNA, 用紫外分光光度仪测定 RNA 质量浓度 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 及 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 。如比值低于 1.7, 需要重新提取 RNA。

System 50 μL ; MgCl₂ 10.0 μL , 10 × Buffer 5.0 μL , dNTP 5.0 μL , RNase 2.5 μL , AMV 3.5 μL , Oligo 5.0 μL , RNA 模板量 (为 1 500/测得浓度最小值), 加无 RNA 酶水补足至 50.0 μL 。采用二步法进行扩充。逆转录 (合成 cDNA) 反应条件: 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min; DNA PCR 反应条件: 94 °C 2 min 预变性, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 循环, 72 °C 延伸 5 min。

取 12 μL PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 VILBER LOURMAT 型成像系统成像, 分别测量 C-met SF, β -actin 电泳条带的累积吸光度 (IA), 以二者的比值代表 C-met SF mRNA 表达水平。

1.6 统计方法 应用 SPSS 11.5 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 *t* 检验, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组疗效比较 总有效率治疗组优于对照组 ($P < 0.05$)。见表1。

2.2 两组治疗前后骨髓单个核细胞 C-met SF mRNA 表达水平的比较 疗前两组 C-met mRNA 表

表1 两组临床疗效比较 ($n = 30$)

组别	基本治愈/例	缓解/例	明显进步/例	无效/例	总有效率/%	基本治愈缓解率/%
治疗	9	11	5	5	83.33 ¹⁾	66.67 ¹⁾
对照	4	7	10	9	70.00	36.67

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表2 两组治疗前后骨髓单个核细胞 C-met mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	疗前	疗后
治疗	30	1.00 ± 0.12 ²⁾	0.93 ± 0.07 ^{1,3,4)}
对照	30	1.01 ± 0.11 ²⁾	0.98 ± 0.08 ²⁾
正常	10	0.91 ± 0.07	0.89 ± 0.08

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与组内治疗前比较³⁾ $P < 0.05$;与对照组治疗后比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

CAA属中医“血证”、“虚劳”等范畴。多数医家采用益气养血方法治疗本病。我们发现,很多CAA病人虽然有气血双亏的症状,但肾虚症状也贯穿在整个发病过程中。“肾藏精,主骨生髓”,精、血、髓三者同源,故认为肾虚髓枯是CAA发病的根本。CAA病程长,而“久病入络”,“虚久必瘀”,因此肾虚必兼血瘀,瘀血加重肾虚,实验研究表明活血化瘀药能改善骨髓造血微环境^[4];补肾活血中药可使血液流速和毛细血管网明显增加,改善骨髓环境,促进骨髓细胞的合成代谢,提高DNA的抗损伤能力^[5],改善黏附分子与骨髓基质细胞的黏附功能^[6-7]。我们采用补肾填精、活血通络法治疗CAA,方中以熟地黄补肾填精益髓;臣以何首乌滋补肝肾;伍用补骨脂以补肾壮阳;强筋壮骨,丹参、坤草活血以生血;白花蛇舌草清热解毒以通络;泽泻利水渗湿给毒邪以出路。诸药同用共奏填精生髓、活络解毒之功。

C-met SF是肝细胞生长因子(HGF)的受体是原癌基因的产物,具有促进分裂、组织成形、诱导上皮细胞迁移以及诱导血管生成等作用^[8]。C-met与HGF的相互作用在造血细胞的增殖、分化、黏附及生存等过程中起重要作用。本研究显示,CAA患者骨髓单个核细胞C-met SF mRNA表达水平明显升高,随着CAA病情的缓解,C-met SF mRNA基因水平也随之下降,且治疗组下降程度与再障生血片相

达水平均高于正常组 ($P < 0.01$)。疗后治疗组 C-met mRNA 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$),与正常组比仍有统计学差异 ($P < 0.05$),未达到正常水平;疗后治疗组下降比对照组明显 ($P < 0.05$)。见表2。

比具有明显优势。我们推测CAA患者骨髓造血细胞中C-met SF虽然数量不少,但其功能可能存在缺陷,不能与其配体HGF正常结合,从而使骨髓造血功能衰竭;实验证明补肾活血方药能降低CAA造血细胞C-met SF表达水平,且优于再障生血片,这一作用有可能是因为该方能改善C-met SF的功能,提高与其配体HGF结合能力,从而促进CAA患者骨髓造血功能恢复。

[参考文献]

- [1] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 34.
- [2] 富名水, 张哲, 曹美凤, 等. 培养的人小梁细胞 HGF 和 c-met 的表达[J]. 临床眼科杂志, 2002, 10(5): 390.
- [3] 张泓, 邵宗鸿, 陈桂彬, 等. 骨髓增生异常综合征骨髓单个核细胞 c-kit 受体表达及功能的研究[J]. 中华血液学杂志, 2000(4): 176.
- [4] 谢仁敷. 中医补肾活血促进造血机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(增刊): 65.
- [5] 王树庆, 李建华, 张圣明, 等. 补肾化瘀方药对再生障碍性贫血患者骨髓细胞 DNA 含量的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996(7): 411.
- [6] 孙伟正, 马智刚, 俞亚琴, 等. 补髓生血颗粒对慢性再生障碍性贫血患者骨髓造血细胞黏附作用影响的研究[J]. 中国医药学报, 2005, 20(2): 874.
- [7] 孙伟正, 王金环, 孙岸弢. 补髓生血颗粒对慢性再生障碍性贫血患者骨髓单个核细胞黏附分子 VLA - 6P/CD49f 水平影响的研究[J]. 中医药学报, 2007, 15(3): 19.
- [8] Zeng Q, Chen S, You Z, et al. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NF- κ B[J]. J Biol Chem, 2002, 277(28): 25203.

[责任编辑 何伟]