

补髓生血颗粒剂对慢性再障血清IL-6及TGF- β_1 表达水平的影响

张守琳¹, 衣春光¹, 马志刚², 孙伟正³

(1 长春中医学院, 吉林 长春 130021; 2 烟台毓璜顶医院, 山东 烟台 264000;

3 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150041)

摘要:目的: 探讨补髓生血颗粒治疗 CAA 的疗效机理。方法: 60 例病人随机分为治疗组和对照组, 分别给予补髓生血颗粒和再障生血片口服, 观察治疗前后血清 IL-6 及 TGF- β_1 表达水平, 并和正常人相比较。结果: 疗前病人血清 IL-6 及 TGF- β_1 分泌水平升高 ($P < 0.05$), 疗后 IL-6 及 TGF- β_1 下降, 且补髓生血颗粒组明显低于再障生血片组 ($P < 0.05$)。结论: 补髓生血颗粒通过下调负性造血调控因子的作用发挥治疗 CAA 的作用, 且其疗效优于再障生血片。

关键词: 补髓生血颗粒; IL-6; TGF- β_1

中图分类号: R255.7; R273 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)02-0055-03

慢性再生障碍性贫血(以下简称为 CAA)是多种

原因导致骨髓造血功能衰竭所引起的疾病。目前认为正、负性细胞因子分泌紊乱在 CAA 发病中起重要作用^[1]。本文通过对应用补髓生血颗粒剂对 CAA

患者血清白介素 6 (IL-6)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 表达水平的影响, 观察其与骨髓造血功能的改变及临床转归的关系, 并进一步探讨补髓生血颗粒剂治疗 CAA 的疗效机理。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有病例均来自黑龙江中医药大学附属第一医院 2001 年 3 月~ 2003 年 2 月期间的门诊和住院患者, 共 60 例, 随机(随机表由计算机产生)分为实验组和对照组。实验组 32 例, 男 18 例, 女 14 例, 年龄在 9~ 65 岁之间。对照组 28 例, 男 16 例, 女 12 例, 年龄在 10~ 66 岁之间。正常组 20 例, 男 10 例, 女 10 例, 年龄在 15~ 54 岁之间。均符合 1987 年第四届全国再障学术会议修订的 CAA 诊断标准^[2]。

1.2 治疗方法 实验组投以补髓生血颗粒剂(主要药物有熟地黄、山茱萸、枸杞子、鹿茸等。由黑龙江中医药大学附属一院药厂制备, 哈卫制药字(98)1003 号)1 袋/次, 一日 3 次; 对照组投以再障生血片(由吉林省辽源中药厂生产, 吉卫药准字(84)730077), 5 片/次, 一日 3 次。所有患者均停用治疗 CAA 的其它药物两周以上。以 3 个月为 1 个疗程, 2 个疗程后判定疗效。合并感染、严重贫血和出血时, 可短期配合使用西药对症治疗或适当输血以改善症状。

1.3 实验方法

1.3.1 主要仪器及试剂 TGF- β_1 试剂盒: 深圳晶美生物工程有限公司; IL-6 试剂盒: 上海森雄生物工程有限公司。恒温水浴箱: 哈尔滨市松花江医疗器械厂; 酶标仪: Clinibio 128, Epson, 美国产。低温高速离心机: 郑州医疗设备厂。

1.3.2 标本制备 取 CAA 患者实验组、对照组和正常组人的静脉血 3ml, 注入加有抗凝剂 EDTA 的无热原和内毒素的试管内, 室温 3500rpm 离心 20min, 取上清, 按一次用量分装, 冻存于 -20℃ 待测。

1.3.3 IL-6 水平测定 设标准 8 孔, 每孔中各加入样品稀释液 100 μ l, 加标准品 100 μ l, 混匀后用加样器吸出 100 μ l, 移至第二孔。如此反复作对倍比稀释至第七孔, 最后从第七孔中吸出 100 μ l 弃去, 使之体积均为 100 μ l。第八孔为空白对照。将测品孔每孔各加入待测样品 100 μ l。将反应板充分混匀后, 置 37℃ 120min。将反应板充分洗涤 4~ 6 次, 在滤纸上阴干。每孔加第一抗体工作液 50 μ l, 将反应板充分混匀后置 37℃ 60min, 再次洗板, 每孔加酶标抗体工作

液 100 μ l, 将反应板置 37℃ 60min, 再次洗板, 每孔加入底物工作液 100 μ l, 置 37℃ 暗处反应 5~ 10min, 每孔加入 1 滴终止液混匀, 在 492nm 处测吸光值。

1.3.4 血清 TGF- β_1 水平测定 将 450 μ l 标准品/标本稀释液(1b)加入 10 μ l 血清或血浆标本。加 20 μ l 1N HCl, 盖紧, 上下混匀。2~ 8℃ 放置 60 \pm 2min。加 20 μ l 1N NaOH, 盖紧, 上下混匀。(总体积 500 μ l, 即 50 倍稀释)。即用, 或置 -20/-70 可保存 3d。计算结果时应乘以稀释倍数。从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条, 其它板条密封放回 4℃。除空白孔外, 分别将标本或不同浓度标准品(50 μ l/孔)加入相应孔中; 再加生物素化抗体工作液(50 μ l/孔), 用封板胶纸封住反应孔。室温(18~ 25℃)孵育 120min。洗板 4 次。除空白孔外, 加入酶结合物工作液(100 μ l/孔)。封住板孔, 室温(18~ 25℃)孵育 30min。洗板 4 次。加入底物 A(5a)、B(5b)(各 1 滴或 50 μ l/孔), 避光室温放置 5~ 30min(视显色深浅灵活掌握)。加入终止液(6)(1 滴或 50 μ l/孔), 混匀后即刻测量 OD450 值(5min 内)。

2 结果

2.1 IL-6 水平测定结果(见表 1) 表 1 结果表明, 疗前实验组、对照组与正常组相比差异均有显著性意义($P < 0.05$), 即 CAA 患者疗前 IL-6 分泌水平均高, 但实验组和对照组两组间差异无显著性意义($P > 0.05$); 实验组和对照组疗后 IL-6 水平下降($P < 0.05$); 两组间差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表 1 血清 IL-6 水平疗前疗后与正常组相比($\bar{x} \pm s$)

组别	n		IL-6 (pg/ml)
实验组	32	治疗前	52.38 \pm 13.84*
		治疗后	35.90 \pm 13.27* Δ Δ Δ *
对照组	28	治疗前	51.53 \pm 11.40 Δ
		治疗后	44.57 \pm 9.41*
正常组	20		23.64 \pm 6.37

注: 与正常组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组疗前比较 Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; 与对照组比较 Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

表 2 血清 TGF- β_1 水平疗前疗后与正常组相比($\bar{x} \pm s$)

组别	n		TGF- β_1 (ng/ml)
实验组	32	治疗前	8.31 \pm 1.36*
		治疗后	1.13 \pm 0.18 Δ Δ Δ *
对照组	28	治疗前	8.49 \pm 1.44*
		治疗后	2.27 \pm 0.39* Δ
正常组	20		1.15 \pm 0.19

2.2 血清 TGF- β_1 水平疗前疗后与正常组相比(见

表 2) 表 2 结果表明, 实验组与对照组疗前无显著差异 ($P > 0.05$), 与正常组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 说明疗前 CAA 患者血清 TGF- β_1 水平显著升高。疗后实验组、对照组与正常组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 疗后 TGF- β_1 均下降且接近正常组水平, 但实验组与对照组相比疗后差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

CAA 属中医血证, 虚癆范畴。肾虚是再障发病的内因, 这已是多数学者的共识。肾为先天之本, 主骨生髓, 藏精, 精血互化, 肾中之精直接参与生血, 故肾精充足则髓有所养, 骨有所充, 血有所生, 才能保持血液充足, 周流不息, 营养全身。因此, 针对再障的发生与肾虚关系密切这一病理变化, 黑龙江中医药大学孙伟正教授总结了多年的临床经验, 研制出补髓生血颗粒剂。实践证明本颗粒剂为治疗 CAA 的有效方剂。

目前认为, 细胞因子分泌紊乱是 CAA 发病重要原因之一。而 IL-6 的分泌紊乱贯穿于 CAA 发病之中^[3]。实验测定再障患者 IL-6 水平增高, 与 Kojima 等^[4]检测结果接近, 推测原因: 1. 再障患者造血功能低下, 机体代偿性分泌 IL-6 以促进造血。2. 患者 CD₈ 细胞激活, 使分泌 TNF、IFN 量提高, 有刺激 IL-6 分泌作用^[5]。相关分析发现 IL-6 与再障患者外周血白细胞数及 CD₄ 细胞呈负相关。揭示出 IL-6 的变化与 CAA 的细胞免疫异常有一定关系, 并反映出细胞因子网络失调在 CAA 发病中所起作用的复杂性^[6]。

近年研究发现 TGF- β_1 是较原始的造血祖细胞生长的选择性抑制因子。它对早期祖细胞的集落形成^[7], 如粒红巨核巨噬多系集落形成单位 (CFU-GEMM)、培养 14d 的粒单系集落形成单位 (CFU-GM)、红系爆式集落形成单位 (BFU-E) 等有很强的抑制作用, 而对 G-CSF、M-CSF、EPO 作用形成的较成熟的祖细胞如粒系集落形成单位 (CFU-G)、单核系集落形成单位 (CFU-M) 不起作用。

当生长因子依赖的祖细胞的生长被 TGF- β_1 抑制时, 这些细胞表面的 IL-1、GM-CSF 和 IL-3 受体表达下调^[8]。去除 TGF- β_1 作用后, 抑制作用可完全逆

转。因此, TGF- β_1 可能通过下调正性作用因子受体而保持祖细胞处于细胞周期静止状态。FLT3 是促进早期造血细胞增殖的重要细胞因子, 其受体水平可被 TGF- β_1 下调, 但加入抗 TGF- β_1 后很快又被上调, 抗 TGF- β_1 使多能和高增殖潜能祖细胞表达低水平的 FLT3 受体。揭示了 TGF- β_1 通过调节细胞因子受体实现其对造血的调节作用。

本次实验中, 我们观察到实验组和对照组患者 IL-6、TGF- β_1 水平异常增高, 说明 IL-6、TGF- β_1 参与了负向调控造血, 正是由于这些造血负调控因子的分泌增加, 抑制了机体的造血功能。经补髓生血颗粒剂治疗以后, IL-6、TGF- β_1 水平均下降, 同时 CAA 患者病情也逐渐好转, 说明补髓生血颗粒剂有下调负性造血调控因子作用, 对机体的造血功能有较好的调节作用, 并且其作用明显优于再障生血片。

参考文献:

- [1] Hsu H C, Tsai W H, Che L Y. Overproduction of inhibitory hematopoietic cytokines by lipopolysaccharide-activated peripheral blood mononuclear cells in patients with aplastic anemia [J]. *Ann Hematol*, 1995, 71: 281.
- [2] 杨天楹. 临床血液学进展[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992. 218.
- [3] 王欣, 张明琰, 宋素琴, 等. 再生障碍性贫血患者细胞免疫功能与造血细胞因子的研究[J]. *中华血液杂志*, 1998, 19(4): 181.
- [4] Kojima S. Hematopoietic growth factors released by marrow stromal cells patients with aplastic anemia[J]. *Blood*, 1992, 79: 2256-2259.
- [5] Moore MAS. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators (review) [J]. *Blood*, 1991, 78: 1-4.
- [6] 陈幸华. 骨髓基质细胞在造血调控中的作用[J]. *国外医学, 临床生物化学与检验分册*, 2000, 21(1): 20.
- [7] W. C. Hooper. The role of transforming growth factor-beta in hematopoiesis. A review[J]. *Leuk Res*, 1991, 15: 179.
- [8] S. Kada, H. Nakuchi, K. Nagagoshi, et al. Enrichment and Characterization of Murine Hematopoietic Stem Cells Express C-kit Molecule[J]. *Blood*, 1991, 78: 1706.