

补髓生血冲剂对慢性再生障碍性贫血患者 血清 Fas、Bcl-2 表达作用

孙伟正¹, 罗梅宏¹, 蒋 宁¹, 李海霞¹, 赵新广¹, 孙岸波², 孙劲辉³

(1 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040;

2 黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨 150010; 3 北京中医药大学, 北京 100070)

关键词: 补髓生血冲剂; 贫血; 再生障碍性; Fas、Bcl-2

中图分类号: R256.3 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)04-0054-02

再生障碍性贫血(AA)作为造血干/祖细胞增殖缺陷性疾病, 是否存在造血干/祖细胞过早、过度凋亡已越来越引起人们的重视。我们课题组的前期工作提示, 骨髓造血干细胞存在着细胞凋亡, 证实了AA时骨髓造血细胞凋亡明显增加, 这与有关报道一致^[1]。本文从免疫学角度检测慢性再生障碍性贫血(CAA)患者血清促细胞凋亡因子(Fas)、血清抑凋亡因子(Bcl-2)表达水平, 并观察用药前后的变化, 以进一步探讨CAA发病中的凋亡机制及中药补髓生血冲剂治疗CAA的疗效机理。

1 材料和方法

1.1 病例资料 本项研究的实验组与对照组病人诊断及疗效判定均采用1987年中华血液学会第四届全国再生障碍性贫血学术会议^[2]制定的AA及CAA诊断及疗效判定标准进行判定。其中实验组30例, 男17例, 女13例, 年龄9~62岁, 中位年龄35.5岁; 对照组18例, 男8例, 女12例, 年龄6~65岁, 中位年龄37岁, 其病程、病情、年龄等与实验组相似。正常对照30例, 男16例, 女14例, 平均年龄38岁, 皆为健康献血员。

1.2 治疗方法

1.2.1 实验组 CAA患者均在停用其他治疗两周后, 口服补髓生血冲剂(熟地黄、山萸肉、枸杞子、淫羊藿、巴戟天、鹿茸、黄芪、红参、鸡血藤、白花蛇舌草、猪苓等)治疗。本冲剂的制备, 参照国家药典(90版)中药制剂冲剂制作方法。由黑龙江中医药大学附属一院药厂制备。

对照组使用再障生血片治疗, 由吉林省辽原市中药厂生产(吉卫药准字(84)730077)。

1.2.2 给药方法 实验组使用补髓生血冲剂治疗, 一次1袋, 日三次。对照组服再障生血片, 一次服5片, 日服三次。实验组与对照组均以三个月为一个疗程, 两个疗程后判定疗效。

1.3 样品制备 取CAA患者和正常献血员的静脉血2ml, 注入加有抗凝剂EDTA的无热原和内毒素的试管内, 4℃3500rpm离心20min, 取上清, 按一次用量分装, 冻存于-20℃待测。注意去除溶血或高血脂标本。

1.4 Fas、Bcl-2测定 采用酶联免疫法(ELISA), 试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供, 操作按说明书进行。

2 结果

2.1 补髓生血冲剂与再障生血片疗效对比 补髓生血冲剂治疗CAA30例, 基本治愈1例, 占3.33%, 缓解12例, 占40.00%, 明显进步9例, 占30.00%, 无效8例, 占26.67%, 总有效率为73.33%。对照组18例, 基本治愈0例, 缓解5例, 占27.78%, 明显进步6例, 占33.33%, 无效7例, 占38.89%, 总有效率为61.11%。两组疗效差异显著($P < 0.05$)。(见表1)。

2.2 实验组和对照组治疗前后血清Fas水平与正常组相比的情况 CAA患者疗前血清Fas水平高于正常($P < 0.05$), 疗后血清Fas水平均有所降低, 与疗前比差异显著($P < 0.05$)。疗后实验组与正常组Fas水平比较无显著性差异($P < 0.05$), 对照组与正常组及实验组相比差异显著($P < 0.05$)。(详见表2)。

收稿日期: 2001-10-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 NO: 39870930

表1 补髓生血冲剂与再生生血片疗效对比

组别	基本治愈	缓解	明显进步	无效	有效	P 值
实验组	例数(30)	1	12	9	8	22
	比例(%)	3.33	40.00	30.00	26.67	73.33
对照组	例数(18)	0	5	6	7	11
	比例(%)	0	27.78	33.33	38.89	61.11

表2 各组疗前、疗后血清 Fas 水平变化

组别	例数	Fas(ng/ml)	
		疗前	疗后
实验组	30	6.39 ± 0.05	5.10 ± 0.06 ^{☆△}
对照组	18	6.38 ± 0.04	5.14 ± 0.06 ^{☆□△}
正常组	30	5.05 ± 0.15 [△]	

注:组内疗前疗后比较[☆] $P < 0.05$;实验组与对照组疗后比较[△] $P < 0.05$;各组疗后与正常组比较[□] $P < 0.01$,[□] $P < 0.05$ (下同)

2.3 实验组、对照组治疗前后血清 Bcl-2 水平与正常组比较 实验组、对照组疗前 Bcl-2 水平明显低于正常,与正常组比差异非常显著($P < 0.01$);而两组疗后 Bcl-2 水平虽有上升,但与正常组比,差异仍显著($P < 0.01$);疗后实验组与对照组比,无显著差异($P > 0.05$)。(详见表3)。

表3 各组疗前、疗后血清 Bcl-2 水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Bcl-2(OD 值, 450nm)	
		疗前	疗后
实验组	30	0.0815 ± 0.0102	0.0852 ± 0.0080 ^{☆□□}
对照组	18	0.0816 ± 0.0105	0.0832 ± 0.0074 ^{☆□□}
正常组	30	0.4341 ± 0.0233 ^{□□}	

3 讨论

本结果显示,CAA 病人的血清 Fas 处于高表达状态,而 Bcl-2 则呈低水平表达。在使用补肾中药治疗后,Fas 水平有不同程度的下降,与疗前比较有显著差异($P < 0.05$),与对照组比差异亦显著($P < 0.05$),而与正常组比则无显著性差异($P > 0.05$);Bcl-2 水平虽然有所升高,但仍低于正常组($P > 0.05$),且实验组疗后与对照组疗后 Bcl-2 水平相比,没有显著性差异($P < 0.05$)。Fas 作为 TNF/NGF 受体超家族的成员,在与其天然配体 FasL 或它的特异性单克隆抗体相互作用时,即可激发死亡信号,导致

细胞迅速凋亡。Fas、FasL 介导细胞凋亡必须具备 3 个条件:1) 细胞表达足够密度的 Fas 受体;2) 高密度的可溶性或膜分子 Fas 与 FasL 结合并以多聚体形式连接;3) 细胞关闭抗凋亡程序而成为凋亡敏感细胞。Callera 等^[3]观察了 AA 患者外周血和骨髓 T、B 淋巴细胞 P⁵³、Bcl-2、Fas 和 FasL 的表达,发现 AA 时 CD₃₄⁺ 细胞 T 和 B 淋巴细胞表面 Fas 表达过度是一个普遍现象。Bcl-2 具有抑凋亡作用,可抑制多种凋亡信号引起的细胞凋亡程度。有研究^[4]证实,在缺少外源性生长因子的情况下,由 Bcl-2 过量而抑制了凋亡过程的造血母细胞能分裂、分化,揭示造血因子通过抑制凋亡来控制红细胞生成。

4 结论

CAA 患者血清存在着细胞凋亡相关因子的表达异常,即促凋亡因子的过度表达和抑凋亡因子的表达不足。Fas 的过度表达促进细胞凋亡,而由于 Bcl-2 水平的降低,对细胞凋亡的抑制作用减弱,从而导致 CAA 发生凋亡过度。我们研制的补肾生血中药补髓生血冲剂是通过降低 CAA 患者的 Fas 水平,从而抑制 CAA 的细胞凋亡来达到治疗的目的,并非在于调节凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达。经补髓生血冲剂治疗后的 CAA 患者 Fas 水平较使用再生生血片治疗者降低明显,初步说明在抑凋亡方面前者是优于后者的。

需要指出的是,AA 的凋亡机制十分复杂,尽管本研究证实 Fas、Bcl-2 与 CAA 凋亡有相关性,但其具体的作用环节及有无其他相关因子的参与,还需进一步的研究。至于补肾生血中药补髓生血冲剂的抑凋亡机制,尚需更深入的探究。

参考文献:

- [1] Callera F, Falcao RP. Increased apoptosis cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anemia[J]. Br J Haematol, 1996, 98(1): 18-20.
- [2] 再生障碍性贫血诊断标准与疗效标准[J]. 中华血液学杂志. 1987, 8(8): 封面, 468.
- [3] Callera F, Garcia AB, Falcao RP. Fas-mediated apoptosis with normal expression of bcl-2 & P₅₃ lymphocytes from aplastic anemia[J]. Br J Haematol, 1998, 100: 698-703.
- [4] Craiy B. Thompson. Apoptosis in the Pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267: 1456-1462.