

· 临床论著 ·

中药益髓生血颗粒对 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿基因表达的影响

柴立民¹ 吴志奎¹ 张新华² 蔡辉国³

摘要 目的 探讨益髓生血颗粒治疗 β -珠蛋白生成障碍性贫血的作用机制。方法 观察 20 例患儿治疗前后血红蛋白(Hb)、红细胞(RBC)、网织红细胞计数(Ret)和胎儿血红蛋白(HbF)的改变;选取 3 例有效病例,通过 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)研究益髓生血颗粒对 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿骨髓有核细胞的基因表达差异。结果 与治疗前比较治疗后患儿各项血液学参数均有提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);患儿骨髓有核细胞的铁蛋白基因表达明显降低。结论 益髓生血颗粒可以改善患儿的临床症状,明显降低患儿铁蛋白基因的表达,有效缓解患儿体内铁的蓄积,这可能是益髓生血颗粒治疗本病的分子机制之一。

关键词 益髓生血颗粒; β -珠蛋白生成障碍性贫血; mRNA 差异显示技术; 铁蛋白

Effect of Yisui Shengxue Granule on Gene Expression in Children with β -Thalassemia CHAI Li-min, WU Zhikui, ZHANG Xin-hua, et al *Department of Molecular Biology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100053)*

Abstract Objective To investigate the mechanism of Yisui Shengxue granule (YSG) in children with β -thalassemia. **Methods** The changes of hemoglobin (Hb), red blood cells (RBC), reticulocyte (Ret) and fetal hemoglobin (HbF) of 20 children with β -thalassemia were measured before and after treatment. The effect of YSG on gene expression in myelo-karyocytes in 3 selected children treated effectively by YSG was determined by using DDRT-PCR. **Results** The hematologic parameters were significantly enhanced and the ferritin gene expression declined after treatment respectively, as compared with those before treatment, the difference were significant ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** YSG could improve the clinical symptoms of children with β -thalassemia. One of its therapeutic mechanisms may be its action in decreasing ferritin gene expression so as to effectively relieve the accumulation of iron in body.

Key words Yisui Shengxue granule; β -thalassemia; mRNA differential display; ferritin

β -珠蛋白生成障碍性贫血(β -thalassemia)又称 β -地中海贫血,是由于 β -珠蛋白合成抑制而引起的溶血性贫血,也是最常见的遗传性疾病之一。本病是危害最为严重的血红蛋白病,临床上缺乏有效的治疗措施,一般预后较差。近年来,我们开展益髓生血颗粒治疗 β -珠蛋白生成障碍性贫血的研究,取得了较好的临床疗效^[1-3]。为了进一步探索中药治疗的作用机理,我们从 2001 年 12 月—2003 年 3 月选取 20 例 β -地中海

贫血患儿,在益髓生血颗粒治疗 3 个月,观察患儿各项血液学参数的改变,以确定临床疗效。选取有效的病例,采用 mRNA 差异显示技术(DD RT-PCR),观察本病患儿益髓生血颗粒治疗前后骨髓有核细胞的基因表达差异。

临床资料

按照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》及“第四届国际血红蛋白基因相关会议”制定的 β -珠蛋白生成障碍性贫血诊断标准选择病例^[4,5]。

1 轻型 (1)临床表现:无症状或有轻度贫血症状,肝脾无肿大或轻度肝大。(2)实验室检查:血红蛋白(Hb)稍降低或正常,末稍血中可有少量靶形红细胞,红细胞轻度大小不均,血红蛋白 A_2 (haemoglobin A_2 , Hb A_2) $> 3.5\%$, 胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30171199); 国家自然科学基金重大项目(No. 90409003)

作者单位:1. 中国中医研究院广安门医院分子生物学研究室(北京 100053); 2. 中国人民解放军第 303 医院血液病研究室; 3. 中国医学科学院实验血液学国家重点实验室

通讯作者:吴志奎, Tel: 010-88001149, E-mail: gamwuzhikui@sina.com

HbF)正常或轻度增加(<5%)。(3)遗传学:父或母为β-珠蛋白生成障碍性贫血杂合子,患儿为杂合子(β⁺)。

2 中间型 (1)症状和体征介于重型和轻型β-珠蛋白生成障碍性贫血之间。(2)实验室检查:Hb<80 g/L,呈小细胞低色素性贫血;红细胞形态不一、大小不均,有靶形红细胞(>10%),网织红细胞增多。骨髓中红细胞系统极度增生。(3)遗传学:父或母为β-珠蛋白生成障碍性贫血杂合子,或父或母为β-珠蛋白生成障碍性贫血杂合子,但其中一方HbF持续存在;或父母中一方为β-珠蛋白生成障碍性贫血杂合子,而另一方为α-珠蛋白生成障碍性贫血。

3 排除 (1)非β-珠蛋白生成障碍性贫血,或重型者(有贫血、黄疸、肝脾肿大;患者发育不良、智力迟钝,有骨骼改变如颧骨隆起、眼距增宽、鼻梁低平,X线可见外板骨小梁条纹清晰呈直立毛发样等)。(2)治疗过程中,进行输血或其他治疗者。(3)未完成1个治疗周期(3个月)者。

4 一般资料 20例,男12例,女8例;年龄9~12岁,平均(10.15±1.09)岁;病程4~9年,平均(6.15±1.79)年;贫血程度:轻型组(Hb 80~100 g/L)6例,中间型(Hb 60~80 g/L)14例。因目前临床上没有治疗本病的特效药物,故本研究未设对照组。

方 法

1 治疗方法 中药益髓生血颗粒(由山萸肉、熟地黄、补骨脂、何首乌、阿胶、鳖甲、黄芪、当归等11味药物组成,每袋10g,每克相当于生药量2.27g,中国中医研究院广安门医院制剂中心制备)每次10g,每天3次,连续服用3个月。观察期间停用其他治疗药物,不进行输血治疗。

2 血液学参数检测 治疗前后分别检测Hb、红细胞(RBC)、网织红细胞(Ret)计数、HbF。同时检查其他常规指标和观察药物的不良反应。

3 基因表达差异检测 采用mRNA差异显示实验(又称differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction,DD RT-PCR),即从有效病例中选取3例患儿抽取骨髓,Percoll细胞梯度分离液分离有核细胞;异硫氰酸胍一步法提取有核细胞总RNA,反转录成cDNA;锚定引物单引物PCR扩增,增加模板量,锚定引物序列:ATACGACTCACAAATAGGGCG(ATCG)CAG(ATCG)G(ATCG)(黑体字所示为4种碱基中的任意一种)。随机选取引物20条,同位素γ-³²P ATP标记引物,PCR扩增后,聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis,PAGE)分离扩增条

带;放射自显影后,筛选有差异的表达条带,送测序后, Gene Bank 查询,鉴定基因归属;若属于功能基因,则进行 Northern Blotting 反向验证。

4 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行 t 检验。

结 果

1 临床疗效 本组20例均有效(患儿临床症状得到改善,Hb、RBC、Ret、HbF有不同程度的提高,疗程结束后,患儿输血次数减少,贫血得到缓解)。

2 临床症状改善情况 所有患儿经中药治疗后贫血症状明显改善,厌食、倦怠、乏力等症状均有好转。

3 不同病情程度患儿治疗前后血液学参数测定结果 见表1。轻型患儿治疗后的Hb、Ret与治疗前比较差异有显著性(P<0.05);中间型患儿治疗后各项血液学指标(Hb、RBC、Ret、HbF)与治疗前比较差异有显著性(P<0.01)。两型患儿HbF差值比较差异有显著性(P<0.01)。提示中药治疗对中间型患儿的疗效优于轻型患儿。

表1 不同病情程度患儿治疗前后血液学参数测定结果比较 (x̄±s)

| 病情程度 | 时间 | Hb (g/L) | RBC (×10 ¹² /L) | Ret | HbF |
|----------|-----|---------------|----------------------------|---------------|------------------------|
| | | | | (%) | (%) |
| 轻型 (6) | 治疗前 | 88.33±6.09 | 4.41±0.27 | 0.062±0.017 | 0.28±0.03 |
| | 治疗后 | 101.83±10.80* | 4.68±0.39 | 0.087±0.023* | 0.28±0.03 |
| | 差值 | 12.71±7.47 | 0.56±0.34 | 0.030±0.038 | 0.05±0.05 |
| 中间型 (14) | 治疗前 | 69.36±5.00 | 3.40±0.34 | 0.078±0.062 | 0.26±0.13 |
| | 治疗后 | 83.07±8.99** | 3.96±0.31** | 0.109±0.089** | 0.31±0.13** |
| | 差值 | 13.50±9.73 | 0.26±0.33 | 0.024±0.018 | 0.02±0.03 [△] |

注:与本型治疗前比较,*P<0.05,**P<0.01;与轻型差值比较,[△]P<0.01;()内数据为例数

4 治疗前后骨髓有核细胞基因差异表达 根据放射自显影后的图谱显示,从凝胶上回收差异条带,PCR扩增获得目的片段,琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果(见图1)。PCR产物测序结果进入 Gene Bank 查询,发现有1条差异片断(见图2)序列与铁蛋白基因部分序列(ferritin heavy chain subunit mRNA)相吻合(见图3),具有同源性;反向 Northern Blotting 验证了这一结果(见图4)。

5 不良反应情况 所有患儿在服药期间,除有2例出现便秘症状外,未见有其他不良反应发生。

讨 论

β-珠蛋白生成障碍性贫血患者血红蛋白的合成不足,不能生成成熟的红细胞,长期有规律的输血是十分必要的。血液中未成熟红细胞分解,骨髓红系细胞造血旺盛,加之长期输血,会导致体内铁负荷过重。如果

chemical Pharmacol 2003;65(3):349—360.

8 Chaston TB, Richardson DR. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. Am J Hematol 2003;73(3):200—210.

9 Pradhan V, Badakere S, Ghosh K. Antihistone and other autoantibodies in beta-thalassemia major patients receiving iron chelators. Acta Haematol 2003;109(1):35—39.

(收稿:2004-07-26 修回:2005-02-07)

别直参联合麝香保心丸治疗稳定型心绞痛 60 例

杨高旺

2001 年 1 月—2004 年 12 月我们采用别直参联合麝香保心丸治疗稳定型心绞痛 60 例,并与单用西药常规治疗的 60 例作对照,现报道如下。

临床资料 120 例均为我院住院的稳定型心绞痛患者,诊断符合 WHO 标准,并具有至少 3 个月劳累型心绞痛病史,心绞痛发作每周≥5 次,经休息或舌下含硝酸甘油可缓解。排除合并休克或血压低于 12/8kPa 者。按住院先后顺序随机将患者分为两组,治疗组 60 例,男 41 例,女 19 例;年龄 49~78 岁,平均(59±7)岁;病程 5~12.5 年,平均(8±3)年。对照组 60 例,男 39 例,女 21 例;年龄 48~76 岁,平均(58±8)岁;病程 5.5~12 年,平均(8±2)年。两组患者资料比较差异无显著性($P>0.05$),具有可比性。

方法 两组均给予必要的基础治疗,如镇静、吸氧、休息、能量,心绞痛发作时给予硝酸甘油等。治疗组在此基础上给予麝香保心丸(上海中药制药一厂生产)2 粒,每天 3 次,别直参(产地朝鲜)3g 舌下含服,每天 1 次。对照组给予极化液,两组均治疗 15 天。观察治疗前及治疗后 3、6、10、15 天心电图,计算 NST 及 ΣST,并观察记录临床情况,如心绞痛发作频率,持续时间及疼痛程度与不良反应,同时记录心率、血压及平均动脉压。全部患者治疗前后检查血、尿、粪三大常规和肝肾功能等。统计学方法:采用 *t* 检验。

结果

1 疗效评定标准 显效:心绞痛基本消失或发作次数和持续时间较用药前减少≥80%,静息心电图原有缺血性 ST 段恢复>0.1mV 或 ST 段恢复正常;有效:心绞痛发作程度和次数减少 50%~80%,心电图 ST 段恢复 0.05~0.10mV 或主导联 T 波变浅 50%以上或由平坦转为直立;无效:未达到有效标准者。

2 两组患者临床疗效比较 治疗组 60 例,显效 40 例(66.7%),有效 11 例(18.3%),无效 9 例(15.0%),总有效率为 85.0%。对照组 60 例,显效 23 例(38.3%),有效 16 例(26.7%),无效 21 例(35.0%),总有效率为 65.0%。两组总有效率比较差异有显著性($P<0.01$)。

3 两组患者治疗前后心绞痛发作次数(次/周) 治疗组治疗前为 15.6 ± 2.8 ,治疗后为 6.9 ± 2.2 ;对照组治疗前为 15.2 ± 2.4 ,治疗后为 9.0 ± 2.3 ,治疗后两组心绞痛发作次数比较差异有显著性($P<0.01$)。两组治疗前后心率、平均动脉压比较,差异无显著性($P>0.05$,具体数据略)。

4 两组患者心电图疗效比较 治疗组 60 例,显效 32 例(53.3%),有效 14 例(23.3%),无效 14 例(23.3%),总有效率为 76.7%。对照组 60 例,显效 18 例(30.0%),有效 12 例(20.0%),无效 30 例(50.0%),总有效率为 50.0%;两组总有效率比较差异有显著性($P<0.01$),两组治疗前后 NST 及 ΣST 差值比较差异有显著性($P<0.01$,见表 1)。

表 1 两组治疗前后 NST 及 ΣST 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 时间 | NST (mV) | ΣST (mm) |
|----|----|-----|----------|----------|
| 对照 | 60 | 治疗前 | 6.4±1.4 | 3.8±0.5 |
| | | 治疗后 | 5.0±0.4 | 2.9±0.6 |
| | | 差值 | 1.4±0.3 | 0.9±0.3 |
| 治疗 | 60 | 治疗前 | 6.5±1.3 | 3.9±0.6 |
| | | 治疗后 | 3.9±0.5 | 1.9±0.8 |
| | | 差值 | 2.5±0.5* | 2.0±0.5* |

注:与对照组比较,* $P<0.01$

5 不良反应 治疗组未见明显不良反应发生。对照组有 1 例出现轻微的低血糖反应。

讨论 中医学认为本病属“胸痹”、“真心痛”范畴,由于各种原因导致的心脉凝塞,气血瘀滞,不通则痛为主要病机,多见于老年患者。麝香保心丸具有活血化瘀、温经止痛之功效,还有扩张冠状动脉,改善冠脉血流、减慢心率、降低心肌耗氧量等作用,有利于调节和维持心肌氧代谢及能量代谢,消除左心室肥厚的诱发因素。别直参具有大补元气,复脉固脱,具有强心甙类作用,可抗心肌缺血、减轻心肌损伤、扩张血管、减轻心肌前后负荷,减慢心率,改善血循环。本结果表明别直参与麝香保心丸合用治疗冠心病心绞痛具有明显协同作用,能明显提高临床疗效,能促进 NST 及 ΣST 变化的恢复与改善,且两药合用,使用方便,疗效显著,临床应用中未发现不良反应。

(收稿:2005-02-17 修回:2005-04-04)

作者单位:浙江省永康市红十字会医院心内科(浙江 321300)