

中药治疗对 IgA 肾病 T 淋巴细胞影响的临床观察

陈小娟¹ 于大君¹ 余仁欢¹ 苏庆民² 许勇刚³ 何 岩¹ 刘巧巧¹

摘要 目的 观察中药治疗对 IgA 肾病(IgAN)患者 T 淋巴细胞亚群的影响。**方法** 选取 2011 年 6 月—2013 年 6 月中国中医科学院西苑医院肾病科门诊及住院 IgAN 患者 36 例为 IgAN 组,健康自愿者 20 例为健康对照组。除伴高血压患者服用降压药[血管紧张素转化酶抑制剂和(或)二氢吡啶类钙拮抗剂]外,IgAN 组均只口服对证中药汤剂 3 个月,健康对照组不予任何干预措施。运用流式细胞仪检测 IgAN 组治疗前后 Th1、Th2、CD4⁺CD25⁺Treg 水平及患者尿红细胞数;运用免疫比浊法检测 24 h 尿蛋白定量。**结果** 与健康对照组比较,IgAN 组 CD4⁺CD25⁺Treg 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);IgAN 组中药治疗后 Th1、尿红细胞数及 24 h 尿蛋白定量均较治疗前明显降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 中药治疗可减少 IgAN 患者的尿红细胞数及 24 h 尿蛋白定量,其作用机制可能是中药治疗可下调 Th1 表达。

关键词 中药治疗;IgA 肾病;T 淋巴细胞

Effect of Chinese Herbal Therapy on T-lymphocytes of IgA Nephropathy Patients: a Clinical Observation CHEN Xiao-juan¹, YU Da-jun¹, YU Ren-huan¹, SU Qing-min², XU Yong-gang³, HE Yan¹, and LIU Qiao-qiao¹ 1 Department of Nephrology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 2 Graduate School, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700), China; 3 Lab of Hematology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of Chinese herbal therapy on T-lymphocyte subsets in patients with IgA nephropathy (IgAN). **Methods** Totally 36 inpatients and outpatients at Department of Nephropathy, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, from June 2011 to June 2013 were recruited in the treatment group, while 20 volunteers were recruited as the healthy control group. Patients in the IgAN group only took Chinese herbal decoctions by syndrome typing for 3 months (except those accompanied with hypertension additionally took antihypertensive agents such as angiotensin-converting enzyme inhibitor and/or dihydropyridines calcium antagonist). No intervention was performed in the healthy control group. The values of Th1, Th2, and CD4⁺CD25⁺Treg, and red blood cell number in urine were detected using flow cytometry before and after treatment. 24 h urine protein was detected using immunoturbidimetry. **Results** Compared with the healthy control group, the CD4⁺CD25⁺Treg level obviously decreased in the IgAN group, showing statistical difference ($P < 0.01$). In the IgAN group, Th1, 24 h urine protein, and urine red blood cell counts were obviously lower after treatment, showing statistical difference when compared with before treatment (all $P < 0.05$). **Conclusion** Chinese herbal therapy could reduce urine erythrocyte number and 24 h urine protein of IgAN patients, and down-regulating Th1 expression might be its mechanism.

KEYWORDS Chinese herbal therapy; IgA nephropathy; T lymphocyte

IgA 肾病(后简称 IgAN)是一种常见的原发性肾

小球疾病,以血尿为主要临床表现,可伴有不同程度的蛋白尿、高血压和肾功能受损,是导致终末期肾脏病的常见原发性肾小球疾病之一。自 1986 年 Th 细胞的发现,Th1 和 Th2 细胞异常就发现与系统性红斑狼疮、多发性硬化症等自身免疫疾病相关^[1]。IgAN 与外来或自身抗原产生的损伤性免疫反应有关。近年来关于 T 淋巴细胞与 IgAN 发病机制研究增多,中国中

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.C190402)

作者单位:1.中国中医科学院西苑医院肾病科(北京 100091);
2.中国中医科学院研究生院(北京 100700);3.中国中医科学院西苑医院血液科实验室(北京 100091)

通讯作者:于大君,Tel:13651229860, E-mail:yudajunfly@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0786

医学院西苑医院肾病科十五科技攻关课题“IgAN 中医证治规律研究”结果表明:中药不仅可以缓解 IgAN 的中医症状,而且对血尿和蛋白尿也有一定治疗作用^[2]。为了进一步观察中医药对患者 T 淋巴细胞亚群的影响,本研究应用流式细胞仪分别检测 36 例 IgAN 患者和 20 例健康人外周血 Th1、Th2 及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞变化情况,以及中药干预前后 IgAN 患者 Th1、Th2 及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞改变情况。

资料与方法

1 诊断标准 IgAN 的诊断标准参照 WHO 1995 年诊断标准^[3]: IgAN 的临床特点多见肉眼或镜下血尿,可伴蛋白尿;肾脏组织病理特点以肾小球系膜细胞增生和系膜基质增多为主,免疫病理特点以系膜区 IgA 沉积为主。肾组织病理分级标准按照 Lee 分级标准^[4]。中医证候诊断标准参照 2007 年中华中医药学会肾病分会标准^[5]:(1)脾肾气虚证:神疲乏力,腰膝酸软,夜尿偏多,大便溏薄或腹泻,口淡不渴,舌淡胖边有齿痕,苔薄白,脉沉弱;(2)气阴两虚证:疲乏无力,腰膝酸痛,自汗或盗汗,易感冒,舌淡红,边有齿痕或舌胖大,苔薄白或薄黄而干,脉细数而无力;(3)肝肾阴虚证:五心烦热,咽干而痛,头目眩晕,耳鸣腰痛,大便偏干,舌红苔干,脉细数或弦细数。

2 纳入、排除及剔除标准 纳入标准:符合诊断标准;年龄 18~65 岁;肾功能正常;自愿签署知情同意书。排除标准:合并心、脑、肝、造血系统及肿瘤等严重疾病者;有精神类疾病史者;诊断为急性肾衰竭者;已进行肾脏替代治疗者(血液透析、腹膜透析、肾移植等);激素治疗中或停药 <0.5 年者。剔除标准:无明显中医临床症状者(具有少于 3 个症状者);不符合中医证候诊断标准中所述 3 种证型。

3 一般情况 选取 2011 年 6 月—2013 年 6 月中国中医科学院西苑医院肾病科门诊及住院 IgAN 患者 36 例为 IgAN 组,健康自愿者 20 名为健康对照组。IgAN 组中男 16 例,女 20 例;年龄 20~57 岁,平均(36.03±8.07)岁;病程最短 24 个月,最长 246 个月,平均(83.95±71.74)个月;病理诊断轻度系膜增生性 17 例,中度系膜增生性 5 例,局灶增生性 8 例,局灶增生硬化性 6 例。单纯血尿 7 例,轻度蛋白尿(<1 g/24 h)13 例,中、重度蛋白尿 6 例(>1 g/24 h),合并高血压 10 例。中医辨证分型气阴两虚证 16 例,脾肾气虚证 9 例,肝肾阴虚证 11 例。健康对照组中男 11 名,女 9 名;年龄 21~44 岁,平均(35.20±5.95)岁;均排

除肾脏疾病。两组间性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 给药方法 IgAN 患者均收集中医四诊资料,按照 IgA 肾病辨证分型方案,给予对证中药治疗。(1)脾肾气虚证:健脾祛湿和络方^[6](余仁欢教授经验方):生黄芪 30 g 汉防己 15~20 g 炒白术 15 g 茯苓 20~30 g 生薏仁 30 g 荷叶 15 g 苏叶 15 g 蝉蜕 10 g 甘草 10 g 黄连 3~6 g;(2)气阴两虚证:益气滋肾汤(聂莉芳教授经验方):太子参 15 g 生黄芪 20 g 生地 20 g 旱莲草 12 g 当归 12 g 炒栀子 12 g 丹参 6 g 芡实 10 g 小蓟 30 g;(3)肝肾阴虚证:六味地黄汤:生地 20 g 山药 12 g 山萸肉 12 g 丹皮 20 g 茯苓 20 g 泽泻 30 g。将每剂中药用冷水浸泡 15 min,用大火煮开之后改小火煮 20 min,倒出药汁,再以上法煎煮 1 次,将 2 次药汁均匀混合,平均分为 2 份。每天 2 次,分早晚饭后 0.5 h 服用,疗程 3 个月。除伴高血压患者服用降压药[血管紧张素转化酶抑制剂和(或)二氢吡啶类钙拮抗剂]外,IgAN 组均只口服中药汤剂。健康组不予任何干预措施。

5 观察指标及方法

5.1 Th1(表达 IL-10)、Th2、CD4⁺CD25⁺Treg 治疗前分别抽取两组受试者静脉血 10 mL,取 200 μ L 肝素抗凝血加入 10 μ L CD4-Pc5 单抗(美国 BC 公司,批号:A07752),室温避光孵育 30 min,RPM1640 洗涤 1 次,将细胞加入 RPM1640 培养体系中,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,孵育 18 h。PBS 洗涤 1 次,用 IntraPrep™ Permeabilization Reagent 进行细胞固定、透膜(按试剂盒说明书),将细胞分成 3 管,第 1 管加入抗人 IL-4-pe(美国 BC 公司,批号:IM2719U)和 IFN- γ -fitc(美国 BC 公司,批号:IM2716U),第 2 管加入 IL-10-pe(美国 eBioscience 公司,批号:12-7108-82,E02098-1630),另第 3 管加入同型对照,室温、避光 30 min,PBS 洗涤 1 次,最后运用流式细胞仪(EPICS ELITE 型,美国 BC 公司)测定:打开流式细胞仪及氩激光光源(488 nm)预热 20 min,同时仪器自动初始化;用标准荧光微球校正光路和荧光补偿,然后依次检测标本,每份标本检测 50 000 以上细胞;在前向散射光(FS)和侧向散射光(SS)散点图中圈定淋巴细胞群,然后分析 Th1(表达 IL-10)、Th2、及 CD4⁺CD25⁺Treg 的表达。IgAN 组中药干预 3 个月后再以相同方法检测上述指标。

5.2 尿红细胞数、24 h 尿蛋白定量检测 IgAN 组患者口服中药汤药前分别留取一次随机尿,应用流式细胞计数法检测其尿红细胞数;留取 24 h 尿液并记录尿量应用免疫比浊法检测 24 h 尿蛋白定量。检验均由西苑

医院检验科完成。口服汤药 3 月后再次以相同方法留取尿液检测。

6 统计学方法 使用 SPSS 20.0 统计分析软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布用 t 检验, 非正态分布用非参数秩和检验。假设检验使用双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 脱落情况及不良反应 3 个月治疗期间, 无脱落病例及不良反应的发生。

2 两组治疗前 Th1、Th2 及 CD4⁺CD25⁺ Treg 比较(表 1) 与健康对照组比较, IgAN 组 CD4⁺CD25⁺ Treg 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。 Th1、Th2 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 两组治疗前 Th1、Th2 及 CD4⁺CD25⁺ Treg 比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Th1	Th2	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg
IgAN	36	15.85 ± 9.53	3.25 ± 4.6	4.98 ± 1.53*
健康对照	20	18.04 ± 5.73	2.12 ± 0.39	7.67 ± 1.97

注:与健康对照组比较, * $P < 0.01$

3 IgAN 组治疗前后 Th1、Th2、CD4⁺CD25⁺ Treg、尿红细胞数及 24 h 尿蛋白定量比较(表 2) IgAN 组中药治疗后 Th1、尿红细胞数及 24 h 尿蛋白定量均较治疗前明显降低, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。 Th2、CD4⁺CD25⁺ Treg 治疗前后比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 IgAN 组治疗前后 Th1、Th2、CD4⁺CD25⁺ Treg、尿红细胞数及 24 h 尿蛋白定量比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	Th1 (%)	Th2 (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (%)	尿红细胞数 (个/μL)	24 h 尿蛋白定量(g)
治疗前	17.9 ± 10.44	2.69 ± 1.46	5.40 ± 1.55	34.55 ± 39.38	1.31 ± 0.48
治疗后	13.00 ± 6.60*	5.10 ± 1.44	3.69 ± 1.30	22.81 ± 26.60*	0.76 ± 0.34*

注:与治疗前比较, * $P < 0.05$

讨 论

IgAN 在世界范围内发病率较高, 亚洲发病较其他洲更高, IgAN 占原发性肾小球疾病的 45.62%^[7]。该病主要发生在青壮年, 男性多见, 男女发病之比为 2 ~ 6:1。本临床研究所选病历, 患者组与健康组年龄比较差异无统计学意义, 主要为青壮年。

Gakaguch S 等^[8]首次提出了在自体免疫耐受中存在一类表达 IL-2 受体 α 链(IL ZRac D25)的活化 T

细胞, 将这类 CD4⁺CD25⁺ T 细胞命名为调节性 T 细胞 (Treg), 又称为抑制性 T 细胞, 是生物机体内完成免疫调节和免疫抑制不可缺少的重要组成部分。此细胞可组成表达众多的细胞表面分子, 如 CD25⁺、细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (CTLA-4)、叉头转录因子 3 (Foxp3)。CD4⁺CD25⁺ Treg 较活化 T 细胞显著增高, 因此目前分选 CD4⁺CD25⁺ Treg 主要分子标志为 CD4⁺CD25⁺^[9]。监测外周血 Treg 水平有助于判断自身免疫性疾病、实体瘤、血液系统恶性肿瘤的病情、预后及疗效。Huang H 等^[10]等发现了具有免疫抑制功能的 CD4⁺CD25⁺ Treg, 它与 Th 细一样, 属于 CD4⁺ T 细胞亚群, 是调节 T 细胞中最重要的, 占外周血 CD4⁺ T 细胞 5% ~ 10%。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞表达的 Foxp3 是其特征性标志。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞具有免疫抑制作用, 能避免自身免疫疾病的发生。IgAN 时, 全身各部位对黏膜抗原的应答反应广泛上调, pl-gA1 产生增加。而且系膜 IgA 是多克隆德, 并非单一抗原造成其在肾脏的沉积^[11]。于此, 有研究者推测 IgAN 的发生与扁桃体 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的数量或功能异常有关^[12]。IgAN 患者的外周血 Treg 与健康组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 即 IgAN 患者的外周血 Treg 明显低于健康人, 表明 IgAN 患者存在免疫失调, 表现为 CD4⁺CD25⁺ Treg 的下降, 与其他学者研究结果一致。

T 淋巴细胞特别是辅助性 T 淋巴细胞在免疫中起重要作用, T 淋巴细胞又分为 Th1 和 Th2, 两者分泌的细胞因子不同。Th1 主要分泌 IL-2、IL-3、IL-10 等细胞因子, Th2 主要分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子。近年来, 许多研究发现 IgAN 存在 Th1、Th2 失衡, 但究竟表现为 Th1 还是 Th2 优势, 结果仍存在争议。Nagaki F 等^[12]利用小鼠模型证明 IgA 的产生可能与 Th1、Th2 平衡向 Th2 偏移有关。Ebihara I 等^[13]也认为 IgAN 患者免疫失衡呈 Th2 优势。Lai KN^[14]等用 ELISA 法检测 IgAN 患者外周单个核细胞培养上清中的细胞因子, 发现 Th1 类细胞因子增多。本研究结果显示(表 2) Th1 的失衡参与了 IgA 肾病的免疫发生发展过程, 与大多数学者研究结果一致, 但未显示出在 IgA 肾病的免疫发生发展过程中是向在 Th1 偏移还是 Th2 偏移, 仅表现出中药治疗能使 Th1 类细胞因子下降。与近年研究显示糖皮质激素可通过抑制 APC、下调 Th1 细胞因子和上调 Th2 细胞因子, 抑制 Th1 型细胞免疫轴并介导向 Th2 偏移^[15,16]结果相一致, 显示中药有类似糖皮质激素的免疫调节功能, 通过对 Th1 的调节阻断 IgAN 病情进展的免疫机制。余仁欢等^[17]

运用流式细胞仪检测肾病患者外周血 T 淋巴细胞亚群。结果显示:不同的肾小球疾病外周血 T 淋巴细胞亚群改变不同,证明了对激素和中药有效的病例,血浆白蛋白水平提高的患者 T 淋巴细胞亚群的失调得到明显改善。于大君等^[18]采用流式细胞仪分析分别检测治疗组与对照组服用益气滋肾颗粒前后 Th1 及 Th2 细胞内的细胞因子,结果显示:益气滋肾颗粒对 T 淋巴细胞有一定调节作用。本研究结果与近代研究中医药可促进人体的正常免疫功能,能够清除免疫复合物,修复受损组织等研究相一致。

中医药不仅可以缓解 IgAN 的中医症状,而且对血尿、蛋白尿也有一定治疗作用^[19,20]。本研究也显示中医药治疗前后 IgAN 患者的尿红细胞数及 24 h 尿蛋白定量减少。在本研究中采取辨证施治的方法,体现中医治病特色,依照不同的证型采取不同的治疗方法。由于样本总例数少,本研究未进行各个证型与免疫细胞的相关性研究,及不同证型的 IgAN 患者免疫细胞的变化情况。在今后的试验中应扩大病例数,进行更大范围的研究。

参 考 文 献

- [1] Li LS, Liu ZH. Epidemiologic date of renal diseases from a single unit in China: analysis based on 13 519 renal biopsies [J]. *Kidney Int*, 2004, 66 (3): 920 - 923.
- [2] 聂莉芳, 余仁欢, 于大君, 等. 益气滋肾颗粒控制 IgA 肾病血尿的多中心临床疗效评价 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2006, 4(4): 215 - 218.
- [3] Churg J, Bernstein J, Classock RJ. Renal disease—classification and atlas of glomerular disease [M]. 2nd ed. New York: Ikagushoin Medical Publishers Inc, 1995: 4.
- [4] 邹万忠主编. 肾活检病理学 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 112.
- [5] 中华中医药学会. IgA 肾病的诊断、辨证分型和疗效评定 (试行方案) [J]. *上海中医药杂志*, 2007, 41(5): 9 - 10.
- [6] 屈欢欢, 陈小娟, 何岩, 等. 健脾祛湿和络方治疗原发性肾小球疾病蛋白尿 50 例临床观察 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(21): 1834 - 1836.
- [7] Tang Q, Knmmel MF. Imaging the function of regulatory T cells *in vivo* [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(4): 854 - 867.
- [8] Gakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25), breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 2011, 186(7): 1151 - 1164.
- [9] Eric G Neilson, William G. Gouser 主编. 免疫肾脏病学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2004: 854 - 867.
- [10] Huang H, Peng Y, Liu F, et al. Is IgA nephropathy induced by abnormalities of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in the tonsils [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69(2): 410 - 413.
- [11] 王娜, 陈建森, 余菲菲. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞免疫抑制及其在疫苗免疫保护中作用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 22(3): 1006 - 3740.
- [12] Nagaki F, Muso E, Kobayashi I, et al. Interleukin12 induces crescentic glomerular lesions in a high IgA strain of ddY mice, independently of changes in IgA deposition [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(8): 1146 - 1154.
- [13] Ebihara I, Hirayama K, Yamamoto S, et al. Th2 predominance at the single-cell level in patients with IgA nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2001, 16(9): 1783 - 1789.
- [14] Lai KN. The cellular immunity and nature of IgA molecule in IgA nephropathy. In: Zhang JH, Du XH, Liu ZH, et al. *Nephrology: Proceedings of the 4th Asian Pacific Congress of Nephrology* [M]. Beijing: International Academic Publishers, 1991: 261 - 271.
- [15] Heller F, Lindenmeyer MT, Cohen CD, et al. The contribution of B cells to renal interstitial inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(2): 457 - 468.
- [16] Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4⁺ lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1997, 158(12): 5589 - 5595.
- [17] 余仁欢, 聂莉芳, 许勇刚, 等. 肾小球疾病患者外周血 T 淋巴细胞亚群的观察 [J]. *上海免疫学杂志*, 2000, 20(4): 254.
- [18] 于大君, 聂莉芳, 许勇刚, 等. 益气滋肾颗粒对 IgA 肾病辅助性 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(9): 836 - 838.
- [19] 聂莉芳, 余仁欢, 于大君, 等. 益气滋肾颗粒控制 IgA 肾病血尿的多中心临床疗效评价 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2006, 7(4): 215 - 218.
- [20] 余仁欢, 聂莉芳, 徐建龙, 等. 益气滋肾颗粒干预 IgA 肾病蛋白尿的临床疗效评价 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2010, 11(8): 721 - 722.

(收稿: 2013 - 08 - 23 修回: 2014 - 05 - 04)