

· 临床报道 ·

补髓生血颗粒治疗慢性再生障碍性贫血的疗效
及对 Th17 细胞和 IL-23 的影响孙 凤¹ 雍彦礼¹ 王金环¹ 郝 晶¹ 田 飞¹ 罗正凯¹ 蒋晓鸥²
初静文² 李 渊² 刘 葛³ 贾春晖⁴ 孙伟正¹

慢性再生障碍性贫血(chronic aplastic anemia, CAA),是由骨髓造血功能衰竭而导致的全身血细胞减少性疾病,以感染、贫血和出血为主要表现的一类综合征。近年来人们对 CAA 的发病机制已从传统的“种子、虫子和土壤”学说发展到“自身免疫性疾病”理论,CAA 现被认为是 T 细胞功能亢进而导致造血组织损伤的一类骨髓衰竭综合征。既往认为多种自身免疫反应是由 Th1 细胞介导的,但越来越多的研究表明,Th17 细胞在疾病的发病中起关键作用,与多种自身免疫性疾病的发生密切相关,甚至是 Th1 细胞亚群功能亢进的始动因素^[1-4]。Th17 细胞是不同于 Th1 和 Th2 细胞亚群的 T 细胞,可以产生 IL-17、IL-21 等多种细胞因子。Th17 主要通过 IL-17 参与自身免疫性疾病的发生,而 IL-23 在 Th17 细胞的分化与表达过程中发挥重要作用^[5,6]。

CAA 属于中医学“慢性髓劳病”范畴。本课题组以“肾藏精”的理论为指导,研制出补肾生血方药补髓生血颗粒应用于临床治疗 CAA,并通过大量临床试验和动物实验对其疗效机制和作用环节进行了研究和探讨。本研究通过观察补髓生血颗粒治疗 CAA 的临床疗效及对患者治疗前后外周血 Th17 细胞、IL-23 和 IL-23p19 mRNA 表达水平的变化,进一步探讨补髓生血颗粒治疗 CAA 免疫失衡的疗效机制。

资料与方法

1 诊断标准 西医诊断标准和疗效判定标准参照《血液病诊断及疗效标准》^[7]中的有关 CAA 临床诊断标准和疗效判定标准;中医证候判定标准参照《2009

年国家中医药管理局“十一五”重点专科髓劳病临床诊疗方案》^[8]中的诊断标准。

2 纳入标准 (1)符合 CAA 西医诊断标准和慢性髓劳病中医证候诊断标准;(2)年龄 5~70 岁;(3)取得知情同意,签定知情同意书。

3 排除标准 (1)引起全血细胞减少的其他疾病:如急性白血病、淋巴瘤、阵发性睡眠性血红蛋白尿、脾功能亢进、巨幼红细胞性贫血、系统性红斑狼疮、浆细胞疾病、骨髓增生异常综合征等;(2)重型再生障碍性贫血者;(3)合并严重心、脑、肾、肝疾病患者及精神系统疾病患者;(4)对试验药物成分过敏者;(5)妊娠期及哺乳期女性;(6)正在参加其他临床试验的患者。

4 一般资料 30 例均来源于 2013 年 8 月—2015 年 3 月黑龙江中医药大学附属第一医院血液病科门诊和住院的 CAA 患者,其中男 14 例,女 16 例,年龄 5~54 岁,平均(30.70±13.81)岁;病程 3~36 个月,平均(18.56±9.27)个月。

5 给药方法 药物补髓生血颗粒(熟地黄、山萸肉、枸杞子、巴戟天、淫羊藿、人参、黄芪、鹿茸、丹参、白花蛇舌草、鸡血藤、猪苓)。参照中国药典(2010 版)中药颗粒剂制作方法,由黑龙江中医药大学附属第一医院药厂制备[黑卫药制字(1997)0048 号],15 g/袋,每袋含原药材 25 g。成人每次 1 袋,每日 3 次,温水冲服,儿童根据公斤体重酌情减量。3 个月为 1 个疗程,2 个疗程后按试验研究方案规定的内容进行相关指标的测定。一般治疗:若出现感染者,视其感染的程度,积极的进行抗感染治疗;若血小板(PLT)计数 $<10\times10^9/L$,或者 PLT 计数 $<20\times10^9/L$ 有明显的出血倾向时,及时输注新鲜血小板悬液和止血治疗;若出现较重贫血,血红蛋白(HGB) $<60\text{ g/L}$,及时输注去白细胞红细胞悬液。

6 观察指标与方法

6.1 临床疗效观察 观察患者治疗前后外周血中 HGB 含量、WBC 计数和 PLT 计数。

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(No.D201237)

作者单位:1.黑龙江中医药大学附属第一医院血液病科(哈尔滨 150040);2.黑龙江中医药大学临床医学院(哈尔滨 150040);3.哈尔滨市中医医院神经内科(哈尔滨 150076);4.黑龙江省中医药科学院血液肿瘤科(哈尔滨 150036)

通讯作者:雍彦礼, Tel: 13766873515, E-mail: yongyanli@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0885

6.2 治疗前后 Th17 细胞表达比例变化 采用 FCM 检测法。标本收集:清晨空腹用 EDTA VACU-TAINER 管采集静脉血 2 mL, 24 h 之内处理、检测。严格按照试剂盒说明进行操作。

6.3 治疗前后 IL-23 表达水平变化 采用 ELISA 法检测。血清标本采集:采集患者静脉血 3 mL, 以 2 000 r/min 低温高速离心 20 min, 收集上层血清, 用 1 mL 离心管分装, 放入 -80 ℃ 的低温冰箱中备用。严格按照试剂盒说明进行操作。

6.4 治疗前后 IL-23p19 mRNA 表达水平变化 采用 RT-PCR 检测法。标本采集:密度梯度离心法提取外周血单个核细胞;PCR 引物的设计和合成:根据引物设计的原则, 设计 IL-23p19 亚基 mRNA 基因的特异性引物, 以 GAPDH 为内参, 引物由上海诺伦医药生物技术有限公司设计合成。IL-23p19 mRNA 上游:5'-TTTCACAGAAGCTCTGCACACTG-3'; 下游:5'-CCTCTTCTCTTAGATCCATGTGTCC-3'; Homo GAPDH 上游:5'-CATGAGAAGTATGACAA-CAGCCT-3'; 下游:5'-AGTCCTTCCACGATAC-CAAAGT-3', TRIzol 法提取 RNA, 逆转录合成 cDNA; PCR 扩增条件:94 ℃ 反应 2 min, 1 个循环; 94 ℃、15 s, 62 ℃、40 s, 持续 40 个循环。基因相对表达量结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 分析试验结果。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 治疗前后比较用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 30 例患者临床疗效 基本治愈 1 例 (3.3%), 缓解 9 例 (30.0%), 明显进步 14 例 (46.7%), 无效 6 例 (20.0%), 总有效率为 80.0% (24/30)。

2 30 例患者治疗前后外周血象比较 (表 1) 与治疗前比较, 治疗后外周血 WBC、HGB 及 PLT 均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 30 例患者治疗前后外周血象比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	WBC ($\times 10^9/L$)	HGB (g/L)	PLT ($\times 10^9/L$)
治疗前	2.73 $\pm$ 0.83	62.07 $\pm$ 17.20	31.03 $\pm$ 14.86
治疗后	3.58 $\pm$ 1.35 *	103.10 $\pm$ 33.11 *	49.20 $\pm$ 13.30 *

注:与治疗前比较, * $P < 0.05$; 下表同

3 30 例患者治疗前后外周血 Th17 细胞、IL-23、IL-23p19 mRNA 表达比较 (表 2) 与治疗前比较, 试验组治疗后 Th17 细胞表达比例、IL-23 和 IL-23p19

mRNA 表达水平均下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 30 例患者治疗前后外周血 Th17 细胞、IL-23 及 IL-23p19 mRNA 表达比例 ($\bar{x} \pm s$)

时间	Th17 (IL-17A ⁺ /CD4 ⁺)	IL-23 (ng/L)	IL-23p19 mRNA
治疗前	13.42 $\pm$ 1.22	12.19 $\pm$ 1.91	1.24 $\pm$ 0.30
治疗后	5.59 $\pm$ 0.81 *	10.78 $\pm$ 0.91 *	0.91 $\pm$ 0.20 *

讨 论

慢性髓劳病以“补肾生血”为治疗原则。补髓生血颗粒是课题组以慢性髓劳病“肾虚髓枯”病机为切入点, 以补肾填精生血中药为主, 配伍健脾益气、活血化瘀和解毒祛湿之品研制而出。本次研究结果显示, 30 例患者临床总有效率为 80.0% (24/30), 可以有效提升外周血 WBC 计数、HGB 含量和 PLT 计数, 提示补髓生血颗粒治疗 CAA 疗效确切。

T 细胞免疫功能亢进已经成为 CAA 发病机制的研究热点, 有学者指出 CAA 是一种自身免疫性疾病, 以骨髓造血功能衰竭为主要特征的全血细胞减少性疾病。异常免疫反应在 CAA 的发病过程中具有重要作用, 尤其是 T 淋巴细胞亚群数量及功能的异常与 CAA 的发生密切相关, 但 CAA 患者可能存在 T 淋巴细胞亚群数量、功能、克隆异常, T 淋巴细胞分泌因子异常, T 淋巴细胞凋亡异常等多种机制共同参与^[9]。T 淋巴细胞的免疫功能亢进可以导致造血干/祖细胞的吞噬破坏、造血干/祖细胞过度凋亡、抑制血细胞的生成等, 从而直接或间接导致骨髓造血功能衰竭^[10]。

Th17 细胞通过分泌特异性细胞因子 IL-17 而广泛参与多种自身免疫系统疾病的发生和发展, 维甲酸相关孤儿受体 γt (retinoid-related orphan nuclear receptor γt , ROR γt) 是控制 Th17 细胞分化的特异性转录因子, ROR γt 在转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的诱导及 IL-6 的协同作用下, 通过激活信号转导和转录活化因子 3 (signal transducer and activators of transcription 3, STAT3) 表达, 从而促使 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化, 分泌 IL-17 等多种细胞因子^[11,12]。Th17 细胞在健康人体外周血单个核细胞中所占比例约为 0.5%, 表达多种细胞表面分子如 IL-23R 等^[13]。IL-23 由 p19/p40 两个亚基构成, p40 亚基是 IL-12 和 IL-23 共有的, 而 p19 亚基是 IL-23 所独有的。IL-23 具有调节促炎性因子和趋化因子产生的作用, 可刺激 T 细胞活化、维持和稳定其特

征,调控 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞扩增分化,使 Th17 细胞特征可以稳定和维持,并通过 Th17 分泌的 IL-17、干扰素- γ (Interferon- γ IFN- γ) 等细胞因子参与多种免疫相关性疾病的发生^[14-17]。另外,可形成 IL-23/IL-17 调节轴,IL-23 上调 IL-17 的水平以扩增 Th17 细胞的效应功能及致病作用^[18,19]。研究表明,CAA 患者的 Th17 细胞比例、IL-23 和 IL-23p19 mRNA 表达水平处于异常升高状态,提示 CAA 患者的免疫发病机制是由 Th17 细胞及其相关细胞因子异常所介导的,且与疾病的严重性相关^[20-24]。

本次研究结果提示,治疗后 CAA 患者 Th17 细胞、IL-23 和 IL-23p19 mRNA 表达水平较治疗前均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。补髓生血颗粒通过下调 Th17 细胞、IL-23 和 IL-23p19 mRNA 表达水平以调整异常的免疫反应,进而恢复骨髓的造血功能,以达到治疗 CAA 的目的,表明补髓生血颗粒具有调整 CAA 患者免疫失衡的作用,这可能是补髓生血颗粒治疗 CAA 的疗效机制之一。

参 考 文 献

- [1] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Immunol*, 2006, 177(1): 566-573.
- [2] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. *Immunity*, 2006, 24(4): 179-189.
- [3] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235-238.
- [4] DB O'Quinn, WS Helms, DC Bullard. Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 231-234.
- [5] Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17, an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties [J]. *Immunity*, 2006, 24(6): 677-688.
- [6] Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, et al. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(2): 469-475.
- [7] 张之南,沈悌主编.血液病诊断及疗效标准[M].第3版.北京:科技出版社,2007:19-22.
- [8] 22个专业95个病种中医诊疗方案[M].北京:国家中医药管理局医政司,2010:328.
- [9] 张强,翟志敏. T 淋巴细胞在再生障碍性贫血发病机制中的作用[J]. *临床输血与检验*, 2006, 8(4): 344-346.
- [10] 吴迪炯,周郁鸿,林圣云. T 淋巴细胞与再生障碍性贫血[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(27): 3379-3380.
- [11] Romagnani S, Maggi E, Liotta F, et al. Properties and origin of human Th17 cells [J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(1): 3-7.
- [12] Sundrud MS, Nolan MA. Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(3): 286-292.
- [13] Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(6): 1647-1656.
- [14] Yannam GR, Gutti T, Poluektova LY. IL-23 in infections inflammation autoimmunity and cancer possible role in HIV-1 and AIDS [J]. *Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7(1): 94-112.
- [15] Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine IL-23 with biological activities similar as well as distinct from IL-12 [J]. *Immunity*, 2000, 13(5): 715-725.
- [16] 张炜,罗芳军,周娇娇,等. Th17 细胞的研究进展[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2007, 36(6): 620-625.
- [17] 郑钰涵,吴晓东,孙兵. Th17 细胞分化和功能的研究进展[J]. *生命科学*, 2010, 22(6): 534-538.
- [18] Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation [J]. *Clin Invest*, 2006, 116(5): 1218-1222.
- [19] Gu Y, Hu X, Liu C, et al. Interleukin (IL)-17 promotes macrophages to produce IL-8, IL-6, and tumour necrosis factor- α in aplastic anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2008, 142(1): 109-114.
- [20] 王敏,王宁玲,王会平,等. 儿童再生障碍性贫血 Th17 细胞及相关因子表达研究[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2011, 16(6): 248-251.
- [21] 胡令彦,周水明,陈英坤,等. 健脾补肾方对再生障碍性贫血患者外周血 Th17 相关细胞因子水平的影响[J]. *云南中医学院学报*, 2013, 36(3): 4-7.
- [22] Dubey S, Shukla P, Nityanand S, et al. Expression of interferon- γ and tumor necrosis factor- α in bone marrow T cells and their levels in bone marrow plasma in patients with aplastic anemia [J]. *Ann Hematol*, 2005, 8(4): 572-577.
- [23] 谷燕. IL-12, IL-23 和 IL-17 在再生障碍性贫血中的作用[D]. 济南:山东大学,2008.
- [24] 陈爱玲,戴锡孟. 中医药对再生障碍性贫血的免疫调控现状[J]. *辽宁中医杂志*, 2005, 32(12): 1339-1440.

(收稿:2015-07-28 修回:2015-11-18)