

· 临床论著 ·

参地颗粒对慢性肾小球肾炎脾肾亏虚证患者 T 细胞亚群及足细胞标志蛋白的影响

王亿平 张磊 王东 吕勇 胡顺金 刘家生 金华 茅燕萍 任克军

摘要 目的 探讨参地颗粒对慢性肾小球肾炎(CGN)脾肾亏虚证患者细胞免疫的调节和足细胞的保护机制。**方法** 60 例 CGN 脾肾亏虚证患者采用随机数字表法分为对照组和治疗组,每组各 30 例,剔除 5 例(治疗组 3 例,对照组 2 例),实际纳入 55 例,对照组 28 例,治疗组 27 例,另设正常组 20 名。对照组服用缬沙坦胶囊,每日 1 次,每次 80 mg;治疗组服用参地颗粒,每次 1 袋(10 g),每日 3 次口服,疗程 12 周。观察两组临床疗效,治疗前后 24 h 尿蛋白定量、全血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞水平,血清 IL-2、IL-4、IL-17 及尿足萼糖蛋白(PCX)、B7-1 水平的变化情况。**结果** 治疗组临床疗效总有效率和中医证候疗效均优于对照组($P < 0.05$)。治疗后,两组 24 h 尿蛋白定量水平均降低($P < 0.05$),治疗组优于对照组($P < 0.05$)。治疗前,治疗组及对照组全血 CD4⁺T 水平、CD4⁺T/CD8⁺T 比值、血清 IL-4 水平均低于正常组($P < 0.05$);全血 CD8⁺T 水平、血清 IL-2、IL-4、IL-17 及尿 PCX、B7-1 水平均高于正常组($P < 0.05$)。治疗后,治疗组及对照组全血 CD4⁺T 水平、CD4⁺T/CD8⁺T 比值、血清 IL-4 水平均较治疗前升高($P < 0.05$);全血 CD8⁺T 水平、血清 IL-2、IL-17 及尿 PCX、B7-1 水平均较治疗前下降($P < 0.05$),且治疗组均较对照组更甚($P < 0.05$)。**结论** 参地颗粒可明显改善 CGN 脾肾亏虚证患者临床症状,减少 24 h 尿蛋白定量,其机制可能与纠正 T 细胞亚群失衡状态,调节血清 IL-2、IL-4、IL-17 及尿 PCX、B7-1 水平有关。

关键词 慢性肾小球肾炎;脾肾亏虚证;参地颗粒;T 细胞亚群;足细胞标志蛋白

Effect of Shendi Granule on T Cell Subsets and Podocyte Marker Protein in Chronic Glomerulonephritis Patients with Pi-Shen Deficiency Syndrome WANG Yi-ping, ZHANG Lei, WANG Dong, LU Yong, HU Shun-jin, LIU Jia-sheng, JIN Hua, MAO Yan-ping, and REN Ke-jun *Department of Nephrology, First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230031)*

ABSTRACT Objective To study the mechanism of Shendi Granule (SDG) on regulating cellular immunity and protecting podocytes in chronic glomerulonephritis (CGN) patients with Pi-Shen deficiency syndrome (PSDS). **Methods** Totally 60 CGN patients with PSDS were randomly assigned to the control group and the treatment group, 30 in each group. Five patients were excluded (3 patients in the treatment group and 2 patients in the control group), and 55 patients completed the trial (28 cases in the control group and 27 cases in the treatment group). Besides, a healthy normal group (20 cases) was set up. Patients in the control group took Valsartan Capsule (VC), 80 mg each time, once per day. Patients in the treatment group took SDG, 1 package each time (10 g), 3 times a day. The treatment course for all was 12 weeks. The clinical efficacy was observed in the two groups. 24 h urinary protein quantization, levels of whole blood CD4⁺T and CD8⁺T cells, serum levels of IL-2, IL-4, IL-17, urinary levels of podocalyxin (PCX) and B7-1 were detected in the two groups before and after treatment. **Results** The total effective rate and total effective rate of TCM syndrome were better in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$). After treatment 24 h urinary protein quantization could be reduced in the two groups ($P < 0.05$). It was better in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$). Before treatment whole

基金项目:安徽省卫生厅中医药科研项目(No. 2012ZY13);安徽省卫计委中医药科研项目(No. 2016ZY13)

作者单位:安徽中医药大学第一附属医院肾病科(合肥 230031)

通讯作者:王亿平, Tel: 0551-62850082, E-mail: wywpyp54@aliyun.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20170828. 246

blood CD4⁺T level, CD4⁺T/CD8⁺T ratio, and serum IL-4 level were lower in the two groups than in the normal group ($P < 0.05$). Whole blood CD8⁺T level, serum levels of IL-2, IL-4, IL-17, and urinary levels of PCX and B7-1 were higher in the two groups than in the normal group ($P < 0.05$). After treatment whole blood CD4⁺T level, CD4⁺T/CD8⁺T ratio, and serum IL-4 level increased more in the treatment group and the control group, as compared with before treatment ($P < 0.05$). The increase was superior in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$). Whole blood CD8⁺T level, serum levels of IL-2 and IL-17, and urinary levels of PCX and B7-1 decreased more in the treatment group and the control group after treatment than before treatment ($P < 0.05$). The decrease was superior in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$). Conclusions SDG could obviously ameliorate clinical symptoms in CGN patients with PSDS, and reduce 24 h urinary protein quantization. Its mechanism might be associated with correcting imbalanced T cell subsets, regulating serum levels of IL-2, IL-4, and IL-17, and urinary levels of PCX and B7-1.

KEYWORDS chronic glomerulonephritis; Pi-Shen deficiency syndrome; Shendi Granule; T cell subsets; podocyte marker protein

慢性肾小球肾炎(chronic glomerulonephritis, CGN)是导致我国终末期肾病的首位病因^[1],主要以蛋白尿、血尿、高血压、水肿为临床表现,可伴有不同程度的肾功能减退,最终发展为慢性肾衰竭。随着中医药在调节 CGN 患者免疫系统和足细胞保护领域研究的不断深入,明确了中医药在调节 T 细胞平衡、免疫球蛋白水平和协同刺激分子的表达等方面的重要作用^[2,3]。前期研究证实参地颗粒对 CGN 有较好的疗效,但对细胞免疫调节和足细胞保护机制的研究仍不明确^[4,5]。本研究基于细胞免疫及足细胞损伤进一步探讨参地颗粒的作用机制,现报告如下。

资料与方法

1 诊断标准 CGN 诊断标准参照《内科学》^[6]诊断标准。中医辨证参考《中药新药临床研究指导原则》^[7]中属脾肾亏虚证。

2 纳入标准 (1)符合 CGN 诊断标准及中医脾肾亏虚证辨证标准。(2)符合慢性肾脏病 I、II 期(肾小球滤过率 > 60 mL/min)。(3)24 h 尿蛋白定量 < 3 g。(4)年龄 18~65 岁。(5)签署知情同意书。

3 排除标准 (1)妊娠及哺乳期妇女;(2)有心、脑、肝及血液系统等严重疾病者;(3)已在服用糖皮质激素、雷公藤多甙片及细胞毒药物者。

4 一般资料 60 例均为 2014 年 6 月—2015 年 12 月符合纳入标准的 CGN 脾肾亏虚证患者,按就诊先后顺序编为 1~60 号,取随机数字表第 30 行第 1 列~第 32 行第 20 列计 60 个随机数字,分对照组和治疗组各 30 例,另设正常组 20 名,来源于本院体检中心。其中治疗组有 3 例加用 ARB 类药物被剔除,

对照组中有 2 例加用雷公藤多甙片被剔除。对照组 28 例中,男 15 例,女 13 例;平均年龄(40.12 ± 12.58)岁;平均病程(2.55 ± 1.24)年。治疗组 27 例,男 14 例,女 13 例;平均年龄(41.34 ± 12.03)岁;平均病程(2.12 ± 1.38)年。正常组 20 名,男 10 名,女 10 名;平均年龄(43.34 ± 11.03)岁。3 组间患者性别、年龄的差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗组与对照组病程的差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理号:2017AH-04)。

5 治疗方法 治疗组服用参地颗粒(由红参、茯苓、鸡内金、川芎、熟地黄、五味子、桑螵蛸组成,每袋 10 g,每包含生药 34 g,生产批号:20140418),每日 3 次,每次 1 袋(10 g)。对照组服用缙沙坦胶囊(每粒 80 mg,北京诺华制药有限公司,生产批号:20130705),每日 1 次,每次 80 mg。两组患者均予以低盐低脂饮食,积极控制血压($< 140/90$ mmHg)。降压药物首选钙通道阻滞剂,若血压控制不能达标,再选用 β 受体阻滞剂、 α 受体阻滞剂、中枢性降压药等。疗程均为 12 周。

6 观察指标

6.1 临床疗效 参照参考文献[7]制定。其中症状量化评分,按照症状的轻、中、重分别计 2、4、6 分。临床疗效判定标准分临床控制、显效、有效和无效。中医证候疗效标准分临床痊愈、显效、有效和无效。

6.2 治疗前后 24 h 尿蛋白定量 采用常规生化法检测。

6.3 治疗前后全血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞水平 采用流式细胞术检测。

6.4 治疗前后血清 IL-2、IL-4、IL-17 及尿足萆糖蛋白(PCX)、B7-1 水平 采用 ELISA 法检测。IL-2、IL-4、IL-17 及尿 PCX、B7-1 试剂盒均由上海源叶生物技术有限公司提供,生产批号分别为:20151216A、20151220A、20151122A、20151218A、20160122A。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 进行统计学处理。计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,若资料不符合正态分布或方差不齐则采用非参数检验,3 组间均数比较采用单因素方差分析。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 疗效比较 临床疗效:治疗组 27 例中临床控制 10 例,显效 9 例,有效 5 例,无效 3 例,总有效率 88.89% (24/27),对照组 28 例中临床控制 5 例,显效 4 例,有效 8 例,无效 11 例,总有效率 60.71% (17/28),治疗组优于对照组 ($\chi^2 = -2.739, P < 0.05$)。中医证候疗效:治疗组 27 例中临床痊愈 10 例,显效 10 例,有效 5 例,无效 2 例,总有效率 92.59% (25/27),对照组 28 例中临床痊愈 5 例,显效 4 例,有效 6 例,无效 13 例,总有效率 53.57% (15/28),治疗组亦优于对照组 ($\chi^2 = -3.134, P < 0.05$)。

2 两组治疗前后 24 h 尿蛋白定量比较 治疗前治疗组为 (1.84 ± 0.36) g,对照组为 (1.83 ± 0.34) g,治疗后分别为 (0.82 ± 0.23)、(1.26 ± 0.25) g,两组均能降低 24 h 尿蛋白定量 ($P < 0.05$),且治疗组优于对照组 ($P < 0.05$)。

3 3 组全血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ T 比值比较(表 1) 治疗前,对照组和治疗组全血 CD4⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ T 比值均低于正常组 ($P < 0.05$);CD8⁺ T 水平高于正常组 ($P < 0.05$)。治疗后,两组 CD4⁺ T 水平和 CD4⁺/CD8⁺ T 比值均较治疗前升高 ($P < 0.05$),CD8⁺ T 水平较治疗前降低 ($P < 0.05$),治疗组优于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 3 组全血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ T 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	CD4 ⁺ T (%)	CD8 ⁺ T (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T 比值
正常	20	治疗前	36.78 ± 2.77	24.23 ± 1.25	0.83 ± 0.15
		治疗后	—	—	—
对照	28	治疗前	19.17 ± 4.16*	41.93 ± 4.20 [△]	0.46 ± 0.24*
		治疗后	27.49 ± 3.26 [△]	31.14 ± 3.28 [△]	0.69 ± 0.26 [△]
治疗	27	治疗前	18.22 ± 4.41*	42.12 ± 4.37*	0.47 ± 0.27*
		治疗后	33.50 ± 3.05 ^{△▲}	26.34 ± 3.02 ^{△▲}	0.80 ± 0.13 ^{△▲}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与本组治疗前比较,[△] $P < 0.05$;与对照组治疗后比较,[▲] $P < 0.05$;下表同

4 3 组血清 IL-2、IL-4 及 IL-17 水平比较(表 2) 治疗前对照组及治疗组血清 IL-4 水平低于正常组 ($P < 0.05$),IL-2、IL-17 水平高于正常组 ($P < 0.05$);治疗后,对照组及治疗组血清 IL-2 和 IL-17 水平均较治疗前下降 ($P < 0.05$),IL-4 水平均较治疗前上升 ($P < 0.05$),且治疗组优于对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 3 组血清 IL-2、IL-4 及 IL-17 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	IL-2	IL-4	IL-17
正常	20	治疗前	296.02 ± 52.82	37.12 ± 5.77	19.92 ± 6.33
		治疗后	—	—	—
对照	28	治疗前	893.59 ± 200.17*	18.07 ± 6.16*	39.93 ± 8.20*
		治疗后	614.94 ± 149.74 [△]	25.49 ± 7.43 [△]	27.14 ± 6.08 [△]
治疗	27	治疗前	911.27 ± 203.05*	17.98 ± 6.41*	40.12 ± 8.37*
		治疗后	427.93 ± 143.59 ^{△▲}	32.50 ± 7.16 ^{△▲}	20.34 ± 5.47 ^{△▲}

5 3 组尿 PCX 及 B7-1 水平比较(表 3) 治疗前,对照组及治疗组尿 PCX、B7-1 水平高于正常组 ($P < 0.05$)。治疗后,对照组及治疗组尿 B7-1、PCX 水平均较治疗前下降 ($P < 0.05$),治疗组优于对照组 ($P < 0.05$)。

表 3 3 组尿 PCX 及 B7-1 水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	PCX	B7-1
正常	20	治疗前	12.92 ± 3.34	35.12 ± 9.71
		治疗后	—	—
对照	28	治疗前	19.54 ± 4.79*	69.89 ± 11.71*
		治疗后	16.44 ± 4.59 [△]	54.62 ± 10.54 [△]
治疗	27	治疗前	19.25 ± 4.77*	70.67 ± 11.62*
		治疗后	13.07 ± 4.07 ^{△▲}	40.15 ± 10.23 ^{△▲}

讨 论

中医学无 CGN 这一病名,当属“肾风”、“水肿”、“风水”、“虚劳”、“腰痛”等范畴。一般认为 CGN 的发病病机为脾肾亏虚。

CGN 作为一种自身免疫性疾病,其发病机制十分复杂,但细胞免疫在 CGN 的发生、发展过程中的重要作用,一直被肾脏病学者所认可^[8]。国内研究证实外周血 T 淋巴细胞亚群的明显失衡和共同刺激分子 CD28 的异常表达,在我国 CGN 患者中十分常见,主要表现为减少的 CD4⁺ T 细胞和增加的 CD8⁺ T 细胞以及倒置的 CD4/CD8 细胞比值^[9]。T 细胞可通过直接损伤或释放可溶性细胞因子或者辅助 B 细胞产生抗自身成分的抗体,从而使炎症过程不断放大^[10]。

蛋白尿患者常伴有足细胞上特异性的标志蛋白的丢失,常见的包括 PCX、podocin 等,其中 PCX 是足

细胞主要的特异蛋白,主要带有负电荷^[11]。当肾脏损伤时,足细胞形态发生变化,会与肾小球基底膜剥离,脱落至肾小囊中随尿液排出,进一步加重蛋白尿的程度,最终导致肾功能损害^[12]。因此检测尿中 PCX 的水平,对于了解 CGN 患者的足细胞损伤水平有着十分重要的意义。B7-1 又称 CD80,为 I 型跨膜蛋白,属免疫球蛋白超家族成员。B7-1 作为一种共刺激分子,与 B 细胞表面的特异受体结合,促进 T 细胞的活化、增殖。在有足突融合及蛋白尿的条件下,可诱导足细胞 B7-1 的表达上调,进一步通过对 SD 蛋白分子进行重排,使肾小球的选择性滤过功能改变,参与蛋白尿的形成^[13]。在以蛋白尿为主要表现的肾脏疾病中,肾脏组织足细胞上 B7-1 的表达增加^[14]。而且尿中 B7-1 的变化水平相较于血清 B7-1,能更好地反应足细胞的损伤情况^[15]。并且尿中 B7-1 排泄水平与 24 h 尿蛋白相关^[16],B7-1 也可以作为肾脏损害程度的预测因子^[17]。

在本临床观察过程中,笔者发现 CGN 脾肾亏虚证患者存在 T 细胞亚群的失衡,其中以 CD4⁺T 表达的减少和 CD8⁺T 表达的增加为主要表现,与文献^[18]研究结果一致。同时伴有血清 IL-2、IL-17 的升高和 IL-4 水平的下降,提示 CGN 脾肾亏虚证可能存在 Th1 和 Th2 细胞亚群的失衡,与文献^[19]报道相符。尿液检查发现 CGN 患者尿 PCX 及 B7-1 水平高于正常组,提示 CGN 患者存在不同程度的足细胞的损伤,其机制可能机体的免疫功能异常,导致免疫炎症直接损伤足细胞,或是足细胞自身的免疫应答损伤,加之循环免疫复合物的沉积后致使肾小球损伤。肾小球滤过功能受损,导致蛋白尿的发生。参地颗粒能明显改善 CGN 脾肾亏虚证患者临床症状,减少 24 h 尿蛋白定量,其机制可能与纠正 T 细胞亚群失衡状态,调节血清 IL-2、IL-4、IL-17 及尿 PCX、B7-1 水平有关,从而抑制免疫炎症对足细胞的损伤,减轻免疫复合物在肾小球的沉积,保护足细胞,维持肾小球毛细血管结构及滤过屏障功能的完整性。

参 考 文 献

[1] 王宗谦,尹丽,张思晴.慢性肾功能衰竭 937 例病因分析[J].中国实用内科杂志,2013,33(1):58-61.
 [2] 魏明刚,张玲,倪莉,等.加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾脏足细胞保护机制的研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(8):1077-1082.
 [3] 丁世永,郑平东,何立群,等.小柴胡汤改善慢性肾小球肾炎患者炎症及减轻蛋白尿的作用研究[J].中国中西医结合杂志,2013,33(1):21-26.

[4] 王亿平,王立媛,王东,等.参地颗粒对慢性肾炎脾肾亏虚证患者血清 VEGF、尿 EGF 的干预作用[J].中国中西医结合肾病杂志,2014,15(10):873-876.
 [5] 王亿平,唐锦囊.参地颗粒对系膜增生性肾小球肾炎大鼠血清和肾脏 MMP-9/TIMP-1 的影响[J].安徽中医药大学学报,2014,33(5):78-81.
 [6] 葛永波,徐永健主编.内科学[M].第 8 版.北京:人民卫生出版社,2013:472-475.
 [7] 郑筱萸主编.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2002:5.
 [8] Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, et al. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology [J]. Semin Immunopathol, 2007, 29(4): 317-335.
 [9] 沈华英,陈蕾,董吉祥,等.慢性肾炎患者外周血 T 细胞亚群和共刺激分子的表达及其意义[J].现代免疫学,2002,22(1):48-50.
 [10] Ooi JD, Snelgrove SL, Engel DR, et al. Endogenous foxp3(+) T-regulatory cells suppress anti-glomerular basement membrane nephritis [J]. Kidney Int, 2011, 79(9): 977-986.
 [11] Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(8): 1669-1676.
 [12] Asao R, Asanuma K, Kodama F, et al. Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2012, 7(9): 1385-1393.
 [13] 蒲丽君. B7-1 在足细胞上的表达及其与蛋白尿的关系 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2006, 26(4): 544-547.
 [14] Larsen CP, Messias NC, Walker PD. B7-1 immunostaining in proteinuric kidney disease [J]. Am J Kidney Dis, 2014, 64(6): 1001-1003.
 [15] Garin EH, Diaz LN, Mu W, et al. Urinary CD80 is excretion increases in idiopathic minimal change disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2): 260-266.
 [16] Garin EH, Mu W, Arthur JM, et al. Urinary CD80 is elevated in minimal change disease but not in focal segmental glomerulosclerosis [J]. Kidney Int, 2010, 78(3): 296-302.
 [17] 钟正霞,罗茜.尿足细胞 B7-1 分子的检测在原发性肾病综合征患者中的价值 [J]. 中外医学研究, 2015, 13(3): 65-66.
 [18] 曹蓓,周庆华,王琛,等.慢性肾炎中医证型与免疫学指标的相关性分析 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(2): 10-13.
 [19] 程悦,张静波,李芙蓉,等.系膜增生性肾小球肾炎患者血清 Th1/Th2 细胞因子表达的变化 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 860-862.

(收稿:2016-12-24 修回:2017-08-20)

责任编辑:段碧芳
英文责编:张晶晶