

青黄散联合健脾补肾中药对骨髓增生异常综合征患者骨髓单个核细胞内缺氧诱导因子-1 α 的影响

高 飞 许勇钢 杨晓红 麻 柔

摘要 **目的** 观察青黄散联合健脾补肾中药对骨髓增生异常综合征(MDS)患者骨髓单个核细胞内缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的影响。**方法** 应用流式细胞仪检测 25 例 MDS 患者使用青黄散合健脾补肾中药治疗前后骨髓单个核细胞内 HIF-1 α 的变化情况,同时以 13 名健康人为对照组,检测骨髓各系列细胞 HIF-1 α 变化水平。**结果** (1)治疗组 25 例患者中,有效患者 19 例,无效患者 6 例,有效率为 76%;(2)与治疗前比较,治疗组治疗后外周血 WBC、Hb、PLT、ANC 均有明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(3)与治疗前比较,治疗组患者治疗后骨髓内淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、有核红细胞的 HIF-1 α 平均荧光强度增强($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与健康对照组比较,治疗组治疗前骨髓内淋巴细胞、单核细胞、有核红细胞 HIF-1 α 平均荧光强度减弱,粒细胞 HIF-1 α 平均荧光强度明显增强($P < 0.01$);治疗后 HIF-1 α 平均荧光强度除粒细胞较健康成人组尚有增高外($P < 0.01$),其余各系差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 青黄散合健脾补肾中药可提高 MDS 患者骨髓内淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、有核红细胞的 HIF-1 α 水平,从而提高 MDS 患者的 Hb 水平,改善患者贫血及相关症状。

关键词 青黄散;健脾补肾中药;骨髓增生异常综合征;缺氧诱导因子-1 α

Effect of Qinghuang Powder Combined Chinese Herbs for Pi-strengthening and Shen-reinforcing on HIF-1 α in Bone Marrow Mononuclear Cells of Myelodysplastic Syndrome Patients: an Experimental Research GAO Fei, XU Yong-gang, YANG Xiao-hong, and MA Rou Department of Hematology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Qinghuang Powder (QHP) combined Chinese herbs for Pi-strengthening and Shen-reinforcing (CHPSSR) on hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in bone marrow mononuclear cells of myelodysplastic syndrome (MDS) patients. **Methods** Changes of HIF-1 α in bone marrow mononuclear cells of MDS patients were detected in 25 MDS patients treated by QHP combined CHPSSR using flow cytometry. Meanwhile, 13 healthy subjects were recruited as the control group. Changes HIF-1 α levels in various serial bone marrow mononuclear cells were detected. **Results** (1) Among the 25 patients in the treatment group, there were 19 patients effective and 6 patients ineffective, with the total effective rate being 76%. (2) Compared with before treatment, levels of peripheral blood WBC, Hb, PLT, and ANC significantly increased in the treatment group after treatment, showing statistical difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (3) Compared with before treatment, the HIF-1 α mean fluorescence intensity was enhanced in bone marrow lymphocytes, monocytes, granulocytes, and nucleated red blood cells of the treatment group after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the HIF-1 α mean fluorescence intensity was weakened in bone marrow lymphocytes, monocytes, and nucleated red blood cells of the treatment group before treatment; while it was obviously enhanced in granulocytes ($P < 0.01$). But after treatment the HIF-1 α mean fluorescence intensity increased more in the granulocytes of the treatment group than in those of the control group ($P < 0.01$), but there was no

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273931)

作者单位:中国中医科学院西苑医院血液科(北京 100091)

通讯作者:麻 柔, Tel: 010-62835627, E-mail: xyxsys@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.02.0174

statistical difference in bone marrow lymphocytes, monocytes, or nucleated red blood cells. Conclusion QHP combined CHPSSR could improve HIF-1 α levels in bone marrow lymphocytes, monocytes, granulocytes, and nucleated red blood cells of MDS patients, thus improving Hb levels of MDS patients, and improving their anemia and correlated symptoms.

KEYWORDS Qinghuang Powder; Chinese herbs for Pi-strengthening and Shen-reinforcing; myelodysplastic syndrome; hypoxia-inducible factor -1 α

经多年临床观察,笔者发现采用青黄散联合健脾补肾中药治疗骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)的有效患者,其外周血象以红细胞、血红蛋白恢复最快。青黄散为含砷的中药制剂,研究显示砷剂可与细胞内的巯基相互作用,使机体处于缺氧状态^[1]。在缺氧状态下,机体通过一系列的反馈调节作用,刺激红系代偿性增生^[2]。据此推测,青黄散促进 MDS 患者外周血象恢复的作用,与其所含砷剂造成机体缺氧状态有关。由于条件所限,无法检测患者骨髓氧分压情况,故选择测定对氧分压较为敏感的指标——缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)作为观测指标,通过观察青黄散对 HIF-1 α 的影响,分析其对红系增生的作用,现将结果报道如下。

资料与方法

1 诊断标准 参照 2006 年维也纳国际会议 MDS 最低诊断标准^[3]。分类标准参照 2008 年 WHO 标准^[4]。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合西医 MDS 诊断标准者;均经骨髓细胞涂片、骨髓病理、流式分析及染色体核型分析确诊,均为难治性血细胞减少伴有多系发育异常型(RCMD);自愿受试,并签署知情同意书者;年龄 18~75 岁。排除标准:合并严重心、肝、肾病变者;精神病不能配合治疗患者;妊娠、哺乳期妇女患者;已知对该药过敏者;参加其他临床研究者。

3 一般资料 25 例来自 2011 年 2 月—2013 年 2 月期间在中国中医科学院西苑医院血液科门诊的 MDS 患者为治疗组,其中女性 13 例,男性 12 例,年龄 18~67 岁,平均年龄为(30.64 $\pm$ 12.96)岁;染色体情况:未发现异常核型患者 20 例,三体 8 患者 3 例,亚二倍体患者 1 例,复杂核型异常患者 1 例。健康对照组 13 名,均来自我院骨髓捐献志愿者,其中男性 6 名,女性 7 名,平均年龄(32.17 $\pm$ 9.75)岁。两组在年龄分布与性别构成上比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

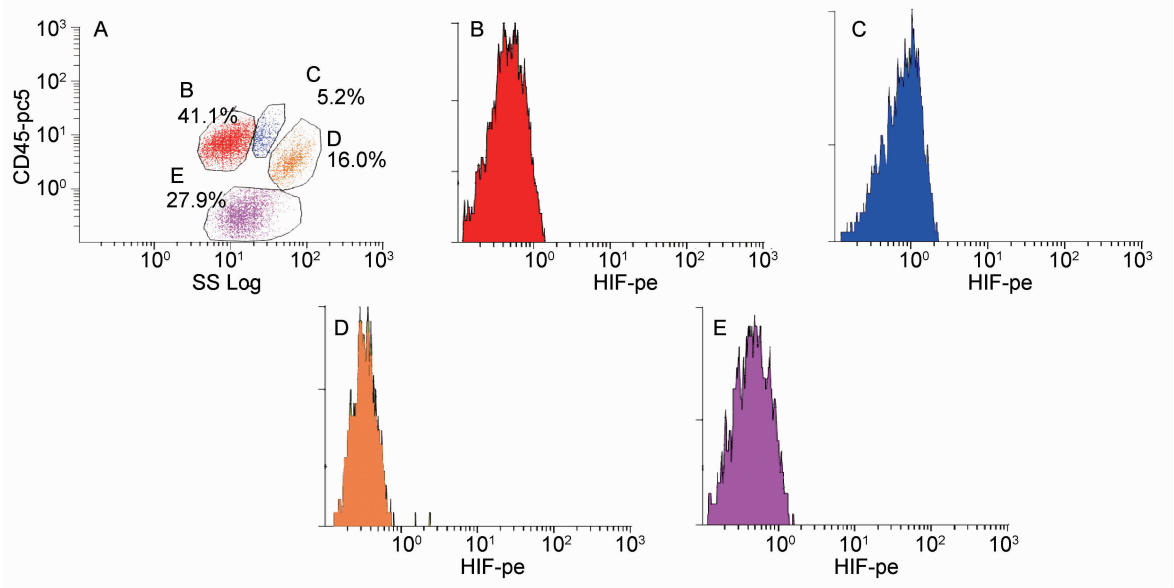
4 治疗方法 青黄散(青黛、雄黄按 6:4 比例研

末混匀盛入胶囊,由我院药厂制备。每个胶囊重 0.4 g。雄黄超微粉碎,统一中药产地、规格)每日 1 次,1 粒/次。补脾肾中药,水煎服,每日 1 剂,每日 2 次,每次 200 mL。基本方为:生地 15 g 熟地 15 g 山药 10 g 山萸肉 10 g 丹皮 10 g 茯苓 10 g 泽泻 10 g 补骨脂 15 g 菟丝子 15 g 制首乌 10 g 太子参 30 g 炒白术 10 g 生姜 10 g 大枣 40 g。阴虚酌加:黑桑椹 10 g,女贞子 20 g,旱连草 10 g;阳虚酌加:锁阳 10 g,巴戟天 10 g,桂枝 10 g,制附片 10 g(先煎)。治疗组采用上述治疗方案,连续服用 3 个月为 1 个疗程,共计观察 2 个疗程;健康对照组不予治疗。

5 观察指标 观察治疗组治疗前后血常规变化,分析疗效情况;检测分析治疗组治疗前后及健康对照组骨髓单个核细胞内 HIF-1 α 表达情况;观察 HIF-1 α 在 MDS 患者治疗前后的变化及与健康对照组的差异。

6 疗效评价标准 根据 2000 年国际工作组 MDS 疗效标准的修订建议^[5]及 2006 年国际工作组疗效标准血液学进步的修订建议^[6]评价疗效。完全缓解、血液学进步为有效;稳定、进展为无效。

7 标本制备 佛波酯(PMA,美国 Sigma 产品, C36H56O8, 1 mg, P-8139) 50 ng/mL;离子霉素(美国 Sigma 产品, C₄₁ H₇₀ O₉Ca, 1 mg, I-0634) 1 μ g/mL;莫能霉素(美国 Sigma 产品, C₃₆ H₆₁ O₁₁ Na; 500 mg, M-5273) 3 μ mol,混匀后分装 50 瓶, 1 mL/瓶, -20 $^{\circ}$ C 冻存,备用。使用肝素钠抗凝管采集 3 mL 骨髓, Ficoll 密度梯度离心分离骨髓单个核细胞,调节细胞浓度为 2×10^6 细胞/mL,将细胞重悬于培养基中,充分混匀后, 37 $^{\circ}$ C, 5 % 二氧化碳培养箱内培养 4 h;收获细胞于 1 支 Falcon 试管内,加入 2 mL PBS 液充分混匀, 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清,加 CD45-PC5(美国, Beckman-Coulter, 76) 20 μ L 于 Falcon 试管内混匀,室温暗处孵育 20 min;加固定液 100 μ L,室温暗处孵育 20 min, 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清;加入 PBS 2 mL 液充分混匀, 1 500 r/min,离心 5 min 后弃上清;加破膜



注:A 为骨髓细胞分群;B 为淋巴细胞系 HIF-1 α 平均荧光强度;C 为单核细胞系 HIF-1 α 平均荧光强度;D 为粒细胞系 HIF-1 α 平均荧光强度;E 为有核红细胞系 HIF-1 α 平均荧光强度

图 1 HIF-1 α 平均荧光表达强度数据分析图

剂 100 μ L, 室温暗处孵育 5 min, 将细胞悬液分装至 2 个 Falcon 试管内; 一管加入 20 μ L PE 标记的 HIF-1 α 同型对照, 另一管加入 10 μ L PE 标记的 HIF-1 α 细胞因子抗体(美国, R&D), 混匀, 室温暗处孵育 30 min; 加 PBS 2 mL, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μ L PBS 于流式细胞仪(美国, Beckman-Coulter)上机检测。

8 HIF-1 α 平均荧光表达强度数据分析(图 1) 前向散射光(forward scatter, FSC)/侧向散射光(side scatter, SSC)散点图中圈定 A 门为所分析的所有细胞群, CD45/SSC 设门圈定 A 门细胞中淋巴细胞系 B 门、单核细胞系 C 门、粒细胞系 D 门、有核红细胞系为 E 门。以直方图显示各细胞系列 HIF-1 α —PE 细胞因子的平均荧光表达强度。应用 EXPO32 流式专业软件分析结果。

9 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述; 采用配对样本 t 检验比较同组之间治疗前后差异。所有统计检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 临床疗效 治疗组 25 例患者中, 有效 19 例, 包括仅 Hb 上升 5 例, Hb 及 PLT 同时上升 10 例, 仅 PLT 上升 4 例, 总体有效率为 76%; 无效 6 例, 包括进展 2 例, 稳定 4 例。

2 治疗组治疗前后患者外周 WBC、Hb、PLT、

ANC 变化比较(表 1) 与治疗前比较, 治疗组治疗后外周血 WBC、Hb、PLT、ANC 均有明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 治疗组治疗前后血常规比较 ($\bar{x} \pm s$)				
时间	WBC ($\times 10^9$)	Hb (g/L)	PLT ($\times 10^9$)	ANC ($\times 10^9$)
治疗前	3.07 $\pm$ 1.67	80.52 $\pm$ 31.05	28.92 $\pm$ 27.37	1.25 $\pm$ 0.79
治疗后	3.51 $\pm$ 1.65 **	108.08 $\pm$ 30.20 **	45.56 $\pm$ 35.62 **	1.55 $\pm$ 1.07 *

注: 与治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 两组骨髓淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、有核红细胞 HIF-1 α 平均荧光强度表达比较(表 2) 与健康对照组比较, 治疗组治疗前骨髓淋巴细胞、单核细胞、有核红细胞 HIF-1 α 平均荧光强度均明显减弱, 粒细胞 HIF-1 α 平均荧光强度明显增强, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 治疗后 HIF-1 α 平均荧光强度除粒细胞较健康对照组尚有增高外($P < 0.01$), 其余各系与健康对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与治疗前比较, 治疗组患者治疗后骨髓淋巴细胞、单核细胞、有核红细胞及粒细胞 HIF-1 α 平均荧光强度均较治疗前增强, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

MDS 为血液病常见病种之一。其基本临床特征是骨髓中造血细胞有发育异常的形态学表现和外周血细胞减少^[7]。麻柔教授经多年临床探索, 指出 MDS

表 2 两组 HIF-1α 平均荧光强度表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	HIF-1α			
			淋巴细胞	单核细胞	粒细胞	有核红细胞
治疗	25	治疗前	0.65 ± 0.11 [△]	0.94 ± 0.18 [△]	0.62 ± 0.31 [△]	0.52 ± 0.09 [△]
		治疗后	0.84 ± 0.23 ^{**}	1.68 ± 0.84 ^{**}	0.90 ± 0.50 ^{*△}	0.78 ± 0.24 ^{**}
健康对照	13		0.92 ± 0.14	1.67 ± 0.34	0.41 ± 0.11	0.75 ± 0.12

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与健康对照组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

疾病本质是以毒瘀邪实为本,气血虚损为标。因而在治疗过程中先以青黄散解毒祛瘀,同时运用补肾健脾中药,以扶其正,从而相辅相成,相得益彰,取得较好疗效。本研究亦进一步证实,该法在提高患者 Hb 方面具有明显作用。

HIF-1 是参与缺氧调节的核心转录因子,它通过对基因表达的调控,参与细胞中缺氧诱导产生的特异应答^[8]。人体内氧浓度主要通过 α 亚基对 HIF-1 活性进行调节,β 亚基是 HIF-1 的结构性亚基,在细胞内的表达不受氧浓度的影响^[9]。在正常氧分压的条件下,HIF-α 蛋白质半衰期不到 5 min,在缺氧条件下,HIF-1α 降解过程受抑制,与 HIF-β 亚单位结合形成二聚体 HIF-1,通过与靶基因的缺氧反应原件(HRE)结合启动靶基因的转录^[10]。目前已发现的 HIF-1 靶基因数目多达 80 余种,这些靶基因的蛋白表达产物如促红细胞生成素(EPO)、血管内皮生长因子(VEGF)等,在骨髓造血(特别是红系造血)方面起到重要的促进作用^[11]。王雪莲等^[12]将大鼠经过 1 个月低氧处理后,骨髓中 HIF-1 表达明显增高,血液中红细胞、Hb 较对照组明显升高;且鼠血液红细胞、Hb 与骨髓中 HIF-1 表达量均呈正相关,并随着 HIF-1 表达量的增加而增加,表明低氧环境可促进红系增殖。

青黄散为含砷制剂,历史上砷剂曾作为强壮剂使用,能够骨髓造血旺盛,红细胞增多,组织细胞生长繁殖活跃,食欲体重增加等。研究显示:砷剂发挥效应的机制是与细胞内的巯基相互作用,可通过与线粒体内参与细胞氧化呼吸的酶体系的巯基相互作用而达到抑制酶活性的作用,从而导致大量电子漏出,直接对氧进行单电子还原,生成大量的活性氧自由基,使活性氧簇(ROS)产生增加,氧不能被细胞有效利用,形成缺氧环境^[1]。由此推测,患者 HIF-1 的升高,可能与砷剂造成的缺氧环境有关。MDS 患者多有贫血表现,临床常见乏力、气短及出血等症状,属气血亏虚,脾不统血之证。中医学认为,脾胃为后天之本,气血生化之源;肾为先天之本,主藏精,而精血同源。因而在治疗过程中,通常采用健脾补肾的治疗方法,先天、后天同补,相辅相成,气血互用。麻柔教授在治疗 MDS 过程中,根

据中医病证结合思想,在使用青黄散的同时,合用健脾补肾中药,标本兼顾,病证同治,故能收效。

本研究结果显示:MDS 患者治疗前骨髓淋巴细胞、单核细胞、有核红细胞 HIF-1α 平均荧光强度均较健康对照组减弱($P < 0.05$);治疗后上述骨髓细胞 HIF-1α 平均荧光强度较治疗前增强($P < 0.05$):淋巴系 HIF-1α 平均荧光强度由治疗前(0.65 ± 0.11)上升至(0.84 ± 0.23);单核系由(0.94 ± 0.18)上升至(1.68 ± 0.84);粒系由(0.62 ± 0.31)上升至(0.90 ± 0.50);有核红系由(0.52 ± 0.09)上升至(0.78 ± 0.24)。治疗后 HIF-1α 平均荧光强度除粒系较正常组尚有增高外($P < 0.05$),其余各系与健康对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。综观整个治疗过程不难发现,治疗前患者 Hb 与 HIF-1 均较健康对照组偏低,而治疗后 Hb 与 HIF-1α 均较治疗前有所上升,HIF-1α 可达到健康人群水平,两者治疗前、后变化方向基本一致,在一定程度上反映 Hb 与 HIF-1 表达呈正相关,与以往研究结论相一致。因此,笔者认为 MDS 患者经青黄散合健脾补肾中药治疗后 Hb 升高与在缺氧环境下 HIF-1 表达量增高进而通过一系列信号,增强 EPO 等基因表达有关。

综上所述,青黄散合并健脾补肾中药能够明显提高 MDS 患者的 Hb 水平,改善患者贫血及相关症状。其中青黄散的作用机制为其与细胞内巯基共同作用,造成缺氧环境,通过提高 HIF-1α 水平,促进靶基因的蛋白表达产物的表达进而提高患者 Hb 水平。健脾补肾中药是在病证结合思想下,运用中医辨证论治理论,与青黄散共同配合取得治疗效果,但其在改善 Hb 水平方面的具体作用机制尚不明确,因而尚需围绕健脾补肾中药治疗 MDS 的作用机制展开进一步研究。

参 考 文 献

[1] 朱新华,陈竺,王振义,等.砷剂对肿瘤的生物学作用[J].国外医学输血及血液学分册,1998,21(5):314-315.
[2] 吴小东,杜磊.高原红细胞增多症[J].中国输血杂志,2013,26(6):589-592.
[3] Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions

- and standards in the diagnosis and treatment of myelodysplastic syndrome: consensus statement and report from a working conference [J]. Leuk Res, 2007, 31(6): 727-736.
- [4] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes [J]. Blood, 2009, 114(5): 937-951.
- [5] Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, et al. Report of an international working group standardized response criteria for myelodysplastic syndrome[J]. Blood, 2000, 96(12): 3671-3674.
- [6] Tefferi A, Barosi G, Mesa RA, et al. International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia: on behalf of the IWG for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT) [J]. Blood, 2006, 108(5): 1497-1503.
- [7] 肖志坚. 骨髓增生异常综合征的诊断与分型[J]. 内科急危重症杂志, 2010, 16(4): 169-171.
- [8] Xia X, Lemieux ME, Li W, et al. Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(11): 4260-4265.
- [9] 李启芳, 王祥瑞. HIF-1 α 和 HIF-2 β 对基因表达的调控[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25(5): 447-449.
- [10] Sharp FR, Bernaudin M. HIF-1 and oxygen sensing in the brain [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(6): 437.
- [11] Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2003, 228(1): 1.
- [12] 王雪莲, 李占全. HIF-1、VEGF 在慢性高原低氧环境下 SD 大鼠骨髓、心脏中的表达及意义[J]. 山东医药, 2009, 49(9): 34-35.

(收稿:2013-05-21 修回:2013-12-04)

全国中西医结合影像学术交流会征文通知

中国中西医结合学会医学影像专业委员会定于 2014 年 8 月 21-25 日在福建省武夷山市召开第十三次全国学术会议。会议同期将举办国家级继续教育项目“全国中西医结合影像学研究进展学习班”,届时将邀请国内知名专家前来讲学,并授予国家级继续教育学分。欢迎广大学者撰写论文,与会交流经验。现将有关征文事项通知如下。

征文内容 (1) 中西医结合影像学基础与临床应用研究;(2) 影像学(包括 X 线、CT、MRI、超声及核医学等)的临床应用;(3) 介入技术的临床应用;(4) 其他传统医学,如针灸等方面的影像学研究和有关信息的交流;(5) 影像学最新进展介绍及有关信息的发布。

征文要求 (1) 文稿字数请尽量控制在 3000 字左右,并附摘要;(2) 论文请附作者简介,内容包括“姓名、出生年月、性别、民族、籍贯、工作单位、学历学位、职称、研究方向、联系电话(若有 E-mail 请写出)”;(3) 本次会议征文统一采用电子文档,以 E-mail 发送至 ptchenyp@163.com,邮件主题请注明“中西医结合影像学征文”字样。

投稿须知 (1) 来稿未在公开发行的刊物上发表,署名无争议,不涉密,图片分辨率 300 dpi 以上,请自留底稿;(2) 来稿经会议学术委员会评审通过,将收录入论文汇编,优秀论文将推荐到《中国中西医结合影像学杂志》优先发表。

截稿日期 2014 年 7 月 31 日

联系人 陈一平(福建医科大学附属第一医院介入科),Tel:13805066904。