

健脾补肾方对再生障碍性贫血患者外周血 Th17 及相关细胞因子水平的影响^{*}

胡令彦, 周永明, 陈英坤, 胡明辉[△]

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

摘要: **目的** 探讨健脾补肾方对 70 例慢性再生障碍性贫血(CAA)患者治疗前后的调节性 T 细胞及白介素-6(IL-6), 白介素-17(IL-17)水平差异的影响。**方法** 收集 CAA 患者 70 例, 分为对照组和治疗组, 治疗组 45 例分为脾肾阴虚组及脾肾阳虚组, 采用 ELISA 法检测血浆中 IL-17, IL-6 的水平, 流式方法检测 Th17 水平。统计治疗前后的各指标水平变化。**结果** 与正常组比较, CAA 患者 Th17 及 IL-6 水平高于正常($P<0.05$)。经健脾补肾方治疗后, 脾肾阳虚组 Th17 及相关细胞因子均有下降($P<0.05$)。脾肾阴虚组 IL-16 水平下降($P<0.05$)。对照组 Th17 水平下降($P<0.05$)。**结论** 健脾补肾方对 CAA 患者水平 Th17 及其相关细胞因子变化有调节作用。

关键词: 再生障碍性贫血; 白细胞介素-6; 白细胞介素-17; TGF- β 1; 健脾补肾方

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)03-0004-04

再生障碍性贫血(aplastic anemia, 简称 AA)是一种以全血细胞减少和骨髓造血衰竭为特征的血液系统难治性疾病。T 细胞免疫异常是目前较为公认的发病机制, 在 Th1/Th2 免疫紊乱方面已经有了较多的研究结论^[1-2]。

CD4⁺T 细胞亚型中以分泌白细胞介素-17 为主要特征的辅助性 17 细胞 (Thelp17, Th17)。Th17 分泌的细胞因子 IL-17 (Interleukin17, IL-17) 与受体结合并被激活, 可导致趋化因子、集落刺激因子和黏附分子的表达或释放, 招募炎症细胞尤其是嗜中性粒细胞, 导致细胞浸润和组织破坏, 促进感染和自身免疫的发生^[3]。由单核-吞噬细胞、血管内皮细胞等细胞分泌的 IL-6 (Interleukin6, IL-6) 在机体的免疫调节, 炎症反应, 造血调控等过程中亦发挥重要的作用, 高浓度的 IL-6 存在时, 使初始 CD4⁺T 细胞分化为 Th17 细胞, 在 Th17 细胞生成过程中起到了非常重要的作用。因此本研究拟检测慢性再障患者用健脾补肾方治疗前后 Th17 细胞比例, 细胞因子 IL-6, IL-17 的水平, 以探索健脾补肾方对于慢性再障 Th17 细胞的作用与影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者来源于上海中医药大学附属岳阳医院 2011.1-2012.12 门诊及病房的 CAA 患者, 诊断分型参照《血液病诊断及疗效标准》第 3 版^[4]中的相关标准。中医分型标准参照 2002 年《中药新药临床研究指导原则》^[5]中分型标准, 分为脾肾阴虚证: 主症: 心悸, 头晕, 周身乏力, 面色口唇指甲苍白, 盗汗, 出血, 次症: 低热, 手足心热, 口渴思饮, 大便干结, 舌质淡或舌尖红, 苔薄, 脉细数。脾肾阳虚证: 主症: 心悸, 头晕, 周身乏力, 面色口唇指甲苍白, 形寒肢冷, 腰膝酸软。次症: 性功能减退, 大便溏, 多无出血或出血轻微, 舌质淡, 脉沉细或虚大。

1.2 治疗方法

治疗组: 用健脾补肾方 (由黄芪 24 g, 女贞子 15 g, 太子参 24 g, 白术芍 15 g, 炒丹皮 15 g, 制半夏 10 g, 小蓟草 15 g, 菟丝子 24 g, 炒枳壳 10 g, 炙甘草 6 g) 治疗联合安雄 40mg tid 或康力龙 2mg tid。脾肾阴虚型加生地黄、黄柏、鳖甲等; 脾肾阳虚型加补骨脂、淫羊藿等。

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金(NO:81001510)

收稿日期: 2013-04-09 修回日期: 2013-05-17

作者简介: 胡令彦(1981~), 女, 上海人, 博士在读, 主治医师, 主要从事中医血液病临床及实验室研究工作。

[△]通信作者: 胡明辉, E-mail: hmhui.com@163.com

对照组:西药治疗:安雄 40mg tid 或康力龙 2 mg tid。

合并感染、显著出血、重度贫血时予抗生素、止血药及输注单采血小板或红细胞悬液。所有患者疗程为 2 月。

1.3 检测方法

1.3.1 Th17 细胞检测

流式仪器型号:Epics Altra(Beckman Coulter 公司)

流式分析软件:EXPO32 V1.2 Analysis, Multicycle for windows 32-bit

取抗凝全血,加红细胞裂解液 3mL 放入试管中静止 10min,离心 1 500 转/min*2min,弃上清液,PBS 洗 1 遍,1 500 转离心 2min,弃上清液,采用人淋巴细胞分离液获得外周血单个核细胞(PBMC),调整细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$,接种至 24 孔板后加入佛波酯 ($50 \mu\text{g/L}$)、 37°C 5% CO_2 细胞培养箱培养至 4h。收集细胞,根据计数等分为测定管和同型对照管,加入 $20 \mu\text{L}$ PE 标记的鼠抗人 CD4 单抗, 4°C 避光孵育 30min。PBS 洗涤 2 次,固定液室温避光固定反应 20min 后离心弃去上清,PBS 洗涤 2 次。为便于细胞因子染色,加入破膜剂细胞打孔,离心弃去上清后,然后予细胞因子染色。测定管加入 FITC 标记的 IL-17A $0.5 \mu\text{g}$,对照管加入同型对照, 4°C 避光孵育 30 min。应用流式细胞仪 Epics Altra 型,根据前向散射光和侧向散射光以淋巴细胞群进行设门,设置各通道之间的荧光补偿,对 Th17 细胞的比例水平进行检测^[6]。

1.3.2 细胞因子测定

用干净试管收集血液,室温凝固 30min,离心 1000g 15min,收集血清。立即分析或分装后 -20°C 冷冻保存。3 种试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供,按照说明书方法进行标准品的稀释与加样,配液,洗涤,加酶,温育,测定等步骤。

1.4 统计学处理

计量资料若正态分布,用 t 检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 检验,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若非正态分布使用非参数检验,检验两组比较用 U 检验,多组比较用 H 检验,数据用四分位数($M(Q1, Q3)$)表示,频度资料用卡方检验。数据统计分析采用 SPSS 13.0 软件。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗组与对照组一般情况及血象比较

CAA 患者 70 例,其中男性 37 例,女性 33 例。根据辨证,治疗组 45 例分为脾肾阴虚 25 例,脾肾阳虚 20 例。平均年龄脾肾阴虚组 43.15 ± 19.16 岁,脾肾阳虚组 37.23 ± 15.14 岁,平均病程脾肾阴虚组 3.70 ± 4.85 年,脾肾阳虚组 3.46 ± 6.59 年。对照组 25 例。CAA 组疗前与正常组比较,年龄、性别差异无统计学意义。治疗组与对照组比较在年龄、病程上差异无统计学意义。两治疗组患者的年龄、性别、病程、血象、骨髓象组间比较差异无统计学意义,均具有可比性。(见表 1)

表 1 CAA 组与正常组血常规比较

证型	例数	WBC/ $(\times 10^9/\text{L})$	Hgb/ (g/L)	PLT/ $(\times 10^9/\text{L})$	NE/ $(\times 10^9/\text{L})$
CAA 组	70	$2.79 \pm 1.26^{***}$	$71.34 \pm 31.77^{***}$	$33.31 \pm 50.78^{***}$	$1.19 \pm 0.84^{***}$
正常组	25	6.18 ± 1.13	144.88 ± 10.75	216.60 ± 40.35	3.50 ± 0.88

注:与正常组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

2.2 不同分型 Th17, IL-6, IL-17 水平治疗前后比较

表 2 治疗前不同中医分型 Th17, IL-6, IL-17 比较

	例数	IL-6/ (pg/mL)	IL-17/ (pg/mL)	Th17/%
CAA	70	$48.45 \pm 21.67^{***}$	49.85 ± 19.08	$12.73 \pm 10.20^*$
正常组	25	31.11 ± 12.20	43.90 ± 17.95	7.40 ± 7.00

注:与正常组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

CAA 与正常组比较,IL-16, Th17 水平明显高于正常($P < 0.001$; $P < 0.05$), IL-17 水平与正常组差异无统计学意义。(见表 2)

2.3 不同分型 Th17, IL-6, IL-17 水平治疗前后比较

治疗组治疗前不同分型比较,IL-6 分泌水平,脾肾阴虚组明显高于脾肾阳虚组 ($P < 0.01$), IL-17, Th17 比例差异均无明显意义。治疗后,脾肾阳虚组

表 3 不同治疗方法分组后 Th17 及相关细胞因子水平比较

分组	分型	例数	治疗前后	IL-6/(pg/mL)	IL-17/(pg/mL)	Th17/%
中药+西药组	脾肾阳虚	20	治疗前	50.94±15.14	53.84±17.67	13.62±10.40
			治疗后	45.89±12.23*	48.34±14.32*	10.35±6.21*
	脾肾阴虚	25	治疗前	57.75±26.58 ^{△△}	47.90±21.09	12.25±10.52
			治疗后	50.21±23.90*	43.07±14.56	10.76±5.78
西药组	对照组	25	治疗前	37.17±15.21	48.60±18.34	12.50±10.10
			治疗后	35.24±14.76	42.56±12.89	8.25±4.53*

注:与治疗前比较 * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$;与脾肾阳虚组比较 $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ $\Delta\Delta\Delta P<0.001$

在 Th17, IL-6, IL-17 水平上均有明显下降 ($P<0.05$), 脾肾阴虚组在 IL-6 水平有明显下降 ($P<0.01$)。而对照组治疗后在 Th17 细胞水平上有明显下降 ($P<0.05$)。(见表 3)

3 讨论

Th17 细胞是以分泌白细胞介素-17 为主要特征的,该细胞具有独立分化和发育调节机制^[7],郭振兴等^[8]应用免疫磁珠分离正常人 CD4+T 细胞并培养。实验表明照射后 CAA 模型小鼠骨髓增生均低下,抗 IL-17 抗体可下调 Th1 细胞,抗 IL-17 抗体治疗后 Th17 比例明显下降,造血组织有恢复。推测 CAA 发病过程中^[9],Th17 及其相关细胞因子的存在重要的致病作用。IL-6 来自于单核-吞噬细胞,以及血管内皮细胞、成纤维细胞、角质细胞、淋巴细胞等细胞的分泌,其拥有广泛生物学活性,能够作用于机体应激过程的反应,自身免疫和肿瘤性疾病的发展过程,而且还参与造血细胞、免疫细胞增殖、分化的调控。并且对造血系统也有着显著的调节作用^[10]。IL-17 与受体结合使趋化因子,集落刺激因子和黏附分子等释放、表达,招募炎性细胞发挥其生物学功能,导致细胞浸润和组织破坏,引起免疫紊乱及相关疾病发生^[11]。IL-17 能维持 CD34+的造血祖细胞,并介导它们增殖分化为中性粒细胞;并促使纤维母细胞产生能影响造血的 IL-8, IL-6, 和 G-CSF 三种因子。这些研究结果均提示 IL-17 可能会在 T 细胞与造血系统的相互调控中起到的介导作用^[12]。

慢性再障中医属虚劳、血亡、血虚、血枯、髓枯等范畴。《素问·生气通天论篇》说:“肾髓坚固,气血皆从”。脾胃健运,则气血生化有源,肾精充足则髓有所养,造血机能正常。肾虚则无以生髓化血,导致

骨髓进行性造血功能紊乱或造血功能低下。脾肾亏损是导致气血不足、生血乏源的根本原因。有研究表明^[13-14],补肾中药能够刺激骨髓造血,并可提高机体免疫功能和应激能力,益气健脾药也有刺激造血功能的作用。健脾补肾以填髓生血,化生气血,是治疗再生障碍性贫血基本法则。由于 Th 细胞失衡在再障免疫发病中起关键作用,本科课题组既往已证实其在慢性再障中的对症候及血象的疗效明确,并证实 CAA 发病中存在 Th1/Th2 极化。

本研究结果显示,CAA 组 Th17 及其调节作用的细胞因子 IL-6 表达水平较正常明显升高,提示可能与 CAA 发病有关。脾肾阴虚与脾肾阳虚不同证型在 Th17 免疫紊乱上存在 IL-6 水平的差异,可能是其分型基础的又一研究切入点。经健脾补肾方治疗后与单用西药组相比,中药组 IL-6 有明显下降。提示健脾补肾方对细胞因子的改善作用存在。治疗后脾肾阳虚组在 Th17 表达水平及其相关细胞因子 IL-6, IL-17 水平上均有明显下降。但脾肾阴虚组仅在 IL-6 水平存在明显下降。而单用西药对照组 Th17 存在下降,提示健脾补肾方对 CAA 患者 Th17 失衡的改善作用可能存在于细胞因子层面。通过调整相关细胞因子水平主要是 IL-6, 减少 Th17 升高产生的对造血祖细胞或干细胞的破坏而导致的骨髓衰竭变化。当然中药方剂的疾病的治疗应多靶点。与疾病本身的发病环节及细胞微环境变化有关。需要进一步比较其他导致 Th17 升高的因子变化来联合印证健脾补肾方的在 Th17 免疫紊乱方面的疗效机制。

参考文献

- [1] Young N S. Hematopoietic cell destruction by immune

- mechanism in acquired aplastic anemia[J]. *Semin Hematol*, 2000;37(1):3-14.
- [2] Young N S, Calado R T, Scheinberg P et al. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. *Blood*, 2006;108(8):2509-2519.
- [3] Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4⁺ T cell repertoire: the Th17 lineage[J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18: 349-356.
- [4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 34.
- [5] 郑筱萸. 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: 178-179.
- [6] Shevach E M. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: More questions than all-answers[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(6): 389-400.
- [7] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517.
- [8] 郭振兴, 郑翠玲, 陈振萍, 等. 白介素 6 对人 Th17 细胞的免疫调节作用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(2): 496-498.
- [9] 尹晓晓, 刘传方, 李丽珍, 等. 再生障碍性贫血患者 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞及 Notch1 表达水平的变化[J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(5): 308-311.
- [10] Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease[J]. *Oral Dis*, 1998, 4(1): 43-7.
- [11] Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4⁺ T cell repertoire: the Th17 lineage [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18: 349-356.
- [12] Antonyamya MA, Fanslow WC, Fu F, et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection IL-17 promotes the function differentiation of dendritic cell progenitor[J]. *J Immunol*, 1999, 162 (1): 577-584.
- [13] 杨裕华, 李震. 补肾中药对肾虚动物模型神经内分泌免疫系统影响的实验研究进展[J]. *天津中医药*, 2007, 24(3): 262-264.
- [14] 项盈, 王金福. 中药对造血干/祖细胞扩增和分化的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(7): 666-669.
- (编辑: 迟越)

Effect of the Tonifying Sleep and Kidney Treatment Method on the Peripheral Levels of Th17 and Related Cytokine in Chronic Aplastic Anemia.

HU Ling-yan, ZHOU Yong-ming, CHEN Ying-kun, HU Ming-hui

(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of TCM, Shanghai 200437)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the significance of the tonifying sleep and kidney treatment in those patients with chronic aplastic anemia through the peripheral levels and clinical significance of Th17, IL-17, IL-6. **Methods** Collect 70 patients with CAA and divided them into the treatment group and control group. The treatment group was divided into PISHENYINXU group and PISHENYANGXU group and treated them with the tonifying sleep and kidney treatment. ELISA assay was used to determine the serum levels of IL-17, IL-6 of 70 patients with CAA and FCM was used to detect the Th17. **Results** The levels of Th17 and IL-17 in CAA were higher than those in normal group ($P < 0.05$). The levels of Th17 and the related cytokines in PISHENYANGXU group and the level of IL-6 in PISHENYINXU group declined. The level of Th17 in normal group declined ($P < 0.05$). **Conclusion** The tonifying sleep and kidney treatment method may have effect on Th17 and the related cytokines.

KEY WORDS: aplastic anemia; Th17; IL-6; IL-17; the tonifying sleep and kidney treatment method

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿

网址: <http://www.ynzyxyxb.cn>