

• 临床研究 •

复方参鹿颗粒调节相对低危骨髓增生异常综合征患者 TGF- β 1 介导的 Treg/Th17 细胞变化的临床研究^{*}

陆颖佳, 陈 珮, 邱仲川, 赵 琳, 胡晓莹, 朱小勤, 瞿玮颖, 封 舟, 黄中迪[△]
(上海中医药大学附属曙光医院血液科, 上海 200021)

摘要: **目的** 探讨复方参鹿颗粒对相对低危 MDS 患者治疗前后外周血 TGF- β 1、IL-2、IL-6、Treg 细胞、Th17 细胞、相关转录因子及比值的影响。**方法** 将 40 例相对低危 MDS 患者随机分成中药组和对照组, 中药组予复方参鹿颗粒联合西药治疗, 对照组单用西药治疗。2 组均 6 个月为 1 个疗程, 共治疗 1 个疗程, 观察外周血 TGF- β 1、IL-2、IL-6、Treg 细胞、Th17 细胞、相关转录因子及比值变化。**结果** 治疗后中药组 TGF- β 1、IL-2 表达上升, IL-6 表达下降; TGF- β 1、IL-2/IL-6 比率均高于对照组, IL-6 表达低于对照组, 均有明显差异($P<0.05$)。Treg 细胞表达、Treg/Th17 比值均高于对照组, 具有统计学意义($P<0.05$)。治疗后中药组 Foxp3 mRNA 表达、Foxp3/RoR γ t 比值检测均高于对照组, 有明显差异($P<0.05$)。**结论** 复方参鹿颗粒可以改善相对低危 MDS 患者 TGF- β 1、IL-6、IL-2/IL-6 比率、Treg 细胞、Treg/Th17 比率。提示复方参鹿颗粒改善相对低危 MDS 患者的造血功能可能通过调整 TGF- β 1、IL-2/IL-6 来调控 Treg/Th17 比率, 进一步改善 T 细胞免疫功能有关。

关键词: 骨髓增生异常综合征; 复方参鹿颗粒; TGF- β 1; IL-2; IL-6; Treg 细胞

中图分类号: R259

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)01-0033-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.01.007

Clinic Observation on Effect of Fufang Shenlu Granule on Treg/Th17 Cells and Related Transcription Factors of the Patients with Lower Risk Myelodysplastic Syndromes by Regulating TGF- β 1

LU Yingjia, CHEN Pei, QIU Zhongchuan, ZHAO Lin, HU Xiaoying, ZHU Xiaoqin,
QU Weiying, FENG Zhou, HUANG Zhongdi

(Shuguang Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the Effect of Fufang Shenlu Granule on TGF- β 1, IL-2, IL-6, Treg cells, Th17 cells and related transcription factors of the patients with lower risk myelodysplastic syndromes. **Methods** 40 patients with lower-risk MDS were randomly divided into treatment group and controlled group. Treatment group was treated with Fufang Shenlu Granule combined with conventional medicine therapy, while the control group was only treated with conventional medicine therapy. Two groups were treated with one course (one course is 6 months). We examined TGF- β 1, IL-2, IL-6, Treg cells, Th17 cells, related transcription factors and related ratio after treatment. **Results** After treatment, TGF- β 1, IL-2/IL-6, Treg cells and Treg/Th17 cells, Foxp3 mRNA and the ratio of peripheral blood Foxp3/RoR γ t mRNA of treatment group were higher than those of controlled group ($P<0.05$). IL-6 was lower than controlled group ($P<0.05$). **Conclusion** Fufang Shenlu Granule can abjust Treg cells, the balance of Treg/Th17 cells and Foxp3 mRNA and Foxp3/RoR γ t mRNA the patients with lower risk myelodysplastic syndromes by TGF- β 1, IL-6, and IL-2/IL-6. The mechanism on the treatment efficiency of Fufang Shenlu Granule is associated with Immune dysregulation.

KEY WORDS: myelodysplastic syndromes; Fufang Shenlu Granule; TGF- β 1; IL-2; IL-6; Treg cells

收稿日期: 2018-12-18

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助(81403233);上海市卫生和计划生育委员会中医药科研专项课题(2016LP045)

第一作者简介: 陆颖佳(1986-),女,硕士,主治医师,主要从事中医血液病的临床和科研工作。

[△]通信作者: 黄中迪, E-mail: doczdh@qq.com

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 是起源于造血干细胞的一组异质性髓系克隆性疾病,特点是髓系细胞发育异常,表现为无效造血、难治性血细胞减少,高风险向急性髓系白血病转化^[1]。相对低危 MDS 是其中向白血病转化的概率相对较低的部分患者,预后相对较好,主要表现为无效造血、难治性血细胞减少,目前此类患者无针对性治疗,以支持治疗、免疫调节、免疫抑制为主。研究发现 Th17 细胞(T helper cell 17, Th17)的增高、Treg 细胞(T regulatory cells, Treg)的降低,及其比率的异常导致低危 MDS 患者的自身免疫异常,导致血细胞降低^[2-4]。TGF- β 是一种转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β),对 Th17 细胞、Treg 细胞有调控作用。TGF- β 1 是 TGF- β 家族中的一个亚型,其与免疫系统相关,与 Treg 细胞扩增有关,也是研究造血系统 TGF- β 的主要对象。研究显示 IL-6 和 TGF- β 1 可以活化 Th17 细胞^[5], IL-2 和 TGF- β 1 可增强维持 Treg 细胞^[6]。我院自制制剂复方参鹿颗粒可以提高 MDS 患者红细胞数量及血红蛋白含量,并可提高患者的 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值、NK 数值,使 CD8⁺ 数值下降^[7]。为进一步了解复方参鹿颗粒对相对低危 MDS 患者细胞免疫的影响,本研究检测复方参鹿颗粒治疗相对低危 MDS 患者治疗前后 TGF- β 1、IL-2、IL-6、Treg 细胞、Th17 细胞、Foxp3mRNA、ROR γ tmRNA 水平及相关比值,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选取均来自上海中医药大学附属曙光医院血液科于 2016 年 5 月-2018 年 6 月间住院收治者的骨髓增生异常综合征属相对低危患者 40 例,其中男性 18 例,女性 22 例,中位数年龄 43 岁(19~75 岁)。随机分为 2 组,中药组 20 例,对照组 20 例。中药组中男性 10 例,女性 10 例,中位数年龄 45 岁(19~75 岁);对照组男性 8 例,女性 12 例,中位数年龄 42 岁(23~68 岁),初发血象 2 组患者性别、年龄均无明显差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 纳入及排除标准 纳入标准:所有病例诊断均符合国内 MDS 诊断标准^[1],并按照 IPSS 积分标准分期,符合相对低危 MDS (包括 IPSS 评分的低危、中危-1),无严重心肺疾病及肝肾功能损害而能配合口服中药制剂者皆为纳入病例。中医辨证标准:中医肾

阳虚证标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[8]中肾阳虚证的诊断标准制定。排除标准:①继发性 MDS 及 MDS 合并有其它血液病或恶性肿瘤者;②有严重心肺疾病及肝肾功能损害者;③未按规定用药、无法判定疗效者。

1.3 治疗方法 对照组服用环孢霉素 A (杭州中美华东制药有限公司,批号 120932),3~6 mg/(kg·d),分早晚 2 次口服,血药浓度维持在 100~300 ng/L。中药组同时加用予复方参鹿颗粒(药用红参须、熟附子、肉桂、鹿角片、炙龟板、菟丝子等,本院院内制剂,沪药制 Z06100005,参照《中华人民共和国药典》2000 版的要求制成冲剂,每包 12 g,批号 20120302),剂量:成人每次服用 1 包,3 次/d,2 组治疗均以 6 个月为 1 个疗程,共 1 个疗程。必要时予输血支持治疗;感染者予抗感染治疗。本试验经过我院伦理委员会批准,并取得所有研究对象的知情同意。

1.4 检测方法

1.4.1 外周血 Treg 细胞检测 分别于治疗前后采集外周血,应用荧光免疫直接标记法及 FCM 检测外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞。加入 CD4-FITC、CD25-PE、CD127-PE 各 20 μ L,振荡混匀,室温避光孵育 20 min 后,每管各加入 250 μ L 的 Cytotfix/Cytoperm 液,室温避光 20 min,380 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 液 1 mL,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 PBS 液 1 mL 混匀后,应用 FAC-Station 流式细胞仪对每管标本采集个细胞进行分析,使用美国 BD 公司的 Celquest 软件,以 CD4⁺细胞设门来分析 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞所占的百分比。

1.4.2 外周血 Th17 细胞检测 分别于治疗前后采集外周血,调节细胞浓度为 2×10^6 细胞/mL。加入 CD3-PerCP、CD4-PE-cy7 各 20 μ L,混匀,室温避光孵育 15~20 min。加入 Cytotfix/Cytoperm 液 250 μ L,室温放置 20 min。加入 Perm/Wash 液 1 mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,清洗 2 次,用 50 μ L Perm/Wash 液重悬 A、B 管。实验管 A 中加入 BD IL-17A-PE 20 μ L,避光孵育 30 min。加入 Perm/Wash 液 1 mL 洗涤 2 次。最后以 300 μ L Staining Buffer 染色缓冲液重悬细胞。采用 Cellquest 软件获取分析细胞。以前向角(FSC)和侧向角(SSC)散射光散点图设门区分淋巴细胞,以 CD3 和 CD4 散点图设门区分 Th 细胞(CD3⁺

CD8⁺)。以 IL-17A 的曲线图表示 Th17 细胞,计算 IL-17A+Th17 细胞在 CD3⁺CD8⁺T 细胞中的比率。

1.4.3 外周血 Foxp3 mRNA、RORγt mRNA 检测 提取 TotalRNA 后,逆转录后,进行荧光定量 PCR,反应条件:95 ℃ 30 sec 1 个循环、95 ℃ 5 sec,60 ℃ 34 sec 持续共 40 个循环→95 ℃ 15 sec,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 sec。最后读取目的基因与内参基因 CT 值,计算 2^{-ΔCT} 值统计。各基因引物序列如下:

RORγt F:5'-CTGCAAGACTCATCGCCAAAAG-3';
RORγt R:5'-TTTCCACATGCTGGCTACACA-3';
Foxp3 F:5'GGGTAGCCATGGAAACAGCA-3';
Foxp3 R:5'TCGCATGTTGTGGAAGTGAAGTAG-3';
β-actin F:5'AAGGTGACAGCAGTCGGTT-3';
β-actin R:5'TGTGTGGACTTGGGAGAGG-3';

1.4.4 外周血 TGF-β1、IL-2、IL-6 检测 TGF-β1、IL-2、IL-6 均用 ELISA 双抗体夹心法检测,具体操作

按照试剂盒提供的说明书进行。

1.5 统计方法 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计学分析,符合正态分布和方差齐性的计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布的计量资料采用中位数表示。计量资料采用 t 检验;不符合正态分布的计量资料和计数资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 Treg 细胞表达、Th17 细胞表达,Treg/Th17 比值比较 中药组治疗前后 Treg 细胞表达、Treg/Th17 比值低均有明显差异($P < 0.05$),对照组治疗前后无明显差异($P > 0.05$)。治疗前中药组与对照组的 Th17 表达、Treg 表达,Treg/Th17 比值均无明显差异($P > 0.05$);治疗后中药组 Th17 细胞无明显差异($P > 0.05$),Treg 细胞表达与 Treg/Th17 比值均高于对照组,组间比较有明显差异($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 组治疗前后 Treg 细胞表达、Th17 细胞表达变化,Treg/Th17 比值变化比较

组别	n		Treg 细胞/%	Th17 细胞/%	Treg/Th17
中药组	20	治疗前	2.52±1.45	3.51±1.46	0.68±0.16
		治疗后	3.59±1.59 ^{△▲}	2.31±0.84	1.71±1.06 ^{△△▲}
对照组	20	治疗前	2.25±1.48	3.30±1.59	0.64±0.19
		治疗后	2.90±1.63	2.32±1.18	1.33±0.76 ^{△△}

注:与治疗前比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与对照组比较,[▲] $P < 0.05$

2.2 外周血 RORγt、Foxp3mRNA 表达、Foxp3/RoRγt mRNA 比值比较 中药组治疗后 RORγt mRNA 表达上升,无明显差异($P > 0.05$)、Foxp3mRNA 表达、Foxp3/RoRγt 比值检测均有所提升,较治疗前有明显差异($P < 0.05$);对照组治疗后 RORγt mRNA 表达、Foxp3mRNA 表达、Foxp3/RoRγt 比值

检测较治疗前有所上升,无明显差异($P > 0.05$)。治疗前中药组与对照组的 Foxp3mRNA、RORγt mRNA 表达、Foxp3/RoRγt 比值无明显差异($P > 0.05$);但治疗后中药组 Foxp3mRNA 表达、Foxp3/RoRγt 比值检测均高于对照组,组间比较有差异($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 治疗前后 RORγt、Foxp3mRNA 表达、Foxp3/RoRγT 比值变化

组别	n		RORγt mRNA (E-4)	Foxp3mRNA (E-4)	Foxp3/ RORγt
中药组	20	治疗前	3.97±2.66	23.00±14.10	5.89±5.28
		治疗后	5.31±4.56 [△]	31.86±11.62 ^{△▲}	6.58±4.59 ^{△▲}
对照组	220	治疗前	4.47±3.56	25.54±22.79	5.61±3.71
		治疗后	5.08±5.84	28.43±21.35	5.71±2.65

注:与治疗前比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与对照组比较,[▲] $P < 0.05$

2.3 外周血 TGF-β1、IL-2、IL-6 及 IL-2/IL-6 比值检测结果比较 组内治疗前后比较:中药组治疗后 IL-2 表达上升,无明显差异($P > 0.05$);IL-6 表达下降,较治疗前有明显差异($P < 0.05$);TGF-β1、IL-2/

IL-6 比值上升,较治疗前有明显差异($P < 0.05$)。对照组治疗后 TGF-β1、IL-2 表达与治疗前比较有所上升,但无明显差异($P > 0.05$),IL-6 比值检测较治疗前有所下降,无明显差异($P > 0.05$);IL-2/IL-6 比

有研究认为,TGF- β 1 是一个骨髓抑制的细胞因子,TGF- β 1 血浆水平在 MDS 患者中增高,与其造血抑制有关^[21],TGF- β 1 与 IL-6 促进 Th17 细胞分化^[5],IL-6 减少 Foxp3^[22],MDS 患者中 IL-6 亦增加^[23],TGF- β 1 的抑制造血作用是否与 IL-6 增加,导致 Treg 细胞降低有关。而我们在复方参鹿颗粒治疗随访中并未出现与其治疗相关的血象恶化或向高危发展的倾向,而 TGF- β 1 在体内抑制骨髓和促进 Treg 细胞分化启动的有效浓度折点是多少,其与 MDS 恶性克隆基因是否存在相关性均有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征诊断与治疗中国专家共识 (2014 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2014,35(11):1042-1048.
- [2] KORDASTI S Y, INGRAM W, HAYDEN J, et al. CD4+ CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome(MDS)[J]. Blood, 2007, 110(3):847-850.
- [3] SHAO L L, ZHANG L, HOU Y, et al. Th22 cells as well as Th17 cells expand differentially in patients with early-stage and late-stage myelodysplastic syndrome [J]. PLoS ONE, 2012, 7(12):e51339.
- [4] KORDASTI S Y, AFZALI B, LIM Z, et al. IL-17 producing CD4 (+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome[J]. Br J Haematol, 2009, 145(1):64-72.
- [5] ZHANG S. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation [J]. Immunology, 2018, 155(1): 24-35.
- [6] HORWITZ D A, ZHENG S G, Gray J D. The role of the combination of IL-2 and TGF- β or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets[J]. J Leukoc Biol, 2003, 74(4):471-478.
- [7] 黄中迪,邱仲川,陈珮,等. 复方参鹿颗粒治疗骨髓增生异常综合征的临床观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(6): 865-866.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1995:178.
- [9] GARCIA M G, SHAN J, FADERL S, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome[J]. Leukemia, 2007, 22(3):538-543.
- [10] OLIVA E N, FINELLI C, SANTINI V, et al. Quality of life and physicians perception in myelodysplastic syndromes[J]. Am J Blood Res, 2012, 2(2):136-147.
- [11] LUCIONI C, FINELLI C, MAZZI S, et al. Costs and quality of life in patients with myelodysplastic syndromes [J]. Am J Blood Res, 2013, 3(3):246-259.
- [12] 黄中迪,邱仲川,陈珮,等. 中医药分期治疗 MDS 临证新得[J]. 中医文献杂志, 2007, 25(3):33-35.
- [13] KOTSIANIDIS I, BOUCHLIOU I, NAKOU E, et al. Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes(MDS)[J]. Leukemia, 2009, 23(3):510-518.
- [14] ZHANG Z, LI X, GUO J, et al. Interleukin-17 enhances the production of interferon- γ and tumour necrosis factor- α by bone marrow T lymphocytes from patients with lower risk myelodysplastic syndromes [J]. Eur J Haematol, 2013, 90(5):375-384.
- [15] ALFINITO F, SICA M, LUCIANO L, et al. Immune dysregulation and dyserythropoiesis in the myelodysplastic syndromes[J]. Br J Haematol, 2009, 148(1):90-98.
- [16] ZHAO Z G, WEN X, YU H P, et al. Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes [J]. Cancer Lett, 2012, 317(2):136-143.
- [17] 古学奎,赵珍品. 骨髓增生异常综合征患者血清 IL-2 和 SIL-2R 活性检测[J]. 广东医学, 2002, 23(4):392-393.
- [18] MAILLOUX A W, SUGIMORI C, KOMROKJI R S, et al. Expansion of effector memory regulatory T cells represents a novel prognostic factor in lower risk myelodysplastic syndrome [J]. J Immunol, 2012, 189 (6):3198-3208.
- [19] KAHN J D, CHAMULEAU M E, WESTERS T M, et al. Regulatory T cells and progenitor B cells are independent prognostic predictors in lower risk myelodysplastic syndromes[J]. Haematologica, 2015, 100(6):e220-e222.
- [20] FOZZA C, LONGU F, CONTINI S, et al. Patients with early-stage myelodysplastic syndromes show increased frequency of CD4+ CD25+ CD127 (low) regulatory T cells [J]. Acta Haematologica, 2012, 128(3):178-182.
- [21] BHAGAT T D, ZHOU L, SOKOL L, et al. MiR-21 mediates hematopoietic suppression in MDS by activating TGF- β signaling[J]. Blood, 2013, 121(15):2875-2881.
- [22] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature (London), 2006, 441(7090):235-238.
- [23] WANG J, XIAO Z. Mesenchymal stem cells in pathogenesis of myelodysplastic syndromes [J]. Stem Cell Investig, 2014(1):16.