再生障碍性贫血治疗前后的造血调控因子变化※

□ 谢文光[1*]　邓成珊[2]　魏钰书[1]

（1. 川北医学院附属医院　南充　637000　2. 中国中医研究院西苑医院　北京　100091）

摘　要　目的：研究环孢菌素 A 配合大菟丝子饮治疗再生障碍性贫血（AA）的造血调控因子变化。方法：收集治疗前后 AA 患者的血浆样本，分别用夹心酶联免疫吸附法测定 IL-3、IL-8、SCF、IFN-γ及 TNF-α含量。结果：治疗后血红蛋白明显升高（$t = 2.4485$，$P < 0.05$）；白细胞及血小板恢复较慢，治疗前后未见明显差异。治疗前的 IL-8、IFN-γ均极显著高于正常对照（$t' = 7.6430$，$P < 0.01$；$t' = 3.2459$，$P < 0.01$），TNF-α也明显升高（$t' = 2.6106$，$P < 0.05$）；治疗后的 IL-8 明显低于治疗前（$t = 2.1081$，$P < 0.05$），但治疗后仍显著高于正常对照（$t' = 3.0605$，$P < 0.05$）。患者入院时血浆 IL-3 有不同程度的升高，经治疗后有下降趋势，但与正常对照组相比均未见显著性差别，所有患者在整个病程中，血浆 SCF 浓度无明显变化。结论：本研究结果表明 IL-8、TNF-α和 IFN-γ参与 AA 的发生、发展，提示 AA 时造血正调控因子可能并不低下，而造血抑制因子在 AA 的发病机制中有重要作用，免疫系统调节功能紊乱可能是导致 AA 的根本原因。

关键词　再生障碍性贫血　治疗　造血调控因子

再生障碍性贫血（Aplastic Anemia，AA），是由多种因素引起的骨髓造血干细胞、造血微环境及机体免疫调节成分改变，导致骨髓造血干细胞减少、造血功能衰竭，出现以全血细胞减少、以进行性贫血、出血、反复感染为主要临床表现的综合症。

中医学中原无 AA 的诊断及相应的病名。根据 AA 的临床特点，多将其归为“急劳”、“热劳”、“血证”、“虚劳”或“血虚”等范畴。随着中医学理论和实践的不断深入，认识到 AA 的髓亏是本，血虚是标，出血与反复感染是正气亏虚后的继发改变，单以“血虚”、“血证”诊断不能概括髓亏这一本质改变，而以“虚（髓）劳”诊断则既可反映血虚、气虚血溢，又能提示“精极”、“骨（髓）极”的本质。

中国中医研究院西苑医院血液科根据中医学“肾为先天之本”、“肾主骨主髓”的理论，在治疗 AA 时拟订了以滋补肾阴为主的大菟丝子饮[1]。本文报告用环孢菌素 A 配合大菟丝子饮治疗再生障碍性贫血的造

※基金项目　四川省教委自然科学青年基金（NO：164-06）。

*作者简介　谢文光，男，副教授。主要从事中医、中西医结合临床免疫学研究工作。。

万方数据

血调控因子变化。

1 材料与方法

1.1 *研究对象* 经血常规、生化及骨髓细胞学检查，符合1987年第四届全国再障贫血学术会议修订的AA诊断标准[2]的11例全血细胞减少患者。其中慢性AA 8例，急性AA 3例；年龄为15~39岁，病程为1月~10年，入院前均用过康力龙等治疗无明显疗效。入院时血常规：血红蛋白40~68g/L、白细胞1.4 ~ 3.5 ×109/L、血小板5~19×109/L、网织红细胞0.1 ~ 1.0%。

1.2 *治疗方法*

1.2.1 中药以大菟丝子饮为基本方 菟丝子15g、何首乌15g、山萸肉15g、旱莲草15g、女贞子15g、枸杞子15g、补骨脂12g、熟地12g、肉苁蓉10g、桑椹子15g。

1.2.2 随证加用活血、祛湿、解毒、健脾之药 针对贫血、出血、感染的程度进行相应的治疗。

1.2.3 环孢菌素A5 mg. $kg^{-1.}d^{-1}$，分2~3次口服，或环孢菌素A250mg加入0. 9%生理盐水中静脉点滴日一次。

1.3 *实验材料* 11例AA患者入院时及治疗3个月后分别抽取新鲜血液5 ml，EDTA抗凝，1 500 r/min离心15 min后取血浆，无菌分装，置-20℃冷冻待用。15例体检合格的成人外周血为正常对照。

1.4 *实验方法* IL-3、IL-8、SCF、IFN-γ及TNF-α检测ELISA法试剂盒均购自晶美生物工程有限公司。各因子的检测均按试剂盒说明书操作，主要步骤为：将标本和已稀释的不同浓度的标准品各100μl至相应各孔，混匀后37℃孵育90 min后洗板。加生物素标记二抗100μl，37℃孵育60min后洗板，加酶联物100μl，37℃孵育20min后洗板，加底物100μl，避光37℃孵育15min，加终止液50μl，用酶标仪测定450nm的OD值，根据标准品测得的OD值绘制标准曲线。实验中设空白对照孔。

2 结 果

2.1 *治疗效果* 用大菟丝子饮为基本方治疗AA患者未见明显的不良反应。有3例患者开始用环孢菌素A时主诉胸闷、头晕，7例患者出现恶心、呕吐等胃肠道反应，给予吗叮啉等处理后症状消失。经3个月治疗2例基本缓解，6例明显进步。

2.2 *患者治疗前后血象变化* 患者入院时及治疗3个月时的外周血象见表1。经统计分析，治疗后血红蛋白明显升高（$t = 2.4485$，$P < 0.05$）。白细胞及血小板恢复较慢，治疗前后未见明显差异。

表1 治疗前后外周血象变化比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	血红蛋白(g/L)	白细胞(×10^9/L)	血小板(×10^9/L)
治疗前	11	55.1±17.6	2.8±3.9	10.3±2.3
治疗后	11	73.8±16.2※	3.1±0.7	10.4±4.0

注:与治疗前比较，* $P < 0.05$

2.3 *患者治疗前后造血调控因子变化* 患者入院时及治疗3个月时的血浆IL-3、IL-8、IFN-γ、TNF-α及SCF浓度变化见表2。经统计学分析，治疗前的IL-8、IFN-γ均极显著高于正常对照（$t' = 7.6430$，$P < 0.01$；$t' = 3.2459$，$P < 0.01$），TNF-α也明显升高（$t' = 2.6106$，$P < 0.05$）；治疗后的IL-8明显低于治疗前（$t = 2.1081$，$P < 0.05$），但治疗后仍显著高于正常对照（$t' = 3.0605$，$P < 0.05$）。治疗前后IL-3及SCF均未见明显变化，与正常对照均无显著性差异。治疗后IFN-γ及TNF-α与正常对照均无显著性差异。

表2 治疗前后血浆IL-3、IL-8、IFN-γ、TNF-α及SCF浓度变化（$\bar{x} \pm s$,pg/ml）

	n	IL-3	IL-8	IFN-γ	TNF-α	SCF
Pretreatment	11	530.9±318.4	63.8±22.0**	48.6±34.9**	35.0±29.1*	987.1±298.9
Posttreatment	11	390.3±288.3	40.0±30.3*Δ	31.9±26.8	21.0±20.2	992.8±311.4
Control	15	466.2±285.6	11.6±6.3	14.1±5.8	11.6±7.1	1050.4±350.8

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$；与治疗前比较，Δ$P < 0.05$。

3 讨 论

3.1 *造血抑制因子在AA的发病过程中有重要作用*

IL-3主要由抗原或丝裂原刺激的T细胞合成分泌，是具有多种生物功能的造血调控因子，主要作用于

万方数据

早、中期造血干/祖细胞的增殖和分化[3]，本组AA患者入院时血浆IL-3有不同程度的升高，经治疗后有下降趋势，但与正常对照组相比均未见显著性差别$P>0.05$)。有意义的是所有患者在整个病程中，血浆SCF浓度无明显变化，Kojima等曾有同样的报道[4]。这提示发生AA时造血正调控因子可能并不低下。

已有研究表明，IL-8、IFN-γ和TNF-α是造血抑制因子。IL-8由单核/巨噬细胞、上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞等多种来源的细胞在IL-1（α、β)、TNFα和LPS等刺激后合成分泌，能趋化中性粒细胞和T淋巴细胞向炎症部位集中，体外可显著抑制早期髓系祖细胞形成，其抑制效应与剂量相关，低浓度时与其它细胞因子如血小板因子-4、巨噬细胞炎性蛋白-1α及单核细胞活化因子等协同抑制CFU-GEMM和CFU-E的形成[5,6]，机体在正常情况下含量很少，而当机体存在炎症病变时，可刺激单核细胞、内皮细胞等分泌IL-8增加。TNF-α主要由巨噬细胞合成分泌，IFN-γ主要由T细胞合成分泌，可阻止细胞周期的进行和促进$CD34^+$细胞的凋亡。正常的$CD34^+$细胞几乎没有Fas抗原的表达，IFN-γ和TNF-α等可通过提高Fas抗原的表达而介导靶细胞的凋亡[7]，AA患者中存在着大量被激活的$CD8^+$T淋巴细胞及其产生的IFN-γ和LT，可以直接诱发造血干细胞的凋亡[8]；在AA患者中，高表达的IFN-γ和TNF-α等造血抑制因子，能够在许多细胞系中诱导一氧化氮聚合酶（NOS2）的合成[9]，NOS2一经合成便可持续催化产生大量的一氧化氮（NO)，从而造成细胞毒性反应，诱发许多细胞的凋亡。我们的测定结果表明，与正常对照比较，治疗前的AA患者血浆IL-8、IFN-γ均极显著升高，TNF-α也明显升高。治疗后的IL-8明显低于治疗前，但治疗后仍显著高于正常对照。说明造血抑制因子在AA的发病过程中有重要作用，多种因子参与了整个疾病的发生和发展过程。

3.2　*免疫系统调节功能紊乱可能是AA发病的实质*　当病毒、射线或药物作用于骨髓造血干细胞造成潜在的病变后，人体免疫系统必然要对这些病变的骨髓细胞作出反应，力求加以清除，以维护人体自身的稳定。AA患者的临床表现和疾病的进程与机体的免疫反应的强弱有关。如果过强，就会发生急性重症再障，反之，就会出现慢性或不典型再障。本文用环孢菌素A配合大菟丝子饮对11例再生障碍性贫血患者治疗3个月后血红蛋白明显升高，但白细胞及血小板恢复较慢，治疗3个月未见明显差异。可能是用环孢菌素A之类的免疫抑制剂对AA患者的治疗只是缓解了机体的免疫反应，改变了AA患者的临床表现和进程，但不能完全恢复AA患者的骨髓造血功能，也不能彻底治疗AA。各种原因引发的免疫系统调节功能紊乱，过度表达的造血抑制因子通过Fas和NO等介导造血干细胞凋亡，可能是AA发病的实质。所以在临床治疗中，对AA的治疗如何使用免疫调节剂值得进一步深入研究。

参考文献

[1] 中医研究院西苑医院内科血液病组. 中西医结合治疗慢性再生障碍性贫血的初步探讨. 中华医学杂志，1975；10：708-11.

[2] 杨崇礼. 再生障碍性贫血. 见：张之南，沈悌，主编. 血液病诊断及疗效标准. 第2版. 北京：科学出版社，1998，33-38.

[3] Ganser A，Lindemann A，Seipelt G et al. Effects fo recombinant human interluekin-3 in patitnes with bone marrow failure. Blood，1990；76：666-76.

[4] Kojima S，Matsuyama T，Kodera Y. Plasma levels and production of soluble stem cell factor by marrow stromal cells in patients with aplastic anaemia. Br J Haematol，1997；99：440-6.

[5] Krishnaswamy G，Kelley J，Yerra L et al. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines：molecular regulation and possible role in human disease. J Interferon Cytokine Res，1999；19：91-104.

[6] Cluitmans F H，Esendam B H，Veenhof W F et al. The role of cytokines and hematopoietic growth factors in the autocrine/paracrine regulation of inducible hematopoiesis. Ann Hematol，1997；75：27-31.

[7] Maciejewski J，Selleri C，Yong NS，et al. Fas antigen expression on CD34+human marrow cell is induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha and potentiates hematopoietic suppression in vitro. Blood，1995；85：3183-3190.

[8] Huichi H，Wenhui T，Lingyang CH，et al. Production of hematopoietic regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells in patients with aplastic anemia. Exp Hematol，1996；24：31-37.

[9] Michael E，Shapiro RA，Nussler AK，et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase（NOS2）gene by cytokines：initial analysis of the human NOS2 promoter. Proc Nat l Acad Sci USA，1996；93：1054-1059.

万方数据