

生血合剂对慢性再生障碍性贫血患者 T-bet/GATA-3、相关信号分子、细胞因子表达及 Th₁/Th₂ 的影响

李峻¹ 周永明² 胡明辉² 孙伟玲² 薛志忠³

摘要 目的 研究转录因子 T-bet (T-box expressed in T cells)、GATA-3 (GATA binding protein3) 及相关信号通路在慢性再生障碍性贫血 (chronic aplastic anemia, CAA) 免疫发病中的作用, 从辅助性 T (helper T, Th) 细胞失衡、转录因子及相关信号通路水平探讨生血合剂治疗 CAA 的免疫调控机制。方法 40 例 CAA 患者均来自上海中医药大学附属岳阳医院, 随机分为治疗组 20 例和对照组 20 例, 选取体检健康者 20 名为正常组。治疗组患者辨证分为脾肾阳虚型和脾肾阴虚型, 脾肾阳虚型患者服用生血合剂 1 号, 脾肾阴虚型患者服用生血合剂 2 号, 对照组服用环孢菌素 A (CsA), 采用实时荧光定量 PCR (Realtime FQ-PCR) 检测 CAA 患者治疗前后外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、T-bet、GATA-3 及信号转导子及转录激活因子 4 (signal transducer and activator of transcription 4, STAT4)、STAT6 mRNA 表达, 采用流式细胞术、酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 CAA 患者治疗前后 PBMC Th₁、Th₂ 比例及 PBMC 培养上清 IFN- γ 、IL-12、IL-4 水平。结果 CAA 患者 PBMC T-bet、STAT4 mRNA 表达、T-bet/GATA-3 比值、Th₁ 比例、Th₁/Th₂ 比值、PBMC 培养上清 IFN- γ 、IL-12 表达均明显高于正常组 ($P < 0.01$), 采用生血合剂或 CsA 治疗后, 患者 T-bet、STAT4 表达、T-bet/GATA-3 比值、Th₁ 比例、IFN- γ 、IL-12 表达均有所下降 ($P < 0.01$), 但 T-bet、STAT4、T-bet/GATA-3 比值、Th₁ 比例、IFN- γ 表达仍未达到正常水平, 治疗组与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 GATA-3、STAT6 mRNA 表达、Th₂ 比例、IL-4 表达治疗前后与正常组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 IFN- γ /T-bet、IL-12/STAT4 通路的异常活化, 及 Th₁/Th₂ 平衡向 Th₁ 型偏移, 在 CAA 免疫异常的发病过程中起关键的作用。生血合剂和 CsA 能通过下调 IFN- γ /T-bet、IL-12/STAT4 通路的异常活化, 并纠正 Th₁ 过度极化, 从而减轻 CAA 异常亢进的细胞免疫, 解除造血抑制。

关键词 慢性再生障碍性贫血; 表达于 T 细胞的 T 盒转录因子; 信号传导和转录激活因子 4; 1 型辅助性 T 细胞/2 型辅助性 T 细胞失衡; 生血合剂

Influence of Shengxue Mixture on the Expression of T-bet/GATA-3, Their Relevant Signal Transduction Molecules, Cytokines, and Th₁/Th₂ Balance in Patients with Chronic Aplastic Anemia LI Jun, ZHOU Yong-ming, HU Ming-hui, et al *Department of Hematology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029)*

ABSTRACT **Objective** To study the actions of transcription factors, T-bet and GATA-3, and their relevant signal transduction pathways on the immune-related pathogenesis with chronic aplastic anemia (CAA), and to investigate the immunological regulation mechanism of Shengxue Mixture (SXM) in regulating levels of Th cell imbalance, transcriptional factor and relevant signal pathways. **Methods** All CAA patients selected from Yueyang Hospital of Shanghai University of traditional Chinese medicine were equally randomized into the treated group and the control group, 20 patients in each group, and 20 healthy persons were selected as normal group, the former was treated with SXM according to patients' syndrome patterns, namely, SXM-1 was given to patients of Pi-Shen yang-deficiency pattern, and SXM-2 to those of Pi-Shen yin-deficiency pattern. Patients in the control group were treated with cyclosporin A (CsA). The mRNA expressions of T-bet, GATA-3, signal transducers and activators of transcription 4 (STAT4) and 6 (STAT6) in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of patients

基金项目:上海市教委科研基金资助项目(No.07cx031);上海市卫生局科研基金资助项目(No.2007Y64)

作者单位:1. 江苏省中医院(南京中医药大学附属医院)血液科;2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院血液科;3. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院检验科

通讯作者:周永明, Tel:13701876136, E-mail:yongmingz@sohu.com

were determined using real-time fluorescent quantitation polymerase chain reaction before and after treatment, meantime, the Th₁/Th₂ proportion in peripheral blood, and levels of IFN- γ , IL-12 and IL-4 in PBMNC-cultured supernatant were detected by flow cytometry and enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The mRNA expressions of PBMNC T-bet and STAT4, ratios of T-bet/GATA-3, Th₁ proportion and Th₁/Th₂ ratio, levels of IFN- γ and IL-12 in PBMNC-cultured supernatant were all significantly higher in CAA patients than in healthy controls ($P < 0.01$), which were lowered after treatment but didn't reach the normal range (all $P < 0.01$), excepting for IL-12 level. Comparisons of the changes between the two treated groups showed insignificant difference ($P > 0.05$). While the difference between patients and healthy persons in terms of GATA-3, STAT6, Th₂ proportion, and IL-4 were insignificant ($P > 0.05$), either before or after treatment. **Conclusions** Abnormal activation of IFN- γ /T-bet and IL-12/STAT4 pathways, as well as Th₁/Th₂ balance deviating to Th₁ excursion play vital roles in the immunological pathogenesis of CAA. SXM and CsA could lower the aforesaid abnormal activation and correct Th₁ hyper-polarization, so as to alleviate the over-activated cell-mediated immunity to eliminate hematopoietic depression in CAA patients.

KEYWORDS chronic aplastic anemia; T-bet; signal transducers and activators of transcription 4; disequilibrium of Th₁/Th₂; Shengxue Mixture

慢性再生障碍性贫血 (chronic aplastic anemia, CAA) 是一组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。现已公认, CAA 患者免疫功能异常, 尤其是 T 细胞免疫功能异常在其发病过程中起重要作用。进一步体内外实验研究证实, Th₁、Th₂ 细胞失衡在 CAA 的免疫异常发生中起到关键的作用。免疫学基础研究表明, Th₁/Th₂ 分化和偏移受多种因素影响, 其中以局部微环境的调节尤为重要, T-bet (T-box expressed in T cells) 和 GATA-3 (GATA binding protein3) 作为特异性 Th 细胞转录因子, 在 Th 细胞分化发育中发挥重要的作用^[1]。近年来研究表明, CAA 患者存在 T-bet 的过度表达, 且和患者的免疫异常、疾病活动性相关^[2]。生血合剂是上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院血液科周永明教授根据“虚劳”、“血证”、“虚久必瘀”及“久病入络”的中医理论, 结合临床经验制定的具有健脾补肾活血作用的中药复方制剂, 多年来临床研究证实治疗 CAA 有效^[3]。本研究拟从转录因子 T-bet、GATA-3 及 IFN- γ /T-bet、IL-12/信号转导子及转录激活因子 4 (signal transducer and activator of transcription 4, STAT4)、IL-4/STAT6 通路水平, 探讨 CAA 造血障碍的免疫发病机制, 同时, 进一步揭示生血合剂治疗 CAA 的免疫调控机制。

材料与方 法

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 参考《血液病诊断及疗效标准》中 CAA 的诊断标准^[4]。

1.2 中医辨证分型标准 按照 CAA 分型标准^[5], 结合周永明教授经验将治疗组患者分为脾肾阳

虚型和脾肾阴虚型。

2 纳入标准 (1) 符合 CAA 诊断标准; (2) 符合中医辨证分型标准; (3) 愿意接受本方案治疗并签署知情同意书; (4) 年龄 12 ~ 75 岁; (5) 未使用环孢菌素 (cyclosporin A, CsA); (6) 停用雄激素治疗 2 周以上。

3 排除及剔除标准 排除标准: (1) 临床资料不全者; (2) 肝肾功能异常者; (3) 过敏体质或对多种药物过敏者; (4) 妊娠期或哺乳期患者; (5) 严重心脏病, 包括心肌梗死、心功能 3 级以上者。剔除标准: (1) 疗程未滿 6 个月者; (2) 不按规定服药者。

4 一般资料 40 例 CAA 患者均来自上海中医药大学附属岳阳医院 2006 年 3 月—2008 年 12 月血液科门诊和病房, 采用随机数字表法分为 2 组: 治疗组 20 例, 男 9 例, 女 11 例; 年龄 14 ~ 64 岁, 平均 (40.4 ± 14.1) 岁; 血红蛋白浓度 (Hb, g/L) 76.1 ± 26.4, 白细胞计数 (WBC, × 10⁹/L) 2.54 ± 1.21, 血小板计数 (PLT, × 10⁹/L) 20.85 ± 12.94, 中性粒细胞百分比 (GR, %) 37.15 ± 11.23, 淋巴细胞百分比 (Ly, %) 54.76 ± 11.45, 网织红细胞绝对值 (Ret, × 10⁹/L) 22.35 ± 12.21; 骨髓像分级 IV 级 16 例, V 级 4 例。对照组 20 例, 男 8 例, 女 12 例; 年龄 13 ~ 62 岁, 平均 38.2 ± 16.1 岁; Hb 75.2 ± 24.3, WBC 2.62 ± 0.97, PLT 22.85 ± 12.34, GR 38.21 ± 12.54, Ly 53.72 ± 13.15, Ret 24.26 ± 13.65; 骨髓像分级 IV 级 15 例, V 级 5 例。两组患者一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。另选取 20 名岳阳医院体检中心健康体检者为正常组, 男 10 名, 女 10 名, 年龄 15 ~ 70 岁, 平均 (42.2 ± 16.5) 岁。

5 治疗方法 治疗组服用生血合剂, 其中脾肾

阳虚型服用生血合剂 1 号(黄芪、党参、熟女贞、补骨脂、菟丝子、巴戟肉、仙灵脾、白术、山药、丹参、三七、炒丹皮、甘草, 含生药 2 g/mL), 脾肾阴虚型服用生血合剂 2 号(黄芪、党参、熟女贞、生地黄、补骨脂、菟丝子、制首乌、熟地黄、山萸肉、丹参、三七、炒丹皮、甘草, 含生药 2 g/mL), 以上制剂由岳阳医院中药制剂中心制成口服合剂(200 mL/瓶), 每次 20 mL, 口服 3 次; 对照组服用 CsA(25 mg/粒, 北京诺华制药有限公司, 批号: 060204, 060812, 070223, 080124), 5 mg/(kg·d), 分 3 次服用(治疗期间根据血清 CsA 浓度适当调整 CsA 用量, 使 CsA 浓度达到 200~400 ng/mL)。两组均治疗 6 个月。治疗期间均停用治疗 CAA 的其他药物, 如合并感染加用抗生素; 严重贫血者, 适量输血; 出血明显者加用止血药。

6 观察指标及检测方法 分别检测两组患者治疗前后及正常组外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)转录因子及相关信号分子 mRNA 表达、Th 细胞亚群比例及细胞因子分泌水平。

6.1 T-bet、GATA-3、STAT4、STAT6 mRNA 表达检测 采用实时荧光定量 PCR(Realtime FQ-PCR)检测。主要试剂与仪器: TRIZOL(联合生物集团公司), FQ-PCR 试剂盒(达辉生物公司), Realtime PCR 检测仪 ABI-7300(ABI 公司)。基因探针及引物序列: GAPDH TaqMan 探针(Pro): 5'-FAM-CATCCTGGGCTACACTGAGGACCA-TAMRA-3', 上游引物 F: 5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3', 下游引物 R: 5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3'; GATA-3 TaqMan 探针(Pro): 5'-FAM-AAATGGCTTGCTCAGGGAAGT-TAMRA-3', 上游引物 F: 5'-GGCACGGGACACTACTG-3', 下游引物 R: 5'-GTCCCCATTGGCATTCT-3'; T-bet TaqMan 探针(Pro): 5'-FAM-TTCCGGGTG-GCAGCTGACAT-TAMRA-3', 上游引物 F: 5'-ATGTGACCCAGATGATTGTGC-3', 下游引物 R: 5'-CTTGAAAGTAAAGATATGCGTG-3'; STAT6 TaqMan 探针(pro): 5'-FAM-TTCCTGTCACCTGCTTGCCTCAGTCACT-TAMRA-3', 上游引物 F: 5'-TGCCTGCCCTACTGTGG-3', 下游引物 R: 5'-GCTGAGTAAGTGGCTTGTAGT-3'; STAT4 TaqMan 探针(Pro): 5'-FAM-CTCCAGCCGTGCGAAGTTCAAGACC-TAMRA-3', 上游引物 F: 5'-ACAAAGCCTTTGGCAAACACTAC-3', 下游引物 R: 5'-CACTTCGGATTGTGAAATGGGTAT-3'。实验方法: Percoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞; 将分离好的细胞抽提总 RNA: 将分离好的各组细胞中加入 Trizol 1 mL, 用移液器吹打混匀, 依

次各组标本中再加入氯仿(预冷)200 mL 用移液器吹打混匀, 室温静置 5 min, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 小心吸出水层加入依次编号的 Eppendorf 管中, 再加入二倍体积的异丙醇(约 600 mL), 混匀, 置于 -20 ℃ 冰箱, 30 min, 4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清留沉淀, 用 700 mL 75% 乙醇洗涤沉淀, 4 ℃ 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清留沉淀, 10 000 r/min 瞬时离心, 用移液器充分吸尽液体留沉淀, 打开管盖, 干式恒温器 65 ℃ 5 min, 烘干, 20 mL DEPC 处理水溶解 RNA, -20 ℃ 冰箱保存待用。逆转录 cDNA: (1) 将试剂盒从 -80 ℃ 冰箱取出, 复融, 将 5 × 逆转录 buffer, dNTPs, MMLV, 上游引物 F, 下游引物 R, 10 000 r/min 离心数秒。(2) 将经过稀释后的 RNA 样本进行 RT, 反应体系如下: 5 × 逆转录 buffer 4 mL、上游引物 F 0.4 mL、下游引物 R 0.4 mL、dNTPs 0.2 mL、逆转录酶 MMLV 1 mL、DEPC 处理水 10 mL、RNA 模板 4 mL, 总体积 20 mL。反应条件: 37 ℃ 1 h, 95 ℃ 5 min, 灭活 MMLV。FQ-PCR 反应: 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系如下: 5 × PCR buffer 10 μL、上游引物 F 0.5 μL、下游引物 R 0.5 μL、dNTPs 0.5 mL、荧光探针 0.5 mL、Taq 酶 1 mL、ddH₂O、32 mL、cDNA 模板 5 mL, 总体积 50 mL。扩增条件: 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 共 40 个循环, 采光。数据分析: 采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software, 基于循环阈值(cycle threshold, CT)与靶基因初始拷贝数的对数之间的线性关系, 通过比较 T-bet、GATA-3、STAT4、STAT6 与 GAPDH 的 CT 值来定量靶基因的相对表达量。mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta CT} \times 100\%$, $\Delta CT = \text{目标基因 CT 值} - \text{内参(GAPDH) CT 值}$, 靶基因相对于正常对照组的倍数 = $2^{-[\Delta CT(\text{靶基因}) - \Delta CT(\text{正常组})]}$, $\Delta CT(\text{正常组}) = \text{正常组目标基因 CT 平均值} - \text{正常组 GAPDH CT 平均值}$ 。

6.2 外周血 Th₁/Th₂ 比例检测 采用流式细胞仪测定。主要试剂与仪器: 佛波脂(PMA, 上海明睿生物技术有限公司), 离子霉素(ionomycin, 美国 Alexis 公司), 布雷菲德菌素 A(BFA, 美国 Sigma 公司), RPMI 1640(美国 Gibco 公司), 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物制品公司), 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司), 单抗 CD3PerCP、CD8-APC、IFN γ -FITC/IL-4PE、FACS 通透液、FACS 溶血素、流式细胞仪(FACS Arial)均为美国 BD 公司产品。PMA 工作液浓度为 1 μg/mL; Ionomycin 工作液浓度为 50 mg/mL; BFA 工作液浓度为 0.5 mg/mL。细胞培养液: RPMI 1640,

表 1 各组治疗前后 PBMNC T-bet、GATA-3、T-bet/GATA-3、STAT4 及 STAT6 比较

组别	例数	时间	T-bet	GATA-3	T-bet /GATA-3	STAT4	STAT6
正常	20		1.03 ± 0.19	1.03 ± 0.19	1.03 ± 0.26	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.25
对照	20	治疗前	6.01 ± 2.66 [△]	1.14 ± 0.19	5.46 ± 2.82 [△]	4.81 ± 2.07 [△]	1.07 ± 0.35
		治疗后	4.33 ± 1.96 ^{*△}	1.13 ± 0.21	3.89 ± 1.85 ^{*△}	3.19 ± 1.59 ^{*△△}	1.06 ± 0.21
治疗	20	治疗前	5.20 ± 2.47 [△]	1.12 ± 0.19	4.71 ± 2.22 [△]	4.55 ± 1.68 [△]	1.10 ± 0.34
		治疗后	3.60 ± 1.95 ^{*△}	1.05 ± 0.21	3.63 ± 2.38 ^{*△}	2.85 ± 1.07 ^{*△△}	1.11 ± 0.25

注:与本组治疗前比较,*P<0.01;与正常组比较,△P<0.01

含 10% FBS, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 50 mg/mL 青霉素, 50 mg/mL 链霉素和 100 μg/mL 新霉素。实验步骤: 肝素抗凝采血 2 mL。取两只试管分别作为阴性对照管(A 管)和测定管(B 管), 于两只试管中均加入 100 μL 血液和 100 mL RPMI1640。A 管中加入:4 μL BFA 工作液;B 管中加入:5 μL PMA 工作液 + 4 μL Ionomycin 工作液 + 4 μL BFA 工作液。37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 4 h。混匀 A 管和 B 管, 分别加入 20 μL CD3PerCP 和 5 μL CD8-APC, 室温避光孵育 15 min。将 A 管和 B 管分别分成 2 管, 每管加入 100 μL 上一步中已染色的全血, 编号分别为 A1, A2 和 B1, B2。每管中加入 1 mL 1 × FACS 溶血素, 混匀, 室温避光孵育 10 min。每管中加入 2 mL PBS 液, 混匀, 2 500 r/min, 5 min, 弃上清。每管中分别加入 0.5 mL 1 × FACS 通透液, 混匀, 室温避光孵育 10 min。分别加入 2 mL PBS 液, 混匀, 2 500 r/min, 5 min, 弃上清。A1、B1 管中分别加入 20 μL IFN-γ-FITC/IL-4PE, A2、B2 管中分别加入 20 μL 同型对照 γ2a-FITC /γ1-PE, 混匀, 室温避光孵育 30 min。PBS 洗涤 1 次, 去上清, 加入 200 μL PBS 重悬细胞沉淀, 上机检测。结果分析:用 CD3 设门选定淋巴细胞, 用 CD8 分别 IL-4 和 IFN-γ 对所确定的淋巴细胞进行分析, 得出 CD3 + CD8-/IL-4 + (Th₂) 和 CD3 + CD8-/IFN-γ + (Th₁) 细胞的百分含量。

6.3 细胞因子检测 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 PBMNC 培养上清 IFN-γ、IL-12、IL-4 的表达水平。主要仪器与试剂:酶标仪(Bio-RAD 680 型), 人 IL-12 (p70)定量 EIA 试剂盒、人 IL-4 定量 EIA 试剂盒、人 IFN-γ 定量 EIA 试剂盒均为上海森雄科技公司产品, PHA-P(L1668, Sigma 公司)。实验方法:肝素抗凝, 采集患者外周血 4 mL, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 含 10% FBS RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 2 × 10⁶/mL, 加入 PHA 10 μg/mL, 放入 37 °C、5% CO₂ 条件培养箱中培养 72 h, 离心(10 000 r/min, 5 min)收集上清, -20 °C 冰箱储存待测, 采用 ELISA 法检测细胞因子 IFN-γ、IL-12、IL-4 的表达水平, 检测方法严格按试剂盒说明书操作。

7 统计学方法 统计分析采用 SPSS 13.0 软件, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 治疗前后均数比较采用配对 t 检验, 两组样本均数比较采用独立样本 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 SNK 检验, 两因素间相关性采用直线相关分析。

结 果

1 各组治疗前后 PBMNC T-bet、GATA-3、T-bet/GATA-3、STAT4 及 STAT6 比较(表 1) 治疗组、对照组治疗前 T-bet、STAT4 表达及 T-bet /GATA-3 比值均高于正常组(P<0.01), 两组治疗后 T-bet、STAT4 表达及 T-bet /GATA-3 比值较治疗前均有明显下降(P<0.01), 但仍高于正常组(P<0.01), 而 GATA-3、STAT6 表达在治疗前后及与正常组比较差异均无统计学意义(P>0.05)。

2 各组治疗前后外周血 Th₁、Th₂、Th₁/Th₂ 比较(表 2) 治疗组、对照组治疗前 Th₁ 比例、Th₁/Th₂ 比值均高于正常组(P<0.01), 治疗组和对照组各有 8 例患者在治疗后拒绝行 Th₁/Th₂ 检测及细胞因子分泌测定。治疗后两组 Th₁ 比例较治疗前均明显下降(P<0.01), 但仍高于正常组(P<0.01), 两组 Th₂ 比例、Th₁/Th₂ 比值治疗前后比较差异无统计学意义(P>0.05), 两组 Th₂ 比例治疗前后与正常组比较差异无统计学意义(P>0.05)。

表 2 各组治疗前后外周血 Th₁、Th₂、Th₁/Th₂ 比较

组别	例数	时间	Th ₁ (%)	Th ₂ (%)	Th ₁ /Th ₂
正常	20		9.91 ± 1.48	1.14 ± 0.24	9.00 ± 2.02
对照	12	治疗前	20.85 ± 2.58 [△]	1.26 ± 0.28	17.38 ± 4.26 [△]
		治疗后	16.25 ± 2.15 ^{*△}	1.19 ± 0.21	14.34 ± 4.20 [△]
治疗	12	治疗前	20.55 ± 2.59 [△]	1.38 ± 0.36	15.77 ± 4.47 [△]
		治疗后	16.45 ± 2.58 ^{*△}	1.18 ± 0.20	14.33 ± 3.81 [△]

注:与本组治疗前比较,*P<0.01;与正常组比较,△P<0.01

3 各组治疗前后 PBMNC 培养上清 IFN-γ、IL-12、IL-4 水平比较(表 3) 治疗组、对照组治疗前 PBMNC 培养上清 IFN-γ、IL-12 均高于正常组(P<0.01), 治疗以两组 IFN-γ、IL-12 较治疗前均明显下降(P<0.01), 两组 IL-12 与正常组比较差异无统计学意义

($P > 0.05$), 而 IFN- γ 水平仍高于正常组 ($P < 0.05$), 两组 IL-4 治疗前后及与正常组比较均无明显差异 ($P > 0.05$)。

表 3 各组治疗前后 PBMNC 培养上清 IFN- γ 、IL-12、IL-4 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	IFN- γ (pg/mL)	IL-12(pg/mL)	IL-4(pg/mL)
正常	20		29.58 \pm 8.50	20.61 \pm 6.53	22.15 \pm 4.07
对照	12	治疗前	73.83 \pm 11.80 ^{$\Delta\Delta$}	41.24 \pm 9.35 ^{$\Delta\Delta$}	20.57 \pm 4.50
		治疗后	37.35 \pm 9.02 [*]	23.96 \pm 5.10 [*]	20.58 \pm 4.53
治疗	12	治疗前	76.43 \pm 13.89 ^{$\Delta\Delta$}	40.13 \pm 8.83 ^{$\Delta\Delta$}	20.86 \pm 3.74
		治疗后	38.42 \pm 10.06 ^{$\Delta\Delta$}	23.84 \pm 3.53 [*]	21.63 \pm 3.86

注:与本组治疗前比较,^{*} $P < 0.01$;与正常组比较, ^{Δ} $P < 0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$

4 CAA 患者不同变量之间相关性分析 治疗前 CAA 患者 T-bet 与 Th₁ 比例、IFN- γ 、IL-12、STAT4 成正相关 (r 分别为 0.716、0.782、0.743、0.819, $P < 0.05$), 与 GR、Ret 呈负相关 (r 分别为 -0.529、-0.723, $P < 0.05$), 与 PLT 无明显相关性; Th₁ 细胞比例与 IFN- γ 、IL-12、STAT4 呈正相关 (r 分别为 0.780、0.705、0.712, $P < 0.05$), 与 GR、Ret 呈负相关 (r 分别为 -0.588、-0.828, $P < 0.05$), 与 PLT 无明显相关性; IL-12 与 STAT4、IFN- γ 呈正相关性 (r 分别为 0.644、0.660, $P < 0.05$), 与 GR、Ret 呈负相关 (r 分别为 -0.443、-0.613, $P < 0.05$), 与 PLT 无明显相关性。

讨 论

本研究结果表明, CAA 患者外周血 Th₁ 比例、PBMNC IFN- γ 分泌水平明显高于正常人, 而 Th₂ 比例、IL-4 分泌水平和正常人没有明显差异, Th₁/Th₂ 比值明显升高, Th₁/Th₂ 平衡向 Th₁ 偏移, 经免疫抑制剂环孢素或生血合剂治疗后, 患者血象改善, 病情好转, 同时 Th₁ 比例下降, IFN- γ 分泌减少, Th₁/Th₂ 比值减小, 这和以上文献报道相似。本研究相关分析也表明 CAA 患者 Th₁ 比例与 PBMNC 分泌 IFN- γ 水平呈正相关, 而与 Ret、GR 呈负相关, 这些结果均说明, Th₁、Th₂ 细胞失衡在 AA 的发病中起到关键的作用。

亚群特异性转录因子 T-bet、GATA-3 在 T 细胞亚群分化过程中具有重要的调节作用, 其能引起相应细胞因子基因染色质重塑(包括 DNA 酶高敏性的诱导、组蛋白乙酰化、DNA 去甲基化), 使之处于开放状态, 并通过自身正反馈途径使亚群特异性转录因子持续高表达, 进而不断激活相应细胞因子基因, 导致相应细胞因子的合成, 这一过程是可通过细胞分裂和增殖周期进行传递的, 从而维持了 Th 亚群表型, 调节了

Th₁/Th₂ 分化, 即转录因子调节 Th 细胞亚群分化^[6]。T-bet 在 T 细胞活化过程中能被 IFN- γ 诱导而上调, IL-12 能通过增强 IFN- γ 表达而间接增加 T-bet 的表达。T-bet 在 Th₁ 细胞分化中起着决定性作用。我们采用实时荧光定量 PCR 技术检测了治疗前后 CAA 患者和正常人的 PBMNC T-bet mRNA 表达情况, 结果表明, 治疗前 CAA 患者 T-bet 在转录水平表达明显高于正常人, 且 T-bet 和外周血 Th₁ 细胞比例、PBMNC IFN- γ 分泌水平成正相关性, CAA 患者经治疗病情缓解后, T-bet 表达明显下降, 因而 T-bet 在 CAA Th₁ 亢进、免疫异常激活过程中起到重要作用。GATA-3 能抑制 IFN- γ 的表达, 导致 Th₁ 亚群的抑制和 Th₂ 亚群的分化。在 Th₂ 细胞分化中, GATA-3 发挥了中心性的作用^[7]。我们检测了治疗前后 CAA 患者和正常人的 PBMNC GATA-3、STAT6 的 mRNA 表达情况及 PBMNC IL-4 分泌水平, 结果显示, 治疗前后 CAA 患者 GATA-3、STAT6 在转录水平表达与正常人无明显差异, PBMNC IL-4 分泌水平也与正常人无明显差异, 说明 IL-4/STAT6/GATA-3 通路在 CAA 的 Th₁/Th₂ 失衡、Th₁ 漂移发生中在基因转录水平没有发生明显变化。由于本研究病例数较少且有部分病例脱落, 进一步研究可增加样本数, 同时检测 STAT6、GATA-3 蛋白磷酸化水平的变化以明确其在 CAA Th₁ 漂移中是否发生活化或抑制。

IL-12 对 Th₁ 分化的作用机制有三:一是作为 Th₁ 细胞的生长因子;二是抑制 Th₂ 特异性转录因子 GATA-3 的转录;三是增强 Th₁ 细胞 IFN- γ 基因的转录, 它通过活化 STAT4 蛋白直接促进 Th₁ 细胞因子基因转录。T-bet 诱导 IFN- γ 表达并非依赖于 IL-12/STAT4 途径, 而且 T-bet 介导 Th₁ 的分化也不依赖于 IL-12^[8]。我们采用 ELISA 法检测 CAA 患者及正常人 PBMNC 培养上清 IL-12 分泌水平, 运用实时荧光定量 PCR 法检测治疗前后 CAA 患者和正常人的 PBMNC STAT4 mRNA 表达情况, 结果表明, 治疗前 CAA 患者 PBMNC 分泌 IL-12、STAT4 转录水平明显高于正常人, CAA 患者经治疗病情缓解后, IL-12 分泌及 STAT4 表达明显下降, 但仍高于正常, 相关分析表明, IL-12 与 STAT4、IFN- γ 、T-bet、Th₁ 呈正相关, 与中性粒细胞绝对值、网织红细胞计数成负相关, 因而 IL-12/STAT4 通路的异常激活在 CAA Th 细胞失衡的免疫发病机制中也起着重要作用。CAA 患者存在 T-bet、IFN- γ 、IL-12、STAT4 的过度表达, 且和 Th₁ 细胞增高相关, 因而, IFN- γ /T-bet 通路、IL-12/STAT4 通路的异常活化在 CAA 患者 Th₁/Th₂ 失衡发生中可能起到关键的作

用,两者之间可能存在着协同关系。而 IL-4 分泌、STAT6/GATA-3 mRNA 表达及 Th₂ 比例与正常人比较没有明显差异,提示 IL-4/STAT6/GATA-3 通路在 CAA 的 Th₁/Th₂ 失衡发生中基因转录水平没有发生明显变化。

本课题组采用生血合剂治疗 CAA,十余年的临床观察表明生血合剂治疗再障总有效率 86.9%,治愈缓解率为 48.81%,明显优于康力龙对照组($P < 0.05$),且未见明显不良反应^[3]。前期临床及动物实验研究证实生血合剂治疗再障可以调整细胞免疫功能,抑制造血细胞的过度凋亡,调控造血细胞因子的释放,改善 TCRV β 谱型倾斜程度,降低异常 T 细胞克隆性增殖,促进骨髓的造血功能改善和恢复^[9-11]。本研究采用具有健脾益肾、泻火活血作用的中药制剂生血合剂或免疫抑制剂 CsA 治疗后,患者血象改善、病情好转, Th₁ 比例下降, Th₁/Th₂ 比值接近正常, PBMNC 培养上清 1 型细胞因子 IFN- γ 分泌减少,而 Th₂ 比例、PBMNC 分泌 IL-4 水平则无明显变化,生血合剂和 CsA 治疗再障、调控再障免疫异常的机理部分是通过抑制亢进的 Th₁ 细胞数量和功能、纠正 Th₁/Th₂ 漂移来实现的。经生血合剂或 CsA 治疗后,CAA 患者 PBMNC T-bet、STAT4 mRNA 表达减低,培养上清中 IFN- γ 、IL-12 水平亦下降,但仍高于正常组,说明 CAA 患者 IFN- γ /T-bet、IL-12/STAT4 通路异常活化状态有所改善,但仍未达正常状态,其 Th₁/Th₂ 失衡的纠正尚需进一步的治疗。本研究也表明,患者治疗前后 PBMNC GATA-3/STAT6 mRNA 表达及分泌 IL-4 水平均没有明显差异。因而,生血合剂和 CsA 可能通过抑制 IFN- γ /T-bet、IL-12/STAT4 通路的异常活化,进而达到纠正 Th₁/Th₂ 失衡、抑制 CAA 亢进细胞免疫、解除造血抑制的作用。

参 考 文 献

- [1] 李峻,胡明辉,周永明. T-bet、GATA3 在 Th₁、Th₂ 细胞分化中的作用及意义[J]. 国际免疫学杂志, 2009, 32(2):126-131.
- Li J, Hu MH, Zhou YM. The effects of T-bet/GATA3 in the differentiation of Th₁/Th₂ cell and their clinical significances [J]. Intern J Immunol, 2009, 32(2):126-131.
- [2] Solomou EE, Keyvanfar K, Young NS. T-bet, a Th₁ transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia[J]. Blood, 2006, 107(10):3983-3991.
- [3] 周永明,黄振翘,黄韬,等. 生血合剂治疗再生障碍性贫血的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20

(3):173-175.

- Zhou YM, Huang ZQ, Huang T, et al. Clinical study of Shengxue mixture in treating aplastic anemia [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2000, 20(3):173-175.
- [4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1999:33-39.
 - Zhang ZN, editor. Standards of diagnosis and therapeutic effect of hematologic diseases [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1999:33-39.
 - [5] 中国中西医结合血液病专业委员会. 再生障碍性贫血分型标准[S]. 大连:全国中西医结合血液病专业委员会第三届第二次学术会议, 1989:4-6.
 - Special Committee of Chinese Association of Integrative Medicine. Syndrome differentiation standards of aplastic anemia [S]. Dalian: The 2nd Academic Conference of the 3rd Hematologic Disease Committee of Chinese Integrative Traditional and Western Medicine Society, 1989:4-6.
 - [6] Mostoslavsky R, Alt FW, Bassing CH. Chromatin dynamics and locus accessibility in the immune system [J]. Nat Immunol, 2003, 4(7):603-606.
 - [7] Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, et al. GATA-3 promotes Th₂ responses through three different mechanisms: induction of Th₂ cytokine production, selective growth of Th₂ cells and inhibition of Th₁ cell-specific factors [J]. Cell Res, 2006, 16(1):3-10.
 - [8] Mullen AC, High FA, Hutchins AS, et al. Role of T-bet in commitment of Th₁ cells before IL-12-dependent selection [J]. Sci, 2001, 292 (5523): 1907-1910.
 - [9] 周永明,程军,薛志忠,等. 生血合剂及其拆方对免疫介导再生障碍性贫血小鼠作用的实验研究[J]. 上海中医药大学学报, 2002, 16(1):56-59.
 - Zhou YM, Cheng J, Xue ZZ, et al. Experimental study on functional mechanism of "blood-producing mixture" and its modified formula on mice with immune-mediated aplastic anemia [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharm Shanghai, 2002, 16(1):56-59.
 - [10] 周永明,薛志忠,夏丰,等. 生血合剂对再生障碍性贫血患者 CD34⁺ 细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药科技, 2001, 8(3):141-142.
 - Zhou YM, Xue ZZ, Xia F, et al. Effect of Shengxue mixture on CD34⁺ cells apoptosis in patients with aplastic anemia [J]. Chin J Tradit Med Sci Tech, 2001, 8(3): 141-142.
 - [11] 周永明,魏学礼,陆嘉惠,等. 再生障碍性贫血 T 细胞受体 V β 基因表达及生血合剂对其的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(11):973-977.
 - Zhou YM, Wei XL, Lu JH, et al. Changes in T-cell receptor repertoire in aplastic anemia and effects of Shengxue Mixture [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2006, 26(11):973-977.

(收稿:2010-04-02 修回:2010-06-07)