

益髓生血颗粒对血红蛋白 H 病患者铁负荷和抗氧化损伤水平影响的临床研究

褚娜利 张新华 方素萍 王文娟 程艳玲 吴志奎

摘要 目的 探讨益髓生血颗粒对血红蛋白 H (HbH) 病患者铁负荷和抗氧化损伤水平的影响。**方法** 采用随机安慰剂平行对照的方法,实验组 45 例患者服用益髓生血颗粒,安慰剂组 15 例患者服用安慰剂治疗,疗程均为 3 个月。检测患者治疗前后 Hb、SI、SF、SOD、MDA、GSH - Px 水平。**结果** (1) 益髓生血颗粒治疗 3 个月后,治疗组 45 例 HbH 病患者 Hb、SOD、GSH - Px 水平与疗前相比显著升高 ($P < 0.01$), MDA 水平与疗前相比显著降低 ($P < 0.01$), SI 和 SF 于疗前相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。安慰剂组治疗 3 个月后,Hb、SI、SF、MDA、GSH - Px、SOD 水平治疗前后无明显变化 ($P > 0.05$)。(2) 益髓生血颗粒治疗 3 个月后,缺失型 HbH 病患者和非缺失型 HbH 病患者 Hb、SOD、GSH - Px 水平与疗前相比显著升高 ($P < 0.01$);MDA 水平与疗前相比显著降低 ($P < 0.01$)。缺失型 HbH 病患者 SI、SF 水平与疗前相比无明显变化 ($P > 0.05$);非缺失型 HbH 病患者 SI 水平与疗前相比显著降低 ($P < 0.01$), SF 水平与疗前相比无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论** HbH 病患者尤其非缺失型 HbH 病患者需要警惕铁超载,应定期复查 SI 水平。益髓生血颗粒改善 HbH 病患者临床疗效的可能机制之一可能与降低体内铁负荷有关,仍需要进一步临床试验进行验证。

关键词 血红蛋白 H 病 益髓生血颗粒 血红蛋白 铁代谢指标 抗氧化损伤指标

[中图分类号] R2 [文献标识码] A

Clinical Research on the Influence of Yisui Shengxue Granule on Iron Overload and Oxidation Damage Levels in Patients with HbH Disease.

Chu Nali, Zhang Xinhua, Fang Suping, et al. Guang'anmen Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract Objective To evaluate the clinical efficacy of Yisui Shengxue Granule (YSSXG), a complex Chinese medicine, in improving the iron metabolism status and oxidative damage level in patients with HbH disease. **Methods** A randomized placebo parallel control method was used in treating 60 patients with HbH disease diagnosed as kidney deficiency, who had divided into YSSXG and placebo groups. 45 cases of HbH disease patients were given YSSXG and 15 cases of HbH disease patients were given the placebo. The whole course of treatment was three months. we observed the blood index Hb, and detected the SI, SF, also the activity of SOD, MDA, GSH - PX from blood plasma before and after treatment. **Results** The levels of Hb, SOD, GSH - Px of YSSXG group with hemoglobin H disease were significantly increased after YSSXG treatment ($P < 0.01$) and the level of MDA was significantly decreased after YSSXG treatment ($P < 0.01$), which were showed no difference in the placebo group after the placebo treatment. The levels of SI, SF were not significant difference in two groups after treatment. After YSSXG treatment, the levels of Hb, SOD, GSH - Px in 32 patients of hemoglobin H disease with gene non - deletion and 13 patients of hemoglobin H disease with gene deletion were significantly elevated ($P < 0.01$) and the level of MDA in the two gene types of hemoglobin H disease were decreased obviously ($P < 0.01$). The level of SF in the two gene types of hemoglobin H disease showed no difference compared with before treatment ($P < 0.01$). The SI level was declined obviously in 32 patients of hemoglobin H disease with gene non - deletion, but SI level showed no difference in 13 patients of hemoglobin H disease with gene deletion. **Conclusion** HbH patients, in particular hemoglobin H disease with gene non - deletion, need to guard against iron overload and should be regularly review SI level. One of the possible mechanism of YSSXG improving the HbH disease clinical curative effect may be related to reduce the load of iron and still need further clinical trials for validation.

Key words HbH; Yisui Shengxue Granule (YSSXG); Hb; Iron overload; Oxidation damage

基金项目:国家重点基础研究发展(“973”计划)基金资助项目(2010CB530406);国家自然科学基金资助项目(81173167)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院(褚娜利、方素萍、程艳玲、吴志奎);530021 中国人民解放军第 303 医院(张新华);100069 北京,首都医科大学(王文娟)

通讯作者:吴志奎,电子信箱:gwmwuzhikui@sina.com

地中海贫血是先天性基因缺陷致使人体不能正常合成血红蛋白珠蛋白引起的一种遗传性血液病,也叫珠蛋白合成障碍性贫血^[1]。慢性溶血和贫血是其主要表现。由于过剩的珠蛋白链聚合、沉积于红细胞膜,出现免疫损伤,诱发氧自由基反应,引起继发性酶和代谢异常,导致红细胞变形能力和机械稳定性下降,最终导致溶血和无效造血^[2,3]。地中海贫血是由于血红蛋白珠蛋白基因缺陷而导致肽链失衡,根据珠蛋白肽链失衡的程度,其临床表型分为,静止型、轻型、中间型和重型 4 种类型。中间型 α - 地中海贫血(又称 HbH 病),可将其分为缺失型和非缺失型 HbH 病。为初步了解中药益髓生血颗粒对 HbH 病患者抗氧化损伤和铁代谢水平的影响,进一步探讨益髓生血颗粒改善 HbH 病患者临床症状疗效的生物学机制,笔者在广西高发区收集 60 例 HbH 病患者,采用随机对照方法,检测治疗前后 HbH 病患者血红蛋白(Hb)、铁代谢指标(SI、SF)以及血清抗氧化损伤水平,见报告如下。

资料与方法

1. 诊断标准:西医诊断标准按照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》,中医辨证参照沈自尹等《中医虚证辨证参考标准》、《中医证候鉴别诊断学》和《中药新药临床研究指导原则,证属肝肾阴虚、精血不足证^[4~9]。

2. 病例纳入、排除、剔除标准:病例纳入标准:①符合中间型珠蛋白生成障碍性贫血西医诊断者;②符合中医肝肾阴虚、精血不足证辨证标准者;③患者年龄 7~26 岁;④自愿接受治疗,并签署知情同意书。病例排除标准:①不符合纳入标准者;②有免疫缺陷,肝、肾及血液系统其他原发性疾病者;③妊娠者。病例剔除标准:①凡未按规定用药,无法判定临床疗效者;②临床资料数据不全,影响评估者;③没有完成方案所规定的治疗周期的脱落病例;④在治疗周期中服用任何抗贫血药物及输血者。

3. 一般资料:全部病例均为 2011 年 9 月~2013 年 10 月就诊于中国人民解放军第 303 医院的门诊病例,共计 60 例 HbH 病患者。60 例 HbH 病患者均为肝肾阴虚、肾精不足证。60 例 HbH 病患者的基因型共有 4 种类型:SEA/3.7 型 6 例,SEA/4.2 型 7 例;SEA/CS 型 31 例,SEA/QS 型 1 例,其中前两种归为缺失型,共 13 例;后两种归为非缺失型,共 32 例。HbH 病患者中,男性 35 例,女性 25 例。60 例 HbH 病患者,患者年龄 7~26 岁,平均年龄 14.25 ± 5.38 岁;壮族 40 例,汉族 20 例。

4. 治疗方法:符合纳入条件的 HbH 病患者,采用数字表法对 60 例 HbH 病患者随机分组,治疗组 45 例,安慰剂对照组 15 例;治疗组给予益髓生血颗粒,由中国中医科学院广安门医院大兴制剂中心生产(批号:2011519),10 克/袋(含生药量

23.68g)。益髓生血颗粒服药方法均为:2~6 岁,0.5 袋/次,每日 2 次;6~10 岁,1 袋/次,每日 2 次;10 岁以上 1 袋/次,每日 3 次,温开水冲服。要求患者在观察期间不输血,坚持服药。药物每月发放 1 次,每月记录其用药量。对照组给予安慰剂,安慰剂含糊精和淀粉等,由中国中医科学院广安门医院大兴制剂中心生产(批号:2011602),外包装及服用方法、用量与益髓生血颗粒治疗组完全相同。

5. 检测指标:检测治疗前后患者血液参数 Hb 水平,检测治疗前后铁代谢指标 SI、SF 水平,检测治疗前后血清抗氧化损伤指标 SOD、MDA、GSH-Px 水平。

6. 检测指标及方法:(1) 血清铁蛋白(SF):采用 RANDOX 公司铁蛋白检测试剂盒(免疫比浊法)[货号:FERRITIN(FN 3452)]进行检测;血清铁(SI)采用 RANDOX 公司铁检测试剂盒(亚铁嗪法)[货号:IRON(SI 7967)]进行检测;SF、SI 检测仪器为 BECKMAN COULTER AU5821 全自动生化分析仪。(2) 血清抗氧化损伤水平的检测:检测 HbH 病患者血清抗氧化损伤指标包括超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量。采用南京建成生物工程研究所生产的超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒[SOD(A001~3),批号:20140321;MDA(A003~1),批号:20140321;GSH-Px(A005),批号:20140321]。SOD、MDA、GSH-Px 检测仪器为酶标仪(2100)。

7. 疗效评定:疗效判定标准按张之南主编《血液病诊断及疗效标准》并参考第 4 届国际血红蛋白基因开关会议提出的标准,以 Hb、RBC、Ret、HbH 上升并且 Hb 上升大于 5g/L 为有效,单纯 Ret、HbH 上升不作为有效病例^[10]。

8. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计数资料进行频数统计和 χ^2 检验;计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 益髓生血颗粒治疗前后 HbH 病患者 Hb 和血清学各指标水平的比较:益髓生血颗粒治疗 3 个月后,45 例 HbH 病患者 Hb、SOD、GSH-Px 水平显著升高($P < 0.01$),MDA 水平明显升高($P < 0.01$),SI 和 SF 水平与治疗前相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。安慰剂组治疗 3 个月后,Hb、SI、SF、MDA、GSH-Px、SOD 水平与治疗前相比无明显变化,见表 1。

2. 两种型别 HbH 病患者益髓生血颗粒治疗前后 Hb 和血清各指标水平的比较:益髓生血颗粒治疗 3 个月后,缺失型 HbH 病患者和非缺失型 HbH 病患者 Hb、SOD、GSH-Px 水平与治疗前相比升高($P < 0.01$),MDA 水平与治疗前相比降低($P < 0.01$)。缺失型 HbH 病患者 SI、SF 水平与治疗前相比无明显变化($P > 0.05$)。非缺失型 HbH 病患者 SI 水平与治疗前相比降低($P < 0.01$),SF 与治疗前相比有降低的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 2。

表 1 治疗前后 HbH 病患者 Hb 和各血清学指标水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	Hb(g/L)	SI(μmol/L)	SF(ng/ml)	SOD(U/gHb)	MDA(nmol/mg)	GSH-Px(U/gHb)
治疗组	45	疗前	84.67 ± 11.01	18.49 ± 7.73	398.29 ± 224.32	99.97 ± 16.15	3.76 ± 0.60	865.12 ± 73.67
	45	疗后	91.60 ± 10.58 *	17.26 ± 7.14	374.69 ± 238.26	149.19 ± 32.78 *	2.96 ± 0.66 *	982.89 ± 108.01 *
安慰剂组	15	疗前	89.57 ± 11.18	24.03 ± 9.40	498.83 ± 202.93	171.11 ± 53.01	2.75 ± 0.43	1032.73 ± 88.50
	15	疗后	91.07 ± 10.99	24.29 ± 9.13	492.96 ± 208.27	146.25 ± 20.84	2.82 ± 0.30	1011.57 ± 92.99

组内比较, * $P < 0.01$

表 2 益髓生血颗粒治疗前后两种型别 HbH 病患者 Hb 和血清学各指标水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	时间	Hb(g/L)	SI(μmol/L)	SF(ng/ml)	SOD(U/gHb)	MDA(nmol/mg)	GSH-Px(U/gHb)
缺失型 α	13	疗前	85.38 ± 11.08	11.56 ± 3.58	283.17 ± 193.69	103.97 ± 12.41	3.53 ± 0.38	905.15 ± 61.82
	13	疗后	93.92 ± 7.84 **	14.46 ± 4.93	283.10 ± 205.45	141.27 ± 26.83 **	2.80 ± 0.71 **	991.74 ± 106.12 **
非缺失型 α	32	疗前	84.38 ± 11.14	21.31 ± 7.17	445.06 ± 221.55	98.35 ± 17.36	3.85 ± 0.65	848.86 ± 72.65
	32	疗后	90.66 ± 11.48 **	18.40 ± 7.63 *	411.90 ± 243.49	152.41 ± 34.78 **	3.02 ± 0.63 **	979.29 ± 110.23 **

组内比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

地中海贫血是一种遗传性溶血性贫血,地中海、中东、非洲、印度和亚洲南部是地中海贫血高发区^[11]。HbH 病患者分为缺失型 HbH 病和非缺失型 HbH 病,其中缺失型 HbH 病是指缺失 3 个 α 基因,非缺失型 HbH 病是指 2 个 α 基因缺失和 1 个 α 基因突变^[12]。非缺失型 HbH 病绝大多数突变位于功能较强的 α2 基因,因此非缺失型 HbH 病的临床表现和血液学改变一般比缺失型 HbH 病严重,多表现为中至重度贫血^[13]。在我国南方最常见缺失型 HbH 病为 -αSEA、-α3.7、-α4.2,非缺失型 HbH 病为 HbCS 和 HbQS。

地中海贫血由于无效造血导致溶血、不断输血、肠道铁吸收增加造成患者体内铁过载^[14,15]。地中海贫血患者氧化应激反应诱发因素之一为患者铁过载^[15,16]。地中海贫血患者由于铁过载,在患者循环系统中氧自由基产物 NTBI 和 LPI 会增加^[17,18]。地中海贫血目前尚无确切有效的治疗方法。西医治疗以输血配合除铁治疗为主,药物治疗有 γ-基因活化药物、抗氧化损伤药物、α-肽链合成抑制药物等,造血干细胞移植和基因治疗在临幊上尚未普及^[19]。中医认为地中海贫血属于“虚劳”、“童子劳”等范畴,病机上既有肾精亏虚、气血不足,又有黄疸、积聚,虚实并存是其特点。根据中医肾生髓、髓生血及精血同源的理论,治法应以补肾益髓法。益髓生血颗粒治疗地中海贫血有 30 多年的临幊经验,且临幊疗效肯定。既往吴志奎课题组对益髓生血颗粒治疗地中海贫血患者有肯定临幊疗效的生物学机制的研究报道很多,但益髓生血颗粒对 HbH 病患者铁负荷水平影响的临

床研究鲜有报道^[20,21]。本研究旨在探讨益髓生血颗粒对 HbH 病患者铁负荷和氧化应激水平的影响,进一步研究益髓生血颗粒治疗地中海贫血患者的生物学机制。

MDA 是一个机体良好的机体内脂质过氧化的生物标志物,有研究显示重型 β-地中海贫血患者体内 MDA 水平和 SF 水平呈正相关^[16,22]。研究结果发现,益髓生血颗粒治疗 3 个月后,13 例缺失型 HbH 病患者和 32 例非缺失型 HbH 病患者 Hb、SOD、GSH-Px 水平与治疗前相比显著升高;MDA 水平与治疗前相比显著降低;非缺失型 HbH 病患者 SI 水平与治疗前相比明显降低,SF 水平与治疗前相比无明显变化;缺失型 HbH 病患者 SI 和 SF 水平与治疗前相比无明显变化。安慰剂组治疗 3 个月后,Hb、SI、SF、MDA、GSH-Px 水平无明显变化,SOD 水平有降低趋势,但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

本研究中缺失型 HbH 病患者体内 SI、SF 水平大多在正常值参考值范围内;非缺失型 HbH 病患者 SI 水平大多在正常参考值范围内,但 SF 水平大多高于参考值上限,说明非缺失型 HbH 病患者体内溶血贫血严重,导致铁负荷加重,体内 SF 代偿性的结合体内过多的 SI,使患者体内 SF 高于正常参考值上限,患者的贮铁能力下降,因此 HbH 病患者尤其非缺失型 HbH 病患者应警惕铁超载,定期复查 SI 水平。由表 2 可知,缺失型 HbH 病患者体内 SI、SF 水平分别低于非缺失型 HbH 病患者 SI 水平,缺失型 HbH 病患者 MDA 水平低于非缺失型 HbH 病患者 MDA 水平,说明随着 SI、SF 水平的升高,MDA 有升高的趋势,与 Samir 等^[22]结果基本一致。HbH 病患者体内 SI 水平

大多在正常范围内,说明中间型地中海贫血患者相对重型地贫患者来说,体内溶血程度较轻,大多还不处于体内高铁状态,此结果与黄钰君等^[23]研究结果一致。益髓生血颗粒改善 HbH 病患者临床疗效的可能机制之一可能与降低体内铁负荷有关,仍需要进一步临床试验进行验证。

参考文献

- 1 吴志奎. 中医药对边远民族地区人口与健康的贡献: 益髓生血治疗地中海贫血取得重大进展[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(11): 4-8
- 2 Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations [J]. Blood, 1989, 74(6): 2194-2202
- 3 Scott MD, Rouyer - Fessard P, Ba MS, et al. Alpha - and beta - haemoglobin chain induced changes in normal erythrocyte deformability: comparison to beta thalassaemia intermedia and Hb H disease [J]. Br J Haematol, 1992, 80(4): 519-526
- 4 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 48-59
- 5 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准[J]. 中西医结合杂志, 1986, 6(10): 598
- 6 姚乃礼. 中医证候鉴别诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 393-394
- 7 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 2002: 173-184, 263-266
- 8 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 1993: 61-63
- 9 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 1995: 13-19, 137-140
- 10 Cao A, Galanello R, Rosatelli MC, et al. Clinical experience of management of β - thalassemia: the sardinian experience [J]. Seminars in Hematology, 1996, 33(1): 70-73
- 11 Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future [J]. Curr Mol Med, 2008, 8: 592-599
- 12 谢杏梅, 周剑英, 唐海深. 应用脐带血毛细管电泳技术筛查常见非缺失型 HbH 病 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(5): 20-21
- 13 刘宁毅, 陈良军. 非缺失型 α - 珠蛋白生成障碍性贫血基因检测分析 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(16): 2113-2114
- 14 Raffaella M, Paola T, Matteo P, et al. Iron metabolism in thalassemia and sickle cell disease [J]. Medit J Hemat Dis, 2009, 1(1): e200906
- 15 Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, et al. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation [J]. Blood, 2003, 102: 2670-2677
- 16 Handan D, Duran C, Güchan A, et al. The antioxidant effects of caparis ovata and deferasirox in patients with thalassemia major [J]. Blood Disorders Transf, 2013, 4(3): 2155-2159
- 17 Koren A, Fink D, Admoni O, et al. Non - transferrin bound labile plasma iron and iron overload in sickle cell disease: a comparative study between sickle cell disease and β - thalassemic patients [J]. Eur J Haematol, 2010, 84: 72-78
- 18 Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI - labile plasma iron in iron overload [J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2005, 18: 277-287
- 19 Galanello R, Origa R. Beta - thalassemia [J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5: 11
- 20 吴志奎, 张新华, 方素萍, 等. 基于“肾藏精生髓”理论治疗地中海贫血 [J]. 中医杂志, 2011, 52(1): 20-23
- 21 程艳玲, 张新华, 孙玉雯, 等. 补肾益髓法治疗 β - 地中海贫血的现状 [J]. 中医杂志, 2013, 54(2): 155-159
- 22 Samir MA, Manar FA, Nisreen AN, et al. Ischemia modified albumin: an oxidative stress marker in β - thalassemia major [J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413: 907-910
- 23 黄钰君, 伍绍国, 区小冰, 等. 不同基因型地中海贫血患儿血清铁代谢指标的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(2): 85-88

(收稿日期: 2014-06-05)

(修回日期: 2014-06-11)

湖北海棠总黄酮纯化工艺研究

郭东艳 王幸 唐志书 汪黎植

摘要 目的 优化湖北海棠总黄酮分离纯化工艺。**方法** 以总黄酮含量为评价指标,采用大孔吸附树脂法进行纯化,确定总黄酮纯化工艺条件。**结果** 湖北海棠总黄酮最佳分离纯化工艺为:选用 HPD100 型大孔树脂,树脂与药材的质量比为 1:1.74,上样药液浓度为 0.15g/ml,上样流速为 2BV/h,树脂径高比为 1:10,洗脱时先用 4BV 水洗除杂,再用 4BV 70% 乙醇洗脱,洗脱速度为 1BV/h。**结论** 纯化工艺简便、可行,适合工业化生产。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81202905);陕西省科技厅基金资助项目(2013KTCQ03-12);陕西省教育厅基金资助项目(11JS036)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医药大学药学院(郭东艳、王幸、唐志书);443002 宜昌,天然产物研究与应用湖北省重点实验室(汪黎植)