

健脾益气摄血颗粒影响免疫性血小板减少症患者出血与免疫功能研究

郎海燕 张玲 王佳 张雅月 王冲 范秋月 张佳诺 陈信义

摘要 **目的** 观察健脾益气摄血颗粒对“脾不统血证(脾气虚)”型免疫性血小板减少症(ITP)患者特异性免疫功能的影响。**方法** 应用中央随机对照、多中心竞争入组临床试验方法,共入组273例,经反复核对临床试验资料,进入全分析集受试者共272例,其中,试验组(健脾益气摄血组)104例,联合组(健脾益气摄血联合泼尼松组)103例,西药组(泼尼松组)65例。21天为1个疗程,临床试验结束后进行统计分析。**结果** 从治疗第7天开始,试验组、联合组的出血程度评分值较入组时明显下降,与治疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而西药组从14天开始,说明西药组止血效果晚于试验组、联合组;3组病例治疗后各访视点血小板减少程度评分值较治疗前有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。末次访视点,联合组血小板评分值下降幅度最优,与试验组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。试验组 $CD4^+CD25^+$ 细胞治疗后测定值与疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与试验组比较,第4次访视点联合组检测的 $CD3^+CD4^+$ 细胞、 $CD19^+$ 细胞正常和异常差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组治疗前后血小板抗体测定值组内或组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 健脾益气摄血颗粒能有效止血和提升患者外周血小板效果,调节免疫可能是治疗机制之一。

关键词 健脾益气摄血颗粒 免疫性血小板减少症 免疫调控

中图分类号 R255.7

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.011

Clinical Research on Specific Immune Function of Immune Thrombocytopenia Treated by Jianpi Yiqi Shexue Granule. Lang Haiyan,

Zhang Ling, Wang Jia, et al. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract Objective To observe Jianpi Yiqi Shexue granule improve immune(spleen qi deficiency), explore the effect mechanism from the perspective of specific immunity. **Methods** A central randomized, multicenter clinical trial was applied with the ITP patients on TCM syndrome of "spleen failing to control blood (spleen qi deficiency)". 272 patients were divided 104 cases into Jianpi Yiqi Shexue prescription group (trial group), 103 cases into Jianpi Yiqi Shexue prescription combined with prednisone group (combination group), and 65 cases into prednisone group. The subjects took medicine for 21 days, collected data of their bleeding, lymphocytes and their sub-groups, and platelet related antibody. And then analyzed curative effect and mechanism. **Results** After 7 days of treatment, the level of bleeding in the trial group and the combination group began to decrease ($P = 0.000$), the effect in the prednisone group appeared 14 days later. The results showed that the hemostasis effect of prednisone group was later than that of the trial group and the combined group. In the three groups, the scores of platelets reduction of each site after treatment were lower than that before treatment, which were statistically significant ($P < 0.05$). The measured value of $CD4^+CD25^+$ in the trial group was significant different before and after treatment ($P < 0.05$), while the other two groups were not ($P < 0.05$). Compared with the experimental group, the normal and abnormal $CD3^+CD4^+$ and $CD19^+$ detected in the combined group of the 4th visit were statistically significant ($P < 0.05$). No statistical significance was found in either group of PAIgG, PAIgA, PAIgM before and after treatment ($P > 0.05$). **Conclusion** The regulation of immunity, especially the regulation of T cell function, probably is one of the mechanisms for the treatment of ITP by Jianpi Yiqi Shexue granule.

Key words Jianpi Yiqi Shexue granule; Immune thrombocytopenia; Cellular immune thrombocytopenia; Immunoregulation

原发性免疫性血小板减少症(primary immune

thrombocytopenia, ITP)是一类由细胞和体液免疫异常导致血小板破坏增多的自身免疫病^[1]。ITP临床表现以广泛的皮肤、黏膜出血为主,急性发病者可出现危及生命的内脏出血或脑出血,且出血风险随年龄的增加而增加,但与患者外周血小板数量减少程度并不一致,尤其慢性患者甚至血小板计数不在安全水平,也不会发生广泛或严重出血。因此,对于ITP的治疗

基金项目:国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2013CB531705);国家自然科学基金青年基金资助项目(81803904)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院(郎海燕);650500 昆明,云南中医药大学(张玲);100700 北京中医药大学东直门医院(王佳、张雅月、王冲、范秋月、张佳诺、陈信义)

通讯作者:陈信义,教授,电子信箱:chenxinyi0729@126.com

除有效地防治出血症状,稳定外周血小板数值在安全水平外,控制或改善患者临床症状,特别是乏力症状至关重要。通过临床实践证明,以中医药为主或辅助治疗在防治 ITP 患者出血、稳定外周血小板数值以及改善临床症状等方面具有明显优势。因此,笔者在协作进行国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目临床试验过程中,分别检测了患者经健脾益气摄血颗粒治疗前后血小板相关抗体、T 淋巴细胞及其亚群变化,以期证实健脾益气摄血颗粒具有免疫调控效果。

对象与方法

1. 病例标准:(1)免疫性血小板减少症诊断标准:参照《血液病诊断及疗效标准》制定的 ITP 诊断标准^[2]:①多次实验室检查血小板计数减少;②脾脏不增大或仅轻度增大;③骨髓检查巨核细胞增多或正常,有成熟障碍;④以下 5 点中应具备任何 1 点:A. 泼尼松治疗有效;B. 切脾治疗有效;C. PAIgG(血小板抗体 IgG)增多;D. PAC₃(血小板抗体补体 C3)增多;E. 血小板寿命缩短;⑤并可排除继发性血小板减少症。(2)脾不统血证诊断标准:参照《中药新药临床研究指导原则》中“中药新药治疗脾虚证临床研

究指导原则”与“中药新药治疗气虚证临床研究指导原则”^[3],结合疾病临床特征拟定“脾不统血证”标准^[4]:①主症:慢性出血(反复皮下瘀点或瘀斑,色泽淡;月经过多或经期延长等),伴随体倦乏力、神疲懒言;②次症:食欲不振、食后腹胀;③舌脉:舌体胖大,边有齿印,舌淡;脉象细弱。具备主症 2 项(第 1 项必备),次症 1 项,结合舌脉可诊断。(3)出血程度与血小板减少分级标准:参照 2010 年卫生部医政司发布的《免疫性血小板减少性紫癜临床路径》,将出血程度与血小板计数减少分 4 级并记分,见表 1^[5]。(4)纳入病例标准:同时具备下列 3 项:①符合免疫性血小板减少症疾病诊断标准;②符合中医“脾不统血”中医证候辨证标准;③自愿受试,并签署知情同意书。(5)排除病例标准:具备下列任意 1 项:①合并严重心脏、脑、肝脏、肾脏疾病;②精神病患者;③妊娠、哺乳期妇女;④有严重糖尿病、高血压并发症患者;⑤已知对受试药物或处方中某个单味中药过敏者。(6)中止和剔除病例标准:符合下列任意 1 项:①不能坚持治疗;②临床试验中出现严重不良反应或严重并发症;③病情加重,需另行治疗。

表 1 血小板计数减少与出血程度分级记分标准

观察项目	轻度(1级,1分)	中度(2级,2分)	重度(3级,4分)	极重度(4级,6分)
血小板计数($\times 10^9/L$)	50~100	25~49	10~24	<10
出血程度	外伤后出血	无广泛出血	广泛出血,外伤处出血不止	自发性出血不止,危及生命(颅内出血)

2. 研究方法:(1)临床分组与治疗方法:用中国中医科学院临床评价中心设计的中央随机系统,按随机抽取的药物编号将受试者分配到健脾益气摄血颗粒组(试验组)、健脾益气摄血颗粒联合泼尼松组(联合组)、泼尼松组(西药组)。健脾益气摄血配方颗粒(黄芪 20g、党参 15g、茯苓 15g、白术 10g、阿胶 15g、茜草 10g、炙甘草 6g;北京康仁堂药业有限公司),每次 1 袋,每日 2 次;泼尼松首次剂量按 1.0~1.5mg/(kg·d),早 8:00 时顿服,治疗期间有效减量。健脾益气摄血联合强的松组联合使用健脾益气摄血配方颗粒和泼尼松(用量用法同上)。21 天为 1 个疗程。(2)观察指标检测方法:于第 1、7、14、21 天进行访视,观察患者出血程度变化,并采集患者外周血,应用全自动血细胞分析仪器检测外周血象中血小板计数,进行血小板减少程度评分值;于第 1、4 次访视点,采集患者外周血,送北京海思特临床检验所,按 T 淋巴

细胞亚群检测试剂盒说明,流式细胞仪法检测淋巴细胞及其相关亚群;以酶联免疫竞争抑制法(ELISA)检测血小板相关抗体(PAIgG、PAIgA、PAIgM)。

3. 统计学方法:同一组治疗前后比较若差值符合正态分布,采用配对 *t* 检验;若前后差值非正态分布,采用符号 *Wilcoxon* 秩和检验。组间比较时,若同时符合正态分布且方差齐,则采用 *ANOVA* 单因素方差分析;若各组均正态分布但方差不齐,采用 *Welch* 检验;若非正态分布,采用 *Kruskal-Wallis* 秩和检验。频数及构成比的检验采用 χ^2 检验/*Fisher* 确切概率法(当理论频数 < 5 的单元数超过 20% 时),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般资料:采用中国中医科学院临床所设计的中央随机系统,按照临床试验方案规定入选病例标准,自 2012 年 8 月~2016 年 8 月,由北京中医药大学

东直门医院等 18 家三级甲等中医医疗单位竞争入组 ITP 患者 273 例,经反复核对临床试验资料,有 1 例因不符合入选标准而剔除,进入全分析集受试者共 272

例(试验组 104 例,联合组 103 例,西药组 65 例)。入组时人口学资料见表 2。

表 2 3 组病例入组时人口学资料

组别	n	性别(n)		χ^2	P	年龄(岁)	Z	P
		男性	女性					
试验组	104	28	76			34.61 ± 16.65		
联合组	103	28	75	0.34	0.843	32.83 ± 16.94	0.88	0.644
西药组	65	20	45			32.06 ± 17.10		

2. 出血程度与血小板计数减少评分值变化:3 组病例出血与血小板计数减少评分值观察结果见表 3。

表 3 3 组病例出血及血小板计数减少评分值比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

分组	访视点	出血评分值	血小板计数减少评分值
试验组 (n = 104)	治疗前	1.60 ± 0.73	2.55 ± 1.42
	第 7 天	1.36 ± 0.54 *	2.13 ± 1.42 *
	第 14 天	1.20 ± 0.41 *	2.08 ± 1.53 * Δ
	第 21 天	1.24 ± 0.63 *	2.33 ± 1.74 Δ
联合组 (n = 103)	治疗前	1.47 ± 0.50	2.49 ± 1.45
	第 7 天	1.24 ± 0.43 *	1.72 ± 1.35 * #
	第 14 天	1.17 ± 0.38 *	1.71 ± 1.37 * #
	第 21 天	1.14 ± 0.35 *	1.68 ± 1.41 * #
西药组 (n = 65)	治疗前	1.54 ± 0.66	2.56 ± 1.49
	第 7 天	1.41 ± 0.59	1.80 ± 1.47 *
	第 14 天	1.20 ± 0.40 *	1.59 ± 1.31 *
	第 21 天	1.20 ± 0.52 *	1.81 ± 1.50 *

与治疗前比较, * P < 0.05; 与试验组相同时间点比较, # P < 0.05; 与西药组相同时间点比较, Δ P < 0.05

从治疗第 7 天开始,试验组、联合组的出血程度评分值较入组时明显下降,与治疗前比较,差异有统计学意义 (P < 0.05),而西药组从 14 天开始积分下降。说明西药组止血效果晚于试验组、联合组。3 组病例治疗后各访视点血小板计数减少程度评分值较治疗前有所下降,差异有统计学意义 (P < 0.05)。末次访视点,联合组血小板评分值下降幅度最优,与试验组相同时间点比较,差异有统计学意义 (P < 0.05)。

3. T 淋巴细胞亚群测定值变化:3 组病例 T 淋巴细胞亚群检入结果见表 4。试验组 CD4⁺CD25⁺ 治疗后测定值与治疗前比较,差异有统计学意义 (P < 0.05),其余各组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

4. T 淋巴细胞亚群正常和异常比例:3 组病例 T 淋巴细胞亚群正常和异常百分比统计结果见表 5。

表 4 3 组病例 T 淋巴细胞亚群测定值比较

时点	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD19 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
		(%)	(%)	(%)	FoxP3 ⁺ (%)	(%)	
试验组	治疗前	70.86 ± 10.19	34.52 ± 9.34	30.76 ± 9.87	15.87 ± 8.63	3.73 ± 1.90	1.29 ± 0.71
	治疗后	69.97 ± 15.01	36.76 ± 10.05	31.39 ± 11.75	19.20 ± 11.10 *	3.83 ± 2.30	1.38 ± 0.77
联合组	治疗前	69.75 ± 11.53	32.46 ± 10.93	31.81 ± 10.91	26.73 ± 73.91	6.56 ± 17.86	1.26 ± 0.74
	治疗后	68.84 ± 13.76	33.29 ± 12.33	29.98 ± 11.38	21.24 ± 51.91 Δ	4.87 ± 12.12	1.57 ± 10.09
西药组	治疗前	69.47 ± 12.79	32.28 ± 10.93	31.38 ± 12.98	15.30 ± 7.29	3.45 ± 1.95	1.31 ± 0.92
	治疗后	72.29 ± 11.96	32.77 ± 8.90	33.86 ± 10.03	15.55 ± 5.36	3.65 ± 2.35	1.07 ± 0.47

与治疗前比较, * P < 0.05; 与试验组治疗后比较, Δ P < 0.05

第 4 次访视点联合组检测的 CD3⁺CD4⁺ 细胞、CD19⁺ 细胞正常和异常例数,与试验组比较,差异有统计学意义 (P < 0.05)。

5. 血小板相关抗体变化:3 组病例血小板相关抗体 PAIgG、PAIgA、PAIgM 检测结果见表 6。各组治疗前后血小板抗体测定值组内或组间比较,差异无统计学意义 (P > 0.05)。

讨 论

ITP 的确切发病机制目前尚不清晰,目前普遍认为该病为异质性免疫性疾病,体液与细胞免疫功能失调承担着始动角色。在体液免疫方面,抗体介导的血小板破坏被认为是 ITP 的经典发病机制,现已证实 50% ~ 60% 的 ITP 患者血小板表面可检测到抗血小板糖蛋白的血小板自身抗体,包括血小板相关抗体

表 5 3 组病例 T 淋巴细胞亚群正常与异常病例数比较 [n(%)]

T 细胞亚群	检测点	试验组 (正常/异常)	联合组 (正常/异常)	西药组 (正常/异常)
CD3 ⁺	治疗前	74(83.15)/15(16.85)	77(81.05)/18(18.95)	36(73.47)/13(26.53)
	治疗后	63(86.30)/10(13.70)	60(82.19)/13(17.81)	28(77.78)/8(22.22)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	治疗前	65(74.71)/22(25.29)	64(69.57)/28(30.43)	29(60.42)/19(39.58)
	治疗后	59(83.10)/12(16.90)	41(59.42)*/28(40.58)	25(71.43)/10(28.57)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	治疗前	69(80.23)/17(19.77)	71(77.17)/21(22.83)	33(70.21)/14(29.79)
	治疗后	58(82.86)/12(17.14)	58(84.06)/11(15.94)	25(71.43)/10(28.57)
CD19 ⁺	治疗前	74(84.09)/14(15.91)	68(73.12)/25(26.88)	34(68.00)/16(32.00)
	治疗后	58(81.69)/13(18.31)	44(61.97)*/27(38.03)	23(65.71)/12(34.29)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	治疗前	64(78.05)/18(21.95)	59(69.41)/26(30.59)	35(71.43)/14(28.57)
	治疗后	52(76.47)/16(23.53)	50(74.63)/17(25.37)	25(75.76)/8(24.24)

与试验组比较, * $P < 0.01$; 治疗前后正常/异常应等于本组入组病例数, 本表治疗前后病例数少于入组病例数均为该项目检测的缺失病例数

表 6 3 组病例治疗前后血小板抗体测定值比较 (ng/ml)

分组	时点	PAIgG	PAIgA	PAIgM
试验组	治疗前	8.01 ± 14.88	4.39 ± 4.30	4.94 ± 5.10
	治疗后	5.61 ± 9.32	4.19 ± 5.97	6.08 ± 9.93
联合组	治疗前	6.52 ± 12.96	3.65 ± 3.42	5.10 ± 5.43
	治疗后	7.47 ± 18.92	4.09 ± 7.02	6.54 ± 15.21
西药组	治疗前	12.34 ± 37.19	4.09 ± 6.82	8.49 ± 25.80
	治疗后	8.46 ± 17.10	2.45 ± 2.14	3.27 ± 2.22

(PAIg)和血小板特异性抗体(PSIg)。这些抗体主要是 IgG 型,也有 IgM、IgA 等。抗体与血小板膜抗原结合后形成抗原抗体复合物,由单核-吞噬细胞摄取后在脾脏中被破坏。吴意红等^[6]研究发现,归脾丸不仅能够提高患者外周血小板计数,亦能降低血小板相关抗体 PAIgG、PAIgA、PAIgM,总体疗效与激素相当。B 细胞通常作为抗原递呈细胞产生抗体,促进 CD4⁺T 细胞分化,在免疫应答中发挥重要调节作用,也可以通过分泌调节细胞因子或通过细胞与细胞接触,直接与病原的 T 细胞相互作用,从而在免疫应答中发挥负性调节作用。这类 B 细胞被称作调节性 B 细胞^[7,8]。细胞免疫异常在 ITP 发生、发展过程中也有重要作用,调节性 T 细胞(Treg)是一类具有免疫调节功能的特殊 T 细胞亚群。有研究表明,ITP 患者存在 Treg 细胞数量及功能的异常^[9,10],与正常对照比较,ITP 患者尤其是活动性和(或)血小板计数特别低的患者,外周 Treg 数量明显减少。目前研究较多的是检测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,其是近几年发现的一种特殊的专职免疫调节细胞,主要通过抑制免疫效应细胞增殖、分化及其免疫功能和抑制自然杀伤细胞、细胞毒 T 细胞等细胞的功能来维持自身免疫平衡。有研究者通过不同实验方法均得出一致结论,初诊和复发的 ITP 患者体内 CD4⁺和 CD25⁺Treg 细胞明显低于正常对照组和缓解期 ITP 患者,表明 ITP 患者体内可能由于缺

乏 Treg 细胞,从而使自身免疫反应不能被有效抑制,导致自身免疫平衡失调^[11]。Arandi 等^[12]报道,ITP 患者 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 细胞数量明显减少,功能降低。吴晓勇等^[13]建立 ITP 小鼠动物模型,检测脾 Treg 细胞,发现 Treg 细胞比例减少、TGF- β 1 水平降低与 ITP 的细胞免疫失调相关。上述研究充分证明,T、B 细胞免疫功能紊乱在 ITP 发病机制中占有重要位置。

本研究从治疗第 7 天开始,试验组、联合组的出血程度评分值较入组时明显下降,与治疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而西药组从 14 天开始。说明西药组止血效果晚于试验组、联合组;3 组病例治疗后各访视点血小板计数减少程度评分值较治疗前有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。末次访视点,联合组血小板评分值下降幅度最优,与试验组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。该项研究从临床角度证明,益气健脾摄血颗粒对 ITP 有明确的治疗效果。试验组 CD4⁺CD25⁺细胞疗后测定值与疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明健脾益气摄血颗粒能够升高 CD4⁺CD25⁺细胞,调节 ITP 患者紊乱的免疫机制,维系自身免疫稳态。与试验组比较,第 4 次访视点联合组检测的 CD3⁺CD4⁺、CD19⁺正常和异常差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD3⁺代表人体细胞免疫功能状态,CD4⁺是调控免疫反应最重要枢纽细胞,CD19⁺则与 B 细胞免疫相关。从上述结果进一步证实联合组不但能够调节 T 细胞免疫,也可调控 B 细胞免疫。各组治疗前后血小板抗体测定值组内或组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),其研究结果与何牧卿等^[14]、Sakakura 等^[15]临床研究结论相一致。该研究结果可以说明,调节免疫尤其是调节 T 细胞免疫可能是健脾益气摄血颗粒治疗 ITP 机制之一。