

· 论著 ·

益气养阴方对慢性肾小球肾炎患者红细胞补体受体 1 型分子及其基因多态性的影响

郭聂涛¹, 杨进¹, 何庭宇²

(1. 广州中医药大学中山附属医院肾内科, 广东 中山 528400; 2. 中山大学附属中山医院检验中心)

【摘要】 目的: 探讨益气养阴方对慢性肾小球肾炎(CGN)患者治疗作用的机制。方法: 将 50 例 CGN 患者随机分为中西医组(30 例)和西医对照组(20 例)。两组均予西医综合治疗; 中西医组加用益气养阴方(由黄芪、白术、茯苓、女贞子、太子参、枸杞子、薏苡仁、丹参、红花等组成), 每日 1 剂, 分 3 次口服; 两组均治疗 3 个月。另选 50 例健康志愿者作为正常对照组。用聚合酶链反应(PCR)和 Hind III 酶切技术测定红细胞补体受体 1 型分子(CR1)基因密度, 用细胞酶联免疫吸附法测定红细胞 CR1 的数量表达, 以红细胞天然免疫黏附试验测定红细胞 CR1 黏附活性。观察 CGN 患者与正常对照组以及中西医组与西医对照组治疗前后红细胞 CR1 的数量表达和黏附活性及其基因多态性的变化。结果: ①CGN 患者与正常对照组的红细胞 CR1 基因多态性差异无显著性, 但 CGN 患者的红细胞 CR1 数量表达和黏附活性明显低于正常对照组(P 均 <0.01)。②中西医组与西医对照组治疗后红细胞 CR1 数量表达和黏附活性均高于治疗前, 但仅中西医组有差异(P 均 <0.05), 而基因多态性均无变化; 中西医组治疗后红细胞 CR1 数量表达和黏附活性较西医对照组治疗后明显升高, 差异均有显著性(P 均 <0.05)。结论: 益气养阴方对 CGN 患者红细胞 CR1 数量表达和黏附活性有明显影响。

【关键词】 肾小球肾炎, 慢性; 益气养阴方; 受体, 补体, 红细胞; 基因多态性

中图分类号: R256.51; R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)01-0007-04

Effect of supplementing Qi and nourishing Yin prescription (益气养阴方) on complement receptor type 1 in erythrocytes and its genomic density polymorphism of patients with chronic glomerulonephritis GUO Nie-tao¹, YANG Jin¹, HE Ting-yu². 1. Department of Nephrology, Zhongshan Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, Guangdong, China; 2. Test Center, Zhongshan Affiliated Hospital, Zhongshan University, Zhongshan 528403, Guangdong, China

【Abstract】 **Objective:** To study the effect and mechanism of supplementing Qi and nourishing Yin prescription (益气养阴方) on patients with chronic glomerulonephritis (CGN). **Methods:** Fifty patients with CGN were randomly divided into Chinese and Western medicine group ($n=30$) and control group ($n=20$). Patients in both groups were given western medicine synthesis treatment. Additionally, Chinese and Western medicine group was added supplementing Qi and nourishing Yin prescription, including radix astragali (黄芪), rhizoma atractylodis macrocephalae (白术), poria (茯苓), fructus ligustri lucidi (女贞子), radix pseudostellariae (太子参), fructus lycii (枸杞子), semen coicis (薏苡仁), radix et rhizoma salviae miltiorrhizae (丹参), flos carthami (红花), one dosage of decoction divided into three portions for drinking in a day. The treatment lasted for 3 months. Fifty healthy persons were selected as normal controls. Polymerase chain reaction (PCR) and Hind III restriction enzyme digestion were used to detect erythrocytes' complement receptor type 1 (CR1) genomic density polymorphism, the quantitative assay of erythrocytes' CR1 was determined by enzyme linked immunoadsorbant assay (ELISA) and the adherent activity of erythrocytes' CR1 was tested by erythrocyte nature immunoadherence assay. The changes of above items in patients with CGN and healthy persons and in two treatment groups were compared before and after treatment. **Results:** ①Erythrocytes' CR1 genomic density polymorphism of CGN patients and healthy persons had no difference, and the quantitative expression and adherent activity of CGN patients were significantly lower than those of healthy persons (both $P<0.01$). ② After treatment, the erythrocytes' CR1 genomic density polymorphism of two treatment groups was not changed, the quantitative expression and adherent activity in Chinese and Western medicine group were significantly higher than those of the control group and those before the treatment (all $P<0.05$). **Conclusion:** Supplementing Qi and nourishing Yin prescription has significant effect on erythrocytes' CR1 quantitative expression and adherent activity in patients with CGN.

【Key words】 chronic glomerulonephritis; supplementing Qi and nourishing Yin prescription; erythrocytes' complement receptor; genomic density polymorphism

慢性肾小球肾炎(CGN)是由多种原因引起原发于肾小球的一组免疫性疾病,病理类型多样,预后不尽相同。大部分 CGN 由循环免疫复合物(CIC)沉积于肾小球,激活补体而引起一系列炎症反应所致。近年来研究发现,红细胞补体受体 1 型分子(CR1)具有清除 CIC、调理吞噬、抑制补体活化等作用^[1]。本研究通过观察 CGN 患者血浆 CR1 数量表达、黏附功能及其基因多态性的变化,旨在探讨益气养阴方对 CGN 的治疗作用及其机制,报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料:50 例 CGN 患者均为我院肾内科 2003 年 6 月—2004 年 12 月收治的住院和门诊者,诊断均符合文献^[2]标准,其中男 27 例,女 23 例;年龄 28~60 岁,平均(45.00±2.68)岁;病程 1~8 年,平均(3.00±1.02)年。按随机原则将 50 例患者分为中西医结合治疗组(中西医组,30 例)和常规西医治疗对照组(西医对照组,20 例)。两组患者一般情况比较差异均无显著性。另选 50 例健康志愿者作为正常对照组,其中男 30 例,女 20 例;年龄 26~60 岁,平均(46.00±3.22)岁。无心、脑、肝、肺疾病。

1.2 治疗方法:中西医组给予益气养阴方治疗(黄芪 30 g,白术 10 g,茯苓 15 g,女贞子 15 g,太子参 15 g,枸杞子 15 g,薏苡仁 20 g,丹参 20 g,红花 5 g 等),每日 1 剂,水煎后分 3 次口服;同时选用洛丁新 10 mg、每日 1 次,潘生丁 50 mg、每日 3 次,并根据病情采用利尿剂、抗生素等,配合低盐、优质低蛋白饮食。西医对照组除不用益气养阴方外,其余治法同中西医组。两组疗程均为 3 个月。

1.3 检测指标及方法:于清晨抽取所有受试者空腹肘静脉血 1 ml,乙二胺四乙酸(EDTA)1:9 抗凝,观察治疗前后红细胞 CR1 数量表达和黏附活性及其基因多态性的变化。

1.3.1 红细胞 CR1 分子基因密度的检测:参照文献^[3]方法联合使用聚合酶链反应(PCR)和 Hind III 酶切技术(RFLP)。根据 CR1 密度相关基因组仅在红细胞膜上表达的原理,CR1 基因内含子 7.4 kb 和 6.9 kb,Hind III 酶切片段与红细胞 CR1 高密度(H)和低密度(L)表达均有关。PCR 扩增时间参数为:94 ℃变性 300 s,55 ℃复性 50 s,72 ℃延伸 50 s,进行 30 个循环,72 ℃延伸 5 min。经过 PCR 扩增和 Hind III 酶切后,进行琼脂糖及溴化乙锭电泳染色,

可在电泳区分出红细胞 CR1 密度相关的 3 种基因型。高表达型即 HH 型无突变位点,酶切后仅有 1 条 1.8 kb 的条带;中表达型即 HL 型,酶切后得到 1.8、1.3 和 0.5 kb 3 个条带;低表达型即 LL 型,酶切后为 1.3 kb 和 0.5 kb 2 个条带。

1.3.2 红细胞 CR1 定量测定:参照文献^[4]方法采用细胞酶联免疫吸附法。取沉淀红细胞 10 μl,用生理盐水洗涤 2 次后,再用磷酸盐缓冲液(PBS)配成体积分数为 2% 的红细胞悬液,在 V 型滴定板的每孔加入 CR1 一抗 10 μl,定量红细胞悬液 20 μl,混匀后 37 ℃孵育 45 min,用质量分数为 1% 的等渗生理盐水/牛血清蛋白(1%BSA)洗涤 2 次,加碱性磷酸酶标记的二抗 10 μl,37 ℃孵育 30 min,洗涤后晾干,加显色液 120 μl,37 ℃孵育 30 min,离心取上清显色液 100 μl,在波长 405 nm 处读取其吸光度(A)值,以 $A_{\text{标本}} - A_{\text{对照}}$ 作为测定值。

1.3.3 红细胞天然免疫黏附功能测定:参照文献^[3]方法测定红细胞 CR1 分子黏附活性。取 EDTA 抗凝血 1 ml,以 2 000 r/min(离心半径 325 μm)离心 5 min,取沉淀红细胞 5 μl 加入 400 μl 生理盐水中配成 1.25% 的红细胞悬液。取红细胞悬液 50 μl,定量致敏靶细胞株悬液 100 μl,自身血浆 100 μl 混匀,37 ℃孵育 40 min,瑞氏液染色,计数 100 个靶细胞并计算黏附率。以上方法及试剂由中国免疫学会红细胞免疫学会提供。

1.4 统计学方法:计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前 CGN 组与正常对照组红细胞 CR1 数量表达和黏附活性及其基因多态性的比较(表 1):CGN 组与正常对照组红细胞 CR1 基因多态性比较差异无显著性($\chi^2 = 1.89, P > 0.05$);CGN 组红细胞 CR1 数量表达和黏附活性均明显低于正常对照组(P 均 < 0.01)。

2.2 中西医组与西医对照组红细胞 CR1 数量表达和黏附活性及其基因多态性的比较(表 2):中西医组与西医对照组治疗前后红细胞 CR1 基因多态性无变化。中西医组治疗后红细胞 CR1 数量表达和黏附活性均高于治疗前,且显著高于西医对照组治疗后,差异均有显著性(P 均 < 0.05);而西医对照组治疗前后比较差异均无显著性(P 均 > 0.05)。

3 讨论

红细胞 CR1 是一种单链膜糖蛋白,分子质量为

作者简介:郭焱涛(1952-),男(汉族),江苏省人,医学硕士,教授,硕士生导师,主任医师,近 5 年获市级科技进步奖 1 项,承担省、市级科研课题 6 项,发表论文 20 篇。

表 1 CGN 组与正常对照组红细胞 CR1 数量表达和黏附活性及其基因多态性的比较
Table 1 Comparison of quantitative expression, adherent activity and genomic density polymorphism of erythrocytes' CR1 between CGN and normal control groups

组别	例数 (例)	CR1 基因多态性[例(%)]			CR1 数量表达	CR1 黏附活性
		HH	HL	LL	($\bar{x} \pm s, A_{405}$)	($\bar{x} \pm s, \%$)
CGN 组	50	28(56)	16(32)	6(12)	0.95 ± 0.12**	59.26 ± 12.31**
正常对照组	50	34(68)	13(26)	3(6)	1.71 ± 0.47	75.32 ± 15.28

注:与正常对照组比较:** $P < 0.01$

表 2 两组治疗前后红细胞 CR1 数量表达和黏附活性及其基因多态性的比较
Table 2 Comparison of quantitative expression, adherent activity and genomic density polymorphism of erythrocytes' CR1 before and after treatment between two groups

组别	例数 (例)	CR1 基因多态性[例(%)]			CR1 数量表达	CR1 黏附活性	
		HH	HL	LL	($\bar{x} \pm s, A_{405}$)	($\bar{x} \pm s, \%$)	
中西医组	治疗前	30	18(60)	9(30)	3(10)	0.94 ± 0.05	59.21 ± 11.28
	治疗后	30	18(60)	9(30)	3(10)	1.48 ± 0.05* Δ	71.41 ± 18.11* Δ
西医对照组	治疗前	20	10(50)	7(35)	3(15)	0.96 ± 0.07	58.92 ± 10.23
	治疗后	20	10(50)	7(35)	3(15)	0.99 ± 0.03	60.20 ± 12.45

注:与本组治疗前比较:* $P < 0.05$;与对照组治疗后比较: $\Delta P < 0.05$

160~260 ku,其具有明显的多态性,不同分子质量的 CR1 并不表现出抗体的差异性,且它们在功能上无差别。红细胞 CR1 配体可分为高亲和力的 C3b 和 C4b 以及低亲和力的 C3bi 和 C3c。在人类不同个体之间,红细胞上的 CR1 种类构成比不同,但就同一个体而言,该构成比是相对恒定的。已证实 CR1 在单个红细胞上呈簇状分布,每一簇含有 2~15 个 CR1 单体,单个红细胞所含的 CR1 簇数和每簇所含的单个受体数总是与每个红细胞上的 CR1 呈高度正相关;每个红细胞含有 500 个左右的 CR1,与年龄和性别无相关性,红细胞 CR1 数量既受遗传控制又受环境控制^[5]。有研究者提出,许多免疫机制参与了肾炎的发病过程,血液中的免疫复合物沉积于肾小球上,免疫复合物激活补体、中性粒细胞、单核/巨噬细胞等炎性细胞,这些细胞释放出的炎症介质和细胞因子促进了系膜细胞和基质增生,导致基底膜破坏^[6]。而红细胞 CR1 具有清除 CIC、调理吞噬、抑制补体活化和免疫调节等作用^[1]。

祖国医学中 CGN 可归属于“水肿”、“腰痛”、“虚劳”等范畴。CGN 的原因复杂、病程长、病情反复,导致其辨证分型多而杂,难以统一。根据我们的长期临床观察发现,CGN 以气虚、阴虚多见,气虚者以肺、脾、肾气虚为主,阴虚者以肝、肾阴虚为主,气阴两虚贯穿于整个疾病过程。中医认为“正气存内,邪不可干”;“邪之所凑,其气必虚”;气阴不足,机体抗病能力下降,脏腑功能失常,致病程长、病情反复。在 CGN 发生发展过程中,长期的蛋白尿、血尿,导

致体内精微物质大量丢失,进一步加剧了阴虚的程度。由于长期大量应用糖皮质激素,伤阴耗气,也能导致气阴两虚。另一方面,不可忽视瘀血在 CGN 中的作用,从中医病机学的角度来探讨瘀血的成因,诸如因虚致瘀、水停致瘀、出血致瘀、情志所伤致瘀、激素致瘀和病邪致瘀等均是 CGN 血瘀广泛存在的基础^[7]。从现代医学的观点,免疫反应所引起的肾小球毛细血管内凝血也符合中医“血瘀”的概念,血液流变学检查也证实了各型均有血瘀^[8]。针对病机,我们采用益气养阴方进行治疗,方中黄芪、白术、茯苓、薏苡仁益气;女贞子、太子参、枸杞子益气养阴;丹参、红花活血化瘀。本研究结果显示:CGN 组红细胞 CR1 数量表达和黏附活性均明显低于正常对照组,但 CGN 组与正常对照组的红细胞 CR1 基因多态性差异无显著性;采用益气养阴方治疗后红细胞 CR1 数量表达和黏附活性均显著高于治疗前及西医对照组治疗后,而单纯采用西医对照组治疗前后无显著变化,益气养阴方治疗对红细胞 CR1 基因多态性也无影响。提示益气养阴方对 CGN 患者的治疗作用在于调节红细胞 CR1 数量表达和黏附活性水平。

益气养阴方中多数药物具有提高红细胞免疫功能的作用^[5]:方中主药黄芪含有多种氨基酸、黄芪多糖、黄芪苷、黄酮、微量元素等成分,有明显的促进红细胞免疫功能的作用;黄芪多糖在体外可直接作用于红细胞,提高红细胞 CR1 活性,增强红细胞的携带能力,促进癌症患者红细胞免疫黏附肿瘤细胞,使 C3b 受体花环率、自然肿瘤红细胞花环率和直向肿

瘤红细胞花环率均有所提高。白术与黄芪配伍可增强红细胞免疫黏附 CIC 的能力,提高肿瘤红细胞花环率和红细胞促淋巴细胞黏附肿瘤细胞率。枸杞子含有的枸杞多糖不仅能明显增强红细胞免疫黏附功能,还能使环磷酰胺引起下降的红细胞 C3b 受体花环率和红细胞免疫复合物花环率显著回升。茯苓对红细胞免疫有明显促进作用。薏苡仁含有的薏苡仁酯可通过降低 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性发挥增强红细胞免疫的作用。丹参含有的丹酚酸 B 能通过抑制脂质过氧化反应,维持氧化与抗氧化之间的平衡,保持红细胞膜的相对稳定,达到促进红细胞 CR1 的作用。红花在较高浓度时能降低红细胞 C3b 受体花环率,在较低浓度时则起升高作用。

参考文献:

[1]刘健,郭雯,翟志敏.新风胶囊对类风湿性关节炎补体调节蛋白红细胞 CR1 和 CD59 的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2006,

13(4):240-243.

[2]叶任高,陈裕盛,方敬爱.肾脏病诊断与治疗及疗效标准专题讨论纪要[J].中国中西医结合肾病杂志,2003,4(6):355-357.

[3]郭峰,钱宝华,许育,等.红细胞免疫分子 CR1 密度相关基因组多态性与其天然免疫活性[J].中华血液学杂志,2002,23(5):274-275.

[4]王海滨,张景萍,沈茜,等.红细胞补体受体 1 型的分子定量测定法[J].中华医学检验杂志,1999,22(6):342-343.

[5]郭峰,钱宝华,张乐之.现代红细胞免疫学[M].上海:第二军医大学出版社,2002:22-23,212-221.

[6]钟伟强,刘冠贤,杨永铭,等.前列腺素 E_1 脂微球载体制剂治疗慢性肾小球肾炎的临床研究[J].中国危重病急救医学,2004,16(5):292-294.

[7]刘宏伟.慢性肾炎血瘀证的形成原因分析[J].贵阳中医学院学报,1990(3):13-14.

[8]张勉之,张大宁.补肾活血法治疗慢性肾小球肾炎 86 例[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(5):297-298.

(收稿日期:2006-09-12 修回日期:2006-10-15)

(本文编辑:李银平)

· 消息 ·

2005 年科技部《中国科技期刊引证报告》(核心版)中 中医学与中药学类 34 种期刊影响因子和总被引频次排序表

(根据 2006 年 12 月中国科技信息研究所公布的《2005 年度中国科技论文统计与分析》的结果)

排序	期 刊	影响因子	排序	期 刊	总被引频次
1	中国中西医结合急救杂志	0.796	1	中草药	3 696
2	中国中西医结合杂志	0.740	2	中国中西医结合杂志	2 709
3	中国中药杂志	0.579	3	中国中药杂志	2 587
4	中国中西医结合肾病杂志	0.574	4	中药材	1 192
5	中西医结合学报	0.521	5	中国针灸	1 125
6	中草药	0.519	6	中医杂志	1 020
7	中国针灸	0.466	7	北京中医药大学学报	692
8	中国中西医结合消化杂志	0.426	8	中国中西医结合急救杂志	622
9	北京中医药大学学报	0.397	9	中国中西医结合肾病杂志	536
10	中药材	0.372	10	中华中医药杂志	511
11	中西医结合肝病杂志	0.366	11	上海中医药杂志	505
12	针刺研究	0.336	12	中国中医药信息杂志	494
13	中华中医药杂志	0.319	13	中国骨伤	487
14	中国实验方剂学杂志	0.272	14	中医药学刊	480
15	湖南中医学院学报	0.241	15	中国中医药科技	406
16	广州中医药大学学报	0.236	16	中西医结合肝病杂志	373
17	中国骨伤	0.227	17	中国实验方剂学杂志	370
18	上海中医药大学学报	0.225	18	中国中西医结合消化杂志	347
19	中国中医骨伤科杂志	0.223	19	广州中医药大学学报	336
20	天津中医药	0.212	20	针刺研究	332
21	南京中医药大学学报	0.203	21	山东中医药大学学报	325
22	中国中医急症	0.196	22	南京中医药大学学报	323
23	世界科学技术-中医药现代化	0.195	22	中国中医骨伤科杂志	323
24	中国中医药科技	0.183	24	中国中医急症	322
25	中医杂志	0.175	25	浙江中医学院学报	279
26	中医药学刊	0.169	26	湖南中医学院学报	256
27	山东中医药大学学报	0.160	27	安徽中医学院学报	244
28	成都中医药大学学报	0.157	28	天津中医药	209
29	上海中医药杂志	0.142	29	成都中医药大学学报	195
30	安徽中医学院学报	0.128	30	世界科学技术-中医药现代化	166
31	云南中医学院学报	0.124	31	上海中医药大学学报	145
31	中国中医药信息杂志	0.124	32	中西医结合学报	125
33	浙江中医学院学报	0.104	33	贵阳中医学院学报	100
34	贵阳中医学院学报	0.044	34	云南中医学院学报	95