

◇临床报道◇

阿胶治疗对地中海贫血孕妇珠蛋白水平的影响研究

李艳芳¹ 张战锋¹ 杨利林¹ 宋思宇¹ 李道成¹ 罗颂平^{2*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨地中海贫血合并妊娠期贫血患者口服阿胶治疗对血红蛋白(Hb)浓度以及 α -、 β -、 γ -、 δ -珠蛋白水平的影响。方法 将符合条件的轻型或中间型 α -或 β -地贫合并轻度贫血孕妇68例,按2:1的比例随机分配到治疗组42例和对照组26例,治疗组予口服阿胶粉治疗,对照组口服阿胶模拟剂治疗,疗程为4周。治疗前后分别采集两组孕妇外周血检测血液分析及铁代谢指标,采用Real-time PCR技术及Western blotting方法从mRNA和蛋白两个水平检测4种珠蛋白表达量的变化。结果 最终共有58例孕妇完成试验,其中,治疗组34例,对照组24例。数据分析结果如下:(1) β CD41-42(-TTCT)/ β^N 是 β -地贫受试者中最常见的基因类型(占41.46%), $\alpha\alpha/$ -SEA是 α -地贫受试者中最主要的基因类型(占70.59%)。(2)治疗后,治疗组孕妇Hb浓度平均上升(5.15±4.62)g/L,明显高于对照组。其中,基因型为 β CD41-42(-TTCT)/ β^N 者的Hb浓度平均上升(6.54±4.74)g/L,疗效显著优于其它类型的 β -地贫孕妇。(3)治疗4周后,伴随着孕周增长,两组孕妇的4种珠蛋白mRNA水平均下降,与对照组相比,治疗组 β -珠蛋白mRNA水平下降幅度显著减少。进一步基于地贫基因类型的分组分析发现,在治疗组中,与 α -地贫亚组相比, β -地贫亚组治疗后的 β -珠蛋白mRNA水平下降幅度明显减少。(4)治疗后,两组孕妇的4种珠蛋白的蛋白表达量均较治疗前下降,与对照组相比,治疗组 β -珠蛋白下降幅度显著减小。在治疗组中, β -地贫亚组的 β -珠蛋白量下降幅度减少和 α -地贫亚组的 α -珠蛋白量下降幅度减少有统计学意义的差别。结论 口服阿胶治疗能明显改善轻型或中间型 α -或 β -地贫孕妇的贫血,基因型为 β CD41-42(-TTCT)/ β^N 者疗效最佳。阿胶对珠蛋白水平的调节作用受地贫基因类型影响, β -地贫孕妇主要上调 β -珠蛋白表达,而 α -地贫孕妇则上调 α -珠蛋白表达。因此推测,口服阿胶治疗有调节地贫贫血孕妇的 α -和非 α -珠蛋白链失衡的作用。

关键词:地中海贫血; 贫血; 妊娠; 珠蛋白; 阿胶

DOI标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2022.03.32

中图分类号: R255.7 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2022)03-0626-05

地中海贫血(简称地贫)是由珠蛋白基因缺陷导致的一种或多种珠蛋白链合成障碍引起的遗传性溶血性贫血。中国南方的地贫发病率相对较高,特别是广东、广西和云南等省。2013年对广东省21个地区的孕妇进行流行病学研究发现, α -和 β -地贫基因携带率分别为4.53%和13.31%,是最常见的两种地贫基因类型^[1]。地贫患者妊娠后容易出现进行性加重的贫血,尤其是在孕24~32周之间。低血红蛋白(Hb)、低主要成人血红蛋白(HbA)和高胎儿血红蛋白(HbF)水平与心血管疾病、血栓性疾病、自然流产、早产、羊水过少、胎儿生长受限以及新生儿低出生体重等不良妊娠结局密切相关^[2,3]。因此,建议地贫孕妇的Hb浓度尽量维持在100g/L以上^[4]。

目前地贫妇女妊娠期贫血尚无安全有效的治疗方法,60%~80%的中间型 β -地贫患者孕期需输血治疗,但由于妊娠期的免疫生理特点,输血可能引起免疫性溶血,进一步加重贫血,并带来铁过负荷等问题^[2,4,5]。笔者自2015年以来开展单味中药阿胶治疗轻型或中间型 β -地贫合并轻度妊娠期贫血的疗效和安全性研究,发现口服阿胶治疗能显著提高 β -地贫孕妇的Hb浓度

和HbA($\alpha_2\beta_2$)比例,并有降低HbF($\alpha_2\gamma_2$)比例的趋势^[6]。这些观察结果引出了一个科学问题:阿胶是否通过诱导 β -珠蛋白链合成,调节 α 和非 α 珠蛋白链失衡而改善地贫孕妇的贫血。为了回答这个问题,我们进一步研究了 α -和 β -地贫贫血孕妇口服阿胶治疗前后外周血中4种珠蛋白水平的变化,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 这是一项随机、双盲、安慰剂平行对照的前瞻性临床试验。研究对象为2018年6月至2020年12月在广州中医药大学第一附属医院产科门诊产检的轻型或中间型地贫孕妇,受试者招募严格按照纳入和排除标准进行。本研究通过医院医学研究伦理委员会的审查和批准(批件编号:ZYUECK[2017]074),所有受试者在入组前均获得知情同意。

1.2 诊断标准 基于孕妇的地贫基因检测结果,参照中华医学会血液学学会编写的《血液病诊断及疗效标准》最新版本中对地贫的诊断标准^[7],做出诊断并确定地贫基因类型。

1.3 纳入标准 (1)确诊为轻型或中间型 α -或 β -地贫者;(2)纳入研究前孕妇为轻度贫血,且70g/L≤Hb<100g/L;(3)经彩超检查结果核实孕龄为24~32周,单胎妊娠;(4)近12周内未曾输血,未服用任何抗贫血的药物;(5)自愿参加研究并由本人及其丈夫签署知情同意书。

1.4 排除标准 (1)重型 β -地贫或复合类型地贫;(2)纳入研究前Hb<70g/L或Hb≥100g/L;(3)纳入研究前合并铁缺乏(血清铁蛋白<30ng/mL);(4)孕龄不足24周,或大于32周;(5)双胎或多胎妊娠;(6)有免疫缺陷性疾病,或有心、肝、肾、消化道、内分泌系统疾病及血液系统其他原发性疾病者;(7)过敏体质或曾对两种以上药物过敏者;(8)近12周内曾输血,或服用过抗贫血的药物;(9)近12周内曾参加其他临床试验者;(10)有心理精

收稿日期:2021-07-19; 修订日期:2021-12-22

基金项目:国家自然科学基金(81704111);

广东省科技计划项目(2017ZC0150)

作者简介:李艳芳(1977-),女(汉族),广东江门人,广州中医药大学第一附属医院主任医师,教授,博士学位,主要从事中医药防治妊娠期和产褥期疾病研究工作。

* 通讯作者简介:罗颂平(1957-),女(汉族),广东佛山人,广州中医药大学教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事生殖健康与生殖障碍的中医药研究工作。

神疾病者或者既往对药物治疗依从性差者; (11) 嗜烟酒, 或吸毒者; (12) 不同意参加研究者。

1.5 剔除标准 (1) 受试者不符合纳入标准而被误纳入试验; (2) 受试者虽符合纳入标准而纳入后未曾用药者; (3) 受试者于试验期间违背方案自行换药或加用非规定范围内治疗用药。

1.6 退出试验标准

1.6.1 研究者决定退出 (1) 试验期间 Hb < 70g/L 或较基线下降比例 > 10% 的受试者, 予以退出试验, 按“无效”合格病例进行统计; (2) 试验期间受试者发生了其它合并症、并发症或特殊生理变化, 不宜继续接受试验; (3) 发生严重不良事件及重要不良事件等, 不宜继续接受试验; (4) 受试者依从性差。

1.6.2 受试者自行退出 (1) 受试者不愿意或不可能继续进行临床试验, 向研究者提出退出试验者; (2) 受试者虽未明确提出退出试验, 但不再接受用药及检测而失访者。

1.6.3 退出病例的处理 对于所有中途退出试验病例, 均积极采取措施, 尽可能完成最后一次检测, 以备对其疗效和安全性进行分析, 并记录中途退出的原因及试验结论。

1.7 随机分配及治疗方法 使用 SPSS 21.0 统计软件产生随机数字表, 将受试者按 2: 1 的比例随机分配到治疗组和对照组。治疗组孕妇予口服阿胶粉(山东东阿阿胶股份有限公司生产, 国药准字 Z37021368), 每日 15g, 温开水冲服; 对照组口服阿胶模拟剂, 每日 15g, 温开水冲服。阿胶模拟剂由山东东阿阿胶股份有限公司制作提供, 与阿胶颜色、气味、外观完全一致而不含活性成分的散剂, 主要成分为糊精、淀粉和焦糖。两组受试者均每日服药, 连续治疗 4 周。

1.8 观察指标 在治疗前后分别抽取两组孕妇晨起空腹肘静脉血 10ml, 进行以下指标检测:

1.8.1 用全自动血细胞分析仪进行血液分析检测

1.8.2 用全自动免疫分析仪测定血清铁蛋白(SF)水平

1.8.3 采用 Real-time PCR 方法检测 α -、 β -、 γ - 和 δ - 珠蛋白 mRNA 水平 在收集新鲜外周全血后的 6 h 内加入 6 倍体积的 Trizol 试剂, 按 Trizol 试剂说明书操作, 混匀分装放置 -80℃ 冰箱中保存。按试剂盒说明书配制反转录反应物, 42℃ 温育进行反转录, 85℃ 加热终止反应, 冻存储存。以反转录产物 cDNA 为模板, 配制 PCR 反应液, 加入合成引物及 SYBER Green, 进行 Real-time PCR 扩增检测, 采用相对定量方法进行 mRNA 表达量分析。

1.8.4 采用 Western blotting(WB) 方法检测 α -、 β -、 γ - 和 δ - 珠蛋白水平 按 Trizol 试剂说明书操作, 分离新鲜外周血中的有核细胞, PBS 洗涤 3 次, 加入细胞裂解液 50 ~ 100 μ L, 冰上静置 20 min, 4℃ 下 12000g 离心 15min, 取上清液加入 0.5mL 离心管中, -80℃ 保存备用。按 BCA 法对总蛋白进行定量。制备 SDS-PAGE 胶, 并进行电泳。电泳后进行膜转印。转膜后将膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, I 抗 4℃ 孵育过夜、洗膜, II 抗室温孵育 1 h, 洗膜。按试剂盒操作说明进行显色。

1.9 统计方法 用 SPSS 21.0 统计软件进行数据的统计处理。计量资料用均数 \pm 标准差表示, 进行方差齐性分析, 若服从正态分布, 组间比较采用独立样本 *t* 检验; 若不服从正态分布, 则采用 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料用率或构成比表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

研究共纳入符合条件的地贫孕妇 68 例, 按 2: 1 随机分配到阿胶治疗组 42 例, 安慰剂对照组 26 例。受试者因各种原因自行退出 10 例, 其中, 治疗组 8 例, 对照组 2 例。最终共 58 例完成试验并参与数据分析, 其中, 治疗组 34 例, 对照组 24 例(见图 1)。

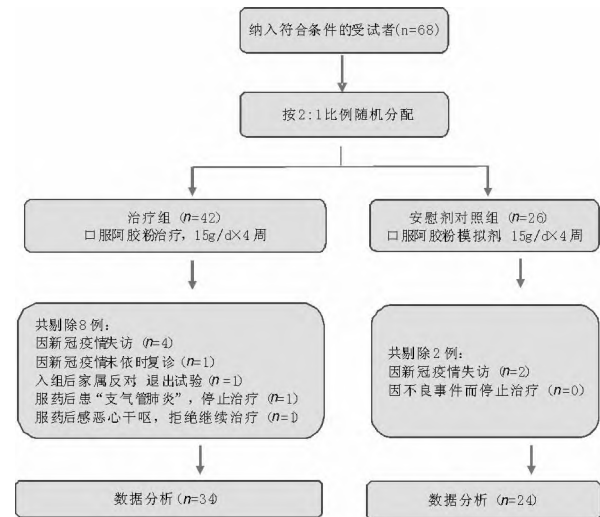


图1 受试者随访流程图

2.1 入组时受试者的人口统计学特征 受试者入组时的人口统计学特征见表 1, 对照组与治疗组在年龄、孕前体重指数(BMI)、孕产次数、人工流产和自然流产次数、教育水平、地贫基因类型构成以及入组时的孕周、Hb 浓度、红细胞(RBC)计数方面无统计学意义上的差别 ($P > 0.05$)。所有受试者均为汉族已婚女性, 无死胎或死产史。

在 β -地贫受试者中, β CD41-42(-TTCT)/ β^N 是最常见的基因类型, 占 41.46% (17/41); β IVS-II-654/ β^N 为第二常见的基因类型, 占 26.83% (11/41)。 $\alpha\alpha$ /--SEA 是 α -地贫受试者中最主要的基因类型, 占 70.59% (12/17); 血红蛋白 H 病 ($\alpha\alpha$ 3.7/--SEA 和 $\alpha\alpha$ CS/--SEA) 次之, 占 29.41% (5/17)。

2.2 临床疗效指标分析 比较两组孕妇治疗前后临床疗效指标的变化, 结果如表 2 所示。治疗 4 周后, 治疗组 Hb 浓度平均上升 (5.15 ± 4.62) g/L, RBC 计数平均上升 (0.09 ± 0.22) $\times 10^{12}$ /L, 均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。两组孕妇治疗前后的平均红细胞容积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白(MCHC)、网织红细胞计数(RET)、未成熟网织红细胞成熟指数(IRF)以及血清铁蛋白(SF)水平无统计学意义上的差别。

2.3 临床疗效与地贫基因类型的关系 如表 3 所示, 在治疗组中, 基因类型为 β CD41-42(-TTCT)/ β^N 的地贫孕妇口服阿胶治疗的疗效最佳, 与其它类型的 β -地贫孕妇相比, 治疗后 Hb 浓度上升最显著, 差别有统计学意义; 治疗后 RBC 计数也呈现更为明显的上升趋势, 但差别无统计学意义, 考虑与样本量不足有关。

另外, 在治疗组中, β -地贫与 α -地贫孕妇治疗后的 Hb 浓度、RBC 计数、平均红细胞压积、网织红细胞计数、未成熟网织红细胞成熟指数等疗效指标均有所上升, 而血清铁蛋白水平均下降, 但差别不存在统计学意义(数据未列出)。

2.4 治疗前后 4 种珠蛋白 mRNA 表达水平的变化

2.4.1 治疗组与对照组的比较 见图 2 及表 4。从图 2 和表 4 的数据可知, 治疗 4 周后, 两组地贫孕妇的 α -、 β -、 γ - 和 δ - 珠蛋白 mRNA 表达水平均呈下降趋势, 考虑与孕妇在妊娠中晚期血容量增加, 生理性血液稀释有关。与对照组相比, 治疗组治疗后的 β -珠蛋白 mRNA 水平下降幅度明显减少, 差别有统计学意义; 而 γ - 和 δ - 珠蛋白 mRNA 水平下调幅度增大, α - 珠蛋白 mRNA 水平下降幅度略减少, 但差别均无统计学意义。结果提示, 地贫孕妇口服阿胶治疗可能有上调 β -珠蛋白链表达的作用。

表 1 两组研究对象入组时临床特征比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	治疗组 (n=34)	对照组 (n=24)	统计量	P 值
年龄(岁) ^T	27.97 ± 4.04	27.71 ± 3.605	0.254	0.800
孕前 BMI (kg/m ²) ^T	19.99 ± 5.50	18.38 ± 4.38	1.189	0.240
入组孕周(周) ^T	25.71 ± 2.419	24.46 ± 2.621	1.869	0.067
孕次 ^F				
3	4	4	0.182	0.856
2	10	5		
1	20	15		
产次 ^F				
1	9	4	0.441	0.661
0	25	20		
人流次数 ^F				
1	5	3	-0.178	0.860
0	29	21		
自然流产次数 ^F				
1	4	4	0.161	0.873
0	30	20		
教育水平 ^F				
初中	6	4	0.036	0.972
高中/中专	9	7		
大学	19	13		
地贫基因类型 ^F				
βCD41-42(-TTCT)/β ^N	13	4	-1.391	0.170
βIVS-II-654/β ^N	7	4		
β28(A-G)/β ^N	0	1		
βCD71-72(+A)/β ^N	1	0		
βCD17(A-T)/β ^N	3	6		
βCD27/28(+C)/β ^N	0	2		
αα/-SEA	6	6		
αα ^{3.7} /-SEA	2	1		
αα ^{CS} /-SEA	2	0		
Hb 浓度(×10 ¹² /L) ^T	87.09 ± 7.36	90.96 ± 7.55	-0.854	0.077
RBC 计数(g/L) ^T	4.06 ± 0.34	4.16 ± 0.37	-2.580	0.113

上标字母“T”的连续变量服从正态分布,进行t检验,结果用均数±标准差表示。上标字母“F”的分类变量进行 Fisher 精确检验

表 2 两组孕妇治疗前后疗效指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

项目	治疗组 (n=34)	对照组 (n=24)	t 值	P 值
ΔRBC(×10 ¹² /L)	0.09 ± 0.22	-0.08 ± 0.26	2.170	0.034
ΔHb(g/L)	5.15 ± 4.62	0.67 ± 3.76	2.565	0.013
ΔMCV(fl)	1.23 ± 1.54	1.42 ± 2.47	-0.356	0.724
ΔMCH(pg)	0.32 ± 0.47	0.43 ± 0.96	-0.555	0.581
ΔMCHC(g/L)	0.00 ± 7.35	-0.17 ± 7.69	-0.083	0.934
ΔSF(μg/L)	-10.98 ± 16.25	-13.99 ± 19.97	0.632	0.530
ΔRET(%)	8.36 ± 16.71	3.57 ± 22.80	0.892	0.377
ΔIRF(%)	0.91 ± 6.43	1.80 ± 8.45	-0.443	0.660

Δ 治疗前后的不同水平; RBC 红细胞计数; Hb 血红蛋白浓度; MCV, 平均红细胞容积; MCH, 平均红细胞血红蛋白; MCHC, 平均红细胞血红蛋白; SF, 血清铁蛋白; RET 网织红细胞计数; IRF 未成熟网织红细胞成熟指数

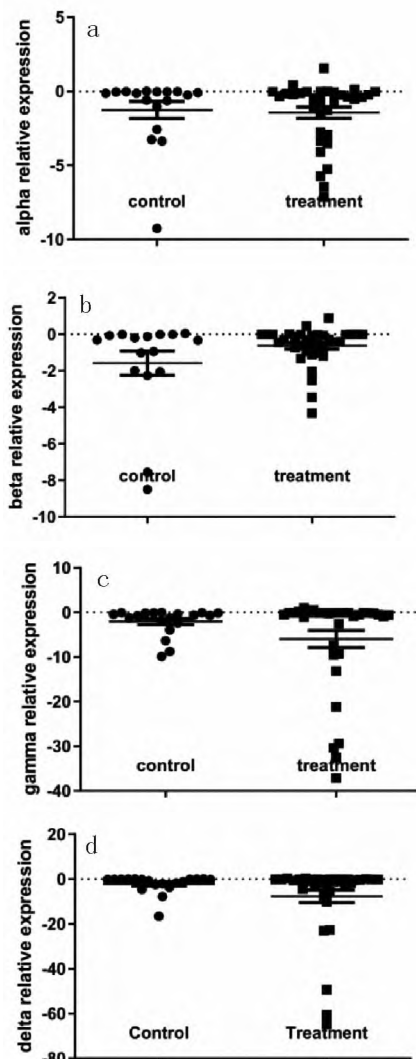
表 3 βCD41-42/β^N 地贫与其它 β-地贫治疗组治疗前后疗效指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

项目	βCD41-42/β ^N 地贫 (n=13)	其它 β-地贫 (n=11)	t 值	P 值
ΔHb(g/L)	6.54 ± 4.74	2.00 ± 4.12	2.387	0.039
ΔRBC(×10 ¹² /L)	0.13 ± 0.25	0.04 ± 0.16	1.088	0.084
ΔMCV(fl)	1.57 ± 1.81	0.76 ± 1.16	1.281	0.214
ΔMCH(pg)	0.47 ± 0.36	0.31 ± 0.47	0.948	0.353
ΔMCHC(g/L)	0.23 ± 6.22	0.73 ± 7.03	-0.184	0.856
ΔSF(μg/L)	-9.90 ± 13.70	-10.56 ± 7.34	0.144	0.887
ΔRET(%)	15.22 ± 15.97	5.48 ± 19.75	1.309	0.205
ΔIRF(%)	2.49 ± 5.79	0.57 ± 6.72	0.737	0.470

Δ 治疗前后的不同水平; RBC 红细胞计数; Hb 血红蛋白浓度; MCV, 平均红细胞容积; MCH, 平均红细胞血红蛋白; MCHC, 平均红细胞血红蛋白; SF, 血清铁蛋白; RET 网织红细胞计数; IRF 未成熟网织红细胞成熟指数

2.4.2 治疗组中 α-地贫亚组与 β-地贫亚组的比较 见图 3 及表 5。如图 3 和表 5 所示,在治疗组中,与 α-地贫孕妇相比,β-地贫孕妇治疗后的 β-珠蛋白 mRNA 表达水平下降幅度明显减少,且组间差异小,差别有统计学意义(P=0.039); δ-珠蛋白 mRNA 水平下降幅度也减少,但差别无统计学意义;而 α-和 γ-

珠蛋白 mRNA 表达水平下降幅度更大,区别无统计学意义。结果提示,口服阿胶治疗对 β-地贫孕妇的 β-珠蛋白 mRNA 表达有上调作用,且疗效的个体差异小。

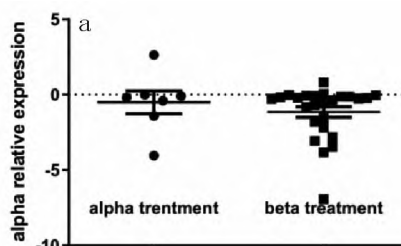


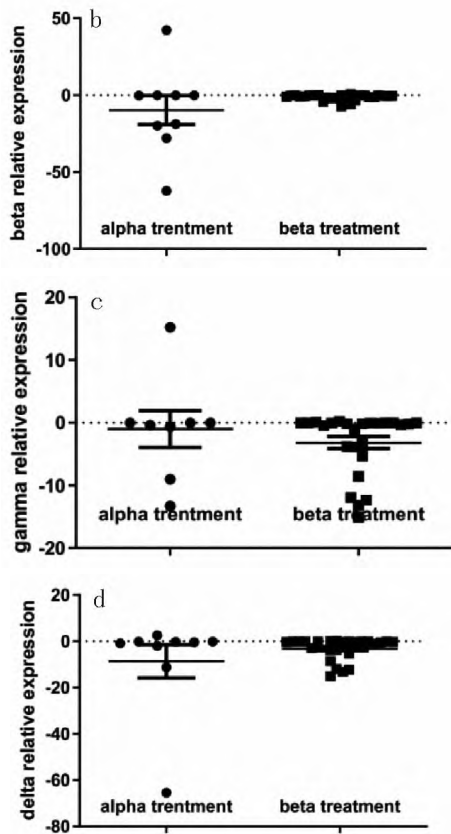
a、b、c、d 分别显示治疗组和对照组地贫孕妇治疗前后 α-、β-、γ-和 δ-珠蛋白水平变化
图 2 治疗前后 4 种珠蛋白 mRNA 水平的变化

表 4 对照组与治疗组治疗前后 4 种珠蛋白 mRNA 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

珠蛋白种类	治疗组 (n=34)	对照组 (n=24)	t 值	P 值
Δα 珠蛋白	-1.322 ± 5.847	-1.258 ± 3.773	-0.093	0.927
Δβ 珠蛋白	-1.551 ± 7.450	-0.431 ± 1.128	-1.865	0.044
Δγ 珠蛋白	-2.111 ± 9.534	-5.117 ± 102.941	1.553	0.128
Δδ 珠蛋白	-2.249 ± 17.165	-7.644 ± 289.538	1.753	0.872

统计学方法为 T 检验: 双样本异方差假设。Δ 治疗前后的不同水平





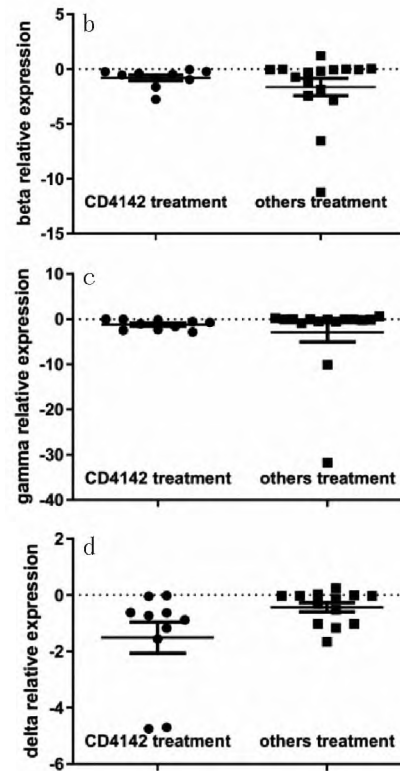
a、b、c、d 分别显示治疗组中 α -地贫孕妇和 β -地贫孕妇治疗前后 α -、 β -、 γ -和 δ -珠蛋白水平变化。“alpha treatment”代表治疗组中基因型为 α -地贫的亚组，“beta treatment”代表治疗组中基因型为 β -地贫的亚组

图 3 治疗组治疗前后 4 种珠蛋白 mRNA 水平的变化

表 5 治疗组治疗前后 4 种珠蛋白 mRNA 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

珠蛋白种类	α -地贫 ($n=10$)	β -地贫 ($n=24$)	t 值	P 值
$\Delta\alpha$ 珠蛋白	-0.581 ± 4.684	-1.035 ± 2.845	0.479	0.323
$\Delta\beta$ 珠蛋白	-10.830 ± 892.414	-1.318 ± 3.784	1.900	0.039
$\Delta\gamma$ 珠蛋白	-1.157 ± 80.091	-2.758 ± 20.868	0.456	0.331
$\Delta\delta$ 珠蛋白	-9.621 ± 526.245	-2.718 ± 20.821	0.841	0.214

统计学方法为 t 检验: 双样本异方差假设。 Δ 治疗前后的不同水平



a、b、c、d 分别显示治疗组中基因型为 $\beta CD41-42(-TTCT)/\beta^N$ 的地贫孕妇和其他基因型 β -地贫孕妇治疗前后 α -、 β -、 γ -和 δ -珠蛋白水平变化。“CD4142 treatment”代表治疗组中基因型为 $\beta CD41-42/\beta^N$ 的亚组，“other treatment”代表治疗组中除 $\beta CD41-42/\beta^N$ 以外其他 β -地贫基因型的亚组

图 4 治疗组治疗前后 4 种珠蛋白 mRNA 水平的变化

表 6 治疗组治疗前后 4 种珠蛋白 mRNA 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

珠蛋白种类	$\beta CD41-42/\beta^N$ 地贫 ($n=13$)	其他 β -地贫 ($n=11$)	t 值	P 值
$\Delta\alpha$ 珠蛋白	-1.019 ± 1.976	-4.899 ± 152.145	1.244	0.116
$\Delta\beta$ 珠蛋白	-0.847 ± 0.749	-1.625 ± 10.502	0.879	0.195
$\Delta\gamma$ 珠蛋白	-1.046 ± 1.028	-3.119 ± 75.088	0.886	0.195
$\Delta\delta$ 珠蛋白	-1.549 ± 3.450	-0.334 ± 0.231	-1.915	0.044

统计学方法为 t 检验: 双样本异方差假设。 Δ 治疗前后的不同水平

2.4.3 治疗组中基因型为 $\beta CD41-42/\beta^N$ 的地贫孕妇与其他基因型 β -地贫孕妇比较

见图 4 及表 6。从图 4 和表 6 的数据可知,口服阿胶治疗 4 周后,与其他基因类型的 β -地贫孕妇相比,基因类型为 $\beta CD41-42(-TTCT)/\beta^N$ 的地贫孕妇的 α -、 β -和 γ -珠蛋白 mRNA 表达水平下降幅度小,且组间差异小,但差别无统计学意义。与其他基因类型的 β -地贫孕妇相比, $\beta CD41-42(-TTCT)/\beta^N$ 的地贫孕妇治疗后的 δ -珠蛋白 mRNA 表达水平下降幅度显著增大,且组间差异大,差别有统计学意义,提示阿胶治疗对 $\beta CD41-42(-TTCT)/\beta^N$ 地贫贫血孕妇 δ -珠蛋白 mRNA 表达有明显的下调作用。



2.5 WB 检测结果

如图 5 所示,采用 WB 法能检测到特异的阳性条带。如表 7 所示,治疗后,两组孕妇的 4 种珠蛋白的蛋白表达量均较治疗前下降,与对照组相比,治疗组的 4 种珠蛋白的表达量均下降幅度减少,但只有 β -珠蛋白的差别有统计学意义,与 qPCR 检测结果相符。

进一步分析不同地贫基因类型的受试者治疗前后 4 种珠蛋白表达水平的差别。如表 8 和表 9 所示,在 β -地贫受试者中,治疗组治疗后 β -珠蛋白蛋白量下降幅度较对照组减少;在 α -地贫受试者中,治疗组治疗后 α -珠蛋白蛋白量下降幅度较对照组减少,差别均有统计学意义。在基因型为 $\beta CD41-42(-TTCT)/\beta^N$ 的受试者中,与对照组相比,治疗组治疗后 4 种珠蛋白表达量不存在统计学意义上的差别(数据未列出)。

3 讨论

正常成人 Hb 是由 2 条 α 链和 2 条非 α 链(β 、 δ 、 γ)组成的四聚体,由主要成人血红蛋白(HbA, $\alpha_2\beta_2$)、次要成人血红蛋白(HbA2, $\alpha_2\delta_2$)和胎儿血红蛋白(HbF, $\alpha_2\gamma_2$)组成,其中, HbA 占 95% 以上,在子宫内, HbF 是主要的 Hb,但在成人 Hb 中只占不足 2%^[8]。 β -地贫是由于 β 珠蛋白基因的缺失或突变造成 β 链合

成缺乏或减少, α 链相对增多, γ 和 δ 链代偿性合成增多, 以致 HbA($\alpha 2\beta 2$) 合成减少, HbA2($\alpha 2\delta 2$) 和 HbF($\alpha 2\gamma 2$) 合成相对增多。而 α -地贫则是由于 α 珠蛋白基因的缺陷造成 α 链合成缺乏或减少, β 链相对增多。 β -地贫过剩的 α 链和 α -地贫过剩的 β 链分别聚合成四聚体 $\alpha 4$ 和 $\beta 4$, 沉积于红细胞膜, 影响红细胞功能沉积于红细胞膜, 诱发氧自由基反应, 导致免疫损伤, 红细胞变形能力和机械稳定性下降, 以致发生溶血和无效造血^[8-9]。

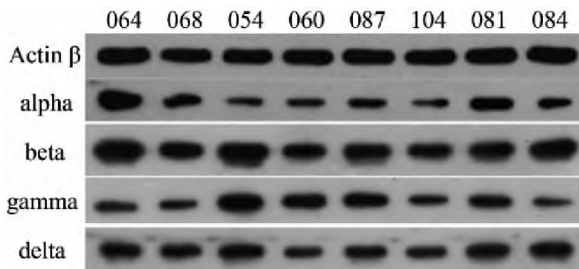


图 5 部分样本的珠蛋白 WB 条带

表 7 所有受试者治疗前后 4 种珠蛋白量的变化($\bar{x} \pm s$)

珠蛋白种类	对照组	治疗组	t 值	P 值
$\Delta\alpha$ 珠蛋白	-0.869 ± 0.195	-0.658 ± 0.119	0.941	0.830
$\Delta\beta$ 珠蛋白	-1.469 ± 0.235	-0.858 ± 0.219	1.934	0.042
$\Delta\gamma$ 珠蛋白	-1.559 ± 0.078	-1.329 ± 0.107	1.064	0.633
$\Delta\delta$ 珠蛋白	-3.131 ± 2.540	-2.654 ± 3.075	1.172	0.212

Δ 治疗前后的不同水平

表 8 β -地贫孕妇治疗前后 4 种珠蛋白量的变化($\bar{x} \pm s$)

珠蛋白种类	对照组	治疗组	t 值	P 值
$\Delta\alpha$ 珠蛋白	-2.116 ± 0.365	-1.551 ± 0.342	1.114	0.243
$\Delta\beta$ 珠蛋白	-1.213 ± 0.335	-0.513 ± 0.319	2.124	0.030
$\Delta\gamma$ 珠蛋白	-1.878 ± 0.068	-1.323 ± 0.401	1.328	0.201
$\Delta\delta$ 珠蛋白	-1.001 ± 0.511	-0.658 ± 0.371	0.873	0.762

Δ 治疗前后的不同水平

表 9 α -地贫孕妇治疗前后 4 种珠蛋白量的变化($\bar{x} \pm s$)

珠蛋白种类	对照组	治疗组	t 值	P 值
$\Delta\alpha$ 珠蛋白	-1.442 ± 0.651	-0.757 ± 0.548	1.901	0.041
$\Delta\beta$ 珠蛋白	-2.014 ± 0.437	-1.813 ± 0.319	1.124	0.313
$\Delta\gamma$ 珠蛋白	-1.017 ± 0.362	-1.319 ± 0.511	1.513	0.114
$\Delta\delta$ 珠蛋白	-1.606 ± 0.402	-1.252 ± 0.548	1.141	0.235

Δ 治疗前后的不同水平

现已证实 α 与非 α 珠蛋白链的不平衡程度与疾病的严重程度成正比, 因此, 纠正珠蛋白链失衡是地贫治疗的关键环节, 药物调控珠蛋白基因表达是研究热点。前期大量研究报道, 药物如 γ 珠蛋白基因活化剂或 α 珠蛋白链合成抑制剂, 能通过促进 γ -珠蛋白链合成或抑制 α -珠蛋白链合成, 改善地贫患者的溶血和贫血^[10-11]。然而, 随着研究的深入, 研究者发现, γ 珠蛋白基因活化剂虽能提高 β -地贫患者的 HbF($\alpha 2\gamma 2$) 水平, 但并不是总能提高 Hb 水平, 疗效个体差异大, 且有效剂量接近中毒剂量, 远期疗效不确切。研究者推测, 这可能由于 HbF 只在不足 2% 的成人血细胞中表达, 因此导致 γ 珠蛋白基因活化剂在安全剂量范围内难以诱导足量的 HbF 合成, 从而未能提高 Hb 水平^[11]。而且, 这两类药物有骨髓抑制或潜在致癌致畸等副作用, 不适合孕妇使用。

更值得注意的是, 高 HbF 水平与地贫孕妇的自然流产发生率呈正相关关系。研究者推测这是由于 HbF 较 HbA、HbA2 有更高的氧亲和力, 不利于氧运送至组织细胞局部时解离, 导致组织细胞缺氧^[12]。因此, γ 珠蛋白基因活化剂仅提高 HbF 水平, 对改

善 β -地贫患者妊娠结局不仅作用不大, 反而可能有害, 提高 β -地贫患者的 β 珠蛋白链水平和提高 α -地贫患者的 α 珠蛋白链水平才可能是真正有效的治疗策略^[13]。

中医将地贫归于“血虚”“血证”“虚黄”“童子劳”等范畴, 认为地贫的病因与先天禀赋不足, 后天失养相关, 主要累及肾、脾、心、肝等脏腑, 病变涉及气、血、阴、阳等范畴。从气血阴阳辨证, 患者首发证候多为气血两虚证, 到疾病晚期, 可转化为阴阳两虚^[14]。妊娠后母体脏腑经络的阴血下注冲任, 以养胎元, 出现阴血聚于下, 阳气浮于上, 甚至阳气偏亢的状态, 亦即妊娠期间整个机体出现“血分不足, 气偏有余”的生理特点^[15]。对于血虚证患者, 妊娠后可进一步加重血虚。

中药阿胶作为补血名药在中医临床已使用 2000 多年, 具有补血、滋阴、止血的功效。常用于治疗缺铁性贫血、再生障碍性贫血等多种血液系统疾病, 还常用于先兆流产的安胎止血治疗^[16-17], 安全有效。大量药理学研究证明阿胶既有促进红细胞生成、升高 Hb 水平的功效, 又有抑制血小板粘附, 降低血液粘稠度的作用^[16], 这与妊娠期“血分不足”、“血液高凝”的生理特点不谋而合。前期研究还显示, 阿胶的补血作用具有多环节和多靶点的作用特点, 其有效成分, 如胶原蛋白、糖胺多糖等, 具异源诱导物质的特性, 可作用于从“全能干细胞”到各系母细胞的整个增殖发育过程, 促进造血干细胞分化, 有类似基因诱导的作用^[18-19]。但其是否具有促进珠蛋白链合成、调节珠蛋白链比例失衡的作用尚未见有文献报道。

本研究发现: 与安慰剂对照组相比, 地贫贫血孕妇口服阿胶治疗 4 周后, 能明显改善贫血。 β -地贫受试者中 $\beta CD41-42(-TTCT)/\beta^N$ 是最常见的基因类型, 且疗效最佳, 这与前期研究的结果一致^[20]。口服阿胶治疗对地贫贫血孕妇体内 4 种珠蛋白链的调节作用受地贫基因类型的影响: 对 β -地贫孕妇的 β -珠蛋白链表达有明显的上调作用, 对 $\beta CD41-42(-TTCT)/\beta^N$ 地贫孕妇的 δ -珠蛋白水平有下调作用; 对 α -地贫孕妇, 则有上调 α -珠蛋白链表达的作用。因此推测, 地贫孕妇口服阿胶治疗可能有调节 α 和非 α 珠蛋白链失衡的作用, 而最终改善贫血, 与 γ 珠蛋白基因活化剂或 α 珠蛋白链合成抑制剂相比, 理论上更有益于妊娠。

本研究在前期研究的基础上^[6-20], 在严格排除缺铁性贫血、妊娠周期等影响因素后进行疗效观察, 再次肯定了地贫孕妇口服阿胶治疗妊娠期贫血的疗效, 并首次从 mRNA 和蛋白两个水平, 探讨阿胶治疗对不同基因类型的地贫贫血孕妇珠蛋白表达水平的调控作用, 为阿胶在地贫治疗领域的临床应用提供理论基础, 可望开拓地贫孕妇妊娠期贫血治疗策略的新思路。但由于受试者的地贫基因类型较多, 基于基因类型的分组分析, 样本量相对不足, 在一定程度上影响结果的准确性。为了制定有效和安全的治疗策略, 以改善地贫贫血孕妇的妊娠结局, 日后需要大样本的多中心临床试验进一步验证研究结果。

参考文献:

[1] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of alpha- and beta- globin gene mutations in 14 332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.
 [2] Leung TY, Lao TT. Thalassaemia in pregnancy[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012, 26(1): 37.
 [3] Amooee S, Samsami A, Jahanbakhsh J, et al. The pregnancy outcome in patients with minor beta-thalassaemia[J]. Iran J Reprod Med, 2011, 9(1): 9.
 [4] Naik R P, Lanzkron S. Baby on board: what you need to know about pregnancy in the hemoglobinopathies[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012, 2012: 208.

- [5] Voskaridou E, Balassopoulou A, Boutou E, et al. Pregnancy in beta - thalassemia intermedia: 20 - year experience of a Greek thalassemia center[J]. Eur J Haematol, 2014, 93(6):492.
- [6] Li Y, He H, Yang L, et al. Therapeutic effect of Colla corii asini on improving anemia and hemoglobin compositions in pregnant women with thalassemia[J]. Int J Hematol, 2016, 104(5):559.
- [7] 张之南, 沈 彬, 等. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 29.
- [8] Muncie H J, Campbell J. Alpha and beta thalassemia[J]. Am Fam Physician, 2009, 80(4):339.
- [9] Lee J S, Cho S I, Park S S, et al. Molecular basis and diagnosis of thalassemia[J]. Blood Res, 2021, 56(S1):S39.
- [10] Costa D, Capuano M, Sommese L, et al. Impact of epigenetic mechanisms on therapeutic approaches of hemoglobinopathies[J]. Blood Cells Mol Dis, 2015, 55(2):95.
- [11] Durlak M, Fugazza C, Elangovan S, et al. A Novel High - Content Immunofluorescence Assay as a Tool to Identify at the Single Cell Level gamma - Globin Inducing Compounds[J]. PLoS One, 2015, 10(10):e141083.
- [12] Voskaridou E, Balassopoulou A, Boutou E, et al. Pregnancy in beta - thalassemia intermedia: 20 - year experience of a Greek thalassemia center[J]. Eur J Haematol, 2014, 93(6):492.
- [13] Musallam K M, Taher A T, Cappellini M D, et al. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with beta - thalassemia[J]. Blood, 2013, 121(12):2199.
- [14] 黄振翹, 梁 冰, 陈信义, 等. 实用中医血液病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 175.
- [15] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017.
- [16] 刘谷全. 中药阿胶的临床应用及药理作用[J]. 临床合理用药杂志, 2014(35):74.
- [17] 常晓慧, 向 阳. 阿胶及其制剂在血液系统疾病中的应用[J]. 河南中医, 2011, 31(5):538.
- [18] Wang D, Ru W, Xu Y, et al. Chemical constituents and bioactivities of Colla corii asini[J]. Drug Discov Ther, 2014, 8(5):201.
- [19] Wu H, Ren C, Yang F, et al. Extraction and identification of collagen - derived peptides with hematopoietic activity from Colla Corii Asini[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 182:129.
- [20] Li Y, Zhang Z, Yang L, et al. Colla corii asini might upregulate ZNF471 and THOC5 by KRAB domain - containing zinc - finger protein pathway and THO complex subunit 5 pathway to improve anemia of pregnant women with beta - thalassemia[J]. Ann Hematol, 2019, 98(8):1813.

当归六黄汤对气阴两虚型 2 型糖尿病患者动态葡萄糖图谱影响的临床研究

马 倩, 胡永慧, 陈 睿, 吴晓明, 翟仰魁, 周 玉, 潘从清*

(天津医科大学朱宪彝纪念医院 天津市内分泌研究所)

国家卫健委激素与发育重点实验室 天津市代谢性疾病重点实验室 天津 300134)

摘要: 目的 观察当归六黄汤对气阴两虚型 2 型糖尿病(T2DM)患者动态葡萄糖图谱(AGP)的影响。方法 采用随机数字表法将 62 例气阴两虚型 2 型糖尿病患者分为对照组和观察组, 每组 31 例。对照组予以盐酸二甲双胍缓释片、阿卡波糖片联合门冬胰岛素 30 注射液调控血糖; 观察组在对照组降糖方案基础上加用当归六黄汤配方颗粒。两组疗程均为 14 天。治疗前后分别评估中医证候积分、胰岛素用量并分析受试者佩戴瞬感扫描式葡萄糖监测(FGM)设备提供的 AGP 报告相关指标: 平均血糖水平(MBG)、血糖水平标准差(SDBG)、变异系数(CV)、预估糖化血红蛋白(eHbA1c)、平均血糖波动幅度(MAGE)、日间血糖平均绝对差(MODD)、葡萄糖高于目标范围时间(TAR)、葡萄糖在目标范围内时间(TIR)、葡萄糖低于目标范围时间(TBR)。结果 62 例患者中, 其中 60 例完成试验。两组治疗后比较, 观察组中医证候积分改善明显优于对照组($P < 0.01$), 观察组胰岛素用量较对照组减少($P < 0.05$), AGP 报告显示, 观察组 MBG、SDBG、CV、eHbA1c、MODD、MAGE、TAR、TBR 与对照组相比均下降, 其中 eHbA1c、MODD、MAGE、TBR 下降有统计学意义($P < 0.05$), TIR 增加显著($P < 0.01$)。结论 当归六黄汤可以增加气阴两虚型 T2DM 患者的目标范围内时间, 减少低血糖发生率, 改善日内、日间血糖波动水平及长期平均血糖水平, 减轻临床症状。

关键词: 当归六黄汤; 气阴两虚型; 2 型糖尿病; AGP; 血糖波动; TIR; 低血糖

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2022.03.33

中图分类号: R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2022)03-0631-05

Clinical study on the effect of Danggui Liu Huang Decoction on the ambulatory glucose profiles of type 2 diabetes mellitus patients with deficiency type of Qi and Yin

收稿日期: 2021-07-11; 修订日期: 2022-02-26

基金项目: 国家自然科学基金(81873304)

作者简介: 马 倩(1984-), 女(汉族), 河北衡水人, 天津医科大学朱宪彝纪念医院 天津市内分泌研究所 国家卫健委激素与发育重点实验室 天津市代谢性疾病重点实验室在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事中西医结合防治糖尿病及其并发症的基础与临床研究工作。

* 通讯作者简介: 潘从清(1965-), 男(汉族), 甘肃民勤人, 天津医科大学朱宪彝纪念医院 天津市内分泌研究所 国家卫健委激素与发育重点实验室 天津市代谢性疾病重点实验室主任医师, 博士研究生导师, 博士学位, 主要从事中西医结合防治糖尿病及其并发症的基础与临床研究工作。