

槐杞黄颗粒辅助治疗 PNS 患儿血清 IL-21 及 IFN- γ 的变化*

赵晶莹^① 赵成广^① 吴玉斌^①

【摘要】 目的: 观察原发性肾病综合征(PNS) 患儿采用槐杞黄颗粒辅助治疗前后血清白细胞介素-21(IL-21) 及干扰素- γ (IFN- γ) 的动态变化。方法: 2010 年 6 月 31 日~2011 年 12 月 31 日收治于中国医科大学附属盛京医院小儿肾脏风湿科的 PNS 患儿 50 例, 随机分为两组: 泼尼松联合槐杞黄颗粒治疗组 24 例(A 组), 单纯泼尼松治疗组 26 例(B 组)。观察治疗前和治疗 1 个月、3 个月后的外周血中 IL-21 及 IFN- γ 的变化。选取健康体检儿童 15 名为健康对照组(C 组)。采用酶联免疫吸附法测定血清中 IL-21 及 IFN- γ 的浓度。结果: (1) A、B 组 IL-21 均显著高于 C 组($P < 0.05$), 治疗 1 个月后两组 IL-21 均显著下降, 组间差异无统计学意义, 至 3 个月后 A 组显著降低, 并低于 B 组($P < 0.05$), 仍未达 C 组水平。(2) A、B 组 IFN- γ 均低于 C 组($P < 0.05$), 治疗 1 个月后两组 IFN- γ 显著升高, 组间差异无统计学意义, 至 3 个月后 A 组显著升高, 并高于 B 组($P < 0.05$), 接近 C 组水平。结论: PNS 患儿治疗前 IL-21 的升高和 IFN- γ 的降低可能参与 PNS 的发病, 槐杞黄辅助治疗可以下调肾病患儿 IL-21 的表达, 上调 IFN- γ 的表达, 纠正 Th1/Th2 失衡, 从而发挥免疫调节作用。

【关键词】 原发性肾病综合征 IL-21 IFN- γ 槐杞黄颗粒

Effect of Huaiqihuang on the Change of IL-21 and IFN- γ in Children with Primary Nephrotic Syndrome

ZHAO Jingying ZHAO Chengguang WU Yubin

Department of Pediatric Nephrology and Rheumatology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang (110004)

ABSTRACT Objective: To observe the dynamic changes of serum leukocyte interleukin-21 (IL-21) and interferon- γ (IFN- γ) in children with primary nephrotic syndrome (PNS) at pre- and post-treatment assist with huaiqihuang particles. **Methods:** The study cohort consisted of 50 children with PNS who were randomly divided into group A (24 cases) and group B (26 cases). Group A was treated with prednisone and huaiqihuang particles, while group B only was treated with prednisone. 15 healthy children were studied as the healthy control group (group C). Observe the serum IL-21 and interferon- γ level before the treatment, 1 month and 3 months after treatment. Serum IL-21 and interferon- γ was tested by enzyme linked immunosorbent assay. **Results:** 1) Before treatment, the serum level of IL-21 of Group A and B was significantly higher than group C ($P < 0.05$), 1 months after treatment the two groups were significantly decreased, there were no differences between the two groups, After 3 months, group A was significantly reduced, and lower than group B ($P < 0.05$), but still did not reach the level of group C. 2) Before treatment, IFN- γ of Group A and B were lower than group C ($P < 0.05$), 1 months after treatment the two groups were increased, there were no differences between the two groups, After 3 months, group A was significantly increased, and higher than group B ($P < 0.05$), close to the level of group C. **Conclusion:** The increased of IL-21 and decreased of IFN- γ may play an important role in the pathogenesis of PNS. The adjuvant therapy of Huaiqihuang can downregulate secretion of IL-21 and upregulate secretion of IFN- γ , regulate Th1/Th2 balance and it plays an important role in immunomodulatory effects

KEY WORDS Primary nephrotic syndrome IL-21 IFN- γ Huaiqihuang particles

原发性肾病综合征(PNS) 是儿童较常见的肾脏疾病, 有研究显示 PNS 患者细胞比例失衡导致 Th1/Th2 类细胞因子分泌失衡, 且以 Th2 类细胞因子占优势^[1]。近年来 Parrish - Novak 等^[2] 发现 IL-21 主要

由活化的 CD₄⁺T 细胞产生, 可促进 Th 向 Th2 分化, 因此我们推测 IL-21 可能在 PNS 的发病中起一定的作用。IFN- γ 主要通过参与 Th 向 Th1 分化来调节免疫应答, 能增强多种细胞表面分子的表达从而发挥重要的免疫调节作用。槐杞黄颗粒具有抗炎、抗过敏、增

* 本课题为中国医科大学附属盛京医院科研基金资助项目
① 中国医科大学附属盛京医院小儿肾脏风湿免疫内科 (沈阳 110004)

强免疫力的功效,用于呼吸道感染^[3],抗肿瘤免疫调节治疗均起到良好的效果^[4,5]。本实验我们检测了 PNS 患儿 Th1 和 Th2 细胞分泌的相关细胞因子 IFN- γ 和 IL-21 的水平,同时研究观察枸杞黄颗粒辅助治疗前后二者的变化,并探讨枸杞黄颗粒可能的免疫调节机制。

资料与方法

1 研究对象 2010 年 6 月~2011 年 12 月收治于中国医科大学附属盛京医院小儿肾脏风湿科的 PNS 患儿 50 例,均符合中华医学会儿科分会肾脏病学组 2001 年 PNS 诊断标准^[6],除外先天性和继发性肾病综合征 6 个月内未使用过免疫抑制剂和免疫调节剂者。随机分为两组:泼尼松联合枸杞黄颗粒治疗组 24 例(A 组),男 15 例,女 9 例,年龄 2 岁~14 岁,平均 4.7 岁;单纯泼尼松治疗组 26 例(B 组)。男 20 例,女 6 例,年龄 2 岁~14 岁,平均 5.1 岁。采用酶联免疫吸附法测定治疗前和治疗 1 个月、3 个月后外周血中 IL-21 及 IFN- γ 的浓度,观察其变化。另外在征得家属同意的情况下,选取同期就诊于我院发育儿科健康体检儿童 15 名为对照组(C 组)。男 10 例,女 5 例,年龄 2 岁~12 岁,平均 4.9 岁。两组年龄、性别差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 研究方法

2.1 治疗 PNS 患儿的糖皮质激素治疗采用中华医学会儿科学分会肾脏病学组 2001 年《小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗》的激素治疗方案^[6]。枸杞黄组加用枸杞黄颗粒(江苏启东盖天力药业有限公司,生产批号: B20020074): < 3 岁者,5 g/次; \geq 3 岁者,10 g/次;均每日 2 次口服,疗程 3~6 个月。

2.2 主要试剂 人 IL-21 定量酶联检测试剂盒、人 IFN- γ 定量酶联检测试剂盒,均购于美国 R&D 公司。

2.3 标本留取 治疗前及治疗后 1、3 个月,全部入选患者及对照者均于清晨空腹采血 5 ml,离心后取上清,置于 PC 管中 -20 $^{\circ}$ C 保存,标本一次性进行测定。IL-21 和 IFN- γ 均采用 ELISA 法检测,药盒购自美国 R&D 公司。

3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示,治疗前后以及两组之间的比较采用 t 检验,取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 IL-21 枸杞黄辅助治疗组、单纯泼尼松组治疗前 IL-21 显著高于对照组($P < 0.05$);治疗 1 个月

后,显著下降,但未至正常水平,组间差异无统计学意义;至 3 个月后枸杞黄组显著降低,并低于激素组($P < 0.05$),仍未至正常水平。

2 IFN- γ 枸杞黄辅助治疗组、单纯泼尼松组治疗前 IFN- γ 低于对照组($P < 0.05$);治疗 1 个月后,有所上升,未至正常水平,组间差异无统计学意义;3 个月后枸杞黄组显著上升,并高于激素组($P < 0.05$),并接近正常水平。见表 1。

表 1 各组治疗前后细胞因子的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n		IL-21	IFN- γ
A 组	24	治疗前	926.5 \pm 253.1 ^{Δ}	13.7 \pm 6.5 ^{Δ}
		1 个月	663.0 \pm 69.4 [#]	15.6 \pm 4.3 [#]
		3 个月	521.0 \pm 34.2 [*]	20.6 \pm 5.3 [*]
B 组	26	治疗前	974.2 \pm 198.4 ^{Δ}	14.5 \pm 7.0 ^{Δ}
		1 个月	701.0 \pm 16.7 [#]	16.0 \pm 5.6 [#]
		3 个月	600.0 \pm 96.8	18.3 \pm 3.2
C 组	15		458.0 \pm 67.2	20.8 \pm 9.0

注:与治疗前比较,[#] $P < 0.05$;与同期 B 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 C 组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

讨 论

有报道临床应用左旋咪唑联合糖皮质激素治疗 PNS,通过选择性调节细胞因子(IL-18)的基因转录,来增加 Th1 的数目并且下调反应过强的 Th2,使得 Th1/Th2 趋于回复正常,降低 PNS 复发次数并延长缓解期^[7],说明 Th1/Th2 的异常参与了 PNS 的发病过程。无论是 Th1 细胞还是 Th2 细胞,其优势的判别取决于各类细胞因子网络关系变化综合效应的结果,只测定其中一种细胞因子来推测整个过程或整个网络作用的结论很可能出现偏差。因此,只有对 PNS 中的这两类细胞所分泌的细胞因子进行检测和分析才能作出更准确全面的判断。

IL-21 是由活化的 CD4⁺T 细胞合成和分泌,与 IL-2、IL-15 同为细胞因子受体 γ_c 家族的单链蛋白质^[2]。IL-21 通过 JAK-STAT 途径传递信号诱导 Th 向 Th2 应答分化,抑制 Th1 应答,从而具有调节 Th1、Th2 细胞平衡作用^[8],以往有研究发现 IL-21 及其受体参与了多种自身免疫性疾病的发生^[9,10],小鼠肿瘤细胞种植实验证明 IL-21 还可以诱导抗肿瘤免疫反应,抑制肿瘤细胞的增殖^[11],预示 IL-21 是一个有潜力的用于免疫治疗的细胞因子。近期 Bubier 等^[12]的动物实验观察到高表达 IL-21 的 BXSb-Yaa 狼疮小鼠有肾小球肾炎、肾病综合征的相关表现,还有研究资料显示 IL-21 水平下降^[13],会导致有抗过敏作用的 IgG4 产生下降,同时 IL-21 能下调 IL-4 诱导的 IgE 产生^[14],联合分析 Abbate^[15]提出的 PNS 患者 T 细胞能自发地产生 IL-13,诱导 IgE 及 IgG4 的产生,间接

提示 IL-21 参与 PNS 的发病过程。不断研究证实 IL-6 能诱导 IL-21 的表达^[16-18], 在 IL-6 诱导下 Th17 自分泌 IL-21, 并调节 T 细胞向 Th17 细胞分化; 而 PNS 患者外周血 IL-6 浓度增加, 单核细胞 IL-17mRNA 表达增加^[19], 从而进一步证实 IL-21 在调节 PNS 患者免疫中起到一定作用。本研究中我们发现 PNS 患儿血清 IL-21 水平显著高于正常人水平, 表明 IL-21 在 PNS 患者体内产生增多, 推测在免疫紊乱的 PNS 患者体内, 大量 CD₄⁺T 淋巴细胞浸润, Th2 细胞增生, 随着 IL-21 水平的升高, 更加剧了自身免疫反应及免疫损伤。

IFN- γ 是 T 细胞和自然杀伤细胞产生的一种淋巴因子, 主要通过参与 Th 向 Th1 分化来调节免疫应答, 能增强多种细胞表面分子的表达从而发挥重要的免疫调节作用。Hitomi 等^[20] 实验发现原发性肾病综合征患儿血清中 IFN- γ 水平低于健康对照组或非 PNS 患儿。本实验同样证实这一点, 提示 IFN- γ 参与了 PNS 的发病过程, 最近有国外学者^[21] 发现 IgA 肾病患者外周血清 IFN- γ 水平降低, 提示 T 辅助细胞亚群失衡与 IgA 肾病的发生密切相关, IL-12 能促进 Th1 的增殖, 诱导 NK 细胞和 T 细胞产生以 IFN- γ 为主的细胞因子, 此外 IFN- γ 又可以提高吞噬细胞产生 IL-12 的能力, 从而形成一个正反馈机制^[22]。而在肾病综合征患儿体内 IL-12 受体 (IL-12R) mRNA 降低^[23], 这或许从一个角度可以解释肾病患者 IFN- γ 的降低。

IFN- γ 和 IL-21 分别由 Th1、Th2 细胞分泌, Th1 和 Th2 细胞通过分泌细胞因子, 彼此进行交叉调节, 相互抑制, 若机体免疫系统选择了某一亚群为主的应答, 这种 Th 细胞就会正反馈地加强自身优势, 压抑另一亚群发展, Strengell 等^[24] 研究发现 IL-21 可以上调 T-bet 基因合成进而增强 Th1 细胞免疫反应, 同时 IL-21 亦可以抑制幼稚 T 细胞向表达 IFN- γ 的 Th1 细胞转化, 参与 Th2 免疫应答, 由此我们可以看出二者之间存在着共同的发病机制。槐杞黄由中药槐耳、枸杞和黄精等成分组成。自 1974 年首次报道免疫机制参与 PNS 发病以来, PNS 患儿机体免疫状态, 尤其是 Th1/Th2 免疫平衡及细胞因子成为研究的热点。本研究通过比较干预前后 IFN- γ 、IL-21 的水平, 证实 PNS 患儿细胞免疫功能的紊乱, 由于槐杞黄调节了 Th1、Th2 细胞功能, 使 PNS 原来紊乱的 Th1/Th2 失衡状态得以恢复, 这对 PNS 缓解具有重要作用。因此推测槐杞黄可能通过下调或抑制 Th 细胞相关转录因子的表达, 影响 Th 细胞分化过程中的某个环节或几个环节, 阻断 Th 细胞的活化, 同时槐杞黄颗粒治疗组在治疗后

3 个月时血清 IL-21、IFN- γ 较同期激素治疗组前下降明显, 但仍未达正常水平, 提示槐杞黄颗粒可协同激素在一定程度上抑制 IL-21 和 IFN- γ 的产生, 减轻免疫因子和炎症因子对肾脏组织的损伤, 但需要较长期服用。

参 考 文 献

1. Kanai T, Shiraishi H. Th2 cells predominate in idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clinical and Experimental Nephrology* 2010, 14(6): 578-583.
2. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, et al. Interleukin-21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000, 408(6808): 57-66.
3. 张琴珍, 尚云晓. 槐杞黄对哮喘大鼠 BALF 中 IL-5 及 IFN- γ 的影响. *实用药物与临床* 2011, 14(1): 4-6.
4. 王晓伟, 杨丽君, 邱法波, 等. 槐耳颗粒对原发性肝癌术后 Th1/Th2 漂移的影响. *中国现代药物应用* 2008, 2(9): 7-9.
5. 欧阳雁红, 李宝山, 袁素琴, 等. 槐耳颗粒治疗消化系统恶性肿瘤 102 例临床疗效观察. *现代医药卫生* 2011, 27(6): 814-881.
6. 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病临床分类、诊断及治疗. *中华儿科杂志* 2001, 39(12): 746-749.
7. Davin JC, Merkus MP. Levamisole in steroid-sensitive nephrotic syndrome of childhood: the lost paradise. *Pediatr Nephrol* 2005, 20(1): 10-14.
8. Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I, et al. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood* 2008, 112(8): 3339-3347.
9. Sawalha AH, Kaufman KM, Kelly JA, et al. Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008, 67(4): 458-461.
10. Webb R, Merrill JT, Kelly JA, et al. A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009, 60(8): 2402-2407.
11. Kasakura S. IL-21 and IL-21 receptor immunomodulatory and antitumor effects. *Biotherapy* 2007, 21(2): 83-91.
12. Bubier JA, Sproule TJ, Foreman O, et al. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(5): 1518-1523.
13. Brandt K, Singh PB, Bulfone-Pans S, et al. Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2007, 18(3-4): 223-232.
14. Suto A, Nakajima H, Hirose K, et al. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C (epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood*, 2002, 100(13): 4565-4573.
15. Abbate M. Membranous Nephropathy Associated With IgG4-

Related Disease. American Journal of Kidney Diseases ,2011 , 58(2) : 272 - 275.

16. Sonderegger I ,Kisielow J ,Meier R ,et al. IL - 21 and IL - 21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. Eur J Immunol ,2008 ,38(7) : 1833 - 1838.

17. Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. Journal of Leukocyte Biology ,2008 ,84(2) : 348 - 356.

18. Wei L ,Laurence A ,Kevin M ,et al. IL - 21 is produced by Th17 cells and drives IL - 17 production in a STAT3 - dependent manner. J Biol Chem ,2007 ,282(48) : 34605 - 34610.

19. Shao XS ,Yang XQ ,Zhao XD ,et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol ,2009 ,24(9) : 1683 - 1690.

20. Hitomi M ,Kazuko U ,Takahiko O ,et al. Low Density Lipoprotein Apheresis Ameliorates Interferon - g Production in Patients With Nephrotic Syndrome. Therapeutic Apheresis and Dialysis ,2012 ,16(2) : 189 - 194.

21. Chintalacharuvu SR ,Yamashita M ,Bagheri N ,et al. T cell cytokine polarity as a determinant of immunoglobulin A(IgA) glycosylation and The severity of experimental IgA nephropathy. Clinexp Immunol ,2008 ,153(3) : 456 - 462.

22. Trinchieri G. Interleukin - 12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol ,2003 ,9(1) : 133 - 146.

23. Sahali D ,Pawlak A ,Valanciute A ,et al. A novel approach to investigation of the pathogenesis of minimal change nephritic syndrome using subtracted cDNA library screening. J Am Soc Nephrol ,2002 ,13(5) : 1238 - 1247.

24. Strengell M ,Sareneva T ,Foster D ,et al. IL - 21 up - regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. J Immunol ,2002 ,169(7) : 3600 - 3605.

(收稿: 2013 - 01 - 02 修回: 2013 - 03 - 11)

• 短篇论著 •

基于内容分析法的名中医治疗难治性肾病综合征的文献研究*

陈富升^① 邹 川^{①△} 刘旭生^{①#}

【摘要】 目的: 探讨名中医对难治性肾病综合征中医病名、病机、辨治的认识规律。方法: 应用内容分析法, 对 1985 年~2012 年发表的名中医治疗难治性肾病综合征的经验类期刊文献进行系统分析。结果: 符合纳入要求的文献共 28 篇。12 篇文献提及中医病名, 依次是水肿 9 篇, 虚劳 4 篇, 正水、皮水各 2 篇等。22 篇文献提及病机: 本虚标实 20 篇, 本虚 1 篇, 标实 1 篇; 对本虚和标实分别进行归纳, 标实中以血瘀(16 篇)、外感(7 篇)、湿热(7 篇)、水湿(6 篇) 为主, 本虚以脾肾气阳虚(8 篇)、肺脾肾虚(6 篇) 为主。13 篇文献提及激素使用阶段病机, 初始阶段病机以阴虚火旺(7 篇) 为主, 减量阶段病机以气阴两虚(7 篇) 为主, 维持阶段病机以气(阳) 虚(3 篇) 为主。11 篇文献提及蛋白尿的病机, 以“肾虚精微下注”(7 篇)、“湿热不除, 蛋白难消”(4 篇) 为主。辨治方式中以辨病(16 篇) 为主, 其中又以辨病机(14 篇) 为主。使用方剂 72 首, 其中经方 9 首, 时方 45 首, 自拟方 18 首。结论: 本文运用内容分析法初步揭示了名医对难治性肾病综合征的认识规律, 为进一步开展名中医治疗难治性肾病综合征的经验传承研究奠定了理论基础。

【关键词】 难治性肾病综合征 名中医经验 内容分析法 文献研究

难治性肾病综合征(refractory nephrotic syndrome ,RNS) 是指激素治疗无效, 或激素依赖, 或反复发作, 因不能耐受激素的副作用而难以继续用药的原发性肾病综合征。而现代名老中医在治疗 RNS 中积累了丰富的临床经验, 并取得了一定的临床疗效, 但各家各派有其自身的经验和学说, 如何挖掘和整理使之清晰和条理化, 并找出共同规律和各自的特色优势, 是目前中医肾病文献研究的热点。内容分析法(content analysis) 是对文献内容进行客观、系统和量化描述与分析的研究方法, 是社会科学中普遍使用的一种科学方法。其目的是弄清或验证文献中本质性的事实和趋势, 揭示文献所含有的隐性情报内

容, 对事物发展作情报预测^[1]。本文尝试采用定性与定量结合的内容分析法对名医治疗 RNS 的文献进行分析、整理, 以期获得名医对 RNS 的病名、病机、辨治的认识规律, 指导 RNS 的治疗。

资料与方法

1 检索收集名中医治疗 RNS 的相关期刊文献

1.1 对象与范围 中国期刊全文数据库 CNKI(1985 年~2012 年 9 月)、维普资讯(1989 年~2012 年 9 月); 名中医包括医学院校附属医院肾病科学术或学科带头人及被省市以上卫生机构评定的名中医; 纳入名中医撰写的或者是其他医师跟师

* 本课题为国家中医药管理局基金资助项目(No. 2012KT1301)

① 广东省中医院 (广州 510120)

△ 通讯作者

指导老师