

本文引用:张丽香,郭全,郭远瑾,韦俊杰,李吕力,钟维章,蔺心敬,李燕华,李晓峰.温肾健脾方对重症肌无力患者免疫功能的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):459-462.

温肾健脾方对重症肌无力患者免疫功能的影响

张丽香¹,郭全²,郭远瑾³,韦俊杰¹,李吕力¹,钟维章¹,蔺心敬¹,李燕华¹,李晓峰^{1*}

(1.广西壮族自治区人民医院神经内科,广西南宁 530021;2.广西壮族自治区人民医院中医科,广西南宁 530021;

3.华中科技大学附属协和医院神经内科,湖北武汉 430022)

[摘要] **目的** 观察温肾健脾方对重症肌无力(MG)脾肾阳虚型患者外周血B淋巴细胞亚群、白细胞介素-6(IL-6)、B淋巴细胞活化因子(BAFF)表达的影响。**方法** 入选脾肾阳虚型MG患者18例为观察组,同期健康体检者20例为正常对照组,采用ELISA法检测治疗前、治疗后IL-6、BAFF的水平,采用流式细胞术检测治疗前、后外周血B淋巴细胞亚群比率。**结果** MG患者IL-6、BAFF表达明显高于正常对照组($P<0.01$),温肾健脾方治疗1月后,MG患者IL-6、BAFF水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$);MG患者治疗前、后CD19⁺CD27⁺细胞百分比分别为(1.04±0.24)%、(0.96±0.28)%,差异无统计学意义($P>0.05$),CD19⁺CD27⁻细胞百分比分别为(3.02±1.12)%、(2.12±0.42)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 温肾健脾方对MG患者有一定的免疫调节作用,其机制可能与降低外周血中未分化B淋巴细胞数量及BAFF、IL-6水平有关。

[关键词] 重症肌无力;温肾健脾方;B淋巴细胞亚群;IL-6;BAFF

[中图分类号]R256.3;R746.1 **[文献标志码]**B **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.024

Effect of Wenshen Jianpi Decoction on the Immunologic Function in Patients with Myasthenia Gravis

ZHANG Lixiang¹, GUO Quan², GUO Yuanjin³, WEI Junjie¹, LI Luli¹, ZHONG Weizhang¹,

LIN Xinjing¹, LI Yanhua¹, LI Xiaofeng^{1*}

(1. Department of Neurology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang-Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021, China;

2. Department of Chinese Medicine, the People's Hospital of Guangxi Zhuang-Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021;

3. Department of Neurology, Union Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Wenshen Jianpi decoction on the immunologic function in spleen-kidney yang deficiency patients with myasthenia gravis. **Methods** 18 MG patients with spleen-kidney yang deficiency were selected as observation group and 20 healthy subjects were selected as normal control group in the same period. The levels of BAFF and IL-6 were measured by ELISA and the percentage of B lymphocyte subsets in peripheral blood was detected by flow cytometry before and after treatment. **Results** The expression of IL-6,BAFF in MG patients were significantly higher than the normal control group ($P<0.01$). After Wenshen Jianpi decoction treatment for 1 month, the levels of IL-6 and BAFF in MG patients decreased significantly ($P<0.01$). The percentage of CD19⁺CD27⁺ cells before and after treatment were (1.04±0.24)%, 0.96±0.28)%, the percentage of CD19⁺CD27⁻ cells before and after treatment were (3.02±1.12)%, (2.12±0.42)%, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Wenshen Jianpi decoction has exact effects on immune regulation in patients with myasthenia gravis, and the mechanism may be related to reducing the number of undifferentiated B lymphocytes and the levels of BAFF and IL-6 in peripheral blood.

[Keywords] myasthenia gravis; Wenshen Jianpi decoction; B lymphocyte subsets; IL-6; BAFF

[收稿日期]2018-01-04

[基金项目]广西中医药科技重点项目(GZKZ10-012)。

[作者简介]张丽香,女,副主任医师,研究方向:神经病学及神经电生理。

[通讯作者]* 李晓峰,男,主任医师,博士,硕士研究生导师,E-mail:450211034@qq.com。

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种乙酰胆碱受体抗体介导、细胞免疫依赖、补体参与、以神经-肌肉接头传递功能障碍为特征的获得性自身免疫性疾病。目前西医多采用胆碱酯酶抑制剂、肾上腺皮质激素、免疫抑制剂、静脉注射免疫球蛋白、免疫吸附、血浆置换等治疗,外科多采用胸腺切除术以及造血干细胞移植疗法,治疗方法虽多,但是副作用较大。既往的临床观察发现全身型MG患者多具有脾肾阳虚症状为主的中医症候特点^[1-2],在此基础上,本研究应用ELISA法检测脾肾阳虚型MG患者外周血白细胞介素-6(Interleukin 6,IL-6)、B淋巴细胞活化因子(b-cell activating factor,BAFF)水平,流式细胞术检测B淋巴细胞亚群分布变化,探讨温肾健脾方对MG患者的免疫调节作用机制。

1 资料与方法

1.1 观察对象

MG病例来源系广西壮族自治区人民医院2010年10月至2013年10月期间神经内科门诊及住院患者,根据中国神经免疫学会诊断标准^[3]确诊MG;按照中医脾肾阳虚症候:眼睑下垂,复视,咀嚼、抬颈无力,四肢倦怠无力,畏寒肢冷,吞咽困难,面色㿔白,腹部冷痛,久泄久痢或便溏、完谷不化,小便清长,或浮肿少尿,舌淡胖,苔薄白或白滑,脉沉迟无力或脉沉细,入选脾肾阳虚型新发病MG患者18例,按照改良Osserman临床分型^[4],IIa型5例、IIb型13例;排除激素、免疫抑制剂治疗史以及其他自身免疫性疾病,其中男6例,女12例,年龄(35.6±8.4)岁。对照组为同期健康体检者20例,其中男8例,女12例,年龄(34.2±9.4)岁,无自身免疫性疾病,近期内未服用影响免疫功能药物。两组性别、年龄、民族差异无统计学意义($P>0.05$),所有受检者均知情同意研究内容后纳入。

1.2 治疗方法

(1)溴吡啶斯的明:根据患者病情严重程度,分别从60 mg每日3次至120 mg每日4次,长期规律口服;(2)中药治疗:患者经中医辨证诊断后口服温肾健脾方(补中益气汤、金匱肾气汤加减):黄芪60 g,党参30 g,白术15 g,当归15 g,陈皮15 g,柴胡15 g,升麻15 g,熟地黄15 g,山萸肉25 g,菟

丝子25 g,山药15 g,牛膝10 g,制附子3 g,丹皮6 g,泽泻6 g,鹿角12 g,巴戟25 g,甘草6 g。每日1剂,疗程1个月。

1.3 观察指标及方法

治疗前、治疗1月后分别检测患者外周血IL-6、BAFF水平及B淋巴细胞亚群比率。

1.3.1 IL-6、BAFF水平测定 所有受试者均于清晨空腹采血6 mL,其中1 mL离心取上清,置于EP管内-80℃保存,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)对所有标本一次性进行测定,所有试剂盒均由Rapidbio Lab提供,严格按照试剂盒说明书要求程序进行操作。酶标仪(GF-M3000型酶标仪)450 nm处测A值,绘制标准曲线,计算BAFF和IL-6浓度值。

1.3.2 B淋巴细胞亚群比率测定 受试者静脉血5 mL,置于肝素钠抗凝管,加入等倍磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,缓慢加于人淋巴细胞分离液之液面上,以3 000 r/min离心15 min,收集第二层细胞(淋巴细胞),1% PBS反复洗涤2次,计数后取100 μL细胞悬液加入相关表面抗体及同型对照抗体5 μL,4℃避光孵育30 min,常温下用2 mL 1%PBS洗2次,加入300 μL 1%多聚甲醛固定,4 h内行流式细胞仪检测。上机收集 1×10^4 个细胞,使用Cell Quest软件分析阳性细胞百分率。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,治疗前后进行配对 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组MG患者外周血IL-6和BAFF水平

治疗前脾肾阳虚型MG患者外周血中IL-6、BAFF的水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),温肾健脾方治疗1月后,MG患者IL-6、BAFF水平均明显下降($P<0.01$),见表1。

2.2 两组MG患者温肾健脾方治疗前后B淋巴细胞亚群的表达

治疗前脾肾阳虚型MG患者外周血CD19⁺CD27⁺细胞表达及CD19⁺CD27⁻细胞表达明显高于对照组($P<0.01$),温肾健脾方治疗后CD19⁺CD27⁺细胞

表1 两组MG患者外周血IL-6和BAFF表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-6/ng·mL ⁻¹		BAFF/pg·mL ⁻¹	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
MG组	18	13.34±2.62*	4.22±1.31 [△]	1.81±0.36*	0.98±0.24 [□]
对照组	20	2.32±0.98		1.01±0.74	
t值		12.849	5.007	4.828	-0.834
P值		<0.001	<0.001	<0.001	0.351

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与治疗前比较, $t=10.347$, $\Delta P<0.001$;
 $t=9.93$, $\square P<0.001$ 。

表达较治疗前略下降,但差异无统计学意义($P>0.05$);
CD19⁺CD27⁺细胞表达较治疗前明显下降,差异有统
计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组MG患者治疗前后B淋巴细胞亚群表达比较 (% $\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD19 ⁺ CD27 ⁺ 细胞百分比		CD19 ⁺ CD27 ⁻ 细胞百分比	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
MG组	18	1.04±0.24*	0.96±0.28	3.02±1.12*	2.12±0.42 [△]
对照组	20	0.82±0.26		1.26±0.24	
t值		2.875	1.769	5.155	7.514
P值		0.007	0.065	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与治疗前比较, $t=2.388$, $\Delta P=0.017$ 。

3 讨论

MG主要临床表现为骨骼肌无力、易疲劳、晨轻暮重,活动后加重,休息后或服用胆碱酯酶抑制剂后减轻等特点。中医学并无重症肌无力病名诊断,根据该病临床表现归属中医“痿证”范畴。病位在脾肝肾,以虚多见。脾主运化,主肌肉,脾虚则运化和散精功能失常,水谷精微内不能供养五脏六腑,外不能濡养肌肉关节;肾主藏精,主生长发育,肾虚则脏腑功能减退,筋骨痿软乏力。根据国内文献报道^[5],应用补中益气汤治疗MG取得较好的临床疗效,但具体机制尚不清楚。

脾肾阳虚证型是临床全身型MG最常见证类型,常发生于MG发病进程中。根据脾肾阳虚的病机特点,当循“虚者补之”“损者益之”,治法以健脾益肾为主,在补益脾胃药中加温补肾阳之品。《黄帝内经》提出“治痿独取阳明”,在此基础上后世医家对痿证的病因、病机研究更加深入,北宋时期的窦材将痿证的发病归之于肾,提出温补肾阳、壮火起痿等治法,明代《普济方》记载了金刚丸、牛膝丸等治疗“肝肾不足”之痿证。温肾健脾方源自补中益气汤、金匮肾气

汤加减而成,方中黄芪、党参、茯苓、甘草、白术、山药、陈皮健脾益气,柴胡、升麻升阳举陷,鹿角、巴戟天、制附子、菟丝子、牛膝、山萸肉温补肾阳,熟地黄、丹皮、泽泻滋补肝肾阴虚。纵观全方,共奏健脾益气、温补肾虚之效。

人体外周血中B细胞亚群主要为未活化的未成熟B细胞、初始B细胞以及活化的记忆性B细胞、浆母细胞^[6]。CD19⁺CD27⁻细胞标记了未活化的未成熟B细胞及初始B细胞,而CD19⁺CD27⁺细胞标记了活化的记忆性B细胞及浆母细胞。既往研究发现^[7-8],BAFF主要表达在单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、生长因子刺激的中性粒细胞和活化的T细胞表面,BAFF信号对T淋巴细胞的活化发挥着共刺激作用。BAFF过度表达可以导致B细胞严重增生、降低B细胞的耐受性,促进体内自身抗体产生,产生自身免疫反应^[9]。II-6可促进B细胞增殖、分化和分泌抗体,在活化、增殖的B细胞分化为浆细胞的过程中起关键作用。既往的研究中发现,新发病MG患者,尤其是IIb型和III型患者中,IL-6、BAFF表达一致性增高^[10]。Dalakas等^[11-12]研究也证实,MG患者BAFF表达明显增高,T、B淋巴细胞在MG发病中具有协同作用,控制B淋巴细胞的功能异常是治疗MG的关键。国内研究表明^[3],以黄芪、党参、茯苓、甘草、白术为主的健脾益气为主的中药,有助于抑制B淋巴细胞代谢和增殖,具有调节体液免疫功能。本研究发现,脾肾阳虚型MG患者外周血CD19⁺CD27⁻细胞及BAFF表达明显增高,提示MG患者体内存在B细胞亚群功能紊乱,由于CD19⁺CD27⁻细胞代表未活化B细胞,BAFF能促进B细胞活化增殖,并延缓其凋亡,MG患者体内未活化B细胞增高可能是由于BAFF表达增加所致,这些增多的未活化B细胞会进一步被激活为活化B细胞,参与MG的发病;以补中益气汤为基础的温肾健脾方能够降低MG患者CD19⁺CD27⁻细胞及BAFF、IL-6表达水平,但CD19⁺CD27⁺细胞的表达在治疗前后无明显变化,由于MG患者免疫功能障碍机制复杂,抑制未活化B细胞表达并不能完全纠正患者体内的免疫功能紊乱。Lebrun等^[14]研究发现,利妥昔单抗能有效抑制MG的复发,通过监测重新出现的CD27⁺记忆B细

胞,可安全降低利妥昔单抗给药频率。提示MG患者外周血CD27⁺细胞亚群的作用仍需进一步探讨。

综上所述,脾肾阳虚型MG患者存在以CD19⁺CD27⁻细胞及BAFF表达增高为特征的免疫功能紊乱,温肾健脾方可能通过抑制BAFF、IL-6的表达,降低未活化B细胞的比率,从而发挥对MG的免疫调节作用。

参考文献:

- [1] 李晓峰,李吕力,罗永坚,等.重症肌无力患者IL-18、TGFβ-1的表达[J].中国神经精神疾病杂志,2010,36(7):393-396.
- [2] 吕志国,王健,徐鹏,等.基于专家共识法的重症肌无力中医证候筛选研究[J].世界科学技术:中医药现代化,2017,19(1):1-6.
- [3] 李柱一,许贤豪,刘建军,等.第八届全国神经免疫会议纪要[J].中华神经科杂志,2005,38(2):128.
- [4] 陈灏珠.实用内科学[M].北京:人民卫生出版社,2002:2490-2493.
- [5] 蒋旭宏,黄小民,章正祥,等.裘昌林教授治疗重症肌无力的用药规律探究[J].中国中医急症杂志,2016,25(3):428-432.
- [6] KOHLER S, KEIL T O, SWIERZY M, et al. Disturbed B cell subpopulations and increased plasma cells in myasthenia gravis patients[J]. J Neuroimmunol, 2013, 264(1-2):114-119.
- [7] KANG S Y, KANG C H, LEE K H. B-cell-activating factor is elevated in serum of patients with myasthenia gravis [J]. Muscle Nerve, 2016, 54(6):1030-1033.
- [8] LISAK R P, RAGHEB S. The role of B cell-activating factor in autoimmune myasthenia gravis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1274(1):60-67.
- [9] COMABELLA M. Neuroimmunology: B cells and variant BAFF in autoimmune disease[J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(8):453-454.
- [10] 李晓峰,李吕力,罗永坚,等.重症肌无力患者血清B淋巴细胞刺激因子、IL-6水平检测及临床意义[J].中国老年学杂志,2010,30(14):1938-1939.
- [11] DALAKAS M C. Novel future therapeutic options in myasthenia gravis[J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(9):936-941.
- [12] BERRIH-AKNIN S, RAGHEB S, LE PANSE R, et al. Ectopic germinal centers, BAFF and anti-B-cell therapy in myasthenia gravis[J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(9):885-893.
- [13] 吴玉霞,黄志惠,袁忠,等.健脾益气摄血颗粒对脾气虚型慢性免疫性血小板减少症淋巴细胞亚群的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(9):65-68.
- [14] LEBRUN C, BOURG V, BRESCH S, et al. Therapeutic target of memory B cells depletion helps to tailor administration frequency of rituximab in myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 2016, 298: 79-81.

(本文编辑 马薇)