

基于铁调素调节铁代谢机制观察蚕砂提取物对血液透析患者促红细胞生成素抵抗的影响

金华 孔敏 王亿平 程皖

【摘要】 目的 通过观察维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)患者体内铁调素对铁代谢的调节作用,探讨蚕砂提取物对促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)抵抗的干预机制。**方法** 将 40 例 MHD 患者随机分为对照组和治疗组各 20 例,均给予常规透析、EPO 皮下注射等治疗,在此基础上,对照组口服多糖铁复合物胶囊,治疗组口服蚕砂提取物,连续观察 12 周;同时选取 20 例健康人群作为正常组。空腹取血,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测铁调素、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6),免疫比浊法检测超敏 C 反应蛋白(high sensitive C reactive protein, hs-CRP),化学发光法检测铁蛋白(serum ferritin, SF)和转铁蛋白饱和度(transferin saturation, TSAT);并检测血常规(血红蛋白、红细胞压积),记录体质量(body weight, BW),计算重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rHuEPO)用量与 EPO 抵抗指数(erythropoietin resistance index, ERI)。**结果** 与正常组比较,对照组和治疗组 MHD 患者的血清铁调素、IL-6、hs-CRP、SF 均显著升高,TSAT 显著降低($P < 0.05$)。治疗前后比较,治疗组治疗后的血清铁调素、IL-6、hs-CRP、SF、rHuEPO 用量、ERI 均较治疗前有显著降低,血红蛋白(hemoglobin, Hb)、红细胞压积(hematocrit value, Hct)较治疗前有显著升高($P < 0.05$),而对照组变化不明显($P > 0.05$)。治疗后组间比较,治疗组的血清铁调素、IL-6、hs-CRP、SF、rHuEPO 用量、ERI 均显著低于同期对照组,Hb、Hct 均显著高于同期对照组($P < 0.05$)。**结论** MHD 患者的 EPO 抵抗与微炎症状态、铁调素升高、铁代谢紊乱具有相关性;蚕砂提取物可以通过抑制机体的微炎症反应及铁调素高表达,改善铁代谢,这可能是蚕砂提取物纠正 MHD 患者贫血、改善 EPO 抵抗的重要机制之一。

【关键词】 铁调素;铁代谢;血液透析;EPO 抵抗;蚕砂提取物

Effects of faeces bombycis extract in treatment of erythropoietin resistance in hemodialysis patients based on the mechanism of hepcidin regulating iron metabolism JIN Hua, KONG Min, WANG Yi-ping, CHENG Wan. Department of Nephropathy, the First Affiliated Hospital of Anhui University of TCM, Hefei 230038, China

【Abstract】 Objective To explore the intervention mechanism of faeces bombycis extract (Shengxuening tablet) in treatment of erythropoietin resistance through the observation of hepcidin regulating iron metabolism in maintenance hemodialysis (MHD) patients. **Methods** MHD patients were randomly divided into the control group and the experimental group ($n = 20$ each), and were given conventional hemodialysis, subcutaneous injection of EPO, and so on. On the basis, the control group was orally administered polysaccharide iron complex capsule, and the experimental group was treated by oral administration of Shengxuening tablets. The patients were observed continuous 12 weeks. At the same time, 20 healthy volunteers were selected as the normal group. Hepcidin, and interleukin-6 (IL-6) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), high sensitive C reactive protein (hs-CRP) by immunoturbidimetry, serum ferritin (SF) and transferin saturation (TSAT) by chemiluminescence, blood routine (hemoglobin and hematocrit) test was performed, body weight (BW) was recorded, and the amount of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) and erythropoietin resistance index (ERI) were calculated. **Results** As compared with the normal group,

MHD patients in control group and experimental group showed significantly increased serum hepcidin, IL-6, hs-CRP, SF, while decreased TSAT ($P < 0.05$). Serum hepcidin, IL-6, hs CRP and SF, rHuEPO dosage, and ERI after the treatment in experimental group patients were markedly decreased, and Hb and Hct were markedly increased, as compared with those before the treatment, while there were no significant differences in control group patients ($P > 0.05$). After treatment, serum hepcidin, IL-6, hs-CRP, SF, rHuEPO dosage, and ERI in experimental group patients were significantly lower than those of the patients in control group, while Hb and Hct showed the opposite tendency ($P < 0.05$). **Conclusions** EPO resistance in MHD patients is associated with micro-inflammatory state, Hepcidin elevation, and iron metabolism disorders. Shengxuening tablets can inhibit the micro-inflammation and overexpression of hepcidin, and improve the metabolism of iron, which may be the important mechanisms of Shengxuening tablets treating anemia and improving erythropoietin resistance in MHD patients.

【Key words】 Hepcidin; Iron metabolism; Hemodialysis; Erythropoietin resistance; Shengxuening tablets

肾性贫血(renal anemia, RA)是终末期肾脏疾病(end stage renal disease, ESRD)常见并发症之一,不仅严重影响维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)患者的生活质量,而且增加心血管疾病发生和死亡的风险,因此 RA 的轻重程度是决定患者预后的主要因素之一^[1-2]。临床上主要使用促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)替代治疗 RA,部分患者通过合理应用 EPO 使 RA 得到纠正,但目前仍有 5%~10% 的患者应用常规剂量 EPO 治疗无法获得满意的疗效,表现为 EPO 抵抗^[3],其主要原因为铁代谢失衡和慢性炎症反应^[4]。近年来发现在炎症细胞因子[如白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)]的刺激下,由肝细胞合成和分泌的抗菌多肽铁调素(hepcidin)可以调节铁代谢,减轻 EPO 抵抗^[5-6]。生血宁片为蚕砂提取物,主要成分为铁叶绿酸钠和叶绿酸衍生物(类 EPO),临床用于缺铁性贫血的治疗。本研究将基于铁调素对铁代谢的调节作用,探讨蚕砂提取物对血液透析 EPO 抵抗患者的干预机制。

资料与方法

一、一般资料

1. 研究对象与分组 选择 2013 年 1 月至 2014 年 12 月在安徽省中医院血液净化中心接受透析治疗的 MHD 患者 40 例,其中男 27 例,女 13 例。采用随机数字表法将 40 例 MHD 患者随机分为对照组和治疗组,每组 20 例。对照组男 12 例,年龄 32~69 岁,平均年龄(53.8 ± 10.2)岁;女 8 例,年龄 42~68 岁,平均年龄(59.9 ± 8.7)岁;其原发病分别为

慢性肾小球肾炎 8 例,糖尿病肾脏疾病 4 例,高血压肾病 2 例,多囊肾病 1 例,其他 3 例。治疗组男 15 例,年龄 37~69 岁,平均年龄(59.9 ± 10.4)岁;女 5 例,年龄 40~70 岁,平均年龄(58.3 ± 11.2)岁;其原发病分别为慢性肾小球肾炎 10 例,糖尿病肾脏疾病 5 例,高血压肾病 3 例,多囊肾病 1 例,其他 1 例。2 组患者性别、年龄、干体质量、透析时间、原发疾病、血白蛋白(albumin, Alb)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、红细胞压积(hematocrit value, Hct)、全段甲状旁腺素(immunoreactive parathyroid hormone, iPTH)、人重组促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rHuEPO)用量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。另选取同期来我院体检的健康人群 20 例作为正常组,其中男 11 例,年龄 29~66 岁,平均年龄(57.1 ± 11.7)岁;女 9 例,年龄 34~65 岁,平均年龄(55.4 ± 9.5)岁。正常组与对照组、治疗组之间年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。(表 1)

2. 病例纳入标准 ①年龄 18~70 岁;②规律血液透析时间 ≥ 6 个月, Kt/V 值 ≥ 1.2 ;③使用 rHuEPO($\geq 300 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$)治疗 ≥ 4 个月, Hb $< 100 \text{ g/L}$, Hct $< 30\%$;④血清铁蛋白(serum ferritin, SF) $> 100 \mu\text{g/L}$,转铁蛋白饱和度(transferrin saturation, TSAT) $> 20\%$, iPTH $< 600 \text{ ng/L}$;⑤签署知情同意书。

3. 病例排除标准 ①患者透析依从性差;②试验前 6 个月内有输血史;③应用糖皮质激素或免疫抑制剂;④ 6 个月内发生过较严重的感染或活动性系统性疾病;⑤ 6 个月内有急慢性出血病史;⑥合并

活动性溃疡、肿瘤、严重肝病、心力衰竭、严重营养不良等疾病。

二、方法

1. 治疗方案 2 组患者常规每周 3 次透析,每次透析 4 h,费森尤斯 4008S 透析机,碳酸氢盐透析液,应用低分子肝素抗凝,血流量 200~280 ml/min,透析量为 500 ml/min,透析器均为一次性使用。每月行透析液内毒素水平和细菌培养检测,要求内毒素<1.0 EU/ml,细菌计数<50 CFU/ml。

2 组患者均给予重组人促红细胞生成素(rHuEPO,沈阳三生制药厂)300 IU·kg⁻¹·周⁻¹,分 3 次皮下注射,rHuEPO 使用剂量的调整参考《重组人促红细胞生成素在肾性贫血中合理应用的专家共识》^[7],治疗期间每 2 周为一观察单位,Hb≥100 g/L 后则每 2 周 rHuEPO 用量减少 25%~50%,维持 Hb 110~120 g/L,Hct 33%~36%。补充铁剂:对照组治疗期间常规口服多糖铁复合物胶囊(美国 Schwarz Pharma Manufacturing, Inc.),150 mg/次,1 次/d;治疗组口服生血宁片(武汉联合药业有限责任公司,国药准字 Z20030088)2 片/次,3 次/d。

2. 观察指标 2 组观察周期为 12 周,观察期两组患者均维持原有降血压药物以及叶酸制剂等常规用药,禁用其他铁剂以及可能影响铁代谢的药物。临床试验过程中按照“透析记录单”的要求,每小时记录透析时的血压、心率、呼吸及体温情况,密切观察出现的任何不良反应及不良事件,并如实记录。

采集空腹静脉血 3 ml 3 份,40 ℃,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,1 份于-80 ℃保存,检测前室温复融,采用酶联免疫吸附法检测铁调素、IL-6,严格按着试剂盒说明书操作;另 2 份于当天分别采

用免疫比浊法检测超敏 C 反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein,hs-CRP);采用化学发光法检测 SF、TSAT。采集空腹静脉血 2 ml,EDTA-K₂抗凝,用于检测血常规(Hb、Hct)。记录体质量(body weight,WB),并计算 rHuEPO 用量与 EPO 抵抗指数(erythropoietin resistance index,ERI)^[8]。ERI=每周 EPO 总剂量/(体质量×血红蛋白浓度)。

三、统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料用均数±标准差表示;组内比较采用配对 *t* 检验,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,若资料不符合正态分布或各组方差不齐,则采用非参数检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组血清铁调素、IL-6、hs-CRP、SF、TSAT 的比较

与正常组比较,对照组和治疗组血清铁调素、IL-6、hs-CRP、SF 均明显升高,TSAT 明显降低(*P*<0.05)。治疗前后比较,治疗组治疗后的血清铁调素、IL-6、hs-CRP、SF 水平均较治疗前明显降低(*P*<0.05);而对照组变化不明显(*P*>0.05)。治疗后组间比较,治疗组血清铁调素、IL-6、hs-CRP、SF 水平均低于同期对照组(*P*<0.05)。(表 2)

二、各组 Hb、Hct、WB、rHuEPO 用量、ERI 的比较

治疗前后比较,治疗组治疗后的 Hb、Hct 较治疗前有明显升高,rHuEPO 用量、ERI 较治疗前有明显降低(*P*<0.05);而对照组变化不明显(*P*>0.05)。治疗后组间比较,治疗组的 Hb、Hct 水平均明显高于同期对照组,rHuEPO 用量、ERI 均明显低于同期对照组(*P*<0.05)。(表 3)

表 1 患者一般资料比较(*n*=20, $\bar{x}\pm s$)

组别	干体质量(kg)	透析时间(年)	Alb(g/L)	Hb(g/L)	Hct(%)	iPTH(ng/L)	rHuEPO 用量(100 IU·kg ⁻¹ ·周 ⁻¹)
对照组	52.63±7.02	5.38±3.42	37.39±10.58	88.56±11.09	28.27±3.44	281.73±82.45	151.72±26.55
治疗组	53.02±7.11	5.17±3.25	36.72±10.14	87.11±10.39	28.04±3.31	302.28±86.30	153.39±29.07

表 2 各组血清 hepcidin、IL-6、hs-CRP、SF、TSAT 的比较(*n*=20, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清铁调素(μg/L)		IL-6(ng/L)		hs-CRP(mg/L)		SF(μg/L)		TSAT(%)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常组	18.40±4.43	-	5.51±2.66	-	2.12±0.75	-	70.27±12.85	-	33.85±8.29	-
对照组	82.84±18.69 ^a	85.22±18.45	10.22±4.70 ^a	10.01±4.55	7.22±2.47 ^a	6.54±1.65	507.31±170.04 ^a	474.63±150.89	25.10±7.70 ^a	26.76±8.27
治疗组	78.19±17.67 ^a	57.15±13.24 ^{bc}	9.93±4.46 ^a	6.28±3.20 ^{bc}	7.04±2.24 ^a	4.46±1.52 ^{bc}	484.59±161.44 ^a	377.18±131.91 ^{bc}	23.48±7.11 ^a	26.22±7.81

注:与正常组比较,^a*P*<0.05;与同组治疗前比较,^b*P*<0.05;与对照组治疗后比较,^c*P*<0.05

表 3 各组 Hb、Hct、WB、rHuEPO 用量、ERI 的比较($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	Hb(g/L)		Hct(%)		WB(kg)		rHuEPO 用量($100 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$)		ERI($\text{IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	88.56 $\pm$ 11.09	94.61 $\pm$ 13.57	28.27 $\pm$ 3.44	30.61 $\pm$ 5.02	52.63 $\pm$ 7.02	54.11 $\pm$ 7.70	151.72 $\pm$ 26.75	144.08 $\pm$ 27.60	3.16 $\pm$ 0.82	2.81 $\pm$ 0.74
治疗组	87.11 $\pm$ 10.39	111.17 $\pm$ 15.25 ^{ab}	28.04 $\pm$ 3.31	35.66 $\pm$ 5.70 ^{ab}	53.02 $\pm$ 7.11	55.09 $\pm$ 7.48	153.39 $\pm$ 29.07	98.33 $\pm$ 19.06 ^{ab}	3.21 $\pm$ 0.95	1.62 $\pm$ 0.58 ^{ab}

注:与同组治疗前比较,^a $P<0.05$;与对照组治疗后比较,^b $P<0.05$

讨 论

EPO 分泌的相对或绝对不足是引起 RA 的主要原因,因此 rHuEPO 是临床上治疗 RA 的主要药物。rHuEPO 替代治疗能有效纠正 MHD 患者的 RA,降低 MHD 患者的住院率和病死率,但仍有一些患者表现为 rHuEPO 低反应性,即 EPO 抵抗。美国肾脏病基金会肾脏病透析预后质量指南将 EPO 抵抗定义为:在体内铁储备充足的情况下,静脉用 $450 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$ 或皮下用 $300 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$ 的 EPO 治疗 4~6 个月后,不能达到血红蛋白的靶目标值或在这个剂量下不能维持目标值^[9]。导致 EPO 抵抗的原因是多方面的,包括:铁剂缺乏或利用障碍、炎症、营养不良、继发性甲状旁腺机能亢进、透析不充分、铝中毒等^[3,10],其中最常见原因是铁缺乏和炎症反应,且二者亦是相互影响的。MHD 患者在各种微生物、内毒素、各种化学物质、补体、免疫复合物刺激下,机体产生以细胞因子驱动为特征的微炎症状态,炎症反应可通过多种途径抑制骨髓对 rHuEPO 的作用。有观点认为,炎症细胞因子可以通过直接抑制红系祖细胞和破坏铁代谢拮抗内源性和外源性 EPO 作用^[11],其中对于炎症因子 IL-6 通过刺激铁调素合成进而影响铁代谢的研究已比较深入。

IL-6 是炎症反应的中枢性调节因子。hs-CRP 作为微炎症状态的一项客观、敏感指标,是机体炎症细胞因子激活的标志。铁调素是一种主要在肝脏中产生的 II 型急相蛋白,是铁代谢的重要调节器^[5],其作用是对肠道铁吸收起负调控作用,而同时对网状内皮组织的巨噬细胞铁的储存起正调控作用;除了其对铁代谢的影响,铁调素可能通过直接抑制红系祖细胞增殖和存活而有助于 EPO 抵抗^[6]。有研究发现^[12],MHD 患者和非透析 ESRD 患者的铁调素水平显著高于健康人群,其原因可能为:①当肾功能减退时,血清铁调素经肾脏的排泄降低,即可在体内蓄积;②机体出现铁缺乏,血清铁调素发挥代偿调节作用。本研究排除了铁缺乏、感染、甲状旁腺亢进

症、透析不充分等因素对 EPO 抵抗的影响,研究发现,存在 EPO 抵抗的 MHD 患者的血清 IL-6、hs-CRP 和铁调素均较正常人群显著升高,提示机体存在微炎症状态以及铁调素合成增加、排泄降低,这亦证实了微炎症状态、铁调素升高与 EPO 抵抗具有相关性。

目前临床上评价铁代谢状况应用最广泛的两个指标为 SF 和 TAST。SF 不仅是了解机体铁储存状况的指标之一,也是观察机体铁负荷的指标,若体内无炎症状态,SF 升高提示铁负荷增加。TAST 代表铁的利用程度,反映了体内可用于红细胞生成的铁。本研究结果发现,MHD 患者的血清 SF 较正常人群显著升高,TSAT 显著降低,提示虽然体内储备铁的总量正常,甚至是铁负荷过载,但机体对铁の利用障碍;结合上述 IL-6、hs-CRP 和铁调素水平升高,其可能原因是:在 MHD 患者的慢性炎症状态下,高表达的炎症因子(如 IL-6)可以通过上调铁调素而影响铁代谢,从而限制了红细胞生成铁的可用性,使之不足以满足骨髓受 EPO 刺激后生成红细胞时对铁的大量需求,导致 EPO 抵抗。

针对 EPO 抵抗患者的机体铁负荷过载、铁利用障碍,通过补铁和增加 rHuEPO 用量,其作用有限,而且风险巨大。长期铁负荷过载可出现铁沉积在肝脏、心脏和内分泌组织,或者沉积在巨噬细胞,均导致组织铁的沉积和组织损害^[13]。大剂量 rHuEPO 应用可导致高血压、凝血机制亢进等不良反应,加剧心脑血管卒中的风险,亦可能出现内瘘闭塞。因此探索安全有效的改善 MHD 患者 EPO 抵抗的方法越来越受到肾内科医生的重视。生血宁片是以蚕砂提取物制备的中药二类新药,主要成分为铁叶绿酸钠和叶绿酸衍生物(类 EPO),具有益气补血功效,能有效纠正 MHD 患者的铁缺乏和贫血状况,与一般铁剂相比还能减少 EPO 使用量^[14]。本研究结果进一步发现,生血宁片能够有效提升 MHD 患者的 Hb 和 Hct,改善贫血状况;并能够减少 rHuEPO 用量,降低 ERI,从而改善 EPO 抵抗反应。生血宁片还能降低 MHD 患者的血清 IL-6、hs-CRP、铁调素、SF

水平,提示可以通过抑制机体的微炎症反应和铁调素高表达,进而改善铁代谢状况,这可能是生血宁片纠正 MHD 患者贫血、改善 EPO 抵抗的重要机制之一。而持续补铁和增加 rHuEPO 用量并不能有效改善 EPO 抵抗患者机体的微炎症状态和铁代谢障碍,不能有效纠正 EPO 抵抗患者的贫血状况。

综上所述,MHD 患者的 EPO 抵抗与微炎症状态、铁调素升高、铁代谢紊乱具有相关性;生血宁片可以通过抑制机体的微炎症反应及铁调素高表达改善铁代谢,这可能是生血宁片纠正 MHD 患者贫血、改善 EPO 抵抗的重要机制之一。

参 考 文 献

- [1] Stompór T, Olszewski A, Kierzkowska I, et al. Can we prolong life of patients with advanced chronic kidney disease; what is the clinical evidence? [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2011, 121(1): 88-93.
- [2] López-Gómez JM, Portolés JM, Aljama P. Factors that condition the response to erythropoietin in patients on hemodialysis and their relation to mortality [J]. *Kidney Int*, 2008, 12(Suppl111): S75-S81.
- [3] Elliontt J, Mishler D, Agarwal R. Hyporesponsiveness to erythropoietin: Causes and management[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2009, 16(2): 94-100.
- [4] Shinzato T, Abe K, Furusu A, et al. Serum pro-hepcidin level and iron homeostasis in Japanese dialysis patients with erythropoietin(EPO)-resistant anemia[J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(9): CR431-437.
- [5] Nemeth E. IL-6 mediates hypolekremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(9): 1271-1276.
- [6] Dallaglio G. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations[J]. *Blood*, 2006, 107(7): 2702-2704.
- [7] 中华医学会肾脏病学分会. 重组人促红细胞生成素在肾性贫血中合理应用的专家共识[J]. *中国血液净化*, 2007, 6(8): 440-443.
- [8] Vega A, Abad S, Verdalles U, et al. Dose equivalence between continuous erythropoietin receptor activator (CERA), Darbepoetin and Epoetin in patients with advanced chronic kidney disease[J]. *HIPPOKRATIA*, 2014, 18(4): 315-318.
- [9] National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease[J]. *Am J Kidney Dis*, 2006, 47: S11-145.
- [10] 赵颖丹, 顾波. 促红细胞生长素抵抗的发病机制研究新进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13(10): 924-925.
- [11] Costa E, Pereira BJ, RochaPereira P, et al. Role of prohepcidin, inflammatory markers and iron status in resistance to rHuEPO therapy in hemodialysis patients[J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28(4): 677-683.
- [12] 张妍, 周晓玲, 陈孟华. 终末期肾脏病患者血清中铁调素的水平变化及其铁代谢的关系[J]. *中国血液净化*, 2011, 10(7): 371-375.
- [13] Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, et al. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism[J]. *Cell*, 2010, 142(1): 24-38.
- [14] 杨岳, 冯胜刚, 白亚君, 等. 生血宁片治疗维持性血液透析患者贫血的临床观察[J]. *华西医学*, 2011, 26(11): 1646-1648.

(收稿日期: 2015-09-13 修回日期: 2016-4-14)