

• 实验研究 •

多虑平治疗慢性病贫血的机制研究^{*}丁芳^{1,2} 吴振添^{1△} 吴良华¹ 何云绮²

【摘要】 目的:探讨多虑平治疗大鼠慢性病贫血(ACD)的机制。**方法:**将 24 只大鼠按照随机对照原则共分为 3 个组:健康对照组、ACD 模型组、多虑平治疗组,每组均为 8 只。药物治疗 1 周后采集新鲜血液,用自动化血液分析仪测定血常规,ELISA 法检测血清中 IL-6 浓度;取肝组织,用 RT-PCR 法检测肝脏 hepcidin mRNA 表达量。**结果:**ACD 模型组血清中 IL-6 水平、肝脏 hepcidin mRNA 表达量较健康对照组显著升高($P<0.01$),且分别与血红蛋白呈线性负相关($r=-0.591$, $r=-0.759$),肝脏 hepcidin mRNA 表达量与血清 IL-6 水平呈线性正相关($r=0.619$)。多虑平治疗组血清 IL-6 水平、肝脏 hepcidin mRNA 表达量较 ACD 模型组均显著下降($P<0.05$),血红蛋白明显升高($P<0.01$)。**结论:**多虑平可改善大鼠 ACD,作用机制可能与其通过抑制 IL-6 水平、降低 hepcidin mRNA 表达量有关。

【关键词】 慢性病贫血;多虑平;IL-6;hepcidin mRNA

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.03.012

【中图分类号】 R556.9 **【文献标志码】** A

An in vivo assay for doxepin in treating anemia of chronic disease

DING Fang^{1,2} WU Zhentian¹ WU Lianghua¹ HE Yunqi²

(¹Department of Hematology and Oncology, Mindong Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, 355000, China; ²Department of Hematology, Zunyi Hospital of Zunyi Medical College)

Corresponding author: HE Yunqi, E-mail: 943946824@qq.com

Abstract Objective: To elucidate the mechanism of doxepin in the treatment of mouse anemia of chronic disease (ACD). **Method:** A total of 24 male SD rats were randomly divided into 3 groups: healthy control group, ACD model group and doxepin treatment group, each group had 8 rats. After 7 days of treatment, peripheral blood was collected for counting hemoglobin (Hb) by automated blood analyzers and the level of serum IL-6 was detected by ELISA, liver tissues were also collected for assessment of hepcidin mRNA by RT-PCR. **Result:** Compared to healthy control group, serum IL-6, hepatic hepcidin mRNA expression in ACD model group were significantly increased ($P<0.01$), and both were negatively correlated with Hb ($r=-0.591$, $r=-0.759$). There was a positive correlation between hepatic hepcidin mRNA expression and IL-6 level ($r=0.619$). Compared to ACD model group, serum IL-6 levels and hepatic hepcidin mRNA expression in the doxepin treatment group were significantly decreased ($P<0.05$), and Hb was increased ($P<0.01$). **Conclusion:** Doxepin should alleviate ACD in rats. It might be interpreted by decreasing hepcidin mRNA expression and inhibiting the secretion of IL-6.

Key words anemia of chronic disease; doxepin; interleukin-6; hepcidin mRNA

慢性病贫血(anemia of chronic disease, ACD) 又称炎症性贫血,常伴发于慢性感染、慢性非感染性炎症及肿瘤等。有研究发现,贫血是肿瘤患者生存率的独立预后因素,如术前贫血将会缩短乳腺癌患者的总生存期^[1-2]。目前,临床上治疗 ACD 重要的方法是使用重组人促红细胞生成素素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)^[3]。但在慢性炎症时,细胞因子网络紊乱使骨髓对 EPO 的反

应性降低,影响红细胞的生成。因此,常有 ACD 患者出现 EPO 低反应性。国内外的研究均提示 rhEPO 的低反应性可能与铁调素(hepcidin)的高水平有关^[4-5]。目前,“炎症-白细胞介素-6(IL-6)-hepcidin-贫血”的发生关系已被证实^[6]。由于组胺可显著刺激 IL-6 产生,有学者建议采用组胺 H1 受体拮抗剂,通过抑制 IL-6 产生,从而抑制 hepcidin 表达,进而达到治疗 ACD 的目的^[7]。多虑平有很强大的抗 H1 受体作用,比传统抗组胺药苯海拉明强 775 倍^[8]。本实验首先建立大鼠 ACD 模型,给予多虑平口服治疗,通过测定血清中 IL-6 水平及肝脏 hepcidin mRNA 表达量,初步探讨多虑平治疗大鼠 ACD 的作用机制。

^{*} 基金项目:宁德市科技计划项目(No:20150060);福建省自然科学基金资助项目(No:闽科计[2015]15号)

¹ 福建医科大学附属闽东医院血液肿瘤科(福建福安, 355000)

² 遵义医学院第三附属医院血液科

[△] 共同第一作者

通信作者:何云绮, E-mail: 943946824@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 清洁级 (Ⅱ级), 6~7 个月龄, 体重 210~250 g, 购自第三军医大学动物实验中心 [合格证书号: SCXK (渝) 2007-0005]。

1.2 动物模型制作

清洁级、健康雄性 SD 大鼠, 反复于背部双肩胛骨之间脂肪垫内注射松节油^[4], 剂量为 0.2 ml/200 g 体重, 每周 1 次, 共 7 周, 第 8 周通过心脏取血法, 取 3.0 ml 进行血常规测定, 如表现为正细胞正色素性贫血, 则表明模型制备成功^[4]。对照组脂肪垫内注射等量生理盐水。

1.3 实验分组及处理

按照随机对照原则共分为 3 个组: 健康对照组、ACD 模型组、多虑平治疗组, 每组均为 8 只。造模成功后给予治疗组大鼠多虑平 15 mg/kg 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d; 对照组及模型组给予等量生理盐水灌胃。灌胃容积 0.5 ml/100 g。

1.4 大鼠血常规的测定

心脏取血法: 取血前禁食 12 h, 实验当天禁水。4% 戊巴比妥钠 0.15 ml/100 g 腹腔注射麻醉后, 将大鼠仰位固定, 右手持 5 ml 注射器由心尖搏动最强处进针, 当针尖刺入心脏时, 血液由于心搏自然涌入注射器, 然后缓慢抽拉取血 3 ml 送检。

1.5 ELISA 法测定血清中 IL-6

术前动物禁食 12 h, 4% 戊巴比妥钠 0.15 ml/100 g 腹腔注射麻醉后, 腹主动脉取血 5.0 ml 注入分离胶促凝管中, 离心, 分离血清, -80℃ 冰箱保存, 用于 IL-6 的测定。

1.6 RT-PCR 法测定肝脏 hepcidin mRNA

上述 1.5 中, 腹主动脉取血 5.0 ml 后, 接着分别切取每只大鼠肝脏最大叶的同一部位部分肝组织 (-80℃) 冻存, 用于肝脏 hepcidin mRNA 的测定。

1.7 统计学处理

所有数据均采用 SPSS16.0 软件包处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多样本比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用直线相关检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACD 大鼠模型的建立及 ACD 模型组与健康对照组血常规检测结果比较

首次注射松节油后 7 周 (第 8 周) 测定大鼠血常规: 与健康对照组比较, ACD 模型组大鼠的血红蛋白、红细胞、血细胞比容均明显下降 ($P < 0.01$); 而红细胞平均体积、平均血红蛋白差异无统计学意义, 大鼠贫血类型为正细胞正色素性贫血, 白细胞和血小板无明显变化, 表明造模成功。详见表 1。

2.2 ACD 模型组与多虑平治疗组血常规检测结果比较

给药 7 d 后测血常规, 与 ACD 模型组比较, 多虑平治疗组大鼠血红蛋白、红细胞、血细胞比容均明显上升 ($P < 0.01$), 详见表 2。

2.3 各组大鼠血清中 IL-6 水平及肝脏 hepcidin mRNA 表达比较

与健康对照组比较, ACD 模型组大鼠血清 IL-6 水平及肝脏 hepcidin mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); 治疗 7 d 后, 与 ACD 模型组比较, 多虑平治疗组大鼠血清 IL-6 水平及肝脏 hepcidin mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$)。详见表 3。

2.4 ACD 模型大鼠中各指标的相关性分析

ACD 模型大鼠包括 ACD 模型组大鼠和多虑平治疗组大鼠, 共 16 只。相关性分析发现这 16 只大鼠血清中 IL-6 水平与血红蛋白呈线性负相关 ($r = -0.591, P < 0.001$), 且肝脏 hepcidin mRNA 表达与血红蛋白亦呈线性负相关 ($r = -0.759, P < 0.001$), 而肝脏 hepcidin mRNA 表达与血清 IL-6 水平呈线性正相关 ($r = 0.619, P < 0.001$)。

表 1 ACD 模型组和健康对照组血常规检测结果

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	血红蛋白 (g · L ⁻¹)	红细胞 (×10 ¹² · L ⁻¹)	血细胞 比容/%	红细胞 平均体积/fl	平均血红蛋白 /pg
健康对照组	8	154.00±3.30	8.60±0.31	44.88±1.43	52.14±2.12	17.98±0.46
ACD 模型组	8	128.62±5.01 ¹⁾	7.29±0.37 ¹⁾	39.93±1.87 ¹⁾	53.86±2.33	17.70±0.82

与健康对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 ACD 模型组与多虑平治疗组血常规检测结果

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	血红蛋白 (g · L ⁻¹)	红细胞 (×10 ¹² · L ⁻¹)	血细胞 比容/%	红细胞 平均体积/fl	平均血红蛋白 /pg
ACD 模型组	8	127.17±5.27	6.83±0.29	38.80±1.67	54.80±1.43	18.63±0.33
多虑平治疗组	8	148.42±4.58 ¹⁾	8.38±0.56 ¹⁾	42.56±1.24 ¹⁾	52.06±4.39	17.89±1.03

与 ACD 模型组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠血清中 IL-6 水平及肝脏 hepcidin mRNA 表达比较

组别	例数	IL-6 /(pg · ml ⁻¹)	hepcidin /β-actin
健康对照组	8	6.558±6.131	3.559±0.969
ACD 模型组	8	108.750±18.085 ¹⁾	32.520±6.630 ¹⁾
多虑平治疗组	8	82.370±20.431 ²⁾	12.426±2.665 ²⁾

与健康对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$; 与 ACD 模型组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

ACD 是临床上常见的贫血类型,目前多认为 hepcidin 高表达导致铁代谢异常是其发生的主要原因^[9]。研究发现,hepcidin 是铁代谢的主要负调节因子^[10],在 ACD 的发生过程中发挥至关重要的作用^[11]。Hepcidin 可通过抑制肠道铁吸收^[12],及十二指肠、巨噬细胞铁释放,造成严重的低铁血症,使血红蛋白合成受限,最终导致 ACD 的发生,这与王恒石等^[13]发现 ACD 患者血清中 IL-6 明显升高相一致。本实验中,ACD 模型组大鼠血清中 IL-6 水平及肝脏 hepcidin mRNA 表达明显增高,二者呈线性正相关($r=0.619$),与血红蛋白水平均为线性负相关(r 分别为 -0.591 及 -0.759),而肝脏 hepcidin mRNA 表达量与血清 IL-6 水平呈线性正相关,与 Hohauss 等^[14]在对霍奇金淋巴瘤贫血患者的研究中所得到的相关关系结果相似。

贫血的存在不仅使患者生活质量下降,而且影响基础疾病的预后。然而,目前 ACD 的治疗缺乏有效手段,探索更为有效的方法显得尤为重要。本实验首先通过反复皮下注射松节油建立 ACD 模型,给予多虑平治疗 1 周后,发现大鼠血清中 IL-6 含量及肝脏 hepcidin mRNA 表达均明显下降,而血红蛋白明显升高,证实多虑平可有效治疗 ACD,其机制可能是通过抑制 hepcidin mRNA 表达和抑制 IL-6 分泌从而调控细胞因子网络。

组胺主要是由肥大细胞、嗜碱粒细胞的 L-组氨酸在组氨酸脱羧酶作用下合成的,通过其 H1、H2、H3 和 H4 的 4 种受体产生效应,参与免疫相关性疾病及肿瘤的炎症等病理过程^[15]。日本学者 Masuda 等^[16]研究显示,抑制巨噬细胞组胺的释放可降低 IL-6 的分泌。多虑平作为强大的 H1 受体拮抗剂,能减少组胺的释放,从而降低血清中 IL-6 的含量,由此推测多虑平可能通过此机制改善贫血。

综上所述,我们发现多虑平有升高 ACD 大鼠血红蛋白的作用,可能通过抑制 H1 受体介导的炎症反应从而降低 IL-6 和 hepcidin mRNA 的表达水平来提高血红蛋白浓度、改善贫血。因此,多虑平可能给 ACD 治疗带来新的手段。然而,在 ACD 患

者中是否能得到同样的疗效,需要进一步临床试验。

参考文献

- [1] Qiu MZ, Yuan ZY, Luo HY, et al. Impact of pretreatment hematologic profile on survival of colorectal cancer patients[J]. Tumour Biol, 2010, 31: 255—260.
- [2] Zhang Y, Chen Y, Chen D, et al. Impact of preoperative anemia on relapse and survival in breast cancer patients[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 844.
- [3] Rainville N, Jachimowicz E, Wojchowski DM. Targeting EPO and EPO receptor pathways in anemia and dysregulated erythropoiesis [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 30: 1—15.
- [4] 孙雪峰, 周道斌, 赵永强. EPO 对铁调蛋白 hepcidin 表达影响的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14 (4): 778—782.
- [5] Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadi G, et al. Kynurenine, by activating aryl hydrocarbon receptor, decreases erythropoietin and increases hepcidin production in HepG2 cells: a new mechanism for anemia of inflammation[J]. Exp Hematol, 2016, 44: 60—67.
- [6] Vokurka M, Krijt J, Vávrová J, et al. Hepcidin expression in the liver of mice with implanted tumour reacts to iron deficiency, inflammation and erythropoietin administration[J]. Folia Biol (Praha), 2011, 57: 248—254.
- [7] Altschuler EL, Kast RE. Using histamine (H1) antagonist, in particular atypical antipsychotics, to treat anemia of chronic disease via interleukin-6 suppression [J]. Med Hypotheses, 2005, 65: 65—67.
- [8] Richelson E. Antimuscarinic and other receptor-blocking properties of antidepressants [J]. Mayo Clin Proc, 1983, 58: 40—46.
- [9] Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later [J]. Blood, 2011, 117: 4425—4433.
- [10] Rishi G, Wallace DF, Subramaniam VN. Hepcidin: regulation of the master iron regulator [J]. Biosci Rep, 2015, 35: e00192.
- [11] Jiang F, Yu WJ, Wang XH, et al. Regulation of hepcidin through GDF-15 in cancer-related anemia [J]. Clin Chim Acta, 2014, 428: 14—19.
- [12] Przybyszewska J, Zekanowska E. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract [J]. Prz Gastroenterol, 2014, 9: 208—213.
- [13] 王恒石, 胡喜梅, 周水阳, 等. 血清 TNF-α、IFN-γ、IL-6 水平与慢性病贫血的关系 [J]. 山东医药, 2014, 54 (45): 79—81.
- [14] Hohauss S, Massini G, Giachelia M, et al. Anemia in Hodgkin's lymphoma: the role of interleukin-6 and hepcidin [J]. J Clin Oncol, 2010, 28: 2538—2543.
- [15] Akdis CA, Blaser K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112: 15—22.
- [16] Masuda K, Kimura A, Hanieh H, et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages [J]. Int Immunol, 2011, 23: 637—645.

(收稿日期: 2015-12-25)