

基于 Act1/NF- κ B 信号通路探讨类风湿关节炎患者血瘀状态的机制及新风胶囊对其影响

章平衡¹ 刘 健² 谈 冰¹ 万 磊²

摘要 **目的** 基于 Act1/NF- κ B 信号传导通路研究新风胶囊(Xinfeng Capsule, XFC)改善类风湿关节炎患者血瘀状态的机制。**方法** 将 76 例 RA 患者按随机数字表法分为 2 组:XFC 组(3 粒/次,每日 3 次)和来氟米特(LEF)组(10 mg/次,每日 1 次),每组 38 例,连续治疗 3 个月。评定两组中医证候临床疗效;ELISA 法检测血清白介素-10(IL-10)、IL-6、IL-17、核因子 κ B 激活蛋白 1 抗体(NF- κ B activator 1, Act1)、p50、p65,血小板凝聚因子(platelet activating factor, PAF)、血小板活化因子乙酰水解酶(platelet activating factor acetyl hydrolase, PAF-AH);评定血瘀证症状的评分;采用荧光定量 PCR 法检测 Act1、p65、p50 mRNA 表达;Western blot 法检测 p50、p65 蛋白表达。采用 Spearman 方法对 RA 患者外周血凝血指标及血瘀证总积分与 IL-10、IL-6、IL-17、Act1、p50、p65 之间进行相关性分析。**结果** XFC 组总有效率为 89.5%(34/38);LEF 组总有效率为 94.7%(36/38),两组总有效率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 D-D、FBG、PLT、PAF、IL-17 及 IL-6 水平下降,Act1、p50、p65 mRNA 表达及含量水平降低,p50、p65 蛋白水平降低,血瘀证各个症状评分均降低,而 PAF-AH 及 IL-10 水平上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 LEF 组比较,XFC 组治疗后 D-D、FBG、PLT、IL-17 及 IL-6 水平下降,Act1、p65 mRNA 表达及含量水平降低,p65 蛋白表达降低,关节刺痛、舌质、皮下瘀斑及血瘀证总积分的评分均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。RA 外周血 D-D 与 IL-17、IL-6、Act1、p65 呈正相关,与 IL-10 呈负相关($P < 0.05$, $P < 0.01$);FBG 与 IL-6 呈正相关($P < 0.05$);PLT 与 IL-17 呈正相关($P < 0.05$);血瘀证总积分与 IL-6、Act1、p65 呈正相关,与 IL-10 呈负相关($P < 0.05$, $P < 0.01$);PAF 与 IL-17、IL-6、Act1、p65 呈正相关($P < 0.05$, $P < 0.01$);PAF-AH 与 p50 呈负相关($P < 0.05$)。**结论** RA 患者血瘀状态的发生机制及新风胶囊对血瘀状态的影响可能是与 Act1/NF- κ B 信号传导通路密切相关。

关键词 类风湿关节炎;核因子- κ B;血瘀状态;新风胶囊;核因子- κ B 激活剂 1

Xinfeng Capsule Improved Blood Stasis State of Rheumatoid Arthritis Patients Based on Act1/NF- κ B Signaling Pathway: Mechanism and Effects ZHANG Ping-heng¹, LIU Jian², TAN Bin¹, and WAN Lei² 1 Graduate School, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230038); 2 Department of Rheumatism, First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230031)

ABSTRACT **Objective** To observe the mechanism of Xinfeng Capsule (XFC) for improving blood stasis state in rheumatoid arthritis (RA) patients based on Act1/NF- κ B signaling pathway. **Methods** Totally 76 RA patients were equally assigned to two groups by random digit table, the XFC group (XFC, 3 pills each time, three times per day) and the Leflunomide group (LEF, 10 mg each time, once per day). All patients were intervened for 3 successive months. Clinical efficacy of symptoms of Chinese medicine (CM) was assessed. Serum levels of interleukin-10 (IL-10), IL-17, IL-6, NF- κ B activator 1 (Act1), p50, p65, platelet activating factor (PAF), platelet activating factor acetyl hydrolase (PAF-AH) were detected using ELISA. Symptoms of blood stasis syndrome (BSS) were also assessed. mRNA expressions of

基金项目:国家科技支撑计划课题(No. 2012BA126B02);国家自然科学基金资助项目(No. 81173211);国家中医药重点学科中医痹病学建设项目(No. 国中医药发[2009]30号);国家临床重点学科中医风湿病科建设项目(No. 财社[2013]239号)

作者单位:1.安徽中医药大学研究生院(合肥 230038);2.安徽中医药大学第一附属医院风湿科(合肥 230031)

通讯作者:刘 健, Tel:13955109537, E-mail:liujianahzy@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 08. 0922

Act1, p50, and p65 were detected using fluorescent quantitative PCR. Protein expressions of p50 and p65 were detected using Western blot. Correlation analyses were performed in RA patients' peripheral blood coagulation indicators, total score of BSS, and IL-10, IL-6, IL-17, Act1, p50, p65 using *Spearman*. Results The total effective rate was 89.5% (34/38) in the XFC group, with no statistical difference as compared with that of the LEF group [94.7% (36/38), $P > 0.05$]. Compared with before treatment in the same group, serum levels of D-dimer (DD), fibrinogen (FBG), platelet (PLT), PAF, IL-17, and IL-6 all decreased, mRNA expressions and serum levels of Act1, p50, and p65 were lowered, protein expressions of p50 and p65 decreased, scores for each symptoms in BSS all decreased, serum levels of PAF-AH and IL-10 increased in the two groups after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the LEF group, serum levels of DD, FBG, PLT, IL-17, and IL-6 decreased, mRNA expressions and serum levels of Act1 and p65 were lowered, protein expression of p65 decreased, scores for joint prickling pain, tongue proper, subcutaneous ecchymosis, and BSS total score all decreased in the XFC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Peripheral blood DD was positively correlated with IL-17, IL-6, Act1, and p65, but negatively correlated with IL-10 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). FBG was positively correlated with IL-6 ($P < 0.05$). PLT was positively correlated with IL-17 ($P < 0.05$). BSS total score was positively correlated with IL-6, Act1, and p65, but negatively correlated with IL-10 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). PAF was positively correlated with IL-17, IL-6, Act1, and p65 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while PAF-AH was negatively correlated with p50 ($P < 0.05$). Conclusion The pathogenesis of BSS in RA patients and the effects of XFC on blood stasis state might be closely correlated to the Act1/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; NF- κ B; blood stasis state; Xinfeng Capsule; NF- κ B activator 1 (Act1)

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病,受累关节表现为以滑膜成纤维细胞为主的炎性细胞增殖与浸润、骨与软骨基质被破坏^[1,2]。其发病机制尚不明确,核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)是参与炎症细胞因子表达的主要转录因子之一,其调节炎症反应、促进滑膜细胞增生、参与关节结构重建,在 RA 发病机制中起关键的调控作用。研究发现 NF- κ B 的高度活化能紊乱微血管的纤溶系统,从而使血液处于一种血瘀状态^[3]。并有研究发现, RA 的疾病发展病程中伴有血小板的活化,临床表现为血液的血瘀状态^[4]。同时血小板的活化产物血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是目前发现的作用最强的脂质介质,同时又是强效的炎症介质,在许多疾病发病过程中扮演重要角色^[5];PAF 在 RA 中对炎性细胞在关节局部的浸润发挥极其重要的作用,与滑膜炎、组织破坏及血管新生密切相关。笔者通过对 RA 患者治疗前及新风胶囊(Xinfeng Capsule, XFC)治疗后外周血中 NF- κ B 通路中蛋白水平、细胞因子的变化以及其与血瘀指标之间的关系,从 NF- κ B 角度探讨 XFC 改善 RA 患者体内血瘀状态的可能发病机制。

材料与方法

1 诊断标准 依据 2010 年美国风湿病学会(ACR)和欧洲抗风湿病联盟(EULAR)提出的最新

RA 分类标准和评分系统^[6],根据评分系统评分,总得分 6 分以上可诊断 RA。RA 的病情活动标准:采用欧洲抗风湿联盟制定的改良疾病活动性标准(3 变量),简称 DAS28-3^[7]。

2 纳入标准 年龄 18~70 岁;符合 RA 诊断标准;患者均为活动期,DAS28 评分 > 2.6 ^[8];同意参加本研究并签署知情同意书。

3 排除标准 (1)合并有心血管、肝脏、肾脏、造血系统等严重疾病以及严重关节外表现,如高热不退、多发类风湿结节、肾脏淀粉样变、缩窄性心包炎、中枢神经系统血管炎等需要使用糖皮质激素的患者。(2)长期服用有关治疗 RA 的药物,且在本研究前至少 1 周内未停用糖皮质激素、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、环磷酰胺、青霉胺和金制剂等免疫抑制药或抗癌药如 MTX 等的患者。(3)孕妇或哺乳期女性的患者。(4)精神病患者。(5)晚期患者,关节严重畸形,完全丧失关节功能者。(6)研究者认为不宜进行此项临床试验者。

4 一般资料 76 例 2014 年 1—12 月在安徽省中医院就诊的住院 RA 患者,其中男性 25 例,女性 51 例;年龄 28~70 岁,平均 (55.98 ± 18.45) 岁;病程 6 个月~20 年,平均 (9.07 ± 4.21) 年。按随机数字表法分为 XFC 组 38 例和 LEF 组 38 例。XFC 组男性 13 例,女性 25 例,年龄 28~69 岁,平均 (54.73 ± 17.25) 岁;病程 6 个月~19 年,平均 (8.78 ± 4.32)

年;LEF 组男性 12 例,女性 26 例,年龄 28~70 岁,平均(55.68±18.23)岁;病程 6 个月~20 年,平均(9.04±4.16)年。两组在年龄、性别等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会批准。

5 治疗方法 XFC 组服用 XFC(0.5 g/粒,安徽中医药大学第一附属医院制剂中心生产,产品批号:201205291),每次 3 粒,每日 3 次,连服 3 个月^[9];LEF 组服用来氟米特片 LEF(10 mg/片,福建江天生物药业有限公司生产,产品批号:H20050175)每次 1 片,每日 1 次,服用天数、疗程均与治疗组相同。两组患者在治疗期间可根据病情需要服用丙酸类非甾体消炎止痛药,不加服免疫抑制剂及其他治疗本病的其他中成药。

6 观察指标及检测方法

6.1 中医证候临床疗效评定 参照参考文献[10]制定,具体为:治愈:症状全部消失,关节功能恢复正常,主要理化检查指标正常;显效:全部症状或主要症状消除,关节功能基本恢复,能参加正常劳动或理化检查指标基本正常;有效:主要症状基本消除,主要关节功能基本恢复或明显进步,生活不能自理转为能够自理,或者失去工作和劳动能力转为工作和劳动能力有所恢复,主要理化检查指标有所改善;无效:与治疗前均无进步。

6.2 血清指标检测 ELISA 法检测血清白介素-10(IL-10)、IL-6、IL-17、核因子 NF- κ B 激活蛋白 1 抗体(NF- κ B activator 1, Act1)、p50、p65、PAF、血小板活化因子乙酰水解酶(platelet activating factor-platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH)。治疗前后清晨空腹采集患者静脉血 2 mL, 4℃ 至自然凝固后 3 000 r/min 离心 5 min,分离血清,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作测定 IL-10、IL-6、IL-17、Act1、p50、p65、PAF、PAF-AH 的含量。本实验完成于安徽中医药大学第一附属医院实验中心。血小板(PLT)用日本 Sysmex XT-2000i 全自动血细胞分析仪检测,D-二聚体(D-D)、纤维蛋白原(FBG)用 Sysmex CA-1500 型全自动凝血仪检测。

6.3 血瘀证症状的评分标准 参照《中药新药临床研究指导原则》制定的“血瘀证症状分级量表”^[11]。(1)关节刺痛:0 分:无疼痛;1 分:偶尔发生,1.5 h 内可自行缓解;2 分:每天疼痛时间<3 h,按之痛甚,服一般药物可缓解;3 分:持续疼痛,疼痛难忍,拒按,需服止痛药才可缓解。(2)唇色:0 分:正常;1 分:紫红;2 分:紫暗;3 分:紫暗且面色晦暗。(3)舌

质:0 分:正常;1 分:舌暗红,有瘀点;2 分:舌紫暗,有瘀斑瘀点;3 分:舌青紫,或舌下静脉曲张。(4)脉象:0 分:正常;1 分:脉涩;2 分:细涩;3 分:无脉,细涩或结代。(5)皮下瘀斑:0 分:无;1 分:全身两处以上瘀斑,因碰撞而起;2 分:全身 3 处以上瘀斑;3 分:全身 3 处瘀斑青紫,自行发生。(6)肌肤甲错:0 分:无;1 分:手足皮肤粗糙不起鳞屑;2 分:手足皮肤粗糙起鳞屑;3 分:全身多处皮肤粗糙,鳞屑脱落。

6.4 Act1、p65、p50 mRNA 表达检测 采用荧光定量 PCR 法检测。根据美国加利福尼亚州 Invitrogen 公司提供的引物序列号,使用 Primer 5 软件设计并分析引物,引物序列见表 1。mRNA 检测步骤:用 Trizol 提取患者血液中的总 RNA,总 RNA 按照 Thermo 反转录试剂盒说明书提供方法进行反转录。PCR 反应体系为 10 μ L:正、反引物各 1 μ L 及 SYBR Green 染料 5 μ L,反转录产物 2 μ L,水补至 10 μ L。每一组样品进行 PCR 反应时,用 β -actin 作为内参照,用同一样品的 cDNA 和同样的 PCR 反应条件进行扩增,扩增条件为 95℃ 预变性 5 min,然后按下列循环条件进行扩增,95℃ 变性 10 s,退火 60℃ 30 s,循环 40 次。本实验完成于安徽中医药大学免疫学实验室(ISO15198:CNAS-MT0111)。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列及扩增长度

基因	引物序列	扩增长度 (bp)
β -actin	上游:5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTAAGG-3'	185
	下游:5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'	
Act1	上游:5'-TAGGGATACCGTGTGAT-3'	181
	下游:5'-GAAGAGCACAGGGATGAA-3'	
p65	上游:5'-GGGGACTACGACCTGAATG-3'	118
	下游:5'-GGGCACGATTGTCAAAGAT-3'	
p50	上游:5'-CACCTGACCTTGCCAT-3'	167
	下游:5'-AAGCTGCCAGTGCTATCC-3'	

6.5 p50 及 p65 蛋白表达水平检测 RIPA 液提取心脏组织蛋白,用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,用 Western blot 法检测 p50、p65 蛋白表达,用 BandScan 软件测定凝胶各条带的积分吸光度(integrated absorbance, IA)值,以 β -actin 为内参照,以 p50/ β -actin、p65/ β -actin 比值表示 p50、p65 蛋白表达水平。

6.6 相关性分析 采用 Spearman 方法对 RA 患者外周血凝血指标及血瘀总积分与 IL-10、IL-6、IL-17、Act1、p50、p65 之间进行相关性分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统

计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布数据,两组间的比较采用独立样本 t 检验,治疗前后的比较采用配对样本 t 检验,非正态分布数据用秩和检验,率的比较用 χ^2 检验。相关性分析采用 *Spearman* 相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组患者中医临床疗效比较(表 2) XFC 组总有效率为 89.5%;LEF 组总有效率为 94.7%,两组总有效率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 两组治疗前后血清指标比较(表 3、4) 与治疗前比较,两组治疗后 D-D、FBG、PLT、PAF、IL-17 及 IL-6 水平下降,PAF-AH 及 IL-10 水平上升($P < 0.01$);与 LEF 组治疗后比较,XFC 组 D-D、FBG、PLT、IL-17 及 IL-6 水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 两组临床疗效的比较 [例(%)]						
组别	例数	治愈	显效	有效	无效	总有效
XFC	38	1(2.6)	10(26.3)	23(60.5)	4(10.5)	34(89.5)
LEF	38	3(7.9)	11(28.9)	22(57.9)	2(5.3)	36(94.7)

3 两组治疗前后血瘀证症状评分比较(表 5) 与治疗前比较,两组血瘀证各个症状评分均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 LEF 组比较,治疗后 XCF 组关节刺痛、舌质、皮下瘀斑及血瘀证总积分的评分均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

4 两组患者治疗前后 Act1、p50、p65 mRNA 表达及含量水平的比较(表 6) 与治疗前比较,两组治疗后 Act1、p50、p65 mRNA 表达及含量水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);且治疗后 XFC 组 Act1、p65 mRNA 表达及含量水平低于 LEF 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 两组治疗前后 D-D、FBG、PLT 及 PAF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	D-D(mg/L)	FBG(g/L)	PLT($10^9/L$)	PAF($\mu g/L$)
XFC	38	治疗前	2.854 ± 2.658	4.264 ± 1.205	305.290 ± 93.220	7.331 ± 3.843
		治疗后	0.288 ± 0.206 * $\Delta\Delta$	2.652 ± 0.547 * $\Delta\Delta$	234.447 ± 23.291 * Δ	5.014 ± 2.937 *
LEF	38	治疗前	2.562 ± 2.486	4.174 ± 1.166	287.632 ± 87.922	7.331 ± 3.843
		治疗后	0.672 ± 0.267 *	3.216 ± 0.608 *	254.842 ± 52.646 *	6.063 ± 3.335 *

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.01$;与 LEF 组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 4 两组治疗前后 PAF-AH、IL-17、IL-10 及 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	PAF-AH($\mu g/L$)	IL-17($\mu g/L$)	IL-10($\mu g/L$)	IL-6($\mu g/L$)
XFC	38	治疗前	117.893 ± 46.955	10.234 ± 1.716	160.696 ± 40.660	4.785 ± 1.826
		治疗后	177.025 ± 52.658 *	8.811 ± 1.311 * $\Delta\Delta$	200.638 ± 40.904 *	3.111 ± 0.860 * Δ
LEF	38	治疗前	117.893 ± 46.955	10.466 ± 1738	160.792 ± 39.825	5.218 ± 2.143
		治疗后	173.766 ± 45.143 *	9.949 ± 1.327 *	198.921 ± 39.075 *	3.872 ± 1.623 *

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.01$;与 LEF 组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 5 两组治疗前后血瘀证症状评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	关节刺痛	唇色	舌质	脉象	皮下瘀斑	肌肤甲错	血瘀总积分
XFC	38	治疗前	1.763 ± 0.714	2.342 ± 0.745	2.158 ± 0.495	1.737 ± 0.795	1.290 ± 0.460	1.684 ± 0.842	10.974 ± 2.573
		治疗后	0.394 ± 0.547 ** Δ	2.184 ± 0.730 *	0.447 ± 0.602 ** $\Delta\Delta$	1.632 ± 0.675 *	0.263 ± 0.446 ** Δ	1.500 ± 0.558 *	4.842 ± 2.200 ** Δ
LEF	38	治疗前	1.763 ± 0.675	2.368 ± 0.750	2.158 ± 0.495	1.711 ± 0.802	1.316 ± 0.471	1.711 ± 0.835	11.026 ± 2.509
		治疗后	1.605 ± 0.638 *	2.211 ± 0.704 *	2.053 ± 0.399 *	1.658 ± 0.708	1.184 ± 0.512	1.526 ± 0.603 *	6.921 ± 2.540 **

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 LEF 组同期比较, $\Delta P < 0.01$

表 6 两组患者治疗前后 Act1、p50、p65 mRNA 表达及含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Act1 mRNA	p50 mRNA	p65 mRNA	Act1($\mu g/L$)	p50($\mu g/L$)	p65($\mu g/L$)
XFC	38	治疗前	1.844 ± 0.113	3.046 ± 0.474	2.767 ± 0.753	1180.424 ± 826.888	657.445 ± 140.342	1201.928 ± 578.104
		治疗后	0.881 ± 0.131 * Δ	0.888 ± 0.187 **	0.911 ± 0.030 ** Δ	726.290 ± 323.257 ** Δ	623.240 ± 114.286 *	798.859 ± 181.564 ** $\Delta\Delta$
LEF	38	治疗前	2.850 ± 0.777	3.346 ± 0.514	2.725 ± 0.114	1163.372 ± 822.051	665.540 ± 136.353	1230.624 ± 549.522
		治疗后	1.344 ± 0.242 *	1.031 ± 0.174 *	1.280 ± 0.134 *	1027.642 ± 670.627 **	626.449 ± 109.930 **	1063.025 ± 467.442 **

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 LEF 组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

5 两组患者治疗前后 p50、p65 蛋白水平比较(图 1) 与治疗前比较,两组治疗后 p50、p65 蛋白水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 LEF 组比较,XFC 组 p65 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

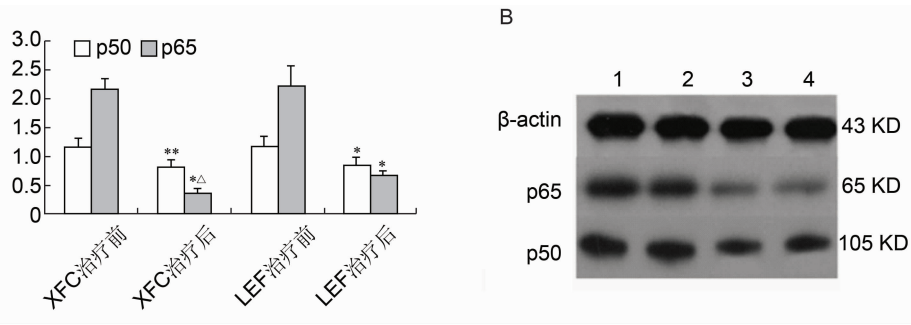
6 RA 患者相关性分析结果比较(表 7) 相关性分析显示,RA 外周血 D-D 与 IL-17、IL- 6、Act1、p65 呈正相关,与 IL-10 呈负相关($P < 0.05$, $P < 0.01$);FBG 与 IL- 6 呈正相关($P < 0.05$);PLT 与 IL-17呈正相关($P < 0.05$);血瘀总积分与 IL- 6、Act1、p65 呈正相关,与 IL-10 呈负相关($P < 0.05$, $P < 0.01$);PAF 与 IL-17、IL- 6、Act1、p65 呈正相关($P < 0.05$, $P < 0.01$); PAF-AH 与 p50 呈负相关($P < 0.05$)。

讨 论

RA 是以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病。RA 属中医学“痹证”的范畴,对痹病日久不愈者,认为“必有湿痰败血瘀滞经络”,而致“血停为瘀,湿凝为痰”,虚、痰、瘀胶结,与外邪相和,合而为患,导致经络闭阻,深入骨髓,胶着难愈。RA 临床表现中外周关节酸痛、肿胀、麻木的特点为痛有定处、关节周围皮下结节或出现瘀斑皆是血瘀证的表现。总之,血瘀贯穿于类风湿关节炎的始终^[12]。

现有研究证明,RA 患者体内存在着凝血纤溶系统的紊乱,从而导致血瘀的发生,FBG 是一种由肝脏合成的与凝血有关的蛋白质^[13]。D-D 水平升高反映纤溶活性增强,是体内血瘀状态和血栓形成的重要指标^[14]。蒋广恩等^[15]发现 D-D 的浓度升高,提示机体凝血-纤溶系统功能异常,与体内的血瘀状态密切相关。而 PLT 是血液中的有形成分之一,在凝血、炎症反应及血栓形成等生理和病理过程中有重要作用^[16]。血小板活化因子 PAF 不仅能够扩大炎症反应,还能刺激滑膜细胞增殖^[17]。关节滑膜细胞过度增殖和血管翳的形成以及血管壁通透性增高是 RA 疾病的重要病理过程;PAF 是使血浆从血管内转移到间质腔的最有力的内源性物质之一^[18],它是血小板活化剂,能引起血小板聚集^[19],从而使血液处于血瘀状态。实验研究发现血小板活化后释放 PAF 可刺激一些炎症细胞释放大量的炎症因子,且 PAF 的水平与这种作用呈明显正相关^[20]。血小板活化因子-乙酰水解酶 PAF-AH 具有明显的底物选择性^[21],能使血小板活化因子失去活性^[22], PAF-AH 与 PAF 的动态平衡对维持 PAF 的正常活性起重要作用。目前血瘀状态在 RA 的临床研究尚少,其作用机制也仍未知。

然而,凝血纤溶系统的紊乱导致血瘀的发生又与致炎抑炎细胞因子的失衡密切相关。IL-10 是一种抑炎



注:A 为两组患者治疗前后 p50、p65 蛋白水平比较; B 为两组患者治疗前后 p50、p65 蛋白电泳图,1 为 XFC 组治疗前,2 为 LEF 治疗前,3 为 XFC 治疗后,4 为 LEF 治疗后;与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 LEF 组同期比较, $\Delta P < 0.01$

图 1 两组 p50、p65 蛋白水平的比较

表 7 RA 患者外周血凝血指标相关性分析 (r)

指标	D-D	FBG	PLT	血瘀总积分	PAF	PAF-AH
IL-10	-0.537**	-0.261	-0.142	-0.393*	-0.275	0.240
IL-17	0.346*	0.309	0.412*	0.138	0.336*	-0.007
IL-6	0.496**	0.369*	0.260	0.545**	0.405*	-0.039
Act1	0.647**	0.124	0.206	0.359*	0.521**	-0.253
p65	0.514**	0.245	0.150	0.515**	0.468**	-0.173
p50	0.282	0.190	0.221	0.191	-0.136	-0.440**

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

因子,可下调炎症细胞因子血浆浓度等机制下调炎症反应强度,并且与血瘀状态密切相关,如韦国玉等^[23]研究发现 IL-10 与 D-D 呈明显的负相关,可以抑制血瘀的发生。IL-17 可诱导滑膜细胞产生粒-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 和前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂),可刺激关节液中巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-1,促发滑膜炎症及滑膜增生。既往国内外研究发现,IL-17 与 RA 患者的临床症状、滑膜成纤维细胞的增生和软骨及骨的病理性损伤密切相关^[24, 25], IL-17 可通过 NF- κ B/HIF-1 α (缺氧诱导因子-1 α) 通路增加基质金属蛋白酶 MMP2 和 MMP9 表达,促进 RA 滑膜细胞迁移和破坏^[26]。而 IL-6 可以诱导中性粒细胞产生大量的血小板激活物血小板活化因子 PAF,PAF 不仅能够扩大炎症反应,还能刺激滑膜细胞增殖^[27],从而能引起血小板聚集^[19],促进血瘀的发生。并且 IL-6 可以上调纤维蛋白原表达,从而导致瘀血发生,且与血管炎症程度密切相关^[28]。

Act1 是新近鉴定出的 NF- κ B 信号通路活化蛋白,是 NF- κ B 的激活剂,Chang SH 等^[29]研究表明 Act1 介导 IL-17 依赖的 NF- κ B 的活化,是一种重要的信号转导调节子。国外对 Act1 进行基因敲除或 RNA 干扰实验研究发现,Act1 是 IL-17 激活 NF- κ B 所必需的^[30]。早期就有研究发现 IL-17 可以分泌到胞外,能激活 Fb 的 NF- κ B,诱导 IL-6 的分泌^[31]。本研究发现,RA 外周血凝血纤溶指标 D-D、FBG、PLT、PAH、PAF-AH、血瘀总积分与细胞因子及 NF- κ B 信号通路均存在相关性,说明 RA 患者体内血瘀状态的发生可能与细胞因子的失衡及 NF- κ B 信号通路的异常活化有关。

RA 属中医学“痹证”的范畴,在对痹证的辨证论治过程中,“瘀血”作为重要的病理因素和致病产物,贯穿在病程始终。“血瘀证”是痹证常见证候之一。历代书籍中记载了大量的以活血化瘀方药为主的治疗痹证的有效方剂。XFC 是基于健脾益气通络的治疗原则^[32]研制的治疗 RA 中药复方制剂,由黄芪、薏苡仁、雷公藤、蜈蚣 4 味药物组成。其中黄芪具有益气健脾、补中固表功效,气能生血,气血充足,则血液运行正常。其中的黄芪多糖可以抑制炎症递质的产生及氧自由基生成,具有良好的抗炎作用^[33]。薏苡仁能健脾利湿,舒筋除痹。蜈蚣能攻毒散结,通络止痛。刘瑞莲等^[34]研究发现蜈蚣煎剂能延长凝血时间,降低血黏度,改善血瘀状态。雷公藤祛风除湿、活血通络、消肿止痛,可以显著抑制巨噬细胞分泌

NO 及 IL-6,从而起到较强的抗炎作用^[35]。雷公藤醋酸乙酯提取物能明显降低大鼠血浆黏度、纤维蛋白原含量,进而改善血瘀状态^[36]。纵观全方,XFC 不仅能够健脾益气,舒筋除痹并且可以活血通络止痛,对改善 RA 患者血瘀状态具有重要意义。同时本研究发现 XFC 组治疗后 D-D、FBG、PLT、PAF、PAF-AH、Act1、p50、p65、血瘀症状、细胞因子均明显改善,且较 LEF 组亦有改善。

综上所述,NF- κ B 信号通路的异常活化导致凝血-纤溶系统的紊乱可能是 RA 患者血瘀状态发生的重要原因之一。与 LEF 组比较,XFC 可更有效的下调 RA 患者 D-D、FBG、PLT、PAF、致炎细胞因子水平以及抑制 NF- κ B 信号通路的异常活化,并更有效地改善 RA 患者血瘀症状,从而更好地改善 RA 患者的血瘀状态。其机制可能是由于 XFC 有效地下调 D-D、FBG、PLT、PAF、PAF-AH、Act1、p50、p65,上调 IL-10、PAF-AH 表达水平,从而改善了关节刺痛、舌质暗红、皮下瘀斑等血瘀症状。

参 考 文 献

- [1] Breedveld FC, Combe B. Understanding emerging treatment paradigms in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(Suppl 1): S3.
- [2] Haraoui B, Pope J. Treatment of early rheumatoid arthritis: concepts in management [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2011, 40(5): 371-388.
- [3] 陈丽萌,李学旺,林嘉友,等. 洛伐他汀对高糖时人肾小管上皮细胞核因子- κ B 和组织纤溶酶原激活物及其抑制物的作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2001, 7(6): 399-403.
- [4] 纵瑞凯,刘健. 血小板活化产物在 RA 中的作用及中药对其干预作用的研究进展 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 8(7): 725-730.
- [5] 王德传,张奕华,彭司勋. 血小板活化因子受体拮抗剂的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2000, 31(5): 397-400.
- [6] Villenave E, Nam J, Emery P. 2010 ACR-EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis [J]. *Rev Bras Reumatol*, 2010, 50(5): 481-483.
- [7] 刘健,徐桂琴. 新风胶囊治疗类风湿关节炎临床疗效的系统评价 [J]. *中医药临床杂志*, 2011, 23(6): 502-508.
- [8] Prevoo MLL, van't Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38(1): 315-324.
- [9] 程园园,刘健,万磊,等. 新风胶囊对膝关节炎患者 B、T 淋巴细胞衰减因子及氧化应激的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(5): 416-421.
- [10] 张进玉主编. 类风湿性关节炎 [M]. 第 2 版. 北京: 人民

卫生出版社,1999:134.

- [11] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002:390-395.
- [12] 左芳. 补益肝肾、活血化瘀法治疗类风湿关节炎 65 例[J]. 天津医药, 2009, 37(11): 963-964.
- [13] 薛红霞, 崔华东, 刘冬梅, 等. D-二聚体及纤维蛋白原水平在类风湿关节炎中的临床意义[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(11): 1004-1006.
- [14] Holtkötter H, Dierig L, Schürenkamp M, et al. Validation of an immunochromatographic D-dimer test to presumptively identify menstrual fluid in forensic exhibits[J]. Int J Legal Med, 2015, 129(1): 37-41.
- [15] 蒋广恩, 周乃珍, 陈治卿. 高血压患者微量白蛋白尿与凝血纤溶指标的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2012, 28(8): 587-589.
- [16] 孟明, 周蕾, 高伟敏, 等. 活化血小板对类风湿关节炎滑膜炎炎症和增生影响的实验研究[J]. 细胞分子与免疫学杂志, 2012, 28(8): 828-829, 833.
- [17] Herrero-Beaumont G, Eqido J. PAF, a potent proinflammatory mediator, looking for its role in the pathogenesis of joint damage[J]. Ann Rheum Dis, 1997, 56(4): 211-213.
- [18] 蒋美珍, 李少华, 张亚霏, 等. 受体激活对血小板激活因子、组胺致血管壁通透性增高的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 1994, 15(3): 207-211.
- [19] 郑慧丽, 温海霞, 刘国艺. 血小板活化因子对大鼠黄体细胞孕酮分泌及血管内皮生长因子表达的作用[J]. 生理学报, 2008, 60(2): 275-278.
- [20] 纵瑞凯, 刘健. 新风胶囊对佐剂关节炎大鼠外周血小板活化因子及白细胞介素 6 和 17 表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2011, 12(9): 1347-1351.
- [21] Corte-Real R, Gomes RN, Castro-Faria-Neto HC, et al. The activity of platelet activating factor-acetyl hydrolase (PAF-AH) in the salivary glands of *Rhodnius prolixus* [J]. J Insect Physiol, 2011, 57(6): 825-829.
- [22] Karasawa K, Harada A, Satoh N, et al. Plasma platelet activating factor acetyl hydrolase (PAF-AH)[J]. Prog Lipid Res, 2003, 42(2): 93-114.
- [23] 韦国玉, 杨莉, 周红. 肺炎支原体肺炎患儿治疗前后血清 IL-2、IL-10、IL-18 和 D-D 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(6): 720-722.
- [24] Abdollahi-Roodsaz S, de Loo FA, Koenders MI, et al. Destructive role of myeloid differentiation factor 88 and protective role of TRIF in interleukin-17-dependent arthritis in mice [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1838-1847.
- [25] Lee SY, Kwok SK, Son HJ, et al. IL-17-mediated Bcl-2 expression regulates survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through STAT3 activation [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(1): 31-35.
- [26] Li G, Zhang Y, Qian Y, et al. Interleukin-17 promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF-kappaB/HIF-1alpha pathway [J]. Mol Immunol, 2013, 53(30): 227-236.
- [27] Herrero-Beaumont G, Eqido J. PAF, a potent proinflammatory mediator, looking for its role in the pathogenesis of joint damage[J]. Ann Rheum Dis, 1997, 56(4): 211-213.
- [28] Lin CY, Yang YH, Lee CC, et al. Thrombopoietin and interleukin-6 levels in Henoch-Schönlein purpura [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2006, 39(6): 476-482.
- [29] Chang SH, Park H, Dong C, et al. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor [J]. J Biol Chem, 2006, 281(47): 35603-35607.
- [30] Qian Y, Liu C, Hartupée J, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease [J]. Nat Immunol, 2007, 8(3): 247-256.
- [31] Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor [J]. Immunity, 1995, 3(6): 811-821.
- [32] 纵瑞凯, 刘健. 新风胶囊对佐剂关节炎大鼠外周血小板活化因子及白细胞介素 6 和 17 表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2011, 9(12): 1347-1352.
- [33] 王芳, 刘健, 叶英法, 等. 基于 Keap1-Nrf2/ARE 信号转导通路探讨黄芪多糖改善干燥综合征模型大鼠心功能机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(5): 566-574.
- [34] 刘瑞连, 廖建萍, 刘绍贵. 蜈蚣不同部位抗凝活性的研究 [J]. 中医药导报, 2015, 21(2): 32-33.
- [35] 杨帆, 白祥军, 刘开俊, 等. 雷公藤内酯醇对内毒素激活小鼠腹腔巨噬细胞分泌促炎递质 NO 和 IL-6 的影响 [J]. 中医药导报, 2010, 29(1): 9-12.
- [36] 何珏, 肖诚, 任海霞, 等. 雷公藤在类风湿性关节炎模型中的研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(9): 720-721.

(收稿:2015-07-24 修回:2016-05-24)