

和痹方联合 MTX 治疗肝脾失调型早期类风湿关节炎疗效及对患者血清 MMP-3 及 RANK/RANKL/OPG 表达的影响

张艳艳^{1,2} 王 建³ 姜 萍¹ 武继彪¹

摘要 目的 观察和痹方联合甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)对肝脾失调型早期类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)疗效及患者血清基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase 3, MMP-3)及核因子- κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)/核因子- κ B 受体活化因子受体(RANKL)/骨保护素(osteoprotegerin, OPG)表达的影响。**方法** 采用随机数字表法将 72 例肝脾失调型早期 RA 患者分为治疗组及对照组,每组 36 例,对照组采用 MTX 治疗,治疗组在此基础上联合和痹方治疗,两组 MTX 从 7.5 mg 逐渐加至 12.5 mg,每周 1 次,疗程 24 周。观察两组 ACR20 改善率、中医证候疗效、类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、血沉(ESR)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、抗环瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibody, CCP)及血清 MMP-3、OPG、RANKL 表达水平,并观察不良反应。**结果** 治疗组 ACR20 达标率为 82.86%(29/35),中医证候疗效有效率为 85.7%(30/35),均明显高于对照组的 51.52%(17/33)和 63.6%(21/33),两组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 RF、ESR、CRP、MMP-3 及 RANKL 水平降低,OPG 水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组比较,治疗组治疗后 RF、ESR、CRP 及 RANKL 均降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。治疗组 1 例出现肝功能异常,对照组 1 例出现白细胞减低,2 例出现肝功能异常。**结论** 和痹方联合 MTX 可改善肝脾失调型早期 RA 患者的症状,调控 RANK/RANKL/OPG 系统诱导的骨质破坏。

关键词 和痹方;早期类风湿关节炎;甲氨蝶呤;肝脾失调;核因子- κ B 受体活化因子;核因子- κ B 受体活化因子受体;骨保护素

Efficacy of Hebi Formula Combined Methotrexate on Early Rheumatoid Arthritis Patients with Disharmony of Gan and Pi Syndrome and Its Effects on Serum MMP-3 and RANK/RANKL/OPG Expressions ZHANG Yan-yan^{1,2}, WANG Jian³, JIANG Ping¹, and WU Ji-biao¹ 1 School of Basic Medical Science, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355); 2 Department of Rheumatology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011); 3 School of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT Objective To observe the efficacy of Hebi Formula (HF) combined Methotrexate (MTX) on early rheumatoid arthritis (RA) patients with disharmony of Gan and Pi syndrome (DGPS) and its effects on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) activator of nuclear factor- κ B/receptor activator of nuclear factor- κ B/osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG). **Methods** Totally 72 early RA patients with DGPS were assigned to the treatment group and the control group according to random digit table, 36 in each group. Patients in the control group took MTX, while those in the treatment group additionally took HF. MTX dose was increased from 7.5 mg to 12.5 mg gradually, once per week, and the course of treatment was 24 weeks. **Efficacy for Chinese medicine (CM) syndromes, ACR20 improvement rate, laboratory re-**

基金项目:山东省高等学校科技计划资助项目(No. J12LK09);山东省科技发展计划资助项目(No. 2014GSF119017)

作者单位:1.山东中医药大学基础医学院(济南 250355);2.山东中医药大学附属医院风湿病科(济南 250011);3.浙江中医药大学基础医学院(杭州 310053)

通讯作者:武继彪, Tel:15169005698, E-mail: wujibiao1963@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1197

lated indices [rheumatoid factor (RF), erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), anti-cyclic citrullinated peptide antibody (CCP)], serum levels of MMP-3, OPG, RANKL, and adverse reactions were observed. Results The standard arriving rate of ACR20 was 82.86% (29/35) in the treatment group, higher than that in the control group [51.52% (17/33); $P < 0.05$]. The effective rate of CM syndrome was 85.7% (30/35) in the treatment group, higher than that in the control group [63.6% (21/33); $P < 0.05$]. Compared with before treatment in the same group, levels of RF, ESR, CRP, MMP-3, and RANKL decreased, the OPG level increased in the two groups after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group, levels of RF, ESR, CRP, and RANKL all decreased with statistical difference ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Liver dysfunction occurred in 1 case of the treatment group. Leucopenia occurred in 1 case and liver dysfunction occurred in 2 cases of the control group. Conclusion HF combined MTX could improve symptoms of early RA patients with DGPS, and regulate bone destruction induced by RANK/RANKL/OPG systems.

KEYWORDS Hebi Formula; early rheumatoid arthritis; methotrexate; disharmony of Gan and Pi; activator of nuclear factor- κ B; receptor activator of nuclear factor- κ B; osteoprotegerin

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是常见的慢性自身免疫性疾病,其主要特征为滑膜炎及继发引起的关节破坏。近年来因血清学中抗环瓜氨酸多肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibody, CCP)检测及关节磁共振和超声的应用促进了RA的早期诊断^[1]。临床研究证实,部分RA在早期即可发生不可逆的骨质侵蚀,因此早期治疗以阻止患者的功能损害成为标准的治疗模式^[2]。近年来学者研究发现,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及核因子- κ B受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)/骨保护素(osteoprotegerin, OPG)系统在RA患者的早期骨与关节损伤有重要作用^[3]。

和痹方是山东中医药大学姜萍教授在临床经验基础上结合古代痹证方药组方规律拟定^[4]。本研究应用和痹方联合甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)治疗肝脾失调型早期RA患者,观察其对患者临床症状及血清MMP-3、OPG、RANKL表达的影响。现报道如下。

资料与方法

1 诊断标准 西医诊断参照美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)与欧洲抗风湿病联盟(The European League Against Rheumatism, EULAR)2010年发布的RA最新分类标准与评分系统^[5]。中医辨证分型参考《中药新药临床研究指导原则》^[6]、《实用中医脏腑辨证治疗学》^[7]及本课题组前期研究结果^[8-10],拟订肝脾失调辨证分型标准如下:主症:关节肿胀、疼痛、酸痛,关节肌肉麻木挛急,或疼痛游走,关节屈伸不利,晨僵,抑郁

或烦躁易怒,倦怠乏力,胃纳减少。次症:口苦,咽干,善太息,头晕目眩,面白或萎黄,腕胁胀痛,食后腹胀,暖气反酸,便溏不爽或时溏时干。女性月经不调。舌脉:舌淡体胖,或舌有齿痕,脉弦或弦细。具备4项主症,兼见4项次症,参照舌脉,即可辨证为肝脾失调。

2 纳入与排除标准 纳入标准:(1)符合诊断标准;(2)年龄18~70岁;(3)早期RA,病程<1年;(4)近4周内未接受激素或其他改善病情抗风湿药(disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)治疗,如已经接受如上治疗者,种类限于一种,且剂量至少稳定3个月;(5)所有患者签署知情同意书。排除标准:(1)受累关节出现变形者;(2)妊娠或哺乳期妇女;(3)合并有心、脑、肺、肾或造血系统等重要器官的严重疾病;(4)虽确诊为RA的病例,但伴发严重关节外表现如血管炎、间质性肺炎等需要使用糖皮质激素或合并其他自身免疫病的患者;(5)有过敏体质者或不能耐受中药者;(6)伴有活动性消化道溃疡、出血的患者。

3 剔除及脱落标准 剔除标准:进入临床试验观察后,发现受试者不符合纳入标准而误纳入病例;虽符合纳入标准而纳入后未按本研究方案服药的病例。脱落标准:接受试验病例,因各种原因在疗程未完成试验时退出或被终止试验,或失访,视为脱落病例。对脱落病例,记录脱落原因。

4 一般资料 72例均为2012年10月—2014年7月就诊于山东中医药大学附属医院及山东省立医院风湿病科门诊及住院的早期RA患者。采用随机数字表法分为治疗组和对照组,每组36例,因药物不良反应治疗组剔除1例,对照组剔除3例。治疗组35例,女性31例,男性4例,年龄22~55岁,平均

(42.0 ± 9.6) 岁, 病程 3 ~ 12 个月, 平均 (5.6 ± 1.6) 个月。对照组 33 例, 女性 30 例, 男性 3 例, 年龄 21 ~ 57 岁, 平均 (43.1 ± 9.5) 岁, 病程 3 ~ 12 个月, 平均 (5.8 ± 1.9) 个月。两组患者年龄、性别、病程比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究经山东省中医药大学附属医院伦理委员会批准。

5 治疗方法 对照组给予以下治疗: (1) MTX 片 (2.5 mg/片, 上海医药集团有限公司信谊制药总厂, 批号: 120501), 从每周 7.5 mg 在 4 周内逐渐加至 12.5 mg 口服, 每周 1 次; (2) 叶酸片 (5 mg/片, 江苏亚邦爱普森药业有限公司, 批号: 1002026), 次日口服叶酸片 10 mg, 每周 1 次; (3) 若关节压痛度积分或关节肿胀度积分达 4 分^[7], 则联用双氯芬酸钠双释放肠溶胶囊 (75 mg/粒, 德国慕尼黑有限公司, 批号: 116589), 75 mg 口服, 每日 1 次。治疗组在此治疗基础上联合和痹方治疗 (药物组成: 当归 20 g 白芍 30 g 炒白术 15 g 苍术 10 g 川芎 20 g 防风 9 g 青风藤 20 g 肿节风 30 g 生甘草 30 g), 所选中药饮片均为山东中医药大学附属医院提供的道地药材。300 mL 水煎服, 早晚餐后分温服 150 mL, 每日 1 剂。连续用药 24 周。

6 观察指标及检测方法 在第 1 次用药及用药第 4、8、12、24 周进行随访观察。

6.1 临床症状观察 由经专业培训的风湿病专科医师及研究生对患者关节疼痛、关节肿胀、晨僵时间等相关表现进行记录, 治疗前后各记录 1 次。食后腹胀、倦怠乏力、精神萎靡等全身肝脾失调相关表现, 填写 RA 临床病例观察表。

6.2 疗效评价 西医疗效评价采用 ACR20^[11] 达标率: 患者关节肿胀及触痛的个数 (28 个) 有 20% 的改善及下列 5 项参数中至少 3 项有 20% 的改善: (1) 患者对疼痛的自我评价 (visual analog scale, VAS); (2) 患者对目前疾病总体状况的自我评价 (VAS); (3) 医生对患者疾病总体状况的评分 (VAS); (4) 健康评估问卷 (health assessment questionnaire, HAQ); (5) 急性期反应物 (ESR、CRP)。中医证候疗效评定参考《中药新药临床研究指导原则》^[7]。临床控制: 中医症状、体征消失或基本消失, 证候积分减少 $\geq 95\%$; 显效: 中医症状、体征明显改善, 证候积分减少 70% ~ 94%; 有效: 中医症状、体征有所改善, 证候积分减少 30% ~ 69%; 无效: 中医症状、体征无明显改善, 甚或加重, 证候积分减少不足 30%。采用尼莫地平法计算总有效率 (%) = (治疗前积分 - 治疗后积分) / 治疗前积分 $\times 100\%$ 。

6.3 血清 ESR、CRP、RF、CCP 及 MMP-3、

OPG、RANKL 表达水平检测 分别采用魏氏法、免疫比浊法及免疫散射比浊法检测 ESR、RF 及 CRP 水平; 采用 ELISA 检测 CCP 抗体及 MMP-3、OPG、RANKL 表达水平。

6.4 安全性评价 在治疗前及治疗第 4、8、12、24 周监测血、尿常规, 肝、肾功能, 记录治疗过程中的不良反应。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验; 计数资料采用 χ^2 检验或秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例观察完成情况 因药物不良反应治疗组剔除 1 例, 对照组剔除 3 例。两组患者服药依从性均良好, 完成临床观察和随访。

2 两组 ACR20 达标率比较 (表 1) 治疗组 ACR20 总达标率为 82.86%, 明显优于对照组的 51.52%, 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 两组 ACR20 达标率比较

组别	例数	达标情况		
		达标 (例)	未达标 (例)	达标率 (%)
治疗	35	29	6	82.86 *
对照	33	17	16	51.52

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

3 两组中医证候疗效比较 (表 2) 治疗组中医证候总有效率优于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 两组中医证候疗效比较

组别	例数	临床控制 (例)	显效 (例)	有效 (例)	无效 (例)	总有效 [例 (%)]
治疗	35	0	14	16	5	30 (85.7) *
对照	33	0	9	12	12	21 (63.6)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

4 两组治疗前后血清 ESR、CRP、RF 及 CCP 水平比较 (表 3) 与本组治疗前比较, 两组治疗后 RF、ESR、CRP 及 CCP 水平均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组比较, 治疗组治疗后 RF、ESR 及 CRP 水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

5 两组治疗前后血清 MMP-3、OPG 及 RANKL 水平比较 (表 4) 与本组治疗前比较, 两组治疗后 MMP-3 及 RANKL 水平降低, OPG 水平升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 治疗组治疗后 RANKL 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 两组治疗前后 ESR、CRP、RF 及 CCP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	RF(IU/mL)	ESR(mm/h)	CRP(μ g/L)	CCP(IU/mL)
治疗	35	治疗前	Ln(2.36 $\pm$ 0.51)	53.37 $\pm$ 19.57	23.73 $\pm$ 10.94	Ln(3.62 $\pm$ 0.33)
		治疗后	Ln(1.89 $\pm$ 0.39) ** Δ	27.26 $\pm$ 11.45 ** $\Delta\Delta$	9.79 $\pm$ 6.18 ** $\Delta\Delta$	Ln(2.54 $\pm$ 0.35) **
对照	33	治疗前	Ln(2.42 $\pm$ 0.50)	52.45 $\pm$ 18.21	21.70 $\pm$ 10.71	Ln(3.73 $\pm$ 0.30)
		治疗后	Ln(1.92 $\pm$ 0.37) *	38.45 $\pm$ 20.50 **	15.85 $\pm$ 7.60 **	Ln(2.60 $\pm$ 0.38) *

注:因 RF、CCP 的两组数据不符合正态分布,取其自然对数后再进行统计学分析;与本组治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与对照组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 4 两组治疗前后血清 MMP-3、OPG 及 RANKL 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	MMP-3 (ng/mL)	OPG (pg/mL)	RANKL (pg/mL)
治疗	35	治疗前	47.5 $\pm$ 1.6	419.5 $\pm$ 198.1	366.6 $\pm$ 185.6
		治疗后	18.5 $\pm$ 1.2 *	1209.7 $\pm$ 540.1 *	129.2 $\pm$ 59.7 * Δ
对照	33	治疗前	47.8 $\pm$ 1.7	678.9 $\pm$ 236.8	399.8 $\pm$ 216.2
		治疗后	23.7 $\pm$ 1.3 *	1286.8 $\pm$ 497.3 *	187.4 $\pm$ 93.5 *

注:与本组治疗前比较, * $P < 0.05$;与对照组同期比较, $\Delta P < 0.05$

6 不良反应 治疗组 1 例患者出现轻度皮疹,可耐受;1 例出现肝功能异常,停用 RA 药物,病例脱落。对照组出现 1 例胃胀,2 例轻度皮疹,均可耐受;1 例白细胞 $2.35 \times 10^9/L$,2 例出现肝功能异常,停用 RA 药物,病例脱落。

讨 论

RA 是一种高度致残性的系统性自身免疫性疾病,其特征是反复发作的滑膜炎及继发引起的关节不可逆性破坏和功能障碍。其中骨侵蚀的程度与疾病严重程度密切相关。目前中医对早期 RA 辨证规律研究较少。临床发现在早期 RA 患者中不仅存在局部关节肿痛症状,且多有食后腹胀、倦怠乏力、精神萎靡等肝脾失调症状。叶蕾等^[8]明确提出“肝脾失调、内生风寒湿热”不仅为 RA 的重要病机,而且影响 RA 的发展转归。本课题组早期临床实践也发现从调和肝脾角度论治 RA 疗效确切。“风、寒、湿三气杂至,合而为痹也”。风、寒、湿邪既能从外而入,亦能从内而生。内生风、寒、湿邪属“内生五邪”,其致病具有发病缓慢、病程较长、外邪诱发病情加重等特点,这与 RA 的临床特征十分吻合。

MMPs 是一组在结构上具有极大同源性、能降解细胞外基质蛋白的内肽酶的总称。其对 RA 的关节破坏作用表现为直接降解软骨和骨质。研究表明, MMP-3 较急性期蛋白更能预测早期 RA 的关节破坏^[12]。一项新的研究显示, MMP-3 作为一种非常有前途生物标志物,能及早发现和诊断 RA^[13]。研究表明, RANK/RANKL/OPG 系统在骨代谢中起着重要的作用^[3],骨破坏是由骨生物学所必需的 3 种基本分子所控制:受体(RANK)、配体(RANKL)和可溶性的诱

饵受体(OPG),三者关系复杂又可相互作用^[14]。Geusens PP 等^[15]检测了 92 例早期活动性 RA 患者循环血中的 RANKL/OPG 的比值,通过 5 年观察,对患者的关节破坏进行 X 线评价,发现 RANKL/OPG 比值高的 RA 患者关节破坏程度要明显高于比值低的患者。这表明循环血中 RANKL 水平越高,OPG 水平越低,其关节的破坏越严重。对 RA 患者 RANK/RANKL/OPG 系统的深入研究,对早期预测和发现 RA 患者的骨与关节损伤,并监测 RA 临床治疗药物对骨与关节损伤的疗效和预后具有重要的临床意义^[16]。

本课题组对于早期 RA 患者拟定“舒肝理脾,祛风胜湿,消肿止痛”的和痹方治疗。方中当归、白术舒肝理脾,养血活血为君,白芍、苍术柔肝除血痹止痛,燥湿健脾为臣。以上 4 味药相须为用,使肝血充、气血调、筋脉柔、挛急止。白芍配当归补肝体,川芎疏肝活血行气,助肝木升发之气,使其调达,以助肝用。苍术配白术健脾燥湿以除内外之湿。青风藤、肿节风祛风湿,通经络,活血散结,消肿止痛;防风为风中润剂,辛能散肝,香能舒脾,祛风以胜湿,且能祛风解表,以防外邪入侵;防风、川芎辛香以防白芍、当归滋腻之性,共为佐药;甘草味甘,能补、能缓、能和。甘草与白芍相配,酸甘化阴,养阴除痹,缓急止痛,调和药性,以为使。全方补肝血疏肝用健脾除湿,祛风消肿定痛,标本同治,共奏疏肝理脾、祛风除湿、消肿止痛之功效。

本研究结果显示,治疗组患者 ACR20 达标率、中医证候疗效、ESR、CRP、RF、MMP-3、RANKL 及 OPG 改善明显优于对照组,提示和痹方可降低早期 RA 患者疾病活动度和骨质破坏,改善全身肝脾失调症状,其机制可能与其参与抑制滑膜炎症,调控 MMP 和 RANK/RANKL/OPG 系统诱导的软骨和骨质破坏

有关。

参 考 文 献

- [1] 徐钟慧,冷晓梅,郑福玲,等. 超声与磁共振对类风湿关节炎腕关节病变诊断价值的比较[J]. 协和医学杂志, 2014, 5(1): 41-45.
- [2] 吕芳,李兴福. 2010 年美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟的类风湿关节炎分类标准解读[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(4): 307-310.
- [3] Assmann G, Koenig J, Pfreundschuh M, et al. Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study[J]. J Rheumatol, 2010, 37: 900-904.
- [4] 姜萍,周丽宁. 基于古代方药组方规律探讨痹证从脏腑辨治的特点[J]. 世界中医药, 2014, 9(9): 1231-1233.
- [5] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. The 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Collaborative Initiative [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [6] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:115-117.
- [7] 程爵堂,程功文主编. 实验中医脏腑辨证治疗学[M]. 北京:学苑出版社, 2009: 91.
- [8] 叶蕾,宫健伟,秦林. 类风湿关节炎从脏腑辨治概况[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(12): 54-56.
- [9] 魏晓广,高春献,古劼劼,等. 从肝脾失调论治类风湿性关节炎的理论探讨[J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(8): 70-71.
- [10] 秦林,滕佳林,叶蕾,等. 类风湿关节炎从肝脾辨证的研究概况[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(3): 65-67.
- [11] Felson DT, Anderson JJ, Boers M, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(6): 727-735.
- [12] Allyn MM, Hodkinson B, Meyer PW, et al. Serum matrix metalloproteinase-3 in comparison with acute phase proteins as a marker of disease activity and radiographic damage in early rheumatoid arthritis[J]. Mediators Inflamm, 2013: 183653.
- [13] Lafeber FP, Van der Laan WH. Progression of joint damage despite control of inflammation in rheumatoid arthritis: a role for cartilage damage driven synovial fibroblast activity[J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(6): 793-795.
- [14] Schett G, Hayer S, Zwerina J, et al. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2005, 1(1): 47-54.
- [15] Geusens PP, Landewé RB, Garnero P, et al. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(6): 1772-1777.
- [16] 彭丽萍,徐胜前. RANK/RANKL/OPG 系统在类风湿关节炎早期骨与关节损伤中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 8(5): 2188-2191.

(收稿:2016-02-27 修回:2016-06-18)