

新风胶囊对强直性脊柱炎活动期患者血栓形成因子及炎症细胞因子的影响

方利¹ 刘健² 朱福兵¹

摘要 **目的** 观察新风胶囊(Xinfeng Capsule, XFC)对强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)活动期患者血栓形成相关因子及炎症细胞因子的影响。**方法** 采用随机数字表法将 76 例 AS 活动期患者分为柳氮磺吡啶对照组(SASP 组)及新风胶囊治疗组(XFC 组),每组 38 例。SASP 组口服柳氮磺吡啶片,0.25 g/片,每次 4 片,每日 2 次;XFC 组口服新风胶囊,0.5 g/粒,每次 3 粒,每日 3 次,连服 12 周。进行血小板计数及凝血功能测定,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测血栓形成因子[血清血栓素 B₂(TXB₂)、前列环素 I₂(PGI₂)、6-酮-前列环素 F1(6-ketone-prostaglandin F1, 6-keto-PGF1)、血小板颗粒膜蛋白(GMP140)、纤溶酶原激活剂抑制剂 2(PAI-2)]和血沉(ESR)、C 反应蛋白(CRP)及细胞因子 TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-17 水平;采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测核因子激活剂(Act1)、核转录因子 kappa(NF- κ B)抑制蛋白(I κ B α)、I κ B 激酶(IKK β)、NF- κ B/P65、NF- κ B/P50 mRNA 变化;采用蛋白免疫印迹法检测 NF- κ B/P65、NF- κ B/P50 蛋白表达。**结果** 与本组治疗前比较, XFC 组 PLT、纤维蛋白原(FBG)、D-二聚体(D-D)、TXB₂、GMP140、PAI-2 明显降低,6-keto-PGF1 明显升高,且改善情况明显优于同期 SASP 组(均 $P < 0.01$)。与本组治疗前及 SASP 组治疗后比较, XFC 组治疗后 IL-17 水平明显降低,IL-4、IL-10 水平升高;ESR、CRP 水平下降(均 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 Act1、IKK β 、I κ B α 、NF- κ B/P50、NF- κ B/P65 mRNA 及 NF- κ B/P65、NF- κ B/P50 蛋白表达均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);且 XFC 组治疗后 IKK β 、I κ B α 、NF- κ B/P50、NF- κ B/P65 mRNA 及 NF- κ B/P65、NF- κ B/P50 蛋白表达较 SASP 组降低更明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 新风胶囊可改善 AS 患者的血栓形成相关因子,其机制可能与调节细胞因子,抑制 NF- κ B 信号通路过度活化有关。

关键词 强直性脊柱炎;新风胶囊;血栓形成因子;细胞因子;核转录因子 kappa

Effect of Xinfeng Capsule on Related Factors of Thrombus Formation and Inflammatory Cytokines in Active Ankylosing Spondylitis Patients FANG Li¹, LIU Jian², and ZHU Fu-bing¹ 1 Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230038); 2 Department of Rheumatism, Anhui Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hefei (230031)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Xinfeng Capsule (XFC) on related factors of thrombus formation and inflammatory cytokines in active ankylosing spondylitis (AS) patients. **Methods** Seventy-six active AS patients were assigned to the XFC group and the Sulfasalazine treated group (SASP group), 38 in each group according to random digits table. Patients in the SASP group took SASP, 0.25 g per tablet, 4 tablets each time, twice per day. Those in the XFC group took XFC, 0.5 g per pill, 3 pills each time, three times per day. All medication lasted for 12 successive weeks. Platelet count and coagulation functions were determined. Factors of thrombus formation [including thromboxane B₂(TXB₂), prostaglandin I₂(PGI₂), 6-ketone-prostaglandin F1 (6-keto-PGF1), platelet granular membrane protein140 (GMP140), plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2)], erythrocyte sedimentation rate (ESR), C reactive protein (CRP), and levels of cytokines (TNF- α , IL-4, IL-10, IL-17) were detected. mRNA expressions of nuclear

基金项目:国家中医药重点学科中医痹病学建设项目(国中医药发[2009]30号);国家临床重点专科中医风湿病建设项目(财社[2013]239);国家科技支撑计划课题资助项目(No. 2012BA126B02);安徽省重点实验室建设项目(No.1306c083035)

作者单位:1.安徽中医药大学研究生院(合肥 230038);2.安徽省中医院风湿科(合肥 230031)

通讯作者:刘健, Tel: 0551-6283068, E-mail: liujianahzy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1202

factor activator (Act1), NF- κ B inhibitory protein- α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), inhibitor of kappa-B kinase beta ($\text{IKK}\beta$), NF- κ B protein 65 (NF- κ B/P65), and NF- κ B protein 50 (NF- κ B/P50) were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR). Meanwhile, the protein expression of NF- κ B/P65 and NF- κ B/P50 were detected by Western blot. Results Compared with before treatment in the same group, levels of PLT, fibrinogen (FBG), D-dimer (DD), TXB_2 , GMP140, and PAI-2 were significantly decreased, but 6-keto-PGF1 level was significantly increased in XFC group after treatment ($P < 0.01$). Besides, the improvement of above indices was significantly superior in the XFC group to SASP group in the same period (all $P < 0.01$). Compared with before treatment and SASP group after treatment, IL-17 level was significantly decreased, IL-4 and IL-10 were significantly increased, levels of ESR and CRP decreased in the XFC group after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with before treatment in the same group, mRNA expressions of Act1, $\text{IKK}\beta$, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, NF- κ B/P50, and NF- κ B/P65, and protein expressions of NF- κ B/P65 and NF- κ B/P50 were obviously reduced in the two groups after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Besides, mRNA expressions of $\text{IKK}\beta$, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, NF- κ B/P50, and NF- κ B/P65, and protein expressions of NF- κ B/P65 and NF- κ B/P50 were more obviously reduced in the XFC group than in the SASP group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions XFC could improve thrombosis related factors in AS patients. Its mechanism might be associated with regulating cytokines and inhibiting excessive activation of NF- κ B signal pathway.

KEYWORDS ankylosing spondylitis; Xinfeng Capsule; related factors of thrombus formation; cytokine; nuclear factor κ B

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是脊柱关节病的一种,以脊柱和骶髂关节炎症性病变为主要特征^[1]。本病缓慢进展,晚期可引起脊柱强直、纤维化,甚者引起心、肺等关节外病变^[2,3]。中医学将其归于“痹证”、“肾痹”、“大偻”等范畴,痹即“痹阻不通”,故痹证必有瘀^[4]。既往研究证实,C 反应蛋白 (C reactive protein, CRP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、血栓素 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 与前列环素 (prostaglandin I_2 , PGI_2) 失衡、血小板颗粒膜蛋白 (platelet granular membrane protein 140, GMP140)、纤溶酶原激活剂抑制剂 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 等指标可反映血瘀状态,且炎症与免疫反应介导了血瘀的发生与发展^[5]。

另外研究表明,AS 与免疫炎症密切相关,而细胞因子作为关节炎症的重要介质,其在 AS 发病、发展过程中发挥重要作用^[6]。研究发现,核转录因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 参与炎症与免疫反应,在 AS 中起重要作用^[7,8]。此外 NF- κ B 信号通路持续活化能促进 PAI、GMP140、尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) 等分泌,导致纤溶系统紊乱^[9]。本研究通过对 AS 活动期患者血栓形成相关因子及炎症细胞因子的分析,探讨新风胶囊 (Xinfeng Capsule, XFC) 对 AS 活动期患者上述指标的影响。

资料与方法

1 诊断标准 参照美国风湿病协会 (American College of Rheumatology, ACR) 1984 年修订的强直性脊柱炎纽约诊断标准^[10]。参考《中药新药临床研究指导原则》^[11],符合 4 项以上者为该病处于活动状态:(1)晨僵 ≥ 30 min;(2)因疼痛、僵硬、夜甚而影响睡眠;(3)外周关节炎;(4)血沉 (ESR) ≥ 30 mm/h (魏氏法);(5)CRP ≥ 20 mg/L;(6)血清免疫球蛋白 IgA 含量 ≥ 3.9 g/L;(7)脊柱痛;(8)正常呼吸时胸痛或颈活动时疼痛或僵硬;(9)昼或夜间双臀痛。

2 纳入与排除标准 纳入标准:符合诊断标准;年龄 18~60 岁;3 个月内未使用慢作用药物;所有纳入者均签署知情同意书。排除标准:妊娠、哺乳期女性及有生育要求的患者;疾病晚期脊柱强直,严重关节畸形患者;合并急性眼炎需用肾上腺皮质激素治疗者;合并有心脑血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病者。

3 一般资料 76 例均为 2014 年 6 月—2015 年 6 月安徽省中医院住院的 AS 患者,其中男性 68 例,女性 8 例,年龄 20~60 岁,平均 (32.78 ± 5.77) 岁;病程 0.5~26 年,平均 (12.09 ± 3.14) 年。采用随机数字表法将 76 例 AS 患者分为 XFC 组和柳氮磺吡啶 (Sulfasalazine, SASP) 组,每组 38 例。两组患者年龄、性别、病程、病情程度比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究通过安徽省中医院伦理审查委员会批准 (No. 2013AH-029-01)。

4 治疗方法 XFC 组口服新风胶囊(药物组成:黄芪、雷公藤、薏苡仁、蜈蚣,安徽省中医院制剂中心生产,批号:20140412),0.5 g/粒,每日3次,每次3粒。SASP 组口服 SASP 片(0.25 g/片,上海三维制药有限公司生产,批号:20140420),每次4片,每日2次,两组均以4周为1个疗程,连服3个疗程。在治疗期间,若病情需要,可加用同等剂量的非甾体类抗炎药。

5 观察指标及检测方法

5.1 血小板、凝血常规及肝、肾功能测定 采用全自动血液分析仪(日本 Sysmex K-4500 型)测定血小板(platelet, PLT)、活化的部分凝血酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、部分凝血酶时间(partial thrombin time, PT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FBG)及D二聚体(D-dimer, D-D)水平;采用魏氏法测定ESR;采用全自动生化分析仪(日立7060型)测定CRP及肝、肾功能。以上指标检测均由安徽省中医院检验中心完成。

5.2 血栓形成相关因子及细胞因子水平测定 所有患者于治疗前后在AM 7:00—8:00空腹采集外周静脉血5 mL,3 000 r/min离心5 min,分离血清,分装后于-80℃保存备用。采用ELISA法检测血清TXA₂、PGI₂、GMP140(批号:E-13088)、PAI-2、TNF-α(批号:E-10110)、IL-4(批号:E-10142)、IL-10(批号:E-10082)、IL-17(批号:E-10149)水平。由于TXA₂、PGI₂极不稳定,通过分别测定其稳定但无活性产物血栓素B₂(thromboxane B₂, TXB₂,批号:E-10700)、6-酮-前列环素F1(6-ketone-prostaglandin F1,6-keto-PGF1,批号:E-10645)了解其变化。具体操作步骤按照ELISA试剂盒(南京建成公司)说明书进行。

5.3 NF-κB 信号通路相关指标 mRNA 表达水平检测 选取治疗前后AS活动期患者各10例,采用实时荧光定量PCR(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测转录因子激活剂1(NF-κB activator 1, Act1)、NF-κB 抑制蛋白(NF-κB inhibitor protein-alpha, IκBα)、IκB 蛋白激酶(NF-κB inhibitor protein kinase beta, IKKβ)、NF-κB 亚基65(NF-κB protein 65, NF-κB/P65)及NF-κB/P50 mRNA水平。引物合成与设计:根据美国加利福尼亚州Invitrogen公司提供的mRNA序列,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:AM 7:00—8:00空腹用EDTA抗凝管采集所有纳入者全血5 mL,3 000 r/min离心15 min。弃上清,将其转移到无RNA酶的15 mL的

离心管中,加入等量的红细胞裂解液(购自碧云天生物技术研究),冰上裂解15 min,3 000 r/min离心15 min。弃上层液体,加10 mL的PBS洗3次,用Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司)提取总RNA。PCR反应体系为20 μL,包括反转录产物2 μL,正、反向引物各1 μL及SYBR Green染料10 μL,水补足至20 μL。用ABI StepOne™实时定量PCR仪(购自美国Thermo, PIKOREAL96)进行反应,反应条件为95℃预变性3 min,变性(95℃)30 min,退火15 s,延伸(60℃)60 s,40个循环,4℃终止。本次实验所使用分析指标为2^{-ΔΔCt}。

表1 目的基因引物序列及扩增长度

基因	引物(5'→3')	扩增长度(bp)
Act1	上游:TAGGGATACCGTGATGAT	432
	下游:AGGAGTGCTACCGACCAG	
IκBα	上游:GAAGGAGCGGCTACTGGA	313
	下游:TTCTGGCTGGTTGGTGAT	
IKKβ	上游:AATGAGGAACAGGGCAATA	357
	下游:ACCAAGACTGAAGGCAAA	
NF-κB/P65	上游:TGCCGAGTGAAACCGAAAC	480
	下游:GCTCAGGGATGACGTAAAGG	
NF-κB/P50	上游:CACCCTGACCTTGCCCTAT	370
	下游:CCCAGACTCCACCATTT	
β-actin	上游:GTGGACATCCGCAAAGAC	302
	下游:AAAGGGGTGAACGCAACTAA	

5.4 NF-κB /P65 及 NF-κB/P50 蛋白表达水平检测 两组治疗前后的AS活动期患者各10例,用EDTA抗凝管于AM 7:00—8:00空腹采集全血5 mL,3 000 r/min离心15 min。弃上清,将其转移到15 mL的离心管中,加入等量的红细胞裂解液,冰上裂解15 min,3 000 r/min离心15 min。弃上层液体,加10 mL的PBS洗3次。后加入RIPA液提取蛋白(购自碧云天生物技术研究),用BCA蛋白定量试剂盒(购自碧云天生物技术研究)测定蛋白浓度,用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测NF-κB/P65及NF-κB/P50蛋白表达(兔抗NF-κB/P50多克隆抗体,批号:ab31410;兔抗NF-κB/P65多克隆抗体,批号:ab131485,均购自艾博抗上海贸易有限公司),采用Image J软件测定凝胶各条带的积分吸光度值,以β-actin(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG购自北京中杉生物技术公司)为内参,以NF-κB/P65/β-actin及NF-κB/P50/β-actin比值表示NF-κB/P65及NF-κB/P50蛋白表达水平。

6 依从性及不良反应观察 依从性评价:试验中

使用的药物至少达到规定量的 85% 以上为依从性佳。不良反应观察:用药过程中出现与本病无关的临床症状;检测指标出现明显的肝、肾功能损害。

7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验或非参数检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例完成情况 本研究治疗期间 XFC 组未出现明显的不良反应,无脱落;SASP 组出现 2 例不良反应(恶心欲吐、胃脘部不适 1 例,肝功能损害 1 例),经对症处理后均好转,脱落 1 例。

2 两组治疗前后血小板、凝血常规及血栓形成相关因子比较(表 2) 与本组治疗前比较, XFC 组

PLT、FBG、D-D、TXB₂、GMP140、PAI-2 水平降低,6-keto-PGF1 水平升高($P < 0.01$),且改善情况明显优于同期 SASP 组($P < 0.01$)。

3 两组治疗前后炎症指标及细胞因子水平比较(表 3) 与本组治疗前及 SASP 组治疗后比较,XFC 组治疗后 IL-17 水平明显降低,IL-4、IL-10 水平升高($P < 0.05, P < 0.01$);与本组治疗前比较,两组治疗后 ESR、CRP 均明显降低($P < 0.01$),且 XFC 组明显低于 SASP 组($P < 0.05, P < 0.01$)。

4 两组治疗前后 NF- κ B 信号通路相关指标 mRNA 表达水平比较(表 4) 与本组治疗前比较,两组治疗后 Act1、IKK β 、I κ B α 、NF- κ B/P50、NF- κ B/P65 mRNA 表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。且 XFC 组治疗后 IKK β 、I κ B α 、NF- κ B/P50、NF- κ B/P65 mRNA 表达较 SASP 组降低更明显($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 两组治疗前后血小板、凝血常规及血栓形成相关因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	SASP 组(37 例)		XFC 组(38 例)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
血小板及凝血常规				
PLT($\times 10^9/L$)	389.57 $\pm$ 38.68	395.43 $\pm$ 35.41	400.22 $\pm$ 33.15	359.22 $\pm$ 26.53 * Δ
PT(s)	11.46 $\pm$ 0.89	11.97 $\pm$ 1.47	11.60 $\pm$ 0.87	12.32 $\pm$ 1.27
APTT(s)	23.82 $\pm$ 1.19	23.43 $\pm$ 1.05	23.31 $\pm$ 0.93	23.02 $\pm$ 0.88
TT(s)	16.43 $\pm$ 0.65	16.55 $\pm$ 0.73	16.52 $\pm$ 0.72	16.38 $\pm$ 0.60
FBG(g/L)	3.93 $\pm$ 0.58	3.89 $\pm$ 0.49	4.04 $\pm$ 0.35	3.33 $\pm$ 0.37 * Δ
D-D(mg/L)	0.67 $\pm$ 0.18	0.64 $\pm$ 0.21	0.68 $\pm$ 0.23	0.53 $\pm$ 0.19 * Δ
血栓形成相关因子				
TXB ₂ (ng/L)	13.77 $\pm$ 2.24	12.90 $\pm$ 1.53	14.36 $\pm$ 1.86	9.93 $\pm$ 1.66 * Δ
6-keto-PGF1(ng/L)	679.26 $\pm$ 110.75	641.94 $\pm$ 125.02	673.23 $\pm$ 109.13	724.59 $\pm$ 98.58 * Δ
GMP140(ng/L)	10.57 $\pm$ 0.89	10.43 $\pm$ 0.98	10.87 $\pm$ 0.79	9.05 $\pm$ 1.01 * Δ
PAI-2(ng/L)	144.48 $\pm$ 29.56	141.84 $\pm$ 25.03	149.15 $\pm$ 25.03	116.22 $\pm$ 17.54 * Δ

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

表 3 两组治疗前后炎症指标及细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	TNF- α (ng/L)	IL-4 (ng/L)	IL-10 (ng/L)	IL-17 (ng/L)	ESR (mm/h)	CRP (mg/L)
SASP	37	治疗前	195.81 $\pm$ 44.41	102.59 $\pm$ 24.82	189.28 $\pm$ 34.44	12.87 $\pm$ 3.36	58.01 $\pm$ 25.42	62.27 $\pm$ 23.15
		治疗后	178.47 $\pm$ 55.25	103.42 $\pm$ 21.71	194.75 $\pm$ 15.71	12.10 $\pm$ 3.14	39.33 $\pm$ 7.88 **	53.70 $\pm$ 10.78 **
XFC	38	治疗前	196.84 $\pm$ 43.14	105.50 $\pm$ 21.96	193.88 $\pm$ 32.44	11.97 $\pm$ 2.84	61.03 $\pm$ 21.10	63.98 $\pm$ 22.21
		治疗后	169.54 $\pm$ 51.42	118.15 $\pm$ 27.62 * Δ	247.72 $\pm$ 39.57 * * Δ Δ	9.31 $\pm$ 1.74 * Δ Δ	32.86 $\pm$ 10.49 * * Δ	38.78 $\pm$ 11.80 * * Δ Δ

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

表 4 两组治疗前后 NF- κ B 信号通路相关指标 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Act1	IKK β	I κ B α	NF- κ B/P50	NF- κ B/P65
SASP	10	治疗前	2.33 $\pm$ 0.39	2.46 $\pm$ 0.44	2.49 $\pm$ 0.54	1.77 $\pm$ 0.34	3.40 $\pm$ 0.62
		治疗后	1.80 $\pm$ 0.34 **	1.37 $\pm$ 0.29 **	1.79 $\pm$ 0.45 **	1.13 $\pm$ 0.20 **	2.68 $\pm$ 0.54 * *
XFC	10	治疗前	2.30 $\pm$ 0.46	2.65 $\pm$ 0.45	2.85 $\pm$ 0.54	1.82 $\pm$ 0.35	3.52 $\pm$ 0.87
		治疗后	1.66 $\pm$ 0.38 * *	1.08 $\pm$ 0.10 * * Δ	1.24 $\pm$ 0.19 * * Δ Δ	0.92 $\pm$ 0.14 * Δ Δ	2.19 $\pm$ 0.32 * Δ Δ

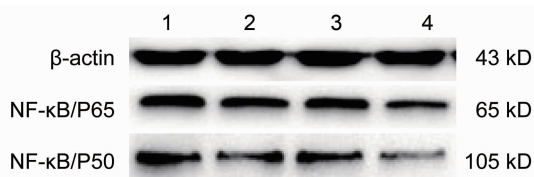
注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 SASP 组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$

5 两组治疗前后 NF- κ B/P65 及 NF- κ B/P50 蛋白表达水平比较(表 5,图 1) 与本组治疗前比较,治疗后两组 NF- κ B/P65、NF- κ B/P50 蛋白表达均明显降低($P < 0.05$)。且 XFC 组治疗后上述指标较 SASP 组降低更明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 5 两组治疗前后 NF- κ B/P65 及 NF- κ B/P50 蛋白表达水平比较 (IA, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	NF- κ B/P65	NF- κ B/P50
SASP	10	治疗前	0.459 $\pm$ 0.007	0.378 $\pm$ 0.007
		治疗后	0.453 $\pm$ 0.005 *	0.369 $\pm$ 0.005 *
XFC	10	治疗前	0.457 $\pm$ 0.006	0.367 $\pm$ 0.005
		治疗后	0.383 $\pm$ 0.008 * $\Delta\Delta$	0.338 $\pm$ 0.010 * Δ

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



注:1 为 SASP 组治疗前;2 为 XFC 组治疗前;3 为 SASP 组治疗后;4 为 XFC 组治疗后

图 1 两组治疗前后 NF- κ B/P65、NF- κ B/P50 蛋白表达电泳图

讨 论

AS 属中医学“痹证”、“肾痹”、“大偻”范畴,血瘀作为致病因素又是其病理产物,始终贯穿于 AS 发生、发展的过程^[12,13]。研究发现,AS 患者血瘀状态主要表现为 PLT 异常活化,FBG、D-D、TXB₂/6-keto-PGF1、GMP140 及 PAI-2 紊乱^[14-16]。本研究结果显示,与 SASP 组比较,XFC 组治疗后 PLT、FBG、D-D、TXB₂、GMP140、PAI-2 明显降低,6-keto-PGF1 明显升高,提示 XFC 可调节 AS 活动期患者血栓形成相关因子。

陈鹏等^[17]研究发现,TNF- α 与 IL-17 间接起协同作用,放大炎症反应;Guo B 等^[18]研究认为,IL-10 可调节 Th17 细胞,间接抑制炎症反应。Kasperska-Zajac A 等^[19]研究发现血小板活化因子参与炎症反应。研究已证实人体受 TNF- α 、IL-17 等刺激后引起 TXA₂、GMP140 等过量产生,参与血栓形成、血管微循环障碍^[20,21],故细胞因子失衡可间接引起 PLT、TXA₂、GMP140 紊乱。本研究结果表明,与 SASP 组比较,XFC 组治疗后 IL-17 水平明显降低,IL-4、IL-10 明显升高,提示 XFC 可显著调节细胞因子失衡,从而可能间接调节血栓形成相关因子。

Act1 是活化 NF- κ B 的重要衔接蛋白,同时正向调控 IL-17 介导的免疫反应^[22]。哺乳动物中 NF- κ B 最常见的形式是 P65/P50 异源二聚体,NF- κ B 与其抑制蛋白亚基 I κ B α 结合,覆盖 NF- κ B 核定位信号,使 NF- κ B 以无活性的形式存在于细胞质中。IKK(人体主要存在形式 IKK β)可激活 I κ B,使 I κ B α 与 NF- κ B 解离,NF- κ B 磷酸化活化。当细胞受到 TNF- α 、IL-17、血小板活化因子等刺激,可与 NF- κ B 相应的受体结合,IKK 激活,NF- κ B 与 I κ B α 解离,NF- κ B 移位到胞核内,与 DNA 上的 κ B 基因序列相结合从而发挥转录调控作用^[23,24]。本研究结果显示,与本组治疗前比较,两组治疗后 Act1、IKK β 、I κ B α 、NF- κ B/P50、NF- κ B/P65 mRNA 及 NF- κ B/P65、NF- κ B/P50 蛋白表达均明显降低,提示 SASP 和 XFC 均可抑制 NF- κ B 过度活化,与既往研究结果相似^[25,26]。与 SASP 组比较,XFC 组治疗后 IKK β 、I κ B α 、NF- κ B/P50、NF- κ B/P65 mRNA 及 NF- κ B/P50、NF- κ B/P65 蛋白表达明显降低,提示 XFC 可显著抑制 NF- κ B 活化,从而可能间接调节 PAI-2、GMP140、PLT 等血栓形成因子。

XFC 主要由黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤药物组成,具有健脾化湿、活血通络作用,在 AS 临床应用中取得一定疗效^[27],且其质量稳定、可控^[28]。现代研究已证实黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤均具有抗炎、调节免疫作用。黄芪能降低血小板黏附力,减少血栓形成,抑制 NF- κ B 激活,调节 Th1/Th2 细胞因子失衡^[29,30];蜈蚣具有抗凝和纤溶活性^[31,32];雷公藤可显著抑制血小板聚集及 NF- κ B 活化^[33,34]。

综上所述,XFC 可调节 AS 活动期患者的血栓形成因子,其可能与调节细胞因子 TNF- α 、IL-17、IL-4、IL-10,抑制 NF- κ B 信号通路 Act1、IKK β 、I κ B α 、P65、P50 过度活化有关。

参 考 文 献

- [1] 娄玉铃主编. 中国风湿病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001:2267.
- [2] 齐亚军,刘健,郑力,等. 基于 Keap1-Nrf2-ARE 探讨强直性脊柱炎患者心功能降低的机制[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 5(30):654-661.
- [3] 刘健,万磊,刘磊,等. 风湿病患者肺功能降低与 BTLA 阳性细胞及调节性 T 细胞的数量减少有关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(6):639-642.
- [4] 田雨,薛轶燕,苏励. 痹证必有瘀[J]. 陕西中医, 2006, 27(5):578.
- [5] 杨银花,王佳宁,韩雪,等. 血瘀证与其客观检测指标关联性研究进展[J]. 中医临床研究, 2014, 6(29):142-144.
- [6] 陈淑增,白剑鹏,谢永华,等. 强直性脊柱炎患者外周血

- Th17、Treg、Th1 免疫失衡及其与疾病活动相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(8):834-847.
- [7] Liu J, Qi Y, Zheng L, et al. Xinfeng Capsule improves pulmonary function in ankylosing spondylitis patients via NF- κ B-iNOS-NO signaling pathway[J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34(6): 657-665.
- [8] Dhir V, Srivastava R, Aggarwal A. Circulating levels of soluble receptor activator of NF- κ B ligand and matrix metalloproteinase 3 (and their antagonists) in Asian Indian patients with ankylosing spondylitis[J]. Int J Rheumatol, 2013: 814350.
- [9] 石慧, 王丹彤, 乌日嘎, 等. TNF- α 介导的 NF- κ B 信号通路在类风湿性关节炎血管形成中的作用[J]. 医学综述, 2012, 18(15):39-41.
- [10] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria [J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4): 361-368.
- [11] 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, 2012:119-123.
- [12] 姜楠, 刘梦玉, 刘宏潇, 等. 从肾虚血瘀论治强直性脊柱炎[J]. 北京中医药, 2013, 32(10):767-768.
- [13] 刘本勇, 刘宏潇, 冯兴华. 补肾活血法治疗强直性脊柱炎的理论基础[J]. 吉林中医药, 2014, 34(12):1189-1191.
- [14] 刘健, 万磊, 冯云霞, 等. 四种风湿病患者血小板参数变化及外周血 BTLA、Treg 观察[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(4): 508-511.
- [15] 王锋, 汪年松, 晏春根, 等. 强直性脊柱炎患者的血小板活化功能研究[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(7): 911-913.
- [16] 薛相虎. 补肾强督方治疗强直性脊柱炎肾虚督寒瘀血阻络证的临床和实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2004.
- [17] 陈鹏, 刘宏潇. Th17/IL-17 炎症轴介导强直性脊柱炎炎症的机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(7):796-798.
- [18] Guo B. IL-10 modulates Th17 pathogenicity during autoimmune diseases [J]. J Clin Cell Immunol, 2016, 7(2): 400.
- [19] Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Platelet-activating factor (PAF): a review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy[J]. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2008, 2(1): 72-76.
- [20] Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(5): 923-931.
- [21] Yamada Y, Yokota M. Roles of plasma platelet activating factor acetylhydrolase in allergic, inflammatory, and atherosclerotic diseases [J]. Jpn Circ J, 1998, 62(5): 328-335.
- [22] Wu L, Zepp J, Li X. Function of Act1 in IL-17 family signaling and autoimmunity [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 946:223-235.
- [23] Wu L, Wang C, Boisson B, et al. The differential regulation of human ACT1 isoforms by Hsp90 in IL-17 signaling [J]. J Immunol, 2015, 193(4): 1590-1599.
- [24] Kim KJ, Cho KD, Jang KY, et al. Platelet-activating factor enhances tumor metastasis via the reactive oxygen species-dependent protein kinase in kinase 2-mediated nuclear factor- κ B activation [J]. Immunology, 2014, 143(1): 21-32.
- [25] 周全魁, 龚杰. 美沙拉嗪和柳氮磺吡啶对溃疡性结肠炎患者肠黏膜中 TLR4 和 NF- κ B 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(1):34-36.
- [26] Huang C, Wan L, Liu J. Effect of Xinfeng Capsule on nuclear factor Kappa B/tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta₁/Smads pathways in rats with cardiac injuries induced by adjuvant arthritis [J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(1): 92-100.
- [27] 黄传兵, 湛曦, 汪元, 等. 新风胶囊联合来氟米特治疗强直性脊柱炎临床研究[J]. 中医药临床杂志, 2011, 23(5): 405-406.
- [28] Wang F, Meng M, Chen L, et al. Development and validation of a high-performance thin-layer chromatographic fingerprint method for the evaluation of Qiyi Capsule with the reference of myotonin [J]. J Planar Chromat, 2014, 3(27): 199-203.
- [29] 高学敏主编. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 428-429.
- [30] 闫智杰, 贾宝辉, 陈军喜, 等. 黄芪多糖对脓毒症大鼠核因子- κ B 和 Th1/Th2 细胞因子及 CD4⁺/CD8⁺ 比值的影响[J]. 江西医药, 2011, 46(8):703-705.
- [31] 代龙, 张红. 蜈蚣不同提取工艺抗凝血及溶栓作用的比较研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 2(8): 1777-1779.
- [32] 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.
- [33] 黄明来, 马卓. 雷公藤的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(7):1-4.
- [34] 张小蒙. 雷公藤的药理作用和临床应用研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(7B):180.

(收稿:2015-11-14 修回:2016-06-18)