· 临床论著 ·

青风藤汤联合甲氨蝶呤对类风湿关节炎患者滤泡辅助性 T 细胞及白介素-21 的影响

许 超[1,2] 张 芳[2] 吴 倩[2] 杨 宁[2] 杨文彦[2] 耿 洁[2] 钱 先[3]

摘要 目的 观察青风藤汤联合甲氨蝶呤(MTX)对初诊类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T cell, Tfh)、白介素-21(IL-21)及病情活动度的影响。**方法** 将 72 例初诊 RA 患者随机分为对照组和观察组,每组 36 例。两组均予 MTX,10 mg/周;塞来昔布 0.2 g,每日 2 次口服治疗,根据临床症状逐渐减停塞来昔布。观察组加青风藤汤口服。连续用药 12 周。治疗前及治疗 4、8、12 周检测患者红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR),并计算患者 28 个关节病情活动指数(disease activity score in 28 joints, DAS28)。治疗前及治疗 12 周采用流式细胞术检测外周血 Tfh 细胞数量,采用酶联免疫吸附法检测治疗前后血清 IL-21、抗环瓜氨酸(anti-cyclic citrullinated peptide antibody,抗 CCP)抗体。**结果** 两组患者治疗 4、8、12 周时 ESR 及 DAS28 均有降低($P<0.01$)。治疗 12 周时,观察组 DAS28 较对照组同期更低($P<0.01$)。治疗前及治疗 12 周两组患者抗 CCP 抗体无明显差异($P>0.05$)。与健康人群比较,治疗前两组患者 Tfh/CD_4^+T 细胞比例、IL-21 水平均明显升高($P<0.01$)。与治疗前比较,治疗 12 周时两组患者 Tfh/CD_4^+T 细胞比例、IL-21 水平均明显降低,且观察组低于对照组($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 青风藤汤联合 MTX 可降低 RA 患者的 Tfh 及 IL-21 水平,并改善患者的临床症状。

关键词 类风湿关节炎;青风藤汤;滤泡辅助性 T 细胞;白介素-21

Effect of Qingfengteng Decoction Combined with Methotrexate on Peripheral Blood Follicular Helper T Cell and Interleukin-21 in Rheumatoid Arthritis Patients

XU Chao[1,2], ZHANG Fang[2], WU Qian[2], YANG Ning[2], YANG Wen-yan[2], GENG Jie[2], and QIAN Xian[3] *1 First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 2 Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210028); 3 Department of Rheumatology and Immunology, First Affiliated Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Qingfengteng Decoction (QFTD) combined with Methotrexate (MTX) on peripheral blood follicular helper T cell (Tfh), IL-21, and disease activity in rheumatoid arthritis (RA) patients at the first visit. **Methods** Totally 72 early RA patients were randomly assigned to the research group and the control group, 36 cases in each group. All patients took MTX (10 mg once a week) and Celecoxib (0.2 g/capsule, twice per day; the dosage of celecoxib was tapered according to clinical symptoms). Patients in the research group additionally took QFTD. The treatment course for all was 12 weeks. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) were measured before treatment, at week 4, 8, and 12 weeks. Tfh count in peripheral blood was detected by flow cytometry before treatment and at week 12 after treatment. Serum contents of IL-21 and anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody were detected by enzyme linked immunosorbent assay

基金项目:中国中医科学院江苏分院开放课题项目(No. FY201509)

作者单位:1.南京中医药大学第一临床医学院(南京 210023);2.南京中医药大学附属中西医结合医院风湿免疫科(南京 210028);3.南京中医药大学第一附属医院风湿免疫科(南京 210029)

通讯作者:钱 先,Tel:13851444984,E-mail:moneyfirst1@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170515.092

中国中西医结合杂志

(ELISA) before and after treatment. Results　Compared with before treatment in the same group, ESR and DAS28 in the both two groups decreased at week 4, 8, and 12 (P <0.01). DAS28 of the research group was lower than that in the control group at week 12 (P <0.01). There was no significant difference in anti-CCP antibody in the two groups between before treatment and at week 12 after treatment (P > 0.05). Compared with the healthy population, the proportion of Tfh/CD_4^+T and the IL-21 level increased in the two groups before treatment (P <0.01). Compared with before treatment in the same group, the proportion of Tfh/CD_4^+T and the IL-21 level decreased in the two groups at week 12. Besides, they were lower in the research group than in the control group (P <0.01, P <0.05). Conclusion　QFTD combined with MTX could decrease Tfh and IL-21 level in RA patients, and improve clinical symptoms of KOA patients.

KEYWORDS　rheumatoid arthritis; Qingfengteng Decoction; follicular helper T cell; interleukin-21

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜慢性炎症为特征的自身免疫性疾病,与环境、遗传背景等因素有关,由多种免疫细胞共同参与[1]。滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T cell, Tfh)是近年来被发现的一种新的 T 细胞亚群,能够表达趋化因子受体 5(chemokine receptor type 5, CXCR5)、产生白介素-21(IL-21),对 B 细胞的活化、增殖发挥重要的辅助功能[2]。RA 患者外周血 Tfh 细胞比例及 IL-21 水平较健康人明显升高,且与 RA 病情活动度呈正相关,这提示 Tfh 在 RA 的发病中产生了重要作用[3]。RA 属中医学"痹证"范畴,早期病机以风、寒、湿邪阻遏关节经络、不通则痛为主。中医药辨证论治治疗 RA 具有良好的临床疗效[4]。本项目组前期研究发现,以青风藤为主要成分的正清风痛宁缓释片治疗活动性 RA 具有良好的临床疗效[5]。本研究拟观察以青风藤为君药的青风藤汤联合甲氨蝶呤(MTX)治疗 RA 的疗效及其对 Tfh、IL-21 的影响,探讨青风藤汤治疗 RA 的免疫学机制。

资料与方法

1　西医诊断标准　参考 2010 年美国风湿病学会及欧洲抗风湿病联盟关于 RA 的诊断标准[6]。

2　中医辨证分型标准　参考《中药新药临床研究指导原则》[7]辨证标准,主症:关节肿痛,恶风寒,阴雨天加重,得温稍缓,关节屈伸欠利,晨僵;次症:口淡不渴,面白或萎黄;舌脉:舌质淡,苔白,脉弦紧。证属风湿痹阻证。

3　纳入标准　符合 RA 诊断标准及中医风湿痹阻证辨证标准;年龄 18 ~65 岁;病程 0 ~6 个月;初诊患者,未接受激素、非甾体抗炎药、慢作用抗风湿药等药物治疗;自愿签署知情同意书。

4　排除标准　合并肺间质病变;合并其他结缔组织病;合并心血管、肝脏、肾脏、肺脏、血液系统等重要器官疾病,慢性感染性疾病,恶性肿瘤,精神病;妊娠或哺乳期妇女。

5　一般资料　72 例均为 2015 年 1 月—2016 年 6 月就诊于南京中医药大学附属中西医结合医院风湿科门诊及住院的 RA 患者,应用随机数字表分为观察组及对照组。观察组 36 例,女 25 例,男 11 例;年龄(52.1 ±10.0)岁,平均病程(3.0 ±1.2)个月。对照组 36 例,女 27 例,男 9 例,年龄(50.3 ±9.1)岁,平均病程(2.9 ±1.1)个月。两组患者年龄、病程比较,差异无统计学意义(P >0.05)。本研究方案获得南京中医药大学附属中西医结合医院医学伦理委员会批准(伦理编号:2015LWYJ-005)。

6　治疗方法　两组患者均予口服 MTX,(2.5 mg/片,上海信谊药厂有限公司),10 mg/周,MTX 服药次日口服叶酸片(5 mg/片,天津力生制药股份有限公司)10 mg;塞来昔布胶囊(0.2 g/粒,辉瑞制药有限公司)0.2 g,每日 2 次,根据患者关节肿痛症状逐渐减量。观察组加用青风藤汤(组成:青风藤 30 g　秦艽 10 g　防己 10 g　乌梢蛇 10 g　蜈蚣 3 g　知母10 g　白芍 15 g　炙甘草 6 g,中药饮片为南京中医药大学附属中西医结合医院提供并鉴定),每日 1 剂,水煎 300 mL,早、晚分 2 次口服,连续用药 12 周。

7　观察指标及方法

7.1　红细胞沉降率(ESR)、28 个关节病情活动指数(disease activity score in 28 joints, DAS28)检测　ESR 采用魏氏法检测,mm/h 为单位(参考值 0 -15 mm/h)。DAS28 包括人体 28 个关节压痛数、肿胀数、患者自身评分等项目。分别于治疗前及治疗 4、8、12 周检测 ESR 及计算 DAS28 积分。

7.2　Tfh 检测　治疗前、治疗 12 周收集两组患者外周血,同时收集 5 名健康人外周血作为阴性对照。各组受试者抗凝血分至 3 支流式管,每管 100 μL。设

中国中西医结合杂志

空白对照、三标测定管[藻红蛋白(PE)-Cy5 标记抗人 CD4 抗体、PE 标记的抗人 CXCR5 抗体、FITC 标记的抗人诱导协同刺激分子(ICOS)抗体]、三标同型对照管(PE-Cy5 标记鼠 IgG1 K 同型对照、PE 标记鼠 IgG2b K 同型对照、FITC 标记的鼠 IgG1 K 同型对照,各种抗体均加入 10 μL,室温避光染色 30 min,裂解红细胞后,上流式细胞仪进行检测。$CD_4^+CXCR5^+ICOS^+$ 的细胞定义为 Tfh。

7.3 抗环瓜氨酸(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体、IL-21 检测 治疗前、治疗 12 周收集两组患者血清,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗 CCP 抗体及 IL-21 水平。上述操作步骤严格按照试剂盒说明进行。

8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件分析。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内比较采用配对 t 检验,组间比较采用成组 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 脱落情况 3 例患者(观察组 1 例,对照组 2 例)用药 4 周时发现肝功能异常,均为 ALT、AST 轻-中度升高,退出研究后接受保肝降酶治疗。2 例患者(观察组及对照组各 1 例)用药 4 周时发现外周血白细胞计数 $<3\times10^9$/L。最终完成研究 67 例。

2 两组患者治疗前后 ESR、DAS28、抗 CCP 抗体比较(表 1) 与本组治疗前比较,两组患者治疗 4、8、12 周时 ESR 及 DAS28 均有降低($P<0.01$)。治疗 12 周时,观察组 DAS28 较对照组同期更低($P<0.01$)。治疗前后两组患者抗 CCP 抗体水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 两组治疗前后 ESR、DAS28 及抗 CCP 抗体比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	ESR (mm/h)	DAS28	抗 CCP 抗体 (U/mL)
观察	36	治疗前	34.6 ±26.6	4.7 ±1.6	242.5 ±128.5
	34	治疗 4 周	23.7 ±13.9 *	3.9 ±1.2 *	—
		治疗 8 周	20.5 ±9.4 *	3.6 ±0.8 *	—
		治疗 12 周	18.1 ±8.5 *	3.2 ±0.8 *△	235.9 ±125.6
对照	36	治疗前	35.4 ±25.3	4.6 ±1.4	232.9 ±154.4
	33	治疗 4 周	28.6 ±17.5 *	4.2 ±1.1 *	—
		治疗 8 周	24.6 ±12.8 *	3.9 ±0.9 *	—
		治疗 12 周	21.8 ±12.3 *	3.7 ±0.8 *	238.1 ±139.1

注:与本组治疗前比较,*$P<0.01$;与对照组同期比较,△$P<0.01$

3 两组患者治疗前后 Tfh 及 IL-21 比较(表 2) 与本组治疗前比较,治疗 12 周时两组患者 Tfh/ CD_4^+ T 细胞比例及 IL-21 水平均明显降低($P<0.01$),且观察组低于对照组($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 2 两组治疗前后 Tfh 及 IL-21 比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	Tfh/CD4 + (%)	IL-21 (ng/L)
观察	36	治疗前	35.8 ±5.0	276.6 ±33.1
	34	治疗 12 周	26.4 ±6.2 *△△	233.5 ±40.6 *△
对照	36	治疗前	35.8 ±4.9	268.2 ±39.7
	33	治疗 12 周	30.9 ±4.7 *	253.1 ±35.0 *

注:与本组治疗前比较,*$P<0.01$;与对照组同期比较,△$P<0.05$,△△$P<0.01$

讨 论

中药青风藤是防己科植物青藤及毛青藤的干燥藤茎,用以治疗关节炎症性疾病已有近千年历史。以青风藤为主要成分的正清风痛宁缓释片治疗活动性 RA 具有良好的临床疗效[5]。目前对青风藤进行的基础研究主要围绕其主要成分青藤碱进行。有研究发现,青藤碱具有抗炎、镇痛、免疫抑制等多种药理作用[8]。以青风藤为君药的青风藤汤是笔者治疗初诊 RA 风湿痹阻证的经验积累,临床用之甚效。方中重用青风藤为君,以祛风除湿,通利关节;秦艽、防己为臣,助君药共达祛风湿、舒经络、止痹痛之效;乌梢蛇入肝、脾经,肝主筋,脾主四肢,可祛留于四肢经脉之邪;蜈蚣祛瘀散结、搜风通络;知母、白芍、炙甘草缓急止痛;诸药合用,共奏祛风散寒、除湿通络之效,以遏制早期 RA 的病情进展。

本研究结果显示,治疗 4 周后两组患者的 ESR 及 DAS28 水平均较入组时显著降低,说明青风藤汤联合 MTX 可有效缓解 RA 患者的临床症状;治疗 12 周后观察组患者 DAS28 水平低于同期对照组,这提示青风藤汤联合 MTX 的疗效优于 MTX 单药治疗。有研究显示,RA 患者接受生物制剂治疗 1 年后,其抗 CCP 抗体水平有显著降低,但其降低程度并不总与 DAS28 水平相关[9]。在本研究中,治疗前后两组患者的抗 CCP 抗体水平无显著差异,这可能与本研究观察间隔较短有关。

2000 年,Breitfeld D[10]等和 Schaerli P[2]等发现了一种定位于淋巴滤泡的辅助性 T 细胞亚群,即 Tfh。2009 年 Nurieva RI[11]等和 Johnston RJ[12]等发现转录因子 B 细胞淋巴瘤-6(B cell lymphoma-6,Bcl-6)和转录因子 B 淋巴细胞诱导的成熟蛋白-1(B lymphocyte-induced maturation protein-1, Blimp1)是 Tfh 分化的关键转录因子,从而将 Tfh 定义为一类新的 T 细胞亚群。Tfh 是一类辅助 B 淋巴细胞的 T 淋巴细胞亚群,参与调控 B 淋巴细胞增殖和浆细胞分化。由 Tfh 分泌的 IL-21,是 Tfh 发挥效应的主

要细胞因子,能够加速 B 细胞的增殖[13]。绝大多数 RA 患者外周血中都有高水平的由 B 细胞分泌的自身抗体,如 RF 和抗 CCP 抗体。前期有研究发现,RA 患者较健康对照组,其外周血 Tfh 百分率明显升高、IL-21 水平明显上调,Tfh 及 IL-21 的增高与抗 CCP 抗体定量、RF 滴度及 RA 病情活动度呈正相关[3],这说明 Tfh 参与了 RA 的发病。本研究纳入的 RA 患者均为初诊患者,尚未接受激素、非甾体抗炎药、慢作用抗风湿药等系统治疗,其外周血 Tfh 及 IL-21 水平明显高于健康人群,结果与前期研究相一致。经治疗后,两组患者的 Tfh 及 IL-21 水平均可下降,且青风藤汤联合 MTX 治疗组低于 MTX 单药组,说明青风藤汤联合 MTX 治疗 RA 的部分机制可能是通过抑制 Tfh 的功能所产生的。

综上所述,RA 患者的 Tfh 及 IL-21 水平显著高于健康人,而青风藤汤可降低 RA 患者的 Tfh 及 IL-21 水平,并改善患者的病情严重程度。青风藤汤产生上述作用的途径是通过抑制 Tfh 的分化还是促进 Tfh 的凋亡,尚需进一步研究辅助明确。

参 考 文 献

[1] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205 - 2219.

[2] Schaerli P, Willimann K, Lang AB, et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular helper T cells with B cell helper function[J]. Exp Med, 2000, 192(11): 1553 - 1562.

[3] Liu R, Wu Q, Su D, et al. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 14(6): 1 - 12.

[4] 姜萍,张琳英, 戴玲玲, 等. 和痹方治疗类风湿关节炎疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(1): 24 - 28.

[5] 张芳, 李晶晶. 正清风痛宁缓释片联合西药治疗活动性类风湿关节炎 53 例临床观察[J]. 中医药导报, 2011, 17(8): 20 - 22.

[6] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative[J]. Arthritis Rheumatism, 2010, 62(9): 2569 - 2581.

[7] 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.

[8] Zhao XX, Peng C, Zhang H, et al. *Sinomenium acutum*: A review of chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use[J]. Pharmac Biol, 2012, 50(8): 1053 - 1061.

[9] Iannone F, Tampoia M, Giannini M, et al. Changes in anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor isotypes serum levels in patients with rheumatoid arthritis following treatment with different biological drugs[J]. Clin Exp Rheumatol, 2016, 34(3): 424 - 429.

[10] Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production[J]. J Exp Med, 2000, 192(11): 1545 - 1552.

[11] Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, et al. Bcl-6 mediates the development of T follicular helper cells[J]. Science, 2009, 325(5943): 1001 - 1005.

[12] Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, et al. Bcl-6 and Blimp1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation[J]. Science, 2009, 325(5943): 1006 - 1010.

[13] Spolski R, Leonard WJ. IL-21 and T follicular helper cells[J]. Int Immunol, 2010, 22(1): 7 - 12.

(收稿:2016 - 10 - 21　修回:2017 - 03 - 05)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶

中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志