

· 临床论著 ·

清肠化湿方联合美沙拉嗪颗粒对溃疡性结肠炎患者
血浆及肠黏膜组织 IL-17 的影响陆玥琳¹ 沈 洪¹ 姚宏凤² 杨 旭³

摘要 **目的** 检测 IL-17 在溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者血浆及结肠组织中的表达水平,探讨清肠化湿方联合美沙拉嗪协同增效的作用机制。**方法** 选择 24 例轻、中度 UC 活动期湿热内蕴证患者,对其肠组织标本进行组织学分级,根据随机数字法分为联合组 (12 例) 与西药组 (12 例),另选择 12 名体检健康者作为健康组,联合组予清肠化湿方联合美沙拉嗪治疗,西药组予美沙拉嗪口服,疗程 3 个月。治疗结束后,ELISA 法检测血浆 IL-17 表达水平,免疫组化 SP 法检测肠黏膜组织中 IL-17 浸润。**结果** UC 患者血浆及肠组织 IL-17 表达均高于健康组 ($P < 0.05$),且随组织学分级增加而升高。两组患者血浆及肠组织中 IL-17 表达较治疗前均降低 ($P < 0.05$),且联合组患者 IL-17 表达水平低于西药组 ($P < 0.05$)。**结论** 清肠化湿方联合美沙拉嗪治疗可协同增效,通过下调 UC 患者体内 IL-17 的表达抑制肠道炎症。

关键词 清肠化湿方;溃疡性结肠炎;白介素-17

Effect of Qingchang Huashi Recipe on IL-17 in the Plasma and Colonic Mucosa of Patients with Ulcerative Colitis LU Yue-lin¹, SHEN Hong¹, YAO Hong-feng², and YANG Xu³ 1 Department of Digestive Diseases, Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing (210029), China; 2 Emergency Department, Chinese Medicine Hospital of Nanjing City, Nanjing (210001), China; 3 Graduate School, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210046), China

ABSTRACT **Objective** To detect the expression level of interleukin 17 (IL-17) in the plasma and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis (UC), and to explore the synergistic mechanism of Qingchang Huashi Recipe (QHR) combined with Mesalazine. **Methods** Recruited were 24 mild or moderate UC patients of damp-heat inner accumulation syndrome (DHAS). Their samples of intestinal tissues were histologically graded. They were assigned to the combination group and the Western medicine (WM) group, 12 in each group. Besides, another 12 healthy volunteers were recruited as the healthy control group. QHR combined Mesalazine were given to patients in the combination group, while those in the WM group took Mesalazine. The therapeutic course for all was 3 months. By the end of treatment the expression level of IL-17 in the plasma and colonic mucosa was detected using ELISA. The infiltration of IL-17 in the intestinal mucosal tissue was detected by immunohistochemical SP method. **Results** The expression level of IL-17 in the plasma and colonic mucosa was significantly higher in UC patients than in healthy controls ($P < 0.05$). The higher the histological grading the higher the expression level. The expression level of IL-17 in plasma and colonic tissues decreased after treatment in the two treatment groups ($P < 0.05$). Besides, the expression level of IL-17 was lower in the combination group than in the WM group ($P < 0.05$). **Conclusion** QHR combined Mesalazine could synergistically enhance the effect and effectively inhibit intestinal inflammation through down-regulating the expression of IL-17.

KEYWORDS Qingchang Huashi Recipe; ulcerative colitis; interleukin 17

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 81072778)

作者单位: 1.江苏省中医院消化科 (南京 210029); 2.南京市中医院急诊科 (南京 210001); 3.南京中医药大学研究生院 (南京 210046)

通讯作者:沈 洪, Tel: 13851872859, E-mail: shenhong999@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.10.1160

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是肠道非特异性炎症性疾病, 反复发作, 迁延不愈, 为临床常见疑难病。目前认为其发生主要是环境作用于遗传易感者, 在肠道菌群的参与下启动了免疫炎症反应, 破坏了肠屏障, 但确切机制尚不完全清楚。近年来发现, $CD4^+$ T 细胞中辅助性 T 细胞 17 (Th17 细胞) 亚群通过特异性释放 IL-17, 从而上调下游的炎症因子“瀑布样释放”, 在 UC 的发生发展中起到关键的促炎作用, 成为该病免疫机制研究的热点。

目前 UC 的治疗手段非常有限, 主要以氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂为主^[1], 但上述药物存在着不同的局限和毒副作用, 影响了患者长期用药的依从性和安全性, 因此许多学者致力于寻求治疗该病的有效药物。清肠化湿方是沈洪教授以芍药汤为主方, 结合多年用药经验及单味中药筛选实验逐步优化而来的验方, 在临床研究中已取得较好的疗效, 但对 UC 患者体内 IL-17 的影响尚不清楚。本试验拟检测 IL-17 在 UC 患者体内的表达及与病理组织学分级的相关性, 并以美沙拉嗪为对照, 探讨清肠化湿方联合美沙拉嗪用药对 IL-17 的影响。

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证分型标准 UC 诊断参照《炎症性肠病诊断与治疗共识意见》^[2]。参照《溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见》^[3], 中医辨证均属湿热内蕴证。

2 纳入及排除标准 纳入标准: 符合 UC 诊断标准; 中医辨证属湿热内蕴证; 年龄 18 ~ 65 岁; 签署知情同意书。排除标准: 细菌性痢疾、阿米巴痢、血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎及克罗恩病、缺血性肠炎、放射性肠炎患者; 妊娠或哺乳期妇女, 过敏体质或已知对本药成分过敏者; 合并有心、脑、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病。

3 一般资料 观察病例为 2012 年 9 月—2013 年 12 月江苏省中医院消化科门诊及住院的 38 例 UC 活动期患者, 男 20 例, 女 18 例, 年龄 20 ~ 63 岁 (中位年龄 42.8 岁), 病程 0.4 ~ 8.0 年。另选择 12 名体检健康受试者作为健康组, 其中男 8 名, 女 4 名, 年龄 20 ~ 60 岁 (中位年龄 39.5 岁)。组织学分级由本院 2 位病理科医生阅片, 按 Riley-Manigoodman 标准进行分级^[4]。将 38 例 UC 患者中属于轻、中度且中医辨证属湿热内蕴证者 (24 例) 随机分为联合组与西药组, 其中联合组 12 例, 年龄 24 ~ 63 岁 (中位年龄 45.6 岁), 病程 1.0 ~ 8.0 年; 西药组 12 例, 年龄

22 ~ 59 岁 (中位年龄 43.2 岁), 病程 0.4 ~ 6.0 年。各组间年龄、病程差异均无统计学意义。

4 治疗方法 西药组口服美沙拉嗪缓释颗粒 (500 mg; 上海爱的发制药有限公司, 批号: 116747), 每次 1 g, 每天 4 次。联合组患者在此基础上加用清肠化湿方 [组成: 黄连 6 g 黄芩 10 g 白头翁 10 g 煨木香 10 g 炒当归 10 g 炒白芍 20 g 肉桂 3 g (后下) 生甘草 6 g], 每天 1 剂, 分 2 次服用, 可根据病情变化随证加减; 配合灌肠方 (黄柏 30 g 石菖蒲 20 g 苦参 10 g 地榆 30 g 白及 9 g 三七粉 3 g 诃子 10 g 锡类散 1.5 g), 混合浓缩至 120 mL, 每晚睡前灌肠 1 次, 连续灌肠 12 天后停灌 2 天, 中药饮片由江苏省中医院药房提供; 锡类散由南通精华制药股份有限公司生产, 每支 1.5 g, 批号: 050890。疗程为 3 个月。

5 观察指标及方法 分别在患者就诊时、治疗结束后行电子结肠镜检查, 留取结肠黏膜活检标本, 10% 甲醛固定, 脱水, 常规石蜡包埋待测; 另于肠镜次日清晨采患者空腹肘静脉血 2 mL, 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min 后分离血浆, 置 -80 °C 冰箱保存待测。

5.1 检测方法 酶联免疫吸附 (ELISA) 法: 使用 IL-17 ELISA 试剂盒 (RB, USA) 检测, 操作按说明书进行。采用 CliniBio 128 型酶标仪测定结果, EXCEL 软件绘制标准曲线。

免疫组织化学染色: 石蜡切片 (0.8 μ m) 脱蜡水化, H_2O_2 灭活内源性酶, 高压锅高温高压修复抗原, 免疫组织化学染色方法参照 SP 试剂盒产品说明书操作流程依次进行, 用 0.01 mol/L PBS 替代一抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照。DAB 显色、苏木素复染, 脱水, 透明, 封片显微镜下观察。所用试剂: 兔抗人 IL-17 多克隆抗体 (稀释比例 1: 100), 购自 Santa Cruz 公司。结果判定: 黏膜病理切片染色强度、染色面积均为阴性记 0 分; 黏膜病理切片染色强度、染色面积分别为淡黄色及 <10% 记 1 分; 黏膜病理切片染色强度、染色面积分别为黄色及 10% ~ 25% 记 2 分; 黏膜病理切片染色强度、染色面积分别为棕黄色及 26% ~ 50% 记 3 分; 黏膜病理切片染色面积 >50% 记 4 分。计算病理切片染色强度、染色面积的赋分和。

5.2 不良反应观察项目及方法 治疗前、治疗后第 28 天和治疗结束后各检查 1 次肝、肾功能。

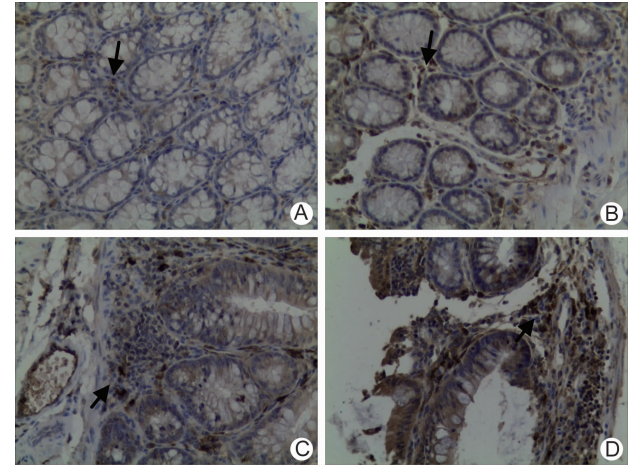
6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用配对 t 检验, 多组间比较采用 One-way ANOVA, 统计作图采用 GraphPad Prism5。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组血浆、肠组织 IL-17 水平比较(表 1,图 1)与健康组比较,活动期 UC 患者血浆及肠组织 IL-17 表达升高($P<0.05$)。与 UC 患者 1 级组比较,IL-17 水平随着病理组织学级别增加而上升,其中 3 级患者血浆 IL-17 水平均高于 1、2 级($P<0.05$), 1、2 级患者血浆 IL-17 水平虽高于健康组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与健康组比较,活动期 UC 患者肠组织中 IL-17 浸润增多($P<0.05$)。IL-17 表达随着病理组织学级别增加而 升高($P<0.05$),且 1、2、3 级组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 各组血浆、肠组织 IL-17 表达比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)			
组别	例数	血浆 IL-17	肠组织 IL-17
健康	12	1.4±0.3	0.4±0.9
UC	38	4.8±1.0 [*]	4.9±0.9 [*]
1 级	10	2.2±0.2	3.7±0.8
2 级	20	3.6±0.9	4.8±0.6 [△]
3 级	8	8.5±1.3 ^{△▲}	5.6±0.7 ^{△▲}

注:与健康组比较,^{*} $P<0.05$;与 UC 1 级组比较,[△] $P<0.05$;与 UC 2 级组比较,[▲] $P<0.05$



注:A 为健康组;B 为 UC 1 级组; C 为 UC 2 级组; D 为 UC 3 级组;箭头所指深染处为肠组织 IL-17 浸润

图 1 各组肠组织 IL-17 表达 (SP, ×200)

2 两组治疗前后血浆 IL-17 水平比较(表 2)与本组治疗前比较,联合组与西药组患者血浆 IL-17 水平均降低($P<0.05$);与西药组比较,联合组患者血浆 IL-17 的治疗前后差值增加($P<0.05$)。

表 2 两组治疗前后血浆 IL-17 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)				
组别	例数	血浆 IL-17		
		治疗前	治疗后	前后差值
联合	12	5.1±5.4	1.8±0.6 [*]	3.3±5.3 [△]
西药	12	4.5±2.6	2.4±2.0 [*]	2.1±2.2

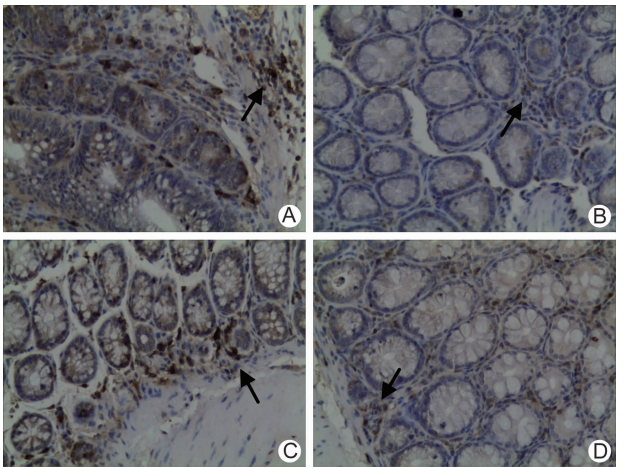
注:与本组治疗前比较,^{*} $P<0.05$;与西药组比较,[△] $P<0.05$

3 两组患者治疗前后肠组织 IL-17 表达比较(表 3,图 2) 治疗前,联合组与西药组均可见细胞质深染,黏膜固有层和淋巴小结内亦可见阳性细胞;治疗后,联合组与西药组肠黏膜组织轻度炎性改变,与本组治疗前比较,联合组与西药组患者肠组织中 IL-17 浸润均减少($P<0.05$),与西药组比较,联合组患者肠组织中 IL-17 的治疗前后差值增加($P<0.05$)。

表 3 两组治疗前后肠组织 IL-17 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	肠组织 IL-17		
		治疗前	治疗后	前后差值
联合	12	5.1±0.8	1.5±1.0 [*]	3.6±1.3 [△]
西药	12	4.7±0.9	2.4±0.9 [*]	2.3±1.5

注:与本组治疗前比较,^{*} $P<0.05$;与西药组比较,[△] $P<0.05$



注:A 为联合组治疗前;B 为联合组治疗后;C 为西药组治疗前;D 为西药组治疗后;箭头所指深染处为肠组织 IL-17 浸润

图 2 两组治疗前后肠组织中 IL-17 表达 (SP, ×200)

4 不良反应 联合组与西药组在治疗期间均未发生药物不良反应。

讨 论

目前认为 UC 的启动和慢性发展过程均可能与免疫调节有密切关系,其中免疫系统分泌的细胞因子平衡失调可能是重要发病机制之一^[5]。Th17 细胞亚群的发现拓宽了对炎症性肠病的认识^[6],幼稚 CD4⁺T 淋巴细胞在 IL-23 等诱导下分化为高致病性的 Th17 细胞,分泌大量 IL-17A、IL-17F、TNF- α 等炎症因子,从而发挥效应。IL-17 具有强大的促炎反应活性,可以诱导固有免疫炎症细胞因子、急性反应蛋白、粒-巨细胞刺激因子(GCSF)和前列腺素 E2 等表达,还能与 TNF- α 等有协同作用,放大其致炎效应^[7]。近年来通过分子靶标技术阻断炎症、免疫途径治疗 UC 的理念

取得了较大进展^[8], 阻断 Th17 细胞的分泌成为治疗 UC 的一种手段。

清肠化湿方是沈洪教授以刘完素的芍药汤为主方, 结合多年临床用药经验和前期单味中药的筛选实验逐步优化而来, 针对 UC 活动期病机而设, 在临床应用中获得肯定疗效^[9-11]。该方由黄连、黄芩、木香、炒白芍、白头翁、生甘草等组成, 黄连、黄芩为君药, 共奏清热燥湿、泻火解毒之功, 急祛其标以除致病之因; 木香、白芍调气和血; 白头翁燥湿排脓; 生甘草调和诸药。全方集清肠化湿、泻火解毒, 调气和血、敛疮排脓、除胀止痛为一体, 正应 UC 活动期湿热蕴肠, 气滞血瘀, 血败肉腐, 肠络受损之病机。前期实验研究也表明, 清肠化湿方能够下调 Th17 细胞特异性转录因子 ROR γ t 的表达, 抑制炎症因子 IL-17 分泌, 从而减轻结肠炎症^[12]。

本试验研究结果表明, UC 患者血浆及结肠组织中 IL-17 水平高于健康人, 这与既往研究结果证实 IBD 患者肠道 IL-17 有更多表达的观点基本一致^[13]。且随着病理组织学分级的增加而增高, 由此可见, IL-17 表达与 UC 的严重程度密切相关。经治疗 3 个月后, 联合组与西药组患者血浆及结肠组织中 IL-17 的表达均有不同程度降低, 且联合组 IL-17 水平低于西药组, 可见清肠化湿方联合美沙拉嗪治疗具有协同增效的作用, 也可以进一步推论, 清肠化湿方可能通过下调患者体内 IL-17 的表达, 抑制肠道炎症, 从而治疗 UC。

综上所述, 清肠化湿方联合美沙拉嗪颗粒可以通过减少 UC 患者血浆及结肠组织中炎症因子 IL-17 的表达, 抑制 Th17 细胞的生成与活化, 从而减轻肠道炎症。对协同增效机制的探讨, 也进一步为中医药治疗 UC 的新药研究提供可靠依据, 但由于受到临床实际用药的限制, 本研究尚未予 UC 患者单用清肠化湿方, 且中药复方治疗 UC 的作用靶点是复杂的, 有待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH. World gastroenterology organization practice guidelines for the

diagnosis and management of IBD in 2010[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(1): 112-124.

- [2] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见[J]. *胃肠病学*, 2012, 17(12): 763-781.
- [3] 中华中医药学会脾胃病分会. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(6): 891-895.
- [4] Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappa B in inflammatory bowel disease[J]. *J Intern Med*, 2008, 263(6): 591-596.
- [5] 张欣, 吴开春, 郭长存, 等. Notch4 在溃疡性结肠炎中的表达与分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(5): 477-478.
- [6] Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T cell repertoire of the Th17 lineage[J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(3): 349-356.
- [7] Komiyama YS, Nakae T, Matsuki A, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmunity encephalomyelitis[J]. *Immunol*, 2006, 177(1): 566-573.
- [8] 欧阳钦. 炎症性肠病的研究策略[J]. *中华消化杂志*, 2005, 35(7): 385-386.
- [9] 郑子春, 沈洪, 朱宣萱, 等. 黄柏、地榆、白及对溃疡性结肠炎大鼠组织中 NF-kB 和细胞因子表达的影响[J]. *中国中医急症*, 2012, 19(3): 469-472.
- [10] 贺海辉, 沈洪, 朱宣萱, 等. 徐长卿对三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎的作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(24): 2237-2242.
- [11] 赵崧, 郑子春, 沈洪. 地榆、白芷、白蔹在溃疡性结肠炎大鼠中的作用及机制探讨[J]. *实用临床医药杂志*, 2011, 15(7): 1-8.
- [12] 陆玥琳, 沈洪, 姚宏凤, 等. 清肠化湿方对小鼠溃疡性结肠炎 Th17/Treg 平衡的调节作用[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(2): 130-133.
- [13] Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, et al. The transcription factor T-beta regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(9): 1129-1143.

(收稿: 2014-01-17 修回: 2014-07-31)