

基于 B、T 淋巴细胞衰减因子及氧化应激探讨新风胶囊治疗强直性脊柱炎的作用机制

齐亚军¹ 刘 健² 郑 力³ 曹云祥² 万 磊²

摘要 **目的** 探讨强直性脊柱炎(AS)患者 B、T 淋巴细胞衰减因子(BTLA)及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(TAOC)、活性氧(ROS)、活性氮(RNS)、丙二醛(MDA)的变化及新风胶囊(XFC)对其影响。**方法** 将 120 例 AS 患者按随机数字表法分为两组:XFC 组(60 例)和柳氮磺胺吡啶(SASP)组(60 例)。两组均治疗 3 个月。60 名健康体检者为健康对照组(NC 组)。采用流式细胞术检测患者外周血 BTLA 表达频率及活化水平;采用酶联免疫分析法检测两组血清中氧化应激指标(SOD、CAT、TAOC、ROS、RNS、MDA)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-4、IL-10 含量;采用魏氏法检测炎性指标血沉(ESR);采用日立 7060 型全自动生化分析仪检测超敏 C 反应蛋白(Hs-CRP);采用 VAS 及 ASAS 20、BASDAI 50 评定疗效;并进行生活质量评分及 BTLA 表达频率的相关分析。**结果** (1)与 SASP 组比较,XFC 组 ASAS 20 及 BASDAI 50 疗效更优,差异有统计学意义($P < 0.01$)。(2)与 NC 组比较,AS 患者外周血 BTLA 表达显著降低($P < 0.05$);SOD、CAT、TAOC 值显著降低($P < 0.01, P < 0.05$);ROS、RNS、MDA 值显著升高($P < 0.01, P < 0.05$);TNF- α 、IL-1 β 、ESR、Hs-CRP 值显著升高($P < 0.01$),IL-4、IL-10 值显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。(3)与本组治疗前比较,治疗后两组外周血 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B、SOD、TAOC、IL-4、SF-36 量表 8 个维度积分值均显著升高,ROS、MDA、TNF- α 、ESR、Hs-CRP、VAS、BASDAI 50、BASFI、BAS-G 均显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。XFC 组在升高 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B、SOD、TAOC、IL-10、BP、MH、VT、SF 及降低 ROS、IL-1 β 、MDA、TNF- α 、ESR、Hs-CRP、VAS、BASDAI、BASFI、BAS-G 方面优于 SASP 组($P < 0.01, P < 0.05$)。(4) Pearson 相关分析结果显示:外周血 BTLA/CD19⁺B 与 SOD、CAT、TAOC、IL-4、IL-10、GH、RP、BP、SF 呈正相关(r 分别为 0.431, 0.325, 0.318, 0.316, 0.348, 0.314, 0.358, 0.318, 0.326; $P < 0.05, P < 0.01$),与 ROS、MDA、TNF- α 、IL-1 β 、ESR、VAS、BASDAI 呈负相关(r 分别为 -0.342; -0.368, -0.334, -0.354, -0.324, -0.372, -0.342, $P < 0.05, P < 0.01$)。BTLA/CD24⁺B 与 SOD、TAOC、IL-4、IL-10、GH、RP、BP、SF、RE、MH、VT 亦呈正相关(r 分别为 0.358, 0.352, 0.372, 0.436, 0.435, 0.326, 0.352, 0.345, 0.326, 0.343, 0.332; $P < 0.05, P < 0.01$),与 ROS、RNS、MDA、ESR、Hs-CRP、VAS、BASDAI、BASFI 呈负相关(r 分别为 -0.447, -0.336, -0.405, -0.395, -0.358, -0.436, -0.338, -0.425; $P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** XFC 能提高 AS 患者外周血 BTLA 表达,负性调节 B 细胞的激活与增殖,降低异常免疫反应和氧化应激损伤,从而有效减轻关节僵硬症状。

关键词 强直性脊柱炎;B、T 淋巴细胞衰减因子;氧化应激;新风胶囊

Exploration of the Mechanism of Xinfeng Capsule in the Treatment of Ankylosing Spondylitis Based on B and T Lymphocyte Attenuator and Oxidative Stress QI Ya-jun¹, LIU Jian², ZHENG Li³, CAO Yun-xiang², and WAN Lei² 1 Faculty of Graduate Studies, Anhui University of Chinese Medi-

基金项目:国家中医药重点学科中医内科学建设项目(No.国中医药发[2009]30 号);安徽省科技厅科研计划项目(No. 11010402170);安徽中医药大学科技创新团队项目(No. 2010TD005)

作者单位:1.安徽中医药大学研究生部(合肥 230038);2.安徽中医药大学第一附属医院风湿科(合肥 230031);3.Department of Radiation Biology, City of Hope National Medical Center and Beckman Research Institute, Duarte(USA CA 91010)

通讯作者:刘 健,Tel:0551-62838582,E-mail:liujianahzy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.01.0025

cine, Hefei (230038), China; 2 Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031), China; 3 Department of Radiation Biology, City of Hope National Medical Center and Beckman Research Institute, Duarte (CA 91010), USA

ABSTRACT **Objective** To explore changes of B and T lymphocyte attenuator (BTLA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAOC), reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), malondialdehyde (MDA) in ankylosing spondylitis (AS) patients, and the effect of Xinfeng Capsule (XFC) on them. **Methods** Totally 120 AS patients were assigned to two groups according to random digit table method, the XFC group (3 XFC pills each time, 3 times a day) and the SASP group (4 SASP tablets each time, twice a day), 60 in each group. All patients were treated for 3 months. Another 60 healthy subjects were recruited as a healthy control group. The expression frequency and activation levels of BTLA were detected using flow cytometry. Serum oxidative stress indices (such as SOD and CAT, TAOC, ROS, RNS, MDA) and contents of cytokines [tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-1 β , IL-4, and IL-10] were detected using enzyme-linked immunoassay (ELISA). Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was detected using Westergren method. High-sensitivity C-reactive protein (Hs-CRP) was detected using HITACHI 7060 type automatic biochemical analyzer. Clinical efficacies of ASAS 20 and BASDAI50 were assessed using VAS. Correlation analysis between scoring for quality of life and BTLA expression frequency was performed. **Results** (1) Clinical efficacies of ASAS 20 and BASDAI50 were significantly better in the XFC group than in the SASP group ($P < 0.01$). (2) Compared with the healthy control group, BTLA expressions in the peripheral blood of AS patients decreased significantly ($P < 0.05$); SOD, CAT, and TAOC values significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$); ROS, RNS, and MDA values significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$); TNF- α , IL-1 β , ESR, and Hs-CRP values significantly increased ($P < 0.01$); IL-4 and IL-10 values decreased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). (3) Compared with pre-treatment in the same group, BTLA/CD19 $^{+}$ B, BTLA/CD24 $^{+}$ B, SOD, TAOC, IL-4, SF-36 [physical functioning (PF), social functioning (SF), role limitation due to physical problems (RP), role limitation due to emotional problems (RE), body pain (BP), mental health (MH), vitality (VT), general health (GH)] were significantly elevated; ROS, MDA, TNF- α , ESR, Hs-CRP, VAS, BASDAI and BASFI, BAS-G were significantly lower in the peripheral blood of the two groups after treatment ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Better effect was shown in the XFC group in elevating BTLA/CD19 $^{+}$ B, BTLA/CD24 $^{+}$ B, SOD, TAOC, IL-10, BP, MH, VT, and SF; and lowering ROS, IL-1 β , MDA, TNF- α , ESR, Hs-CRP, VAS, BASDAI, BASFI, and BAS-G ($P < 0.01$, $P < 0.05$). (4) Pearson correlation analysis showed, BTLA/CD19 $^{+}$ B expression of the peripheral blood was positively correlated with SOD, CAT, TAOC, IL-4, IL-10, GH, RP, BP, and SF ($r = 0.431, 0.325, 0.318, 0.316, 0.348, 0.314, 0.358, 0.318, 0.326$, respectively, $P < 0.05$, $P < 0.01$), while it was negative correlated with ROS, MDA, TNF- α , IL-1 β , ESR, VAS, and BASDAI ($r = -0.342, -0.368, -0.334, -0.354, -0.324, -0.372, -0.342$, respectively, $P < 0.05$, $P < 0.01$). BTLA/CD24 $^{+}$ B expression of the peripheral blood was positively correlated with SOD, TAOC, IL-4, IL-10, GH, RP, BP, SF, RE, MH, VT ($r = 0.358, 0.352, 0.372, 0.436, 0.435, 0.326, 0.352, 0.345, 0.326, 0.343, 0.332$, respectively, $P < 0.05$, $P < 0.01$), while it was negative correlated with ROS, RNS, MDA, ESR, Hs-CRP, VAS, BASDAI, and BASFI ($r = -0.447, -0.336, -0.405, -0.395, -0.358, -0.436, -0.338, -0.425$, respectively, $P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** XFC could improve BTLA expression in the peripheral blood of AS patients, negatively regulate activation and proliferation of B cells, and reduce abnormal immune responses and oxidative stress injury, thereby effectively alleviating joint stiffness and pain.

KEYWORDS ankylosing spondylitis; B and T lymphocyte attenuator; oxidative stress; Xinfeng Capsule

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种以主要侵犯骶髂关节、脊柱,并可不同程度累及外周关节的慢性进行性炎性疾病,好发于 20~30 岁的青壮年男性,其病变特点为病变易累及骶髂关节,椎间盘纤维环及其附近韧带常发生钙化,不及时诊治可发生脊柱强直和关节严重畸形。AS 髋关节受累常见,国内学者研究发现,我国 AS 髋关节受累率约 60%,髋关节严重畸形改变患者将终身残废,丧失劳动力,生活质量明显下降^[1]。迄今为止,AS 确切的发病机制仍不明确,因此积极探索 AS 的发病机制显得尤为重要。近年来研究表明,免疫炎症、细胞因子、氧化应激等参与了 AS 的发生、发展^[2-6]。AS 患者处于氧化应激失衡状态,且体内能检测到多种自身抗体,存在 B 淋巴细胞的异常活化^[7,8]。B、T 淋巴细胞衰减因子(B and T lymphocyte attenuator, BTLA)是 CD28 家族发现的第 3 个抑制性共刺激分子,主要表达在 B 细胞、T 细胞等细胞表面,参与负性调节 B 细胞、T 细胞的激活与增殖^[9,10]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)是机体组织在代谢过程中产生的有害自由基,可诱导氧化应激;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)是一类重要的抗氧化酶,能清除生物体内超氧阴离子等自由基发生歧化反应;丙二醛(malondialdehyde, MDA)是体内脂质过氧化的产物,总抗氧化能力(TAOC)可反映体液中已知和未知的抗氧化剂的多少,以上六者可反应机体的氧化应激状态。AS 患者 B 淋巴细胞异常活化及氧化应激失衡是否与 BTLA 的表达相关,尚不清楚。因此,本研究通过对 AS 患者治疗前及新风胶囊(XFC)治疗后 BTLA、SOD、CAT、TAOC、ROS、RNS、MDA 等指标表达的检测和分析,从而探讨 BTLA 在 XFC 改善 AS 患者免疫及氧化应激状态的机制。

资料与方法

1 诊断标准 AS 参照美国风湿病协会(ACR)1984 年修订的 AS 纽约诊断标准^[11]并参考 2009 年国际强直性脊柱炎工作小组(ASAS)发布的中轴型脊柱关节病分类标准^[12]。

2 纳入标准 (1)符合以上 AS 的诊断标准;(2)年龄 18~60 岁;(3)患者知情同意并签署知情同意书;(3)依从性好,能严格遵从医生的医嘱服药。

3 排除标准 (1)脊柱已出现强直改变,严重畸形的患者;(2)处于妊娠和哺乳期的女性;(3)其他类型的血清阴性脊柱关节病;(4)合并严重并发症需要使用肾上腺皮质激素治疗者;(5)合并心、脑、肾等脏

器严重损伤的患者。

4 一般资料 120 例 AS 患者均为安徽中医药大学第一附属医院风湿病科 2013 年 2 月—2014 年 3 月期间住院患者,采用随机数字表分组法分为 XFC 组和柳氮磺胺吡啶(SASP)组,每组各 60 例。XFC 组男 47 例,女 13 例,年龄 18~60 岁,平均 (30.2 ± 10.1) 岁;病程 0.5~26 年,平均 (9.2 ± 7.6) 年。SASP 组男 49 例,女 11 例,年龄 18~60 岁,平均 (30.4 ± 9.8) 岁;病程 0.5~26 年,平均 (9.5 ± 6.8) 年。两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。另从安徽中医药大学第一附属医院体检中心经体检和免疫学检查无自身免疫性疾病,无明显器质性疾病的人群中选取 60 名作为正常对照组(NC 组),其中男 48 名,女 12 名,年龄 20~52 岁,平均为 (28.5 ± 10.4) 岁。本试验方案已通过安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会审批。

5 治疗方法 XFC 组服用 XFC(每粒含生药量 0.5 g,安徽中医药大学第一附属医院制剂中心生产,批号:201205291),每次 3 粒,每日 3 次,3 个月为 1 个疗程,连服 1 个疗程;SASP 组服用 SASP(每片含生药量 0.25 g,上海三维制药有限公司生产,批号:201104c20),每次 4 片,每日 2 次,服用天数及疗程同治疗组。在治疗期间,两组对症治疗药物维持不变,若患者病情需要,两组均加用同等剂量的非甾体抗炎药。

6 疗效评定

6.1 症状、体征积分 采用视觉模拟评分(visual analog scales, VAS)^[13,14]、Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数(Bath ankylosing spondylitis disease active index, BASDAI)^[15]、Bath 强直性脊柱炎功能指数(Bath ankylosing spondylitis functional index, BASFI)^[16]、Bath 强直性脊柱炎总体指数(Bath ankylosing spondylitis global index, BAS-G)^[17,18]对 AS 患者进行评分(0~10 分),分值越高,表示病情越重。

6.2 生活质量评分 采用国际普适生活质量量表(SF-36)^[19]进行评定。主要通过对生理机能(physical functioning, PF)、社会功能(social functioning, SF)、生理职能(role limitation due to physical problems, RP)、情感职能(role limitation due to emotional problems, RE)、躯体疼痛(body pain, BP)、精神健康(mental health, MH)、活力(vitality, VT)以及一般健康状况(general health, GH)等维度的测评来评定 AS 患者的生活质量。标准分计算公式 = [(实际评分 - 最低可能评分) / 一般平均可能评分] × 100%。标准分值越低,则 AS 患者生活质量越差;反之,则提示 AS 患者生活质量越好。填写该量表之前,

每位患者均需要认真阅读并且能够准确理解该量表中涉及的每一条问题。

6.3 临床疗效 采用ASAS 20、BASDAI 50 评价标准^[20] 评价。ASAS 20 是指患者总体评价(PGA)、脊柱疼痛VAS评分、功能指数BASFI评分、脊柱炎症评分(晨僵程度和持续时间) 4 个方面与初诊值相比,4 个指标中有 3 个改善 $\geq 20\%$,并且绝对分值至少有 1 分的进步;而未能达到 20% 改善的一项,与初诊相比无恶化。达到ASAS 20 标准为有效,否则判之为无效。而BASDAI 50 评价是指BASDAI 改善达到 50% 的受试者比例。

7 观察指标及检测方法

7.1 B 细胞亚群表面BTLA 表达水平检测 采用流式细胞术。取AS 患者全血 100 μL ,应用以下荧光标记的单抗进行染色:BTLA-PE/CD19-PE-CYTM5/CD24-FITC 及相应同型对照。样品于室温避光染色 30 min。加入溶血素 3 mL,室温避光 10 min,离心 5 min。弃上清。加入 2 mL PBS 洗涤 2 次,以含 1% 多聚甲醛的 PBS 重悬,FACSAria 流式细胞仪 FlowJo 软件进行分析。分析CD19⁺、CD24⁺ B 细胞表面BTLA 表达水平。

7.2 血清中SOD、CAT、TAOC、ROS、RNS、MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-10 含量检测 采用ELISA 法。清晨空腹抽取健康对照组和AS 患者静脉血 10 mL,3 000 r/min 离心 15 min,分离后进行 4 等份分装,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存统一检测。所有指标均严格按照试剂盒说明书进行操作。参照标准曲线计算标本相应指标的测定值。SOD、CAT、TAOC、ROS、RNS、MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-10 试剂盒购自英国伯明翰公司。

7.3 血清ESR、Hs-CRP 检测 分别采用魏氏法、全自动生化分析仪。所有被选对象均于清晨空腹时静脉采血 5 mL,采集后标本立即送往安徽中医药大

学第一附属医院实验中心检测,采用魏氏法对ESR (mm/h)进行测定,使用日立 7060 型全自动生化分析仪测定Hs-CRP (mg/L)。

8 统计学方法 采用SPSS 17.0 软件包进行数据分析,连续性变量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均采用Kolmogorov-Smirnov 正态性检验;计量资料采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验;并采用Spearman 进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 XFC 组和SASP 组临床疗效比较 治疗 3 个月 后,XFC 组ASAS 20 为 93.3% (56/ 60);SASP 组ASAS 20 为 66.7% (40/60),两组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 13.32, P < 0.01$);XFC 组BASDAI 50 为 88.3% (53/60);SASP 组BASDAI 50 为 63.3% (38/60),两组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 10.24, P < 0.01$)。

2 AS 患者和NC 组外周血B 细胞亚群BTLA 比较(表1) 与NC 组比较,AS 患者外周血CD19⁺ B 细胞、CD24⁺ B 细胞BTLA 表达显著降低($P < 0.05$)。

表1 AS 患者和NC 组外周血B 细胞亚群BTLA 比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BTLA/CD19 ⁺ B	BTLA/CD24 ⁺ B
AS	60	73.85 $\pm$ 7.43 *	75.46 $\pm$ 8.52 *
NC	60	84.28 $\pm$ 2.76	87.54 $\pm$ 3.18

注:与NC 组比较,* $P < 0.05$

3 AS 患者和NC 组外周血氧化应激指标比较(表2) 与NC 组比较,AS 患者外周血SOD、CAT、TAOC 值显著降低($P < 0.01, P < 0.05$);ROS、RNS、MDA 值显著升高($P < 0.01$)。

4 AS 患者和NC 组外周血细胞因子、炎症指标比较(表3) 与NC 组比较,AS 患者外周血TNF- α 、

表2 AS 患者和NC 组外周血氧化应激指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SOD(U/mL)	CAT(kU/L)	TAOC(U/mL)	ROS(ng/mL)	RNS(U/mL)	MDA(nmol/mL)
AS	60	131.33 $\pm$ 37.46 *	224.56 $\pm$ 124.95 **	2.07 $\pm$ 0.21 **	3.69 $\pm$ 0.56 **	131.02 $\pm$ 24.35 **	33.64 $\pm$ 18.67 **
NC	60	163.85 $\pm$ 46.39	303.52 $\pm$ 128.43	3.08 $\pm$ 0.53	2.64 $\pm$ 0.23	98.84 $\pm$ 5.82	12.42 $\pm$ 7.93

注:与NC 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表3 AS 患者和NC 组外周血细胞因子、炎症指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (pg/mL)	IL-4(ng/L)	IL-10(ng/L)	ESR(mm/h)	Hs-CRP(mg/L)
AS	60	279.23 $\pm$ 168.71 **	3.88 $\pm$ 2.71 **	357.76 $\pm$ 259.02 *	102.78 $\pm$ 13.45 **	26.33 $\pm$ 13.68 **	11.38 $\pm$ 3.15 **
NC	60	21.85 $\pm$ 18.78	2.68 $\pm$ 1.57	427.73 $\pm$ 244.08	172.64 $\pm$ 31.12	9.12 $\pm$ 4.26	1.93 $\pm$ 0.86

注:与NC 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

IL-1β、ESR、Hs-CRP 值显著升高($P < 0.01$), IL-4、IL-10 值显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

5 XFC 组和 SASP 组治疗前后 BTLA 水平比较(表 4) 两组治疗前外周血 BTLA 表达频率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B 均显著升高($P < 0.01$)。XFC 组在升高 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B 方面优于 SASP 组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 4 XFC 组和 SASP 组治疗前后 BTLA 水平比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	BTLA/CD19 ⁺ B	BTLA/CD24 ⁺ B
XFC	60	治疗前	71.46 ± 9.36	76.38 ± 7.81
		治疗后	82.57 ± 3.64 **△	85.72 ± 5.27 **△△
SASP	60	治疗前	74.54 ± 5.32	74.23 ± 9.61
		治疗后	79.95 ± 4.21 **	82.68 ± 5.03 **

注:与本组治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 SASP 组治疗后比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

6 XFC 组和 SASP 组治疗前后氧化应激指标水平比较(表 5) 两组治疗前外周血氧化应激指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 SOD、TAOC 显著升高,ROS、MDA 方面显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。XFC 组在升高 SOD、TAOC,降低 ROS、MDA 优于 SASP 组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 5 XFC 组和 SASP 组治疗前后氧化应激指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	SOD (U/mL)	CAT (kU/L)	TAOC (U/mL)	ROS (ng/mL)	RNS (U/mL)	MDA (nmol/mL)
XFC	60	治疗前	132.46 ± 36.42	226.69 ± 122.81	2.14 ± 0.26	3.84 ± 0.42	133.27 ± 22.09	33.79 ± 18.73
		治疗后	159.49 ± 46.63 **△△	239.25 ± 129.64 *	3.72 ± 0.54 **△	2.77 ± 0.23 **△△	124.34 ± 14.92 *	11.37 ± 5.89 **△△
SASP	60	治疗前	131.38 ± 37.54	225.85 ± 123.92	2.19 ± 0.18	3.62 ± 0.64	131.04 ± 24.28	31.54 ± 19.91
		治疗后	142.46 ± 39.76 *	230.52 ± 127.36	2.93 ± 0.67 *	3.04 ± 0.58 *	128.04 ± 26.86	25.49 ± 17.24 *

注:与本组治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 SASP 组治疗后比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表 6 XFC 组和 SASP 组治疗前后细胞因子、炎性指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	TNF-α (ng/L)	IL-1β (pg/mL)	IL-4 (ng/L)	IL-10 (ng/L)	ESR (mm/h)	Hs-CRP (mg/L)
XFC	60	治疗前	281.25 ± 166.68	3.93 ± 2.67	357.72 ± 260.04	102.53 ± 13.67	28.62 ± 11.35	11.43 ± 1.58
		治疗后	79.78 ± 25.31 **△△	2.12 ± 1.19 **△△	410.58 ± 258.47 *	182.58 ± 30.15 **△	5.08 ± 3.22 **△△	2.31 ± 1.24 **△△
SASP	60	治疗前	279.04 ± 168.76	3.78 ± 2.81	356.63 ± 261.18	100.38 ± 15.72	25.78 ± 13.32	10.39 ± 2.58
		治疗后	146.84 ± 116.54 **	3.67 ± 2.86	402.14 ± 251.32 *	122.25 ± 10.26	9.72 ± 3.49 **	5.12 ± 2.33 **

注:与本组治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 SASP 组治疗后比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表 7 XFC 组和 SASP 组治疗前后症状、体征积分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	VAS	BASDAI	BASFI	BAS-G
XFC	60	治疗前	5.48 ± 1.81	5.82 ± 1.78	5.71 ± 1.67	6.38 ± 1.45
		治疗后	2.21 ± 1.27 **△△	2.78 ± 1.86 **△	2.53 ± 1.26 **△	3.19 ± 1.92 **△△
SASP	60	治疗前	5.63 ± 1.58	6.58 ± 1.47	6.58 ± 1.49	6.58 ± 1.36
		治疗后	3.41 ± 1.89 *	3.82 ± 1.48 **	3.46 ± 1.81 **	4.67 ± 1.87 **

注:与本组治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 SASP 组治疗后比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

7 XFC 组和 SASP 组治疗前后细胞因子、炎性指标水平比较(表 6) 两组治疗前外周血细胞因子、炎性指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 IL-4 显著升高, TNF-α、ESR、Hs-CRP 显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。XFC 组在升高 IL-10,降低 IL-1β、MDA、TNF-α、ESR、Hs-CRP 方面优于 SASP 组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

8 XFC 组和 SASP 组治疗前后症状体征积分比较(表 7) 两组治疗前症状体征积分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 VAS、BASDAI、BASFI、BAS-G 显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。XFC 组在降低 VAS、BASDAI、BASFI、BAS-G 方面优于 SASP 组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

9 XFC 组和 SASP 组治疗前后生活质量评分比较(表 8) 两组治疗前生活质量评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组治疗前比较,两组治疗后 SF-36 各维度积分均显著升高。XFC 组在升高 BP、SF、MH、VT 上显著优于 SASP 组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

10 AS 患者 BTLA 表达频率与氧化应激指标相关性分析(表 9) *Pearson* 相关分析结果显示:外周血 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B 与 SOD、TAOC 呈正相关($P < 0.01$, $P < 0.05$),与 ROS、MDA 呈负相关($P < 0.01$, $P < 0.05$);BTLA/CD19⁺B 与 CAT 呈正相关($P < 0.05$);BTLA/CD24⁺B 与 RNS 呈负相关($P < 0.05$)。

表 8 XFC 组和 SASP 组治疗前后生活质量各维度评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	GH	PF	RP	BP	SF	RE	MH	VT
XFC	60	治疗前	47.28 ± 16.45	30.81 ± 24.88	30.22 ± 8.42	46.12 ± 23.02	46.96 ± 24.19	51.18 ± 18.78	58.48 ± 18.86	55.84 ± 21.29
		治疗后	59.25 ± 15.62 **	39.15 ± 32.72 **	45.25 ± 20.38 **	70.96 ± 11.78 ** [△]	65.62 ± 17.73 ** [△]	53.41 ± 20.38	66.13 ± 11.92 * [△]	65.02 ± 17.44 * ^{△△}
SASP	60	治疗前	50.36 ± 19.32	28.48 ± 19.75	28.54 ± 5.59	47.71 ± 24.05	41.94 ± 21.66	46.72 ± 19.08	53.71 ± 15.46	47.21 ± 19.67
		治疗后	53.51 ± 13.04	38.64 ± 20.67 **	39.38 ± 11.63 **	64.58 ± 14.26 **	59.92 ± 17.85 **	48.95 ± 19.16	60.32 ± 12.45 *	53.92 ± 17.84 *

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 SASP 组治疗后比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 9 AS 患者 BTLA 表达频率与氧化应激指标相关性分析 (r 值)

	SOD	CAT	TAOC	ROS	RNS	MDA
BTLA/CD19 ⁺ B(%)	0.431 **	0.325 *	0.318 *	-0.342 *	-0.272	-0.368 *
BTLA/CD24 ⁺ B(%)	0.358 *	0.264	0.352 *	-0.447 **	-0.336 *	-0.405 **

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

11 AS 患者 BTLA 表达频率与细胞因子、炎症指标相关性分析(表 10) *Pearson* 相关分析结果显示:外周血 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B 与 IL-4、IL-10 呈正相关($P < 0.01$, $P < 0.05$),与 TNF- α 、IL-1 β 、ESR 呈负相关($P < 0.01$, $P < 0.05$);BTLA/CD24⁺B 与 Hs-CRP 呈负相关($P < 0.05$)。

表 10 AS 患者 BTLA 表达频率与氧化应激指标相关性分析 (r 值)

	TNF- α	IL-1 β	IL-4	IL-10	ESR	Hs-CRP
BTLA/CD19 ⁺ B	-0.334 *	-0.354 *	0.316 *	0.348 *	-0.324 *	-0.284
BTLA/CD24 ⁺ B	-0.372 *	-0.426 **	0.372 *	0.436 **	-0.395 *	-0.358 *

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

12 AS 患者 BTLA 表达频率与症状体征积分相关性分析(表 11) *Pearson* 相关分析结果显示:外周血 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B 与 VAS、BASDAI 呈负相关($P < 0.01$, $P < 0.05$);BTLA/CD24⁺B 与 BASFI 呈负相关($P < 0.01$)。

表 11 AS 患者 BTLA 表达频率与症状体征积分相关性分析 (r 值)

	VAS	BASDAI	BASFI	BAS-G
BTLA/CD19 ⁺ B	-0.372 *	-0.342 *	-0.278	-0.234
BTLA/CD24 ⁺ B	-0.436 **	-0.338 *	-0.425 **	-0.262

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

13 AS 患者 BTLA 表达频率与 SF-36 各维度积分相关性分析(表 12) *Pearson* 相关分析结果显示:外周血 BTLA/CD19⁺B、BTLA/CD24⁺B 与 GH、RP、BP、SF 呈正相关($P < 0.01$, $P < 0.05$);BTLA/CD24⁺B 与 RE、MH、VT 呈正相关($P < 0.05$)。

表 12 AS 患者 BTLA 表达频率与症状体征积分相关性分析 (r 值)

	GH	PF	RP	BP	SF	RE	MH	VT
BTLA/CD19 ⁺ B	0.314 *	0.226	0.358 *	0.318 *	0.326 *	0.252	0.278	0.294
BTLA/CD24 ⁺ B	0.435 **	0.184	0.326 *	0.352 *	0.345 *	0.326 *	0.343 *	0.332 *

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

AS 主要病变特点为易累及骶髂关节,椎间盘纤维环及其附近韧带常发生钙化,若不及时诊治,可导致长期的中轴关节疼痛、功能障碍甚至颈部、腰背强直,活动不利,髋关节损害等,严重影响患者的生活质量^[21]。迄今为止,AS 确切的发病机制仍未明确,但研究发现,细胞因子、氧化应激、免疫炎症等因素与 AS 的发生关系密切^[5,6]。在 AS 患者的体内检测到多种自身抗体,提示免疫球蛋白合成增强,存在 B 淋巴细胞的异常活化^[7,8]。B 细胞在抗原刺激下可分化为浆细胞,合成和分泌免疫球蛋白,主要执行机体的体液免疫。BTLA 是细胞毒 T 淋巴细胞抗原-4、继程序性死亡分子-1,白细胞表面分化抗原 28 家族新近发现的负性共刺激分子^[22]。既往研究主要侧重于研究 BTLA 对于 T 淋巴细胞的影响,结果显示,BTLA 对 T 淋巴细胞活化、增殖发挥着重要的负性调控作用^[23,24]。本研究采用 CD19⁺、CD24⁺双标记法检测 BTLA 对 B 淋巴细胞表达的影响。CD19⁺是 B 细胞表面特有的 CD 抗原分子,其表达贯穿 B 细胞分化成熟全过程。因此外周血 CD19⁺分子表达水平能够代表 B 淋巴细胞的水平^[25]。CD24⁺在 B 淋巴细胞发育成熟不同阶段表达,包括未成熟 B 细胞和记忆性 B 细胞,最新研究表明在早期祖 B 细胞 CD19⁺表达之前,就发现有 CD24⁺的表达。CD24⁺能够调节 B 淋巴细胞生长发育和影响细胞功能状态的特点,可能在免疫自稳、调控免疫应答方面起着关键的作用^[26]。本研究发现 AS 患者外周血 CD19⁺B 细胞、CD24⁺B 细胞 BTLA 的表达水平较健康人显著下降($P < 0.05$)。

近年来临床研究证实,氧化/抗氧化系统失衡在 AS 的发生发展中起着至关重要的作用^[3,27]。笔者前期研究

表明^[28],与正常参考范围比较,63.33%的 AS 患者血清 SOD 水平低于与正常参考范围,且 SOD 水平与 ESR、CRP 呈负相关性,而与年龄、病程无相关性。本研究发现,外周血 BTLA 表达频率下降的 AS 患者,ESR、Hs-CRP 显著升高,且氧化指标 ROS、RNS、MDA 水平升高,抗氧化指标 SOD、CAT、TAOC 水平降低。

本研究结果表明外周血 BTLA/CD19⁺B 细胞、BTLA/CD24⁺B 细胞表达频率与抑炎细胞因子 IL-4、IL-10 呈正相关,与促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 呈负相关。IL-1 β 能刺激 B、T 淋巴细胞增生,引起发热反应以及骨的重吸收^[29];此外,研究还发现 AS 患者血浆 IL-1 β 水平升高,并与 AS 患者的强直性脊柱炎附着点指数呈正相关^[30]。TNF- α 是一种调节多种生理和免疫反应的多肽细胞因子。TNF- α 含量适中时可促进细胞的分化,参与机体正常免疫反应;但若机体分泌的 TNF- α 含量过多或过少,则都会产生一系列的免疫异常反应,对机体造成一定的损伤^[31]。IL-4 是重要的抑炎因子之一,可刺激 B 细胞生长。研究发现,IL-4 与 BASDAI 呈正相关,而与病程无相关性^[32]。IL-10 是一种多效性抑炎细胞因子,能抑制激活的单核细胞/巨噬细胞产生其他的致炎细胞因子如 TNF- α ^[33]。综上,笔者认为,可能是由于外周血 BTLA⁺B 细胞减少、B 细胞活化增强,致使 B 细胞异常浸润聚集,炎性细胞因子大量分泌,损伤机体 SOD 和 CAT,导致 ROS 和 RNS 水平升高,产生过量的氧自由基 MDA,MDA 可抑制关节软骨细胞基质及 II 型胶原的合成,使得软骨细胞的形态和功能严重损伤,进而导致 AS 发病。AS 不及时诊治,病情日久迁延不愈,从而出现关节僵硬、活动受限等临床症状,严重影响患者的生活质量。

XFC 可明显降低 AS 患者 VAS、BASDAI、BASFI、BAS-G 积分,提高 SF-36 各维度积分。XFC 在提高 BTLA⁺B 细胞数量、降低致炎细胞因子、氧化指标水平,升高抑炎细胞因子、抗氧化指标水平方面,明显优于 SASP 组。XFC 主要由君药黄芪、薏苡仁以及臣药雷公藤、蜈蚣等药物合而成方,该方在治疗 AS 临床应用上已取得较好疗效^[34,35]。现代药理学研究表明,在病理性免疫反应异常增高的状态下,黄芪具有减轻免疫反应的作用。黄芪多糖能够提高自由基清除剂 SOD 的活性,从而抑制氧自由基对软骨细胞及基质的损害^[36]。薏苡仁油可以显著降低炎症大鼠模型 TNF- α 及 IL-1 β 水平,还可以通过增强内源性活性氧自由基清除系统的功能,减少脂质过氧化物的生成^[37]。雷公藤多苷能抑制细胞炎性因子的核酸表达,

减少促炎细胞因子 TNF- α 分泌^[38,39]。蜈蚣酸性蛋白能显著升高抗氧化指标 SOD,降低氧化指标 MDA、NOS、NO 的表达,减轻脂质过氧化对组织的损伤^[40]。纵观全方,XFC 诸药配伍可提高 AS 患者外周血 BTLA 表达,抑制 B 淋巴细胞活化,从而纠正细胞因子紊乱和氧化应激失衡状态。

综上所述,B 淋巴细胞异常活化和氧化应激在强直性脊柱炎的发生、发展中起着重要作用。与 SASP 比较,XFC 可以更加有效地改善 AS 患者的临床症状,提高 AS 患者的生活质量。其机制可能是由于 XFC 能有效提高 AS 患者外周血 BTLA 表达频率,抑制 B 淋巴细胞异常活化,上调 IL-4、IL-10、SOD、CAT 水平,下调 IL-1 β 、TNF- α 、ESR、Hs-CRP、ROS、MDA 水平,降低机体内异常免疫炎症反应和氧化应激损伤,从而有效延缓或抑制关节软骨病变,减轻 AS 患者关节僵硬症状,提高 AS 患者生活质量。

参 考 文 献

- [1] 张乃峥主编.临床风湿病学[M].上海:上海科学技术出版社,1997:156-173.
- [2] Gao F. Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan [J]. Biol Chem, 2008, 283 (10): 58-66.
- [3] Karakoc M, Altindag O, Keles H, et al. Serum oxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis [J]. Rheumatol Int, 2007, 27 (12): 1131-1134.
- [4] Ozgocmen S, Sogut S, Ardicoglu O, et al. Serum nitric oxide, catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde status in patients with ankylosing spondylitis [J]. Rheumatol Int, 2004, 24 (2): 80-83.
- [5] Park M C, Chung S J, Park Y B, et al. Pro-inflammatory effect of leptin on peripheral blood mononuclear cells of patients with ankylosing spondylitis [J]. Joint Bone Spine, 2009, 76(2): 170-175.
- [6] 李军霞,张莉芸,霍月红,等.甲泼尼龙治疗难治性强直性脊柱炎对 Th1/Th2 细胞及其细胞因子的影响[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2009,3(1): 28-33.
- [7] 吴洪坤,周琳,张玲珍,等.强直性脊柱炎患者外周血中 B 淋巴细胞亚群、B 细胞活化因子及其受体的表达研究[J].检验医学,2011,26(12): 818-822.
- [8] Wright C, Sibani S, Trudgian D, et al. Detection of multiple autoantibodies in patients with ankylosing spondylitis using nucleic acid programmable protein arrays [J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11 (2): M9.00384.
- [9] Liu X, Alexiou M, Martin-Orozco N, et al. Cutting

- edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction[J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 4516-4520.
- [10] Del Rio ML, Lucas CL, Buhler L, et al. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 co-signaling pathways as targets for immune regulation[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(2): 223-235.
 - [11] 陆再英, 钟南山主编. 内科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 867-868.
 - [12] 中华医学会风湿病学分会. 强直性脊柱炎诊断及治疗指南[S]. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14(8): 557-559.
 - [13] Huskisson EC. Measurement of pain[J]. *Lancet*, 1974, 2(7889): 1127-1131.
 - [14] 盛锋, 沈国权, 孙武权. 神经根型颈椎病疗效评价量表的研究近况[J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(9): 824-828.
 - [15] Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, et al. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index [J]. *J Rheumatol*, 1994, 21(12): 2286-2291.
 - [16] Calin A, Garrett S, Whitelock H, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index [J]. *J Rheumatol*, 1994, 21(12): 2281-2285.
 - [17] Madsen OR, Rytter A, Hansen LB, et al. Reproducibility of the Bath Ankylosing Spondylitis Indices of Disease Activity (BASDAI), functional status (BASFI) and overall well-being (BAS-G) in anti-tumor necrosis factor-treated spondyloarthropathy patients[J]. *Clin Rheumatol*, 2010, 29(8): 849-854.
 - [18] 冯兴华, 姜泉, 刘宏潇, 等. 中医辨证治疗强直性脊柱炎的临床疗效评价[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(10): 1309-1314.
 - [19] Ware JE, Snow KK, Kosinski M, et al. SF-36 Health Survey: manual and interpretation guide [M]. New England: The Health Institute, New England Medical Center, 1993: 5-224.
 - [20] Zochling J, Braun J. Assessment of ankylosing spondylitis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, 23(5 Suppl 39): S133-S141.
 - [21] 阎小萍主编. 强直性脊柱炎[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 23-36.
 - [22] 王万党, 曾今诚, 徐军发. B、T 淋巴细胞活化因子在人类免疫性疾病中的作用及机制研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(24): 11647-11650.
 - [23] 王月颖, 王雪峰, 张学光, 等. BTLA 在 T 细胞上的表达和功能[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(3): 271-273.
 - [24] 齐亚军, 刘健, 郑力, 等. 新风胶囊治疗对强直性脊柱炎患者 BTLA⁺T 细胞数量和氧化应激的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(10): 1084-1089.
 - [25] 王京旭, 魏平, 王俊祥, 等. 类风湿关节炎患者外周血 CD23⁺/CD19⁺ 细胞表达状况的研究[J]. *临床荟萃*, 2009, 24(23): 2031-2033.
 - [26] 庄建良, 黄荣金, 潘群雄. CD24 及其免疫调节与免疫耐受诱导作用[J]. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4(6): 541-544.
 - [27] Yazici C, Köse K, Calis M, et al. Protein oxidation status in patients with ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatology*, 2004, 43(10): 1235-1239.
 - [28] 刘磊, 刘健, 冯云霞, 等. 强直性脊柱炎患者血清超氧化物歧化酶的变化及相关因素分析[J]. *中国临床保健杂志*, 2012, 15(5): 478-481.
 - [29] 贺牡丹, 王小平, 陈同生. 白介素-1 β 诱导关节软骨细胞凋亡的分子机理[J]. *中国细胞生物学报*, 2011, 33(1): 49-54.
 - [30] 赵嘉英, 赵阴环. 强直性脊柱炎患者血浆 IL-1 β 水平变化[J]. *山东医药*, 2011, 51(2): 85.
 - [31] 齐亚军, 刘健. 强直性脊柱炎患者外周血辅助性 T 细胞亚群变化及药物干预[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2013, 7(3): 260-263.
 - [32] 龙欣. 强直性脊柱炎与血清 T 细胞因子的相关性研究[J]. *现代预防医学*, 2013, 40(1): 173-174.
 - [33] 刘秀婵, 王俊祥, 魏平. 强直性脊柱炎患者 Th 淋巴细胞功能的研究[J]. *天津医药*, 2010, 38(12): 1047-1049.
 - [34] 汪四海, 刘健, 张金山, 等. 中医健脾单元疗法治疗强直性脊柱炎临床观察[J]. *中医药临床杂志*, 2011, 23(5): 401-404.
 - [35] 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.
 - [36] 胡爱心, 陈廖斌, 汪晖, 等. 黄芪多糖对大鼠骨关节炎的影响[J]. *武汉大学学报*, 2008, 29(2): 157-161.
 - [37] 蒋艳荣, 张振海, 丁冬梅, 等. 玉米多孔淀粉的制备及其粉末化苡苡仁油的研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(14): 2287-2291.
 - [38] 万毅刚, 孙伟, 陈晓艳, 等. 雷公藤多苷对抗 Thy1.1 抗体肾炎肾小球内炎症细胞浸润的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(1): 72.
 - [39] 宋芹, 芦济洲, 李健, 等. 雷公藤多苷对白塞病患者血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素-2、肿瘤坏死因子- α 及干扰素- γ 的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(6): 598-600.
 - [40] 赵志国, 李军云, 蒋晔, 等. 蜈蚣酸性蛋白对急性心力衰竭大鼠心功能的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(2): 106-109.

(收稿: 2013-12-18 修回: 2014-06-12)