

三黄一龙汤联合 MTX 对类风湿关节炎湿热痹阻型患者血清白细胞介素-1、6、17 表达的影响

刘德芳¹ 罗 勇¹ 晏 姣¹ 邹 薇¹ 郭明阳¹ 呼永河¹
杨 敏¹ 张 俊¹ 贡明东¹ 李 昆² 杨 梅¹ 李 华³

摘要 目的 通过检测类风湿关节炎(RA)湿热痹阻型患者治疗前后血清中白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-17 的表达水平,探索苦寒燥湿法配方三黄一龙汤联合甲氨蝶呤(MTX)对 RA 细胞因子 IL-1、IL-6、IL-17 表达的影响。**方法** 选择 2011 年 1 月—2013 年 1 月成都军区总医院中西医结合风湿科住院的 RA 湿热痹阻型患者 90 例作为研究对象,采用 SPSS 11.5 统计软件产生的随机数字表分为治疗组 45 例,对照组 45 例,治疗组用重剂苦寒燥湿药配方三黄一龙汤联合 MTX 治疗,对照组用 MTX 治疗。采用 ELISA 法检测治疗前、治疗 2 周、治疗 4 周时血清中 IL-1、IL-6、IL-17 的表达水平,并检测治疗前后的 ESR、CRP 及 DAS28 评定。**结果** 治疗 2、4 周时,治疗组较对照组 ESR、CRP、DAS28 明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);治疗 4 周时,治疗组 IL-1、IL-6、IL-17、ESR、CRP、DAS28 较治疗前及对照组同期均明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 三黄一龙汤联合 MTX 在 2 周内改善炎症指标,4 周内抑制细胞因子 IL-1、IL-6、IL-17 表达的作用。

关键词 类风湿关节炎;湿热痹阻;苦寒燥湿;细胞因子

Effect of Sanhuang Yilong Decoction Combined MTX on the Expression of Serum IL-1, IL-6, and IL-17 in Rheumatoid Arthritis Patients of Accumulated Dampness-heat Syndrome LIU De-fang¹, LUO Yong¹, YAN Jiao¹, ZOU Wei¹, GUO Ming-yang¹, HU Yong-he¹, YANG Min¹, ZHANG Jun¹, YUN Ming-dong¹, LI Kun², YANG Mei¹, and LI Hua³ 1 Department of Integrative Medicine on Rheumatoid Disease, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu (610083), China; 2 Department of Central Laboratory, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu (610083), China; 3 Department of Oncology, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu (610083), China

ABSTRACT Objective To study the effect of bitter-cold herbs easing dampness method (BCHEDM) plus Sanhuang Yilong Decoction (SYD) combined with methotrexate (MTX) on expression levels of interleukin-1 (IL-1), IL-6, and IL-17 in rheumatoid arthritis (RA) patients of accumulated dampness-heat syndrome (ADHS). **Methods** From January 2011 to January 2013 recruited were 90 RA inpatients of ADHS at Department of Integrative Medicine on Rheumatoid Disease, General Hospital of Chengdu Military Region. They were assigned to the treatment group (45 cases) and the control group (45 cases) according to the random digit table produced by SPSS 11.5 Software. Patients in the treatment group were treated by heavy bitter-cold herbs plus SYD combined with MTX, while those in the control group were treated by MTX alone. Expressional levels of IL-1, IL-6, and IL-17 in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) before treatment, at week 2 and 4 after treatment. Erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), and disease activity

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81072455);全军医学科研“十二五”计划课题(No.BWS11J067);四川省卫生厅课题(No.120573);成都军区总医院科研基金项目(No.2013YG-B111)

作者单位:1.中国人民解放军成都军区总医院中西医结合风湿科(成都 610083);2.中国人民解放军成都军区总医院中心实验室(成都 610083);3.中国人民解放军成都军区总医院肿瘤科(成都 610083)

通讯作者:刘德芳, Tel:18683958336, E-mail:liudefang199@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.01.0033

score in 28 joints (DAS28) were detected as well. Results After two or four weeks of treatment, ESR, CRP, and DAS28 decreased more in the treatment group than in the control group with statistical difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After four weeks of treatment, IL-1, IL-6, IL-17, ESR, CRP, and DAS28 in the treatment group were all lower than before treatment and those of the control group at corresponding time points with statistical difference ($P < 0.01$). Conclusion SYD combined MTX could play roles of improving inflammatory indices within 2 weeks, and inhibiting the expression of IL-1, IL-6, and IL-17 within 4 weeks.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; accumulated dampness-heat; bitter-cold herbs easing dampness; cytokine

类风湿关节炎(RA)是一种以关节滑膜炎症为主要表现的自身免疫性疾病。目前,RA的发病机制还不是很清楚,T细胞,尤其 $CD4^+$ Th细胞在疾病调控中起着关键性作用。Th1、Th17是诱导RA发病的主要促炎性Th亚群^[1]。Th17细胞在白细胞介素(IL)-6、转化生长因子- β (TGF- β)和IL-23的诱导下,产生IL-17、IL-6、IL-21、IL-22、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等,而IL-17是其主要的效应性细胞因子^[2],在RA由急性炎症转变成慢性炎症中起着潜在作用^[1]。红细胞沉降率(ESR)、C-反应蛋白(CRP)是临床上常用的反映RA病情活动性的实验室指标,DAS28评分是评估RA病情活动的综合指标^[3]。

本研究采用重剂苦寒燥湿药配方三黄一龙汤联合甲氨蝶呤片(MTX)治疗RA,通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测RA湿热痹阻型患者治疗前后血清中细胞因子IL-1、IL-6、IL-17的表达水平及炎性活动指标ESR、CRP,结合DAS28,分析其变化及相互关系,从而探索苦寒燥湿法配方三黄一龙汤联合MTX对RA细胞因子表达的影响。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 RA诊断符合美国风湿病学会1987年的RA诊断标准^[4]或ACR/EULAR 2009年RA的诊断标准^[5]。

1.2 中医湿热痹阻证辨证标准 参照《中药新药临床研究指导原则》^[6]中RA的中医证候诊断标准属湿热痹阻证,具备以下主症3项次症2项加舌脉即可辨为此证。主症:(1)关节红、肿、热痛;(2)关节晨僵;(3)关节肿胀;(4)关节压痛;(5)关节变形。次症:(1)关节有沉重感;(2)关节局部触之灼热;(3)口渴不欲饮。舌象、脉象:(1)舌质红或暗红,苔白腻或黄、黄腻;(2)脉濡数或滑数。

2 纳入及排除标准

2.1 纳入标准 (1)符合中、西医诊断标准;(2)年龄45~65岁;(3)患者均知情同意,并签署知情同意书。

2.2 排除标准 (1)合并其他自身免疫系统疾病者;(2)伴有严重心、脑、肝、肾、血液、内分泌系统及胃肠道疾病者;(3)伴有意识障碍或精神异常者;(4)妊娠或哺乳期妇女,过敏体质者。

3 一般资料 90例均为2011年1月—2013年1月于成都军区总医院中西医结合风湿科住院治疗RA的患者,采用随机数字表法分为2组:治疗组和对照组各45例。治疗组45例中,女38例,男7例,年龄45~65岁,平均 (55.67 ± 7.59) 岁;病程0.25~40年,平均 (14.12 ± 12.21) 年。对照组45例中,女37例,男8例,年龄45~65岁,平均 (54.97 ± 7.73) 岁;病程0.25~40年,平均 (13.77 ± 10.95) 年。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 治疗方法 治疗组:给予三黄一龙汤(组成:黄芩15g 黄连15g 黄柏15g 秦艽30g 威灵仙30g 白芍30g 细辛6g 地龙10g 茯苓30g,成都军区总医院中药房自动煎药机煎煮300mL,分3次温服)联合MTX(每片2.5mg,上海信谊药厂有限公司生产,每次10~15mg,每周1次)。对照组:给予口服MTX治疗(剂量、用法、疗程同治疗组)。两组均以2周为1个疗程,连续观察2个疗程。治疗期间均可酌情给予非甾体药物,必要时换成小剂量甾体药物。

5 观察项目及检测方法 清晨空腹采集外周静脉血2~3mL,3000r/min,离心10min,吸出上层血清置于-80℃冰箱保存。检测治疗前后患者血清的IL-1、IL-6、IL-17的表达及ESR、CRP的变化,观测患者的肿痛、压痛关节数及健康状况评分,计算DAS28^[7]。

5.1 IL-1、IL-6、IL-17的测定 采用ELISA法测

定,试剂盒购自四川瑞生科技有限公司。

5.2 ESR、CRP 及 DAS28 测定 ESR 采用魏氏法检测,以 mm/h 表示;CRP 采用全自动免疫速率散射比浊法测定,以 mg/L 表示(参考值:ESR:0~15 mm/h;CRP:0~3 mg/L)。DAS28 包括人体 28 个关节的压痛计数、肿胀计数、ESR 及 CRP 的水平以及患者的自身综合评估等 4 个项目,采用 DAS28 评分软件计算。根据 DAS28,将疾病的活动性分为 4 级:缓解(<2.6),轻度活动($2.6\sim3.2$),中度活动($3.2\sim5.1$)和重度活动(>5.1)。

6 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间和组内比较均采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组患者治疗前后 IL-1、IL-6、IL-17 表达比较(表 1) 治疗 4 周时,两组 IL-1、IL-6、IL-17 较治疗前均明显降低,治疗组差异有统计学意义($P<0.01$),且低于对照组($P<0.01$)。

表 1 两组治疗前后 IL-1、IL-6、IL-17 表达水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	IL-1	IL-6	IL-17
治疗	45	治疗前	58.94 $\pm$ 17.23	20.45 $\pm$ 5.77	21.98 $\pm$ 6.65
		治疗 2 周	76.48 $\pm$ 31.25	31.47 $\pm$ 13.90	26.69 $\pm$ 7.04
		治疗 4 周	17.31 $\pm$ 5.85 ^{*△}	10.05 $\pm$ 4.36 ^{*△}	6.43 $\pm$ 4.05 ^{*△}
对照	45	治疗前	56.72 $\pm$ 18.29	20.76 $\pm$ 5.46	22.11 $\pm$ 6.52
		治疗 2 周	73.55 $\pm$ 28.36	28.07 $\pm$ 10.31	24.84 $\pm$ 7.27
		治疗 4 周	45.21 $\pm$ 9.58	18.55 $\pm$ 7.84	15.97 $\pm$ 6.33

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

2 两组治疗前后 ESR、CRP 及 DAS28 比较(表 2) 与本组治疗前比较,治疗 2、4 周时,两组均有明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),且治疗组较对照组降低更明显($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 两组治疗前后炎症指标 ESR、CRP 及 DAS 28 比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	ESR(mm/h)	CRP(mg/L)	DAS 28(分)
治疗	45	治疗前	60.65 $\pm$ 34.44	73.87 $\pm$ 60.25	6.97 $\pm$ 0.83
		治疗 2 周	33.3 $\pm$ 29.16 ^{**△}	18.24 $\pm$ 19.14 ^{**△}	3.39 $\pm$ 1.15 ^{**△}
		治疗 4 周	13.28 $\pm$ 10.64 ^{**△△}	4.45 $\pm$ 3.27 ^{**△△}	1.89 $\pm$ 0.45 ^{**△△}
对照	45	治疗前	61.12 $\pm$ 33.85	74.36 $\pm$ 59.69	7.07 $\pm$ 0.94
		治疗 2 周	40.89 $\pm$ 30.62 [*]	55.07 $\pm$ 34.19 [*]	5.26 $\pm$ 2.13 [*]
		治疗 4 周	29.63 $\pm$ 28.65 ^{**}	17.88 $\pm$ 15.16 ^{**}	2.98 $\pm$ 1.01 ^{**}

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

讨 论

RA 是以小关节肿痛、晨僵等为主要表现的一种系统性炎症性自身免疫性疾病。属中医学“痹证”、“历节风”等范畴,中医辨证多为湿热痹阻证。湿热病邪为阴阳合邪,湿热相合,蕴郁胶结,难以速化,形成关节组织慢性炎症。蒋连泓等^[8]研究了 316 例活动期 RA 患者,发现湿热阻络型与寒热错杂型患者 ESR 明显增速,而且以中高度活动为主;湿热阻络型与寒热错杂型患者 CRP 阳性率最高。王志中等^[9]研究 322 例 RA 患者,发现湿热痹阻型多见于 RA 疾病高活动性,寒湿痹阻型多见于 RA 疾病中低活动性,指出 DAS28、ESR、CRP、PLT、WBC、球蛋白(GLB)及白蛋白(ALB)指标可作为湿热痹阻型与寒湿痹阻型类风湿关节炎的客观化分型参考指标。

现代资料表明,Th1、Th17 是诱导 RA 发病的主要促炎性辅助性 T 细胞亚群^[1]。很多证据证实 Th17 可能与 RA 的发病有关^[10]。Th17 细胞在 IL-23 诱导下,可产生 IL-17、IL-6 和 IL-22 等效应性细胞因子,在清除胞外菌、原虫和真菌等病原体感染^[11-13],以及自身炎症性炎症中发挥重要作用^[14-17]。IL-17 是 Th17 细胞产生的主要效应因子^[18,19],可激活巨噬细胞、树突状细胞,产生 IL-1、TNF- α 、IL-6 和 CRP,导致炎症反应。IL-6 是一种促炎症细胞因子,刺激 B 细胞产生多种炎症介质,参与免疫调节。在 RA 的致病作用中,IL-6 是增加 IL-1 β 和 TNF- α 的某些生物效应的放大因子,并能诱导肝脏合成急性期蛋白和类风湿因子^[20]。

本研究结果显示,RA 湿热痹阻证患者经三黄一龙汤联合 MTX 治疗 4 周时,治疗组 IL-1、IL-6、IL-17 的表达明显下降,炎症指标 ESR、CRP 及 DAS28 亦明显降低。三黄一龙汤以黄芩、黄连和黄柏苦寒燥湿为主,黄连擅泻中焦湿火,清少阳邪热,黄芩擅泻上焦湿火,黄柏擅泻下焦湿火;配伍地龙清热利水,通经活络。现代医学研究,三黄一龙汤中的黄芩提取物黄芩素(BAI)能通过抑制转录因子 NF- κ B 的活化和 I κ B α 的磷酸化以及肥大细胞的降解而抑制炎症细胞因子的产生^[21]。黄柏、黄连共有的提取物小檗碱(Ber)治疗胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠,可抑制细胞因子 IFN- γ 、IL-17、IL-2 和 IL-10 的分泌,改善关节炎,抑制特异性免疫反应,并选择性诱导脾和淋巴结中树突状细胞的凋亡^[22];小檗碱在人 THP-1 巨噬细胞中,可通过抑制 NF- κ B 的活化而抑制 MMP-9 和 EMMPRIN 的表达^[23]。地龙提取物对组织胺诱导的小鼠后爪炎症肿胀和松脂所致的炎性肉芽肿都有明显抑制作用^[24]。MTX 治疗 RA 的疗效已得

到了广大风湿病学者的认同,通过抑制二氢叶酸还原酶,使嘌呤合成受到抑制,从而抑制胸腺嘧啶合成,减少中性细胞的趋化作用,抑制炎症细胞因子的释放,从而减轻症状,并改善骨质破坏。

参 考 文 献

- [1] Ferraccioli G, Gremese E. Pathogenetic, clinical and pharmaco-economic assessment in rheumatoid arthritis (RA) [J]. Intern Emerg Med, 2011, 6(Suppl 1): 11–15.
- [2] Annunziato F, Cosmi L, Santarlaschi V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells [J]. J Exp Med, 2007, 204(8): 1849–1861.
- [3] van der Heijde DM, van't Hof M, van Riel PL, et al. Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists [J]. J Rheumatol, 1993, 20(3): 579–581.
- [4] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1988, 31(3): 315–324.
- [5] Daniel A, Tuhina N, Alan JS, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria [J]. Arthritis Rheum, 2010, 69(9): 2569–2581.
- [6] 国家食品药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则(试行) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 115–119.
- [7] Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(1): 44–48.
- [8] 蒋连泓, 胡晓蕙, 赵亚莉. 316 例活动期类风湿关节炎患者辨证规律分析 [J]. 中医药通报, 2002, 1(4): 22–26.
- [9] 王志中, 方勇飞, 罗彦, 等. 322 例湿热痹阻型及寒湿痹阻型类风湿关节炎中医证型的客观化研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 466–470.
- [10] Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, et al. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis T lymphocytes [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(1): 202.
- [11] Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells [J]. Nat Immunol, 2007, 8(6): 639–646.
- [12] Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae* [J]. J Exp Med, 2005, 202(6): 761–769.
- [13] Leibund Gut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, et al. Syk and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17 [J]. Nat Immunol, 2007, 8(6): 630–638.
- [14] Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, et al. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology [J]. Immunity, 2006, 25(2): 309–331.
- [15] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation [J]. J Exp Med, 2005, 201(2): 233–240.
- [16] Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1317–1326.
- [17] Rudner XL, Happel KI, Young EA, et al. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection [J]. Infect Immun, 2007, 75(6): 3055–3061.
- [18] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells [J]. Mechanism Dis, 2009, 361(9): 888–898.
- [19] Hue S, Ajern P, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation [J]. J Exp Med, 2006, 203(11): 2473–2483.
- [20] Madhok R, Crilly A, Watson J, et al. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity [J]. Ann Rheum Dis, 1993, 52(3): 232–234.
- [21] Hsieh CJ, Hall K, Ha T, et al. Baicalein inhibits IL-1 β and TNF- α induced inflammatory cytokine production from human mast cells via regulation of the NF- κ B pathway [J]. Clin Mol Allergy, 2007, 5(1): 5.
- [22] Hu Z, Jiao Q, Ding J, et al. Berberine induces dendritic cell apoptosis and has therapeutic potential for rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(4): 949–959.
- [23] Huang Z, Meng S, Wang L, et al. Suppression of oxLDL-induced MMP-9 and EMMPRIN expression by berberine via inhibition of NF-kappaB activation in human THP-1 macrophages [J]. Anat Rec (Hoboken), 2012, 295(1): 78–86.
- [24] Balamurugan M, Parthasarathi K, Cooper EL, et al. Anti-inflammatory and anti-pyretic activities of earthworm extract *Lampitoma auritii* (Kinberg) [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(2): 330–332.

(收稿: 2014-04-13 修回: 2014-09-15)