

新风胶囊对强直性脊柱炎患者疗效及血清免疫球蛋白亚型、外周血淋巴细胞自噬的影响

叶文芳^{1△} 刘 健² 万 磊² 曹云祥² 汪四海² 王亚黎¹ 阮丽萍¹

摘要 目的 观察新风胶囊(XFC)对强直性脊柱炎(AS)患者的症状体征、血清免疫球蛋白、外周血淋巴细胞自噬蛋白、自噬基因的影响,探讨其作用机制。**方法** 将 59 例 AS 患者按随机数字表法分为 2 组,治疗组(39 例)和对照组(20 例),治疗组给予 XFC 治疗,每次 3 粒,每日 3 次;对照组给予柳氮磺胺吡啶(SASP)治疗,每次 4 片,每日 2 次。治疗 3 个月。统计 Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数(BASDAI)及 Bath 强直性脊柱炎功能指数(BASFI);采用 ELISA 法检测两组血清免疫球蛋白(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、SIgA、IgM)水平,采用 Western blot 检测两组的淋巴细胞自噬蛋白 Beclin1、LC3-II、PI3K、Akt、mTOR 水平,采用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法检查血清自噬相关基因 Atg1、Atg5、Atg12、Atg13、Atg17 表达改变。采用 Spearman 相关分析方法比较 AS 患者免疫球蛋白亚型与细胞自噬基因的相关性。**结果** 与治疗前比较,治疗组治疗后 BASDAI、IgG1、IgG3、IgA 水平下降($P < 0.01$),PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达下降($P < 0.01$),ATG1、ATG12、ATG13、ATG17 mRNA 表达下降,ATG5 mRNA 表达升高($P < 0.01$);对照组 BASDAI、IgG1、IgA 水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达下降($P < 0.05$),ATG1、ATG13 mRNA 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组比较,治疗组 BASDAI、IgG1、IgA 水平下降($P < 0.05$),PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达水平下降($P < 0.01$),ATG12、ATG17 mRNA 表达下降,ATG5 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。相关分析结果显示,AS 患者 IgG1、IgG2、IgG3、IgA、SIgA、IgM 与 ATG17 呈负相关,IgG4 与 ATG17 呈正相关($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** XFC 提高 AS 患者临床疗效,其增强 AS 患者细胞自噬的机制可能为作用于 PI3K/Akt/mTOR 信号,影响自噬基因和自噬蛋白的表达,参与调节 B 淋巴细胞的增殖和分化,加强体液免疫。

关键词 强直性脊柱炎;免疫球蛋白;自噬蛋白;自噬基因;自噬通路;新风胶囊

Effect of Xinfeng Capsule on AS Patients and Their Serum Immunoglobulin Subtypes and Peripheral Lymphocyte Autophagy YE Wen-fang¹, LIU Jian², WAN Lei², CAO Yun-xiang², WANG Si-hai², WANG Ya-li¹, and RUAN Li-ping¹ 1 Faculty of Graduates, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230038); 2 Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230038)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Xinfeng Capsule (XFC) on ankylosing spondylitis (AS) patients' symptoms and signs, serum immunoglobulin levels, peripheral blood lymphocyte autophagy protein, autophagy gene, and to explore its mechanism. **Methods** Totally 59 AS patients were assigned to the treatment group (39 cases) and the control group (20 cases) according to random digit table. Patients in the treatment group received XFC, 0.5 g each pill, three pills each time, 3 times per day, while those in the control group received sulfasalazine (SASP), 0.25 g per tablet, 4 tablets each time, twice per day. Three months consisted of one therapeutic course. Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) were statistically calculated. Serum

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173211);国家中医药重点学科中医痹病学建设项目(No. 国中医药发[2009]30 号);安徽省科技厅科研计划(No. 09-020304046)

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 230038)

通信作者:刘 健, Tel: 13955109537, E-mail: liujianahzy@126.com

△现任于安徽人口职业学院(安徽 247099)

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 03. 0310

immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, SIgA, and IgM) were detected using ELISA. Changes of Beclin1, LC3-II, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt, the mammalian target of rapamycin (mTOR) were detected using Western blot. Serum autophagy related genes such as Atg1, Atg5, Atg12, Atg13, and Atg17 were detected using the polymerase chain reaction (PCR). The correlation between immunoglobulin subtypes and autophagy gene in AS patients using Spearman correlation. Results Compared with before treatment, BASDAI, IgG1, IgG3, and IgA decreased ($P < 0.01$); PI3K, Akt, and mTOR protein expressions decreased ($P < 0.01$); ATG1, ATG12, ATG13, and ATG17 mRNA expressions decreased, ATG5 mRNA expression increased ($P < 0.01$) in the treatment group. But BASDAI, IgG1, and IgA levels decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); PI3K, Akt, and mTOR protein expressions decreased ($P < 0.05$); ATG1 and ATG13 mRNA expressions decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the control group. Compared with the control group, BASDAI, IgG1, and IgA levels decreased ($P < 0.05$); PI3K, Akt, mTOR protein expressions decreased ($P < 0.01$); ATG12 and ATG17 mRNA expression decreased, ATG5 mRNA expression increased ($P < 0.01$) in the XFC group. Correlation analysis showed AS patients' IgG1, IgG2, IgG3, IgA, SIgA, IgM had negative correlation with ATG17; IgG4 and ATG17 were positively correlated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion XFC could elevate clinical efficacy of AS patients and enhance their autophagy, which might be achieved by acting on PI3K/Akt/mTOR signal, affecting autophagy gene and autophagy protein expression, taking part in the regulation of proliferation and differentiation of lymphocyte B, and strengthen humoral immunity.

KEYWORDS ankylosing spondylitis; immunoglobulin; autophagy protein; autophagy gene; autophagy pathway; Xinfeng Capsule

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是以骶髂关节和脊柱关节慢性、进行性炎性病变为主的自身免疫性疾病, 骶髂关节受累和附着点炎为其特点。AS 多发于青壮年男性, 其患病率较高, 国内报道约为 0.3%^[1]。研究表明 AS 患者多项免疫学指标异常^[2]。自噬作用引起自身免疫耐受可防止自身免疫性疾病的发生, 自噬功能异常与免疫疾病的发生有关^[3]。自噬通路如何限制病原体入侵、活化免疫系统、提呈抗原给 T 细胞以及维持 T 细胞和 B 细胞的功能, 自噬能够维持机体对自身组织的免疫耐受^[4]。以自噬作为靶点治疗免疫相关疾病已经成为目前研究的热点。既往研究发现, 新风胶囊 (XFC) 具有调节细胞免疫反应, 减轻关节局部炎性反应, 加之改善微循环, 促进局部供血, 促进单核巨噬细胞系统的功能, 增强细胞免疫及体液免疫功能; 维持细胞因子免疫平衡; 改善 AS 患者临床症状、降低急性时相反应物水平, 缓解患者病情, 提高生活质量^[5]。AS 作为一种常见的自身免疫性疾病, 其与细胞自噬的研究目前尚少。本文通过检测 39 例治疗组和 20 例对照组患者的血清免疫球蛋白亚型、外周血淋巴细胞自噬蛋白、自噬基因、自噬通路, 对患者 Bath 强直性脊柱炎疾病活动指数 (BASDAI)、Bath 强直性脊柱炎功能指数 (BASFI) 进行视觉模拟评分 (Visual Analogue Scale/Score, VAS) 评分, 并对各项指标进行分析, 以便为临床提供指导意义。

资料与方法

1 诊断标准 采用 1984 年美国风湿病协会修订的强直性脊柱炎或 2009 年中轴性脊柱关节病的诊断标准^[6,7]。

2 纳入标准 (1) 符合以上 AS 的西医诊断标准; (2) 年龄 18 ~ 60 岁; (3) 自愿参加本次研究, 并签署书面知情同意书; (4) 曾使用非甾体类抗炎药, 须停药 2 周后方可入组; 曾使用柳氮磺胺吡啶 (Sulfa-salazine, SASP)、来氟米特, 须停药 1 个月后方可入组。

3 排除标准 (1) 妊娠期、哺乳期女性患者; (2) 疾病晚期脊柱强直, 严重关节畸形患者; (3) 合并急性眼炎需用肾上腺皮质激素治疗者; (4) 合并有严重的心脑血管、肝、肾等原发性疾病者。 (5) 研究者认为不宜参与该项研究的受试者。

4 试剂 IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、SIgA、IgM 试剂盒及其配套试剂购自南京建成分装进口公司, 生产批号依次为 E-10142、E-10140、E-10139、E-10155、E-13085、E-13086、E-13087、E-13087、E-11511、E-11457、E-11513; Beclin1、LC3-II、PI3K、AKT、mTOR 试剂购自美国 Bioworld 公司, 生产批号依次为 ab62472、Sc-271625、bs-3006、bs-1810、bs-3611; Atg1、Atg5、Atg12、Atg13、Atg17 及合成引物购自美国 Invitrogen 公司。

5 仪器 自动制冰机 (意大利 SCOTSMAN),

EPS 300 型电泳仪、VE-180 型电泳槽、VE-186 型转膜仪(上海天能科技有限公司), LX 300 型微量离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 微孔板迷你离心机(杭州奥盛仪器有限公司, 型号: MINI-P25), 低速迷你离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, LX 300 型), 高速台式冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司, JW-3021HR), TS-1000 水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 垂直板电泳槽(上海天能科技有限公司), 纯水机(美国 SIM 公司), 电热恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司), 万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司), 微量移液器(德国 Eppendorf), 紫外凝胶成像系统(北京科创锐新生物科技有限公司), 显影液(扬州贾桥照相用品厂), 定影液(天津市汉中摄影材料厂), 普通 PCR 仪(杭州晶格科学仪器有限公司, 型号: K960), 荧光定量 PCR 仪(Thermo, PIKOREAL 96)。

6 一般资料 59 例为 2013 年 10 月—2014 年 3 月于安徽中医药大学第一附属医院风湿免疫科住院的 AS 患者, 按随机数字表法分为治疗组(39 例)和对照组(20 例)。治疗组 AS 患者 39 例, 其中男性 31 例(79.5%), 女性 8 例(20.5%), 男:女为 3.9:1, 年龄 15~65 岁, 平均(33.15 ± 11.24)岁, 病程 1 个月~40 年, 平均(6.51 ± 6.86)年。对照组 AS 患者 20 例, 其中男性 12 例(60%), 女性 8 例(40%), 男:女为 4.2:1, 年龄 18~65 岁, 平均(31.24 ± 10.56)岁, 病程 1 个月~35 年, 平均(6.23 ± 6.10)年。两组在年龄、性别、病程及病情等方面比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

7 治疗方法 两组患者在治疗前至少 1 月停用其他改变病情抗风湿药, 非甾体类消炎药和其他对症治疗的药物维持不变。治疗组给予 XFC 治疗, XFC 由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心生产, 批号: 201405291, 规格: 0.5 g/粒, 组方: 黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤, 每粒胶囊含生药浸出物 0.5 g。服用方法: 口服, 每次 3 粒, 每日 3 次, 连服 3 个月。(图 1 为 XFC HPTLC 指纹图谱)。对照组给予 SASP, SASP 由上海三维制药有限公司生产, 批号: 201404C20, 规格: 0.25 g/片, 服用方法: 口服, 每次 4 片, 每日 2 次, 服用天数、疗程均与治疗组相同。2 组均于治疗后评价疗效。

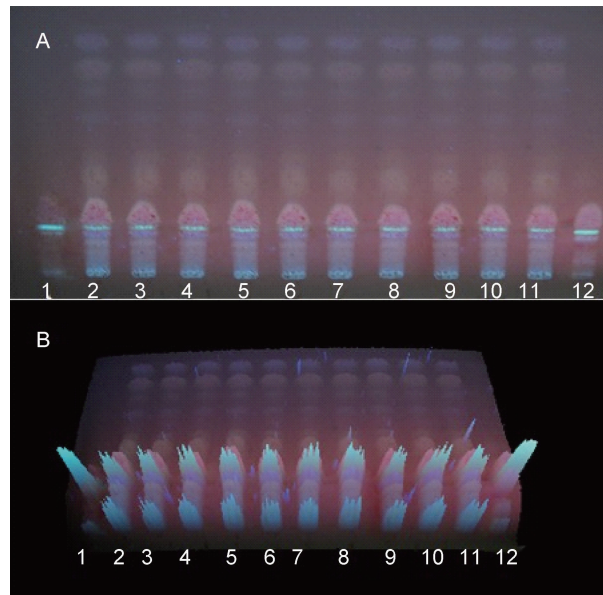
8 标本采集 两组患者治疗前后均于清晨空腹时静脉采血 10 mL, 室温下静置 2 h 后, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离出血清, 后置于 -20°C 冰箱至使用。

9 观察指标及方法

9.1 AS 患者的调查问卷量表^[6]

9.1.1 BASDAI 检测

由与 AS 相关的 5 个症



注: 1、12 为薏苡仁对照药材; 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 为供试品溶液; A 为 XFC HPTLC 指纹图谱; B 为 XFC HPTLC 指纹图谱三维图

图 1 XFC HPTLC 指纹图谱及三维图

状(疲乏、脊柱痛、关节肿痛、局部触痛、晨僵及其时间)的 6 个问题组成, 采用 VAS 评分法测定患者对每个问题的得分, 最后换算的标准分范围为 0~10 分, 0 分表示最好, 10 分表示最差。标准分 ≤ 4 分为疾病缓解, 标准分 > 4 分为疾病活动。

9.1.2 BASFI 检测 要求患者将目前能完成的穿袜子或贴身衣服、弯腰拾物、从较高处取物、从没有扶手的椅子上及仰躺着的地板上站起来、站立 10 min、登上 12~15 级台阶、向后看、完成体力活动及一整天的家务和工作等共 10 项时的难易程度在 VAS 标尺上标出, 0 分表示最好, 10 分表示最差。

9.2 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、SIgA、IgM 水平测定 指标检测均采用 ELISA 试剂盒进行检测, 严格按照说明书进行操作。用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

9.3 PI3K、AKT、mTOR、Beclin1、LC3-II 蛋白水平检测 采用 Western blot 法。治疗前后两组患者均于晨起后采 10 mL 全血, 置于 2 个抗凝管中, 加入等量的淋巴细胞分离液于离心管中, 沿着管壁缓慢加入血标本; 放置于水平梯度离心机中离心(2 000 r/min)处理后, 可见分为 4 层, 其中云雾状层, 为单个核细胞层; 吸取该层置试管中, 加入等量的 PBS 冲洗 2 次(1 500 r/min), 贮存于 EF 管内, 放置于 -80°C 的冰箱中保存, 以用于

Western blot 观察。整个采集过程不得超过 2 h。

Western blot 方法:淋巴细胞称重重量 100 mg 左右,加入 RIPA 细胞裂解液 1 mL(内含 1 mmol/L PMSF)进行裂解。12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液,即含有组织总蛋白。使用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒。在收集的蛋白样品中加入等量的 2 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。沸水浴加热 10 min,以充分变性蛋白。待样品冷却到室温后,把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内即可。每孔加 15 μL。浓缩胶所用电压为 80 V,时间为 30 min;分离胶所用电压为 120 V,时间为 1 h。将预先裁好与胶条同样大小的滤纸和 PVDF 膜(预先在甲醇中浸泡 3 min),浸入转膜缓冲液中 5 min。转膜装置从下至上依次按阳极板、3 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层滤纸、阴极板的顺序放好,滤纸、凝胶、PVDF 膜精确对齐,每一步都要去除气泡。接通电源,恒流转膜。转膜完毕后,立即把蛋白膜放置到预先准备好的 Western 洗涤液中,漂洗 5 min,以洗去膜上的转膜液。加入 Western 封闭液(5%脱脂奶粉),在摇床上缓慢摇动,室温封闭 2 h。Beclin1、AKT、PI3K、LC3-2,抗体属性为兔抗 1:800 稀释,10%的分离胶分离;mTOR、TOR 抗体属性为兔抗 1:600 稀释,10%的分离胶分离。4 ℃ 缓慢摇动孵育过夜。加入洗涤液(TBST),每次洗涤 10 min,共洗涤 3 次。按照 1:10 000 比例用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗。室温封闭 2 h 时。加入洗涤液(TBST),每次洗涤 10 min,共洗涤 3 次。参考相关说明书,使用 ECL 发光试剂盒来检测蛋白(批号:NL178395,生产厂家:Thermo)。

9.4 ATG1、ATG5、ATG12、ATG13、ATG17 mRNA 检测 采用荧光定量实验方法检测。淋巴细胞的采取方法同上。保存在 RNAlater 中的细胞离心,弃上清,加入 1 mL TRIzol,充分裂解;加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min。4 ℃ 10 000 g 离心 15 min,取上清(约 500 μL)加入到另一 EP 管中。加入 0.5 mL 异丙醇,温和混匀,室温放置 10 min。然后 4 ℃ 12 000 ×g 离心 10 min,弃去上清。加入 1 mL 75%乙醇(DEPC 水配制)。4 ℃ 12 000 ×g 离心 5 min,弃上清。室温放置 30 min 干燥 RNA 沉淀。加入 25 μL DEPC 水,55 ℃ 促溶 10 min,-80 ℃ 保存备用。在 0.2 mL EP 管中,加入总 RNA(质量为 3 μg)、10 μmol/L Oligo(dT)1 μL、DEPC 水补足至 12 μL,轻轻混匀、点动离心。PCR 仪上 65 ℃ 加热 5 min,立即冰浴 3 min。在上述 EP 管中加入 5 × Reaction Buffer 4.0 μL、10 mmol/L

dNTP Mix 2 μL、Ribolock™ RNase inhibitor 1 μL、RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μL。42 ℃ 60 min,70 ℃ 5 min。取出上述反应液,即为 cDNA,-80 ℃ 保存备用。取出上述反应液 1 μL 作为荧光定量的模板,反应体系如下:2 × SYBR Green Mixture 5 μL,Forward primer,10 μmol/L 1 μL,Reverse primer,10 μmol/L 1 μL,Template cDNA 1 μL,Rnase Free water 2 μL,反应总体积为 10 μL。反应条件如下:95 ℃ 5 min(步骤一),95 ℃ 10 s(步骤二),60 ℃ 30 s(步骤三),步骤二和三 40 个循环。各检测指标引物见表 1。计算得出相对表达量。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列	引物长度(bp)
ATG1	上游 5'-CACACGCCACATAACAGACAAA-3'	145
	下游 5'-CCACAAGGTGAGAATAAGCCA-3'	
ATG5	上游 5'-GGCCATCAATCGGAAACTCAT-3'	125
	下游 5'-CAGCCACAGGACGAAACAGC-3'	
ATG12	上游 5'-TAATTGCGTCCCCCTACTCCG-3'	181
	下游 5'-GGACCTTCTATCGGGAGTTTCAG-3'	
ATG13	上游 5'-TTCTCATGCACAGCCAGCTTCT-3'	121
	下游 5'-TGCAGATCGAAGAGTGTGTACCTAC-3'	
ATG17	上游 5'-TGCAGATCGAAGAGTGTGTACCTAC-3'	198
	下游 5'-TGTGTCCTTGAAGCAACAGTATG-3'	
β-actin	上游 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'	185
	下游 5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTAAGG-3'	

9.5 相关性关系 对 AS 患者免疫球蛋白亚型(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、SIgA 及 IgM)与细胞自噬基因(ATG1、ATG5、ATG12、ATG13 及 ATG17)进行相关性分析。

10 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件包对数据进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内两两比较采用配对样本 *t* 检验,相关性分析采用 *Spearman* 相关分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组 BASDAI、BASFI 结果比较(表 2) 与

表 2 两组 BASDAI、BASFI 结果比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	BASDAI	BASFI
治疗	39	治疗前	4.400 ± 2.026	3.100 ± 1.250
		治疗后	2.235 ± 1.152 * Δ	2.515 ± 0.764
对照	20	治疗前	4.259 ± 2.328	3.738 ± 2.670
		治疗后	2.637 ± 1.549 *	2.950 ± 1.644

注:与本组治疗前比较,**P* < 0.01;与对照组治疗后比较,Δ*P* < 0.01

本组治疗前比较,治疗组及对照组治疗后 BASDAI 明显减低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与对照组比较,治疗组 BASDAI 明显减低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。两组 BASFI 治疗前后比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 两组免疫球蛋白水平结果比较(表 3) 与本组治疗前比较,治疗后治疗组 IgG1、IgG3、IgA 水平明显下降($P < 0.01$),对照组 IgG1、IgA 水平下降($P < 0.05$);与对照组比较,治疗组 IgG1、IgA 水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 两组细胞自噬蛋白表达水平比较(表 4) 与本组治疗前比较,治疗组及对照组 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与对照组比较,

治疗组治疗后 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达水平下降($P < 0.01$)。

4 两组细胞自噬基因表达水平比较(表 5) 与本组治疗前比较,治疗组 ATG1、ATG12、ATG13、ATG17 mRNA 表达下降,ATG5 mRNA 表达升高($P < 0.01$),对照组 ATG1、ATG13 mRNA 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与对照组比较,治疗组治疗后 ATG12、ATG17 mRNA 表达下降,ATG5 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。

5 AS 患者免疫球蛋白亚型与细胞自噬基因指标的相关性分析(表 6) 相关分析结果显示,AS 患者 IgG1、IgG2、IgG3、IgA、SIgA、IgM 与 ATG17 呈负相关,IgG4 与 ATG17 呈正相关($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 两组免疫球蛋白水平结果比较 ($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	SIgA	IgM
治疗	39	治疗前	64.082 ± 13.951	20.778 ± 12.951	12.496 ± 11.687	34.659 ± 13.259	14.090 ± 11.320	33.135 ± 15.868	16.336 ± 12.981
		治疗后	31.183 ± 15.395 ** Δ	19.890 ± 9.168	5.095 ± 4.210 **	22.786 ± 12.787	8.303 ± 4.600 ** Δ	29.633 ± 17.271	13.843 ± 6.406
对照	20	治疗前	57.082 ± 8.951	15.458 ± 10.989	10.473 ± 7.741	37.659 ± 8.009	13.135 ± 10.868	34.651 ± 10.756	16.783 ± 10.911
		治疗后	36.763 ± 6.357 *	13.890 ± 9.110	7.769 ± 5.639	24.548 ± 10.721	12.633 ± 9.271 *	27.291 ± 14.562	14.563 ± 4.210

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.05$

表 4 两组细胞自噬蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Beclin1	LC3- II	PI3K	AKT	mTOR
治疗	39	治疗前	0.212 ± 0.058	0.166 ± 0.055	0.678 ± 0.112	0.936 ± 0.129	1.051 ± 0.195
		治疗后	0.439 ± 0.045	0.613 ± 0.154	0.137 ± 0.040 ** Δ	0.184 ± 0.041 ** Δ	0.320 ± 0.143 ** Δ
对照	20	治疗前	0.346 ± 0.063	0.190 ± 0.054	0.534 ± 0.153	1.206 ± 0.257	0.884 ± 0.167
		治疗后	0.362 ± 0.085	0.638 ± 0.110	0.370 ± 0.074 *	0.674 ± 0.091 *	0.667 ± 0.162 *

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.01$

表 5 两组细胞自噬相关基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	ATG1	ATG5	ATG12	ATG13	ATG17
治疗	39	治疗前	1.770 ± 0.322	0.473 ± 0.089	1.928 ± 0.285	2.138 ± 0.383	1.754 ± 0.349
		治疗后	1.004 ± 0.965 **	1.004 ± 0.106 ** Δ	1.004 ± 0.106 ** Δ	1.008 ± 0.126 **	1.007 ± 0.105 ** Δ
对照	20	治疗前	1.920 ± 0.240	0.523 ± 0.976	1.735 ± 0.361	2.009 ± 0.450	1.866 ± 0.271
		治疗后	1.251 ± 0.835 **	0.638 ± 0.115	1.478 ± 0.373	1.472 ± 0.254 *	1.437 ± 0.309

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.01$

表 6 AS 患者免疫球蛋白与细胞自噬基因指标的相关性分析

指标	自噬基因				
	ATG1	ATG5	ATG12	ATG13	ATG17
IgG1($\mu\text{g/mL}$)	-0.126	0.186	-0.123	0.259	-0.708 *
IgG2($\mu\text{g/mL}$)	-0.200	0.137	-0.140	0.284	-0.788 **
IgG3($\mu\text{g/mL}$)	-0.210	0.112	-0.189	0.385	-0.783 **
IgG4($\mu\text{g/mL}$)	-0.154	0.168	-0.140	0.322	0.783 **
IgA($\mu\text{g/mL}$)	-0.231	0.095	-0.210	0.329	-0.776 **
SIgA($\mu\text{g/mL}$)	-0.133	0.098	-0.119	0.315	-0.629 **
IgM($\mu\text{g/mL}$)	-0.056	0.210	-0.063	0.224	-0.720 **

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

AS 是一种全身性自身免疫疾病,主要侵犯人体的中轴关节,并以长期慢性炎症为特点。AS 患者存在多种抗体和细胞免疫改变,免疫球蛋白为现代临床上为 AS 的诊断和治疗提供了重要依据^[8]。自噬是细胞的自我消化过程,在细胞发育、分化、存活和内环境稳定中起关键作用。自噬作用引起自身免疫耐受可防止自身免疫疾病的发生,自噬功能的异常与免疫疾病的发生相关,AS 患者体内存在细胞自噬。PI3K/Akt/mTOR 信号通路在淋巴细胞增殖和存活中起到重要作用^[9]。同时,PI3K/Akt/mTOR 信号通路在细胞自噬中发挥关键的调节作用^[10]。

免疫球蛋白是 B 淋巴细胞受抗原刺激后增殖、分化为浆细胞而产生的,可分为 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD 五类,都是人体血液、组织液及部分外分泌液的重要组成部分^[11],免疫球蛋白的免疫作用是机体与疾病斗争的骨干力量,免疫球蛋白水平的高低直接反映体内的病理反应及疾病的发展情况。目前临床一般检测 IgG、IgM 和 IgA。AS 患者在活动期,血清中 IgG、IgM,尤其是 IgA 水平经常增高^[12],检测免疫球蛋白水平可为 AS 的临床治疗和早期诊断提供更好的依据。自噬是细胞维持平衡的重要机制,自噬的异常与各种疾病相关。在风湿性疾病的破骨细胞、滑膜成纤维细胞、淋巴细胞中都存在自噬基因及蛋白表达的异常^[13-15]。PI3K/Akt/mTOR 是广泛存在于多种细胞内的一条重要信号通路,参与体内多种生理病理过程,其活化后对细胞自噬有抑制作用,PI3K/Akt 信号是通过活化 mTOR 来参与调节 B 淋巴细胞的增殖和分化^[9]。Beclin-1 可能是自噬的“守门人”,被证明是巨自噬和微自噬的必要的基因标志,其表达增强可作为评价自噬水平升高的重要指标,调控自噬前体产生和自噬体形成^[16]。LC3 是构成自噬体双层膜所必需的蛋白,是自噬体膜上标志性蛋白质,是参与多种信号传导调节的蛋白^[17]。PI3K 是一种磷脂酰肌醇激酶,广泛存在于各种细胞胞质中,Akt 可以接受 PI3K 的信号并下传到 mTOR,mTOR 是 Akt 的下游分子,可以通过被 Akt 直接或间接磷酸化而激活,活化后的 mTOR 既能上调细胞周期主要蛋白加速细胞周期,也可通过抑制自噬的发生,调控细胞的生长^[18]。由此可见,PI3K/Akt/mTOR 信号通路的主要功能是抑制细胞凋亡、加速细胞周期和抑制细胞自噬。ATG1 是 TOR 第一个下游信号分子,是自噬体形成过程中的一个重要的正调控因子^[19]。ATG5 复合物对自噬的形成至关重要。ATG12 与

ATG5 结合体是自噬体膜上标志性蛋白质。基因突变的 ATG5 丧失与 ATG12 结合的能力,同时也导致前自噬泡的延伸障碍^[20]。ATG12 结合系统和 LC3 修饰作用下逐渐包裹自噬底物形成自噬体,与前自噬泡的形成相关^[21]。ATG13 是自噬对 mTOR 通路反应过程中的重要调节者^[22]。ATG17 突变或活性受抑制时,自噬体的生成能力降低。ATG13 迅速去磷酸化,通过增强与 ATG1 和 ATG17 之间的相互作用,从而增强 ATG1 的活性,诱导细胞自噬的发生。另外,ATG13-ATG17 复合物的作用对 ATG1 激酶活性和自噬体的形成也非常重要,这说明 ATG13-ATG17 复合物的形成是该阶段必不可少的因素^[23]。

目前 SASP 是目前公认的对 AS 有效的西药改变病情抗风湿药^[24],而中医药以其“整体调节,扶正固本”为治疗优势,日益受到重视。近年来,刘健教授从中医理论出发并在临床和实验上加以验证,发现中医脾虚在 AS 病程中起着关键作用,提出以 XFC 为主药,益气健脾利湿通络法治疗本病^[25]。XFC 以黄芪、薏苡仁为君药,黄芪富含黄酮、多糖、苷类和多种氨基酸,能调节免疫功能,及糖代谢,改善血液循环,加速受损组织的修复;薏苡仁健脾利湿、舒筋除痹,可以缓解关节肌肉的挛缩疼痛^[25];Liu Y 等^[26]研究表明,中药薏苡仁为主要成分的 KTL 能调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的下游蛋白。雷公藤、蜈蚣为臣,雷公藤有免疫抑制作用,可抑制 AS 患者体内异常免疫反应;蜈蚣祛风止痛,攻毒散结,通过改善循环而起良好的镇痛作用;黄芪、薏苡仁可调节免疫及防止雷公藤的免疫抑制作用大而造成机体免疫功能过于低下^[25];全方不仅有效地改善患者的症状,且有整体调节作用。既往研究证实新风胶囊具有抗炎、抑制免疫、降低 ESR、CRP、RF 滴度和 IgG、IgA、IgM 浓度的作用,与本研究相符^[25]。

本研究发现:与对照组比较,XFC 能明显增强 AS 患者体液免疫和细胞自噬的情况。有研究认为:mTOR 和 PI3K 信号在 B 淋巴细胞形态,新陈代谢活性,细胞周期过程的调节中起到重要作用^[27]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与 B 淋巴细胞增殖和存活功能,促进 B 淋巴细胞的应答能力^[28,29]。所以笔者推测,AS 患者体液免疫和细胞自噬都与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关,AS 患者体液免疫增强的同时,PI3K/Akt/mTOR 信号激活,细胞自噬受到抑制。XFC 增强 AS 患者细胞自噬的机制可能为作用于 PI3K/Akt/mTOR 信号,影响自噬基因和自噬蛋白的表达,参与调节 B 淋巴细胞的增殖和分化,加强体液免疫,改善临床症状及炎性指标。

参 考 文 献

- [1] 汪四海, 刘健, 杨佳, 等. 102 例强直性脊柱炎患者中医证候回顾性研究[J]. 中医临床杂志, 2011, 23(6): 522-524.
- [2] 赵驻军, 颀玉欣, 汤慧华, 等. 强直性脊柱炎的免疫学指标评价[J]. 颈腰痛杂志, 1998, 19(4): 283-284.
- [3] Kim JE, Chen J. Cytoplasmic nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin 2 sensitive signaling and translation initiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(4): 14340-14345.
- [4] 刘健, 万磊, 黄传兵, 等. 类风湿关节炎患者肺功能变化及中药新风胶囊干预研究[J]. 中国临床保健杂志, 2014, 2, 17(1): 102-106.
- [5] Mcpherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGFbeta superfamily member[J]. Nature, 1997, 387(4): 83-90.
- [6] 陆再英主编. 内科学教材-强直性脊柱炎[M]. 第 7 版. 2008: 867-868.
- [7] 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.
- [8] 黄泽伟, 黄玉香. 800 例免疫球蛋白与补体检测结果分析[J]. 吉林医学, 2012, 33(6): 1262-1263.
- [9] 李培培. BAFFBAFF-R 介导 PI3K-Akt-mTOR 信号通路上调胶原性关节炎大鼠 B 淋巴细胞的功能及芍药苷的调节作用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [10] 王和峰. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [11] 陈惠黎. 生物大分子的结构和功能[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 1.
- [12] 刘大舟. 免疫学基础[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 225.
- [13] Bohensky J, Shapiro IM, Leshinsky S, et al. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway[J]. Autophagy, 2007, 3(3): 207-214.
- [14] Settembre C, Artea Solis E, McKee MD, et al. Proteoglycan defalcation determines the deficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification[J]. Genes Dev, 2008(19): 2645-2650.
- [15] 孟明, 梁红格, 方皓, 等. PI3K/Akt/mTOR 通路与自噬在类风湿关节炎滑膜细胞增生中的意义[J]. 医学研究与教育, 2013, 30(5): 69-74.
- [16] 叶青. 自噬的分子机制与病理生理意义[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(3): 358-362.
- [17] 李欣志. 缺血/再灌注过程中心肌细胞自噬研究进展[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 704-707.
- [18] Reedquist KA, Ludikhuize J, Tak PP. Phosphoinositide 3-kinase signaling and FoxO transcription factors in rheumatoid arthritis[J]. Biochem Soc Transactions, 2006, 34(Pt 5): 727-730.
- [19] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(8): 961-967.
- [20] Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase[J]. Aging Cell, 2006, 5(2): 187-195.
- [21] Yokoi T. Troglitazone. Handbook of experimental pharmacology[M]. London: Springer, 2011: 419-435.
- [22] 陈洪菊, 屈艺, 母得志. mTOR 信号通路的生物学功能[J]. 生命的化, 2010, 30(4): 555-560.
- [23] 钱帅伟, 漆正堂, 丁树哲. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路自噬[J]. 生命科学, 2011, 23(8): 730-734.
- [24] 王桂珍, 刘健, 曹云祥, 等. 新风胶囊联合中药熏蒸治疗强直性脊柱炎临床观察[J]. 中国临床保健杂志, 2014, 26(6): 581-583.
- [25] 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]. 中医临床杂志, 2011, 5, 23(5): 405-406.
- [26] Liu Y, Zhang W, Wang XJ. Antitumor effect of Kanglaite Injection in human pancreatic cancer xenografts[J]. BMC Complement Alternat Med, 2014, 228(14): 2-6.
- [27] Tomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(11): 324-337.
- [28] Roczynska B, Kaur S, Plataniias LC. Growth suppressive cytokines and the AKT/mTOR pathway[J]. Cytokine, 2009, 48(1-2): 138-143.
- [29] Bnath I, Roundy KM, Weis JJ, et al. Analysis of the regulatory role of BAFF in controlling the expression of CD21 and CD23[J]. Mol Immunol, 2007, 44(9): 2388-2399.

(收稿:2014-11-02 修回:2015-01-10)