

论 著

· 临床研究 ·

强脊方对强直性脊柱炎患者 Th17 细胞及
相关因子 IL-6、IL-23 影响的临床研究*李江¹ 徐斌¹ 乔治² 谭龙旺¹

(1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 西安市第五人民医院, 陕西 西安 710000)

摘要:目的 观察杨毓华教授验方强脊方治疗强直性脊柱炎疗效, 以及对 AS 患者 Th17 细胞(T helpcell 17, Th17)及相关因子 IL-6、IL-23 的影响。方法 患者分为验方中药组与柳氮磺嘧啶对照组, 分别用药治疗 2 月。对中药组和对照组所有患者治疗前后进行强直性脊柱炎疾病活动度评分, C 反应蛋白、血沉、HLA-B27 检测, 观察两组患者临床疗效。对所有病例治疗前进行抽血采样, 流式细胞术检测 Th17 细胞数量; 酶联免疫吸附法相关细胞因子 IL-6、IL-23。治疗 2 月后再次进行抽血采样, 组间进行标本对比分析。结果 治疗前后两组患者各项指标及 Th17 细胞数量均明显下降($P < 0.05$), 并且两组之间无明显差异($P > 0.05$)。结论 杨毓华教授验方强脊方可以减少 AS 患者 Th17 细胞及相关因子 IL-6、IL-23, 从而起到治疗作用, 其疗效与柳氮磺嘧啶无明显差异。

关键词:强直性脊柱炎; Th17 细胞; 中药; IL-6、IL-23

中图分类号: R289 文献标识码: A 文章编号: 2096-1340(2022)01-0088-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jstcm.2022.01.019

Clinical Study on The Effect of Qiangji Recipe
on Th17 Cells and Related Factors IL-6 and IL-23
in Patients with Ankylosing SpondylitisLI Jiang¹ XU Bin¹ QIAO Zhi² TAN Longwang¹

(1. Affiliated Hospital of Shaanxi University of traditional Chinese medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China;

2. Xi'an Fifth People's Hospital, Xi'an 710000, China)

Abstract: Objective To observe the efficacy of Professor YANG Yuhua's prescription Qiangji formula in the treatment of ankylosing spondylitis (AS) and its effect on Th17 cells and related factors IL-6 and IL-23 in patients with AS. **Methods** Patients were divided into the prescription traditional Chinese medicine group and the sulfasalazine control group, which were treated for 2 months respectively. All patients in the traditional Chinese medicine group and the control group were scored for disease activity of ankylosing spondylitis before and after treatment (ASDAS), C-reactive protein, ESR and HLA-B27 were detected to observe the clinical efficacy of the two groups. Blood samples were taken from all cases before treatment, and the number of Th17 cells was detected by flow cytometry; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) related cytokines IL-6 and IL-23. Blood samples were taken again after 2 months of treatment, and samples were

compared and analyzed between groups. **Results** All indexes and the number of Th17 cells in the two groups decreased significantly before and after treatment ($P < 0.05$), And there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Professor YANG Yuhua's prescription Qiangji recipe can reduce Th17 cells and related factors IL-6 and IL-23 in patients with AS, so as to play a therapeutic role, and its curative effect is not significantly different from that of sulfasalazine.

Key words: Ankylosing spondylitis; Th17 cells; Traditional Chinese medicine; IL-6, IL-23

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种类风湿因子阴性, 以脊柱僵硬并逐渐强直畸形为特征, 逐渐发展累及其他关节, 甚至累及眼、肺、肾脏等器官及心血管系统, 最后导致功能障碍的一种免疫性疾病。目前越来越多的研究表明^[1], Th17 细胞在 AS 发病中的作用不容忽视。Th17 细胞是近年发现的一群产生 IL-17 的辅助性 T 细胞, 通过分泌 IL-17、IL-6、IL-21、IL-22、IL-23、TNF- α 等多种细胞因子促进炎症、参与抗感染免疫、参与组织损伤和炎症性骨破坏。

杨毓华教授经 40 年临床经验总结, 所拟中药方强脊方治疗强直性脊柱炎患者, 疗效显著, 为进一步探讨分析方药疗效机理, 设计此临床试验, 并与柳氮磺吡啶进行疗效对比, 为临床推广提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 AS 患者 40 例, 来自 2018 年 6 月—2019 年 6 月陕西中医药大学附属医院骨科与西安市第五人民医院 (西安风湿病研究所) 风湿科门诊患者。患者按照来诊时间排序分为两组, 每组 20 例, 单号患者为验方中药组, 双号患者为柳氮磺吡啶对照组。所有对象均对本研究知情同意并签署知情同意书, 活动度 ASDAS < 2.1 为稳定期、ASDAS ≥ 2.1 为活动期。本实验主要以稳定期为研究对象。

1.2 AS 诊断标准 所有入选的强直性脊柱炎患者均按 1984 年修订的纽约标准进行诊断^[2]。

1.3 纳入标准 ①年龄 18 ~ 65 岁; ②病程 > 3 个月; ③符合 1984 年修订的 AS 纽约分类标准; ④就诊前 1 个月未使用过糖皮质激素, 6 个月内未使用过 DMARDs。

1.4 排除标准 ①妊娠期或哺乳期妇女; ②合并有严重心、肝、肾等重要脏器和血液、内分泌系统

病变; ③合并有恶性肿瘤或者其他风湿性疾病的患者; ④精神病患者; ⑤正处于急、慢性感染期患者; ⑥活动度评分 ASDAS ≥ 2.1 的活动期患者。

1.5 临床指标检测 测定 AS 组治疗前的实验室指标: ①强直性脊柱炎疾病活动度评分分值的计算; ②CRP; ③ESR; ④HLA-B27。

1.6 研究方法 对照组: 患者给予柳氮磺吡啶肠溶片 (信谊, 上海福达制药有限公司, 国药准字 H31020840, $0.25 \text{ g} \times 12 \text{ s} \times 5 \text{ 板}$) 开始 0.25 g , 日 3 次, 以后每周增加 $0.25 \sim 1.0 \text{ g}$, 日 3 次, 维持 2 周, 从第 6 周每周减 0.25 g , 第 8 周恢复 0.25 g , 日 3 次, 维持 2 月。

中药组: 中药丸剂口服, 每日 2 次, 每次 2 丸。具体方剂如下: 当归 12 g, 草薢 15 g, 红花 20 g, 白芷 10 g, 制南星 10 g, 制川乌 6 g, 制草乌 6 g, 薏苡仁 15 g, 细辛 6 g, 地龙 6 g, 狗脊 30 g, 葛根 30 g, 牛膝 20 g, 赤芍 30 g, 白芍 30 g, 杜仲 15 g, 淫羊藿 15 g, 五加皮 15 g, 三七 15 g, 干胎盘 1 个 蚂蚁 200 g, 与蜂蜜制作为蜜丸, 约 180 丸, 每日 2 次, 每次 2 丸, 黄酒送服, 维持 2 月。所有药物由本院药剂室制作。

1.7 分析指标 对中药组和对照组所有患者治疗前后进行强直性脊柱炎疾病活动度评分, C 反应蛋白、血沉、HLA-B27 检测, 观察两组患者临床疗效。对所有病例治疗前进行抽血采样, 流式细胞术检测 Th17 细胞数量; 酶联免疫吸附法检测相关细胞因子 IL-6、IL-23。治疗 2 月后再次进行抽血采样, 组间进行标本对比分析。

2 实验方法

2.1 标本制备 对照者均于早晨 8 ~ 9 点间空腹采血。抽取 2 mL 于 EDTA 抗凝管中及 4 mL 于肝素钠抗凝管中。①EDTA 抗凝血 2 mL, 于 3000 r/min 离心后收集血清冻存于 -80°C , 用于

ELISA 检测 IL-6、IL-23 细胞因子。②肝素钠抗凝血 4 mL,用于流式细胞术检测 Th17 细胞数量。

2.2 收集外周血单核细胞及血浆 步骤方法:抽取研究对象外周静脉血 5 mL 于 EDTA 抗凝采血管内;在 15 mL 离心管中加入 4 mL 淋巴细胞分离液并将外周血缓缓倒入离心管内(采血 6 小时之内),2000 转/分离心 20 分钟;吸出上层血浆和中间层 PBMCs(外周血单核细胞);血浆置于 -80 ℃ 冰箱保存,PBMCs 用于流式细胞术检测。

2.3 实验室检测 流式细胞术检测 Th17 细胞,过程如下:

①调整细胞 PBMCs 浓度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$,取 2 mL PBMCs 悬液接种于 6 孔培养板后加入终浓度为 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的佛波醇乙酯(PMA), $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的离子霉素(ionomycin)和 $1.7 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蛋白质转运抑制剂莫能霉素(monesin),在 37 ℃,5% CO_2 细胞培养箱培养 5 h。

②用 PBS 洗,离心收集细胞,加入 5 μL FITC 标记的鼠抗人 CD4 单抗,避光孵育 15 分钟。

③加入 50 μL 固定液((A 液)室温避光固定反应 15 分钟后加入 3 mL PBS,混匀后离心弃上清。

④加入 50 μL 破膜剂(B 液)进行细胞打孔利于细胞因子单抗进入细胞,进行胞内细胞因子

染色。

⑤加入 5 μL PE 标记的 IL-17 单克隆抗体,4 ℃ 避光孵育 15 ~ 20 分钟,再用 0.5 mL PBS 重悬细胞,上机检测。

⑥检测前常规对流式细胞仪进行光流路质量调控和荧光补偿,使仪器各项指标在质量控制允许值范围,检测时首先根据前向(FSC)和侧向(SSC)散射光信号对淋巴细胞群进行设门,每份标本获取设门内细胞在 10000 个以上,数据分析使用 EXP032 软件。

2.4 统计学方法 Epi data 3.0 软件建立数据库,采用 SPSS 19.0 统计软件进行结果分析,如资料符合正态分布,采用两组独立样本 t 检验,不符合正态分布采用非参数检验,两变量之间的相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

所有 AS 患者中,中药组有 15 名患者,对照组有 13 名患者配合完成全部实验测试,其外周血进行流式细胞术检测 Th17 细胞。Th17 细胞检测选取的抗体是 CD4 与 IL-17⁺,所以 CD4⁺、IL-17⁺ 的细胞被确认为 Th17 细胞。流式细胞仪检测结果表明:AS 患者经治疗后 CD4⁺、IL-17⁺ 细胞(即 Th17 细胞)均显著减少,且中药组与对照组相比较,二者无明显差异($P > 0.05$),如图 1、图 2 示。

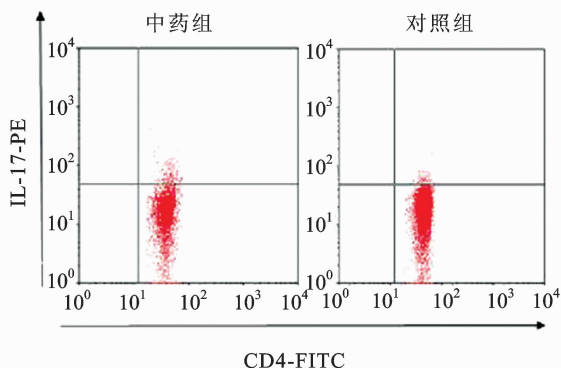


图 1 治疗前 CD4⁺、IL-17⁺ 细胞流式检测图

(在 CD4⁺ 淋巴细胞设门分选后得出)

研究对象的一般临床指标检测情况显示,治疗前后两组患者的活动度评分(ASDAS),C 反应蛋白、血沉各项指标均明显下降($P < 0.05$),并且两组之间无明显差异($P > 0.05$),其中中药组有 2 例患者 HLA-B27 转为阴性,对照组有一例转为

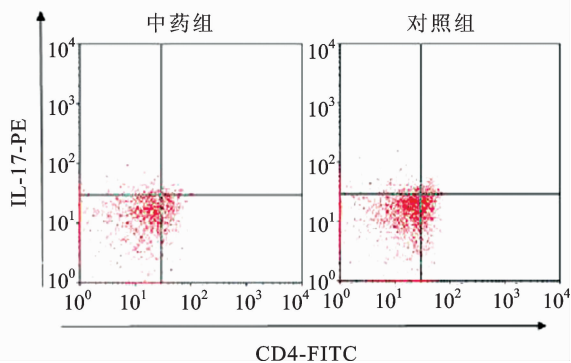


图 2 治疗 2 月后 CD4⁺、IL-17⁺ 细胞流式检测

(在 CD4⁺ 淋巴细胞设门分选后得出)

阴性。酶联免疫吸附法检测两组患者相关细胞因子治疗前后水平如下表 1。结果显示两组均可以有效降低 IL-6、IL-23,但二者无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 两组治疗前后相关细胞因子水平差异($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)		IL-23($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
中药组	15	6.57 \pm 2.84	6.0 \pm 1.76	3831 \pm 1127	2875 \pm 869
对照组	13	6.96 \pm 1.82	5.73 \pm 2.1	3514 \pm 1094	2675 \pm 713

注:中药组与对照组比较,治疗前 $P > 0.05$,治疗后 $P > 0.05$;两组组内治疗前后比较 $P < 0.05$

4 讨论

目前 AS 的发病机制尚不清楚,但机体的免疫功能异常在该病发病中的作用已经得到了肯定,T 细胞的免疫功能异常更是得到了广泛的重视^[3]。CD4 辅助性 T 细胞作为 T 细胞中的一个重要群体因分泌的细胞因子不同而被分为多个亚群,各个 Th 细胞亚群在自身免疫疾病发病中的作用在近十年中得到了广泛的研究,关于 Th 细胞各亚群之间的失衡在一些自身免疫疾病的发生发展的作用也得到了肯定^[4]。大量研究^[5-7]证实了 AS 患者外周血中 Th17 与 Treg 细胞的不平衡可能参与了 AS 的发病和病变进展。在 AS 患者外周血中微小核糖核酸-155(miR-155)表达水平可能影响 Th17/Treg 细胞平衡状态^[8]。Th 细胞根据其功能和分泌的细胞因子分为不同的亚群,主要的 Th 细胞亚群有:Th1,Th2,Th17 及 Treg 四种^[9]。

Th17 作为近几年一种新发现的 Th 细胞亚群,在适应性免疫应答中起着十分重要的作用。Th17 细胞因分泌 IL-17 而得名,除了分泌 IL-17 以外,Th17 细胞还分泌 IL-6、IL-23 等细胞因子,其主要效应功能是在对外来的细菌和真菌的免疫应答中活化中性白细胞,进一步介导炎症反应。初始的 CD4 + 分化为 Th17 细胞所需要的条件是:局部微环境中的 IL-6、TGF- β 和 IL-23;转录因子 ROR γ t 的激活^[10]。有人对 IL-6 在 AS 中的诊断价值进行了评测,发现诊断灵敏度为 62.5%,特异度为 92.5%^[11],可作为 AS 患者早期诊断及评判疗效的参考。

中医在治疗本病方面积累了丰富的经验,一些固定成方、验方和单方的应用更是百花齐放,达到祛除病痛,调节免疫的作用,且可避免或对抗西药的毒副作用。中药内服是治疗 AS 的常用方法,治疗本病常以补益肝肾、活血通络、祛风湿强筋骨

为主,配以其他药物,辨证施治,临证加减^[12]。也有一些中成药在临床上取得明确疗效^[13-15]。

现代医学对中药治疗 AS 也有了大量研究,证实苦参碱及雷公藤甲素抑制 Th17 分化,可能是治疗 AS 炎症的有效药物之一^[16]。谭希运用 HPLC(高效液相色谱法)分析了补肾强督治痿方有效化学成分,证明存在川芎嗪,芍药苷、柚皮苷、蛇床子素和熊果酸五种化合物,其有效成分对 LPS(脂多糖)诱导的 RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞)细胞模型的 IL-23/Th17 炎症轴有不同的影响,如熊果酸和川芎嗪也可以抑制 RAW264.7 模型细胞 NO 和 TNF- α 、IL-6、IL-17、ROR γ t、IL-23 的表达,且对细胞增殖无影响^[17]。目前临床上也有大量的中西医结合治疗 AS 的报道,如口服药物、针灸、中药熏蒸等联合西医常规药物,取得了一定疗效,并且取长补短,相辅相成^[18-20]。

杨毓华教授经多年临床经验所拟强脊方治疗 AS 患者,临床效果显著,通过此实验证实它能够通过降低 Th17 细胞的表达数量,减少 IL-6、IL-23 细胞因子分泌,改善炎症反应,与柳氮磺吡啶疗效相当,避免了西药的毒副作用,值得临床推广。

参考文献

[1] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct Lineage of CD4 T cells regulate tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.

[2] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria [J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4): 361-368.

[3] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy[J]. Curr Opin Immunol 2002, 14: 771-778.

[4] Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD4 + regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function[J].

- Autoimmun Rev, 2005, 4(8): 491-496.
- [5] 梅杨. 强直性脊柱炎患者外周血 Th17/Treg 细胞失衡研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
- [6] 王翠玲, 李开智, 崔文. 强直性脊柱炎患者外周血 Th1, Th17, Treg 细胞含量及相关细胞因子表达水平研究[J]. 慢性病学杂志, 2018, 19(9): 1154-1156, 1160.
- [7] 王亚芳, 王梅, 宋爱凤. 强直性脊柱炎患者外周血 Th17/Treg 平衡状态对疾病状况的评估价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(7): 842-845.
- [8] 李文清. 强直性脊柱炎患者外周血 miR-155 表达及 Th17/Treg 平衡的关系[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(2): 235-240.
- [9] Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Autoimmun, 2006, 27: 110-118.
- [10] Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, et al. Type 1 T regulatory cells[J]. Immunol Rev, 2001, 182(1): 68-79.
- [11] 刘小莉, 张红梅, 唐敏, 等. 不同疾病分期强直性脊柱炎患者外周血 DKK-1、MMP-3、TNF- α 和 IL-6 的表达及治疗前后水平变化[J]. 现代免疫学, 2020, 40(4): 300-305.
- [12] 许甜甜, 沈炳香, 李向阳, 等. 强直性脊柱炎的中药使用规律浅析[J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9(4): 20-23, 37.
- [13] 庞红梅. 寒湿痹颗粒治疗类风湿关节炎、强直性脊柱炎和膝骨关节炎中医辨证属寒湿痹阻证的临床疗效[J]. 中医临床研究, 2014, 6(26): 87-88.
- [14] 陈育尧, 佟丽, 吴启富, 等. 寒湿痹片对类风湿性关节炎模型大鼠踝关节组织病理改变的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2010, 20(1): 12-14.
- [15] 杜望磊, 李治琴, 杨西超, 等. 白芍总苷治疗强直性脊柱炎临床疗效及对血清炎症因子水平的影响[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(1): 87-91.
- [16] 赵亚男. 组蛋白甲基化酶 EZH2 调控强直性脊柱炎 Th17 分化及中药干预机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.
- [17] 谭希. 补肾强督治痿方有效成分分析以及对 IL-23/Th17 炎症轴的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [18] 靳国强, 赵蕾, 韩宗昌, 等. 顽痹清丸联合常规西药治疗湿热痹阻证强直性脊柱炎 28 例临床观察[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(7): 8-12.
- [19] 刘碧燕. 针灸联合常规药物治疗强直性脊柱炎患者的效果[J]. 中国当代医药, 2019, 26(2): 21-24, 33.
- [20] 伍伟, 何东初. 中药熏蒸联合常规西药治疗强直性脊柱炎 30 例临床观察[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(12): 13-16.

(收稿日期: 2020-09-23 编辑: 巩振东)