

临床研究

补肾通督胶囊对 RA 患者 Th17/Treg 平衡影响的研究

朱阳春¹ 王英旭² 林 琳¹ 侯丽萍¹

(1 北京中医药大学, 北京, 100029; 2 太原市类风湿病医院, 山西, 030060)

摘要 目的: 观察补肾通督胶囊对肾虚寒凝型类风湿性关节炎患者外周血 Th17/Treg 细胞及血清白细胞介素 17A (IL-17A)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、IL-10 的影响。方法: 入选类风湿性关节炎患者随机双盲分为治疗组 (36 例) 和对照组 (35 例), 治疗组口服补肾通督胶囊, 对照组口服雷公藤多苷片, 均服药 12 周, 采用流式细胞术观察比较治疗前后两组患者外周血 Th17/Treg 及采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 观察血清 IL-17A、TGF- β 1、IL-10 的变化。结果: 治疗后两组与各自治疗前相比, Th17 及 Th17/Treg 显著降低 ($P < 0.01$), Treg 显著升高 ($P < 0.01$); 治疗后两组间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后两组与各自组治疗前相比, IL-17A 显著降低 ($P < 0.01$), TGF- β 1、IL-10 显著升高 ($P < 0.01$); 治疗后两组间比较, 治疗组 TGF- β 1 与 IL-10 升高更加明显 ($P < 0.01$), IL-17A 无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 补肾通督胶囊可以明显降低肾虚寒凝型类风湿性关节炎患者外周血 Th17/Treg 水平, 降低血清 IL-17A 含量, 而使血清 TGF- β 1、IL-10 含量升高。

关键词 补肾通督胶囊; 类风湿性关节炎; Th17/Treg; IL-17A; TGF- β 1; IL-10

Study on Effect of Bushen Tongdu capsule on Peripheral Th17/Treg Ratio of Patients with Rheumatoid Arthritis

Zhu Yangchun¹, Wang Yingxu², Lin Lin¹, Hou Liping¹

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Taiyuan city class rheumatism hospital, Shanxi 030060, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Bushen Tongdu capsule on peripheral Th17/Treg ratio and serum IL-17A, TGF- β 1 and IL-10 of patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** RA patients were divided randomly and double-blinded into treatment group ($n=36$) that were treated with Bushen Tongdu capsules and control group ($n=35$) that were treated with Tripterygium glycosides tablets. Patients in both groups were treated for 12 weeks. The changes of peripheral blood Th17/Treg ratio and serum IL-17A, TGF- β 1 and IL-10 were observed by flow cytometry and ELISA in patients of both teams before and after the treatments. **Results:** After treatments, Peripheral Th 17%, Th17/Treg ratio significantly decreased and Treg% significantly evaluated ($P < 0.01$) in both groups, and there was no statistically significant difference between the two groups after the treatments ($P > 0.05$). After treatments, the level of serum IL-17A significantly decreased, and TGF- β 1 and IL-10 significantly evaluated in both groups ($P < 0.01$). Comparing the two groups, TGF- β 1 and IL-10 evaluated more in treatment group ($P < 0.01$), while there was no statistically significant difference between the two groups on the changes of IL-17A ($P > 0.05$). **Conclusion:** Bushen Tongdu capsule can reduce RA patients' peripheral Th17/Treg ratio and serum IL-17A content, and it also can evaluate serum TGF- β 1 and IL-10 content.

Key Words BushenTongdu capsule; Rheumatoid arthritis; Th17/Treg; IL-17A; TGF- β 1; IL-10

中图分类号: R255.9; R259 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.013

类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 是一种慢性、进行性、系统性自身免疫病, 以对称性的外周关节持续性滑膜炎为主要特征, 我国初步调查该病发病率约为 0.32% ~ 0.36%^[1]。RA 的发病机制尚未完全清晰, 其症状与病情的进展与免疫失衡密切相关, 主要表现为 Th1/Th2 比例失衡。随着对 RA 发病机制的不断深入研究发现 Th17/Treg 免疫失衡导致了持续的

局部关节炎症, 造成对骨及软骨的侵袭破坏, 最后导致关节强直、畸形、功能丧失^[2]。辅助性 T 细胞 17 (Th help cell 17, Th17) 主要功能为介导炎症反应, 通过释放白细胞介素 17 (IL-17)、白介素 22 (IL-22) 等细胞因子, 吸引炎症趋化因子和致炎因子聚集在正常细胞周围^[3], IL-17 还可以与其他致炎信号分子协同作用, 增强致炎效应^[4]。调节性 T 细胞 (Regulatory T

cell, Treg) 是一类特意性表达叉头状转录因子家族蛋白 3 (Forkhead box protein 3, Foxp3), 包括天然的 T 调节细胞和可诱导的 T 调节细胞。天然 Treg 的抑制机制主要是细胞接触依赖性及细胞因子非依赖性, 而获得性 Treg 的抑制机制不依赖于细胞间接触而是依赖细胞因子的作用^[5], 如转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、IL-10 等途径发挥抑炎和维持自身免疫耐受的作用^[6]。CD4 + CD25 + Treg 属于天然调节 T 细胞, 而 Tr1 和 Th3 属于获得性调节性 T 细胞^[7]。与正常人相比, RA 患者外周血 CD4 + T 细胞中, Th17 比率上升, 而 Foxp3 + CD + CD25 + Treg 细胞比率降低, Th17/Treg 细胞免疫失衡, 向 Th17 方向偏移^[8]。本文从分子水平出发, 探讨了补肾通督胶囊对中医辨证属肾虚寒凝型的 RA 患者外周血 Th17/Treg 细胞及分泌的细胞因子的影响。

1 临床资料

1.1 一般资料 收集 2012 年 11 月至 2013 年 9 月太原类风湿病医院符合纳入标准的 RA 患者。根据随机数表, 按 1:1 比例随机双盲分为补肾通督胶囊治疗组和雷公藤多苷片对照组, 共收入患者 74 例, 脱落 3 例, 最终完成 71 例。治疗组 36 例, 男性 8 例, 女性 28 例; 年龄 28 ~ 65 岁, 平均 (54.08 ± 8.25) 岁; 病程 18 ~ 335 个月, 平均 (106.00 ± 83.44) 个月。对照组 35 例, 男性 8 例, 女性 27 例; 年龄 24 ~ 63 岁, 平均 (51.23 ± 9.83) 岁; 病程 24 ~ 300 个月, 平均 (119.47 ± 88.43) 个月。两组性别、年龄、病程经统计学处理, 无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 诊断标准 西医诊断标准参照美国风湿病学会及欧洲抗风湿联盟 2010 年共同制定的《类风湿性关节炎诊断及治疗指南》^[9], 中医诊断及辨证分型标准参照 2008 年中华中医药学会《中医内科常见病诊疗指南·中医病证部分》^[10] 及参照 1994 年国家中医药管理局《中医病证诊断疗效标准》^[11] 中疝痹的肾虚寒凝型。

1.3 纳入标准 年龄在 18 ~ 65 周岁之间, 符合美国风湿病学会及欧洲抗风湿联盟 2010 年 RA 诊断标准, X 线分期处于 I、II、III 期, 中医辨证为肾虚寒凝型。

1.4 排除标准 1) 目前正在参加或在本研究前 1 个月内参加过其他治疗 RA 临床研究。2) 近期准备生育, 或处于孕期或哺乳期女性。3) 长期服用糖皮质激素治疗 RA, 且在本研究前至少 1 个月内未停用药物。4) 合并有心血管、肺部、肝脏、肾脏、造血系统等严重疾病。5) 重叠其他风湿病如系统性红斑狼疮、干燥综合征、严重的膝骨关节炎等。6) 合并严重关节外表现如高热不退、间质性肺炎、肾脏淀粉样变、缩窄性心包炎、

中枢神经系统血管炎等, 需要使用糖皮质激素治疗。7) 伴有活动性胃肠道疾病, 或本研究前 30 d 内有食物或消化道溃疡。

1.5 脱落标准 1) 患者依从性差, 中途停止治疗者; 2) 发生严重并发症, 研究无法继续者; 3) 病情严重恶化, 必须采用其他治疗者; 4) 受试者不能坚持治疗者。

2 方法

2.1 治疗方法 治疗组口服补肾通督胶囊 (太原市类风湿病医院院内制剂, 药物组成: 熟地黄、鹿角、肉桂、芥子、制马钱子、麻黄), 3 次/d, 3 粒/次, 饭后温水送服; 对照组口服雷公藤多苷片, 3 次/d, 1 片/次, 饭后温水送服。两组疗程均为 12 周。

2.2 检测方法 两组患者在用药前及用药 12 周后, 于清晨空腹抽取外周血 15 mL, 其中 10 mL 加入肝素钠抗凝管中, 使用淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞后, 置于 1 640 培养液、胎牛血清和刺激剂中培养 4 h, 平均分成 2 份, 分别按试剂盒说明书步骤进行破膜和固定, 一份过程中加入 PerCP - Cy5.5 - CD4 抗体、PE - IL - 17A 抗体; 另一份过程中加入 FITC - CD4 抗体、APC - CD25 抗体、PE - FoxP3 抗体。之后分别使用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测其荧光反应, 采用 BD Cell Quest 软件分析测定 Th17/Treg 的比值; 另 5 mL 加入 2% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝, 离心后收集血清, -80°C 保存。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 IL - 17A、TGF - $\beta 1$ 、IL - 10 含量。

2.3 主要试剂及实验仪器 BD FACS Calibur 流式细胞仪 (BD, 美国); 酶标仪 DENLEY DRAGON Wellscan MK 2 (Thermo, 芬兰) 使用 Ascent software for Multiskan 软件进行分析; 洗板机为 Wellwash 4 MK2 (Thermo, 芬兰)。

牛的 II 型胶原 (Sigma, 美国); 人淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); PerCP - Cy5.5 - CD4 抗体 (BD, 美国); PE - IL - 17A 抗体 (BD, 美国); FITC - CD4 抗体 (BD, 美国); APC - CD25 抗体 (BD, 美国); PE - FoxP3 抗体 (BD, 美国); IL - 17A、TGF - $\beta 1$ 、IL - 10 酶联免疫吸附法试剂盒 (山西普兴生化有限公司)。

2.4 统计方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。所有结果均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验。

3 结果

3.1 流式细胞术检测外周血 Th17/Treg 治疗后两组与各自治疗前相比, Th17 及 Th17/Treg 显著降低 ($P < 0.01$), Treg 显著升高 ($P < 0.01$); 治疗后两组间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 两组治疗前后 Th17/Treg 细胞在 CD4 + T 细胞中的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	例时间	Th17 (CD4 + IL-17A +, %)	Treg (CD4 + CD25 + FoxP3 +, %)	Th17/Treg
治疗组	36	治疗前	3.74 ± 1.52	1.21 ± 1.60	5.13 ± 2.68
		治疗后	2.07 ± 1.76 **	4.47 ± 2.81 **	0.89 ± 0.99 **
对照组	35	治疗前	3.81 ± 1.80	1.16 ± 1.59	5.40 ± 3.83
		治疗后	2.49 ± 2.00 **	3.68 ± 2.86 **	1.38 ± 2.25 **

注:与本组治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

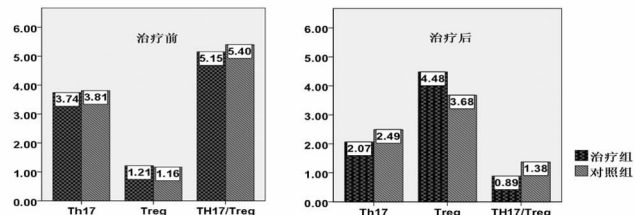


图 1 两组治疗前后 Th17/Treg 在 CD4 + T 细胞中的表达情况

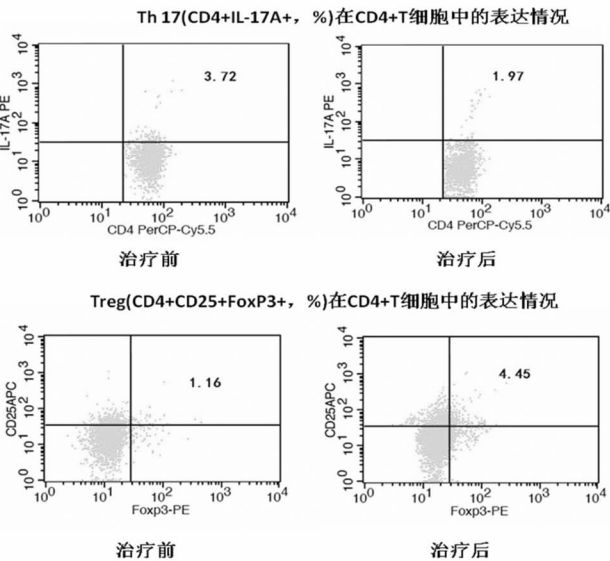


图 2 治疗组 Th17/Treg 的典型图例

3.2 ELISA 检测血清 IL-17A、TGF- β 1、IL-10 治疗后两组与各自组治疗前相比, IL-17A 显著降低($P < 0.01$), TGF- β 1、IL-10 显著升高($P < 0.01$); 治疗后两组间比较, 治疗组 TGF- β 1 与 IL-10 升高更加明显($P < 0.01$), IL-17A 无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 两组治疗前后血清 IL-17A、TGF- β 1、IL-10 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	IL-17A (pg/mL)	TGF- β 1 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
治疗组	36	治疗前	34.78 ± 3.81	17.94 ± 1.24	17.15 ± 2.51
		治疗后	20.14 ± 3.80 **	28.15 ± 4.70 ** $\Delta\Delta$	24.69 ± 4.00 ** $\Delta\Delta$
对照组	35	治疗前	34.94 ± 2.96	18.35 ± 1.12	17.62 ± 4.05
		治疗后	21.61 ± 2.71 **	25.15 ± 2.21 **	21.49 ± 2.47 **

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

4 讨论

RA 是一种以慢性的自身免疫性疾病, 其主要病理改变为关节滑膜的慢性炎性反应, 造成骨、软骨及关节

周围组织的破坏。RA 发病率居自身免疫性疾病的首位^[12], 未经治疗的 RA 患者 2 年致残率达 50%, 3 年致残率达 70%, 大约有一半的 RA 患者最终因致残丧失劳动能力^[13]。

现代医学对 RA 的发病机制尚未明确, 一般认为是感染引起的遗传易感个体的自身免疫反应。Th17 细胞亚群是介导自身免疫性疾病的中药群体。Th17 细胞分化并且产生的 IL-17 是一种强大的前炎性细胞因子, 可以诱导 RA 患者核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 表达, 诱导破骨细胞祖细胞向成熟破骨细胞分化, 使破骨增加而成骨减少, 造成对关节骨与软骨的侵蚀破坏^[14]; 还可以产生 IL-17F/IL-17A 蛋白异二聚体, 从而促使 T 细胞介导的免疫应答^[15]。可诱导的 T 调节细胞一种在 TGF- β 1 的诱导下, 分化为表达 Foxp3 的 Treg, 另一种不表达 Foxp3, 形成以 IL-10 高表达为标志的 Treg 细胞^[16]。IL-10 能够抑制促炎性细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 的生成, 可以明显延缓滑膜炎性反应的进展^[17]。TGF- β 1 在低浓度时与 IL-6 协同作用, 促进 Th17 的分化^[18]; 在高浓度状态下上调 Foxp3 的表达, 促进 Treg 细胞的产生, 抑制炎性反应形成并防止自身免疫性疾病的产生^[19]。有研究表明, 在 RA 发病时, 血液中的 TGF- β 1 可以游离至组织中, 使血液中 TGF- β 1 降低^[20]。可见 Th17 细胞和 Treg 细胞在分化上具有相互排斥的信号通路, 在功能上相互抑制, Th17/Treg 细胞比率的平衡对维持正常免疫应答及防止自身免疫具有重要意义。

补肾通督胶囊是由阳和汤化裁而来, 主要成分为熟地黄、鹿角胶、肉桂、芥子、制马钱子、麻黄等。全方辛散滋补同伍, 通中有补, 扶正与祛邪兼顾, 以达到补肾通督、化瘀散结消肿的作用。从药理学方面分析, 本方具有较好的消炎镇痛、免疫调节和改善骨破坏的作用。方中熟地黄可以提高免疫器官的增长指数, 增强巨噬细胞的吞噬能力^[21]; 鹿角胶可以显著增加成骨细胞数量, 降低骨转化, 提高骨质量^[22]; 马钱子具有显著的镇痛消炎作用, 还可以对免疫功能进行双向调节^[23]。前期的研究显示补肾通督胶囊对于中医辨证属于肾虚寒凝型的 RA 有着确切的临床疗效^[24]。肾虚寒凝型 RA 为临床常见证型, 主要表现为关节疼痛肿胀, 晨僵, 活动不利, 畏寒怕冷, 神倦懒动, 腰背酸痛, 俯仰不利, 天气寒冷加重, 舌淡胖, 苔白滑, 脉沉细。

本研究表明, 补肾通督胶囊可以明显降低 RA 患者外周血 Th17 细胞比率($P < 0.01$), 而使 Treg 细胞升高($P < 0.01$), 使 Th17/Treg 向 Treg 方向偏移, 纠正 RA 患者的免疫偏移。在 Th17/Treg 的调节上, 与对照

组雷公藤多苷片相比较,没有统计学意义($P > 0.05$)。在细胞因子调节方面,可以使血清中的 IL-17A 浓度显著降低,而 TGF- β 和 IL-10 显著升高($P < 0.01$);与对照组相比,使 TGF- β 和 IL-10 升高的作用要明显优于雷公藤多苷片($P < 0.01$),而 IL-17A 的调节没有统计学意义($P > 0.05$)。本研究的对照组药物雷公藤多苷片是缓解 RA 病情的有效药物,其主要成分为雷公藤甲素,具有抗炎、免疫抑制、糖皮质激素样作用作用^[25],可以改善 RA 患者的病情。但是雷公藤多苷片的有效成分,也是它的毒性成分,容易发生不良反应。2012 年 4 月国家药品不良反应监测中心公布了 2004 年至 2011 年 9 月雷公藤片不良反应病例报告 201 例,其中严重者 19 例(9.5%),主要表现为药物性肝炎、肝肾功能异常、肾衰竭、胃出血、白细胞减少、血小板减少、闭经等^[26]。雷公藤多苷片,对于 RA 病情的控制疗效确切,但不宜耐受且不能长期应用,在应用上有明显的局限性。

以 Th17/Treg 为靶点研究 RA 越来越受到人们的关注,但目前此类研究大多围绕动物模型展开。而本项研究表明,补肾通督胶囊在调节 Th17/Treg 方面与雷公藤多苷片没有统计学意义,对于个别相关细胞因子的作用甚至更有优势,而且安全性更高,在治疗肾虚寒凝型 RA 上有一定的优势,有着更广阔的开发空间,是中医药在治疗 RA 方面的重要应用,但其作用机制与有效靶点有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊治指南(草案)[S]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(4): 250.
- [2] Mai J, Wang H, Yang XF. Th 17 cells interplay with Foxp3 + Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2010 Jun 1, (15): 986-1006.
- [3] Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010 Feb, 95(2): 953-62.
- [4] Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. Immunity, 2004 Oct, 21(4): 467-76.
- [5] Lawson C A, Brown A K, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4 + CD25high regulatory T cell population in peripheral blood [J]. Rheumatology, 2006, 45(10): 1210-1217.
- [6] Lawson C A, Brown A K, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4 + CD25high regulatory T cell population in peripheral blood [J]. Rheumatology, 2006, 45(10): 1210-1217.
- [7] Lawson C A, Brown A K, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4 + CD25high regulatory T cell population in peripheral blood [J]. Rheumatology, 2006, 45(10): 1210-1217.
- [8] 牛倩, 黄卓春, 蔡蓓, 等. 类风湿性关节炎患者外周血 Th17/Treg 细胞比率失衡的研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010 (003): 267-269.
- [9] Daniel Aletaha, Tuhina Neogi, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria [J]. Arthritis & Rheumatism, 2010, 62: 2569-2581.
- [10] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南·中医病证部分 [S]. 北京: 中国中医药出版社, 2008, 129-131.
- [11] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准 [S]. 北京: 1994, 47.
- [12] 张品南, 陈艳梅. 类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2008, 2(11): 59-61.
- [13] Rugiene R, Dadonienė J, Venalis A, et al. Comparison of health-related quality of life between patients with rheumatic diseases and a control group [J]. Medicina, 2005, 41(7): 561-565.
- [14] 秦霞, 刘钟滨. 白细胞介素 17 家族 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2003, 24(6): 519-522.
- [15] Wright J F, Guo Y, Quazi A, et al. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4 + T cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(18): 13447-13455.
- [16] 牛磊, 蒋瑾瑾. Th1/Th2, Th17/Treg 平衡与幼年特发性关节炎 [J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(011): 1095-1098.
- [17] Jiang J L, Peng Y P, Qiu Y H, et al. Adrenoreceptor-coupled signal-transduction mechanisms mediating lymphocyte apoptosis induced by endogenous catecholamines [J]. Journal of neuroimmunology, 2009, 213(1): 100-111.
- [18] Laurence A, Tato C M, Davidson T S, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation [J]. Immunity, 2007, 26(3): 371-381.
- [19] Weaver C T, Hatton R D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-) evolutionary perspective [J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(12): 883-889.
- [20] 万磊, 刘健, 黄传兵, 等. 新风胶囊对佐剂关节炎大鼠肺功能及 Treg, Foxp3, TGF- β 1/Smads 的作用 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2013, 42(4): 418-425.
- [21] 李佳, 程井军, 刘洋洋. 原花青素与熟地对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2010, 19(11): 26-27.
- [22] 蒙海燕, 曲晓波, 李娜, 等. 鹿茸及鹿角胶对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响 [J]. 中药材, 2009, 2(2): 179-182.
- [23] 王立杰, 蔡宝昌, 陈军, 等. 马钱子碱对小鼠免疫功能的影响 [J]. 现代中药研究与实践, 2008, 22(6): 42-44.
- [24] 周晓莉, 刘秀峰, 王英旭, 等. 补肾通督胶囊治疗类风湿关节炎 22 例疗效观察 [J]. 山西中医, 2012, 28(2): 21-23.
- [25] 李德平, 翟华强, 曹炜, 等. 雷公藤的药性文献回顾及其作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 299-303.
- [26] 肖廷超, 朱必越. 雷公藤片的临床应用及不良反应文献分析 [J]. 重庆医学, 2013, 42(9): 1007-1009.

(2013-11-27 收稿 责任编辑: 曹柏)