

自拟止泻方通过调节 Th17 细胞功能治疗 小儿迁延性腹泻的临床观察

张宪伟 孙 杭

(南京医科大学附属南京儿童医院检验科, 南京, 210008)

摘要 目的:观察自拟止泻方对小儿迁延性腹泻的临床疗效以及其部分调节机制的研究。方法:将本院2010年3月至2013年3月100例迁延性腹泻的患儿纳入研究,对照组50例患儿接受内科常规治疗,观察组50例在对照组治疗基础上加用自拟止泻方,观察2组患儿均以10d为1个疗程,疗程结束后观察2组患儿临床症状的变化,同时采用流式细胞术检测外周血中Th17细胞表达水平,ELISA检测患者血清中IL-6、IL-17、IL-23的蛋白表达水平。结果:1)2组患儿体温恢复时间、呕吐停止时间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但是观察组患儿腹泻停止时间短于对照组($P < 0.05$);2)治疗后2组患儿血清中IL-6、IL-17、IL-23水平低于治疗前($P < 0.05$),治疗1个疗程后观察组患者IL-17、IL-6、IL-23水平下降趋势较对照组患儿明显($P < 0.01$);3)随访3个月后发现,观察组患儿的体重增长明显高于对照组患儿($P < 0.05$)。结论:迁延性腹泻患儿存在Th17细胞表达增加,功能亢进,自拟止泻方可以明显下调Th17细胞表达频数及功能,该效应可能是自拟止泻方从机体免疫方面改善迁延性腹泻的作用机制之一。

关键词 迁延性腹泻;自拟止泻方;Th17细胞;IL-6;IL-17;IL-23

Clinical Observation on Self-Made Antidiarrheal Decoction in Treating Pediatric Protracted Diarrhea by Regulating Th17 Cell Function

Zhang Xianwei, Sun Hang

(Laboratory, Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

Abstract Objective: To observe the clinical curative effect of self-made antidiarrheal decoction in the treatment of pediatric protracted diarrhea and some of its regulatory mechanism. **Methods:** One hundred cases of pediatric protracted diarrhea treated in our hospital during March 2010 to March 2013 were included in the study. Fifty cases in the control group accepted medical conventional treatment, and the other 50 cases in the observation group received self-made antidiarrheal decoction apart from the same treatment of the control group. The treatment course of both groups was 10 days. The symptoms changes of children in the two groups after treatment was observed. Simultaneously flow cytometry was used to test peripheral blood expression level of Th17 cells, and ELISA was used to detect the protein expression level of IL-6, IL-17, IL-23 in the serum of patients. **Results:** 1) Temperature recovery time, vomiting stop time of the two groups were with no statistical differences ($P > 0.05$), but the diarrhea stop time of the observation group was shorter than that of the control group ($P < 0.05$). 2) after treatment, serum IL-6, IL-17, IL-23 levels in children in the two groups with lower than those before treatment ($P < 0.05$), and after one period of treatment, IL-17, IL-6, IL-23 levels of the observation group declined significantly than those of the control group ($P < 0.01$). 3) after the 3 months follow-up, children's weight gain of the observation group was obviously more than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Children with protracted diarrhea have increased expression of Th17 cells and hyperfunction, and self-made antidiarrheal decoction can obviously down-regulate frequency and function of Th17 cells expression which may be one of the mechanisms of self-made antidiarrheal decoction improving protracted diarrhea in the aspects of the body's immune ability.

Key Words Protracted diarrhea; Self-made antidiarrheal decoction; Th17 cells; IL-6; IL-17; IL-23

中图分类号:R285.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.12.014

感染性腹泻是属于世界性的公共卫生问题,其以大便次数以及大便性状的改变为主要临床症状,其中小儿是腹泻的主要发病人群,如果急性腹泻无法得到及时、合理的治疗将即为可能转变为迁延性腹泻,造成儿童的营养不良、生长发育迟缓、免疫功能低下等,影

响生活质量^[1-3]。随着目前临床抗生素的滥用,细菌耐药性现象越来越严重,且由于各类西药都可能产生不同程度的不良反应导致患儿无法耐受,所以,探寻更安全有效的迁延性腹泻治疗方案尤其重要,中药汤药的治疗价值逐渐受到重视。从中医学角度认为迁延性

腹泻乃先天不足,后天调护失宜,病后体弱,以致脾胃虚弱,不能升清降浊谷反成滞,水反为湿,合污下降而成,本院根据上述病机自拟止泻方予患儿口服,疗效显著,但其治疗机制尚未清楚。

CD4⁺T 细胞是免疫反应以及炎性反应性疾病的重要调节者,遇到特异性抗原后,他们被激活并增殖分化为不同的效应 T 细胞亚群,如 Th1 型辅助细胞(Th1)、调节性 T 细胞(Treg 细胞)抑制炎性反应的发生、发展,Th2 细胞及产生白细胞介素 17(IL-17)的 T 辅助 17 型细胞(Th17 细胞)则促进炎性反应进程。已有文献表明在腹泻患者中存在 Treg 细胞比率降低, Th17 细胞比率升高的 Treg/Th17 失衡^[4-6],但 Th17 细胞及其相关作用因子 IL-6、IL-17、IL-23 在疾病过程中发挥的作用尚未明确。于是我们假设,小儿迁延性腹泻与机体免疫功能存在密切联系,那此病的发生发展是否与 Th17 细胞功能相关,而自拟止泻方是否通过该途径发挥作用,本研究拟通过检测自拟止泻方对于迁延性腹泻患儿治疗前后 Th17 细胞及其相关作用因子 IL-17、IL-6、IL-23 的表达变化进一步阐明 Th17 细胞及其作用因子 IL-17、IL-6、IL-23 在迁延性腹泻中发挥的作用并探讨自拟止泻方对 Th17 细胞功能的调节作用。

1 资料和方法

1.1 一般资料 将本院 2010 年 3 月至 2013 年 3 月 100 例迁延性腹泻的患儿纳入研究,所有入组患儿诊断均符合 2008 年出版的全国高等医学教材中关于中国腹泻病的诊断标准。100 例患儿根据入院顺序随机分为对照组和观察组,对照组 50 例,男 27 例,女 23 例,年龄 7 个月至 5 岁,平均(2±0.8)岁,大便次数 3~12 次/d,平均(6±1.7)次;观察组 50 例,男 29 例,女 21 例,年龄 6 个月至 4.5 岁,平均(2±0.8)岁,大便次数 4~11 次/d,平均(5±2.1)次。2 组患儿在年龄、性别、每日大便次数等方面比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究方案经过医院伦理学委员会审查批准,所有受试对象家属均知情同意。

1.2 治疗方法 所有患儿均接受内科常规治疗,均以去乳糖/配方奶饮食,有脱水症状的患儿予补液纠正,思密达口服[蒙脱石散,国药准字 H20000690 博福-益普生(天津)制药有限公司,3 g/袋],1 岁以下,1 袋/日;1~2 岁,1~2 袋/d;2 岁以上,2~3 袋/d,均分三次服用。观察组患儿在上述治疗方案基础上加服本院自拟止泻方,具体方药如下:黄芪 20 g,炒白术 9 g,防风 6 g,山药 6 g,干姜 6 g,肉豆蔻 6 g,甘草 3 g,水煎药方 100 mL,1 剂/d(早晚分服)。

1.3 观察指标 临床症状改善情况:2 组患儿体温恢

复时间、呕吐停止时间、Th17 细胞水平的变化、IL-6、IL-17、IL-23 浓度变化。

1.4 主要试剂与仪器 RPMI 1640 和胎牛血清(美国 Thermo 公司);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);佛波酯(PMA)、离子霉素(Ion)、莫能菌素(Mon)、破膜剂、CD4-FITC、IL-17A-APC 流式抗体、人细胞因子 IL-6、IL-17、IL-23 ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司);酶标仪(美国 Thermo labsystem 公司);BD FACSVerserTM System(美国 BD Biosciences 公司)。

1.5 检测方法

1.5.1 Th17 细胞检测 取患儿治疗前后前臂外周抗凝血 5 mL,用人淋巴细胞分离液提取外周血单核细胞(PBMC, 1×10^6 /mL)200 μ L,置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,加入刺激剂佛波醇乙酯(PMA)及离子霉素、莫能菌素等工作液并混匀,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。培养箱中培养 4~6 h。用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,离心收集细胞,加入 5 μ L 异硫氰酸荧光素标记的 CD4(CD4-FITC)、5 μ L 藻红蛋白标记的 IL-17(IL-17A-APC),操作按试剂盒说明书进行,采用流式细胞仪检测 Th17 细胞。

1.5.2 细胞因子检测 取从患儿治疗前后前臂外周血 2 mL 置入肝素钠抗凝管内,以 3 000 r/min 高速离心后,取上清液置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,按照 IL-6、IL-17、IL-23 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

1.6 统计学分析 全部数据采用 SPSS 17.0 和 Graph-Pad Prism 5 软件进行统计分析,所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据的比较先进行 Shapiro-Wilk test 检验正态性和 Levene test 检验方差齐性。若两者都符合,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并用 LSD-t 检验进行多样本均数间的两两比较。若有至少一项不符合,则采用 Kruskal-Wallis H 检验和 Dunn's 多重检验对各组数据进行统计分析。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患儿临床症状比较 2 组患儿体温恢复时间、呕吐停止时间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但是观察组患儿腹泻停止时间与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

2.2 自拟止泻方显著抑制迁延性腹泻患儿外周血中 Th17 细胞的表达 对不同组患儿外周血进行流式细胞术检测 CD4⁺IL-17⁺结果显示:观察组治疗后 CD4⁺IL-17⁺T 细胞百分率(0.895±0.309)%,显著低于治疗前[(0.895±0.309)% vs (2.556±0.491)%, |t| =

22.07, $P = 0.0008 < 0.001$] 及对照组治疗后 $[(0.895 \pm 0.309)\% \text{ vs } (1.262 \pm 0.247)\%, |t| = 3.676, P = 0.009 < 0.01]$, 见图 1, 自拟止泻方可以显著降低抑制迁延性腹泻患儿外周血中 Th17 细胞表达。

表 1 2 组患儿临床症状比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	体温恢复时间(d)	呕吐停止时间(d)	腹泻停止时间(d)
观察组	50	1.88 ± 0.92	2.23 ± 0.44	5.61 ± 1.26
对照组	50	1.83 ± 0.84	2.30 ± 0.18	7.56 ± 1.73 *
<i>P</i>		0.08	0.09	0.02
<i>t</i>		3.54	4.79	3.91

注:与观察组比较, * $P < 0.05$ 。

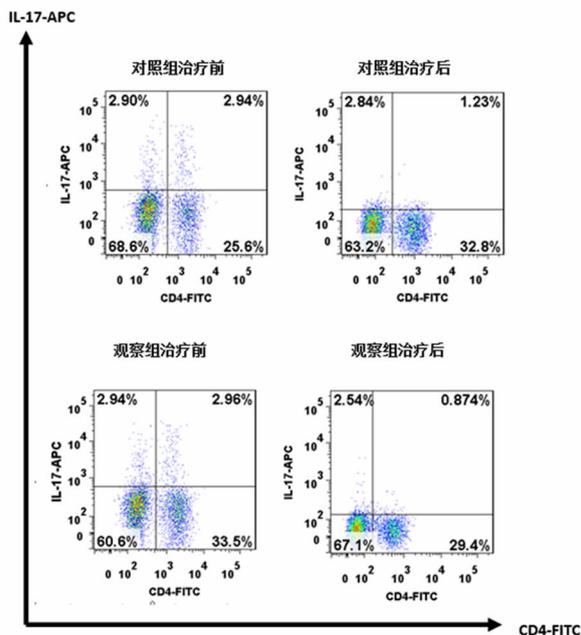


图 1 2 组患儿外周血中 CD4、IL-7 + T 细胞百分率变化

2.3 自拟止泻方能显著抑制迁延性腹泻患儿血清中 Th17 细胞功能细胞因子的表达 治疗后 2 组患儿血清中 IL-6、IL-17、IL-23 水平低于治疗前 ($P < 0.05$), 治疗 1 个疗程后观察组患者 IL-17、IL-6、IL-23 水平下降趋势较对照组患儿有统计学意义 ($P < 0.01$); 见表 2。

表 2 2 组指标变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 (μg/L)	IL-17 (μg/L)	IL-23 (μg/L)
观察组 治疗前	22.89 ± 0.93	34.65 ± 0.71 *	39.65 ± 2.40
观察组 治疗后	9.31 ± 0.31 * Δ	10.69 ± 0.08 * Δ	14.92 ± 1.76 * Δ
对照组 治疗前	23.03 ± 0.81	34.94 ± 0.92 *	38.44 ± 2.17
对照组 治疗后	16.92 ± 0.41 *	5.91 ± 0.20 *	25.28 ± 1.31 *

注:与治疗前相比, * $P < 0.05$; 与对照组相比, Δ $P < 0.05$ 。

3 讨论

迁延性腹泻是造成儿童严重营养不良、发育不全、免疫力低下的主要原因, 本研究 2 组患儿的体温恢复时间、呕吐停止时间虽然相近, 但是加用自拟止泻汤的患儿腹泻停止时间短于常规治疗组患儿, 说明可将自

拟止泻汤做为治疗迁延性腹泻的主要辅助手段。由于迁延性腹泻发病机制较为复杂, 患儿机体免疫病理损伤在发病过程中发挥主要作用, 免疫系统紊乱及细胞因子网络失衡是迁延性腹泻重要的致命因素之一, 因此, 纠正迁延性腹泻患者的免疫调节紊乱及细胞因子网络的失衡具有重大的防治意义, 而外周血 T 细胞亚群是反映迁延性腹泻免疫状态的重要指标^[7-8]。笔者根据这一思路, 希望从外周血 T 细胞亚群的功能变化探讨自拟止泻汤的作用机制。

Th17 细胞是与 Th1、Th2 的 CD4⁺ T 细胞亚群不同的新发现细胞, 有文献证实: Th17 细胞可能担负着调节机体自身免疫和炎症反应的角色, 多数迁延性腹泻患儿存在机体免疫功能异常以及消化道炎症反应, 由于炎症反应因子 (IL-6) 的存在, 幼稚的 CD4⁺ T 细胞分化为 Th17 细胞, 并产生其主要效应因子是 IL-17, 而 IL-17 已被证实是一种促炎因子, 其与受体结合后可诱导机体产生多种炎症反应因子, 如 IL-23 等, 影响机体免疫应答, 所以 Th17 细胞分化和免疫功能的调控研究具有重要的基础和临床应用价值^[9-15]。本研究通过观察 2 组患儿血清中 Th17 细胞的数量及功能, 发现经过治疗后 2 组患儿外周血中 Th17 细胞表达频率均较治疗前降低, 考虑迁延性腹泻发生时, 大量 Th17 细胞被活化, 通过分泌 IL-6、IL-17、IL-23 来招募中性粒细胞等参与肠道炎症反应过程, 而自拟止泻方逆转此过程, 明显降低 Th17 细胞表达频率及 IL-6、IL-17、IL-23 浓度, 因此纠正了患儿的临床症状。

中医学认为迁延性腹泻是先天不足, 后天调护失宜, 病后体弱, 以致脾胃虚弱, 不能升清降浊谷反成滞, 水反为湿, 合污下降导致而成, 本院自拟止泻方重用黄芪、白术, 取两味药在益气升脾的基础上促进脾胃运化, 药理研究证实黄芪具有增强机体免疫功能、抗菌作用。防风入脾经, 质轻, 可引导水谷之气上升, 山药性平和, 归肺、脾、肾三经, 主要功效为补脾止泻, 药理研究显示山药可改善消化, 调节自主神经, 增强体质; 迁延性腹泻患儿由于久泄伤阳, 予加干姜温中涩肠止泻; 肉豆蔻, 除寒燥湿, 解结行气, 专理脾胃, 能固及大肠之滑脱; 甘草予调和诸药药性。诸药合用, 攘外安内, 疗效显著。本研究显示, 观察组患者 Th17 细胞表达频率, IL-6、IL-17、IL-23 细胞因子的表达水平显著低于对照组, 提示自拟止泻方可能具有下调 Th17 细胞功能, 改善慢性炎症反应的作用, 该效应可能是自拟止泻方从机体免疫方面改善迁延性腹泻患儿的作用机制之一。

总之, 迁延性腹泻的发病机制与 Th17 细胞功能失

调密切相关,而自拟止泻方可以部分逆转该疾病的发展,从而改善患者预后。考虑可能此次入选样本量较小有关,随访时间不长等,故有待于增加样本量,进一步扩大研究予以证实自拟止泻方对于迁延性腹泻的预后及确切机制,为指导临床治疗提供参考价值。

参考文献

- [1] Navaneethan U, Giannella RA. Mechanisms of infectious diarrhea[J]. Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology, 2008, 5(11): 637-647.
- [2] 汤滢, 江国荣. 玉屏风散不同方法提取物免疫增加效应的实验研究进展[J]. 安徽医药, 2011, 15(2): 141-143.
- [3] 程瑞朵, 吴岚, 张荣, 等. 玉屏风散对迁延性腹泻患儿的免疫调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(1): 61-63.
- [4] 徐培平, 丁伟, 赵昉, 等. 中药预防流感作用与黏膜免疫相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(11): 992-998.
- [5] 段如成. 微生态调节剂在儿科消化系统疾病的作用[J]. 中国微生态学杂志, 2002, 14(1): 1-2.
- [6] 万盛华, 罗红, 李香萍. 培菲康联合洁维乐治疗小儿迁延性和慢性腹泻[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(1): 88.

- [7] 朱孝琳. 锌制剂联合布拉酵母菌治疗小儿迁延性腹泻疗效观察[J]. 儿科药学杂志, 2014, 20(1): 22-24.
- [8] 李旭光. 小儿迁延性腹泻临床分析[J]. 临床医学, 2011, 31(4): 93-94.
- [9] 石永生, 王永军, 蒋成鹏, 等. 婴幼儿迁延性腹泻病发病及预后的高危因素[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(5): 695-699.
- [10] 郭振锋. 婴幼儿迁延性慢性腹泻 130 例的临床特点分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(18): 1413-1414.
- [11] 王秀丽, 刘进生, 方辉, 等. 婴幼儿急性腹泻病血锌水平及补锌治疗的临床观察[J]. 安徽医学, 2013, 34(4): 434-436.
- [12] 曲辉, 康凯, 付姝丽, 等. 婴幼儿腹泻病血清硒水平的研究[J]. 中国医师进修杂志, 2012, 35(30): 12-14.
- [13] 应爱娟, 江米足. 锌在儿童腹泻治疗中的作用[J]. 国际儿科学杂志, 2009, 8(5): 535-537.
- [14] 王冬萌, 毕晶, 孙正纤. 小儿迁延性腹泻与锌缺乏病发病关系研究[J]. 中国全科医学, 2011, 6(2): 196-197.
- [15] 江米足. 慢性、难治性腹泻病的诊断与治疗进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(3): 201-203.

(2014-07-14 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 1611 页)

参考文献

- [1] Spahr L, Villeneuve JP, Tran HK, et al. Furosemide-induced natriuresis as a test to identify cirrhotic patients with refractory ascites[J]. Hepatology, 2001, 33(1): 28-31.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治办法[J]. 中华内科杂志, 2001, 40(1): 62-68.
- [3] 田德禄, 等. 中医内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 249.
- [4] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 10-11.
- [5] 王伯祥. 中医肝胆病学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 261.
- [6] 揭盛华. 肝硬化顽固性腹水及其治疗[J]. 医药导报, 2003, 22(4): 219-221.
- [7] 申雯竹, 孔庆志, 吴洪斌. 黄蔑对肾生化指标和病理学的影响[J]. 湖北中医杂志, 2005, 27(8): 7-8.
- [8] 黄正明, 杨新波. 抗肝炎中药现代研究与应用[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2006.

- [9] 陈科力. 易休几种中药的保肝作用研究进展[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2012, 33(4): 51-56.
- [10] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖的保肝与催眠作用[J]. 食用菌, 2003, 25(S1): 46-47.
- [11] 王振海, 安锡忠, 任增超. 泽泻对大鼠急性肝脏损伤的保护作用[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(9): 56-57.
- [12] 李继承, 吕志连, 石元和, 等. 中药对腹膜孔调控作用的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(8): 20-22.
- [13] 耿放, 孙虔, 杨莉, 等. 车前子与车前草利尿作用研究[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(8): 72-74.
- [14] 兰凤英, 何静春, 赵颖, 等. 郁金抗四氯化碳致小鼠急性肝损伤的作用[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(5): 444-446.
- [15] 王曙东, 周军. 丹参及其制剂的药理研究及临床应用[J]. 中国中医药科技, 2000(4): 270-271.
- [16] 曾星华, 陈晓丽, 刘飞跃. 中西医结合治疗肝硬化腹水 34 例临床观察[J]. 实用中西医结合临床, 2012, 12(1): 31-33.

(2014-03-12 收稿 责任编辑:张文婷)