

中药熏蒸联合 Infliximab 治疗类风湿性关节炎疗效及与 TNF- α 基因-238 位点单核苷酸多态性的相关性

崔永建¹ 张红霞² 王 英¹ 李 艳³

(新疆医科大学第六附属医院风湿免疫科¹, 中医科², 急诊科³, 乌鲁木齐, 830002)

摘要 目的: 观察中药熏蒸联合 Infliximab 治疗类风湿性关节炎疗效, 并探讨其疗效与 TNF- α 基因-238 位点单核苷酸多态性的相关性。方法: 随机选取 2014 年 8 月至 2016 年 4 月于我院内分泌科门诊及住院部就诊的脑中风患者 110 例, 以甲氨蝶呤片基础治疗基础上采用中药熏蒸联合 Infliximab 治疗类风湿性关节炎。治疗前和最后一次治疗后, 采用 28 处关节疾病活动度 (DAS28) 和健康评估问卷 (HAQ) 评定, 作为 RA 患者疗效的评定标准。采用高通量荧光 PCR 检测 TNF- α 基因-238 位点单核苷酸多态性。结果: 中药熏蒸联合 Infliximab 治疗 RA, 治疗后 DAS28 评分和 HAQ 评分均比治疗前低 ($P < 0.05$), 说明中药熏蒸联合 Infliximab 能有效治疗 RA。而在 TNF- α 基因-238 位点单核苷酸多态性中仅 GG 基因型治疗后 DAS28 评分和 HAQ 评分均低于治疗前 ($P < 0.05$), 而 AA 基因型和 AG 基因型在这两项评分中差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。中药熏蒸联合 Infliximab 治疗后临床缓解情况, TNF- α 基因-238 位点单核苷酸 GG 型 84 例, AG 型 5 例, AA 型 2 例, GG 型的临床缓解率显著高于 AG 型 ($\chi^2 = 26.134, P = 0.000 < 0.05$) 和 AA 型 ($\chi^2 = 44.872, P = 0.000 < 0.05$)。结论: 中药熏蒸联合 Infliximab 能有效治疗 RA, 且其疗效与 TNF- α 基因-238 位点的单核苷酸基因多态性可能相关, 其中对 GG 型治疗效果最佳, 而 AG 型和 AA 型疗效反应则相对较差。

关键词 中药熏蒸; Infliximab; 类风湿性关节炎; TNF- α 基因-238 位点单核苷酸多态性

Efficacy of Chinese Medicinal Fumigation Combined with Infliximab in Treatment of Rheumatoid Arthritis and Its Correlation with the TNF- α gene-238 Gene Single Nucleotide Polymorphism

Cui Yongjian¹, Zhang Hongxia², Wang Ying¹, Li Yan³

(Xinjiang Medical University Sixth affiliated Hospital ¹ Rheumatology Department; ² Chinese Medicine Department; ³ Emergency Department, Urumqi 830002, China)

Abstract Objective: To observe the curative effect of Chinese medicinal fumigation combined with Infliximab in the treatment of rheumatoid arthritis, and to explore the correlation between the curative effect and the single nucleotide polymorphism of-238 gene TNF- α locus. **Methods:** There were 110 cases of stroke patients in endocrinology clinic and inpatient department in our hospital during August 2014 to April 2016. The rheumatoid arthritis patients were treated with Chinese medicinal fumigation combined with Infliximab on the basis of Methotrexate Tablets. And 28 joint disease activity (DAS28) and health assessment questionnaire (HAQ) were used to assess the efficacy of RA patients before and after the treatment. Detection of single nucleotide polymorphism of-238 gene in TNF- α gene was performed by high throughput fluorescence PCR. **Results:** The DAS28 score and HAQ score were lower after treatment ($P < 0.05$), which showed that Chinese medicinal fumigation combined with Infliximab can effectively treat RA. And in TNF- α gene 238 single nucleotide polymorphisms, only GG genotype's DAS28, HAQ scores dropped after treatment ($P < 0.05$), and AA and AG genotypes had no significant differences in the two scores ($P > 0.05$). As for Chinese medicinal fumigation treatment combined with Infliximab clinical remission, there were 84 cases of TNF- α gene 238 nucleotide GG genotype, 5 cases AG type and 2 cases AA type, GG type of clinical remission rate was significantly higher than that of AG ($\chi^2 = 26.134, P = 0.000 < 0.05$) and the AA type ($\chi^2 = 44.872, P = 0.000 < 0.05$). **Conclusion:** Chinese medicinal fumigation and infliximab can be effective in the treatment of RA, and its efficacy may be related to 238 locus and TNF- α gene single nucleotide polymorphism, which could be the best treatment of GG genotype, but the treatment of AG and AA genotype are relatively poor.

Key Words Chinese medicinal fumigation; Infliximab; Rheumatoid Arthritis; TNF- α gene-238 gene single nucleotide polymorphism

中图分类号: R274.9 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.08.013

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种好发于女性的以关节滑膜为主的结缔组织广泛发生的免疫性炎性反应,该病有一定致畸性^[1]。RA的发病机制较为复杂,目前有研究发现细胞因子(如TNF- α 、IL-6等)引起滑膜衬里细胞增殖、微血管新生和单核/巨噬细胞浸润^[2-3],这些产物反作用于免疫细胞,进一步扩大RA自身免疫反应的发生和发展。RA属于中医学中“痹症”“尪痹”和“历节”的范畴,致病因素多因外感风寒湿邪,内致瘀血痹阻,正气不足,本虚标实。目前RA的治疗还是一个医学难题,目前主要以缓解疼痛和保护肌肉关节功能为主要目的,西医疗法多采用抗风湿药(英夫利昔单抗,Infliximab),抗炎药和生物制剂等^[4],而中医疗法采用中药熏蒸、针灸拔罐、中药辨证治疗等^[5]。中药熏蒸是通过煎煮药物产生药物蒸汽,蒸汽熏疗全身或者患处,促进患者机体功能的恢复,该疗法疗效颇佳、不良反应较少,适宜推广应用。研究表明中药熏蒸疗法有效治疗RA^[6],且能够降低促炎性细胞因子肿瘤细胞因子(TNF- α)水平^[7]。Infliximab已被证实联合甲氨蝶呤能够迅速改善RA患者的临床症状,降低其TNF- α 的表达水平,然而研究中也显示虽然Infliximab未见明显不良反应^[8],但是有效率仅约66.7%,可能与TNF- α 基因-238位点单核苷酸多态性的相关^[9]。因此,本研究采用中药熏蒸联合Infliximab治疗RA,旨在观察其疗效,并探讨其疗效与TNF- α 基因-238位点单核苷酸多态性的相关性。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取2014年8月至2016年4月,于我院风湿科门诊及住院部就诊的类风湿关节炎患者110例,其中女81例,男29例;年龄18~76岁,平均年龄(35.04 $\pm$ 9.31)岁;平均病程(6.92 $\pm$ 4.57)年。

1.2 诊断标准 类风湿关节炎西医诊断,参照2009年ACR和EULAR联合颁布的RA诊断标准^[10];中医参照2002年试行《中药新药临床研究指导原则》^[11]中RA中医辨证分型。

1.3 纳入与排除标准 纳入标准:1)符合上述诊断标准;2)符合类风湿关节炎活动期判断标准;3)受试者自愿并签署知情同意书的患者;4)对临床实验研究意义有正确认识,对研究人员的观察和评价有良好的依从性;5)停用本研究未提及的其他类抗类风湿关节炎药物至少1个月以上。

排除标准:1)不符合上述诊断标准和纳入标准

的患者;2)1个月内接受过皮质类固醇关节腔内注射治疗;3)既往有活动性结核病史或正处感染期;4)合并有心脑血管、肝、肾和造血系统等严重危及生命的原发性疾病以及精神病患者。

1.4 治疗方法 1)基础治疗:甲氨蝶呤片(由通化茂祥制药有限公司提供,规格:2.5 mg,批号:H22022674),每周10 mg/次。2)中药熏蒸:应用我科常用类风湿I方,药物组成为制川乌20 g、制草乌20 g、透骨草30 g、海风藤30 g、鸡血藤30 g、青风藤30 g、羌活20 g、独活20 g、细辛10 g、土鳖虫15 g、桂枝15 g、防风15 g。所有中药由我院中药房提供。用纱布包裹将类风湿I方并置于中药汽疗仪(厂家:深圳市中新浩医学科技有限公司,型号:SH-800P-7型),中药汽疗仪将药物煮沸后,将蒸汽温度设为38℃,嘱患者躺入仪器中,露出头颈部,熏蒸20 min。1次/d,5 d为1个疗程,间隔2 d,治疗14周。3)Infliximab静脉输注:分别于第0、2、6、14周给患者静脉输注3 mg/kg的Infliximab(中文名:英夫利昔单抗,商品名:类克,厂家:武汉瑞立升科技发展有限公司,批号:CB01027020)。

1.5 疗效评估 治疗前和最后一次治疗后,采用28处关节疾病活动度(DAS28)和健康评估问卷(HAQ)评定,作为RA患者疗效的评定标准。根据美国风湿病学会中RA临床缓解标准,本研究患者HAQ整体评估 ≤ 1 ,治疗前和最后一次治疗后实验室检查中的红细胞沉降率(ESR):男性 < 20 mm/h,女性 < 15 mm/h和C反应蛋白(CRP): ≤ 1 mg/dL,结合关节的肿胀和疼痛数量均 ≤ 1 。采集患者静脉血3 mL以检测类风湿因子等一般情况。

1.6 TNF- α 基因-238位点单核苷酸多态性检测 治疗前和最后一次治疗后采集患者静脉血5 mL于EDTA抗凝管,严格遵循微量全血基因组DNA提取试剂盒(货号:DP1101,北京博凌科为生物科技有限公司)说明书提取全血DNA, -80℃保存代用。TNF- α 基因-238和磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物和探针序列设计和产品生成均由上海生工负责,TNF- α 基因-238和GAPDH探针引物序列见表1。根据购于美国ABI公司的TNF- α 基因-238的探针MGB等位基因分型试剂盒逐步操作,最终在高通量荧光定量PCR仪(型号:PRISM 7900型,美国应用生物系统公司上海分公司)进行预变性、变性、退火延伸、循环再延伸的PCR反应,再以SDS 2.0软件以上述获得结果进行基因分型。

1.7 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件进行

统计学处理,计量资料以(均数±标准差)表示,组间比较当方差齐时采用方差分析或 *t* 检验,不齐采用秩和检验;组内用配对 *t* 检验进行组间分析。计数资料采用非参数卡方等检验。相关性分析采用 Pearson 检验。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

表 1 TNF-α 基因-238 和 GAPDH 探针引物序列

名称	正反相	序列
TNF-α 基因-238 引物	正相	5'-AGAAGAC2CCCCTCGGAACC-3'
	反相	5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3'
TNF-α 基因-238 探针		5'-(FAM)-TCGTCATCTCTGAGGACAT-CACATCATCT(MGB)-3'
GAPDH 引物	正相	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
	反相	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
GAPDH 探针		5'-(FAM)-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC(TRAMA)-3'

2 结果

2.1 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性含有 GG 型、AG 型和 AA 型,分别有 91、12、7 例,其分型占比和各等位基因频率。见图 1。

2.2 各基因分型 RA 患者一般情况 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸各基因型间的年龄和病程差异无统计学意义(*P* > 0.05),而性别、类风湿因子阳性和 X 线片分期差异均有统计学意义(*P* < 0.01),说明女性较男性患 RA 的概率高,以中后期患者为主,及大多数患者能检测出类风湿因子阳性,对 RA 的诊断具有代表性。见表 2。

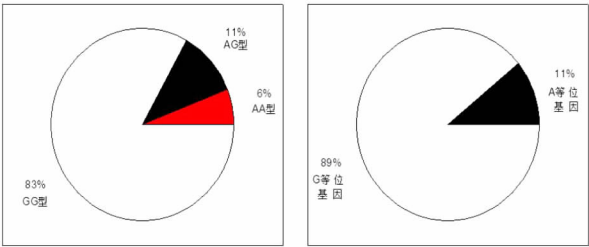


图 1 TNF-α 基因-238 的分型比例和等位基因频率

表 2 各基因分型 RA 患者一般情况比较

项目	GG 型(91)	AG 型(12)	AA 型(7)	χ ² / <i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)	34.82 ± 10.24	35.17 ± 8.65	35.64 ± 7.98	5.35	0.879
性别(男/女)	25/66	3/9	1/6	24.58	0.000
病程(年)	6.84 ± 3.37	7.03 ± 4.11	6.96 ± 4.26	6.136	0.824
类风湿因子(阳性/阴性)	76/15	9/3	6/1	47.13	0.000
X 线片分期				38.34	0.000
I 期	6	2	1		
II 期	57	5	2		
III 期	18	4	3		
IV 期	10	1	1		

2.3 中药熏蒸联合 Infliximab 治疗 RA 疗效及与 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性的相关性 中

药熏蒸联合 Infliximab 治疗 RA,治疗后 DAS28 评分和 HAQ 评分均比治疗前低(*P* < 0.05),说明中药熏蒸联合 Infliximab 能有效治疗 RA。而在 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性中仅 GG 基因型治疗后 DAS28 评分和 HAQ 评分均低于治疗前(*P* < 0.05),而 AA 基因型和 AG 基因型在这 2 项评分中差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 3。

2.4 中药熏蒸联合 Infliximab 治疗 RA 后 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性各基因型的临床缓解率

中药熏蒸联合 Infliximab 治疗后临床缓解情况, TNF-α 基因-238 位点单核苷酸 GG 型 84 例,AG 型 5 例,AA 型 2 例,GG 型的临床缓解率显著高于 AG 型($\chi^2 = 26.134, P = 0.000 < 0.05$)和 AA 型($\chi^2 = 44.872, P = 0.000 < 0.05$)。见图 2。

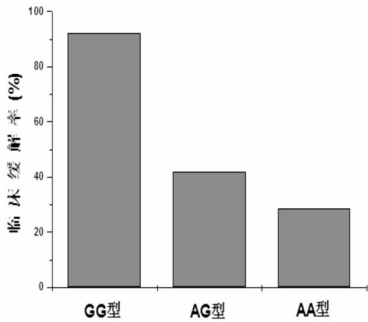


图 2 中药熏蒸联合 Infliximab 治疗 RA 后 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性各基因型的临床缓解率

2.5 安全性分析 严格无菌操作进行静脉输注、规范的中药熏蒸流程均未出现不良事件,安全性良好。

3 讨论

《黄帝内经》云:“风寒湿三气杂至合而为痹也。其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为着痹也”,由此可知中医学的 RA 主要由风寒湿邪引起的。《黄帝内经》提出“其邪者,渍形以为汁”,此处的“渍形”即中药熏蒸。人体皮肤的表面积最大,通过对药物的煮沸熏蒸肌肤,药物中的有效成分在蒸汽的作用下被人体透皮吸收,已达到治疗作用;同时蒸汽促进全身或局部血液循环,加速组织新陈代谢排出炎症反应物质。中药熏蒸属于中药外治的范畴,本研究中所用中药以祛风湿止痹痛为主,制川乌、制草乌、羌活、独活、细辛、桂枝、防风,祛风寒湿邪,此类药物具有抗炎止痛解痉的作用;配伍活血祛瘀类药物透骨草、土鳖虫,改善全身和局部的血液循环,通则不痛;佐藤类药物海风藤、鸡血藤、青风藤,疏通经络,祛除风湿。

RA 是一种致残率较高的自身免疫性疾病,多累及关节滑膜,长期可能引起关节软骨和骨头的破坏。

表3 中药熏蒸联合 Infiximab 治疗 RA 疗效及与 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性的相关性

基因分型	DAS28 评分		t/P	HAQ 评分		t/P
	治疗前	治疗后		治疗前	治疗后	
GG 型	6.13 ± 1.08	2.87 ± 0.94	18.139/0.000	2.34 ± 1.05	1.16 ± 0.55	10.083/0.000
AG 型	6.27 ± 2.15	5.18 ± 2.06	5.884/0.722	2.29 ± 0.94	2.02 ± 0.68	4.982/0.641
AA 型	6.33 ± 2.24	5.42 ± 1.97	6.241/0.813	2.37 ± 0.89	2.10 ± 0.47	5.018/0.704
合计	6.24 ± 1.82	3.49 ± 1.07	16.882/0.000	2.33 ± 0.96	1.34 ± 0.50	9.436/0.000

TNF-α 是一种参与各种免疫和炎性反应的促炎性细胞因子,当其过表达时打破机体内免疫平衡状态,促进 RA 患者滑膜内炎性反应,造成软骨和骨的损伤。动物实验显示^[12]采用 TNF-α 单克隆抗体治疗 RA 模型鼠可以缓解的关节炎症反应等症状,而作为人鼠嵌合 TNF-α 单克隆抗体的 Infiximab,其疗效和安全性被许多研究证实^[5,13-14]。然而其无效率(33.3%)略高^[8],因此假如可以预先排出这部分 Infiximab 治疗无效的患者,将能节约大量的医疗资源,同时也使患者减轻不必要的经济负担和避免延误患者病情。

本研究结果显示,中药熏蒸联合 Infiximab 治疗 RA,治疗后 DAS28 评分和 HAQ 评分均比治疗前低($P < 0.05$),说明中药熏蒸联合 Infiximab 能有效治疗 RA。而在 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性中仅 GG 基因型治疗后 DAS28 评分和 HAQ 评分均低于治疗前($P < 0.05$),而 AA 基因型和 AG 基因型在这 2 项评分中差异均无统计学意义($P > 0.05$)。中药熏蒸联合 Infiximab 治疗后临床缓解情况, TNF-α 基因-238 位点单核苷酸 GG 型 84 例,AG 型 5 例,AA 型 2 例,如图 2 所示,GG 型的临床缓解率显著高于 AG 型($\chi^2 = 26.134, P = 0.000 < 0.05$)和 AA 型($\chi^2 = 44.872, P = 0.000 < 0.05$)。研究报道发现^[15-16]Infiximab 对 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸中 AG 基因型的疗效相对 GG 型较差,显示 Infiximab 治疗 RA 的疗效与 TNF-α-238 基因多态性有关,与本研究结果相似。

由此,本研究初步表明,中药熏蒸联合 Infiximab 能有效治疗 RA,减轻 RA 的临床症状,且 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性与中药熏蒸联合 Infiximab 的疗效相关,未来将进一步研究 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性对中药熏蒸联合 Infiximab 治疗 RA 疗效的预测价值,通过检查 TNF-α 基因-238 位点单核苷酸多态性,选择 GG 型进行本研究治疗方案疗效较佳。

参考文献

[1]张徐明,刘群,吴頔,等. 甲氨蝶呤与依那西普联用对类风湿关节炎患者的临床疗效及安全性分析[J]. 抗感染药学,2015,12(6):

996-998.
[2]王国华. 类风湿关节炎免疫发病机制研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2010,19(3):309-312.
[3]Yen JH,Chen CJ,Tsai WC,et al. Tumor necrosis factor microsatellite alleles in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan[J]. Immunol Lett,2002,81(3):177-182.
[4]Rezaieyazdi Z,Afshari JT,Sandooghi M,et al. Tumour necrosis factor a-308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis [J]. Rheumatol Int,2007,28(2):189-191.
[5]邵璟. 中药熏蒸辅助西药治疗类风湿性关节炎临床分析[J]. 内蒙古中医药,2015,34(3):57.
[6]刘明岭,沈鹰. 中药熏蒸治疗类风湿性关节炎的临床观察[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1466-1471.
[7]于水莲. 中药熏蒸治疗类风湿性关节炎临床及动物实验研究 [D]. 广州:广州中医药大学,2009.
[8]刘丽丹. 英夫利西单抗和甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎有效性和安全性的 Meta 分析[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2012.
[9]谢宝钊,黄建林,王明霞,等. 广东汉族类风湿关节炎患者肿瘤坏死因子 α 启动子区单核苷酸多态性与肿瘤坏死因子 α 拮抗剂疗效的关系[J]. 中国新药与临床杂志,2011,20(11):862-867.
[10]陶惠红,倪卫红,周健. 类风湿性关节炎最新诊断标准在社区医疗机构普及的研究[J]. 山西医药杂志,2011,40(6):605-606.
[11]李攻成. 从技术评价角度对合理应用《中药新药临床研究指导原则》的几点思考[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(4):319-321.
[12]刘建,朱静. 抗肿瘤坏死因子 α 单克隆抗体治疗类风湿性关节炎临床应用体会[J]. 川北医学院学报,2008,23(5):477-479.
[13]邓梅,韩志伟,马大卫. 英夫利西单抗联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎的疗效观察[J]. 泸州医学院学报,2013,36(2):157-160.
[14]Kim SK,Choe JY,Bae J,et al. TNFAIP3 gene polymorphisms associated with differential susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Korean population[J]. Rheumatology (Oxford),2014,53(6):1009-1013.
[15]Laivoranta-Nyman S,Möttönen T,Hannonen P,et al. Association of tumour necrosis factor a,b and c microsatellite polymorphisms with clinical disease activity and induction of remission in early rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol,2006,24(6):636-642.
[16]Balog A,Klausz G,Gál J,et al. Investigation of the prognostic value of TNF-alpha gene polymorphism among patients treated with infliximab,and the effects of infliximab therapy on TNF-alpha production and apoptosis[J]. Pathobiology,2004,71(5):274-280.