文章编号:1000-5404(2005)15-1573-03

论著

青藤碱对类风湿关节炎患者炎性细胞因子及抗环瓜氨酸肽抗体的影响

王 勇,钟 兵,方勇飞,李景怡,艾九松 (第三军医大学西南医院中医科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨青藤碱对类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者血清中炎性细胞因子如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-10(IL-10)及抗环瓜氨酸肽抗体(抗CCP抗体)的影响。**方法** 以健康成人为正常对照组,用双抗体夹心法(ELISA)检测活动性类风湿关节炎患者予青藤碱或甲氨喋呤治疗前及治疗1、2个月时血清中TNF-α、IL-1β、IL-10的含量及抗CCP抗体的滴度。**结果** 与正常对照组相比,RA患者血清中TNF-α、IL-1β含量明显增加($P<0.01$),IL-10的含量无明显变化。青藤碱及甲氨喋呤能显著降低RA患者血清中IL-1β、TNF-α的含量($P<0.01$),而对IL-10的含量及抗CCP抗体的滴度无明显作用($P>0.05$)。**结论** 青藤碱可通过降低RA患者中血清TNF-α、IL-1β的含量而治疗类风湿关节炎。

关键词: 关节炎;类风湿;青藤碱;肿瘤坏死因子;白细胞介素-1β

中图法分类号: R282.71; R392.11; R593.22 **文献标识码:** A

Effects of sinomenine on inflammatory cytokines and anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis

WANG Yong, ZHONG Bing, FANG Yong-fei, LI Jing-yi, AI Jiu-song (Department of Traditional Chinese Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of sinomenine (SN) on the inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-10 (IL-10), and anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP) in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Eight healthy adults were enrolled as normal controls (negative control, NC), eight active RA patients without any treatment as controls to those treated with SN ($n=8$) or MTX ($n=7$). The levels of TNF-α, IL-1β, IL-10 and anti-CCP were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) before treatment or after 1 month and 2 months. **Results** The levels of TNF-α and IL-1β in RA patients without any treatment were significantly higher than those in NC group ($P<0.01$), but no difference in IL-10 was shown. SN and MTX significantly decreased the serum levels of TNF-α and IL-1β in active RA patients ($P<0.01$) and had no effect on IL-10 level and anti-CCP relative units ($P>0.05$) as compared to active RA patients without any treatment. **Conclusion** SN could treat RA by decreasing serum levels of TNF-α and IL-1β in patients with RA.

Key words: rheumatoid arthritis; sinomenine; tumor necrosis factor-α; interleukin-1β

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以对称性多关节炎为主要临床表现的异质性、系统性疾病,在发病2年内即可出现不可逆的骨关节破坏。其发病机制较为复杂,迄今尚未阐明。青藤碱(sinomenine, SN)是从中药青风藤(sinomenium acutum Rehd et Wils)中提取的生物碱单体。它具有抗炎、免疫抑制、镇痛、降压、抗心律失常等药理作用。在治疗RA方面,该药具有较明确的疗效,在临床上得到了广泛的应用。前期研究表明,体外一定浓度的SN可通过抑制核因子-kappa B活性而降低大鼠巨噬细胞及滑膜细胞内TNF-α mRNA及IL-1β mRNA的表达[1,2]。因此,本研究从临床研究的角度探讨SN对RA患者血清中炎

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300452);重庆市卫生局中医药科研资助项目(2003C77)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300452) and the Foundation for Traditional Chinese Medicine Project of Bureau of Public Health of Chongqing (2003C77)

作者简介: 王 勇(1970-),男,湖南省吉首市人,硕士,副教授,主要从事类风湿关节炎及抗炎免疫方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68765206

收稿日期: 2004-10-19;**修回日期:** 2004-12-21

性相关的细胞因子如肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素 -1β（IL-1β）、白细胞介素-10（IL-10）及抗环瓜氨酸肽抗体（anti-cyclic citrullinated peptide antibody，anti-CCP）的影响，初步阐释 SN 治疗 RA 的机制。

1 对象与方法

1.1 对象

健康成年人 8 例（为本科室医生及护士）设为正常对照组，其中男 5 例，女 3 例。活动性 RA 患者 36 例，均为 2003 年 9 月至 2004 年 3 月在第三军医大学西南医院风湿科住院诊治的患者，病程为 5 年以内，全部符合 1987 年美国风湿病协会的 RA 分类标准。36 例中男 10 例，女 26 例，年龄 18～61 岁。排除未按时服药或未抽血者，选 8 例为 RA 未用药组（用药前），7 例为甲氨喋呤（MTX）治疗组（阳性对照组），8 例为 SN 治疗组（选自湖南正清制药集团，批号：0308115）。其中 SN 用法：60 mg 口服 2 次/d；甲氨喋呤用法：7.5 mg 口服 1 次/周，两组均服非甾体消炎药乐松 60 mg 口服 3 次/d。于 SN 或 MTX 治疗前及治疗 1、2 个月时抽血留血清样本，置 -20 ℃度低温冰箱保存待测。

1.2 观测指标

1.2.1 TNF-α、IL-1β、IL-10 的检测 采用双抗体夹心法（ELISA）法。试剂购自荷兰 DIACLONE 公司，严格按试剂盒说明书操作。结果用美国 Bio-Rad Model 550 酶标仪检测。用直线回归方程计算出细胞因子的血清含量，结果单位为 pg/ml。IL-1β、TNF-α 及 IL-10 最小可检测范围为 5 pg/ml。

1.2.2 anti-CCP 的检测 采用美国 INOVA 公司的 ELISA 试剂盒。患者待测血清按 1∶101 稀释，结果单位为 relative units（RU）。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 8.0 统计软件包进行。组间数据先作方差齐性检验，若方差齐性，多组数据显著性差异用单因素方差分析，与 RA 未用药组相比，组间比较用 Dunnett's t 检验。若方差不齐，组间比较用 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 SN 或 MTX 治疗后血清中 TNF-α 的含量

正常人中有 1 例样本检测不出，余样本检测出低水平的 TNF-α，RA 未用药组中检测出高水平的 TNF-α，两组有显著性差异（$P<0.01$）。经予 SN 或 MTX 治疗后 1 个月或 2 个月时 TNF-α 的含量较 RA 未用药组明显下降（$P<0.01$），见表 1。

2.2 SN 或 MTX 治疗后血清中 IL-1β 的含量

正常对照组中仅在第 4 号样本可检测出低水平的 IL-1β 的含量，为 5.2 pg/ml，余样本均检测不出 IL-1β 的含量。RA 未用药组有相对较高的 IL-1β 的表达，为 11.42（4～23）pg/ml。经予 SN 或 MTX 治疗后 1 个月或 2 个月时 IL-1β 由于含量极低，无法检测出（Kruskal-Wallis 检验示 $\chi^2=33.30$，$P=0.000$）。

2.3 SN 或 MTX 治疗后血清中 IL-10 的含量

正常对照组检测出低水平的 IL-10，为（9.15 ± 2.22）pg/ml，RA 未用药组含量为（24.24 ± 31.84）pg/ml。两组数据无显著性差异（$P>0.05$）。经予 SN 或 MTX 治疗后 1 个月或 2 个月时 IL-10 无明显下降（$P>0.05$），见表 1。

表 1 SN 或 MTX 治疗后血清中 TNF-α、IL-10 的含量（ρ_B/pg · ml^{-1}）

Tab 1 Serum level of TNF-α and IL-10 after SN or MTX treatment（ρ_B/pg · ml^{-1}）

Group	TNF-α		IL-10	
	n	value	n	value
Negative control	8	17.05 ± 11.27	8	9.15 ± 2.22
RA without any treatment	8	116.9 ± 69.40	8	24.24 ± 31.84
RA + MTX 1 month	7	18.34 ± 10.06	6	18.67 ± 11.99
RA + MTX 2 months	7	17.64 ± 17.16	6	13.93 ± 4.94
RA + SN 1 month	7	28.09 ± 12.44	6	15.33 ± 4.54
RA + SN 2 months	7	19.96 ± 20.33	6	13.37 ± 9.51

Kruskal-Wallis test showed $\chi^2 = 18.14$, $P = 0.003$; One-way ANOVA test showed $F = 0.405$, $P = 0.839$

2.4 SN 或 MTX 治疗后血清中抗 CCP 抗体的相对单位

正常对照组中抗 CCP 抗体的滴度均小于 20 RU，RA 未用药组中有 7 人检测出抗 CCP 抗体阳性，滴度与正常对照组相比明显升高（$P<0.05$）。经予 SN 或 MTX 治疗后 1 个月或 2 个月时抗 CCP 抗体无明显下降（$P>0.05$），见表 2。

表 2 青藤碱或甲氨喋呤治疗后血清中的抗 CCP 抗体的相对单位（RU，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 Serum relative units of anti-CCP antibody after SN or MTX treatment（RU，$\bar{x} \pm s$）

Group	n	Anti-CCP
Negative control	8	12.87 ± 4.16 *
RA without any treatment	8	103.25 ± 72.82
RA + MTX 1 month	7	120.71 ± 74.21
RA + MTX 2 months	7	113.00 ± 61.20
RA + SN 1 month	8	99.25 ± 66.55
RA + SN 2 months	8	95.75 ± 69.55

One-way ANOVA test showed $F = 3.057$, $P = 0.020$. *: $P<0.05$, *vs* RA without any treatment (Dunnett's t-test).

3 讨论

RA 为一种自身免疫介导的炎症性疾病。有研究表明，RA 患者的外周血单核细胞及关节滑膜细胞能分泌高表达量的 IL-1β 与 TNF-α，这两种细胞因子相互协调，共同促进，在 RA 的急性滑膜炎症、滑膜纤维化、骨和软骨破坏等病情进展中起主导作用，且与 RA 的病情活动有关[3]。针对致炎因子，机体有一系列抑

制剂，IL-10 作为重要的抑炎性细胞因子正日益受到人们的关注[4]。我们以往的动物实验研究表明，体外运用一定浓度的青藤碱可通过抑制核因子-kappa B 活性而降低大鼠巨噬细胞及滑膜细胞内 TNF-α mRNA、IL-1β mRNA 及 IL-10 mRNA 的表达[1,2]。因此，中药青藤碱单体在临床上运用可否通过调控炎性相关的细胞因子 TNF-α、IL-1β 及 IL-10 而治疗类风湿关节炎，这是一个值得探讨的问题。

MTX 为经典的治疗 RA 的慢作用抗风湿药。体内及体外实验均表明，该药可抑制 RA 患者外周血单个核细胞分泌 IL-10 及脂多糖的促分泌作用，在高浓度(15 mg/L)对 TNF-α 也有较强的抑制作用，对 RA 起效时间一般为用药后 1～1.5 个月[5]。因此，我们选 MTX 为阳性对照，观察时间选用治疗后 1 个月及 2 个月两个时间点。另外，乐松(洛索洛芬钠)为苯丙酸非甾体类抗炎镇痛药，通过抑制环氧化酶的合成从而减少前列腺素的生成，也可抑制血管内皮生长因子的合成而限制移植的小鼠 Lewis 肺肿瘤的生长，对 TNF-α 、IL-1β 及 IL-10 的分泌无影响[6]。为了增加受试者的依从性及缓解关节肿痛症状，我们在 MTX 及 SN 治疗组均使用乐松作为相同的处理因素。初步临床研究显示，与正常对照组相比，RA 未用药组血清中 TNF-α 与 IL-1β 的含量均显著增高($P<0.01$)，经予 MTX 或 SN 治疗后 1 个月或 2 个月时 TNF-α 及 IL-1β 的含量较 RA 未用药组明显下降($P<0.01$)。研究表明，RA 外周血中抗炎因子 IL-10 分泌量增高[3]。但是，Voulgari 等[7]的研究却发现 RA 病人血清中与正常人相比无明显差异，而且，贫血与非贫血患者的血清 IL-10 水平无明显差异(中位数 3 pg/ml，范围 3～128 *vs* 中位数 3 pg/ml，范围 3～197)。本实验中正常对照组样本检测出低水平的 IL-10，为(9.15±2.22) pg/ml。RA 未药组含量为(24.24±31.84) pg/ml。经予 SN 或 MTX 治疗后 1 个月或 2 个月时 IL-10 无明显下降，组间数据无显著性差异($F=0.405$，$P=0.839$)。因此，SN 可抑制血清中 TNF-α 与 IL-1β 的产生而发挥治疗 RA 的疗效，而对 IL-10 无影响。

RA 的特异性抗原环瓜氨酸肽(CCP)现可经人工合成，用 ELISA 方法检测患者血清内的抗 CCP 抗体，对 RA 具有较高的特异性和敏感性。Kroot 等[8]研究发现，在 6 年的随访过程中，RA 患者发生放射学上的骨质破坏可由 IgM-RF、抗 CCP 抗体状态及入组时 X 线片改良的 Sharp 评分数值来预测，抗 CCP 抗体阳性的比阴性的更易发生严重的骨质破坏。我们的研究显示，抗 CCP 抗体与 RF 滴度有显著的正相关，X 线分期有一定的相关性，抗 CCP 抗体强阳性的、滴度高的比阴性的、滴度低的更易发生骨质破坏[9]。本研究 RA 未用药组中有 6 人检测出抗 CCP 抗体阳性，滴度与正常对照组相比明显升高($P<0.05$)。经予 SN 或 MTX 治疗后 1 个月或 2 个月时抗 CCP 抗体无明显下降($P>0.05$)，提示 SN 在短期内对抗 CCP 抗体滴度无明显影响，至于长期的作用及对骨质侵蚀的抑制效果，尚有待进一步观察。

总之，初步的研究显示，SN 可显著降低 RA 患者血清中 IL-1β、TNF-α 的含量，从而治疗类风湿关节炎，而对 IL-10 的含量及抗 CCP 抗体的滴度无明显影响。其深层次的机制及更确切的疗效，尚需更多的入组病例，多中心的合作及较长时间的观察。

参考文献：

[1] 王　勇，方勇飞，周　新，等. 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞表达细胞因子的影响[J]. 中华风湿病学杂志，2003，7(7)：415－419.

[2] 方勇飞，王　勇，周　新，等. 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞因子表达的影响[J]. 医药导报，2003，22(8)：519－521.

[3] Dayer J M. The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2004, 18(1): 31－45.

[4] 周惠琼，陈仁涉. 白介素-10 治疗类风湿性关节炎的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册，2000，21(4)：169－170.

[5] 王志坚，万军梅. 氨甲喋呤对类风湿性关节炎患者外周血单个核细胞产生细胞因子的影响[J]. 中国药理学通报，1998，14(4)：367－369.

[6] Kanda A, Ebihara S, Takahashi H, *et al*. Loxoprofen sodium suppresses mouse tumor growth by inhibiting vascular endothelial growth factor [J]. Acta Oncol, 2003, 42(1): 62－70.

[7] Voulgari P V, Kolios G, Papadopoulos G K, *et al*. Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis [J]. Clin Immunol, 1999, 92(2): 153－160.

[8] Kroot E J, de Jong B A, van Leeuwen M A, *et al*. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(8): 1831－1835.

[9] 王　勇，方勇飞，钟　兵. 类风湿关节炎诊断中抗环瓜氨酸肽抗体与类风湿因子的意义[J]. 中国临床康复，2004，8(9)：1616－1617.

(编辑　龙　亮)