

· 论著 ·

新风胶囊对类风湿性关节炎补体调节蛋白 红细胞 CR1 及 CD59 的影响

刘 健¹, 郭 雯¹, 翟志敏²

(1. 安徽中医学院第一附属医院风湿科, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽省立医院中心实验室)

【摘要】 目的:探讨新风胶囊对类风湿性关节炎(RA)补体调节蛋白的影响及其作用机制。方法:将 40 例 RA 患者按随机数字表分为新风胶囊实验组(20 例)和正清风痛宁对照组(20 例),并设 10 名健康者为健康对照组,观察两组 RA 患者治疗前后补体调节蛋白红细胞 CR1、CD59 以及临床症状、体征关节疼痛度、关节肿胀度、关节压痛度、晨僵时间、握力、步行 15 m 时间和实验室指标[血沉(ESR),类风湿因子滴度(RF),C-反应蛋白(CRP),补体 C3、C4,免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA, α_1 -糖酸蛋白(α_1 -AGP),红细胞计数(RBC)]的改善情况。结果:RA 患者治疗前红细胞 CR1 与 CD59 表达水平均显著低于健康对照组(P 均 <0.05);治疗后两组 RA 患者临床症状、体征及实验室指标均较治疗前有明显改善(P 均 <0.05),其中实验组关节疼痛度、晨僵时间、双手平均握力、15 m 步行时间及 ESR、补体 C3、RBC 改善程度均较对照组显著(P 均 <0.05 或 P 均 <0.01)。两组治疗后红细胞 CR1、CD59 均比治疗前显著升高(P 均 <0.05),治疗后实验组的红细胞 CR1、CD59 均值均显著高于对照组(P 均 <0.01)。结论:新风胶囊能有效提高体内过低的补体调节蛋白红细胞 CR1、CD59 含量,进而抑制过亢的体液免疫反应,使补体有效清除体内循环免疫复合物,并减少补体对自身细胞的攻击损伤,从而控制病情活动,这也是其治疗 RA 的机制之一。

【关键词】 类风湿关节炎;红细胞;补体调节蛋白;CR1;CD59

中图分类号:R285.6;R593.22 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2006)04-0240-04

Influence of Xinfeng capsule (新风胶囊) on complement regulator protein erythrocyte CR1 and CD59 in patients with rheumatoid arthritis LIU Jian¹, GUO Wen¹, ZHAI Zhi-min². 1. Department of Rheumatoid diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Traditional Chinese Medical College, Hefei 230031, Anhui, China; 2. Central Laboratory, Anhui Municipality Hospital, Hefei 230001, Anhui, China

【Abstract】 Objective: To observe the influence of Xinfeng capsule (新风胶囊, XFC) on complement regulator protein erythrocyte CR1 and CD59 in patients with rheumatoid arthritis (RA), and investigate the mechanism of XFC therapeutic effect. **Methods:** Forty cases of RA were randomly divided into XFC group (experimental group, $n=20$) and Zhengqing Fengtongning (正清风痛宁) group (control group, $n=20$), and 10 healthy volunteers were set up as a normal control group. The expression of complement regulator protein CR1 and CD59, the clinical symptoms, physical signs, the degree of joint pain and joint swelling, time of morning stiffness, average grip strength of both hands, time of walking for 15 miles and laboratory indexes including erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor (RF), C-reactive protein (CRP), immunoglobulin G (IgG), IgM, IgA, α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP) and red blood cell (RBC) count of patients with RA were observed before and after the treatment in the two groups. **Results:** The levels of expression of erythrocytes CR1 and CD59 in patients with RA before treatment were lower than those in normal controls (both $P < 0.05$). After treatment, the clinical symptoms, physical signs and laboratory indexes of patients with RA in the two groups were both improved than those of pretreatment, and the treatment groups were improved markedly on the degree of joint pain, time of morning stiffness, average grip strength, time of walking 15 miles, ESR, levels of complement C3 and RBC count in comparison with those of the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the levels of erythrocyte CR1 and CD59 of the two treatment groups were significantly higher than those of pretreatment (all $P < 0.05$), and levels in the experimental treatment group were very significantly higher than those of the control group (all $P < 0.01$). **Conclusion:** XFC can regulate the disorder of immune system, improve the over-lower levels of complement regulator protein CR1 and CD59, inhibit the excessive humoral immunity reaction, promote the complement to eradicate the circulating immune complexes in the body, decrease the attack of the complement toward autologous cells, so it can control the disease activity and these may be one of the mechanisms for treating RA.

【Key words】 rheumatoid arthritis; erythrocyte; complement regulator protein; CR1; CD59

我们前期有关类风湿性关节炎(RA)的研究已经显示新风胶囊能明显提高 RA 患者的临床疗效,改善患者晨僵、关节疼痛、肿胀、压痛等体征,提高关节功能,降低体液免疫反应指标,维持 T 细胞亚群 OKT4/OKT8 的平衡^[1];其机制在于降低 RA 滑膜细胞、胸腺淋巴细胞线粒体病变^[2],降低滑膜和胸腺细胞的 Bcl-2 和 Fas 表达量,减少细胞凋亡率^[3]。近年来发现,CR1 与 CD59 在补体调节过程中起着主要的作用^[4]。本研究中通过观察红细胞 CR1 与 CD59 在 RA 中的表达,探讨其与 RA 发病的关系,并观察新风胶囊的疗效及其对补体调节蛋白 CR1 和 CD59 的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象:40 例 RA 患者为 2005 年 3—10 月我科门诊及住院患者。按照随机数字表法分成实验组和对照组两组;实验组 20 例中男 4 例,女 16 例;年龄 19~68 岁,平均(46.96±16.52)岁;平均病程(5.38±1.15)年;对照组 20 例中男 4 例,女 16 例;年龄 21~66 岁,平均(52.31±13.67)岁;平均病程(4.78±0.86)年。全部患者均符合美国风湿病学会 1987 年 RA 诊断标准^[5]。两组患者年龄、病情、病程等比较差异无显著性($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 健康对照组:选取 10 名与 RA 患者年龄、性别相匹配的健康体检者。

1.3 排除标准:①不符合 RA 诊断标准者;②合并有心血管、肺部、肝脏、肾脏、造血系统等严重疾病以及严重关节外表现,如高热不退、多发类风湿结节、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者;③长期服用有关治疗 RA 的药物,且在本研究前至少 1 周内未停用糖皮质激素、氯喹、柳氮磺胺吡啶、环磷酰胺、青霉胺和金制剂等免疫抑制药或抗癌药如甲氨喋呤(MTX)等者;④年龄<17 岁或>70 岁者;⑤孕妇或哺乳期女性;⑥精神病患者;⑦晚期患者,关节严重畸形、完全丧失关节功能者;⑧RA 研究者认为不宜进行此项临床试验者。

1.4 治疗方法:实验组和对照组两组患者在治疗期间均停用其他慢反应药及糖皮质激素,非甾体类消炎镇痛药及其他对症治疗药物的应用维持不变。实验组服用新风胶囊(安徽中医学院第一附属医院制剂室生产,批号:20050116),每次 3 粒,每日 3 次,

3 个月为 1 个疗程,服用 1 个疗程后评价疗效。新风胶囊组方:黄芪、薏苡仁、蜈蚣等,每粒胶囊含生药浸出物 0.5 g。对照组用正清风痛宁缓释片(湖南正清制药集团股份有限公司生产,批号:0502011),每次 60 mg,每日 2 次,服用时间及疗程同实验组。分别于治疗前后检测各项临床指标及实验室指标。

1.5 观察指标:①临床指标包括 RA 患者年龄、性别、病程、关节症状积分值(关节疼痛度、关节肿胀度、关节压痛度、晨僵时间、握力、步行 15 m 时间);②实验室指标包括补体 C3、C4、类风湿因子滴度(RF)、免疫球蛋白(α_1 IgG、IgM、IgA)、血沉(ESR)、C-反应蛋白(CRP)、 α_1 -糖酸蛋白(α_1 -AGP)、红细胞计数(RBC)、红细胞 CR1 和 CD59;③健康对照组观察红细胞 CR1 和 CD59。

1.5.1 主要症状、体征积分量化标准:参照卫生部《中药新药临床研究指导原则》^[6],关节疼痛是指休息时关节疼痛;其指数为所有关节积分之和。①关节疼痛度:0 分为无疼痛;1 分为轻度疼痛,可以忍受;2 分为中度疼痛,常影响睡眠;3 分为重度疼痛,日夜持续且难以忍受。②关节肿胀度:0 分为不肿;1 分为轻度肿胀,附近骨突清楚可见;2 分为肿胀与骨突相平;3 分为肿胀高出骨突,影响功能活动。③关节压痛度:0 分为无压痛;1 分为在关节边缘或触及韧带时重压,患者称有压痛;2 分为重压或被动活动时重压,且表情痛苦;3 分为重压时患者有压痛且退缩。④晨僵:直接记录晨僵时间。⑤凡 15 m 步行时间超过 120 s 者,则按 120 s 计算。

1.5.2 实验指标的测定

1.5.2.1 红细胞 CR1 测定:取待测枸橼酸钠抗凝新鲜血 0.5 μ l,加入装有磷酸盐缓冲液(PBS)50 μ l 的编号试管中,然后加入鼠抗人红细胞 CR1 单抗 1.5 μ l,充分吹打混匀,置室温下避光 30 min;加入 PBS 2 ml,混匀,1 500 r/min(离心半径 114 mm)离心 5 min,弃上清液;加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗(羊抗鼠 IgG)1 μ l,吹打混匀,置室温下避光 30 min;再加入 PBS 液 2 ml,充分混匀洗涤,流式细胞仪操作程序测定 15 min^[7]。

1.5.2.2 红细胞 CD59 测定:采集静脉血 3 ml,用肝素抗凝,RBC 采用全血标本,用 PBS 将细胞浓度调为 $5 \times 10^9/L$,设测定管和对照管,每管加上述悬液 100 μ l,测定管加入 CD59-FITC 抗体,对照管加 IgG-FITC,各 20 μ l,室温下避光孵育 15 min,RBC 和其对照管均分别加 1 ml PBS 稀释;标本在 0.5 h 内上机检测。检测时选用激发波长为 488 nm 的氦

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(050431002)

作者简介:刘健(1964-),男(汉族),安徽人,医学博士,教授,主任医师(E-mail:liujianahzy@yahoo.com.cn)。

氛激光管,信号用光电倍增管 PMT1 采集,并以对数形式进行处理。细胞的选取采用前向和侧向散射光的点状图进行设门(gate),并圈出要测的细胞群体,RBC 至少测 104 个。鼠抗人 CR1 单抗试剂盒购于 DAKO 公司(批号:GM071010);羊抗小鼠 IgG-FITC 购于 SABC 公司(批号:GMF61405);CD59 试剂盒购于广东深圳晶美生物工程有限公司(批号:2005-01-20)。

1.5.2.3 其他指标测定:采用全自动蛋白分析仪速率散射比浊法测定血清 C3、C4 及 IgG、IgA、IgM 含量;RF、 α_1 -AGP、CRP 采用日立 7.60 型全自动生化分析仪进行测定;ESR 采用魏氏法测定;RBC 采用 Sysmex K 4500 型全自动血液分析仪进行测定;CR1、CD59 数据分析用 System I 软件对细胞的信号进行分析处理。

1.6 统计学处理:所有数据采用 SPSS 11.5 软件,数据结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 患者与健康对照组红细胞 CR1、CD59 比较:健康对照组 CR1 表达水平为(31.2±12.4)%,CD59 表达水平为(99.6±1.6)%;40 例 RA 患者 CR1 表达水平为(15.4±6.8)%,CD59 表达水平为(90.2±4.5)%。RA 患者与健康对照组之间红细胞 CR1 和 CD59 比较差异均有显著性(P 均 < 0.05)。

2.2 两组 RA 患者治疗前后主要关节症状积分变

化(表 1):治疗后两组临床症状及体征均有明显改善,关节疼痛度、关节肿胀度明显减轻,晨僵时间明显缩短,双手平均握力明显增加,15 m 步行时间明显缩短(P 均 < 0.05);其中关节疼痛度、晨僵时间、双手平均握力、15 m 步行时间等指标,实验组较对照组改善程度更明显(P 均 < 0.05)。

2.3 两组 RA 患者治疗前后实验室指标的比较(表 2):治疗后两组异常的实验室指标均有明显改善,ESR、CRP、RF、IgG、补体 C3 指标均明显降低,CR1、CD59、RBC 均明显升高。其中实验组 ESR、RBC、C3、CR1、CD59 均较对照组改善程度更加明显(P 均 < 0.01)。

2.4 两组治疗期间不良反应的发生情况:实验组在接受治疗的过程中未发现明显不良反应及肝、肾功能损害。对照组中有 4 例出现不良反应,主要表现在皮疹、过敏反应,口角糜烂,亦有 1 例白细胞减少,经对症治疗后恢复。实验组未发现不良反应,故未进行两组不良反应作用出现率的 χ^2 检验。

3 讨论

CR1 是补体的高亲和力受体,是固有免疫细胞发挥红细胞免疫黏附功能的重要分子基础,主要分布在红细胞膜上,由 CR1 细胞表达。其功能:①促进细胞吞噬、趋化、黏附和清除免疫复合物的功能;②抑制 B 细胞产生免疫球蛋白和白细胞介素-1(IL-1);③红细胞和 M ϕ 细胞膜表面的 CR1 吸附并促补体(C3b、C4b)与免疫复合物结合后吞噬,被

表 1 两组 RA 患者治疗前后关节症状积分变化比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of changes of joint symptom scores before and after treatment between two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	关节晨僵时间(h)	关节疼痛度(分)	关节肿胀度(分)	关节压痛度(分)	双手平均握力(kPa)	15 m 步行时间(s)
实验组	治疗前	20	2.55±1.55	21.26±7.92	13.69±9.37	15.37±9.73	5.85±2.07
	治疗后	20	0.28±0.32* Δ	7.81±3.61* Δ	4.92±4.36*	5.81±3.67	12.49±4.15* Δ
对照组	治疗前	20	2.45±1.46	22.05±8.03	13.77±9.58	16.14±9.82	5.79±1.94
	治疗后	20	0.58±0.41*	8.63±3.97*	5.18±4.62*	6.05±4.29	10.92±3.81*

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

表 2 两组 RA 患者治疗前后实验室指标变化比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of changes of laboratory indexes before and after treatment between two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	ESR(mm/1 h)	CRP(mg/L)	α_1 -AGP(mg/L)	RF(kU/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)
实验组	治疗前	20	43.51±6.37	25.39±27.19	1 101.50±356.10	70.92±34.87	18.96±2.13
	治疗后	20	32.63±19.57* $\Delta\Delta$	10.26±12.33*	806.50±236.10	26.35±24.18*	6.10±0.94*
对照组	治疗前	20	45.58±29.16	26.40±23.66	1 126.40±415.20	71.78±35.26	18.84±4.14
	治疗后	20	29.40±17.05*	11.85±14.10*	873.40±206.80	42.01±31.25*	9.29±2.86*

组别	例数(例)	IgM(g/L)	RBC($\times 10^{12}$ /L)	C3(mg/L)	C4(mg/L)	CR1(%)	CD59(%)
实验组	治疗前	20	3.47±0.58	3.88±0.54	1 493.90±406.30	232.80±56.10	15.38±6.97
	治疗后	20	1.07±0.43	4.56±0.38* $\Delta\Delta$	1 275.70±273.90* $\Delta\Delta$	186.40±38.70	25.39±6.84* $\Delta\Delta$
对照组	治疗前	20	3.89±0.64	3.92±0.40	1 429.40±386.10	246.50±63.10	14.42±5.38
	治疗后	20	2.10±0.37	4.00±0.38	1 289.70±269.40*	197.20±46.90	21.67±6.62*

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

灭活与清除, CR1 缺陷时易发生自身免疫性疾病, 如 RA^[8]。CD59 作为一种分布最为广泛的补体调节蛋白, 其生物学功能是通过阻碍补体膜攻击复合物 (MAC) 的组装^[9], 防止补体对自身细胞的攻击而起同源限制作用, 在补体调节过程中起着主要的作用。如果 CD59 缺乏, 则不能调节 MAC 组装, 补体就会攻击自身细胞而发生自身免疫性疾病。

本研究结果表明, 与健康对照组相比较, RA 患者的红细胞 CR1、CD59 表达率均明显下降, RA 红细胞 CR1 和 CD59 分子的表达水平和活性显著降低, 不能及时有效清除体内产生的循环免疫复合物, 以致血液中循环免疫复合物浓度进一步升高, 沉积于局部关节, 激活补体系统、巨噬细胞和中性粒细胞吞噬免疫复合物, 释放炎症介质, 导致炎症反应, 造成自身细胞的损伤, 很可能是 RA 发病的机制之一。

新风胶囊在全面改善 RA 患者关节局部症状、降低炎症活动性指标的同时, 也能升高 CR1 和 CD59, 提示其对 RA 的作用与提高补体调节蛋白的水平及含量, 调节体内过亢的自身免疫反应, 从而减少补体对自身细胞的攻击损伤有关。由于 CR1 和 CD59 多在红细胞膜上表达, 故红细胞的数目对该指标有一定的影响。新风胶囊以中医药整体调节为基本原则, 采用健脾益气、化湿通络相结合组方, 其中黄芪有益气养血固表、利水消肿、健脾化湿、除痹之功。现代研究证实, 黄芪中含有的叶酸成分为红细胞合成所必需^[10], 能显著促进骨髓造血细胞 DNA 的合成, 促进各类造血细胞的生成、发育、成熟。黄芪能保护红细胞变形能力, 稳定红细胞膜, 改善血液黏滞性, 增加微循环灌注, 从而改善细胞代谢和促进功能恢复^[11]。薏苡仁健脾利湿、舒筋除痹, 薏苡仁的浸出物能抑制人中性粒细胞产生活性氧, 并显著抑制中性粒细胞、淋巴细胞膜的甲基转移酶、磷脂酶 A₂ 和前列腺素 E₂ 的分泌^[12,13]; 同时研究发现, 薏苡仁具有抗胃溃疡、通过抗炎机制而止泻及缓慢促进胆汁分泌的作用^[14]。蜈蚣祛风止痉、通络止痛、攻毒散结, 可以通过改善微循环, 促进病变部位的新陈代谢而起到良好的镇痛作用; 蜈蚣能改善微循环, 延长凝血时间, 降低血细胞比容, 降低血黏度, 增加微血管开放数, 增大微血管直径, 具有明显的抗炎、镇痛作用, 并能升高脾脏指数^[15]; 蜈蚣水提物能显著增加胃液量、总酸分泌量、胃液酸度和胃蛋白酶总活性, 提高大鼠胰液的分泌量和胰蛋白分泌量, 降低胰淀粉酶活性, 同时明显促进小鼠肠推进运动^[16]。诸药合用可抗炎、消肿、止痛、调节免疫、改善 RA 贫血状

态, 实验组红细胞数量显著高于对照组; 并能增加红细胞膜表面的 CR1、CD59 表达, 实验组提高补体调节蛋白的作用优于对照组。

综上所述, 本研究结果表明, 新风胶囊能有效提高体内过低的补体调节蛋白含量, 抑制过亢的体液免疫, 减少补体对自身细胞的攻击损伤, 并对部分患者低下的红细胞水平起到提升作用, 从而控制病情活动, 这也是其治疗 RA 的机制之一。

参考文献:

- [1] 刘健, 韩明向, 方朝晖, 等. 新风胶囊治疗类风湿性关节炎的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8: 202-205.
- [2] 刘健, 郑志坚, 朝明向, 等. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞及胸腺淋巴细胞超微结构作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8: 344-346.
- [3] 张皖东, 刘晓辉, 刘健. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠滑膜和胸腺 Fas、FasL、Bcl-2 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 86-90.
- [4] Gordon D L, Papazaharoudakis H, Sadlon T A, et al. Upregulation of human neutrophil CD59, a regulator of the membrane attack complex of complement, following cell activation[J]. Immunol Cell Biol, 1994, 72: 222-229.
- [5] Arnett F C, Edworthy S M, Bloch D A, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1988, 31: 315-324.
- [6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药出版社, 2002: 115-119, 349-353.
- [7] 郭峰, 钱宝华, 张乐之. 现代红细胞免疫学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 56.
- [8] Lindorfer M A, Hahn C S, Foley P L, et al. Heteropolymer-mediated clearance of immune complexes via erythrocyte CR1: mechanisms and applications [J]. Immunol Rev, 2001, 183: 10-24.
- [9] Rafnar B O, Traustadottir K H, Sigfusson A, et al. An enzyme based assay for the measurement of complement mediated binding of immune complexes to red blood cells[J]. J Immunol Methods, 1998, 211: 171-181.
- [10] 钟洪, 赵洁, 藏堂. 黄芪临床妙用[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25: 53.
- [11] 徐先祥. 黄芪皂苷类成分对心血管系统的作用[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(增刊): 128.
- [12] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 1576.
- [13] 郭虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用(第 5 卷)[M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 4492.
- [14] 张明发, 沈雅琴, 朱自平, 等. 薏苡仁的消化系统的药理研究[J]. 基层中药杂志, 1998, 12: 36.
- [15] 毛小平, 陈子, 毛晓健, 等. 蜈蚣的部分药理研究[J]. 云南中医学院学报, 1999, 22: 1.
- [16] 张维文, 罗建平. 蜈蚣水提物对动物消化功能的增强作用[J]. 中药材, 1999, 22: 518.

(收稿日期: 2006-05-15)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①天津红日药业: 血必净注射液 …………… (封底)