

· 论 著 ·

双歧杆菌四联活菌片联合芪倍合剂对溃疡性结肠炎患者 T 细胞亚群及 Fas/FasL 系统表达的调节*

郭晓鹤¹, 张彩凤^{1△}, 夏永华², 朱艳丽¹, 秦咏梅¹, 韩 宇¹

(1. 新乡医学院第一附属医院: 1. 消化科; 2. 皮肤科, 河南新乡 453100)

摘要:目的 探讨双歧杆菌四联活菌片(以下简称四联活菌片)联合芪倍合剂治疗溃疡性结肠炎的临床疗效及对免疫系统的调节作用。**方法** 应用流式细胞仪和 ELISA 法检测四联活菌片联合芪倍合剂治疗溃疡性结肠炎前后 T 细胞亚群及外周血淋巴细胞 Fas 及 FasL 的表达水平, 并与四联活菌片及芪倍合剂单一治疗进行比较。**结果** 四联活菌片联合芪倍合剂治疗(第一组)总有效率为 92.50%, 高于四联活菌片单独治疗(第二组)(72.50%)($P < 0.01$)。各组治疗前外周血 T 细胞($CD3^+$)、辅助性 T 细胞($CD3^+ CD4^+$)、抑制性 T 细胞($CD3^+ CD8^+$)均高于健康对照组($P < 0.01$), $CD4^+ / CD8^+$ 值升高($P < 0.05$), Fas 表达明显升高($P < 0.05$)。治疗后 $CD3^+$ 、 $CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 较治疗前下降($P < 0.05$), $CD4^+ / CD8^+$ 值降低($P < 0.05$), Fas 明显下降($P < 0.01$)。**结论** 四联活菌片可通过逆转外周血淋巴细胞的 Fas/FasL 系统表达异常, 诱导淋巴细胞的正常凋亡, 与中药芪倍合剂合用起协同作用。

关键词: 结肠炎, 溃疡性; T 淋巴细胞亚群; 四联活菌片; 芪倍合剂; Fas/FasL 系统

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)14-1684-03

Tetralogy of viable tablets combined with Qibei mixture on ulcerative colitis patients with T cell subsets and the expression of Fas/FasL system*

Guo Xiaohu¹, Zhang Caifeng^{1△}, Xia Yonghua², Zhu Yanli¹, Qin Yongmei¹, Han Yu¹

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453100, China)

Abstract: Objective To estimate the clinical efficacy and immunomodulatory effect of tetralogy of viable tablets combined with Qibei mixture. **Methods** Flow cytometry and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were performed to detect T cell subsets and expression level of Fas and FasL respectively. **Results** The response rate was significantly higher in patients treated with tetralogy of viable tablets combined with Qibei mixture than in those with tetralogy of viable tablets alone (92.50% vs. 72.50%, $P < 0.01$), before the treatment, patients showed a higher percentage of $CD3^+$ cells, $CD3^+ CD4^+$ cells and $CD3^+ CD8^+$ cells in peripheral blood ($P < 0.01$), weaker expression of Fas ($P < 0.01$), but a higher $CD4^+ / CD8^+$ ratio ($P < 0.01$) compared with the controls. The treatment with Qibei mixture and tetralogy of viable tablets alone or in combination all induced a decrease in the percentage of $CD3^+$ cells, $CD3^+ CD4^+$ cells and $CD3^+ CD8^+$ cells in peripheral blood ($P < 0.05$) and in the expression of Fas ($P < 0.01$), but an decrease in $CD4^+ / CD8^+$ ratio ($P < 0.05$). **Conclusion** Tetralogy of viable tablets may induce the normal apoptosis in lymphocytes via reversing the abnormality in the expression of Fas/FasL by peripheral blood lymphocytes, and the effect of tetralogy of viable tablets may be enhanced by Qibei mixture.

Key words: colitis, ulcerative; cell subsets; tetralogy of viable tablets; qibei mixture; Fas/FasL system

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 属于炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的一种, 是一种局限于结肠和直肠黏膜或黏膜下层的、边界清楚的炎性反应。病变以远端结肠受累多见, 但也可累及整个结肠。临床主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重等, 病程缠绵, 易反复发作, 治疗无特异性。发病机制与免疫、遗传和环境等因素有关^[1], 免疫学说在 UC 的病因学中日益受到重视, 微生态制剂双歧杆菌四联活菌片(以下简称为四联活菌片)为肠道菌群调节药物, 可直接补充人体正常生理细菌, 在肠道形成生物屏障, 抑制肠道中某些致病菌, 促进肠道蠕动, 调整肠道菌群平衡, 激发机体免疫力。芪倍合剂(豫药制字 Z04070018)是本院根据张仲景之大黄附

子汤加味研制的一种灌肠剂, 包括: 黄芪 300 g, 附子 60 g, 大黄 50 g, 干姜 30 g, 五倍子 50 g, 赤石脂 600 g, 白及 50 g, 其临床疗效肯定。用四联活菌片联合芪倍合剂治疗 UC, 并对 UC 患者治疗前后外周血 T 淋巴细胞亚群及 Fas/FasL 系统表达水平进行检测, 探讨 UC 发病的免疫机制及联合用药的免疫调控作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 观察病例为 2009 年 6 月至 2012 年 6 月本院消化科门诊及住院的 UC 患者 120 例, 其中, 男 53 例, 女 67 例, 年龄 13~75 岁, 平均(38.6±7.8)岁, 病程 3 个月至 18 年, 平均(5.6±2.1)年, 用随机数字表抽样法分为 3 组, 第一组为

* 基金项目: 河南省教育厅科研基金资助项目(20073200143)。 作者简介: 郭晓鹤(1981-), 主治医师, 硕士, 主要从事临床消化性疾病的诊断。 △ 通讯作者: Tel: 13781908416; E-mail: zhangcaifeng666@163.com。

四联活菌片联合芪倍合剂治疗患者 40 例,第二组为四联活菌片治疗患者 40 例,第三组为芪倍合剂治疗患者 40 例,3 组性别、年龄、病程、严重程度及分型差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。同样方式抽取 40 名体检者为健康对照组,其中,男 18 例,女 22 例,年龄 18~57 岁,平均(28.6±6.8)岁,均无免疫性疾病及系统性疾病史,本研究通过医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 诊断标准及纳入标准 根据 2007 年制订的对中国炎症性肠病诊断治疗规范的标准^[2],在排除细菌性痢疾、阿米巴痢疾、慢性血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎、结肠克罗恩病、缺血性肠炎等疾病后,按以下诊断标准:(1)有典型临床表现,并至少有内镜 3 项特征性改变的 1 项和(或)黏膜活检,可诊断为本病;(2)有典型临床表现,并至少有 X 线钡剂灌肠特征性改变 3 项中的 1 项,可诊断为本病;(3)临床症状不典型,但有典型内镜或 X 线钡剂灌肠所见者,拟诊为本病,并观察发作情况。UC 患者依据 True-Love 标准,将病情分为轻型、中型和重型。轻型:患者腹泻每日 4 次以下,便血轻或无,无发热,脉搏加快或贫血,血沉正常;中型:介于轻度与重度之间;重型:腹泻每日 6 次以上,明显黏液脓血便,体温在 37.5℃以上,脉搏在 90 次/分及以上,血红蛋白小于 100 g/L,血沉大于 30 mm/h。内镜分级参考改良的 Baron 分级标准:0 级为黏膜正常;I 级为黏膜充血,血管模糊;II 级为黏膜有接触性出血;III 级为黏膜有自发性出血;IV 级为黏膜可见大小不等的溃疡^[3]。

1.3 方法 用药:第一组,四联活菌片(杭州龙达新科生物制药有限公司,规格每粒 0.5 g)3 粒/次,每天 3 次。同时口服本院自制中药芪倍合剂(新乡医学院第一附属医院,规格每瓶 100 mL,每次 50 mL,每天 2 次);第二组服用四联活菌片,剂量同第一组;第三组服用芪倍合剂,剂量同第一组。以 3 个月为 1 个疗程,观察并记录疗效及不良反应。疗效判断:参照《临床疾病诊断依据治愈好转标准》^[4]和《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[5]制订。痊愈:临床症状消失,肠镜检查、肠黏膜检查恢复正常。好转:临床症状减轻,肠镜检查、肠黏膜病变较前

明显改善,大便常规检查有少量红、白细胞。无效:治疗前后,临床症状和镜检等检查无改善或无明显改善。总有效率=(痊愈例数+好转例数)/总例数×100%。外周血淋巴细胞 Fas 及 FasL 的定量检测及 T 细胞亚群分类检测:采静脉血 3 mL,肝素抗凝,离心取血清,用美国 Coulter EPICS XL 型流式细胞仪对 3 组病例治疗前、后及健康对照组进行外周血淋巴细胞 Fas、FasL 表达水平的定量检测及 T 细胞亚群分类检测。试剂异硫氰酸荧光素(FITC)标记 CD95 单克隆抗体、FITC 标记 Fas 配体单克隆抗体及 FITC 标记小鼠 IgG1 同型对照抗体购自法国 Immunotech 公司。

1.4 不良反应 观察有无胃肠道症状(如恶心、呕吐、食欲不振、腹泻等)和其他不良反应情况。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效比较 四联活菌片联合芪倍合剂组总有效率达 92.50%,各组临床疗效见表 1。

2.2 外周血 T 细胞亚群检测结果 各组治疗前外周血 T 细胞(CD3⁺)、辅助性 T 细胞(CD3⁺CD4⁺)、抑制性 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)均高于健康对照组($P < 0.01$),CD4⁺/CD8⁺ 比值下降($P < 0.01$);各组治疗后 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD8⁺ 均较治疗前下降($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺ 值也下降($P < 0.05$),见表 2。

表 1 各组临床疗效比较

组别	<i>n</i>	痊愈 [<i>n</i> (%)]	显效 [<i>n</i> (%)]	好转 [<i>n</i> (%)]	无效 [<i>n</i> (%)]	总有效率(%)
第一组	40	7(17.50)	23(57.50)	7(17.50)	3(7.50)	92.50
第二组	40	3(7.50)	19(47.50)	7(17.50)	11(27.50)	72.50 ^a
第三组	40	4(10.00)	22(55.00)	6(15.00)	8(20.00)	80.00 ^{ab}

^a: $P < 0.01$,与第一组比较;^b: $P < 0.05$,与第一组比较。

表 2 各组治疗前后外周血 T 细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 值
第一组	40	治疗前	68.65±5.15 ^b	34.88±8.97 ^b	21.76±5.19 ^b	1.86±0.38 ^b
		治疗后	63.61±8.25 ^d	33.68±7.96 ^d	20.56±5.09 ^d	1.57±0.66 ^d
第二组	40	治疗前	65.91±5.05 ^b	32.98±7.67 ^b	21.76±5.29 ^b	1.76±0.58 ^b
		治疗后	63.55±9.05 ^d	33.54±6.88 ^a	20.45±4.59 ^a	1.45±0.56
第三组	40	治疗前	67.51±5.10 ^a	35.48±5.65 ^b	22.66±4.79 ^a	1.66±0.58 ^a
		治疗后	62.54±7.65 ^d	32.78±7.65 ^c	22.76±8.97 ^c	1.35±0.56 ^c
健康对照组	40		63.91±5.35	33.88±9.97	20.76±6.19	1.58±0.88

^a: $P < 0.05$;^b: $P < 0.01$,与健康对照组比较;^c: $P < 0.05$;^d: $P < 0.01$,与同组治疗前比较。

表 3 各组治疗前后外周血淋巴细胞 Fas 及 FasL 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	Fas	FasL
第一组	40	治疗前	48.54±14.46 ^b	1.27±0.69
		治疗后	35.78±12.19 ^d	1.09±1.20
第二组	40	治疗前	42.38±12.45 ^b	1.18±1.35
		治疗后	36.55±13.34 ^c	1.17±1.26

续表 3 各组治疗前后外周血淋巴细胞 Fas 及 FasL 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	Fas	FasL
第三组	40	治疗前	43.96±11.97 ^b	1.27±1.24
		治疗后	35.83±12.86 ^{ac}	1.11±1.76
健康对照组	40		38.55±9.99	1.18±1.25

^a: $P < 0.05$;^b: $P < 0.01$,与健康对照组比较;^c: $P < 0.05$;^d: $P < 0.01$,与同组治疗前后比较。

2.3 外周血淋巴细胞 Fas 及 FasL 检测结果 与健康对照组比较,各组治疗前外周血淋巴细胞 Fas 表达明显升高($P < 0.01$),治疗后 Fas 较治疗前明显下降($P < 0.01$),见表 3。

2.4 不良反应 第一组有 2 例出现恶心不适,第三组 1 例出现腹泻加重,其余均无不良反应发生。

3 讨 论

UC 的病因和发病机制尚未明确,被 WHO 列为疑难病^[6]之一。它的病因和发病机制与免疫功能紊乱有密切的联系^[7]。Th1/Th2 亚群平衡失调可能参与 UC 发病^[8],多认为是一种自身免疫性疾病,多种细胞因子[如 IL、 γ -干扰素、TNF、转化生长因子(TGF)等]和炎性介质(白细胞三烯、血栓素、组胺、前列腺素等)参与 UC 的发生发展,引起组织破坏及炎性改变,具有较高的遗传倾向^[9]。由于其发病机理涉及多因素多环节相互作用,其治疗是综合的^[10-11]。由于西药治疗本病存在毒副作用多、病情反复等^[12]缺点,采用中医药治疗越来越受到医学界的关注。UC 治疗原则为尽早控制症状,维持缓解,预防复发,防治并发症。因其病程迁延不愈,长达十几年甚至几十年亦有发生癌变的可能性^[13]。流行病学资料提示 UC 的发病率在国内和国外都有逐年增高的趋势^[14-15],可能与人们生活习惯、生活方式的变化、城市环境改变以及医疗水平的提高等有关。微生态制剂四联活菌片为新型免疫调节剂,可诱导 Th1 反应,对外周血 CD4⁺ T 细胞亚群有一定的直接刺激作用,有助于调节和恢复体内 Th1/Th2 平衡,使 CD4⁺/CD8⁺ 比值处于正常范围。本研究表明,UC 患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 Fas/FasL 系统表达明显升高,这与文献报道的结果一致。芪倍合剂(豫药制字 Z04070018)是本院中药制剂室研制的纯中药制剂具有健脾益肾、涩肠止泻之功效。处方中黄芪补气升阳、行滞通痹,五倍子涩肠止泻,大黄泻下攻积,附子散寒止痛,白及收敛止血,赤石脂敛疮生肌,诸药合用,相辅相成,具有健脾益肾、涩肠止泻之功效。近年来研究表明,黄芪、附子、干姜都具有免疫调节作用,大黄有消炎及免疫调节和使局部血管收缩的止血作用,五倍子能使黏膜、溃疡等局部组织蛋白凝固而呈现收敛作用,能加速血液凝固止血,对多种细菌均有明显抑制和杀灭作用,赤石脂能吸附消化道的毒物和炎症渗出物,使炎症得以缓解。有研究报道芪倍合剂能显著降低大鼠模型结肠组织促炎细胞因子、TNF- α 、IL-8 水平,表明其能抑制促炎细胞因子的分泌,调节免疫反应,减少炎症递质的释放,从而有效阻断免疫反应性对机体造成的损伤,达到治疗的目的。研究表明在活动性 UC 病变区域或炎症附近的区域的上皮细胞和保护性免疫细胞发生凋亡的程度和范围都高于正常组织,且导致这种大量凋亡是通过 Fas/FasL 途径完成的。Fas/FasL 在结肠上皮细胞内的信号主要是通过半胱天冬蛋白酶 caspase 介导细胞凋亡的,caspase 可通过裂解细胞角蛋白 18 等引导细胞凋亡发生。

本研究通过对微生态制剂联合芪倍合剂治疗 UC,无论在临床疗效还是各项指标的改善上均优于健康对照组,总有效率 92.5%,明显高于四联合菌片单独治疗($P < 0.01$)。CD3⁺、

CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 较治疗前降低($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺ 比值降低($P < 0.05$),Fas 明显下降($P < 0.01$),表明四联合菌片在芪倍合剂的协同作用下,通过调整机体细胞免疫功能,提高 UC 的疗效。

参考文献:

- [1] 汪建平. 克罗恩病的流行病学及外科治疗[J]. 中华胃肠外科杂志, 2007, 10(3): 199-201.
- [2] 欧阳钦, 胡品津, 钱家鸣, 等. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 现代消化及介入诊疗, 2008, 27(2): 139-145.
- [3] Ang YS, Mahmud N, White B, et al. Randomized comparison of unfractionated heparin with corticosteroids in severe active inflammatory bowel disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2000, 14(8): 1015-1022.
- [4] 孙传兴. 临床疾病诊断依据治愈好转标准[M]. 2 版. 北京: 人民军医出版社, 1998: 77-78.
- [5] 郑筱蓓. 中药新药临床研究指导原则: 试行[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 139-143.
- [6] 江学良, 崔慧斐. 溃疡性结肠炎的新思路[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(4): 319-322.
- [7] 施嫣红, 郭传勇. 溃疡性结肠炎的免疫学研究进展[J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(3): 302-304.
- [8] Dahi T, Fujihashi K, Kiyono H, et al. Mice deficient in Th1-and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis [J]. Gastroenterology, 2000, 119(3): 724-733.
- [9] 刘慧荣, 郑昱, 吴焕淦, 等. 溃疡性结肠炎相关基因研究[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(7): 125-131.
- [10] Kirschner BS. Ulcerative colitis in children[J]. Pediatr Clin North Am, 1996, 43(2): 235-254.
- [11] 陆达海, 刘新光, 贾博琦. 炎症性肠病的病因和发病机制的研究进展[J]. 中华内科杂志, 1996, 35(12): 45-47.
- [12] 王常松. 从西医治疗溃疡性结肠炎的难点看中医治疗优势[J]. 陕西中医学院学报, 2008, 31(4): 3-5.
- [13] Eaden J, Abrams K, Ekbom A, et al. Colorectal Cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2000, 14(2): 145-153.
- [14] Russel MG. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean[J]. Eur J Intern Med, 2000, 11(2): 191-196.
- [15] Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 158-161.

(收稿日期: 2013-12-03 修回日期: 2014-02-28)