

健脾清热活血方对溃疡性结肠炎患者疗效及 NLRP-6、Caspase-1、IL-8的影响

陈良荣¹, 绳荣端¹, 邱燕婷¹, 宋杰¹, 陈玉², 马媛萍³, 方健松⁴, 刘畅¹, 张涛¹

(¹广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011; ²遵义市第一人民医院, 遵义 563002; ³广西国际壮医院, 南宁 530000; ⁴广西桂平市中医医院, 广西桂平 537200)

摘要: 目的: 探讨健脾清热活血方对UC患者NLRP-6、Caspase-1及IL-8的变化。方法: 将30例UC患者随机分为治疗组和对照组, 治疗组给予健脾清热活血方, 对照组给予美沙拉嗪颗粒剂, 疗程为12周, 应用肠镜下Baron评分、中医证候积分及NLRP-6、Caspase-1、IL-8表达变化评估两组疗效。结果: 两组患者总体有效率相当, 无显著差异; 肠镜下Baron评分治疗后降低, 组内前后比较有统计学意义, 组间比较无显著性差异; 两组患者中医证候积分治疗后均降低, 治疗前与治疗12周组内比较有显著性差异 ($P<0.05$), 组间比较无显著性差异; 治疗后两组患者NLRP-6、Caspase-1、IL-8基因及免疫组化阳性细胞分布面积均降低, 治疗后组内及组间比较均有统计学差异 ($P<0.05$)。结论: 健脾清热活血方可负向调节NLRP-6表达, 抑制Caspase-1活化, 下调IL-8表达, 发挥治疗溃疡性结肠炎效用。

关键词: NLRP-6; Caspase-1; IL-18; 健脾清热活血方; 溃疡性结肠炎

基金资助: 2016年广西中医药民族医药传承创新专项立项课题(临床研究类)(No.GZLC16-14)

Curative effect of Jianpi Qingre Huoxue Formula on ulcerative colitis patients and effects of NLRP-6, Caspase-1 and IL-8

CHEN Liang-rong¹, SHENG Rong-tuan¹, QIU Yan-ting¹, SONG Jie¹, CHEN Yu², MA Yuan-ping³,
FANG Jian-song⁴, LIU Chang¹, ZHANG Tao¹

(¹Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; ²The First People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563002, China; ³International Zhuang Medical Hospital of Guangxi, Nanning 530000, China; ⁴Guangxi Guiping Traditional Chinese Medicine Hospital, Guiping 537200, China)

Abstract: Objective: To investigate the changes of NLRP-6, Caspase-1, and IL-18 in patients with ulcerative colitis treated by Jianpi Jianpi Huoxue Formula. Methods: Thirty patients with ulcerative colitis were randomly divided into treatment group and control group, the treatment group was given Jianpi Qingre Huoxue Formula while the control group was treated with mesalazine granules. The course of the treatment was 12 weeks. The therapeutic effect of the two groups was evaluated by the Baron score under colonoscopy, TCM syndrome score and the expression of NLRP-6, Caspase-1, and IL-18. Results: There was no significant difference in the overall effective rate between the two groups; Baron score under colonoscopy decreased after the treatment, and there was no statistical difference between the two groups; after treatment, the scores of TCM syndromes decreased, there was a significant difference in the same group ($P<0.05$) and no significant difference when compared with the control group; after treatment, the expression of NLRP-6, Caspase-1, IL-18 gene and the number of immunohistochemical positive cells were decreased in both groups, and there were significant differences between the two groups ($P<0.05$). Conclusion: Jianpi Qingre Huoxue Formula can negatively regulate the expression of NLRP-6, inhibit the activation of Caspase-1, and down-regulate the expression of IL-18, thus exerting its therapeutic effect on ulcerative colitis.

Key words: NLRP-6; Caspase-1; IL-18; Jianpi Qingre Huoxue Formula; Ulcerative colitis

Funding: Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Inheritance and Innovation Project of Guangxi Province in 2016 (Clinical Research Category) (No.GZLC16-14)

结合全国名老中医谢建群教授、马贵同教授及劳绍贤教授学术思想认为溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)以“脾虚为本, 湿热毒瘀为标贯穿疾病始终”为病机^[1-3], 予健脾清热活血方干预疗效确切, 其机制与促进结肠上皮细胞修复, 诱导炎症缓解相关。核苷酸结合寡聚化结构域样受体含pyrin结构域蛋白6(non-like receptor family pyrin domain containing-6, NLRP-6)通过调节肠道上皮细胞中炎症体依赖的IL-18的产生从而减轻炎症反应在UC发生发展中占据重要地位, 但关于该方是否可通过调控炎症小体NLRP-6及炎症因子表达及缓解UC症状尚未见报道。本研究基于随机、对照设计, 观察治疗前后患者肠黏膜NLRP-6、Caspase-1、IL-18等指标变化, 以期评估健脾清热活血方治疗效用及可能机制, 现报道如下。

资料与方法

1. 一般资料

1.1 病例来源 全部病例源自广西中医药大学附属瑞康医院2016年1月~2017年1月门诊及住院符合纳入标准的UC(轻度~中度)患者30例。治疗组15例, 其中男6例(轻、中度各3例), 女9例(轻度5例, 中度4例), 年龄18~63岁, 平均(41.93±13.60)岁, 病程0.5~6年, 平均(2.50±1.62)年; 对照组15例, 其中男7例(轻度4例, 中度3例), 女8例(轻、中度各4例); 年龄21~65岁, 平均(40.00±11.82)岁; 病程0.5~5年, 平均(2.42±1.43)年, 两组患者基线资料无显著性差异。

1.2 诊断标准 参照中华医学会脾胃病分会炎症性肠病协作组《溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)》^[4]。

1.3 纳入标准 ①符合溃疡性结肠炎诊断标准及脾虚湿热中医证型, 疾病活动指数属于轻度~中度患者。②年龄18~65岁。③签署知情同意书。

1.4 排除标准 ①不符合纳入标准。②重度溃结患者或合并结肠癌、胆道、胰腺等器质性病变。③合并有心血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病, 精神病患者。

2. 仪器、试剂与药品 普通PCR仪(型号: C1000 Thermal cycler, 厂家: BIO-RAD), 荧光定量仪(型号: 7300, 厂家: ABI), 电子结肠镜(型号: 富士能EG-590WR); Trizol(美国Invitrogen公司), 健脾清热活血方: 救必应15g, 三七8g, 白芍12g, 马齿苋12g, 冰片3g, 白术12g, 水蛭6g, 炙甘草6g, 中药制剂购买于广西中医药大学附属瑞康医院中药房; 美沙拉嗪缓释颗粒剂(商品名: 艾迪莎法国爱的发制药集团生产, 批号: H20040726, 500mg/袋)。

3. 研究方法

3.1 分组与干预方案 ①治疗组: 健脾清热活血方中药免煎颗粒剂, 每日1剂, 200mL水冲服, 分2次服用。②对照组: 美沙拉嗪缓释颗粒剂, 每次1g, 4次/d。

3.2 指标观察

3.2.1 主要效应指标: 治疗前、治疗后12周肠镜下黏膜积分, 评定标准采用Baron评分标准^[5]。

3.2.2 次要效应指标: 收集UC患者治疗前、治疗后4、8、12周便血或黏液脓血便、腹痛、腹泻、里急后重中医证候积分, 评定标准参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[6]。

3.2.3 实验室指标: 应用荧光定量PCR及免疫组化SP法检测两组炎症小体复合物NLRP-6、IL-18及Caspase-1基因与阳性细胞分布面积, 具体实验步骤及判定严格按试剂盒说明操作。

3.2.4 疗效评价: 参照2010年《溃疡性结肠炎中西医结合诊疗指南(草案)》^[7]。完全缓解: 临床症状消失, 肠镜复查黏膜病变基本消失或主要症状及肠黏膜病变活动指数总分值降低95%。显效: 临床主要症状明显缓解, 肠镜复查黏膜病变明显减轻或主要症状及肠黏膜病变活动指数总分值降低70%。有效: 临床主要症状有所缓解, 肠镜复查黏膜病变有所减轻或主要症状及肠黏膜病变活动指数总分值降低30%。无效: 经治疗后临床症状、内镜及病理检查结果均无改善或加重, 或主要症状及肠黏膜病变活动指数总分值降低<30%。疗效评定标准按照尼莫地平法计算, 即疗效指数=[(治疗前病变活动指数积分-治疗后病变活动指数积分)/治疗前病变活动指数积分]×100%。

4. 统计学方法 采用SPSS 22.0软件处理, 计数资料以频数和构成比描述, 比较采用 χ^2 检验; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 总体疗效判定及症状改善情况 见表1。治疗组完全缓解2例, 肠镜黏膜无明显异常, 便脓血症状消失, 大便成型; 显效3例, 肠镜下表现可见少量溃疡灶, 便脓血症状基本消失, 大便稍成型, 伴少许黏液; 有效7例, 便脓血症状较治疗前减轻, 便血及腹泻次数减少, 肠镜下可见散在溃疡, 附着白苔; 无效3例, 便脓血及腹痛腹泻症状无明显改善, 内镜下可见结肠多发溃疡, 总有效率为80.0%; 对照组完全缓解1例, 临床症状消失, 镜下肠黏膜未见异常; 显效2例, 便血及腹泻次数减少, 内镜下可见结肠各段溃疡明显愈合; 有效8例, 腹痛及里急后重等症状有所改善, 便脓血量较前减少; 无效4例, 腹痛腹泻无改善, 肠镜下直肠、乙状结肠散在溃疡, 总有效率为73.3%。经卡方检验两组疗效无显著性差异。

表1 两组患者总体有效率比较 [例(%)]

组别	例数	完全缓解	显效	有效	无效	总有效
对照组	15	1(6.7)	2(13.3)	8(53.3)	4(26.7)	11(73.3)
治疗组	15	2(13.3)	3(20.0)	7(46.7)	3(20.0)	12(80.0)

表3 两组患者治疗前后中医证候积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	腹痛	腹泻	里急后重	便脓血
对照组	15	治疗前	3.73±1.79	4.47±1.77	3.67±1.54	7.00±1.85
		治疗4周	3.40±1.80	4.07±1.71	3.00±1.46	6.20±2.11
		治疗8周	3.20±1.66	3.87±1.64	2.73±1.42	6.00±2.28
		治疗12周	2.53±1.36*	3.53±1.68*	2.10±1.40*	5.00±2.17*
治疗组	15	治疗前	3.27±1.91	4.27±1.27	3.60±1.24	6.20±2.11
		治疗4周	3.07±1.75	4.01±1.71	2.87±1.55	5.80±2.11
		治疗8周	2.87±1.55	3.80±1.37	2.33±0.98*	5.40±2.03*
		治疗12周	2.40±1.40*	3.33±1.54*	2.22±1.01*	4.80±1.90*

注:与本组治疗前比较,* $P<0.05$ 。

2. 肠镜下Baron评分比较 见表2。治疗前两组肠镜下Baron评分无显著性差异;治疗后中药及西药组肠镜下Baron评分均有不同程度降低,与同组治疗前相比,差异显著($P<0.05$),治疗组与对照组治疗后比较无显著性差异。

表2 两组患者治疗前后肠镜下Baron评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后12周
对照组	15	5.27±1.51	3.85±1.71*
治疗组	15	5.42±1.46	3.47±1.37*

注:与本组治疗前比较,* $P<0.05$ 。

3. 中医证候积分比较 见表3。结果示,治疗前两组患者各指标无显著性差异;治疗后,两组患者在腹痛、腹泻、里急后重及便脓血各方面均有不同程度改善,其中治疗组治疗12周后腹痛、腹泻中医证候积分较治疗前显著降低($P<0.05$),里急后重及便脓血治疗8周、12周后与治疗前相比,有统计学差异($P<0.05$);对照组腹痛、腹泻、里急后重及便脓血治疗后12周与治疗前有显著性差异($P<0.05$)。

4. 两组患者Caspase-1、NLRP-6、IL-18基因相对表达量比较 见表4。治疗前,两组患者无显著性差异,治疗后两组Caspase-1、NLRP-6、IL-18基因表达显著降低($P<0.05$),且治疗组低于对照组($P<0.05$)。

表4 两组患者治疗前后Caspase-1、NLRP-6、IL-18基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Caspase-1	NLRP-6	IL-18
对照组	15	治疗前	1.26±0.27	2.35±0.54	0.98±0.16
		治疗后	0.51±0.02*	1.21±0.30*	0.51±0.01*
治疗组	15	治疗前	1.18±0.32	2.27±0.58	1.05±0.22
		治疗后	0.11±0.08* Δ	0.81±0.30* Δ	0.22±0.07* Δ

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

5. 两组患者NLRP-6、Caspase-1、IL-18免疫组化阳性细胞分布面积比较 见表5,图1-图2。两组治疗前阳性细胞分布面

积表达治疗前无显著性差异,治疗后对照组NLRP-6与本组治疗前比较,显著降低($P<0.05$)。治疗组NLRP-6、Caspase-1、IL-18表达均降低($P<0.05$),且优于对照组($P<0.05$)。

表5 两组患者治疗前后Caspase-1、NLRP-6、IL-18免疫组化阳性细胞分布面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Caspase-1	NLRP-6	IL-18
对照组	15	治疗前	0.16±0.04	0.23±0.04	0.18±0.04
		治疗后	0.13±0.03	0.08±0.01*	0.14±0.03
治疗组	15	治疗前	0.15±0.03	0.24±0.04	0.16±0.01
		治疗后	0.05±0.02* Δ	0.04±0.03* Δ	0.05±0.03* Δ

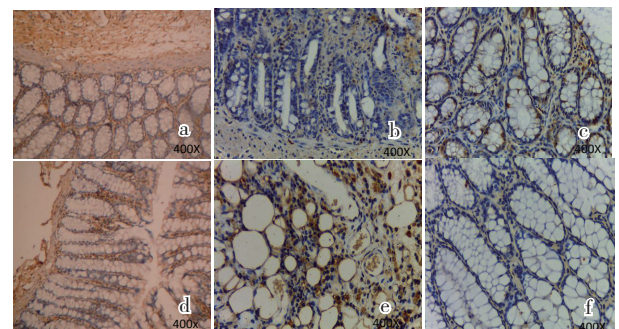


图1 两组患者治疗前免疫组化阳性细胞分布面积($\times 400$)

注:a、b、c分别为治疗组Caspase-1、NLRP-6、IL-18;d、e、f分别为对照组Caspase-1、NLRP-6、IL-18。

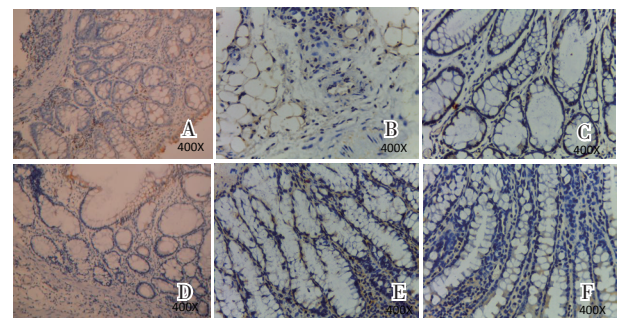


图2 两组患者治疗后免疫组化阳性细胞分布面积($\times 400$)

注:A、B、C分别为治疗组Caspase-1、NLRP-6、IL-18;D、E、F分别为对照组Caspase-1、NLRP-6、IL-18。

讨论

中医学将UC归属于“久痢”范畴,课题组应用“健脾清热活血”为治疗大法开展防治UC临床观察,以美沙拉嗪颗粒剂为阳对照,结果提示该方有缓解UC效用,其疗效与美沙拉嗪颗粒剂相当,尤其是在内镜下Baron评分、中医证候积分上较治疗前有明显改善;当然,对于炎症相关因子NLRP-6、Caspase-1、IL-18相对表达亦有一定的调控作用。

细胞因子的表达异常作为肠道炎症反应的关键始动因素,我们可以肯定促炎因子升高与抗炎因子的降低相互作用最终导致炎症活动的产生,炎症发生在UC的各个阶段,其导致慢性炎症的关键是通过对炎症因子中间产物Caspase-1激活^[8]; NLRP-6是核苷酸结合结构域属NLRs家族成员,作为先天免疫受体家族的成员,具有调节炎症和宿主微生物防御功能, NLRP-6不仅参与炎症小体形成,而且还涉及核因子- κ B (NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号调节和促进胃肠道抗病毒效应子功能,主要高表达于肠上皮细胞及杯状细胞^[9-11],在肠道先天免疫即维持生理性炎症保持肠道稳态占据重要地位^[12-13]。NLRP-6可以通过激活Caspase-1使无活性的IL-18及IL-1 β 前体切割为成熟的IL-1 β 和IL-18细胞因子释放到胞外参与炎症反应及细胞自噬^[14-15]。肠上皮细胞自噬对维持肠道稳态也起着重要作用,当肠内稳态失衡时,肠上皮细胞发生自噬,并破坏肠黏膜屏障,炎症反复刺激或者使机体炎症过度放大,损伤肠黏膜,导致UC的发生与发展^[16-17]。IL-18作为促炎性细胞因子,在活动期UC患者血清及肠黏膜细胞中保持高表达水平,且IL-18遗传多态性可明显增加UC易感性,同时IL-18的表达水平可作为UC疾病轻重程度的客观评价指标,IL-18主要通过调节肠上皮中杯状细胞发育的转录程序来抑制杯状细胞成熟^[18-19]。通过调节炎症因子IL-18的表达对诱导UC缓解具有明显促进作用^[20-21]。本研究结果显示,治疗后两组患者NLRP-6、Caspase-1、IL-18基因相对表达量及阳性细胞分布面积较治疗前降低,且治疗组优于对照组,提示健脾清热活血方可通过调节NLRP-6表达诱导UC患者炎症缓解。

综上所述,健脾清热活血方治疗UC时可下调NLRP-6、Caspase-1、IL-18表达,减轻炎症反应,发挥治疗溃疡性结肠炎效用,该方疗效确切,相比美沙拉嗪价格实惠,值得临床推广应用,但本研究样本量较小,可能存在一定偏倚,下一步我们将扩大样本量进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张涛,谢建群.谢建群分期论治慢性非特异性溃疡性结肠炎经验.江西中医药,2006,37(9):9-10
- [2] 龚雨萍,柳文,马贵同,等.清肠栓治疗溃疡性结肠炎的随机对照研究.上海中医药大学学报,2007,21(6):33-36
- [3] 庄昆海,刘凤斌.劳绍贤教授对溃疡性结肠炎的辨证论治思想.广州中医药大学学报,2013,30(6):914-916

- [4] 张声声,沈洪,郑凯,等.溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017).中华中医药杂志,2017,32(8):3585-3589
- [5] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组.炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年·广州).胃肠病学,2012,51(12):763-781
- [6] CFDA.中药新药临床研究指导原则(试行).北京:中国医药科技出版社,2002
- [7] 陈治水,危北海,张万岱,等.溃疡性结肠炎中西医结合诊疗指南(草案),(2010.西昌).中国中西医结合消化杂志,2011,19(1):61-65
- [8] Karki R,Man S M,Kanneganti T D.Inflammasomes and cancer. Cancer Immunol Res,2017,5(2):94-99
- [9] Elinav E,Strowig T,Kau A L,et al.NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis.Cell,2011,145(5):745-757
- [10] Wlodarska M,Thaiss C,Nowarski R,et al.NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion.Cell,2014,156(5):1045-1059
- [11] Levy M,Shapiro H,Thaiss C A,et al.NLRP6:A multifaceted innate immune sensor.Trends Immunol,2017,38:248-260
- [12] Opipari A,Franchi L.Role of inflammasomes in intestinal inflammation and Crohn's disease.Inflamm Bowel Dis,2015,21(1):173-181
- [13] Anand P K,Subbarao M R K,Lukens J R,et al.NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defense against bacterial pathogens.Nature,2012,488:389-393
- [14] Günther C,Neumann H,Neurath M F,Becker C.Apoptosis,necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. Gut,2013,62(7):1062-1071
- [15] Dupaul-Chicoine J,Yeretssian G,Doiron K,et al.Control of intestinal homeostasis,colitis,and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases.Immunity,2010,32(3):367-371
- [16] Williams T M,Leeth R A,Rothschild D E,et al.The NLRP1 inflammasome attenuates colitis and colitis-associated tumorigenesis.J Immunol,2015,194(7):3369-3380
- [17] Wang Y,Tong J,Chang B,et al.Genetic polymorphisms in the IL-18 gene and ulcerative colitis risk:A meta-analysis.DNA Cell Biol,2014,33(7):438-447
- [18] Nowarski R,Jackson R,Gagliani N,et al.Epithelial IL-18 equilibrium controls barrier function in colitis.Cell,2015,163(6):1444-1463
- [19] Nemeth Z H,Bogdanovski D A,Barrattstopper P,et al.Crohn's disease and ulcerative colitis show unique cytokine profiles. Cureus,2017,9(4):1177-1188
- [20] Montrose D C,Horelik N A,Madigan J P,et al.Anti-inflammatory effects of freeze-dried black raspberry powder in ulcerative colitis. Carcinogenesis,2011,32(3):343-350
- [21] Timothy,Hand W.Interleukin-18:The bouncer at the mucosal bar. Cell,2015,163(6):1310-1312

(收稿日期:2017年8月27日)