红花逍遥片对血虚风燥型特应性皮炎患者免疫因子影响的研究 *

苏传丽　吴志洪 #　钟江　黄涛　徐张杰　岳天天

（广西中医药大学第一附属医院皮肤科　南宁 530023）

摘要：目的：观察红花逍遥片治疗血虚风燥型特应性皮炎(AD)的临床效果及对患者血液中免疫因子水平的影响。方法：85 例血虚风燥型 AD 患者随机分为治疗组和对照组，两组均采用甘草润肤洗剂外用治疗，治疗组 43 例加用红花逍遥片治疗，对照组 42 例加用氯雷他定颗粒治疗。应用 ELISA 法检测两组血清 TNF-a、IL-17A、IL-23、TGF-β 1 水平；应用 qRT-PCR 方法检测外周血浆趋化因子 MDC/CCL22、TARC/CCL17、CTACK/CCL27、RANTES/CCL5 和 CXCL10/IP-10 mRNA 的表达。结果：6 周后治疗组临床基本治愈 26 例，显效 10 例，好转 5 例，无效 2 例，总有效率 83.7%，对照组临床基本治愈 5 例，显效 19 例，好转 10 例，无效 8 例，总有效率为 57.1%，两组相比差异具有显著性意义(u=4.1731)。治疗组治疗前血清 IL-17A 为(68.32± 13.47) pg/ml，治疗后为(20.56± 15.51) pg/ml，其表达水平下调明显，且与 CXCL10/IP-10 分子呈正直线相关(r=0.5218，$P<0.05$)；IL-23、TARC/CCL17 治疗后表达水平明显下调，但与 IL-17A 及 CXCL10/IP-10 无明显相关性；而 TNF-a、TGF-β 1 和其他趋化因子治疗前后变化不明显。结论：红花逍遥片联合甘草润肤洗剂可以负向调控 CXCL10/IP-10 和 IL-17A 的表达从而影响表皮角化过程，这可能在其对特应性皮炎患者的治疗中起重要作用。

关键词：特应性皮炎；红花逍遥片；血虚风燥；趋化因子

中图分类号：R752.9　　**文献标识码：**B　　doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.10.004

特应性皮炎（Atopic Dermatitis，AD）是一种儿童、青少年常见的慢性复发性、免疫炎症性皮肤病，中医治疗该病疗效肯定，但具体作用机制尚不明了。我们在长期的临床实践中发现，采用健脾利湿、培土清心法对病程不长的脾虚湿热患者疗效较好，但对血虚风燥型作用有限。近年学习名老中医苏忠德丹栀逍遥散治疗湿疹的经验[1]，我们应用红花逍遥片联合甘草润肤洗剂治疗血虚风燥型 AD 患者疗效显著。本研究收集红花逍遥片联合甘草润肤洗剂治疗血虚风燥型特应性皮炎患者血液标本，通过 ELISA 和 qRT-PCR 等技术，对 Th1/Th2 和 Treg/Th17 相关细胞因子和趋化因子差异表达进行比较探讨其作用机制。现报道如下：

1　临床资料

1.1　一般资料　本研究选择 2012 年 1 月～2015 年 1 月 85 例血虚风燥型 AD 患者为研究对象，均符合 Willimans1994 年提出的 AD 诊断标准以及国家中医药管理局关于中医病证诊断疗效标准。血虚风燥型诊断标准：慢性病程，反复发作，皮损浸润，肥厚苔藓化，或有抓痕结痂、脱屑等，脉细，舌淡红。患者年龄 5～21 岁，男 50 例，女 35 例。排除真菌及细菌感染，治疗前 2 周内无系统应用皮质类固醇激素及免疫抑制剂史。采用随机开放平行对照方法，分为治疗组 43 例和对照组 42 例。

1.2　AD 病情评分标准　采用欧洲 AD 评分标准（SCORAD）：包括皮肤病变范围（A）、皮损严重程度（B）、瘙痒和睡眠影响程度（C）。A：成人的头颈部、臂各 9.0%，躯干前、躯干后各 13.5%，下肢各 22.5%。14 岁以下儿童中，头颈部、臂各 9.0%，躯干前、躯干后及下肢各按 18.0%来计算。1%的面积为 1 分。B 按上述部位评分，评分标准 0～3 四级评分法。症状、体征包括：红斑、丘疹或水肿、表皮剥脱、裂纹或皲裂、渗出或结痂、苔藓化、皮肤干燥（评价末受累皮肤）。C：按最近的 3 昼夜平均评分，0～3 四级评分。按皮损程度、面积及瘙痒情况分别评分。重度 3 分、中度 2 分、轻度 1 分、无 0 分。

1.3　治疗方法　治疗组 43 例：红花逍遥片（国药准字 Z20080299）口服，体重 15～25 kg 者 2 片 / 次，3 次 /d；体重＞25 kg 者 3 片 / 次，3 次 /d，饭后温水冲服。对照组 42 例：氯雷他定颗粒剂（国药准字 H20040439）口服，体重＞30 kg，1 次 /d，2 包 / 次（10 mg）；体重≤30 kg，1 次 /d，1 包 / 次（5 mg）。3 周为 1 个疗程，观察 2 个疗程。两组均联合采用甘草润肤洗剂外用，甘草润肤洗剂方：甘草 60 g，黄精、鸡血藤、桃仁、蛇床子、地肤子、艾叶各 30 g，当归、莪术、红花、吴茱萸各 20 g；小儿用量酌减[2]。水煎 2 000 ml

* 基金项目：国家自然科学基金项目（编号：81360599）

广西自然科学基金项目(编号：2013GXNSFAA019148)

广西壮族自治区卫生厅课题（编号：GZZY13-17）

通讯作者：吴志洪，E-mail：wuzhihong_doc@163.com

外用。

1.4 疗效判断标准 总有效率为基本治愈加显效计算。疗效判定标准分 4 级。临床基本治愈：皮损全部消退；显效：皮损消退 70%以上；好转：皮损消退 30%～70%；无效：皮损消退 30%以下或皮损无任何改变。

1.5 MDC/CCL22、TARC/CCL17、CTACK/CCL27、RANTES/CCL5 和 CXCL10/IP-10 mRNA 的检测 用 Trizol 试剂盒提取外周血浆的总 RNA（GIBCO BRL 公司），用 Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 进行荧光定量 PCR 实验。紫外分光光度仪检测其 A260/A280 值，从 1 μg 的总 RNA 获得互补 DNA 用作 PCR 模板。逆转录反应体系 25 μl：1 μg 总 RNA，1 μl Oligo（dT），DEPC 水补足至 15 μl，70 ℃孵育 5 min，加入 5× Buffer 5 μl、RNase inhibitor 1 μl、dNTPs 3 μl、M-MLV ReverTra Ace 1 μl，离心混匀，PCR 仪上，42 ℃ 60 min，85 ℃ 6 min。PCR 反应条件：94 ℃ 2 min，94 ℃ 20 s，58 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s，40 循环。融解曲线分析：温度 62～95 ℃，每个样重复 3 次。MDC 上游引物 5'- TGCCGTGATTACGTCCGTTA-3'；下游引物 5'-AAGGTTAGCAACACCACGCC-3'；TARC 上游引物 5'-CTCCAGGGATGCCATCGTTT-3'；下游引物 5'-CTCTTGTTGTTGGGGTCCGA-3'；CTACK 上游引物 5'-TCAGCTCTACCGAAAGCCAC-3'；下游引物 5'-GATGCAGATGCTGCGTTGAG-3'；RANTES 上游引物 5'-'TGCTGCTTTGCCTACATTGC-3'；下游引物 5'-CCAGACTTGCTGTCCCTCTC-3'；IP-10 上游引物 5'-GGCCATCAAGAATTTACTGAAAGC-3'；下游引物 5'-TCTGTGGGTCCATCCTTGGAA-3'；内参 GAPDH 上游引物：5'-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3'，下游引物：5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'。实验按照 2-△△Ct 方法处理数据。其中，△Ct=（目的基因 Ct- 内参 Ct）的平均值± 标准偏差；△△Ct=（待测样品中目的基因△Ct- 参照样品中目的基因△Ct）的平均值± 标准偏差（若无参照样品则选择 Ct 最大的样品为参照进行计算）；相对样品初始模板量 =（2-△△Ct）的平均值± 标准偏差。

1.6 ELISA 检测外周血清中 TNF-α、IL-17A、IL-23、TGF-β1 的表达水平：取上述收集的冻存上清，应用固相夹心法酶联免疫吸附试验（ELISA）检测上清中 TNF-α、IL-17A、IL-23、TGF-β1 水平，具体操作按试剂盒提供的说明书进行。

1.7 统计学处理 数据处理采用 SPSS17.0 统计学软件，计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，各组间均数首先进行方差齐性检验，如满足方差齐性，采用两样本 t 检验，如不满足，则采用秩和检验方法，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床疗效比较 我们治疗 6 周后观察疗效，43 例红花逍遥片治疗组中 36 例感觉瘙痒症状减轻，皮损明显好转，总有效率为 83.7%；其中临床基本治愈 26 例，显效 10 例，好转 5 例，无效 2 例。而氯雷他定颗粒对照组中 24 例皮损消退明显，感觉瘙痒减轻，总有效率为 57.1%（其中临床基本治愈 5 例，显效 19 例，好转 10 例，无效 8 例）。治疗组总有效率明显高于对照组，计算两组等级疗效的 Ridit 值进行分析，结果 u=4.1731，$P<0.05$，两组临床疗效进行比较差异有显著性意义。

2.2 两组患者治疗前后 MDC/CCL22、TARC/CCL17、CTACK/CCL27、RANTES/CCL5 和 CXCL10/IP-10 mRNA 表达比较 与对照组比较，治疗组 CXCL10/IP-10 和 TARC/CCL17 的 mRNA 表达明显降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；MDC/CCL22 和 RANTES/CCL5 mRNA 表达变化不明显；CTACK/CCL27 表达有所降低，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。红花逍遥片治疗组 CXCL10/IP-10 mRNA 扩增条带的数值组治疗前为（3.53± 0.62），治疗后为（0.74± 0.16），治疗组前后（配对）比较 t=28.2552，差异有显著性意义（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 MDC/CCL22、TARC/CCL17、CTACK/CCL27、RANTES/CCL5 和 CXCL10/IP-10 mRNA 表达水平比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	MDC /CCL22	TARC /CCL17	CTACK /CCL27	RANTES /CCL5	CXCL10 /IP-10
治疗组	43	1.04± 0.32	1.75± 0.39	2.06± 0.40	2.04± 0.37	3.53± 0.62
对照组	42	1.08± 0.28	1.49± 0.41	1.85± 0.58	1.93± 0.39	0.74± 0.16
t		0.6127	2.9961	1.9471	1.3342	28.2552
P		>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	<0.01

2.3 两组治疗前后患者血清中 TNF-α、IL-17A、IL-23、TGF-β1 的表达比较 IL-17A 分子表达量治疗组治疗前为（68.32± 13.47）pg/ml，治疗后为（20.56± 15.51）pg/ml，下调显著且与 CXCL10/IP-10 分子表达水平呈正直线相关（r=0.5218，$P<0.05$）关系。TNF-α、TGF-β1 治疗前后变化不明显；而 IL-23 治疗后表达水平有所下降，但与 CXCL10/IP-10 及 TARC/CCL17 均无明显相关性（r=0.1582，$P>0.05$；r=0.1397，$P>0.05$）。对照组治疗前后四项指标比较均无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

表 2　两组治疗前后患者血清中 TNF-α、IL-17A、IL-23、TGF-β1 的检测结果比较（pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

组别		IL-17	TNF-α	IL-23	TGF-β1
治疗组	治疗前	68.32± 13.47	174.03± 33.29	568.52± 123.67	468.35± 84.22
	治疗后	20.56± 15.51	159.81± 39.56	453.80± 105.09	434.65± 79.87
对照组	治疗前	70.17± 14.18	173.10± 36.72	610.07± 106.04	477.03± 80.25
	治疗后	63.59± 16. 85	156.90± 40.64	568.51± 99.75	439.80± 98.78
t	治疗组	15.168 3（$P<0.05$）	1.794 7（$P>0.05$）	4.603 5（$P<0.05$）	1.892 0（$P>0.05$）
	对照组	1.949 7（$P>0.05$）	1.929 2（$P>0.05$）	1.860 2（$P>0.05$）	1.909 2（$P>0.05$）

3　讨论

Thomas Werfel 对 AD 免疫反应的各个阶段进行了总结，阐明不同的 T 细胞亚群如 Th1、Th2 细胞、Treg 细胞与 Th17 细胞在炎症反应中起重要作用。在这些炎症细胞网络中，树突状细胞（Dendritic Cells,DC）和角质形成细胞则是 AD 致病中的关键触发要素。过敏原可能通过血液或表皮到达皮肤，特异性的 IgE 结合 DCs 或肥大细胞上的 Fc 受体，帮助抗原呈递给特异性 T 淋巴细胞。急性期活化的主要为 Th2 细胞因子 IL-4 和组织胺等；亚急性期可能与 Treg 细胞相关，而慢性病程则是 Th1 相关的因子 IL-12 和 IL-18 等[3~4]。这些观点许多与中医学理论不谋而合，AD 属中医的“浸淫疮”（《诸病源候论》）和“奶癣”（《外科正宗》）范畴，在临床上辨证分型多为湿热内蕴、脾虚湿蕴和血虚风燥三型，可分别对应于 AD 急性期、亚急性期和慢性期。本研究发现红花逍遥片联合甘草润肤洗剂对血虚风燥型 AD 患者效果明显优于对照组，差异有统计学意义。红花逍遥片主要成分是当归、白芍、白术、茯苓、红花、皂角刺、竹叶柴胡、薄荷、甘草组成，其中竹叶柴胡、红花和皂角刺为君药，疏肝解郁、活血通经散毒；白芍、当归养血柔肝，白术、茯苓健脾去湿一起作为臣药；薄荷疏肝郁所生之热，甘草益气补中，缓肝之急，为佐使之品。方中皂角刺能通肺及大肠，既能熄风止痒，又能托毒攻伐，对于顽固蕴久深在之湿毒作痒（特别是血虚风燥顽湿之毒），用之最为相宜。血虚风燥证型 AD 患者临床表现为皮损反复发作和缓解，导致 Th1、Th2 和表皮角质形成细胞通过释放趋化因子介导皮肤重塑。有研究表明 Th1 倾向于通过 CXCR3 的配体 CXCL10（P-10）和 CXCL11（MIG）所趋引；Th2 细胞倾向于表达 CCR3、CCR4 等而被 CCL11 或 CCL22 所吸引，从而被选择性的募集到炎症反应部位[5]。AD 和哮喘等 Th2 型为主导的疾病一般和高表达的 TARC/CCL17、MDC/CCL22 和 CCL18 等趋化因子密切相关。CCL18 能趋化过敏性皮炎患者的 T 细胞向皮肤表皮移行，从而在疾病的最初始时期发挥作用。MDC/CCL22 也有类似作用，它和 CXCL12 分子介导 Treg 细胞驱动的 Th2 细胞优先增殖。而皮肤 T 细胞趋化因子 CTACK/CCL27 是 CC 型趋化因子家族中的一员，在 AD 患者血清和病变组织中的 CTACK/CCL27 表达显著增高，且和 TNF-a 的高表达密切相关[6]。Nakazato J 等结果认为 TARC/CCL17 属于 Th2 型细胞因子，主要和 AD 患儿炎症渗出、血管炎症病变纤维化的病情严重程度紧密相关；而 CCL5 主要趋化 CCR5 阳性 T 细胞（主要为 Th1 细胞）到达炎症部位，介导皮损渗出反应[7]。

研究结果显示治疗组 CXCL10/IP-10 和 TARC/CCL17 的 mRNA 表达与对照组相比明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明这两个因子在红花逍遥片联合甘草润肤洗剂治疗血虚风燥型 AD 中起着重要作用。进一步血清中细胞因子检测 IL-17A 分子表达量治疗组治疗前为（68.32± 13.47）pg/ml，治疗后为（20.56± 15.51）pg/ml，下调显著且与 CXCL10/IP-10 分子表达水平呈正直线相关（r=0.5218，$P<0.05$）关系。TNF-α、TGF-β1 治疗前后变化不明显，提示该因子在血虚风燥证型患者中并未起实质作用；而 IL-23 治疗后表达水平有所下降，但与 CXCL10/IP-10 及 TARC/CCL17 均无明显相关性，显示可能起着非主导作用。IL-23 是 Th17 发育分化的一类重要的促动因子，有研究表明缺失 IL-23 靶基因的小鼠体液免疫和刺激 T 细胞分泌 IL-17 前炎症因子的能力受损严重[8]。在天然免疫和获得性免疫间可能存在 IL-17/IL-23 轴，IL-23 作用于已分化好的 Th17 细胞，并起到稳定和维持 Th17 细胞特性的作用[9]。上述结果表明红花逍遥片可能是通过调节 Th17 细胞产生 IL-17A 这个靶点，从而作用于多种细胞类型来诱导产生或抑制细胞因子（包括 TNF、IL-1β、IL-6、GM-CSF）、趋化因子（CXCL1、CXCL8、CXCL10/IP-10）或各种金属蛋白酶，从而发挥各种生物学效应包括表皮角质化，其中 CXCL10/IP-10 可能占据主导作用。

目前国内外关于 IL-17 在组织纤维化中的重要性尚未得出明确结论，有多篇研究认为 IL-17 是促进心肌纤维化还有肝纤维化的重要因素；IL-17 既可以通过诱导一些炎性细胞因子的表达、诱导促纤维

化因子 TGF-β 的表达,而促进肝纤维化发展,又可直接上调胶原的合成、促进肌成纤维细胞的活化。TGF-β1 作为关键的促纤维化因子,主要通过 Smad 信号通路而产生致纤维化效应[10]。我们试验表明在血虚风燥型 AD 患者中 TGF-β1 并非起着致纤维化主导作用,经过 6 周治疗治疗组患者的 IL-17、IL-23 及 CXCL10/IP-10 出现了显著抑制,说明红花逍遥片治疗可抑制 AD 患者的系统性 Th17 免疫反应,可能是通过下调 IL-17 和 IL-23 等分子抑制 CXCL10 (IP-10) 的表达从而调节表皮角质增生。CXCL10/IP-10 为非 ELR CXC 型趋化因子,这类趋化因子还可抑制血管生成,Zrioual S 等研究也发现 IL-17A 通过 TNF-α 诱导后,它可抑制 CXCL10/IP-10 mRNA 表达[11]。综上所述,我们结果表明红花逍遥片联合甘草润肤洗剂治疗 AD 可能是通过下调患者的 CXCL10/IP-10 和 IL-17 等分子的表达水平而起作用,下一步我们将在 AD 患者皮损标本中进一步验证其调控作用,以期为 AD 分型辨证和个体化治疗拓展新的思路。

参考文献

[1]黄玉贝,张华敏,刘松林.名老中医苏忠德丹栀逍遥散治疗湿疹的经验[J].光明中医,2010,25(6):943

[2]钟江,付兰兰,方刚,等.甘草润肤洗剂合多磺酸粘多糖乳膏治疗手部角化性湿疹 50 例临床研究 [J]. 浙江中医杂志,2010,45(9):635-636

[3]Werfel T.The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis [J].J Invest Dermatol, 2009,129(8):1878-1891

[4]Palmer CN,Irvine AD,Terron-KWiatkows-ki A,et al.Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis [J].Nat Genet, 2006,38(4):441-446

[5]Kaplan AP.Chemokines,chemokine receptors and allergy[J].Int Arch Allergy Immunol,2001,124(4):423-43

[6]Riis JL,Johansen C,Vestergaard C,et al.Kinetics and differential expression of the skin-related chemokines CCL27 and CCL17 in psoriasis, atopic dermatitis and allergic contact dermatitis [J].Exp Dermatol,2011,20(10):789-794

[7]Nakazato J,Kishida M,Kuroiwa R,et al.Serum levels of Th2 chemokines,CCL17,CCL22,and CCL27,were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis [J].Pediatr Allergy Immunol, 2008,19(7):605-613

[8]Baars EW,Nierop AF,Savelkoul HF.Development of systems biology-oriented biomarkers by permuted stepwise regression for the monitoring of seasonal allergic rhinitis treatment effects [J].J Immunol Methods,2012,378(1-2):62-71

[9]Bajoriuniene I,Malakauskas K,Lavinskiene S,et al.Response of peripheral blood Th17 cells to inhaled Dermatophagoides pteronyssinus in patients with allergic rhinitis and asthma [J].Lung, 2012,190(5):487-495

[10]Santiba 由 ez JF,Quintanilla M,Bernabeu C.TGF-β /TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions[J].Clin Sci(Lond),2011,121(6):233-251

[11]Zrioual S,Toh ML,Tournadre A,et al.IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood[J].J Immunol,2008,180(1):655-663

三伏灸贴(冬病夏治)防治支气管哮喘(慢性持续期)临床疗效观察

徐涵斌[1] 宋南昌[2#] 何勇[2] 潘浩[3] 周奕[3]

(1 南京中医药大学 江苏南京 210046;2 江西省南昌市中西医结合医院 南昌 330003;3 江西中医药大学 2013 级研究生 南昌 330006)

摘要:目的:观察三伏灸贴(冬病夏治)防治支气管哮喘(慢性持续期)的临床疗效。方法:将 80 例患者随机分为治疗组与对照组各 40 例。治疗组采用三伏灸贴治疗;对照组采用曼吉磁贴治疗。观察两组治疗前、治疗 1 年后及 3 年后哮喘症状评分和肺功能。结果:治疗 1 年后,两组患者哮喘症状评分和肺功能比较,有显著性差异($P<0.05$)。治疗 3 年后,两组患者哮喘症状评分和肺功能比较,有极显著性差异($P<0.01$)。结论:三伏灸贴(冬病夏治)疗法能有效地缓解支气管哮喘患者的症状,改善肺功能,从而提高患者生活质量,值得推广使用。

关键词:支气管哮喘;慢性持续期;三伏灸;穴位贴敷;艾灸

中图分类号:R562.25 **文献标识码**:B doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.10.005

支气管哮喘(慢性持续期)是呼吸系统的常见病、多发病,常常反复发作、迁延难愈,严重影响着患者的生活质量和工作,许多患者因此丧失了工作能力,对家庭和社会造成严重的不利影响。随着空气污染和家庭装修材料的广泛使用等因素,罹患支气管哮喘(慢性持续期)人群逐年增加,其中儿童患者占有一定的比例。西医西药可以有效地控制支气管哮喘的急性发作、缓解症状,但不能有效地控制病情

通讯作者:宋南昌,E-mail:459935351@qq.com