

文章编号:1671-7554(2007)01-0031-04

## 卡莫氟对强直性脊柱炎 Th1/Th2 类细胞 因子表达影响的研究

杨清锐<sup>1</sup>,张源潮<sup>1</sup>,李 鸣<sup>1</sup>,孙红胜<sup>1</sup>,牟 坤<sup>2</sup>

(山东大学 1. 山东省立医院风湿免疫科, 山东 济南 250021;  
2. 医学院病理学教研室, 山东 济南 250012)

**[摘要]** 目的:观察卡莫氟(1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil, HCFU)和柳氮磺胺吡啶(sulfalazine, SSZ)治疗强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)后体内 Th1/Th2 类细胞因子的变化。方法:19例 AS 患者随机分为2组,分别给予 HCFU(9例)和 SSZ(10例),RT-PCR 检测其治疗前后外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中细胞因子  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)mRNA 片段的表达。结果:HCFU 治疗后 AS 患者 PBMC 中 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达率分别为 33.33%、44.44%,与治疗前相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),IL-2、IL-4 及 IL-6 mRNA 的表达差异无统计学意义。SSZ 治疗后 AS 患者 PBMC 中 IFN- $\gamma$  mRNA 的阳性表达率为 70%,半定量结果显示,治疗后 PBMC 中 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。80% AS 患者在治疗后 PBMC 中 IL-4 mRNA 呈阳性表达,较治疗前 21.05%明显升高( $P < 0.05$ )。IL-2、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达无明显变化( $P > 0.05$ )。结论:HCFU 能使 TNF- $\alpha$  mRNA 表达降低,促进 AS 患者的免疫应答从 Th1 型向 Th2 型转变,小剂量即可使病情缓解。SSZ 未发现对 TNF- $\alpha$  mRNA 表达有明显影响,可促使 AS 患者的免疫应答从 Th1 型向 Th2 型转变。

**[关键词]** 脊柱炎,强直性; Th1 细胞; Th2 细胞; 柳氮磺胺吡啶; 卡莫氟

**[中图分类号]** R593.23 **[文献标识码]** A

### Role of 1-Hexylcarbamoyl-5-Fluorouracil on the Th1/Th2 balance in patients with ankylosing spondylitis

YANG Qing-ru<sup>1</sup>, ZHANG Yuan-chao<sup>1</sup>, LI Ming<sup>1</sup>, SUN Hong-sheng<sup>1</sup>, MU Kun<sup>2</sup>

(1. Department of Rheumatology and Immunology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China;

2. Department of Pathology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the influence of sulfalazine (SSZ) and 1-Hexylcarbamoyl-5-Fluorouracil (HCFU) on T helper cytokines in patients with ankylosing spondylitis (AS). **Methods:** Nineteen AS patients were randomized treated with SSZ or HCFU. The RT-PCR semi-quantitative method was employed to determine the mRNA expression of Th1/Th2 cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 and TNF- $\alpha$ ). The changes of Th1/Th2 subgroups modulated by SSZ and HCFU was studied. **Results:** HCFU administration was followed by a decrease expression of IFN- $\gamma$  mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA (33.33% vs 89.74%, 44.44% vs 94.74%,  $P < 0.05$ ), whereas other cytokines (IL-2, IL-4, IL-6) produced no significant changes ( $P > 0.05$ ). SSZ administration was followed by an increased expression of IL-4 mRNA (80% vs 21.05%,  $P < 0.05$ ) and a decrease expression of IFN- $\gamma$  mRNA ( $P < 0.05$ ), whereas other cytokines (IL-2, IL-6, and TNF- $\alpha$ ) produced no significant changes ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** HCFU and SSZ therapy for AS patients

**[基金项目]** 山东省科技发展计划资助课题(2005GG4402007)。

**[作者简介]** 杨清锐(1973-),男,博士在读,主治医师,主要研究方向:强直性脊柱炎遗传机制的研究。

results in a shift from Th1 to Th2 subsets. HCFU can decrease the mRNA levels of TNF- $\alpha$ .

[KEY WORDS] Spondylitis, ankylosing; Th1 cell; Th2 cell; Sulfalazine; 1-Hexylcarbamoyl-5-Fluorouracil

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种以中轴骨骼系统受累为主的慢性炎性疾病,骶髂关节炎和椎旁小关节炎是其标志性改变。目前,柳氮磺胺吡啶(sulfalazine, SSZ)广泛用于治疗 AS,卡莫氟(1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil, HCFU)为啞啞拮抗剂,具有免疫抑制作用。本研究采用半定量 RT-PCR 方法检测了 AS 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC) Th1/Th2 类细胞因子 mRNA 的表达,对 SSZ 和 HCFU 治疗前后 AS 患者 Th1/Th2 类细胞因子谱的变化进行了对比分析,报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 随机选择山东省立医院风湿科专家门诊初诊 AS 患者 19 例,其中,男 17 例,女 2 例;年龄为 12 ~ 31 岁,平均(21.21  $\pm$  5.62)岁;病程 0.25 ~ 14 年。入选患者随机分为 SSZ 和 HCFU 2 组,SSZ 组:男 8 例,女 2 例;起病年龄为 12 ~ 25 岁,平均 19.42 岁;病程 0.25 ~ 2 年,平均(1.01  $\pm$  0.72)年。HCFU 组:男 9 例,女 0 例;起病年龄为 12 ~ 30 岁,平均 17.69 岁;病程为 0.25 ~ 1.5 年,平均(0.97  $\pm$  0.41)年。两组患者在性别、起病年龄及病程差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。诊断采用 1984 年纽约修订标准。详细记录 AS 患者治疗前后的症状、体征(胸廓活动度、Schober 试验、4 字试验等)和家族史;实验室检查包括血常规、血沉(ESR)、C 反应蛋白(CRP)、免疫球蛋白(Ig)。腰痛程度判定采用视物模拟尺法。

### 1.2 方法

1.2.1 给药方法 SSZ 组患者给予 SSZ, 750 mg/次, 3 次/d, 戴芬 75 mg, 1 次/d; HCFU 组患者给予 HCFU 50 mg, 1 次/d, 戴芬 75 mg, 1 次/d。1 月后复查。

1.2.2 常规分离外周血单个核细胞 EDTA 抗凝血 3 ml, 密度梯度离心法常规分离 PBMC。

1.2.3 抽提 RNA 采用异硫氰酸胍一步法提取 RNA。

1.2.4 逆转录反应 引物序列见表 1。 $\beta$ -actin 引物由中国科学院上海生科院植物生理生态研究所合成, TNF- $\alpha$  引物由上海 Sangon 公司合成, IL-2 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 均由美国 Virginia 大学高斌博士惠赠。

万方数据

DEPC 水混匀的 RNA 标本约 11  $\mu$ l, MMLV 1.0  $\mu$ l、下游引物 P2 1  $\mu$ l 逆转录反应体系 7  $\mu$ l, 总反应体积 20  $\mu$ l, 快速离心混匀; 37  $^{\circ}$ C 1 h, 95  $^{\circ}$ C 10 min(灭活 MMLV), 快速离心。

表 1 5 种细胞因子及  $\beta$ -actin 的引物序列

细胞因子	引物序列	长度(bp)
$\beta$ -actin	P <sub>1</sub> 5'-GTG GGC CGC CCC AGG CAC CA-3'	500
	P <sub>2</sub> 5'-CTC CIT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'	
IFN- $\gamma$	P <sub>1</sub> 5'-ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TT-3'	494
	P <sub>2</sub> 5'-GTA GCT CTT CGA CCT CGA AAC AGC AT-3'	
IL-2	P <sub>1</sub> 5'-ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTC TCT T-3'	458
	P <sub>2</sub> 5'-GTT AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGAC-3'	
IL-4	P <sub>1</sub> 5'-ATG GGT CTC ACC TCC CAA GTG CT-3'	456
	P <sub>2</sub> 5'-CGA ACA CIT TGA ATA TTT CTC TCT CAT GA-3'	
IL-6	P <sub>1</sub> 5'-CC GAATC ATG ATT GAC AAA CAA ATT CGG-3'	531
	P <sub>2</sub> 5'-CGC GGA TCC TTA CAT TTG CCG AAG AG-3'	
TNF- $\alpha$	P <sub>1</sub> 5'-CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG-3'	354
	P <sub>2</sub> 5'-CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG-3'	

1.2.5 PCR 反应 上述含 20  $\mu$ l RT 产物加入 PCR 反应体系 11  $\mu$ l、上游引物 P1 1  $\mu$ l、加入 DEPC 水 66  $\mu$ l, 快速离心混匀, PCR 仪中 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 快速离心, 使蒸汽沉于管底, 加入 2  $\mu$ l Taq DNA 聚合酶, 快速离心混匀, 总反应体积 100  $\mu$ l。加入 100  $\mu$ l 液体石蜡。循环条件 94  $^{\circ}$ C 1 min、58  $^{\circ}$ C 1 min、72  $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次, 最后 72  $^{\circ}$ C 延长 7 min。电泳鉴定。

1.2.6 凝胶成像分析系统检测阳性细胞因子和  $\beta$ -actin 表达强度 按相对系数 = 待测细胞因子表达强度/ $\beta$ -actin 表达强度计算相对系数。

1.3 统计学处理 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 计量资料采用  $t$  检验。统计学界值为 0.05。所有资料均在 SPSS13.0 软件下完成。

## 2 结果

2.1 SSZ 组 AS 患者治疗后 PBMC 中 Th1/Th2 类细胞因子 mRNA 的表达 经过 1 个月 SSZ 治疗, AS 患者 PBMC 中 IFN- $\gamma$  mRNA 的阳性表达率为 70% (7/10 例), 半定量结果显示, 治疗后 PBMC 中 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。80% (8/10 例) 的 AS 患者在治疗后 PBMC 中 IL-4 mRNA 呈阳性表达, 较治疗前的 21.05% (4/19 例) 明显升高( $P < 0.05$ )。

但 IL-2、IL-6 和 TNF- $\alpha$ mRNA 的表达无明显变化( $P > 0.05$ )。(见表 2、图 1、2)

表 2 SSZ 组患者治疗后 PBMC 中 Th1/Th2 细胞因子 mRNA 的表达

细胞因子	治疗前(n=19)		治疗后(n=10)	
	阳性例数	半定量值	阳性例数	半定量值
IFN- $\gamma$	17	0.672	7	0.368*
IL-2	2	0.195	0	<0.1
IL-4	4	0.169	8*	0.271*
IL-6	5	0.229	2	0.194
TNF- $\alpha$	18	0.706	7	0.621

\* $P < 0.05$  vs 治疗前

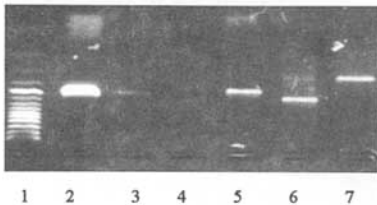


图 1 AS 患者治疗前 Th1/Th2 类细胞因子的表达  
Fig.1 Expression of Th1/Th2 cytokines mRNA in AS patients before treatment

Lane 1: Marker; Lane 2:  $\beta$ -actin; Lane 3: IFN- $\gamma$ ; Lane 4: IL-2; Lane 5: IL-4; Lane 6: IL-6; Lane 7: TNF- $\alpha$

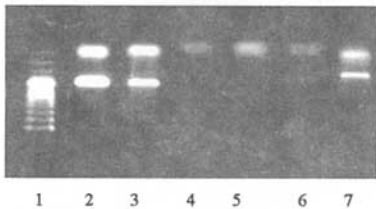


图 2 SSZ 治疗后 AS 患者 Th1/Th2 类细胞因子的表达  
Fig.2 Expression of Th1/Th2 cytokines mRNA in AS patients after treated with SSZ

Lane 1: Marker; Lane 2:  $\beta$ -actin; Lane 3: IFN- $\gamma$ ; Lane 4: IL-2; Lane 5: IL-4; Lane 6: IL-6; Lane 7: TNF- $\alpha$

2.2 HCFU 组 AS 患者治疗后 PBMC 中 Th1/Th2 类细胞因子 mRNA 的表达 经过 1 月 HCFU 的治疗, AS 患者 PBMC 中 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达率分别为 33.33%、44.44%,与治疗前相比明显降低( $P < 0.05$ )。但 IL-2、IL-4 及 IL-6 mRNA 的表达差异无统计学意义。(见表 3、图 3)。

表 3 HCFU 组患者治疗后 PBMC 中 Th1/Th2 细胞因子 mRNA 的表达

细胞因子	治疗前(n=19)		治疗后(n=9)	
	阳性例数	半定量值	阳性例数	半定量值
IFN- $\gamma$	17	0.672	3*	0.284*
IL-2	2	0.195	0	<0.1
IL-4	4	0.169	2	0.171
IL-6	5	0.229	2	0.125
TNF- $\alpha$	18	0.706	4*	0.397*

\*  $P < 0.05$  vs 治疗前

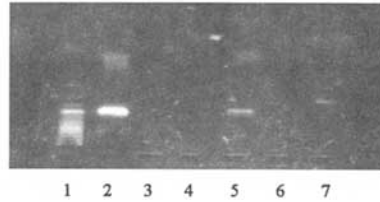


图 3 HCFU 治疗后 AS 患者 Th1/Th2 类细胞因子的表达  
Fig.3 Expression of Th1/Th2 cytokines mRNA in AS patients after treated with HCFU

Lane 1: Marker; Lane 2:  $\beta$ -actin; Lane 3: IFN- $\gamma$ ; Lane 4: IL-2; Lane 5: IL-4; Lane 6: IL-6; Lane 7: TNF- $\alpha$

2.3 两组 AS 患者治疗前后临床表现比较 同治疗前相比,治疗后 SSZ 组患者腰痛和腰椎活动度明显减轻( $P < 0.05$ ),HCFU 组患者表现为腰痛程度减轻和 IgM 血清浓度降低( $P < 0.05$ )。其他病情活动参数如胸廓活动度、ESR、CRP 等虽有不同程度的改善,但差异无统计学意义。见表 4。

表 4 SSZ 组 AS 患者治疗前后临床表现比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	SASP 组		HCFU 组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
腰痛	5.57 $\pm$ 1.90*	2.43 $\pm$ 1.27	5.67 $\pm$ 1.21*	2.00 $\pm$ 0.89
胸廓活动度	2.90 $\pm$ 1.11	3.24 $\pm$ 1.13	3.31 $\pm$ 1.16	3.67 $\pm$ 1.18
Schober	3.81 $\pm$ 1.08*	4.86 $\pm$ 1.40	4.87 $\pm$ 1.13	5.15 $\pm$ 1.71
PLT	234.86 $\pm$ 47.22	221.71 $\pm$ 48.97	348.17 $\pm$ 140.61	312.00 $\pm$ 126.29
ESR	47.71 $\pm$ 33.22	28.86 $\pm$ 21.87	18.67 $\pm$ 14.77	23.33 $\pm$ 23.11
CRP	20.57 $\pm$ 5.86	12.52 $\pm$ 8.78	23.67 $\pm$ 18.86	19.11 $\pm$ 15.18
IgG	13.24 $\pm$ 1.79	12.63 $\pm$ 1.57	11.98 $\pm$ 3.89	11.52 $\pm$ 2.73
IgM	1 804.86 $\pm$ 633.29	1 787.71 $\pm$ 337.75	1 661.67 $\pm$ 247.5*	1 186.67 $\pm$ 226.42
IgA	2 204.29 $\pm$ 456.28	2 111.43 $\pm$ 643.05	2 106.67 $\pm$ 704.86	1 975.00 $\pm$ 1 528.99

\* $P < 0.05$  vs 治疗前

万方数据

### 3 讨论

CD4+T细胞可分为3个亚型,即Th0细胞、Th1细胞和Th2细胞。其中,Th1细胞主要分泌IFN- $\gamma$ 、IL-2和TNF- $\alpha$ ,引起细胞免疫应答;Th2细胞主要分泌IL-4、IL-6和IL-10,介导体液免疫。研究认为<sup>[1]</sup>,AS患者活动期体内炎性细胞因子表达以Th1为主,表现为IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ mRNA的表达升高,其中IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ mRNA的表达升高被认为是AS患者炎性活动和关节破坏的原因。体外研究发现,TNF- $\alpha$ 可激活多形核细胞,刺激滑膜细胞产生前列腺素,并且通过刺激成骨细胞释放Ca<sup>2+</sup>,抑制碱性磷酸酶和胶原合成来增强骨和软骨破坏。动物实验证实<sup>[2]</sup>:TNF- $\alpha$ 转基因鼠可产生自发性关节炎。TNF- $\alpha$ 阻滞剂(Etanercept和infiximab)治疗AS的临床研究显示抗TNF- $\alpha$ 的治疗具有抗炎和改善病情的作用<sup>[3,4]</sup>。

本研究结果表明,HCFU和SSZ皆有促进Th1/Th2细胞平衡恢复从而控制关节炎症的作用。但二者免疫调节位点并不完全一致。其中,HCFU主要是通过抑制Th1细胞功能,减少IFN- $\gamma$ 分泌来发挥作用;SSZ主要是通过抑制IFN- $\gamma$ 分泌和增加IL-4的表达来达到逆转Th1/Th2细胞平衡的作用。另外,HCFU对TNF- $\alpha$ mRNA的表达亦有降低作用,未发现SSZ对其他细胞因子(如TNF- $\alpha$ 、IL-6等)的表达有明显作用。二者治疗后AS患者的症状、体征和实验室指标皆有不同程度的改善。

HCFU是细胞S期特异性药物,在体内可缓慢释放5-氟尿嘧啶(5-FU)<sup>[5]</sup>。其对Th1/Th2细胞平衡的恢复作用与5-FU参入增殖活跃淋巴细胞的DNA分子或RNA分子,并最终阻断遗传信息传递或使其传递发生错误有关。具有作用时间长,毒性小等优点。临床观察发现:HCFU每日50mg即有明显疗效。HCFU对TNF- $\alpha$ mRNA表达的明显抑制作用提示其可能具有阻止关节破坏的功能。本研究对1例服用HCFU1年的AS患者的随访亦发现,其骶髂关节放射学检查呈稳定状态。另外,本研究有1例AS患者在治疗1月后临床症状基本消失,细胞因子检测呈Th2优势免疫应答。但出现IgA轻度升高,原因不清。HCFU主要不良反应为轻度腹泻,未发现骨髓抑制和肝、肾功能破坏。因样本较小,HCFU在AS治疗中的确切作用尚有待正规临床试验的进一步验证。

SSZ是5-氨基水杨酸和磺胺吡啶的偶氮复合

物。口服后在肠道内分解。国外认为其对AS外周关节炎的控制较佳<sup>[6,7]</sup>。本研究结果表明,SSZ对Th1/Th2细胞平衡有明显影响,可能是其缓解AS病情的主要原因之一。有学者对AS患者单个核细胞进行体外培养时发现,SSZ可抑制IL-1和IL-6等细胞因子的分泌。IL-6是TNF- $\alpha$ 和IL-1生物效应的放大因子,在骨及软骨的破坏中起协同作用。但本研究资料AS患者在治疗前后PBMC中IL-6mRNA的表达皆与正常对照无差异,故无法得出SSZ对IL-6mRNA有无影响的结论。SSZ不良反应主要为消化道不适,部分患者不能耐受。

### [参考文献]

- [1] 杨清锐,张源潮,张春玲. 强直性脊柱炎Th1/Th2相关细胞因子的检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(4): 328-329.
- [2] Butler DM, Malfait AM, Mason LJ, et al. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition[J]. J Immunol, 1997, 15(159): 2 867-2 876.
- [3] Maksymowych WP, Poole AR, Hiebert L, et al. Etanercept exerts beneficial effects on articular cartilage biomarkers of degradation and turnover in patients with ankylosing spondylitis[J]. J Rheumatol, 2005, 32(10): 1 911-1 917.
- [4] Marzo-Ortega H, McGonagle D, Jarrett S, et al. Infiximab in combination with methotrexate in active ankylosing spondylitis: a clinical and imaging study[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(11): 1 568-1 575.
- [5] Ooi A, Ohkubo T, Higashigawa M, et al. Plasma, intestine and tumor levels of 5-fluorouracil in mice bearing L1210 ascites tumor following oral administration of 5-fluorouracil, UFT (mixed compound of tegafur and uracil), carmofur and 5'-deoxy-5-fluorouridine[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(11): 1 329-1 331.
- [6] Schmidt WA, Wierth S, Milleck D, et al. Sulfasalazine in ankylosing spondylitis: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled study and comparison with other controlled studies[J]. Z Rheumatol, 2002, 61(2): 159-167.
- [7] Clegg DO, Reda DJ, Abdellatif M. Comparison of sulfasalazine and placebo for the treatment of axial and peripheral articular manifestations of the seronegative spondylarthropathies: a Department of Veterans Affairs cooperative study[J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(11): 2 325-2 329.

[收稿日期 2006-09-01]

(编辑:刘霞)