

中医药对抗类风湿性关节炎多药耐药的思路及方法

马武开 钟 琴 刘正奇 姚血明 贾二涛

(贵阳中医学院第二附属医院风湿免疫科, 贵州省贵阳市飞山街 83 号, 550003)

[摘要] 类风湿性关节炎(RA)的多药耐药(MDR)是指RA患者对某一种药物耐药的同时,对其他结构和机制不同的药物也产生了耐药,是RA治疗失败的原因之一,如何逆转RA耐药,提高抗风湿药物的敏感性已成为国外现代医学研究的热点。中医药通过多成分、多途径协同作用于多个部位和靶点,集中体现了中医理论的精华,是逆转多药耐药研究的方向。从中医药增加RFC活性、提高细胞内药物浓度,降低MDR基因的表达,阻断NF- κ B活性、提高靶向治疗效果等方面提出逆转RA耐药的新思路,有望克服RA患者的耐药。

[关键词] 类风湿性关节炎;中医药;多药耐药;思路

甲氨喋呤(MTX)作为一种治疗类风湿性关节炎(RA)的第一线改善病情的抗风湿药(DMARDs)已被很多国家的风湿科医生或专家所采纳应用。迄今为止,几乎所有治疗RA新药的上市前临床试验均将它列为首选的阳性对照药物,甚至有学者将之比喻为Anchor Drug。但可惜的是,在以MTX治疗RA时,部分患者疗效欠佳,甚至无效。当MTX治疗效果不佳时,应用其他DMARDs如柳氮磺胺吡啶(SSZ)、硫唑嘌呤、羟氯喹、来氟米特等也不敏感,除RA本身的特点、患者依从性因素等外,药物的多药耐药(MDR)是一个重要原因。

药物的耐药包括原药耐药和MDR,原药耐药是组织细胞内固有的特性,即细胞在以前没有接触过某种药物的情况下就对这种药物耐药,而多药耐药是指对某一种药物耐药的同时,对其他结构和机制不同的药物也产生了耐药性,是治疗失败的原因之一。多药耐药的发生可以分为原发性耐药和继发性耐药两种形式。原发耐药是细胞固有的对药物的不敏感,即首次用药产生耐药;继发性耐药是指初始对药物敏感,但经过几个疗程的治疗后,对药物产生了耐药。

1 多药耐药的发生机制

作为治疗失败的原因之一,耐药在肿瘤和抗感染的治疗中已得到足够重视,但在RA的治疗中却刚刚被认识。导致抗风湿药物失效的根本原因尚未完全清楚,但它可能是或部分是由细胞的耐药所介导的。目前研究比较清楚的是MTX的耐药机制,即由于细胞膜上载体蛋白的表达减少或转运能量的改变,导致MTX摄入细胞减少和细胞内药物浓度的降低,从而影响药物疗效。另外,在细胞内MTX被转化为多聚谷氨酸盐的形式也是耐药的一个原因^[1]。而柳氮磺胺吡啶发生耐

药的可能机制是药物的排出增加。RA需要用药的时间很长,保持病情缓解抗风湿药的疗效是个挑战。

2007年Nature系列杂志的Clin Pract Rheumatol发表了一篇荷兰医学专家对传统DMARDs耐药的综述性论文^[2]。作者在文章中详细介绍了MTX治疗RA产生耐药性研究的最新进展。首先,MTX发挥疗效,必须进入靶向的免疫细胞内,而进入细胞主要通过两条途径:RFC途径和叶酸受体(FR)途径。而SSZ能竞争性结合RFC,叶酸能竞争性结合FR,所以在临床上应用MTX治疗RA时,合并应用SSZ或高剂量的叶酸会降低MTX的疗效,或者先天的FR或RFC水平较低的,都会引起患者对MTX耐药。其次,细胞内的MTX可通过叶酰基聚谷氨酸合成酶转化成MTX聚谷氨酸盐(MTXPG),反之后者可由叶酰基聚谷氨酸水解酶转化成MTX。与MTX比较,MTXPG的细胞泵出度显著下降,使细胞内的MTX水平持续稳定或高表达,从而增加MTX的疗效。MTXPG可直接作用靶向酶如二氢叶酸还原酶、5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸甲酰基转移酶等,从而抑制嘌呤和胸腺嘧啶的合成,以及炎症因子的释放,最终发挥MTX的疗效,所以任何能改变靶向酶的活性或表达,损害MTXPG存在或表达的因子,都会直接或间接地导致MTX耐药。外源性或内源地补充叶酸或嘌呤,以及肝脏代谢增强(如将MTX代谢成7-氢化MTX)都会影响MTX的疗效,产生耐药。

由于MTX的作用是通过RFC转运入细胞内而起效,再通过mdr1和MRP转运出细胞外而失效,因此,MTX的耐药还可能与mdr1和MRP的高表达有关。P-gp是mdr1基因编码的一种分子量为170KD的跨膜蛋白,通过它的两个核苷酸结合位点水解ATP获得能量,将有毒性的亲脂性药物从细胞内泵出细胞外,使细胞内药物积聚减少,降低细胞毒性药物在细胞内的浓

度,从而产生耐药,导致治疗失败。Llorente 等检测了 16 例 RA 患者外周血单个核细胞 P-gp 表达发现,8 例难治性 RA 患者 P-gp 表达较对照组明显增高,从而认为 MTX 耐药可能与 P-gp 高表达有关^[3]。MRP 也是一个能量依赖性的外排泵,它的底物是与谷胱甘肽结合的亲脂性复合物以及阴离子残基,包括白三烯以及 S-谷胱甘肽。通过水解 ATP 获能,把谷胱甘肽-葡萄糖醛酸-、硫酸盐-药物结合物泵出细胞外或细胞内囊泡,降低细胞内药物浓度。Wolf 等检测 163 例 RA 患者 MRP 表达和 RFC 含量,结果显示,MRP/RFC 均阴性组和 MRP/RFC 均阳性组 MTX 治疗效果最好(有效率为 60% 和 53%),MRP 阳性/RFC 阴性组有效率仅为 29%,因此认为,MRP 和 RFC 同时缺乏或同时表达的 RA 患者对 MTX 治疗效果好,可作为预测 MTX 治疗效果的前瞻性指标^[4]。

2 多药耐药的逆转

在研究 MDR 产生机制的同时,如何克服 MDR 是国内外研究的重要课题。目前主要应用的 MDR 逆转剂包括:①ATP 结合膜糖蛋白为作用靶点的逆转剂;②与谷胱甘肽代谢有关酶为作用靶点的逆转剂;③以蛋白激酶 C 为作用靶点的逆转剂;④以拓扑异构酶 II 为作用靶点的逆转剂;⑤其他逆转剂。据报道,非类固醇类抗炎药吲哚美辛可与胎盘型谷胱甘肽转移酶(GST- π)结合,克服苯丁酸氮芥的耐药问题,但其在体内的有效浓度尚未确认。柳氮磺吡啶是 GST- π 的非特异性抑制剂,可提高顺铂的细胞毒作用。

目前对肿瘤细胞耐药逆转剂的研究较多,包括钙通道阻滞剂(维拉帕米、异博定等)、激素、环孢素 A 及衍生物、肿瘤坏死因子、细胞因子、干扰素及某些从中药中提取的单体物质(如粉防己甲素、汉防己甲素、补骨脂提取物等)。此类药物逆转细胞耐药的机制有两方面,一是与化疗药物竞争性结合 P-gp 的结合点,使抗肿瘤药物与 P-gp 的结合减少,抑制药物外排,增加细胞内药物浓度;二是抑制 *mdr1* 基因的表达,或直接抑制 P-gp 的合成,降低 P-gp 的含量^[5]。

MDR 是肿瘤细胞耐药的主要形式,也是导致风湿免疫病耐药的主要原因,因此,注重 MDR 发生机制的研究,针对性地设计出一些特异性的干预措施,提高组织细胞对药物的敏感性,对于预防或克服 RA 多药耐药具有重要作用。由于 MDR 产生的机制复杂,采用单一措施来达到逆转目的是不切实际的,因此,对抗 MDR 宜采用综合治疗措施,如基因转导技术、反义核酸、免疫治疗等新方法、新技术,预防、逆转、诱导分化及促凋亡等,有可能为提高 RA 的治疗效果、克服耐药提供新思路和新策略。

3 中医学对 RA 的认识

RA 属中医学“痹证”、“尪痹”、“骨痹”等范畴,《内经》最早提出了风寒湿邪与机体“外内相合”致痹的观点,认为“风寒湿三气杂至,合而为痹也”;“逆其气则病,从其气则愈,不与风寒湿气合,故不为痹”;“阴气少,阳气多,故为病热;阳气少,阴气多,故为病寒”等,指出痹证的发生除了风寒湿外邪的侵袭外,还由于机体内部脏腑经络阴阳失调逆乱的导致,“两气相感”而发病,强调先有脏腑内伤、阴阳失调及营卫不和,后风寒湿邪乘虚内侵而致病。根据 RA 的发生和演变过程,我们认为,“毒蕴血瘀”是其主要病理基础,并贯穿于整个病程的始终。毒的来源有:①风、寒、湿、热外感病邪转化之毒;②某些药物,特别是一些抗风湿药物反复作用于人体,以致药毒内陷;③机体在代谢过程中或代谢失常所产生,未能及时、有效地排除而停留于体内形成内生之毒。这些有“毒”物质如不及时得到祛除,留恋机体,导致脏腑、经络、营卫、气血之间关系失常,正所谓“无邪不有毒,热从毒化,变从毒起,瘀从毒结”。毒邪一经形成,深入关节经隧,阻碍气血的运行而致瘀,瘀积日久不散,久蕴则成瘀毒。不论是因正气不足而外感邪毒,或因邪毒外感而伤及正气,均可导致“毒蕴血瘀”。毒邪侵入关节经脉,经络受阻,气血运行不畅,甚至瘀塞不通,则出现关节疼痛、僵硬、不得屈伸等症。因此,“毒蕴血瘀”的理论揭示了 RA 发展的总趋势,表明其发展过程中必然存在毒瘀互结、络脉瘀阻的病理病变,是其病情缠绵,久发难愈的根源所在。

4 中医药逆转 RA 多药耐药

传统中医药逆转肿瘤细胞耐药的研究已有近 20 年的历史,取得了较好的成就,被证实具有耐药逆转作用的中药活性成分有数十种,如汉防己甲素、补骨酯素、苦参碱、人参皂苷、斛皮素、丹皮酚、川芎嗪、姜黄素、蝎毒、冬凌草甲素、紫杉醇、贝母甲素等^[6,7]。这些药大多数具有钙通道拮抗作用,通过降低 P-糖蛋白表达,增加细胞内的药物浓度,或下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,促使耐药细胞凋亡,从而达到耐药逆转的作用。现代研究表明,抗风湿药物对 RA 的耐药机制与抗肿瘤药物相似,因此,推测中医药能够通过逆转抗风湿药物的耐药,恢复其疗效。

4.1 增加 RFC 活性,提高细胞内药物浓度

叶酸盐进入细胞通过两种途径:叶酸盐受体和 RFC。叶酸盐受体对叶酸的亲和力比对还原叶酸的亲和力要高,RFC 对还原叶酸的亲和力相对高。MTX 因其结构与生理性叶酸盐相同,主要通过 RFC 转运入细胞内,因此,RFC 功能下降是 MTX 耐药的主要原因之一^[4]。克服 RA 患者 RFC 低表达的可能对策是采用抗

叶酸的抗风湿药物或联用增强抗风湿作用的药物,提高RFC活性,从而达到耐药逆转作用。现代研究表明,许多中药、中药活性成分(如多糖、苷类)及中药复方都具有很好的免疫调节作用,在一定剂量范围内能增强机体免疫功能,或使紊乱的机体免疫状态恢复正常,提高MTX在RA治疗中的敏感性。中药如人参、黄芪、枸杞子、茯苓、灵芝、女贞子、甘草等具有调节人体免疫功能,增加RA患者的抗病能力^[8],但是否具有促进RFC活性,增加MTX敏感性的作用尚须进一步研究。

4.2 降低多药耐药基因的表达

在RA的治疗中,糖皮质激素、非类固醇类抗炎药、慢作用抗风湿药及免疫抑制剂是重要的治疗药物,并且常为多种药物长期、联合应用,但仍有部分患者在治疗开始或治疗中对药物不敏感。导致抗风湿药物失效的根本原因尚未完全清楚,但它可能是或部分是由细胞的耐药所介导的。其耐药机制包括药物到靶细胞的传递受损、药物摄取障碍、药物排除增加、细胞内药物活性改变、作用靶的抑制等,而目前研究最多的是与mdr1和MRP高表达有关的药物转运载体。由于mdr1和MRP是药物的外排泵,其高表达能使细胞内药物积聚减少,降低细胞毒性药物在细胞内的浓度,从而产生耐药^[9]。因此,阻断mdr1和MRP活性,降低其在细胞内的表达是逆转MDR主要措施之一。在研究肿瘤细胞耐药逆转剂过程中发现,部分中药如汉防己、川芎、丹参、补骨脂、浙贝母等具有钙离子拮抗作用,可通过降低mdr1和MRP表达而逆转MDR^[6],推测这些肿瘤耐药逆转剂可能同样具有逆转RA多药耐药的作用。

4.3 阻断NF- κ B活性,达到靶向治疗

现代研究表明,核转录因子NF- κ B可能通过信号传导通路,调控基因的表达,从而参与RA的发生和发展。在正常情况下,NF- κ B位于细胞胞浆内,一般由两个功能亚单位,即p65和p50所组成,同时和其天然性的抑制因子IKBa和IKBb结合在一起,而后者阻止NF- κ B进入细胞核,调控相关的靶基因。一旦细胞受到刺激(感染、氧化和抗原等),IKB磷酸化,相应的蛋白酶体发生降解,NF- κ B激活,进入细胞核,与靶基因结合,后者可产生大量的炎症介质(如白细胞介素1b和肿瘤坏死因子a),引起炎症反应的发生,同时基因的产物会进一步激活NF- κ B,从而扩大局部的异常炎症反应^[10]。正是由于NF- κ B在RA发病中的关键作用,所以NF- κ B已做为一种新型的抗炎靶向,成为治疗RA的研究热点。因此,从RA的产生及演变过程探索其中医病因病机,在中医中药理论指导下寻找天然中药复方逆转剂是新的研究方向,将为临床逆转多药耐药提

供新的手段。以NF- κ B信号通路为靶点研究中药复方对抗RA的耐药机制,可能为RA的治疗发掘出新的药物。

现代研究显示,中医药逆转多药耐药的机制非常复杂,使用单一成分逆转耐药的方法受到挑战。中药复方多成分通过多途径协同作用于多个部位和靶点,集中体现了中医理论的精华,是逆转多药耐药研究的方向。中医药逆转RA多药耐药的研究要有所突破,首先应从RA患者耐药机制的研究中获得突破,在既往的研究中,更多的是针对RA的中医病因病机进行探讨,较少从中医角度去探讨RA患者应用DMARDs疗效不佳原因及产生机制。

参考文献

[1] Koizumi S, Curt GA, Fine RL, et al. Formation of methotrexate polyglutamates in purified myeloid precursor cells from normal human marrow. J Clin Invest, 1985, 75 (3):1008-1014.

[2] van der Heijden JW, Dijkmans BA, Scheper RJ, et al. Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs — from bench to bedside [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3(1):26-34.

[3] Llorente L, Richaud-Patin Y, Diaz-Borjon A, et al. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome [J]. Joint Bone Spine, 2000, 67 (1):30-39.

[4] Wolf J, Stranzl T, Filipits M, et al. Expression of resistance markers to methotrexate predicts clinical improvement in patients with rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(4):564-568.

[5] 常宏宇. 白血病多药耐药逆转研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(Suppl 1):101-102.

[6] 李冬云, 陈信义, 刘瑞娟. 单味中药成分逆转白血病多药耐药基础研究评述 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(11):951-953.

[7] 杨燕霞, 蔡宇, 徐炎, 等. 中药逆转肿瘤多药耐药的研究进展 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17):1862-1863.

[8] 陈明明, 王科, 李世杰. 扶正抑癌中药免疫调节作用的研究进展 [J]. 中华医药杂志, 2007, 7(1):40-42.

[9] 马劼, 赖永榕, 卢玉英, 等. 急性白血病多药耐药基因与多药耐药相关蛋白基因的表达及临床研究 [J]. 中华内科杂志, 1999, 38(1):47.

[10] Feldmann M, Andreakos E, Smith C, et al. Is NF-kappa B a useful therapeutic target in rheumatoid arthritis? [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(Suppl 2):13-18.