

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.09.010

益气养阴通络方治疗气阴两虚型干燥综合征患者 30 例随机对照研究

孙思凌¹, 汪元²✉, 刘健², 黄传兵², 张皖东², 孙玥², 黄旦²

1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽省合肥市蜀山区梅山路 117 号, 230000; 2. 安徽中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 观察益气养阴通络方治疗气阴两虚型干燥综合征(SS)患者的临床疗效,并探讨其可能作用机制。**方法** 选取60例气阴两虚型SS患者随机分为治疗组及对照组各30例,另选取同时期健康人30名为正常组。治疗组给予益气养阴通络方,每日1剂,分早晚两次温服;对照组给予硫酸羟氯喹口服,每次0.1g,每日3次。两组均连续治疗8周后比较两组患者临床疗效总有效率,分别采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测正常组及治疗组、对照组患者治疗前后血清白细胞介素1 β (IL-1 β)和白细胞介素18(IL-18)水平,免疫印迹实验法(WB)检测外周血单个核细胞(PBMC)中Nod样受体蛋白3(NLRP3)、半胱天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、消皮素D(GSDMD)蛋白表达。透射电镜观察PBMC细胞焦亡形态。评估疾病活动指数(ESSDAI)、自我报告指数(ESSPRI)评分、中医证候积分。魏氏法检测两组红细胞沉降率(ESR),免疫散射比浊法测C反应蛋白(CRP)、免疫球蛋白(IgG)、补体C3、C4水平。**结果** 治疗组临床疗效总有效率(86.7%)优于对照组(60.0%, $P<0.05$)。与对照组治疗后比较,治疗组中医证候积分、ESSDAI、ESSPRI评分、ESR、CRP、IgG水平明显降低,C3、C4明显升高,均优于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常组比较,透射电镜下治疗组与对照组患者PBMC均出现胞浆肿胀、膜破裂、鼓泡等焦亡形态学变化,患者血清IL-1 β 、IL-18水平及PBMC中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白表达均显著升高($P<0.01$);治疗组与对照组治疗后NLRP3、caspase-1、GSDMD水平及IL-1 β 、IL-18水平均明显下调($P<0.05$),两组患者PBMC细胞焦亡均减少,治疗组细胞焦亡减少更明显($P<0.01$)。**结论** 益气养阴通络方可有效缓解SS临床症状及免疫炎症反应,其作用机制可能与调控NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号轴功能,抑制细胞焦亡有关。

[关键词] 干燥综合征;气阴两虚;益气养阴通络方;细胞焦亡;NLRP3/Caspase-1/GSDMD

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种慢性免疫性系统性疾病,以口、眼干燥为主要临床表现,严重者可累及其他重要器官,致多系统受累。本病在我国人群中发病率为0.29%~0.77%^[1]。本病病因和发病机制尚未完全明确,炎症反应和免疫系统异常被认为与该病密切相关^[2]。细胞焦亡作为近几年新发现的一种促炎性细胞死亡方式,被认为在SS发生发展中起重要作用^[3],NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号轴的异常激活与细胞焦亡密切相关^[4],

是焦亡发生的经典途径。Nod样受体蛋白3(NLRP3)/半胱天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)/消皮素D(GSDMD)信号轴的重要效应蛋白NLRP3、Caspase-1、GSDMD及其下游炎症因子白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素18(IL-18)被发现在SS患者的泪液和唾液腺组织中呈高表达,这种炎症因子的长时间释放会触发SS患者免疫系统过度活跃,导致疾病的持续和进展^[4-5]。国医大师徐经世认为本病基本病机为气阴两虚、瘀血阻络^[6],益气养阴通络方以二至丸为基础方化裁而成,应用于SS临床治疗取得良好疗效^[7]。本研究拟观察益气养阴通络方治疗气阴两虚型SS患者的临床疗效及对NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号轴的影响,为其临床应用提供依据。本研究经

基金项目:安徽省青年领军后备人才支持项目(中发展[2022]4号);安徽省教育厅2019年度高校优秀拔尖人才培养资助项目(gxyq2019031)

✉ 通讯作者:echowang0268@126.com

安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会审查通过(伦理批准号: 2021AH-15)。

1 临床资料

1.1 诊断标准

西医诊断标准: 符合 2016 年美国风湿病学会/欧洲抗风湿病联盟 (ACR/EULAR) 最新国际 SS 分类标准^[8]。1) 唇腺、唾液腺组织病理活检显示灶性淋巴细胞浸润, 且灶性指数 ≥ 1 个灶/ 4 mm^2 (3分); 2) 抗 Ro/SSA 抗体阳性 (3分); 3) 至少一侧眼表染色 (+) (≥ 5 ocular staining 计分法) 或 (≥ 4 van Bijsterveld 计分法) (1分)^[9]; 4) 至少一侧眼的泪液分泌试验 $\leq 5\text{ mm}/5\text{ min}$ (1分); 5) 无刺激的唾液流量 $\leq 0.1\text{ ml}/\text{min}$ (1分)。5项总和 ≥ 4 分可诊断 SS。

中医辨证标准: 根据 2010 年国家中医药管理局印发的《22 个专业 95 个病种中医诊疗方案》^[10]中“燥痹”气阴两虚证相关内容及临床实践制定, 主症: 两目干涩、口燥咽干、皮肤干燥、舌红少苔或苔少而干、剥脱或无苔、脉细数或细弱; 次症: 五心烦热、盗汗、唾液腺肿、发热、关节疼痛、体倦乏力、干咳, 符合上述主症 3 项及以上+次症 1 项及以上, 即可诊断。

1.2 纳入标准

1) 符合以上西医诊断标准及中医辨证标准; 2) 年龄 ≥ 18 岁; 3) 自愿参加本研究并签署知情同意书。

1.3 排除标准

1) 对治疗药物过敏; 2) 合并严重感染、重要脏器损伤和造血系统等严重疾病, 如严重肺间质性病变、严重血液系统受损; 3) 妊娠期及哺乳期妇女; 4) 近 1 个月内使用过激素或者免疫抑制剂; 5) 合并其他严重风湿病。

1.4 脱落标准

1) 未定期服药, 且不遵医嘱加用治疗 SS 药物; 2) 出现严重肝、肾功能损害, 红细胞、白细胞、血小板减少等不良反应; 3) 未完成用药周期, 资料不全或失访。

1.5 一般资料

选取 2021 年 6 月 1 日至 2022 年 6 月 31 日安徽省中医院风湿病科住院的气阴两虚型 SS 患者 60 例, 治疗组男 4 例, 女 26 例; 年龄 30~75 岁, 平均 (55.13 ± 13.77) 岁; 病程 1~10 年, 平均 (4.1 ± 2.19) 年。对照组男 6 例, 女 24 例; 年龄 31~71

岁, 平均 (54.73 ± 13.23) 岁; 病程 1~8 年, 平均 (4.37 ± 2.44) 年。两组一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。

2 方法

2.1 样本量估算及分组方法

利用 MedSci 6.3.1 样本量计算软件 (进行试验样本量的估算, 根据既往临床研究观察^[7], 预估益气养阴通络方临床有效率为 76%, 文献资料显示羟氯喹有效率为 43.3%^[11], 两组平行对照按照 1:1 设计, 取 $\alpha=0.05$, $\beta=0.20$, 计算得出样本量 $N=25$, 考虑可能出现 20% 脱落率, 最终估算两组病例最少共 60 例。

采用随机数字表产生随机序列, 用不透明密闭信封实现随机隐藏, 计划将受试者按照 1:1 的比例随机分组, 共准备 60 个不透明封闭信封, 治疗组与对照组各 30 个, 让受试者随机抽取进行分组。另在安徽省中医院健康体检中心选取同时期 30 名健康体检者设为正常组。

2.2 治疗方法

治疗组: 给予益气养阴通络方加减。该方由太子参 20 g, 黄芪 20 g, 酸枣仁 20 g, 炒白芍 20 g, 北沙参 15 g, 麦冬 15 g, 川芎 9 g, 甘草 6 g 组成。随症加减: 若口干明显伴干咳少痰等肺阴亏虚明显者, 加川贝母 6 g、芦根 15 g; 伴低热不退、潮热盗汗、阴虚内热明显者, 加地骨皮 12 g、青蒿 9 g; 唇舌干燥、心悸怔忡、虚烦不寐等心阴亏虚明显者, 加五味子 9 g; 若双目干涩、视物模糊、头晕耳鸣、腰膝酸软等肝肾阴虚明显者, 加枸杞子 9 g、龟甲 15 g。中药饮片均购自安徽省中医院, 由煎药房专业人员熬制, 每日 1 剂, 煮取 400 ml, 早晚各 200 ml 温服。

对照组: 给予以硫酸羟氯喹片 (每片 0.1 g, 上海中西制药有限公司, 国药准字 H19990263), 每次 1 片, 每日 3 次。

两组患者均治疗 8 周。

2.3 观察指标和方法

2.3.1 中医证候积分及临床疗效标准 中医证候积分参考国家中医药管理局 2010 年印发的《22 个专业 95 个病种中医诊疗方案》^[10]中气阴两虚证“燥痹”相关内容, 按主次症状进行积分, 主要症状包括两目干涩、口燥咽干、皮肤干燥、舌象, 次要症状包括五心烦热、唾液腺肿、发热、关节疼痛、体倦乏力、干咳, 分别按无、轻、中、重计为

0、3、6、9 分及 0、2、4、6 分。

临床疗效标准依据《中医病证诊断疗效标准》^[12]及《实用中医风湿病学》^[13]中关于燥痹的评价标准拟定,依尼莫地平法公式计算。显效:患者治疗后证候评分较治疗前减少 $\geq 70\%$;有效:患者治疗后证候评分较治疗前减少 $\geq 50\%$ 但 $< 70\%$;改善:患者治疗后证候评分较治疗前减少 $\geq 20\%$ 但 $< 50\%$;无效:患者治疗后证候评分较治疗前减少 $< 20\%$ 。总有效率=(显效+有效+改善)/总例数 $\times 100\%$ 。

2.3.2 疾病活动度评分 疾病活动指数(ESSDAI)评分^[14]:分为轻(0~4分)、中(5~13分)、重(≥ 14 分)3个等级,主要记录全身症状、淋巴结病变、腺体病变、关节病变、皮肤病变、肺部病变、肾脏病变、肌肉病变、外周神经病变、中枢神经病变、血液系统病变、血清学变化12个方面的病情活动程度。

自我报告指数(ESSPRI)评分^[15]:包括干燥症状、疲劳、关节疼痛3项,每项0~10分,三者分值相加取均值,分值越高表示症状越严重。

2.3.3 实验室指标 包括免疫球蛋白(IgG)水平、C反应蛋白(CRP)及补体C3、C4水平。两组患者治疗前后清晨收取空腹静脉血5 ml,由安徽省中医院检验科检测,采用免疫散射比浊法检测IgG、CRP水平及C3、C4水平(贝克曼5800全自动生化分析仪,试剂:贝克曼原装试剂,批号:IgG: 2547、CRP: 2400、C3: 2557、C4: 2558),用魏氏法检测ESR(Monitor100全自动血沉仪,意大利ELECTA-LAB)。

2.3.4 细胞因子 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测正常组及治疗组、对照组患者治疗前后血清标本中白细胞介素1 β (IL-1 β)和白细胞介素18(IL-18)水平,具体实验步骤按照ELISA试剂盒说明书执行(IL-1 β 、IL-18试剂盒由泉州市睿信生物科技有限公司提供,批号分别为RX106152H、RX106154H)。

2.3.5 焦亡相关蛋白 PBMC细胞提取:用PBS稀释全血,离心管加入适量分离液,稀释后的血液平铺到分离液液面上方;室温离心500~1000 g/20~30 min,离心后出现明显分层,血浆与分离液之间的白膜层即为淋巴细胞层;吸取白膜层细胞到15 ml离心管,加入PBS洗涤细胞,离心250 g/min细胞;弃上清,加入5 ml PBS重悬细胞,离心25 g/10 min细胞;弃上清,重复上述步骤;弃上清,得细胞重悬备用。将收集的PBMC细胞沉淀,每6孔板加入100 μ l RIPA细胞裂解液(内含1 mM PMSF),

冰上裂解30 min。离心15 min,收集上清液,即为总蛋白。经过电泳、转膜、封闭,用一抗稀释液进行稀释,稀释倍数1:10000,孵育过夜,洗涤液(PBST)洗涤3次,二抗孵育2 h, PBST洗涤3次,使用ECL超敏发光试剂盒检测NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白表达,以条带与内参 β -Actin的比值作为蛋白的相对表达量。

NLRP3、GSDMD、Cleaved Caspase1单抗均由Affinity公司提供,批号分别为7p8121、55h2355、17i9147。 β -actin、山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG、PBS缓冲液粉末,均由Zs-BIO公司提供,批号分别为19AW0505、142637、139931、19071101。ECL超敏发光试剂盒(Thermo公司,批号:S1257444);电镜固定液(Servicebio公司,货号:G1102);丙酮(国药集团化学试剂有限公司,货号:10000418)。

2.3.6 透射电镜观察PBMC细胞形态学变化 PBMC细胞提取后,2.5%戊二醛4 $^{\circ}$ C固定1.5 h,0.1 mol/L磷酸缓冲液PB(pH 7.4)配制的1%锇酸避光室温固定2 h, PB洗涤后,按30%、50%、70%、80%、95%、100%、100%酒精上行脱水各20 min,100%丙酮上行脱水两次,各15 min,丙酮812包埋后37 $^{\circ}$ C烤箱过夜,包埋板放于60 $^{\circ}$ C烤箱聚合48 h,取出超薄切片,150目方华膜铜网捞片,于2%醋酸铀饱和酒精溶液避光染色8 min;70%酒精、超纯水清洗各3次;2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色8 min;超纯水清洗3次,滤纸稍吸干。铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜。透射电子显微镜(厂家:JEOL;型号:JEM-1400flash)下观察,采集图像分析。

2.4 统计学方法

采用SPSS 27.0统计学软件,计量资料均符合正态分布,用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,方差齐者采用 t 检验,方差不齐者采用秩和检验;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。

3 结果

3.1 两组患者临床疗效比较

表1示,治疗组临床疗效总有效率为86.67%,对照组为60.00%,两组比较差异有统计学意义($Z=-2.041$, $P=0.041$),治疗组优于对照组。

3.2 两组患者治疗前后中医证候积分及疾病活动度评分比较

表2示,两组治疗前中医证候积分比较差异均无统计学意义[两目干涩($t=0.537$, $P=0.593$)、

表 1 两组气阴两虚型干燥综合征患者临床疗效比较
Table 1 Comparison of clinical effect in patients with Sjögren's syndrome of both qi and yin deficiency pattern between the two groups [例(%)]

组别	例数	显效	有效	改善	无效	总有效
治疗组	30	15 (50.00)	7 (23.33)	4 (13.33)	4 (13.33)	26 (86.67)
对照组	30	10 (33.33)	4 (13.33)	4 (13.33)	12 (40.00)	18 (60.00)

口燥咽干 ($t=0.0236, P=0.814$)、皮肤干燥 ($t=0.158, P=0.875$)、舌象 ($t=1.840, P=0.071$)、五心烦热、盗汗 ($t=0.273, P=0.786$)、唾液腺肿 ($t=0.361, P=0.720$)、发热 ($t=0.146, P=0.885$)、关节疼痛 ($t=0.150, P=0.882$)、体倦乏力 ($t=0.535, P=0.594$)、干咳 ($t=0.513, P=0.610$)]。

与本组治疗前比较, 治疗组治疗后两目干涩、口燥咽干、皮肤干燥、舌象、五心烦热、盗汗、关节疼痛、体倦乏力积分水平均明显下降 ($P<0.01$); 对照组治疗后两目干涩、口燥咽干、皮肤干燥、舌象积分水平均明显下降 ($P<0.01$)。

与对照组治疗后比较, 治疗组两目干涩 ($t=3.829, P<0.001$)、口燥咽干 ($t=2.168, P=0.034$)、皮肤干燥 ($t=3.195, P=0.002$)、舌象 ($t=6.458, P<0.001$)、五心烦热、盗汗 ($t=4.335, P<0.001$)、关节疼痛 ($t=2.652, P=0.010$)、体倦乏力 ($t=4.927, P<0.001$) 积分明显降低。

表 3 示, 两组治疗前 ESSDAI ($t=0.437, P=0.664$)、ESSPRI ($t=0.667, P=0.507$) 评分比较差异均无统计学意义。与治疗前比较, 治疗组治疗后 ESSDAI ($t=12.172, P<0.001$)、ESSPRI ($t=11.438, P<0.001$) 评分均明显降低, 对照组治

疗后 ESSDAI ($t=5.368, P<0.001$)、ESSPRI ($t=6.349, P<0.001$) 评分均明显降低。与对照组治疗后比较, 治疗组 ESSDAI ($t=7.205, P<0.001$)、ESSPRI ($t=4.255, P<0.001$) 评分均明显降低。

表 3 两组气阴两虚型干燥综合征患者治疗前后疾病活动度相关指标评分比较
Table 3 Comparison of disease activity-related indexes before and after treatment in patients with Sjögren's syndrome of both qi and yin deficiency pattern between two groups (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	时间	例数	ESSDAI 评分	ESSPRI 评分
治疗组	治疗前	30	4.33±0.48	4.33±0.47
	治疗后	30	1.13±0.35 ^{a)} b)	1.53±0.51 ^{a)} b)
对照组	治疗前	30	4.53±0.73	4.53±0.51
	治疗后	30	2.33±0.61 ^{a)}	2.60±0.50 ^{a)}

注: ESSDAI 评分, 疾病活动指数; ESSPRI 评分, 自我报告指数。
a) 与本组治疗前比较, $P<0.01$; b) 与对照组治疗后比较, $P<0.01$ 。

3.3 两组患者治疗前后实验室指标比较

表 4 示, 两组治疗前实验室指标比较差异均无统计学意义 [ESR ($t=0.658, P=0.513$)、CRP ($t=0.452, P=0.653$)、IgG ($t=1.287, P=0.203$)、C3 ($t=1.280, P=0.206$)、C4 ($t=0.391, P=0.697$)]。与治疗前比较, 治疗组治疗后 ESR ($t=13.545, P<$

表 2 两组气阴两虚型干燥综合征患者治疗前后中医症状评分比较
Table 2 Comparison of TCM syndrome scores before and after treatment in patients with Sjögren's syndrome of both qi and yin deficiency pattern between two groups (分, $\bar{x}\pm s$)

中医症状	治疗组				对照组			
	治疗前(30例)	治疗后(30例)	t 值	P 值	治疗前(30例)	治疗后(30例)	t 值	P 值
两目干涩	6.93±1.84	2.47±1.11 ^{a)}	11.410	<0.001	6.67±2.01	4.20±2.22	4.517	<0.001
口燥咽干	6.33±1.99	3.27±1.74 ^{a)}	6.356	<0.001	6.20±2.37	4.33±2.06	3.259	0.002
皮肤干燥	4.93±1.51	1.67±1.37 ^{a)}	8.776	<0.001	4.87±1.77	2.80±1.37	5.075	<0.001
舌象	4.33±1.24	2.40±1.43 ^{a)}	5.595	0.001	4.93±1.28	4.13±0.35	3.293	0.002
五心烦热、盗汗	3.03±1.22	1.40±0.50 ^{a)}	6.802	<0.001	2.93±1.60	2.47±1.25	1.260	0.213
唾液腺肿	1.27±1.08	0.87±0.35	0.361	0.720	1.37±1.07	0.87±0.50	0.443	0.180
发热	1.13±0.82	0.80±0.66	0.146	0.885	1.17±0.95	1.07±0.74	0.455	0.651
关节疼痛	3.20±1.65	2.07±1.20 ^{a)}	3.043	0.002	3.27±1.80	3.07±1.68	0.445	0.658
体倦乏力	3.67±1.95	1.33±1.12 ^{a)}	5.670	0.001	3.40±1.90	3.13±1.66	0.579	0.565
干咳	0.80±0.55	0.67±0.48	0.513	0.610	0.73±0.45	0.70±0.47	0.282	0.779

注: a) 与对照组治疗后比较, $P<0.01$ 。

表 4 两组气阴两虚型干燥综合征患者治疗前后实验室指标比较

Table 4 Comparison of laboratory outcomes before and after treatment in patients with Sjögren's syndrome of both *qi* and *yin* deficiency pattern between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	ESR (mm/h)	CRP (mg/L)	IgG (g/L)	C3 (mg/dL)	C4 (mg/dL)
治疗组	治疗前	30	58.53±13.86	2.36±0.58	20.12±5.04	1.21±0.28	0.39±0.24
	治疗后	30	19.10±7.88 ^{a)} c)	1.24±0.22 ^{a)} b) c)	9.83±1.07 ^{a)} c)	1.55±0.56 ^{a)} c)	0.75±0.22 ^{a)} c)
对照组	治疗前	30	55.70±19.07	2.51±0.52	18.33±5.69	1.14±0.12	0.42±0.27
	治疗后	30	30.33±6.05 ^{a)}	1.62±0.21 ^{a)}	14.50±6.92 ^{a)}	1.36±0.22 ^{a)}	0.59±0.23 ^{a)}

注: ESR, 红细胞沉降率; CRP, C反应蛋白; IgG, 免疫球蛋白G; C3, 补体C3; C4, 补体C4。

a) 与本组治疗前比较, $P<0.01$; b) 与对照组治疗后比较, $P<0.05$; c) 与对照组治疗后比较, $P<0.01$ 。

0.001)、CRP ($t=3.830$, $P<0.001$)、IgG ($t=10.899$, $P<0.001$)水平均明显降低, C3($t=5.876$, $P<0.001$)、C4 ($t=6.088$, $P<0.001$)较治疗前明显升高; 对照组治疗后 ESR ($t=6.944$, $P<0.001$)、CRP($t=3.470$, $P<0.001$)、IgG($t=2.340$, $P=0.023$)水平均明显降低, C3 ($t=4.893$, $P<0.001$)、C4 ($t=2.592$, $P=0.012$)较治疗前明显升高。与对照组治疗后比较, 治疗组治疗后 ESR ($t=6.192$, $P<0.001$)、CRP($t=2.041$, $P=0.046$)、IgG($t=3.653$, $P<0.001$)明显降低, 而C3($t=3.734$, $P<0.001$)、C4 ($t=2.873$, $P=0.006$)明显升高。

3.4 各组PBMC焦亡形态特征

透射电镜下正常组PBMC细胞结构完整, 内含丰富粗面内质网、线粒体等, 细胞状态良好。两组SS患者治疗前PBMC均观察到细胞变大变圆, 胞浆肿胀、膜破裂、鼓泡, 气泡状凸起物、伴膜孔, 呈典型细胞焦亡形态。两组治疗后电镜下观察到细胞形态均有不同程度好转, 胞浆肿胀、胞膜破裂减少, 细胞结构恢复, 结构完整的细胞增多, 其中治疗组细胞形态改善更明显。

3.5 两组患者治疗前后细胞因子水平比较

表5示, 治疗组及对照组治疗前 IL-1 β ($t=0.145$, $P=0.885$)及IL-18 ($t=0.049$, $P=0.961$)比较差异无统计学意义。与正常组比较, 治疗组患者治疗前外周血中 IL-1 β ($t=12.126$, $P<0.001$)、IL-18 ($t=5.213$, $P<0.001$)水平明显升高, 对照组患者治疗前外周血中 IL-1 β ($t=13.768$, $P<0.001$)、IL-18($t=5.403$, $P<0.001$)水平明显升高。与本组治疗前比较, 治疗后治疗组 IL-1 β ($t=6.752$, $P<0.001$)、IL-18 ($t=4.798$, $P<0.001$)水平均下降, 治疗后对照组 IL-1 β ($t=4.146$, $P<0.001$)、IL-18 ($t=2.030$, $P=0.047$)水平均下降。与对照组治疗后比较, 治疗组治疗后 IL-1 β ($t=2.102$, $P<0.001$)、IL-18($t=2.655$, $P=0.010$)下降更明显。

表 5 各组气阴两虚型干燥综合征患者治疗前后细胞因子水平比较

Table 5 Comparison of disease activity-related indexes before and after treatment in patients with Sjögren's syndrome of both *qi* and *yin* deficiency pattern in each group (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	IL-1 β	IL-18
正常组		30	6.65±6.19	40.12±28.68
治疗组	治疗前	30	30.53±8.83 ^{a)}	80.91±31.84 ^{a)}
	治疗后	30	15.00±8.97 ^{b)} c)	47.68±26.61 ^{b)} c)
对照组	治疗前	30	30.23±7.05 ^{a)}	80.52±29.24 ^{a)}
	治疗后	30	20.42±10.88 ^{b)}	65.12±29.51

注: IL-1 β , 白细胞介素-1 β ; IL-18, 白细胞介素-18。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与本组治疗前比较, $P<0.05$; c) 与对照组治疗后比较, $P<0.01$ 。

3.6 两组治疗前后焦亡相关蛋白水平比较

表6示, 两组治疗前焦亡相关蛋白水平各指标比较差异均无统计学意义 [Caspase-1 ($t=1.116$, $P=0.887$) GSDMD ($t=1.870$, $P=0.104$) NLRP3 ($t=1.237$, $P=0.073$)]。

表 6 两组气阴两虚型干燥综合征患者治疗前后焦亡相关蛋白水平比较

Table 6 Comparison of pyroptosis-associated protein levels before and after treatment in patients with Sjögren's syndrome of both *qi* and *yin* deficiency pattern in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	Caspase-1	GSDMD	NLRP3
正常组		30	0.43±0.03	0.41±0.04	0.41±0.04
治疗组	治疗前	30	0.93±0.02 ^{a)}	0.94±0.04 ^{a)}	0.89±0.03 ^{a)}
	治疗后	30	0.66±0.03 ^{b)} c)	0.63±0.03 ^{b)} c)	0.51±0.03 ^{b)} c)
对照组	治疗前	30	1.05±0.02 ^{a)}	1.05±0.06 ^{a)}	1.00±0.03 ^{a)}
	治疗后	30	0.77±0.04 ^{b)}	0.74±0.03 ^{b)}	0.67±0.03 ^{b)}

注: Caspase1, 半胱氨酸天冬氨酸酶1; GSDMD, 消蛋白D; NLRP3, Nod样受体蛋白3。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与本组治疗前比较, $P<0.01$; c) 与对照组治疗后比较, $P<0.01$ 。

与正常组比较, 治疗组治疗前患者 NLRP3($t=72.934$, $P<0.001$)、Caspase-1($t=70.139$, $P<0.001$)、GSDMD ($t=48.245$, $P<0.001$)蛋白明显升高,

对照组治疗前患者 NLRP3 ($t=94.312, P<0.001$)、Caspase-1 ($t=88.623, P<0.001$)、GSDMD ($t=50.527, P<0.001$) 蛋白明显升高。

与本组治疗前比较, 治疗组治疗后 NLRP3 ($t=50.216, P<0.001$)、Caspase-1 ($t=38.010, P<0.001$)、GSDMD ($t=31.218, P<0.001$) 蛋白表达下调; 对照组治疗后 NLRP3 ($t=43.233, P<0.001$)、Caspase-1 ($t=32.711, P<0.001$)、GSDMD ($t=27.015, P<0.001$) 蛋白表达下调; 治疗组治疗后 NLRP3 ($t=22.391, P<0.001$)、Caspase-1 ($t=10.170, P<0.001$)、GSDMD ($t=14.736, P<0.001$) 蛋白表达与对照组比较下调更明显。

4 讨论

SS 属于中医学“燥痹”范畴, 其基本病机在于气阴两虚, 脾胃阴虚在发病中起重要作用。脾胃为后天之本, 执中央以运四旁, 有化气生血之功, 可滋养四肢百骸^[16]。若中焦不运, 津化无源, 久而气阴两虚, 津液失于输布, 或炼液蒸津, 清窍失养, 脏腑不荣, 机体失润, 则成燥痹。脾虚不能运化, 津液无以上承, 则见两目干涩、口燥咽干; 不能外达四肢皮肤则见皮肤干燥, 气血津液乏源则脏腑不荣, 不荣则痛, 炼液蒸津、阴虚火旺可见五心烦热、盗汗、发热。甚者, 脾气阴两虚日久, 易损心神, 产生水湿、痰浊、瘀血, 使血失畅运, 血脉痹阻, 可见关节疼痛或心烦躁扰, 夜寐不安。

益气养阴通络方中太子参味甘、微苦而性平, 偏微寒, 既能益气, 又可养阴生津, 且药力平和, 为清补之品, 适用于脾肺亏虚、气阴不足、气津不足诸症, 与黄芪配伍, 以增强益气健脾之功, 共为君药; 北沙参、麦冬滋养肺胃、养阴生津, 白芍益胃生津、滋阴清热, 酸枣仁宁心安神、滋阴养肝、调和五脏, 均为臣药; 川芎为血中之气药, 方中少佐川芎以活血行气、祛风止痛; 甘草为使药调和诸药, 并合白芍酸甘养阴, 缓急止痛。

现代药理研究发现, 黄芪对唾液分泌有突出的促进作用, 其有效成分可有效抑制 NLRP3 炎症小体, 降低炎症因子水平减缓炎症反应^[17]。太子参有降糖调脂、抗疲劳、抗应激、增强免疫, 保护心肌、延长寿命等药理作用, 能提高 SS 小鼠免疫功能, 增加小鼠免疫器官的质量, 对小鼠网状内皮系统 (RES) 吞噬功能有明显的激活作用^[18]。麦冬对调节 Th1/Th2 平衡有一定作用, 可降低淋巴细胞浸润程度, 达到保护颌下腺、改善患者干燥症状、

治疗 SS 的作用^[19]。北沙参含有大量的多糖及多糖复合物, 可发挥调节免疫功能、促进腺体分泌作用, 有效缓解患者临床症状。白芍的多种有效成分通过多通路、多靶点, 发挥调节免疫细胞的功能和激活, 减少炎症因子的分泌和传导, 延缓外分泌腺体的炎症进展, 进而改善口干眼干症状^[20]。川芎内酯是川芎有效成分, 能有效调控 NF- κ B 信号通路, 通过下调 IL-6、IL-1 β 等下游炎症因子表达从而在免疫调节中发挥作用, 同时还可通过降低大鼠血浆中 TNF- α 水平, 抑制免疫炎症反应以发挥抗炎作用^[21]。酸枣仁具有抗焦虑、抗惊厥、镇静催眠、增强免疫功能、改善认知功能、抗炎、心肌保护作用等, 其所含黄酮类成分是影响血清细胞因子水平的物质基础, 能够降低焦虑模型大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 水平, 调节焦虑状态下机体内分泌-免疫功能紊乱^[22]。甘草素可降低 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 的表达, 有效抑制细胞炎症因子 IL-1 β 及 TNF- α 的释放, 甘草酸还能显著抑制 LPS 诱导的炎症介质产生, 发挥抗炎作用^[23]。由上可见该方的中药有效成分协同作用, 从而发挥抗炎、调节免疫作用。

SS 西医治疗多以对症处理为主, 常用免疫抑制药物临床推荐使用羟氯喹^[24], 故本研究选择羟氯喹为对照药物。SS 的确切发病机制仍不清楚, 近年来越来越多的研究证实, 细胞焦亡在 SS 的病理过程中起到重要作用^[25]。细胞焦亡是一种新型的炎症性细胞死亡途径, 其经典途径是 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号轴^[26]。NLRP3 炎症小体的激活是细胞焦亡过程中关键的环节, NLRP3 炎症小体能够调控固有免疫系统, 是组成宿主防御反应的关键, 可识别多种微生物、内源和外源危险信号, 使细胞因子释放, 活化炎症细胞, 参与多种炎症疾病进程^[27]。NLRP3 炎症小体的效应蛋白是以酶原形式存在于胞质中的 Caspase-1。GSDMD 是所有炎症 Caspase 的共同底物, 表达于免疫细胞, 是细胞焦亡的直接执行者。Caspase-1 被 NLRP3 激活后, 加工、分泌 IL-1 β 、IL-18, 切割 GSDMD, 致细胞膜孔洞形成, 细胞肿胀、破裂, 诱导细胞焦亡, 放大炎症反应^[28-29]。细胞焦亡产生丰富的炎症介质, 引发免疫系统过度活跃, 产生的促炎细胞因子分化成熟的 T 细胞诱导适应性免疫, 并使其失调, 然后导致自身免疫系统功能紊乱, 在上述条件下, 自身抗体和/或自身反应性 T 细胞会错误地攻击机体, 导致 SS 的发生和加重^[4-5]。

本研究中透射电镜观察到 SS 患者 PBMC 中出

现细胞变大变圆,胞浆肿胀、膜破裂、鼓泡,气泡状凸起物、伴膜孔,呈典型细胞焦亡形态变化,患者血清 IL-1 β 、IL-18 水平明显升高, NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达显著增加,提示细胞焦亡明显。益气养阴通络方治疗后患者 PBMC 细胞形态好转,胞浆肿胀、胞膜破裂减少,细胞结构恢复,结构完整的细胞明显增多,焦亡小体数量明显减少,且患者中医证候积分、疾病活动度评分、炎症指标水平明显下降, NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达及 IL-1 β 、IL-18 水平也明显降低,提示 SS 患者的免疫炎症状态与细胞过度焦亡有关。而益气养阴通络方可有效降低 SS 患者中医证候积分、生活质量评分、ESSDAI、ESSPRI 评分,且临床疗效优于硫酸羟氯喹片,其作用机制可能是通过下调焦亡通路相关蛋白表达,抑制 NLRP3/caspase1/GSDMD 信号轴过度活化,抑制炎症因子释放,减轻 SS 患者免疫炎症反应,从而缓解患者临床症状,控制 SS 疾病进展。

本研究是对中药复方治疗 SS 临床疗效及作用机制的初步观察,样本量较小、疗程较短,未能采取多中心、双盲、大样本研究,可能导致研究结果存在偏倚。下一步拟扩大样本量,从细胞分子学角度深入探讨其作用机制,为中医药治疗 SS 的临床应用提供高质量实验证据。

利益冲突声明

本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1]中华医学会风湿病分会.干燥综合征诊断及治疗指南[J].中华风湿病学杂志,2010,14(11):766-768.
- [2]陈志伟.重视原发性干燥综合征的腺体外表现[J].风湿病与关节炎,2013,2(2):5-7.
- [3]HONG SM, LEE J, JANG SG, et al. Type I interferon increases inflammasomes associated pyroptosis in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome [J]. Immune Netw, 2020, 20(5):e39.
- [4]ZARRIN AA, BAO K, LUPARDUS P, et al. Kinase inhibition in autoimmunity and inflammation [J]. Nat Rev Drug Discovery, 2021, 20(1):39-63.
- [5]DEETS KA, VANCE RE. Inflammasomes and adaptive immune responses [J]. Nat Immunol, 2021, 22(4):412-422.
- [6]汪元,梁红,徐经世.徐经世治疗干燥综合征经验[J].中医杂志,2018,59(14):1185-1188.
- [7]孙思凌,汪元,林章英,等.益气养阴通络法治气阴两虚型干燥综合征临床疗效观察[J].山西中医,2022,38(8):19-22.
- [8]SHIBOSKI CH, SHIBOSKI SC, SEROR R, et al. 2016 American College of Rheumatology/European league against rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts [J]. Arthritis Rheumatol, 2017, 69(1):35-45.
- [9]张顺华,卞爱玲,赵岩,等.角膜结膜染色评分新方法在原发性干燥综合征的应用[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2013,7(2):134-138,215.
- [10]国家中医药管理局医政司.22个专业95个病种中医诊疗方案[M].北京:中国中医药出版社,2011:274-279.
- [11]王瑞瑞,何晓瑾,金实,等.健脾润燥通络方加减治疗脾虚络阻型原发性干燥综合征30例临床观察[J].中医杂志,2021,62(5):419-423.
- [12]国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[M].南京:南京大学出版社,1994:139-140.
- [13]王承德,沈丕安,胡萌奇.实用中医风湿病学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2009:698-699.
- [14]SWROR R, RAVAUD P, BOWMAN SJ, et al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjögren's syndrome [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(6):1103-1109.
- [15]SEROR R, THEANDER E, BRUN JG, et al. Validation of EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient indexes (ESSPRI) [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(5):859-866.
- [16]姜泉,张华东,陈伟,等.路志正治疗干燥综合征经验[J].中医杂志,2016,58(6):463-465.
- [17]贾新菊,康岩,杜丽娜,等.黄芪甲苷抑制NLRP3/IL-1 β 轴改善高糖诱导的血管平滑肌细胞炎症反应[J].上海中医药大学学报,2020,34(3):62-69.
- [18]金桂兰,汪悦.气阴双补法对干燥综合征小鼠的实验研究[J].时珍国医国药,2009,20(12):3139-3142.
- [19]李成荫,汪悦,孙丽霞,等.麦冬多糖对NOD小鼠颌下腺保护作用研究[J].中国免疫学杂志,2014,30(2):198.
- [20]ZHANG LL, WEI W. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of paeoniflorin and total glucosides of paeony [J]. Pharmacol Ther, 2020, 207(C):107452.
- [21]李洁,马贤德.川芎嗪抑制CIRI大鼠小胶质细胞活化发挥抗炎作用机制的实验研究[J].免疫学杂志,2021,37(9):759-765.
- [22]王欣.酸枣仁汤抗焦虑作用的神经-内分泌-免疫网络调节机制[D].北京:北京中医药大学,2004.
- [23]DU YX, LUO M, FENG M, et al. The protective effect of liquiritigenin on Alzheimer's disease by inhibiting inflammation response [J]. Immunological Journal, 2019, 35

- (4):327-333.
- [24]张文,厉小梅,徐东,等.原发性干燥综合征诊疗规范[J].中华内科杂志,2020,59(4):269-276.
- [25]VAKRAKOU AG, BOIU S, ZIAKAS PD, et al. Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammatory DNA accumulations[J]. Autoimmun, 2018, 02(010): 23-33.
- [26]黄清宇,杜楚江,张雨竹,等.细胞焦亡研究进展[J].中国免疫学杂志,2020,36(2):245-250.
- [27]谷晓蕾. NLRP3 炎症小体在热应激损伤中的作用研究[D]. 上海:第二军医大学,2016.
- [28]AIZAWA E, KARASAWA T, WATANABE S, et al. GSDME-Dependent incomplete pyroptosis permits selective IL-1 α release under caspase-1 inhibition [J]. IScience, 2020, 23(5):101-120.
- [29]WANG Y, ZHU X, YUAN S, et al. TLR4/NF- κ B signaling induces GSDMD-Related pyroptosis in tubular cells in diabetic kidney disease [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 19(10):603-629.

***Yiqi Yangyin Tongluo Formula* (益气养阴通络方) in the Treatment of Sjögren's Syndrome of Deficiency of both *Qi* and *Yin* Pattern in 30 Cases: A Randomized Controlled Trial**

SUN Siling¹, WANG Yuan², LIU Jian², HUANG Chuanbing², ZHANG Wandong², SUN Yue², HUANG Dan²

1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, 230000; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the clinical effect and possible mechanism of *Yiqi Yangyin Tongluo Formula* (益气养阴通络方, YYTF) in treating Sjögren's syndrome (SS) of both *qi* and *yin* deficiency pattern. **Methods** Sixty SS patients of deficiency of both *qi* and *yin* pattern were randomly divided into a treatment group and a control group with 30 cases in each, and another 30 healthy people were selected as the normal group. The treatment group was given YYTF, one dose for twice daily, each in the morning and evening, and the control group was given hydroxychloroquine sulfate orally, 0.1 g per time, three times daily. Both groups were treated continuously for 8 weeks. The total effective rate was evaluated and compared between groups. The changes of serum interleukin (IL)-1 β and IL-18 levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and protein expression of Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), caspase-1 (Caspase-1), and sadermin D (GSDMD) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were detected by Western blot (WB) before and after treatment in the treatment group and the control group, and also health subjects. The pyroptotic morphology of PBMC cells was observed by transmission electron microscope. The EULAR SS disease activity index (ESSDAI), EULAR SS patient reported index (ESSSPRI), and TCM syndrome scores were evaluated. The erythrocyte sedimentation rate (ESR) of the two groups was detected by Wei's method, and the levels of C-reactive protein (CRP), immunoglobulin (IgG), and complement C3 and C4 were measured by immunoscattering turbidimetry. **Results** The total effective rate in the treatment group (86.7%) was higher than that in the control group (60.0%, $P < 0.05$). The treatment group was superior than the control group in decreasing TCM syndrome scores, ESSDAI and ESSSPRI scores, ESR, CRP, and IgG levels, and increasing C3 and C4 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the normal group, PBMCs in the treatment group and the control group showed pyroptotic morphological changes such as cytoplasmic swelling, membrane rupture, and bubbling under the transmission electron microscope, and the levels of serum IL-1 β and IL-18 as well as the protein expressions of NLRP3, caspase-1 and GSDMD in PBMCs significantly increased ($P < 0.05$); after treatment, the levels of NLRP3, caspase-1 and GSDMD, as well as the IL-1 β and IL-18 levels in the two groups were significantly down-regulated ($P < 0.05$), while the pyroptosis of PBMC cells in the two groups was reduced; the reduction of pyroptosis was more obvious in the treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** YYTF can effectively relieve SS clinical symptoms and immune inflammatory responses, and the mechanism of action may be functional with the regulation of NLRP3/CASPase-1/GSDMD signal axis function and the inhibition of cell pyroptosis.

Keywords Sjogren's syndrome; deficiency of both *qi* and *yin*; *Yiqi Yangyin Tongluo Formula* (益气养阴通络方); pyroptosis; NLRP3/Caspase-1/GSDMD

(收稿日期: 2022-11-30; 修回日期: 2023-02-28)

[编辑: 叶晨]