

类风湿关节炎患者细胞凋亡与临床指标相关性分析

曹永贺¹ 刘 健²

摘要 **目的** 观察寒湿型类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞凋亡基因表达,探讨其与 RA 疾病临床指标的相关性。**方法** 选取 16 例寒湿型 RA 患者(RA 组)和 16 名健康人(对照组),应用 FCM 检测 RA 组及对照组 CD4⁺T 细胞凋亡率,应用 RT-PCR 法检测凋亡基因 fas、fasL、caspase-8、caspase-3、bcl-2、bax mRNA 相对表达水平;分析凋亡基因与临床活动指标[ESR、CRP、RF、CCP、中医证候积分、关节晨僵时间、关节压痛数、关节肿胀数、关节功能分级及 28 个关节数疾病活动度评分(disease activity scores that include different 28-joint counts, DAS28)]相关性。**结果** 与对照组比较,RA 组 CD4⁺T 细胞凋亡率降低[(2.6 ± 0.9)% vs. (7.7 ± 1.3)%, $P < 0.01$], RA 组 CD4⁺T fas、fasL、caspase-8、caspase-3、bax mRNA 相对表达降低, bcl-2 升高($P < 0.01$)。CD4⁺T 细胞凋亡率与 ESR 呈负相关($P < 0.05$), caspase-8 与关节肿胀数呈负相关($P < 0.05$), bcl-2 与中医证候积分和关节功能分级亦呈负相关($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** RA 患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞存在凋亡障碍,并且与疾病的活动性密切相关。

关键词 寒湿型;类风湿关节炎;凋亡基因;CD4⁺T 细胞凋亡率

Correlation Analysis of Apoptosis and Clinical Indicators in Rheumatoid Arthritis Patients CAO Yong-he¹ and LIU Jian² 1 Department of Integrated Chinese and Western Medicine, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Henan (453100); 2 Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230031)

ABSTRACT **Objective** To observe the expression of peripheral blood CD4⁺T lymphocyte apoptosis gene in rheumatoid arthritis (RA) patients with cold dampness type (CDT), and to explore its correlation with clinical indicators of RA. **Methods** Sixteen RA patients with CDT (as the RA group) and 16 healthy subjects (as the normal control group) were recruited. CD4⁺T cell apoptosis rate was detected in the RA group and the normal control group using FCM. mRNA expressions of fas, fasL, caspase-3, caspase-8, bcl-2, and bax were detected using RT-PCR. Correlations between the expression of apoptosis gene and clinical activity indicators of RA (ESR, CRP, RF, CCP, integrals for Chinese medial symptoms, morning stiffness time, joint tenderness number, joint swelling number, DAS28-3) were analyzed. **Results** The apoptosis rate of CD4⁺T was significantly lower in the RA group than in the control group [(2.6 ± 0.9)% vs. (7.7 ± 1.3)%, $P < 0.01$]. mRNA expression levels of fas, fasL, caspase-8, caspase-3, and bax mRNA of CD4⁺T significantly decreased, but bcl-2 mRNA expression increased in the RA group ($P < 0.01$). The apoptosis rate of CD4⁺T was negatively correlated with ESR ($P < 0.05$). The mRNA expression of caspase-8 was negatively correlated with joint swelling number ($P < 0.05$). The mRNA expression of bcl-2 was negatively correlated with integrals for Chinese medial symptoms and joint function classification ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** Apoptosis obstacle exists in peripheral blood CD4⁺T lymphocyte of RA patients, and is closely related to disease activity.

KEYWORDS cold dampness type; rheumatoid arthritis; gene apoptosis; apoptotic rate of CD4⁺T cell

基金项目:国家科技支撑计划(No. 2012BAI26B02)

作者单位:1.新乡医学院第一附属医院中西医结合科(河南 453100);2.安徽中医药大学第一附属医院风湿科(合肥 230031)

通讯作者:刘健, Tel: 0551-62850102, E-mail: liujianahzy@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 01. 0035

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以侵蚀性关节炎为主要表现的慢性、全身性自身免疫性疾病。欧美等发达国家成年人患病率为 0.5%~1.0%,是人类致残的主要疾病之一^[1]。其基本病理表现为关节滑膜的慢性炎症、血管翳形成,关节滑膜异常增生形成绒毛状突入关节腔,导致软骨和骨的破坏,最终可导致关节畸形和功能丧失^[2,3]。细胞凋亡异常是 RA 发病的重要机制^[4]。CD4⁺T 细胞、B 细胞的异常活化与 RA 的发生、发展密切相关^[5]。RA 属于中医学“痹证”、“历节”范畴,亦称为“尪痹”。较多学者将活动期 RA 分为湿热痹阻证及寒湿痹阻证^[6]。本实验采用流式细胞术拟检测寒湿型 RA 患者及健康人外周血 CD4⁺T 淋巴细胞凋亡率,RT-PCR 检测及相关基因 fas、fasL、caspase-8、caspase-3、bcl-2、bax 表达,旨在探讨 RA 的发病机制,分析寒湿型 RA 患者细胞凋亡与临床症状、实验指标的相关性。

资料与方法

1 诊断标准 RA 诊断标准参照 1987 年美国风湿病学会修订的 RA 诊断标准^[7]。凡符合以下 7 项中 5 项,即可确诊为 RA:(1)晨僵≥1 h;(2)对称性关节肿胀持续≥6 周;(3)3 个关节以上关节肿胀持续≥6 周;(4)腕关节或掌指关节或近端趾指关节肿胀、疼痛、触痛,并超过 6 周;(5)类风湿因子(rheumatoid factor, RF)阳性;(6)类风湿结节;(7)受累关节 X 线片呈 RA 改变。中医辨证分型参照《中药新药临床研究指导原则》^[8]中寒湿痹阻证标准,证见关节冷痛而肿,遇寒痛增,关节屈伸不利,晨僵,关节畸形,口淡不渴,阴雨天病情加重,肢体沉重,舌质淡、苔白,脉弦紧。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合诊断标准及辨证分型标准;2.6<DAS28≤5.1;年龄 20~68 岁;患者签署知情同意书。排除标准:(1)重叠其他风湿病如系统性红斑狼疮、干燥综合征等;(2)合并其他系统严重疾病或有严重感染者;(3)妊娠期及哺乳期妇女;(4)近期内曾使用糖皮质激素、慢作用药、生物制剂;(5)精神病患者。

3 一般资料 16 例均为 2013 年 11—2014 年 4 月安徽省中医院风湿科门诊及住院 RA 患者,作为 RA 组。其中男性 4 例,女性 12 例,年龄 22~66 岁,平均(47±12)岁;病程 6 个月~33.3 年,平均(5.0±6.7)年。经本院伦理委员会批准(批号:2012AH-038-01)。另选择本院健康医护人员 16 名作为对照组,其中男性 4 名,女性 12 名,年龄 23~64 岁,平均(45±13)岁。两组性别、年龄比较,

差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 观察指标及方法 于清晨 7:00 点采两组上肢静脉血 30 mL。

4.1 细胞凋亡率检测 取 100 μL 新鲜血液,加入 1 mL 溶血剂。10 min 后 1 500 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入 PBS 混匀、震荡,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,洗涤细胞 2 次。加入 10 μL Percp-Cy5.5-anti-humanCD4 混匀,避光孵育 30 min。用 400 μL 1×AnnexinV 结合液悬浮细胞,浓度约为 1×10^6 /mL。在细胞悬浮液中加入 5 μL AnnexinV-FITC 染色液,轻轻混匀后于 2~8℃避光孵育 15 min。加入 10 μL PI 染色液后,轻轻混匀后于 2~8℃避光孵育 5 min。流式细胞仪(Coulter Epics XL,美国 Beckman Coulter 公司)检测 CD4⁺T 细胞凋亡指标 AnnexinV 水平,利用功能软件进行参数获取和数据分析细胞凋亡率。

4.2 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) (1)取两组肝素钠/枸橼酸钾抗凝静脉血 20~30 mL,用 PBS 按 1:1 比例稀释,用无菌滴管充分混匀;(2)取 15 mL 无菌离心管,加入适量淋巴细胞分离液(约 5 mL);(3)将稀释过的全血用无菌滴管沿管壁缓慢叠加于淋巴细胞分离液液面之上,保持界限清晰;(4)离心:25℃,1 800 r/min,20 min,不设刹车制动;(5)离心后管内分为 3 层,上层为血浆和 PBS,下层主要为红细胞和粒细胞,中层为淋巴细胞分离液,在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带,小心吸取白色窄带层至 15 mL 无菌离心管中;(6)离心:加入 3~5 倍 PBS 或 RPMI-1640 培养基混匀,4℃,1 200 r/min 离心 10 min 洗涤细胞 2 次;(7)定容计数:重悬并定容细胞后,从中取出 10 μL,稀释 40 倍,混匀后取出 10 μL 滴入细胞计数板中计数,分别计数四角 4 个大格中的细胞数,取得总和为 n,按 $n/4$ 稀释倍数 $\times 10^4$ 计算得单个核细胞数,根据细胞数定容,使细胞密度为 10^7 /mL。

4.3 流式细胞分选仪分选纯化细胞 (1)将分离得到的 PBMC 转移至无菌流式管中;(2)加入抗体:20 μL 的小鼠抗人 FITC 标记的 anti-CD4 抗体,4℃,避光孵育 30 min;(3)荧光抗体标记结束后,加入无菌 PBS,4℃,1 200 r/min 离心 10 min 洗涤细胞,弃上清,用无菌 PBS 重悬细胞;(4)用无菌 200 目尼龙网过滤细胞至新的无菌流式管中;(5)用流式细胞分选仪进行目的细胞的分选纯化。

4.4 Real time RT-PCR 测定 fas、fasL、

caspase-8、caspase-3、bcl-2、bax mRNA 表达 参
照文献[10],按照文献设计 fas、fasL、caspase-8、
caspase-3、bcl-2、bax 引物,由 Introvigen 公司合成
引物序列(表1)。

表 1 引物序列		
基因 名称	引物序列	扩增片断 长度(bp)
β-actin	正向 5'-GGGAAATCGTGC GTGACATTAAGG-3'	185
	反向 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'	
fas	正向 5'-TATCACC ACTATTGCTGGAGTCATG-3'	188
	反向 5'-TCAATGTGTCA TACGCTTCTTTCTT-3'	
fasL	正向 5'-CTCTGGAATGGGAAGACACCTATG-3'	131
	反向 5'-GCAAGATTGACCCCGGAAGTATA-3'	
caspase-8	正向 5'-TAGGGACAGGAATGGAACACACTT-3'	177
	反向 5'-GAGAGGATACAGCAGATGAAGCAGT-3'	
caspase-3	正向 5'-AAGAACTTAGGCATCTGTGGGCA-3'	129
	反向 5'-TTCAGGACAAAACATCACA AAACCA-3'	
bcl-2	正向 5'-GAGCAGACGGATGGAAAAAGGA-3'	102
	反向 5'-CAGGGCAAAGAAATGCAAGTGA-3'	
bax	正向 5'-GGTCTATAATGCGTTTTCTTACGT-3'	180
	反向 5'-AGAGCTAGGGTCAGAGGGTCATC-3'	

4.5 RNA 提取 (1)收取分离纯化后的 CD4⁺T
细胞,加入 1 mL Trizol (Invitrogen 公司),充分裂解;
(2)加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min;
(3)4 ℃ 10 000 × g 离心 15 min,取上清(约 0.5 mL)
加入到另一 EP 管中;(4)加入 0.5 mL 异丙醇,温和混
匀,室温放置 10 min;(5)4 ℃ 12 000 × g 离心 10 min,
弃去上清;(6)加入 1 mL 75%乙醇(DEPC 水配制),
4 ℃ 12 000 × g 离心 5 min,弃上清;(7)室温放置
30 min干燥 RNA 沉淀;(8)加入 20 ~50 μL DEPC 水,
55 ℃促溶 10 min, -80 ℃保存备用。

4.6 RT-PCR (1)在 0.2 mL EP 管中,加入
总 RNA(质量为 2 μg)、10 μmol/L Oligo(dT)1 μL、
DEPC 水补足至 12 μL,轻轻混匀、点动离心;(2)
PCR 仪(Thermo PIKOREAL 96)上 65 ℃加热
5 min,立即冰浴 3 min;(3)在上述 PCR 管(无 RNase
酶)中加入 5 × Reaction Buffer 4.0 μL、10 mmol/L
dNTP Mix 2 μL、RibolockTM Rnase inhibitor 1 μL、
RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase
1 μL;(4)42 ℃ 60 min,70 ℃ 5 min;(5)取出上述

反应液,即为 cDNA, -80 ℃保存备用。
4.7 荧光定量 PCR 反应 取出上述反应液
1 μL作为荧光定量的模板,反应体系如下:2 × SYBR
Green Mixture(QuantiFast SyBr Green PCR kit,
Qiagen) 5 μL;正向 10 μmol/L 1 μL;反向 10 μmol/L
1 μL; cDNA 1 μL;RNase Free Water 2 μL;反应总
体积为 10 μL。反应条件如下:95 ℃ 5 min;95 ℃
10 s,40 个循环;60 ℃ 30 s,40 个循环。

4.8 临床指标观察 检测 RA 患者 ESR、C 反
应蛋白(C-reactive protein,CRP)、RF、抗环瓜氨酸
肽(anti-cyclic citrullinated peptide,CCP)、中医证
候积分、关节晨僵时间(晨僵)、关节肿胀数(肿胀)、关
节压痛数(压痛)、关节功能分级、28 个关节数疾病活
动度评分(disease activity scores that include dif-
ferent 28-joint counts,DAS28)^[9] >2.6。关节功能
分级参照文献[3],I 级:能照常进行日常生活和各项
工作;II 级:可进行一般的日常生活和某种职业工作,
但参与其他项目活动受限;III 级:可进行一般的日常生
活,但参与某种职业工作或其他项目活动受限;IV 级:
日常生活的自理和参与工作能力均受限。

5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统
计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各变量间相关分析
采用 Person 相关分析,两样本比较采用独立 t 检验。
 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组 CD4⁺T 细胞凋亡率比较(表2) 与对照
组比较,RA 组 CD4⁺T 细胞凋亡率降低($t =$
 $-12.909, P < 0.01$)。

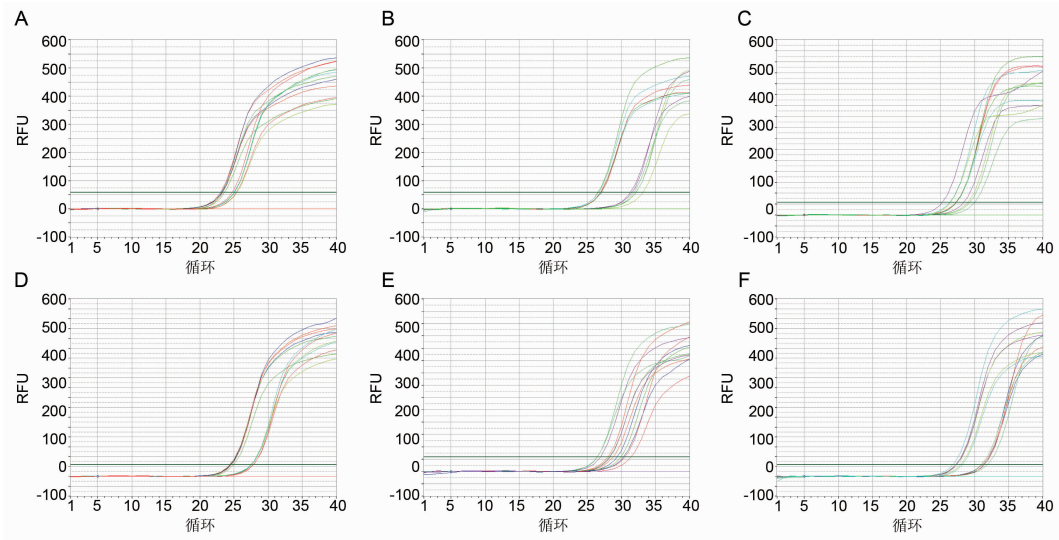
表 2 两组 CD4 ⁺ T 细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)		
组别	例数	CD4 ⁺ T 细胞凋亡率
RA	16	2.6 ± 0.9 *
对照	16	7.7 ± 1.3

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

2 两组 fas、fasL、caspase-8、caspase-3、
bcl-2、bax mRNA 表达比较(表3,图1) 与对照组比
较,RA 组 fas、fasL、caspase-8、caspase-3、bax mR-
NA 表达降低($P < 0.01$),bcl-2 表达升高($P < 0.01$)。

表 3 两组 fas、fasL、caspase-8、caspase-3、bcl-2、baxmRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)							
组别	例数	fas	fasL	caspase-8	caspase-3	bcl-2	bax
对照	16	0.97 ± 0.07	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.08
RA	16	0.32 ± 0.01 *	0.77 ± 0.04 *	0.35 ± 0.06 *	0.45 ± 0.04 *	3.20 ± 0.22 *	0.40 ± 0.04 *

注:与对照组比较,* $P < 0.01$



注:A 为 fas;B 为 fasL;C 为 caspase-8;D 为 caspase-3;E 为 bcl-2;F 为 bax

图 1 RT-PCR 扩增曲线

3 RA 患者 CD4⁺T 细胞凋亡率、fas、fasL、caspase-8、caspase-3、bcl-2、bax 与各临床指标相关性分析(表 4) CD4⁺T 细胞凋亡率与 ESR 呈负相关($P<0.05$), caspase-8 与关节肿胀数呈负相关($P<0.05$), bcl-2 与中医证候积分和关节功能分级亦呈负相关($P<0.01$, $P<0.05$)。其余凋亡基因表达水平与各观察指标之间的相关性差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

我国 RA 患病率为 0.32%~0.36%, 各年龄组均可发病, 80% 发病于 35~50 岁, 女性高于男性, 女性患者约 3 倍于男性^[3]。RA 是一种以血清中出现多种自身抗体及滑膜有显著淋巴细胞浸润为特征的自身免疫性疾病, 在浸润的细胞中, CD4⁺T 细胞是主要的细

胞成员而且在 RA 的发病中起重要作用^[11]。RA 关节软骨和骨组织的损害, 与滑膜细胞的过度增生活化与凋亡不足有关, 凋亡机制在 RA 发病中占重要地位^[12]。

RA 的主要病因病机多是因为体质素虚, 卫表不固, 风、寒、湿邪乘虚侵袭, 或脾虚湿盛, 内外合邪, 导致气血运行不畅, 邪郁经络关节而致, 《严氏济生方》云“皆因体虚, 腠理空疏, 受风寒湿气而成痹也”^[13]。刘健教授根据多年临床研究, 认为脾虚湿盛是 RA 基本病机, 并对急性期 RA 病机分为寒湿型和湿热型。并且在以往对佐剂关节炎(adjuvant arthritis, AA) 大鼠的研究表明, fas、fasL、bcl-2 等在 RA 中起重要作用^[14,15]。有学者从血清蛋白组学的角度探讨其与中医证候的关系^[16]。本研究即以寒湿型 RA 患者为研究对象, 采用流式细胞术、RT-PCR 检测相关基因 fas、

表 4 RA 患者 CD4⁺T 细胞凋亡率、fas、fasL、caspase-8、caspase-3、bcl-2、bax 与各临床指标相关性分析

相关凋亡蛋白 mRNA		临床指标									
		ESR	CRP	RF	CCP	中医证候积分	晨僵	肿胀	压痛	关节功能分级	DAS28
CD4 ⁺ T 细胞凋亡率	<i>r</i>	-0.5095	-0.479	-0.197	-0.066	0.101	-0.272	0.076	0.344	0.216	-0.448
	<i>P</i>	0.015	0.061	0.466	0.807	0.709	0.309	0.780	0.193	0.421	0.082
fas	<i>r</i>	0.663	-0.050	-0.191	0.107	-0.720	0.379	-0.657	-0.562	-0.058	0.323
	<i>P</i>	0.152	0.925	0.716	0.841	0.107	0.458	0.156	0.246	0.913	0.532
fasL	<i>r</i>	0.192	-0.035	-0.068	0.243	-0.237	0.026	-0.037	0.182	0.054	0.447
	<i>P</i>	0.715	0.947	0.899	0.642	0.651	0.961	0.944	0.730	0.919	0.374
caspase-8	<i>r</i>	0.277	-0.051	0.074	-0.294	-0.662	-0.213	-0.816	-0.493	-0.055	-0.360
	<i>P</i>	0.595	0.923	0.889	0.572	0.152	0.685	0.048	0.321	0.918	0.483
caspase-3	<i>r</i>	0.031	0.438	0.156	0.471	0.240	-0.391	0.195	0.189	-0.043	0.155
	<i>P</i>	0.954	0.385	0.768	0.346	0.648	0.444	0.711	0.720	0.936	0.769
bcl-2	<i>r</i>	0.409	-0.200	0.770	0.352	-0.935	-0.216	-0.515	-0.530	-0.853	0.165
	<i>P</i>	0.420	0.704	0.073	0.494	0.006	0.681	0.295	0.279	0.031	0.755
bax	<i>r</i>	0.576	0.286	0.069	0.185	-0.472	0.140	-0.598	-0.783	-0.278	-0.033
	<i>P</i>	0.232	0.583	0.897	0.726	0.345	0.791	0.210	0.066	0.593	0.951

fasL、caspase-8、caspase-3、bcl-2、bax 表达,探讨 RA 的发病机制,并分析寒湿型 RA 患者细胞凋亡与临床症状、实验指标的相关性。

结果显示,与对照组比较,寒湿型 RA 患者 CD4⁺T 细胞凋亡率降低,RA 患者 CD4⁺T 细胞促凋亡基因 fas、fasL、caspase-3、caspase-8 表达显著降低,抑制凋亡基因 bcl-2 表达显著增高,提示寒湿型 RA 患者存在着细胞凋亡障碍,从而使关节滑膜细胞凋亡不足,滑膜细胞异常增殖和血管翳形成,最终导致关节软骨和软骨下骨的破坏,可能是 RA 发病的重要机制。本研究进一步探讨寒湿型 RA 患者 CD4⁺T 细胞凋亡指标 AnnxinV 水平及 CD4⁺T 细胞凋亡基因的表达与 RA 临床指标的关系,发现 RA 患者的 CD4⁺T 细胞凋亡率与 ESR 呈负相关,caspase-8 的表达与关节肿胀数呈负相关,抑制凋亡基因 bcl-2 的表达与中医症状积分呈明显负相关,并与关节功能分级亦呈负相关。结果表明,RA 患者 CD4⁺T 细胞凋亡率越低,则 ESR 数值越高,疾病的活动性越高;caspase-8 表达越低,关节肿胀数目越多,bcl-2 表达越高,则中医症状积分就会越低,关节功能分级越低。可能机制是,CD4⁺T 细胞凋亡率下降,是由于促凋亡基因 fas 表达降低,从而使细胞凋亡不足,致使致炎因子聚集在关节滑膜处,引起关节滑膜的异常增生,疾病处于活动状态,与疾病活动相关的 ESR 明显上升;caspase-8 的表达降低,细胞凋亡障碍,致炎因子在关节滑膜处聚集增多,从中医学的角度来说,是湿邪过重,关节肿胀数就越多,疾病越重。bcl-2 和 bax 是目前已知的在凋亡调控过程中功能相互对立的一对最重要的调控基因,是一种重要的凋亡抑制基因,能抑制多种因素引起的细胞凋亡。bax 可以促进细胞凋亡^[17]。由于 bcl-2 家族中抗凋亡成员与促凋亡成员的比例是决定细胞进入凋亡与否的关键因素,二者之间的相互作用决定了细胞死亡的阈值^[18]。因此,出现抑制凋亡基因 bcl-2 与中医症状积分、关节功能分级呈负相关。

综上所述,寒湿型 RA 患者体内存在 CD4⁺T 细胞凋亡率明显下降,凋亡蛋白的表达异常,这可能是导致 RA 自身免疫系统异常,免疫反应增强的原因。临床相关症状、实验室指标与之有较密切的关系。由此可知,通过调控凋亡基因蛋白的表达从而干预细胞的凋亡可能是今后治疗 RA 的一个新的研究方向。本研究病例较少,仅采用 RT-PCR,不能与其他的试验方法相互印证,是其不足之处。今后将再加大试验标本数量,合并使用如 Western blot 等方法,相互对照。

参 考 文 献

- [1] Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoeidemiology, gender and autoimmune disease[J]. Autoimmun Rev, 2012, 11(6-7): A386-A392.
- [2] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW, et al. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [3] 陆再英,钟南山主编. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012:848-855.
- [4] 陆意. 类风湿关节炎发病机制的研究进展[J]. 国外医学(免疫学分册), 2001, 24(5): 256-259.
- [5] 王婷,蒋觉安,胡俊涵,等. ICOS/ICOSL 在类风湿关节炎患者外周血淋巴细胞的表达及临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 17(3): 369-374.
- [6] 何卫,邱联群,王翠柳,等. 150 例类风湿性关节炎中医证候特点及其与影像学关系的研究[J]. 新中医, 2011, 43(6): 58-60.
- [7] 中华医学会. 临床诊疗指南·风湿病分册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:3.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:116-118.
- [9] Fransen J, Stuck G, van Riel PL. Rheumatoid arthritis measures[J]. Arthritis Rheum, 2003, 49(S5): 214-224.
- [10] 姚媛,王吉波,李华. 系统性红斑狼疮 PBMCs c-myc mRNA 的表达及其与疾病活动性相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(5): 508-510.
- [11] 陈丽娜,王聪华,朱平,等. CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞在类风湿性关节炎病程中的消长及其意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(4): 331-334.
- [12] 陈安平,袁国华,罗雄燕,等. 类风湿关节炎滑膜组织及关节液中 DcR3 表达的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(8): 825-828.
- [13] (南宋)严用和著,刘阳校注. 严氏济生方[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2012:12.
- [14] 刘健,张皖东,陈光亮,等. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠疗效及滑膜 fas、fasL 及 bcl-2 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(8): 599-602.
- [15] 刘健,韩明向,翟志敏,等. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2005, 8(4): 296-299.
- [16] 孙志玲,王玲,王富强,等. 类风湿关节炎寒湿痹阻证患者血清蛋白组学分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(7): 901-902.
- [17] 董雅洁,高维娟. bcl-2、bax、caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(21): 4828-4830.
- [18] 薛茜,邹玉安,赵宝民,等. 康脑液 1 号对大鼠脑缺血再灌注半暗带细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 比值的影响[J]. 中国全科医学, 2010, 13(2): 498-501.

(收稿:2014-11-05 修回:2015-10-28).