

低剂量环磷酰胺辅助治疗复发性尖锐湿疣的疗效及其对辅助型 T17 细胞的影响

吴苗(浙江省中医院皮肤科, 杭州 310006)

摘要: 目的 观察低剂量环磷酰胺辅助治疗复发性尖锐湿疣的疗效及其对辅助型 T17 细胞的影响。方法 80 例患者随机分为对照组和观察组, 各 40 例, 对照组予 CO₂ 激光联合 5-氨基酮戊酸光动力疗法治疗, 每周 1 次, 连续 4 周; 观察组加用环磷酰胺 50 mg 口服, 连用 7 d, 停药 3 d, 再连用 7 d。比较患者复发情况、HPV 基因型分布; 流式细胞仪检测外周血中 Th17 细胞比例, ELISA 法检测 IL-17 和 IL-23 蛋白含量, RT-PCR 检测 IL-17 和 IL-23 mRNA 表达情况; 记录不良反应。结果 观察组治疗后 3, 6, 9, 12 个月时的复发率分别为 5.0%, 10.0%, 15.0% 和 17.5%, 均低于对照组的 20.0%, 32.5%, 40.0% 和 47.5% ($P < 0.05$); Th17 细胞比例、IL-17、IL-23 蛋白及 mRNA 含量均较对照组明显降低; 80 例患者共检出 9 种 HPV 基因型, 观察组 HPV 清除率(90.0%)显著高于对照组(70.0%, $P < 0.05$); 2 组不良反应发生率相近。结论 低剂量环磷酰胺联合 5-氨基酮戊酸光动力、CO₂ 激光, 对复发性尖锐湿疣具有良好治疗作用, 且安全性良好。

关键词: 环磷酰胺; CO₂ 激光; 5-氨基酮戊酸光动力; 复发性尖锐湿疣; 辅助型 T17 细胞

中图分类号: R965.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)04-0599-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.026

Auxiliary Effects of Low-dose Cyclophosphamide for Recurrent Condyloma Acuminatum and the Influence on Th17 Cells

WU Miao(Dermatological Department, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the auxiliary effects of low-dose cyclophosphamide on the patients with recurrent condyloma acuminatum (CA) and its influence on Th17 cells. **METHODS** Eighty cases of patients were randomly divided into control group and study group (40 cases each group). The control group was treated with CO₂ laser and 5-aminolevulinic acid photodynamic (ALA-PDT), once a week for 4 weeks continuously. The study group received cyclophosphamide 50 mg orally; a treatment course lasted for 7 d, and received 2 treatment courses with 3 days' interval. The recurrence of CA and HPV genotypes were compared. The subgroups of Th17 cells were investigated by flow cytometry; the protein content and mRNA expression of cytokines (IL-17 and IL-23) in peripheral blood were determined by ELISA and RT-PCR, respectively. The adverse reactions were recorded. **RESULTS** After treatment, the recurrence rate of 3, 6, 9 and 12 months of study group was 5.0%, 10.0%, 15.0% and 17.5%, respectively; were all lower than that of control group of 20.0%, 32.5%, 40.0% and 47.5% ($P < 0.05$). The ratio of Th17 cells, the protein content and mRNA expression of IL-17 and IL-23 were lower than those of control group. There were 9 kinds of HPV genotypes in the 80 cases, the clearance rate of HPV in study group was 90.0%, which was higher than that in control group of 70.0% ($P < 0.05$). The incidence of adverse reaction rate was similar between the two groups. **CONCLUSION** Low-dose cyclophosphamide combined with CO₂ laser and ALA-PDT is effective and safe for recurrent CA.

KEY WORDS: cyclophosphamide; CO₂ laser; ALA-PDT; recurrent condyloma acuminatum; Th17 cells

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)是常见的性传播疾病, 病原体为人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV), 以生殖器、会阴、肛门等处出现增生物为主要临床特征^[1]。与其他性传播疾病不同的是, CA 治疗后极易复发, 迁延难愈, 患者精神压力大, 家庭生活也受到严重影响, 寻找可切实降低 CA 复发率药物的临床意义重大。环磷酰胺是一种非周期特异性抗肿瘤药物, 也是一种常用的免疫调节剂, 在慢性粒细胞白血病、恶性淋巴瘤、骨髓瘤等肿瘤中应用较多。近来有研究

发现, 低剂量环磷酰胺可有效预防 CA 的复发, 且不良反应轻微^[2-4], 但对于复发性 CA 的疗效未见报道。本研究采用低剂量环磷酰胺联合 CO₂ 激光及 5-氨基酮戊酸光动力(5-aminolevulinic acid photodynamic, ALA-PDT)治疗复发性 CA, 观察其疗效及可能的机制, 以期为复发性 CA 治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 患者情况

2013 年 6 月—2015 年 3 月浙江省中医院皮肤

作者简介: 吴苗, 女, 主治医师 Tel: (0571)87068001 E-mail: janisewu2009@163.com

科门诊收治的 80 例复发 CA 患者,符合 CA 诊断标准^[5],外生殖器、会阴、肛周等部位有典型乳头状、菜花状或鸡冠状增生物。本研究经伦理委员会审核通过,患者签署知情同意书。其中男性 56 例(疣体位置:包皮系带、冠状沟、尿道口、肛周、阴囊皮肤等处),女性 24 例(疣体位置:阴唇和/或大小阴唇交界处、阴蒂、阴道口等处)。按随机数字表法随机分为对照组和观察组,各 40 例。其中,对照组男 29 例,女 11 例;年龄 20~67 岁,平均 (38.7 ± 4.5) 岁;复发次数为 1~6 次,平均 (2.7 ± 1.5) 次;平均疣体数目 (5.5 ± 2.1) 个;平均疣体直径 (2.1 ± 0.7) cm,最大疣体直径 (3.0 ± 1.1) cm。观察组男 27 例,女 13 例;年龄 22~68 岁,平均 (39.5 ± 6.0) 岁;复发次数 1~5 次,平均 (2.8 ± 1.7) 次;平均疣体数目 (5.8 ± 1.9) 个;平均疣体直径 (2.0 ± 0.8) cm,最大疣体直径 (3.1 ± 1.4) cm。经统计,2 组患者性别、年龄、病情等差异无统计学意义,资料均有可比性。

1.2 入选标准

有不洁性接触史;醋酸白试验阳性;复发次数>1 次;最大疣体直径<4.0 cm;按医嘱用药并能接受随访。

1.3 排除标准

初次确诊;合并梅毒、艾滋病等性病;合并严重细菌、真菌感染;恶性肿瘤患者;严重心肝肾等脏器功能障碍;近 1 个月接受过激素、免疫抑制剂等治疗;孕妇或哺乳期妇女等。

1.4 治疗方法

2 组均予 ALA-PDT 联合 CO₂ 激光治疗。即常规消毒患处,2%利多卡因局部浸润麻醉,根据疣体大小调整输出功率(JC-100D 型 CO₂ 激光治疗仪,吉林科英激光技术有限公司),将 CO₂ 激光头对准疣体,逐个直接烧灼,直至清除完全。取配制好的 20% 5-氨基酮戊酸溶液均匀涂抹于病灶及周围 1 cm 范围,保鲜膜封包,4 h 后去保鲜膜,取 LD-600C 型激光治疗仪(武汉亚格光电技术有限公司)在暗室内进行激光照射,照射波长 635 nm,功率密度 $150 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,每次 30 min。术后创面常规外涂金霉素软膏(河南同源制药有限公司,规格:10 g),每周治疗 1 次,持续 4 周。观察组同时口服环磷酰胺片(通化茂祥制药有限公司,规格:50 mg),每次 1 片,7 d 为 1 疗程,服用 1 个疗程后停药 3 d,再服用 1 个疗程。

此外,嘱患者在治疗中及治疗结束后注意个

人卫生,杜绝不洁性生活,积极诊治性伴侣的相关疾病。

1.5 观察指标

1.5.1 复发情况 每周电话随访,记录不同时间复发情况。在原病灶 2 cm 范围内长出疣体或醋酸白试验阳性(试验操作简述如下:用消毒棉签蘸 3%~5%的冰醋酸,涂于原病灶皮肤及其周围,数分钟后观察局部皮肤组织的颜色,变白者为阳性)记为复发。

1.5.2 HPV 基因型检测 治疗前及治疗结束后,暴露病灶,消毒棉签擦掉表面分泌物,取专用无菌细胞刷在病灶表面来回摩擦数次,刷取脱落细胞,浸入盛有无菌生理盐水的 EP 管中,送检验科行 PCR 检测,所用 HPV 核酸定量检测试剂盒(中山大学达安基因公司)。仅检出 HPV6 和/或 HPV11 和/或 HPV42 为低危型,存在 HPV16、18、31、33、58、59、68、70 任一感染为高危型。

1.5.3 Th17 细胞及相关细胞因子的检测 治疗前后抽取患者空腹静脉血适量,测定指标。

1.5.3.1 Th17 细胞比例的测定 分离外周血单个核细胞,依次加入 PE-Cy7-抗-CD4、PerCP-Cy5.5-抗-IL-17 单抗(eBioscience 公司),分别避光孵育 20 min, PBS 洗涤重悬,FS/SS 设门,Navios 型流式细胞仪(Beckman 公司)检测。

1.5.3.2 IL-17 及 IL-23 含量测定 根据绘制的标准曲线,采用 ELISA 法计算外周血中 IL-17 及 IL-23 含量(南京建成公司)。

1.5.3.3 IL-17 及 IL-23 mRNA 的测定 取外周血单个核细胞适量,Trizol(Takara 公司)提取总 RNA,逆转录后扩增目的基因片段。IL-17 上游引物:5'-TTTATGATTTTATTGGGGGTGG-3',下游引物:5'-AATAAACAAAATATAACACTATCATC-3'。IL-23 上游引物:5'-GAGCAGCAACCCTGAGTCCCTA-3',下游引物:5'-CAAATTTCCCTTCCCATCTA-3'。由英潍捷基(上海)贸易有限公司设计。模板 2 μL ,反应体系 20 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s(40 个循环)。以 GAPDH 为内参,通过检测到的阈值循环数(C_t 值)计算各细胞因子 mRNA 相对量。

1.5.4 不良反应情况的检查 治疗前后检测肝肾功能、血尿常规、血压、心率、类风湿因子,记录治疗过程中的不良反应。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件包进行分析,性别、复发

率、不良反应发生率等计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验;其余计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验(组间的比较采用配对 t 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复发情况的比较

所有患者均完成治疗并接受 12 个月的随访。通过比较随访不同时间的复发率发现,随着时间的延长,各组复发率均有所增高;与对照组相比,观察组在治疗后 3, 6, 9, 12 个月时的复发率均明显降低,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 复发情况比较($n=40$)

Tab. 1 Comparison of recurrence rate($n=40$)

组别	复发情况/例(%)				
	1 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月
对照组	5(12.5)	8(20.0)	13(32.5)	16(40.0)	19(47.5)
观察组	1(2.5)	2(5.0)	4(10.0)	6(15.0)	7(17.5)

2.2 HPV 基因型检测结果比较

80 例患者中均检出 HPV 阳性,检出率为 100%。共检出低危型 3 种 HPV 基因类型(HPV6、11、42)和高危型 6 种 HPV 基因类型(HPV16、18、31、58、59、68),以低危型为主,占 60.0%(48/80)。治疗后,各组病毒均得到很大程度的清除,对照组和观察组的清除率分别达 70.0%(28/40)和 90.0%(36/40),观察组清除率明显较高($\chi^2=5.000$ 0, $P < 0.05$),且对高危型 HPV 具有良好清除作用($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 HPV 基因型检测结果($n=40$)

Tab. 2 Results of HPV genotypes($n=40$) 例(%)

组别	HPV 检出数		低危型 HPV		高危型 HPV	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	40(100.0)	12(30.0)	23(57.5)	4(10.0)	17(42.5)	8(20.0)
观察组	40(100.0)	4(10.0)	25(62.5)	2(5.0)	15(37.5)	2(5.0)

表 3 HPV 基因型蛋白检测和基因检测结果($n=40$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Results of HPV genotype protein and mRNA ($n=40$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Th17 细胞比例/%		IL-17 蛋白/ng·L ⁻¹		IL-23 蛋白/ng·L ⁻¹		IL-17 mRNA($\times 10^{-4}$)		IL-23 mRNA($\times 10^{-4}$)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	0.86 $\pm$ 0.21	0.64 $\pm$ 0.22 ¹⁾	1.96 $\pm$ 0.23	1.66 $\pm$ 0.16 ¹⁾	0.79 $\pm$ 0.37	0.53 $\pm$ 0.25 ¹⁾	9.35 $\pm$ 2.95	7.21 $\pm$ 1.10 ¹⁾	3.39 $\pm$ 0.89	2.75 $\pm$ 0.53 ¹⁾
观察组	0.90 $\pm$ 0.18	0.45 $\pm$ 0.21 ¹⁾²⁾	1.99 $\pm$ 0.35	1.49 $\pm$ 0.22 ¹⁾²⁾	0.76 $\pm$ 0.25	0.40 $\pm$ 0.11 ¹⁾²⁾	9.61 $\pm$ 1.90	6.01 $\pm$ 1.99 ¹⁾²⁾	3.53 $\pm$ 0.76	2.18 $\pm$ 0.48 ¹⁾²⁾

注:与治疗前比较,¹⁾ $P < 0.05$;与对照组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with before treatment, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with control group, ²⁾ $P < 0.05$.

2.3 Th17 细胞及相关细胞因子检测结果比较

治疗前,2 组各指标无显著性差异。治疗后,2 组患者外周血中 Th17 细胞比例、IL-17、IL-23 的蛋白及基因水平均显著下降($P < 0.05$),组间比较,观察组明显低于对照组($P < 0.05$)。结果见表 3。

2.4 不良反应比较

患者接受激光治疗时,均诉病灶处有烧灼痛或针刺刺激痛,可耐受;均有不同程度疼痛、红肿、渗出,1~3 d 自行缓解。均无严重感染/糜烂、疤痕、色素沉积等出现;肝肾功能、类风湿因子等指标均检测正常。

3 讨论

CA 复发原因非常复杂,包括患者免疫功能异常、存在 HPV 亚临床感染和潜伏感染、治疗不及时彻底等^[6]。常规的 CO₂ 激光只能清除肉眼可见的病变组织,无明显病变的亚临床感染未得到有效清除;外源性的 5-ALA 可选择性聚集于增生活跃的病变区,包括 HPV 亚临床感染和潜伏感染处,在特定能量照射下,产生光动力效应和细胞毒作用,引起 HPV 感染的疣体及周围组织坏死,ALA-PDT 对 CA 起到较好的治疗作用^[7-8];但一般仅适用于直径 < 0.5 cm 的疣体,联合冷冻疗法可用于直径 0.5~2.0 cm 的疣体,对于 > 2.0 cm 者均推荐联合 CO₂ 激光^[9]。考虑到本研究中患者疣体普遍较大,选用了 ALA-PDT 联合 CO₂ 激光为基础疗法。通过统计 2 组患者 CA 复发率发现,与对照组相比,加用低剂量环磷酰胺的观察组患者在治疗后 1 个月时的复发率无明显降低(2.5% vs 12.5%),但治疗 3, 6, 9, 12 个月时的复发率较对照组分别降低 15.0%, 22.5%, 25.0% 和 30.0%,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$),表明低剂量环磷酰胺可显著降低复发性 CA 患者的复发率,且随访时间越长,趋势越明显。

HPV6、11 等低危型是引起 CA 复发的主要病原菌,本研究入选的 80 例复发性患者均检出 HPV 感染,以低危型为主(60%, 48/80),与多数报道一致^[10-11]。治疗后,大部分 HPV 得到清除(80%, 64/80),其中以低危型为主(87.5%, 42/48),高危型清除率相对较低(68.8%, 22/32)。而高危型的 HPV16、18 等潜伏期长,易造成潜伏感染^[10],危害更大。组间比较,观察组 HPV 清除率(90.0% vs 70.0%)及高危型 HPV 清除率均较高(86.7% vs 52.9%),表明环磷酰胺对 HPV 感染包括高危型 HPV 感染均有良好清除作用。

Th17 细胞是一种新发现的效应型 CD4⁺T 辅助细胞亚型,主要分泌产生特征性细胞因子 IL-17、IL-23 等,具有强大的致炎效应,HPV 感染后会促进机体 IL-17、IL-23 等的释放。对于 CA 患者体内 Th17 细胞比例变化的报道不一^[12-14],多数认为 Th17 细胞比例较正常组下降,相应 IL-17 和 IL-23 含量也显著较低^[13-15]。本研究发现,观察组患者治疗后外周血中 Th17 细胞比例,IL-17 和 IL-23 的蛋白及基因表达均较对照组显著下降($P<0.05$),推测环磷酰胺通过免疫调节及 HPV 病毒清除作用,抑制了机体 Th17 细胞的过高表达及相关炎症因子的过多释放,在一定程度上可减轻病情,减少复发,这也与本研究观察到治疗后 3, 6, 9, 12 个月时观察组复发率明显较低相吻合。曹育春等对低剂量环磷酰胺治疗 CA 进行了较系统研究,发现环磷酰胺通过降低三磷酸腺苷、谷胱甘肽等,可调节 Treg 细胞比例,清除 HPV,有效防止 CA 复发^[16-17],与本研究的结果类似。隐藏性的病损是 CA 复发的重要原因之一,推测通过调节 Th17 细胞及 Treg 细胞表达及功能、清除病毒等,低剂量环磷酰胺有助于隐藏性病损的修复,从而降低复发。同时,观察组患者未出现类风湿因子、肝肾功能等实验室检测指标的异常,不良反应发生率无明显增加,表明低剂量环磷酰胺安全性良好。

综上所述,低剂量环磷酰胺联合常规 CO₂ 激光、ALA-PDT,可明显降低 CA 的复发率,增强 HPV 病毒清除力,改善 Th17 细胞功能,且安全性较好,值得进一步临床研究。

REFERENCES

- [1] LESZCZYŹYŹYN J, ŁEBSKI I, ŁYSENKO L, et al. Anal warts (condylomata acuminata)-current issues and treatment modalities [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2014, 23(2): 307-311.
- [2] 蔡在胜. 低剂量环磷酰胺治疗尖锐湿疣的疗效及其机制和安全性初步探讨[D]. 华中科技大学, 2013.
- [3] HU Y, TANG H F, ZHENG X F, et al. Effects of low-dose cyclophosphamide combined with compound huangbai lotion on recurrence in patients with condylomata acuminata after CO₂ laser therapy [J]. *China Pharm(中国药房)*, 2014, 25(32): 2997-2999.
- [4] ZHAO J, ZENG W, CAO Y, et al. Immunotherapy of HPV infection-caused genital warts using low dose cyclophosphamide [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014, 10(6): 791-799.
- [5] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010: 1816-1817.
- [6] WANG T Y. Therapeutic strategy for recurrent condyloma acuminatum [J]. *Qinghai Med J(青海医药杂志)*, 2010, 40(4): 79-80.
- [7] XU Q, SHEN L L. 20% 5-aminolevulinic acid photochemotherapy combined with liquid nitrogen frozen therapy in treatment of condyloma acuminatum patients [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志)*, 2015, 34(12): 935-939.
- [8] HUANG J, ZENG Q, ZUO C, et al. The combination of CO₂ laser vaporization and photodynamic therapy in treatment of condylomata acuminata [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2014, 11(2): 130-133.
- [9] SHI H, ZHANG X, MA C, et al. Clinical analysis of five methods used to treat condylomata acuminata [J]. *Dermatology*, 2013, 227(4): 338-345.
- [10] GU K F, GE D D. Study on the relationship between infection types of human papilloma virus and clinical relapse in condyloma acuminatum patients [J]. *Chin J Nosocomio(中华医院感染学杂志)*, 2014, 24(7): 1633-1634.
- [11] LI X H, MAN J, CHEN J W, et al. Correlation analysis between human papilloma virus genotyping and recurrent condyloma acuminatum [J]. *China Prescr Drug(中国处方药)*, 2015, 12(7): 100-101.
- [12] ZHANG H, WANG L. Detection and clinical significance of Th17 cells/Regulatory T cells in peripheral blood for patients with condyloma acuminatum [J]. *Chin Drugs Clin(中国药物与临床)*, 2013, 13(1): 43-44.
- [13] SUN G Z. Relationship between HPV infection and Regulatory T cells/Th17 cells for patients with condyloma acuminatum [J]. *Chin J Clin: Elec Ed(中华临床医师杂志: 电子版)*, 2013, 7(9): 4069-4071.
- [14] WENG Z S, LI X H, PENG J W, et al. The expression of Th17 cells and IL-17 in peripheral blood from patients with condyloma acuminatum [J]. *Diagn Ther J Dermatol-Venereol(皮肤性病诊疗学杂志)*, 2013, 20(5): 327-330.
- [15] LI X H, ZHUANG J K, PENG J W, et al. Detection of interleukin-23 in peripheral blood from patients with condyloma acuminatum [J]. *Chin J Derm Venereol(中国皮肤性病学杂志)*, 2014, 28(12): 1230-1232.
- [16] CAO Y, ZHAO J, YANG Z, et al. CD4+FOXP3+ regulatory T cell depletion by low-dose cyclophosphamide prevents recurrence in patients with large condylomata acuminata after laser therapy [J]. *Clin Immunol*, 2010, 136(1): 21-29.
- [17] ZHANG Y, DUAN Y, ZHAO J, et al. Low-dose oral cyclophosphamide therapy is effective for condylomata acuminata [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(16): 3198-3199.

收稿日期: 2016-08-04

(本文责编: 蔡珊珊)