

文章编号 1006-8147(2019)01-0080-04

论 著

31例多发性硬化患者T淋巴细胞亚群及相关细胞因子的检测

李丹

(威海市立医院南院区检验科,威海 264200)

摘要 目的:探讨多发性硬化(MS)患者静脉血T淋巴细胞亚群及相关细胞因子的意义。方法:采用流式细胞术(FCM)检测31例MS患者治疗前(MS组)、泼尼松治疗4周后(泼尼松组)及20例健康者(正常组)外周血Th1(CD4⁺IFN- γ ⁺)、Th2(CD4⁺IL-4⁺)、Th17(CD4⁺IL-17⁺)、Treg(CD4⁺FoxP3⁺)、Tc1(CD4-CD8⁺IFN- γ ⁺)和Tc2(CD4-CD8⁺IL-4⁺)T淋巴细胞亚群变化;流式微球芯片捕获技术(CBA)检测血浆细胞因子IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-4和IL-10的含量。结果:(1)FCM分析结果显示,与正常组比较,MS组Th1细胞和Th17细胞均明显升高($P<0.05$);Treg细胞和Tc1细胞显著下降($P<0.01$),Th17/Treg比例明显升高($P<0.01$);与MS组比较,泼尼松组Tc1、Tc2和Treg细胞百分率均明显升高($P<0.01$),而Th1和Th17细胞显著下降($P<0.05$),Th17/Treg比值降低($P<0.01$);(2)CBA法检测结果显示,与正常组比较,MS组IFN- γ 和IL-17A含量升高($P<0.05$; $P<0.01$),IL-4和IL-10含量明显降低($P<0.01$);与MS组比较,泼尼松组IL-17A含量明显降低($P<0.01$),IL-4和IL-10均显著升高($P<0.01$)。结论:MS的发生可能主要与Th17上调和Treg下调有关,提示临床上针对MS靶向下调Th17和上调Treg,纠正Th17/Treg比例失衡,具有潜在应用价值。

关键词 多发性硬化;T淋巴细胞亚群;Th17细胞;Treg细胞;细胞因子

中图分类号 R744.5

文献标志码 A

Detection of T lymphocyte subsets and related cytokines in 31 cases of multiple sclerosis

LI Dan

(Department of Laboratory, Southern Hospital, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, China)

Abstract Objective: To investigate the levels of T lymphocyte subsets and related cytokines in 31 cases of the patients with multiple sclerosis(MS)and their significance to clinic. **Methods:** The lymphocyte subsets including Th1(CD4⁺IFN- γ ⁺), Th17(CD4⁺IL-17⁺), Treg(CD4⁺FoxP3⁺), Tc1 (CD4-CD8⁺IFN- γ ⁺) and Tc2 (CD4-CD8⁺IL-4⁺) in peripheral blood mononuclear cells were determined by flow cytometry in three different groups; concentrations of plasma cytokines including IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4 and IL-10 were determined by cytometric bead array. **Results:** Compared with normal control group, the percentages of Th1 and Th17 cells were increased significantly ($P<0.05$), while Treg and Tc1 cells were decreased significantly ($P<0.01$), the proportion of Th17/Treg was increased significantly in MS group ($P<0.01$); compared with MS group, the percentages of Tc1, Tc2 and Treg cells were increased significantly ($P<0.05$), while Th17 and Th1 cells were reduced significantly ($P<0.01$), and the proportion of Th17/Treg was reduced significantly ($P<0.01$) in Prednisone group; Compared with normal control group, the concentration of IFN- γ and IL-17A were increased significantly ($P<0.05$; $P<0.01$), while the concentration of IL-4 and IL-10 were decreased significantly in MS group ($P<0.01$); compared with MS group, the concentration of IL-17A were decreased obviously ($P<0.05$; $P<0.01$), while the concentration of IL-4 and IL-10 were increased significantly in prednisone group ($P<0.01$). **Conclusion:** The mechanism of multiple sclerosis might relate to Treg down-regulation, and Th17 cells up-regulation. Experiments in this paper show that it has potential application value for Treg up-regulation, and Th17 cells down-regulation, which could be used as an immunomodulatory therapy in the patients with clinical multiple sclerosis.

Key words multiple sclerosis; T lymphocyte subsets; T help 17 cell; Treg cells; cytokines

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是一种以中枢神经系统脱髓鞘病变为主的自身免疫性疾病,常见于欧美国家,中国发病率较低,为1/10万~2/10万^[1]。MS确切的病因及发病机制尚未清楚。通常认为,MS

作者简介 李丹(1986-),女,检验医师,硕士,研究方向:临床化学与免疫学;E-mail: yiran7519@foxmail.com。

的发生与遗传因素、自身免疫反应及环境因素关系密切。主要病理改变是免疫活性细胞浸润、轴索损伤及髓鞘脱失,主要的临床表现为进行性神经功能障碍,随着病程的进展,双下肢瘫痪为绝大多数患者最终的结果。目前为止尚无根治MS的方法,常用的是激素治疗和免疫抑制,可明显缓解急性期和复

发期的病程,但病损程度却不能减轻,长期疗效也不肯定,且毒副作用很大。本文通过对31例MS患者静脉血T淋巴细胞亚群及相关细胞因子含量的检测,探讨Th17细胞、Treg细胞在多发性硬化发病中的作用,为今后临床治疗多发性硬化提供新的方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年1月-2017年8月威海市立医院神经内科门诊及住院MS患者31例,男13例,女18例;平均年龄(37 ± 11)岁,均符合2005年修订的McDonald诊断标准;正常对照组选自同期该院健康体检者20例,平均年龄(38 ± 12)岁。排除标准:(1)并发严重心、脑血管疾病,肝、肾功能不全;(2)急、慢性感染;(3)合并其他自身免疫性疾病;(4)应用免疫调节剂、非甾体类抗炎药物者;(5)肿瘤;(6)合并妊娠。

1.2 仪器与试剂 仪器采用美国BD FACSCalibur流式细胞仪,小鼠抗人荧光标记的抗体、同型对照抗体小鼠IgG,流式微球芯片捕获技术细胞因子试剂盒均购自美国BD公司;小鼠抗人IL-17-FITC购自eBioscience公司;淋巴细胞分离液、佛波酯乙醇、离子霉素、蛋白质转运抑制剂莫能霉素购自Sigma公司。

1.3 标本采集 31例门诊及住院MS患者初诊和泼尼松治疗4周后均清晨空腹采集肘静脉血标本5 mL于肝素钠抗凝管中,3 mL血标本用于分离外周血单个核细胞进行流式细胞学检测,2 mL血标本离心后留取血浆于EP管中保存在 -80°C 低温冰箱中用于检测细胞因子,随机抽取20名同期健康体检人员采集相应血液标本作为对照检查。

1.4 流式细胞仪检测 T淋巴细胞亚群加入等体积PBS稀释静脉血,采用淋巴细胞分离液分离单个核细胞。加入10 mg/L的布雷菲德菌素A、1 mg/L的离子霉素和0.02 mg/L的佛波酯, 37°C 培养箱孵育4 h。 $3\,000\text{ r/min}$ 离心5 min,弃去上清液收集细胞,调整细胞浓度至 $1\times 10^6/\text{mL}$,取细胞悬液300 μL ,按淋巴细胞亚群配对方案分别加入10 μL 荧光标记

mAbCD4-APC、CD8-PercP,室温避光孵育30 min,4%多聚甲醛固定20 min,加破膜缓冲液作用10 min。按组合方案加入相应的小鼠抗人mAbIFN- γ -FITC、IL-4-PE、IL-17-FITC、FOXP3-PE,室温避光孵育30 min,PBS充分洗涤,1%多聚甲醛固定,上机检测,每份标本采集的细胞数 $\geq 20\,000$ 个,采用Cell Quest分析。

1.5 流式微球芯片捕获技术(CBA)检测血浆细胞因子 通过BD FACSComp软件设置FCM的基本参数,按照试剂盒中细胞因子标准品梯度法依次稀释成以下8个浓度:1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128和1:256,加上阴性对照和最高浓度绘制各细胞因子标准曲线。待测血浆 $1\,500\text{ r/min}$ 离心5 min,吸取50 μL 上清液于待测管中,加入5种捕获微球混合物50 μL ,孵育1 h,再加入50 μL PE检测试剂,室温避光孵育2 h。加入1 mL洗液, $1\,500\text{ r/min}$ 离心5 min,弃上清,加入300 μL 洗液上机,使用Cell Quest检测。将标准品和待测样品捕获数据转入BD FCAP Array软件,绘出标准曲线,分析待测样品的细胞因子IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-4、IL-10含量。

1.6 统计学分析 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 18.0软件包对实验数据进行统计分析。组间差异比较采用独立样本 t 检验分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组外周血T淋巴细胞亚群与正常组比较 MS组Th1细胞和Th17细胞均明显升高($P<0.05$);Treg细胞和TC1细胞显著下降($P<0.01$),Th17/Treg比例明显升高($P<0.01$);与MS组比较,泼尼松组Tc1、Tc2和Treg细胞百分率均明显升高($P<0.01$),而Th1和Th17细胞显著下降($P<0.05$),Th17/Treg比值降低($P<0.01$)(表1,图1)。

2.2 血浆细胞因子的变化与正常组比较 MS组IFN- γ 和IL-17A含量升高($P<0.05$; $P<0.01$),IL-4和IL-10含量明显降低($P<0.01$);与MS组比较,泼尼松组IL-17A含量明显降低($P<0.01$),IL-4和IL-10均显著升高($P<0.01$)(表2)。

表1 3组外周血T淋巴细胞亚群的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients in three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	T淋巴细胞亚群/%						Th1/Th2	Th17/Treg
	Th1	Th2	Th17	Treg	TC1	TC2		
正常组	0.54 \pm 0.27	1.96 \pm 0.44	3.12 \pm 1.67	35.04 \pm 4.21	3.39 \pm 1.42	4.57 \pm 1.87	0.36 \pm 0.12	0.10 \pm 0.02
MS组	1.57 \pm 0.20 [▲]	1.84 \pm 0.36	15.24 \pm 2.54 [▲]	10.12 \pm 4.13 [▲]	0.62 \pm 0.18 [▲]	3.35 \pm 1.31	0.91 \pm 0.33	1.51 \pm 0.62 [▲]
泼尼松组	0.70 \pm 0.30 [#]	1.13 \pm 0.39	6.12 \pm 2.04 [#]	29.52 \pm 12.01 [*]	2.97 \pm 0.69 [*]	13.70 \pm 7.22 [*]	0.61 \pm 0.97	0.19 \pm 0.07 [*]

▲: $P<0.01$, vs 正常组; #: $P<0.05$; *: $P<0.01$, vs MS组

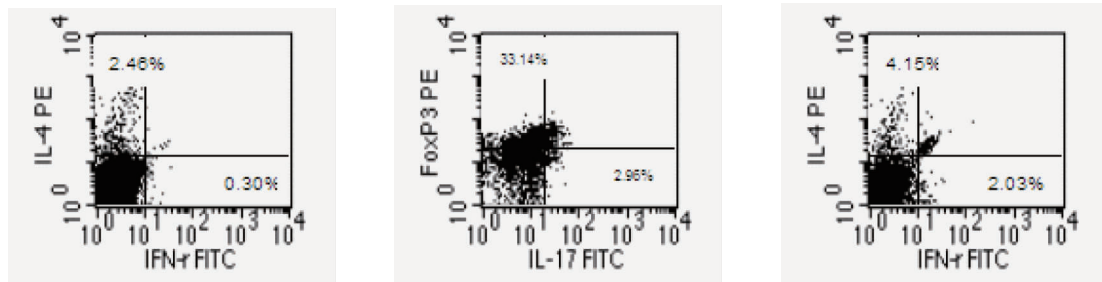


图 1 3 组外周血淋巴细胞亚群 FCM 图

Fig 1 Phenotype of lymphocyte subsets analyzed by FCM in three groups

表 2 3 组血浆细胞因子的含量($\bar{x} \pm s$, pg/mL)Tab 2 Concentrations of plasma cytokines in three groups($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	Th1 型细胞因子		Th2 型细胞因子		Th17 型细胞因子
	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-4	IL-17A
正常组	8.53 \pm 1.42	378.21 \pm 283.72	36.65 \pm 15.41	13.07 \pm 7.24	22.53 \pm 2.26
MS 组	17.54 \pm 4.20 [▲]	241.03 \pm 132.40	12.10 \pm 10.21 [*]	3.83 \pm 1.10 [*]	269.97 \pm 75.93 [*]
泼尼松组	12.40 \pm 1.30	211.04 \pm 110.45	66.45 \pm 14.31 [*]	9.20 \pm 1.93 [*]	50.63 \pm 8.62 [*]

▲: $P < 0.05$, *: $P < 0.01$, vs 正常组; *: $P < 0.01$, vs MS 组

3 讨论

过去普遍认为, Th1 细胞活性异常升高是 MS 的重要免疫发病机制, MS 是由 Th1 细胞介导的。近年来, Th17 细胞成为免疫学研究的热点, 研究发现其在自身免疫性疾病发病过程中发挥重要作用^[1-2]。Th17 细胞是一类独立的 CD4⁺T 细胞, 因活化后可以产生 IL-17 而得名, IL-17 是早期产生的具有广泛生物学活性的炎性细胞因子, Th17 细胞同时也分泌 IL-21、IL-22、IL-26、IL-29 和 TNF- α 等, 这些细胞因子可以诱导促炎性细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶的表达, 引起组织细胞炎性浸润和组织破坏^[3], 进而引起自身免疫性疾病的发生。已有研究证明在 MS 患者病灶中 IL-17 转录上调, 且脑脊液中 IL-17 表达明显高于正常对照组^[4]。国内研究已证明在多发硬化动物模型 EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 大鼠外周血中 CD4⁺IL-17⁺(Th17) 细胞亚群百分率明显升高, 且在 EAE 模型组脑和脊髓组织呈现大量炎性细胞浸润, 有血管套形成^[5-6]。

本研究中 MS 患者静脉血中 Th1 和 Th17 细胞亚群百分率明显升高, 而 Treg 细胞百分比显著降低, 且 Th17/Treg 比例也明显升高。有研究报道, FoxP3⁺Treg 可以调节机体对外源性抗原免疫反应的程, 其功能失调与多种疾病密切相关如自身免疫性疾病、过敏性疾病、感染性疾病等^[7-8]。正常情况下, Th17 和 FoxP3⁺Treg 细胞之间相互拮抗、制约, 维持两者的生理平衡是机体抗感染免疫和自身免疫耐受的重要机制。通过本实验推测, MS 的发生与 Th17/Treg 比例失衡关系密切。因此探讨靶向抑制 Th17 细胞和调节 FoxP3⁺Treg 细胞是目前自身免疫

性疾病重要的免疫治疗方向。目前, 临床上治疗多发性硬化大多应用激素和非特异性的免疫抑制剂, 本实验中泼尼松治疗组 Tc1、Tc2 和 Treg 细胞百分率均明显升高, 而 Th1 和 Th17 细胞显著下降, Th17/Treg 比值降低; IL-17A 含量明显降低, IL-4 和 IL-10 均显著升高, 在一定程度上可以缓解 MS 的症状, 但是毒副作用较大, 不适合长期使用, 因此, 寻找靶向免疫调节 Th17/Treg 失衡可能是今后临床治疗 MS 的新希望。已有研究报道, 干细胞不仅具有自我复制及定向分化的功能, 更能发挥巨大的免疫调节功能, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 模型具有明显的效果, 主要是 MSCs 抑制 T 淋巴细胞增殖, 下调 Th1 和 Th17, 上调 Th2 和 Treg 细胞, 纠正 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡, 机制可能主要与其抑制炎性细胞因子及促进抗炎细胞因子分泌密切相关^[9-13]。国内也已有研究证实人羊膜间充质干细胞、人羊膜上皮细胞, 可以下调 Th17 细胞的表达, 上调 FoxP3⁺Treg 细胞的表达, 纠正 Th17/Treg 失衡^[5-6]。

在免疫系统中, 各类细胞因子相互协同或制约发挥着重要的免疫调节作用, 本文通过检测 Th1 和 Th2 型细胞因子发现, MS 组 Th1 型细胞因子 IFN- γ 含量均明显高于正常组, Th2 型细胞因子 IL-10 和 IL-4 则明显降低, 推测通过调节 Th1/Th2 型细胞因子的平衡也是减轻 MS 免疫损伤的重要机制之一。本实验采用 CBA 方法检测血浆细胞因子含量, 与传统的 ELISA 和 Western blot 技术相比, 该方法不仅标本用量少, 检测速度更快, 结果更精准, 灵敏度更高, 值得临床研究及实验室广泛应用。同时, 本研

究由于样本量较少也存在一定的局限性,今后的研究中要增加临床样本量,降低结果的误差。本实验推测,MS的发生与Th17/Treg比例失衡和Th1/Th2型细胞因子的失衡关系密切,但在MS的发生发展过程中具体通过什么途径促使Th17表达上调,Treg表达下调,还不完全清楚,是今后研究的重点内容,此外TC1和TC2淋巴细胞亚群在MS中意义尚不清楚,值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] Zhang R W, Tian A Y, Zhang H M, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by β -elemene treatment is associated with th17 and treg cell balance[J]. J Mol Neur, 2011, 44(1):31.
- [2] 李晓玲,张博,于春梅,等. Th17/Treg 细胞在复发缓解型多发性硬化中的表达[J].中国神经免疫学和神经病学杂志, 2015, 22(3):153
- [3] Tsang J, Lu L, Jiang S P. TH17 cells in organ transplantation rejection and tolerance[J]. TH17 Cells in Health and Disease, 2011, 319
- [4] Ishizu T, Osoegawa M, Mei F J, et al. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis [J]. Brain, 2005, 128(5):988
- [5] 李丹,方宁,陈代雄,等. 人羊膜上皮细胞治疗大鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎的效应及免疫调节作用[J].中国免疫学杂志, 2013, 29(10):1011
- [6] 方宁,李丹,余丽梅,等.人羊膜间充质干细胞对大鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎的疗效及免疫调节作用[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(1):6
- [7] Mills K H. Designer adjuvants for enhancing the efficacy of infectious disease and cancer vaccines based on suppression of regulatory T cell induction[J]. Immunol Lett, 2009, 122(2):108
- [8] 陈祚珈,高雅懿,李志远,等. FOXP3+调节性T细胞[J]. 生命科学, 2010, 22(6):515
- [9] Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, et al. Mesenchymal stem cells inhibit human th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype[J]. J Immunol, 2010, 185(1):302
- [10] Wang J H, Wang G Y, Sun B, et al. Interleukin-27 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis during bone marrow stromal cell treatment[J]. J Autoimmunity, 2008, 30(4):222
- [11] Bai L, Lennon D P, Eaton V, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis[J]. Glia, 2009, 57(11):1192
- [12] Darlington P J, Boivin M N, Renoux C, et al. Reciprocal th1 and th17 regulation by mesenchymal stem cells: implication for multiple sclerosis[J]. Annals of Neurology, 2010, 68(4):540
- [13] Kang J W, Koo H C, Hwang S Y, et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells[J]. J Vet Sci, 2012, 13(1):23

(2018-04-02 收稿)

(上接第72页)

然而,本研究改良方法组不宜过早将支气管、主管纵轴塑成一致,以免影响导管自身弹性,防止撤出管芯时导管回位不良而影响支气管定位,面罩加压给氧辅助通气结束,喉镜置入口腔前塑形即可。当然,本研究亦具有局限性:入选病例均为左侧支气管插管的非困难气道患者,且无气管、支气管解剖异常者,插管条件相对较好,尚无法判断改良插管方法是否能较好地应用于右侧支气管插管及困难气道患者;双腔气管导管选用美国 HUDSON RCI 公司导管,其材质管型塑形较好,若国产导管可能因材质问题塑形不良,导致一次定位成功率可能下降。综上所述,双腔气管导管改良插管方法具有操作简单,稳定循环,降低术后并发症等优势,但能否在右侧支气管插管及困难气道中应用需进一步临床研究。

参考文献:

- [1] 卢增停,蔡永红,王立勋,等.国产小儿型明视插管软镜和听诊法用于双腔支气管导管定位的对比研究[J]. 中国内镜杂志, 2017, 23(10):6
- [2] 王纯辉,陈珂,顾尔伟,等. Supreme 喉罩联合 Coopdech 支气管阻塞器在食管癌手术中的应用[J].临床麻醉学杂志, 2013, 29(5):479
- [3] 易杰,黄宇光,罗爱伦. Airtraq DL 喉镜用于双腔气管导管插管的临床效果[J].临床麻醉学杂志, 2012, 28(2):146
- [4] 沈荣荣,杨鑫,李樱青,等. McGrath-5 型视频喉镜与 McCoy 喉镜引导困难气道双腔支气管插管的效果比较[J]. 中国内镜杂志, 2016, 22(09):15
- [5] 瞿慧,嵇晓阳,杨芸斌,等.可视喉镜联合纤维支气管镜在声门显露困难患者双腔支气管插管中的应用[J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(1):26
- [6] Purugganan R V, Jackson T A, Heir J S, et al. Video laryngoscopy versus direct laryngoscopy for double-lumen endotracheal tube intubation: a retrospective analysis[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2012, 26(5):845
- [7] Hung N K, Wu C T, Chan S M, et al. Effect on postoperative sore throat of spraying the endotracheal tube cuff with benzydamine hydrochloride, 10% lidocaine, and 2% lidocaine[J]. Anesth Analg, 2010, 111(4): 882
- [8] Campos J H, Hallam E A, Van N T, et al. Devices for lung isolation used by anesthesiologists with limited thoracic experience: comparison of double-lumen endotracheal tube, Univent torque control blocker, and Arndt wire-guided endobronchial blocker[J]. Anesthesiology, 2006, 104(2):261
- [9] Hsu H T, Chou S H, Chen C L, et al. Left endobronchial intubation with a double-lumen tube using direct laryngoscopy or the Trachway® video stylet[J]. Anaesthesia, 2013, 68 (8): 851
- [10] 黄萍,魏闯. 纤维支气管镜引导下双腔支气管导管插管在胸外科手术麻醉中的应用[J]. 重庆医学, 2012, 41(7):661
- [11] Kim H Y, Baek S H, Kim K H, et al. Endobronchial hemorrhage after intubation with double-lumen endotracheal tube in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura for minimally invasive cardiac surgery: a case report[J]. Korean J Anesthesiol, 2014, 66(1): 59

(2018-04-15 收稿)