

文章编号:1003-2754(2019)06-0496-05

CD19 + CD24^{high} CD38^{high} 调节性 B 细胞及相关细胞因子在视神经脊髓炎谱系疾病患者外周血中的变化及意义

董梅¹, 史肖鹤², 王炜¹, 李世平¹, 侯慧清¹, 吴冰洁¹

摘要: **目的** 检测 NMOSD 患者外周血中 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 及其细胞因子 IL-10、TGF-β 水平,探讨 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg、IL-10、TGF-β 在 NMOSD 急性期的变化及可能作用;检测 NMOSD 患者外周血 GFAP 水平,结合 EDSS 评分,探讨 GFAP 与疾病严重程度的相关性。**方法** 选取 2016 年 12 月 -2018 年 1 月就诊于河北医科大学第二医院神经内科 NMOSD 急性期患者 27 例为实验组,性别、年龄相匹配的 20 例健康人为对照组。入组的 NMOSD 患者进行 EDSS 评分、流式细胞术检测外周血 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 数量,PCR 法检测外周血 IL-10、TGF-β、GFAP 的 mRNA 水平,并与健康人比较。**结果** NMOSD 组 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 水平较对照组下降,差异有统计学意义,CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 与 EDSS 之间无线性关系。NMOSD 组 IL-10、TGF-β 的 mRNA 水平较对照组下降,差异有统计学意义。NMOSD 组 GFAP 水平较对照组升高,差异有统计学意义。GFAP 与 EDSS 之间无线性关系。**结论** CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 在 NMOSD 急性期发病中数量和功能上均受损,血清 GFAP 水平增高,但不能反应复发患者疾病残疾程度。

关键词: 视神经脊髓炎谱系疾病; 白介素 10; 转化生长因子-β; 胶质纤维酸性蛋白
中图分类号: R774.6 **文献标识码:** A

The study of CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} regulatory B cells and related cytokines in the spectrum of optic nerve myelitis DONG Mei, SHI Xiaohuo, WANG Wei, et al. (Department of Neurology, Key Laboratory of Neurology of Hebei Province, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective The levels of CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg, IL-10 and TGF-beta in peripheral blood of patients with NMOSD were analyzed, and the role of CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg in the acute phase of NMOSD was discussed. The level of GFAP in peripheral blood of NMOSD patients was detected and the correlation between GFAP and the severity of the disease was discussed with the EDSS score. **Methods** From December 2016 to 2018 01, 27 patients in the acute phase of NMOSD in the Second Hospital of Hebei Medical University were selected as the experimental group, and 20 healthy persons matched for sex and age were selected as control group. The EDSS score and flow cytometry were used to detect the number of CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg in peripheral blood of NMOSD patients. The levels of IL-10, TGF- and GFAP in peripheral blood were detected by PCR and compared with healthy persons. **Results** The level of CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg in group of NMOSD was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant. There was no linear relationship between Bregs and EDSS score. The levels of IL-10 and TGF-beta in group of NMOSD were lower than that in the control group, and the difference was statistically significant. The level of GFAP in group of NMOSD was higher than that in the control group, and there was a significant difference between the two groups. There is no linear relationship between GFAP and EDSS. **Conclusion** CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg was not only significantly reduced in the pathogenesis of NMOSD, but also significantly impaired in its function. The serum GFAP increased but it has no relationship with EDSS in relapsed NMOSD patients.

Key words: Optic neuromyelitis spectrum disease; Interleukin-10; Transforming growth factor beta; B cell activating factor; Glial fibrillary acidic protein

视神经脊髓炎谱系疾病 (Neuromyelitis optica spectrum disorders, NMOSD) 是中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 炎性免疫性疾病, 反复发作, 主要为视神经炎、长节段横贯性脊髓炎和颅内典

收稿日期:2019-04-16; 修订日期:2019-06-02

作者单位:(1. 河北医科大学第二医院神经内科, 神经病学河北省重点实验室, 河北 石家庄 050000; 2. 河北医科大学第三医院心电图室, 河北 石家庄 050000)

通讯作者:董梅, E-mail: dm-mp@126.com

型部位^[1],中国、日本等亚洲地区患病显著高于欧美等国家^[2,3]。常导致失明、截瘫等,是我国青壮年致残的重要原因之一。因此,探索其发病机制,寻找潜在的治疗靶点尤为关键。

水通道蛋白4(Aquaporin 4, AQP4)抗体(AQP4-Ab)是NMOSD特异性抗体,在NMOSD发病机制中占据重要作用^[4]。2015年修订诊断标准将NMOSD分为AQP4抗体阳性和阴性两类,AQP4抗体阴性NMOSD可能包含其他异质性致病因素^[5]。AQP4-Ab与血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)的星形胶质细胞足突成分AQP4特异性结合,在补体参与下,导致严重的星形胶质细胞(astrocyte, AS)损害,使AQP4和其标志性成分胶质纤维酸性蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP)大量丢失,形成NMOSD根本性病理损害-星形胶质细胞病(Astrocytopathy)^[6]。上述证据表明:B细胞是NMOSD发病机制中重要参与者。作为AS重要组成成分,血清GFAP含量变化可以间接反应脑组织损伤程度。

B细胞除产生特异性抗体外,还有多种“抗体非依赖性(Antibody Independent)”功能,例如,新近发现部分B细胞亚群具有免疫调节作用,称为“调节性B细胞”(Regulatory B cell, Breg),主要通过分泌IL-10、TGF- β 发挥免疫抑制作用,大量研究表明Breg在NMOSD急性期起重要作用。

本研究主要测定AQP4-Ab阳性的急性期NMOSD患者及健康对照组人群外周血CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg数量,以及血清IL-10、TGF- β 的mRNA含量水平,进一步探讨Breg在NMOSD急性期的数量变化及功能,以及与EDSS评分之间的关系;通过对外周血GFAP测定及EDSS评分,探讨GFAP是否与疾病残疾程度有关。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取2016年12月-2017年12月就诊于河北医科大学第二医院东院区神经内科的27例急性期NMOSD患者为实验组(急性期:患者出现新的神经系统症状体征,持续时间大于24h不缓解,EDSS评分增加 ≥ 1 分),同期选取性别、年龄相似的20位健康志愿者作为对照组。所有患者均经由我科主治及以上资质的医师诊断,符合最新NMOSD指南制定的诊断标准。本实验研究征得患者或家属同意,所有患者均在治疗前抽取外周血。

1.2 标本采集 患者急性期入院后,抽取晨起

空腹静脉血两管,各2ml,分别置于柠檬酸钠管、EDTA管中,柠檬酸钠管内血于-80℃冰箱保存备用。EDTA管静脉血立即送血液科实验室进行CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg检测,柠檬酸钠管标本冷存于-80℃,用于检测IL-10、TGF- β 、GFAP的mRNA水平。

1.3 研究方法

1.3.1 临床资料收集 记录所有研究对象的基本信息,包括:姓名、性别、年龄、病程、EDSS评分、AQP4抗体结果等。

1.3.2 应用SYBR Green I Real-time PCR方法检测血液中IL-10、TGF- β 及GFAP的mRNA含量,实验操作按产品说明书进行。

1.3.2.1 Real Time PCR检测目的基因引物均在北京Invitrogen公司合成。

1.3.2.2 提取样本总RNA:采用Trizol法提取样本总RNA,使用NanoDrop[®]ND-2000分光光度计测定RNA浓度和纯度。

1.3.2.3 逆转录合成cDNA:采用PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser方法进行,步骤一,去除基因组DNA反应:于冰上配制反应混合液,5 \times gDNA Eraser Buffer 2.0 μ l, gDNA Eraser 1.0 μ l, Total RNA 1 μ g,加RNase Free H₂O至总体积10 μ l,42℃孵育2 min。步骤二,反转录反应,上述反应液加入PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μ l, RT Primer Mix 1.0 μ l, 5 \times PrimeScript Buffer 2 4.0 μ l, RNase Free H₂O 4.0 μ l,共20 μ l,37℃孵育15 min,之后放入85℃5 s,cDNA保存至-20℃冰箱备用。

1.3.2.4 Real Time PCR样本检测 将所有cDNA样品分别配置RT-PCR反应体系。体系配置如下:2 \times Master Mix 10 μ l,10 μ mol的PCR特异引物F 0.5 μ l,10 μ mol的PCR特异引物R 0.5 μ l,加水至总体积为18 μ l 5000 rpm短暂离心。将18 μ l混合液、2 μ l cDNA依次加入96-PCR板对应的每个孔中,混匀,置于Real time PCR仪上进行PCR反应,95℃,30 s;40个PCR循环95℃,5 s;60℃,40 s(收集荧光)。建立PCR产物的熔解曲线,从60℃缓慢加热到99℃。将目的基因和内参分别进行Real time PCR反应,每个样本进行3个复孔检测。仪器自动汇总荧光值后进行分析。

1.3.3 血清CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg水平测定 患者EDTA管静脉血送至河北医科大学第二

医院血液内科实验室采用流式细胞学方法测定血清 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 水平。

1.3.4 统计学分析 采用 SPSS 21.0 对 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg、IL-10、TGF-β、GFAP 的 mRNA 水平数据进行统计学分析。首先对数据进行正态性检验,如正态分布数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验进行两组间比较,不符合正态分布数据采用中位数(四分位数间距)表示,组间比较采用秩和检验。Breg 水平与 EDSS 评分、GFAP 与 EDSS 评分之间相关性分析,符合正态分布采用线性相关分析,不符合正态分布采用 Spearman 相关分析。*P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料 NMOSD 患者共 27 例,女性 20 例,平均发病年龄 44 岁(19 ~ 62 岁),患者均符合 NMOSD 诊断标准,平均 EDSS 评分 3.59 分,NMO-IgG 阳性率 75%。对照组 20 例,均为女性,平均发病年龄,41 岁(20 ~ 64 岁),两组性别、年龄无统计学差异。

2.2 NMOSD 急性期患者与健康对照组 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 相比下降,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。Breg 水平与 EDSS 评分不存在线性相关关系(见图 1、图 2)。

2.3 NMOSD 急性期患者与健康对照组血清 IL-10、TGF-β 的 mRNA 水平相比下降,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)(见图 3、图 4)。

2.4 NMOSD 急性期患者与健康对照组血清 GFAP 水平相比升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。GFAP 与 EDSS 评分之间无线性相关关系(见图 5、图 6)。

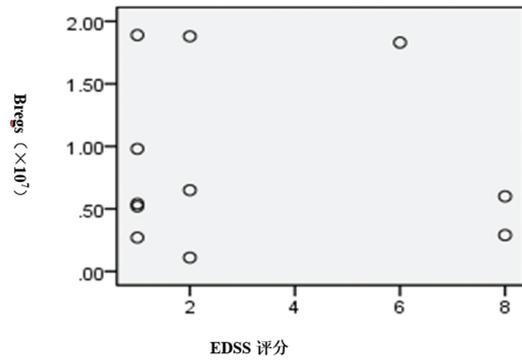


图 2 血液中 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Bregs 数量与 EDSS 评分无相关关系

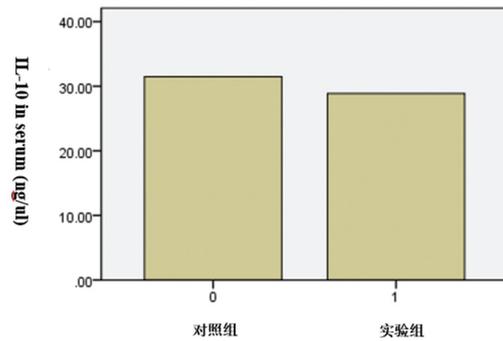


图 3 NMOSD 急性期患者为实验组,健康者为对照组,两组血液中 IL-10 mRNA 水平比较实验组明显降低 *P* < 0.05

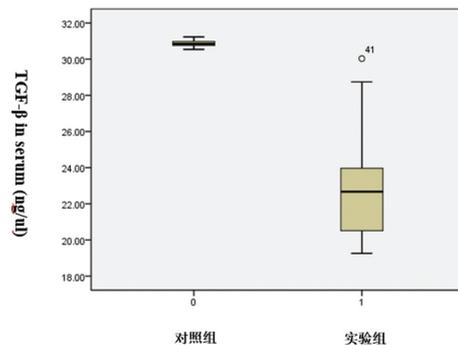


图 4 NMOSD 急性期患者为实验组,健康者为对照组,两组血液中 TGF-β mRNA 水平比较实验组明显降低 *P* < 0.05

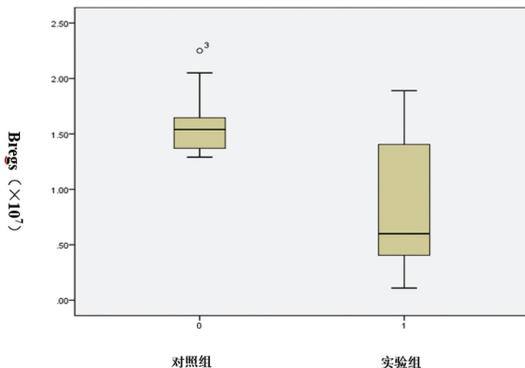


图 1 NMOSD 急性期患者为实验组,健康者为对照组,两组血液中 CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} Breg 数量比较实验组明显降低 *P* < 0.05

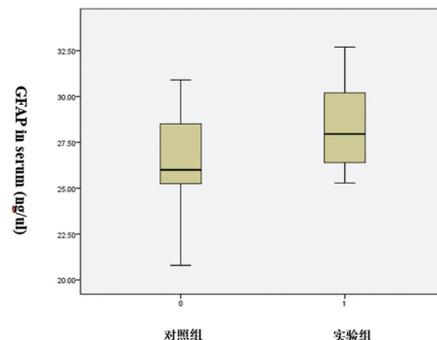


图 5 NMOSD 急性期患者为实验组,健康者为对照组,两组血液中 GFAP mRNA 水平比较实验组明显升高 *P* < 0.05

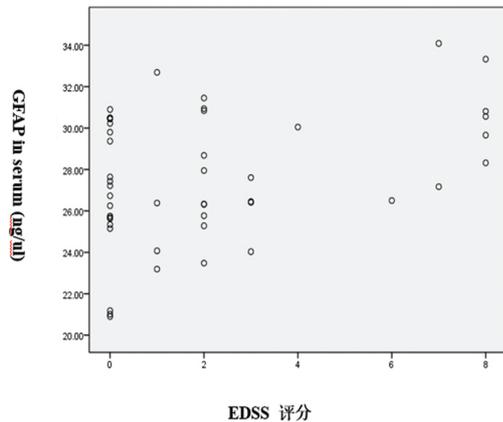


图6 血液中GFAP含量与EDSS评分无相关关系

3 讨论

B细胞是NMOSD发病重要因素,B细胞一个重要特征是激活后产生抗体。其活化后大量增殖并分化为效应B细胞亚群(浆细胞)和记忆B细胞亚群(Memory B cell, Bmem),浆细胞能分泌特异性抗体,中和抗原执行免疫保护功能,也可因攻击具有免疫原性的自体组织导致自身免疫性疾病发生^[7]。Bmem则在再次受刺激后,直接增殖、分化为浆细胞,产生大量抗体。此外,B细胞还有多种“抗体非依赖性”功能,包括抗原呈递、分泌各种细胞因子和趋化因子等。新近发现部分B细胞亚群具有免疫调节作用。Mizoguchi等^[8]首次将具有免疫抑制特性的B细胞亚群定义为“调节性B细胞”(Breg)。大量研究提示Breg参与了自身免疫性疾病、感染性疾病、肿瘤等众多疾病的发病过程,Breg可抑制炎症反应细胞如DC细胞、T细胞的免疫应答,同时可促进Treg细胞的抑制炎症反应作用,并诱导Treg活化^[9]。

目前发现,CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}B细胞、CD19⁺CD24⁺CD27⁺B细胞和CD19⁺CD1d⁺CD5⁺B细胞是人类Breg的3种表型^[10]。主要通过分泌IL-10、TGF-β、IL-35发挥免疫抑制作用,其中IL-10被认为是鉴定Breg的特征性标志^[11]。其中,CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg于2010年由英国伦敦大学学院Blair等^[12]证实,随后研究证实该表型Breg在多种自身免疫相关性疾病的患者外周血中数量降低且功能受损,表现为抑制性细胞因子IL-10分泌减少,从而抑制Th1细胞因子和诱导Th2细胞因子的能力

降低。NMOSD患者Breg不同表型及相关细胞因子表达情况及其作用机制尚不清楚。故我们研究了CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg在NMOSD急性期患者中的变化。

我们的研究发现在AQP4-Ab阳性的NMOSD急性期患者外周血中Breg数量较健康对照组显著下降,与之前国内外学者的报道相一致。研究证明Breg通过分泌IL-10、IL-35、TGF-β等炎症抑制细胞因子,实现负向免疫调控,保障免疫平衡。Breg可通过分泌IL-35、TGF-β诱导B细胞分泌IL-10;通过分泌TGF-β及膜表面的CD80/CD86、GITRL诱导调节性T细胞生成;通过分泌IL-10促进辅助性T细胞向Th2分化并且抑制其向Th1的分化^[13]。Breg及其细胞因子可与T细胞、单核细胞等之间进行动态、多样的相互作用,在免疫调节发挥至关重要的作用^[14]。

IL-10是重要的抗炎细胞因子,对免疫反应的调控主要是通过抑制过度炎症反应实现。IL-10可诱导Th0向Th2发育,诱导Th2细胞因子,并通过抑制Th1细胞因子进一步抑制Th1发育,影响Th1/Th2平衡,阻止抗原呈递。单核细胞及巨噬细胞产生促炎因子,抑制树突细胞分泌细胞因子如IL-6、IL-12,因IL-12水平下降可抑制EAE进程,故IL-10/IL-12平衡在EAE发病过程中起重要调节作用。IL-10通过下调促炎性细胞因子、共刺激分子的表达,从而效应T细胞激活减少,进而发挥负向调节作用^[15]。TGF-β抑制可细胞毒性T淋巴细胞、Th1型和Th2型细胞分化,促进外周血树突状细胞、Th17-、Th9-和Tfh-细胞的产生,在维持自身耐受性,控制免疫应答方面发挥着关键作用^[16]。有研究采用CD8⁺CD103⁺iTreg过继转移治疗典型狼疮综合征的慢性移植抗宿主病,表明可降低自身抗体和蛋白尿水平,减少肾脏病理损害,提高存活率,提示可能与TGF-β和IL-10信号,直接抑制B细胞反应有关。TGF-β在Bregs发挥负向免疫调节作用中占有不可忽视的地位^[17]。此外,Breg可能通过产生TGF-β增强Treg的扩增^[18]。

我们的研究证实NMOSD患者急性期外周血中IL-10和TGF-β的含量较健康对照组明显降低,上述研究结果提示NMOSD患者外周血Breg不仅数量减低,在功能上也存在异常,急性期免疫活性增强,

免疫平衡紊乱,大量炎症因子激活,而相应抑制功能下降,造成组织损伤,这可能是 NMOSD 发病机制的重要组成部分。

NMOSD 急性期 AQP4 抗体通过受损的 BBB 与 AS 足突表面的 AQP4 特异性结合, AS 受损,GFAP 作为 AS 的重要组成部分,释放入细胞间隙,通过 BBB 进入外周血,研究表明 NMOSD 患者中 CSF 中的 GFAP 浓度显著高于血清,血清中 GFAP 含量变化的研究相对少见,也较对照组水平增加^[19]。我们的研究表明 NMOSD 患者急性期外周血中 GFAP 水平较健康对照组显著升高,与既往研究结果相一致,反应 AS 损害, BBB 破坏,脑组织内发生炎性损伤。但我们的研究并未发现血清 GFAP 水平与 EDSS 评分之间具有明确相关性,分析原因可能为,本组患者大部分为复发患者,EDSS 评分为多次复发后累积残疾评分,而检测的血清 GFAP 仅为此次免疫损伤后 AS 破坏的反应,故 GFAP 不能作为生物学指标反应复发的 NMOSD 患者病情严重程度及预后。

[参考文献]

- [1] Weinschenker BG, Wingerchuk DM. Neuromyelitis spectrum disorders [J]. *Mayo Clin Proc*, 2017, 92(4): 663-679.
- [2] Hor JY, Lim TT, Chia YK, et al. Prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder in the multi-ethnic penang island, malaysia, and a review of worldwide prevalence [J]. *Mult Scler Relat Disord*, 2018, 19: 20-24.
- [3] Bukhari W, Prain KM, Waters P, et al. Incidence and prevalence of NMOSD in Australia and New Zealand [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2017, 88(8): 632-638.
- [4] 韩冰, 朱辉, 刘晶瑶. AQP4 与 NMO-IgG 在视神经脊髓炎谱系疾病发病机制中的作用 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2017, 34(11): 1045-1046.
- [5] Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders [J]. *Neurology*, 2015, 85(2): 177-189.
- [6] Vaknin-Dembinsky A, Karussis D, Avichzer J, et al. NMO spectrum of disorders: a paradigm for astrocyte-targeting autoimmunity and its implications for MS and other CNS inflammatory diseases [J]. *J Autoimmun*, 2014, 54: 93-99.
- [7] Liu Y, McDaniel JR, Khan S, et al. Antibodies encoded by FCRL4-bearing memory B cells preferentially recognize commensal microbial antigens [J]. *J Immunol*, 2018, 200(12): 3962-3969.
- [8] Quan C, Yu H, Qiao J, et al. Impaired regulatory function and enhanced intrathecal activation of B cells in neuromyelitis optica; distinct from multiple sclerosis [J]. *Mult Scler*, 2013, 19(3): 289-298.
- [9] Zhang R, Sage PT, Finn K, et al. B cells drive autoimmunity in mice with CD28-deficient regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2017, 199(12): 3972-3980.
- [10] Bocian K, Kiernozek E, Domaga-Kulawik J, et al. Expanding diversity and common goal of regulatory T and B cells. I: origin, phenotype, mechanisms [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2017, 65(6): 501-520.
- [11] Banko Z, Pozsgay J, Szili D, et al. Induction and differentiation of IL-10-producing regulatory B cells from healthy blood donors and rheumatoid arthritis patients [J]. *J Immunol*, 2017, 198(4): 1512-1520.
- [12] Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients [J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 129-140.
- [13] Ding Q, Yeung M, Camirand G, et al. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3645-3656.
- [14] Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(8): 662-674.
- [15] Falcao PL, Tpr C. The role of regulatory T cells, interleukin-10 and in vivo scintigraphy in autoimmune and idiopathic diseases-Therapeutic perspectives and prognosis [J]. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 2017, 63(12): 1090-1099.
- [16] Houzen H, Kondo K, Niino M, et al. Prevalence and clinical features of neuromyelitis optica spectrum disorders in northern Japan [J]. *Neurology*, 2017, 89(19): 1995-2001.
- [17] Zhong H, Liu Y, Xu Z, et al. TGF- β -Induced CD8+ CD103+ regulatory T cells show potent therapeutic effect on chronic graft-versus-host disease lupus by suppressing B cells [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 35.
- [18] Song J, Xiao L, Du G, et al. The role of regulatory B cells (Bregs) in the Tregs-amplifying effect of Sirolimus [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 90-96.
- [19] Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BF, et al. The pathology of an autoimmune astrocytopathy: lessons learned from neuromyelitis optica [J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(1): 83-97.