

# 多发性硬化患者外周血白细胞介素-4、10 和干扰素- $\gamma$ 分泌临床研究

乔立艳 许贤豪 侯世芳

**【摘要】** 目的 从单个 T 细胞水平探讨多发性硬化患者病程不同阶段外周血细胞因子分泌变化, 以为鉴别诊断和判断病情提供线索。方法 采用酶联免疫斑点试验 (ELISPOT) 检测外周血单个核细胞在自分泌状态下和经外源性抗原(刀豆蛋白 A、髓鞘碱性蛋白、乙酰胆碱受体)刺激后, 外周血白细胞介素(IL)-4、10 和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )分泌变化。结果 与正常对照组和其他非免疫性神经疾病组相比, 多发性硬化组患者经髓鞘碱性蛋白刺激后外周血 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$ 分泌水平升高(均  $P=0.000$ ), 其中髓鞘碱性蛋白特异性 IFN- $\gamma$ 分泌水平在急性发作期或加重期高于稳定期( $P=0.002$ ), 而 IL-4 和 IL-10 则无明显改变。结论 在外源性抗原髓鞘碱性蛋白刺激下, 采用 ELISPOT 法检测多发性硬化患者血清 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$ 特异性分泌水平, 具有鉴别诊断和判断疾病进展阶段的作用。

**【关键词】** 多发性硬化; 白细胞介素 4; 白细胞介素 10; 干扰素 II 型; 髓磷脂蛋白质类

## The study on secretion of cytokine interleukin-4, interleukin-10 and interferon- $\gamma$ in peripheral blood of multiple sclerosis patients

QIAO Li-yan<sup>1</sup>, XU Xian-hao<sup>2</sup>, HOU Shi-fang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, Tsinghua University Yuquan Hospital, Beijing 100040, China

<sup>2</sup>Department of Neurology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Corresponding author: QIAO Li-yan (Email: qiaoliyan2000@aliyun.com)

**【Abstract】** **Objective** Multiple sclerosis (MS) is a mainly cell-mediated autoimmune demyelinating disease in central nervous system (CNS), characterized by inflammatory demyelinating and infiltration of mononuclear cells around microvessels in CNS. It has been shown that MS is caused by the imbalance between T helper cell 1 (Th1) and Th2 or between inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines. However, the profile of cytokine according to the published data is contradictory. This study is to evaluate the status of cytokines from mononuclear T cells in MS patients and try to provide clues for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) was used to test the spontaneous and antigen-specific [concanavalin A (ConA), myelin basic protein (MBP) and acetylcholine receptor (AChR)] Th1-related cytokine interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and Th2-related cytokines interleukin-4 (IL-4), IL-10 in the peripheral blood mononuclear cells in MS patients, who had not received any immunological treatment over the last 3 months. **Results** Compared with normal controls and patients with non-immune neurological diseases, MBP specific IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  of MS patients increased significantly ( $P=0.000$ , for all). In addition, MBP specific IFN- $\gamma$  level of MS patients increased significantly in acute or exacerbating phase when compared with that in stable phase ( $P=0.002$ ), while MBP specific IL-4 and IL-10 levels did not differ significantly ( $P>0.05$ , for all). **Conclusions** The examinations of IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  cytokines using ELISPOT are helpful for the differential diagnosis and the disease course of MS.

**【Key words】** Multiple sclerosis; Interleukin-4; Interleukin-10; Interferon type II; Myelin proteins

多发性硬化(MS)是中枢神经系统炎性脱髓鞘

疾病,以中枢神经系统炎性脱髓鞘改变和血管周围单个核细胞浸润为特征,发病机制主要以 T 细胞介导的细胞免疫为主<sup>[1]</sup>。目前主要依靠临床症状与体征,以及神经功能缺损程度[扩展残疾状态量表(EDSS)]和影像学(MRI)检查判断病情严重程度。

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.10.008

作者单位:100040 北京,清华大学玉泉医院神经内科(乔立艳);100730 卫生部北京医院神经内科(许贤豪,侯世芳)

通讯作者:乔立艳 (Email: qiaoliyan2000@aliyun.com)

在多发性硬化明确的免疫学发病背景下,一直以来主要尝试通过监测细胞因子分泌变化以评价病情、辨别治疗时机和判断疗效、阐明某种治疗的作用机制,业已取得极大进展。然而,不同医学研究中心所报道的结果不尽一致,使其在临床应用过程中缺乏公认的标准。既往酶联免疫吸附试验(ELISA)是检测体液中游离细胞因子的常用实验室方法,但是由于半衰期不同,其在体液中不断代谢或与靶器官结合,不能确切地反映体内细胞因子分泌水平。自 20 世纪 80 年代以来, Sedgwick 和 Holt<sup>[2]</sup>、Czerkinsky 等<sup>[3]</sup>,以及 Sedgwick<sup>[4]</sup>参照 ELISA 技术的基本原理,研制出敏感性和特异性俱佳的于体外检测细胞因子分泌水平的酶联免疫斑点试验(ELISPOT)方法。该项技术基于多发性硬化特异性抗原髓鞘碱性蛋白(MBP)是人类中枢神经系统髓鞘的主要成分,该蛋白能够诱导多发性硬化模型动物发生实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE),以及多发性硬化患者外周血和脑脊液中检出高表达的髓鞘碱性蛋白特异性单个 T 细胞<sup>[5]</sup>。辅助性 T 细胞(Th)及其分泌的细胞因子是免疫应答的重要成分。CD4<sup>+</sup>T 细胞可以分化为 Th1 和 Th2,其中 Th1 分泌的白细胞介素(IL)-2 和 3、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)辅助细胞免疫,介导细胞毒性作用,故 Th1 细胞分泌的细胞因子又称为炎性因子;Th2 分泌的 IL-4、5、6、10、13 和转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )主要辅助抗体的产生,故 Th2 细胞分泌的细胞因子又称为抗炎性因子或免疫调节因子,对 Th1 细胞的增殖呈负反馈调节效应。除经典的 Th1/Th2 平衡作用外,2005 年 Harrington<sup>[6]</sup>发现了第 3 种 T 细胞亚群即 Th17 细胞,以产生 IL-17 为特征,同时还分泌 IL-22 和 10,参与自身免疫应答反应。但是与 Th17 细胞相比,经典的 Th1 和 Th2 细胞仍占优势。在正常情况下,人体 Th1 和 Th2 细胞处于相对平衡即机体处于免疫平衡状态;在病理状态下,不同辅助性 T 细胞的优势激活打破二者平衡即诱发不同类型的免疫应答反应。在本研究中,笔者采用 ELISPOT 技术从单个 T 细胞水平检测多发性硬化患者在自分泌状态下,以及经有丝分裂原刀豆蛋白 A(ConA)、髓鞘碱性蛋白、乙酰胆碱受体(AChR)等外源性抗原刺激后,分别于急性发作期或加重期及稳定期其外周血 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$ 分泌变化,以期为临床鉴别诊断和判断病情严重程度提供线索。

## 对象与方法

### 一、研究对象

1. 多发性硬化诊断标准 根据文献[7]分为临床确诊和实验室支持确诊两项标准。(1)临床确诊:有两次发作和两个部位病变的临床证据;或有两次发作,一个部位病变的临床证据和另外一个部位病变的亚临床证据。(2)实验室支持确诊:仅有一次发作,但有两个部位病变的临床证据,而且脑脊液寡克隆区带(OB)阳性和(或)IgG 合成率升高;有两次发作并有一个部位病变的临床或亚临床证据,脑脊液寡克隆区带阳性和(或)IgG 合成率升高;有一次发作、一个部位病变的临床证据和另一个部位病变的亚临床证据,脑脊液寡克隆区带阳性和(或)IgG 合成率升高。

2. 多发性硬化分期 参照文献[8]中方法分为急性发作期或加重期和稳定期。(1)急性发作期:发作或加重前 1 个月内病情稳定或趋于好转,发作或加重时间为 24 h 以上、但未超过 8 周。(2)加重期:出现新的症状与体征,或原有症状与体征加重(EDSS 评分增加 > 1 分)。(3)稳定期:近 1~2 年病情稳定,根据 EDSS 评分和日常生活活动能力判断,未见发作、缓解和进展证据。

3. 纳入标准 (1)明确诊断为临床确诊型或实验室支持确诊型病例。(2)临床分期为急性发作期或加重期及稳定期病例。(3)年龄 18~60 岁。(4)采血时 EDSS 评分 0~8 分。(5)采血前至少 3 个月未接受免疫抑制剂(包括糖皮质激素)治疗。

4. 排除标准 (1)年龄 < 18 岁或 > 60 岁。(2)合并其他自身免疫性疾病。(3)合并意识障碍。(4)合并高血压、糖尿病、支气管哮喘、心功能衰竭、冠状动脉粥样硬化等内科疾病。(5)合并脑卒中、周围神经病、神经变性病等神经系统疾病。(6)合并外伤。

5. 一般资料 选择 2000 年 9 月~2002 年 1 月在卫生部北京医院神经内科就诊的多发性硬化或其他非免疫性神经疾病患者共 52 例。(1)多发性硬化组(MS 组):共 36 例患者,男性 15 例,女性 21 例;年龄 24~56 岁,平均为(37.06 ± 12.69)岁;病程 0.25~13 年,平均(4.15 ± 4.45)年;EDSS 评分 1~7.50 分,平均(3.67 ± 2.39)分。其中临床确诊型 20 例、实验室支持确诊型 16 例;急性发作期或加重期 20 例、稳定期 16 例。(2)其他非免疫性神经疾病组(OND 组):共 16 例患者,男性 6 例,女性 10 例;年龄 17~53 岁,平

均( $35.19 \pm 15.09$ )岁。其中进行性肌营养不良(MD)8例、肌萎缩侧索硬化症(ALS)5例、Meige综合征2例和原发性癫痫1例。(3)正常对照组:选择同期在我院进行体格检查且性别和年龄相匹配的健康志愿者16例,男性6例,女性10例;年龄27~45岁,平均为( $35.87 \pm 16.60$ )岁。3组受试者性别( $\chi^2 = 3.841, P = 0.054$ )和年龄( $F = 1.977, P = 0.174$ )比较,差异无统计学意义,具有可比性。

## 二、研究方法

1. 主要仪器与试剂 淋巴细胞分离液购自天津生物制品有限公司。RPMI1640培养液由美国Gibco BRL公司提供。胎牛血清(FBS)购自美国Promeg公司。用于细胞因子IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ 检测的ELISPOT试剂盒购自法国Diclone公司。刀豆蛋白A、髓鞘碱性蛋白均由美国Sigma公司提供。乙酰胆碱受体取自腓肠肌,由卫生部北京医院神经免疫室自行制备。

2. 试验方法 (1)分离外周血单个核细胞:采集空腹肘静脉血5ml,肝素锂抗凝,以等量生理盐水混匀,滴至5ml淋巴细胞分离液界面上,于离心半径16cm、2000r/min离心30min,收集中间层细胞即为外周血单个核细胞(PBMC);加入无菌生理盐水,于离心半径16cm、1500r/min离心10min,弃上清,取细胞沉淀待用。(2)检测血清IL-4、IL-10和IFN- $\gamma$ 表达水平:96孔酶标板和酶标板盖于紫外线下照射30min,捕获抗体,经无菌磷酸盐缓冲液1:100稀释,每孔滴加100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C反应1h;弃上清后滴加200 $\mu$ l质量分数为2%牛血清白蛋白,37 $^{\circ}$ C反应1h;弃上清、滴加外周血单个核细胞悬液100 $\mu$ l(共含外周血单个核细胞 $200 \times 10^3$ 个),37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%二氧化碳湿润条件下培养1h;甩去细胞,冲洗( $\times 3$ 次)后滴加200 $\mu$ l蒸馏水冰水混合物冰浴15min;滴加100 $\mu$ l抗体,37 $^{\circ}$ C反应1h,滴加过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C反应1h;弃上清、冲洗( $\times 3$ 次),滴加琼脂糖底物液50 $\mu$ l、冰浴20min,凝固后37 $^{\circ}$ C温箱放置72h,形成蓝色斑点。计数 $200 \times 10^3$ 个外周血单个核细胞的蓝色斑点数目。每一样本分为不加刺激(自分泌)或滴加刀豆蛋白A、髓鞘碱性蛋白和乙酰胆碱受体。

3. 统计分析方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用Kolmogorov-Smirnov检验进行正态分布检验,采用Levene检验行方差齐性检验;方差齐者采

用单因素方差分析,方差不齐者行Kruskal-Wallis *H*检验,两两比较行Tamhane's *T*<sub>2</sub>检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

经Kolmogorov-Smirnov检验,各组受试者在自分泌状态下和经外源性抗原(刀豆蛋白A、髓鞘碱性蛋白、乙酰胆碱受体)刺激后,急性发作期或加重期和稳定期血清IL-4、IL-10和IFN- $\gamma$ 分泌水平均呈正态分布( $P > 0.05$ )。

在自分泌状态下,各组受试者血清IL-4分泌水平接近( $P = 0.360$ ,表1);而IL-10( $P = 0.048$ ,表2)和IFN- $\gamma$ ( $P = 0.000$ ,表3)比较,组间差异有统计学意义。经外源性抗原刀豆蛋白A和髓鞘碱性蛋白刺激后,各组受试者血清IL-4(均 $P = 0.000$ ,表1)和IL-10(均 $P < 0.05$ ,表2)分泌水平差异有统计学意义;但经乙酰胆碱受体刺激后,仅IFN- $\gamma$ 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$ ,表3),而IL-4和IL-10组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

与正常对照组和OND组相比,MS组患者经髓鞘碱性蛋白刺激后血清IL-4、IL-10和IFN- $\gamma$ 分泌水平升高,且差异有统计学意义(均 $P = 0.000$ );乙酰胆碱受体是重症肌无力特异性抗原,在其刺激下MS组患者上述3种细胞因子分泌水平并未出现反应性升高(均 $P > 0.05$ );MS组患者经刀豆蛋白A刺激后血清IL-4和IFN- $\gamma$ 分泌水平升高(均 $P = 0.000$ ),而血清IL-10分泌水平降低且低于OND组( $P = 0.007$ ),但与正常对照组之间差异无统计学意义( $P = 0.430$ ,表4)。

对不同病程(急性发作期或加重期和稳定期)外周血细胞因子分泌水平分析显示,MS组患者在急性发作期或加重期髓鞘碱性蛋白特异性分泌IFN- $\gamma$ 水平高于稳定期( $P = 0.002$ );特异性分泌IL-4( $P = 0.185$ )和IL-10( $P = 0.206$ )水平虽低于稳定期,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ ,表5)。

## 讨 论

为明确未经免疫调节治疗的多发性硬化患者之免疫状态,我们采用ELISPOT法对多发性硬化患者外周血单个核细胞Th1细胞因子IFN- $\gamma$ ,以及Th2细胞因子IL-4和IL-10在体外培养条件下分泌细胞因子的能力进行检测,所观察到的蓝色斑点数目即代表其分泌细胞因子的水平。

**表 1** 各组受试者在自分泌和外源性抗原刺激下外周血 IL-4 分泌水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , 斑点数/ $200 \times 10^3$  PBMC)\*

**Table 1.** Comparison of IL-4 levels of spontaneous and stimulated secretion in different groups ( $\bar{x} \pm s$ , blot number/ $200 \times 10^3$  PBMC)\*

Group	N	Spontaneous secretion	ConA	MBP	AChR
Control (1)	16	0.21 ± 0.14	0.72 ± 0.06	0.15 ± 0.15	0.20 ± 0.06
MS (2)	36	0.30 ± 0.33	1.10 ± 0.55	1.12 ± 1.01	0.13 ± 0.18
OND (3)	16	0.18 ± 0.14	0.64 ± 0.04	0.20 ± 0.18	0.15 ± 0.14
<i>H</i> or <i>F</i> value		2.025	58.438	51.182	1.469
<i>P</i> value		0.360	0.000	0.000	0.235

\*One-way ANOVA for comparison of IL-4 levels after AChR stimulation, and Kruskal-Wallis *H* test for comparison of others. MS, multiple sclerosis, 多发性硬化; OND, other non-immunoneurological disease, 其他非免疫性神经疾病; ConA, concanavalin A, 刀豆蛋白 A; MBP, myelin basic protein, 髓鞘碱性蛋白, AChR, acetylcholine receptor, 乙酰胆碱受体。The same as Table 2

**表 3** 各组受试者在自分泌和外源性抗原刺激下外周血 IFN- $\gamma$  分泌水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , 斑点数/ $200 \times 10^3$  PBMC)

**Table 3.** Comparison of IFN- $\gamma$  levels of spontaneous and stimulated secretion in different groups ( $\bar{x} \pm s$ , blot number/ $200 \times 10^3$  PBMC)

Group	N	Spontaneous secretion	ConA	MBP	AChR
Control (1)	16	0.11 ± 0.86	2.99 ± 0.29	0.78 ± 0.79	2.43 ± 0.59
MS (2)	36	0.94 ± 2.87	4.54 ± 1.22	2.87 ± 2.11	2.97 ± 1.09
OND (3)	16	2.55 ± 0.89	12.02 ± 3.46	5.93 ± 2.15	2.82 ± 0.89
<i>H</i> value		35.210	66.930	66.854	6.388
<i>P</i> value		0.000	0.000	0.000	0.041

MS, multiple sclerosis, 多发性硬化; OND, other non-immunoneurological disease, 其他非免疫性神经疾病; ConA, concanavalin A, 刀豆蛋白 A; MBP, myelin basic protein, 髓鞘碱性蛋白, AChR, acetylcholine receptor, 乙酰胆碱受体

多发性硬化患者缓解期如果并发感染,尤其是病毒感染可使病情复发。其机制与“分子模拟学说”相关,即病毒的某些成分与髓鞘碱性蛋白等髓鞘结构相似,诱发针对中枢神经系统的免疫攻击,这是由于自身抗原致敏的 T 细胞在一定条件下分泌细胞因子所致。本研究多发性硬化组患者外周血单个核细胞髓鞘碱性蛋白特异性分泌 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  水平明显高于正常对照组和其他非免疫性神经疾病组,与“分子模拟学说”相关。2000 年, Rohowsky-Kochan 等<sup>[9]</sup>采用有限稀释法从多发性硬化患者外周血中分离获得 T 细胞克隆,其髓鞘碱性蛋白自身反应性 T 细胞数目与正常对照组相似,但外周血 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 mRNA 表达水平明显升高。对本研究多发性硬化患者病程不同阶段(急性

**表 2** 各组受试者在自分泌和外源性抗原刺激下外周血 IL-10 分泌水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , 斑点数/ $200 \times 10^3$  PBMC)\*

**Table 2.** Comparison of IL-10 levels of spontaneous and stimulated secretion in different groups ( $\bar{x} \pm s$ , blot number/ $200 \times 10^3$  PBMC)\*

Group	N	Spontaneous secretion	ConA	MBP	AChR
Control (1)	16	6.31 ± 1.21	12.09 ± 2.39	5.57 ± 2.05	8.11 ± 1.67
MS (2)	36	7.28 ± 2.47	11.10 ± 3.56	11.19 ± 3.91	7.53 ± 2.25
OND (3)	16	7.04 ± 1.78	13.40 ± 2.54	5.07 ± 3.39	7.80 ± 2.04
<i>H</i> or <i>F</i> value		6.079	8.767	48.497	0.773
<i>P</i> value		0.048	0.012	0.000	0.464

**表 4** 各组受试者在自分泌和外源性抗原刺激下外周血 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  分泌水平的两两比较(*P* 值)

**Table 4.** Paired comparison of IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  levels of spontaneous and stimulated secretion in different groups (*P* value)

Paired comparison	Spontaneous secretion	ConA	MBP	AChR
IL-4				
(1) : (2)	0.379	0.000	0.000	0.326
(2) : (3)	0.172	0.000	0.000	0.995
IL-10				
(1) : (2)	0.089	0.430	0.000	0.651
(2) : (3)	0.990	0.007	0.000	1.000
IFN- $\gamma$				
(1) : (2)	0.000	0.000	0.000	0.087
(2) : (3)	0.000	0.000	0.000	0.898

IL-4, interleukin-4, 白细胞介素-4; IL-10, interleukin-10, 白细胞介素-10; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ , 干扰素- $\gamma$ ; ConA, concanavalin A, 刀豆蛋白 A; MBP, myelin basic protein, 髓鞘碱性蛋白, AChR, acetylcholine receptor, 乙酰胆碱受体

发作期或加重期及稳定期)髓鞘碱性蛋白特异性分泌细胞因子水平的观察发现,髓鞘碱性蛋白特异性分泌 IL-4 和 IL-10 T 细胞数目无明显差异,而急性发作期或加重期特异性分泌 IFN- $\gamma$  T 细胞数目明显高于稳定期,证实 IFN- $\gamma$  分泌水平与多发性硬化残疾程度存在相关性<sup>[10-11]</sup>。表明多发性硬化患者外周血 Th1 和 Th2 细胞对髓鞘碱性蛋白反应性增高,当疾病复发时,髓鞘碱性蛋白特异性 Th1 细胞功能紊乱先于 Th2 细胞。因此,监测外周血 IL-4 和 IL-10 分泌变化,有助于了解病情进展并判断疗效。目前临床常用的修正治疗方法是通过不同细胞因子发挥作用。例如,经干扰素- $\beta$ (IFN- $\beta$ )治疗后血清 IL-4 分泌水平仅于治疗早期发生变化,而治疗 1 年后 IL-10 分泌水平明显升高<sup>[12]</sup>。此外,IFN- $\beta$  治疗期间(2 个月

**表 5** 多发性硬化组患者在病程不同阶段外周血髓鞘碱性蛋白特异性细胞因子分泌水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , 斑点数/ $200 \times 10^3$  PBMC)

**Table 5.** Comparison of MBP specific cytokines in the peripheral blood in different phases of MS ( $\bar{x} \pm s$ , blot number/ $200 \times 10^3$  PBMC)

Disease phase	N	IL-4	IL-10	IFN- $\gamma$
Acute or exacerbating phase	20	0.28 $\pm$ 0.14	10.65 $\pm$ 3.64	5.82 $\pm$ 1.83
Stable phase	13	2.66 $\pm$ 1.68	12.37 $\pm$ 4.80	1.46 $\pm$ 0.87
<i>t</i> value		2.271	0.870	8.070
<i>P</i> value		0.185	0.206	0.002

IL-4, interleukin-4, 白细胞介素-4; IL-10, interleukin-10, 白细胞介素-10; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ , 干扰素- $\gamma$

内)血清 IFN- $\gamma$ 呈低分泌者可能更倾向于未来复发次数减少<sup>[13]</sup>。

Uysal 等<sup>[14]</sup>采用 ELISA 法对多发性硬化患者进行检测,未发现血清 IFN- $\gamma$ 分泌水平显著异常,推测可能与其所纳入的病例未进行临床分期有关。本研究结果显示,多发性硬化患者急性发作期或加重期血清 IFN- $\gamma$ 分泌水平显著升高,而至稳定期则无此种改变。最近一项针对复发-缓解型多发性硬化(RRMS)患者开展的前瞻性临床研究结果显示,血清 IFN- $\gamma$ 分泌水平升高与多发性硬化复发存在相关性,而 IL-10 和 IL-4 则不具有这种关联性<sup>[15-16]</sup>。Hidaka 等<sup>[17]</sup>的研究显示,中枢神经系统脱髓鞘病变患者外周血 IFN- $\gamma$ 分泌水平升高,亦表明 IFN- $\gamma$ 与多发性的复发存在相关性。本研究结果显示,在自分泌状态下,多发性硬化组患者外周血 IL-10 分泌水平接近正常值范围,经有丝分裂原刀豆蛋白 A 刺激后,其分泌 IL-10 的能力明显降低并低于其他非免疫性神经疾病组。推测可能与多发性硬化发病后 IL-10 表达降低<sup>[18]</sup>或体内存在大量 IFN- $\gamma$ 有关。Bsibsi 等<sup>[19]</sup>经体外模型研究发现,小胶质细胞和巨噬细胞经 IFN- $\gamma$ 诱导后即丧失分泌 IL-10 的能力。目前,药物治疗起效途径之一,即是促 IL-10 分泌,例如芬戈莫德<sup>[20]</sup>。不同药物导致 Th2 细胞分泌抗炎性因子的能力略有区别,如格拉默比那他珠单抗具有促 Th2 细胞分泌抗炎性因子之功效<sup>[21]</sup>。妊娠期女性随着外周血雌激素水平的升高,临床症状改善,亦伴随更多的 IL-10 分泌<sup>[22]</sup>。然而,即使是处于缓解期的患者,其体内炎症因子和抗炎性因子也呈现出一定的分泌形态并影响和调节疾病进展<sup>[16]</sup>。

与常用的 ELISA 法相比,ELISPOT 法具有进一

步明确分泌细胞因子的特异性抗原之作用。例如,多发性硬化患者外周血 T 细胞特异性抗原为髓鞘碱性蛋白,对乙酰胆碱受体不产生特异性反应;而重症肌无力患者则对乙酰胆碱受体具有特异性反应,而对髓鞘碱性蛋白无特异性反应。虽然,多发性硬化可能与其他自身免疫性疾病共存,但仍可根据髓鞘碱性蛋白特异性细胞因子之分泌变化,对二者进行鉴别诊断,尤其是在多发性硬化早期。由于人类外周血单个核细胞数目较少,ELISPOT 法所需血液标本约达 10 ml 以上,使其临床推广受限。目前,一种基于 ELISPOT 技术的新方法仅需 150  $\mu$ l 血液标本,将有助于扩大检测人群<sup>[23]</sup>。

#### 参 考 文 献

- [1] Xu XH. Multiple sclerosis//Xu XH. Neuroimmunology. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2000: 210-236.[许贤豪. 多发性硬化//许贤豪. 神经免疫学. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2000: 210-236.]
- [2] Sedgwick JD, Holt PG. A solid - phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody - secreting cells. J Immunol Methods, 1983, 57(1-3):301-309.
- [3] Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid - phase enzyme - linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. J Immunol Methods, 1983, 65:109-121.
- [4] Sedgwick JD. ELISPOT assay: a personal retrospective. Methods Mol Biol, 2005, 302:3-14.
- [5] Hellings N, Barée M, Verhoeven C, D'hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, Raus J, Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. J Neurosci Res, 2001, 63:290-302.
- [6] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17 - producing CD4 + effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol, 2005, 6:1123-1132.
- [7] Zhang XH. Clinical diagnosis of multiple sclerosis. Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2012, 12:122-126.[张星虎. 多发性的临床诊断. 中国现代神经疾病杂志, 2012, 12: 122-126.]
- [8] Weiner HL, Ellison GW. A working protocol to be used as a guideline for trials in multiple sclerosis. Arch Neurol, 1983, 40: 704-710.
- [9] Rohowsky-Kochan C, Molinaro D, Cook SD. Cytokine secretion profile of myelin basic protein - specific T cells in multiple sclerosis. Mul Scler, 2000, 6:69-77.
- [10] Sepulcre J, Sanchez - Ibarrola A, Moreno C, de Castro P. Association between peripheral IFN-gamma producing CD8+T-cells and disability score in relapsing - remitting multiple sclerosis. Cytokine, 2005, 32:111-116.
- [11] Moldovan IR, Rudick RA, Cotleur AC, Born SE, Lee JC, Karafa MT, Pelfrey CM. Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. J Neuroimmunol, 2003, 141:132-140.
- [12] Kvarnström M, Ydrefors J, Ekerfelt C, Vrethem M, Emerudh J. Longitudinal interferon -  $\beta$  effects in multiple sclerosis: differential regulation of IL-10 and IL-17A, while no sustained

- effects on IFN- $\gamma$ , IL-4 or IL-13. *J Neurol Sci*, 2013, 325:79-85.
- [13] Petek-Balci B, Coban A, Shugaiv E, Türkoglu R, Ulusoy C, İçöz S, Pehlivan M, Tüzün E, Akman - Demir G, Kürtüncü M, Eraksoy M. Predictive value of early serum cytokine changes on long-term interferon beta-1a efficacy in multiple sclerosis. *Int J Neurosci*, 2014. [Epub ahead of print]
- [14] Uysal S, Meriç Yılmaz F, Bogdaycioglu N, Mungan Öztürk S, Ak F. Increased serum levels of some inflammatory markers in patients with multiple sclerosis. *Minerva Med*, 2014, 105:229-235.
- [15] Simpson S Jr, Stewart N, van der Mei I, Otahal P, Charlesworth J, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T, Pittas F, Gies P, Taylor B. Stimulated PBMC-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are associated with altered relapse risk in multiple sclerosis: results from a prospective cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014. [Epub ahead of print]
- [16] Kallaur AP, Oliveira SR, Colado Simão AN, Delicato de Almeida ER, Kaminami Morimoto H, Lopes J, de Carvalho Jennings Pereira WL, Marques Andrade R, Muliterno Pelegrino L, Donizete Borelli S, Kaimen-Maciel DR, Reiche EM. Cytokine profile in relapsing remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Mol Med Rep*, 2013, 7:1010-1020.
- [17] Hidaka Y, Inaba Y, Matsuda K, Itoh M, Kaneyama T, Nakazawa Y, Koh CS, Ichikawa M. Cytokine production profiles in chronic relapsing - remitting experimental autoimmune encephalomyelitis: IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are important participants in the first attack but not in the relapse. *J Neurol Sci*, 2014, 340:117-122.
- [18] Glasnovic A, Cvija H, Stojic M, Tudoric - Deno I, Ivcevic S, Romic D, Ticinovic N, Vuletic V, Lazibat I, Greivic D. Decreased level of sRAGE in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients at clinical onset. *Neuroimmunomodulation*, 2014, 21:226-233.
- [19] Bsibi M, Peferoen LA, Holtman IR, Nacken PJ, Gerritsen WH, Witte ME, van Horsen J, Eggen BJ, van der Valk P, Amor S, van Noort JM. Demyelination during multiple sclerosis is associated with combined activation of microglia/macrophages by IFN- $\gamma$  and alpha B-crystallin. *Acta Neuropathol*, 2014, 128: 215-229.
- [20] Miyazaki Y, Niino M, Fukazawa T, Takahashi E, Nonaka T, Amino I, Tashiro J, Minami N, Fujiki N, Doi S, Kikuchi S. Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, based on altered proportions of B-cell subpopulations. *Clin Immunol*, 2014, 151:127-135.
- [21] Oreja - Guevara C, Ramos - Cejudo J, Aroeira LS, Chamorro B, Diez - Tejedor E. TH1/TH2 cytokine profile in relapsing - remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. *BMC Neurol*, 2012. [Epub ahead of print]
- [22] Javadian A, Salehi E, Bidad K, Sahraian MA, Izad M. Effect of estrogen on Th1, Th2 and Th17 cytokines production by proteolipid protein and PHA activated peripheral blood mononuclear cells isolated from multiple sclerosis patients. *Arch Med Res*, 2014, 45:177-182.
- [23] Kuerten S, Rottlaender A, Rodi M, Velasco VB Jr, Schroeter M, Kaiser C, Addicks K, Tary - Lehmann M, Lehmann PV. The clinical course of EAE is reflected by the dynamics of the neuroantigen - specific T cell compartment in the blood. *Clin Immunol*, 2010, 137:422-432.

(收稿日期:2014-08-11)

## · 小词典 ·

## 中英文对照名词词汇(四)

- 巨噬细胞集落刺激因子  
macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)
- 巨噬细胞炎性蛋白-1  
macrophage inflammatory protein-1(MIP-1)
- 抗原呈递细胞 antigen-presenting cell(APC)
- 扩展残疾状态量表 Expanded Disability Status Scale(EDSS)
- 朗格汉斯细胞组织细胞增生症  
Langerhans cell histiocytosis(LCH)
- 类风湿性关节炎 rheumatoid arthritis(RA)
- 粒细胞集落刺激因子  
granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)
- 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子  
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)
- 裂隙脑室综合征 slit ventricle syndrome(SVS)
- 临床孤立综合征 clinically isolated syndrome(CIS)
- 临床绝对评分 Clinical Absolute Score(CAS)
- 临床相对评分 Clinical Relative Score(CRS)
- 淋巴细胞性垂体炎 lymphocytic hypophysitis(LYH)
- 1-磷酸鞘氨醇 sphingosine-1-phosphate(S1P)
- 磷脂氧化产物 oxidation products of phospholipids(oxPAPC)
- 硫代巴比妥酸 thiobarbituric acid(TBA)
- 硫代巴比妥酸反应物  
thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)
- 滤泡辅助性T细胞 T follicular helper cell(Tfh)
- 卵泡刺激素 follicle stimulating hormone(FSH)
- 慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病  
chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy  
(CIDP)
- 酶联免疫斑点试验  
enzyme-linked immunospot assay(ELISPOT)
- 酶联免疫吸附试验  
enzyme-linked immunsorbent assay(ELISA)
- 美国国家胆固醇教育计划成人高胆固醇血症评价和  
治疗专家委员会第3次报告  
National Cholesterol Education Programme Adult Treatment  
Panel III(NCEP ATP III)
- 美国国立卫生研究院卒中量表  
National Institute of Health Stroke Scale(NIHSS)
- 美国食品与药品管理局  
Food and Drug Administration(FDA)
- 美国重症肌无力基金会  
Myasthenia Gravis Foundation of America(MGFA)