

重症肌无力患者外周血 Th17 细胞及其相关细胞因子表达研究

高雨菡 金海强 郝洪军 孙永安 高枫

【摘要】 目的 研究重症肌无力患者外周血辅助性 T 细胞 17(Th17)及其相关细胞因子水平,探讨其与血清抗乙酰胆碱受体(AChR)抗体水平的相关性。方法 纳入 2016 年 9 月至 2017 年 12 月共 30 例初诊重症肌无力患者,眼肌型(OMG)16 例、全身型(GMG)14 例。流式细胞术检测外周血单个核细胞 Th17 细胞比例,实时定量聚合酶链反应检测 Th17 细胞标志性细胞因子白细胞介素-17A(IL-17A)及其相关转录因子维 A 酸相关孤儿受体 γ (ROR γ)mRNA 水平,酶联免疫吸附试验检测血浆 IL-17A、IL-6、IL-23 和抗 AChR 抗体水平。结果 与正常对照组相比,GMG 组和 OMG 组外周血 Th17 细胞比例($t = -3.312, P = 0.002; t = -2.286, P = 0.030$)及其相关转录因子 ROR γ mRNA 表达水平($t = 4.408, P = 0.001; t = 1.991, P = 0.049$),以及 IL-17A 水平($t = -4.282, P = 0.004; t = -2.788, P = 0.007$)均高于正常对照组;GMG 组 IL-23 水平亦高于正常对照组($t = -2.267, P = 0.031$)。重症肌无力患者外周血 Th17 细胞比例及血浆 IL-17A 水平与血清抗 AChR 抗体水平呈正相关($r = 0.851, P = 0.012; r = 0.743, P = 0.025$)。结论 重症肌无力患者外周血 Th17 细胞数目增加、血浆 IL-17A 表达水平升高,可能是导致重症肌无力发生与发展的重要原因,二者之间关系尚待进一步研究加以证实。

【关键词】 重症肌无力; T 淋巴细胞; 白细胞介素类; 逆转录聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定

Study of circulating Th17 cells and associated cytokines in myasthenia gravis

GAO Yu-han¹, JIN Hai-qiang², HAO Hong-jun², SUN Yong-an², GAO Feng²

¹Department of Transfusion, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

²Department of Neurology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Corresponding author: GAO Feng (Email: gaofh2011@126.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of helper T cell 17 (Th17) cells and associated cytokines in patients with myasthenia gravis (MG) and its correlations to the level of anti-acetylcholine receptor (AChR) antibodies. **Methods** Thirty patients with MG including 16 patients with ocular myasthenia gravis (OMG) and 14 patients with general myasthenia gravis (GMG) were enrolled in the study from September 2016 to December 2017. Flow cytometry was used to calculate the percentage of circulating Th17 cells in the peripheral blood mononuclear cell (PBMC). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examine the expression of interleukin-17A (IL-17A) retinoid-related orphan receptor γ (ROR γ) mRNA. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect IL-17A, IL-6, IL-23 and anti-AChR antibodies. **Results** The percentage of circulating Th17 cells ($t = -3.312, P = 0.002; t = -2.286, P = 0.030$), the expression of the IL-17A level ($t = -4.282, P = 0.004; t = -2.788, P = 0.007$) and ROR γ mRNA ($t = 4.408, P = 0.001; t = 1.991, P = 0.049$) in GMG and OMG group were higher than those in control group with statistical significance. IL-23 was also higher in the GMG group than that in the control group ($t = -2.267, P = 0.031$). The percentage of Th17 and level of IL-17A were positively correlated with the anti-AChR antibodies ($r = 0.851, P = 0.012; r = 0.743, P = 0.025$; respectively). **Conclusions** The high level of Th17 cells and IL-17A may be closely related to the

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.10.014

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:31700767)

作者单位:100044 北京大学人民医院输血科(高雨菡);100034 北京大学第一医院神经内科(金海强,郝洪军,孙永安,高枫)

通讯作者:高枫,Email:gaofh2011@126.com

etiology of MG. It must be verified in the future.

【Key words】 Myasthenia gravis; T-lymphocytes; Interleukins; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

This study was supported by the National Natural Sciences Foundation for Young Scientists of China (No. 31700767).

Conflicts of interest: none declared

重症肌无力(MG)是一种T淋巴细胞依赖、抗体介导的获得性自身免疫性疾病,主要由抗乙酰胆碱受体(AChR)抗体介导引起的神经肌肉接头(NMJ)传递障碍^[1-2]。根据美国重症肌无力基金会(MGFA)公布的分类标准,可分为单纯眼肌受累的眼肌型(OMG)和全身肌肉受累的全身型(GMG),其中,80%~85%的全身型患者和50%的眼肌型患者血清抗AChR抗体滴度升高^[3-4]。近年研究发现,辅助性T细胞(Th)功能异常在重症肌无力发病机制中起重要作用。Th17细胞是近期发现的功能性辅助性T细胞,其所分泌的细胞因子如白细胞介素-17A(IL-17A)、IL-21和IL-22等能够通过趋化中性粒细胞,促进性因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等的分泌,进而促进炎症反应^[5-6]。IL-6和IL-23具有促进Th17细胞增殖及存活的作用,是Th17细胞分化不可或缺的细胞因子^[7-8],而维A酸相关孤儿受体 γ (ROR γ)则是Th17细胞分化的关键性转录因子^[9]。相关研究表明,重症肌无力尤其是合并胸腺瘤的患者,血清Th17细胞及其所分泌的细胞因子IL-17A水平明显升高,提示Th17细胞可能参与重症肌无力的病理生理学机制^[5-6,10-12],但目前尚存争议。本研究以初诊重症肌无力患者作为观察对象,分别通过流式细胞术检测其外周血Th17细胞比例、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测Th17细胞相关细胞因子IL-17A及其转录因子ROR γ mRNA的表达变化、酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆IL-17A、IL-6和IL-23水平,同时进行外周血Th17细胞比例与其抗AChR抗体滴度间关系分析,以探讨Th17细胞及其细胞因子在重症肌无力发病机制中的作用。

对象与方法

一、研究对象

1. 纳入标准 (1)均符合2015年中华医学会神经病学分会神经免疫学组和中国免疫学会神经免疫学分会发布的《中国重症肌无力诊断和治疗指南2015》中重症肌无力的诊断标准^[13]。(2)根据重症肌

无力的典型临床表现、新斯的明试验和重复神经电刺激(RNS)检查结果,由两位以上神经内科医师确诊。(3)年龄>18岁。(4)本研究经北京大学第一医院道德伦理委员会审核批准,患者或其家属对观察项目知情并签署知情同意书。

2. 排除标准 (1)妊娠期女性。(2)既往曾接受免疫抑制剂或糖皮质激素治疗的患者。(3)既往曾罹患免疫性疾病或肿瘤的患者。

3. 一般资料 入组患者均为2016年9月至2017年12月在我院神经内科门诊初诊或住院治疗并确诊的重症肌无力患者共30例,男性13例、女性17例,年龄为27~69岁、平均(46 \pm 15)岁;其中眼肌型(OMG组)16例,男性7例、女性9例,年龄为27~65岁、平均(43 \pm 12)岁;全身型(GMG组)14例,男性6例、女性8例,年龄为31~69岁、平均为(47 \pm 10)岁。以我院体检中心近期无感染或自身免疫性疾病病史的健康志愿者作为正常对照,共30例受试者,男性16例、女性14例,年龄为25~65岁、平均(42 \pm 14)岁。MG组与正常对照组受试者性别($\chi^2=0.601, P=0.438$)、年龄($t=1.029, P=0.308$)比较,差异无统计学意义,均衡可比。

二、研究方法

1. 试剂与仪器 (1)主要试剂:本研究所用流式抗体均为荧光抗体(I抗),包括别藻蓝蛋白(APC)标记的抗人CD4单克隆抗体(批号:560251,1:400)和藻红蛋白(PE)标记的抗人IL-17A单克隆抗体(批号:560436,1:200)购自美国BD Biosciences公司;含I抗[IL-17A(批号:#88-7176-22,100 μ l)、IL-6(批号:#88-7066-22,100 μ l)和IL-23(批号:#BMS2023-3,50 μ l)]的ELISA试剂盒及四甲基联苯胺(TMB)由美国eBioscience公司提供;含抗AChR抗体的ELISA试剂盒为欧蒙(杭州)医学实验诊断有限公司产品。离子霉素(批号:407952)、佛波酯(PMA,批号:A7080)和莫能霉素(批号:475897)为美国Sigma-Aldrich公司产品;Ficoll人淋巴细胞分离液(批号:F2637)、Trizol提取液(批号:15596018)和

细胞破膜固定试剂(批号:554714)分别购自美国 Sigma-Aldrich、Invitrogen 和 BD Biosciences 公司。RT-PCR 试剂盒(批号:12595025)由美国 Thermo 公司提供。(2)主要仪器:Gallios 流式细胞仪及分析软件购自美国 Beckman Coulter 公司,iMark 酶标仪(批号:#1681135,准确度:0.010 OD,精确度:0.005 OD,分辨率:0.001 OD)购自美国 Bio-Rad 公司,5810 型离心机(转鼓直径:200 mm,转速:14 000 r/min)购自德国 Eppendorf 公司。

2. 流式细胞术检测 Th17 细胞比例 抽取受试者肘静脉血 15 ml, Ficoll 密度梯度离心法以转速 2000 r/min 高速离心 25 min, 分离外周血单个核细胞(PBMC)制备细胞悬液。血浆置于 1.50 ml EP 管中, -80 °C 保存; PBMC 密度调至 2×10^6 个/ml, 分别滴加佛波酯(50 ng/ml)、离子霉素(1 μ g/ml)及莫能霉素(2 μ mol/L), 置于 37 °C、体积分数 5% 的二氧化碳细胞培养箱内孵育 6 h; 流式管收集细胞, 滴加 50 μ l APC-抗人 CD4 抗体混匀, 4 °C 避光孵育 30 min 后以 1500 r/min 高速离心 5 min; 加入破膜固定液固定细胞 10 min, 洗涤离心后滴加 50 μ l PE-抗人 IL-17A 抗体混匀, 4 °C 避光孵育 30 min, 洗涤后流式细胞术检测 CD4⁺IL-17A⁺细胞在 CD4⁺细胞中所占百分比。

3. 荧光定量 RT-PCR 法检测 Th17 相关细胞因子 mRNA 转录水平 Trizol 法提取单个核细胞 RNA, 于 2×10^6 个 PBMC 中加入 1 ml Trizol, 室温静置 5 min, 加入 0.20 ml 氯仿, 剧烈摇动 30 s, 室温静置 10 min, 12 000 r/min 高速离心 15 min, 取上层水相, 再加入 0.50 ml 异丙醇, 室温静置 10 min, 12 000 r/min 高速离心 15 min; 弃上清液, 沉淀获得 RNA。以无 RNase 水溶解 RNA, -20 °C 冻存备用; 按照试剂盒说明书要求, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 荧光定量 RT-PCR 法检测各组 PBMC IL-17A 和 ROR γ mRNA 转录水平, 以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照物。IL-17A 正向引物序列: 5'-AATTCTGAGGACAAGAACTTCCC-3', 反向引物序列: 5'-ATAGTCTAACTGCTTTGGGACTG-3'; ROR γ 正向引物序列: 5'-GCTGTCATCTTGCCAGAAC-3', 反向引物序列: 5'-CTGCCATCATTGCTGTTAATCC-3'; β -actin 正向引物序列: 5'-CTGTCCACCTCCAGCAGATGT-3', 反向引物序列: 5'-CGCAACTAAGTCATAGTCCGCC-3'。以目的基因 mRNA 表达量与内参基因表达量之比值作为其 mRNA 转录水平。RT-PCR 反应条件

为: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 10 s(共 40 个循环); 72 °C 10 min。

4. ELISA 法检测血浆相关细胞因子及其抗体水平 (1)IL-17A、IL-6 和 IL-23 检测: 前期冻存的血浆标本于 4 °C 解冻, ELISA 双抗体夹心法检测 IL-17A、IL-6 和 IL-23 表达水平。于 96 孔平底板中分别加入包被抗体(I 抗), 4 °C 孵育过夜, 含 0.05% Tween20 的磷酸盐缓冲液冲洗($\times 3$ 次), 滴加标准品或经磷酸盐缓冲液稀释后的血浆标本, 37 °C 孵育 2 h; PBST 洗涤($\times 5$ 次), 滴加生物素标记的抗人 IL-17A、IL-6 和 IL-23 IgG II 抗, 37 °C 孵育 2 h; 磷酸盐缓冲液冲洗($\times 5$ 次)、滴加亲和素辣根过氧化物酶(HRP) 37 °C 孵育 2 h; 磷酸盐缓冲液冲洗($\times 5$ 次), 滴加 TMB 底物缓冲液避光孵育 20~30 min, 2 mol/L 硫酸终止液终止反应。(2)抗 AChR 抗体检测: 于含有 AChR 的微孔板中加入血浆, 37 °C 孵育 2 h, 清洗缓冲液冲洗($\times 5$ 次)、滴加辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG, 37 °C 孵育 1 h, 清洗缓冲液冲洗($\times 5$ 次)、滴加 TMB/过氧化氢(H₂O₂)底物液室温放置 15 min, 滴加 0.50 mol/L 硫酸终止液。于 iMark 酶标仪 450 nm 处读取各样品光密度值(OD 值), 参照标准曲线计算血浆 IL-17A、IL-6 和 IL-23 表达水平。

5. 统计分析方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理与分析, 统计学数据正态性检验采用 Kolmogorov-Smirnov 检验方法进行正态性检验, 所有统计数据均符合正态分布(均 $P > 0.05$)。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析, 不同组间的两两比较行 LSD- t 检验; 外周血 Th17 细胞比例、血浆 IL-17A 水平与其抗 AChR 抗体水平的相关性采用 Pearson 相关分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

经流式细胞术检测, 各组受试者外周血 Th17 细胞在 CD4⁺细胞中所占比例分别为 GMG 组(2.29 \pm 0.30)%、OMG 组(1.82 \pm 0.28)%、正常对照组(1.23 \pm 0.11)% , 组间差异具有统计学意义($F = 7.083, P = 0.002$); 其中, GMG 组($t = -3.312, P = 0.002$)和 OMG 组($t = -2.286, P = 0.030$) Th17 细胞比例高于正常对照组, 而 GMG 组与 OMG 组之间差异无统计学意义($t = 1.173, P = 0.247$)。

ELISA 法检测结果显示, GMG 组和 OMG 组患者血浆 IL-17A 表达水平与正常对照组之间差异有统

表 1 各组受试者血浆 IL-17A 表达水平及外周血 IL-17A mRNA 转录水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The analysis of plasma IL-17A level and IL-17A mRNA expression in PBMC among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-17A(pg/ml)	IL-17A mRNA
正常对照组(1)	20.81 ± 2.51	14.18 ± 1.94
GMG 组(2)	34.45 ± 1.68	26.74 ± 2.81
OMG 组(3)	31.00 ± 5.26	22.14 ± 3.16
F 值	6.441	6.364
P 值	0.003	0.005

IL-17A, interleukin-17A, 白细胞介素-17A; GMG, general myasthenia gravis, 全身型重症肌无力; OMG, ocular myasthenia gravis, 眼肌型重症肌无力

表 3 各组受试者外周血 ROR γ mRNA 和血浆 IL-6、IL-23 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Comparison of ROR γ mRNA level in PBMC and plasma IL-6 and IL-23 level among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6(pg/ml)	IL-23(pg/ml)	ROR γ mRNA
正常对照组(1)	24.73 ± 1.76	198.94 ± 41.33	0.91 ± 0.14
GMG 组(2)	28.85 ± 3.85	364.82 ± 59.27	2.01 ± 0.22
OMG 组(3)	24.91 ± 3.73	329.35 ± 47.24	1.37 ± 0.19
F 值	0.629	3.550	9.814
P 值	0.537	0.038	0.001

IL-6, interleukin-6, 白细胞介素-6; IL-23, interleukin-23, 白细胞介素-23; ROR γ , retinoid-related orphan receptor γ , 维 A 酸相关孤儿受体 γ ; GMG, general myasthenia gravis, 全身型重症肌无力; OMG, ocular myasthenia gravis, 眼肌型重症肌无力

学意义($P = 0.003$); GMG 组($P = 0.004$)和 OMG 组($P = 0.007$)IL-17A 表达水平高于正常对照组, 但 GMG 组与 OMG 组之间差异无统计学意义($P = 0.572$; 表 1, 2)。荧光定量 RT-PCR 法检测 IL-17A mRNA 转录水平, GMG 组、OMG 组与正常对照组之间差异有统计学意义($P = 0.005$); GMG 组($P = 0.001$)和 OMG 组($P = 0.035$)PBMC IL-17A mRNA 转录水平均高于正常对照组, 但 GMG 组与 OMG 组间差异无统计学意义($P = 0.289$; 表 1, 2)。

荧光定量 RT-PCR 法检测, 各组受试者 PBMC ROR γ mRNA 转录水平差异亦有统计学意义($P = 0.001$); 其中 GMG 组($P = 0.001$)和 OMG 组($P = 0.049$)转录水平高于正常对照组, 而 OMG 组转录水平略低于 GMG 组($P = 0.050$)。ELISA 法显示, GMG 组($P = 0.276$)和 OMG 组($P = 0.960$)患者血浆 IL-6 表达水平与正常对照组之间差异无统计学意义; GMG 组患者血浆 IL-23 表达水平高于正常对照组($P = 0.031$), 但 OMG 组与 GMG 组之间差异无统计学意义($P = 0.642$; 表 3, 4)。

表 2 各组受试者血浆 IL-17A 及外周血 IL-17A mRNA 转录水平的两两比较

Table 2. Pairwise comparison of plasma IL-17A level and IL-17A mRNA expression in PBMC among 3 groups

组间两两较	IL-17A		IL-17A mRNA	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) (2)	-4.282	0.004	3.681	0.001
(1) (3)	-1.915	0.007	2.252	0.035
(2) (3)	0.703	0.572	1.089	0.289

IL-17A, interleukin-17A, 白细胞介素-17A

表 4 各组受试者外周血 ROR γ mRNA 及血浆 IL-6、IL-23 表达水平的两两比较

Table 4. Pairwise comparison of ROR γ mRNA level in PBMC and plasma IL-6 and IL-23 level among 3 groups

组间两两较	IL-6		IL-23		ROR γ mRNA	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) (2)	-0.690	0.276	-2.267	0.031	4.408	0.001
(1) (3)	-0.050	0.960	-1.813	0.062	1.991	0.049
(2) (3)	0.439	0.473	0.473	0.642	2.107	0.050

IL-6, interleukin-6, 白细胞介素-6; IL-23, interleukin-23, 白细胞介素-23; ROR γ , retinoid-related orphan receptor γ , 维 A 酸相关孤儿受体 γ

ELISA 法显示, MG 组患者外周血抗 AChR 抗体阳性率($OD > 0.625$)为 93.33%(28/30), 且抗 AChR 抗体滴度(0.88 ± 0.03)与 Th17 细胞在 CD4⁺ 细胞所占比例($r = 0.851, P = 0.012$)和血浆 IL-17A 表达水平($r = 0.743, P = 0.025$)呈正相关; 正常对照组受试者外周血抗 AChR 抗体均呈阴性。

讨 论

重症肌无力是以胸腺为靶器官的自身免疫性疾病, 越来越多的研究证实细胞免疫紊乱参与重症肌无力的发病机制^[1]。Th17 细胞是一种功能性辅助性 T 细胞, IL-17A 为其标志性细胞因子, 前者参与多种自身免疫性疾病的病理过程, 如克罗恩病、系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化(MS)等^[14-17], 然而至今对 Th17 细胞在重症肌无力发病机制中的作用尚未完全阐明。

实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)研究发现, 模型动物外周血 Th17 细胞比例和血浆 IL-17A 水平均明显高于正常对照水平^[18], 但该结论在临床研

究中尚存争议。例如, Masuda 等^[19]的观察结果即未得出重症肌无力患者外周血 Th17 细胞比例高于正常对照者的结论。而在 Roche 等^[20]所观察的重症肌无力病例中, 仅 GMG 型患者外周血 Th17 细胞比例增加, 并与正常对照组和 OMG 组之间存在差异, OMG 组则未获得阳性结果。对本组 30 例重症肌无力患者的观察显示, 其外周血 Th17 细胞比例约为正常对照组的 2 倍, 同时转录因子 ROR γ mRNA 表达水平亦明显升高; 但 GMG 组与 OMG 组之间, 虽然前者 ROR γ mRNA 转录水平略有增加, 但两组 Th17 细胞比例并无明显差异, 笔者认为, 可能与所纳入的样本量较小有关。作为 Th17 细胞的标志性细胞因子, IL-17A 可与上皮细胞和内皮细胞表面 IL-17 受体结合, 从而激活核因子- κ B(NF- κ B)及丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)通路, 以促进炎性因子分泌、趋化中性粒细胞等炎性细胞, 增强炎症反应^[21-22]。本研究还发现, 重症肌无力患者血浆 IL-17A 水平和外周血 IL-17 mRNA 转录水平均明显高于正常对照者, 而不同发病类型(OMG 型或 GMG 型)患者则未出现显著差异。进一步相关分析, 重症肌无力患者外周血 Th17 细胞比例和血浆 IL-17A 表达水平均与血清抗 AChR 抗体滴度呈正相关, 提示 Th17 细胞及其细胞因子 IL-17A 与重症肌无力病情严重程度存在相关性, 可作为观察病情变化的指标之一。

有研究显示, 转化生长因子- β (TGF- β)、IL-6 和 IL-1 β 均为 Th17 细胞分化的始动因子, 启动 Th17 分化过程^[23], 其中 IL-6 主要调控由 TGF- β 诱导的 Th17 细胞和调节性 T 细胞(Treg)之间的平衡, 以抑制 TGF- β 对调节性 T 细胞的诱导功能。在正常情况下, 体内 IL-6 处于较低水平, 幼稚 T 细胞可在 TGF- β 的作用下分化为调节性 T 细胞; 当病原体入侵或自身免疫机制失衡时, 体内 IL-6 水平即明显升高, 在 IL-6 和 TGF- β 的共同作用下, 幼稚 T 细胞分化为 Th17 细胞使调节性 T 细胞分化受抑制^[24]。本研究纳入的重症肌无力患者血浆 IL-6 水平与正常对照者之间并无明显差异, 提示重症肌无力患者体内 Th17 细胞比例升高并非由 IL-6 表达变化所引起, 但是否与血浆 IL-1 β 或 TGF- β 水平变化有关, 尚需提供进一步的临床证据。IL-23 为 Th17 细胞分化所必须的细胞因子, 与 IL-6 不同, 其并不作用于 Th17 细胞分化的起始环节, 而是参与 Th17 细胞的稳定和增殖过程^[25-26]; 因此, IL-23 缺陷并不影响 Th17 细胞的分化与成熟, 而是通过促进已经完成分化的 Th17 细胞

分泌相关细胞因子, 以维持其增殖和稳定。本研究重症肌无力患者血浆 IL-23 水平约为正常对照者的 1.74 倍, 表明其体内细胞因子 IL-23 稳态失衡, IL-23 表达水平升高有利于维持体内 Th17 细胞存活并促进 IL-17A 的分泌, 此即可能是诱发重症肌无力的重要原因之一。

本研究结果提示, 重症肌无力患者外周血 Th17 细胞比例和血浆细胞因子 IL-17A 水平明显高于正常对照者, 而且其外周血 Th17 细胞比例和 IL-17A 水平与血浆抗 AChR 抗体滴度呈正相关, 提示 Th17 细胞表达上调可导致机体免疫稳态失衡, 从而促进疾病的发生与发展。然而, Th17 细胞在重症肌无力发病过程中的具体机制和信号转导通路尚需进一步研究, 以为重症肌无力的诊断与治疗提供新的思路和方法。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D. Myasthenia gravis [J]. *Lancet*, 2001, 357:2122-2128.
- [2] Mantegazza R, Bernasconi P, Cavalcante P. Myasthenia gravis: from autoantibodies to therapy [J]. *Curr Opin Neurol*, 2018, 31: 517-525.
- [3] Newsom-Davis J, Pinching AJ, Vincent A, Wilson SG. Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: investigation by plasma exchange [J]. *Neurology*, 1978, 28:266-272.
- [4] Farrugia ME, Jacob S, Sarrigiannis PG, Kennett RP. Correlating extent of neuromuscular instability with acetylcholine receptor antibodies [J]. *Muscle Nerve*, 2009, 39:489-493.
- [5] Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation [J]. *Immunity*, 2008, 28:454-467.
- [6] Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2017:E3908061.
- [7] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:1910-1914.
- [8] Barrie A, Khare A, Henkel M, Zhang Y, Barmada MM, Duerr R, Ray A. Prostaglandin E2 and IL-23 plus IL-1 β differentially regulate the Th1/Th17 immune response of human CD161(+) CD4(+) memory T cells [J]. *Clin Transl Sci*, 2011, 4: 268-273.
- [9] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126:1121-1133.
- [10] Villegas JA, Van Wassenhove J, Le Panse R, Berrh-Aknin S, Dragin N. An imbalance between regulatory T cells and T helper 17 cells in acetylcholine receptor-positive myasthenia gravis patients [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2018, 1413:154-162.
- [11] Wang Z, Wang W, Chen Y, Wei D. T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma [J].

- Scand J Immunol, 2012, 76:54-61.
- [12] Gradolatto A, Nazzari D, Foti M, Bismuth J, Truffault F, Le Panse R, Berrih - Aknin S. Defects of immunoregulatory mechanisms in myasthenia gravis: role of IL-17 [J]. Ann NY Acad Sci, 2012, 1274:40-47.
- [13] Neuroimmunology Group of Neurology Branch of Chinese Medical Association, Chinese Society of Immunology Neuroimmunology Branch. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of myasthenia gravis 2015 [J]. Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi, 2015, 48:934-940. [中华医学会神经病学分会神经免疫学组, 中国免疫学会神经免疫学分会. 中国重症肌无力诊断和治疗指南 2015 [J]. 中华神经科杂志, 2015, 48:934-940.]
- [14] Ueno A, Jeffery L, Kobayashi T, Hibi T, Ghosh S, Jijon H. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease [J]. J Autoimmun, 2018, 87:38-49.
- [15] Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity [J]. J Autoimmun, 2018, 87:1-15.
- [16] Yamagata T, Skepner J, Yang J. Targeting Th17 effector cytokines for the treatment of autoimmune diseases [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2015, 63:405-414.
- [17] Dige A, Stoy S, Rasmussen TK, Kelsen J, Hvas CL, Sandahl TD, Dahlerup JF, Deleuran B, Agnholt J. Increased levels of circulating Th17 cells in quiescent versus active Crohn's disease [J]. J Crohns Colitis, 2013, 7:248-255.
- [18] Mu L, Sun B, Kong Q, Wang J, Wang G, Zhang S, Wang D, Liu Y, Liu Y, An H, Li H. Disequilibrium of T helper type 1, 2 and 17 cells and regulatory T cells during the development of experimental autoimmune myasthenia gravis [J]. Immunology, 2009, 128(1 Suppl):826-836.
- [19] Masuda M, Matsumoto M, Tanaka S, Nakajima K, Yamada N, Ido N, Ohtsuka T, Nishida M, Hirano T, Utsumi H. Clinical implication of peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients [J]. J Neuroimmunol, 2010, 225:123-131.
- [20] Roche JC, Capablo JL, Larrad L, Gervas - Arruga J, Ara JR, Sanchez A, Alarcia R. Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis [J]. Muscle Nerve, 2011, 44:278-280.
- [21] Whitley SK, Balasubramani A, Zindl CL, Sen R, Shibata Y, Crawford GE, Weathington NM, Hatton RD, Weaver CT. IL-1R signaling promotes STAT3 and NF-kappaB factor recruitment to distal cis-regulatory elements that regulate Il17a/f transcription [J]. J Biol Chem, 2018, 293:15790-15800.
- [22] Tang X, Tian J, Ma J, Wang J, Qi C, Rui K, Wang Y, Xu H, Lu L, Wang S. GITRL modulates the activities of p38 MAPK and STAT3 to promote Th17 cell differentiation in autoimmune arthritis [J]. Oncotarget, 2016, 7:8590-8600.
- [23] Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma [J]. Nat Immunol, 2008, 9:641-649.
- [24] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature, 2006, 441:235-238.
- [25] Hoeve MA, Savage ND, de Boer T, Langenberg DM, de Waal MR, Ottenhoff TH, Verreck FA. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells [J]. Eur J Immunol, 2006, 36:661-670.
- [26] Jain R, Chen Y, Kanno Y, Joyce-Shaikh B, Vahedi G, Hirahara K, Blumenschein WM, Sukumar S, Haines CJ, Sadekova S, McClanahan TK, McGeachy MJ, O'Shea JJ, Cua DJ. Interleukin-23-induced transcription factor blimp-1 promotes pathogenicity of T helper 17 cells [J]. Immunity, 2016, 44:131-142.

(收稿日期:2019-09-07)

《中国现代神经疾病杂志》关于谨防伪造微信采编中心的声明

《中国现代神经疾病杂志》编辑部近期发现伪造本刊微信采编中心的非法行为,微信号 1025282431,昵称麦芽糖,伪造《中国现代神经疾病杂志》采编中心。该微信号以核对作者信息为由,请我刊作者添加其为微信好友,借以窃取相关信息甚至索取审稿费和版面费等,此举对我刊及广大作者、读者造成严重不良影响。

《中国现代神经疾病杂志》特此郑重声明:我刊迄今为止并未建立微信平台的采编中心,作者投稿的唯一途径是登录我刊官方网站 www.xdjb.org,进入“作者在线投稿”界面,按照操作提示提交稿件。稿件经外审通过后,需作者配合修改,达到发表要求后方可待编、排期和刊出,这一过程中编辑部人员与作者之间的联系均采用我刊公共邮箱(xdsjbbzz@263.net.cn)和公用电话[(022)59065611,59065612]。

若遇假冒我刊网站、伪造我刊采编中心、中介、代理等不法事件,欢迎广大作者和读者向我刊提供相关线索!对于以我刊名义从事非法活动的个别网站或微信号,我刊保留通过法律途径解决问题的权利。此声明长期有效,最终解释权归我刊所有。