

重症肌无力患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群表达变化

蒋建华 薛群 刘翠平 方琪 俞立强 张陆陆 蒋觉安

【摘要】 目的 探讨重症肌无力患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群表达变化。**方法** 观察对象均为 2016 年 1 月至 2018 年 12 月住院治疗的重症肌无力患者共 43 例,采用流式细胞术和三色荧光标记法检测其外周血 CD27⁺CD38⁻、CD27⁺CD38⁺、CD27⁻CD38⁺和 CD27⁻CD38⁻B 细胞表达变化。**结果** 与正常对照者相比,重症肌无力患者外周血 CD27⁺CD38⁻和 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例升高($P = 0.000, 0.000$)、CD27⁻CD38⁻B 细胞比例降低($P = 0.001$)。其中,外周血 CD27⁻CD38⁻B 细胞比例,全身型高于眼肌型($P = 0.031$);CD27⁻CD38⁺B 细胞比例,合并胸腺瘤者低于无胸腺异常者($P = 0.026$);CD27⁺CD38⁻和 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例,肌无力危象者高于非肌无力危象者($P = 0.017, 0.011$)。经甲泼尼龙冲击治疗后,QMGS 评分减少($P = 0.012$)、外周血 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例降低($P = 0.034$)、CD27⁻CD38⁻B 细胞比例升高($P = 0.006$);Spearman 秩相关分析,QMGS 评分与外周血 CD27⁻CD38⁻B 细胞比例呈正相关($r_s = 0.394, P = 0.009$)。**结论** 重症肌无力患者外周血中存在具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群,其表达变化与疾病严重程度相关,提示不同表型的 B 细胞亚群可能在重症肌无力的免疫机制和疾病进程中发挥不同作用。

【关键词】 重症肌无力; B 淋巴细胞亚群; 抗原,CD27; 抗原,CD38

Changes of B cell subsets characterized with CD27 and CD38 phenotypes in peripheral blood of myasthenia gravis patients

JIANG Jian-hua¹, XUE Qun¹, LIU Cui-ping², FANG Qi¹, YU Li-qiang³, ZHANG Lu-lu¹, JIANG Jue-an³

¹Department of Neurology, ²Jiangsu Institute of Clinical Immunology, ³Department of General Medicine, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215031, Jiangsu, China

Corresponding author: JIANG Jue-an (Email: jiangjuean@163.com)

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of peripheral B cell subsets with CD27 and CD38 phenotypes in myasthenia gravis (MG) patients. **Methods** Peripheral blood samples of 43 MG patients and 38 healthy controls from January 2016 to December 2018 were collected. Peripheral CD27⁺CD38⁻, CD27⁺CD38⁺, CD27⁻CD38⁺ and CD27⁻CD38⁻B cells were detected through flow cytometer and tricolor fluorescence labeling. **Results** Percentages of CD27⁺CD38⁻ and CD27⁺CD38⁺B cells were increased ($P = 0.000, 0.000$), while percentage of CD27⁻CD38⁺B cells was decreased in MG patients compared with those in controls ($P = 0.001$). The percentage of CD27⁺CD38⁻B cells was higher in generalized GMG patients than that in OMG patients ($P = 0.031$). However, patients with thymoma had lower percentage of CD27⁻CD38⁺B cells than that in patients with normal thymus ($P = 0.026$). CD27⁺CD38⁻ and CD27⁺CD38⁺B cells were enriched in patients with myasthenic crisis compared with patients without crisis ($P = 0.017, 0.011$). In addition, after treatment of methylprednisolone, the Quantitative Myasthenia Gravis Score (QMGS) was decreased ($P = 0.012$), the CD27⁺CD38⁺B cells reduced ($P = 0.034$) and CD27⁻CD38⁻B cells elevated ($P = 0.006$). Meanwhile, percentage of CD27⁻CD38⁻B cells was positively correlated with disease severity in MG patients ($r_s = 0.394, P = 0.009$). **Conclusions** Abnormal changes of B cell

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.11.013

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81873876);江苏省社会发展重点病种规范化诊疗项目(项目编号:BE2016670);苏州大学自然科学基金预研项目(项目编号:SDY2012B25)

作者单位:215031 苏州大学附属第一医院神经内科(蒋建华、薛群、方琪、张陆陆),全科医学科(俞立强、蒋觉安),江苏省临床免疫研究所(刘翠平)

通讯作者:蒋觉安,Email:jiangjuean@163.com

subsets with CD27 and CD38 phenotypes were observed and closely associated with disease severity in MG patients. All of these findings suggested that aberrancy of B cell subsets may be involved in the progression of MG.

【Key words】 Myasthenia gravis; B-lymphocyte subsets; Antigens, CD27; Antigens, CD38

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81873876), the Project of Standardized Diagnosis and Treatment for Key Diseases in Social Development of Jiangsu Province, China (No. BE2016670), and the National Natural Science Foundation of Advanced Research Project of Soochow University (No. SDY2012B25).

Conflicts of interest: none declared

重症肌无力(MG)是免疫炎症反应累及神经肌肉接头(NMJ)所导致的自身免疫性疾病,临床表现为波动性肌无力。而B细胞则在患者的病情进展过程中发挥着重要的病理作用,其与CD4⁺辅助性T细胞(Th)相互作用可分化为浆细胞,产生自身抗体,抗原-抗体反应介导免疫性损伤^[1-2]。在B细胞的分化发育过程中,不同表型B细胞亚群具有不同的生物学特性^[3],如CD27属于肿瘤坏死因子(TNF)超家族受体分子,是记忆性B细胞的表型特征之一^[4];CD38是ADP核糖环化酶家族成员,为浆母细胞和调节性B细胞(Breg)表型特征之一^[5]。本研究采用流式细胞术和三色荧光标记法检测重症肌无力患者外周血CD19⁺B细胞表面CD27⁺和CD38⁺表达变化,以揭示不同表型B细胞亚群的表达变化对机体的影响,并探讨其临床意义。

对象与方法

一、研究对象

1. 纳入标准 本研究所纳入的病例均为新发病例或入组前3个月内未接受激素或免疫抑制剂治疗的患者,且诊断符合《中国重症肌无力诊断和治疗指南2015》^[6]标准。(1)临床表现:眼外肌、咽喉肌、四肢肌群和呼吸肌等特定横纹肌群呈波动性肌无力,即活动后加重、休息后缓解,晨轻暮重,疲劳试验阳性。(2)药理学表现:新斯的明试验阳性。(3)神经电生理学表现:低频重复神经电刺激(RNS)波幅递减>10%和(或)单纤维肌电图颤抖(jitter)增宽。(4)血清学表现:血清抗乙酰胆碱受体(AChR)、肌肉特异性受体酪氨酸激酶(MuSK)抗体阳性。其中,具有重症肌无力临床表现,并兼具新斯的明试验阳性和(或)神经电生理学表现者即可临床诊断为重症肌无力,如果同时血清学表现呈阳性者,则可明确诊断。

2. 排除标准 (1)入组前3个月内曾接受激素、

环磷酰胺等免疫抑制剂或利妥昔单抗等免疫调节药物治疗。(2)合并脑卒中、感染或其他免疫系统疾病如系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎(RA)和肿瘤(除外胸腺肿瘤)等。

3. 一般资料 (1)重症肌无力组(MG组):选择2016年1月至2018年12月在苏州大学附属第一医院神经内科住院治疗的重症肌无力患者共43例,均为汉族,男性16例,女性27例;年龄16~77岁,平均(49.05±16.59)岁;病程15天至30年,中位病程6.00(1.50,26.00)个月;入院时定量重症肌无力评分(QMGS)^[7]2~22分,中位评分7(5,14)分。根据临床表现,全身型(GMG)28例(65.12%)、眼肌型(OMG)15例(34.88%);根据住院期间胸部CT和术后病理学检查,合并胸腺瘤者17例(39.53%)、无胸腺异常者26例(60.47%);住院期间发生肌无力危象者11例(25.58%)、未发生肌无力危象者32例(74.42%)。(2)正常对照组(对照组):选择同期在我院进行体格检查且性别和年龄与MG组相匹配的健康志愿者作为正常对照,所有受试者均符合无自身免疫性疾病、无肿瘤病史或过敏性疾病病史,以及入组前3个月内无感染性疾病病史,未曾接受过激素、免疫抑制剂或其他免疫调节药物治疗的纳入标准。38例受试者均为汉族,男性13例,女性25例;年龄18~78岁,平均(51.29±15.51)岁。两组受试者性别($\chi^2=0.079, P=0.779$)和年龄($t=0.626, P=0.533$)比较,差异无统计学意义,具有可比性。本研究经苏州大学附属第一医院道德伦理委员会审核批准,所有受试者均被告知检测项目和治疗方法,并签署知情同意书。

二、研究方法

1. 治疗方法 (1)药品:甲泼尼龙[500 mg/瓶(批号:H20170199)或40 mg/瓶(批号:H20170197)]、泼尼松[5 mg/片(批号:H31020675)]、免疫球蛋白[质量分数为5%,50 ml,

含免疫球蛋白 2.50 g/瓶(批号:S19993042)],分别购自美国 Pfizer 公司、上海上药信谊药厂有限公司和成都蓉生药业有限责任公司。(2)治疗方案:43 例重症肌无力患者中 29 例予甲泼尼龙冲击治疗方案,先以甲泼尼龙 500 mg/d 连续静脉滴注 3 d,然后剂量减至 80 mg/d 静脉滴注 7 d,再改为泼尼松 1 mg/(kg·d)口服,此后每周减量 5 mg,直至 10 mg/d 并维持治疗 1 年;14 例予免疫球蛋白 0.40 g/(kg·d)连续静脉滴注 5 d,同时联合泼尼松 1 mg/(kg·d)口服,每周减量 5 mg,直至 10 mg/d 并维持治疗 1 年。

2. 药物治疗前后外周血 B 细胞亚群的检测

(1)试剂与仪器:荧光染料标记的抗体包括藻红蛋白-德克萨斯红(ECD)标记的小鼠抗人 CD19 单克隆抗体(1:20)、藻红蛋白-花青素(PE-Cy5)标记的小鼠抗人 CD27 单克隆抗体(1:20)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD38 单克隆抗体(1:20),分别购自美国 Beckman 公司、eBioscience 公司和 BioLegend 公司;荧光染料标记的同型对照 IgG 包括 ECD 标记的小鼠 IgG(1:20)和 FITC 标记的小鼠 IgG(1:20),由美国 Beckman 公司提供,PE-Cy5 标记的小鼠 IgG(1:20)为美国 BioLegend 公司产品;红细胞裂解液购自美国 Beckman 公司。COULTER EPICS XL 型流式细胞仪和 Allegra X-12 型温控离心机购自美国 Beckman 公司。(2)流式细胞术检测外周血 CD19⁺、CD27⁺和 CD38⁺淋巴细胞比例:患者于入院第 2 天清晨、正常对照者于体格检查时空腹采集肘静脉血 4ml,置乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中;每管取全血样品 50 μl,分别滴加由 ECD、PE-Cy5 和 FITC 标记的小鼠抗人 CD19、CD27 和 CD38 单克隆抗体各 5 μl,同时单独设立同型对照,每管取全血样品为 50 μl,分别加入由 ECD、PE-Cy5 和 FITC 标记的小鼠 IgG 各 5 μl;上述所有样品均于室温下避光孵育 20 min,每管滴加红细胞裂解液 250 μl、40 °C 水浴 10 min,滴加磷酸盐缓冲液 5 ml 终止红细胞裂解反应,于 4 °C、离心半径 10 cm、1600 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入磷酸盐缓冲液 500 μl 轻微震荡后形成细胞悬液,行流式细胞术检测。以前向角和侧向角设门,选择淋巴细胞群,剔除单核细胞、粒细胞和细胞碎片,每管获取 30 × 10³ 个淋巴细胞,计数 CD19⁺、CD27⁺和 CD38⁺淋巴细胞比例,以相应荧光染料标记的小鼠 IgG 作为同型对照,去除背景荧光后以 ECD 染色呈红色、PE-Cy5 染色呈紫色、FITC 染色呈绿色为阳性细胞。(3)三色荧光标记法检测外周

血 B 细胞亚群:每例血液样品设 2 个检测管和 2 个同型对照管,检测管分别为单色荧光标记的 CD19 检测管和三色荧光标记的 CD19、CD27 和 CD38 检测管,每管均取全血样品 50 μl,单色管滴加 ECD 标记的小鼠抗人 CD19 单克隆抗体 5 μl,三色管同时滴加 ECD、PE-Cy5 和 FITC 标记的小鼠抗人 CD19、CD27 和 CD38 单克隆抗体各 5 μl;同型对照管每管亦取全血样品 50 μl,单色对照管滴加 ECD 标记的小鼠 IgG 5 μl,三色对照管同时滴加 ECD、PE-Cy5、FITC 标记的小鼠 IgG 各 5 μl。细胞悬液制备方法同前,行流式细胞术检测。以前向角和侧向角设门,选择淋巴细胞群,剔除单核细胞、粒细胞和细胞碎片,每管获取 30 × 10³ 个淋巴细胞,在单色荧光标记的检测管中手工圈出 CD19⁺B 细胞,在三色荧光标记的检测管中计数该群细胞中 CD27⁺和 CD38⁺B 细胞比例,同样以相应荧光染料标记的小鼠 IgG 作为同型对照,剔除背景荧光后,ECD 染色呈红色、PE-Cy5 染色呈紫色、FITC 染色呈绿色分别为 CD19⁺、CD27⁺和 CD38⁺细胞。(4)经甲泼尼龙治疗后外周血 B 细胞亚群表达变化的检测:于接受甲泼尼龙冲击治疗方案的 29 例患者中随机单盲选择 9 例,于治疗第 11 天时再次行流式细胞术检测,检测方法同前。

3. 统计分析方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本的 *t* 检验或配对 *t* 检验;呈非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,采用 Wilcoxon 秩和检验或 Wilcoxon 符号秩和检验。重症肌无力严重程度与具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群的相关性采用 Spearman 秩相关分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、外周血 B 细胞亚群表达变化

1. CD19、CD27 和 CD38 表达变化 流式细胞术检测显示,与正常对照组相比,MG 组患者外周血 CD27⁺淋巴细胞比例升高 ($P = 0.025$),而 CD19⁺和 CD38⁺淋巴细胞比例组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$,表 1)。

2. 具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群的表达变化 三色荧光标记法显示,与正常对照组相比,MG 组患者外周血 CD27⁺CD38⁻B 细胞和 CD27⁻CD38⁺B 细胞比例升高 ($P = 0.000, 0.000$)、CD27⁻CD38⁺B 细

表 1 MG 组与正常对照组受试者外周血 CD19⁺、CD27⁺和 CD38⁺淋巴细胞比例的比较(%)

Table 1. Comparison of percentages of CD19⁺, CD27⁺ and CD38⁺ peripheral lymphocytes between MG patients and control patients (%)

组别	例数	CD19 ⁺ 淋巴细胞 [M(P ₂₅ , P ₇₅)]	CD27 ⁺ 淋巴细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD38 ⁺ 淋巴细胞 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	38	8.28(5.07, 13.17)	40.73 ± 12.32	43.21 ± 12.98
MG 组	43	9.82(7.66, 14.40)	47.04 ± 12.37	38.73 ± 11.35
Z 或 t 值		-1.614	2.293	-1.660
P 值		0.054	0.025	0.101

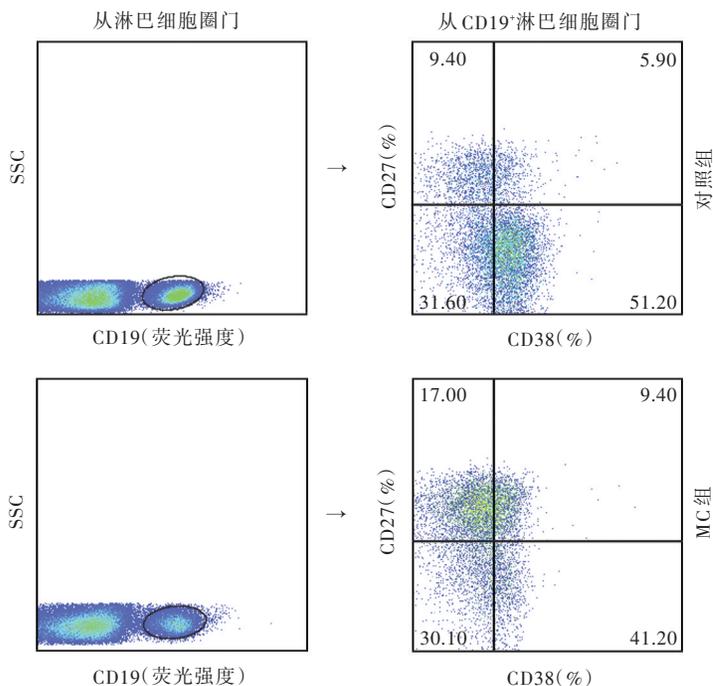
Wilcoxon rank test for comparison of CD19⁺ lymphocyte, and two-independent-sample *t* test for comparison of others, CD19⁺淋巴细胞比例的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,其余各项指标的比较采用两独立样本的 *t* 检验。MG, myasthenia gravis, 重症肌无力

表 2 MG 组与正常对照组受试者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群所占比例的比较(%)

Table 2. Comparison of percentages of peripheral B cell subsets with CD27 and CD38 phenotypes between MG patients and control patients (%)

组别	例数	CD27 ⁺ CD38 ⁻ B 细胞 [M(P ₂₅ , P ₇₅)]	CD27 ⁺ CD38 ⁺ B 细胞($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁻ B 细胞($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁺ B 细胞($\bar{x} \pm s$)
对照组	38	9.42(6.82, 13.45)	5.86 ± 3.48	51.21 ± 14.12	31.55 ± 11.00
MG 组	43	17.00(11.09, 25.78)	9.44 ± 3.42	41.18 ± 13.31	30.06 ± 9.44
Z 或 t 值		-3.946	4.659	-3.290	-0.653
P 值		0.000	0.000	0.001	0.516

Wilcoxon rank test for comparison of CD27⁺CD38⁻B cells, and two-independent-sample *t* test for comparison of others, CD27⁺CD38⁻B 细胞比例的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,其余各项指标的比较采用两独立样本的 *t* 检验。MG, myasthenia gravis, 重症肌无力



MG, myasthenia gravis, 重症肌无力; SSC, side scatter, 侧向角散射

图 1 流式细胞术检测显示,与正常对照组相比, MG 组患者外周血 CD27⁺CD38⁻和 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例升高、CD27⁻CD38⁻B 细胞比例下降

Figure 1 Flow cytometer detection findings B-cell subsets in peripheral blood samples showed that percentages of CD27⁺CD38⁻ and CD27⁺CD38⁺ B cells were increased, but percentage of CD27⁻CD38⁻ B cells was decreased in MG patients than those in control group.

胞比例降低($P = 0.001$),而 CD27⁻CD38⁻B 细胞比例组间差异无统计学意义($P > 0.05$;表 2,图 1)。

3. 不同临床特点重症肌无力患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群的表达变化 对不同临床特点重症肌无力患者的比较提示,全身型(28 例)患者仅外周血 CD27⁺CD38⁻B 细胞比例高于眼肌型(15 例)患者($P = 0.031$),而 CD27⁺CD38⁺、CD27⁻CD38⁺和 CD27⁻CD38⁻B 细胞比例二者之间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$,表 3);合并胸腺瘤(17 例)患者外周血 CD27⁻CD38⁺B 细胞比例低于无胸腺异常(26 例)患者($P = 0.026$)、CD27⁻CD38⁻B 细胞比例高于无胸腺异常患者($P = 0.024$),而 CD27⁺

CD38⁻和 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例二者差异无统计学意义(均 $P > 0.05$,表 4);肌无力危象(11 例)患者在危象发生前外周血 CD27⁺CD38⁻和 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例均高于未发生肌无力危象(32 例)患者($P = 0.017, 0.011$),而 CD27⁻CD38⁺和 CD27⁻CD38⁻B 细胞比例二者差异无统计学意义(均 $P > 0.05$,表 5)。

二、重症肌无力严重程度与具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群的相关分析

经甲泼尼龙冲击治疗后,随机单盲选择的 9 例患者 QMG 评分为 2~10 分,平均(6.22 ± 2.64)分,低于治疗前的(8.44 ± 3.71)分,治疗前后差异具有统计学意义($t = 3.255, P = 0.012$)。甲泼尼龙冲击治疗

表 3 全身型与眼肌型患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群所占比例的比较 (%)

Table 3. Comparison of the percentages of peripheral B cell subsets with CD27 and CD38 phenotypes between GMG and OMG patients (%)

组别	例数	CD27 ⁺ CD38 ⁺ B 细胞 [$M(P_{25}, P_{75})$]	CD27 ⁺ CD38 ⁺ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁺ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁻ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)
GMG	28	20.26(12.60,27.96)	9.84 ± 3.95	39.07 ± 13.39	29.61 ± 9.38
OMG	15	15.49(7.97,17.87)	8.69 ± 2.04	45.13 ± 12.66	30.91 ± 9.84
Z 或 t 值		-1.873	1.264	-1.441	-0.425
P 值		0.031	0.214	0.157	0.673

Wilcoxon rank test for comparison of CD27⁺CD38⁺B cells, and two-independent-sample *t* test for comparison of others, CD27⁺CD38⁺B 细胞比例的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,其余各项指标的比较采用两独立样本的 *t* 检验。GMG, generalized myasthenia gravis, 全身型重症肌无力; OMG, ocular myasthenia gravis, 眼肌型重症肌无力

表 4 合并胸腺瘤与无胸腺异常患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群所占比例的比较 (%)

Table 4. Comparison of percentages of the peripheral B cell subsets with CD27 and CD38 phenotypes between MG patients with thymoma and without abnormal thymus (%)

组别	例数	CD27 ⁺ CD38 ⁺ B 细胞 [$M(P_{25}, P_{75})$]	CD27 ⁺ CD38 ⁺ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁺ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁻ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)
合并胸腺瘤	17	17.00(12.90,26.19)	9.58 ± 4.05	35.65 ± 13.83	34.44 ± 11.05
无胸腺异常	26	17.11(8.47,25.86)	9.35 ± 3.03	44.79 ± 11.87	27.20 ± 7.08
Z 或 t 值		-0.447	0.211	-2.313	2.398
P 值		0.331	0.834	0.026	0.024

Wilcoxon rank test for comparison of CD27⁺CD38⁺B cells, and two-independent-sample *t* test for comparison of others, CD27⁺CD38⁺B 细胞比例的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,其余各项指标的比较采用两独立样本的 *t* 检验

表 5 肌无力危象与无肌无力危象患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群所占比例的比较 (%)

Table 5. Comparison of percentages of the peripheral B cell subsets with CD27 and CD38 phenotypes between MG patients with and without myasthenic crisis (%)

组别	例数	CD27 ⁺ CD38 ⁺ B 细胞 [$M(P_{25}, P_{75})$]	CD27 ⁺ CD38 ⁺ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁺ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁻ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)
肌无力危象	11	24.93(14.10,34.51)	11.66 ± 3.95	36.18 ± 14.09	26.66 ± 6.24
无肌无力危象	32	16.20(9.62,22.51)	8.68 ± 2.92	42.90 ± 12.81	31.23 ± 10.14
Z 或 t 值		-2.116	2.663	-1.463	-1.403
P 值		0.017	0.011	0.151	0.168

Wilcoxon rank test for comparison of CD27⁺CD38⁺B cells, and two-independent-sample *t* test for comparison of others, CD27⁺CD38⁺B 细胞比例的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,其余各项指标的比较采用两独立样本的 *t* 检验

后,9 例重症肌无力患者外周血 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例降低($P = 0.034$)、CD27⁻CD38⁺B 细胞比例升高($P = 0.006$),而 CD27⁺CD38⁻和 CD27⁻CD38⁻B 细胞比例治疗前后差异无统计学意义(均 $P > 0.05$,表 6)。Spearman 秩相关分析显示,重症肌无力患者 QMGs 评分与外周血 CD27⁺CD38⁻B 细胞比例呈正相关($r_s = 0.394, P = 0.009$),而与 CD27⁺CD38⁺B 细胞($r_s = 0.138, P = 0.377$)、CD27⁻CD38⁺B 细胞($r_s = -0.242, P = 0.118$)和 CD27⁻CD38⁻B 细胞($r_s = -0.201, P = 0.197$)比例无关联性。

讨 论

B 细胞分化发育过程中存在不同亚群,包括初始性 B 细胞、记忆性 B 细胞、浆母细胞(亦称抗体分

泌性 B 细胞)和 Breg 细胞等^[3]。由于 B 细胞分化呈动态过程,不同亚群免疫表型较为复杂,其中 CD27 和 CD38 是 B 细胞亚群的重要表型分子^[4-5]。然而,在由 B 细胞介导的自身免疫性疾病重症肌无力的相关研究中,尚无文献报道关于二者同时标记的 B 细胞亚群的系统阐述和分析。本研究通过检测外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群的表达变化,以为重症肌无力患者 B 细胞亚群的鉴定提供临床依据。

近年在重症肌无力的临床研究中,大多以 CD27 作为记忆性 B 细胞的阳性标志物^[8]。在本研究中,重症肌无力患者与正常对照者外周血 CD19⁺淋巴细胞比例无显著差异,提示存在 B 细胞功能或构成异常;重症肌无力患者外周血 CD27⁺淋巴细胞比例高

表 6 甲泼尼龙冲击治疗前后重症肌无力患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群比例的比较 (%)**Table 6.** Comparison of the percentages of peripheral B cell subsets with CD27 and CD38 phenotypes between MG patients before and after therapy (%)

组别	例数	CD27 ⁻ CD38 ⁻ B 细胞 [M(P ₂₅ , P ₇₅)]	CD27 ⁻ CD38 ⁻ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁻ CD38 ⁺ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)	CD27 ⁺ CD38 ⁻ B 细胞 ($\bar{x} \pm s$)
治疗前	9	17.81 (9.77, 26.44)	9.11 ± 3.86	40.68 ± 11.68	31.20 ± 10.89
治疗后	9	17.65 (10.10, 22.90)	7.75 ± 2.81	43.97 ± 12.42	30.98 ± 9.85
Z 或 t 值		-1.186	2.549	-3.760	0.181
P 值		0.236	0.034	0.006	0.861

Wilcoxon signed rank test for comparison of CD27⁻CD38⁻B cells, and paired-sample *t* test for comparison of others. CD27⁻CD38⁻B 细胞比例的比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验, 其余各项指标的比较采用配对 *t* 检验

于正常对照者且差异有统计学意义, 表明此类患者可能存在记忆性 B 细胞构成异常。晚近研究显示, 在炎症过程中 CD27⁺CD38⁻B 细胞即是记忆性 B 细胞^[9]。在本研究中, 重症肌无力患者外周血 CD27⁺CD38⁻B 细胞比例明显高于正常对照者且差异有统计学意义, 符合记忆性 B 细胞在自身免疫性疾病中的表现。重症肌无力患者外周血 CD27⁺CD38⁻B 细胞是具有抗体分泌特性的浆母细胞^[10], 本研究重症肌无力患者外周血 CD27⁺CD38⁻B 细胞和 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例均高于正常对照者, 提示二者作为记忆性 B 细胞和浆母细胞参与了体液免疫应答反应, 是重症肌无力免疫机制中的效应性 B 细胞。在 Muto 等^[8]的研究中, 当单纯以 CD27 作为记忆性 B 细胞阳性标志物时, 无法区分利妥昔单抗清除的是浆母细胞还是记忆性 B 细胞, 而改用 CD27 和 CD38 双标记 B 细胞亚群后则有助于拓展临床研究的深度。在 B 细胞分化过程中, CD27⁻CD38⁺是过渡性 B 细胞表型, 处于不成熟 B 细胞与成熟 B 细胞的过渡阶段, 但其生物学功能尚未被完全证实^[11]。在重症肌无力的免疫机制中, CD38 不仅是浆母细胞的阳性标志物, 也是调节性 B 细胞之表型^[12], 尽管目前尚无证据证实 CD27⁻CD38⁺B 细胞是调节性 B 细胞, 但本研究结果显示, 重症肌无力患者外周血 CD27⁻CD38⁺B 细胞比例低于正常对照者且差异有统计学意义, 提示此类细胞可能在重症肌无力的病理生理学机制中发挥免疫抑制作用。初始性 B 细胞由 CD27⁻CD38⁺B 细胞分化而来, 在接触外界抗原时向记忆性 B 细胞和浆母细胞等效应性 B 细胞分化, 进而对自身抗原形成耐受^[11]。而在自身免疫性疾病中, CD27⁻CD38⁻则为初始性 B 细胞表型^[13], 本研究重症肌无力患者与正常对照者 CD27⁻CD38⁻B 细胞表达无显著差异, 表明在重症肌无力的免疫机制

中, 初始性 B 细胞的免疫耐受被破坏后, 可能得到过渡性 B 细胞的补充, 从而导致具有抑制功能的 CD27⁻CD38⁺B 细胞比例下降, 使效应性 B 细胞和调节性 B 细胞比例失衡。

在 B 细胞分化过程中, 浆母细胞作为分泌自身抗体的效应细胞, 在重症肌无力的免疫机制中与抗体滴度直接相关, 但其存活期较短, 而记忆性 B 细胞具有长期存活特性, 在自身抗原的刺激下能够迅速分化为浆母细胞而分泌自身抗体, 是浆母细胞的储备库^[14]。在本研究中, 重症肌无力患者外周血具有记忆性 B 细胞和浆母细胞表型的 CD27⁺CD38⁻B 细胞和 CD27⁺CD38⁺B 细胞比例升高, 可能直接导致自身抗体滴度升高, 进而加重免疫损害程度, 诱发肌无力危象。由于本研究重症肌无力患者的血液标本采集于肌无力危象发生之前, 故检测结果并不能代表发生危象时的 B 细胞亚群状况, 但是 CD27⁺CD38⁻B 细胞和 CD27⁺CD38⁺B 细胞对预测病情急性加重具有重要意义。研究显示, CD27⁺CD38⁺浆母细胞是重症肌无力患者单次复发的预测因子^[10], 但其分泌的自身抗体与病情严重程度并不完全一致^[2]。用于评价病情严重程度的 QMGs 评分不仅受单次肌无力发作的影响, 而且与既往长期病程中积累的肌无力症状密切相关, 因此, 本研究重症肌无力患者 QMGs 评分与外周血 CD27⁺CD38⁺浆母细胞比例并无明显关联性, 而在长期病程中, 存活期较长的 CD27⁺CD38⁻B 细胞与 QMGs 评分有关。临床特点的转化是重症肌无力的常见临床现象, 约有 18.4% 的眼肌型患者可以转化为全身型^[15], 而且, 疾病类型的演化是一个长期过程, 其中起关键作用的可能是存活期较长的 CD27⁺CD38⁻B 细胞, 究其原因, 可能是存活期较长的记忆性 B 细胞在眼肌型重症肌无力的病程中不断分化为浆母细胞, 从而逐渐累及全身

肌肉,转化为全身型重症肌无力,因此,CD27⁺CD38⁻B 细胞比例具有预测重症肌无力类型转化的作用。由此可见,CD27⁺CD38⁻记忆性 B 细胞比例可反映重症肌无力患者长期病程中的总体病情和预后,CD27⁺CD38⁺浆母细胞则对肌无力危象的发生具有一定预测作用。调节性 B 细胞也是重症肌无力患者 B 细胞亚群的重要组成部分,其表达变化和功能障碍是重症肌无力免疫调控中的关键因素,CD38⁺Breg 细胞通过分泌白细胞介素-10(IL-10)抑制 CD4⁺Th 细胞增殖^[16],在重症肌无力的免疫机制中,调节性 B 细胞不仅具有调控自身免疫应答之作用,而且与胸腺状态密切相关^[17]。本研究所纳入的重症肌无力患者外周血 CD27⁺CD38⁺Breg 细胞比例下降可能削弱对胸腺 T 细胞的免疫抑制作用,从而促进胸腺瘤的形成。晚近研究显示,重症肌无力患者切除胸腺后,外周血调节性 B 细胞数目可有所恢复^[12]。尽管本研究重症肌无力患者初始性 B 细胞比例较低,但合并胸腺瘤的患者外周血 CD27⁺CD38⁻B 细胞比例异常升高可能有利于胸腺瘤免疫耐受的形成。

糖皮质激素对自身免疫性疾病中 B 细胞的作用尚不清楚,因此,不同疾病的 B 细胞亚群表达变化也不尽一致,可能与糖皮质激素受体的敏感性有关^[18-19]。本研究结果显示,重症肌无力患者经甲泼尼龙冲击治疗后外周血 CD27⁺CD38⁺Breg 细胞比例升高、CD27⁺CD38⁺浆母细胞比例下降,提示效应性 B 细胞和调节性 B 细胞比例失衡被纠正后,患者病情得到缓解;但是 CD27⁺CD38⁻记忆性 B 细胞比例无明显变化,表明重症肌无力疾病进展和复发的根源并未解除。因此,在重症肌无力的免疫调节治疗中,深入探讨干预措施对记忆性 B 细胞的作用机制可能才是今后的治疗方向。

综上所述,重症肌无力患者外周血存在具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群,不同临床特点和治疗反应的患者其表达变化有所差异,与病情严重程度有关,提示不同表型的 B 细胞亚群可能在重症肌无力的免疫机制和疾病进程中发挥不同作用,其具体的生物学功能尚待进一步深入研究。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Yi JS, Guptill JT, Stathopoulos P, Nowak RJ, O'Connor KC. B cells in the pathophysiology of myasthenia gravis[J]. *Muscle Nerve*, 2018, 57:172-184.
- [2] Liu Y, Liu R, Hao HJ, Zhao GP, Gao F. Detection and clinical significance of serum autoantibodies in patients with myasthenia gravis[J]. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2016, 16:678-683. [刘云, 刘冉, 郝洪军, 赵桂萍, 高枫. 重症肌无力患者血清学标志物检测及临床意义[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2016, 16:678-683.]
- [3] Garraud O, Borhis G, Badr G, Degrelle S, Pozzetto B, Cognasse F, Richard Y. Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond[J]. *BMC Immunol*, 2012, 13:63.
- [4] Figgitt WA, Vincent FB, Saulep-Easton D, Mackay F. Roles of ligands from the TNF superfamily in B cell development, function, and regulation[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26:191-202.
- [5] Vale AM, Schroeder HW Jr. Clinical consequences of defects in B-cell development[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125:778-787.
- [6] Neuroimmunology Group, Neurology Branch, Chinese Medical Association; Neuroimmunology Branch, Chinese Society for Immunology. Guidelines for diagnosis and treatment of myasthenia gravis in China 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.]
- [7] Jaretki A 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS, Sanders DB. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task force of the medical scientific advisory board of the myasthenia gravis foundation of America[J]. *Neurology*, 2000, 55:16-23.
- [8] Muto K, Matsui N, Unai Y, Sakai W, Haji S, Udaka K, Miki H, Furukawa T, Abe M, Kaji R. Memory B cell resurgence requires repeated rituximab in myasthenia gravis[J]. *Neuromuscul Disord*, 2017, 27:918-922.
- [9] Han Y, Jin Y, Miao Y, Shi T, Lin X. Improved RANKL expression and osteoclastogenesis induction of CD27⁺CD38⁻ memory B cells: a link between B cells and alveolar bone damage in periodontitis [J]. *J Periodontol Res*, 2019, 54:73-80.
- [10] Stathopoulos P, Kumar A, Nowak RJ, O'Connor KC. Autoantibody-producing plasma blasts after B cell depletion identified in muscle-specific kinase myasthenia gravis[J]. *JCI Insight*, 2017, 2:94263.
- [11] Suryani S, Tangye SG. Therapeutic implications of advances in our understanding of transitional B-cell development in humans[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2010, 6:765-775.
- [12] Yilmaz V, Maillard S, Truffault F, Bolgert F, Behin A, Regnard JF, Berrih-Aknin S, Le Panse R. Regulatory B cells in myasthenia gravis are differentially affected by therapies[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2018, 5:1408-1414.
- [13] Monteiro A, Cruto C, Rosado P, Rosado L, Fonseca AM, Paiva A. Interferon-beta treated - multiple sclerosis patients exhibit a decreased ratio between immature/transitional B cell subset and plasmablasts[J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 326:49-54.
- [14] Stathopoulos P, Kumar A, Heiden JA, Pascual-Goñi E, Nowak RJ, O'Connor KC. Mechanisms underlying B cell immune dysregulation and autoantibody production in MuSK myasthenia gravis[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2018, 1412:154-165.
- [15] Mazzoli M, Ariatti A, Valzania F, Kaleci S, Tondelli M, Nichelli PF, Galassi G. Factors affecting outcome in ocular myasthenia gravis[J]. *Int J Neurosci*, 2018, 128:15-24.
- [16] Sheng JR, Rezanian K, Soliven B. Impaired regulatory B cells in myasthenia gravis[J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 297:38-45.
- [17] Lu Y, Meng F, Yang Y, Li L, Wang D, Cui Y, Dong S, Wang W. Significance of B10 cell in patients with thymoma complicated with myasthenia gravis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8:73774-73786.
- [18] Quan C, Zhang Bao J, Lu J, Zhao C, Cai T, Wang B, Yu H, Qiao

J, Lu C. The immune balance between memory and regulatory B cells in NMO and the changes of the balance after methylprednisolone or rituximab therapy [J]. J Neuroimmunol, 2015, 282:45-53.

[19] Gudbrandsdottir S, Brimnes M, Køllgaard T, Hasselbalch HC,

Nielsen CH. Effects of rituximab and dexamethasone on regulatory and proinflammatory B-cell subsets in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. Eur J Haematol, 2018, 100:45-52.

(收稿日期:2019-10-18)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(六)

小细胞肺癌 small cell lung cancer(SCLC)

信号传导与转录激活因子 3/6

signal transducer and activator of transcription 3/6 (STAT3/6)

兴趣区 region of interest(ROI)

血管内机械取栓作为急性缺血性卒中血管内主要治疗试验 Solitaire™ with the Intention for Thrombectomy as Primary Endovascular Treatment for Acute Ischemic Stroke (SWIFT PRIME) trial

血管内皮生长因子

vascular endothelial growth factor(VEGF)

血管内皮生长因子受体

vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)

血管内治疗急性缺血性卒中的多中心随机临床试验

Multicenter Randomized CLinical Trial of Endovascular Treatment for Acute Ischemic Stroke in the Netherlands (MR CLEAN)

血-脑屏障 blood-brain barrier(BBB)

延长急性神经功能缺损至动脉内溶栓时间的临床试验

EXtending the time for Thrombolysis in Emergency Neurological Deficits with Intra-Arterial therapy (EXTEND-IA) trial

眼肌型重症肌无力 ocular myasthenia gravis(OMG)

钥孔血蓝蛋白 keyhole limpet hemocyanin(KLH)

胰岛素样生长因子结合蛋白 3

insulin-like growth factor-binding protein 3(IGFBP3)

遗传性痉挛性截瘫 hereditary spastic paraplegia(HSP)

乙二胺四乙酸 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)

乙酰胆碱受体 acetylcholine receptor(AChR)

异柠檬酸脱氢酶 1/2 isocitrate dehydrogenase 1/2(IDH1/2)

异硫氰酸荧光素 fluorescein isothiocyanate(FITC)

意向治疗 intention to treat(ITT)

吲哚胺-2,3-双加氧酶 indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)

预防性脑照射 prophylactic cranial irradiation(PCI)

Glasgow 预后分级 Glasgow Outcome Scale(GOS)

原始神经外胚层肿瘤

primitive neuroectodermal tumor(PNET)

运动诱发电位 motor-evoked potential(MEP)

整合素样金属蛋白酶与凝血酶

disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin (ADAMT)

Barthel 指数 Barthel Index(BI)

中国国家卒中登记 Chinese National Stroke Registry(CNSR)

中国脑胶质瘤基因组图谱计划

Chinese Glioma Genome Atlas(CGGA)

中国脑胶质瘤协作组

Chinese Glioma Cooperative Group(CGCG)

中枢神经系统肿瘤分子信息与分类实践联盟-

非 WHO 官方组织

the Consortium to Inform Molecular and Practical

Approaches to Central Nervous System Tumor Taxonomy-Not Official WHO(cIMPACT-NOW)

中位总生存期 medium overall survival(mOS)

肿瘤电场治疗 tumor-treating fields(TTF)

肿瘤干细胞 tumor stem cells(TSCs)

肿瘤坏死因子 tumor necrosis factor(TNF)

肿瘤基因组学图谱计划 The Cancer Genome Atlas(TCGA)

肿瘤浸润淋巴细胞 tumor infiltrating lymphocyte(TIL)

肿瘤突变负荷 tumor mutation burden(TMB)

肿瘤微环境 tumor microenvironment(TME)

肿瘤细胞来源的外泌体 tumor-derived exosomes(TEX)

肿瘤相关巨噬细胞 tumour-associated macrophages(TAMs)

肿瘤异常蛋白 tumor abnormal protein(TAP)

肿瘤易感基因 101 tumor susceptibility gene 101(TSG101)

肿瘤诱发骨软化症 tumor-induced osteomalacia(TIO)

重症肌无力 myasthenia gravis(MG)

重症肌无力定量评分

Quantitative Myasthenia Gravis Score(QMGS)

轴向扩散率 axial diffusivity(AD)

主要组织相容性复合物

major histocompatibility complex(MHC)

自然杀伤 T 细胞 natural killer T lymphocyte(NKT)

总生存期 overall survival(OS)

族错误率 family-wise error(FWE)

组蛋白去乙酰化酶 histone deacetylase(HDAC)

最长发声时间 maximum phonation time(MPT)