

临床孤立综合征患者外周血 T 细胞受体 β 链可变区多态性研究

吴岩 张纪红 董会卿 李大伟 刘峥 万岁桂

【摘要】 目的 分析临床孤立综合征患者外周血 T 细胞受体 β 链可变区 (TCRV β) 多态性, 初步预测特异性 TCRV β 片段, 研究其对临床孤立综合征的诊断价值。方法 选择 2012 年 9 月至 2014 年 3 月诊断并接受治疗的临床孤立综合征患者 30 例 (CIS 组), 以同期行健康体检的 30 例受试者为正常对照组。流式细胞术检测常规免疫学指标和 TCRV β 亚家族表达变化, CELL Quest Pro 5.1 等相关软件分析 24 个 TCRV β 亚家族成员表达水平, 并计算扩增者比例、扩增个数和扩增分数。结果 TCRV β 24 个亚家族中, CIS 组 CD4⁺TCRV β 2、4、5.2、5.3、7.1、8、14、17、20、21.3 片段, 以及 CD8⁺TCRV β 4、14 片段表达水平高于正常对照组, 而 CD4⁺TCRV β 11 和 CD8⁺TCRV β 9、11 片段表达水平低于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。CIS 组 CD4⁺TCRV β 2 ($P = 0.002$) 和 CD8⁺TCRV β 14 ($P = 0.010$) 扩增者比例均高于正常对照组, 其余亚家族扩增者比例差异则无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。CIS 组 TCRV β 扩增者比例与正常对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但扩增个数 ($P = 0.001$)、扩增分数 ($P = 0.006$) 均高于正常对照组。受试者工作特征 (ROC) 曲线显示, CD4⁺TCRV β 4 诊断临床孤立综合征的曲线下面积 (AUC) 为 0.719 (95% CI: 0.592 ~ 0.851, $P = 0.003$), 灵敏度 83.33%、特异度 56.67%; CD4⁺TCRV β 14 诊断的 AUC 为 0.713 (95% CI: 0.581 ~ 0.845, $P = 0.005$), 灵敏度 70%、特异度 56.23%; CD8⁺TCRV β 4 诊断的 AUC 为 0.727 (95% CI: 0.600 ~ 0.854, $P = 0.002$), 灵敏度 93.33%、特异度 50%; 以上 3 个片段对临床孤立综合征均具有中等诊断价值。结论 虽然临床孤立综合征患者外周血 CD4⁺TCRV β 4、CD4⁺TCRV β 14 和 CD8⁺TCRV β 4 片段表达水平升高, 但其诊断价值有限。

【关键词】 脱髓鞘疾病; 受体, 抗原, T 细胞, α - β ; 多态现象, 遗传; 流式细胞术

Polymorphism of peripheral blood T cell receptor β chain variable region in patients with clinically isolated syndrome

WU Yan¹, ZHANG Ji-hong², DONG Hui-qing¹, LI Da-wei¹, LIU Zheng¹, WAN Sui-gui³

¹Department of Neurology, ²Department of Hematology, Beijing Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

³Department of Neurology, the Affiliated Brain Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China

Corresponding author: DONG Hui-qing (Email: shshtt@sina.com)

【Abstract】 Objective To investigate the polymorphism of T cell receptor β chain variable region (TCRV β) in peripheral blood of clinically isolated syndrome (CIS) patients. To preliminarily predict the specific TCRV β fragment of CIS and its diagnostic value for CIS. **Methods** Hospitalized patients of Beijing Xuanwu Hospital from September 2012 to March 2014, were divided into 2 groups including CIS group (experimental patients, $n = 30$) and normal control group (healthy volunteers, $n = 30$). The routine immune indexes and expression of TCRV β subfamilies were detected by flow cytometry. CELL Quest Pro 5.1 software was used to analyze 24 subfamilies of TCRV β . Calculated the statistic of amplification rate, amplification number and amplification fraction of the total 24 subfamilies of TCRV β . **Results** Compared

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2020.09.005

基金项目:北京市科技计划课题(项目编号:Z131100006813020)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院神经内科[吴岩(现在北京大学首钢医院神经内科,邮政编码:100144)、董会卿、李大伟、刘峥],血液科(万岁桂);210029 南京医科大学附属脑科医院神经内科(张纪红)

通讯作者:董会卿,Email:shshtt@sina.com

to the normal control group, the quantitative expression of CD4⁺TCRVβ2, 4, 5.2, 5.3, 7.1, 8, 14, 17, 20, 21.3 and CD8⁺TCRVβ4, 14 were significantly expanded in CIS group, CD4⁺TCRVβ11 and CD8⁺TCRVβ9, 11 were significantly reduced in CIS group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The amplification rate of CD4⁺TCRVβ2 ($P = 0.002$) and CD8⁺TCRVβ14 ($P = 0.010$) in CIS group were higher than those in normal control group, but there was no significant difference in the other subfamilies. There was no statistical difference in the expansion rate of the TCRVβ between CIS group and normal control group. The amplification number ($P = 0.001$) and amplification fraction ($P = 0.006$) of the TCRVβ in CIS group were significantly higher than the normal control group. Receiver operating characteristic curve (ROC) analysis indicated that the area under the curve (AUC) of CD4⁺TCRVβ4 in the diagnosis of CIS was 0.719 (95%CI: 0.592–0.851, $P = 0.003$). The sensitivity was 83.33%, the specificity was 56.67%. The AUC of CD4⁺TCRVβ14 in the diagnosis of CIS was 0.713 (95%CI: 0.581–0.845, $P = 0.005$). The sensitivity was 70%, the specificity was 56.23%. The AUC of CD8⁺TCRVβ4 in the diagnosis of CIS was 0.727 (95%CI: 0.600–0.854, $P = 0.002$). The sensitivity was 93.33%, the specificity was 50%. The three fragments have medium diagnostic value for CIS.

Conclusions Although the expression levels of CD4⁺TCRVβ4, CD4⁺TCRVβ14 and CD8⁺TCRVβ4 in peripheral blood are increased in CIS group, their diagnostic value is limited.

【Key words】 Demyelinating diseases; Receptors, antigen, T-cell, alpha-beta; Polymorphism, genetic; Flow cytometry

This study was supported by Beijing Municipal Science and Technology Commission (No. Z131100006813020).

Conflicts of interest: none declared

临床孤立综合征(CIS)是一种十分常见的中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病,为中枢神经系统首次发作的单病灶或多病灶脱髓鞘事件,亦是复发-缓解型多发性硬化(RRMS)的早期阶段^[1-2];常见损害部位包括视神经、脑干、脑室旁和脊髓等^[2]。免疫系统尤其是T淋巴细胞(包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞)在脱髓鞘疾病的致病过程中发挥重要作用,可以直接或通过分子模拟机制对髓鞘自身抗原发生反应而致病^[3]。T淋巴细胞的免疫活动基本通过T细胞受体(TCR)实现,TCR由αβ或γδ两条肽链构成,TCRβ链可变区(TCRVβ)具有高度特异性,可反映TCR表达变化。在目前已公布的研究结果中,较少关注临床孤立综合征患者TCRVβ多态性,而且至今在TCR基因位点与临床孤立综合征之间亦未发现明确的遗传与致病相关性^[4]。本研究以首都医科大学宣武医院神经内科近年收治的30例临床孤立综合征患者为观察对象,分析其CD4⁺TCRVβ和CD8⁺TCRVβ多态性,初步预测特异性TCRVβ片段表达水平,并讨论其对临床孤立综合征的诊断价值。

对象与方法

一、研究对象

1. 纳入与排除标准 (1) CIS的诊断符合国际多发性硬化国际学会联合会(IFMSS)2010年诊断标准(McDonald标准)中有关CIS诊断标准。(2)入院前

6周内未曾使用过糖皮质激素,以及入院前3个月未曾使用免疫抑制剂。(3)排除血常规、红细胞沉降率检查结果正常的急性或慢性感染性疾病、恶性肿瘤性疾病或其他自身免疫性疾病。(4)入组患者及其家属对研究项目知情同意并签署知情同意书。

2. 一般资料 (1) CIS组:2012年9月至2014年3月在首都医科大学宣武医院神经内科住院治疗且诊断明确的CIS患者30例,男性16例,女性14例;年龄11~66岁,平均(37.17±16.07)岁。(2)正常对照组:同期在我院行健康体检的30例受试者为对照,年龄21~40岁,平均(31.23±5.98)岁。两组受试者性别($\chi^2 = 0.067$, $P = 0.796$)和年龄($t = 1.350$, $P = 0.182$)差异无统计学意义,具有可比性。

二、研究方法

1. 材料与仪器 TCRVβ单克隆抗体试剂盒(货号:IM3497,规格:25TEST,含TCRVβA~H共8支试剂)中I抗工作液包括异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)或藻红蛋白蓝蛋白5.1(PECY5)标记的小鼠抗人CD4、CD8和TCRαβ单克隆抗体,以及CD3 PerCP、CD8 APC、红细胞裂解液和磷酸盐缓冲液(PBS)均购自美国BD公司。BY-600c离心机由北京白洋医用离心机有限责任公司提供,FACS Calibur四色双激光流式细胞仪购自美国BD公司。

2. 流式细胞术检测 采集患者空腹时肘正中静脉或贵要静脉血2 ml至EDTA抗凝管,取1支试管

表 1 CIS 组与正常对照组受试者外周血常规免疫学指标的比较($\bar{x} \pm s, \%$)**Table 1.** Comparison of general immune index in peripheral blood between CIS group and normal control group ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	淋巴细胞比例	T 淋巴细胞占淋巴细胞比例	CD4 ⁺ T 细胞占 T 淋巴细胞比例	CD8 ⁺ T 细胞占 T 淋巴细胞比例	CD4 ⁺ T 细胞/CD8 ⁺ T 细胞
对照组	30	29.36 ± 5.95	68.38 ± 6.79	54.11 ± 8.04	40.80 ± 8.40	1.41 ± 0.46
CIS 组	30	26.13 ± 10.71	69.26 ± 11.63	56.08 ± 9.30	39.61 ± 8.54	1.69 ± 1.15
<i>t</i> 值		1.442	0.358	0.880	0.545	1.237
<i>P</i> 值		0.155	0.722	0.382	0.588	0.221

CIS, clinically isolated syndrome, 临床孤立综合征。The same for Table 2, 3

分别滴加 CD3⁻PerCP (20 μl)、CD8⁻APC (5 μl) 和 TCRVβ (5 μl, A ~ H), 加入经充分混匀的 100 μl 抗凝血, 摇匀、室温避光 20 min。加入 2 ml 红细胞裂解液, 摇匀、室温避光 10 min, 2600 × *g* 离心 5 min, 去上清、PBS 冲洗 (× 2), 加入质量分数 1% 多聚甲醛溶液 1 ml, 摇匀、4 ~ 8 °C 冰箱保存, 24 h 内上机检测。流式细胞仪上机操作, 发射激光采用氩离子激光器, 功率 15 mW, 激发光波长 488 nm, 测定前以标准校正荧光微球校正仪器, 每检测管共收集 10 × 10³ 个细胞, 其中 FITC、PE、PECY5 荧光分别设定在 1、2、3 通道上。应用 CELL Quest Pro 5.1 多功能数据获取分析软件获得以下各项指标。(1) 常规免疫学指标: 包括淋巴细胞比例、T 淋巴细胞占淋巴细胞比例、CD4⁺T 细胞占 T 淋巴细胞比例、CD8⁺T 细胞占 T 淋巴细胞比例、CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞比值。(2) TCRVβ 亚家族表达变化: 检测 CD4⁺TCRVβ 和 CD8⁺TCRVβ 所含 24 个亚家族成员表达水平, 分别为 Vβ1、Vβ2、Vβ3、Vβ4、Vβ5.1、Vβ5.2、Vβ5.3、Vβ7.1、Vβ7.2、Vβ8、Vβ9、Vβ11、Vβ12、Vβ13.1、Vβ13.2、Vβ13.6、Vβ14、Vβ16、Vβ17、Vβ18、Vβ20、Vβ21.3、Vβ22 以及 Vβ23。以 TCRVβ 每个片段的表达水平 ≥ 10% 为存在扩增, TCRVβ 扩增程度分别以扩增个数 (TCRVβ 表达水平 ≥ 10% 的片段个数) 及扩增分数 (TCRVβ 扩增的各个片段表达水平之和) 表示。

3. 统计分析方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理与分析。计数资料以相对数构成比 (%) 或率 (%) 表示, 行 χ^2 检验。通过 Kolmogorov-Smirnov 法进行正态性检验, 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; 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 Mann-Whitney *U* 检验。绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线并计算曲线下面积 (AUC) 以评价 TCRVβ 片段对 CIS 的诊断价值, AUC > 0.70 具有中等诊断价值、≤ 0.70 则具有低等

诊断价值; 计算 TCRVβ 片段诊断 CIS 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、Youden 指数 (YI)。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

流式细胞术检测结果显示, CIS 组与正常对照组受试者外周血淋巴细胞比例、T 淋巴细胞占淋巴细胞比例、CD4⁺T 细胞占 T 淋巴细胞比例、CD8⁺T 细胞占 T 淋巴细胞比例、CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞比值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

在 TCRVβ 家族的 24 个亚家族中, CIS 组患者外周血 CD4⁺TCRVβ2、4、5.2、5.3、7.1、8、11、14、17、20、21.3 片段, 以及 CD8⁺TCRVβ4、9、11、14 片段表达水平与正常对照组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 其中仅 CD4⁺TCRVβ11 和 CD8⁺TCRVβ9、11 片段表达水平低于正常对照组, 其余亚家族片段表达水平均高于正常对照组 (表 2, 3)。

在 TCRVβ 家族的 24 个亚家族中, CIS 组患者 CD4⁺TCRVβ2 ($P = 0.002$) 和 CD8⁺TCRVβ14 ($P = 0.010$) 两个亚家族片段扩增者比例高于正常对照组且差异有统计学意义; 两组其余亚家族扩增者比例差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$; 表 4, 5)。

两组受试者总 TCRVβ 扩增者比例差异无统计学意义 ($P = 0.052$), 其中 CIS 组患者外周血 CD4⁺TCRVβ 扩增者比例高于正常对照组 ($P = 0.000$), 而 CD8⁺TCRVβ 扩增者比例与正常对照组差异无统计学意义 ($P = 0.796$, 表 6)。

CIS 组患者外周血 TCRVβ 扩增个数 ($P = 0.001$) 和扩增分数 ($P = 0.006$) 均高于正常对照组且差异有统计学意义。其中, CIS 组 CD4⁺TCRVβ 扩增个数 ($P = 0.000$) 和扩增分数 ($P = 0.000$) 均高于正常对照组, 而 CD8⁺TCRVβ 扩增个数和扩增分数与正常对照组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$; 表 7, 8)。

将两组受试者亚家族表达水平或存在扩增者

表 2 CIS 组与正常对照组受试者外周血 CD4⁺TCRVβ 24 个亚家族表达水平的比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

Table 2. Comparison of the quantitative expression of 24 subfamilies of CD4⁺TCRVβ in peripheral blood between CIS group and normal control group [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	1	2	3	4	5.1	5.2
对照组	30	2.85(2.50, 3.44)	8.57(6.95, 9.70)	5.97(4.30, 6.38)	2.07(1.65, 2.66)	6.37(5.75, 7.45)	0.99(0.81, 1.13)
CIS 组	30	3.31(2.84, 3.73)	9.78(8.01, 10.70)	5.61(4.49, 6.38)	2.61(2.22, 3.12)	7.07(6.32, 8.18)	1.10(0.93, 1.26)
Z 值		1.973	2.403	0.096	2.950	1.885	2.181
P 值		0.053	0.016	0.923	0.003	0.059	0.029
组别	例数	5.3	7.1	7.2	8	9	11
对照组	30	0.95(0.75, 1.11)	2.14(1.71, 2.41)	0.55(0.07, 0.85)	3.75(3.39, 4.54)	3.68(2.68, 5.00)	1.15(0.73, 1.51)
CIS 组	30	1.10(0.94, 1.50)	2.38(1.91, 2.96)	0.65(0.07, 0.90)	4.76(3.55, 5.48)	3.16(2.44, 4.49)	0.77(0.61, 1.06)
Z 值		2.462	1.974	0.237	2.181	1.013	2.196
P 值		0.014	0.048	0.813	0.029	0.311	0.028
组别	例数	12	13.1	13.2	13.6	14	16
对照组	30	1.46(1.23, 1.92)	3.32(2.81, 3.68)	3.06(1.99, 4.88)	1.78(1.37, 2.60)	2.20(1.95, 2.56)	0.76(0.61, 0.93)
CIS 组	30	1.64(1.37, 2.01)	3.39(2.91, 3.75)	3.19(2.35, 4.38)	2.07(1.72, 2.61)	2.67(2.27, 3.35)	0.80(0.65, 0.92)
Z 值		0.991	0.584	0.436	1.745	2.832	0.806
P 值		0.322	0.559	0.663	0.081	0.005	0.420
组别	例数	17	18	20	21.3	22	23
对照组	30	4.85(4.50, 5.32)	2.24(1.19, 3.74)	2.33(2.04, 2.91)	2.87(2.13, 3.21)	3.65(3.33, 4.87)	0.38(0.31, 0.64)
CIS 组	30	5.38(4.84, 6.03)	2.01(1.34, 2.99)	2.90(2.27, 3.83)	3.31(2.54, 4.31)	4.36(3.41, 6.23)	0.35(0.27, 0.48)
Z 值		2.114	0.835	2.033	2.166	1.796	0.784
P 值		0.034	0.404	0.042	0.030	0.072	0.433

表 3 CIS 组与正常对照组受试者外周血 CD8⁺TCRVβ 24 个亚家族表达水平的比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

Table 3. Comparison of the quantitative expression of 24 subfamilies of CD8⁺TCRVβ in peripheral blood between CIS group and normal control group [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	1	2	3	4	5.1	5.2
对照组	30	4.88(3.52, 7.86)	6.43(4.10, 7.99)	6.48(3.90, 7.89)	1.70(1.35, 2.37)	3.66(3.01, 4.26)	0.83(0.62, 1.36)
CIS 组	30	4.44(3.31, 5.71)	5.95(4.18, 7.51)	5.26(4.11, 7.19)	2.43(1.89, 3.75)	3.64(2.82, 5.60)	1.04(0.68, 1.27)
Z 值		1.079	0.776	0.813	3.024	0.303	0.858
P 值		0.280	0.438	0.416	0.002	0.762	0.391
组别	例数	5.3	7.1	7.2	8	9	11
对照组	30	1.14(0.96, 1.82)	3.41(2.40, 4.48)	0.97(0.82, 1.63)	3.41(2.75, 4.27)	3.94(2.60, 6.44)	2.73(1.77, 5.72)
CIS 组	30	1.41(0.89, 2.23)	3.65(2.48, 4.87)	0.84(0.13, 1.48)	3.55(2.65, 4.65)	2.66(1.78, 4.41)	0.83(0.49, 1.32)
Z 值		0.510	0.769	0.059	0.281	2.026	4.413
P 值		0.610	0.442	0.953	0.779	0.043	0.000
组别	例数	12	13.1	13.2	13.6	14	16
对照组	30	1.04(0.66, 1.37)	4.03(3.14, 5.04)	6.20(4.86, 7.57)	1.43(1.14, 1.67)	4.74(3.30, 6.48)	0.82(0.69, 1.28)
CIS 组	30	1.02(0.58, 1.67)	3.20(2.38, 5.01)	5.00(2.70, 7.28)	1.51(0.98, 2.15)	6.67(4.41, 8.75)	0.91(0.58, 2.14)
Z 值		0.303	1.479	1.634	0.954	2.025	0.481
P 值		0.762	0.139	0.102	0.340	0.043	0.631
组别	例数	17	18	20	21.3	22	23
对照组	30	3.71(3.29, 5.08)	2.91(1.37, 4.24)	1.84(1.38, 2.69)	2.50(1.90, 3.18)	3.23(2.37, 4.18)	1.23(0.91, 2.16)
CIS 组	30	4.50(3.14, 5.49)	2.06(1.08, 3.90)	1.97(1.12, 3.46)	2.75(1.83, 4.60)	3.12(2.13, 4.73)	1.48(0.82, 2.56)
Z 值		0.266	0.976	0.784	1.102	0.495	0.392
P 值		0.790	0.329	0.433	0.271	0.620	0.695

表 4 CIS 组与正常对照组受试者外周血 CD4⁺TCRVβ 24 个亚家族扩增者比例的比较[例(%)]

Table 4. Comparison of the frequency of amplification in 24 subfamilies of CD4⁺TCRVβ in peripheral blood between CIS group and normal control group [case (%)]

组别	例数	1	2	5.1	8	13.2	22
对照组	30	0(0.00)	2(6.67)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
CIS 组	30	1(3.33)	12(40.00)	3(10.00)	2(6.67)	1(3.33)	2(6.67)
χ ² 值		1.017	9.317	3.158	2.069	1.017	2.069
P 值		0.313	0.002	0.076	0.150	0.313	0.150

CIS 组与正常对照组 CD4⁺TCRVβ3、4、5.2、5.3、7.1、7.2、9、11、12、13.1、13.6、14、16、17、18、20、21.3、23 亚家族扩增者例数均为 0, 未在表中列出。CIS, clinically isolated syndrome, 临床孤立综合征

表 5 CIS 组与正常对照组受试者外周血 CD8⁺TCRVβ 24 个亚家族扩增者比例的比较[例(%)]

Table 5. Comparison of the frequency of amplification in 24 subfamilies of CD8⁺TCRVβ in peripheral blood between CIS group and normal control group [case (%)]

组别	例数	1	2	3	5.1	7.1	7.2	8
对照组	30	4(13.33)	3(10.00)	3(10.00)	1(3.33)	1(3.33)	0(0.00)	1(3.33)
CIS 组	30	2(6.67)	3(10.00)	4(13.33)	1(3.33)	0(0.00)	1(3.33)	1(3.33)
χ ² 值		0.741	0.000	0.162	0.000	1.017	1.017	0.000
P 值		0.389	1.000	0.688	1.000	0.313	0.313	1.000

组别	例数	9	12	13.1	13.6	14	17	22
对照组	30	0(0.00)	0(0.00)	2(6.67)	0(0.00)	0(0.00)	2(6.67)	1(3.33)
CIS 组	30	1(3.33)	1(3.33)	2(6.67)	1(3.33)	6(20.00)	1(3.33)	0(0.00)
χ ² 值		1.017	1.017	0.000	1.017	6.667	0.351	1.017
P 值		0.313	0.313	1.000	0.313	0.010	0.554	0.313

CIS 组与正常对照组 CD8⁺TCRVβ4、5.2、5.3、11、13.2、16、17、18、20、21.3、23 亚家族扩增者例数均为 0, 未在表中列出。CIS, clinically isolated syndrome, 临床孤立综合征

比例具有统计学差异的片段, 根据该片段表达水平, 假设不同临界点, 获得一系列诊断灵敏度和特异度: 以灵敏度为纵坐标, 1 - 特异度为横坐标, 绘制 ROC 曲线。AUC 反映的范围即为诊断准确性, AUC > 0.70 则该片段诊断 CIS 具有中等诊断价值, AUC ≤ 0.70 则具有低等诊断价值。结果显示, CD4⁺TCRVβ4 诊断 CIS 的 AUC 为 0.719(95% CI: 0.592 ~ 0.851, P = 0.003; 图 1), 灵敏度 83.33%、特异度 56.67%; CD4⁺TCRVβ14 诊断 CIS 的 AUC 为 0.713(95% CI: 0.581 ~ 0.845, P = 0.005; 图 2), 灵敏度 70%、特异度 56.23%; CD8⁺TCRVβ4 诊断 CIS 的 AUC 为 0.727(95% CI: 0.600 ~ 0.854, P = 0.002; 图 3), 灵敏度 93.33%、特异度 50%; 以上 3 个片段对 CIS 均具有中等诊断价值。CD4⁺TCRVβ2 和 CD8⁺TCRVβ14 这两组亚家族表达水平及扩增者比例差异均有统计学意义, 其诊断 CIS 的 AUC 分别为 0.681(95% CI: 0.543 ~ 0.819, P = 0.016; 图 4)、0.652(95% CI: 0.512 ~ 0.792, P = 0.043; 图 5), 灵敏度分别为 33.33% 和 43.37%, 特异度为 88.89% 和 54.55%, 其对 CIS 的诊

断价值较低(表 9)。

讨 论

2005 年由国际临床孤立综合征研讨会撰写的《提示转归为多发性硬化的临床孤立综合征》将该综合征大致分为 3 种类型, 即时间和空间均为孤立; 时间孤立, 空间多发; 病变在同一部位反复出现, 空间上是孤立的, 时间上可为多次的^[2]。其常见损害部位有: 视神经、脑干、脑室旁以及脊髓等^[5], 被认为是多发性硬化的早期阶段。临床孤立综合征患者是否会进展为多发性硬化目前尚缺乏临床证据证实^[6-7]。有些研究通过对脑脊液或 MRI 病灶等辅助检查指标的观察分析, 预测疾病进展情况。Schwenkenbecher 等^[1]对 120 例临床孤立综合征患者进行为期 24 ~ 87 个月的随访(中位随访时间 47 个月), 其中 50 例(41.67%)后续进展为多发性硬化; 脑脊液寡克隆区带(OCB)阳性者 73 例、阴性 47 例, 阳性者中 40 例(54.79%)、阴性者中 10 例(21.28%)进展为多发性硬化, OCB 阳性患者进展为多发性硬化

表 6 CIS 组与正常对照组受试者外周血 TCRVβ 扩增者比例的比较 [例 (%)]

Table 6. Comparison of the amplification rate of TCRVβ in peripheral blood between CIS group and normal control group [case (%)]

组别	例数	总 TCRVβ	CD4 ⁺ TCRVβ	CD8 ⁺ TCRVβ
对照组	30	17(56.67)	2(6.67)	15(50.00)
CIS 组	30	24(80.00)	18(60.00)	16(53.33)
χ ² 值		3.774	19.200	0.067
P 值		0.052	0.000	0.796

CIS, clinically isolated syndrome, 临床孤立综合征; TCRVβ, T cell receptor β chain variable region, T 细胞受体 β 链可变区。The same for Table 7, 8

表 7 CIS 组与正常对照组受试者外周血 TCRVβ 扩增个数的比较 [M(P₂₅, P₇₅)]

Table 7. Comparison of the amplification number of TCRVβ in peripheral blood between CIS group and normal control group [M (P₂₅, P₇₅)]

组别	例数	总 TCRVβ 扩增个数	CD4 ⁺ TCRVβ 扩增个数	CD8 ⁺ TCRVβ 扩增个数
对照组	30	1.00(0.00, 1.00)	0.00(0.00, 0.00)	0.50(0.00, 1.00)
CIS 组	30	1.50(1.00, 3.00)	1.00(0.00, 1.00)	1.00(0.00, 2.00)
Z 值		3.454	4.562	1.387
P 值		0.001	0.000	0.165

表 8 CIS 组与正常对照组受试者外周血 TCRVβ 扩增分数的比较 [M(P₂₅, P₇₅)]

Table 8. Comparison of the amplification percentage of TCRVβ in peripheral blood between CIS group and normal control group [M (P₂₅, P₇₅)]

组别	例数	总 TCRVβ 扩增个数	CD4 ⁺ TCRVβ 扩增个数	CD8 ⁺ TCRVβ 扩增个数
对照组	30	12.64(0.00, 20.06)	0.00(0.00, 0.00)	6.34(0.00, 20.06)
CIS 组	30	23.32(10.33, 38.94)	10.48(0.00, 11.34)	18.41(0.00, 28.37)
Z 值		2.750	4.409	1.380
P 值		0.006	0.000	0.168

的比例明显高于阴性者,提示脑脊液 OCB 检测对临床孤立综合征的进展可能具有一定预测作用。研究显示, MRI 异常的临床孤立综合征患者进展为多发性硬化的比例高达 80%^[8-9]。而且,在多发性硬化的早期阶段 TCRVβ 扩增针对新抗原短暂性存在,当抗原刺激减弱后,相应细胞群凋亡继而数目下降,致病主要抗原或反复出现的抗原使 TCRVβ 持续存在且扩增,随着脱髓鞘疾病的进展,导致 TCRVβ 扩增比例可能增高^[10-11]。故监测临床孤立综合征患者外周血 TCRVβ 扩增表达水平可能对其是否会进展为多发性硬化做出初步判断。

TCR 是一种结构复杂的异二聚体,其将抗原片段识别为多肽,并与主要组织相容性复合物(MHC)

结合^[12]。T 淋巴细胞在发育过程中,表达 TCRVβ 的基因随机重排,健康人 TCRVβ 一般呈现多样性^[13],部分健康人会有 1 个或以上 TCRVβ 克隆性扩增,并且与年龄存在一定关联性,年龄越大,扩增片段数目越多,20~30 岁人群无克隆性扩增,40~50 岁有 1~2 个克隆性扩增^[2];脱髓鞘患者至少存在 1 个主要克隆性 TCRVβ(占有受体 > 10%)^[14]。本研究结果显示,正常对照组有 17 例(56.67%)受试者出现 TCRVβ 扩增,CIS 组有 24 例(80%)患者存在 TCRVβ 扩增,两组 TCRVβ 扩增者比例虽无明显差异,但正常对照组扩增者均为 CD4⁺TCRVβ 或 CD8⁺TCRVβ 单一片段扩增,而 CIS 组则为 CD4⁺TCRVβ 和(或)CD8⁺TCRVβ 多片段扩增;另外,CIS 组 CD4⁺TCRVβ 扩增者比例高于正常对照组,与 Slansky 和 Nakayama^[15] 研究所得出的 T 淋巴细胞在脱髓鞘疾病自身免疫反应中 CD4⁺TCRVβ 扩增的结论相符。与此同时,CIS 组扩增个数和扩增分数均显著高于正常对照组,提示中枢性或周围性免疫调节异常可导致髓鞘特异性 T 淋巴细胞数目扩增至致病程度,产生更剧烈的免疫反应,进而导致炎性脱髓鞘疾病^[16]。有研究表明,参与脱髓鞘疾病的 T 淋巴细胞亚群主要为 CD4⁺T 细胞^[17],T 淋巴细胞被认为是多发性硬化病理过程中的关键细胞,但是 T 淋巴细胞在临床孤立综合征发生发展过程中的功能和抗原特异性尚不十分清楚^[18]。

目前有关临床孤立综合征患者 TCRVβ 多态性的研究较为少见,相关研究的样本量较小,且研究对象大多为白种人群。Démoulin 等^[19] 曾对 1 例临床孤立综合征患者进行脑脊液检测,其结果显示,该患者存在 TCRVβ13、TCRVβ15、TCRVβ20~23 克隆性扩增。Mandel 等^[14] 于 12 例临床孤立综合征患者症状出现 3 个月内采集外周血,并以片段表达数量占总片段数量的 10%~50% 作为克隆性扩增诊断标准,经检测发现 TCRVβ6~9 存在克隆性扩增,扩增率与健康对照组比较差异有统计学意义。然而,上述国外研究均未对 CD4⁺TCRVβ 和 CD8⁺TCRVβ 的克隆性扩增类型进行区分。本研究 CIS 组患者 CD4⁺TCRVβ2、4、5.2、5.3、7.1、8、11、14、17、20、21.3 片段,以及 CD8⁺TCRVβ4、9、11、14 片段表达水平高于正常对照组,CD4⁺TCRVβ2、CD8⁺TCRVβ14 扩增者比例高于正常对照组,提示临床孤立综合征患者在 TCRVβ 扩增上具有特异性片段。Planas 等^[20] 对 3 例多发性硬化患者进行外周血基因测序,结果显示,

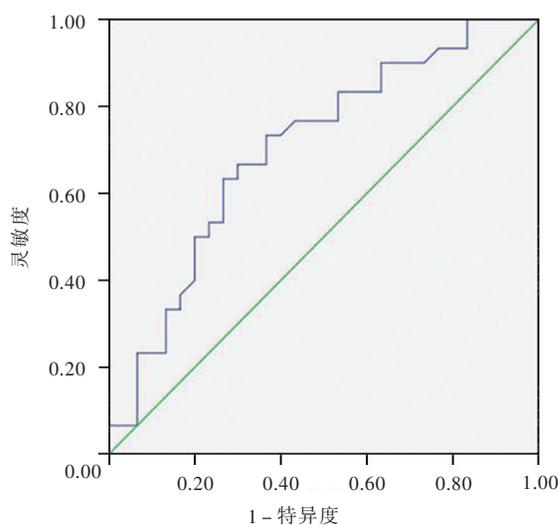


图1 ROC曲线显示,CD4⁺TCRVβ4诊断CIS的AUC为0.719(95%CI:0.592~0.851,*P*=0.003)

Figure 1. ROC curve showed that the AUC of CD4⁺TCRVβ4 in the diagnosis of CIS was 0.719 (95%CI: 0.592-0.851, *P*=0.003).

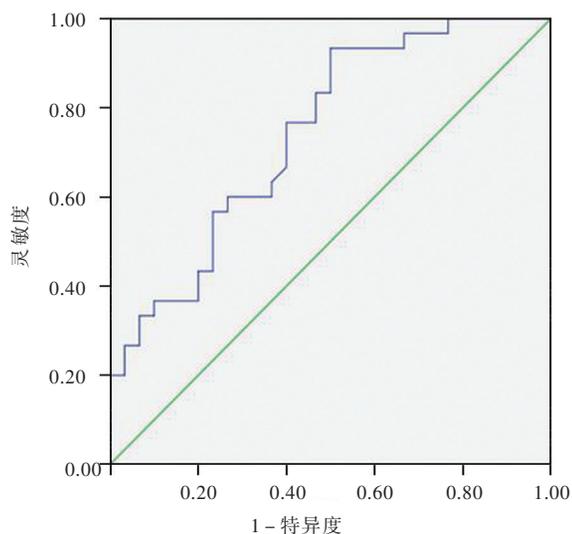


图2 ROC曲线显示,CD4⁺TCRVβ14诊断CIS的AUC为0.713(95%CI:0.581~0.845,*P*=0.005)

Figure 2. ROC curve showed that the AUC of CD4⁺TCRVβ14 in the diagnosis of CIS was 0.713 (95%CI: 0.581-0.845, *P*=0.005).

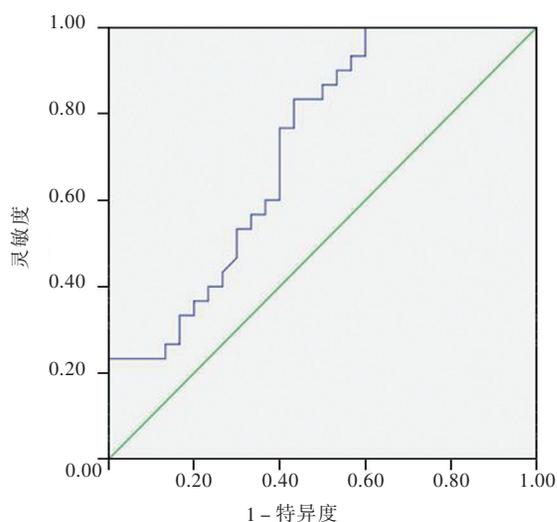


图3 ROC曲线显示,CD8⁺TCRVβ4诊断CIS的AUC为0.727(95%CI:0.600~0.854,*P*=0.002)

Figure 3. ROC curve showed that the AUC of CD8⁺TCRVβ4 in the diagnosis of CIS was 0.727 (95%CI: 0.600-0.854, *P*=0.002).

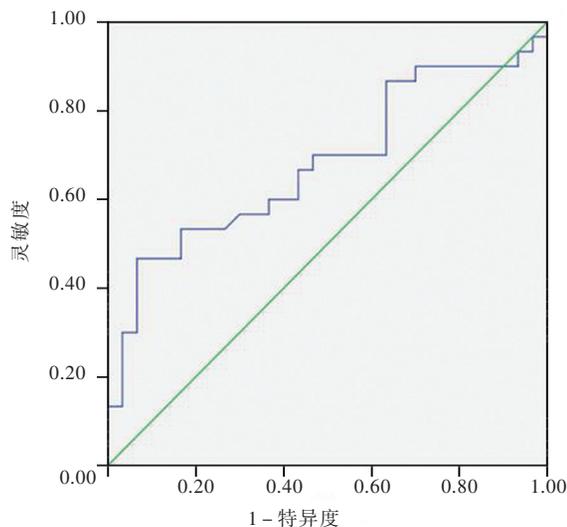


图4 ROC曲线显示,CD4⁺TCRVβ2诊断CIS的AUC为0.681(95%CI:0.543~0.819,*P*=0.016)

Figure 4. ROC curve showed that the AUC of CD4⁺TCRVβ2 in the diagnosis of CIS was 0.681 (95%CI: 0.543-0.819, *P*=0.016).

CD8⁺TCRVβ4、CD4⁺TCRVβ5序列存在显著扩增,其中CD8⁺TCRVβ4片段存在扩增与本研究结果相同,提示该片段可能对脱髓鞘疾病的诊断具有一定特异性;本研究CIS组患者未检出CD4⁺TCRVβ5序列存在扩增,可能与诊断标准和检测方法存在差异有关。另外,本研究CIS组患者CD4⁺TCRVβ11和CD8⁺TCRVβ9、11片段表达水平均低于正常对照组,目前未在文献中检索到与本研究相类似的结果,其具

体临床意义有待进一步探究。

本研究所绘制的ROC曲线提示,CD4⁺TCRVβ4、CD4⁺TCRVβ14、CD8⁺TCRVβ4对临床孤立综合征具有中等诊断价值(AUC>0.70),表明通过外周血检测对TCRVβ进行分型可能对临床孤立综合征的早期诊断具有重要价值,但这些片段的敏感性相对较高、特异性相对较低,而且这些片段表达水平的临界值均未达到扩增水平,临床应用价值有限。本研

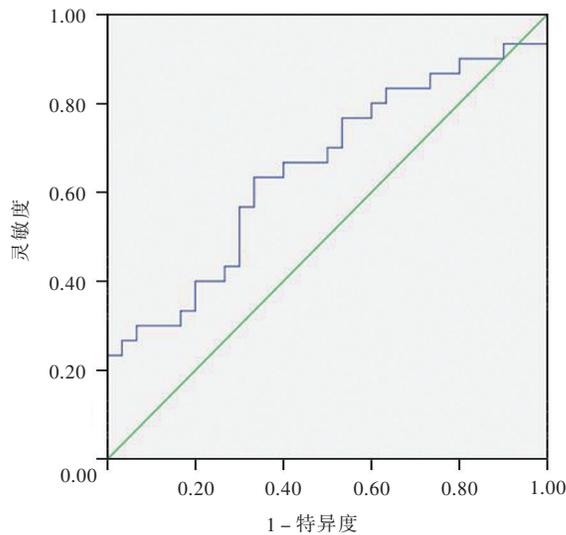


图 5 ROC 曲线显示, CD8⁺TCRVβ14 诊断 CIS 的 AUC 为 0.652(95%CI:0.512~0.792, P=0.043)

Figure 5. ROC curve showed that the AUC of CD8⁺TCRVβ14 in the diagnosis of CIS was 0.652 (95% CI: 0.512-0.792, P=0.043).

表 9 TCRVβ亚家族对 CIS 诊断效能的分析

Table 9. Analysis of diagnostic efficiency of TCRVβ subfamilies in CIS

亚家族	AUC	95%CI	P 值	临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	预测值(%)		Youden 指数
							阳性	阴性	
CD4 ⁺ TCRVβ2	0.681	0.543~0.819	0.016	9.970	33.33	88.89	87.50	63.64	0.222
CD4 ⁺ TCRVβ4	0.719	0.592~0.851	0.003	2.140	83.33	56.67	65.79	77.27	0.400
CD4 ⁺ TCRVβ14	0.713	0.581~0.845	0.005	2.460	70.00	56.25	76.67	71.88	0.263
CD8 ⁺ TCRVβ4	0.727	0.600~0.854	0.002	1.680	93.33	50.00	65.12	88.24	0.433
CD8 ⁺ TCRVβ14	0.652	0.512~0.792	0.043	5.685	47.37	54.55	64.29	62.50	0.019

AUC, area under the curve, 曲线下面积

究 CIS 组患者 CD4⁺TCRVβ2 和 CD8⁺TCRVβ14 这两组亚家族表达水平及扩增者比例差异均有统计学意义,但其诊断临床孤立综合征的 AUC ≤ 0.70,且敏感性较低,对于临床孤立综合征的早期诊断价值亦十分有限。然而,由于本研究样本量较小,且未进行脑脊液和 MRI 等相关辅助检查,无法比较相关指标的关联性,相关研究结论尚待进一步研究加以验证。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Schwenkenbecher P, Sarikidi A, Bönig L, Wurster U, Bronzlik P, Sühs KW, Pul R, Stangel M, Skripuletz T. Clinically isolated syndrome according to McDonald 2010: intrathecal IgG synthesis still predictive for conversion to multiple sclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18:2061.

[2] Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis [J]. Lancet Neurol, 2005, 4:281-288.

[3] Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ. T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis[J]. Science, 1990, 247:718-721.

[4] Watson CT, Para AE, Lincoln MR, Ramagopalan SV, Orton SM, Morrison KM, Handunnetthi L, Handel AE, Chao MJ, Morahan J, Sadovnick AD, Breden F, Ebers GC. Revisiting the T-cell receptor alpha/delta locus and possible associations with multiple sclerosis[J]. Genes Immun, 2011, 12:59-66.

[5] Efendi H. Clinically isolated syndromes: clinical characteristics, differential diagnosis, and management[J]. Noro Psikiyatr Ars, 2015, 52:S1-11.

[6] Borràs E, Cantó E, Choi M, Maria V, Álvarez-Cermeño JC, Chiva C, Montalban X, Vitek O, Comabella M, Sabidó E. Protein-based classifier to predict conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis[J]. Mol Cell Proteomics, 2016, 15:318-328.

[7] Peixoto S, Abreu P. Magnetic resonance imaging conversion predictors of clinically isolated syndrome to multiple sclerosis [J]. Acta Med Port, 2016, 29:742-748.

[8] Brownlee WJ, Miller DH. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis[J]. J Clin Neurosci, 2014, 21: 2065-2071.

[9] Hou YL, Jia YJ, Hou JT. Natural course of clinically isolated syndrome: alongitudinal analysis using a Markov mode [J]. Sci Rep, 2018, 8:10857.

[10] Muraro PA, Jacobsen M, Necker A, Nagle JW, Gaber R, Sommer N, Oertel WH, Martin R, Hemmer B. Rapid identification of local T cell expansion in inflammatory organ diseases by flow cytometric T cell receptor Vbeta analysis[J]. J Immunol Methods, 2000, 246:131-143.

- [11] Lossius A, Johansen JN, Vartdal F, Holmøy T. High-throughput sequencing of immune repertoires in multiple sclerosis[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2016, 3:295-306.
- [12] Wang CY, Fang YX, Chen GH, Jia HJ, Zeng S, He XB, Feng Y, Li SJ, Jin QW, Cheng WY, Jing ZZ. Analysis of the CDR3 length repertoire and the diversity of T cell receptor α and β chains in swine CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16:75-86.
- [13] Warabi Y, Yagi K, Hayashi H, Matsumoto Y. Characterization of the T cell receptor repertoire in the Japanese neuromyelitisoptica: T cell activity is up-regulated compared to multiple sclerosis[J]. *J Neuro Sci*, 2006, 249:145-152.
- [14] Mandel M, Achiron A, Tuller T, Barliya T, Rechavi G, Amariglio N, Loewenthal R, Lavie G. Clone clusters in autoreactive CD4 T-cell lines from probable multiple sclerosis patients form disease-characteristic signatures[J]. *Immunology*, 2009, 128:287-300.
- [15] Slansky JE, Nakayama M. Peptide mimotopes alter T cell function in cancer and autoimmunity[J]. *Semin Immunol*, 2020, 47:101395.
- [16] Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. Memory CD4⁺ CD127^{high} T cells from patients with multiple sclerosis produce IL-17 in response to myelin antigens[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 226:185-191.
- [17] Willing A, Jäger J, Reinhardt S, Kursawe N, Friese MA. Production of IL-17 by MAIT cells is increased in multiple sclerosis and is associated with IL-7 receptor expression[J]. *J Immunol*, 2018, 200:974-982.
- [18] van Nierop GP, van Luijn MM, Michels SS, Melief MJ, Janssen M, Langerak AW, Ouwendijk WJ, Hintzen RQ, Verjans GM. Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134:383-401.
- [19] Démoulin T, Mouthon F, Clayette P, Bequet D, Gachelin G, Dormont D. The same TCR (N) D beta (N) J beta junctional region is associated with several different Vbeta13 subtypes in a multiple sclerosis patient at the onset of the disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2003, 14:470-482.
- [20] Planas R, Metz I, Martin R, Sospedra M. Detailed characterization of T cell receptor repertoires in multiple sclerosis brain lesions[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:509.

(收稿日期:2020-09-16)

(本文编辑:彭一帆)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(三)

- 肌肉特异性受体酪氨酸激酶
muscle-specific receptor tyrosine kinase(MuSK)
- 基本日常生活活动能力
basic activities of daily living(BADL)
- 基底动脉 basal artery(BA)
- 极低密度脂蛋白 very low-density lipoprotein(VLDL)
- 急性播散性脑脊髓炎
acute disseminated encephalomyelitis(ADEM)
- 疾病修饰药物 disease modifying agents(DMA)
- N-甲基-D-天冬氨酸受体
N-methyl-D-aspartate receptor(NMDAR)
- 甲状腺过氧化物酶 thyroid peroxidase(TPO)
- 甲状腺球蛋白 thyroglobulin(TG)
- 简易智能状态检查量表
Mini-Mental State Examination(MMSE)
- 间接免疫荧光法 indirect immunofluorescence assay(IFA)
- 僵肢综合征 stiff-limb syndrome(SLS)
- 接触蛋白相关蛋白-2
contactin-associated protein 2(CASPR2)
- 进行性多灶性白质脑病
progressive multifocal leukoencephalopathy(PML)
- 进行性核上性麻痹 progressive supranuclear palsy(PSP)
- 进行性核上性麻痹步态冻结型
PSP with progressive gait freezing(PSP-PGF)
- 进行性核上性麻痹额叶症状型
PSP with predominant frontal presentation(PSP-F)
- 进行性核上性麻痹孤立性眼球活动障碍型
PSP with predominant ocular motor dysfunction(PSP-OM)
- 进行性核上性麻痹孤立性姿势不稳型
PSP with postural instability(PSP-PI)
- 进行性核上性麻痹理查森型
PSP with Richardson's syndrome(PSP-RS)
- 进行性核上性麻痹帕金森综合征型
PSP with parkinsonism(PSP-P)
- 进行性核上性麻痹皮质基底节综合征型
PSP with corticobasal syndrome(PSP-CBS)
- 进行性核上性麻痹小脑共济失调型
PSP with predominant cerebellar ataxia(PSP-C)
- 进行性核上性麻痹言语障碍型
PSP with predominant speech or language disorder(PSP-SL)
- 颈内动脉 internal carotid artery(ICA)
- 局灶性皮质发育不良 focal cortical dysplasia(FCD)
- 聚偏二氟乙烯 polyvinylidene fluoride(PVDF)
- 抗核抗体 anti-nuclear antibody(ANA)
- 抗磷脂抗体 anti-phospholipid antibody(APL)
- 抗内皮细胞抗体 anti-endothelial cell antibody(AECA)
- 抗神经节苷脂抗体 anti-ganglioside antibody(AGA)
- 抗双链DNA抗体
anti-double stranded DNA antibody(dsDNA)
- 抗线粒体抗体 anti-mitochondria antibody(AMA)
- 抗心磷脂抗体 anti-cardiolipin antibody(ACA)
- 抗中性粒细胞胞质抗体
anti-neutrophil cytoplasmic antibody(ANCA)