

吉兰-巴雷综合征患者外周血 Th17 细胞和 IL-23 表达变化与其发病机制的相关性研究

何改平 张彬 张宝文 乔梁杰

【摘要】 探讨吉兰-巴雷综合征患者外周血 Th17 细胞、血清和脑脊液 IL-23 表达变化在其免疫发病机制中的作用。流式细胞术和酶联免疫吸附试验显示, 吉兰-巴雷综合征组患者外周血 Th17 细胞比例 $[(4.86 \pm 0.60)\%]$ 和血清 IL-23 水平 $[(111.80 \pm 13.84) \text{ pg/ml}]$ 均高于对照组 $[(2.71 \pm 0.54)\%、(72.55 \pm 8.19) \text{ pg/ml}]$, 差异有统计学意义 ($t = 2.616, P = 0.012; t = 2.300, P = 0.026$)。吉兰-巴雷综合征组患者经静脉注射免疫球蛋白后, 血清和脑脊液 IL-23 水平恢复正常 $[(74.13 \pm 6.18) \text{ 和 } (72.92 \pm 12.09) \text{ pg/ml}]$, 与治疗前 $[(110.50 \pm 15.66) \text{ 和 } (102.30 \pm 7.52) \text{ pg/ml}]$ 相比, 差异具有统计学意义 ($t = 2.557, P = 0.022; t = 1.422, P = 0.046$)。吉兰-巴雷综合征患者外周血 Th17 细胞比例增加、血清和脑脊液 IL-23 水平升高, 提示二者可能参与吉兰-巴雷综合征的发生与发展。

【关键词】 多发性神经根神经病; T 淋巴细胞, 辅助诱导; 白细胞介素 23

A study of the changes of Th17 cells and IL - 23 in patients with Guillain - Barré syndrome

HE Gai-ping, ZHANG Bin, ZHANG Bao-wen, QIAO Liang-jie
Department of Neurology, Tianjin Fourth Hospital, Tianjin 300222, China
Corresponding author: HE Gai-ping (Email: hgptj@126.com)

【Abstract】 Guillain - Barré syndrome (GBS) is an acute autoimmune - mediated inflammatory neuropathy. In this paper, the percentage of Th17 in peripheral blood lymphocyte and the level of IL-23 in serum and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with GBS were detected. Twenty-five patients with GBS and 20 controls were analyzed. The percentage of Th17 cells in patients with GBS was $(4.86 \pm 0.60)\%$, which was higher than that in controls $[(2.71 \pm 0.54)\%; t = 2.616, P = 0.012]$. Serum IL-23 increased in patients with GBS $[(111.80 \pm 13.84) \text{ pg/ml vs } (72.55 \pm 8.19) \text{ pg/ml}; t = 2.300, P = 0.026]$. The level of IL-23 in serum and CSF from patients with GBS before therapy $[(110.50 \pm 15.66) \text{ and } (102.30 \pm 7.52) \text{ pg/ml}]$ declined to normal after therapy $[(74.13 \pm 6.18) \text{ and } (72.92 \pm 12.09) \text{ pg/ml}]$, and the difference was statistically significant ($t = 2.557, P = 0.022; t = 1.422, P = 0.046$). Th17 cells and IL-23 increased in patients with GBS, indicating that they may involve in the pathogenesis of GBS.

【Key words】 Polyradiculoneuropathy; T-lymphocytes, helper-inducer; Interleukin-23

吉兰-巴雷综合征(GBS)是一类由免疫应答反应介导的急性炎症性周围神经病。呈急性发病, 症状与体征多于 2 周达高峰, 表现为多发神经根及周围神经损害, 脑脊液蛋白-细胞分离, 以单相自限性病程为主, 静脉注射免疫球蛋白(IVIg)和血浆置换疗法有效^[1]。细胞和体液免疫异常可能参与其发病, 自身抗神经节苷酯抗体多见于轴索变性和

Fisher 综合征患者, 而 CD4⁺T 细胞诱导巨噬细胞引起的脱髓鞘改变可能参与脱髓鞘型的发病^[2-3]。Th17 细胞是新发现的辅助性 T 细胞(Th), 在 IL-23 等细胞因子刺激下由 Th0 细胞分化成的 Th17 细胞主要分泌 IL-17 和 23 等细胞因子, 维 A 酸相关孤儿受体 γt (ROR γt) 是其重要转录因子。研究显示, Th17 细胞在感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤免疫中均具有重要意义^[4]。在本研究中, 我们对 25 例吉兰-巴雷综合征患者外周血 Th17 细胞、血清和脑脊液 IL-23 表达水平进行观察, 旨在探讨 Th17 细胞在吉兰-巴雷综合征免疫发病机制中的作用。

资料与方法

一、一般资料

选择 2009 年 1 月-2013 年 6 月在天津市第四医院就诊且符合我国吉兰-巴雷综合征诊断标准^[1]的患者 25 例,男性 14 例,女性 11 例;年龄 27~61 岁,中位年龄 42 岁;一经明确诊断均静脉注射免疫球蛋白 $[0.40\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$,5 d 为一疗程。选择同期在我院进行体格检查的健康志愿者共 20 例,男性 10 例,女性 10 例;年龄 40~75 岁,中位年龄 57 岁。两组受试者性别($\chi^2 = 0.161, P = 0.769$)、年龄($\chi^2 = 0.327, P = 0.593$)比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),均衡可比。本研究方案获我院伦理道德委员会批准,所有受试者均知情并签署知情同意书。

二、观察方法

1. 主要试剂与仪器 本研究所用鼠抗人藻红蛋白(PE)-IL-23R(0.50 mg/ml)、异硫氰酸荧光素(FITC)-CD4(0.50 mg/ml)、别藻青蛋白(APC)-CD3(0.50 mg/ml)、PE-IgG1(0.50 mg/ml)、FITC-IgG1(0.50 mg/ml)、APC-IgG1(0.50 mg/ml)单克隆抗体和溶血素均为美国 BD Biosciences Pharmingen 公司产品。酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒由美国 R&D 公司提供。FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。Elx-800 光吸收酶标仪为美国 BioTek 公司产品。

2. 流式细胞术检测外周血 Th17 细胞 (1)标本采集:所有受试者均晨起空腹采集外周血 2 ml、肝素抗凝。试管中滴加全血 100 μl ,分别加入 APC-CD3、FITC-CD4、PE-IL-23R 和同型 IgG1 对照单克隆抗体 20 μl ,混匀、室温避光孵育 30 min;滴加溶血素 2 ml,室温避光 10 min 溶解红细胞;离心半径 13.50 cm、1500 r/min 高速离心 5 min,去上清,加入磷酸盐缓冲液 5 ml,高速离心 5 min,去上清(重复 2 次),200 μl 多聚甲醛溶液固定 20 min。(2)流式细胞仪分析:采用 FACSCalibur 流式细胞仪 CellQuest3.0 分析软件(Macintosh)获取外周血 Th17 细胞并分析,以 IgG1 为同型对照,去除背景荧光。由于外周血树突状细胞(DC)前向角与单核细胞相似,侧向角与淋巴细胞相似,故以前向角和侧向角设门,选择单个核细胞群(含淋巴细胞和单核细胞),去除粒细胞和细胞碎片,获取 20×10^3 个细胞进行分析。

3. ELISA 法检测脑脊液和血清 IL-23 表达变化

(1)标本采集:选择无腰椎穿刺禁忌证者,采集脑

脊液 2 ml,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存储存。所有受试者均晨起空腹采集外周血 2 ml、肝素抗凝;离心半径 13.50 cm、1500 r/min 高速离心 5 min,取上清液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存储存。(2)ELISA 法检测:血清 IL-23 检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行,采用 Elx-800 光吸收酶标仪检测 450 nm 处光密度(OD)值。

三、统计分析方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

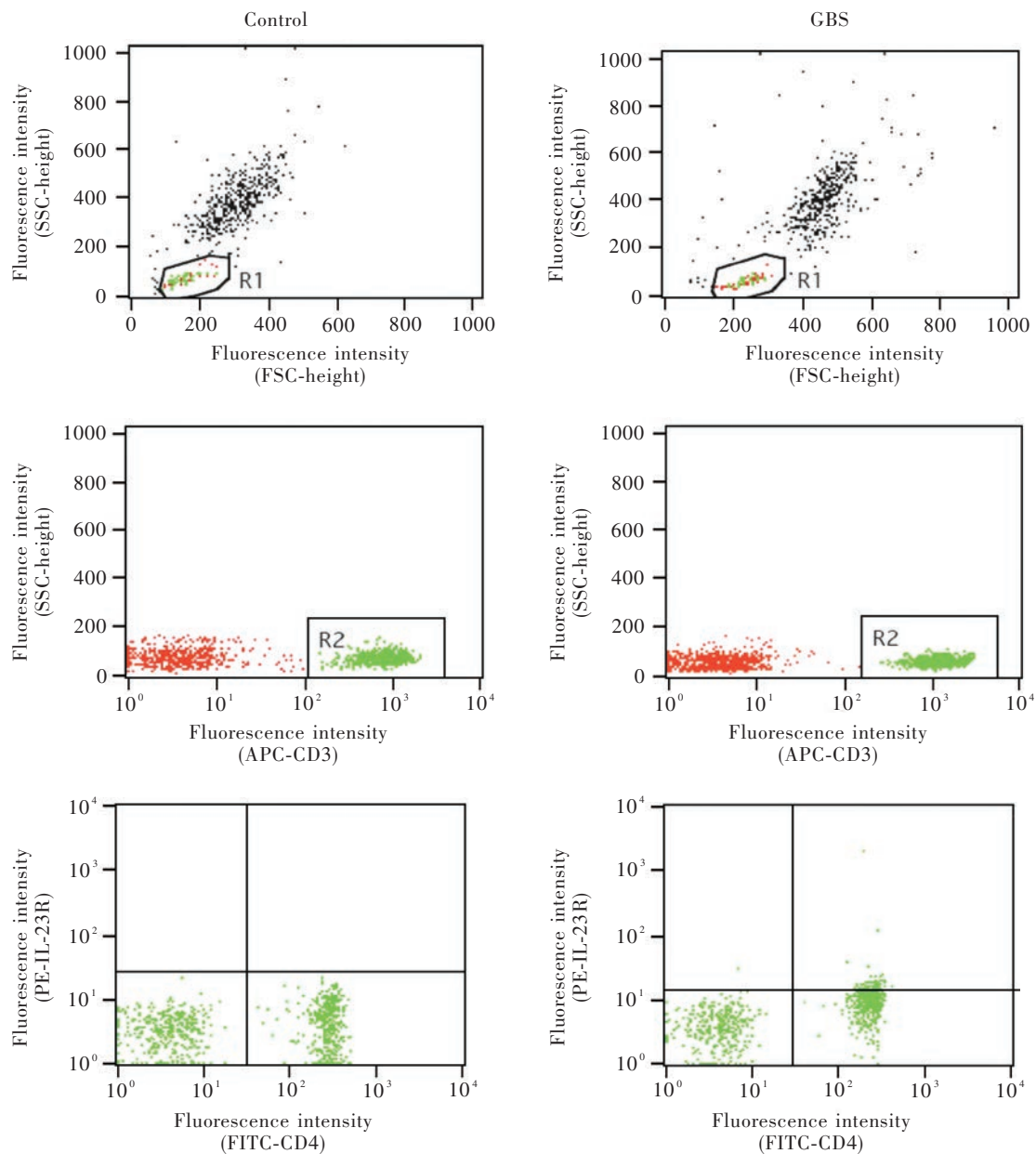
结 果

流式细胞术检测显示,吉兰-巴雷综合征组患者外周血 Th17 细胞(CD3+CD4+IL-23R+外周血单个核细胞)比例为 $(4.86 \pm 0.60)\%$,高于正常对照组的 $(2.71 \pm 0.54)\%$ ($t = 2.616, P = 0.012$);其中 16 例静脉注射免疫球蛋白治疗前外周血 Th17 细胞比例为 $(4.86 \pm 0.85)\%$ 、治疗后降至 $(3.41 \pm 0.44)\%$,差异有统计学意义[差值为 $(1.45 \pm 0.52)\%$; $t = 2.781, P = 0.014$;图 1,2]。

ELISA 法检测显示,吉兰-巴雷综合征组患者血清 IL-23 表达水平为 (111.80 ± 13.84) pg/ml,与正常对照组的 (72.55 ± 8.19) pg/ml 相比,差异有统计学意义($t = 2.300, P = 0.026$);其中 15 例静脉注射免疫球蛋白治疗前血清 IL-23 表达水平为 (110.50 ± 15.66) pg/ml、治疗后降至 (74.13 ± 6.18) pg/ml,差异有统计学意义[差值为 (36.40 ± 14.23) pg/ml; $t = 2.557, P = 0.022$;图 3]。同时,吉兰-巴雷综合征组患者静脉注射免疫球蛋白治疗前脑脊液 IL-23 表达水平为 (102.30 ± 7.52) pg/ml,治疗后降至 (72.92 ± 12.09) pg/ml,差异有统计学意义[差值为 (29.42 ± 13.12) pg/ml; $t = 1.422, P = 0.046$;图 4]。

讨 论

Th17 细胞参与调节自身免疫性疾病,研究发现,IL-23 可以诱导 Th17 细胞的产生,导致实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)。最初认为,Th1 细胞通过诱导 IL-12(包括 IL-12p40 和 IL-12p35)而致实验性自身免疫性脑脊髓炎,后续研究发现,IL-12p35 缺乏小鼠在无 Th1 细胞的参与下仍能诱发实验性自身免疫性脑脊髓炎^[4]。其原因是 IL-12p35 缺乏小鼠体内存在 IL-23,后者即为诱发实验性自身免疫性脑脊



GBS, Guillain-Barré syndrome, 吉兰-巴雷综合征; FSC, forward scatter, 前向角散射光; SSC, side scatter, 侧向角散射光; APC, allophycocyanin, 别藻青蛋白; FITC, fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素; PE, phycoerythrin, 藻红蛋白

图1 吉兰-巴雷综合征组与正常对照组受试者外周血Th17细胞流式细胞术检测结果

Figure 1 Peripheral blood Th17 cells in patients with Guillain-Barré syndrome and in health controls were detected by using flow cytometry.

髓炎的免疫学机制。随后的动物实验进一步证实, IL-23 基因多态性及其下游信号异常与人类自身免疫性疾病相关, 如炎症性肠病、银屑病和再生障碍性贫血等^[5-6]; 而 Th17 细胞导致的组织破坏可以通过直接识别抗原特异性抗体或招募中性粒细胞和巨噬细胞进入微环境而诱发自身免疫性疾病。在实验性自身免疫性脑脊髓炎发病过程中, IL-17 可以

诱导内皮细胞产生氧自由基而致血-脑屏障破坏, 并促进炎症因子 IL-1、IL-6 和趋化因子配体 20 (CCL20) 的产生。CCL20 为髓系细胞趋化因子, Th17 细胞高表达其受体 CCR6 并产生 IL-9, 通过后两者增强 T 细胞和 IL-6 分泌巨噬细胞效应, 进一步加重实验性自身免疫性脑脊髓炎病变程度。与此同时, Th17 细胞尚可产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激

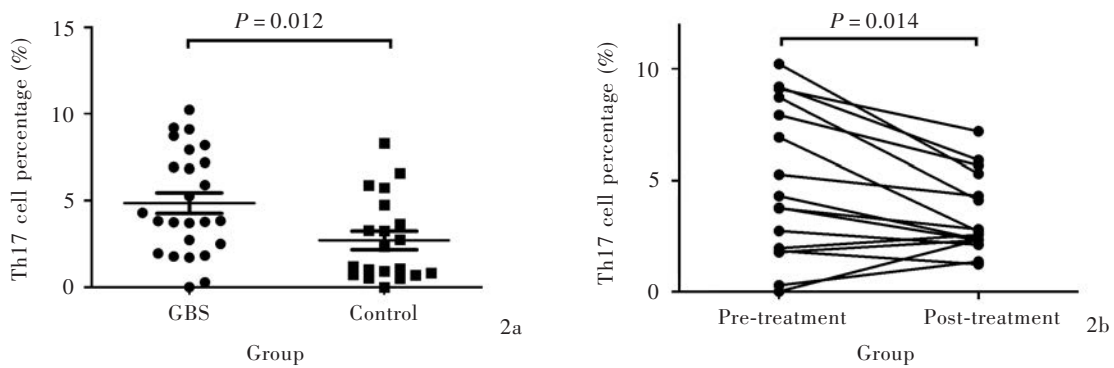


图2 外周血Th17细胞比例分析 2a 吉兰-巴雷综合征组患者外周血Th17细胞比例高于正常对照组 2b 与治疗前相比,治疗后吉兰-巴雷综合征组患者外周血Th17细胞比例降低

Figure 2 The percentage of Th17 cells in patients with Guillain-Barré syndrome was higher than that in health controls (Panel 2a). The percentage of Th17 cells decreased in patients with Guillain-Barré syndrome after therapy (Panel 2b).

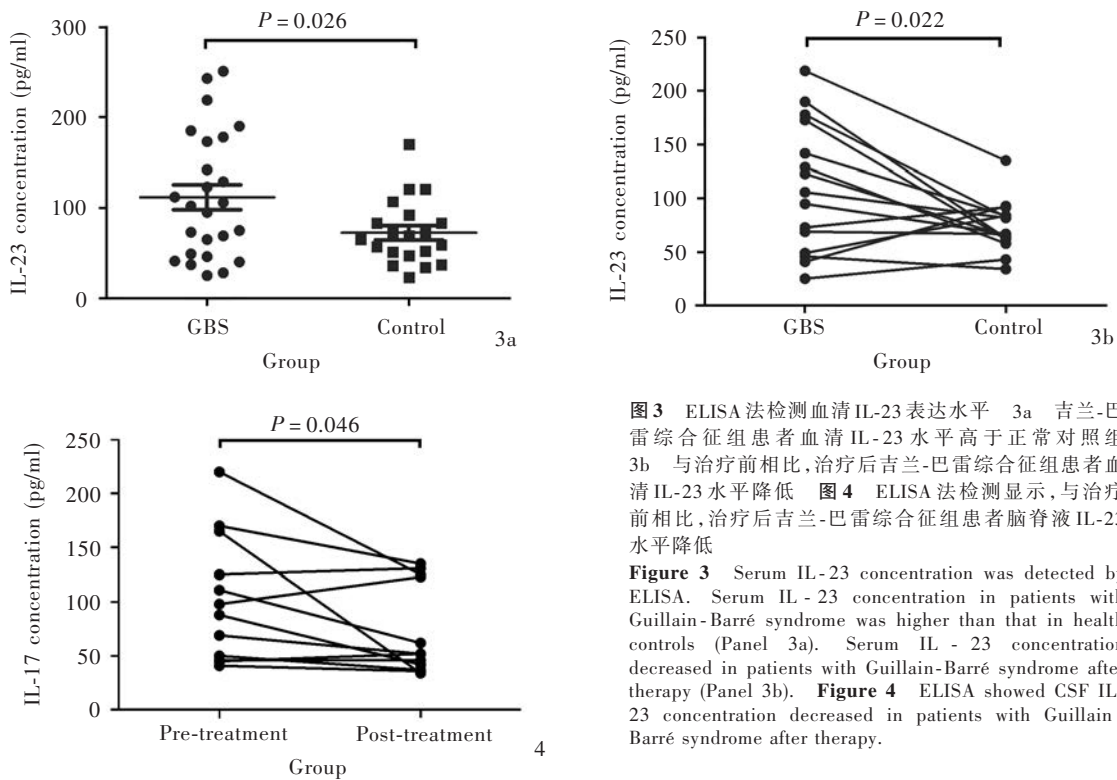


图3 ELISA法检测血清IL-23表达水平 3a 吉兰-巴雷综合征组患者血清IL-23水平高于正常对照组 3b 与治疗前相比,治疗后吉兰-巴雷综合征组患者血清IL-23水平降低 图4 ELISA法检测显示,与治疗前相比,治疗后吉兰-巴雷综合征组患者脑脊液IL-23水平降低

Figure 3 Serum IL - 23 concentration was detected by ELISA. Serum IL - 23 concentration in patients with Guillain-Barré syndrome was higher than that in health controls (Panel 3a). Serum IL - 23 concentration decreased in patients with Guillain-Barré syndrome after therapy (Panel 3b). Figure 4 ELISA showed CSF IL - 23 concentration decreased in patients with Guillain-Barré syndrome after therapy.

因子(GM-CSF),作用于髓系细胞并诱导产生IL-1、6和23,以及主要组织相容性复合物(MHC)Ⅱ,因此阻断粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子信号可有效避免小鼠发生自身免疫性疾病^[7]。

有研究显示,多发性硬化患者外周血Th17细胞数目明显增多,其中枢神经系统损伤部位IL-17A和干扰素- γ (IFN- γ)表达水平明显升高^[8]。Th17细胞还可能与银屑病有关,IL-23、17和22参与其发病过程;作用于IL-12/IL-23亚单位p40的单克隆抗体

Ustekinumab治疗银屑病有效,而且抗IL-17受体单克隆抗体Brodalumab在绝大多数银屑病患者中业已取得良好疗效^[9]。动物实验结果证实,IL-23可直接导致结肠炎小鼠产生病理性辅助性T细胞,而且干扰素- γ 可导致结肠黏膜损伤^[4]。有研究发现,Crohn病患者肠道分泌IL-17和CD4⁺T细胞明显增多,这些细胞均表达CD161、CCR6和CCR4^[4]。临床前期试验证实,Brodalumab治疗Crohn病无效且不良反应明显^[2],但Ustekinumab的临床应用获得了较

好的疗效^[10]。提示在 Crohn 病发病过程中, IL-23 不仅通过 Th17 细胞引起炎症反应, 还可通过肠黏膜内固有淋巴细胞引起炎症反应。

目前, 各种调节 Th17 细胞药物正在研究中^[11], 如地高辛抑制 Th17 细胞发育、调节 RoR α 和 RoR γ t 活性等。在 Th17 细胞介导的自身免疫性疾病发病中, 以 IL-23 为主、IL-17 为辅诱发炎症反应, 而病理性 Th17 细胞主要参与类似 Th1 细胞免疫反应^[12]。

在本研究中, 吉兰-巴雷综合征组患者外周血 Th17 细胞比例和血清 IL-23 水平均明显高于正常对照组, 经静脉注射免疫球蛋白后病情好转, 外周血 Th17 细胞比例和血清 IL-23 水平明显下降, 表明 Th17 细胞可能参与吉兰-巴雷综合征的免疫发病机制。对吉兰-巴雷综合征患者脑脊液 IL-23 水平分析显示, 静脉注射免疫球蛋白前脑脊液 IL-23 处于较高水平, 治疗后逐渐下降, 提示 IL-23 在吉兰-巴雷综合征中枢神经系统损害中具有重要作用。刘海螺等^[13]观察 38 例吉兰-巴雷综合征患儿静脉注射免疫球蛋白治疗前后血清 IL-17、23 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达变化, 吉兰-巴雷综合征组患儿治疗前血清 IL-17、23 和 TNF- α 水平均明显高于正常对照组, 治疗后上述细胞因子水平明显下降, 提示炎症因子在儿童吉兰-巴雷综合征的发生与发展过程中起重要作用。Li 等^[14]对 22 例吉兰-巴雷综合征患者血清和脑脊液 IL-17 和 22 表达变化的观察显示, 二者水平均明显升高, 且与疾病严重程度密切相关。推测 IL-17 和 22 表达上调可能与血-脑屏障破坏、周围神经局部炎症反应有关, 可能参与了吉兰-巴雷综合征的发病。

综上所述, 吉兰-巴雷综合征患者外周血 Th17 细胞比例增加、血清和脑脊液 IL-23 表达升高, 可能参与该病的免疫发病机制。针对 Th17 细胞或 IL-23 的单克隆抗体和小分子物质可能成为治疗吉兰-巴雷综合征的有效药物, 值得进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Chinese Medical Association Neurology Branch Neuromuscular Disease Group, Chinese Medical Association Neurology Branch Electromyography and Clinical Nerve Electrophysiology Group, Chinese Medical Association Neurology Branch Neuroimmunology Group. China guideline for diagnosis and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2010, 43:583-586. [中华医学会神经病学分会神经肌肉病学组, 中华医学会神经病学分会肌电图及临床神经电生理学组, 中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 中国吉兰-巴

雷综合征诊治指南. *中华神经科杂志*, 2010, 43:583-586.]

[2] Yuki N, Hartung HP. Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med*, 2012, 366:2294-2304.

[3] Zhang J, Guo L. Progress in pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2012, 12:117-121. [张静, 郭力. 吉兰-巴雷综合征发病机制研究进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2012, 12:117-121.]

[4] Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, 2013, 121:2402-2414.

[5] Takaku T, Calado RT, Kajigaya S, Young NS. Interleukin-23 receptor (IL-23R) gene polymorphisms in acquired aplastic anemia. *Ann Hematol*, 2009, 88:653-657.

[6] Zwiers A, Kraal L, van de Pouw Kraan TC, Wurdinger T, Bouma G, Kraal G. Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production. *J Immunol*, 2012, 188:1573-1577.

[7] Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*, 2011, 12:560-567.

[8] Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH; Ustekinumab MS Investigators. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing - remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol*, 2008, 7:796-804.

[9] Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, Aras G, Li J, Russell CB, Thompson EH, Baumgartner S. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med*, 2012, 366:1181-1189.

[10] Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, Wehkamp J, Feagan BG, Yao MD, Karczewski M, Karczewski J, Pezous N, Bek S, Bruin G, Mellgard B, Berger C, Londei M, Bertolino AP, Tougas G, Travis SP; Secukinumab in Crohn's Disease Study Group. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 2012, 61:1693-1700.

[11] Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, Istrate MA, Kamenecka TM, Roush WR, Vidovic D, Schürer SC, Xu J, Wagoner G, Drew PD, Griffin PR, Burris TP. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature*, 2011, 472:491-494.

[12] Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*, 2010, 464:1371-1375.

[13] Liu HL, Gao YX, Li SL, Li H, Ma AH, Xi JS, Zhang XY. Function of interleukin-17, interleukin-23 and tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Shi Yong Er Ke Lin Chuang Za Zhi*, 2012, 27:1675-1677. [刘海螺, 高玉兴, 李淑兰, 李慧, 马爱华, 席家水, 张新颖. 白细胞介素-17、白细胞介素-23 和肿瘤坏死因子- α 在吉兰-巴雷综合征发病中的作用. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27:1675-1677.]

[14] Li S, Yu M, Li H, Zhang H, Jiang Y. IL-17 and IL-22 in cerebrospinal fluid and plasma are elevated in Guillain-Barré syndrome. *Mediators Inflamm*, 2012:ID260473.

(收稿日期: 2014-03-03)