

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.008

Th1/Th9/Th17 细胞失衡对实验性自身免疫性重症肌无力幼鼠的影响及机制初探

郭丽丽¹, 黄志¹, 吴惧²

(1. 重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014; 2. 成都市妇女儿童中心医院神经内科, 成都 610091)

【摘要】目的:对实验性自身免疫性重症肌无力(myasthenia gravis, MG)幼鼠采用双类似物(Lys262-Ala207)经鼻黏膜诱导免疫耐受后, 了解实验幼鼠 Th1/Th17/Th9 细胞及产生相关细胞因子的细胞变化情况及其与 EAMG 幼鼠发病的相关性, 探讨其调控作用机制。**方法:**将 30 只幼年雌性 C57BL/6 小鼠采用完全随机分组方法分为 3 组: 模型组、耐受组 and 对照组。模型组经腹腔注射含 1.0 mg/kg mAb35 的 Ringer's 液 0.2 ml, 建立 EAMG 模型; 耐受组在致敏前 10 d 先经鼻黏膜滴入 Lys262-Ala207 诱导黏膜耐受, 再按照模型组方式进行处理; 对照组注射不含 mAb35 的 Ringer's 缓冲液 0.2 ml。采用流式细胞仪检测小鼠脾脏细胞中分别代表 Th1/Th17/Th9 细胞功能的 CD4⁺ 干扰素(interferon, IFN)- γ 细胞、CD4⁺ 白介素(interleukin, IL)-17⁺ 细胞和 CD4⁺ IL-9⁺ 细胞的含量。采用双抗体夹心 ELISA 法检测脾细胞培养上清中 IFN- γ 、IL-17、IL-9 的水平。**结果:**(1)MG 的临床表现对耐受组明显轻于模型组和耐受组, 而耐受组经双类似物免疫耐受后, 其临床症状也较模型组明显减轻。(2)模型组、耐受组和对照组的 CD4⁺ IFN- γ ⁺ 细胞含量 3 组间比较差异有统计学意义($P=0.00$), 即: 模型组分别比耐受组和对照组高($P=0.00$), 而耐受组也比对照组高($P=0.00$); (3)模型组、耐受组和对照组的 CD4⁺ IL-17⁺ 细胞含量 3 组间比较差异有统计学意义($P=0.00$), 即: 模型组分别比耐受组和对照组高($P=0.00$), 而耐受组也比对照组高($P=0.00$); (4)模型组、耐受组和对照组的 CD4⁺ IL-9⁺ 细胞含量 3 组间比较差异有统计学意义($P=0.00$), 即: 模型组分别比耐受组和对照组高($P=0.00$), 而耐受组也比对照组高($P=0.00$)。 (5)模型组、耐受组和对照组的脾细胞上清中细胞因子 IFN- γ 、IL-17、IL-9 的水平 3 组间比较差异有统计学意义($P=0.00$), 即: 模型组分别比耐受组和对照组高($P=0.00$), 而耐受组也比对照组高($P=0.00$)。**结论:**采用 Lys262-Ala207 对实验幼鼠进行鼻黏膜耐受后不仅能有效的缓解其 MG 的临床症状, 同时还能下调导致实验幼鼠发病的 CD4⁺ IFN- γ ⁺ 细胞、CD4⁺ IL-17⁺ 细胞和 CD4⁺ IL-9⁺ 细胞含量水平以及细胞因子 IFN- γ 、IL-17、IL-9 的水平, 缓解 Th1/Th17/Th9 细胞功能失衡现象, 从而达到预防和减轻实验幼鼠发病的作用。

【关键词】实验性自身免疫性重症肌无力; 鼻黏膜耐受; 双类似物; Th1/Th17/Th9 细胞

【中图分类号】R746.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-08-29

Effects of Th1/Th9/Th17 cells imbalance on young rats with experimental autoimmune myasthenia gravis and its mechanism

Guo Lili¹, Huang Zhi¹, Wu Ju²

(1. Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Ministry of Education, Key Laboratory of Child Developmental Diseases, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders;
2. Department of Neurology, Women's & Children's Central Hospital in Chengdu)

【Abstract】Objective: To study the variation of Th1/Th17/Th9 cells which produce cytokines and to explore the correlation between these cells and pathogenesis of experimental autoimmune myasthenia gravis(EAMG) young mice after being treated with dual analogue(Lys262-Ala207) to create immune tolerance effect through nasal mucosa. **Methods:** Thirty young C57BL/6 female rats were randomized into three groups: model group, tolerance group and control group. Rats in model group were injected with 0.2 ml Ringer's containing mAb35(1.0 mg/kg) to establish EAMG model; rats in tolerance group were given Lys262-Ala207 intranasally for ten successive days before immunization then were injected 0.2 ml Ringer's containing mAb35(1.0 mg/kg); rats in control group were intraperi-

作者介绍: 郭丽丽, Email: 394322592@qq.com,

研究方向: 小儿神经内科。

通信作者: 黄志, Email: huangzhi3500@aliyun.com。

基金项目: 重庆市卫生局科研基金重点资助项目(编号: 2011-1-077)。

toneally injected 0.2 ml Ringer's without containing mAb35(1.0 mg/kg). Cells of CD4⁺ IFN- γ ⁺, CD4⁺ IL-17⁺ and CD4⁺ IL-9⁺, which respectively represent the cells of Th1/Th17/Th9 in spleen cell of young rats were detected by flow cytometry. IFN-

γ 、IL-17 和 IL-9 在脾脏细胞上清液中由抗体-三明治 ELISA 检测。 **Results:** (1) 临床症状在模型组、耐受组和对照组中，模型组最明显，耐受组临床症状减轻。 (2) 三组间 CD4⁺IFN- γ ⁺ 含量有显著差异 ($P=0.00$)；模型组 CD4⁺IFN- γ ⁺ 含量高于耐受组和对照组 ($P=0.00$)。 (3) 三组间 CD4⁺IL-17⁺ 含量有显著差异 ($P=0.00$)；模型组 CD4⁺IL-17⁺ 含量高于耐受组和对照组 ($P=0.00$)。 (4) 三组间 CD4⁺IL-9⁺ 含量有显著差异 ($P=0.00$)；模型组 CD4⁺IL-9⁺ 含量高于耐受组和对照组 ($P=0.00$)。 (5) 三组间 IFN- γ 、IL-17 和 IL-9 在脾脏细胞上清液中的含量有显著差异 ($P=0.00$)，模型组含量高于耐受组和对照组 ($P=0.00$)，耐受组含量高于对照组 ($P=0.00$)。 **Conclusions:** 临床症状在模型组、耐受组和对照组中，模型组最明显，耐受组临床症状减轻。 CD4⁺IFN- γ ⁺、CD4⁺IL-17⁺ 和 CD4⁺IL-9⁺ 含量以及 IFN- γ 、IL-17 和 IL-9 含量在模型组、耐受组和对照组中，模型组最高，耐受组次之，对照组最低。 这表明通过鼻黏膜耐受可以减轻临床症状，恢复 Th1/Th17/Th9 细胞平衡，从而减轻临床症状。 这明确了鼻黏膜耐受在免疫耐受中的作用。

【Key words】experimental autoimmune myasthenia gravis; nasal tolerance; dual analogue; Th1/Th17/Th9 cells

重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是 B 细胞介导、T 细胞依赖、细胞因子及补体参与的器官特异性自身免疫性疾病。实验性自身免疫性重症肌无力 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) 动物模型在临床表现、电生理和病理学等方面与 MG 极为相似^[1-2]，从而为 EAMG 作为 MG 的动物模型提供了条件。尽管 B 细胞及其产生的抗乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) 的抗体是其发病的主要机制，然而，AChR 特异性 T 细胞被重新激活，并辅助 B 细胞产生抗 AChR Ab，被认为是 MG/EAMG 发病的始动因素，在疾病的发生及发展中发挥着重要作用。目前的研究发现^[3-4]，CD4⁺T 细胞不仅可分化为 Th1、Th2、CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 (T regulatory cells, Treg)，还可以分化为 Th17、Th9 细胞。而 Th17、Th9 作为新近发现 Th 细胞，在 EAMG 的发病及免疫耐受中的作用如何，它们之间的相互关系如何？目前尚少见相关的报道。因此，本研究拟通过双类似物对 EAMG 幼鼠进行免疫耐受研究，检测小鼠脾脏细胞中 CD4⁺干扰素 (interferon, IFN)- γ ⁺ 淋巴细胞、CD4⁺白介素 (interleukin, IL)-17⁺ 淋巴细胞和 CD4⁺IL-9⁺ 淋巴细胞的含量，了解 Th1/Th17/Th9 细胞与 EAMG 幼鼠发病的相关性和三者之间的相互关系，探讨鼻黏膜耐受对 EAMG Th1/Th17/Th9 细胞亚群失衡的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

健康清洁级，雌性 C57BL/6 小鼠 30 只，4~5 周龄，体重 11~13 g (重庆医科大学实验动物中心提供)。乙酰胆碱受体单克隆抗体 (mAb35)，购自美国 Sigma 公司；耐受肽：Lys262-Ala207 是由氨基酸自动合成仪合成并链接的 2 条单个氨基酸置换的多肽类似物，作为本实验的耐受肽 (V-I-V-K-L-I-P-S-T-S-S-A-V-D-T-P-Y-L-D-I-T-Y-H-F-V-A-Q-R-L-P-L)，由吉尔生化 (上海) 有限公司合成，耐受肽经主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 结合实验证明其具有结合、黏附从脾细胞分离的 T 细胞或提纯的 MHC 分子的能力^[5]；任氏 (Ringer's) 缓冲液 (含 140 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 2.4 mmol/L NaHCO₃, pH 7.4)；RPMI1640 培养液、小牛血清购自 GIBCO 公司；佛波醇 (phorbolmyristic acetate, PMA)、离子霉素、莫能霉素购自美国 Sigma 公司；FITC 标记抗小鼠 CD4 抗体，PERCP 标记抗小鼠 CD3 抗体，Alexa Fluor® 647 标记抗小鼠 IFN- γ 抗体，Alexa Fluor® 647 标记抗小鼠 IL-17A 抗体，PE 标记抗小鼠 IL-9 抗体及其相匹配的同型对照抗体，固定破膜套装均购自美国 BD 公司；小鼠 IFN- γ 、IL-17、IL-9 ELISA 试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司；流式细胞仪 (型号 FACS Calibur) 为 BD 公司产品。

1.2 模型

将 30 只 C57BL/6 小鼠分成 3 组：MG 模型组、耐受组和对照组。每组 10 只，参照本课题组前期所成功建立的 EAMG 动物模型剂量 (1.0 mg/kg)^[6]经腹腔注射含 mAb35 的 Ringer's 液 0.2 ml 建立模型，对照组注射不含 mAb35 的 Ringer's 液

0.2 ml。鼻腔耐受的诱导:致敏前 10 d 水合氯醛腹腔注射浅麻醉小鼠后,用微量加样器取含有耐受肽 25 μg 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)50 μl 滴入 2 个鼻孔,每个鼻孔 25 μl ,连续 10 d。对照组滴入不含耐受肽的 PBS 50 μl ,每个鼻孔 25 μl ,连续 10 d。

1.3 检测指标

1.3.1 症状观察 小鼠致敏后,由 2 名观察者每 12 h 采用双盲法对小鼠进行体质量的测量。每 6 h 观察动物毛色、步态及摄食情况。按 Lennon 等^[7]的分级法对 3 组小鼠进行临床评分以及血清 AChR Ab 水平的检测,判断模型是否成功。

1.3.2 药理学试验 给予注射用甲基硫酸新斯的明(上海信宜制药厂,用量 37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$),经腹腔注射给实验小鼠,观察 10~15 min 后其症状有无改善,同时给予阿托品(上海和丰制药厂,用量 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$)以对抗甲基硫酸新斯的明可能产生的副作用^[8]。

1.3.3 血清 AChR Ab(IgG)水平的检测 参照前期课题的方法^[8],致敏 48 h 后由小鼠股动脉取血并分离血清,用间接 ELISA 法测定小鼠血清 AChR Ab 滴度(nAChR 抗原由上海第二军医大学长海医院提供),以 mAb35(5 mg/ml)作为阳性标准品,并设阴性对照和空白对照。

1.3.4 小鼠脾脏细胞中 $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ 细胞、 $\text{CD4}^+\text{IL-17}^+$ 细胞、 $\text{CD4}^+\text{IL-9}^+$ 细胞含量的检测 致敏 48 h 后,小鼠断颈处死,无菌条件下取小鼠脾脏,制备单个脾细胞悬液,离心弃上清液后 PBS 液洗 2 遍,加入红细胞裂解液裂解红细胞,将脾细胞悬液置于 12 孔培养板中,每孔加入 1×10^6 个细胞,同时每孔加入 PMA(100 ng/ml)、离子霉素(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和莫能霉素(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每孔加 RPMI1640 至 1 ml,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 5 h,收集细胞,进行细胞表面 CD4 分子,胞内 IFN- γ ,胞内 IL-17 因子,胞内 IL-9 因子及相应同型对照抗体染色。经过一系列固定,破膜,孵育后,24 h 内利用流式细胞仪进行检测。

1.3.5 脾细胞培养上清细胞因子的检测 致敏 48 h 后,小鼠断颈处死,制备单个脾细胞悬液,将其置于 12 孔培养板中,每孔加入 1×10^6 个细胞,同时每孔加入 PMA(100 ng/ml)、离子霉素(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每孔加 RPMI1640 至 1 ml,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 5 h,收集上清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将脾细胞培养上清按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测 IFN- γ 、IL-17、IL-9 的水平。

1.4 统计学分析

经正态一致性检验及方差齐性检验,数据符合正态分布,采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。3 组间比较用单因素方差分析,比较有

差异再采用 SNK- q 检验行两两比较,数据不符合正态分布或方差不齐,则用多组定量资料 Kruskal-Wallis 秩和检验;3 组等级资料采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 症状观察及体质量变化

症状观察:模型组小鼠致敏后 6~8 h 部分出现临床症状,表现为摄食、运动减少,毛皱、易脱落失去光泽;24 h 内均表现轻重不等的 MG 症状:不能咀嚼,被动翻转不能复位等。耐受组症状稍轻,而对照组摄食、活动正常,无肌无力症状发生。

体质量变化:致敏前 3 组小鼠体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。致敏后模型组小鼠的体质量在不同时间观察呈下降趋势。EAMG 幼鼠经 Lys262-Ala207 鼻黏膜免疫耐受治疗后,伴随着临床症状的改变,出现相应的体质量变化。在给药后 36 h 时模型组体质量(15.19 ± 0.11) g,耐受组体质量(15.68 ± 0.13) g,对照组体质量(16.07 ± 0.14) g,在 48 h 时模型组体质量(14.70 ± 0.14) g,耐受组体质量(15.74 ± 0.18) g,对照组体质量(16.11 ± 0.13) g,在给药后 36、48 h 时 3 组比较差异均有统计学意义($P=0.02$)。

按 Lennon 等^[7]的分级法对 3 组小鼠进行临床评分,3 组在不同时间水平比较差异均有统计学意义($P=0.00$),见表 1。

2.2 药理学实验

模型组各小鼠于致敏后 12~24 h 出现临床症状,经腹腔注射甲基硫酸新斯的明后,10~15 min 小鼠症状均有不同情况的改善。

2.3 血清 AChR Ab 水平的检测

对小鼠血清中的 AChR Ab 水平采用 ELISA 法定量检测,模型组、耐受组、对照组的 AChR Ab 水平分别为(24.29 ± 0.90)、(15.06 ± 0.78)、(2.14 ± 0.27) $\mu\text{g}/\text{ml}$,3 组间比较差异有统计学意义($P=0.00$),模型组 AChR Ab 水平分别高于耐受组和对照组($P=0.00$),耐受组 AChR Ab 水平也比对照组高($P=0.00$)。

2.4 小鼠脾脏细胞中 $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ 细胞含量的检测

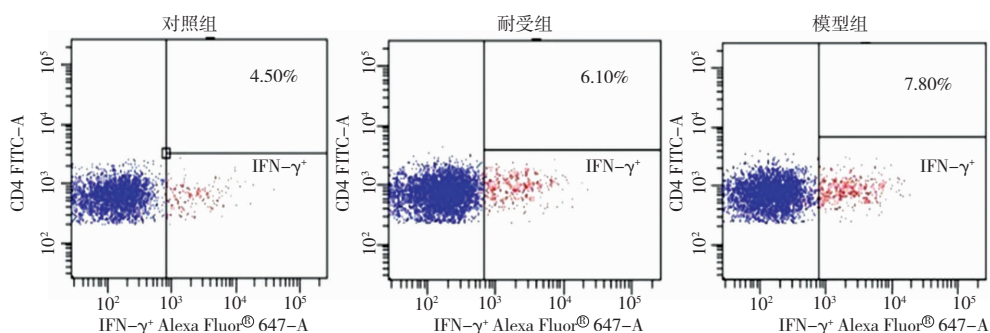
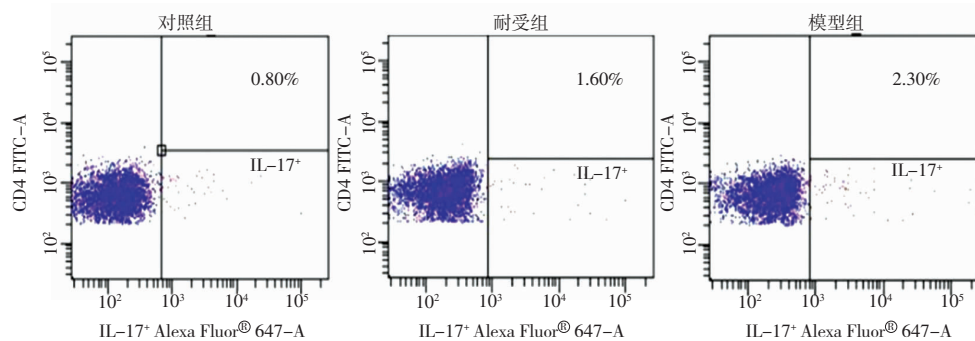
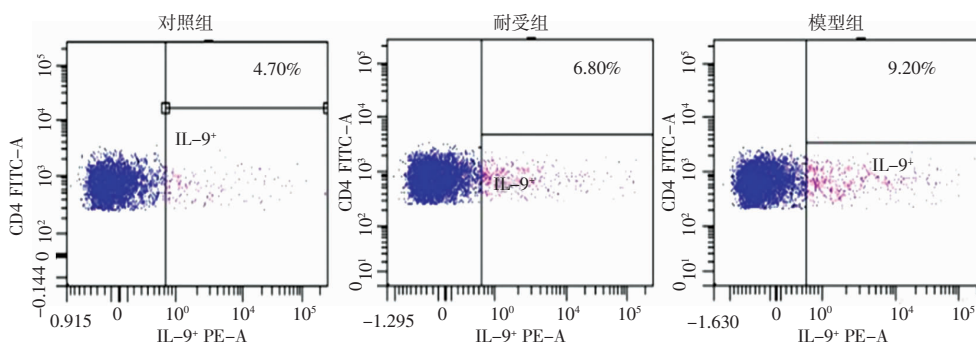
3 组小鼠脾脏细胞中 $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ 细胞的比例:通过流式细胞仪检测 $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ 细胞,以 $\text{CD4}^+\text{T}$ 细胞设门,观察到模型组为(7.76 ± 0.51)%,耐受组为(6.23 ± 0.45)%,对照组为(4.34 ± 0.60)%,3 组间比较差异有统计学意义($P=0.00$),模型组高于耐受组和对照组($P=0.00$),耐受组高于对照组($P=0.00$),代表性流式分析图见图 1。

表 1 各组小鼠注射 Ringer's 液后各时间点临床评分比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of clinical results at each time point after intraperitoneal injection of Ringer's ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	注射 mAb35 后的时间 (h)							
	0	6	12	18	24	30	36	42
模型组	0	0.35 ± 0.24	0.74 ± 0.30	1.22 ± 0.12	1.44 ± 0.15	1.64 ± 0.21	2.05 ± 0.19	2.36 ± 0.24
耐受组	0	0.20 ± 0.26	0.34 ± 0.29	0.57 ± 0.07	0.63 ± 0.12	0.70 ± 0.13	0.80 ± 0.09	0.73 ± 0.12
对照组	0	0	0	0	0	0	0	0

注:3 组等级资料采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,3 组在不同时间点比较均有统计学差异, $P=0.00$

图 1 流式细胞仪检测各组小鼠脾脏细胞中 CD4⁺IFN- γ ⁺ 细胞的比例Fig.1 Proportion of CD4⁺IFN- γ ⁺ in mouse spleen cell in each group detected by FCM图 2 流式细胞仪检测各组小鼠脾脏细胞中 CD4⁺IL-17⁺ 细胞的比例Fig.2 Proportion of CD4⁺IL-17⁺ in mouse spleen cell in each group detected by FCM图 3 流式细胞仪检测各组小鼠脾脏细胞中 CD4⁺IL-9⁺ 细胞的比例Fig.3 Proportion of CD4⁺IL-9⁺ in mouse spleen cell in each group detected by FCM

2.5 小鼠脾脏细胞中 CD4⁺IL-17⁺ 细胞含量的检测

3 组小鼠脾脏细胞中 CD4⁺IL-17⁺ 细胞的比例:通过流式细胞仪检测 CD4⁺IL-17⁺ 细胞,以 CD4⁺T 细胞设门,观察到模型组为 $(2.37 \pm 0.33)\%$,耐受组为 $(1.66 \pm 0.14)\%$,对照组为 $(1.04 \pm 0.16)\%$,3 组间比较差异有统计学意义 ($P=0.00$),模型组高于耐受组和对照组 ($P=0.00$),耐受组高于对照组 ($P=0.00$),代表性流式分析图见图 2。

2.6 小鼠脾脏细胞中 CD4⁺IL-9⁺ 细胞的含量的检测

3 组小鼠脾脏细胞中 CD4⁺IL-9⁺ 细胞的比例:通过流式细胞仪检测 CD4⁺IL-9⁺ 细胞,以 CD4⁺T 细胞设门,观察到模型组为 $(9.35 \pm 0.62)\%$,耐受组为 $(7.43 \pm 0.69)\%$,对照组为 $(4.98 \pm 0.64)\%$,3 组间比较差异有统计学意义 ($P=0.00$),模型组高于耐受组和对照组 ($P=0.00$),耐受组高于对照组 ($P=0.00$),代表性流式分析图见图 3。

2.7 脾细胞培养上清细胞因子水平的检测

3 组小鼠脾脏细胞培养上清,采用 ELISA 法分别检测 IFN- γ 、IL-17、IL-9 的浓度,单位为 pg/ml,3 组间比较差异有统计学意义 ($P=0.00$),模型组高于耐受组和对照组 ($P=0.00$),耐受组高于对照组 ($P=0.00$),见表 2。

表 2 各组小鼠细胞上清中 IFN- γ 、IL-17、IL-9 的比较
($n=10$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison of contents of IFN- γ 、IL-17 and IL-9
($n=10$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IFN- γ	IL-17	IL-9
模型组	446.32 $\pm$ 9.07 ^a	270.25 $\pm$ 13.81 ^a	128.70 $\pm$ 3.80 ^a
耐受组	182.24 $\pm$ 5.25 ^b	159.85 $\pm$ 7.01 ^b	103.92 $\pm$ 2.09 ^b
对照组	108.28 $\pm$ 4.29	91.60 $\pm$ 6.18	85.37 $\pm$ 2.39

注: a, 与耐受组和对照组比较, $P=0.00$; b, 与对照组比较, $P=0.00$

3 讨 论

MG 是神经肌肉接头处最常见的一种自身免疫性疾病,其发生的关键在于机体针对 AChR 所产生的免疫应答异常。AChR 特异性 T 细胞被重新激活,并辅助 B 细胞产生抗 AChR 特异性抗体,被认为是 MG/EAMG 发病的始动因素,新近研究发现 CD4⁺T 细胞亚群 Th1/Th2/Th17/Treg 失衡在 EAMG 的发病和发展过程中起到重要作用^[9]。

研究发现 Th1 细胞主要分泌 IFN- γ ,与 MG 疾病的起始有关。T-bet 通过激活 Th1 基因程序和抑制相对应的 Th2 基因程序,从而促进初始辅助性 T 细胞向 Th1 转化^[10]。

Th2 细胞主要分泌 IL-4。研究发现 IL-4 具有促进 B 细胞增殖、分化,并促进 AChR Ab 产生的作用,认为它可能与 MG 疾病的进展和持续有关。GATA-3 特异性表达于 Th2 细胞,是目前确定的唯一能够调控包括 IL-4 等所有关键性 Th2 细胞因子合成的转录因子^[11]。

CD4⁺CD25⁺Treg 是维持机体免疫耐受的重要因素之一。大量的研究提示,CD4⁺CD25⁺Treg 的数量减少或功能异常均有可能导致自身免疫病的发生。Foxp3 被认为是促使 CD4⁺CD25⁺Treg 分化成熟以及维持其主要功能的主要调控因子。

滤泡性辅助性 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh),主要负责辅助 B 细胞参与体液免疫。而 MG 的发病与 AChR Ab 介导的体液免疫密切相关。B 细胞活化及 AChR Ab 的产生是 MG 发病的中心环节,IL-21 是 Tfh 执行效应功能的主要细胞因子,具有促进 MG 发病的作用^[12],影响 MG 患者血清中抗 AChR Ab 向 IgG1 和 IgG3 亚型转换的作用。

本课题前期研究中发现^[13-14],IFN- γ 和 IL-4 在 EAMG 模型组中增高,经免疫耐受治疗后降低,而转化生长因子(transforming growth factor, TGF)在 EAMG 模型组中水平下降,经免疫耐受治疗后水平上调,表明 Th1 和 Th2 细胞通过各自分泌的细胞因子相互作用,对 MG 的发病起促进作用。研究还发现,模型组小鼠脾细胞中 CD4⁺CD25⁺Treg 数量与正常对照组相比降低,经免疫耐受治疗后其含量增高,提示 Treg 数量的减少和功能降低,使其免疫抑制功能发生障碍,自身反应性 T 细胞激活增多,导致 AChR 的损伤,是诱发小鼠 MG 产生的重要原因之一,表明 CD4⁺CD25⁺Treg 在维持机体免疫耐受方面起到重要的作用。

那么作为本课题研究的重点 Th17、Th9 细胞来说,它们在 EAMG 的发生、发展及其免疫耐受中的作用如何,成为本次研究的关键问题。新近的研究表明 Th17、Th9 是不同于 Th1 和 Th2 的辅助性 T 细胞。Th17 分泌的细胞因子 IL-17 在 MG 形成中有重要作用^[15]。研究发现 IL-17-/- 鼠几乎不发生 MG^[16],而在 EAMG 发生、发展过程中,Th17 细胞的比例变化最显著,且 Th17 细胞及其相关因子升高程度与 AChR Ab 浓度、疾病的严重程度密切相关^[17]。被激活的 Th17 细胞还能促进特异性 B 细胞产生 AChR 抗体,促进 EAMG 发展,加速疾病的进程^[16]。而 Th9 细胞是近来研究发现的一群新的 CD4⁺T 细胞,它需要 IL-4 和 TGF- β 的协同刺激,以分泌 IL-9 和 IL-10 为主,在小鼠肠炎模型中发挥促炎作用^[18-21],研究还发现 Th9 细胞可以诱发实验性自身免疫性脑脊髓炎^[22],且 IL-9 在免疫反应中可以因不同的疾病或在疾病的不同阶段同时扮演积极和消极的调节作用^[23],也有作者发现 Th9 细胞具有与 Th17 细胞类似的功能。而 Th9 和 IL-9 在 EAMG 的发病及免疫耐受中的作用究竟如何,目前相关的研究报道尚少见。

随着对 Th17 与 Th9 细胞的不断深入了解,为研究病因学及治疗疾病打开了新的思路。本研究的主要目的是对 Th17 与 Th9 细胞在 EAMG 幼鼠模型中的发病机制给予初步探讨,并通过鼻黏膜耐受的方法来纠正 CD4⁺T 细胞亚群的失衡,从而了解其对 Th1、Th17、Th9 等 T 细胞亚群的调控作用,为研究及治疗 MG 开辟新的途径。

本实验在前期课题的基础上,用流式细胞仪检测 EAMG 模型小鼠中 Th1、Th17、Th9 细胞的变化以及 ELISA 法检测其分泌的细胞因子 IFN- γ 、IL-17、IL-9 的水平,结果发现 EAMG 模型小鼠的脾脏细胞中 Th1、Th17、Th9 细胞及其分泌的细胞因子均明显增加。这些实验数据提示 Th1、Th17、Th9 在 EAMG 发病过程中具有重要作用,课题组推测由于 Th1、Th17、Th9 细胞分泌的细胞因子如 IFN- γ 、IL-17、IL-9,这些增加的细胞因子能激活自身反应性 T 细胞以及 B 细胞,活化的 T 细胞和 B 细胞可以通过细胞因子相互影响和加重疾病的发展。有关它们在 EAMG 小鼠中增高的机制和它们与 Th2、Treg 及其相关细胞因子所形成的复杂网络关系和在 EAMG 发病、预防和治疗中的相互作用机制怎样将是本课题下一步研究的目标。

目前的研究认为,对 MG 理想的治疗方法是既不影响机体免疫功能的完整性,又能特异性的抑制

或清除异常的自身免疫性 T 细胞和 B 细胞。目前 MG 免疫耐受治疗受到广泛的重视,其主要是通过下调 AChR 特异性免疫反应来纠正异常的免疫病理反应,从而达到从根本上治愈 MG 的目的。Lys262-Ala207 是经过改良使免疫原性减弱后的肽段,除具有很好的安全性外,还具有下调人类针对 AChR 自身免疫反应的作用。本课题组前期通过使用双类似物进行免疫耐受,已取得初步效果^[12-13],本研究应用 Lys262-Ala207 预防性免疫耐受 EAMG 幼鼠后,其体质量变化、药理学实验和血清 AChR Ab 水平的变化与本课题前期结果相一致,进一步证明了本实验的稳定性和可靠性。

通过本实验,可以推测 Lys262-Ala207 对实验幼鼠进行鼻黏膜耐受后不仅能有效的缓解其 MG 的临床症状,同时还能下调导致实验幼鼠发病的 CD4⁺IFN- γ ⁺ 细胞、CD4⁺IL-17⁺ 细胞和 CD4⁺IL-9⁺ 细胞含量水平,缓解 Th1/Th17/Th9 细胞功能失衡现象,从而达到预防和减轻实验幼鼠发病的作用,为阐明 Lys262-Ala207 对实验幼鼠的免疫耐受机制研究提供了新的实验依据。然而实验结果提示 Lys262-Ala207 对实验幼鼠的免疫耐受效果还不十分令人满意,在对幼鼠进行免疫耐受后,耐受组小鼠仍有肌无力表现,其检测指标与对照组相比仍未达到正常水平,此为耐受肽本身的缺陷或不足,不能达到 100% 的耐受效果,而且进一步说明 EAMG 的发病机制非常复杂,尚需进行多途径的、更加深入的研究。

参 考 文 献

- [1] De Baets M, Stassen M, Losen M, et al. Immunoregulation in experimental autoimmune myasthenia gravis—about T cells, antibodies, and endplates[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003(998): 308–317.
- [2] Baggi F, Annoni A, Ubiali F, et al. Breakdown of tolerance to a self-peptide of acetylcholine receptor alpha-subunit induces experimental myasthenia gravis in rats[J]. *J Immunol*, 2004, 172(4): 2697–2703.
- [3] Milani M, Ostlie N, Wu H, et al. CD4⁺T and B cells cooperate in the immunoregulation of experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 179(1–2): 152–162.
- [4] Milani M, Ostlie N, Wang W, et al. T cells and cytokines in the pathogenesis of acquired myasthenia gravis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003(998): 284–307.
- [5] Paas-Rozner M, Sela M, Mozes E. The nature of the active suppression of responses association with experimental autoimmune myasthenia gravis by a dual altered peptide ligand administered by different routes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(22): 12642–12647.
- [6] 黄 志, 徐秀娟. nAChR 单克隆抗体建立重症肌无力被动转移小鼠模型的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(13): 1397–1340.
- [7] Lennon VA, Lambert EH, Leiby KR, et al. Recombinant human acetylcholine receptor alpha subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. *J Immunol*, 1991, 146(7): 2245–2248.
- [8] 魏秀丽, 黄 志, 李 欣, 等. Foxp3 基因及调节性 T 细胞在重症肌无力被动转移幼鼠发病中的作用机制[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(4): 353–356.
- [9] Mu L, Sun B, Kong Q, et al. 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(s1): e826–e836.
- [10] Yang Y, Ochando JC, Bromberg JS, et al. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN-gamma/Stat1 signals[J]. *Blood*, 2007, 110(7): 2494–2500.
- [11] Hosoya T, Kuroha T, Moriguchi T, et al. GATA-3 is required for early T lineage progenitor development[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(13): 2987–3000.
- [12] Hu B, Tian X, Huang H, et al. Expression of IL-21 in the peripheral blood of myasthenia gravis patients and its correlation with anti-AChR-Ab class switch[J]. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, 2010, 35(9): 958–963.
- [13] 刘仕林, 黄 志. 双类似物 Lys262-Ala207 鼻黏膜耐受对 EAMG 幼鼠作用机制的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(2): 191–194.
- [14] 徐秀娟, 黄 志. 重症肌无力被动转移幼鼠的黏膜免疫耐受研究[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(5): 366–369.
- [15] Roche JC, Capablo JL, Larrad L, et al. Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis[J]. *Muscle Nerve*, 2011, 44(2): 278–280.
- [16] Bai Y, Liu R, Huang D, et al. CCL2 recruitment of IL-6-producing CD11b⁺ monocytes to the draining lymph nodes during the initiation of Th17-dependent B cell-mediated autoimmunity[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(7): 1877–1888.
- [17] Wang Z, Wang W, Chen Y, et al. T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma[J]. *Scand J Immunol*, 2012, 76(1): 54–61.
- [18] Li H, Rostami A. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4⁺T cells and implications for autoimmunity[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010, 5(2): 198–209.
- [19] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1347–1355.
- [20] Veldhoen M, Uytendhoe C, van Snick J, et al. Transforming growth factor- β ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1341–1346.
- [21] Ma CS, Tangye SG, Deenick EK. Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21[J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88(6): 621–623.
- [22] Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes[J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 7169–7177.
- [23] Lu Y, Hong S, Li H, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4160–4171.

(责任编辑: 关蕴良)