重症肌无力患者免疫治疗前后 AIRE、Tfr/Tfh 比值与病情的相关性*

王圣元[1]，肖枫林[2]，李 航[1]，张 禹[1]**
(1. 中国人民解放军海军总医院 高压氧科，北京 100048；2. 中国人民解放军海军总医院 肾脏病科，北京 100048)

[摘 要] **目的**：观察重症肌无力(MG)患者免疫治疗前后自身免疫性调节因子(AIRE)及 Tfr/Tfh 比值变化，分析其与 MG 严重程度的相关性。**方法**：收集 16 例全身型 MG(GMG)患者、14 例眼肌型 MG(OMG)患者、10 例健康体检者(对照组)的外周血标本，并收集 10 例接受免疫抑制治疗 1 个月并获得随访的 GMG 患者(治疗组)外周血标本；采用流式细胞术检测 AIRE 阳性细胞、Tfr 细胞及 Tfh 细胞数量，计算 Tfr/Tfh 比值；观察治疗组治疗前后 AIRE 及 Tfr/Tfh 比值变化，分析 AIRE 阳性表达率、Tfr/Tfh 比值与 MG 严重程度的相关性。**结果**：治疗组 GMG 患者治疗后 AIRE 阳性表达率及 Tfr/Tfh 比值较治疗前均有显著提高($P<0.01$)，治疗组 AIRE 阳性表达率与 OMG 组及对照组比较差异均无统计学意义($P=0.164$，$P=0.862$)；治疗组 Tfr/Tfh 比值低于对照组($P<0.001$)，而与 OMG 组比较差异无统计学意义($P=0.685$)；GMG 患者 AIRE 阳性表达率及 Tfr/Tfh 比值与 MG 定量评分(QMG)评分及临床绝对评分均呈负相关($P<0.05$)。**结论**：AIRE 阳性表达率及 Tfr/Tfh 比值与 MG 严重程度呈负相关，免疫治疗可提高 AIRE 及 Tfr/Tfh 比值。

[关键词] 重症肌无力；自身免疫性调节因子；T 淋巴细胞亚群；免疫治疗
[中图分类号] R746.1 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)08-0933-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.08.014

Analysis of AIRE, Tfr and Tfh Cell Ratio Changes in MG Patients before and after Immunotherapy

WANG Shengyuan[1], XIAO Fenglin[2], LI Hang[1], ZHANG Yu[1]
(*1. Department of HBO, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China; 2. Department of Nephrology, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To analyse the ratio changes of AIRE and Tfr/Tfh in patients with myasthenia gravis (MG) before and after immunotherapy. **Methods**: Peripheral blood samples of 16 cases with generalised MG (GMG group), 14 cases with ocular MG (OMG group) and 10 cases as the control group from Jan. 2016 to Jan. 2017 were collected from Tangdu Hospital of Airforce Military Medical University, China. 10 cases wth GMG as the experiment group were followed up after immunotherapy. The expression of autoimmune regulator (AIRE), Tfr cell and Tfh cells were measured by flow cytometry. **Results**: The AIRE expression and Tfr/Tfh ratio of 10 GMG patients were significantly improved after treatment ($P=0.01$, $P=0.009$). The expression of AIRE in the treatment group was higher than that in GMG group ($P<0.001$), while the difference between OMG group and the control group were not statistically significant ($P=0.164$, $P=0.862$). The Tfr/Tfh ratio in the treatment group was higher than that of GMG group ($P<0.01$), lower than that of the control group ($P<0.001$), but with no significant difference from OMG group ($P=0.685$). The expression of AIRE and Tfr/Tfh ratio were

*[基金项目]国家自然青年科学基金项目(81500669)
**通信作者 E-mail:6914260@qq.com
网络出版时间:2018-08-21 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180821.0759.019.html

negatively correlated with the quantitative MG (QMG) score and clinical absolute score in all GMG group ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.05$, $P=0.002$). **Conclusion**: The AIRE and Tfr/Tfh ratio increased in different degrees after immunotherapy, and there might be an interactive mechanism between AIRE and Tfr, Tfh cells.

[**Key words**] myasthenia gravis; autoimmune regulator; T lymphocyte subsets; immunotherapy

重症肌无力(MG)是自身免疫性疾病(AID),病变靶点为突触后膜上的乙酰胆碱受体异常,导致神经-肌肉接头传递功能障碍[1]。作为典型的AID,MG发病的关键在于异常免疫耐受的发生,药物治疗首选胆碱酯酶抑制剂(AChEI)及免疫抑制剂,可以有效改善患者的肌无力症状。自身免疫调节因子(autoimmuneregulator,AIRE)是一种转录因子,由胸腺髓质上皮细胞产生,对自身反应性T细胞有极高的亲和性,可选择性的与之结合并促使其凋亡,避免了自身反应性T细胞的逃逸,从而避免自身免疫反应的发生[2-3]。Tfh细胞是T细胞的重要亚群,在B细胞分化、增殖、迁移过程中发挥重要作用[4]。Tfr细胞是调节性T(Treg)细胞的亚群,对Tfh细胞介导的细胞活化起拮抗作用[5]。本课题组之前的研究发现AIRE、Tfr细胞及Tfh细胞水平与MG患者分型及病情严重程度明显相关[6],本研究通过观察免疫治疗前后AIRE、Tfr细胞及Tfh细胞水平的变化,进一步分析其在MG发病过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2016年1月~2017年1月收治的MG患者30例。入组患者符合中国MG诊断和治疗指南(2015):(**1**)骨骼肌易疲劳,表现为波动性及易疲劳性,呈晨轻暮重;(**2**)新斯的明试验阳性;(**3**)肌电图低频刺激波幅递减10%以上。排除标准:3个月内曾接受免疫抑制剂、免疫球蛋白或血浆置换治疗者,合并其他AIDs。根据Osserman分型将患者分为全身型MG(GMG)组(16例),眼肌型MG(OMG)组(14例),选择同期10例健康体检者作为对照组;GMG患者中10名患者采用免疫抑制利妥昔单抗治疗(未使用血浆置换或静注免疫球蛋白治疗)并取得随访、为治疗组,其余6名GMG患者因无法复诊而失访。GMG组男8例、女8例,平均年龄(43.19±13.47)岁;OMG组男8例、女6例,平均年龄(40.50±15.62)岁;对照组男5例、女5例,平均年龄(40.70±15.44)岁,各组年龄、性别分布差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得医院伦理委员会的批准,受试者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 收集标本 GMG组及OMG组患者于治疗前留取空腹静脉血标本,治疗组于治疗1月后留取空腹静脉血标本,用15 mL无菌干燥肝素抗凝的血标本采集管从每位MG患者和对照者肘静脉采集静脉血3 mL两管,充分摇匀,放置在4 ℃环境中保存。

1.2.2 AIRE阳性细胞、Tfr细胞及Tfh细胞占比检测 采用密度离心法分离外周血单个核细胞(PBMCs)。将3 mL血样本与等量1640培养液(HyClone公司)充分混和,加入人外周血淋巴细胞分离液3 mL,在4 °C下2 000 r/min离心20 min;离心后吸出云雾层,即PBMCs层,加入5倍体积RMPI-1640溶液洗涤细胞2次,保留黏附在离心管底部的PBMCs。细胞表面标志CD4及CXCR5免疫荧光染色:将抗人CD4抗体(Biolegend公司)和抗人CXCR5抗体(Biolegend公司)与细胞悬液充分混匀,避光孵育30 min;洗涤细胞2次后保留黏附在离心管底部的细胞,避光情况下加入1 mL固定/破膜液(Miltenyi公司)重悬,避光30 min进行细胞破膜。细胞胞内标志AIRE及Foxp3免疫荧光染色:避光情况下,将洗涤好的细胞加入1 mL固定/破膜液中重悬,避光30 min进行细胞破膜,洗涤并重悬细胞后加入抗人AIRE抗体(Miltenyi公司)和抗鼠/人Foxp3抗体(Biolegend公司)避光孵育30 min;避光加入2%多聚甲醛500 μL固定细胞。采用FACS Calibur流式细胞分析仪(BD公司)进行AIRE阳性细胞、CD4+CXCR5+Foxp3+的Tfr细胞及CD4+CXCR5+Foxp3-的Tfh细胞检测。

1.2.3 MG病情严重程度评价 采用MG定量评分(QMG评分)法及绝对评分法评价MG患者病情的严重程度,评分越高,表明MG病情越重。3组MG患者病情严重程度评分见表1。

表 1　3 组 MG 患者病情严重程度评分($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1　MG patients´severity score in GMG group, OMG group and treatment group

组别	MG 严重程度评分(分)	
	QMG 评分	绝对评分
GMG 组	14.87 ± 5.67	17.63 ± 5.07
OMG 组	6.50 ± 3.28	8.71 ± 4.08
治疗组	6.60 ± 1.84	8.80 ± 2.39

1.3　观察指标

比较治疗组治疗前后及各组间 AIRE 阳性表达率、Tfr 细胞占比、Tfh 细胞占比及 Tfr/Tfh 比值。并分析 AIRE 阳性表达率、Tfr/Tfh 比值与病情严重程度的相关性。

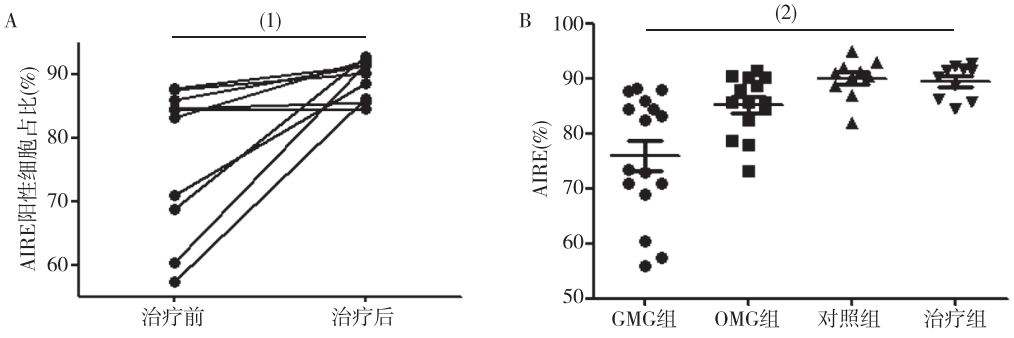
1.4　统计学分析

统计学分析采用 SPSS 19.0 进行分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,治疗组治疗前后指标比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 *LSD* 检验;相关性分析采用 *Spearman* 检验。以 $P < 0.05$ 代表有统计学意义。

2　结果

2.1　AIRE 阳性表达率

治疗组 GMG 患者治疗后 AIRE 阳性表达率较治疗前显著提高($t = -3.248$, $P = 0.01$),见图 1A。4 组被检者 AIRE 阳性表达率比较,差异有统计学意义($F = 10.763$, $P < 0.001$);治疗组 AIRE 阳性表达率[(89.41 ± 2.99)%]较 GMG 组[(76.25 ± 12.73)%]明显上升($P < 0.001$),治疗组与 OMG 组[(84.30 ± 6.13)%]、对照组[(89.98 ± 3.56)%]比较,差异无统计学意义($P = 0.164$, $P = 0.862$),见图 1B。



注:A 为治疗组治疗前后 AIRE 阳性表达率,B 为各组 AIRE 阳性表达率;(1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.001$

图 1　治疗组治疗前后及各组被检者 AIRE 阳性表达率

Fig. 1　The positive expression rate of AIRE in the treatment group before and after treatment and in each group of patients

2.2　Tfr 细胞、Tfh 细胞占比及 Tfr/Tfh 比值

治疗组 GMG 患者治疗后 Tfr/Tfh 比值较治疗前显著提高($t = -3.314$, $P = 0.009$)。4 组被检者 Tfr/Tfh 比值比较,差异有统计学意义($F = 23.251$, $P < 0.001$);治疗组 Tfr/Tfh 比值较 GMG 组明显上升($P < 0.01$),但低于对照组($P < 0.001$),而与 OMG 组比较差异无统计学意义($P = 0.685$)。见表 2、图 2。

2.3　AIRE 阳性表达率、Tfr/Tfh 比值与 MG 严重程度的相关性

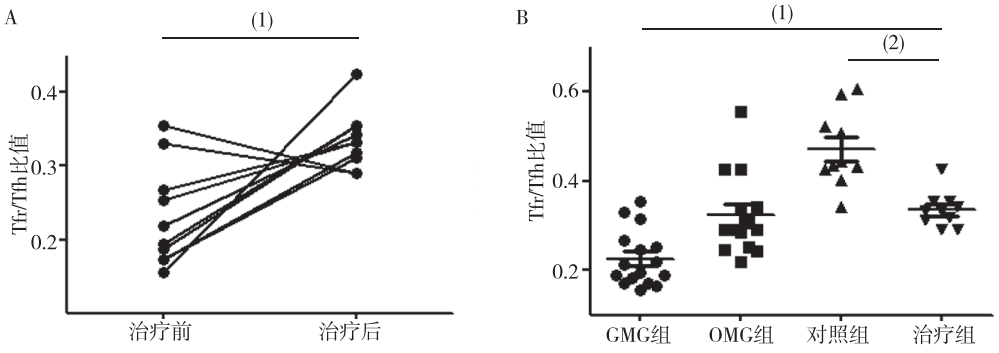
GMG 患者 AIRE 阳性表达率与 QMG 评分($r = -0.729$, $P < 0.001$)及绝对评分($r = -0.709$, $P < 0.001$)均呈负相关;Tfr/Tfh 比值与 QMG 评分($r = -0.640$, $P < 0.05$)及绝对评分($r = -0.656$, $P = 0.002$)呈负相关。见图 3。

表 2　各组被检者 Tfr、Tfh 细胞占比及 Tfr/Tfh 比值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　The percentage of Tfr and Tfh cells and the ratio of Tfr to Tfh cells in each group

分组	Tfr 细胞占比(%)	Tfh 细胞占比(%)	Tfr/Tfh 比值
治疗组	25.03 ± 2.14	74.97 ± 2.14	0.34 ± 0.04
GMG 组	18.24 ± 4.02	81.76 ± 4.02	0.23 ± 0.06
OMG 组	24.08 ± 4.86	75.92 ± 4.86	0.32 ± 0.09
对照组	31.82 ± 3.87	68.18 ± 3.87	0.47 ± 0.08

(1) 与 GMG 组比较,$P < 0.01$; (2) 与对照组组比较,$P < 0.01$



注:A 为治疗组治疗前后 Tfr/Tfh 比值,B 为各组 Tfr/Tfh 比值;$^{(1)}P<0.01$,$^{(2)}P<0.001$

图 2　治疗组治疗前后及各组被检者 Tfr/Tfh 比值

Fig. 2　The ratio of Tfr to Tfh cells in the treatment group before and after treatment and in each group of patients

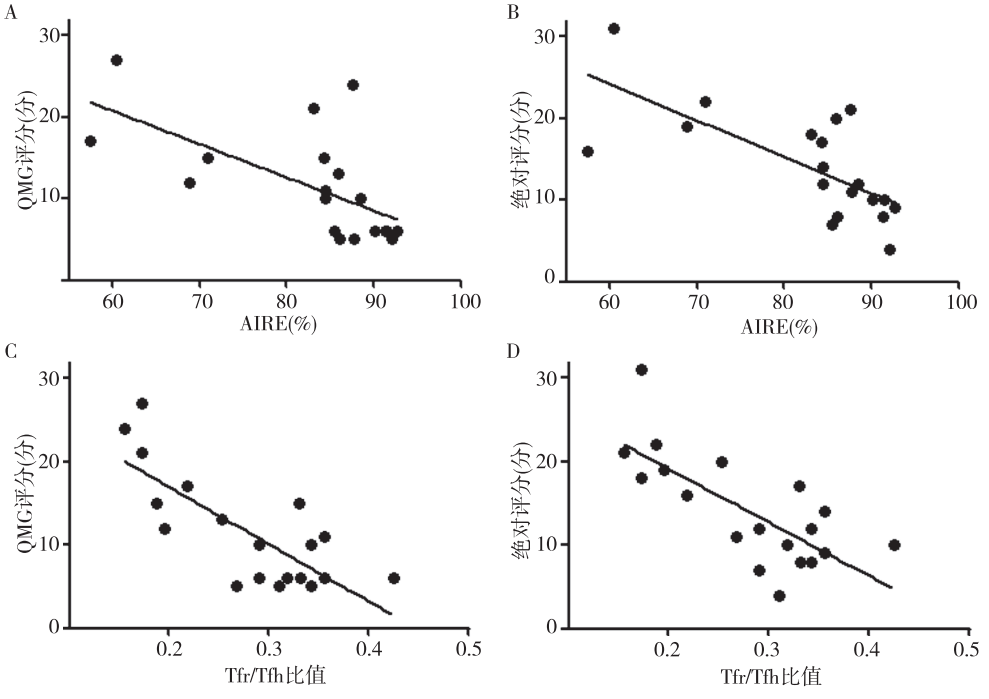


图 3　AIRE 阳性表达率、Tfr/Tfh 比值与 MG 病情严重程度相关性

Fig. 3　The corelation of positive expression rate of AIRE and the ratio of Tfr to Tfh cells with MG severity

3　讨论

MG 发病的关键在于异常免疫耐受的发生,并产生了相应抗乙酰胆碱受体抗体(AChR-Ab),因而体液免疫在 MG 整个发病、发展过程中起了关键作用,但是目前针对自身抗体的治疗效果仍较差,因而现阶段临床主要的治疗方式是对症支持治疗及个体化的免疫抑制治疗,必要时外科手术介入进行胸腺切除并逐步改善患者的生活方式以避免 MG 的复发[7]。利妥昔单抗为鼠源性单克隆抗体,其针对的抗原为 B 细胞的表面标志 CD20,利妥昔单抗可通过与其特异性结合的方式清除体内的 B 细胞。利妥昔单抗多用于普通药物治疗效果较差的 MG 患者,能有效降低患者体内的 AChR-Ab 抗体水平,与其他免疫抑制剂可相互协同并减少使用剂量[8]。结合本研究结果,10 名 GMG 患者均取得了较好的疗效,治疗后 AIRE 及 Tfr/Tfh 比值均较前有明显提升,治疗组 AIRE 表达与 OMG 组、对照组差异无统计学意义,而治疗组 Tfr/Tfh 比值介于

治疗前 GMG 组及对照组之间,与 OMG 组差异无统计学意义,提示 AIRE 表达恢复正常水平后,Tfr/Tfh 细胞比值可能仍低于正常水平,在外周的免疫系统中可能存在 AIRE 和 Tfh、Tfr 之间的相互作用。AIRE 主要存在于胸腺髓质上皮细胞(mTECs),参与多种组织特异抗原的表达,AIRE 能够控制 mTECs 自身抗原表达水平,是维持免疫耐受的一个重要调控因子,在免疫耐受过程中起了重要作用[9-10]。而 AIRE 在外周血的主要作用是对抗原进行修饰及增强 T 细胞活性,并加强对部分 AIRE 相关的抗原的清除,维护了免疫系统的稳定[11]。Tfh 细胞是一个独特的 T 细胞的亚集,可以通过共刺激细胞因子促进 B 细胞的成熟,并进一步促进浆细胞的分化,从而产生大量的抗体[12]。同时,Tfh 细胞可迁徙至外周组织,并不断通过级联反应加强 B 细胞的迁徙及强化,从而形成恶性循环,不断加强异常免疫反应[13]。Tfh 细胞与 B 细胞间存在相应的调控机制,这一调控过程可能与 AIRE 有关[14]。Tfr 细胞具有 Treg 及 Tfh 细胞的双重特性,可直接或间接与 B 细胞发生作用,在 Tfr 细胞数量上升或功能增强时,可限制 Tfh 细胞的表达及功能,进而使 B 细胞的数量下降[15]。可见,Tfr 细胞对免疫调节行使重要功能,可避免 B 细胞的过度表达,保持细胞免疫内部的平衡,减少抗体的产生,从而改善临床症状[16]。当 Tfr 细胞、Tfh 细胞比值发生变化,会导致免疫平衡紊乱,其结果是 B 细胞过度表达,抗体增多,MG 病情进展。结合本实验结果及文献回顾来看,治疗后患者病情好转的同时伴随 AIRE 及 Tfr、Tfh 细胞比值不同程度的回升,AIRE 因子更多的是参与抗原递呈阶段,或调控机制[17];而 Tfr、Tfh 细胞更多的是参与对 B 细胞的调控,直接影响抗体的生成。

综上所述,AIRE 和 Tfh、Tfr 细胞与 MG 病情严重程度相关联,治疗后更进一步印证这种关联的存在,但从两者不同步的回升程度提示可能存在 AIRE 与 Tfr 细胞、Tfh 细胞间相互影响的机制,尚需要进一步的实验研究验证。

4　参考文献

[1] RICHARDS J, HOWARD J F. Seronegative myasthenia gravis associated with malignant thymoma[J]. Neuromuscul Disord, 2017,27(5):417-418.

[2] KUSHAGRA B, HIDEYUKI Y, CHRISTOPHE B, et al. The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers[J]. Nature Immunology, 2017,18(3):263-273.

[3] 闫斌,朱明振,李卫君,等. 自身免疫调节因子在重症肌无力患者胸腺内的表达及作用分析[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017,34(10):913-915.

[4] ANNE K, BASTIAN G, DAVID N, et al. Generation of T follicular helper cells *in vitro*: requirement for B-cell receptor cross-linking and cognate B- and T-cell interaction [J]. Immunology, 2018,153(2):214-224.

[5] YANG G, YANG X S, ZHANG J M, et al. Transcriptional repressor Blimp1 regulates follicular regulatory T-cell homeostasis and function[J]. Immunology, 2018,153(1):105-117.

[6] 王圣元,张憋,李柱一,等. 重症肌无力患者外周血 AIRE、Tfh 细胞和 Tfr 细胞与病情严重性相关分析[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017,24(3):170-173.

[7] 汪杰,李宏增,李川,等. 重症肌无力患者的免疫指标与临床疗效分析[J]. 现代生物医学进展, 2016,16(31):6162-6191.

[8] YI J S, DECROOS E C, SANDERS D B, et al. Prolonged B-cell depletion in MuSK myasthenia gravis following rituximab treatment. [J]. Muscle Nerve, 2013,48(6):992-993.

[9] PEZZI N, ASSIS A F, COTRIM-SOUSA L C, et al. Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire protein, deregulates cell adhesion genes and decreases thymocyte interaction [J]. Molecular Immunol, 2016, 77:157-173.

[10] ANDREW S K, ERIK L M, GERALD R C, et al. Rapid chromatin repression by Aire provides precise control of immune tolerance [J]. Nature Immunology, 2018, 19(2):162-172.

[11] PERNIOLA R. MUSCO G. The biophysical and biochemical properties of the autoimmune regulator (AIRE) protein [J]. Biochimicaet Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease, 2014,1842(2):326-337.

[12] 金伯泉. T-B 细胞协作研究的重大突破——滤泡辅助性 T 细胞的发现,一个新的 CD4+效应 T 细胞亚群[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(1):1-5.

[13] ZHU Y, ZOU L, LIU Y. T follicular helper cells, T follicular regulatory cells and autoimmunity[J]. International Immunology, 2016,28(4):173-179.

[14] DEENICK E K, MA C S, BRINK R, et al. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells[J]. Curr Opin Immunol, 2011,23(1):111-118.

(下转第 942 页)