

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.04.006
文章编号: 1005-8982(2020)04-0034-05

调节性B细胞在吉兰-巴雷综合征患者外周血中的表达及意义*

郝晨光¹, 王艳², 马建华²

[1. 新疆医科大学第一附属医院昌吉分院(昌吉市第二人民医院)神经内科, 新疆 昌吉 831100; 2. 新疆医科大学第一附属医院 神经内科, 新疆 乌鲁木齐 830054]

摘要: 目的 研究吉兰-巴雷综合征(GBS)患者外周血CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg细胞的变化。**方法** 选取2018年10月—2019年6月新疆医科大学第一附属医院昌吉分院收治的GBS患者50例作为GBS组,选取同期该院健康体检者50例作为对照组。检测两组外周血CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg的表达。**结果** GBS组CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg细胞表型比例较对照组低($P < 0.05$),GBS组CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg细胞表型比例较对照组低($P < 0.05$)。**结论** GBS患者外周血CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg细胞减少,其可能参与GBS的发病,可作为疗效指标之一。

关键词: B淋巴细胞;吉兰-巴雷综合征/综合征;治疗结果

中图分类号: R745.4

文献标识码: A

Expression and significance of regulatory B cells in peripheral blood of patients with Guillain-Barre syndrome*

Chen-guang Hao¹, Yan Wang², Jian-hua Ma²

(1. Department of Internal Neurology, Changji Branch of the First Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Changji, Xinjiang 831100, China; 2. Department of Internal Neurology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To study the changes of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Breg and CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg cells in peripheral blood of patients with Guillain-Barre syndrome (GBS). **Methods** Flow cytometry was used to detect the expression of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Breg and CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg in peripheral blood of 50 patients with Guillain-Barre syndrome and 50 healthy controls. **Results** The phenotype ratio of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Breg cells in GBS group was lower than that in control group ($P < 0.05$), and that of CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg cells in GBS group was lower than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Decreased CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Breg and CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg cells in peripheral blood of patients with GBS may be involved in the pathogenesis of GBS, which may be an observation index of curative effect.

Keywords: b-lymphocytes; Guillain-Barre syndrome/syndrome; treatment outcome

吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)是一种自身免疫介导的周围神经疾病,是引起四肢急性对称迟缓性瘫痪的最常见致病因素之一。一旦发病可严重影响患者的生活质量,甚至出现呼吸

肌麻痹,危及患者生命,给社会及家庭造成沉重的负担^[1]。但GBS具体的发病机制及发病环节中具体的免疫作用机制仍不明确。调节性B细胞(regulatory B cells, Bregs)是新发现的B细胞亚群。有研究证实

收稿日期: 2019-08-23

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(No: 2017D01A05)

[通信作者]马建华, Email: mjh9191@163.com; Tel: 13109956336

Bregs 在免疫相关性疾病中具有负向免疫调节的作用,在神经免疫性疾病,如临床孤立综合征、多发性硬化等患者外周血中均存在 Bregs 数量或功能的异常^[2-4]。国内外鲜有针对 GBS 患者外周血中 Bregs 及相关细胞因子表达的研究报道,笔者旨在通过分析 GBS 患者外周血中 Bregs 亚群的数量,探讨其在疾病发生过程中的临床意义及免疫学机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 10 月—2019 年 6 月新疆医科大学第一附属医院昌吉分院收治的 GBS 患者 50 例作为 GBS 组。其中,男性 33 例,女性 17 例;年龄 6 ~ 83 岁,平均(45.12 ± 20.54)岁;病程 1 ~ 15 d,平均病程(7.9 ± 3.4) d。纳入标准:符合 2010 年《中国 GBS 诊治指南》诊断标准^[5]。排除标准:排除其他自身免疫性疾病、白血病、淋巴瘤、器官移植、甲状腺功能亢进症、桥本甲状腺炎、甲状腺功能减退症、乙型病毒性肝炎、人类免疫缺陷病毒感染等。选取同期本院健康体检者 50 例作为对照组。其中,男性 30 例,女性 20 例;年龄 8 ~ 72 岁,平均(46.78 ± 16.87)岁。两组年龄、性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 试剂及仪器

PBS 无菌液体、红细胞裂解液、FITC-单克隆鼠抗人 CD19 抗体、PE-单克隆鼠抗人 CD24 抗体、APC-单克隆鼠抗人 CD38 抗体及 APC-单克隆鼠抗

人 CD27 抗体均购自美国 Becton Dickinson 公司,流式细胞仪(Aprial 型)购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.3 方法

将乙二胺四乙酸抗凝血 70 μ l 置于 2 个试管,标记为 Br1、Br2。Br1 中加入 FITC-单克隆鼠抗人 CD19 抗体、PE-单克隆鼠抗人 CD24 抗体及 APC-单克隆鼠抗人 CD38 抗体。Br2 中加入 FITC-单克隆鼠抗人 CD19 抗体、PE-单克隆鼠抗人 CD24 抗体及 APC-单克隆鼠抗人 CD27 抗体。Br1、Br2 混匀室温避光孵育 18 min,加红细胞裂解液 2 ml,室温避光 5 min,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,1 ml PBS 洗涤,再次 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 PBS 3 ml 重悬。室温避光孵育后用流式细胞仪检测 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg 细胞。

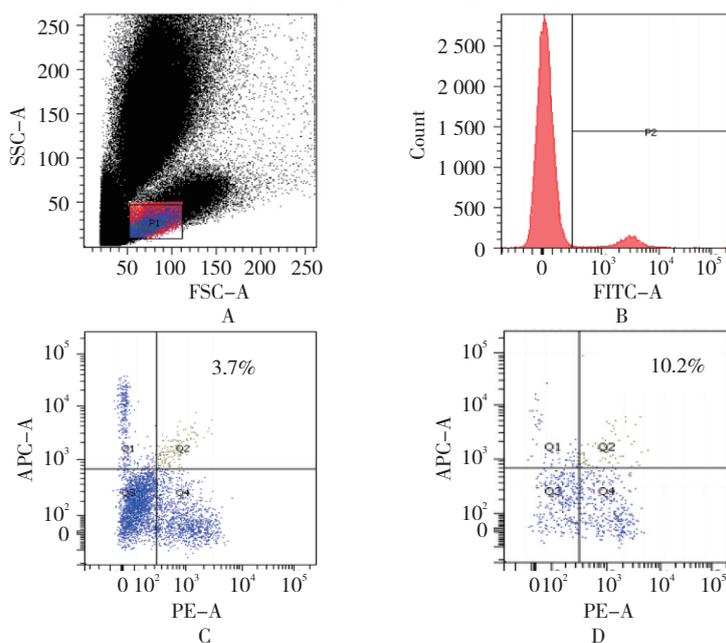
1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg 细胞表型比例比较

GBS 组 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg 细胞表型比例为(3.98 ± 1.18)%,对照组为(6.88 ± 2.20)%,经 t 检验,差异有统计学意义($t = -6.932$, $P = 0.005$),GBS 组较对照组低。见图 1。



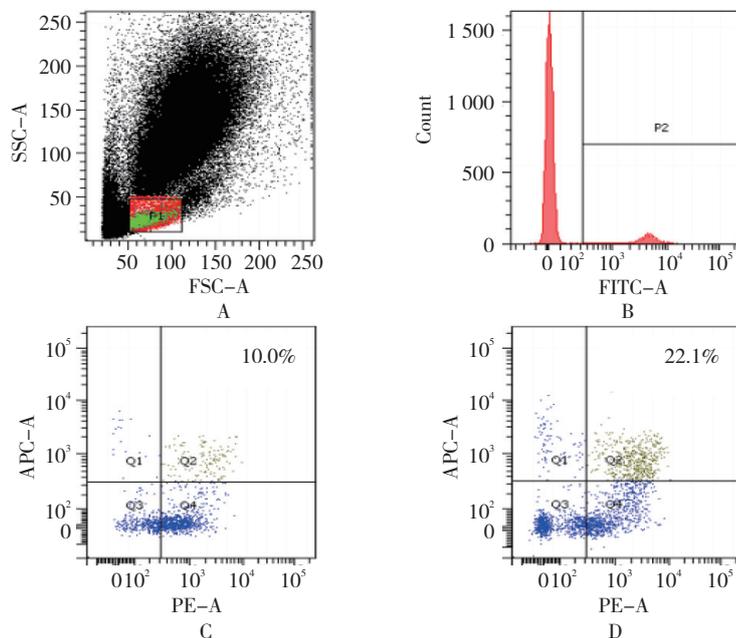
A: CD19⁺B 细胞设门; B: CD19⁺B 细胞表达; C: GBS 组 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg 细胞表型; D: 对照组 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg 细胞表型。

图 1 外周血 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Breg 细胞表型流式细胞图

2.2 两组外周血 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg 细胞表型比例比较

GBS 组 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg 细胞表型比例为

(13.67 ± 3.79)%, 对照组为(23.97 ± 4.84)%, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = -11.853$, $P = 0.007$), GBS 组较对照组低。见图 2。



A: CD19⁺B 细胞设门; B: CD19⁺B 细胞表达; C: GBS 组 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg 细胞表型; D: 对照组 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg 细胞表型。

图 2 外周血 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Breg 细胞表型流式细胞图

3 讨论

GBS 是一种自身免疫性、感染后免疫介导疾病, 其特点是自身抗体的产生、补体的激活, 以及对神经节苷脂的 T 反应活性。有研究发现, 包括 T1 细胞、T2 细胞和 Treg 细胞在内的几个免疫细胞亚群参与了 GBS 自身抗体的产生^[6]。通过产生 IL-23/IL-17, 滤泡 T 辅助细胞的频率也与 GBS 有关, 然而 Bregs 细胞是否参与这一过程尚不清楚。

B 细胞是体液免疫的核心成分之一。传统观念认为 B 细胞的主要作用在于产生抗体, 直到后来发现其直接参与细胞免疫。B 淋巴细胞通过抗原呈递、共刺激和细胞因子产生参与 T 细胞活化; 其影响机体组织中的抗菌保护机制和炎症过程, 充当控制细胞和体液免疫反应的调节细胞。早在 20 世纪 70 年代, 人们就首次提出存在能够抑制免疫反应的 B 细胞。仅 20 年后, 通过实验性自身免疫性脑炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 这一多发性硬化的动物模型, 首次可靠地描述了 B 细胞的调节特性^[7]。在 EAE 小鼠模型的实验中发现, 与有自愈倾向的野

生型小鼠相比, EAE 可使 B 细胞缺陷的 C57BL/6 小鼠疾病进一步进展, 表明小鼠体内可能存在抑制炎症反应的 B 细胞亚群, 找到了 Bregs 存在的有力证据^[7]。2002 年 MIZOGUCHI 等^[8]在炎症性肠病动物模型中找到了 Bregs 存在的有力证据, 并将这种发挥疾病抑制作用的 B 细胞亚群命名为 Bregs。

Bregs 是一小部分 B 细胞群, 参与免疫调节和抑制免疫反应^[9]。到目前为止, Bregs 究竟是起源于一个特定的祖细胞, 还是起源于传统的 B 细胞亚群, 还不清楚, 因此很难确定 Bregs 的确切表型^[10]。然而, 有一种共识认为 Bregs 主要通过分泌细胞因子发挥免疫调节作用^[11]。在人类中, CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞都通过分泌 IL-10 来控制免疫反应^[12-13]。然而, 这 2 个亚群对 T 细胞有不同的影响。含有未成熟 B 细胞标志物 CD38 的 Bregs 被认为能够诱导 T 调控细胞的发育, 同时限制 T1 和 T17 细胞的分化。而具有记忆 B 细胞标志物 CD27 的 Bregs 主要负责抑制 CD4⁺T 细胞的活性。此前有研究认为 CD19⁺IL-10 Bregs 与人类 CD24^{hi}CD27⁺B 细胞相对

应^[14]。因此,笔者重点研究 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Bregs、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Bregs 在 GBS 患者中的表达频率和免疫调节功能。

自身免疫性疾病的发生是机体免疫系统不能正确识别自体抗原和异体抗原,发生交叉免疫反应,出现免疫调节紊乱,导致自身免疫性疾病的发生。近年研究发现 Bregs 在维持机体内环境免疫稳态及调节免疫耐受中起到极其重要的作用,并与自身免疫性疾病发生、发展密切相关^[9, 15]。大量证据表明 B 细胞在多发性硬化症、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、皮炎等自身免疫性疾病的发病机制中起着重要作用^[3, 16-19]。

在自身免疫性疾病中, Bregs 的频率仍然存在争议。本实验重点研究 GBS 患者 Bregs 的变化,发现与对照组相比, GBS 组循环 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}和 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Bregs 均降低。有利于细胞毒性 T 细胞对宿主进行攻击,促进宿主免疫系统的下降,这之前系统性红斑狼疮、血小板减少症的研究结果一致^[20-21]。CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Bregs 主要抑制 T 细胞的活化,这是 B 细胞自身抗体产生的必要条件^[13]。笔者发现, GBS 患者源性 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Bregs 在抑制 CD4⁺T 细胞增殖和原发性细胞因子分泌方面具有调节作用。这些发现提示, Bregs 通过控制 CD4⁺T 细胞活化的功能转变,参与 GBS 的发病。

当然,目前各种实验发现 Bregs 存在许多不同的表型,本研究只研究了其中 2 种表型,尚不足以完全代表 Bregs,且本实验的研究人群较少,患者来源群体单一,无法完全代表所有 GBS 患者,故本实验仅作为参考,仍需大样本随机对照实验进一步明确结论。而且本实验只是研究了 GBS 急性期的 CD19⁺CD24^{hi}CD38⁺Bregs 及 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Bregs,限于资金及研究时间限制,未对 GBS 恢复期患者进一步研究对照,所以实验相对单一。以后笔者将对患者恢复期的不同时机作进一步研究,以更加有效地证实研究结果。

综上所述, Bregs 在维持免疫耐受和免疫平衡中有重要的作用。CD19⁺CD24^{hi}CD38⁺Bregs 及 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺Bregs 可能参与 GBS 的发病,但具体的机制尚不明确,有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] SORABH G, RAJESH V, RISHI S, et al. Cardiovascular complications and its relationship with functional outcomes in Guillain-Barré Syndrome[J]. QJM, 2019, 29: 1-12.
- [2] VALIZADEH A, SANAEI R, REZAEI N, et al. Potential role of regulatory B cells in immunological diseases[J]. Immunology Letters, 2019, 215:48-59.
- [3] THI CUC B, POHAR J, FILLATREAU S. Understanding regulatory B cells in autoimmune diseases: the case of multiple sclerosis[J]. Current Opinion in Immunology, 2019, 61: 26-32.
- [4] PIANCONE F, SARESELLA M, MARVENTANO I, et al. B lymphocytes in multiple sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 expressing-CD19⁺ lymphocytes modulate disease severity[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 1-11.
- [5] 中华医学会神经病学分会神经肌肉病学组. 中国吉兰-巴雷综合征诊治指南[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(8): 583-586.
- [6] DEBNATH M, NAGAPPA M, MURARI G, et al. IL-23/IL-17 immune axis in guillain barré syndrome: exploring newer vistas for understanding pathobiology and therapeutic implications[J]. Cytokine, 2018, 103: 77-82.
- [7] WOLF S D, DITTEL B N, HARDARDOTTIR F, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice[J]. Journal of Experimental Medicine, 1996, 184(6): 2271-2278.
- [8] MIZOGUCHI A, MIZOGUCHI E, TAKEDATSU H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation[J]. Immunity, 2002, 16(2): 219-230.
- [9] MARAVILLAS-MONTERO J L, ACEVEDO-OCHOA E. Acevedo-Ochoa, human B regulatory cells: the new players in autoimmune disease[J]. Revista De Investigacion Clinica, 2017, 69(5): 243-246.
- [10] VITALE G, MION F, PUCILLO C. Pucillo, regulatory b cells: evidence, developmental origin and population diversity[J]. Molecular Immunology, 2010, 48(1-3): 1-8.
- [11] van de VEEN W, STANIC B, WIRZ O F, et al. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(3): 654-665.
- [12] YU S, QI Y, WANG H, et al. Dysfunction of CD24⁺ CD38⁺ B cells in patients with Hashimoto's thyroiditis is associated with a lack of interleukin 10[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 90: 114-120.
- [13] LIU Z, DANG E, LI B, et al. Dysfunction of CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ B regulatory cells in patients with bullous pemphigoid[J]. Scientific Reports, 2016, 136(5): S7.
- [14] YANG B, TAN X, XIONG X, et al. Effect of CD40/CD40L signaling on IL-10-producing regulatory B cells in Chinese children with Henoch-Schönlein purpura nephritis[J]. Immunologic Research, 2017, 65(3): 592-604.
- [15] PALOMARES O, AKDIS M, MARTÍN-FONTECHA M, et al. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells[J]. Immunological Reviews, 2017, 278(1): 219-236.
- [16] GUO S, CHEN Q, LIANG X, et al. Reduced peripheral blood regulatory B cell levels are not associated with the expanded disability status scale score in multiple sclerosis[J]. J Int Med

- Res, 2018, 46(9): 3970-3978.
- [17] LIU F, JI J, LI X, et al. Decreased CD1d level is associated with CD86 over-expression in B cells from systemic lupus erythematosus[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(4): 328-337.
- [18] SAKKAS L I, DAOUSSIS D, MAVROPOULOS A, et al. Regulatory B cells: new players in inflammatory and autoimmune rheumatic diseases[J]. Semin Arthritis Rheum, 2019, 48(6): 1133-1141.
- [19] LI W, TIAN X, LU X, et al. Significant decrease in peripheral regulatory B cells is an immunopathogenic feature of dermatomyositis[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): DOI: 10.1038/srep27479.
- [20] AKDIS M, AAB A, ALTUNBULAKLI C, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : receptors, functions, and roles in diseases[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(4): 984-1010.
- [21] FANG J, LIN L, LIN D, et al. The imbalance between regulatory memory B cells reveals possible pathogenesis involvement in pediatric immune thrombocytopenia[J]. Hematology, 2019, 24: 473-479.

(李科 编辑)

本文引用格式：郝晨光，王艳，马建华．调节性 B 细胞在吉兰 - 巴雷综合征患者外周血中的表达及意义 [J]．中国现代医学杂志，2020，30(4): 34-38.