

# MS 患者泼尼松治疗前后外周血 Th1、Th2、Th17、Treg、Tc1 和 Tc2 淋巴细胞亚群变化

古再努尔·艾尔肯 古丽波斯旦·阿尤甫

**【摘要】 目的** 探讨多发性硬化(MS)患者泼尼松治疗前后外周血 Tc1、Tc2、Treg、Th1、Th2 及 Th17 淋巴细胞亚群变化。**方法** 选取本院 45 例 MS 患者(病例组)和 35 例同期于本院行常规体检的健康人员(对照组),比较病例组治疗前与对照组体检之日 T 淋巴细胞亚群和血浆细胞因子的水平,并比较病例组治疗前和泼尼松治疗后 T 淋巴细胞亚群和血浆细胞因子的水平。**结果** 病例组 Tc1、Treg 细胞百分率较对照组均明显降低,Th1、Th17 细胞百分率较对照组显著增高,Th17/Treg 细胞比例较对照组显著增高( $P<0.01$ );病例组与对照组 Tc2、Th2 细胞百分率及 Th1/Th2 细胞比例的比较均无明显差异( $P>0.05$ );与治疗前比较,病例组治疗 1 个月后 Th1、Th17 细胞百分率均明显降低,Treg、Tc1、Tc2 细胞百分率均显著增高,Th17/Terg 细胞比例显著下降( $P<0.01$ );病例组治疗 1 个月后 Th2、Th1/Th2 细胞比例与治疗前比较均无明显差异( $P>0.05$ )。病例组白细胞介素-4(IL-4)和白细胞介素-10(IL-10)水平较对照组均显著下降,白细胞介素-17A(IL-17A)和 $\gamma$ 干扰素水平较对照组均明显增高( $P<0.01$ );与治疗前比较,病例组治疗 1 个月后 IL-4 和 IL-10 水平均明显增高,IL-17A 和 $\gamma$ 干扰素水平显著下降( $P<0.01$ )。**结论** MS 的发生可能与 Treg 下调、Th17 上调密切相关,推测可能通过 MS 靶向提高 Treg 与降低 Th17 细胞百分率来维持 Th17/Treg 细胞比例的平衡。

**【关键词】** 多发性硬化 泼尼松 T 淋巴细胞 细胞因子

**【中图分类号】** R744.5<sup>+</sup>1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)02-0212-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.02.016

**The changes of Th1, Th2, Th17, Treg, Tc1 and Tc2 lymphocyte subsets in peripheral blood of MS patients before and after prednisone treatment** Guzainuer Aierken, Gulibositan Ayoufu. Department of Neurology, Kashi Prefecture First People's Hospital, Kashi Prefecture 844000

**【Abstract】 Objective** To study the changes of peripheral blood Tc1, Tc2, Treg, Th1, Th2 and Th17 lymphocyte subsets in patients with multiple sclerosis (MS) before and after prednisone treatment. **Methods** 45 MS patients (case group) and 35 healthy persons (control group) who underwent routine physical examination in our hospital at the same time were selected. The levels of T lymphocyte subsets and plasma cytokines were compared between the case group before treatment and the control group on the day of physical examination, and the levels of T lymphocyte subsets and plasma cytokines before treatment and after prednisone treatment were compared in the case group. **Results** The percentage of Tc1 and Treg cells in the case group was significantly lower than that in the control group, the percentage of Th1 and Th17 cells was significantly higher than that in the control group, and the percentage of Th17/Treg cells was significantly higher than that in the control group ( $P<0.01$ ). There was no significant difference in the percentage of Tc2 cells, Th2 cells and Th1/Th2 cells between the case group and the control group ( $P>0.05$ ). Compared with before treatment, the percentage of Th1 and Th17 cells in the case group decreased significantly after treatment, the percentage of Treg, Tc1 and Tc2 cells increased significantly, and the percentage of Th17/Terg cells decreased significantly ( $P<0.01$ ). The percentage of Th2 and Th1/Th2 cells in the case group had no significant difference after treatment compared with that before treatment ( $P>0.05$ ). The levels of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) in the case group were significantly lower than those in the control group, and the levels of interleukin-17A (IL-17A) and interferon- $\gamma$  were significantly higher than those in the control group ( $P<0.01$ ). Compared with before treatment, the levels of IL-4 and IL-10 in the case group increased significantly after treatment, while the levels of IL-17A and IFN- $\gamma$  decreased significantly ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The occur-

rence of MS might be closely related to Treg down-regulation and Th17 up-regulation. It was speculated that the proportion of Th17/Treg cells could be maintained by MS targeting to increase Treg and decrease Th17 cells in clinic.

【Key words】 Multiple sclerosis Prednisone T lymphocyte Cytokines

作为常见的一种自身免疫性疾病,多发性硬化(multiple sclerosis, MS)主要表现在中枢神经系统脱髓鞘病变,多发于欧美国家<sup>[1]</sup>,而在我国人群中的患病率相对较低。现阶段临床中尚无根治 MS 的特效方法,而免疫抑制和激素治疗仍是目前临床常用的治疗方法,均可有效减缓患者急性期和复发期病程<sup>[2-3]</sup>。本研究通过检测 MS 患者泼尼松治疗前后外周血 T 淋巴细胞亚群和相关细胞因子水平变化,进而探讨 T 淋巴细胞亚群在 MS 中的可能作用,从而为 MS 的临床治疗提供新的思路和策略。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月-2019 年 1 月本院收治的 45 例 MS 患者(病例组)和 35 例同期于本院行常规体检的健康人员(对照组),其中病例组男 18 例,女 27 例;年龄 22~64 岁,平均年龄( $38.07 \pm 9.14$ )岁;对照组男 15 例,女 20 例;年龄 21~62 岁,平均年龄( $36.99 \pm 9.46$ )岁。2 组性别和年龄比较均无明显差异( $P > 0.05$ )。纳入标准:病例组均符合 MS 的诊断标准<sup>[4]</sup>;对照组均为常规体检的健康人员,既往无严重急、慢性病史;年龄  $> 18$  岁;获得研究对象知情同意;排除标准:伴有感染、其它自身免疫性疾病、肝肾功能异常、心脑血管疾病、肿瘤、精神性疾病等;处于妊娠期或哺乳期;既往使用非甾体类抗炎药、免疫调节剂等;对研究药物过敏或伴有过敏体质;合并认知功能障碍、视力障碍、听力障碍等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本采集

分别取对照组体检之日血液标本、病例组治疗前和治疗 1 个月后清晨空腹肘前静脉血 5 mL,均置于肝素钠抗凝管中,其中 3 mL 血标本用于检测 T 淋巴细胞亚群,2 mL 血标本用于血浆细胞因子水平的检测。

#### 1.2.2 外周血 T 淋巴细胞亚群水平的检测

取 2 组各 3 mL 血标本,经等体积磷酸盐缓冲液进行稀释,通过淋巴细胞分离液对外周血单个核细胞进行分离;3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,

收集细胞,将细胞浓度调整为  $1 \times 10^6$ /mL,制成细胞悬液;标本采集的细胞数均至少为 2 000 个,采用全自动流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司, FC500 型)进行检测。

#### 1.2.3 血浆细胞因子水平的检测

取 2 组各 2 mL 血标本经离心处理后取血浆置于离心管中,于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境下保存待测。以 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液 50  $\mu\text{L}$  置于待测管中,加入 50  $\mu\text{L}$  捕获微球混合物,孵育 1 h;加入检测试剂 50  $\mu\text{L}$ ,于室温下进行孵育,时间为 2 h;加入洗液 1 mL,2 000 r/min 离心 10 min,弃其上清液;加入洗液 300  $\mu\text{L}$ ,采用流式微球芯片捕获技术进行检测 $\gamma$ -干扰素、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)及白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)的水平,用 Cell Quest 软件进行分析。

#### 1.2.4 统计学处理

采用 SPSS 23.0 版统计学软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示并采用  $t$  检验,计数资料以或(和)构成比、率(%)表示并采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病例组与对照组外周血 T 淋巴细胞亚群水平的比较

病例组 Tc1, Treg 细胞百分率较对照组均明显降低, Th1, Th17 细胞百分率较对照组显著增高, Th17/Treg 细胞比例较对照组显著增高( $P < 0.01$ );病例组与对照组 Tc2, Th2 细胞百分率及 Th1/Th2 细胞比例的比较均无明显差异( $P > 0.05$ )(表 1)。

### 2.2 病例组治疗前、治疗 1 个月后外周血 T 淋巴细胞亚群水平的比较

与治疗前比较,病例组治疗 1 个月后 Th1, Th17 细胞百分率均明显降低, Treg, Tc1, Tc2 细胞百分率均显著增高, Th17/Terg 细胞比例显著下降( $P < 0.01$ );病例组治疗 1 个月后 Th2 细胞百分率、Th1/Th2 细胞比例与治疗前比较均无明显差异( $P > 0.05$ )(表 2)。

表 1 病例组与对照组外周血 T 淋巴细胞亚群水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	T 淋巴细胞亚群(%)							
		Tc1	Tc2	Treg	Th1	Th2	Th17	Th17/Treg	Th1/Th2
对照组	35	3.36 ± 1.01	4.48 ± 1.13	34.89 ± 5.36	0.58 ± 0.17	1.98 ± 0.37	3.09 ± 0.94	0.12 ± 0.03	0.39 ± 0.09
病例组	45	0.78 ± 0.22*	4.09 ± 1.05	12.04 ± 3.11*	1.53 ± 0.24*	1.91 ± 0.32	13.86 ± 2.75*	1.48 ± 0.34*	0.43 ± 0.11

注:与对照组比较, \*  $P < 0.01$

表 2 病例组治疗前、治疗 1 个月后外周血 T 淋巴细胞亚群水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	T 淋巴细胞亚群(%)							
		Tc1	Tc2	Treg	Th1	Th2	Th17	Th17/Treg	Th1/Th2
治疗前	45	0.78 ± 0.22	4.09 ± 1.05	12.04 ± 3.11	1.53 ± 0.24	1.91 ± 0.32	13.86 ± 2.75	1.48 ± 0.34	0.43 ± 0.11
治疗 1 个月后	45	2.89 ± 0.51*	12.64 ± 3.05*	27.98 ± 7.35*	0.75 ± 0.19*	1.81 ± 0.21	6.43 ± 1.95*	0.24 ± 0.06*	0.39 ± 0.09

注:与治疗前比较, \*  $P < 0.01$

2.3 病例组与对照组血浆细胞因子水平的比较

病例组 IL-4 和 IL-10 水平较对照组均显著下降,IL-17A 和  $\gamma$ -干扰素水平较对照组均明显增高( $P < 0.01$ )(表 3)。

2.4 病例组治疗前、治疗 1 个月后血浆细胞因子水平的比较

与治疗前比较,病例组治疗 1 个月后 IL-4 和 IL-10 水平均明显增高,IL-17A 和  $\gamma$ -干扰素水平显著下降( $P < 0.01$ )(表 4)。

3 讨 论

直至目前,有关 MS 的具体病因和发病机制尚未完全明确,但普通观点认为 MS 的发生与环境因素、自身免疫反应、遗传因素、病毒感染等多方面密切相关<sup>[5]</sup>。MS 的临床表现主要为进行性神经功能障碍,病理改变主要表现在髓鞘脱失、轴索受损和免疫活性细胞浸润。随着病程的延长、病情的进展和加重,多数 MS 患者可进展为双下肢瘫痪,严重降低患者的生活质量,威胁患者的生命安全。免疫抑制等常规治疗虽可延缓病程进展,但难以明显缓解 MS 患者的病情程度,且长期治疗效果并不明确,同

时不良反应多发<sup>[6]</sup>,因此如何更好地改善 MS 的治疗效果仍是目前临床研究的热点。

通常认为,Th1 细胞活性过度增高是 MS 发病的主要免疫学机制,Th1 细胞介导在 MS 发生和发展的病理过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。随着近年来临床研究的不断深入,Th17 细胞已成为免疫学研究的一大热点,已有研究指出 Th17 细胞在多种自身免疫性疾病的病理过程中扮演着重要的角色<sup>[8]</sup>。作为一类独立的 CD4<sup>+</sup> T 细胞,Th17 细胞经活化后可诱导 IL-17 的生成,因此得名而来。Th17 细胞在分泌 IL-17 的同时,亦可诱导多种细胞因子的产生,如 TNF- $\alpha$ 、IL-26、IL-21、IL-29 及 IL-22 等<sup>[9]</sup>,而这些细胞因子均可刺激基质金属蛋白酶、趋化因子及促炎性细胞因子的表达,导致组织细胞炎性浸润、组织破坏,最终可诱发自身免疫性疾病的发生<sup>[10-11]</sup>。有研究表明,FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞具有调节机体对外源性抗原免疫反应程度的作用,并且其功能失调与感染性疾病<sup>[12]</sup>、过敏性疾病<sup>[13]</sup>和自身免疫性疾病<sup>[14]</sup>等多种疾病的发生存在密切关系。

本研究发现,病例组 Tc1、Treg 细胞百分率较对照组均明显降低,Th1、Th17 细胞百分率较对照

表 3 病例组与对照组血浆细胞因子水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	Th1 型细胞因子	Th2 型细胞因子		Th17 型细胞因子
		$\gamma$ -干扰素(pg/mL)	IL-4(ng/L)	IL-10(ng/L)	IL-17A(ng/L)
对照组	35	8.96 ± 1.69	12.65 ± 3.27	34.68 ± 9.14	23.64 ± 4.04
病例组	45	16.96 ± 4.14*	3.98 ± 1.17*	13.95 ± 3.25*	233.85 ± 29.13*

注:与治疗前比较, \*  $P < 0.01$

表 4 病例组治疗前、治疗 1 个月后血浆细胞因子水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	Th1 型细胞因子	Th2 型细胞因子		Th17 型细胞因子
		$\gamma$ -干扰素(pg/mL)	IL-4(ng/L)	IL-10(ng/L)	IL-17A(ng/L)
治疗前	45	16.96 ± 4.14	3.98 ± 1.17	13.95 ± 3.25	233.85 ± 29.13
治疗 1 个月后	45	11.89 ± 3.65*	9.14 ± 2.14*	63.74 ± 10.02*	66.98 ± 12.14*

注:与治疗前比较, \*  $P < 0.01$

组显著增高, Th17/Treg 细胞比例较对照组显著增高; 病例组与对照组 Tc2 细胞、Th2 细胞及 Th1/Th2 细胞比例的比较均无明显差异。此外, 与治疗前比较, 病例组治疗 1 个月后 Th1、Th17 细胞百分率均明显降低, Treg、Tc1、Tc2 细胞百分率均显著增高, Th17/Terg 细胞比例显著下降; 病例组治疗 1 个月后 Th2、Th1/Th2 细胞比例与治疗前比较均无明显差异。这表明通过激素治疗可在一定程度上减轻 MS 患者的临床症状, 但其不宜长期使用, 且不良反应明显, 因而存在一定不足。本研究结果提示, 靶向抑制 Th17 细胞和调节 FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞, 即通过靶向免疫调节 Th17/Terg 失衡可能是今后临床治疗自身免疫性疾病的重要方向。

IL-17 是早期生成的一种炎性细胞因子, 其具有广泛的生物学活性。既往研究发现, IL-17 在 MS 患者病灶中的转录水平显著升高, 并且其在患者脑脊液中的表达水平较健康人群显著上调<sup>[15]</sup>。各类细胞因子的相互制约或协同作用在免疫系统中起到重要的免疫调节作用, 本研究通过检测 MS 患者 Th1、Th2 及 Th17 型细胞因子水平后发现, 病例组 IL-4 和 IL-10 水平较对照组均显著下降, IL-17A 和  $\gamma$  干扰素水平较对照组均明显增高; 与治疗前比较, 病例组治疗 1 个月后 IL-4 和 IL-10 水平均明显增高, IL-17A 和  $\gamma$  干扰素水平显著下降。这提示通过调节 Th1/Th2 型细胞因子平衡可能是缓解 MS 患者免疫损伤的一种重要机制。

综上所述, MS 的发生可能与 Treg 下调、Th17 上调、Th17/Treg 型细胞因子失衡密切相关, 推测临床中可通过 MS 靶向提高 Treg 与降低 Th17 细胞来维持 Th17/Treg 细胞比例的平衡。

## 参 考 文 献

- [1] Jick SS, Li L, Gj F, et al. Epidemiology of multiple sclerosis: results from a large observational study in the UK[J]. *J Neurol*, 2015, 262(9):2033-2041.
- [2] Correale J, Gaitan MI, Ysrraelit MC, et al. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment[J]. *Brain*, 2017, 140(3):527-546.
- [3] Goodin DS. Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis[J]. *Handb Clin Neurol*, 2014, 122(1):455-464.
- [4] 中国免疫学会神经免疫分会. 中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 多发性硬化诊断和治疗中国专家共识(2018 版)[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2018, 25(6):387-394.
- [5] Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects[J]. *Curr Opin Neurol*, 2018, 31(6):752-759.
- [6] Bove R, Mchenry A, Hellwig K, et al. Multiple sclerosis in men: management considerations[J]. *J Neurol*, 2016, 263(7):1263-1273.
- [7] 王启荣, 卢祖能, 毛春, 等. T 细胞亚群与多发性硬化发病机制的关系[J]. *医学综述*, 2017, 23(15):2918-2922.
- [8] 李晓玲, 张博, 于春梅, 等. Th17/Treg 细胞在复发缓解型多发性硬化中的表达[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2015, 22(3):153-155, 161.
- [9] 傅增辉, 姜岩, 刘晶, 等. 多发性硬化患者 Th17 转录因子及相关细胞因子表达的研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2018, 44(4):226-229.
- [10] 李清学. 多发性硬化与白细胞介素的关系[J]. *神经损伤与功能重建*, 2015, 10(5):429-431.
- [11] 任刚, 李新毅, 李玉峰, 等. 多发性硬化患者外周血辅助性 T 细胞 17 比率 and 血清辅助性 T 细胞 17 相关细胞因子水平的 Meta 分析[J]. *中华风湿病学杂志*, 2018, 22(12):828-832.
- [12] Sun JK, Zhang WH, Chen WX, et al. Effects of early enteral nutrition on Th17/Treg cells and IL-23/IL-17 in septic patients[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(22):2799-2808.
- [13] Noval RM, Ta CL. Regulatory T cells in allergic diseases[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(3):639-652.
- [14] Spence A, Klementowicz JE, Bluestone JA, et al. Targeting Treg signaling for the treatment of autoimmune diseases[J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 37(1):11-20.
- [15] Bühler U, Fleischer V, Luessi F, et al. Role of IL-17-producing lymphocytes in severity of multiple sclerosis upon natalizumab treatment[J]. *Mult Scler*, 2017, 23(4):567-576.

(2019-07-16 收稿)

[1] Jick SS, Li L, Gj F, et al. Epidemiology of multiple sclerosis: re-