

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)07-0751-03

## 干扰素 $\beta 1b$ 对 Th17 细胞介导的复发-缓解型多发性硬化无效

张晓燕<sup>1</sup>, 张琦<sup>2</sup>, 石向群<sup>1\*</sup>, 尹榕<sup>1</sup>, 张志强<sup>1</sup>, 侯雪涓<sup>1</sup>(<sup>1</sup>兰州军区兰州总医院神经内科, 甘肃兰州 730050; <sup>2</sup>解放军第一医院神经内科, 甘肃兰州 730030)

**[摘要]** 目的 探讨干扰素  $\beta 1b$  (IFN- $\beta 1b$ ) 在复发-缓解型多发性硬化 (RRMS) 中的疗效与外周血中 Th17 细胞的关系。方法 收集 11 例 RRMS 患者, 给予 6 个月 IFN- $\beta 1b$  治疗。评估治疗前后扩展残疾状态评分 (EDSS) 及核磁共振 (MRI) T2 病灶数的变化。并通过流式细胞术检测治疗前患者外周血单个核细胞 (PBMC) 中 Th17 细胞的数量。结果 11 例 RRMS 患者根据 EDSS 评分的变化分为治疗有效组和无效组。两组之间 EDSS 评分及 MRI T2 病灶数在治疗前无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 治疗后有效组 EDSS 评分和 MRI T2 病灶数较无效组明显减少 ( $P < 0.05$ )。治疗前 PBMC 中 Th17 细胞数量在无效组较有效组明显增加 ( $P < 0.05$ )。结论 IFN- $\beta 1b$  治疗对 Th17 细胞介导的 RRMS 无明显疗效。

**[关键词]** 复发-缓解型多发性硬化; 干扰素  $\beta$ ; Th17 细胞

**[中图分类号]** R744.5<sup>+</sup>1, R392.11 **[文献标志码]** A

## Th17-mediated relapsing-remitting multiple sclerosis is nonresponsive to interferon- $\beta 1b$

ZHANG Xiaoyan<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>2</sup>, SHI Xiangqun<sup>1\*</sup>, YIN Rong<sup>1</sup>, ZHANG Zhiqiang<sup>1</sup>, HOU Xuemei<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Neurology, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Region, Lanzhou 730050; <sup>2</sup>Department of Neurology, First Hospital of PLA, Lanzhou 730030, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between the efficacy of interferon beta-1b (INF- $\beta 1b$ ) on relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and the Th17 cells in peripheral blood. **Methods** Eleven RRMS patients were enrolled and treated with 250  $\mu$ g INF- $\beta 1b$  for 6 months. Expanded disability status scale (EDSS) score and T2 lesion number on MRI were examined both at baseline and at the end of the study. Flow cytometry was used to detect the number of Th17 cells in peripheral blood before the treatment. **Results** According to the EDSS scores, the 11 cases of RRMS were divided into two groups: the effective group and the ineffective group. The EDSS scores and the number of lesions on T2-weighted MRI were not different significantly between the two groups ( $P > 0.05$ ) before the treatment. But after the treatment, compared with the ineffective group, the EDSS scores and the number of lesions on T2-weighted MRI decreased significantly in the effective group ( $P < 0.05$ ). Compared with the effective group, the number of Th17 cells in the ineffective group increased significantly ( $P < 0.01$ ) before treatment. **Conclusion** Th17-mediated RRMS is nonresponsive to IFN- $\beta 1b$  treatment.

**[Key words]** relapsing-remitting multiple sclerosis; IFN- $\beta$ ; Th17 cells

IFN- $\beta$  在治疗多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 中主要起免疫调节的作用, 并且因其具有良好的耐受性, 减少约 30% 复发率及可明显缓解残疾程度, 已成为临床治疗 MS 的一线药物<sup>[1]</sup>。但 IFN- $\beta$  价格昂贵, 且有 10% ~ 50% 的 RRMS 患者对 IFN- $\beta$  治疗无效<sup>[2]</sup>。因此寻找一个可能预测 IFN- $\beta$  疗效的标志物非常重要。近年 Th17 细胞因参与多种自身免疫性疾病的病理过程而备受关注<sup>[3]</sup>。其不但可以介导 MS 的发生, 还参与了 IFN- $\beta$  治疗 MS 的作用机制。Th17 细胞主要产生 IL-17、IL-7F、IL-21 等细胞因子, 介导自身免疫性疾病、炎症反应、移植排斥和肿瘤的

发生发展。MS 中 IFN- $\beta$  可以通过减少 IL-17 介导的免疫反应发挥治疗作用<sup>[4]</sup>。但部分 MS 患者经 IFN- $\beta$  治疗后病情恶化<sup>[5]</sup>。有研究显示 IFN- $\beta$  可以缓解 Th1 细胞介导的小鼠实验性自身反应性脑脊髓膜炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), 但 Th17 细胞介导的 EAE 却加重<sup>[6]</sup>。在 MS 患者中 IFN- $\beta$  为何具有双相作用尚不清楚。本实验检测了治疗前复发-缓解型 MS (relapse-remitting multiple sclerosis, RRMS) 患者外周血中 Th17 细胞, 评估 Th17 细胞水平是否与 IFN- $\beta$  的疗效相关。

收稿日期: 2013-01-12; 接受日期: 2013-03-22

作者简介: 张晓燕(1978-), 女, 陕西渭南人, 硕士研究生

Tel: 18629259558; E-mail: babatang@163.com

\*Corresponding author, 石向群, E-mail: shixq-2003@163.com

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 选取2011-08/2013-02在兰州军区兰州总医院神经内科和解放军第一医院神经内科就诊的RRMS患者11例,诊断均符合2005年版McDonald诊断标准<sup>[7]</sup>。患者中男2例,女9例。以上所有患者此前均未经过干扰素治疗,并且近3个月内未使用过激素或免疫抑制药物。排除了其他自身免疫性疾病、近期感染及肿瘤等。全部受试对象均签署知情同意书。IFN- $\beta$ -1b选自中国北京拜耳先灵公司。核磁共振为德国西门子公司VERIO 3.0T。淋巴细胞分离液购自达科为公司。荧光团标记的单克隆抗体(mAb)(CD3-APC, CD8-FITC, IL-17-PE)流式抗体购自Biolegend公司。流式细胞仪为FAC-Scalibur。破膜试剂盒购自BD公司。佛波酯(PMA)和离子霉素(ionomycin)购自Sigma公司。小牛血清购自武汉三利生物技术公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 干扰素使用方法** 所有患者均给予IFN- $\beta$ -1b 250  $\mu$ g,皮下注射,隔日1次,治疗6个月。治疗期间,所有患者饮食及生活习惯未发生变化,且未使用免疫抑制药物。

**1.2.2 神经系统功能缺失评分** 所有患者治疗前后均使用扩展残疾状态评分(expanded disability status scale, EDSS)量表进行评分,取0~5分,得分越高残疾程度越严重。

**1.2.3 核磁共振检查** 所有患者在治疗前后均进行头颅及全脊髓MRI检查,采用国际标准程序进行,统计T2病灶数。

**1.2.4 分离外周血单个核细胞** 使用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。治疗前无菌采集患者静脉血5 mL,置于肝素钠抗凝管中,加入0.1 mol/L PBS缓冲液5 mL制成细胞悬液。用巴氏吸管吸取细胞悬液沿离心管壁缓慢加在5 mL的淋巴细胞分离液上,室温水平离心2 000 r/min, 20 min。离心后可见从上到下分为5层。小心吸取中间云雾状层,即为PBMC层。用0.1 mol/L PBS洗涤2次备用。

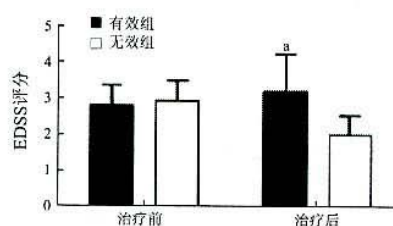
**1.2.5 流式细胞术检测外周血Th17细胞** 取 $2 \times 10^6$ 个PBMC, RPMI1640培养基重悬至250  $\mu$ L,接种于96孔培养板,加入PMA 50 ng/mL和离子霉素750 ng/mL刺激5 h。收集细胞洗涤后,同时加入CD3-APC mAb和CD8-FITC mAb,混匀后4℃冰箱避光放置30 min。用流式洗液洗涤2次,加入破膜剂,4℃冰箱避光放置20 min,洗液洗涤2次。加入PE标记

的IL-17A进行胞内染色,4℃冰箱避光放置30 min,洗液洗涤1次。重悬至300  $\mu$ L重悬,用FACScalibur型流式细胞仪进行检测,Flowjo7.6软件进行数据分析。

**1.3.6 统计学分析** 采用SPSS 13.0统计学软件完成。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用单因素的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EDSS评分** 经IFN- $\beta$ -1b治疗后11例患者中6例EDSS评分下降,设定为有效组;3例患者评分无变化,2例患者评分升高,设定为无效组。有效组与无效组在治疗前EDSS评分无统计学差异( $P > 0.05$ ),但治疗结束后两组之间有显著统计学差异( $P < 0.05$ ,图1)。

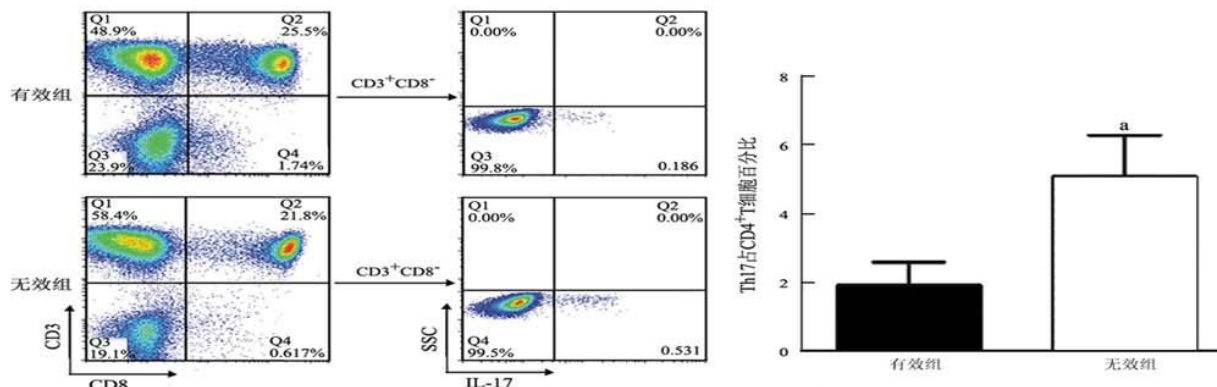


\* $P < 0.05$  vs 治疗前有效组。

图1 11例RRMS患者经IFN- $\beta$ -1b治疗前、后EDSS评分比较

**2.3 MRI检查** 治疗前无效组T2病灶数( $3.20 \pm 0.83$ ),有效组T2病灶数( $2.83 \pm 0.75$ ),2组之间无统计学差异( $P > 0.05$ )。经IFN- $\beta$ -1b治疗6个月后,无效组T2病灶数( $3.60 \pm 1.14$ ),有效组T2病灶数( $1.52 \pm 0.58$ ),两组之间有显著统计学差异( $P < 0.05$ )。

**2.4 PBMC中Th17细胞含量** 通过流式细胞术检测,治疗前PBMC中Th17细胞数无效组较有效组明显增加,两组之间有统计学差异( $P < 0.05$ ,图2)。治疗后2组Th17细胞数均有所下降,有效组治疗前后有统计学差异( $P < 0.05$ ),无效组治疗前后无统计学差异( $P > 0.05$ )。



\* $P < 0.05$  vs 有效组。

图2 使用IFN- $\beta$ -1b治疗RRMS无效组和有效组之间PBMC中Th17细胞数量

### 3 讨论

MS是以中枢神经系统白质脱髓鞘病变为特点的自身免疫性疾病,临床RRMS最常见,占85%以上,主要以病程中复发-缓解为特点。IFN- $\beta$ 为1型IFN,通过其免疫调节作用有效预防RRMS复发。但有30%~50%的MS患者对IFN- $\beta$ 治疗无效。临床上主要通过临床和影像学两方面对IFN- $\beta$ 的疗效进行判定。本研究结果显示11例经IFN- $\beta$ -1b治疗6月的RRMS患者中有6例EDSS评分降低,MRI T2病灶数减少,治疗有效,而其余5例EDSS评分和MRI T2病灶数无明显变化或者增高,治疗无效。此外,我们在使用IFN- $\beta$ -1b治疗前检测患者PBMC中Th17细胞,发现无效组Th17细胞数量较有效组明显增加。

以往认为MS是由Th1细胞诱导产生的。IFN- $\beta$ 通过抑制Th1产生的炎性因子IFN- $\gamma$ 和IL-12发挥作用<sup>[8]</sup>。近期研究Th17细胞亦可以介导MS的发生<sup>[9]</sup>。1型IFN可以通过抑制RORc,IL-17A和IL-23R的表达减少CD45RA T细胞向Th17细胞的分化<sup>[10]</sup>。MS患者经IFN- $\beta$ 治疗后血清IL-17水平明显下降<sup>[11]</sup>。但仍有部分MS患者使用IFN- $\beta$ 治疗无效甚至病情加重。以前报道因为产生了针对IFN- $\beta$ 的抗体导致治疗无效。近期研究显示IFN- $\beta$ 治疗Th1介导的鼠类EAE有效,但加重Th17介导的EAE<sup>[12]</sup>。血清中IL-17A水平在IFN- $\beta$ 治疗无效的RRMS组患者较有效组明显增加<sup>[13]</sup>。但IFN- $\beta$ 疗效是否与Th17细胞水平存在相关性尚不清楚。本研究发现IFN- $\beta$ 无效组在治疗前PBMC中Th17细胞较有效组明显增加。提示由Th17细胞介导的MS可能是导致IFN- $\beta$ 治疗无效的重要原因,但其机制不详。有报道IFN- $\beta$ 治疗有效的MS患者PBMC中可以比治疗无效患者诱导产生更多IL-27,IL-27可以抑制IL-17的产生<sup>[14]</sup>。Th17介导的MS患者可能类似银屑病和系统性红斑狼疮患者可以产生大量的内源性的IFN- $\beta$ 干扰素致使治疗失败<sup>[15]</sup>,此外,由于遗传基因的不同也是导致IFN对MS的不同疗效的原因之一<sup>[16]</sup>。

综上所述,IFN- $\beta$ 治疗对Th17介导的RRMS患者是无效的,因此在治疗前检测患者外周血Th17细胞的水平对预测IFN- $\beta$ 的疗效有一定的帮助。

### 参考文献:

- [1] Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis[J]. *CNS Drugs*, 2011, 25(6): 491-502.
- [2] Kvarnström M, Ydrefors J, Ekerfelt C, et al. Longitudinal interferon- $\beta$  effects in multiple sclerosis; Differential regulation of IL-10 and IL-17A, while no sustained effects on IFN- $\gamma$ , IL-4 or IL-13[J]. *J Neurol Sci*, 2013, 325(1-2): 79-85.
- [3] 牛倩,黄卓春,蔡蓓,等. 类风湿性关节炎患者外周血Th17/Treg细胞比率失衡的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(3): 267-273.
- [4] Sweeney CM, Loneragan R, Basdeo SA, et al. IL-27 mediates the response to IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(6): 1170-1181.
- [5] Axtell RC, Raman C, Steinman L. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44(2): 114-120.
- [6] Axtell RC, Raman C, Steinman L. Interferon- $\beta$  exacerbates Th17-mediated inflammatory disease[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(6): 272-277.
- [7] Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis; 2005 revisions to the "McDonald Criteria"[J]. *Ann Neurol*, 2005, 58(6): 840-846.
- [8] Nagai T, Devergne O, van Seventer GA, et al. Interferon-beta mediates opposing effects on interferon-gamma-dependent interleukin-12 p70 secretion by human monocyte-derived dendritic cells[J]. *Scand J Immunol*, 2007, 65(2): 107-117.
- [9] Montes M, Zhang X, Berthelot L, et al. Oligoclonal myelinreactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells[J]. *Clin Immunol*, 2009, 130(2): 133-144.
- [10] Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, et al. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation[J]. *J Immunol*, 2009, 183(8): 5418-5427.
- [11] Esendagli G, Kume AT, Sayat G, et al. Evaluation of Th17-related cytokines and receptors in multiple sclerosis patients under interferon beta-1 therapy[J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 255(1-2): 81-84.
- [12] Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis[J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 406-412.
- [13] Balasa R, Bajko Z, Hutanu A. Serum levels of IL-17A in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon- $\beta$ [J]. *Mult Scler*, 2012 Dec 3. [Epub ahead of print]
- [14] Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta[J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(5): 499-509.
- [15] Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production[J]. *J Exp Med*, 2005, 202(1): 135-143.
- [16] Mahurkar S, Moldovan M, Suppiah V, et al. Identification of shared genes and pathways: a comparative study of multiple sclerosis susceptibility, severity and response to interferon beta treatment[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57655.