

白细胞介素9在重症肌无力发病中的作用

何柳平,杨欢

摘要 目的:检测重症肌无力(MG)患者治疗前、后血清和CD4⁺T细胞中白细胞介素(IL)-9的表达水平及变化,探讨IL-9水平与MG发病的关系。**方法**:MG患者22例纳入MG组,年龄、性别匹配的正常健康人21例纳入对照组。于治疗前和治疗8周后,采用酶联免疫分析法(ELISA)检测2组患者血清IL-9水平和抗AChR抗体滴度;2组各随机抽取8例受试,于治疗前、后采用免疫磁珠法分选其外周血CD4⁺T细胞,RT-qPCR法检测CD4⁺T细胞总mRNA中的IL-9的表达水平。于治疗前、后对患者进行进行QMG评分。**结果**:本研究结束时,MG组失访4例,共获得18例数据,纳入分析。治疗前,MG组血清IL-9水平及外周血CD4⁺T细胞中IL-9的相对表达水平均高于对照组(均 $P<0.05$);治疗后,MG组血清IL-9水平及外周血CD4⁺T细胞中IL-9的相对表达水平均低于本组治疗前($P<0.05$)。未发现IL-9水平与定量重症肌无力评分(QMG)、IL-9水平与抗AChR抗体滴度之间存在显著相关性。**结论**:IL-9在成年人MG患者治疗前的血清和CD4⁺T细胞中表达升高,且治疗后下降,可能参与了MG的发病过程。

关键词 重症肌无力;白细胞介素9;CD4⁺T细胞

中图分类号 R741;R741.02;R746.1 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.04.012

何柳平,杨欢. 白细胞介素9在重症肌无力发病中的作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(4): 199-201.

作者单位
中南大学湘雅医院
神经内科
长沙 410008
基金项目
国家自然科学基金
(81571173)
收稿日期
2018-09-19
通讯作者
杨欢
yangh69@126.com

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种由于神经肌肉接头突触后膜乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR)被自身抗体破坏,从而引发神经肌肉接头传递障碍的自身免疫性疾病,其主要症状是骨骼肌易疲劳性^[1]。研究显示,AChR-特异性的辅助性T(Th)细胞与自身反应性抗体的产生密切相关,并在MG和实验性自身反应性重症肌无力(experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG)中起着重要作用^[2]。CD4⁺T细胞可分为Th1、Th2、Th17及调节性T细胞等^[3,4],在MG的发生、发展中均发挥着重要作用。既往认为IL-9是Th2相关的细胞因子,现已表明IL-9主要是由CD4⁺Th细胞亚群中的Th9所分泌^[5],在炎症性疾病中有着重要作用^[6-8]。研究显示,血清IL-9水平在EAMG中上升,IL-9抗体能抑制EAMG动物疾病进展和降低血清中抗AChR Ab IgG的水平^[9]。但针对IL-9在MG患者中的研究极少,本研究通过检测MG患者治疗前后血清及CD4⁺T细胞中IL-9的水平,进一步分析其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2017年3月至2018年4月就诊于中南大学湘雅医院神经内科确诊为MG的患者22例纳入MG组,14例患者有抗胆碱酯酶剂服用史,均无免疫抑制剂服用史。MG诊断标准:具备MG典型的临床症状和体征,即疲劳试验阳性,同时新斯的明试验阳性,并经神经电生理检查确诊。记录患者年龄、性别、用药史、定量重症肌无力评分(quantitative myasthenia gravis score, QMG)及抗AChR抗体滴度。选择我院排除感染、神经系统及自身免疫系统疾病、且性别和年龄匹配的健康体检者21例纳入对

照组。2组年龄和性别差异无统计学意义,见表1。本研究获得医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

表1 2组一般情况比较

组别	例数	年龄/ (岁, $\bar{x}\pm s$)	男/女
对照组	21	66.4±5.6	10/11
MG组	22	67.8±5.81	11/11
P值		0.916	0.924

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与材料 人血清IL-9检测试剂盒购于美国ThermoFisher公司,人外周血CD4⁺T分选磁珠购于德国Miltenyi公司,逆转录及荧光定量PCR试剂盒购于加拿大Abm公司。

1.2.2 血清标本收集及指标检测 MG组患者给予免疫抑制剂治疗(其中口服糖皮质激素15例,口服他克莫司3例)治疗,共治疗8周。于治疗前、后,抽取患者静脉血10 mL,分离血清,−80℃保存。对照组于体检时抽取患者静脉血10 mL,分离血清,−80℃保存。①血清IL-9水平检测:采用ELISA法检测血清IL-9水平,试验步骤及结果定性严格参照ELISA试剂盒说明书。②CD4⁺T细胞IL-9表达水平检测:2组各随机选取8例受试,密度离心法提取人外周血中单个核细胞,免疫磁珠分选单个核细胞中的CD4⁺T细胞,流式检测分选细胞纯度>95%。Trizol法提取CD4⁺T细胞总mRNA,采用RT-qPCR法检测IL-9表达。所有实验步骤均按照说明书操作。③抗AChR抗体滴度检测:送血清样本至广州达安检验公司,采用ELISA法检测抗AChR抗体滴度。④于治疗前、后对患者进行进行QMG评分^[10]。

1.3 统计学处理

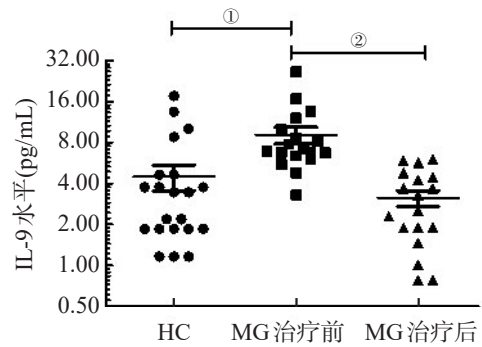
采用SPSS 23.0及Graph Prism5.0软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本均数 *t* 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 *Pearson* 分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

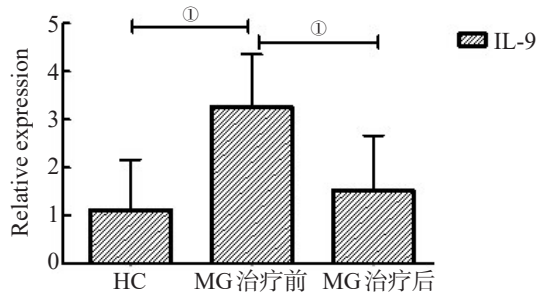
本研究结束时, MG 组失访 4 例,共获得 18 例数据,纳入分析。MG 组治疗前血清 IL-9 水平为 (9.12 ± 1.13) pg/mL,高于对照组的 (4.51 ± 0.96) pg/mL ($P<0.05$);MG 组治疗后血清 IL-9 水平为 (3.13 ± 0.42) pg/mL,低于本组治疗前 ($P<0.05$);见图 1。

RT-qPCR 法检测结果显示,治疗前 MG 组外周血 CD4⁺ T 细胞中 IL-9 的相对表达水平高于对照组 ($P<0.05$);治疗后 MG 组 CD4⁺ T 细胞中 IL-9 的相对表达水平为低于本组治疗前 ($P<0.05$);见图 2。

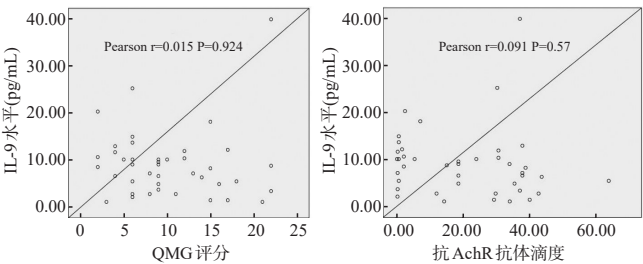
将 MG 患者治疗前、后血清 IL-9 水平分别与对应时间点的 QMG 评分和抗 AChR 抗体滴度进行相关性分析,未发现 IL-9 水平与 QMG 评分,IL-9 水平与抗 AChR 抗体滴度之间存在显著相关性,见图 3。



注:① $P<0.05$,② $P<0.01$
图1 各组血清IL-9水平及治疗前后变化



注:① $P<0.05$
图2 各组CD4⁺T细胞中IL-9的表达水平及治疗前后变化



注:(A)MG患者血清IL-9水平与QMG评分的相关性;(B)MG患者血清IL-9水平与抗AChR抗体滴度的相关性
图3 血清IL-9水平与QMG评分和抗AChR抗体滴度的相关性

3 讨论

既往研究显示,CD4⁺ T 细胞及其辅助细胞亚群中的 Th1、Th2 及 Th17、调节性 T 细胞 (Treg) 均参与了 MG 和 EAMG 的发生^[2,11]。当 CD4⁺ 初始 T 细胞受到转化生长因子 β (TGF- β) 和 IL-4 的共同刺激后,可分化为 Th9^[12]。Th9 在 II 型变态反应方面的功能与 Th2 细胞有关,而在自身免疫方面与 Th1 细胞和 Th17 细胞有关,其分泌的 IL-9 可在 Th1/Th17 细胞介导的炎症和 Treg 中产生广泛作用^[13,14]。MG 是一种自身免疫性疾病,探讨 IL-9 在 MG 患者中的表达与作用有助于阐释 MG 的发病机制。本研究结果显示,与对照组相比, MG 组治疗前血清 IL-9 水平明显升高, MG 组治疗后血清 IL-9 水平较治疗前下降 (均 $P<0.05$)。这与 EAMG 动物实验结果显示的 Th9 比例及血清 IL-9 水平上升相一致^[9]。在其他自身免疫相关性疾病也有类似报道, IL-9 细胞比例及血清 IL-9 在类风湿性关节炎^[15]、系统性红斑狼疮^[16,17] 中升高。IL-9 在 MG 发病机制中所起作用,可能是由于 Th9 细胞能通过分泌 IL-9 介导募集自身免疫功能的 Th17 细胞^[18], 而 Th17 细胞和调节性 T 细胞失衡在 MG 发病机制中的作用已被报道^[2,19]。进一步研究显示 Th17 细胞也可产生大量 IL-9^[20], 而产生的 IL-9 反过来可使 Th17 扩增, 从而在类风湿性关节炎^[21]、多发性硬化^[22] 和系统性红斑狼疮^[23] 等自身免疫疾病中起作用。在 IL-9R 敲除的 EAE 小鼠模型中, Th17 数量减少^[24]。与此一致, 在 MG 外周血中 Th17 比例增加^[19], 由此推测 IL-9 可能通过影响 CD4⁺ T 的不同亚群细胞, 在 MG 中起作用, 这需要进行进一步的研究去验证。

Th9 细胞主要由 CD4⁺ 初始 T 细胞分化而来, 而 IL-9 主要由 Th9 分泌^[18]。因此, 本研究进一步分析 MG 患者 CD4⁺ T 细胞中 IL-9 的水平, 结果显示与对照组相比, MG 组治疗前 CD4⁺ T 细胞中 IL-9 表达上调, 且 MG 组治疗后其 IL-9 水平较治疗前下降 (均 $P<0.05$)。Ouyang 等^[25] 研究发现在未接受治疗的系统性红斑狼疮患者中, 血清 IL-9 水平升高, 经过激素治疗, 其水平出现下降。目前的研究尚未阐明免疫治疗使血清 IL-9 水平下调的机制。推测有以下几个原因: ①免疫治疗使血清中 IL-4 下降^[26], 从而引起由 CD4⁺ 初始 T 细胞转化分泌 IL-9 的 Th9 细胞减少。②激素治疗可降低外周血中产生 IL-9 的 CD4⁺ T 数量^[25]。这提示 IL-9 在 MG 的发病过程中可能起了一定的作用, 需进一步研究证实。

研究显示, IL-9 能促进 B 细胞分泌 IgE 和 IgG 抗体^[27-30]。本研究结果显示: IL-9 与患者血清中抗 AChR 抗体滴度之间并无明显相关性, 这与前人的研究不一致。既往研究显示, IL-9 抗体能抑制 EAMG 动物疾病进展和降低血清中 anti-AChR Ab IgG 的水平^[9]。在系统性红斑狼疮动物模型中, 也发现 IL-9 抗体能降低血清抗 dsDNA 抗体滴度, 缓解狼疮肾炎的症状^[31]。在系统性红斑狼疮中, IL-9 和 IL-17 能通过激活 B 细胞内的 JAK/STAT 途径, 增加 STAT3 磷酸化, 进而诱导 B 细胞的活化与自身抗体的产生^[32,33]。在 EAMG 中, 应用 IL-9 抗体后也发现 STAT3 表达是下调的^[9], 但是在 MG 患者中尚无此研究, 故需要进一步扩大样本量去验证 IL-9 与 MG 血清中抗 AChR 抗体的关系, 并提示最好的是验证 AChR 抗体特异性 B 细胞与 IL-9 之间的关系。本研

究中未发现IL-9与患者QMG评分之间的明显相关性。血清IL-9水平与自身免疫性疾病的严重程度及治疗的关系尚存在争议,既往也有研究显示在系统性红斑狼疮及风湿性关节炎患者中,其血清IL-9与疾病的严重程度之间无明显相关性^[16]。这可能与IL-9既能促进Th17扩增,又增强Treg细胞的抑制功能^[19,34]有关。在不同疾病的复杂机体免疫反应过程中,Th9可作为一种“双刃剑”,既有免疫保护的作用,也有免疫致病的方面。

综上所述,本试验结果显示IL-9在成年人MG患者治疗前的血清和CD4⁺T细胞中表达升高,且治疗后下降,其可能参与了MG的发病过程。但是否可作为评价MG的治疗监测指标,还需进一步加大样本量,进行临床分析。

参考文献

- [1] Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14: 1023-1036.
- [2] 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(1 Suppl): e826-836.
- [3] Dupage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 149-163.
- [4] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 445-489.
- [5] Ramming A, Druz D, Leipe J, et al. Maturation-related histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development[J]. *Blood*, 2012, 119: 4665-4674.
- [6] Weigmann B, Neurath MF. Th9 cells in inflammatory bowel diseases[J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39: 89-95.
- [7] Ciccía F, Guggino G, Ferrante A, et al. Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 185: 125-132.
- [8] Pan HF, Leng RX, Li XP, et al. Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24: 515-522.
- [9] Yao X, Kong Q, Xie X, et al. Neutralization of interleukin-9 ameliorates symptoms of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats by decreasing effector T cells and altering humoral responses[J]. *Immunology*, 2014, 143: 396-405.
- [10] Jaretzke A, 3rd, Barohn RJ, Ernst RM, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America[J]. *Neurology*, 2000, 55: 16-23.
- [11] Masuda M, Matsumoto M, Tanaka S, et al. Clinical implication of peripheral CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 225: 123-131.
- [12] Veldhoen M, Uyttenhove C, Van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9: 1341-1346.
- [13] 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: 7169-7177.
- [14] Tan C, Azia MK, Lovaas JD, et al. Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site[J]. *J Immunol*, 2010, 185: 6795-6801.
- [15] Ciccía F, Guggino G, Rizzo A, et al. Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*

- (Oxford), 2015, 54: 2264-2272.
- [16] Dantas AT, Marques CD, Da Rocha Junior LF, et al. Increased Serum Interleukin-9 Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenic Role or Just an Epiphenomenon[J]? *Dis Markers*, 2015, 2015: 519638.
- [17] Ouyang H, Shi YB, Su N, et al. [Abnormality and significance of interleukin-9 and CD4(+) interleukin-9(+) T-cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus][J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2013, 93: 99-103.
- [18] Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity[J]. *Trends Immunol*, 2014, 35: 61-68.
- [19] Villegas JA, Van Wassenhove J, Le Panse R, et al. An imbalance between regulatory T cells and T helper 17 cells in acetylcholine receptor-positive myasthenia gravis patients[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1413: 154-162.
- [20] Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3⁺ natural regulatory T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 12885-12890.
- [21] Khan IH, Krishnan VV, Ziman M, et al. A comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009, 76: 159-168.
- [22] Tzartos JS, Friese MA, Caner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172: 146-155.
- [23] Pan HF, Ye DQ, Li XP. Type 17 T-helper cells might be a promising therapeutic target for systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008, 4: 352-353.
- [24] Nowak EC, Noelle RJ. Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine[J]. *Immunology*, 2010, 131: 169-173.
- [25] Ouyang H, Shi Y, Liu Z, et al. Increased interleukin9 and CD4⁺IL-9⁺ T cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7: 1031-1037.
- [26] NESTOR CE, DADFAR E, ERNERUDH J, et al. Sublingual immunotherapy alters expression of IL-4 and its soluble and membrane-bound receptors[J]. *Allergy*, 2014, 69: 1564-1566.
- [27] Wilhelm C, Turner JE, Van Snick J, et al. The many lives of IL-9: a question of survival[J]? *Nat Immunol*, 2012, 13: 637-641.
- [28] Petit-Frere C, Dugas B, Braquet P, et al. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes[J]. *Immunology*, 1993, 79: 146-151.
- [29] Vink A, Warnier G, Brombacher F, et al. Interleukin 9-induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population[J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 1413-1423.
- [30] Fawaz LM, Sharif-Askari E, Hajoui O, et al. Expression of IL-9 receptor alpha chain on human germinal center B cells modulates IgE secretion[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120: 1208-1215.
- [31] Yang J, Li Q, Yang X, et al. Interleukin-9 Is Associated with Elevated Anti-Double-Stranded DNA Antibodies in Lupus-Prone Mice[J]. *Mol Med*, 2015, 21: 364-370.
- [32] Wang L, Yi T, Kortylewski M, et al. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway[J]. *J Exp Med*, 2009, 206: 1457-1464.
- [33] Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9[J]. *J Immunol*, 2011, 186: 3283-3288.
- [34] Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, et al. Serum interleukin 9 levels are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency and severity of pulmonary fibrosis[J]. *J Rheumatol*, 2011, 38: 2193-2197.

(本文编辑:唐颖馨)