

吉兰-巴雷综合征患者外周血记忆性 T 细胞和记忆性 B 细胞亚群的变化及其临床意义

刘坛¹, 黄小雨², 张勇²

1.湖州市第一人民医院神经内科, 浙江湖州 313000; 2.徐州医科大学附属医院神经内科, 江苏徐州 221000

[摘要] 目的 探讨吉兰-巴雷综合征 (Guillain-Barré syndrome, GBS) 患者外周血记忆性 T 细胞和记忆性 B 细胞亚群的变化及其临床意义。方法 选取 2018 年 6 月至 2020 年 12 月于徐州医科大学附属医院神经内科住院的 16 例 GBS 患者作为研究组, 并选取同期 16 名来院的健康体检者作为对照组。流式细胞术检测两组入选者的外周血 T 细胞亚群, 包括 CD4⁺ 初始 T 细胞 (naive T cells, TN)、CD4⁺ 中央记忆性 T 细胞 (central memory T cells, TCM)、CD4⁺ 效应记忆性 T 细胞 (effector memory T cells, TEM) 和 CD4⁺ 终末分化效应记忆性 T 细胞 (terminally differentiated effector memory T cells, TEMRA) 及记忆性 B 细胞、浆母细胞的占比并分析其临床价值。结果 与对照组相比, 研究组患者的 CD4⁺TN 及 CD8⁺TN 均明显下降 ($P<0.05$), CD4⁺TEM 及 CD8⁺TEM 均明显升高 ($P<0.05$), TCM 及 TEMRA 在 CD4 和 CD8 上的比例比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组相比, 研究组记忆性 B 细胞比例明显升高 ($P<0.05$), 两组患者间浆母细胞占比比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。GBS 患者外周血 CD4⁺TEM 及 CD8⁺TEM 占比与 Hughes 残疾评分、脑脊液蛋白、脑脊液免疫球蛋白 G 及记忆性 B 细胞占比均呈正相关 ($P<0.05$)。结论 GBS 患者存在记忆性 T 细胞和记忆性 B 细胞亚群免疫紊乱, CD4⁺TEM 细胞、CD8⁺TEM 细胞及记忆性 B 细胞占比升高, 这很可能是 GBS 发病过程中重要的外周免疫机制。

[关键词] 吉兰-巴雷综合征; 效应记忆性 T 细胞; 记忆性 B 细胞

[中图分类号] R743.3 **[文献标识码]** A **[DOI]** 10.3969/j.issn.1673-9701.2024.06.013

Changes and clinical significance of memory T cells and memory B cell subsets in peripheral blood of patients with Guillain-Barré syndrome

LIU Tan¹, HUANG Xiaoyu², ZHANG Yong²

1.Department of Neurology, the First People's Hospital of Huzhou, Huzhou 313000, Zhejiang, China; 2.Department of Neurology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of memory T cells and memory B cells subsets in peripheral blood of patients with Guillain-Barré syndrome (GBS) and their clinical significance. **Methods** A total of 16 patients with GBS who were hospitalized in the Department of Neurology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from June 2018 to December 2020 were selected as the research group, and 16 healthy people who came to the hospital for physical examination during the same period were selected as the control group. The proportion of CD4⁺ naive T cells (TN), CD4⁺ central memory T cells (TCM), CD4⁺ effector memory T cells (TEM), CD4⁺ terminally differentiated effector memory T cells (TEMRA), memory B cells and plasmacytocytes in peripheral blood of the two groups was detected by flow cytometry and its clinical value was analyzed. **Results** Compared with the control group, CD4⁺TN and CD8⁺TN were significantly decreased in research group ($P<0.05$), while CD4⁺TEM and CD8⁺TEM were significantly increased in research group ($P<0.05$). There was no significant difference between TCM and TEMRA in the proportion of CD4 and CD8 ($P>0.05$). Compared with the control group, the proportion of memory B cells in the GBS group was significantly increased ($P<0.05$), while the proportion of plasmacytocytes was not significantly different. The percentages of CD4⁺TEM and CD8⁺TEM in peripheral blood of GBS patients were positively correlated with Hughes disability score, cerebrospinal fluid protein, cerebrospinal fluid immunoglobulin G and memory B cells ($P<0.05$). **Conclusion** There are immune disorders of memory T cells and memory B cells subsets in patients with GBS. The increased proportion of CD4⁺TEM cells, CD8⁺TEM cells and memory B cells may be a peripheral immune mechanism in the pathogenesis of GBS.

[Key words] Guillain-Barré syndrome; Effector memory T cells; Memory B cells

通信作者: 张勇, 电子信箱: 836988673@qq.com

吉兰-巴雷综合征 (Guillain-Barré syndrome, GBS) 是一类免疫介导的急性炎性周围神经病, 主要病理生理机制是外周神经中抗体-抗原相互作用引起的补体介导的神经损伤^[1-2]。既往研究发现体液免疫及细胞免疫共同参与此病的发生, 然而国内外关于 GBS 免疫细胞亚群的研究尚不充分, 尤其是记忆性细胞亚群在 GBS 患者外周血中的占比仍需进一步探讨。已有文献报道记忆性 B 细胞参与了 GBS 的发病^[3]; 也有学者指出记忆性 T 细胞可帮助记忆性 B 细胞更快速地产生抗体反应^[4]。由此推测记忆性 T 细胞及记忆性 B 细胞均可能参与 GBS 的发病。本研究通过分析 GBS 患者记忆性 T 细胞及记忆性 B 细胞亚群的变化, 为探索 GBS 的发病机制提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性选取 2018 年 6 月至 2020 年 12 月于徐州医科大学附属医院神经内科住院的 16 例 GBS 患者作为研究组, 其中男 8 例、女 8 例, 年龄 28~78 岁, 平均 (54.38 ± 15.24) 岁。选取同期 16 名来院的健康体检者作为对照组, 其中男 7 例、女 9 例, 年龄 29~69 岁, 平均 (46.56 ± 11.18) 岁。纳入标准: ①符合《中国吉兰-巴雷综合征诊治指南 2019》诊断标准^[1]; ②年龄 ≥ 18 岁; ③未接受静脉注射免疫球蛋白治疗。排除标准: ①其他自身免疫性疾病, 如白血病、类风湿疾病、甲状腺疾病、人类免疫缺陷病毒感染的患者; ②器官移植的患者; ③诊断不明确或临床资料不全、资料丢失的患者。所有研究对象均签署知情同意书。本研究经徐州医科大学附属医院伦理委员会审批通过 (伦理审批号: XYFY2020-JS019-01)。

1.2 方法

所有研究对象均于入组后空腹抽取 6ml 静脉血, 其中 2ml 静脉血用乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝, 余静脉血不抗凝直接分离血清。采用人淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物公司) 分离得到外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 经磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤离心后加入鼠抗人 CD3-APC-Cy7 抗体、鼠抗人 CD4-APC 抗体、鼠抗人 CD8-Percp-Cy5-5 抗体、鼠抗人 CD45RA-V450 抗体、鼠抗人 CCR7-BV510 抗体 (美国 BD 公司); 同时设同型对照管, 室温避光孵育 15min 后, 流式细胞仪检测记忆性 T 细胞亚群, 其中 CD4⁺初始 T 细胞 (naive T cells, TN) 表型为 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻CD45RA⁺、CCR7⁺, CD4⁺中央记忆性 T 细胞

(central memory T cells, TCM) 表型为 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻CD45RA⁻、CCR7⁺, CD4⁺效应记忆性 T 细胞 (effector memory T cells, TEM) 表型为 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻CD45RA⁻、CCR7⁻, CD4⁺终末分化效应记忆性 T 细胞 (terminally differentiated effector memory T cells, TEMRA) 表型为 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻CD45RA⁻、CCR7⁻; CD8⁺TN 细胞表型为 CD3⁺、CD4⁻、CD8⁺CD45RA⁺、CCR7⁺, CD8⁺TCM 细胞表型为 CD3⁺、CD4⁻、CD8⁺CD45RA⁻、CCR7⁺, CD8⁺TEM 细胞表型为 CD3⁺、CD4⁻、CD8⁺CD45RA⁻、CCR7⁻, CD8⁺TEMRA 细胞表型为 CD3⁺、CD4⁻、CD8⁺CD45RA⁻、CCR7⁻。在分离的 PBMC 中加入鼠抗人 CD45-Percp-Cy5-5 抗体、鼠抗人 CD19-APC、鼠抗人 CD27-BV510、鼠抗人 CD38-FITC 抗体 (美国 BD 公司), 同时设同型对照管。室温避光孵育 15min 后, 流式细胞仪检测记忆 B 细胞亚群, 其中记忆 B 细胞表型为 CD19⁺CD27⁺, 浆母细胞表型为 CD19⁺CD27⁺CD38⁺。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行处理分析。符合正态分布的计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。不符合正态分布的计量资料以中位数 (四分位数间距) [*M* (*Q*₁, *Q*₃)] 表示, 组间比较采用秩检验。计数资料以例数 (百分率) [*n* (%)] 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Pearson 相关性分析 CD4⁺TEM 及 CD8⁺TEM 占比与 Hughes 残疾评分、脑脊液蛋白、脑脊液免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 及记忆性 B 细胞的相关性。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GBS 患者的一般资料及外周血记忆性 T 细胞亚群占比分析

GBS 患者的一般资料分析见表 1。与对照组相比, 研究组患者的 CD4⁺TN 及 CD8⁺TN 均明显下降 (*P* < 0.05), CD4⁺TEM 及 CD8⁺TEM 均明显升高 (*P* < 0.05), TCM 及 TEMRA 在 CD4 和 CD8 上的比例差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 2。

2.2 两组患者的外周血记忆性 B 细胞占比比较

与对照组比较, 研究组患者的记忆性 B 细胞比例明显升高 (*P* < 0.05), 浆母细胞的比例差异无统计学意义, 见表 3。

2.3 GBS 患者外周血 CD4⁺TEM 和 CD8⁺TEM 占比与 GBS 患者临床严重程度的相关性分析

GBS 患者外周血 CD4⁺TEM 及 CD8⁺TEM 占比与 Hughes 残疾评分、脑脊液蛋白、脑脊液 IgG 及记忆性 B 细胞占比均呈正相关 (*P* < 0.05), 见图 1。

表 1 GBS 患者的一般资料

患者	年龄 (岁)	性别	前驱感染	入院 GBS 残疾评分	电生理分型	脑脊液蛋白质 (g/L)	脑脊液白细胞计数 ($\times 10^6/L$)	脑脊液 IgG (mg/L)
GBS 1	56	男	上呼吸道感染	3	脱髓鞘型	0.75	2	43.4
GBS 2	70	女	—	1	脱髓鞘型	0.49	1	23.5
GBS 3	28	女	—	4	脱髓鞘型	1.70	3	89.0
GBS 4	36	男	胃肠道感染	1	不能分型	0.52	2	19.2
GBS 5	30	男	—	2	轴索型	0.73	1	22.2
GBS 6	45	女	—	2	脱髓鞘型	0.65	1	33.2
GBS 7	74	女	上呼吸道感染	3	脱髓鞘型	0.59	2	27.3
GBS 8	57	男	—	3	不能分型	0.70	1	43.4
GBS 9	64	男	上呼吸道感染	4	脱髓鞘型	1.40	3	78.0
GBS 10	78	男	—	3	脱髓鞘型	0.65	1	30.7
GBS 11	45	女	胃肠道感染	3	轴索型	1.10	7	38.4
GBS 12	56	男	—	1	脱髓鞘型	0.85	2	47.7
GBS 13	65	女	—	2	不能分型	0.60	3	38.6
GBS 14	53	女	—	2	轴索型	0.86	2	45.5
GBS 15	68	男	上呼吸道感染	5	脱髓鞘型	2.19	3	116.0
GBS 16	45	女	—	3	脱髓鞘型	0.92	2	50.2

表 2 两组患者的外周血记忆性 T 细胞亚群占比比较 ($n=16$)

分组	对照组	研究组	t	P
CD4 ⁺ TN ($\bar{x} \pm s$)	29.48 \pm 12.03	17.77 \pm 7.73	3.516	0.001
CD4 ⁺ TCM ($\bar{x} \pm s$)	28.69 \pm 5.04	29.05 \pm 9.49	0.141	0.889
CD4 ⁺ TEM ($\bar{x} \pm s$)	39.68 \pm 11.70	51.08 \pm 11.90	3.129	0.003
CD4 ⁺ TEMRA ($\bar{x} \pm s$)	2.14 \pm 0.97	2.13 \pm 0.98	0.033	0.974
CD8 ⁺ TN [$M(Q_1, Q_3)$]	34.91 (12.35, 73.89)	17.51 (7.21, 44.24)	2.878	0.004
CD8 ⁺ TCM [$M(Q_1, Q_3)$]	7.38 (4.03, 18.01)	6.83 (4.02, 19.15)	0.110	0.912
CD8 ⁺ TEM ($\bar{x} \pm s$)	34.46 \pm 10.20	51.82 \pm 9.02	5.714	0.000
CD8 ⁺ TEMRA [$M(Q_1, Q_3)$]	24.88 (13.39, 54.45)	28.69 (12.81, 57.79)	0.496	0.620

表 3 两组患者的外周血记忆性 B 细胞占比比较 ($n=16$)

项目	对照组	研究组	t	P
CD19 ⁺ CD27 ⁺ 细胞 ($\bar{x} \pm s$, %)	33.46 \pm 8.67	52.76 \pm 10.02	6.812	0.000
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺ 细胞 [$M(Q_1, Q_3)$, %]	2.74 (1.52, 7.34)	5.01 (2.40, 10.66)	2.225	0.026

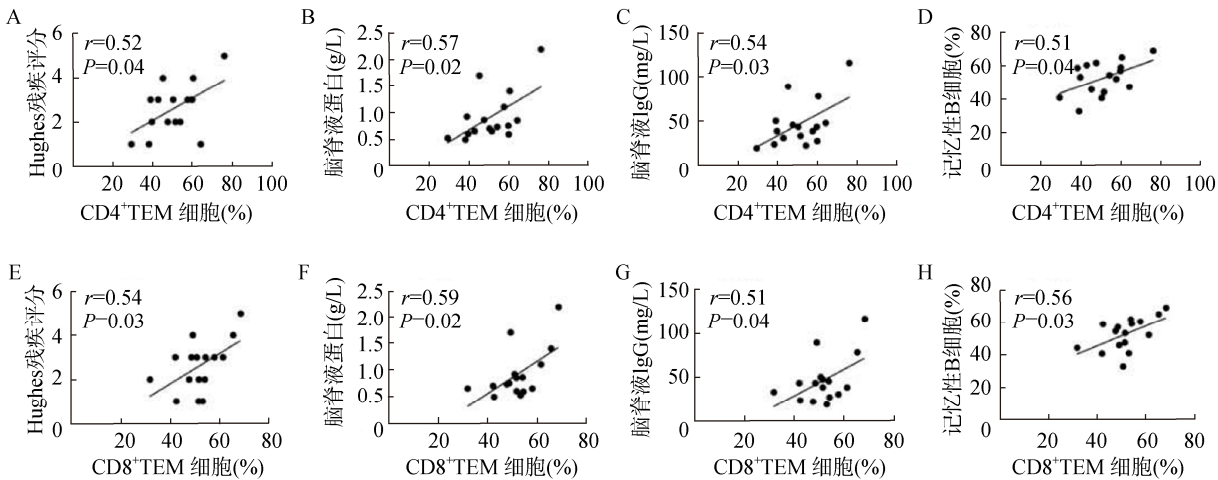


图 1 GBS 患者外周血 TEM 占比与 GBS 临床严重程度相关性分析

3 讨论

GBS 发病与自身免疫功能障碍相关,各种类型的活化的 T 细胞被认为是 GBS 的发生和发展的协调者。研究表明记忆性 T 细胞对 B 细胞生发中心的形成及产生对抗髓鞘的抗体具有十分重要的作用,其中 TEM 细胞可通过产生细胞因子白细胞介素(interleukin-17, IL-17)和重组人干扰素(recombinant human interferon- γ , IFN- γ)等炎症因子参与 B 细胞的分化^[5];同时记忆性 B 细胞也与 GBS 的发病相关^[3]。因此,进一步明确记忆性 B 细胞亚群、记忆性 T 细胞亚群尤其是 TEM 细胞在 GBS 患者外周血中的占比,对解释 GBS 的发病机制至关重要。

有学者根据是否表达 CD45RA 区别初始 T 细胞和记忆性 T 细胞,并进一步依据趋化因子受体 CCR7 的表达将记忆性 T 细胞分为 TCM 和 TEM^[6]。与初始 T 细胞和 TCM 细胞相比,TEM 细胞更能快速被抗原识别,迅速激活免疫反应,且可立刻到达炎症部位并发挥作用^[7]。既往多项研究表明,TEM 细胞与一些自身免疫性疾病如多发性硬化、系统性红斑狼疮、结肠炎、1 型糖尿病等的发生、发展、复发及严重程度密切相关^[8-12]。本研究结果也显示,与对照组相比,研究组患者外周血 CD4⁺TEM 细胞和 CD8⁺TEM 细胞占比更高,差异有统计学意义。初始 B 细胞成熟后,与抗原相遇被其激活,随后分化为 CD19⁺CD27⁺记忆性 B 细胞;当记忆性 B 细胞再次与相同抗原相遇时就会增殖,分化为浆细胞,产生特异性抗体,从而发挥介导体液免疫应答的作用。据报道,记忆性 B 细胞在一些自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、自身免疫性溶血性贫血等疾病中发挥至关重要的作用^[13-15]。Wang 等^[3]发现记忆 B 细胞在 GBS 急性期显著增加,并随着病情的恢复而减少,进一步的 Spearman 相关分析显示 GBS 的临床严重程度与患者外周血中记忆 B 细胞的占比呈正相关。本研究结果与之一致,研究组患者记忆性 B 细胞比例高于对照组;此外,进一步 Pearson 相关性分析显示 CD4⁺TEM 及 CD8⁺TEM 细胞占比与 Hughes 残疾评分、脑脊液蛋白、脑脊液 IgG 及记忆性 B 细胞占比均呈正相关,CD4⁺TEM 及 CD8⁺TEM 细胞与疾病临床严重程度呈正相关。在 GBS 发病中发挥重要作用,并可能通过自身效应功能调节 B 细胞的分化参与 GBS 的发病。

综上,本研究发现 GBS 患者存在记忆性 T 细胞和记忆性 B 细胞亚群免疫紊乱,外周血中 CD4⁺TEM 细胞、CD8⁺TEM 细胞及记忆性 B 细胞占比升高可能是 GBS 发病过程中的一个外周免疫机制。进一步深入探讨 TEM 细胞参与 GBS 发病的机制有望成为治

疗 GBS 的新靶点。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 卜碧涛,崔丽英,笪宇威,等. 中国吉兰-巴雷综合征诊治指南 2019[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(11): 877-882.
- [2] 曹磊,胡燕杰,张雨欣,等. 神经电生理检查对吉兰-巴雷综合征病程及病情的判定价值[J]. 安徽医学, 2020, 41(11): 1258-1260.
- [3] WANG Q, XING C, HAO Y, et al. Memory B cells in Guillain-Barre syndrome[J]. J Neuroimmunol, 2017, 305: 1-4.
- [4] SHIMIZU T, NAGAFUCHI Y, HARADA H, et al. Decreased peripheral blood memory B cells are associated with the presence of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: A case-control study[J]. Mod Rheumatol, 2021, 31(1): 127-132.
- [5] JAIN A, SONG R, WAKELAND E K, et al. T cell-intrinsic IL-1R signaling licenses effector cytokine production by memory CD4 T cells[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3185.
- [6] 卢红娟,孙卫民. CD4⁺记忆性 T 细胞产生的细胞学机制[J]. 现代免疫学, 2010, 30(6): 507-510.
- [7] 陈孟嘉,冯辉. 干细胞样记忆性 CD8⁺T 细胞的生物学特性研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(11): 1403-1406.
- [8] 李盈,胡学强. 记忆性 T 细胞在多发性硬化发病和治疗中的作用[J]. 中华神经医学杂志, 2009, 8(3): 319-320.
- [9] HOHLFELD R, BELTRAN E, GERDES L A, et al. Tissue-resident CD8⁺ memory T cells in multiple sclerosis[J]. Brain, 2021, 12, 144(1): e7.
- [10] ZHANG B, WEI B, GAO M, et al. Aberrant T cell subsets and cytokines expression profile in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(9): 2405-2413.
- [11] 吴甜甜,刘雪珂,刘馥春,等. 左金丸对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠免疫记忆性 T 细胞水平的调节作用[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(10): 1158-1164.
- [12] 周小斌,费小蕾,叶军,等. T1DM 患者外周血记忆性 T 细胞表面 PD-1 表达水平与其疾病发生发展的初步研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(4): 476-481.

(下转第 66 页)