

# 儿童眼肌型重症肌无力免疫相关发病机制的初步探讨

周立军,王平,杨俊芳,唐晓荣,邓姿峰,张金梅

作者单位:(410007)中国湖南省长沙市,湖南省儿童医院眼科

作者简介:周立军,硕士,研究方向:小儿眼科。

通讯作者:周立军. zhoulijun1256@163.com

收稿日期:2013-08-21 修回日期:2013-11-14

## Preliminary study on the immunology pathogenesis of ocular myasthenia gravis in children

Li-Jun Zhou, Ping Wang, Jun-Fang Yang, Xiao-Rong Tang, Zi-Feng Deng, Jin-Mei Zhang

Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China

**Correspondence to:** Li-Jun Zhou. Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China. zhoulijun1256@163.com

Received:2013-08-21 Accepted:2013-11-14

### Abstract

• **AIM:** To discuss the role of humoral immunity and cellular immunity in the development of ocular myasthenia gravis in children by analyzing the clinical value of the indices including immunoglobulin, complement and T cell subgroup in peripheral blood.

• **METHODS:** The concentrations of serum IgG, IgA, IgM, C3 and C4 in the myasthenia gravis group and the control group were detected by immune compare turbid. The contents of CD3<sup>+</sup> T cell, CD4<sup>+</sup> T cell and CD8<sup>+</sup> T cell were detected by flow cytometry. Data was analyzed by Independent-Sample Test.

• **RESULTS:** There were no significant differences in contents of IgA, IgM, CD3<sup>+</sup> T cell, CD8<sup>+</sup> T cell between ocular myasthenia gravis group in children and the control group ( $P>0.05$ ). The concentrations of serum IgG, C3 and C4 for myasthenia gravis group were lower than those of the control group ( $P<0.05$ ). The content of CD4<sup>+</sup> T cell were higher than those of the control group ( $P<0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Complement C3, C4 and CD4<sup>+</sup> T cell played an important role in immunology pathogenesis mechanism for ocular myasthenia gravis in children.

• **KEYWORDS:** children; ocular myasthenia gravis; immunoglobulin; complement; T cell subgroup

**Citation:** Zhou LJ, Wang P, Yang JF, et al. Preliminary study on

the immunology pathogenesis of ocular myasthenia gravis in children.

*Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(12):2540-2542

### 摘要

**目的:**通过分析儿童眼肌型重症肌无力患儿外周血中免疫球蛋白、补体及T细胞亚群的含量,初步探讨体液免疫和细胞免疫在儿童眼肌型重症肌无力发病中的作用。

**方法:**采用免疫比浊法检测37例儿童眼肌型重症肌无力患儿及健康对照儿童外周血中IgG, IgA, IgM, 补体C3及C4的含量,流式细胞术检测12例儿童眼肌型重症肌无力患儿及健康对照儿童外周血中CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞及CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的含量,独立样本t检验进行数据统计分析。

**结果:**儿童眼肌型重症肌无力患儿外周血IgA, IgM及CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞值与健康儿童比较,均无显著性差异( $P>0.05$ ), IgG, 补体C3及C4的含量低于健康儿童( $P<0.05$ )。CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞值高于对照儿童( $P<0.05$ )。

**结论:**补体C3, C4及CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞在儿童眼肌型重症肌无力的发病机制中起着重要作用。

**关键词:**儿童;眼肌型重症肌无力;免疫球蛋白;补体;T细胞亚群

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.55

**引用:**周立军,王平,杨俊芳,等.儿童眼肌型重症肌无力免疫相关发病机制的初步探讨.国际眼科杂志2013;13(12):2540-2542

### 0 引言

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种累及神经肌肉接头处的突触后膜乙酰胆碱受体的自身免疫性疾病,在体液免疫和细胞免疫方面都有异常<sup>[1]</sup>,但确切的发病原因尚不清楚。眼肌型重症肌无力(ocular myasthenia gravis, OMG)是最常见的类型,OMG的临床症状和体征主要局限在眼外肌,其中75%初发症状出现而首先就诊于眼科。我们回顾性分析2010-01/2013-01我院眼科病房共治疗的37例儿童眼肌型重症肌无力患儿的相关免疫学指标,初步探讨其在儿童眼肌型重症肌无力发病机制及临床中的意义。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 2010-01/2013-01我院眼科病房共治疗的37例未经治疗、首诊于眼科门诊的儿童眼肌型重症肌无力患儿。入选标准:具有典型眼肌型重症肌无力的临床特征,且新斯的明试验阳性。排除标准:(1)并发胸腺瘤者;(2)伴有肝肾疾病或其他自身免疫性疾病者;(3)已经治疗的

表1 儿童 OMG 组与对照组体液免疫学指标比较

( $\bar{x} \pm s, g/L$ )

组别	n	IgG	IgA	IgM	C3	C4
儿童 OMG 组	37	8.25±1.95	0.90±0.48	1.28±0.51	1.05±0.17	0.20±0.10
正常对照组	37	9.01±0.63	1.08±0.28	1.21±0.48	1.18±0.14	0.25±0.07
P		0.03	0.52	0.57	0.002	0.016

表2 儿童 OMG 组与对照组细胞免疫学指标比较

( $\bar{x} \pm s, %$ )

组别	n	CD3 <sup>+</sup> T	CD4 <sup>+</sup> T	CD8 <sup>+</sup> T
儿童 OMG 组	12	70.16±8.22	37.35±4.32	24.04±6.61
正常对照组	12	63.94±6.38	33.24±3.89	22.91±4.86
P		0.50	0.02	0.64

患儿。患儿 37 例中,男 10 例,女 27 例,年龄 5±3(1~13)岁。患儿 37 例均行体液免疫学相关检查,并对其中的 12 例患儿进行了 T 细胞亚群的检查。体液免疫对照组为 37 名于疾病组年龄相匹配的健康体检儿童。T 细胞亚群检查的对照组为 12 名年龄相匹配的健康体检儿童。

## 1.2 方法

**1.2.1 体液免疫指标** 血清 IgG, IgA, IgM 及补体 C3, C4 的测定采用免疫透视比浊法(g/L),清晨空腹采静脉血 2mL,加入相应抗体利用全自动生化分析仪,用光浊度测定抗原的量。

**1.2.2 细胞免疫指标** 血清 CD3<sup>+</sup>T 细胞, CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD8<sup>+</sup>T 细胞测定采用流式细胞术,清晨空腹取血 2mL,用 100μL EDTA 抗凝,每管加 FITC-CD3, APC-CD4 和 PE-CD8 抗体 20μL,在 18℃~25℃ 室温的暗室里孵育 15min 后,用红细胞裂解液裂解红细胞,加入 3mL PBS 平衡液摇匀,2000r/min 离心 5min,去上清液,PBS 液重悬细胞并摇匀至 200μL,上流式细胞仪计数阳性细胞的百分率。抗体购自 BD Biosciences 公司,仪器为 PARTEC 流式细胞仪。

统计学分析:用 SPSS 16.0 软件分析处理数据资料,采用独立样本 t 检验的统计学方法,显著性检验标准为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 体液免疫结果** 儿童 OMG 患者血清 IgG、补体 C3 及 C4 浓度与健康对照组比较,均有统计学差异(均有  $P < 0.05$ ,表 1);IgA 及 IgM 浓度与健康儿童比较均无统计学差异(表 2)。

**2.2 细胞免疫结果** 流式细胞术检测外周血 T 细胞亚群的结果显示:儿童 OMG 组 CD4<sup>+</sup>T 细胞值高于正常儿童,二者比较差异有统计学意义( $P = 0.02$ );儿童 OMG 组 CD3<sup>+</sup>T 细胞值及 CD8<sup>+</sup>T 细胞值均高于正常儿童,但均无统计学差异。

## 3 讨论

重症肌无力是一种神经肌肉接头处突触后膜上乙酰胆碱受体(AChR)自身致敏和破坏的全身性自身免疫性疾病,既往的研究表明乙酰胆碱受体抗体(AChR-Ab)介导的体液免疫反应和 T 细胞介导的细胞免疫反应可能是其主要发病机制<sup>[2,3]</sup>。儿童正处于发育阶段,其免疫状态

与成人不同,且眼肌型重症肌无力为最常见类型,因此有必要对这特殊群体的常见类型发病机制进行探讨,为临床治疗提供理论依据。

乙酰胆碱受体是一种跨膜蛋白,是 MG 发生的主要自身免疫原,机体产生的抗体主要结合在 AChR 分子的  $\alpha$  亚单位上<sup>[4]</sup>。在免疫应答中,由于免疫微环境的异常改变,机体对自身 AChR 的免疫耐受产生破坏,产生自身抗体破坏 AChR,导致神经肌肉接头处神经传递功能障碍而引起骨骼肌的病态疲劳<sup>[5]</sup>。AChR 作为一种抗原物质首先被抗原呈递细胞(APC)识别,加工成与组织相容复合物 II(MHCII)类抗原相关的肽片段,并将肽片段转送到 AChR 特异的 T 淋巴细胞表面而激活 T 细胞,从而启动细胞免疫过程,后者并激发机体 B 细胞产生 AChRb 及白介素-2(IL-2)等因子,而后者又可以激活 T 淋巴细胞<sup>[6]</sup>,导致 MG 患儿存在体液免疫和细胞免疫失调。经本文研究发现,在体液免疫指标中儿童 OMG 患者血清 IgG、补体 C4 及 C3 的浓度低于健康对照组,而 IgA 及 IgM 浓度与健康儿童比较均无统计学差异,结果提示 IgG、补体 C4 及 C3 均参与了儿童 OMG 的发病,并发挥一定的作用。刘卫彬等<sup>[7]</sup>通过研究发现眼肌型的体液免疫指标值与全身型有差别,眼肌型的 IgG 及 IgA 浓度低于全身型,而全身型重症肌无力患者病情严重性要高于眼肌型患者,因此这些结果不但提示 IgG 等免疫球蛋白参与 MG 的发病,而且对病情的治疗具有一定的参考价值。国外学者通过实验表明,敲除了 C3 和 C4 基因的小鼠,无法建立自身免疫性 MG 模型,免疫组化显示运动终板突触后膜无补体复合物的沉积,证实了补体 C3 和 C4 在 MG 发病中可能起着重要作用<sup>[8]</sup>。日本学者 Tüzün 等<sup>[9]</sup>在敲除 C4 基因的小鼠实验中也证实通过减少 T 淋巴细胞产生 IL-6 及神经肌肉接头处 IgG 及 C3 的沉积可抑制重症肌无力的发生。这些结果均表明补体 C3 和 C4 在 MG 发病中可能起着重要作用<sup>[10]</sup>。

机体免疫系统对自身抗原产生免疫耐受,防止发生自身免疫病过程中起重要作用<sup>[11]</sup>。本研究发现 OMG 组患儿外周血 CD3<sup>+</sup>T 及 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分率与正常儿童无统计学差异,但外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞百分率高于对照组( $P < 0.05$ ),这一结果与国内学者许蕾等<sup>[12]</sup>的报道成人 MG 结果一至,但刘卫彬等<sup>[7]</sup>认为 IgM 及 T 细胞亚群的百分比在

不同类型的重症肌无力中无明显差异,这可能与其研究对象以成人为主有关,儿童免疫器官功能尚在发育中,对疾病的反应可能与成人不同。近年来的研究充分肯定了T淋巴细胞在MG发病过程中的重要性,尤其是辅助T淋巴细胞在调节AChR-Ab合成过程中所发挥的重要作用。AChR反应性CD4<sup>+</sup>T细胞能够分泌IL-2,IL-4,IL-6及干扰素等辅助B淋巴细胞分泌AChR-Ab,并启动体液免疫,而抑制该细胞的活性,可有效缓解MG肌无力症状<sup>[13,14]</sup>。

重症肌无力患者免疫状态的失衡是体液免疫与细胞免疫共同作用的结果,活化的CD4<sup>+</sup>T细胞识别与MHC-II类分子相关的AChRab多肽区,从而刺激机体产生IgG<sup>[15]</sup>,我们的研究表明在儿童OMG患儿的免疫状态也支持这样的结果,补体C3,C4及CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞在儿童眼肌型重症肌无力的发病机制中起着重要作用。

#### 参考文献

- 1 Gomez AM, Van Den Broeck J, Vrolix K, et al. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis - pathogenesis at the neuromuscular junction. *Autoimmunity* 2010;43(5-6):353-370
- 2 Wang W, Milani M, Ostlie N, et al. C57BL/6 mice genetically deficient in IL-12/IL-23 and IFN-gamma are susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis, suggesting a pathogenic role of non-Th1 cells. *J Immunol* 2007;178(11):7072-7080
- 3 晏琳,罗梦川,杨欢. 重症肌无力的免疫机制研究进展. *中国神经免疫学和神经病学杂志* 2012;19(6):419-424
- 4 常婷,李柱一. 重症肌无力免疫学发病机制研究进展. *中国神经免疫学和神经病学杂志* 2011;18(5):357-360
- 5 罗六一,任明山. 重症肌无力的免疫耐受治疗. *国际免疫学杂志*

- 2009;32(1):54-57
- 6 Chen Q, Kim YC, Laurence A, et al. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells *in vivo*. *J Immunol* 2011;186(11):6329-6337
- 7 刘卫彬,门丽娜,夏强,等. 重症肌无力患者免疫指标检测及其临床评价. *中华医学杂志* 2006;86(47):3331-3334
- 8 Tuzun E, Scott BG, Goluszko E, et al. Genetic evidence for involvement of classical complement pathway in induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 2003;171(7):3847-3854
- 9 Tüzün E, Li J, Saini SS, et al. Targeting classical complement pathway to treat complement mediated autoimmune diseases. *Adv Exp Med Biol* 2008;632:265-272
- 10 Kusner LL, Kaminski HJ. The role of complement in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1274(10):127-132
- 11 翟志敏. IL-2对免疫激活和免疫耐受的双向调节作用. *中国药理学通报* 2013;29(3):319-322
- 12 许蕾,朱一飞,哈志远. 重症肌无力患者细胞免疫水平的检测及临床意义. *脑与神经疾病杂志* 2002;10(4):221-223
- 13 Araga S, Xu L, Nakashima K, et al. A peptide vaccine that prevents experimental autoimmune myasthenia gravis by specifically blocking T cell help. *FASEB J* 2000;14(1):185-196
- 14 Milani M, Ostlie N, Wu H, et al. CD4+ T and B cells cooperate in the immunoregulation of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis. *J Neuroimmunol* 2006;179(1-2):152-162
- 15 Yeh TM, Krolick KA. T cells reactive with a small synthetic peptide of the acetylcholine receptor can provide help for a clonotypically heterogeneous antibody response and subsequently impaired muscle function. *J Immunology* 1990;144(5):1654-1660

## IJO 发表的论文被译为波兰语再次发表

本刊讯 《国际眼科杂志》英文刊 International Journal of Ophthalmology (IJO) 于2012年第6期发表的由亚美尼亚作者 Marianne L. Shahsuvaryan 撰写的一篇题为: Therapeutic potential of intravitreal pharmacotherapy in retinal vein occlusion 的综述论文在国际上引起高度关注。

波兰医学论坛公司于2013年3月向 IJO Press 提交版权许可申请,经 IJO Press 同意,于2013年6月将上述论文译为波兰语正式发表在 Okulistyka po Dyplomie 期刊上。

波兰医学论坛公司从众多国际名刊中精选本刊论文表明 IJO 的国际影响在不断提升,IJO 发表的文章引起了医学界读者的极大兴趣。