

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.23.006

全反式维甲酸对乙酰胆碱受体特异性淋巴细胞的免疫调控作用*

孔庆飞¹ 张晓莉² 朱伟² 王丹丹¹ 谢晓丽¹ 穆莉莉¹ 么秀华¹ 李呼伦^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学神经生物学教研室 黑龙江 哈尔滨 150081; 2 牡丹江医学院 黑龙江 牡丹江 157000)

摘要 目的:观察全反式维甲酸(ATRA)对乙酰胆碱受体(AChR)特异性淋巴细胞的体外调控作用,探讨其治疗重症肌无力(MG)的可能机制。**方法:**建立完全弗氏佐剂(CFA)对照组及实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)组大鼠,并获取淋巴结单个细胞悬液,以 AChR97-116 多肽片段以及不同浓度的 ATRA 体外培养 72 h,采用流式细胞仪法、CCK-8 法、ELISA 法分别检测活细胞比例、细胞凋亡和周期的改变以及 Th 亚群的格局和 B 细胞抗体分泌能力的变化。**结果:**ATRA 显著降低活细胞比例($P<0.001$);不同浓度的 ATRA 均促进了特异性细胞群的凋亡($P<0.001$),且呈剂量依赖性,而 ATRA 未改变 AChR 特异性淋巴细胞的生长周期;ATRA 处理后,CFA 和 EAMG 组的淋巴细胞增殖均受到明显抑制,且 ATRA 对 AChR 特异性的淋巴细胞的抑制明显(EAMG 组, $P<0.01$)于 CFA 组($P<0.05$);ATRA 干预后,AChR 特异性 CD4⁺T 淋巴细胞的比下降($P<0.01$),且 ATRA 促进了 Th2、Treg 细胞亚群百分比($P_{IL-4}<0.001$, $P_{Foxp3}<0.001$),而抑制了促炎性的 Th17、Th1 细胞亚群百分比($P_{IL-17}<0.05$, $P_{IFN-γ}<0.001$);ATRA 能够降低 AChR 特异性 B 细胞的抗体分泌能力($P<0.01$)。**结论:**ATRA 不仅能抑制 AChR 特异性 T 细胞功能,同时也能抑制 AChR 特异性 B 细胞功能,其在 MG 的临床治疗中可能起治疗作用。

关键词:全反式维甲酸;乙酰胆碱受体;重症肌无力;实验性自身免疫性重症肌无力;辅助性 T 细胞

中图分类号:R-33;746.1;R392.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)23-4426-06

The Immunomodulatory Effects of All-trans Retinoic Acid on AChR-specific Lymphocytes*

KONG qing-fei¹, ZHANG Xiao-li², ZHU Wei², WANG Dan-dan¹, XIE Xiao-li¹, MU Li-li¹, YAO Xiu-hua¹, LI Hu-lun^{1Δ}

(1 Harbin Medical University, Neurobiological Department, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

2 Mudanjiang Medical University, Harbin, Heilongjiang, 157000, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of All-trans retinoic acid (ATRA) on the immune functions of AChR-specific lymphocytes via in vitro assays, and investigate the possibility of ATRA in the clinical treatment of myasthenia gravis (MG). **Methods:** CFA control group and EAMG experimental rats were established to obtain single lymphocytes suspension and cells were followed by AChR97-116 peptide with or without ATRA stimulation for 72 h, and then viable cell population, cell apoptosis, cell cycle and the distribution of Th cells were determined by flow cytometry. CCK-8 assay was selected to evaluate the effects of ATRA on proliferative ability of lymphocytes. ELISA was used to detect the antibody secretion of B cells affected by ATRA. **Results:** Compared with CFA group, lymphocytes obtained from EAMG rats had higher ratios of living cells, and this ratio was obviously decreased after ATRA treatment, $P<0.001$. Different concentrations of ATRA promoted the apoptosis of AChR-specific cells ($P<0.001$), and the promoted effects were ATRA dose-dependent, however, cell cycles were not changed. ATRA markedly inhibited the proliferation of cells from both CFA and EAMG groups, moreover, AChR-specific cells were more sensitive to ATRA treatment ($P<0.01$) than that of cells from CFA rats ($P<0.05$). The ratio of AChR-specific CD4⁺T cells was reduced by ATRA ($P<0.01$), and ATRA incubation significantly promoted the percentages of Th2, ($P_{CD4+IL-4+}<0.001$), Treg ($P_{CD4+Foxp3+}<0.001$) cell types, but markedly inhibited the percentages of Th17 ($P_{CD4+IL-17+}<0.05$), Th1 ($P_{CD4+IFN-γ+}<0.001$) cells. ELISA data showed us that ATRA obviously down regulated the antibody secretion of AChR-specific B cells, $P<0.01$. **Conclusions:** ATRA not only inhibited the functions of AChR-specific T cells, but also suppressed the roles of AChR-specific B cells, predicating a therapeutic effect of ATRA on myasthenia gravis therapy.

Key words: All-trans retinoic acid; Acetylcholine receptor; Myasthenia Gravis; Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis; T Helper cells

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R746.1; R392.12 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)23-4426-06

前言

重症肌无力(Myasthenia Gravis, MG)低一种 B 细胞介导、T 细胞依赖的神经自身免疫性疾病, T 细胞是疾病的启动因素。

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目重点项目(12541z008)

作者简介:孔庆飞(1982-),博士,副教授,主要从事神经免疫学的研究工作, E-mail: kqfangel@hrbmu.edu.cn

Δ 通讯作者:李呼伦(1975-),博士,教授,从事神经生物学,神经免疫学的研究工作, E-mail: lihl@hrbmu.edu.cn

(收稿日期:2017-01-19 接受日期:2017-02-13)

目前研究显示 MG 的发病机制与 Th 细胞亚型功能失衡有关,而 Th 细胞失衡导致的对 B 细胞的辅助功能失控是疾病发生的直接因素,提示针对 T、B 细胞的免疫学治疗可能是 MG 临床治疗的作用靶点^[1]。随着养生观念的升温,越来越多的人意识到,药补不如食补,因而从食物中获取的营养物质的营养和治疗功效备受关注。随着维生素 A 免疫调节功能的发现,全反式维甲酸(All-trans retinoid Acid, ATRA)作为维生素 A 的代谢产物备受关注^[2]。现已有研究报导 ATRA 对免疫细胞尤其对 Th17/Treg 有着重要调节作用,对诸如自身免疫性脑脊髓炎、重症肌无力、I 型糖尿病等自身免疫性疾病的动物模型有良好的治疗效果^[3,4],为了进一步证实 ATRA 对 MG 动物模型的治疗机制,本研究以 MG 的动物模型实验性自身免疫性重症肌无力(Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis, EAMG)为研究对象,通过体外实验探讨 ATRA 治疗 EAMG 的免疫调节机制,也为进一步阐明 MG 等自身免疫性疾病的发病机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 纯系健康雌性 Lewis 大鼠,清洁级,体重 140-160 g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.2 试剂及仪器 R-AChR (大鼠来源的 AChR, rat-AChR α 97-116),购自西安联美生物科技有限公司;结核菌素(H37RA)购自美国 Difco Laboratories;不完全弗氏佐剂 (incomplete freund ajuvant, IFA)和全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)购自美国 Sigma-Aldrich。

1.2 实验方法

1.2.1 EAMG 实验动物模型及 CFA 对照组的建立 将 Lewis 大鼠随机分为 2 组,即:阴性对照组(完全弗氏佐剂, complete freund's adjuvant, CFA)和阳性对照组(EAMG 模型组)。EAMG 组大鼠以 100 μ L PBS+100 μ L IFA+50 μ g AChR+2 mg H37RA/大鼠,尾根部免疫。于免疫后第 30 天以 100 μ L PBS+100 μ L IFA+50 μ g AChR/大鼠,尾根部追加免疫一次。CFA 阴性对照组大鼠免疫方法同 EAMG 大鼠,其中以 PBS 替代 AChR 补充至 200 μ L。

1.2.2 临床症状评定 依据 Lennon 评分法,隔天进行体重检测和临床症状评定:0 分:无确定的肌无力现象;1 分:轻度活动减少,撕咬抓取无力,易疲劳;2 分:明显活动减少,体重下降,休息时身体呈隆起姿势,头尾下垂,前肢趾屈曲,行走不稳,震颤;3 分:严重的全身无力,无抓取、撕咬动作,身体震颤,濒死状态;4 分:死亡。

1.2.3 流式细胞仪染色法 获取实验动物的淋巴结单个细胞悬液,体外 ATRA 不同浓度培养 48-72 h 后,以 PMA, Ionomycin, BFA (购自 ALEXIS, 美国)刺激 4-6 h, 分别用 CD4-FITC, CD45R-FITC, IL-17-APC, IL-4-PE, IFN- γ -PE, Foxp3-PE, CD25-PerCP, 以及 PI/Annexin V, PI/Rnase 试剂盒按照说明书方法进行染色,细胞因子及周期染色后 2 h 内上机检测,凋亡染色结束后半小时内上机检测,所有流式抗体均购自 BD 公司(美国)。

1.2.4 ELISA 法 用 Coating buffer 稀释 AChR 抗原至 2 μ g/mL 包被 96 孔板(Nunc, 丹麦),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,10

% 的 FCS 室温封闭 2 h。逐孔加入不同处理的细胞培养上清 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜。加入兔抗大鼠 IgG(1:2000 倍稀释,北京中杉)100 μ L/孔,室温孵育 2 h;加入二抗辣根标记的山羊抗兔(1:5000 倍稀释,北京中杉)室温孵育 1 h;显色液显色,并在 490 nm 波长下测定吸光度。

1.2.5 CCK-8 法 调整细胞浓度至 2×10^4 /孔/100 μ L,加入 ATRA 至浓度 1 μ mol/L,细胞培养箱培养 72 h 后,每孔加入 CCK-8(日本同仁)10 μ L,继续孵育 4-8 h 后,450 nm 波长下检测吸光度值。

1.3 统计学分析

实验动物的临床评分使用 Mann-Whitney U 检验,两组以上数据采用方差分析,两组比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAMG 模型建立

二次免疫后,EAMG 组动物相继出现肢体无力、身体颤抖、体重减轻等典型的重症肌无力临床表现,且 p 值均小于 0.001,证明建模成功。根据 Lennon 评分法^[5],当评分达到 2.5 分以上时,可以进行样本取材,进行后续实验。

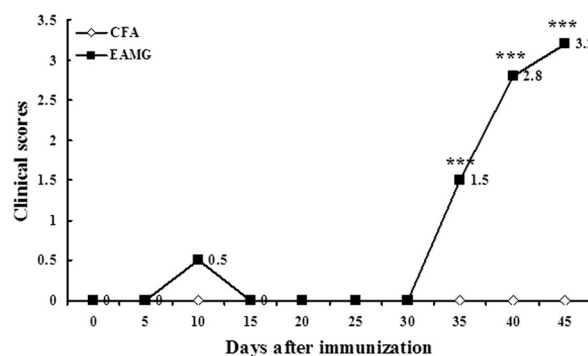


图 1 临床评分,*** $P < 0.001$

Fig. 1 Clinical scores. *** $P < 0.001$

2.2 特异性淋巴细胞存活率

分别获取 CFA、EAMG 组大鼠的淋巴结单个细胞悬液,用特异性抗原 AChR97-116 多肽片段体外刺激 72 h,流式细胞仪法圈定活细胞群,设置 CFA 对照组和 ATRA 1 μ M 体外干预组,结果如下图(图 2A)所示,左边由上至下分别为 CFA、EAMG 和 ATRA 体外干预组的细胞流式分析图,右侧 B 图为 AChR 特异性淋巴细胞存活率的统计分析图。由于 EAMG 组淋巴细胞为 AChR 特异性,因而与 CFA 对照组相比较,AChR 单纯体外刺激 72 h 后,活细胞比例升高明显,而 ATRA 同时干预后,活细胞比例明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.001$),表明 ATRA 体外干预能抑制 AChR 特异性淋巴细胞的存活。

2.3 特异性淋巴细胞凋亡检测

为进一步探讨体外 ATRA 干预后,AChR 特异性淋巴细胞存活率下降的原因,我们以 2.2 条件体外刺激细胞,并分别加入 ATRA 终浓度至 0、0.5、1、5 μ M,体外孵育 72 h 后检测淋巴细胞的凋亡率和周期的改变,如下图所示,A 为细胞凋亡流式图、B 为细胞凋亡检测的统计图,C 为 ATRA 干预后的细胞周

期流式图,结果显示不同浓度的 ATRA 体外干预均促进了该特异性细胞群的凋亡,差异具有统计学意义(** $p < 0.001$),且随着浓度的增加,促凋亡效果也增加,而以往的研究中 $1 \mu\text{M}$ 的 ATRA 的使用较为常见,且效果明显。因此,在后续研究中,我

们选用此浓度,进行淋巴细胞的体外干预。细胞周期结果显示 ATRA 的体外刺激并未改变 AChR 特异性淋巴细胞的生长周期。结合上一结果提示 ATRA 通过促进 AChR 特异性淋巴细胞的凋亡,从而降低 AChR 特异性淋巴细胞的存活率。

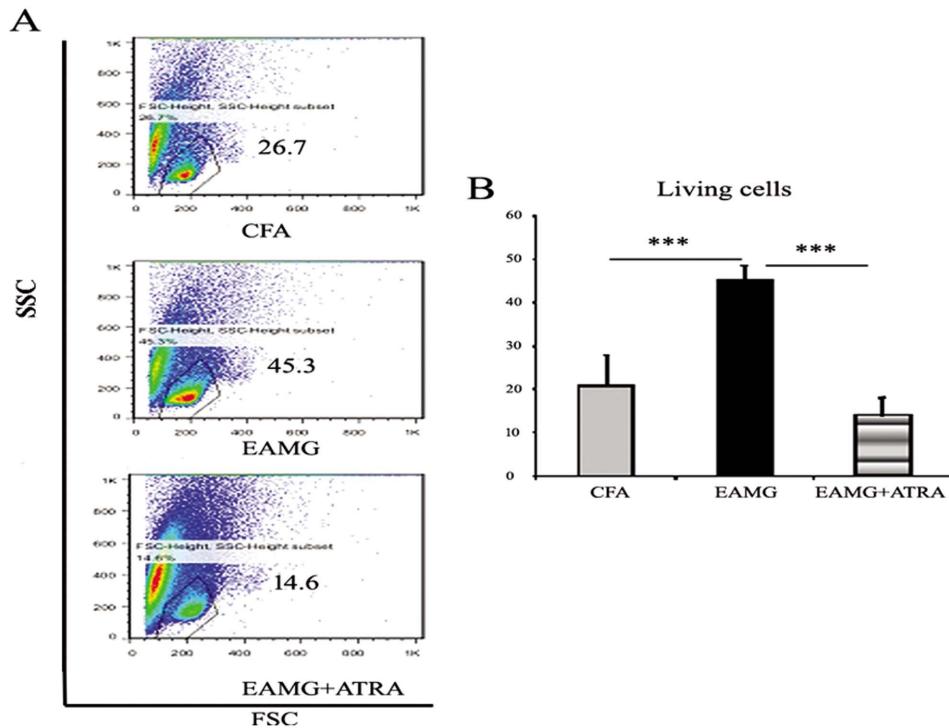


图2 AChR 特异性淋巴细胞存活率

Fig.2 Ratios of the AChR-specific living cells

与 EAMG 组相比较,***P 值均小于 0.001; Compared with EAMG group, *** $P < 0.001$.

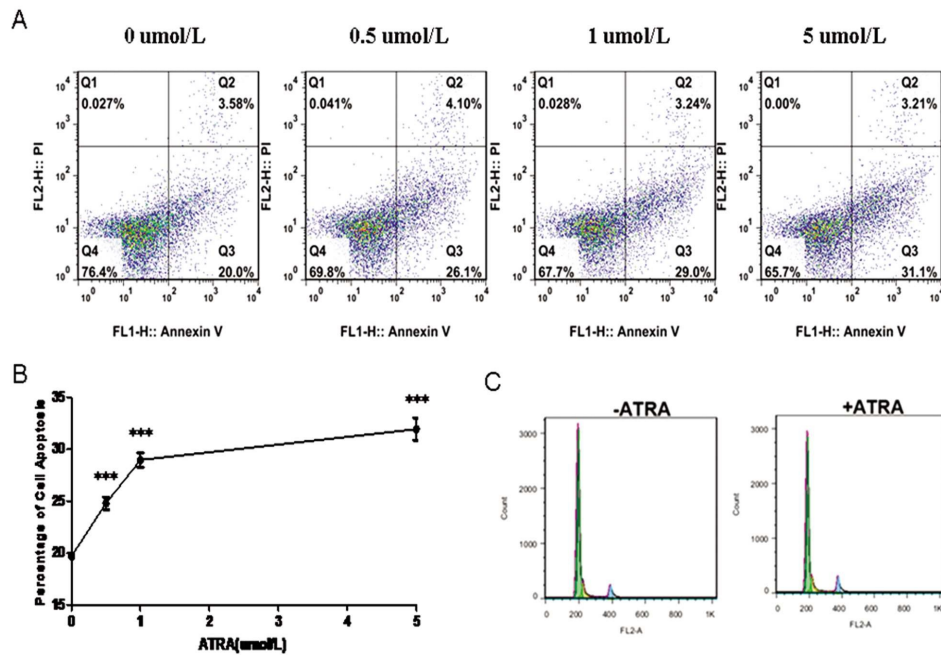


图3 ATRA 对 AChR 特异性淋巴细胞凋亡和周期的影响

A-B.与 $0 \mu\text{mol/L}$ 相比较,0.5,1,5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 均明显促进了淋巴细胞的凋亡,P 值均小于 0.001,***;C.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 并没有改变淋巴细胞的周期。

Fig.3 The effects of ATRA on the apoptosis and cell cycle of AChR-specific lymphocytes

A-B. Compared with $0 \mu\text{mol/L}$, 0.5,1 and 5 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA promoted the apoptosis of AChR-specific lymphocytes, *** $P < 0.001$. C. No change was observed by the addition of 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA.

2.4 ATRA 对 AChR 特异性淋巴细胞的增殖抑制

如上实验步骤, $1 \mu\text{M}$ ATRA 体外对 CFA 组以及 EAMG 组淋巴细胞进行体外刺激, 72 h 后 CCK-8 法检测不同处理后组细胞的增殖差异, 结果显示: ATRA 处理后, CFA 和 EAMG 组的淋巴细胞增殖均受到明显抑制, 且 ATRA 对 AChR 特异性的淋巴细胞(EAMG 组, **, $P<0.01$)的抑制明显与 CFA 组细胞(*, $P<0.05$), 可见 ATRA 的作用有一定的 AChR 特异性。

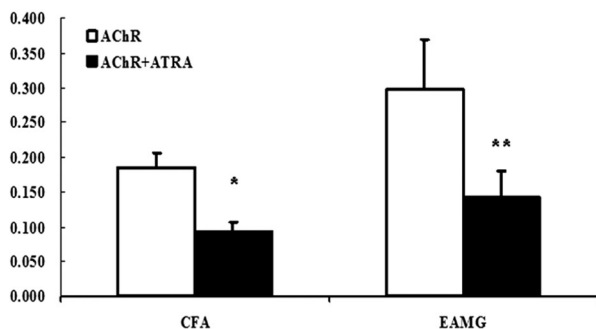


图 4 细胞增殖

Fig.4 Proliferation assay

* $P<0.05$; ** $P<0.01$.

2.5 AChR 特异性 CD4^+ T 淋巴细胞比例

既然 ATRA 对淋巴细胞的作用具有一定的 AChR 特异

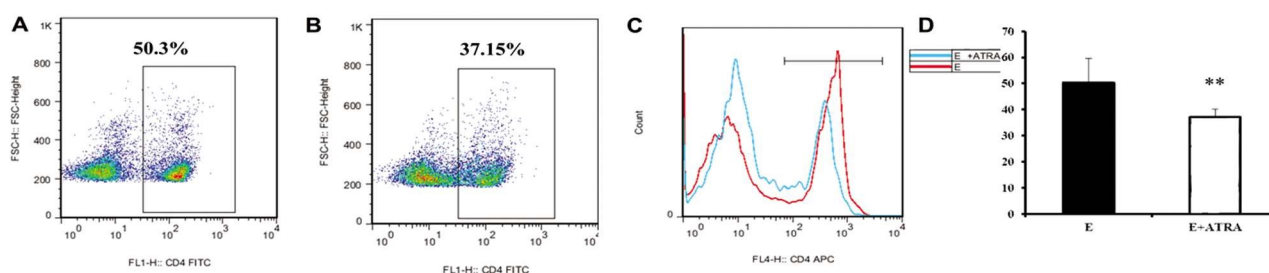


图 5 CD4^+ T 细胞比例

Fig.5 CD4^+ T cell ratios

A、B 图分别为未干预组和 ATRA 体外干预组的 AChR 特异性 CD4^+ T 淋巴细胞的流式散点图, C 图为两组 CD4^+ T 细胞的流式峰图, D 图为两组的统计分析图, 与单纯 EAMG 组淋巴细胞相比较, $\text{PE}+\text{ATRA}<0.01$.

A, non-treated group; B, ATRA-treated groups; C, overlay; D statistical analysis. Compared with non-treated group, $\text{PE}+\text{ATRA}<0.01$.

2.7 ATRA 对 B 淋巴细胞特异性抗体的分泌的影响

与此同时, ELISA 法检测 ATRA 体外干预后 AChR 特异性 B 淋巴细胞抗体的分泌情况, 统计结果显示: 与单纯 AChR 刺激、ATRA 未加药干预组比较, ATRA 加药后 AChR 特异性 B 细胞抗体分泌能力下降, 且差异显著($P<0.01$)。可见, ATRA 不仅能够抑制 AChR 特异性 T 细胞功能, 同时也抑制了 AChR 特异性 B 细胞的功能。

3 讨论

重症肌无力是一种世界范围内较为罕见的神经系统自身免疫性疾病, 尽管相对其他疾病而言, MG 的发病率和死亡率均较低, 但目前仍然没有一种高效、特异、副作用小的治疗手段^[6]。随着营养免疫学的深入研究, 人们逐渐认识到营养物质对免疫功能影响的重要性。目前研究表明维生素及其代谢产物能够影响机体的免疫系统, 而维生素 A 是能够起到免疫调节功能的维生素之一^[7], 以三种形式来源于食物, 包括全反式视黄醇

性, 那么, 这种特异性作用是针对 AChR 特异性的 T 细胞, 还是针对 AChR 特异性的 B 细胞呢? 为进一步验证, 我们对体外培养 72 h 的 AChR 特异性淋巴细胞进行 anti- CD4 -FITC 的染色后, 流式细胞仪法检测显示 EAMG 组 AChR 特异性 CD4^+ 淋巴细胞的阳性率占总细胞说的 50.3%(图 5. A), 而 ATRA $1 \mu\text{M}$ 体外干预后, 其阳性率下降至 37.15%(图 5. B), 两组相比较 $P<0.01$ (图 5. C, D), 差异有统计学意义。综合以上结果, ATRA 体外刺激能够通过诱导细胞凋亡降低 CD4^+ 细胞比例, 从而抑制 CD4^+ AChR 特异性 T 细胞的活性。

2.6 ATRA 对 Th 细胞格局的影响

为进一步分析, ATRA 对 CD4^+ T 细胞的功能影响, 流式法检测不同处理组的 AChR 特异性 T 淋巴细胞体外培养 72 h 后, $\text{Th1}/\text{Th2}/\text{Th17}/\text{Treg}$ 四种细胞亚群的格局变化: 与单纯 AChR 刺激组相比, ATRA 体外干预组 T 淋巴细胞中具有免疫抑制功能的 $\text{CD4}^+\text{IL-4}^+$ (Th2)、 $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ (Treg) T 细胞亚群百分比明显增加, 且 $P_{\text{CD4}^+\text{IL-4}^+}<0.001$ (图 6. E, F, G), $P_{\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+}<0.001$ (图 6. H, I, J), 有显著性差异, 而促炎性的 $\text{CD4}^+\text{IL-17}^+$ (Th17)、 $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ (Th1) T 细胞亚群百分比则明显降低, 且 $P_{\text{CD4}^+\text{IL-17}^+}<0.05$ (图 6. A, B, C), $P_{\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+}<0.001$ (图 6. A, B, D), 有统计学意义。因此, 结果提示, ATRA 能够通过逆转 Th 亚群失衡从而调控 AChR 特异性 T 细胞的免疫学功能。

(all-trans-retinol)、视黄酯、 β -胡萝卜素。其中, 组织中的全反式视黄醇被视黄醛脱氢酶(RALDHs)不可逆地氧化为全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA), 而维甲酸则通过与维甲酸受体(retinoic acid receptor, RAR)家族的核受体结合, 而发挥多种免疫调节作用, 因而备受重视^[8]。

MG 是一种典型的抗体介导的自身免疫性疾病, 但 AChR 特异性 Th 细胞连同相应的细胞因子在允许和促进高亲和的抗 AChR 抗体的合成过程中起到非常重要的病理性作用^[9], 因此, 在 MG/EAMG 发病机制中, AChR 特异性 T 细胞是疾病的始动者, 在没有 T 细胞存在情况下, EAMG 是不能发生的^[9]。而自上世纪 80 年代, 就有研究者尝试性的应用维甲酸对 EAE 大鼠模型、I 型糖尿病、类风湿性关节炎及自身免疫性肾炎等疾病进行了治疗性研究, 并取得了良好的疗效^[3,4,10]。鉴于 EAMG 发病机制中 Th 细胞的始动性和不可或缺性、目前对维生素 A 及其代谢产物维甲酸的研究以及 ATRA 对 EAMG 治疗效果的研究证实, 我们进一步探讨了 ATRA 治疗 EAMG 的可能机制。

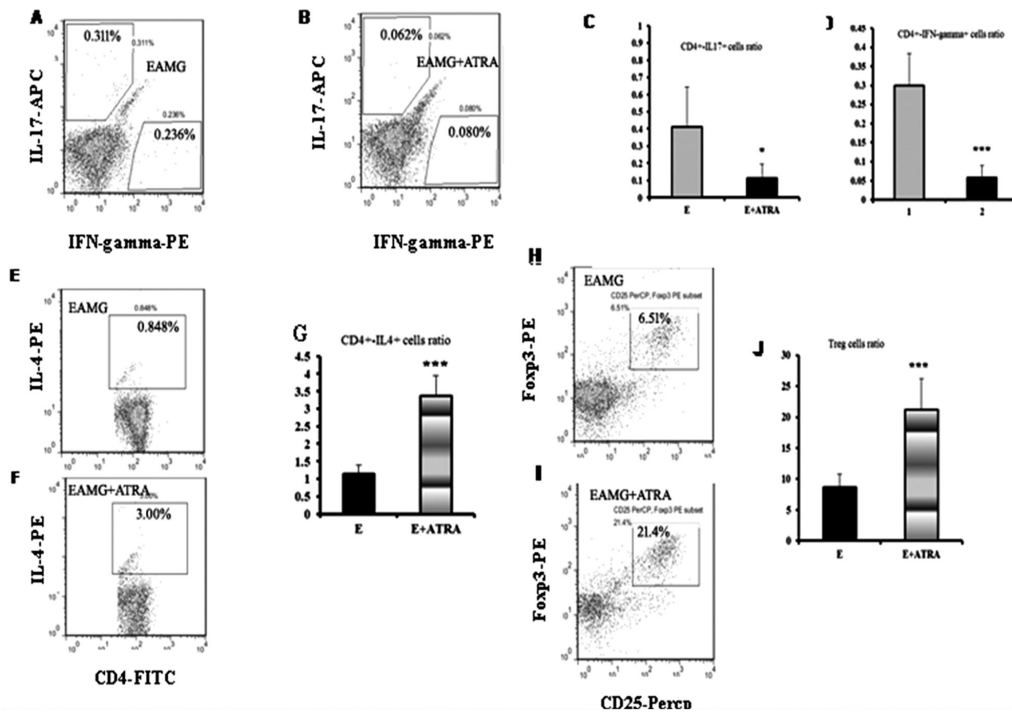


图 6 Th 亚群改变。B 图分别 ATRA 未干预与干预组, AChR 特异性 $CD4^+IL-17^+$ 、 $CD4^+IFN-\gamma^+$ 淋巴细胞的流式散点图, C、D 图二者统计图; E、F 图分别 ATRA 未干预与干预组, AChR 特异性 $CD4^+IL-4^+$ 淋巴细胞的流式散点图, G 图二者统计图; H、I 图分别 ATRA 未干预与干预组, AChR 特异性 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 淋巴细胞的流式散点图, J 图二者统计图。* $P<0.05$; *** $P<0.001$ 。

Fig. 6 $CD4^+$ T cell ratios. A-B. The ratios of AChR-specific $CD4^+IL-17^+$ cells with or without ATRA incubation. E-F. The ratios of AChR-specific $CD4^+IFN-\gamma^+$ cells with or without ATRA incubation. H-I. The ratios of AChR-specific $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ cells with or without ATRA incubation. C, D, G, J showed the statistical analysis for AChR-specific $CD4^+IL-17^+$, $CD4^+IFN-\gamma^+$, $CD4^+IL-4^+$, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ treated by ATRA, compared with non-treated group, respectively, * $P<0.05$; *** $P<0.001$.

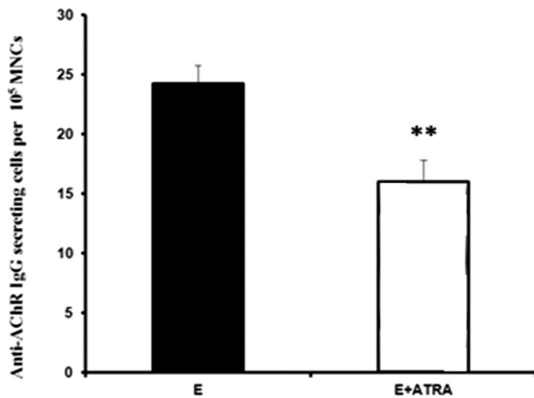


图 7 B 淋巴细胞抗体的分泌情况
Fig. 7 Immunoglobulin production by B cells
** $P<0.01$.

首先,我们将 EAMG 组大鼠淋巴细胞进行体外培养,在正常 AChR 肽段的体外刺激培养同时,我们设立了 ATRA $1\mu M$ 的药物干预组,72 h 后收集 ATRA 干预组和未干预组细胞以及 CFA 未加药对照组,进行流式检测。散射角结果显示 ATRA 药物干预后的 AChR 特异性淋巴细胞的存活率明显降低(图 2),且细胞周期和凋亡实验结果证实了 ATRA 能够促进淋巴细胞的凋亡,但并不参与淋巴细胞的周期阻断(图 3),同时,结果还显示由于 ATRA 药物干预后的 AChR 特异性淋巴细胞的存活率降低,而在这些存活下来的细胞团中, $CD4^+$ T 细胞的比例明显下降(图 5),说明 ATRA 能够特异性的诱导活化的 $CD4^+$ T

细胞发生凋亡。大量数据表明 Th1、Th2、Th17 以及 Treg 四种细胞亚群通过他们本身和各自分泌的细胞因子,相互影响,相互制约构成了一个复杂的网络系统,参与 EAMG 的发病过程^[11]。这提示疾病的进展或者在有效治疗下向正常状态的转归,都可能与这四种细胞亚群的偏移有关。

IL-17 基因敲除小鼠实验证实 IL-17 及 Th17 细胞在 T 介导的自身免疫性疾病的发病过程中均起到极为重要的作用,其中也包括由 B 细胞介导的自身免疫性疾病、EAMG^[12]。Th17 细胞的分化依赖于另一种 $CD4^+$ T 细胞,即 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 的调节性 T 细胞(Treg),Treg 细胞亚群能抑制 EAMG 中自身反应性 T 细胞的增殖^[13,14],因而成为治疗 EAMG 一个有力的靶点。已有研究者发现全反式维甲酸能通过诱导 Foxp3 编码基因的转录进而促进树突状细胞依赖的 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的生成^[15,16],同时能有效抑制孤核受体 γ 编码基因 --Th17 细胞亚群的重要转录因子的转录,导致对 Th17 细胞的抑制^[17]。此外, $TGF-\beta$ 也能降低很多自身免疫性 T 细胞的反应性,对细胞的增殖、生长、凋亡均有调节作用。并且,维生素 A 代谢产物对 Th1-Th2 的细胞亚群平衡以及 Th17 和 Treg 细胞亚群的分化具有特异性的免疫调节功能。体内、外实验表明维生素 A 缺乏时,Th2 细胞的反应性降低;反之,当补充维生素 A 时能阻断 Th1 细胞因子的分泌,而这些作用均是通过维生素 A 代谢产物 RA 介导的^[18]。

在以往的研究中,我们也已经证实了 IFN- γ 和 IL-17 在 EAMG 中的促疾病发生作用,表现为以分泌这两种致病性因子

为主的 Th1 和 Th17 细胞在 EAMG 发病过程中显著增高,而 Treg、Th2 细胞的比例则明显低于对照组^[4]。体外流式检测结果显示 ATRA 处理组大鼠的 T 淋巴细胞中 CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺IL-17⁺ 阳性细胞表达量明显均低于 EAMG 组,说明 ATRA 能通过降低致病性 CD4⁺IFN- γ ⁺ 和 CD4⁺IL-17⁺ 阳性 T 细胞的促炎性因子的分泌而发挥免疫调节功能(图 6 A-D)。与之相反的是, Th2 细胞被认为在 EAMG 可能是保护性的, 缘于 IL-4 能促进 AChR 特异性 CD4⁺ 调节性 T 细胞 Treg 的分化,而这种 Treg 细胞则能抑制 EAMG 的发生、发展,维持机体的免疫耐受^[19]。本研究结果显示 ATRA 药物干预后的 AChR 特异性 T 淋巴细胞中 CD4⁺IL-4⁺ T 细胞,尤其是 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 细胞的比例明显高于未干预组(图 6E-J),提示 ATRA 在抑制 Th1 和 Th17 细胞的促炎性细胞因子分泌的同时,能诱导 Th2 以及 Treg 细胞的分化。

以上结果进一步证实了 ATRA 对 CD4⁺T 细胞的免疫调节是通过逆转 Th1、Th2、Th17、Treg 这四种辅助性 T 细胞亚群的失衡状态而达到的^[4]。而 ELISA 结果显示 ATRA 药物干预后 B 细胞的抗体分泌减少(图 7),提示 ATRA 不仅能通过对 T 细胞的抑制,间接抑制 B 细胞的抗体分泌能力,同时也能够直接作用在 B 细胞上,从而降低了 B 细胞的抗体分泌能力。

综上, ATRA 通过对 EAMG 中 AChR 特异性 Th1、Th2、Th17 及 Treg 几种细胞亚群平衡格局的逆转恢复了内环境的相对稳态^[20], 同时降低了 AChR 特异性 B 细胞的抗体分泌能力。 ATRA 的免疫调节功能为 MG 等自身免疫性疾病及其他关乎人类健康的疾病的治疗提供了可能,而我们的实验结果将为进一步的 ATRA 对 MG 的临床治疗提供实验和理论基础。

参考文献(References)

- [1] Balandina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis[J]. *Blood*, 2005, 105(2): 735-741
- [2] Arts RJ, Blok BA, van Crevel R, et al. Vitamin A induces inhibitory histone methylation modifications and down-regulates trained immunity in human monocytes[J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 98(1): 129-136
- [3] Van YH, Lee WH, Ortiz S, et al. All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon-gamma-producing T-cells without affecting Th17 cells [J]. *Diabetes*, 2009, 58(1): 146-155
- [4] Xie X, Mu L, Yao X, et al. ATRA alters humoral responses associated with amelioration of EAMG symptoms by balancing Tfh/Tfr helper cell profiles[J]. *Clin Immunol*, 2013, 148(2): 162-176
- [5] Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs[J]. *J Exp Med*, 1975, 141(6): 1365-1375
- [6] Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, et al. Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12(5): 259-268
- [7] Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Retinoic acid actions through mammalian nuclear receptors[J]. *Chem Rev*, 2014, 114(1): 233-254
- [8] Lu L, Lan Q, Li Z, et al. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(33): E3432-3440
- [9] Cao Y, Amezquita RA, Kleinstein SH, et al. Autoreactive T Cells from Patients with Myasthenia Gravis Are Characterized by Elevated IL-17, IFN-gamma, and GM-CSF and Diminished IL-10 Production [J]. *J Immunol*, 2016, 196(5): 2075-2084
- [10] Zhan XX, Liu Y, Yang JF, et al. All-trans-retinoic acid ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by affecting dendritic cell and monocyte development[J]. *Immunology*, 2013, 138(4): 333-345
- [11] 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
- [12] Schaffert H, Pelz A, Saxena A, et al. IL-17-producing CD4⁺ T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(5): 1339-1347
- [13] Aricha R, Reuveni D, Fuchs S, et al. Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by autologous T regulatory cells [J]. *J Autoimmun*, 2016, 67: 57-64
- [14] Alahgholi-Hajibehzad M, Kasapoglu P, Jafari R, et al. The role of T regulatory cells in immunopathogenesis of myasthenia gravis: implications for therapeutics [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015, 11(7): 859-870
- [15] Wang J, Huizinga TW, Toes RE. De novo generation and enhanced suppression of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by retinoic acid [J]. *J Immunol*, 2009, 183(6): 4119-4126
- [16] Guillemins M, Crozat K, Henri S, et al. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103⁺ dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Blood*, 2010, 115(10): 1958-1968
- [17] Santarlasci V, Maggi E, Capone M, et al. Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion[J]. *Immunity*, 2012, 36(2): 201-214
- [18] Zhu YF, Hu JZ, Zhao PN, et al. All-transretinoic acid regulates Th1/Th2 balance in CD4⁺T cells when GATA-3 is deficient [J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(9): 774-777
- [19] 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(3): 396-405
- [20] Wang X, Wang W, Xu J, et al. All-trans retinoid acid promotes allogeneic corneal graft survival in mice by regulating Treg-Th17 balance in the presence of TGF-beta[J]. *BMC Immunol*, 2015, 16: 17