

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.16.012

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220525.1712.004.html\(2022-05-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220525.1712.004.html(2022-05-26))

免疫治疗对儿童抗 NMDAR 脑炎免疫功能的影响*

黄志新, 孙小兰, 陈辉, 陈勇, 钟建民[△]
(江西省儿童医院神经内科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨免疫治疗对儿童抗 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR)脑炎免疫功能的影响机制。**方法** 应用流式细胞术检测抗 NMDAR 脑炎患儿免疫治疗(治疗组)治疗前后及健康对照组儿童外周血淋巴细胞亚群水平(包括 CD16⁺56、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺ 淋巴细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 等);应用化学发光法检测治疗组患儿治疗前后及健康对照组儿童外周血炎症性细胞因子水平[包括白细胞介素(IL)-6、IL-10 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等]。**结果** 治疗组患儿治疗前 CD16⁺56、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平与健康对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗后 CD16⁺56、CD4⁺/CD8⁺ 水平均显著低于治疗前和同期健康对照组,CD4⁺/CD8⁺ 水平均显著高于治疗前健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);两组研究对象 CD4⁺ 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗组患儿治疗前后 CD19⁺ 水平均显著高于健康对照组,治疗后 CD19⁺ 水平显著降低,但仍显著高于健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);治疗组患儿治疗前 IL-6、IL-10、TNF- α 水平均显著高于治疗后和健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);治疗后 IL-6、IL-10、TNF- α 水平与健康对照组,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 免疫治疗主要影响体液免疫反应而发挥其作用。

[关键词] 免疫治疗;儿童;抗 NMDAR 脑炎;体液免疫;细胞因子

[中图分类号] R729 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)16-2762-04

Effect of immunotherapy on immune function in children with anti-NMDAR encephalitis*

HUANG Zhixin, SUN Xiaolan, CHEN Hui, CHEN Yong, ZHONG Jianmin[△]

(Department of Neurology, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect mechanism of immunotherapy on the immune function of children with anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis. **Methods** The peripheral blood lymphocyte subsets were detected by the flow cytometry before and after immunotherapy in children patients with anti-NMDAR encephalitis and healthy control group (including CD16⁺56, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ ratio); the values of cytokines were detected by chemiluminescence method in peripheral blood before and after treatment in children patients with anti-NMDAR encephalitis and healthy control group (including IL-6, IL-10 and TNF- α). **Results** The levels of CD16⁺56, CD8⁺ lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ before treatment had no statistical differences between the treatment group and healthy control group; the levels of CD16⁺56, CD4⁺/CD8⁺ after treatment in the treatment group were significantly lower than those before treatment and the healthy control group, CD4⁺/CD8⁺ level was significantly higher than that before treatment in the healthy control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The CD4⁺ level had no statistical difference between the two groups ($P>0.05$); the CD19⁺ level before and after treatment group in the treatment group was significantly higher than that in the healthy control group, the CD19⁺ level after treatment was significantly decreased, but was still higher than that in the healthy control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$); the IL-6, IL-10 and TNF- α levels before treatment in the treatment group were significantly higher than those after treatment and in the healthy control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); the levels of IL-6, IL-10 and TNF- α after treatment in the treatment group had no statistically significant difference compared with the healthy control group. **Conclusion** Immunotherapy mainly affects the humoral immunity reaction to play the effect.

[Key words] immunotherapy; children; anti-NMDAR encephalitis; humoral immunity; cytokine

* 基金项目:江西省卫生健康委员会资助项目(20191108)。 作者简介:黄志新(1985—),主治医师,硕士,主要从事小儿神经系统疾病的研究。[△] 通信作者, E-mail: zhongjm@163.com。

抗 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR)脑炎是临床最常见的自身免疫性脑炎^[1],好发于儿童及成年女性,临床主要表现为精神行为异常、抽搐、记忆障碍、运动障碍、睡眠障碍、意识障碍、认知障碍和自主神经功能障碍。其发病与细胞膜表面 NMDAR 自身抗体形成有关,主要为机体产生了针对其受体组成部分的 NR1 亚基特异性 IgG 抗体,而 NR1 亚基与学习、记忆和精神行为密切相关,自身抗体与 NR1 的结合诱导受体内吞,被溶酶体降解,导致细胞表面 NMDAR 密度降低,从而导致疾病的发生^[2]。抗 NMDAR 脑炎的治疗主要分为一线免疫治疗和二线免疫治疗,对大多数患儿而言,一线免疫治疗通常是有效的,仅少部分需上升至二线免疫治疗。本研究通过检测抗 NMDAR 脑炎患儿一线免疫治疗前后外周血淋巴细胞亚群和细胞因子水平的变化,初步探讨了免疫治疗对该病的干预机制,从而为临床诊治该病提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 7 月至 2021 年 6 月本院新诊断的抗 NMDAR 脑炎患儿 20 例作为治疗组,既往未患自身免疫性疾病及口服激素等免疫抑制剂病史。抗 NMDAR 脑炎诊断标准^[3]:(1)临床主要表现为精神行为异常或认知损害、言语障碍、癫痫发作、运动障碍/不自主运动、意识水平下降、自主神经功能障碍或中枢性通气障碍;(2)抗 NMDAR 抗体阳性;(3)合理排除其他病因。选取同期儿保科健康体检儿童 20 例作为健康对照组,入选儿童无自身免疫性疾病、感染、手术、创伤、精神创伤、不适药物等病史。两组研究对象均在其父母知情同意的情况下参与本研究,本研究得到医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

一线免疫治疗方案:甲强龙(20~30 mg·kg⁻¹·

d⁻¹,连用 3~5 d,最大量为 1 000 mg/d)联合人免疫球蛋白(400 mg·kg⁻¹·d⁻¹,连用 5 d)。

1.2.2 检测方法

应用流式细胞术检测两组研究对象外周血淋巴细胞亚群水平(CD16⁺56、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD4⁺/CD8⁺等),仪器采用流式细胞仪(FACSCanto,美国 BD 公司),试剂盒由美国 BD 公司提供。应用化学发光法检测两组研究对象炎性细胞因子水平[白细胞介素(IL)-6、IL-10,肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等],仪器采用 IMMULITE1000 化学发光免疫分析仪(德国西门子公司),试剂盒由德国西门子公司提供。

1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,当 $\alpha < 0.05$ 时,再进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞亚群水平

治疗组患儿治疗前 CD16⁺56、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺水平与健康对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);治疗后 CD16⁺56、CD4⁺/CD8⁺水平均显著低于治疗前和健康对照组,CD4⁺/CD8⁺水平均显著高于治疗前健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);两组研究对象 CD4⁺水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗组患儿治疗前后 CD19⁺水平均显著高于健康对照组,治疗后 CD19⁺水平显著降低,但仍显著高于健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 外周血炎性细胞因子水平

治疗组患儿治疗前 IL-6、IL-10、TNF-α 水平均显著高于治疗后和健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);治疗后 IL-6、IL-10、TNF-α 水平与健康对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 1 两组研究对象淋巴细胞亚群水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	CD16 ⁺ 56(%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD19 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
治疗组					
治疗前	14.9±5.1 ^a	32.8±4.1	21.6±3.5 ^a	24.0±2.9 ^{ab}	1.59±0.33 ^a
治疗后	7.1±3.4 ^b	30.3±5.5	30.0±6.4 ^b	17.8±7.7 ^b	1.04±0.41 ^b
健康对照组	16.7±5.1	32.7±5.0	23.8±3.2	12.6±2.9	1.45±0.32
F	24.420	1.670	17.458	25.564	12.996
P	0.000	0.197	0.000	0.000	0.000

^a: $P < 0.05$,与同组治疗后比较;^b: $P < 0.05$,与健康对照组比较。

表 2 两组患儿细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s, 10^{-12}$ g/mL)

组别	IL-6	IL-10	TNF-α
治疗组			
治疗前	6.0±7.0 ^{ab}	5.3±2.1 ^{ab}	14.4±6.7 ^{ab}
治疗后	2.3±3.2	3.0±1.3	5.3±3.5
健康对照组	1.7±1.2	3.6±2.3	4.4±2.3
F	5.124	7.687	29.522
P	0.009	0.001	0.000

^a: $P < 0.05$,与同组治疗后比较;^b: $P < 0.05$,与健康对照组比较。

3 讨论

抗 NMDAR 脑炎的发病主要是 B 淋巴细胞产生了针对神经细胞表面抗原——NMDAR 的特异性抗体,而 CD4⁺淋巴细胞通过促进 B 淋巴细胞的生成和特异性抗体的分泌而发挥其辅助作用^[4]。免疫治疗的目的是纠正免疫紊乱,使机体回复至正常的免疫状态,本研究通过检测外周血淋巴细胞亚群在免疫治疗前后的改变,初步了解抗 NMDAR 脑炎的免疫失衡机

制及免疫治疗的干预机制。CD16⁺56 淋巴细胞具有抗肿瘤、抗病毒、调节免疫等作用,在一定条件下与自身免疫性疾病的发生有关,本研究结果显示,治疗组患儿治疗前和健康对照组 CD16⁺56 水平均明显高于治疗后,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而治疗前 CD16⁺56 水平与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示该细胞参与了抗 NMDAR 脑炎的发生,经免疫治疗后显著下降,而治疗前和健康对照组无差异的原因可能与患儿均在发病初期,免疫功能紊乱较轻微,在疾病的不同时期监测 CD16⁺56 水平有助于证实本研究的推测。CD4⁺淋巴细胞与细胞免疫相关,治疗组与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明细胞免疫在抗 NMDAR 脑炎患儿的发病中并非起主导作用,其通过辅助体液免疫反应促进特异性抗体的生成而发挥作用。CD8⁺淋巴细胞与 CD4⁺淋巴细胞的功能相反,能抑制细胞免疫和体液免疫反应,在机体的免疫耐受方面发挥重要作用。本研究结果显示,治疗组患儿治疗后 CD8⁺水平显著高于治疗前和健康对照组,而治疗前 CD8⁺水平与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗前和健康对照组 CD4⁺/CD8⁺均明显高于治疗后,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而治疗前 CD4⁺/CD8⁺与健康对照组比较,差异无统计学意义($P < 0.05$),表明 CD8⁺水平的降低参与了儿童抗 NMDAR 脑炎的发病,经过免疫治疗后 CD8⁺水平明显上升,提示机体免疫功能逐渐恢复。CD19⁺淋巴细胞与体液免疫相关,本研究结果显示,治疗组患儿 CD19⁺水平均显著高于健康对照组,治疗前 CD19⁺水平显著高于治疗后,提示体液免疫反应在抗 NMDAR 脑炎患儿的发病中具有重要作用,其通过分泌特异性抗体与 NMDAR 结合导致疾病的发生。经过免疫治疗后 CD19⁺水平明显下降,但仍明显高于健康对照组,说明机体免疫功能的恢复需要时间,与我国专家共识中需要维持免疫治疗约半年相一致^[5]。二线免疫治疗药物——利妥昔单抗正是通过清除外周血 CD19⁺淋巴细胞而发挥免疫调节作用。基于 CD19⁺淋巴细胞在抗 NMDAR 脑炎发病中的重要作用,对一些难治性抗 NMDAR 脑炎患者中应用浆细胞耗竭剂硼替佐米也可取得良好效果^[6]。

IL-6 是一种重要的促炎性细胞因子,能促进 B 淋巴细胞增殖、分化为浆细胞和产生抗体,与多种免疫性疾病的发生相关^[7]。BYUN 等^[8]研究表明抗 NMDAR 脑炎患者 IL-6 水平明显高于抗 LGI1 脑炎患者。吕遐等^[9]也发现抗 NMDAR 脑炎患者急性期 IL-6 水平明显高于缓解期,是评估抗 NMDAR 脑炎病情的潜在生物学标记物。PENG 等^[10]发现患者脑脊液 IL-6 水平与疾病严重程度及预后密切相关。以上研究均提示 IL-6 在抗 NMDAR 脑炎的发病中扮演着重要角色,参与了该病的发生,且与病情和预后相关。鉴于 IL-6 在抗 NMDAR 脑炎发病的重要作用,托珠单抗作为 IL-6 拮抗剂,已被用于一、二线免疫治疗无效者,并获得了一定疗效^[11-12]。本研究结果显

示,治疗组患儿治疗前 IL-6 水平显著高于治疗后和健康对照组,而治疗后 IL-6 水平与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),与诸上研究结论一致,再次证实 IL-6 与疾病的发生相关,且经过免疫治疗后 IL-6 水平显著下降,与健康对照组无明显差异。

IL-10 作为一种重要的抗炎性细胞因子,在维持机体的免疫耐受中发挥了重要作用,能抑制 T 淋巴细胞的增殖,降低促炎性细胞因子的表达,有效抑制细胞介导的免疫反应^[13]。虽然 IL-10 在机体的免疫系统中主要发挥免疫抑制功能,但在一定条件下也具有免疫促进作用,主要是通过抑制 B 淋巴细胞凋亡、促进 B 淋巴细胞增殖及分化为抗体而发挥作用^[14]。本研究结果显示,治疗组患儿治疗前 IL-10 水平显著高于治疗后和健康对照组,治疗后 IL-10 水平与健康对照组无显著差异,即 IL-10 在抗 NMDAR 脑炎患儿的发病中发挥着促进炎症免疫反应的作用,而非免疫抑制作用。经过免疫治疗后,治疗组 IL-10 水平显著下降,与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本研究结果一致,LI 等^[15]和 JIANG 等^[16]也发现抗 NMDAR 脑炎患者 IL-10 水平不同程度增高,参与了疾病的发生,为今后探索针对 IL-10 的精准治疗新方法提供了理论依据。

TNF- α 通过促进 B、T 淋巴细胞和 NK 细胞的增殖及分化介导多种自身免疫性疾病的发生,并诱导产生其他促炎性细胞因子而发挥促炎性反应作用。WANG 等^[17]发现,TNF- α 和 IL-6 介导的神经炎症与抗 NMDAR 脑炎小鼠的记忆缺失相关。LIU 等^[18]和 ZOU 等^[19]研究也表明,抗 NMDAR 脑炎患者 TNF- α 水平明显高于健康对照组,且急性期水平明显高于缓解期,均提示 TNF- α 参与了疾病的发生。本研究结果显示,治疗组患儿治疗前 TNF- α 水平显著高于治疗后和健康对照组,治疗后 TNF- α 水平与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),即 TNF- α 与疾病的发生相关,经免疫治疗后水平明显下降,与诸上研究结果一致。基于以上研究结果,是否可试用 TNF- α 拮抗剂治疗一、二线免疫治疗无效的抗 NMDAR 患者尚有待于进一步考究。

综上所述,免疫治疗通过影响外周血淋巴细胞亚群(CD16⁺56、CD8⁺、CD19⁺、CD4⁺/CD8⁺)和细胞因子(IL-6、IL-10、TNF- α)水平而发挥其在抗 NMDAR 脑炎患儿中的免疫调节作用,初步阐述了免疫治疗的干预机制,为临床探索该病的发病机制和治疗新方法提供了理论依据。然而,本研究还存在许多不足,如未同步检测以上指标在脑脊液的变化;病例数偏少,研究时间过短,只检测了急性期诸上指标的变化,而未动态监测其在疾病的不同时期的变化情况;纳入研究的免疫指标有限,尚不能完全阐明免疫治疗对整个免疫网络的调节机制,这些不足尚有待于在今后的研究中进一步阐明。

参考文献

- [1] DALMAU J, GRAUS F. Antibody-mediated

- encephalitis[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(9): 840-851.
- [2] PAN H, STEIXNER-KUMAR A A, SEELBACH A, et al. Multiple inducers and novel roles of autoantibodies against the obligatory NMDAR subunit NR1: a translational study from chronic life stress to brain injury[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(6): 2471-2482.
- [3] CELLUCCI T, VAN MATER H, GRAUS F, et al. Clinical approach to the diagnosis of autoimmune encephalitis in the pediatric patient[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2020, 7(2): e663.
- [4] HUANG Q, XIE Y, HU Z, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a review of pathogenic mechanisms, treatment, prognosis [J]. *Brain Res*, 2020, 1727: 146549.
- [5] 中华医学会神经病学分会. 中国自身免疫性脑炎诊治专家共识[J]. *中华神经科杂志*, 2017, 50(2): 91-98.
- [6] BIEN C G, BIEN C. Autoimmune encephalitis in children and adolescents [J]. *Neurol Res Pract*, 2020, 2: 4.
- [7] YAO X, HUANG J, ZHONG H, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(2): 125-139.
- [8] BYUN J, LEE S T, MOON J, et al. Distinct intrathecal interleukin-17/interleukin-6 activation in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis[J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 297(2016): 141-147.
- [9] 吕遐, 徐晓璐, 任海涛, 等. 抗 N-甲基-D-天冬氨酸受体脑炎患者细胞因子检测及其临床意义 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2021, 28(3): 214-218, 223.
- [10] PENG Y, LIU B, PEI S, et al. Higher CSF levels of NLRP3 inflammasome is associated with poor prognosis of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 905.
- [11] NOSADINI M, THOMAS T, EYRE M, et al. International consensus recommendations for the treatment of pediatric NMDAR antibody encephalitis [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2021, 8(5): e1052.
- [12] WANG H, XIAO Z. Current progress on assessing the prognosis for anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7506590.
- [13] KAPELSKI P, SKIBINSKA M, MACIUKIEWICZ M, et al. Family-based association study of interleukin 10 (IL10) and interleukin 10 receptor alpha (IL10RA) functional polymorphisms in schizophrenia in Polish population[J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 297(11): 92-97.
- [14] 朱平, 杜小萍, 鞠吉雨. IL-10 与疾病关系的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2012, 35(1): 14-17, 28.
- [15] LI Q, CHEN J, YIN M, et al. High level of soluble CD146 in cerebrospinal fluid might be a biomarker of severity of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 680424.
- [16] JIANG X Y, LEI S, ZHANG L, et al. Co-expression of NMDA-receptor subunits NR1, NR2A, and NR2B in dysplastic neurons of teratomas in patients with paraneoplastic NMDA-receptor-encephalitis: a retrospective clinicopathology study of 159 patients[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 130.
- [17] WANG X, MA C, LIU C Y, et al. Neuronal NMDAR currents of the hippocampus and learning performance in autoimmune anti-NMDAR encephalitis and involvement of TNF- α and IL-6[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 684.
- [18] LIU J, LIU L, KANG W, et al. Cytokines/chemokines: potential biomarkers for non-paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 582296.
- [19] ZOU C, PEI S, YAN W, et al. Cerebrospinal fluid osteopontin and inflammation-associated cytokines in patients with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 519692.

(收稿日期: 2021-12-25 修回日期: 2022-05-08)