

## 昼夜节律对多发性硬化发病机制的影响

梁洁<sup>1</sup>, 陈志刚<sup>2</sup>, 范荣<sup>1</sup> 综述 江滢<sup>1</sup> 审校

1. 中山大学附属第三医院神经病学科, 广东省广州市 510630

2. 中山大学附属第五医院神经病学科, 广东省广州市 519000

**摘要:**多发性硬化(MS)是一种常见的主要引起中枢神经系统脱髓鞘病变的自身免疫性疾病,它由 IFN- $\gamma$  (Th1 细胞)或 IL-17 (Th17 细胞)为特征的 CD4<sup>+</sup> T 细胞介导发病。流行病学观察到多发性硬化存在疾病活动的季节性变化,轮班工作等环境因素改变对疾病活动产生影响,因而昼夜节律有可能影响 MS 发病机制、病情严重程度及治疗。本文主要阐述核心昼夜节律基因对 MS 的影响,与昼夜节律相关的时间治疗方案可能成为治疗新方向。

**关键词:**多发性硬化;生物钟;昼夜节律;免疫

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.05.023

地球自转产生 24 小时明/暗周期的昼夜节律,公转产生季节变化。生物为了适应光照、温度或食物供应的规律变化,在生理行为上进化内源性昼夜节律,使器官和细胞能够对变化作出有效反应,以预测危险、防止感染。由生物钟产生的昼夜节律存在于大多数细胞中,包括免疫细胞<sup>[1]</sup>。多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种自身免疫性脱髓鞘疾病,主要由 IFN- $\gamma$  (Th1 细胞)或 IL-17 (Th17 细胞)为特征的 CD4<sup>+</sup> T 细胞介导,导致中枢神经系统(central nervous system, CNS)炎症和脱髓鞘病变,而在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型小鼠(一种 MS 模型小鼠)中同样也观察到自身抗原特异性的 Th1 细胞和 Th17 细胞。目前,普遍认为发生 MS 的风险是由遗传和环境因素共同决定的<sup>[2]</sup>,并且环境对免疫状态的影响更大<sup>[3]</sup>。飞行员、轮班工人和频繁国际旅行者等人群中 MS 的发病率增加,轮班工作破坏昼夜节律并导致免疫系统失调,这些因素与 MS 具有较高风险相关联<sup>[4]</sup>。以上发现促使人们关注昼夜节律与 MS 疾病活动性之间的关系<sup>[5]</sup>。

昼夜节律通过细胞固有生物钟驱动,经众多基因及表达产物调节免疫反应。研究表明,分子时钟参与调控机体免疫应答,包括核心时钟基因脑和肌肉芳香受体核转位蛋白(brain and muscle aromatic

receptor nuclear translocation proteins, BMAL1)、ROR、NFIL3、CLOCK、Period 基因(PER)等<sup>[6]</sup>。基本机制依赖于 CLOCK/BMAL1 二聚体激活时钟基因 PER1 和 PER2 以及隐花色素(cryptochrome, CRY)1 和 CRY2,以及 PER 和 CRY 蛋白对 CLOCK/BMAL1 活性的负反馈。CLOCK/BMAL1 还激活编码核受体的基因,例如调节 BMAL1 的 REV-ERB 和 ROR 因子基因转录。这些反馈回路使得时钟控制的基因及编码的 RNA 节律表达。大多数组织中存在昼夜节律,特别是受环境影响的器官,如巨噬细胞基因的 10% 被时钟控制<sup>[7]</sup>,淋巴结中淋巴细胞的迁移和发育也有固定的节律<sup>[8]</sup>。

生物钟基因主要通过核心振荡器途径对节律产生影响。振荡器主要由 3 个内嵌反馈环组成,这 3 个回路构成了昼夜节律分子钟的基础<sup>[6]</sup>。生物钟基因在神经组织的免疫反应中产生作用。健康人若被睡眠剥夺或存在生物钟紊乱,血浆 IL-6 浓度将增加<sup>[9]</sup>。IL-6 分泌缺陷小鼠不能产生分泌 IL-17 的 T 细胞,提示其对 EAE 发病有抵抗作用,而 IL-6 和 TGF- $\beta$  共同促进 Th17 细胞分化,Treg 细胞分化相对减少,导致自身免疫失衡<sup>[10]</sup>。Yu 等<sup>[11]</sup>提出昼夜节律可以调节 Th17 细胞分化,而 IL-17、IL-22 等主要促炎细胞因子是 MS 免疫发病机制中的关键因素,Th17 细胞介导的炎症以中性粒细胞向中枢神经系统内募集和神经元损伤为特征<sup>[12]</sup>。炎

**基金项目:**国家自然科学基金面上项目(81671182);广东省自然科学基金面上项目(2016A030313228)

**收稿日期:**2019-01-07;**修回日期:**2019-09-03

**作者简介:**梁洁(1992-),女,硕士研究生,主要从事神经免疫性疾病方面研究。

**通信作者:**江滢(1979-),男,副主任医师,硕士研究生导师,硕士研究生,主要从事神经免疫性疾病和中枢神经系统感染性疾病方面研究。

E-mail:jiangying722@163.com。

性细胞因子具有季节性变化等<sup>[13]</sup>提示节律基因可能通过回路对 MS 的发病机制产生作用。

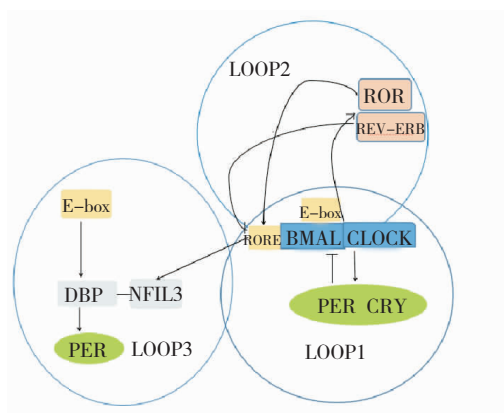


图1 生物钟基因环路图

## 1 NFIL3 基因在 MS 发病机制上的作用

NFIL3, 也称为 E4BP4, 是在多种免疫细胞中表达的碱性亮氨酸拉链转录因子, 并通过各种细胞类型调控免疫功能。NFIL3 通过作用于 Th17、Th1 细胞等影响 MS 的发病。肠道微生物群通过影响转录因子 NFIL3 节律, 从而调节脂质摄取和储存, 有助于解释在轮班工作或国际旅行中肥胖、糖尿病等疾病发生率增加<sup>[14]</sup>。NFIL3 可协调多个反应通路。REV-ERB $\alpha$  通过与 NFIL3 基因位点上的一个序列结合, 直接抑制 NFIL3 的转录。因此, 活化的 REV-ERB $\alpha$   $^{-/-}$  CD4 T 细胞中 NFIL3 的表达高于野生型细胞。此外, 幼稚型 REV-ERB $\alpha$   $^{-/-}$  CD4 T 细胞在 Th17 极化条件下表现为分化 Th17 细胞的能力降低, REV-ERB $\alpha$   $^{-/-}$  小鼠的肠道的 Th17 频度减少, 说明 Th17 细胞系发育因 NFIL3 和 REV-ERB $\alpha$  而与生物钟有关。因为主要免疫细胞谱系发育处于昼夜控制下。Yu 等<sup>[11]</sup>发现, 转录因子 NFIL3 通过直接结合和抑制 ROR- $\gamma$  启动子来抑制与 MS 发病密切相关的 Th17 细胞发育。NFIL3 通过转录因子 REV-ERB $\alpha$  将 Th17 细胞的发育与昼夜时钟网络连接起来, Th17 细胞的数量越多, 那么炎症疾病的易感性也随之增加。有研究表明, 在 SPF 环境中饲养的 NFIL3  $^{-/-}$  小鼠中约 10% 在 6~9 月龄时出现直肠脱垂和免疫细胞浸润肠道, 而相同环境饲养的野生型小鼠则无此现象。NFIL3  $^{-/-}$  小鼠有较高的 IL-17 和 ROR- $\gamma$ , 小肠和结肠中 Th17 细胞频率均高于野生型小鼠。另外, NFIL3 也对 Th1 细胞产生影响。长期免疫刺激 NFIL3  $^{-/-}$  小鼠的 Th1 细胞、Treg

细胞和 NK 细胞, IL-10 的表达减少。Motomura 等<sup>[15]</sup>研究表明, NFIL3 在控制 T 细胞中 IL-10 的分泌可塑性方面 also 具有重要作用, NFIL3  $^{-/-}$  EAE 小鼠表现出更高的 EAE 评分, 且 NFIL3  $^{-/-}$  EAE 小鼠淋巴结 T 细胞不表达 IL-10, 但可产生更多的 IL-17, 因而 NFIL3 诱导产生 IL-10 对 EAE 疾病缓解十分重要。NFIL3 缺失也可消除褪黑素对 Th17 细胞分化的抑制作用, 提示褪黑素对 Th17 细胞分化的抑制作用依赖于 NFIL3, 从而支持 NFIL3 与 MS 活性负相关<sup>[16]</sup>。以上研究说明 NFIL3 可通过调节 T 细胞的分泌对自身免疫疾病产生影响。

## 2 髓系细胞分子时钟基因 BMAL 在 MS 发病机制上的作用

在髓系细胞中, BMAL1 主要作用是抗炎反应和降低 T 细胞极化。Lavtar 等<sup>[17]</sup>发现 BMAL 基因中 rs3789327 的 CC 基因型 MS 的发病风险显著增加。Sutton 等<sup>[18]</sup>证实缺乏髓系 BMAL1 基因的小鼠可产生更多致病型 IL-17/IFN- $\gamma$  T 细胞, 通过向中枢神经系统扩散和渗透 IL-1 $\beta$  分泌 CD11b-Ly6 C 单核细胞, 可使 EAE 疾病病情加重, 进而显示 BMAL1 通过改变炎症因子的表达来影响 EAE 的病情严重程度, 他们同时也观察到 ZT6 时间段感染的小鼠 MS 病情更重, 这些小鼠的脊髓中脱髓鞘较为严重且有较多的免疫细胞浸润, ZT18 时间段感染的小鼠病情相对较轻, 而骨髓细胞中缺乏 BMAL1 这一生物钟基因的小鼠不再表现出感染时间与病情相关的差异, EAE 病情的临床进程也相似。Druzal 等<sup>[8]</sup>在一项分析中也发现 T 细胞中 BMAL1 的缺失会影响 EAE 的病情严重程度。

## 3 CLOCK 基因在 MS 发病机制上的作用

遗传水平上, CLOCK 基因型在某些人群中有患 MS 的倾向性。因 MS 患病率随地理纬度而变化, Lavtar 等<sup>[17]</sup>比较了 900 名白种人患者和 1024 名健康人的 8 个单链标记核苷酸多态性 (SNP) 的遗传特征, CLOCK 基因中 rs6811520 的 CC 基因型 MS 的发病风险显著增加。他们还发现患者和对照组的基因型分布有统计学差异, 但该结果只在女性患者中显著, 由此推测若存在 CLOCK 基因遗传变异, 则有患 MS 的风险。Fortier 等<sup>[19]</sup>研究表明 TCR 活性在抗原活化时表现出昼夜节律模式, 而在 CLOCK 突变小鼠这种活性效应变得迟钝, 同时他们还发现 T 细胞增殖需要 CLOCK 基因, 突变小鼠 T 细胞有丝分裂的敏感性下降。

#### 4 CRY 基因在 MS 发病机制上的作用

Narasimamurthy 等<sup>[20]</sup>在实验中观察到与 WT 小鼠相比,CRY1<sup>-/-</sup>及 CRY2<sup>-/-</sup>小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达明显增加,在 CRY1<sup>-/-</sup>和 CRY2<sup>-/-</sup>细胞中 NF- $\kappa$ B 和 PKA 的信号被激活,PKA 信号活性增加引起 S276 残基处 p65 磷酸化增强从而激活 NF- $\kappa$ B,而 NF- $\kappa$ B 信号是哺乳动物炎性反应的主要调节因子和整合因子之一。转录因子 p65 与 NF- $\kappa$ B 结合位点相结合,激活其靶基因,最终导致炎性细胞因子表达增加。基于这些数据,推测缺乏 CRY 蛋白可能会减少对 cAMP 产生的抑制作用,从而引起 cAMP 升高,pKa 活化增加,最终导致 PKA 的激活。S276 通过磷酸化 p65 激活 NF- $\kappa$ B。这些结果提示,缺乏 CRY 基因的免疫细胞通过某些固定的环路可增加炎症因子表达,进而提高慢性炎性疾病易感性<sup>[20]</sup>。Cao 等<sup>[21]</sup>的研究也与上文一致,CRY<sup>-/-</sup>小鼠 B 细胞发育节律被改变,导致血清 IgG 浓度、血清抗核抗体增高,更易于表现出自身免疫疾病,包括系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)和 MS。

#### 5 昼夜节律与 MS 的治疗

在过去的二十年中,免疫调节和免疫抑制治疗被广泛用于治疗 MS,主要一线药物包括  $\beta$  干扰素和醋酸格拉替雷等。几种免疫治疗方法已经开发或正在被评估用于减少 MS 复发、进展和残疾<sup>[22]</sup>。大量文献表明,褪黑素与免疫密切相关,被认为是一种可以调节免疫增强和抗炎平衡的缓冲剂<sup>[23,24]</sup>。Wataad 等<sup>[25]</sup>认为这种作用是通过调节 Th1/Th2 细胞的比例,促进 Th1 细胞因子的释放,从而具有免疫治疗潜力。同时有动物实验表明外源性褪黑素能增强免疫反应<sup>[26]</sup>。褪黑素的季节性模式也可影响多种生理过程,包括昼夜节律和免疫反应,Mauricio 等<sup>[3]</sup>在 EAE 模型小鼠中使用褪黑素治疗可改善疾病病情,并直接抑制人类和小鼠 T 细胞的分化,使 MS 活动性降低。每日注射褪黑素(5 mg/kg)能改善 EAE 的临床症状,脾脏、淋巴结和中枢神经系统中 Th17 细胞的频数下降,且 IL-17、IFN- $\gamma$  和 IL-17 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)CD4 T 细胞出现下降,因而,褪黑素可抑制对 Th17 细胞的应答,改善临床症状。国外研究临床上已有使用褪黑素作为溃疡性结肠炎的辅助治疗以逆转宏观和微观病变减轻炎症过程<sup>[27]</sup>,因此对于 MS 患者而言调节昼夜节律的相关药物

治疗值得关注。

#### 6 小结与展望

节律与免疫之间的关系近年来愈加获得关注。根据昼夜节律中核心生物钟基因 BMAL、ROR、NFIL3、CLOCK、PER 等对神经免疫性疾病的影响,免疫节律可以为临床制定更合理的治疗方案,以加强昼夜功能或时间的治疗靶向策略,从而减轻 MS 复发及其所致功能障碍。

#### 参 考 文 献

- [1] Labrecque N, Cermakian N. Circadian clocks in the immune system[J]. J Biol Rhythms, 2015, 30(4): 277-290.
- [2] Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, et al. Multiple sclerosis[J]. Lancet, 2018, 391(10130): 1622-1636.
- [3] Brodin P, Jojic V, Gao T, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences[J]. Cell, 2015, 160(1-2): 37-47.
- [4] Hedström AK, Åkerstedt T, Hillert J, et al. Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis[J]. Ann Neurol, 2011, 70(5): 733-741.
- [5] Farez MF, Mascalfroni ID, Yeste A, et al. Melatonin contributes to the seasonality of multiple sclerosis relapses[J]. Cell, 2015, 162(6): 1338-1352.
- [6] Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, et al. Circadian clock proteins and immunity[J]. Immunity, 2014, 40(2): 178-186.
- [7] Keller M, Mazuch J, Abraham U, et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(50): 21407-21412.
- [8] Druzd D, Matveeva O, Ince L, et al. Lymphocyte circadian clocks control lymph node trafficking and adaptive immune responses[J]. Immunity, 2017, 46(1): 120-132.
- [9] Druzd D, Matveeva O, Ince L, et al. Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans[J]. FASEB J, 2006, 20(12): 2174-2176.
- [10] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090): 235-238.
- [11] Yu X, Rollins D, Ruhn KA, et al. Th17 cell differentiation is regulated by the circadian clock[J]. Science, 2013, 342(6159): 727-730.
- [12] Solt LA, Kumar N, Nuhant P, et al. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand[J]. Nature, 2011, 472(7344): 491-494.
- [13] Damasceno A, Moraes AS, Farias A, et al. A spring to

- summer shift of pro-inflammatory cytokine production in multiple sclerosis patients[J]. J Neurol Sci, 2016, 360(1): 37-40.
- [14] Wang Y, Kuang Z, Yu X, et al. The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock[J]. Science, 2017, 357(6354): 912-916.
- [15] Motomura Y, Kitamura H, Hijikata A, et al. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells[J]. Nat Immunol, 2011, 12(5): 450-459.
- [16] Yin J, Zhang J, Lu Q. The role of basic leucine zipper transcription factor E4BP4 in the immune system and immune-mediated diseases[J]. Clin Immunol, 2017, 180(7): 5-10.
- [17] Lavtar P, Rudolf G, Maver A, et al. Association of circadian rhythm genes ARNTL/BMAL1 and CLOCK with multiple sclerosis[J]. PLOS ONE, 2018, 13(1): e0190601.
- [18] Sutton CE, Finlay CM, Raverdeau M, et al. Loss of the molecular clock in myeloid cells exacerbates T cell-mediated CNS autoimmune disease[J]. Nat Comm, 2017, 8(1): 1923.
- [19] Fortier EE, Rooney J, Dardente H. Circadian variation of the T cells to antigen[J]. J Immunol, 2011, 187(12): 6291-6300.
- [20] Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, et al. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines[J]. Proc Nat Acad Sci, 2012, 109(31): 12662.
- [21] Cao Q, Zhao X, Bai J, et al. Circadian clock cryptochrome proteins regulate autoimmunity[J]. Proc Nat Acad Sci, 2017, 114(47): 12548-12553.
- [22] Chen SJ, Wang YL, Fan HC, et al. Current status of the immunomodulation and immunomediated therapeutic strategies for multiple sclerosis[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012(2012): 1-16.
- [23] Liebmman PM, Wölfler A, Felsner P, et al. Melatonin and the immune system[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 112(3): 203-211.
- [24] Hardeland R, Cardinali DP, Brown GM, et al. Melatonin and brain inflammaging[J]. Prog Neurobiol, 2015, 127-128(1): 46-63.
- [25] Watad A, Azrielant S, Soriano A, et al. Association between seasonal factors and multiple sclerosis[J]. Eur J Epidemiol, 2016, 31(11): 1081-1089.
- [26] Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sánchez N, et al. Melatonin: Buffering the immune system[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(4): 8638-8683.
- [27] Esteban-Zubero E, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, et al. Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: A review[J]. Life Sci, 2017, 170(4): 72-81.

## TAR DNA 结合蛋白 43 在肌萎缩侧索硬化症中致病机制的研究进展

廖巧,卢可,袁姣,周瑾瑕 综述 毕方方 审校  
中南大学湘雅医院神经内科,湖南省长沙市 410008

**摘要:**肌萎缩侧索硬化症(ALS)是一种主要累及上、下运动神经元的神经系统退行性疾病。TAR DNA 结合蛋白 43(TDP-43)蛋白是大部分 ALS 患者中特征性的病理性聚集蛋白。TDP-43 蛋白致 ALS 的机制尚不明确,可归纳为以下两种假说:“功能缺失”和“功能获得”。相关机制有:①TDP-43 蛋白稳态与自噬密切相关;②TDP-43 蛋白与 RNA 结合,干扰 RNA 代谢,并与应激颗粒的形成密切相关;③TDP-43 蛋白聚集与线粒体功能障碍相互影响;④TDP-43 蛋白异常聚集影响细胞骨架结构,致轴突运输异常,并引起神经肌肉接头功能障碍;⑤外泌体能降解胞浆 TDP-43 蛋白聚集并促进其在细胞之间的扩散等。本文就 TDP-43 蛋白致 ALS 的机制的最新进展做一综述。

**关键词:**肌萎缩侧索硬化症;TAR DNA 结合蛋白 43;自噬;RNA 代谢

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.05.024

基金项目:国家自然科学基金项目(81571256;81760238)

收稿日期:2019-06-18;修回日期:2019-08-30

作者简介:廖巧(1994-),女,在读硕士研究生,主要从事神经变性疾病相关研究。

通信作者:毕方方(1977-),男,副主任医师,医学博士,硕士生导师,主要从事神经肌肉疾病及神经变性疾病相关研究。E-mail:fangfangbi@csu.edu.cn。