

· 实验研究 ·

诱导性调节 T 细胞的体外扩增及其对小鼠角膜移植免疫排斥的抑制作用

魏彤心 李光玲 郭旭明

【摘要】 背景 研究表明,CD4⁺CD25⁺自然调节性 T 细胞(nTregs)在维持外周免疫耐受及自身免疫平衡中起到重要作用,而体外诱导和扩增的诱导性调节性 T 细胞(iTregs)可通过过继转移的方式抑制器官移植的免疫排斥反应。目前 iTregs 的诱导方法仍在不断优化,且其对角膜移植的作用尚不明确。目的 研究 iTregs 的体外诱导和扩增方法,及其在体内对免疫排斥反应的抑制作用和体外对效应 T 细胞(Teffs)增生的抑制作用。方法 从 C57BL/6 小鼠股骨髓组织中提取和培养骨髓来源树突状细胞(BMDCs);取 BALB/c 小鼠脾脏,磁珠分选 CD4⁺CD25⁺ T 细胞和 CD4⁺CD25⁻ T 细胞,将 CD4⁺CD25⁻ T 细胞分为阴性对照组(单纯 CD4⁺CD25⁻ T 细胞)、CD3/28 抗体珠组(CD4⁺CD25⁻ T 细胞+抗鼠 CD3/28 抗体珠)、2.5 ng/ml 转化生长因子-β₁(TGF-β₁)诱导组和 10.0 ng/ml TGF-β₁诱导组。在不同质量浓度 TGF-β₁和抗 CD3/CD28 抗体珠(细胞和抗体珠比例为 1:1)条件下诱导 iTregs 的生成,并使用抗 CD3/CD28 抗体珠(细胞和抗体珠比例为 1:2)、白细胞介素-2(IL-2)和 TGF-β₁体外扩增 iTregs。采用流式细胞仪检测 Tregs 各表面因子的表达,采用混合淋巴细胞反应分析体外扩增 iTregs 对 Teffs 的抑制能力。建立同种异体小鼠角膜移植模型(C57BL/6→BALB/c),并将模型分为 nTregs 注射组、iTregs 注射组和 PBS 组;根据分组经小鼠对侧眼球后静脉丛分别注射 0.1 ml nTregs、体外扩增 iTregs 悬液和 PBS,观察注射后 3 个月小鼠植片情况。结果 阴性对照组、CD3/28 抗体珠组、2.5 ng/ml TGF-β₁诱导组和 10.0 ng/ml TGF-β₁诱导组中 CD4⁺CD25⁻ T 细胞表达 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的比例分别为(6±3)%、(91±4)%、(91±3)%和(86±6)%,其中 CD3/28 抗体珠组、2.5 ng/ml TGF-β₁诱导组和 10.0 ng/ml TGF-β₁诱导组 CD4⁺CD25⁺ T 细胞比例明显高于阴性对照组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。CD3/28 抗体珠组、2.5 ng/ml TGF-β₁和 10.0 ng/ml TGF-β₁诱导组 Foxp3⁺ T 细胞比例分别为(1.18±0.20)%、(8.70±1.80)%和(21.80±3.36)%,其中 2.5 ng/ml TGF-β₁诱导组和 10.0 ng/ml TGF-β₁诱导组 Foxp3⁺ T 细胞比例明显高于 CD3/28 抗体珠组,且 10.0 ng/ml TGF-β₁诱导组 Foxp3⁺ T 细胞比例明显高于 2.5 ng/ml TGF-β₁诱导组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。体外扩增 iTregs 中 CD69⁺ T 细胞比例明显低于 nTregs,PD-1⁺、Foxp3⁺和 CD25⁺ T 细胞比例均明显高于 nTregs,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。在 1:1、1:2、1:4、1:8 和 1:16 Tregs/Teffs 比例条件下,iTregs 与 Teffs 混合培养后 Teffs 的增生能力明显低于 nTregs 与 Teffs 混合培养组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。iTregs 注射组角膜植片存活时间为 4 周,永久耐受者占 50%,而 nTreg 组小鼠角膜植片的存活时间为 3 周,永久耐受者占 17%,2 个组比较差异有统计学意义(P<0.05)。结论 TGF-β₁可诱导 CD4⁺CD25⁻ T 细胞生成 iTregs 并高表达 Foxp3,体外扩增 iTregs 较 nTregs 具有更强的抑制淋巴细胞增生能力,从而抑制角膜移植排斥反应的发生。

【关键词】 CD4⁺ T 淋巴细胞/细胞学;调节性 T 细胞/药物作用;角膜移植/治疗;免疫耐受;动物模型;小鼠

In vitro-expansion of induced regulatory T cells and its inhibitory effects on corneal allograft rejection Wei

Tongxin, Li Guangling, Guo Xuming. Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China

Corresponding author: Guo Xuming, Email: guoxuming1124@163.com

【Abstract】 **Background** Researches showed that CD4⁺CD25⁺ natural regulatory T cells (nTregs) play an important role in maintaining peripheral immune tolerance, while immunotherapy using *in vitro*-expanded induced regulatory T cells (iTregs) suppresses allograft rejection in multiple organ transplantation. The inducing method of iTregs still needs to be optimized. Furthermore, the effect of iTregs on grafts of keratoplasty is unclear. **Objective**

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.007

作者单位:030002 太原,山西省眼科医院(魏彤心、李光玲);030009 太原市中心医院眼科(郭旭明)

通信作者:郭旭明,Email:guoxuming1124@163.com

This study was to investigate the inducing and expansion method of iTregs and explore its inhibitory effects on corneal allograft rejection. **Methods** Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were isolated from C57BL/6 mice femora and cultured. CD4⁺CD25⁺ T cells and CD4⁺CD25⁻ T cells were isolated from mouse spleen and separated using flow cytometry. The CD4⁺CD25⁻ T cells were divided into negative control group (CD4⁺CD25⁻ T cells), CD3/28 antibody bead group (CD4⁺CD25⁻ T cells+CD3/28 antibody bead), 2.5 ng/ml transforming growth factor (TGF)- β_1 induced group and 10.0 ng/ml TGF- β_1 induced group. The iTregs was formed after induction of different concentrations of TGF- β_1 and CD3/CD28 antibody bead (1:1). CD3/CD28 antibody bead (1:2), interleukin-2 (IL-2) and TGF- β_1 were used to expand iTregs. The phenotype and proliferation of iTregs were assayed by flow cytometry, and the inhibitory effect of iTregs on effector T cells (Teffs) was analyzed by mixed lymphocyte reaction. Allogenic keratoplasty model (C57BL/6→BALB/c) was build, and 0.1 ml iTregs or nTregs suspension or PBS was injected via posterior venous plexus of fellow eyes to assess the graft survival time. The use and care of the mice followed the ARVO statement. **Results** The CD4⁺CD25⁺ T cell proportions were (6±3)%, (91±4)%, (91±3)% and (86±6)% in the negative control group, CD3/CD28 antibody bead group, 2.5 ng/ml TGF- β_1 induced group and 10.0 ng/ml TGF- β_1 induced group, showing significant increases in the CD3/CD28 antibody bead group, 2.5 ng/ml TGF- β_1 induced group and 10.0 ng/ml TGF- β_1 induced group compared with the negative control group (all at $P < 0.01$). The Foxp3⁺ T cell proportions of the CD3/CD28 antibody bead group, 2.5 ng/ml TGF- β_1 induced group and 10.0 ng/ml TGF- β_1 induced group were (1.18±0.20)%, (8.70±1.80)% and (21.80±3.36)%, showing significant increases in the 2.5 ng/ml TGF- β_1 induced group and 10.0 ng/ml TGF- β_1 induced group compared with the CD3/CD28 antibody bead group (both at $P < 0.01$). Compared with the nTregs, the expression of CD69 was lower, and the expressions of PD-1 and Foxp3 were raised in the iTregs (all at $P < 0.01$). The proliferation of Teffs were decreased when cocultured with iTregs in comparison with nTregs at 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 Tregs/Teffs ratios (all at $P < 0.01$). The survival time of mouse corneal grafts was 4 weeks with the permanent tolerance of 50% in the iTregs injected group, which was superior to the 3 weeks survival time and 17% permanent tolerance in the nTregs injected group ($P < 0.05$). **Conclusions** TGF- β_1 can induce CD4⁺CD25⁻ T cells to form iTregs, which highly express Foxp3. iTregs show a stronger inhibitory effect on the growth of lymphocytes than nTregs, and therefore suppress the graft rejection after keratoplasty.

[Key words] CD4-positive T-lymphocytes/cytology; T-lymphocytes, regulatory/drug effects; Corneal transplantation/therapy; Immune tolerance; Disease model, animal; Mice

角膜盲是眼科主要可治疗盲之一, 穿透角膜移植术是目前主要的治疗方法。尽管角膜是器官移植的免疫赦免部位, 但同种异体免疫排斥反应仍然是角膜移植术失败的主要原因, 因此降低角膜移植术后免疫排斥反应, 达到角膜植片长期存活尤为重要。调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 是一类具有免疫负向调节作用的细胞总称, 表型为 CD4⁺CD25⁺, 其特异性标志物为 Foxp3, 其中自然调节性 T 细胞 (natural Tregs, nTregs) 在维持外周免疫耐受及自身免疫平衡方面发挥重要作用, 而体外诱导和扩增的诱导性 Tregs (induced Tregs, iTregs) 则起到加强和过继 nTregs 的作用。效应 T 细胞 (effector T cells, Teffs) 是一类具有免疫正向调节作用的细胞总称, 表型为 CD4⁺CD25⁻, Tregs 与 Teffs 间的平衡对于预防和控制自身免疫性疾病的发生和发展至关重要。研究显示, 将 BALB/c 小鼠来源的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞注射到 BALB/c 无胸腺裸鼠体内可引起裸鼠发生自身免疫性疾病^[1], 表明外周血和组织中胸腺来源的 nTregs 在啮齿动物和人类免疫耐受中起重要作用。多项研究已证实, Tregs 表面

可表达肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受体, 并表现出免疫相关调节功能^[2-4]。治疗自身免疫性疾病的理想方法并不是去除自身 Teffs, 而是减少其细胞数量, 尤其是病理性和记忆性 T 细胞, 更重要的是诱导和扩增 Tregs 细胞数量, 调节 Tregs 和 Teffs 之间的平衡。多种方式参与调节 Tregs 和 Teffs 之间的平衡, 如 CD3、CD4 和 CD40L 单克隆抗体治疗可以减少抗原特异性 T 细胞的数量而不影响 Tregs, 从而达到 Tregs 占主导的免疫状态; Akt-mTOR 通道抑制剂雷帕霉素可增加 Tregs 的 Foxp3 转录^[5]; 组蛋白去乙酰基酶抑制剂曲古霉素 A 可促进 Foxp3 的乙酰化, 从而促进 Foxp3⁺ Tregs 的扩增^[6]; 目前有多种方法可以生成 iTregs 以治疗自身免疫性疾病、过敏、炎性疾病和移植耐受等疾病^[7]。本研究中探讨 iTregs 的诱导过程及其对鼠角膜移植排斥反应的治疗作用, 为细胞疗法在临床上的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 6~8 周龄雄性 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠,由中国军事研究院提供。实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明,本研究经首都医科大学实验动物伦理委员会审核批准。

1.1.2 主要试剂及仪器 1640 培养液(美国 Gibco 公司);抗鼠 CD4-APC (RM4-5)、CD25-PerCP-Cy5.5 (PC61.5)、Foxp3-FITC (FJK-16s)、CD69-PE (MEL-14)、CD62L-PE (H1.2F3)、CD127-PE (A7R34) 抗体(美国 eBioscience 公司);CD4⁺CD25⁺ 细胞分选试剂盒(德国 Miltenyi Biotec 公司);抗鼠 CD3/28 抗体珠(美国 Invitrogen 公司);鼠白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、人转化生长因子-β₁(transforming growth factor-β₁, TGF-β₁)、鼠 TNF-α、鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、鼠 IL-4(美国 Peprotech 公司)。流式细胞仪(美国 BD 公司);Flowjo 7.6.1 软件(加拿大 Tree Star 公司)。

1.2 方法

1.2.1 C57BL/6 小鼠骨髓起源树突状细胞的培养

无菌条件下,麻醉并颈椎脱臼法处死 BALB/c 小鼠,剖取小鼠股骨和胫骨,2 ml 注射器针头穿透骨端,PBS 冲洗骨髓腔,收集冲洗液,200 目滤纸过滤,调整细胞密度至 1×10^6 /ml,加入含体积分数 20% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、10 ng/ml GM-CSF 和 10 ng/ml IL-4 的 1640 培养液,接种于 24 孔板。隔日换液,去除悬浮细胞,贴壁细胞即为骨髓起源的树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs),于培养后 7 d 吹打培养皿,收集 BMDCs,加入 10 ng/ml 鼠 TNF-α 继续培养 24 h,促进细胞成熟。收集细胞并计数。

1.2.2 CD4⁺CD25⁻ T 细胞和 CD4⁺CD25⁺ T 细胞分选

无菌操作下麻醉并颈椎脱臼法处死 BALB/c 小鼠,剖取小鼠脾脏,碾磨后用 200 目滤网过滤,按照 CD4⁺CD25⁺ T 细胞分选试剂盒操作说明书的方法分离 CD4⁺CD25⁺ T 细胞(即 nTregs)和 CD4⁺CD25⁻ T 细胞。

1.2.3 体外诱导 iTregs 的生成 取新鲜分离的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,加入含 20% FBS 的 1640 培养液中,加入抗鼠 CD3/28 抗体珠,使细胞和抗体珠的最终比例为 1:1,作为 CD3/28 抗体珠组;实验组在 CD3/28 抗体珠组基础上再分别加入 2.5 ng/ml TGF-β₁ 和 10.0 ng/ml TGF-β₁;以单纯 CD4⁺CD25⁻ T 细胞作为阴性对照,接种于 96 孔板,培养 48 h。

1.2.4 iTregs 的体外扩增 取 iTregs,计数并调整细胞密度为 1×10^6 /ml,加入抗鼠 CD3/28 抗体珠,细胞和抗体珠的最终比例为 1:2,加入 1 000 IU/ml(商品单位)鼠 IL-2 和终质量浓度为 2.5 ng/ml 的人 TGF-β₁。

将细胞接种于 96 孔板中,于培养后 7 d 收集细胞。

1.2.5 流式细胞仪检测 Tregs 中各因子阳性细胞比例 取 iTregs 进行 Foxp3、CD25 检测。取 nTregs 和体外扩增的 iTregs 进行 Foxp3、CD62L、CD69、PD-1、PD-L1、CD152、CD154、annexin-V、CD127 和 CD25 检测。取细胞悬液 100 μl,调整细胞密度至 1×10^6 /ml,按照试剂操作说明进行细胞表面染色和核内染色。实验重复 3 次,取其平均值。

1.2.6 流式细胞技术分析 iTregs 对 Teffs 增生的抑制能力 取新鲜分离的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞作为 Teffs,调整细胞密度为 $5 \times 10^7 \sim 7 \times 10^7$ /ml 至含 5% FBS 的 PBS 中,加入羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyl fluorescein diacetate succinimide ester, CFSE) 0.1 μl,迅速混匀,置于 37 °C 温箱中孵育 5 min,吸弃泡沫,600×g 离心 5 min,吸去多余 CFSE, PBS 漂洗,每次 5 min,共 3 次。调整细胞密度为 5×10^5 /ml,将供体小鼠 BMDCs 与 Teffs 按 1:1 混合,并加入含 20% FBS 的 1640 培养液中,作为对照组;实验组在对照组的基础上分别加入 nTregs 和体外扩增后的 iTregs,使 Tregs 和 Teffs 最终比例分别为 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16 和 1:32,每个比例平行设 3 个样本。培养后 72 h,流式细胞仪检测对照组和不同比例实验组中 Teffs 的荧光强度,并计算细胞增生抑制率。抑制率(%) = [(对照组荧光强度 - 实验组荧光强度) / 对照组荧光强度] × 100%。实验重复 3 次,取其平均值。

1.2.7 小鼠角膜移植模型的建立 取 30 只纯系 BALB/c 小鼠作为受体,取右眼制作直径 2.0 mm 角膜植床,15 只 C57BL/6 小鼠作为供体,制作直径 2.5 mm 角膜植片,用 11-0 缝线将植片与植床间断缝合 8 针。

1.2.8 nTregs 和体外扩增 iTregs 悬液注射后小鼠角膜植片的生存分析 将模型眼按照随机数字表法分为 nTregs 注射组、iTregs 注射组和 PBS 组,每组 5 只眼。小鼠同种异体角膜移植术后当天根据分组经小鼠对侧眼球后静脉丛分别注射 0.1 ml nTregs、体外扩增 iTregs 悬液和 PBS,细胞悬液均含细胞 1×10^6 /ml。术后每周裂隙灯显微镜下观察 2 次,至少观察 8 周,按照植片的混浊程度进行评分:0 分:角膜透明;1 分:混浊但可分辨虹膜纹理;2 分:无法分辨虹膜纹理;3 分:仍可见前房;4 分:无法分辨前房;5 分:角膜完全不透明。裂隙灯显微镜下角膜评分 ≥ 2 分定义为植片排斥,分析植片的生存率和生存时间。实验重复 2 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究测试指标的数据资料经 K-S 检验均呈正态分布,以

$\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Levene 检验方差齐。各组间 TGF- β_1 诱导后 CD4⁺CD25⁻ T 细胞表达 CD25⁺ T 细胞比例的差异及各组 Foxp3⁺ 细胞比例比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验; 体外扩增 iTregs 与 nTregs 间细胞表面分子表达的差异及其对 TefFs 增生抑制率的差异比较采用独立样本 *t* 检验。均采用双尾检测法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析小鼠同种异体角膜移植术后体外扩增 iTregs 与 nTregs 对植片生存的影响。

2 结果

2.1 各体外诱导 iTregs 组 CD4⁺CD25⁺ T 细胞比例的比较

流式细胞仪检测结果显示, 新鲜分离的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞 (阴性对照组) 中 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的比例为 (6±3)%, CD3/28 抗体珠组为 (91±4)%, 2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组为 (91±3)%, 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组为 (86±6)%, 各组间总体比较差异有统计学意义 ($P<0.01$), 其中 CD3/28 抗体珠组、2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组和 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组 CD4⁺CD25⁺ T 细胞比例明显高于阴性对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$)。CD3/28 抗体珠组、2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组和 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组间 CD4⁺CD25⁺ T 细胞比例的比较, 差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (图 1)。

2.2 各体外诱导 iTregs 组 Foxp3⁺ T 细胞比例的比较

CD3/28 抗体珠组 Foxp3⁺ T 细胞的比例为 (1.18±0.20)%, 2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组为 (8.70±1.80)%, 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组为 (21.80±3.36)%, 3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($P<0.01$), 其中 2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组和 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组 Foxp3⁺ T 细胞比例均明显高于 CD3/28 抗体珠组, 且 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组 Foxp3⁺ 细胞比例均明显高于 2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 2)。

2.3 体外扩增的 iTregs 和 nTregs 中各因子阳性细胞比例的比较

体外扩增的 iTregs 中 CD69⁺ T 细胞比例明显低于 nTregs, PD-1⁺、Foxp3⁺ 和 CD25⁺ T 细胞比例均明显高于 nTregs, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$); 体外扩增的 iTregs 和 nTregs 中 CD62L⁺、CD152⁺、CD127⁺、CD154⁺、PD-L1⁺、annexin-V⁺ T 细胞比例比较, 差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (图 3)。

2.4 Tregs 对 TefFs 的抑制率

体外混合 T 细胞培养表明, 随着 Tregs 比例的增加, TefFs 的抑制率逐渐增加; 在 1:1、1:2、1:4、1:8 以及 1:16 Tregs/TefFs 比例条件下, 体外扩增 iTregs 对 TefFs 的细胞增生抑制率明显高于 nTregs, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 4)。

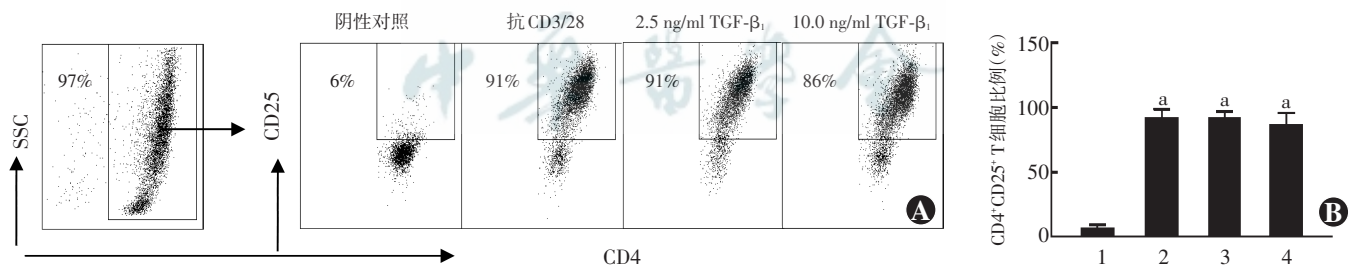


图 1 各体外诱导 iTregs 组 CD25⁺ T 细胞比例的比较 A: 流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺ T 细胞在抗 CD3/28 抗体珠、2.5 ng/ml TGF- β_1 和 10.0 ng/ml TGF- β_1 刺激下表达 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的比例 B: 各组间 CD25⁺ T 细胞比例的比较 与阴性对照组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) 1: 阴性对照组; 2: CD3/28 抗体珠组; 3: 2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组; 4: 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组 SSC: 侧向角散射; TGF: 转化生长因子

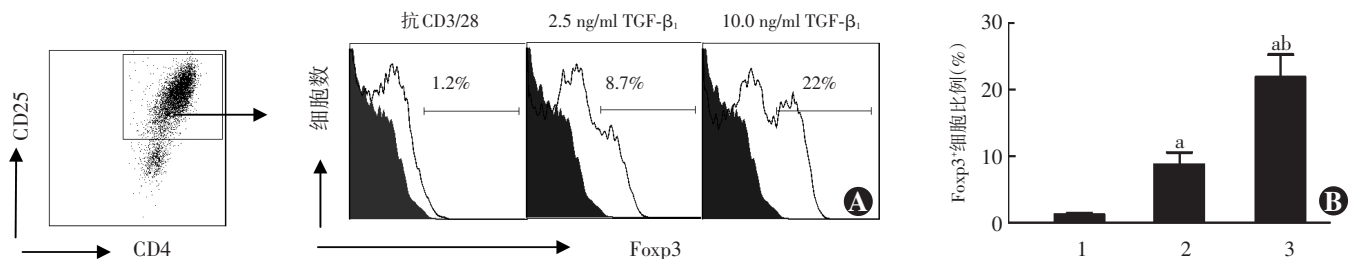


图 2 各体外诱导 iTregs 组 Foxp3⁺ T 细胞比例的比较 A: 流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺ T 细胞在 CD3/28 抗体珠、2.5 ng/ml TGF- β_1 和 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导后 Foxp3⁺ T 细胞比例 B: 各组 Foxp3⁺ 细胞比例的比较 与 CD3/28 抗体珠组比较, $^a P<0.01$; 与 2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组比较, $^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) 1: CD3/28 抗体珠组; 2: 2.5 ng/ml TGF- β_1 诱导组; 3: 10.0 ng/ml TGF- β_1 诱导组 TGF: 转化生长因子

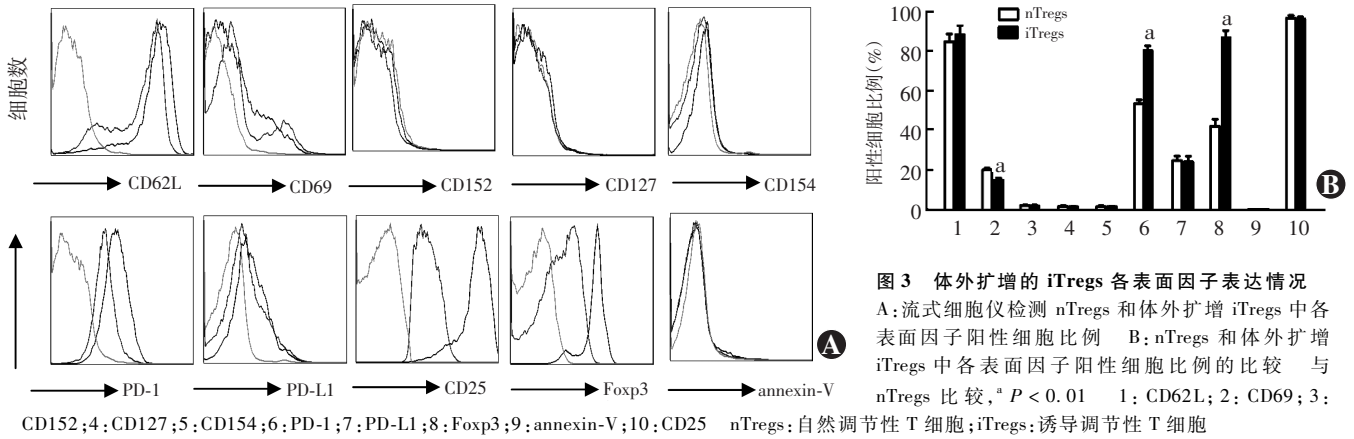


图3 体外扩增的 iTregs 各表面因子表达情况 A:流式细胞仪检测 nTregs 和体外扩增 iTregs 中各表面因子阳性细胞比例 B: nTregs 和体外扩增 iTregs 中各表面因子阳性细胞比例的比较 与 nTregs 比较, ^a $P < 0.01$ 1: CD62L; 2: CD69; 3: CD152; 4: CD127; 5: CD154; 6: PD-1; 7: PD-L1; 8: Foxp3; 9: annexin-V; 10: CD25 nTregs: 自然调节性 T 细胞; iTregs: 诱导调节性 T 细胞

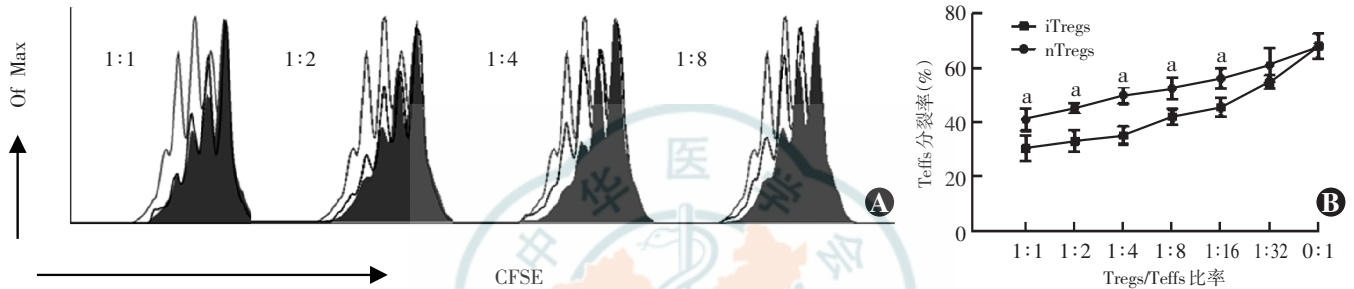


图4 体外扩增的 Tregs 的抑制能力 A:流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁻ T 细胞 CFSE 的稀释度 iTregs(灰色), nTregs(虚线), 对照组(实线) B: 不同 Tregs/Teffs 比例条件下 nTregs 和体外扩增 iTregs 对 Teffs 分裂率的比较 iTregs 组对 Teffs 的抑制率均明显高于 nTregs 组(与 nTregs 比较, ^a $P < 0.01$) (独立样本 t 检验) CFSE: 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂; Teffs: 效应 T 细胞; iTregs: 诱导调节性 T 细胞; nTregs: 自然调节性 T 细胞

2.5 Tregs 注射后 BALB/c 小鼠角膜植片的生存分析

PBS 组小鼠眼角膜植片存活时间为 2.8 周, 永久耐受者占 20%; nTregs 注射组小鼠眼植片存活时间为 3 周, 永久耐受者占 17%; iTregs 注射组小鼠眼植片存活时间为 4 周, 永久耐受者占 50%。iTregs 注射组、nTregs 注射组和 PBS 组小鼠角膜植片的生存率比较差异有统计学意义 ($P = 0.041$), 其中 iTregs 注射组角膜植片生存时间最长, 生存率最高, 植片生存时间明显长于 nTregs 注射组和 PBS 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 而 nTregs 注射组与 PBS 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。

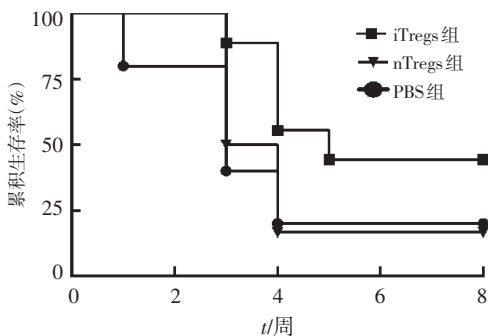


图5 各组小鼠角膜移植术后植片生存曲线分析 iTregs 注射组、nTregs 注射组和 PBS 组小鼠角膜植片的生存曲线比较差异有统计学意义 ($P = 0.041$), 其中 iTregs 注射组植片生存时间明显长于 nTregs 注射组和 PBS 组 ($P < 0.05$); 而 nTregs 注射组与 PBS 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (Kaplan-Meier 分析, $n = 5$) iTregs: 诱导调节性 T 细胞; nTregs: 自然调节性 T 细胞

3 讨论

如何利用 Tregs 诱导移植物耐受的同时而不抑制正常免疫系统对外来微生物的免疫反应是 Tregs 治疗的成败关键。Tregs 仅占正常人外周血 CD4⁺ T 细胞的 5% ~ 10%, 有限的细胞数量和分离难度也是临床应用的一大障碍^[8-10]。由于 Tregs 对于抗原刺激的无反应性, 自身抗原限制性也是目前难以解决的问题^[11-12]。目前有很多研究介绍了如何体外扩增 Tregs, 以及应用 Tregs 在实验用小鼠移植物抗宿主病、炎症肠病和器官移植模型中, 并获得较好的效果^[13-17]。Tregs 在调节自身免疫稳态和移植物耐受中的作用仍存在较多问题。目前, 比较公认的 Tregs 介导免疫抑制的机制包括诱导 T 细胞的无反应性^[18]、传染性耐受和直接抑制 Teffs 活性^[19-21], 其中, 传染性耐受是指 Tregs 通过诱导其他 Tregs 的形成来发挥作用, 也是目前相关领域的研究热点。

对于角膜移植免疫排斥反应, 较公认的学说是辅助性 T 细胞 1 介导的间接抗原识别通路, 控制宿主 CD4⁺ T 细胞是达到诱导移植植片存活的关键。Ikemoto 等^[22] 研究显示, 过继转移 nTregs 可以诱导移植角膜植片的长期存活。本研究中结果显示, nTregs 与对照组比较并不能提高植片的存活率, 分析其可能

由于 nTregs 对抗原的无反应性。另一方面,本研究中虽然证实了 nTregs 在体外的抑制能力,但是同样观察到 nTregs 中 Foxp3 表达较低。Foxp3 的稳定表达与 Tregs 的功能密切相关,本研究中利用 TGF- β_1 诱导 Tregs 体外扩增,一方面维持了 Foxp3 表达的稳定性,另一方面激活 Tregs,使其表现出对免疫反应较强的抑制能力。本研究证实体外扩增 iTregs 表达高水平的 Foxp3,并在体外和体内均证明有较好的抑制能力,因此推断 Foxp3 的表达水平决定了 Tregs 的体外和体内抑制功能。此外,本研究中验证了 Tregs 过继转移从而诱导传染性耐受是抑制角膜移植排斥的机制,而这种耐受的维系主要来源于子代 Tregs 的作用,因为角膜移植排斥的发生一般在 1 个月左右,而 T 细胞的寿命在 2 周左右。

综上所述,目前临床上解决移植排斥存在 2 个方面的难题,一是无法有效地控制记忆性 T 细胞对移植物的攻击,另一个是免疫抑制剂带来的不良反应,如现在广泛应用的免疫抑制剂可导致机体免疫力低下。诱导移植耐受最佳的治疗结果是既抑制 Tregs 对移植物的攻击,又维持正常免疫反应对有害抗原的攻击。本研究中尚未能证明扩增后的 iTregs 是否具有抗原特异性,且未考察角膜移植排斥反应的强弱与不同背景鼠系的关系。如何改造 Tregs 使之发挥特异性保护作用将是未来研究的方向。

参考文献

- [1] Sakaguchi S, Ono M, Setoquchi R, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease[J]. *Immunol Rev*, 2006, 212 : 8 - 27. doi: 10. 1111/j. 0105-2896. 2006. 00427. x.
- [2] Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4⁺ regulatory cells as a potential immunotherapy [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1461) : 1647-1661. doi: 10. 1098/rstb. 2005. 1695.
- [3] Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, et al. Regulatory CD25⁺ T cells in human kidney transplant recipients [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(6) : 1643-1651. doi: 10. 1097/01. ASN. 0000057540. 98231. C1.
- [4] Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, et al. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome [J]. *Transplantation*, 2004, 77(5) : 762-766.
- [5] Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25^{hi}CD4⁺ T cells/ Foxp3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance [J]. *Transplantation*, 2006, 81(3) : 398-407. doi: 10. 1097/01. tp. 0000203166. 44968. 86.
- [6] Nishimura E, Sakihama T, Setoquchi R, et al. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells [J]. *Int Immunol*, 2004, 16(8) : 1189 - 1201. doi: 10. 1093/intimm/dxh122.
- [7] Tang Q, Henriken K, Bluestone J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(11) : 1455-1465. doi: 10. 1084/jem. 20040139.
- [8] Yamazaki S, Patel M, Steinman R, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 : 2758-2763. doi: 10. 1073/pnas. 0510606103.
- [9] Joffre O, Santolaria T, Van Meerwijk JP, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes [J]. *Nat Med*, 2008, 14(1) : 88 - 92. doi: 10. 1038/nm1688.
- [10] Taylor PA, Lees C, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺ CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality [J]. *Blood*, 2002, 99(10) : 3493-3499.
- [11] Xia G, Kovochich M, Truitt RL, et al. Tracking ex vivo-expanded CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ CD25⁺ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease [J]. *Bio Blood Marrow Transplant*, 2004, 10(11) : 748-760.
- [12] Xia G, He J, Leventhal JR. Ex vivo-expanded natural CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells synergize with host T-cell depletion to promote long-term survival of allograft [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(2) : 298-306. doi: 10. 1111/j. 1600-6143. 2007. 02088. x.
- [13] Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell function are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression [J]. *Nature*, 2007, 445(7129) : 766-770. doi: 10. 1038/nature05479.
- [14] Chai JG, Coe D, Scott D, et al. In vitro expansion improves in vivo regulation by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2008, 180(2) : 858-869. doi: 10. 4049/jimmunol. 180. 2. 858.
- [15] Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance [J]. *Diabetes*, 2006, 55(1) : 40-49. doi: 10. 2337/diabetes. 55. 01. 06. db05-0613.
- [16] Zhai Y, Shen XD, Kupiec-Weqlinski JW, et al. T cell subsets and in vitro immune regulation in "infectious" transplantation tolerance [J]. *J Immunol*, 2009, 167(9) : 4814-4820. doi: 10. 4049/jimmunol. 167. 9. 4814.
- [17] Andersson J, Tran D, Shevach E, et al. CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(9) : 1975-1981. doi: 10. 1084/jem. 20080308.
- [18] Benghiat FS, Graca L, Braun MY, et al. Critical influence of natural regulatory CD25⁺ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression [J]. *Transplantation*, 2005, 79(6) : 648-654.
- [19] Schenk S, Kish DD, He C, et al. Alloreactive T cell responses and acute rejection of single class II MHC-disparate heart allografts are under strict regulation by CD4⁺CD25⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 2005, 174(6) : 3741-3748. doi: 10. 4049/jimmunol. 174. 6. 3741.
- [20] Sanchez-Fueyo A, Sandner S, Habicht A, et al. Specificity of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function in alloimmunity [J]. *J Immunol*, 2006, 176(1) : 329-334. doi: 10. 4049/jimmunol. 176. 1. 329.
- [21] Jiang X, Morita M, Sugioka A, et al. The importance of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in mouse hepatic allograft tolerance [J]. *Live Transpl*, 2006, 12(7) : 1112-1118. doi: 10. 1002/lt. 20787.
- [22] Ikemoto T, Tashiro S, Yasutomo K, et al. Donor-specific tolerance induced by simultaneous allogeneic islet transplantation with CD4⁺ CD25⁺ T cells into hepatic parenchyma in mice [J]. *J Med Invest*, 2004, 51(3-4) : 178-185.

(收稿日期: 2015-05-17)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)