

调节性 T 细胞在缺血性脑卒中的作用

王启荣 何小明 卢祖能

【中图分类号】 R743.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2017)06-0568-04
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.06.027

Treg 细胞(Regulatory T cells, 调节性 T 细胞)在缺血性脑卒中炎性反应中起着重要作用,Treg 细胞缺乏与功能低下是脑卒中炎性进展的重要原因,它能分泌抗炎因子,并且促进神经损伤修复,近来研究显示 Treg 细胞有治疗缺血性脑卒中的潜力。因而,进一步研究 Treg 细胞在缺血性脑卒中的作用具有重要意义。

缺血性脑卒中是指由于脑的供血动脉狭窄或闭塞、脑血

栓形成等脑局部血液循环障碍所导致的神经功能缺损综合征,患者多伴有脑局部组织不可逆的损害,导致脑组织缺血和缺氧性坏死。缺血性脑卒中多为急性起病,症状持续时间至少 24 h,发病后 T 细胞在缺血组织内的作用正逐渐被认识,在尸检中发现 T 细胞主要出现在梗死区,且在缺血后几小时内出现,T 细胞渗入的程度以及其他免疫细胞在不同的缺血性脑卒中模型中各有不同的特点和规律^[1]。当前使用的大鼠大脑中动脉供血区梗死模型显示 CD8 + T 淋巴细胞能在缺血性脑卒中后 3 h 被组织释放的趋化因子所聚集,而 CD4 + T 淋巴细胞和 NKT 细胞(natural killer T cell,自然杀伤性 T 细胞)发生在 24 h 内^[2],其他大鼠模型显示 T 淋巴细

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[王启荣 何小明(通信作者,现工作于襄阳市中心医院神经内科) 卢祖能(通信作者)]

胞和 NKT 细胞聚集发生在发作后 3~4 d^[3],而 Treg 细胞在很多脑卒中模型中聚集与增殖反应可以一直持续到 30 d^[4]。其他研究也证实内源性 Treg 细胞在急性大脑损伤触发的炎症反应中起着重要作用。现就 Treg 与缺血性脑卒中的关系做如下综述。

1 Treg 的基本特性

Treg 细胞属于抑制性 T 细胞的其中一个亚群,以细胞表面 CD4 和 CD25 共表达为特征,且表达转录因子 FOXP3 (Forkhead Box P3),Treg 自身主要又分为 2 个亚群:自然发生的胸腺来源的天然 Treg 和由二级淋巴器官成熟 T 淋巴细胞所诱导产生的获得性 Treg,用来对抗原暴露作出反应。Treg 的基本功能是抑制其他免疫细胞(尤其是效应 T 淋巴细胞)的增殖和活化^[3]。Treg 细胞的缺乏和功能低下是人类自身免疫性疾病的主要原因,大脑缺血大鼠和大脑出血大鼠模型中 Treg 的选择性抑制作用限制了损伤组织诱发的炎症反应所造成的损害^[5]。

2 缺血性脑卒中模型中的 Treg

采用大脑中动脉闭塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)可以观察到 Treg 渗透到缺血脑组织的动力学和量级特征。在此之前的实验模型主要关注于天然 Treg 细胞。有的课题组通过研究短期 MCAO 模型中的大脑匀浆流式细胞计数来系统分析大脑组织中的各淋巴细胞亚群,该研究表明少量 CD25 + FOXP3 + Treg 细胞在短暂脑缺血后 1 周被观察到^[6]。而采用末梢永恒的 MCAO 模型在脑缺血后 1 周可在缺血半球检测到大量的 T 细胞和 Treg 计数上调,并且 Foxp3 + Treg 细胞的比例达到 CD4 + T 细胞总数的 20%^[3]。可以看出,末梢永恒的闭塞诱导了强烈的神经炎症反应,因而 T 细胞计数会提高。

用 Treg 种系缺失消耗的方法来研究实验性脑卒中 Treg 的功能作用是另一种常用的研究模式。使用 Treg 消耗范例,约 50% 的实验表现出梗死体积的增加^[7],然而另一半实验没有观察到 Treg 细胞对于改善脑卒中预后的任何效应^[8],有 1 个研究甚至观察到 Treg 缺陷大鼠中脑梗死面积的减少^[9]。这个差异触发了关于 Treg 在缺血性脑卒中中生物作用的深度讨论,引出了 Treg 在急性大脑损伤中发挥“双面剑”作用的理论。这种不一致不能归因于使用不同的消耗范例,因为转基因鼠模型被用于“功能频谱”的各方面^[10]。Treg 消耗对大脑缺血后神经炎症反应在免疫学方面的影响在已发表的研究中多有报道,都观察到在 Treg 消耗后缺血性脑卒中结局的恶化,同时也观察到大脑组织中促炎性淋巴细胞迁移的增加以及促炎性细胞因子分泌的上调^[11]。

3 Treg 对缺血性脑卒中的影响

实验性缺血性脑卒中后亚急性时期连续检测和观察显示,细胞免疫抑制和脾脏萎缩伴随着脾脏和血液中 Treg 计数的相对增加^[12]。近期研究显示,Treg 的过继性疗法减少了缺血性脑卒中早期的系统炎症反应,同时也减弱了脑损伤

后亚急性期的免疫抑制程度^[13]。Treg 强有力的稳态功能可能帮助抑制最初的系统炎症,因而减弱后来的免疫失衡,例如活性诱导的淋巴减少症和抗原呈递细胞消耗。

Treg 细胞在活体发挥免疫稳态效应的重要机制是抗炎因子的分泌[如 IL-10(interleukine 10, 白介素 10)、TGF- β (Transforming Growth Factor β , 转化生长因子 β)],跨膜免疫抑制分子的分泌[如 CTLA-4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, 细胞毒 T 细胞相关抗原)、CD39(clusters of differentiation 39, 白细胞分化抗原 39)]及溶细胞分子的分泌(如颗粒酶和穿孔素)^[14]。有研究显示,在实验性脑缺血中 IL-10 是重要的缺血性脑卒中前神经炎症调节细胞因子,增加淋巴细胞的分泌功能或调节 IL-10 水平能显著改善缺血性脑卒中的预后^[15];并且活性 Treg 细胞通过 IL-10 促进神经干细胞的增殖,从而达到神经修复的作用,而 IL-10 抑制物阻止 Treg 细胞的促神经干细胞增殖的作用^[16]。在 PD-1/PD-L1 共抑制通路中 Treg 也起着重要作用,PD-1 的免疫调控功能起到限制着大脑缺血损害程度和保护血脑屏障的作用;相比之下,PD-L1 在缺血性脑卒中病程中则表现为损害作用。这种矛盾是由于(1)PD-1 也表达于免疫抑制细胞表面,从而被 PD-Ls 选择性抑制,并且封闭 PD-Ls 增加损伤大脑半球再灌注 96h 后的 Treg 水平,从而减少脑梗死面积和神经损伤指数,改善预后^[17];(2)PD-Ls 可选择的受体(如 CD80)可能只有在脑缺血后急性炎症的条件下才表现出 T 细胞激活的效应。在缺血性脑卒中的晚期阶段 Treg 的效应与脑组织中促炎性 T 淋巴细胞入侵的减少相关^[18],其他效应还包括 T 细胞增殖的抑制以及促炎性细胞因子产生的下调。

最近研究显示 Treg 能促进神经系统损伤后的修复,其对神经损伤的修复可能与细胞上整合素 $\alpha 4$ 的封锁有关,且在临床前多中心实验中得到证实,封锁整合素 $\alpha 4$ 显著减少 MCAO 后 5 d 外周 T 淋巴细胞的入侵^[19]。更有研究发现 Treg 通过分泌 IL-10、TGF- β 促进缺血大脑 M₂ 神经胶质细胞(小神经胶质细胞的 M₂ 型,通过摄取谷氨酰胺、转移细胞碎片、产生神经营养因子起着神经保护作用)的活性,保护免受大脑损伤,同时 M₂ 神经胶质细胞也能通过 IL-10、TGF- β 促使 Treg 分化,起着抗炎作用,减少缺血大脑梗死面积。故 M₂ 神经胶质细胞和 Treg 细胞相互作用起着抗炎效应,提供再生和修复环境,促进脑缺血后的大脑修复^[20]。此外,过量的 Treg 细胞也将产生损害作用,Kleinschmitz^[9]等发现在小鼠脑卒中模型中选择性消除 Treg 反而减少了脑卒中后 24 h 的脑梗死面积,且改善了神经缺损功能。

Lietal 等观察到在缺血性脑卒中患者中外周血循环 Treg 细胞会显著减少^[21],已发表的临床数据也支持该观点。此外,其他研究也证实缺血性脑卒中后外周组织存在大量免疫中介物,包括 Treg 在内的各 T 细胞亚群。但是这些特异性的改变也因缺血性脑卒中的本身严重性以及患者的特性而不同。

可见 Treg 对缺血性脑损伤的预后及修复有着重要影响,其应用潜力有待进一步的实验来发掘。

4 Treg 的治疗作用

尽管细胞消耗研究存在有争议的结论,利用 Treg 治疗缺血性脑卒中中仍然大有潜力,临床研究表明缺血性脑卒中发病急性期就出现外周循环 Treg 数目急剧减少,并为 Treg 能否有效的治疗缺血性脑卒中这项争论提供了有力的理论基础^[22]。

截至目前,缺血性脑卒中动物模型的研究也表明提高 Treg 的数目和功能能保护实验动物免受缺血脑损伤。最新的研究表明,缺血性脑卒中模型中过继性 Treg 治疗具有神经保护作用,表现出脑卒中大鼠模型的急性保护和促进长期修复^[18]。最有意义的是 Treg 相关的治疗窗可被推迟到缺血开始后 24 h,使得临床上错过治疗窗的患者也能够获益。Treg 细胞可通过下调外周免疫细胞的有害活动而发挥 CNS 保护作用,Treg 可在脑卒中后 5 d 左右进入缺血大脑,进一步在大脑中发挥免疫调节或促修复作用^[23]。另有研究使用 CD28 超兴奋单克隆抗体处理大脑动脉闭塞后 3~6 h 的 C57BL6 小鼠,3~7 d 检测发现脾脏和大脑中 Treg 的数目增加,并且脑梗死面积减少,缺血性脑卒中后 7 d 的功能缺失减轻^[24]。这些研究为临床脑卒中的 Treg 治疗发展提供了新的希望。

虽然缺血性脑卒中动物模型中存在以 Treg 为目标的免疫治疗的有效性证据,但是在临床应用中仍需要考虑 Treg 治疗的潜在风险。首先需要考虑的是 Treg 可能恶化缺血性脑卒中后免疫抑制,因此增加感染伴随疾病或癌症的风险。该风险已在动物模型中有过深入研究,表明获得性 Treg 治疗并没有恶化缺血性脑卒中后免疫抑制^[13]。Treg 治疗帮助维持缺血性脑卒中后外周血和脾脏中淋巴细胞种群的稳态,抑制了细胞免疫和脾脏萎缩的发生,减少缺血性脑卒中后感染的风险,然而患者脑卒中后 Treg 治疗的效果仍需要仔细考虑。

缺血性脑卒中后免疫反应的调节将成为限制缺血大脑损伤和促进大脑恢复的有效策略,研究证实了 Treg 可作为脑卒中免疫细胞治疗的良好靶标。但是目前还需要进一步的研究使得 Treg 的脑卒中治疗最终成功应用于临床。

5 结束语

综上所述,Treg 在缺血性脑卒中病变发展过程中发挥了重要作用。Treg 体内免疫机制涉及到局部微环境、诸多炎性细胞、炎性因子网络,目前尚不明确,甚至出现分歧。对于缺血性脑卒中与 Treg 的关系需要进一步的探讨,这些研究可以对缺血性脑卒中的病理过程有更深入的认识,并为疾病的治疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Zhou W, Liesz A, Bauer H, et al. Postischemic brain infiltration of leukocyte subpopulations differs among murine permanent and transient focal cerebral ischemia models[J]. Brain Pathol, 2013, 23(1): 34-44.
- [2] Chu HX, Kim HA, Lee S, et al. Immune cell infiltration in ma-

lignant middle cerebral artery infarction: comparison with transient cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34(3): 450-459.

- [3] Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke[J]. Nat Med, 2009, 15(2): 192-199.
- [4] Stubbe T, Ebner F, Richter D, et al. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(1): 37-47.
- [5] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 1995[J]. J Immunol, 2011, 186(7): 3808-3821.
- [6] Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke[J]. Stroke, 2009, 40(5): 1849-1857.
- [7] Llovera G, Hofmann K, Roth S, et al. Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT): Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(299): 299ra121.
- [8] Liesz A, Zhou W, Na SY, et al. Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke[J]. J Neurosci, 2013, 33(44): 17350-17362.
- [9] Kleinschnitz C, Kraft P, Dreykluft A, et al. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature[J]. Blood, 2013, 121(4): 679-691.
- [10] Liesz A, Hu X, Kleinschnitz C, et al. Functional role of regulatory lymphocytes in stroke: facts and controversies [J]. Stroke, 2015, 46(5): 1422-1430.
- [11] Xie L, Sun F, Wang J, et al. mTOR signaling inhibition modulates macrophage/microglia-mediated neuroinflammation and secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia[J]. J Immunol, 2014, 192(12): 6009-6019.
- [12] Liesz A, Hagmann S, Zschoche C, et al. The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation [J]. Stroke, 2009, 40(8): 2849-2858.
- [13] Li P, Mao L, Zhou G, et al. Adoptive regulatory T-cell therapy preserves systemic immune homeostasis after cerebral ischemia [J]. Stroke, 2013, 44(12): 3509-3515.
- [14] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, FOXP3(+) regulatory T cells in the human immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(7): 490-500.
- [15] Bodhankar S, Chen Y, Vandenbark AA, et al. IL-10-producing B-cells limit CNS inflammation and infarct volume in experimental stroke[J]. Metab Brain Dis, 2013, 28(3): 375-386.
- [16] Wang, J. Activated regulatory T cell regulates neural stem cell proliferation in the subventricular zone of normal and ischemic mouse brain through interleukin 10[Z], 2015: 361.
- [17] Bodhankar S, Chen Y, Lapato A, et al. PD-L1 monoclonal antibody treats ischemic stroke by controlling central nervous system inflammation[J]. Stroke, 2015, 46(10): 2926-2934.

- [18] Li P, Gan Y, Sun BL, et al. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia[J]. *Ann Neurol*, 2013, 74(3):458-471.
- [19] Langhauser, F. Blocking of alpha4 integrin does not protect from acute ischemic stroke in mice[J]. *Stroke*, 2014, 45(6):1799-1806.
- [20] Wang SZ, Y. Xu, crosstalk between microglia and T cells contributes to brain damage and recovery after ischemic stroke [J]. *Neurol Res*, 2016, 38(6):495-503.
- [21] Li Q, Wang Y, Yu F, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(6):1015-1027.
- [22] Yan J, Greer JM, Etherington K, et al. Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke[J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 206(1/2):112-117.
- [23] Li P, Mao L, Liu X, et al. Essential role of program death 1-ligand 1 in regulatory T-cell-afforded protection against blood-brain barrier damage after stroke[J]. *Stroke*, 2014, 45(3):857-864.
- [24] Na SY, Mracsko E, Liesz A, et al. Amplification of regulatory T cells using a CD28 superagonist reduces brain damage after ischemic stroke in mice[J]. *Stroke*, 2015, 46(1):212-220.

(2017-02-19 收稿)