

CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在抗心脏移植血管病中的研究进展

孙来龙, 张松林[△]

三峡大学第一临床医学院、湖北省宜昌市中心人民医院胸心大血管外科(443002)

DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2016.14.038

心脏移植是终末期心脏病最有效的治疗手段,但移植术后多种并发症限制供心的长期存活;移植失败和感染是前3年内移植患者的主要死因,移植3年后心脏移植血管病(cardiac allograft vasculopathy, CAV)即成为患者最主要的死因^[1-2]。免疫因素和非免疫因素共同参与CAV的发生和进展,免疫因素在CAV发生及发展中占重要地位^[3];非免疫因素也参与CAV的发生与进展^[4],主要包括心血管危险因素,如吸烟、高血压、糖尿病、血脂异常、冠状动脉疾病史等。免疫和非免疫因素介导的内皮损伤被认为与CAV的发生及发展紧密相关^[5]。CAV形态学改变主要包括血管内膜的纤维肌性增生、动脉粥样硬化、脉管炎等^[6-7]。其中最具有特征性、最常见的损害是血管内膜同心圆的纤维肌性增生,血管内膜的不断增生导致冠状动脉腔内堵塞、局部缺血损伤,最终导致心功能不全。CAV常表现为隐匿性进展,临床上患者一旦被诊断出CAV时大多处于较严重的阶段^[5,8],突发的心源性猝死可能是CAV的首发表现^[9]。而且一旦CAV确诊后,血管成形术或者冠状动脉旁路移植术都是姑息性治疗,确切的治疗该疾病需要再次心脏移植。免疫抑制剂可以相对延缓CAV的进展,但免疫抑制治疗非特异性地抑制了所有的免疫应答,效果有限还易诱发感染和恶性肿瘤。如何诱导移植心脏免疫耐受,减少甚至摒弃传统的免疫抑制治疗,成为心脏移植领域研究的关键。现对CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺Tregs)抗CAV发生与进展的研究作一综述。

1 移植免疫耐受及其诱导方法

免疫耐受是免疫活性细胞接触抗原物质后的免疫抑制状态。在这种状态下,对抗原特异性应答的T细胞、B细胞在抗原物质的刺激下不被激活,不产生特异性效应细胞及特异性抗体,不引起免疫反应,而其他的正常免疫功能不受影响。同种异体心脏移植后,免疫应答始于供体主要组织相容性分子的同种识别,使T细胞、B细胞激活而产生对移植物的慢性免疫排斥^[5]。阻断抗原识别或活化过程中的任何环节,有望诱导免疫耐受。免疫耐受包括中央型耐受和外周型耐受。前者是在中枢免疫器官内,T细胞和B细胞在尚未发育成熟前,即被清除或诱导为无反应性状态;后者是在外周免疫器官内,阻断成熟T细胞的激活,调节成熟T细胞表面的生长因子受体来促进其凋亡,从而达到免疫耐受的目的。免疫耐受的机制主要包括:特异性T细胞克隆的清除、特异性T细胞克隆无反应、产生免疫抑制细胞或因子。近年来,

多种诱导移植免疫耐受的方法都有大量研究,也各有利弊,但诱导受体产生免疫抑制细胞或因子来维持移植耐受的研究较为广泛,其中,CD4⁺CD25⁺Tregs的作用越来越受到研究者的重视,其在免疫耐受维持中的地位不可替代。大量的动物移植模型已经证实,CD4⁺CD25⁺Tregs在抑制排斥反应、维持移植免疫耐受中发挥着至关重要的作用^[10-11]。

2 CD4⁺CD25⁺Tregs概述

根据CD4⁺T细胞表面分子CD25表达的不同,可将其分为CD4⁺CD25⁻效应性T细胞(Teff)和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(Treg)。活化后的Teff促进免疫反应,而Treg抑制免疫反应。Treg可分为天然调节性T细胞(nTreg)和获得性调节性T细胞(iTreg),是一类可以调节多种免疫细胞功能的T细胞亚型,其主要功能是抑制其他T细胞的活化,发挥免疫抑制及诱导免疫耐受作用。Tregs可操控各种不同免疫应答,其中又以天然的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺表型的Tregs最为重要。Foxp3(Forkhead box protein P3)是一种叉头状转录因子,2001年首次被报道,随后,Wildin等^[12]和Bennett等^[13]提出人类Foxp3基因与小鼠Foxp3基因具有同源性。Foxp3是小鼠和人类nTreg细胞的特异性形态和功能标记,该基因位于X染色体上,对调节性T细胞的分化起到重要作用,决定着Treg的发育和功能。利用基因转染技术将Foxp3基因导入CD4⁺CD25⁺T细胞,使获得足够量与nTreg表型相似且调节能力相当的iTreg成为可能。

CD4⁺CD25⁺Tregs的免疫抑制功能具有高度的通用性,可以控制各种免疫细胞应答,包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、B细胞和不同的抗原提呈细胞^[14]。而且,CD4⁺CD25⁺Treg有多种不同的免疫抑制机制,可以根据组织微环境的不同而采取不同的免疫抑制策略^[15-16]。CD4⁺CD25⁺Tregs因其强大的免疫抑制能力在器官移植领域引起了广泛的关注,有研究发现CD4⁺CD25⁺Tregs在抑制移植排斥反应中发挥重要作用,其在肾移植^[17-18]、肝移植^[19-20]中均已被证实可以调节供体特异性无应答。在大量动物心脏移植模型中的研究表明,CD4⁺CD25⁺Tregs可发挥抗CAV、延长移植心脏存活时间的作用^[21-22]。

3 CD4⁺CD25⁺Tregs对NK细胞的调控作用

NK细胞是机体非特异性免疫系统的重要组成部分,其表面不表达特异性抗原识别受体,在病原体入侵的早期,NK细胞即可发挥免疫效应。已有研究证实,NK细胞在CAV的发生和发展中扮演着重要的角色^[23-25]。心脏移植后早期,NK细胞即被激活,激活后可作为效应细胞直接损伤移植,也可以通过细胞间交互关系或者分泌细胞因子及趋化因子

[△]通信作者。博士,硕士研究生导师,副主任医师; E-mail: zhangsonglin1101@sina.com

来诱导其他免疫细胞参与免疫反应。有研究者在小鼠同种异体心脏移植模型中发现,分别将冷却血贮存后的供心移植给 T 细胞、B 细胞缺乏的 Rag - / - 小鼠和 T 细胞、B 细胞、NK 细胞均缺乏的 γc - / - Rag - / - 小鼠,术后 60 d 发现, Rag - / - 小鼠组发生 CAV,而 γc - / - Rag - / - 小鼠组未见 CAV。然而,当 γc - / - Rag - / - 小鼠组接受过继转移 NK 细胞后又诱导了 CAV 的发生^[25]。Uehara 等^[26]在亲代到子一代的小鼠心脏移植实验中,消除普通的宿主抗移植物的 T 细胞和 B 细胞应答而保持正常宿主的 NK 细胞应答,发现 NK 细胞在导致 CAV 中发挥重要作用,且发现单独消除 NK 细胞可以预防移植后 3 周内的 CAV,但是不能预防移植 8 周后的 CAV。移植 8 周后的 CAV 的预防需要同时消除 NK 细胞和 CD4⁺ T 细胞。这说明 NK 细胞在 CAV 的早期发病过程中扮演了重要角色。Hirohashi 等^[21]在晚期(移植 8 周后)小鼠心脏移植模型实验中发现,仅 NK 细胞不足以导致典型的 CAV,但是 NK 细胞是激起一个级联反应所必须的条件,这个级联反应与 CD4⁺ T 细胞相关联,可以导致移植心脏严重的内皮损害和 CAV 的形成。先前已有大量研究证实 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 能够通过转化生长因子(TGF- β)依赖途径抑制体内 NK 细胞活性^[27-28],Hirohashi 等^[21]为了验证 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 可以抑制 NK 细胞介导的 CAV,在小鼠移植模型中消除 CD4⁺ CD25⁺ Tregs,移植 3 周后发现消除 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 组较移植对照组冠状动脉损伤更严重,近端冠状动脉狭窄程度更高。Kim 等^[29]在小鼠实验中发现,消除 Tregs 后,小鼠脾脏及淋巴结中 NK 细胞数量分别为正常时的 4 倍和 7 倍。这些实验充分说明了 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 对 NK 细胞的数量和功能有明显的抑制作用。

4 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 对 T 细胞和 B 细胞的调控作用

移植免疫损伤起源于 T 细胞激活、B 细胞抗体产生和细胞毒性细胞反应^[30]。动物实验表明,对供体主要组织相容性复合体(MHC)有活性的同种异型反应性 T 细胞和抗体在 CAV 的发病机制中发挥着重要作用^[31]。而 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 在免疫耐受形成与维持中,通过阻止抗原提呈,阻断 Th 细胞的功能,抑制 B 细胞分化为抗体形成细胞等而诱导 T、B 细胞耐受。目前所公认的调控机制主要包括以下几个方面。

4.1 高表达细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4) CD4⁺ CD25⁺ Tregs 表面高表达 CTLA-4,又名 CD152,是 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 发挥抑制作用的重要协同因素之一。CTLA-4 与 CD28 共同享有 B7 分子配体,但 CTLA-4 与 B7 的结合亲和力远高于 Teff 表面分子 CD28 与 B7 的结合亲和力,CTLA-4 与活化的 B7 分子结合后阻断了激活 T 细胞所需的共刺激信号,使 T 细胞的活化及增殖降低而抑制 T 细胞免疫应答。

4.2 分泌抑制因子白细胞介素-10(IL-10)和 TGF- β CD4⁺ CD25⁺ Tregs 可通过产生 IL-10^[32]和 TGF- β ^[33]调节免疫。IL-10 和 TGF- β 是具有广泛免疫抑制作用的细胞因子。IL-10 可以通过阻断上述的 CD28 与 B7 的结合产生的共刺激信号,抑制树突状细胞的成熟而下调其表面 MHC II 类分子的表达,从而抑制效应 T 细胞的活化。IL-10 还能通过抑制 IL-2 等细胞因子在 Th1 和 Th2 细胞内的合成,来抑制 T 细胞增殖和 B 细胞活化。TGF- β 可以通过抑制免疫效应细胞的增殖、抑制免疫效应细胞的分化和活性、抑制

细胞因子的产生及其免疫调节作用来发挥免疫抑制作用。

4.3 减少 IL-2 对 T 细胞、B 细胞的作用 IL-2 又名 T 细胞生长因子,是 T 细胞分化、成熟和增殖的重要因子,也可以促进活化 B 细胞增殖,参与抗体反应。而 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 表面表达 IL-2 的高亲和受体 CD25、CD122 和 CD132,使 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 可与 Teff 竞争结合 IL-2,通过消耗 IL-2 导致效应性 T 细胞凋亡;通过细胞-细胞紧密接触抑制效应性 T 细胞中 IL-2 的产生。CD4⁺ CD25⁺ Tregs 还可以将 cAMP 传递给效应性 T 细胞,减少 IL-2 的产生,进而发挥免疫抑制功能^[34]。

4.4 其他作用机制 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 可以分泌颗粒酶 A 或者穿孔素,直接杀死活化的效应性 T 细胞;阻止抗原提呈细胞共刺激分子(如 CD80、CD86)的表达和树突状细胞的成熟;可见,CD4⁺ CD25⁺ Tregs 的选择性抑制是各种抑制机制相互协调作用的结果^[35]。

CD4⁺ CD25⁺ Tregs 免疫抑制的高度通用性和机制多样性在抗心脏移植后长期的免疫排斥反应中发挥着至关重要的作用。在心脏移植后 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 对 NK 细胞、T 细胞、B 细胞应答产生了广泛的抑制作用,无论是在理论上还是动物模型实践上均是诱导免疫耐受、抗 CAV 发生与进展的良好策略。

5 小结与展望

长期以来,研究者试图寻找出一种新的移植后治疗手段,以替代昂贵的免疫抑制药物,且避免长期使用免疫抑制药物导致感染和恶性肿瘤的风险。在大量研究后,发现 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 作为一类具有免疫抑制效应的 T 淋巴细胞亚群,因其在体内外均能诱导免疫耐受,极有可能成为一种新兴的免疫治疗细胞,成为目前移植领域研究的热点。越来越多的动物实验研究了 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 有效可行的获得方法、治疗安全性及其在抗 CAV 中的剂量等,发现适量 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 诱导免疫耐受在抗 CAV 中较安全且效果明显。但也有大量的研究认为单独使用 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 虽然可以明显延长移植心脏存活时间,但是不能完全避免心脏移植排斥反应,因此为了追求更好的移植后效果,目前很多研究偏向于将 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 治疗联合一种常用的免疫抑制剂,特别是联合使用时可以促进 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 数量和功能的免疫抑制药物,如西罗莫司。随着对 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 的不断研究,一旦人们完全掌握了 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的生物学特性、功能及安全性或者发掘出疗效更突出的联合治疗方案,并将其推广到人类心脏移植后对抗 CAV 的发生与进展,其在心脏移植领域开创新的细胞治疗、延长心脏移植存活时间必将有一个广阔的前景。

参考文献

- [1] Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: thirtieth official adult heart transplant report - 2013; focus theme: age[J]. Heart Lung Transplant, 2013, 32(10): 951-964.
- [2] Rodriguez Cetina Bieffer H, Stündermann SH, Emmert MY, et al. Surviving 20 years after heart transplantation: a success story[J]. Ann Thorac Surg, 2014, 97(2): 499-504.
- [3] Mehra MR. Contemporary concepts in prevention and treatment of

- cardiac allograft vasculopathy [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(6): 1248 – 1256.
- [4] Costello JP, Mohanakumar T, Nath DS. Mechanisms of chronic cardiac allograft rejection [J]. *Tex Heart Inst J*, 2013, 40(4): 395 – 399.
- [5] Benatti RD, Taylor DO. Evolving concepts and treatment strategies for cardiac allograft vasculopathy [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2014, 16(1): 278.
- [6] Lu WH, Palatnik K, Fishbein GA, et al. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: a pathologic study of 64 allograft hearts [J]. *Heart Lung Transplant*, 2011, 30(9): 1044 – 1050.
- [7] Chen YJ, Lam J, Gregory CR, et al. The Ca^{2+} – Activated K^{+} ChannelKCa3. 1 as a potential newtarget for the prevention of allograft vasculopathy [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81006.
- [8] Miller CA, Sarma J, Naish JH, et al. Multiparametric cardiovascular magnetic resonance assessment of cardiac allograft vasculopathy [J]. *Am Coll Cardiol*, 2014, 63(8): 799 – 808.
- [9] Chantranuwat C, Blakey JD, Kobashigawa JA, et al. Sudden, unexpected death in cardiac transplant recipients: an autopsy study [J]. *Heart Lung Transplant*, 2004, 23(6): 683 – 689.
- [10] Joffe O, Santolaria T, Calise D, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{Foxp3}^{+}$ regulatory T lymphocytes [J]. *Nat Med*, 2008, 14(1): 88 – 92.
- [11] Muller YD, Golshayan D, Ehrchiou D, et al. Immunosuppressive effects of streptozotocin – induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells [J]. *Diabetes*, 2011, 60(9): 2331 – 2340.
- [12] Wildin RS, Smyk – Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome [J]. *Med Genet*, 2002, 39(8): 537 – 545.
- [13] Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F, et al. A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA→AAUGAA) leads to the IPEX syndrome [J]. *Immunogenetics*, 2001, 53(6): 435 – 439.
- [14] Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T – cell therapy in transplantation: moving to the clinic [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, 3(11): a015552.
- [15] Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: A jack of all trades, master of regulation [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(3): 239 – 244.
- [16] Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3⁺ regulatory T cells under inflammatory or non – inflammatory conditions [J]. *Semin Immunol*, 2011, 23(6): 424 – 430.
- [17] Hendriks TK, van Gurp EA, Sewgobind VD, et al. Generation of donor – specific regulatory T – cell function in kidney transplant patients [J]. *Transplantation*, 2009, 87(3): 376 – 383.
- [18] Wang Z, Fu XY, Shi BY, et al. Antigen – specific suppression by induced $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ high regulatory T cells in kidney recipients [J]. *Proceedings*, 2009, 41(5): 1574 – 1576.
- [19] Yoshizawa A, Ito A, Li Y, Koshiba T, et al. The roles of $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation [J]. *Proceedings*, 2005, 37(1): 37 – 39.
- [20] Chu Z, Zhang J, Zhao Y, et al. Influence of immunosuppressive drugs on the development of $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{high}}\text{Foxp3}^{+}$ T cells in liver transplant recipients [J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(7): 2599 – 2601.
- [21] Hirohashi T, Chase CM, DellaPelle P, et al. Depletion of T regulatory cells promotes natural killer cell – mediated cardiac allograft vasculopathy [J]. *Transplantation*, 2014, 98(8): 828 – 834.
- [22] Zhu J, Gao B. Simvastatin combined with aspirin increases the survival time of heart allograft by activating $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ Treg cells and enhancing vascular endothelial cell protection [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2015, 24(3): 173 – 178.
- [23] Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(2): 313 – 321.
- [24] Graham JA, Wilkinson RA, Hirohashi T, et al. Viral infection induces de novo lesions of coronary allograft vasculopathy through a natural killer cell dependent pathway [J]. *Am J Transplant*, 2009, 9(11): 2479 – 2484.
- [25] Zhang ZX, Huang XY, Jiang JF, et al. Natural killer cells play a critical role in cardiac allograft vasculopathy in an interleukin – 6 – dependent manner [J]. *Transplantation*, 2014, 98(10): 1029 – 1039.
- [26] Uehara S, Chase CM, Kitchens WH, et al. NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts [J]. *Immunol*, 2005, 175(5): 3424 – 3430.
- [27] Barao I, Hanash AM, Hallett W, et al. Suppression of natural killer cell mediated bone marrow cell rejection by $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ regulatory T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(14): 5460 – 5465.
- [28] Ghiringhelli F, Ménard C, Martin F, et al. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression [J]. *Immunol Rev*, 2006, 214: 229 – 238.
- [29] Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(2): 191 – 197.
- [30] Weiss MJ, Madsen JC, Rosengard BR, et al. Mechanisms of chronic rejection in cardiothoracic transplantation [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2980 – 2988.
- [31] Kalache S, Dinavahi R, Pinney S, et al. Anticardiac myosin immunity and chronic allograft vasculopathy in heart transplant recipients [J]. *Immunol*, 2011, 187(2): 1023 – 1030.
- [32] Kobayashi T, Nakatsuka K, Shimizu M, et al. Ribavirin modulates the conversion of human $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{-}$ T cell to $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{FOXP3}^{+}$ T cell via suppressing interleukin – 10 – producing regulatory T cell [J]. *Immunology*, 2012, 137(3): 259 – 270.
- [33] Zhang W, Wu K, He W, et al. Transforming growth factor beta 1 plays an important role in inducing $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ forkhead box P3⁺ regulatory T cells by mast cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 161(3): 490 – 496.
- [34] Bodor J, Bopp T, Vaeth M, et al. Cyclic AMP underpins suppression by regulatory T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42: 1375 – 1384.
- [35] Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell – mediated suppression [J]. *Immunity*, 2009, 30(5): 636 – 645.