

角膜移植排斥反应中调节性 T 细胞的发展及应用

杜鑫¹, 关瑞娟², 亢泽峰³, 李凌², 晏鑫³, 张晓英²

引用: 杜鑫, 关瑞娟, 亢泽峰, 等. 角膜移植排斥反应中调节性 T 细胞的发展及应用. 国际眼科杂志, 2024, 24(8): 1246-1249.

基金项目: 青海省卫健委重点课题 (No.2020-WJZD-02); 青海省昆仑人才· 高端创新拔尖人才 [No.(2021)13]

作者单位: ¹(810000) 中国青海省西宁市, 青海大学医学院; ²(810007) 中国青海省西宁市, 青海省人民医院眼科; ³(100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院

作者简介: 杜鑫, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病、白内障、眼底病。

通讯作者: 关瑞娟, 女, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障. grjchuer@163.com

收稿日期: 2023-11-14 修回日期: 2024-06-21

摘要

角膜移植术是角膜盲的有效治疗方式, 是角膜盲患者复明的唯一希望。角膜无血管、无淋巴管, 被称为免疫赦免器官, 因此角膜移植术的成功率明显高于其他器官移植术, 但角膜移植术后的排斥反应仍然是角膜移植术失败的主要原因。器官移植术后的免疫反应主要是免疫细胞向淋巴组织、炎症部位的定向移动, 而调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 在免疫调节中起着关键性作用, 其可以通过调节和抑制效应 T 细胞的活化来诱导免疫耐受, 从而减轻角膜移植术后的排斥反应。据此, 文章对在角膜移植术后发生免疫排斥反应中 Treg 的来源、作用机制以及治疗等多方面做简单综述, 同时也探讨了应用冬虫夏草提取物 FTY720 增强 Treg 的有效性, 以期为后续针对性开展临床应用转化及基础研究提供一定的参考。

关键词: 角膜移植术; 排斥反应; 免疫调节; 调节性 T 细胞
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.8.12

Development and application of regulatory T cells in corneal transplant rejection

Du Xin¹, Guan Ruijuan², Kang Zefeng³, Li Ling², Yan Xin³, Zhang Xiaoying²

Foundation items: Key Project of Qinghai Health Commission (No.2020-WJZD-02); Qinghai Kunlun Talents, High-end Innovative Top-notch Talents [No.(2021)13]

¹School of Medicine, Qinghai University, Xining 810000, Qinghai Province, China; ²Department of Ophthalmology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China; ³Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Correspondence to: Guan Ruijuan. Department of Ophthalmology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China. grjchuer@163.com

Received: 2023-11-14 Accepted: 2024-06-21

Abstract

• Corneal transplantation is an effective treatment for corneal blindness, and it is the only hope for patients with corneal blindness. Cornea has no blood vessels and no lymphatic vessels, which is called immune privilege organ, so the success rate of corneal transplantation is significantly higher than that of other organ transplantation, but the rejection reaction after corneal transplantation is still the main reason for the failure of corneal transplantation. The directional movement of immune cells to lymphoid tissue and inflammatory sites is the mainly immune response after organ transplantation. And the regulatory T cells (Treg) play a key role in immune regulation, which can induce immune tolerance by regulating and inhibiting the activation of effector T cells and reduce the rejection reaction after corneal transplantation. In addition, this review also discussed the effectiveness of applying cordyceps sinensis extract FTY720 to enhance the function of Treg. Based on this, we briefly reviewed the sources, mechanism of action and treatment of Treg after corneal transplantation, so as to provide some reference for the subsequent clinical application transformation and basic research.

• KEYWORDS: corneal transplantation; rejection reaction; immune regulation; regulatory T cells

Citation: Du X, Guan RJ, Kang ZF, et al. Development and application of regulatory T cells in corneal transplant rejection. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024, 24(8): 1246-1249.

0 引言

近年来, 随着角膜保存技术及显微手术的发展, 角膜移植手术已成为治疗严重角膜疾病的重要方法之一, 是角膜盲患者复明的最有效、最可靠的手段^[1]。由于角膜无血管、无淋巴管以及前房相关性免疫偏离 (anterior chamber associated immune deviation, ACAID), 这些因素使角膜移植术的成功率相对较高, 但术后的炎症反应、新生血管的长入、手术缝线、植床的状态以及手术方式等都有可能引起术后的免疫排斥反应。早在 1905 年, 眼科医生 Edward Zirm 成功完成了首例人类同种异体穿透性角膜移植术^[2], 随着时间的推移, 角膜移植技术也在不断发展和进步, 板层角膜移植术 (lamellar keratoplasty, LKP)、角膜内皮移植术 (endothelial keratoplasty, EK) 等角膜移植术的发展降低了角膜移植术后的排斥反应和保持了眼部结构的完整性^[3]。当角膜移植术后出现炎症、新生血管的长入以及手术缝线的刺激, 会破坏角膜的免疫赦免, 发生对异体抗

原的免疫应答,继而宿主机体出现免疫调节来对抗免疫排斥反应,使机体达到一个稳定的状态,降低角膜移植术后的免疫反应,保护角膜植片的完整性。在这一过程中,调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)是一个关键因素。因此,我们对Treg参与角膜移植排斥反应作用机制、来源以及应用进行一简单讨论和综述。

1 诱导眼部免疫耐受 Treg 的来源

1.1 通过前房相关性免疫偏离产生 Treg 前房相关性免疫偏离(anterior chamber associated immune deviation, ACAID)被认为是眼部免疫赦免的中心部分,由于角膜无血管、眼内相对缺乏淋巴引流通道、组织液直接引流至血管等这一特殊的解剖学特点,使得血源性免疫因子和效应细胞无法进入前房,但前房内的抗原可通过房水引流途径进入血液循环,到达脾脏,进而发生偏离的免疫应答^[4]。ACAID是指抗原进入前房后,随房水引流逸出前房可诱导产生非特异性抗体以及特异性细胞毒性T淋巴细胞的前体细胞,但不诱导迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)的现象^[5]。有学者发现^[6],在前房中注射的抗原可被抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)吸收并处理,抗原提呈细胞可通过血液循环被运送到胸腺和脾脏,随后促使CD4+和CD8+ α/β 调节性T细胞抑制效应T细胞(TH1和TH2)的表达,减轻了TH1和TH2介导的免疫应答,从而发挥抑制免疫反应的作用,使眼部组织免疫耐受。

1.2 通过眼组织内部诱导产生 Treg 房水中存在 α -黑色素细胞刺激素、血管活性肠肽、降钙素基因相关肽和生长抑素,这些房水因子可减轻病原体诱导的炎症和抑制TH1细胞的活化,同时促进Treg的生成^[7]。有研究表明,房水可以利用转化生长因子- β (transforming growing factor- β , TGF- β)的活性将T细胞转化为分泌TGF- β 的Treg,进而抑制反应性T细胞的增殖和活化,诱导免疫耐受^[8]。眼组织存在血-眼屏障,包括血-房水屏障、血-视网膜屏障和血-视神经屏障。当发生角膜炎、葡萄膜炎等炎症性疾病时,血-房水屏障遭到破坏,使大量的免疫细胞进入房水,继而诱导产生Treg来减缓炎症的进展和参与到免疫耐受的过程中,进而起到减缓眼内炎症反应的作用^[9]。

1.3 炎症反应时 Treg 从淋巴结引流而来 当眼内发生感染、过敏、免疫性疾病时,抗原刺激免疫细胞在外周免疫系统中分化、增殖,进而产生大量的效应T细胞,随后其经引流淋巴结迁移至炎症部位,导致大量的效应T细胞在眼组织内增殖,分泌大量的促炎性因子加重免疫反应,来促使病情的发展。同时,机体为了减轻免疫反应带给眼组织的损伤,Treg会被诱导产生打破免疫平衡,来抑制效应T细胞介导的免疫反应以及炎症的进展,从而减轻眼组织内部的炎症反应,降低炎症因子引起的损害,诱导免疫耐受^[10-11]。

2 Treg 与角膜移植排斥反应

将异体组织器官移植到机体的某些特殊部位与移植到常规发生剧烈免疫排斥反应的部位相比,其存活时间明显延长的现象称为免疫赦免,眼部的免疫赦免是指与其他部位相比,角膜、前房、玻璃体腔以及视网膜下间隙对外源

性移植组织或其他抗原无反应的状态^[5]。角膜移植术后,当眼部的免疫赦免部位遭到各种因素(包括炎症、新生血管的长入、缝线刺激等)的破坏时,便容易受到外来抗原的刺激。角膜缘周围富含树突状细胞(Dendritic cell, DC)以及Langerhans细胞,这些细胞对外来抗原进行加工和递呈,继而诱发免疫排斥反应^[12]。Treg被认为是免疫稳态的调节剂,在维持外周免疫耐受和控制免疫应答方面起着至关重要的作用^[13],其主要机制是通过细胞表面分子与其他淋巴细胞的相应配体结合,以细胞-细胞接触依赖的方式,发挥抑制效应细胞增殖和分化的作用^[14]。

2.1 Treg 诱导眼部免疫耐受的作用机制 Treg分为CD4+Treg与CD8+Treg,其中CD4+Treg根据其个体发生和作用方式分为两种亚型:直接由胸腺细胞分化而来的自然调节T细胞(natural regulatory cell, nTreg)、由TH0细胞诱导而来的诱导性调节T细胞(induce regulatory cell, iTreg)^[15]。nTreg表达高水平的CD25,这一过程需要转录因子叉头蛋白(forkhead box protein 3, FoxP3)的支持,以细胞接触依赖性方式在体外介导其抑制作用,iTreg需要白介素-2(interleukin-2, IL-2)的支持才能存活和发挥作用,并且被认为是通过释放抗炎症细胞因子白介素-10(interleukin-10, IL-10)和TGF- β 来抑制免疫反应^[14]。Treg表达的关键抑制性因子包括IL-10、白介素-35(IL-35)以及TGF- β ^[16],其中,Treg分泌的IL-10可以有效的抑制巨噬细胞和效应T细胞,其中IL-10抑制Th1细胞活化,并且作用于巨噬细胞以阻止其激活促炎因子、趋化因子的形成和分泌^[17]。因此,Treg在对炎症反应的抑制以及免疫应答的抑制过程中起了重要作用。Treg被激活后产生IL-35,与IL-35受体结合后作用于其靶细胞,通过抑制T细胞的增殖和效应功能来起到抑制免疫反应的作用^[18]。TGF- β 是调节T细胞介导免疫应答和诱导免疫耐受的关键因素,在体内和体外Treg的分化过程中起着至关重要的作用,可维持nTreg细胞内转录因子Foxp3表达,并抑制炎症细胞^[19]。以上研究表明,Treg可以从多种途径对免疫反应进行调节及抑制,在免疫排斥反应中起着重要作用。

2.2 调节 Treg 的相关因子 Foxp3属于叉头/翼状螺旋转录因子(Forkhead/winged helix transcription factor)家族,研究发现,在人和小鼠胸腺或外周组织的CD4+、CD25+T调节细胞中Foxp3的表达量增高^[20]。研究发现^[21],c-Rel可通过Foxp3基因直接控制iTreg的分化,c-Rel缺陷小鼠的Treg细胞增殖水平减少高达90%,并且c-Rel缺陷的T细胞在向着Treg细胞分化的过程中受到损害。核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)蛋白家族在细胞的免疫应答、炎症反应过程中起着关键作用^[22],c-Rel目前被认为是调节性T细胞生物学影响比较深刻的NF- κ B成员之一。c-Rel是T细胞受体(t-cell receptor, TCR)活化后早期激活的基因之一,可在胸腺Treg发育中促进Foxp3的表达,从而特异性上调CD4+CD25+胸腺Treg细胞的发育。由此可见,Foxp3的表达及功能与CD4+CD25+Treg有着密不可分的关系,当Foxp3表达异常可能会对Treg的分化和发育产生很大的影响,继而会影响其诱导免疫耐受的能力。

2.3 Treg 在角膜移植排斥反应中的作用 虽然角膜移植是最普遍和最成功的实体组织移植方式之一,但是穿透性角膜移植术后,外来抗原会被角膜缘处的 APC 捕获并提呈给次级淋巴器官的 T 细胞并使其活化,活化的 T 细胞经血液循环、角膜新生血管及淋巴管运送至角膜,继而对角膜植片进行免疫攻击,进一步诱发免疫排斥反应^[12]。而 Treg 通过依赖穿孔素或颗粒酶途径杀灭活化的 CD4+和 CD8+T 细胞^[23]或通过释放免疫抑制性细胞因子,如 IL-10 和 TGF- β 来抑制免疫排斥反应的进展^[16]。此外,在角膜移植过程中,角膜植片上的抗原细胞会发生脱落进入前房并诱发 ACAID,随后 ACAID 诱导 Treg 的表达,诱导免疫耐受,延长角膜植片的存活时间^[24-25]。

3 角膜移植排斥反应治疗中 Treg 的应用

目前,免疫治疗正在不断发展成为一个新的研究领域。研究发现,Treg 已成为免疫稳态的关键调节剂,在维持外周耐受和控制免疫应答方面起着至关重要的作用^[16]。通过对 Treg 免疫活性调节机制的深入研究,有可能为靶向 Treg 细胞治疗角膜移植排斥反应带来新的希望。

3.1 利用全反式维甲酸与 TGF- β 增强 Treg 的分化 全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)是维生素 A 的代谢产物,在调节淋巴细胞的分化、增殖和凋亡中发挥着重要作用,ARTA 诱导的 Foxp3 在幼稚 CD4+Treg 中表达增多,但其与细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)表达增强有关^[26]。研究发现,ARTA 与 TGF- β 联合治疗角膜移植术后排斥反应明显增加了移植物的存活率,其机制是 ATRA 可以使 Treg/Th17 平衡偏向 Treg,增加 Treg 的分化。此外,在 TGF- β 的存在下,ARTA 可上调 CD4+CD25+Foxp3 Treg,抑制受体小鼠血液、脾脏和引流淋巴结中的 Th17 细胞^[27],从而促进同种异体角膜移植术后免疫耐受的诱导。

3.2 利用雷帕霉素增强体内 Treg 的分化 雷帕霉素属于大环内酯类抗生素,Wang 等^[28]研究发现,在小鼠接受角膜移植术前 2 wk 对其腹腔内注射雷帕霉素,结果显示术前和术后雷帕霉素预处理能够显著提高外周血和引流淋巴结中 CD4+CD25+Foxp3 Treg 的表达,并且可以减少角膜移植术后新生血管的形成。此外,雷帕霉素预处理导致大量 CD4+CD25+T 细胞浸润于角膜移植体和结膜,从而抑制移植排斥反应。研究表明^[29],在小鼠进行同种异体角膜移植术后,给予雷帕霉素和 IL-2 混合药物治疗,可观察到移植体中的 Foxp3 的基因表达显著增高。由此可见,雷帕霉素在抑制角膜移植术后排斥反应发挥着重要作用。

3.3 体内注射 Treg 经体外分离的 Treg 直接注射到体内,通过增加 Treg 的数量,发挥其免疫耐受功能也是一种治疗排斥反应的方法。有研究表明,分离大鼠脾脏中未被激活的 CD4+CD25+Treg,然后通过球结膜下注射的方式治疗角膜移植术后排斥的大鼠,随后局部注射的 Treg 可迁移到大鼠的角膜和引流淋巴结,进而抑制 APC 的成熟以及抑制效应细胞 TH1 的活化,减少移植体中炎症细胞的浸润,因此,此种治疗方式可明显降低角膜移植术后的排斥反应,并且可以用于预防性治疗,增加角

膜植片的存活率^[30]。

3.4 利用冬虫夏草提取物增强 Treg 的活性 芬戈莫德(fingolimod, FTY720)的来源是通过冬虫夏草进行化学修饰,并且对冬虫夏草中有免疫抑制功能的药理活性成分 ISP-1 进行改造后得到的^[31]。研究表明 FTY720 可以通过细胞间接触依赖的方式来增强 Treg 的功能,进而减轻免疫排斥反应^[32]。此外,另有研究表明,在大鼠角膜移植术后,应用 FTY720 可以迅速降低大鼠外周血中淋巴细胞的数量,可显著降低角膜移植术后的排斥反应^[33]。当应用 FTY720 与 1% 环孢素(cyclosporin, CsA)在延长角膜植片达到相同效果时,FTY720 的用量明显少于后者的用量,并且无明显的毒副作用^[34]。这为探索角膜移植术后排斥反应的药物治疗开辟了新的方向,奠定了理论基础。

4 小结

Treg 是机体自然存在的具有主动调节的活性 T 细胞,具有预防自身免疫性疾病或移植排斥反应的能力。角膜移植术后的排斥反应通过调控 Treg 诱导免疫耐受,在免疫治疗领域有着很好的发展前景。虽然现在对 Treg 诱导免疫耐受机制的研究不断进展,并且取得了良好的成果,但未来对于 Treg 体外分离和扩增后进行回输治疗的有效性、安全性以及稳定性仍然有很多问题需要深入研究。本综述对 Treg 在角膜移植术后排斥反应的作用机制和应用进行了讨论,同时也探讨了应用冬虫夏草提取物 FTY720 治疗移植术后排斥反应的有效性。在未来,有效的开发和应用 FTY720,将有可能促进角膜移植事业的发展,为角膜移植患者带来福音。

参考文献

- [1] 付彦江. 深板层角膜移植术治疗真菌性角膜溃疡临床研究. 临床医药文献电子杂志, 2018,5(88):44.
- [2] Gómez-Benlloch A, Montesel A, Pareja-Aricò L, et al. Causes of corneal transplant failure: a multicentric study. *Acta Ophthalmol*, 2021, 99(6):e922-e928.
- [3] Price MO, Gupta P, Lass J, et al. EK (DLEK, DSEK, DMEK): new frontier in Cornea surgery. *Annu Rev Vis Sci*, 2017,3:69-90.
- [4] Stepp MA, Menko AS. Immune responses to injury and their links to eye disease. *Transl Res*, 2021,236:52-71.
- [5] Maharana PK, Mandal S, Kaweri L, et al. Immunopathogenesis of corneal graft rejection. *Indian J Ophthalmol*, 2023,71(5):1733-1738.
- [6] Vendomele J, Khebiqi Q, Fisson S. Cellular and molecular mechanisms of anterior chamber - associated immune deviation (ACAID): what we have learned from knockout mice. *Front Immunol*, 2017,8:1686.
- [7] Sun JJ, Wang T, Bian J, et al. Immune tolerance induced in the anterior chamber ameliorates corneal transplant rejection. *Clin Immunol*. 2023 Dec;257:109797.
- [8] Moreau JM, Velegraki M, Bolyard C, et al. Transforming growth factor- β 1 in regulatory T cell biology. *Sci Immunol*, 2022,7(69):eabi4613.
- [9] Wildner G, Diedrichs-Möhning M. Resolution of uveitis. *Semin Immunopathol*, 2019,41(6):727-736.
- [10] Ratay ML, Glowacki AJ, Balmert SC, et al. Treg - recruiting microspheres prevent inflammation in a murine model of dry eye disease. *J Control Release*, 2017,258:208-217.
- [11] Keino H, Horie S, Sugita S. Immune privilege and eye-derived T-regulatory cells. *J Immunol Res*, 2018,2018:1679197.

- [12] Amouzegar A, Chauhan SK, Dana R. Alloimmunity and tolerance in corneal transplantation. *J Immunol*, 2016,196(10):3983-3991.
- [13] Eggenhuizen PJ, Ng BH, Ooi JD. Treg enhancing therapies to treat autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*, 2020,21(19):E7015.
- [14] Bolivar-Wagers S, Larson JH, Jin S, et al. Cytolytic CD4+ and CD8+ regulatory T-cells and implications for developing immunotherapies to combat graft-versus-host disease. *Front Immunol*, 2022,13:864748.
- [15] Savage PA, Klawon DEJ, Miller CH. Regulatory T cell development. *Annu Rev Immunol*, 2020,38:421-453.
- [16] Foulsham W, Marmalidou A, Amouzegar A, et al. Review: The function of regulatory T cells at the ocular surface. *Ocul Surf*, 2017,15(4):652-659.
- [17] Sawant DV, Yano H, Chikina M, et al. Adaptive plasticity of IL-10⁺ and IL-35⁺ T_{reg} cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 2019,20(6):724-735.
- [18] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007,450(7169):566-569.
- [19] Ouyang WM, Beckett O, Ma Q, et al. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity*, 2010,32(5):642-653.
- [20] Deng GP, Song XM, Fujimoto S, et al. Foxp3 Post-translational Modifications and Treg Suppressive Activity. *Front Immunol*. 2019,18;10:2486.
- [21] Ruan QG, Kameswaran V, Tone Y, et al. Development of Foxp3 (+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity*. 2009,18;31(6):932-940.
- [22] Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, et al. NF-κB: At the borders of autoimmunity and inflammation. *Front Immunol*, 2021,12:716469.
- [23] 许长涛, 李为民, 姚咏明. 调节性 T 细胞免疫效应的调节机制. *国际病理科学与临床杂志*, 2008,28(3):199-204.
- [24] Cunnusamy K, Paunicka K, Reyes N, et al. Two different regulatory T cell populations that promote corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010,51(12):6566-6574.
- [25] Hori J, Yamaguchi T, Keino H, et al. Immune privilege in corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res*, 2019,72:100758.
- [26] Wu S, Wang W, Le Q. All-trans Retinoic Acid Regulates the Balance of Treg-Th17 Cells through ERK and P38 Signaling Pathway. *Iran J Immunol*, 2019,16(1):1-10.
- [27] Wang X, Wang W, Xu J, et al. All-trans retinoid acid promotes allogeneic corneal graft survival in mice by regulating Treg-Th17 balance in the presence of TGF-β. *BMC Immunol*, 2015,16:17.
- [28] Wang X, Wang W, Xu J, et al. Pretreatment of rapamycin before allogeneic corneal transplant promotes graft survival through increasing CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Exp Clin Transplant*, 2013,11(1):56-62.
- [29] Wang X, Wang W, Xu J, Le Q. Effect of rapamycin and interleukin-2 on regulatory CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells in mice after allogeneic corneal transplantation. *Transplant Proc*, 2013,45(2):528-537.
- [30] Shao C, Chen Y, Nakao T, et al. Local Delivery of Regulatory T Cells Promotes Corneal Allograft Survival. *Transplantation*, 2019,103(1):182-190.
- [31] 胡贤达, 黄雪, 王彪, 等. 冬虫夏草抗肿瘤及免疫调节作用的研究进展. *药物评价研究*, 2015,38(04):448-452.
- [32] Sawicka E, Dubois G, Jarai G, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4⁺/CD25⁺ T-regulatory cells and enhances their functional activity. *J Immunol*, 2005,175(12):7973-7980.
- [33] 曹寓佳, 罗志娟. FTY720 的作用特点及机制的研究进展. *国外医学(中医中药分册)*, 2005,5:279-282.
- [34] 钟帆, 陆晓和, 彭小娟. 新型免疫抑制剂 FTY720 的研究进展. *广东医学*, 2007,28:319-321.