

• 综述 •

调节性 T 细胞在重症肌无力研究中的进展

徐朋亮 朱勇俊 宋阳 陈志明

【摘要】 重症肌无力(MG)为一种由乙酰胆碱受体的抗体介导的、具有 T 细胞依赖性的自身免疫性疾病。目前研究发现,调节性 T 细胞(Treg)功能异常在多种自身免疫性疾病包括重症肌无力的发生、发展起着重要作用。文章重点介绍了 Treg 细胞的特点及其在重症肌无力作用机制方面的进展,旨在能够发现一种对重症肌无力和其他自身免疫性疾病有效的以异常 T 细胞为基础的治疗方法。

【关键词】 重症肌无力; 调节性 T 细胞; Foxp3

Regulatory T cells and its research progress in myasthenia gravis Xu Pengliang, Zhu Yongjun, Song Yang, Chen Zhiming. Department of Cardiothoracic Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: Chen Zhiming, Email: chzm_md@163.com

【Abstract】 Myasthenia gravis (MG) is an antibody-mediated, T cell-dependent autoimmune disease. Recent researches have revealed that the dysfunction in the Regulatory T cell (Treg) compartment is involved in the etiology and pathogenesis of a variety of autoimmune diseases, including MG. This paper focuses on the characteristics of Treg and its mechanism of action on MG. It is hoped to pave a way that will restore self-tolerance in MG and other autoimmune diseases towards the Treg-based treatment modalities.

【Key words】 Myasthenia gravis; Regulatory T cell; Foxp3

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种相对罕见的疾病,临床症状表现为骨骼肌和眼肌无力。MG 的发生机制是 T 细胞依赖、抗体及补体介导的自身免疫性疾病。抗自身抗体与神经肌肉接头处突触后膜上的相关受体结合,阻碍了神经肌接头处信号转导^[1]。抗体包括乙酰胆碱受体抗体(anti-acetylcholine receptor, AChR)(占患者总量的 85%)、肌肉特异性激酶抗体(Musk 抗体)、脂蛋白受体相关蛋白 4(lipoprotein receptor related protein 4, LRP4)抗体^[2-4]。AChR 抗体结合后通过补体反应损伤突触后膜,其中约 80% 的 AChR 抗体阳性患者存在胸腺异常(包括胸腺滤泡增生或胸腺瘤)。目前研究^[5]发现调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)在 MG 发生、发展中起着重要作用。本文对 Treg 细胞的特点及其在 MG 发病机制中的作用进行综述。

一、Treg 的分类及特点

1. Treg 细胞分类:主要依据其来源分为两类,包括天然 Treg 和获得性 Treg^[6]。天然调节性 T 细胞(natural regulatory T cells, nTreg)是由胸腺的 T 细胞自然分化并发育成熟后,进入外周淋巴组织的调节性 T 细胞。nTreg 抑制活性需要在 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)活化后才能表现出来,但其活化后所介导的免疫抑制作用为抗原非特异性。获得性 Treg 细胞(iTreg)是在外周血中成熟的 CD4⁺CD25⁺T 细胞,也可在一定条件下被诱导而转变成 Treg,并获得抑制活性。实验显示,诱导外周血未成熟 CD4⁺CD25⁺T 细胞向 Treg 转化的主要细胞为未成熟树突状细胞(imature dendritic cell, IDC)和转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β , TGF- β_1)^[7]。此外,抗原通过黏膜途径也可诱导 Treg 分化。

2. Treg 细胞表面标志分子:Treg 细胞表面分子标志主要为 CD4⁺和 CD25⁺。CD4⁺CD25⁺T 细胞同时具有免疫无反应性和免疫抑制性两大特征,其特征性分子标志为转录因子 3(forkhead

transcription factor 3, FOXP3)。FOXP3 对 Treg 的发育及功能起重要作用。用反转录病毒将 Foxp3 基因转染至小鼠外周血中型 CD4⁺CD25⁺T 细胞后,在体内外均表现出 Treg 细胞的免疫无反应性和免疫抑制性,能够抑制抗原特异性 CD4⁺细胞增殖^[8]。Foxp3 已被确认为大型转录复合体(如 HDAC、Runx1、Gata3)的成分之一,通过特定参与组成 Treg 细胞转录因子复合物,Treg 中的基因才能表达转录因子^[9]。CD4⁺CD25⁺Treg 是维持机体免疫耐受的重要 T 细胞,由胸腺产生并通过主动调节方式抑制正常机体内潜在的自身反应性 T 细胞的活化与增殖,从而防止自身免疫应答的发生。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞核内表达的 Foxp3 是该细胞发育的主要调节分子以及识别该 T 细胞亚群最好的标志物。细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)则是成熟 Treg 组成性表达的细胞表面分子,它作为一种共刺激信号分子参与免疫应答的负调控。CTLA-4 在维持 T 细胞耐受方面具有双重功能:Treg 表达的 CTLA-4 可抑制异常幼稚 T 细胞激活,而 Tconv 表达的 CTLA-4 可以防止自身反应性 T 细胞在重要器官中的积累^[10]。Chan 等^[11]通过阻断 CD4⁺T 细胞上 CTLA-4 的表达后发现 CD4⁺T 细胞比 CD8⁺T 细胞有增殖能力。这种 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞亚群对阻断 CTLA-4 后表现出不同的反应,提示抗 CTLA-4 治疗可以用于临床改变自身免疫疾病的免疫应答反应。糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (glucocorticoid induced tumour necrosis factor receptor, GITR)主要表达在静息性的 Treg 细胞,当 Treg 被激活也可以在一定时间内持续表达 GITR;用抗 GITR 或糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体配体 (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand, GITRL)抗体均可消除 Treg 的免疫抑制作用。Masuda 等^[12]证实了 GITR 在 CD4⁺CD25⁺Treg 中组成性高表达, GITR+Treg 在外周血淋巴细胞中所占比例与患者病情的严重程度相关,因此 GITR+Treg 能增强免疫抑制功能。

3. Treg 的功能:Treg 在抑制自身免疫反应方面起着重要作用。1995 年, Sakaguchi 等首先发现^[13],将 CD4⁺CD25⁺T 细胞去除后的裸鼠体会引发多种自身免疫性疾病;当同时输入 CD4⁺CD25⁺T

细胞则可避免自身免疫疾病的发生。出生后 3 d 进行了胸腺切除的小鼠,会罹患自发的多器官自身免疫疾病,同时伴有外周淋巴细胞中 CD25⁺T 细胞数量减少;然而如果将正常小鼠 Treg 细胞移植到实验组小鼠,可有效抑制身免疫反应。

4. nTreg 细胞在胸腺内的发育:成熟的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞转移至外周,发挥抑制自身免疫应答功能。同时, Sakaguchi 等^[14]在自身免疫疾病的动物实验模型中发现 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞功能的破坏导致了自身免疫性疾病,而这些疾病在接受移植的有功能的 Treg 细胞后会有逆转。Treg 可抑制 T 淋巴细胞激活,对 B 淋巴细胞、巨噬细胞及树突样细胞也具有调节作用。抑制其他 CD4⁺细胞和 CD25⁺细胞活性,其抑制活性具有抗原非特异性和可逆性,推测其抑制作用途径可能是细胞与细胞的直接接触或通过分泌抑制性细胞因子发挥抑制作用。

二、Treg 细胞和 MG

1. Treg 细胞和 MG 的关系 胸腺中存在自身受体反应性 CD4⁺T 细胞,若对此类细胞抑制减弱,将产生抗自身抗体。如果对 AchR 反应性 CD4⁺T 细胞的抑制作用减弱,将会引起辅助 B 细胞分化成熟产生 AchR 抗体,进而导致 MG 发生。这同时也可以解释合并胸腺异常的 MG 患者可同时合并其他自身免疫性疾病,如 SLE、桥本甲状腺炎、纯红细胞再生障碍性贫血等^[15-16]。Luther 等^[17]发现, MG 合并胸腺瘤组的胸腺中, CD4⁺CD25⁺T 细胞数量明显下降。Treg 数量改变可能与 MG 合并胸腺瘤相关。Sun 等^[18]研究发现:MG 症状稳定患者外周血 Treg 数量显著高于症状不稳定患者。Chi 等^[19]研究发现部分 MG 患者 CD4⁺CD25⁺Treg 数量虽正常,但 Foxp3 表达明显减少,且这些细胞不具有抑制自身反应性 T 细胞增殖的能力,提示 CD4⁺CD25⁺Treg 和 FoxP3 阳性表达细胞数目减少与 MG 相关。Balandina 等^[20]的研究也表明 MG 患者胸腺 CD4⁺CD25⁺T 细胞 Foxp3 mRNA 表达水平低于对照组,且伴免疫抑制功能降低。该研究发现, MG 患者胸腺中 FoxP3 阳性细胞率、mRNA 表达水平均显著低于正常对照组,并且 Foxp3 表达的下降与 MG 患者的性别、年龄无关,而与 MG 的临床分型呈负相关,即临床症状较重者 Foxp3 表达水平较低,提示 Foxp3 表达变化可能在 MG 的发生、发展

中起重要作用,其基因的异常表达可能是 MG 自身免疫调控失衡的主要原因。

2. Treg 细胞与 MG 的治疗:Ronchetti 等^[21]研究发现,GITR 为有活性的 Treg 细胞的关键分子,可诱导 iTreg 细胞分化^[22]。庄战强等^[23]报道,MG 患者经过糖皮质激素治疗后,外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 表达显著提高,但仍然低于健康人群,提示糖皮质激素可以诱导 Foxp3 的表达。T 细胞功能受损不仅仅由于 Treg 细胞数量较少和功能低下,也来自效应性 T 细胞对 Treg 介导的抑制作用的抵抗^[24]。

2012 年, Singh 和 Kamen 等^[25]发现高浓度 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 的活化形式在体外也可以促进 CD4⁺FOXP3⁺Treg 产生,并且维生素 D₃ 能直接促进 CD4⁺CD25⁺T 细胞产生 FOXP3⁺T 细胞,从而表达高水平的 CTLA-4 产生免疫抑制作用^[26]。另外,Askmark 等^[27]发现 MG 患者血浆维生素 D 水平较正常人降低,这种低水平可能对 MG 患者的 CD4⁺CD25⁺⁺Treg 产生了潜在的作用^[28]。Khoo 等^[29]证明 Treg 能表达维生素 D 受体。维生素 D₃ 在健康个体体外可以诱导产生 Treg,促进 FOXP3 和 IL-10 分泌细胞的表达^[30]。然而,仅仅维生素 D 低水平并不能解释 MG 患者 Treg 抑制能力的下降,有研究证实土耳其的健康人也会有较低水平的维生素 D^[31],患者 Treg 细胞调节功能的改变可能与 Treg、Tresp 和抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)的协同刺激或协同抑制分子作用有关,FOXP3 在 CD4⁺CD25⁺T 细胞中的低表达可能与 IL-2 介导的 STAT5 的磷酸化作用有关^[32]。

胸腺切除术(thymectomy, TE)是目前治疗 MG 的一种方法,可以起到改善临床症状的作用。Guillermo 等^[33]证实有 52% 的 MG 患者在 TE 后得到缓解, Hatton 等^[34]则证实有 59% 获得缓解, Busch 等^[35]证实有 71% 获得缓解, Frist 等^[36]证实有 87% 获得缓解。非胸腺瘤 MG 患者胸腺切除术后一年, 89% 患者量化肌无力评分有降低。但仅做 TE 治疗而没有免疫抑制治疗的患者不足以增加足够的循环 Treg 细胞以及建立完全稳定缓解率(complete stable remission, CSR), Jakubikova 等^[37]还观察到 TE 术前仅使用新斯的明的患者 Treg 细胞增加率远低于类固醇激素治疗的患者。

Zhang 等^[38]发现免疫抑制剂雷帕霉素对增加

Treg 细胞数量具有显著的积极作用。雷帕霉素作为一种新型大环内酯类免疫抑制剂,最近研究显示其在体外可以选择性地扩增 nTreg, CD4⁺T 细胞的扩增和活化能够诱导细胞凋亡,但确切机制尚不清楚。Barrat 等^[39]研究表明,经皮质类固醇激素治疗后的 MG 患者比未经激素治疗者体内的调节性 T 细胞抑制功能增强,因而认为激素在控制外周调节网络中可能发挥作用,其作用可能是提供一种环境以促进免疫调节作用。可能因为其可以干扰树突状细胞的成熟,从而减少了表层表达或者共刺激分子,同时可以产生 IL-10 来诱导抑制性 T 细胞的产生。因此, MG 患者进行免疫抑制治疗后 Treg 数量会明显增加^[40]。

三、展望

随着对 Treg 细胞在各种自身免疫性疾病方面研究的进展,其在 MG 发病机制方面的研究也日趋深入,已基本明确 Treg 细胞数量和功能缺陷与 MG 的发生、发展相关,但其引起 MG 的具体发病机制尚不明确。MG 患者 Treg 细胞 Foxp3 诱导表达仍不十分清楚,依靠 Treg 细胞对人类自身免疫性疾病,特别是 MG 的治疗方法还存在很多争议。理想的治疗方法是利用 MG 患者自身的 Treg 细胞来治疗 MG,因此有必要进一步探究 MG 患者 Treg 细胞重新建立免疫抑制作用所需的条件。

参 考 文 献

- 1 Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(5):475-490.
- 2 Cavalcante P, Le Panse R, Berrih-Aknin S, et al. The thymus in myasthenia gravis: Site of "innate autoimmunity"? [J]. *Muscle Nerve*, 2011, 44(4):467-484.
- 3 Lindstrom J. Antibody to acetylcholine receptors in human MG [J]. *Int J Neurol*, 1980, 14(1):17-24.
- 4 Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al. Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(4):1016-1024.
- 5 夏强, 刘卫彬, 陈振光, 等. 重症肌无力患者胸腺调节性 T 细胞的原位表达及意义 [J]. *中华医学杂志*, 2009, 89(43):3031-3034.
- 6 Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(3):253-257.
- 7 Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T

- cells and immune tolerance[J]. *Cell*, 2008, 133(5):775-787.
- 8 Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(7):490-500.
 - 9 Rudra D, Deroos P, Chaudhry A, et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(10):1010-1019.
 - 10 Jain N, Nguyen H, Chambers C, et al. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(4):1524-1528.
 - 11 Chan DV, Gibson HM, Aufiero BM, et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4⁺ versus CD8⁺ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4⁺ proliferation [J]. *Genes Immun*, 2014, 15(1):25-32.
 - 12 Masuda M, Matsumoto M, Tanaka S, et al. Clinical implication of peripheral CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 225(1-2):123-131.
 - 13 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 1995, 155(3):1151-1164.
 - 14 Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease[J]. *Immunol Rev*, 2006, 212:8-27.
 - 15 Bekircan-Kurt CE, Tuncer KA, Erdem-Ozdamar S, et al. The course of myasthenia gravis with systemic lupus erythematosus [J]. *Eur Neurol*, 2014, 72(5-6):326-329.
 - 16 Bernard C, Frih H, Pasquet F, et al. Thymoma associated with autoimmune diseases: 85 cases and literature review [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(1):82-92.
 - 17 Luther C, Poeschel S, Varga M, et al. Decreased frequency of intrathymic regulatory T cells in patients with myasthenia-associated thymoma[J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 164(1-2):124-128.
 - 18 Sun Y, Qiao J, Lu CZ, et al. Increase of circulating CD4⁺CD25⁺ T cells in myasthenia gravis patients with stability and thymectomy[J]. *Clin Immunol*, 2004, 112(3):284-289.
 - 19 Chi LJ, Wang HB, Wang WZ. Impairment of circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2008, 13(1):54-63.
 - 20 Balandina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis[J]. *Blood*, 2005, 105(2):735-741.
 - 21 Ronchetti S, Ricci E, Petrillo M G, et al. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells[J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015:171520.
 - 22 Xiao X, Shi X, Fan Y, et al. GITR subverts Foxp3⁺Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8266.
 - 23 庄战强, 许文华, 吴元波, 等. 糖皮质激素对重症肌无力患者外周血调节性 T 细胞中 Foxp3 及其胞内 CTLA-4 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(9):1297-1300.
 - 24 Clough LE, Wang CJ, Schmidt EM, et al. Release from regulatory T cell-mediated suppression during the onset of tissue-specific autoimmunity is associated with elevated IL-21 [J]. *J Immunol*, 2008, 180(8):5393-5401.
 - 25 Singh A, Kamen DL. Potential benefits of vitamin D for patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Dermatoendocrinol*, 2012, 4(2):146-151.
 - 26 Chambers ES, Suwannasaen D, Mann EH, et al. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ in combination with transforming growth factor-beta increases the frequency of Foxp3⁺ regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2 [J]. *Immunology*, 2014, 143(1):52-60.
 - 27 Askmark H, Haggard L, Nygren I, et al. Vitamin D deficiency in patients with myasthenia gravis and improvement of fatigue after supplementation of vitamin D₃: a pilot study[J]. *Eur J Neurol*, 2012, 19(12):1554-1560.
 - 28 Alahgholi-Hajibehzad M, Oflazer P, Aysal F, et al. Regulatory function of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with myasthenia gravis is associated with phenotypic changes and STAT5 signaling: 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates the suppressor activity[J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 281:51-60.
 - 29 Khoo A L, Joosten I, Michels M, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells[J]. *Immunology*, 2011, 134(4):459-468.
 - 30 Chambers ES, Suwannasaen D, Mann EH, et al. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ in combination with transforming growth factor-beta increases the frequency of Foxp3⁺ regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2 [J]. *Immunology*, 2014, 143(1):52-60.
 - 31 Cigerli O, Parildar H, Unal AD, et al. Vitamin D deficiency is a problem for adult out-patients? A university hospital sample in Istanbul, Turkey [J]. *Public Health Nutr*, 2013, 16(7):1306-1313.
 - 32 Li Q, Barish S, Okuwa S, et al. A functionally conserved gene regulatory network module governing olfactory neuron diversity[J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(1):e1005780.
 - 33 Guillermo GR, Tellez-Zenteno JF, Weder-Cisneros N, et al. Response of thymectomy: clinical and pathological

- characteristics among seronegative and seropositive myasthenia gravis patients[J]. *Acta Neurol Scand*, 2004, 109(3):217-221.
- 34 Hatton PD, Diehl JT, Daly BD, et al. Transsternal radical thymectomy for myasthenia gravis: a 15-year review[J]. *Ann Thorac Surg*, 1989, 47(6):838-840.
- 35 Busch C, Machens A, Pichlmeier U, et al. Long-term outcome and quality of life after thymectomy for myasthenia gravis[J]. *Ann Surg*, 1996, 224(2):225-232.
- 36 Frist WH, Thirumalai S, Doehring CB, et al. Thymectomy for the myasthenia gravis patient: factors influencing outcome[J]. *Ann Thorac Surg*, 1994, 57(2):334-338.
- 37 Jakubikova M, Pitha J, Mareckova H, et al. Two-year outcome of thymectomy with or without immunosuppressive treatment in nonthymomatous myasthenia gravis and its effect on regulatory T cells[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 358(1-2):101-106.
- 38 Zhang C, Shan J, Feng L, et al. The effects of immunosuppressive drugs on CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells: a systematic review of clinical and basic research[J]. *J Evid Based Med*, 2010, 3(2):117-129.
- 39 Barrat FJ, Cua D J, Boonstra A, et al. *In vitro* generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(5):603-616.
- 40 Xu WH, Zhang AM, Ren MS, et al. Changes of Treg-associated molecules on CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in myasthenia gravis and effects of immunosuppressants[J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(5):975-983.
- (收稿日期:2016-03-14)
(本文编辑:周珠凤)

徐朋亮,朱勇俊,宋阳,等.调节性 T 细胞在重症肌无力研究中的进展[J/CD]. *中华胸部外科电子杂志*, 2016, 3(4):234-238.

中华医学会