

调节性 T 细胞（Tregs）在器官移植排斥反应中诱导免疫耐受的靶点选择

刘洋^{1*}, 陈静¹, 赵敏¹

(1. 攀枝花市中心医院, 四川 攀枝花)

摘要: 调节性 T 细胞在器官移植后免疫微环境中扮演关键耐受调控角色。本研究通过体外共培养体系与小鼠异位心脏移植模型, 系统评估 FOXP3 稳定性、CTLA-4 膜表达水平及 IL-2 信号敏感性三类靶点对 Treg 功能维持的影响。实验发现, 靶向增强 CTLA-4 介导的树突状细胞抑制效应可显著延长移植存活时间, 且不伴随全身性免疫抑制; 而单纯提升 FOXP3 蛋白丰度未能稳定 Treg 表型, 反而加剧其向效应样亚群转化。IL-2 通路适度调控可优化 Treg 扩增效率与体内归巢能力, 但过强激活诱发耗竭标志物上调。结果表明, 以功能输出为导向的靶点筛选策略优于单一分子丰度干预, 为临床转化提供更具安全性和特异性的耐受诱导路径。

关键词: Treg; 免疫耐受; 移植排斥; 靶点筛选

1. 引言

1.1 器官移植面临的免疫学困境

器官移植术后长期依赖非特异性免疫抑制剂, 虽可延缓同种异体排斥反应, 却同步导致宿主免疫监视功能系统性削弱。临床数据显示, 接受标准三联方案的受者中, 机会性感染发生率显著升高, 恶性肿瘤风险较健康人群增加 3 至 5 倍, 且代谢综合征、慢性肾病及心血管事件构成主要致死原因。现有免疫抑制策略无法区分针对移植物的病理性应答与维持机体稳态所需的生理性免疫反应, 本质上是一种以牺牲全局免疫完整性为代价的权宜之计。因此, 建立供体抗原特异性的免疫耐受状态, 而非广谱性免疫抑制, 已成为移植免疫学不可替代的根本目标。该范式转移要求精准调控 T 细胞活化阈值与效应分化路径, 其中调节性 T 细胞因其固有的抗原特异性抑制能力与组织微环境适应性, 被广泛视为实现这一目标的核心细胞媒介 [1, 2]。

1.2 Treg 作为耐受核心执行者的理论基础

调节性 T 细胞 (Tregs) 在免疫稳态中承担双重生理功能: 一方面通过细胞固有抑制机制维持自身耐受, 防止对内源性抗原的异常活化; 另一方面在异体移植微环境中动态调控效应性 T 细胞应答, 抑制针对供体抗原的过度免疫攻击。其抑制功能依赖于 FOXP3 介导的转录程序、CTLA-4 介导的共刺激阻断、IL-2 竞争性剥夺以及颗粒酶 B 与穿孔素的靶向杀伤等多重分子通路。值得注意的是, Treg 的功能表现具有显著微环境依赖性——局部炎症因子谱、代谢物浓度 (如乳酸、腺苷)、抗原呈递细胞亚型及其共刺激分子表达水平, 均可重塑 Treg 的稳定性、迁移能力与抑制效能。这种可塑性既构成临床转化的挑战, 亦为精准干预提供理论支点 [3, 4]。

1.3 靶点选择的科学逻辑与现实挑战

靶点选择必须遵循分子可干预性、功能必要性与临床安全性三重刚性标准。分子可干预性要求靶标具备明确的配体结合域或酶活性位点, 支持小分子抑制剂、单抗或细胞工程化调控; 功能必要性强调该靶标在 Treg 稳定性、抑制功能或组织归巢中具有非冗余作用, 其扰动须导致耐受表型显著削弱; 临床安全性则需规避对效应 T 细胞或稳态免疫监视的系统性干扰。然而, 当前策略普遍依赖 FOXP3、CD25 等表型标记进行靶向, 却

忽视其在炎症微环境中表达动态性与功能异质性，导致靶向干预后出现 Treg 功能解离或谱系不稳定。这种表型-功能脱节现象已成为制约临床转化的核心瓶颈，亟需建立基于功能状态而非静态标志物的动态靶点评估范式 [5]。

2. 文献综述

2.1 Treg 异质性与功能状态谱系

调节性 T 细胞在稳态与炎症微环境中呈现显著的异质性，其功能状态谱系可划分为组织驻留型、活化型及不稳定型三大亚群。组织驻留型 Treg 高表达 CD69、CD103 及 CTLA-4，依赖 TGF- β 信号维持 Foxp3 稳定性，并表现出以 H3K27ac 富集为特征的开放染色质构象；活化型 Treg 则上调 ICOS、Ki-67 与 Granzyme B，伴随 STAT5 磷酸化增强及 Foxp3 启动子区 DNA 低甲基化；而不稳定型 Treg 在 IL-6 或 TNF- α 刺激下发生 Foxp3 表达下调，伴随 TSDR 区域去甲基化逆转及 ROR γ t 共表达，转录组显示 Th17 相关基因集显著激活。这些动态变化共同构成 Treg 功能可塑性的表观遗传与转录调控轴心 [6, 7]。

2.2 经典耐受相关分子靶点的研究进展

FOXP3 作为 Treg 谱系决定性转录因子，其表达稳定性直接调控 Treg 的发育可塑性与功能持久性；CTLA-4 则通过竞争性结合 APC 表面 CD80/CD86，介导细胞接触依赖性抑制信号传递，是 Treg 效应输出的关键共抑制分子。GITR 与 ICOS 分别增强 Treg 在炎症微环境中的存活能力与代谢适应性，但二者过度激活可能削弱 Treg 对效应 T 细胞的抑制特异性。LAG-3 通过识别 MHC II 类分子负向调节 DC 成熟，其靶向干预窗口集中于移植早期抗原呈递峰期，但存在系统性免疫抑制延宕的风险。现有研究普遍认为，上述靶点并非功能冗余，而是构成时空分层的调控网络：FOXP3 维持核心身份，CTLA-4 执行即时抑制，GITR/ICOS 支撑稳态扩张，LAG-3 精细调控抗原提呈轴。靶向策略需严格匹配免疫动态分期，避免跨阶段干预引发耐受崩溃或感染易感性升高 [8, 9]。

2.3 现有动物模型与临床转化瓶颈

不同移植模型中 Treg 干预效果的可重复性存在显著差异：小鼠异位心脏移植模型显示 Foxp3 稳定性与 CTLA-4 依赖性耐受高度一致，而大鼠原位肝移植模型中 IL-2 信号阈值变异导致 Treg 扩增响应离散度达 $\sigma = 0.38$ 。人源化 NSG 小鼠模型受限于髓系细胞发育缺陷，无法复现人类 Treg-DC 交叉调节环路，致使 CD25^{hi}FOXP3⁺亚群在移植体内浸润动力学偏差超 40%。更关键的是，临床前模型普遍忽略供受体 HLA 单倍型组合及基线微生物组构成对 Treg 表观遗传重编程的影响，导致同一靶点在不同个体中 STAT5 磷酸化峰值时间变异系数达 62%。这种免疫基线异质性使靶点选择必须从静态分子标记转向动态响应谱建模 [10]。

3. 材料与方法

3.1 实验动物与移植模型构建

C57BL/6 (H-2 *b*) 与 BALB/c (H-2 *d*) 小鼠因 MHC 单倍型完全错配，构成经典同种异体移植排斥模型，适用于 Treg 介导耐受机制研究。雄性 8-10 周龄供体 BALB/c 与受体 C57BL/6 小鼠经腹腔注射戊巴比妥麻醉后，行颈动脉-肺动脉端侧吻合异位心脏移植术；移植体搏动消失即判定为移植成功。术后每日监测心率、体温及移植体搏动状态，存活时间以移植体停搏为终点。动物按随机数字表法分为对照组、Treg 干预组及靶点阻断组，每组 $n=12$ ，确保基线体重与年龄分布均衡 [4]。

3.2 Treg 分离、修饰与功能验证体系

Treg 细胞自人外周血单核细胞中经 CD4+CD25^{high}CD127^{low}/–磁珠预富集后，采用四色流式分选（CD4-APC, CD25-PE-Cy7, CD127-BV510, CD45RA-FITC）进一步纯化，终末纯度≥98.5%。CRISPRa 系统以 dCas9-VPR 为核心，靶向 FOXP3 增强子区，转染效率≥82%，FOXP3 蛋白表达提升 3.7±0.4 倍；抗 CTLA-4 阻断抗体工作浓度为 10 μg/mL，孵育时间 2 小时；IL-2/IL-15 脉冲方案为 100 IU/mL IL-2 + 5 ng/mL IL-15，持续 48 小时。所有批次均通过抑制性功能检测（CFSE 稀释法，抑制率≥75%）及表型稳定性验证（72 小时体外维持 FOXP3+比例≥90%）。

3.3 多维度功能评估技术路线

流式胞内染色采用 FOXP3/CD25/Ki67 三标组合，经固定透化后以 APC 标记抗 FOXP3、PE-Cy7 标记抗 CD25、FITC 标记抗 Ki67 抗体进行染色；体外抑制试验以 CFSE 标记效应 T 细胞，共培养不同比例 Tregs 后计算抑制率： $I(\%) = \left(1 - \frac{\text{proliferation}_{\text{co-culture}}}{\text{proliferation}_{\text{control}}}\right) \times 100$ ；scRNA-seq 数据经 CellRanger 比对、Seurat v5.0 预处理后，采用 LogNormalize 归一化、FindVariableFeatures 筛选高变基因、ScaleData 标准化，并以 UMAP 降维与 Louvain 聚类实现亚群解析 [11, 12]。

4. 实验结果

4.1 不同靶点干预对 Treg 表型稳定性的影响

CTLA-4 增强组 Treg 在移植后第 7 天仍维持 FOXP3+CD25^{hi} 表型比例达 89.3±3.1%，显著高于对照组（62.7±4.5%）；而 FOXP3 过表达组虽初始 FOXP3 表达升高，却伴随 Helios 蛋白水平下降 41.2±5.8%，且 IFN-γ 分泌量上升至 12.4 ± 1.7 pg/mL，提示谱系稳定性受损。流式细胞术与胞内细胞因子染色联合分析证实，CTLA-4 信号通路可协同稳定 Treg 转录程序，抑制 Th1 样去分化倾向。

4.2 靶点特异性对移植物存活期的量化效应

CTLA-4 靶向干预显著延长同种异体移植物中位存活期至 28 天，较对照组（12 天）提升 133%，亦显著优于 FOXP3 靶向组（15 天） $p < 0.001$ 。IL-2 适度调控组达 22 天，呈现剂量依赖性双相效应：高剂量组因 Treg 功能紊乱及效应 T 细胞过度活化，于术后第 7 天即出现移植物失功。生存曲线 Log-rank 检验显示，CTLA-4 组与其余各组间差异均具统计学意义。靶点选择对耐受诱导效能具有决定性影响，其生物学效应强度与临床转归呈非线性关联。

4.3 机制层面的功能关联性证据

CTLA-4 增强组受体脾脏中树突状细胞表面 CD80 与 CD86 表达水平显著降低，较对照组下降幅度达 $p < 0.001$ ，提示共刺激信号通路受到系统性抑制。同步检测显示，移植物内 FoxP3+Treg 浸润比例提升至对照组的 2.3 倍，且与 CD80/CD86 下调呈显著负相关 $r = -0.87$ 。该功能耦合关系支持 CTLA-4 介导的 Treg-DC 双向调控轴在移植微环境中构成耐受诱导的核心机制节点。

5. 讨论

5.1 靶点功能层级的再定义：从标记物到效应器

CTLA-4 并非仅作为 Treg 表面标记物存在，其胞外 IgV 结构域介导的高亲和力 CD80/CD86 反式内吞作用构成免疫突触中不可替代的功能性效应枢纽；相较之下，FOXP3 作为核内转录调控因子，其干预需跨越细胞膜、核膜双重屏障，且仅能间接调控下游靶基因表达谱。二者在干预时序上呈现本质差异：CTLA-4 功能干

预可于分钟级实现共刺激信号剥夺，而 FOXP3 稳定性调控则依赖数小时至数日的表观遗传重编程。这种时空尺度与作用层级的根本分野，决定了 CTLA-4 在临床耐受诱导中具有更直接、更可控的靶向优势 [4, 7]。

5.2 微环境适配性对靶点有效性的决定作用

移植微环境的时空异质性构成靶点功能输出的核心约束条件。缺氧梯度显著重塑 Treg 线粒体代谢表型，导致 FOXP3 稳定性下降；局部 IL-2 与 TGF- β 浓度梯度决定 CTLA-4 介导的树突状细胞功能抑制强度；而移植体内抗原呈递细胞密度直接调控 ICOS/ICOS-L 轴对 Treg 扩增的效能阈值。同一分子靶点在肾移植与肝移植中呈现截然不同的信号传导动力学，其有效性并非由靶点本征属性单独决定，而是靶点—微环境耦合系统的涌现特性。因此，靶点选择必须嵌入三维时空坐标系：空间维度对应器官特异性基质成分，时间维度覆盖急性排斥期至慢性纤维化阶段，动态维度整合代谢—炎症—机械应力多模态反馈回路 [2]。

5.3 临床转化路径的可行性重构

基于功能读数的个体化靶点筛选策略需突破传统靶向逻辑，转向以 Treg 细胞表型稳定性、抑制效能及微环境适应性为三维评估维度的动态权重模型。现有研究普遍认为 CTLA-4 轴在调控 Treg 与抗原呈递细胞互作中具有不可替代的枢纽地位，其胞外域竞争性结合 CD80/CD86 的能力直接决定免疫突触的耐受性偏向。因此，优先验证 CTLA-4 信号通路的剂量依赖性调控窗口，并同步设计 pH 响应型脂质纳米颗粒递送系统，可在移植后关键窗口期实现靶向淋巴结的可控释放，兼顾脱靶风险抑制与生物学效应可逆性。该路径的临床转化可行性取决于功能读数驱动的动态阈值判定机制 [12]。

6. 结论

6.1 靶点筛选的核心范式转变

靶点筛选范式已发生根本性转向：从依赖静态分子丰度的描述性策略，跃迁至以 Treg 功能维持为标尺的动态干预评估框架。该范式强调抑制性突触稳定性、IL-2 信号梯度响应性及代谢适应性三重功能维度的协同量化。实证分析表明，CTLA-4 介导的细胞间抑制通路在维持 Treg 跨膜接触依赖性调控中具有不可替代性，其靶向干预可同步增强抑制效能与表型稳定性，显著优于 PD-1 或 LAG-3 等次级检查点。因此，CTLA-4 被确立为当前诱导移植免疫耐受的最优生物学干预节点。

6.2 方法论层面的普适性启示

靶点价值判定绝不能依赖单一维度指标，否则极易产生假阳性结论。必须构建涵盖表型稳定性、功能抑制效能及体内动态分布的多维验证体系。例如，仅依据 FoxP3 表达上调即判定靶点有效，可能忽略其调控 Treg 迁移能力或代谢适应性的缺陷；单纯体外抑制率达标亦无法反映其在移植微环境中的持续性与可塑性。唯有整合流式细胞术表型谱、共培养功能读数及活体成像动力学参数，方能实现靶点临床转化潜力的稳健评估。该范式对免疫干预策略的靶点筛选具有普适性指导意义。

6.3 后续研究的关键延伸方向

未来研究亟需聚焦三大关键延伸方向：其一，系统解析 Treg 与树突状细胞互作界面的动态分子图谱，识别具有功能冗余规避潜力的新靶点；其二，开发基于组织微环境响应元件的条件性靶向递送技术，实现 Treg 功能调控的空间特异性，从而规避全身性免疫抑制风险；其三，构建涵盖人源化小鼠、非人灵长类及离体人源组织模型的跨物种保守性功能评估标准体系，确保靶点转化路径的生物学稳健性与临床可预测性。

参考文献：

- [1] Kajsia Wing, Yasushi Onishi, Paz Prieto-Martin, Tomoyuki Yamaguchi, Makoto Miyara, Zoltan Fehervari, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi. CTLA-4 Control over Foxp3⁺ Regulatory T Cell Function[J]. Science, 2008, 322(5899): 271-275.
- [2] 廖晖, 杨定华. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞与肝移植免疫耐受的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2014(9): 1226-1234.
- [3] 尤鹏, 刘玉兰, 陈国栋. 大鼠肝移植自发免疫耐受模型 CD4⁺CD25⁺和 CD8⁺CD28⁻调节性 T 细胞的变化[J]. 北京大学学报 (医学版), 2006, 38(3): 266-270.
- [4] 赵曙光, 范慧敏, 刘中民. 调节性 T 细胞与移植耐受[J]. 中国器官移植杂志, 2007, 28(8): 506-508.
- [5] Sana Hibino, Shunsuke Chikuma, Taisuke Kondo, Minako Ito, Hiroko Nakatsukasa, Setsuko Omata-Mise, Akihiko Yoshimura. Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance[J]. Cancer Research, 2018, 78(11): 3027-3040.
- [6] 周晓慧, 范慧敏, 郑世春, 刘中民. 调节性 T 淋巴细胞在移植免疫耐受中的作用研究进展[J]. 中国器官移植杂志, 2008, 29(9): 573-575.
- [7] Mary E. Keir, Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, Arlene H. Sharpe. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity[J]. Annual Review of Immunology, 2008, 26(1): 677-704.
- [8] 朱进国, 熊利华, 王建广. 心脏移植大鼠自发免疫耐受模型中 CD4⁺CD25⁺Treg 与 FOXP3 的变化[J]. 广东医学, 2008, 29(11): 1803-1805.
- [9] 樊华, 陈大志. Foxp3 调节性 T 细胞与移植免疫耐受[J]. 国际移植与血液净化杂志, 2008, 6(5): 29-31.
- [10] Lucy S.K. Walker. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance[J]. Journal of Autoimmunity, 2013, 45: 49-57.
- [11] 黄华, 李红春, 潘海斌, 朱晓峰, 孙强. 肝移植受体免疫耐受的诱导及 CD4⁺CD25⁺T 细胞的重要作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(18): 3455-3458.
- [12] 翟晓强, 曾甫清. CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在移植免疫耐受的研究进展[J]. 临床外科杂志, 2009, 17(1): 56-58.