

· 综述 ·

缓解 1 型糖尿病新策略:以调节性 T 细胞为干预靶点

杨雪 陈煜 陈国芳 刘超

南京中医药大学附属中西医结合医院内分泌科,南京 210028

通信作者:陈国芳,Email:chengguofang9801@126.com;刘超,Email:liuchao@nfmcn.com

【摘要】 1 型糖尿病主要是由 T 细胞介导的针对胰岛 β 细胞的自身免疫性疾病,主要依赖胰岛素治疗,移植疗法可有效恢复胰岛功能,但存在术后排异等问题。近来的研究发现,调节性 T 细胞在 1 型糖尿病的发生发展以及移植治疗后的免疫稳态中发挥着关键作用。以调节性 T 细胞为干预靶点的疗法可作为一种重要手段在 1 型糖尿病中减轻(消除)自身免疫,以延缓疾病进展或逆转疾病进程;应用于 1 型糖尿病移植治疗后,则可缓解乃至消除术后的排异反应。该策略为 1 型糖尿病的治疗及缓解开辟了新的思路。

【关键词】 1 型糖尿病;调节性 T 细胞;防治;逆转;缓解

基金项目:江苏省第十六批“六大人才高峰”项目(WSN-035)

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20211227-12064

A new strategy for reversing type 1 diabetes: targeting regulatory T cells Yang Xue, Chen Yu, Chen Guofang, Liu Chao. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Corresponding author: Chen Guofang, Email: chengguofang9801@126.com; Liu Chao, Email: liuchao@nfmcn.com

【Abstract】 Type 1 diabetes is an autoimmune disease mainly mediated by T cells and targeted at islet beta cells. It mainly relies on insulin therapy. Transplantation therapy can effectively restore the function of the islet, but there are problems such as postoperative rejection. Recently, regulatory T cells have been found to play an important role in the development of type 1 diabetes and in immune homeostasis after transplantation therapy. Therapies targeting regulatory T cells may be a means to reduce/eliminate autoimmunity, delay disease progression, or reverse disease progression in type 1 diabetes; After transplantation for type 1 diabetes, it can alleviate/eliminate the rejection reaction after surgery. This strategy provides a new idea for the treatment and reversal of T1DM.

【Keywords】 Type 1 diabetes mellitus; Regulatory T cells; Prevention and control; Reversal; Remission

Fund program: The 16th batch of “Six Talent Peak” projects in Jiangsu Province(WSN-035)

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20211227-12064

随着医疗技术的发展,糖尿病的治疗观点已从过去的只可控制转变到现在的可以缓解(逆转)^[1]。其中,2 型糖尿病缓解方法较多,且效果明确^[2],并由权威学术机构发布了立场声明^[1,3]。而 1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)缓解(逆转)的研究较少,因其特殊病因(自身免疫破坏胰腺 β 细胞),常规治疗难以逆转已被破坏的 β 细胞功能。而移植治疗(胰岛移植、胰腺移植、干细胞移植)通过补充外源性胰岛 β 细胞,起到了恢复胰岛功能的作用,有望缓解(逆转)T1DM。但该类技术尚未完

全成熟,临床应用较少,且多数患者术后需要终生免疫治疗^[4]。因此,亟待找到新的缓解(逆转)T1DM 的手段或优化移植治疗的辅助措施。

调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)是调节机体免疫稳态的关键细胞,其数量和(或)功能的下降使 Tregs/效应 T 细胞(effector T cell, Teffs)之间的功能失衡所致的机体免疫稳态破坏在多种自身免疫性疾病的发病中起着重要作用,包括 T1DM^[5]。因此,基于提高 Tregs 的数量和功能的疗法可在新发病的 T1DM 中减轻或消除自身免疫,延缓疾病进展

或逆转疾病进程;应用于 T1DM 移植治疗后的患者,则可缓解甚至消除术后的排异反应。

1 Tregs 是维持机体免疫稳态的关键细胞

Tregs 是 CD4⁺ T 细胞的一个亚型,其主要功能是抑制机体对自身抗原不适当的免疫反应^[5]。Tregs 最重要的分子标记是特异性转录因子叉头框蛋白 P3 (forkhead box protein 3 transcription factor, FOXP3),其在 Tregs 的分化和功能调节方面起重要作用^[6]。Tregs 可通过调节 Teffs、自然杀伤细胞、B 细胞、树突状细胞的激活和增殖抑制免疫应答。有 4 种机制介导这些效应^[5]:(1)分泌抑制性细胞因子;(2)通过细胞溶解机制杀死靶细胞;(3)通过代谢阻断介导的机制产生抑制效应;(4)通过调节靶向抗原提呈细胞来调节机体免疫。Tregs 数量减少或者功能缺陷,将影响机体的免疫状态,使得免疫稳态遭到破坏,从而引起自身免疫耐受紊乱,导致自身免疫性疾病的发生和发展。

2 Tregs 参与 T1DM 的发生和发展

早在 20 世纪 80 年代,就有研究发现 T1DM 的发病可能与 Tregs 相关^[7]。1995 年, Sakaguchi 等^[8]报道,脱 Tregs 小鼠出现严重的自身免疫(包括 T1DM),Tregs 重建则可以剂量依赖性的方式有效地阻止上述自身免疫的发展,进一步确定了 Tregs 在自身免疫疾病中的重要作用。此后,除个别研究发现 T1DM 患者(尤其初发者)的 Tregs 数量和健康患者并无明显差异外^[9],大多数研究均发现 T1DM 伴随 Tregs 的数量减少。一项研究在发现新发的 T1DM 患者的 Tregs 水平正常后,对这些患者的 Tregs 进行体外实验,发现其增殖的功能明显下降,且发生促进炎症的表现,提示 Tregs 功能障碍在 T1DM 发病中也起着重要作用^[10]。另有研究提示,新发 T1DM 患者和有 T1DM 患病高风险的受试者的 Tregs 凋亡增加、功能显著降低,说明在临床发病之前,Tregs 存活及功能即存在缺陷^[11]。上述研究表明,Tregs 数量及功能缺陷应是导致 T1DM 发病的因素,而不是其患病后的继发现象。

3 Tregs 可减轻或消除 T1DM 移植治疗后的排异反应

移植治疗可使 T1DM 患者脱离胰岛素治疗数年甚至 10 年以上^[12]。自身免疫已被证明可以影响移植术后的临床成功程度^[13]。因此,增加移植手术的耐受性至关重要,在导致手术耐受的复杂机制中,Tregs 尤为关键^[14]。早在 2002 年, Graca 等^[15]将耐

受的皮肤移植物重新移植到缺乏 Tregs 的宿主上后,发现浸润了移植物的 Tregs 会离开移植物并重新定殖该宿主,继续发挥其调节免疫的功能,首次强调了 Tregs 在移植耐受性中的关键作用。此后,大量研究证明了 Tregs 在多器官移植模型耐受诱导和维持免疫稳态中的重要性。目前,虽然针对糖尿病移植治疗后 Tregs 的作用尚无直接证据,但多项研究间接发现 Tregs 可减轻或消除 T1DM 移植治疗后的排异反应。如 Berney 等^[16]发现 1 位接受胰岛移植后移植物存活长达 11 年的患者体内的 Tregs 数量显著高于其他胰岛移植的患者,推测胰岛细胞长期存活可能与 Tregs 有关。笔者团队前期的研究亦发现:向小鼠体内输注抗原特异性 Tregs 可以延长同种异体胰岛移植物的存活时间^[17]。

4 基于 Tregs 缓解 T1DM 的研究

4.1 丙酮酸乙酯预防 T1DM 丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)是稳定的丙酮酸衍生物,是高迁移率蛋白 B1 (high mobility group proteins B1, HMGB1)的抑制剂, HMGB1 广泛分布于哺乳动物细胞,可诱导炎症反应,参与包括 T1DM 在内的多种自身免疫性疾病及感染性疾病的发生发展。EP 在类风湿关节炎和脑脊髓炎的动物模型中发挥抗氧化和抗炎作用。Koprivica 等^[18]在小剂量链脲佐菌素诱导的 C57BL/6 小鼠腹膜内给予 EP 治疗,发现除降低 HMGB1 表达外, EP 治疗还成功干预了局部胰腺淋巴结和胰腺内的炎症反应,通过增强 Tregs 的分化、增殖、抑制能力和在胰腺中的聚集,从而降低了 C57BL/6 小鼠的 T1DM 发病率。

4.2 青蒿素及其衍生物青蒿琥酯预防 T1DM 最近的研究表明,除疟疾外,青蒿素及其衍生物青蒿琥酯(artemunate, AS)还可以缓解几种自身免疫性疾病。但是, AS 在预防或治疗 T1DM 中是否起作用尚不清楚。因此, Li 等^[19]在非肥胖糖尿病(non-obese diabetes, NOD)小鼠的饮用水中加入 AS, 对照组加入二甲基亚砜。发现对照组 62.5% 的小鼠发展为糖尿病,而 AS 组只有 25% 的小鼠出现糖尿病。另外,在 AS 组小鼠胰腺中发现更多的 Tregs, 促炎细胞因子的 mRNA 水平降低,且产生白细胞介素(IL)-4 的 CD4⁺ 单阳性 T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的比率显著升高。表明 AS 给药主要可通过减少自身免疫性 T 细胞和增加 Tregs 来预防 NOD 小鼠中的 T1DM。

4.3 RGI-3100-iB 预防 T1DM 使用胰岛自身抗原恢复免疫耐受的抗原特异性免疫疗法已成为治疗

T1DM 的最有前途的方法之一。Akimoto 等^[20]报道, RGI-3100-iB 作为一种新型脂质体制剂, 同时具有恒定的自然杀伤 T 细胞的代表性配体 α -半乳糖神经酰胺和胰岛素 B 链 9-23 肽, 可以以肽依赖的方式诱导胰岛中 Tregs 的集聚, 进而显著预防 NOD 小鼠的糖尿病发生。RGI-3100-iB 协同增强了每种单药疗法的预防效果, 免疫病理分析表明其亦减轻了 NOD 小鼠中的胰岛炎。

4.4 药物联合 Tregs 疗法逆转 T1DM T1DM 涉及免疫调节机制的丧失, 从而导致组织特异性细胞毒性增加。Mbongue 等^[21]制备了一种新型的口服疫苗, 使用减毒沙门氏菌活疫苗来递送转化生长因子- β 、IL-10 和胰岛素原, 并与低剂量的抗 CD3 单克隆抗体结合使用。予 NOD 小鼠口服上述联合制剂可逆转 NOD 小鼠中的新发 T1DM。并且, 联合疗法的效果与诱导免疫抑制性 Tregs 和 CD4⁺、CD49b⁺、LAG3⁺、Tr1 细胞有关。在过继转移实验中, 添加或消耗 Tregs 或 Tr1 细胞表明两者对于预防联合治疗的小鼠的糖尿病都很重要, 但 Tr1 细胞可能扮演更重要的角色。这些结果也证明了口服沙门氏菌联合疗法在早期 T1DM 治疗中的潜力。

4.5 CD154 单克隆抗体治疗抑制胰岛移植后排异反应 抗 CD154 单克隆抗体 (anti-CD154 monoclonal antibody, anti-CD154 mAb) 治疗具有诱导器官移植免疫耐受的潜力。Yoon 等^[22]先将分离纯化的成年猪胰岛细胞在糖尿病 C57BL/6J 小鼠肾囊下移植, 在移植后 0、1、3、5 和 7 d 每天服用 0.5 mg/小鼠抗 CD154 mAb, 通过血糖水平监测移植物存活状况。免疫组织化学染色显示, 移植小鼠周围部位的 Tregs 比率明显更高, 但受体小鼠的脾脏和肾脏引流淋巴结中的 Tregs 比率却更高。Tregs 的耗竭引起了移植物排斥, 而从抗 CD154 mAb 处理的受体中 Tregs 的过继转移为移植物的排斥提供了保护。这些 Tregs 具有比未处理的对照组更强的抑制能力, 且具有猪抗原特异性。该研究表明, 抗 CD154 mAb 单一疗法可使小鼠猪胰岛移植物长期存活, 移植物周围部位的猪特异性 Tregs 在保护胰岛移植物免受排斥中起着关键作用。

4.6 Tregs 扩增抑制胰岛移植后排异反应 通过 Tregs 扩增来增加 Tregs/Teffs 比率, 可在 T1DM 或移植治疗后减轻/消除自身免疫, 延缓疾病进展或逆转疾病进程。这种扩张可以在体外或体内进行。

Marek-Trzonkowska 等^[23]对 12 例 T1DM 儿童进

行的自体扩增离体 Tregs 治疗后的一年随访中没有观察到严重的不良反应, 该试验发现, Tregs 输注后, 外周血中 Tregs 数量增加, 大多数患者对治疗的反应是 C 肽水平升高。Tregs 的使用还降低了对外源性胰岛素的需求, 并且有两个患儿在一年内完全不依赖胰岛素, 表明了 Tregs 体外扩增注入治疗的安全性, 并可以延长 T1DM 中 β 细胞的存活。胰岛移植后体外扩增 Tregs 输注治疗目前尚无明确的研究结果。虽然这一治疗方法多年在不断的改进与完善, 但因扩增的时间及技术要求高, 费用较昂贵等问题, 其临床应用较少, 其在 T1DM 移植治疗后的临床经验更加有限。

临床前模型中的许多干预措施已经被证明能在体内诱导明显的 Tregs 扩增, 从而预防、延缓甚至逆转 T1DM。基于 IL-2 的免疫治疗是少数专门关注体内 Tregs 扩张的药物之一。Hu 等^[24]建立了 T 细胞介导的人胰岛异体移植排斥反应的糖尿病人源化 NOD-scidIL2R γ null (NSG) 小鼠模型, 并开发了低剂量重组人 IL-2 联合低剂量雷帕霉素的治疗方案。单独使用 IL-2 或单独使用雷帕霉素 3 周不能延长生存期。但是, 雷帕霉素与 IL-2 的组合治疗 3 周显著延长了人胰岛同种异体移植的存活时间。移植物存活与 Tregs 的扩增以及 CD4⁺T 细胞产生的转化生长因子- β 产生的增强有关。IL-2 和雷帕霉素的组合具有通过在体内扩增 Tregs 和抑制效应细胞功能来抑制人胰岛异体移植排斥的潜力, 并可能是基于机体的有效耐受。同样, 临床前研究证据表明, 在体内, Tregs 的扩增可以延长移植物存活。然而, 临床应用受到了 Tregs 扩增不理想、不良影响较大等因素的阻碍。

5 总结与展望

近年来, 随着 T1DM 相关研究的进展, 发现 Tregs 与 T1DM 的发生发展以及移植治疗后的排异反应密切相关, 基于提高 Tregs 的数量和功能的 Tregs 疗法可作为一种全新手段在新发病的 T1DM 中减轻 (消除) 自身免疫, 延缓疾病进展或逆转疾病进程。大量动物实验也显示了该策略的有效性 & 安全性。然而, 迄今仍有许多问题亟待解决, 比如, 很多实验在动物及体外完成, 在临床及体内的作用机制及效果还值得商榷; 一些免疫抑制剂在体内是否会导致较为严重的免疫低下尚不可知; 对于 Tregs 的特异性的生物标记亦有待进一步探究。尽管如此, 增加 Tregs 数目和 (或) 功能的策略已被视为治

疗 T1DM 的较有前景的方法,并且,已经出现了使用这些策略的若干临床试验。深入研究 Tregs 对 β 细胞的保护机制及以 Tregs 为靶点的治疗策略,可为有效防治甚至逆转 T1DM 提供新的思路和方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Riddle MC, Cefalu WT, Evans PH, et al. Consensus report: definition and interpretation of remission in type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2021, 44(10): 2438-2444. DOI: 10.2337/doi21-0034.
- [2] 杨雪, 陈国芳, 刘超. 逆转 2 型糖尿病的现状与展望[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(7): 666-672. DOI: 10.3760/cma.j.cn115791-20210305-00127.
- [3] Kelly J, Karlsen M, Steinke G. Type 2 diabetes remission and lifestyle medicine: a position statement from the American college of lifestyle medicine[J]. *Am J Lifestyle Med*, 2020, 14(4): 406-419. DOI: 10.1177/1559827620930962.
- [4] Rickels MR, Robertson RP. Pancreatic islet transplantation in humans: recent progress and future directions[J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(2): 631-668. DOI: 10.1210/er.2018-00154.
- [5] Marfil-Garza BA, Hefler J, Bermudez De Leon M, et al. Progress in translational regulatory T cell therapies for type 1 diabetes and islet transplantation[J]. *Endocr Rev*, 2021, 42(2): 198-218. DOI: 10.1210/endrev/bnaa028.
- [6] Atif M, Conti F, Gorochov G, et al. Regulatory T cells in solid organ transplantation[J]. *Clin Transl Immunology*, 2020, 9(2): e01099. DOI: 10.1002/cti2.1099.
- [7] Boitard C, Yasunami R, Dardenne M, et al. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice[J]. *J Exp Med*, 1989, 169(5): 1669-1680. DOI: 10.1084/jem.169.5.1669.
- [8] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. 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]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [9] Hull CM, Peakman M, Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(10): 1839-1850. DOI: 10.1007/s00125-017-4377-1.
- [10] Lindley S, Dayan CM, Bishop A, et al. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(1): 92-99. DOI: 10.2337/diabetes.54.1.92.
- [11] Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jailwala P, et al. At-risk and recent-onset type 1 diabetic subjects have increased apoptosis in the CD4⁺CD25⁺ T-cell fraction[J]. *PLoS One*, 2007, 2(1): e146. DOI: 10.1371/journal.pone.0000146.
- [12] Rickels MR, Robertson RP. Pancreatic islet transplantation in humans: recent progress and future directions[J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(2): 631-668. DOI: 10.1210/er.2018-00154.
- [13] Pathak S, Meyer EH. Tregs and mixed chimerism as approaches for tolerance induction in islet transplantation[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 612737. DOI: 10.3389/fimmu.2020.612737.
- [14] Vaikunthanathan T, Safinia N, Boardman D, et al. Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 189(2): 197-210. DOI: 10.1111/cei.12978.
- [15] Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(12): 1641-1646. DOI: 10.1084/jem.20012097.
- [16] Berney T, Ferrari-Lacraz S, Bühler L, et al. Long-term insulin-independence after allogeneic islet transplantation for type 1 diabetes: over the 10-year mark[J]. *Am J Transplant*, 2009, 9(2): 419-23. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02481.x.
- [17] 张梅, 徐书杭, 徐瑜, 等. CFSE 标记抗原特异性 CD4⁺CD25⁺T 细胞在胰岛移植体内归巢的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(12): 1174-1176. DOI: 10.3321/j.issn:1007-8738.2008.12.013.
- [18] Koprivica I, Vujičić M, Gajić D, et al. Ethyl pyruvate stimulates regulatory T cells and ameliorates type 1 diabetes development in mice[J]. *Front Immunol*, 2019, 9: 3130. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03130.
- [19] Li Z, Shi X, Liu J, et al. Artesunate prevents type 1 diabetes in NOD mice mainly by inducing protective IL-4-producing T cells and regulatory T cells[J]. *FASEB J*, 2019, 33(7): 8241-8248. DOI: 10.1096/fj.201900146R.
- [20] Akimoto H, Fukuda-Kawaguchi E, Duramad O, et al. A novel liposome formulation carrying both an insulin peptide and a ligand for invariant natural killer T cells induces accumulation of regulatory T cells to islets in nonobese diabetic mice[J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 9430473. DOI: 10.1155/2019/9430473.
- [21] Mbongue JC, Rawson J, Garcia PA, et al. Reversal of new onset type 1 diabetes by oral salmonella-based combination therapy and mediated by regulatory T-cells in NOD mice[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 320. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00320.
- [22] Yoon IH, Chung H, Kim HJ, et al. Peri-graft porcine-specific CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells by CD40-CD154 blockade prevented the rejection of porcine islet graft in diabetic mice[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(5): e12533. DOI: 10.1111/xen.12533.
- [23] Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszek A, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets-results of one year follow-up[J]. *Clin Immunol*, 2014, 153(1): 23-30. DOI: 10.1016/j.clim.2014.03.016.
- [24] Hu M, Hawthorne WJ, Nicholson L, et al. Low-dose interleukin-2 combined with rapamycin led to an expansion of CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T Cells and prolonged human islet allograft survival in humanized mice[J]. *Diabetes*, 2020, 69(8): 1735-1748. DOI: 10.2337/db19-0525.

(收稿日期: 2021-12-27)