PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2025,52(4):946~956
www.pibb.ac.cn

诱导调节性T细胞抑制缺血性脑卒中神经炎症的研究*

亢天放[1,2)**] 马爱青[3)**] 陈丽琦[1,2)] 龚 含[1)] 欧阳佳城[3)] 潘 璠[1,2)***]
潘 宏[1,2)***] 蔡林涛[1,2)***]

([1)] 中国科学院深圳先进技术研究院，深圳 518055；[2)] 中国科学院大学，北京 100049；[3)] 广东医科大学药学院，东莞 523808）

摘要 目的 神经炎症在缺血性脑卒中的发生和发展过程中起着至关重要的作用，并显著影响中枢神经系统的恢复。过度的神经炎症可能导致继发性神经元损伤，进一步加重脑损害并阻碍功能恢复。因此，有效调控和减少脑内神经炎症已成为改善缺血性脑卒中预后的关键治疗策略。在众多方法中，通过免疫调节控制炎症反应逐渐受到广泛关注。本研究旨在探讨体外诱导的调节性T细胞（Treg细胞）在抑制缺血性脑卒中后神经炎症中的作用及其潜在的治疗效果。通过研究Treg细胞发挥免疫调节功能的机制，希望为缺血性脑卒中的治疗策略提供新的科学依据。**方法** 采用阴性选择的方法从小鼠脾脏中分离初始$CD4^+$ T细胞，以确保高纯度，然后通过添加特定细胞因子在体外诱导其分化为Treg细胞。评估Treg细胞移植在缺血性脑卒中小鼠模型中的抗炎作用及治疗潜力。在大脑中动脉闭塞（MCAO）模型中，移植Treg细胞后，观察其是否能顺利到达脑梗死区域，以及对神经炎症水平的影响。分析细胞因子表达的变化及其对免疫细胞相互作用的影响。测定梗死面积及行为学评分，以评估Treg细胞在神经保护方面的效果。通过整合多种指标，全面探讨Treg细胞在缺血性脑卒中治疗中的潜在优势。**结果** Treg细胞在体外和体内均显著调节了促炎和抗炎因子的表达水平，有效平衡免疫反应并抑制过度炎症。此外，Treg细胞能够抑制炎症细胞的激活和活性，从而减少神经炎症。在MCAO小鼠模型中，观察到Treg细胞在脑梗死区域富集，显著降低了梗死面积，显示出其神经保护作用。此外，Treg细胞治疗显著改善了行为学评分，提示其对功能恢复的促进作用，并且提高了缺血性脑卒中小鼠的存活率，突出了其作为卒中治疗潜在策略的应用价值。**结论** 体外诱导的Treg细胞能够有效抑制缺血性脑卒中引发的神经炎症，展现出良好的临床应用前景。通过调节促炎和抗炎因子平衡，Treg细胞可抑制神经系统中的免疫反应来减少神经元损伤。Treg细胞还能调控免疫微环境，抑制炎症细胞的激活，促进组织修复。此外，Treg细胞的治疗作用还包括增强卒中后恢复、改善行为学表现以及提高缺血性脑卒中小鼠的存活率。凭借其抑制神经炎症的特性，Treg细胞疗法为缺血性脑卒中的治疗提供了一种新颖且有效的策略，在临床免疫治疗和再生医学领域具有广阔的应用潜力。

关键词 调节性T细胞，缺血性脑卒中，神经炎症，细胞治疗，免疫调控
中图分类号 Q813.5，Q819，R743.31 **DOI**：10.16476/j.pibb.2025.0019 **CSTR**：32369.14.pibb.20250019

脑卒中目前已成为全球关注的重大健康问题[1]。其中，缺血性脑卒中约占所有脑卒中的80%[2]。目前美国食品及药物管理局（food and drug administration，FDA）批准的治疗缺血性脑卒中的方法为静脉注射重组组织纤溶酶原激活剂（rt-PAs）[3]。然而，由于治疗有严格的时间限制，许多患者无法得到及时医治，而且溶栓和机械性血栓切除术还伴随一定风险[4-6]，包括脑出血、再灌注损伤带来的神经炎症反应，最终导致病人残疾甚至死亡[7]。研究表明，导致这个结果的主要原因是缺血再灌注后的神经炎症反应（如神经元凋亡、小胶质细胞极化、星形胶质细胞过度活化等）[8]。

* 国家重点研发计划（2022YFC2402400，2023YFA0915400），广东省自然科学基金（2024A1515010825，2022A1515011337），广东省基础与应用基础研究基金（2022A1515111168）和深圳市医学科研基金（A2303057）资助项目。
** 并列第一作者。
*** 通讯联系人。
潘璠 Tel：0755-86528704，E-mail：fan.pan@siat.ac.cn
潘宏 Tel：0755-86585204，E-mail：hong.pan@siat.ac.cn
蔡林涛 Tel：0755-86392210，E-mail：lt.cai@siat.ac.cn
收稿日期：2025-01-13，接受日期：2025-02-28

脑卒中缺血再灌注后的神经炎症在缺血性脑损伤中的时空特异性已经得到广泛认可，其在再灌注后的不同阶段发挥着截然不同的作用[9]。在初期，再灌注导致梗死区域的血氧急剧上升，引发活性氧类（reactive oxygen species，ROS）的产生和促炎因子的释放，从而加重组织损伤。随后，免疫系统和神经胶质细胞（尤其是小胶质细胞）被激活，清除坏死细胞碎片、修复神经回路并重建突触。然而，炎症因子的多重作用可能导致小胶质细胞过度激活，进一步分泌肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）等炎性细胞因子，激活基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）等酶类，从而加重脑损伤。针对这一问题，研究人员发现抗炎药物在一定程度上可以减轻急性炎症损伤，但是仍有许多不足，如治疗指数低、神经修复失败以及恢复期脑重塑效果不佳[10]，难以实现长期有效的康复效果[11]。因此，开发能够有效缓解神经炎症的治疗策略，对于缺血性脑卒中的临床治疗和改善预后具有重要意义。

调节性T细胞（regulatory T cell，Treg cell）是$CD4^+$T细胞的一个亚群，占循环$CD4^+$T细胞的5%~10%[12]，在维持免疫自我耐受和限制炎症相关损伤方面发挥着至关重要的作用[13-14]。其作用机理包括分泌转化生长因子β（transforming growth factor-β，TGF-β）和白介素-10（interleukin-10，IL-10）等细胞因子，从而抑制$CD8^+$T细胞和自然杀伤细胞（natural killer cell，NK cell）的细胞毒性，并抑制自反应T细胞的激活与增殖[15-16]，同时也可通过调节炎症过程来保护大脑免受缺血性损伤[17]。在缺血性脑卒中患者中，Treg细胞数量急剧下降，并在随后显著恢复，这提示其在缺血性再灌注损伤中的重要调控作用[18-20]。基于这一现象，本研究探讨了回输补充体外诱导Treg细胞是否能够缓解缺血性脑卒中引发的神经炎症，从而为该疾病的治疗提供新的思路和策略。

本研究通过免疫磁珠的阴性筛选法，从小鼠脾脏、淋巴结分离得到$CD4^+$初始T细胞，在体外采用细胞因子诱导法，扩增成稳定表达转录因子Foxp3的Treg细胞。这些体外诱导的Treg细胞展现出与内源Treg细胞相同的免疫抑制功能，能够在体外和体内有效调节巨噬细胞与小胶质细胞的活性和功能。通过尾静脉将这些Treg细胞注入缺血性脑卒中小鼠体内，结果显示，这些细胞能够显著缓解脑内神经炎症，减轻缺血再灌注损伤，减少脑梗死体积，降低TNF-α、IL-6等炎症因子的表达，促进血脑屏障（blood-brain barrier，BBB）通透性的修复以及小鼠行为学的恢复，发挥保护大脑的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

抗小鼠CD3抗体和抗小鼠CD28抗体购自美国BioXcell公司。RPMI-1640培养基，小鼠$CD4^+$初始T细胞阴性分选试剂盒，白介素-2（IL-2），TGF-β，β巯基乙醇（2-mercaptoethanol），HEPES缓冲液（4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸），丙酮酸钠（sodium pyruvate），谷氨酰胺（glutamine），胎牛血清（fetal bovine serum，FBS），红细胞裂解液，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS），青霉素-链霉素溶液，PE偶联的抗小鼠Foxp3抗体，FITC偶联的抗小鼠CD25抗体，Percp-cy5.5偶联的CD4抗体，流式胞内固定破膜缓冲液购自美国Thermo Fisher公司。Evans Blue（EB）染料和Dio染料购自上海碧云天生物技术有限公司。IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-10酶联免疫分析（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒购自美国Biolegend公司。TGF-β ELISA试剂盒购自深圳市达科为生物技术股份有限公司。脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　$CD4^+$初始T细胞的提取

从C57BL/6小鼠分离脾脏组织，置于70 μm细胞滤器上进行研磨，获得均匀的单细胞悬液。随后，将悬液以300*g*离心5 min，收集细胞沉淀，并用3 ml红细胞裂解液重悬细胞，裂解8 min加入1 ml含10% FBS和1%双抗的1640完全培养基终止裂解反应，再次以300*g*离心5 min，收集沉淀细胞。接着，通过磁铁分选技术分离$CD4^+$初始T细胞，分选过程严格按照试剂盒说明书操作。分离后，通过流式细胞术对$CD4^+$T细胞的纯度进行检测。所有动物实验均在动物护理和使用委员会（中国科学院深圳先进技术研究院）批准的协议下进行，伦理审查编号为SIAT-IACUC-240415-YYS-PH-A2618。

1.2.2　Treg细胞的诱导分化及体外扩增

将获得的$CD4^+$初始T细胞用300*g*离心5 min后，用Treg培养基（1640培养基，10% FBS，

5 μg/L TGF-β，100 U/ml IL-2，1 mmol/L 丙酮酸钠，10 μmol/L HEPES，2 mmol/L GlutaMAX，55 μmol/L β 巯基乙醇，2 mg/L Anti-CD28）重悬。重悬后的细胞接种于预先铺有 Anti-CD3 的 48 孔板中，细胞密度 1×10^6/孔。细胞在 37℃，5% CO_2 的条件下培养 5 d，每 24 h 更换一半培养基。

1.2.3 Treg细胞活性和纯度检测

在含因子的诱导培养基诱导 72 h 后，将细胞重悬并以 300*g* 离心 5 min。加入 0.5 μl CD4 单克隆抗体（RM4-5），0.5 μl CD25 单克隆抗体（PC61.5），混合均匀后，在 4℃避光孵育 30 min。随后，细胞用缓冲液洗涤 2 次，并使用 Foxp3 转录因子染色缓冲试剂盒（transcription factor staining buffer set）进行染色，具体步骤严格按照说明书操作，染色后使用流式细胞仪检验细胞的 CD4、CD25、Foxp3 的阳性率。

1.2.4 对BV-2细胞极化调控的体外评估

为了对 Treg 细胞的抑炎作用进行体外研究，BV-2 细胞系在添加了 10% FBS、100 IU/ml 青霉素和 100 g/L 硫酸链霉素的 DMEM 中进行培养。细胞系在 5% 的 CO_2 培养箱中培养，温度为 37℃。用 LPS 诱导细胞系，使 BV-2 向促炎性分化。向极化的 BV-2 中加入 Treg 细胞，共培养 48 h 后，收取 BV-2 共培养体系的上清液，用于 ELISA 检测。用 PBS 洗两次后加入胰酶消化 BV-2，分别用 F4/80 和 CD86 流式抗体对 BV-2 细胞染色，其中 F4/80 为 BV-2 细胞的标记物，CD86 为炎性 BV-2 细胞的标记物。染色后用流式细胞仪分析 BV-2 细胞的 F4/80 和 CD86 阳性比例。

1.2.5 用于治疗评估的小鼠模型的建立

利用 6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠建立了大脑中动脉闭塞（MCAO）模型，用于治疗评估。小鼠被随机分为 3 组（SHAM 组、Saline 组、Treg 组）。后两组的小鼠接受 MCAO 手术。实验在异氟烷麻醉下进行。在颈内动脉（10 mm）处引入一根尖端变钝的 6-0 尼龙单丝缝合线，并预处理 1% 聚左旋赖氨酸，以阻断 MCAO 处的血流。为防止体温过低，手术过程中使用了温度维持仪，缺血 60 min 后轻轻抽出单丝，允许再灌注。然后在再灌注开始后 4 h 向 Saline 组和 Treg 组小鼠尾静脉注射生理盐水和 Treg 细胞，Treg 细胞注射量为 2×10^6/只。SHAM 组小鼠的治疗程序相同，但不进行单丝阻断和给药。

1.2.6 体内治疗效果评估

为了研究脑内梗死情况，在再灌注 72 h 后用 2,3,5-三苯基盐酸四唑（TTC，0.25%）对脑切片进行染色。动物模型的梗死体积由 ImageJ 测量，并通过校正水肿的间接方法确定。梗死体积比例=对侧未梗死面积—同侧未梗死面积）/对侧未梗死总面积×100%。术后的行为评估采用 Neurologic Severity Score（NSS）评分法 [21] 进行，从运动能力、感知能力、反射能力 3 个方面进行评估。在手术后的第 3 天，给小鼠尾静脉注射 0.5% EB 溶液，注射量为 10 μl/g。在注射 2 h 后，用 PBS 和 4%（*w*/*v*）多聚甲醛（paraformaldehyde，PFA）对小鼠进行经心灌注。收集对侧半球并在 PBS 中均质，然后离心（12 000*g*，15 min）。收集上清液并以 3∶7 的体积比（上清液∶丙酮）加入丙酮。室温反应 24 h 后，使用分光光度计在 620 nm 波长处测量 EB 吸光度。手术后第 3 天，收集对侧半球并在 PBS 中均质，用 ELISA 试剂盒测定小鼠脑中炎症因子的变化。

1.2.7 Treg细胞的标记及体内示踪

为了探究 Treg 对脑组织的浸润情况，在注射药物前用 Dio 染料对 Treg 进行染色。在注射药物后的第 3 天，给小鼠尾静脉注射 EB 染料标记脑中的血管。将取出的脑组织放入 IVIM-MS3 显微镜，观测脑梗死区域 Treg 的浸润情况。

1.2.8 统计分析

使用 Graphpad Prism 8.0.1 软件处理实验数据，实验结果均以平均值±标准差（n=3）表示。组间差异采用单因素方差分析（one-way ANOVA）和 Tukey 检验进行分析。其中，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，表示有显著的统计学差异。

2 结　果

2.1 体外评估Treg细胞的抑炎效果和神经保护作用

2.1.1 Treg细胞的体外诱导与表征

Treg 细胞在维持免疫耐受和调节免疫反应中发挥着关键作用，其独特的免疫调节功能使其成为当前免疫治疗领域的一个重要研究方向。本研究采用体外诱导 T 细胞的策略，构建了稳定表达 Foxp3 的 $CD4^+$ 调节性 T 细胞。在诱导过程中，TGF-β 和 IL-2 是两种关键生长因子。TGF-β 不仅塑造了 Treg 细胞的表型，还显著增强了其免疫抑制功能；而 IL-2 则在促进 Treg 细胞的生长和增殖中发挥了不可或

缺的作用。

研究通过将CD4⁺初始T细胞与TGF-β和IL-2共同孵育，在培养体系中提供适宜的环境，以促使其分化为Treg细胞。为了确认诱导效果，采用流式细胞术对诱导后Treg细胞的表型进行评估。流式细胞术分析显示，诱导的Treg细胞表达了CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺的典型表型，且其阳性率达到了88.8%（图1）。上述结果表明，我们通过体外细胞因子诱导策略，成功构建了稳定表达Foxp3的Treg细胞。这一策略为进一步研究Treg细胞在神经炎症、神经元的修复再生等免疫相关调控中的作用提供了重要的实验模型和理论支持。

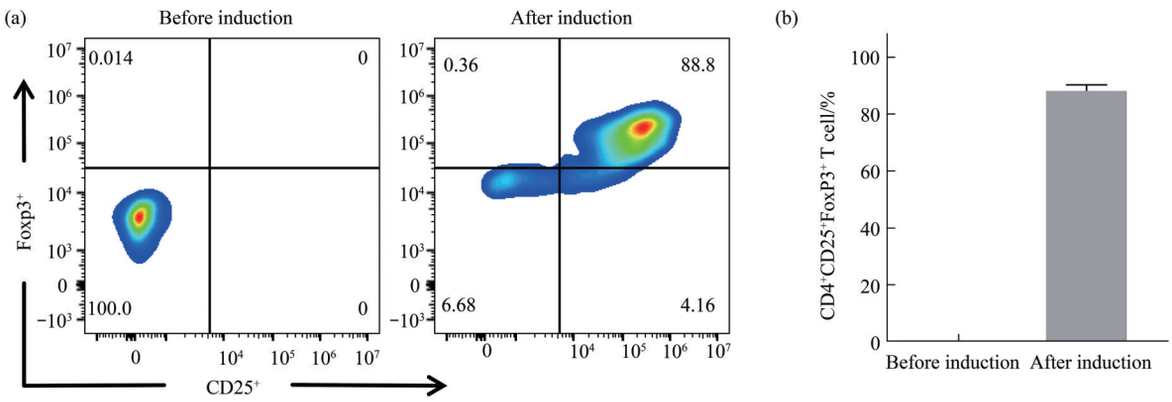


Fig. 1　The positive rate of CD25 and Foxp3 in *in vitro* induced Treg cells

(a) Expression of CD25 and Foxp3 in CD4⁺ T cells before and after induction. (b) Quantitative analysis of Treg cells before and after induction. Foxp3 and CD25 are markers of Treg cells.

2.1.2　Treg细胞在体外影响小胶质细胞的炎性极化

小胶质细胞是中枢神经系统中主要的免疫细胞，在缺血性损伤和再灌注过程中发挥着重要的免疫调节作用。在缺血性脑损伤后期，过度激活的小胶质细胞可能导致持续的神经炎症，进一步加重脑组织的损伤。因此，小胶质细胞的激活和极化状态在缺血性脑卒中的发病机制中具有关键作用。

为了探讨体外诱导的Treg细胞炎症环境中的免疫调节作用，本研究利用了小胶质细胞BV-2体外炎症模型，评估Treg细胞在调节小胶质细胞的免疫反应中的作用。如图2所示，在LPS刺激下，小胶质细胞的CD86表达量显著增加，F4/80和CD86双阳性细胞达到了83.7%，表明LPS成功诱导了小胶质细胞的促炎性极化，促使其进入活跃的炎症反应状态。在与Treg细胞共培养后，极化的小胶质细胞数量显著下降，F4/80和CD86双阳性的比例减少了约50%。表明Treg细胞能够有效抑制小胶质细胞的促炎极化，减少其对炎症反应的促进作用，参与抑制神经炎症的过程。因此，Treg细胞在此过程中发挥了重要的免疫调节作用。

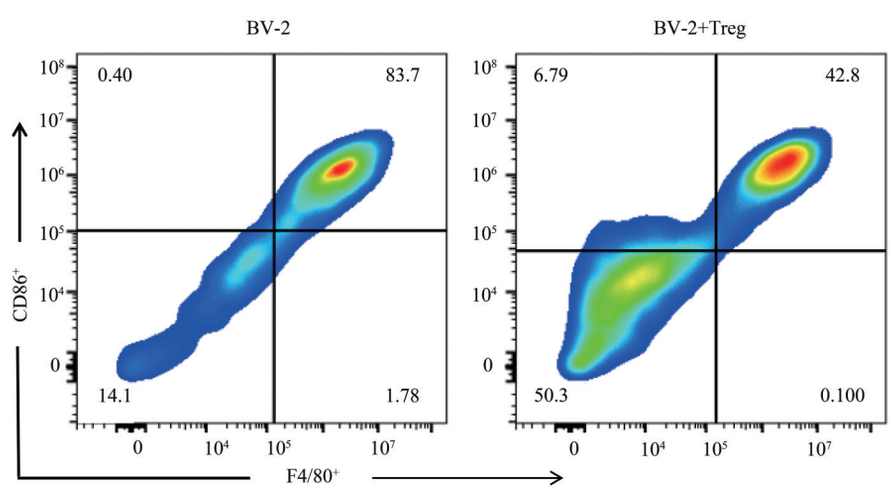


Fig. 2　Analysis of the effect of Treg cells on BV−2 pro−inflammatory polarization by flow cytometry

F4/80 is a marker of BV-2 cells, and CD86 is a marker of pro-inflammatory BV-2 cells.

2.1.3　Treg细胞在体外通过调控炎性因子来抑制炎症

为了进一步验证体外诱导的Treg细胞在炎症环境中对促炎因子和抑炎因子的调控作用，采用了BV-2细胞构建炎症模型。通过将体外诱导的Treg细胞与BV-2细胞共培养，模拟了Treg细胞在缺血脑组织炎症微环境中的调节作用。

如图3所示，经过Treg细胞处理后，炎性巨噬细胞上清液中的促炎因子TNF-α的水平显著下降，分别减少了约15%，而抗炎因子IL-10的浓度则显著上升，增加了约60%。这些数据表明，Treg细胞能够有效抑制炎症环境中促炎因子的分泌，同时促进抑炎因子的释放，从而恢复免疫系统的平衡，减轻由过度炎症反应引发的组织损伤。

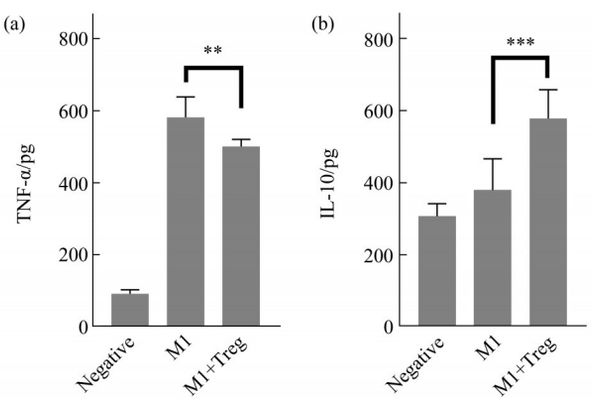


Fig. 3　Evaluation of the effect of Treg cells on the levels of pro−inflammatory and anti−inflammatory cytokines by ELISA

(a) The level of TNF-α in the M1 group significantly decreased after co-culturing with Tregs. (b) The level of IL-10 in the M1 group significantly increased after co-culturing with Tregs. The Negative group refers to BV-2 cells that were not stimulated with LPS, the M1 group refers to BV-2 cells stimulated with LPS, and the M1+Tregs group refers to BV-2 cells co-cultured with Tregs after LPS stimulation. n=3, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001.

2.2　Treg细胞在缺血再灌注损伤中的脑保护作用评价

2.2.1　Treg细胞疗法对小鼠脑部的梗死体积和BBB通透性的影响

为了验证体外诱导的Treg细胞在缺血再灌注损伤中的脑保护作用，本研究建立了MCAO模型，该模型广泛应用于研究缺血性脑卒中的神经保护机制。与SHAM组相比，MCAO组小鼠的脑片中明显观察到较大的脑梗死区域，表明缺血性脑损伤的成功诱导。而接受体外诱导Treg细胞治疗的小鼠在脑梗死体积上有显著的减小，说明Treg细胞在减少梗死区域方面发挥了显著的神经保护作用（图4a，b）。这一结果验证了体外诱导的Treg细胞在脑缺血再灌注损伤中的潜在治疗效能。

为了探讨Treg细胞是否对BBB的完整性起到保护作用，我们采用EB染色法定量分析BBB的通透性。如图4c所示，与对照组相比，尾静脉注射Treg细胞的小鼠表现出明显降低的EB渗出量，表明Treg细胞能够有效减轻BBB的损伤，从而有助于维持BBB的功能完整性。因此，体外诱导的Treg细胞不仅能够显著减少脑梗死体积，还能降低BBB的通透性，这些结果提示Treg细胞可能通过多途径发挥其神经保护作用，从而为缺血性脑卒中的治疗提供了新的潜在策略。

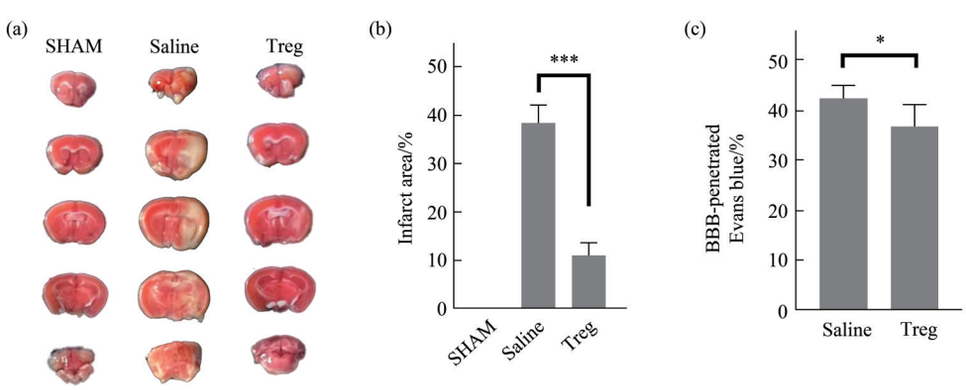


Fig. 4　Evaluation of the effect of Treg cells on brain tissue recovery by TTC staining and EB staining

(a) Cerebral infarct volume in mice after different treatments based on TTC staining. (b) Quantitative analysis of infarct volume in different treatment groups. (c) Evaluation of blood-brain barrier (BBB) permeability in mice after different treatments based on EB staining. SHAM is the sham surgery group, Saline is the group injected with saline after modeling, and Treg is the group injected with Treg cells after modeling. n=3, $^{*}P$<0.05, $^{***}P$<0.001.

2.2.2　Treg细胞疗法对小鼠行为学、体重和存活率的影响

为了进一步评估体外诱导的Treg细胞对缺血性脑卒中小鼠神经系统损伤的修复效果，我们结合运动、感觉和反射功能3个方面，对小鼠的神经功能缺损程度进行了综合评分。如图5所示，在缺血性脑卒中的急性期，接受Treg细胞治疗的小鼠在运动和感觉功能上显示出明显的改善，且相较于对照组（未接受治疗的小鼠），其神经功能损伤的程度显著下降，表明Treg细胞在促进神经功能恢复方面具有潜力。

此外，我们对缺血性脑卒中小鼠在急性期的体重变化和存活率进行了监测。如图6a所示，尽管缺血性脑卒中会导致小鼠体重的显著下降，但体外诱导Treg细胞治疗的小鼠能够在急性期内较好地维持体重，相比于未治疗的对照组，其体重下降幅度明显较小，这表明Treg细胞治疗能够减轻缺血性脑卒中带来的全身性负担。进一步分析存活率，在缺血性脑卒中的急性期，接受Treg细胞治疗的小鼠显示出更高的存活率（图6b），提示Treg细胞不仅有助于改善神经功能，还能显著提高小鼠的生存几率。

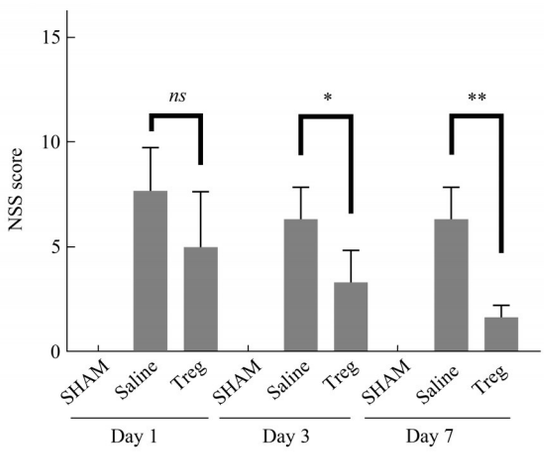


Fig. 5　Assessment of the effect of Treg cells therapy on mouse behavior through NSS scoring

n=3, *ns*: no significance, **P*<0.05, ***P*<0.01.

这些行为学和生理学指标的结果表明，体外诱导的Treg细胞能够有效减轻缺血再灌注损伤对小鼠的神经系统和整体健康的负面影响，从而提供了一种有效的策略来保护大脑免受缺血性脑卒中的严重损伤。

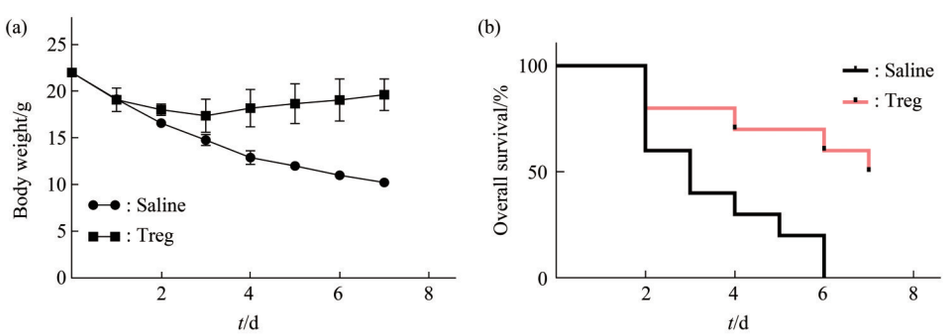


Fig. 6　Evaluation of the effect of Treg cells therapy on MCAO model mice through changes in body weight and survival rate

(a) Changes in body weight of mice in different treatment groups. (b) Changes in the survival rate of mice in different treatment groups.

2.2.3　Treg细胞疗法通过影响脑中炎症因子水平抑制神经炎症

为了验证体外诱导的Treg细胞在缺血性脑卒中的神经炎症抑制作用，我们通过ELISA对缺血再灌注后3 d内不同组小鼠大脑中的炎症因子进行定量分析。实验结果如图7所示，促炎性细胞因子（如IL-1β）在缺血性脑损伤后的大脑中的表达水平显著下降，这表明Treg细胞能够抑制促炎反应，减轻神经炎症的程度。与此相反，抑炎性细胞因子（如TGF-β）的表达水平显著上升，进一步表明Treg细胞通过促进抗炎反应发挥其神经保护作用。这与先前在体外实验中的观察（图4）一致，体外诱导的Treg细胞在BV-2细胞模型中已显示出通过调控促炎和抑炎因子含量来抑制炎症的潜力。这些结果表明，Treg细胞不仅在体外能有效调节炎症反应，而且在体内通过调控炎症因子的动态平衡，进一步增强其作为免疫调节细胞的治疗潜力。

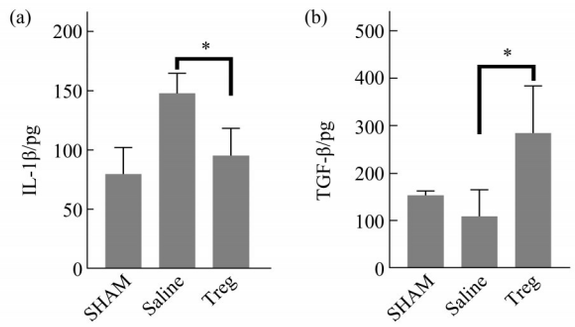


Fig. 7　Evaluation of the inhibitory effect of Treg cells therapy on neuroinflammation through inflammatory cytokines in the brain tissue of MCAO mice

(a) Treg treatment significantly reduced the level of IL-1β in the infarct area of ischemic stroke (IS) mice. (b) Treg treatment significantly increased the level of TGF-β in the infarct area of IS mice. n=3, *P<0.05.

2.2.4　Treg细胞对脑梗死区域的浸润

为了验证Treg细胞是否能够进入脑组织并在缺血性损伤区域富集，我们使用IVIM-MS3显微镜对脑卒中模型小鼠的梗死区域进行高分辨率成像分析。如图8所示，在尾静脉注射Treg细胞后，这些

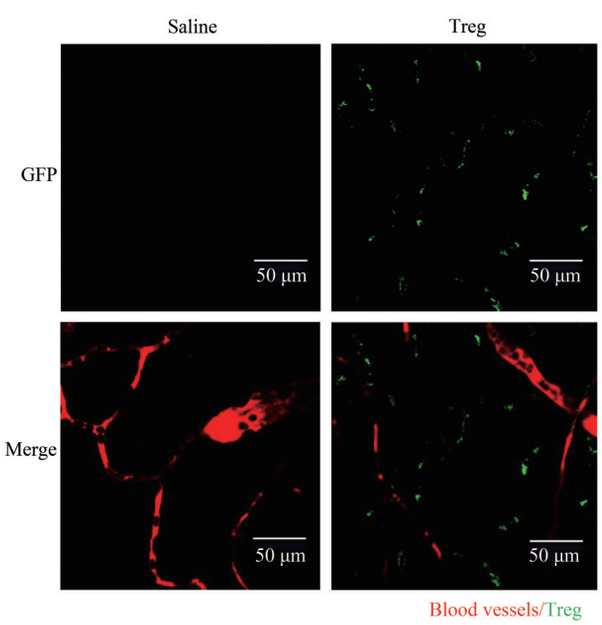


Fig. 8　Observation of Treg infiltration in brain tissue through fluorescence staining

细胞不仅成功穿越BBB，而且在脑组织中聚集。该结果表明，Treg细胞在缺血性脑卒中后的归巢特性可能受到损伤信号或炎症因子的驱动，为其在卒中后炎症调控及神经修复中的潜在作用提供了形态学和细胞分布层面的直接证据。这一发现不仅进一步支持了Treg细胞在缺血性脑损伤中的治疗潜力，同时也为后续研究其具体作用机制奠定了基础。

3　讨　　论

本研究全面探讨了体外诱导的Treg细胞在缺血性脑卒中中的治疗潜力，特别是在神经炎症调节和神经功能恢复方面的作用。通过MCAO小鼠模型，我们验证了Treg细胞在减小脑梗死体积、抑制神经炎症、改善BBB功能以及促进神经功能恢复等方面的显著效果。结果表明，Treg细胞通过显著减轻脑梗死体积，发挥了重要的神经保护作用。在缺血性脑损伤中，免疫系统的过度激活是导致神经细胞损伤的一个关键因素[22]。本研究发现，Treg细胞通过抑制促炎因子的表达，尤其是IL-6和TNF-α，减少了小胶质细胞和巨噬细胞的激活，从而有效降低了神经炎症。这一结果与现有研究一致，Treg细胞被认为是通过抑制T细胞和其他免疫细胞的激活来维持免疫耐受性，从而减轻炎症反应[23]。此外，Treg细胞促进了IL-10和TGF-β等抑炎因子的上调，这与其已知的免疫调节作用相吻合。我们的数据表明，Treg细胞不仅通过直接调节免疫细胞的活性来控制炎症反应，还可能通过其他机制，如促进局部组织的修复，间接促进了神经功能的恢复。

除了对炎症反应的调节，Treg细胞在改善小鼠神经功能方面也表现出显著的作用。我们观察到接受Treg细胞治疗的小鼠在运动、感觉和反射功能上的评分显著提高。运动功能的改善可能与Treg细胞通过减轻神经炎症、促进神经修复密切相关。神经损伤后的神经功能障碍通常与局部炎症和细胞死亡的加剧密切相关，而Treg细胞通过减少这些炎症反应，不仅减小了脑梗死区域，还可能通过增强神经可塑性和修复机制，促进了神经功能的恢复[17]。在本研究中，Treg细胞治疗在一定程度上降低了BBB的通透性，减少了EB的渗漏量，表明Treg细胞可能修复或保护BBB的结构，阻止有害物质的进入，从而进一步减轻神经损伤。

对于Treg细胞在缺血性脑卒中后调节神经炎症的机制，我们认为主要有两种。一是免疫抑制因子分泌。Treg细胞能够分泌IL-10、TGF-β等免疫抑制因子，抑制促炎性细胞因子的释放，减少炎症细胞的浸润，从而缓解缺血后炎症反应。这一机制在神经退行性疾病和自身免疫性疾病的研究中已有

所报道，并可能在缺血性脑卒中后发挥类似的抗炎保护作用。Huang等[24]和Arellano等[25]的研究均表明，Treg细胞通过分泌免疫抑制因子在神经炎症中发挥重要作用。这些因子能够直接抑制促炎细胞因子的产生，调节免疫细胞的功能，减少对脑组织的损伤。二是细胞间接触依赖性抑制。Treg细胞可以通过CTLA-4、FasL/Fas等通路，与抗原提呈细胞、效应T细胞或巨噬细胞直接相互作用，抑制其活化，减少促炎因子的释放。这种细胞间接触依赖的免疫调节机制，可能是Treg细胞在脑卒中后局部炎症微环境中发挥作用的关键途径。Li等[26]的研究为这种细胞间接触依赖性抑制机制提供了支持。Treg细胞通过这种机制，可能通过细胞间的直接接触抑制效应免疫细胞的激活，从而减轻神经炎症。Treg细胞调控神经炎症的机制问题我们将在后续的研究中重点探讨。

虽然我们观察到Treg细胞能够通过抑制促炎因子和增强抑炎因子来减轻神经炎症，但仍有多个方面需要进一步优化。首先，Treg细胞的制备和扩增仍是一个关键问题。在体外扩增Treg细胞需要特定的生长因子（如TGF-β和IL-2），但目前仍存在细胞扩增效率低、长期存活率差的问题[27]。其次，Treg细胞治疗的最佳时机和剂量仍不明确。缺血性脑卒中的不同阶段可能对Treg细胞的效果产生不同的影响。现有研究表明，急性期和恢复期的免疫反应有所不同，因此Treg细胞的治疗时机可能对其效果至关重要[5，28-29]。这些问题在临床应用中可能成为瓶颈，因此需要在细胞的扩增和长期存活方面进一步优化技术。此外，Treg细胞的安全性也需要在未来的研究中进行评估，尤其是在临床治疗中的长期效果和可能的副作用。另外，本研究未涉及具体的免疫调节机制的研究。Treg细胞可能通过直接与其他免疫细胞的相互作用，或通过分泌特定的细胞因子，发挥其免疫调节作用。未来的研究需要进一步探索Treg细胞的免疫调节途径，以揭示其在缺血性脑卒中中的详细作用机制。

4　结　　论

本研究探讨了体外诱导的Treg细胞在缺血性脑卒中中的神经保护作用，特别是在抑制神经炎症方面的关键作用。在MCAO小鼠模型中的研究显示，Treg细胞通过显著抑制促炎因子（如IL-6和TNF-α）并上调抑炎因子（如IL-10和TGF-β），有效减轻了神经炎症，减少了脑梗死体积，并促进了神经功能恢复。研究进一步表明，Treg细胞通过抑制小胶质细胞和巨噬细胞的激活，减少了促炎反应，并改善了BBB的功能，减轻了脑组织的损伤。通过调节免疫反应，Treg细胞有效恢复了免疫平衡，减少了炎症因子对神经细胞的直接损害。综上所述，Treg细胞治疗通过其免疫调节作用，显著抑制神经炎症并改善神经功能，展示了其作为缺血性脑卒中治疗策略的巨大潜力。未来的研究应聚焦于优化Treg细胞的扩增和治疗时机及作用机制的深入研究，为其临床应用提供更可靠的理论支持和技术保障。

参　考　文　献

[1] Pandian J D, Gall S L, Kate M P, *et al*. Prevention of stroke: a global perspective. Lancet, 2018, **392**(10154): 1269-1278

[2] Powers W J. Acute ischemic stroke. N Engl J Med, 2020, **383**(3): 252-260

[3] Jolugbo P, Ariëns R A S. Thrombus composition and efficacy of thrombolysis and thrombectomy in acute ischemic stroke. Stroke, 2021, **52**(3): 1131-1142

[4] Gerschenfeld G, Muresan I P, Blanc R, *et al*. Two paradigms for endovascular thrombectomy after intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke. JAMA Neurol, 2017, **74**(5): 549-556

[5] Xia Y, Hu G, Chen Y, *et al*. Embryonic stem cell derived small extracellular vesicles modulate regulatory T cells to protect against ischemic stroke. ACS Nano, 2021, **15**(4): 7370-7385

[6] Xu J, Wang X, Yin H, *et al*. Sequentially site-specific delivery of thrombolytics and neuroprotectant for enhanced treatment of ischemic stroke. ACS Nano, 2019, **13**(8): 8577-8588

[7] Berkhemer O A, Fransen P S S, Beumer D, *et al*. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. N Engl J Med, 2015, **372**(1): 11-20

[8] Chamorro Á, Meisel A, Planas A M, *et al*. The immunology of acute stroke. Nat Rev Neurol, 2012, **8**(7): 401-410

[9] Pundik S, Xu K, Sundararajan S. Reperfusion brain injury: focus on cellular bioenergetics. Neurology, 2012, **79**(13 Suppl 1): S44-S51

[10] Buchan A M, Kennedy J. Strategies for therapy in acute ischemic stroke. Nat Clin Pract Neurol, 2007, **3**(1): 2-3

[11] Eltzschig H K, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. Nat Med, 2011, **17**(11): 1391-1401

[12] Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, *et al*. Rapamycin promotes expansion of functional $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. J Immunol, 2006, **177**(12): 8338-8347

[13] Duffy S S, Keating B A, Perera C J, *et al*. The role of regulatory T cells in nervous system pathologies. J Neurosci Res, 2018, **96**(6): 951-968

[14] Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell, 2000, **101**(5): 455-458

[15] Boonpiyathad T, Sözener Z C, Akdis M, *et al*. The role of Treg cell subsets in allergic disease. Asian Pac J Allergy Immunol, 2020, **38**(3): 139-149

[16] Ohkura N, Sakaguchi S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases. Cell Res, 2020, **30**(6): 465-474

[17] Shi L, Sun Z, Su W, *et al*. Treg cell-derived osteopontin promotes microglia-mediated white matter repair after ischemic stroke. Immunity, 2021, **54**(7): 1527-1542.e8

[18] Ishibashi S, Maric D, Mou Y, *et al*. Mucosal tolerance to E-selectin promotes the survival of newly generated neuroblasts *via* regulatory T-cell induction after stroke in spontaneously hypertensive rats. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, **29**(3): 606-620

[19] Urra X, Cervera A, Villamor N, *et al*. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. Neuroscience, 2009, **158**(3): 1174-1183

[20] Yan J, Greer J M, Etherington K, *et al*. Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke. J Neuroimmunol, 2009, **206**(1/2): 112-117

[21] Li Y, Chopp M, Chen J, *et al*. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, **20**(9): 1311-1319

[22] Li Z, Xiao J, Xu X, *et al*. M-CSF, IL-6, and TGF-β promote generation of a new subset of tissue repair macrophage for traumatic brain injury recovery. Sci Adv, 2021, **7**(11): eabb6260

[23] Vignali D A, Collison L W, Workman C J. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol, 2008, **8**(7): 523-532

[24] Huang Y, Liu Z, Cao B B, *et al*. Treg cells attenuate neuroinflammation and protect neurons in a mouse model of Parkinson's disease. J Neuroimmune Pharmacol, 2020, **15**(2): 224-237

[25] Arellano G, Acuña E, Loda E, *et al*. Therapeutic role of interferon-γ in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through a tolerogenic subset of splenic $CD11b^{+}$ myeloid cells. J Neuroinflammation, 2024, **21**(1): 144

[26] Li X L, Li H, Zhang M, *et al*. Exosomes derived from atorvastatin-modified bone marrow dendritic cells ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated levels of IDO/Treg and partly dependent on FasL/Fas pathway. J Neuroinflammation, 2016, **13**: 8

[27] Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, *et al*. Induced regulatory T cells: their development, stability, and applications. Trends Immunol, 2016, **37**(11): 803-811

[28] Ricci A, Liesz A. A tale of two cells: regulatory T cell-microglia cross-talk in the ischemic brain. Sci Transl Med, 2023, **15**(721): eadj0052

[29] Wang H Y, Ye J R, Cui L Y, *et al*. Regulatory T cells in ischemic stroke. Acta Pharmacol Sin, 2022, **43**(1): 1-9

Therapeutic Study on The Inhibition of Neuroinflammation in Ischemic Stroke by Induced Regulatory T Cells*

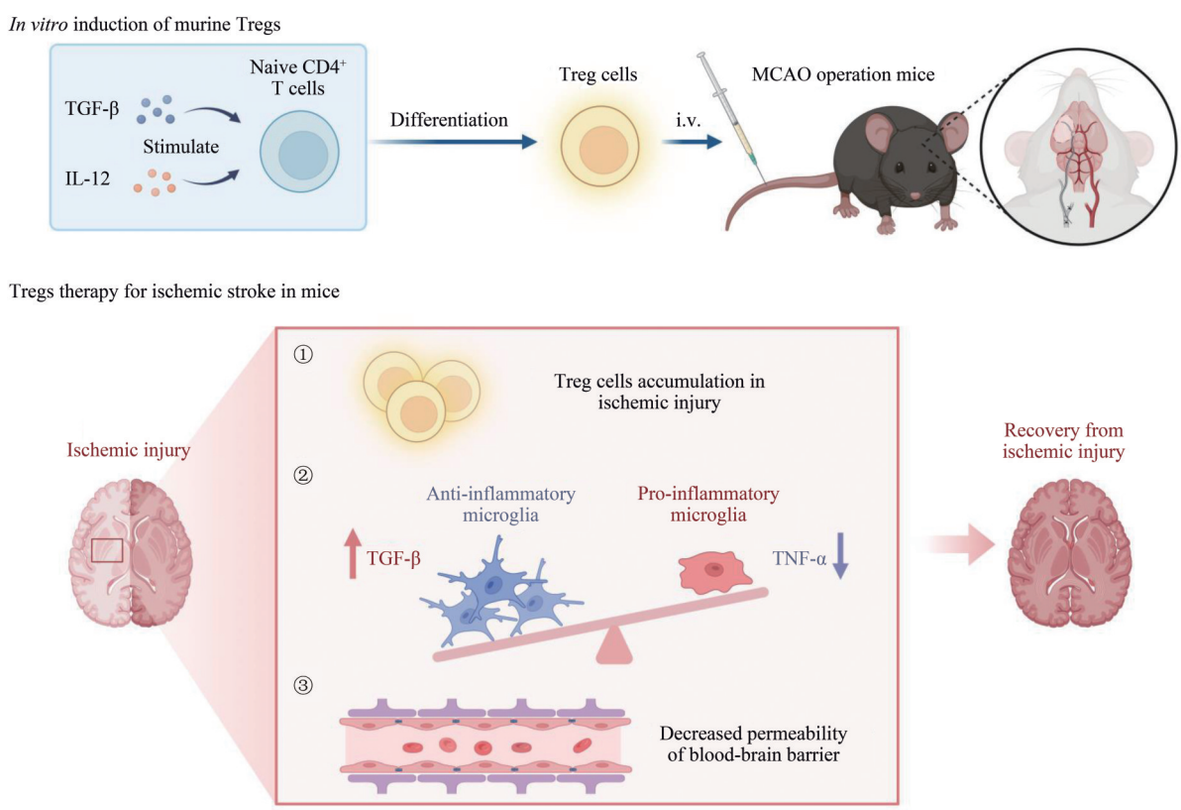
KANG Tian-Fang[1,2)**], MA Ai-Qing[3)**], CHEN Li-Qi[1,2)], GONG Han[1)], OUYANG Jia-Cheng[3)], PAN Fan[1,2)***], PAN Hong[1,2)***], CAI Lin-Tao[1,2)***]

([1)]*Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen* 518055, China;

[2)]*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, China;

[3)]*Pharmacy School, Guangdong Medical University, Dongguan* 523808, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2402400, 2023YFA0915400), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2024A1515010825, 2022A1515011337), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2022A1515111168), and Shenzhen Medical Research Funding (A2303057).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

PAN Fan. Tel：86-755-86528704，E-mail：fan.pan@siat.ac.cn

PAN Hong. Tel：86-755-86585204，E-mail：hong.pan@siat.ac.cn

CAI Lin-Tao. Tel：86-755-86392210，E-mail：lt.cai@siat.ac.cn

Received：January 13，2025　Accepted：February 28，2025

Abstract **Objective** Neuroinflammation plays a crucial role in both the onset and progression of ischemic stroke, exerting a significant impact on the recovery of the central nervous system. Excessive neuroinflammation can lead to secondary neuronal damage, further exacerbating brain injury and impairing functional recovery. As a result, effectively modulating and reducing neuroinflammation in the brain has become a key therapeutic strategy for improving outcomes in ischemic stroke patients. Among various approaches, targeting immune regulation to control inflammation has gained increasing attention. This study aims to investigate the role of *in vitro* induced regulatory T cells (Treg cells) in suppressing neuroinflammation after ischemic stroke, as well as their potential therapeutic effects. By exploring the mechanisms through which Tregs exert their immunomodulatory functions, this research is expected to provide new insights into stroke treatment strategies. **Methods** Naive $CD4^+$ T cells were isolated from mouse spleens using a negative selection method to ensure high purity, and then they were induced *in vitro* to differentiate into Treg cells by adding specific cytokines. The anti-inflammatory effects and therapeutic potential of Treg cells transplantation in a mouse model of ischemic stroke was evaluated. In the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model, after Treg cells transplantation, their ability to successfully migrate to the infarcted brain region and their impact on neuroinflammation levels were examined. To further investigate the role of Treg cells in stroke recovery, the changes in cytokine expression and their effects on immune cell interactions was analyzed. Additionally, infarct size and behavioral scores were measured to assess the neuroprotective effects of Treg cells. By integrating multiple indicators, the comprehensive evaluation of potential benefits of Treg cells in the treatment of ischemic stroke was performed. **Results** Treg cells significantly regulated the expression levels of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo*, effectively balancing the immune response and suppressing excessive inflammation. Additionally, Treg cells inhibited the activation and activity of inflammatory cells, thereby reducing neuroinflammation. In the MCAO mouse model, Treg cells were observed to accumulate in the infarcted brain region, where they significantly reduced the infarct size, demonstrating their neuroprotective effects. Furthermore, Treg cell therapy notably improved behavioral scores, suggesting its role in promoting functional recovery, and increased the survival rate of ischemic stroke mice, highlighting its potential as a promising therapeutic strategy for stroke treatment. **Conclusion** *In vitro* induced Treg cells can effectively suppress neuroinflammation caused by ischemic stroke, demonstrating promising clinical application potential. By regulating the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, Treg cells can inhibit immune responses in the nervous system, thereby reducing neuronal damage. Additionally, they can modulate the immune microenvironment, suppress the activation of inflammatory cells, and promote tissue repair. The therapeutic effects of Treg cells also include enhancing post-stroke recovery, improving behavioral outcomes, and increasing the survival rate of ischemic stroke mice. With their ability to suppress neuroinflammation, Treg cell therapy provides a novel and effective strategy for the treatment of ischemic stroke, offering broad application prospects in clinical immunotherapy and regenerative medicine.

Key words regulatory T cell, ischemic stroke, neuroinflammation, cell therapy, immune regulation
DOI：10.16476/j.pibb.2025.0019 **CSTR**：32369.14.pibb.20250019