

## 免疫反应对面神经损伤后 FMN 的作用研究进展

吴莉<sup>1)</sup>, 刘流<sup>2)</sup>, 张承磊<sup>3)</sup>

(1) 昆明医科大学第一附属医院医学影像科; 2) 整形外科; 3) 血管外科, 云南昆明 650032)

[摘要] 面神经损伤后中枢神经元发生细胞凋亡, 国内外大量研究显示获得性免疫反应对面神经元维持存活状态有保护作用, 本文综述了面神经损伤后参与保护面神经元的自身免疫细胞类型、作用时间和范围及影响细胞免疫反应的因素等研究进展。

[关键词] 面神经损伤; 面运动神经元; CD4<sup>+</sup>T 细胞; 免疫反应; 活体示踪

[中图分类号] R651.3 [文献标识码] A [文章编号] 2095-610X (2015) 03-0165-04

## Research Progress of Immune Response on FMN after Facial Nerve Injury

WU Li<sup>1)</sup>, LIU Liu<sup>2)</sup>, ZHANG Cheng-lei<sup>3)</sup>

(1) Dept. of Medical Imaging; 2) Dep of Plastic Surgery; 3) Dep of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

[Abstract] Central neuron apoptosis occurs after facial nerve injury, both at home and abroad a large number of studies have shown that acquired immune response across the neurons to maintain survival state has a protective effect, the review summarizes the facial nerve injury involved in the protection of facial nerve yuan after immune cell types, duration and scope and factors, which affect the cellular immune response and so on is reviewed.

[Key words] Facial nerve injury; Facial motoneuron; CD4<sup>+</sup>T cell; Immune responses; Living tracer method

外伤及肿瘤切除后所造成的面神经损伤是口腔颌面部常见的疾病之一, 其所引起的患者面部的形态和功能的改变, 不仅给患者带来生理缺陷, 也会引发患者心里和精神障碍, 从而对患者生活质量造成极大影响<sup>[1]</sup>. 临床上常采用精细的显微外科手术恢复面神经的连续性, 然而面神经损伤修复及再生的生物学机制尚未完全阐明, 因此神经功能的恢复仍不令人满意。

大量研究表明, 周围神经损伤后, 不仅外周神经干发生变化, 中枢神经元也会出现明显改变, 即发生细胞凋亡<sup>[2,3]</sup>, 而神经元维持存活状态是损伤后神经功能恢复的基础<sup>[4]</sup>. 因此探讨面神经损伤后神经元凋亡发生的机制、采取方法减少面神经元的凋亡是目前研究的热点之一. 近年来尽管有

些研究显示自发免疫过程对中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 有损害作用<sup>[5]</sup>, 但在免疫系统对面神经损伤后面运动神经元 (facial motoneuron, FMN) 的作用的研究中则发现 CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的获得性免疫反应对 FMN 有明显的保护作用. 本研究拟通过建立裸鼠与 SD 大鼠面神经损伤模型, 在不同阶段评价 FMN 凋亡的数量及在面神经核内分布特征及对裸鼠进行双重标记的 (荧光素及抗 CD4<sup>+</sup>T 细胞-SPIO 复合体) CD4<sup>+</sup>T 细胞移植 (免疫重建) 后, 用 MR 活体监测 CD4<sup>+</sup>T 细胞的迁移路径及同步病理学观测其对 FMN 凋亡的影响, 从而建立了面神经损伤裸鼠免疫重建后移植细胞迁移路径的活体监测模型, 为进一步探讨获得性免疫反应对面神经损伤后神经元凋亡的影

[基金项目] 教育部博士点基金资助项目 (200806780002); 国家自然科学基金资助项目 (30960388)

[作者简介] 吴莉 (1976~), 女, 黑龙江大庆市人, 在读博士研究生, 主治医师, 主要从事头颈部影像诊断工作。

[通讯作者] 刘流. E-mail: liuliu3939@126.com

响奠定了基础。

早在 1999 年 Serpe<sup>[6]</sup>等采用免疫缺陷鼠证明获得性免疫反应在面神经伤后具有阻止 FMN 凋亡的重要保护作用,且对其保护作用的原因提出了 2 个假设:(1) T 细胞和 / 或 B 细胞与神经元细胞相互接触,直接保护 FMN;(2) T 细胞和 / 或 B 细胞通过释放可溶性因子,激活 SCID 鼠中枢神经系统内小胶质细胞和巨噬细胞,使其释放减少面神经元凋亡的因子,从而间接的保护 FMN。从此大量学者对其保护作用机制进行广泛深入研究。然而,究竟是哪类免疫细胞亚群、那些因子免疫细胞共同做用对神经元起到的保护作用,众多学者近 10 a 对可能的影响因子做了大量的研究。

## 1 参与面神经损伤修复的获得性免疫反应细胞类型

为进一步了解介导该获得性免疫反应的究竟是那类免疫细胞亚群(CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、B 淋巴细胞),Serpe 团队(2003)通过研究缺乏不同类型免疫细胞的免疫缺陷鼠证明,是 CD4<sup>+</sup>T 细胞的细胞免疫而不是 CD8<sup>+</sup>T 细胞或 B 淋巴细胞介导的体液免疫对面神经损伤后的 FMN 的存活起着调节作用。Deboy 等<sup>[7]</sup>(2006 年)研究发现由 STAT6 介导的从 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化来的 Th2 细胞亚群对伤后 FMN 的存活是必需的,而无证据显示 Th1 细胞亚群参与该免疫反应。Serpe 团队(2005 年)最近的研究则显示,除 Th1 和 Th2 两个亚群外,还有其他一些 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群,如 Th17、调节性 T 细胞(Tr1)以及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Foxp3+Treg)等参与面神经损伤修复中的免疫反应。Junping Xin<sup>[8]</sup>(2008 年)在研究 C57BL/6 野生型小鼠面神经损伤时用荧光辅助细胞筛选分析损伤后各 T 细胞亚群(Th1, Th17, Th2, Tr1 及 Foxp3+Treg CD4<sup>+</sup>T)的发展变化随时间变化的趋势时将 CD4<sup>+</sup>T 细胞分成两类亚群:促炎细胞亚群(Th1 和 Th17)和抗炎细胞亚群(Th2, Tr1 及 Foxp3+Treg),其中促炎细胞亚群具有促进面神经元损伤的作用,而抗炎细胞亚群具有保护面神经元防止其凋亡的作用。

## 2 免疫反应在面神经核内的范围

MINH-Y 等及国内学者<sup>[8-12]</sup>在研究外周免疫系统对面神经损伤后 FMN 的影响时发现,FMN 的大致可分为数量上相对稳定的 3 个亚群,其中有 2

类亚群的 FMN 的数目基本不随损伤后免疫反应是否参与而改变(在面神经损伤后能存活较长时间的亚群约占 50%及面神经损伤后既死亡的亚群占 10%),而第三类亚群 FMN 的存活则却依赖有功能的外周免疫系统和(或)神经营养因子(NTF)的参与,此类亚群占面神经元的 40%。Minh-Y.Canh 等希望通过对上述三类神经元的研究绘制出面神经轴索损伤后凋亡的面神经元及在面神经核内出现的保护面神经元的免疫细胞的存在范围,从而了解每一类神经元和免疫细胞的存在状态。但进一步研究发现,这三类神经元在按照传统的根据其轴索所支配的面肌所分成的 6 个面神经亚核中均有存在,分布未见明显规律,也就是说 FMN 的凋亡对面神经损伤的效应发生在全核团范围内且分布没有明显规律,上述分布特征与国内学者全世明 2012 年研究结果相同。

## 3 免疫反应作用时间

研究发现获得性免疫反应对伤后 FMN 保护作用是一时的,仅在伤后几周时间内<sup>[13]</sup>。面神经损伤后,CD4<sup>+</sup>T 细胞的数量在引流淋巴结(颈淋巴结)内明显升高,在损伤后的第 7 天达峰值,从第 9 天开始下降,而到了 28 d 后数量基本不变。其变化规律与 FMN 的存活数量的变化是一致的。而到伤后 10 周,无论是野生型小鼠,还是成功重组的 SCID 小鼠,其面神经断伤侧 FMN 数目均无明显下降。因此及时采取措施,减少面神经元凋亡是亟待解决的问题。

## 4 影响细胞免疫反应的因素

近些年来,多数学者不断研究探索面神经损伤后 CD4<sup>+</sup>T 对面神经元保护作用的影响因子,并发现了一些细胞因子和化学趋化因子如 IL-10、IL-2, IL-15, CCL-2, CXCL10 及其他神经免疫学因子,他们在神经损伤时可影响小胶质细胞的功能和外周 T 细胞的募集。

### 4.1 IL10 对 CD4+Th2 细胞的作用

IL10 对维持中枢神经系统内抗炎环境起着重要的作用<sup>[14]</sup>,而在研究 IL10 对神经元的保护作用中认为,IL-10 有可能的直接或间接的两种神经元的保护机制:直接作用是 IL-10 与其受体结合,激活了神经元的 SRSA-3 途径,表达抗凋亡因子;间接作用是其与小胶质细胞内 IL-10 受体(IL-10R)结合,抑制促炎因子及特殊化学趋化因子的生成,

从而调整神经免疫微环境阻止面神经元的凋亡<sup>[15]</sup>。然而 Junping Xin<sup>[16]</sup> (2011) 在对面神经损伤后的 Rag-2<sup>-/-</sup>、IL-10<sup>-/-</sup> 及同型野生小鼠研究显示: IL-10 不能通过血脑屏障, 面神经核内 IL-10 是非外周来源、由非 CD4<sup>+</sup>T 细胞产生的; Rag-2<sup>-/-</sup> 鼠面神经损伤后面神经核内 IL-10 的数量明显减低, 而移植入 CD4<sup>+</sup>T 细胞后, 使其数量达到野生型鼠水平, 即 IL-10 数量的维持是需要有 CD4<sup>+</sup>T 细胞存在的; IL-10R 在面神经核内持续以低剂量存在, 面神经轴索损伤时即并未改变 IL-10R 在小胶质细胞内的表达数量, 而上调了星形胶质细胞内 IL-10R 的表达, 因而星形胶质细胞也有可能是神经保护机制研究中重要的细胞。然而, IL-10 是由那种细胞产生, 其与 CD4<sup>+</sup>T 细胞作用的机制目前仍不清楚。

#### 4.2 CD4<sup>+</sup>Th2 细胞相关的趋化因子 CCL11 及其受体 CCR3

Wainwright D A<sup>[17,18]</sup>研究了与 TH2 细胞相关的趋化因子 (CCL11) 及趋化因子受体 (CCR3, CCR4 及 CCR8), 结果显示 CCL11 存在于面神经元细胞核内, 面神经损伤时促使细胞核内的 CCL11 迁移到星形胶质细胞内 (与 Th2 细胞向面神经核迁移在同一时间), 与此同时, 外周引流淋巴结 (颈部淋巴结) 内 CD4<sup>+</sup>T 分化成 Th2 细胞亚群, 上调 CCR3 的表达, 从而使 CD4<sup>+</sup>T 定向移动到面神经核内。实验显示在面神经损伤后第 7 天, CCR3mRNA 的数量 (87.2) 明显多于 CCR4mRNA (11.4) 及 CCR8mRNA (9.6), 且 CCR3mRNA 的表达在面神经损伤后第 7 天最高 (较野生型小鼠高  $1403 \pm 199$  %), 随后下降, 14 d 只有野生型组的  $459 \pm 127$  % 到 30 d 约高于野生型组的 ( $115 \pm 126$ ) %。在后续试验中 Wainwright 取野生型小鼠、CCR3<sup>-/-</sup> 小鼠、重组野生型小鼠脾细胞内 CD4<sup>+</sup>T 细胞的 CCR3<sup>-/-</sup> 小鼠单侧面神经损伤后面神经元存活水平分别为 ( $82 \pm 3.0$ ) %、( $65 \pm 4.0$ ) %、( $75 \pm 4.0$ ) %, 统计分析认为重组组小鼠面神经元存活的数目与野生型没有差异, 因此可认为面神经元及星形胶质细胞表达 CCL11 及 CD4<sup>+</sup>T 细胞表达 CCR3 使其向面神经核定向移动对面神经元的存活具有重要的意义。进一步研究发现<sup>[19]</sup>CCR3mRNA 表达在面神经元细胞质内而不是在小胶质细胞或星形胶质细胞中表达。因此认为, 面神经核内 CCR3 是 CD4<sup>+</sup>Th2 细胞重要的趋化因子。

#### 4.3 CD4<sup>+</sup>Th2 细胞的作用与 BDNF 及 ER 无关

最近 Junping Xin<sup>[20,21]</sup>等采用 RT-PCR 和 western blot 研究发现, CD4<sup>+</sup>T 细胞是脑源性神经营养

因子 (BDNF) 的主要来源, 在外周神经损伤后检测出 BDNF 一过性上调, 无论 mRNA 的表达还是蛋白的分泌在 7 h 内均持续升高, 24 h 达高峰, 72 h 后仍能探测到蛋白的存在, 但 CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的神经免疫保护作用与 T 细胞产生的 BDNF 无关; 尽管面神经损伤后大多数 T 细胞高表达 ER 受体, 但采用雌二醇治疗的 Rag-2KO 小鼠并不能挽救面神经元的凋亡, 与野生型小鼠脾细胞重组的 Rag-2KO 小鼠 (免疫水平接近野生型) 比较神经元凋亡的数量明显增多, 因此认为 CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的神经保护作用与 BDNF 及雌激素 (ER) 无关。

#### 4.4 IL2 对 Treg 细胞的作用及影响

IL2 对 Treg 细胞的功能和自身耐受起着重要的作用。无论缺少脑内源性还是外源性 IL2 的表达, 均会增加面运动神经元的凋亡。Zhi Huang<sup>[22]</sup>通过对同系小鼠的喂养和免疫重建证明面神经元对面神经损伤后的免疫反应是由 IL-2 介导的对脑内内源性免疫环境的调节及和对周围免疫系统的 Treg 的调节实现的。脑内、外的 IL2 的缺失均会影响损伤后第 14 天的星形胶质细胞的募集, 而外周 Treg 的活化状态会影响 T 细胞进入受伤脑组织的数量, 进而影响小胶质细胞活化和向面神经元募集。即脑内源性及外周性 IL2 缺失是通过影响小胶质细胞的活化和募集来增加面神经元的凋亡。

## 5 总结

CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的获得性免疫反应的过程综合以上研究, Jones 等国内外学者提出了该获得性免疫反应的假设模型: 面神经的损伤后, 一方面上调了 FMN 内腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) mRNA, PACAP 被中枢小胶质细胞获悉, 使或上调小胶质细胞和 / 或星形胶质细胞和 / 或面神经元表达 Th2 相关趋化因子, 如 CCL11、IL2、IL10 等; 另一方面外周抗原递呈细胞 APC 吞噬或胞吞抗原, 与产生的特异性抗原结合, 激活外周引流淋巴结内 (颈部淋巴结) CD4<sup>+</sup>T 细胞中的 CD4<sup>+</sup>Th2 细胞, 使其表达趋化因子受体, 促使 CD4<sup>+</sup>Th2 细胞通过血脑屏障, 进入面神经核, 与面运动神经元周围募集的小胶质细胞相互作用, 进入面神经核内的细胞再与其内星形胶质细胞相互作用, 促进其产生 IL10, 其使 CD4<sup>+</sup>Th2 细胞再次活化, 同时小胶质细胞产生大量 IL10 (间接作用) 及 IL2, 亦可直接与面神经元接触保护面神经元 (直接作用) 从而保护面神经元防止其凋亡。

## [参考文献]

- [1] 黄绍辉,于洋,王绪凯. MnBAP对鼠面神经元损伤后凋亡的抑制作用 [J]. 中国口腔颌面外科杂志,2011,9(4):276-280.
- [2] HA G K, HUANG Z, PARIKH R, et al. Immunodeficiency impairs re-injury induced reversal of neuronal atrophy: relation to T cell subsets and microglia [J]. *Exp Neurol*, 2007, 208(1):92-99.
- [3] MIGNINI F, GIOVANNETTI F, COCHIONIM, et al. Neuropeptide expression and T-lymphocyte recruitment in facial nucleus after facial nerve axotomy [J]. *J Craniofac Surg*, 2012, 23(5):1 479-1 483.
- [4] OKHEE P, KEA J L, IMJR, et al. Bax-dependent and independent death of motoneurons after facial nerve injury in adult mice [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26(6):1 421-1 432.
- [5] MARCONDES M C, FURTADO G C, WENSKY A, et al. Immune regulatory mechanisms influence early pathology in spinal cord injury and spontaneous autoimmune encephalomyelitis [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(6):1 749-1 760.
- [6] SERPE C J, KOHM A P, HUPPENBAUER C B, et al. Exacerbation of facial motoneuron loss after facial nerve transection in severe combined immunodeficient (scid) mice [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(11): 7.
- [7] DEBOY C A, XIN J, BYRAM S C, et al. Immune-mediated neuroprotection of axotomized mouse facial motoneurons is dependent on the IL-4/STAT6 signaling pathway in CD4+ T cells [J]. *Exp Neurol*, 2006, 201(1): 212-224.
- [8] MINH-Y, CANH A, CRAIG J, et al. CD4+ T cell mediated facial motoneuron survival after injury: Distribution pattern of cell death and rescue throughout the extent of the facial motor nucleus [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2006, 181(1-2):93-99.
- [9] JONES K J, SERPE C J, BYRAM S C, et al. Role of the immune system in the maintenance of mouse facial motoneuron viability after nerve injury [J]. *Brain Behav Immun*, 2005, 19(1):12-19.
- [10] MARZO S J, MOELLER C W, SHARMA N, et al. Facial motor nuclei cell loss with intrateporal facial nerve crush injuries in rats [J]. *Laryngoscope*, 2010, 120(11): 2 264-2 269.
- [11] JUNPING X I N, DEREK A, WAINWRIGHT, et al. Phenotype of CD4+ T cell subsets that develop following mouse facial nerve axotomy [J]. *Brain Behavior and Immunity*, 2008, (22):528-537.
- [12] CRAIG J, SERPE, SUSANNA COERS, et al. CD4+ T but not CD8+ or B, lymphocytes mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection brain [J]. *Behavior and Immunity*, 2003, 17(5):393-402.
- [13] JUNPING X I N, DEREK A, WAINWRIGHT, et al. Phenotype of CD4+ T cell subsets that develop following mouse facial nerve axotomy [J]. *Brain Behav Immun*, 2008, 22(4):528-537.
- [14] TAYLOR A, VERHAGEN J, BLASERK, et al. Review mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells [J]. *Akdis M, Akdis CA Immunology*, 2006, 117(4): 433-442.
- [15] WILMSH, ZECCAL, ROSENSTIELP, et al. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13(18):1 925-1 928.
- [16] JUNPING X I N, DEREK A, WAINWRIGHT, D A, et al. IL-10 within the CNS is necessary for CD4+ T cells to mediate neuroprotection [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(5): 820-829.
- [17] WAINWRIGHT D A, XIN J, MESNARD N A, et al. Exacerbation of facial motoneuron loss after facial nerve axotomy in CCR3-deficient mice [J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 216(1-2):66-75.
- [18] DEREKA, WAINWRIGHT, NICHOLEA, et al. Effects of facial nerve axotomy on Th2 and Th1-associated chemokine expression in the facial motor nucleus of wild-type and presymptomatic mSOD1 mice [J]. *Neurodegener Regen*, 2009, 2(1):39-44.
- [19] XIN J, WAINWRIGHT D A, SERPE C J, et al. Phenotype of CD4+ T cell subsets that develop following mouse facial nerve axotomy [J]. *Brain Behav Immun*, 2008, 22(4): 528-537.
- [20] JUNPING X I N, NICHOLE A, MESNARD, et al. CD4+ T cell-mediated neuroprotection is independent of T cell-derived BDNF in a mouse facial nerve axotomy model [J]. *Brain Behavior and Immunity*, 2012, 26(6):886-890.
- [21] BYRAM S C, CARSON M J, DEBOY C A, et al. CD4+ T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation [J]. *J Neurosci*, 2004, 18(18):4 333-4 339.
- [22] ZHIHUANGA, DANIELLE Meola, b, John M. Petito et al. Dissecting the effects of endogenous brain IL-2 and normal versus autoreactive T lymphocytes on microglial responsiveness and T cell trafficking in response to axonal injury [J]. *Neuroscience Letters*, 2012, 526(2):138-143.

(2015-01-01 收稿)