

文章编号: 0258-5898 (2009) 10-1148-04

· 论著 ·

## 自体灭活 T 细胞免疫后诱导 Treg 下调的机制

张秋玉<sup>1</sup>, 吴娟娟<sup>2</sup>, 林锦彪<sup>2</sup>, 张壮壮<sup>2</sup>, 史媛<sup>2</sup>, 沈佰华<sup>2</sup>, 张艳<sup>2</sup>, 李宁丽<sup>2</sup>, 王利<sup>2</sup>

(1. 福建医科大学免疫学系, 福州 350108; 2. 上海交通大学基础医学院 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

**摘要:** 探讨自体灭活 T 细胞免疫注射后诱导体内调节性 T 细胞(Treg)下调的机制。方法 自体 T 细胞体外用刀豆蛋白(ConA)刺激活化, 照射灭活 T 细胞给小鼠进行皮下和腹腔免疫(每只小鼠  $5 \times 10^6$ /次), 每隔 5 d 免疫一次, 免疫 3 次后检测小鼠体内 Treg 的数量及功能; 对照组小鼠皮下注射 PBS。ELISA 法检测血清中抗鼠 CD25 抗体。免疫小鼠血清分离后经尾静脉注入未免疫小鼠体内, 检测受体小鼠 Treg 的数量及功能变化。结果 免疫小鼠体内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 数量较对照组减少( $P < 0.01$ ), 抑制功能也显著降低( $P < 0.01$ ), 但血清中抗 CD25 的抗体增加( $P < 0.01$ )。正常小鼠接受免疫小鼠血清后, Treg 的数量和抑制功能下调( $P < 0.01$ )。结论 采用 ConA 活化的自体灭活 T 细胞免疫, 可诱导抗 CD25 抗体增加, 进而减少体内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞数量和功能。

**关键词:** 自体 T 细胞; 调节性 T 细胞; CD4; CD25; Foxp3; 抗体; 小鼠**中图分类号:** R392.11      **文献标志码:** A

## Mechanism of Treg down-regulation by immunization with attenuated activated autologous T cells

ZHANG Qiu-yu<sup>1</sup>, WU Juan-juan<sup>2</sup>, LIN Jin-biao<sup>2</sup>, ZHANG Zhuang-zhuang<sup>2</sup>, SHI Yuan<sup>2</sup>, SHEN Bai-hua<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, LI Ning-li<sup>2</sup>, WANG Li<sup>2</sup>

(1. Department of Immunology, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; 2. Shanghai Institute of Immunology, Basic Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the mechanism of down-regulation of regulatory T cells (Treg) by immunization with attenuated activated autologous T cells. **Methods** Autologous T cells were activated with ConA *in vitro*. Mice were immunized subcutaneously and intraperitoneally every 5 days for 3 times ( $5 \times 10^6$  per time for each mouse), and the number and function of Treg were examined. PBS was subcutaneously injected for control group. Serum level of anti-mouse CD25 antibody was measured by ELISA. The number and function of Treg was detected by serum adoptive transfer and proliferation and inhibition assays. **Results** Compared with control group, there were less CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg in the mice after immunization ( $P < 0.01$ ), the immunosuppression ability decreased ( $P < 0.01$ ), and the level of anti-CD25 antibody increased ( $P < 0.01$ ). Adoptive transfer of serum from immunized mice to naive mice led to a significant decrease in Treg population and function in recipient mice ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Immunization with attenuated activated autologous T cells induces more anti-CD25 antibody, which may further down-regulate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg expansion and function *in vivo*.

**Key words:** autologous T cell; regulatory T cell; CD4; CD25; Foxp3; antibody; mouse

调节性 T 细胞(T regulatory cell, Treg)是近年来发现并深入研究的重要 T 细胞亚群<sup>[1-2]</sup>。研究表明, Treg 是维持机体免疫自稳的主要细胞, 通过细胞之间的直接接触或分泌细胞因子如白介素-10(IL-10)、转化生长因子-β(TGF-β)而抑制免疫反应,

起到免疫调节作用<sup>[1-3]</sup>。Treg 的异常与许多疾病发生有关<sup>[4-7]</sup>。目前, 在肿瘤发生、发展的研究中发现肿瘤微环境中存在 Treg, 可能是肿瘤逃避免疫防御、诱导机体对肿瘤细胞耐受的重要因素<sup>[8-10]</sup>。本实验观察到经过灭活的活化自体 T 细胞免疫小鼠后, 可

基金项目: 国家自然科学基金(30671945, 30872990)和上海市科委基金(08ZR1412400)(National Natural Science Foundation of China, 30671945, 30872990; Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 08ZR1412400)。

作者简介: 张秋玉(1974—), 女, 讲师, 博士生; 电子信箱: ZhangQY9801@126.com。

通讯作者: 王利, 电子信箱: aqzh16@haotmail.com.

以下调 Treg 的数量和功能,其机制可能与受体小鼠体内产生抗 CD25 抗体,通过细胞毒作用而导致了 Treg 数量下降有关。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和试剂

**1.1.1 动物及分组:** C57BL/6J 小鼠,雄性,6~8 周龄,购自中国科学院上海实验动物中心,清洁级环境饲养。动物生产许可证号为 SCXK(沪)2007-0005,动物使用许可证号为 SYXK(沪)2008-0050。免疫组和对照组各 38 只小鼠,其中每组 8 只直接用于 Treg 和抗鼠 CD25 抗体的检测,30 只用于血清过继转移实验。

**1.1.2 主要试剂:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells 分选试剂盒 (Meltiny, 德国); 鼠 CD25 蛋白 (R&D, 美国); 抗鼠 CD25 单克隆抗体和 Foxp3 胞内染色试剂盒 (eBioscience, 美国); APC-CD4、FITC/PE-CD8、FITC/PE-CD25、PE-CD62L 抗体(BD Bioscience, 美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 小鼠脾脏淋巴细胞制备:** 无菌分离小鼠脾脏单个核细胞,显微镜下计数,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 重悬,调整细胞浓度为  $4 \times 10^6/\text{mL}$ 。用 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  刀豆蛋白 (concanavalin A, ConA) 刺激,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养 72 h。Dynabeads 分离 T 细胞,用 4 000 rad 的  $\gamma$  射线照射制备自体灭活的 T 细胞。用经自体灭活的 T 细胞经皮下和腹腔注射免疫小鼠,每只小鼠注射  $5 \times 10^6$  个 T 细胞,每 5 天一次,连续免疫 3 次。第 3 次免疫后的第 5 天处死小鼠,取脾脏,制备单个核细胞。对照组小鼠皮下注射 PBS。

**1.2.2 细胞染色及流式细胞仪检测:** 收集小鼠外周血,用含 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 洗涤 1 次,用红细胞裂解液裂解后,细胞重悬于含 0.1% BSA 的 PBS 中,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{管}$ 。细胞表面染色:每管加入荧光标记抗小鼠 CD3、CD4 和抗 CD25 小鼠流式抗体,4 °C、避光孵育 20 min (设同型对照),含 0.1% BSA 的 PBS 洗涤 3 次,流式细胞仪检测。Foxp3 胞内染色:每管加入 1 mL Foxp3 staining 固定透膜液,4 °C、避光孵育 60 min,缓冲液洗涤 2 次,加入 PE-Foxp3 抗体染色,4 °C、避光孵育 20 min,含 0.1% BSA 的 PBS 洗涤 3 次,流式细胞仪检测。

**1.2.3 Treg 细胞抑制实验:** MACS 分别阴选、阳选分离 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞,分离正常小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 和 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 效应细胞,获得 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 细胞悬液。用 5 000 rad 辐射,以 CD4<sup>+</sup> 非接触性磁珠分离获得抗原提呈细胞 (antigen presenting

cells, APCs)。完全 DMEM 培养液分别调整 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞和 APCs 至适合浓度。以 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA 分别刺激  $2 \times 10^4$  个 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 细胞,加入  $1 \times 10^5$  个 APCs 联合作用,并在部分组别的孔中以  $2 \times 10^4/\text{孔}$  的接种量加入 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞。通过检测共培养体系中 [3H]-胸腺嘧啶的脉冲数评估 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞对效应细胞增殖的抑制能力。用公式:  $(1 - \text{实验组 CPM} / \text{对照组 CPM}) \times 100\%$ , 评估其抑制百分率。

**1.2.4 ELISA 法检测血清中抗鼠 CD25 抗体:** 将纯化的鼠 CD25 蛋白包被于酶标板中,分别为 50 ng/孔,4 °C 过夜。用含 0.02% 吐温-20 的 PBS 洗涤 4 次后,再以含 3% BSA 的 PBS 室温封闭 2 h。洗涤 4 次后依次在板中加入收集的小鼠血清,同时加入单克隆的抗鼠 CD25 抗体作为阳性对照和标准曲线,室温孵育 1 h。洗涤 4 次,加入生物素检测抗体 (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),室温孵育 2 h。加入 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的卵白素,室温孵育 30 min。以 0.012 3% 四甲基联苯胺/0.008% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.0) 为底物。室温 20 min 显色后用 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。检测光密度 ( $D_{450\text{ nm}}$ ),根据标准曲线计算细胞因子的浓度。

**1.2.5 血清过继转移:** 收集 30 只对照组小鼠和 30 只免疫组小鼠的血清分别混合后,将 0.8 mL 血清经尾静脉注入各 5 只正常的小鼠体内,血清转移后连续 4 d 收集小鼠外周血单个核细胞,流式细胞仪检测小鼠外周血单个核细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 的水平。处死小鼠,取出脾脏细胞,制备单个细胞,进行 Foxp3 染色。

**1.2.6 活化自体 T 细胞表面分子检测:** 无菌分离小鼠脾脏单个核细胞,显微镜下计数,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 重悬,调整细胞浓度为  $4 \times 10^6/\text{mL}$ 。用 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA 刺激,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。分别于培养 24、48、72、96 h 时取出,用荧光标记抗小鼠 CD3、CD62、CD69 抗体标记细胞,4 °C、避光孵育 20 min (设同型对照),含 0.1% BSA 的 PBS 洗涤 3 次,流式细胞仪检测。

**1.3 统计学分析** 采用 GraphPad Prism 5.0 进行作图和分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 免疫小鼠体内 Treg 数量变化** 流式细胞仪检测结果显示,免疫小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞数,

与对照组比较明显降低(图 1A)。由于 CD25 也是 T 细胞活化指标,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞并不能说明就是

Treg,Foxp3 的核内染色发现 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞也降低(图 1B)。

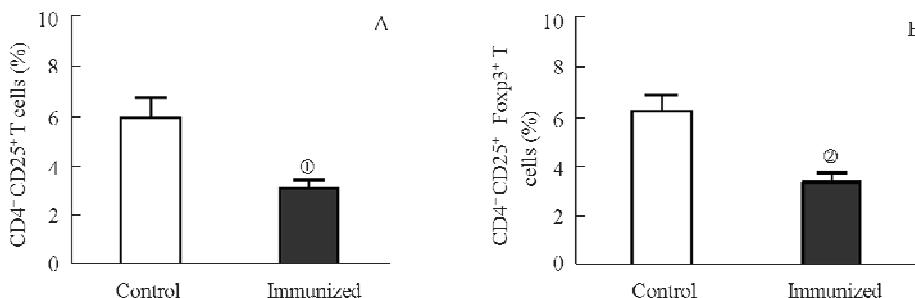


图 1 流式细胞仪检测免疫小鼠外周血中 Treg 格局变化( $n=8$ )

Fig 1 Treg profile in immunized mice compared with control detected by flow cytometry( $n=8$ )

A: percent of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells; B: percent of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T cells; <sup>①</sup>  $P < 0.05$ , <sup>②</sup>  $P < 0.01$  vs control

**2.2 免疫小鼠 Treg 抑制功能变化** 免疫小鼠中 Treg 抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞增殖的能力(抑制百分率)明显低于未接受免疫的对照组小鼠( $P < 0.01$ ) (图 2)。

**2.3 免疫小鼠体内抗 CD25 抗体的变化** 从免疫小鼠中获得的血清可特异地结合活化的自体 T 细胞(图 3A)。进一步用小鼠 CD25 抗原包被定量检测血清中抗 CD25 抗体,结果表明免疫小鼠血清中的抗 CD25 抗体为( $28.3 \pm 1.8$ ) ng/mL,较对照组的( $8.7 \pm 1.2$ ) ng/mL 显著增加( $P < 0.01$ ) (图 3B)。

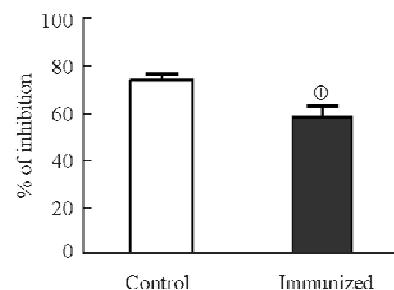


图 2 免疫小鼠体内 Treg 抑制功能的变化( $n=8$ )

Fig 2 Change of inhibition function of Treg in immunized mice( $n=8$ )

<sup>①</sup>  $P < 0.01$  vs control

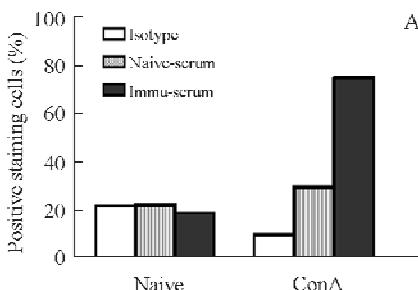


图 3 免疫小鼠体内抗 CD25 抗体的检测( $n=8$ )

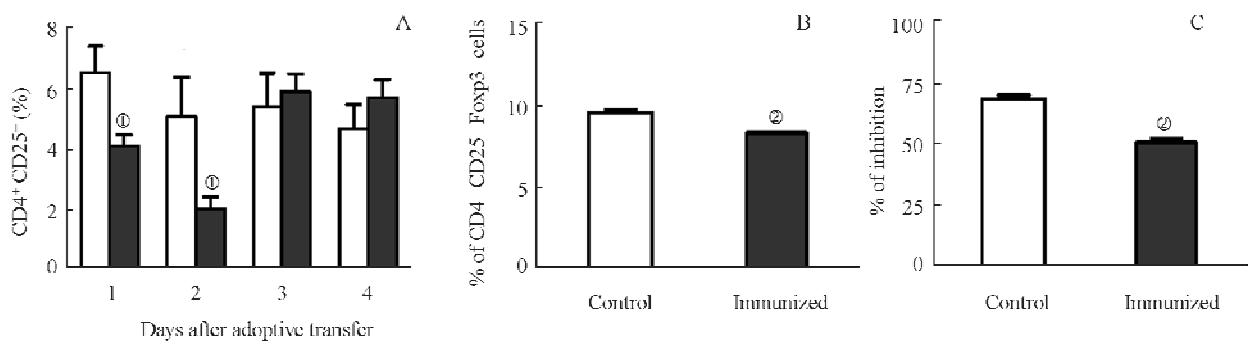
Fig 3 Detection of anti-CD25 antibody in immunized mice( $n=8$ )

A: staining patterns of resting and ConA activated T cells; B: quantitative analysis of anti-CD25 antibody levels in serum of naive and immunized mice;  
<sup>①</sup>  $P < 0.01$  vs control

**2.4 血清过继转移后受体小鼠 Treg 变化** 流式细胞仪检测发现,与接受对照组小鼠血清相比,正常小鼠在接受免疫小鼠血清被动转移的第 1 天,外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞开始减少( $P < 0.05$ ),第 2 天到达最低水平( $P < 0.01$ ),第 3 天,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞恢复并且在第 4 天达到初始水平(图 4A)。为进一步检测减少的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞是 Treg,选择接受血清转移第 2 天的小鼠,分析其 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Foxp3 的表达及对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞的抑制作用;结果表明,接受免疫血清小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞的 Foxp3

表达明显降低( $P < 0.01$ )(图 4B),抑制实验也显示其 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的抑制功能明显降低( $P < 0.01$ )(图 4C)。

**2.5 活化自体 T 细胞 CD25 的表达** 在 ConA 活化的 48 h,T 细胞的 CD69 和 CD25 表达远高于 CD62L;而在 72 h,CD62L 和 CD69 均降低近初始水平,只有 CD25 表达持续增多( $> 70\%$ );继续培养至 96 h,CD25 可以高表达至 85%~95%(图 5)。因此,可以明确本实验中用于免疫接种的 ConA 活化 T 细胞表面主要表达 CD25 分子。

图 4 免疫血清受体小鼠 Treg 的数量和功能变化 ( $n=4$ )Fig 4 Treg population and function in recipient mice after sera transfer ( $n=4$ )

A: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells; B: Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells obtained from recipient mice on day 2 after sera transfer; C: inhibition of responder cell proliferation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells obtained from recipient mice on day 2 after sera transfer; <sup>①</sup> $P < 0.05$ , <sup>②</sup> $P < 0.01$  vs control

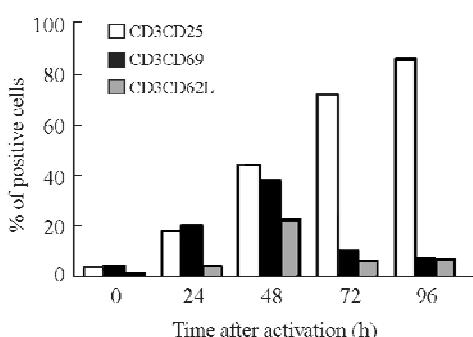


图 5 ConA 刺激自体 T 细胞后细胞表面 CD25、CD62L 和 CD69 的动态变化

Fig 5 Kinetic expression of CD25, CD62L and CD69 on ConA activated autologous T cells

### 3 讨 论

Treg 是诱导和维持外周耐受并在肿瘤免疫中发挥负向调节作用的重要细胞。目前, 已经被公认的调节性 T 细胞至少有两大类: ①Treg: 这类调节性 T 细胞最早发现, 发生于胸腺, 目前研究最为深入的一群细胞, 统称为 Treg, 其特征是表达 Foxp3 的转录因子, 表面标志为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (所以称为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞), 占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 5% ~ 15%; ②Tr1: 在免疫应答过程中诱导转化而成, 其发挥免疫抑制的机制主要是通过 IL-10 和 TGF- $\beta$ <sup>[11~13]</sup>。ConA 活化的自体 T 细胞灭活后免疫小鼠, 能够诱导 T 细胞免疫功能上调。

在研究过程中我们发现, 这些 T 细胞免疫功能增强的小鼠, 其外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞数量反而减少, 因此推测, 可能由于免疫小鼠体内 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 的调节性 T 细胞降低, 而非效应性 T 细胞(同样为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>)降低。为了证明这一推测, 我们进行了一系列实验。

功能试验结果显示, 免疫小鼠 Treg 的抑制作用

显著下降。为了探索免疫接种如何下调 Treg 群的数量和功能, 分析了免疫小鼠血清的总 IgG 水平, 发现其浓度显著升高。进一步分析升高的 IgG 针对何种抗原分子, 结果表明免疫后宿主小鼠血清中抗 CD25 抗体显著升高。这一结果提示, 灭活的自体 T 细胞免疫接种后能诱导抗 CD25 抗体的产生, 而这可能是引起 Treg 群下降的原因之一。血清被动转移实验证实了接受血清转移的小鼠的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞水平显著下降, 并在转移后 2 d 降低最为明显; 功能试验也证实 Treg 的抑制作用显著下降。通过分析进行免疫的 ConA 活化的自体 T 细胞表面 CD25 分子表达格局, 推测本实验中用于免疫接种的 ConA 活化 T 细胞表面主要表达 CD25 分子, 因此刺激受体小鼠产生抗 CD25 抗体, 而该抗体能进一步通过细胞毒作用减少 Treg 的数量, 但如何降低其功能尚不清楚。CD25 是 IL-2 受体  $\alpha$  链, 因此 CD25 也是效应性 T 细胞活化的标志<sup>[14~15]</sup>。从理论上说, 抗 CD25 抗体既能够杀伤 Treg, 使其数量减少, 也同样能够杀伤活化的效应性 T 细胞。但是还有许多问题值得探讨, 如本实验中为何只观察到 Treg 数量降低, 而没有观察到效应性 T 细胞数量的变化; 抗 CD25 抗体导致了 Treg 数量减少, 但在实验中, 用于检测 Treg 抑制功能时已经采用相同数量的 Treg, 为何来自免疫小鼠的 Treg 抑制功能仍然较对照组低; 是否还有其他能够导致功能改变的因素存在。

在用 T 细胞疫苗的治疗中发现一种称为抗“Ergotope”的反应, 其介导分子是 CD25 的不同分子表位。在治疗类风湿性关节炎的研究<sup>[16]</sup>中发现, CD25 的 61 ~ 73、145 ~ 167 可能参与了 Treg 的上调。是否其他的表位参与 Treg 的下调或 Teff 的上调, 尚有待于进一步研究。

(下转第 1156 页)

旋体黄疸出血群患者血清中 PAF-AH 酶活力约升高 100% ,而这种 PAF-AH 酶活力的升高可能与人细胞内 I 型 PAF-AH 的释放有关。本实验结果表明,可以利用两种类型 PAF-AH 对两个商业化底物特异性的不同对细胞内 I 型 PAF-AH 和血浆型 PAF-AH 进行快速区分,为进一步研究血浆型 PAF-AH 和细胞内 I 型 PAF-AH 的致病机制奠定了实验基础。

### 参考文献:

- [1] Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Platelet-activating factor (PAF): a review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy [J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2008, 2(1): 72–76.
- [2] Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2) [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, 23(1): 73–83.
- [3] Arai H, Koizumi H, Aoki J, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) [J]. *J Biochem (Tokyo)*, 2002, 131(5): 635–640.
- [4] Min J H, Wilder C, Aoki J, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases: broad substrate specificity and lipoprotein binding does not modulate the catalytic properties of the plasma enzyme [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(15): 4539–4549.
- [5] Liu G, Jin G, Jin C. CMP-N-acetylnurameric acid synthetase from *Escherichia coli* K1 is a bifunctional enzyme: identification of minimal catalytic domain for synthetase activity and novel functional domain for platelet-activating factor acetylhydrolase activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17738–17749.
- [6] Kosaka T, Yamaguchi M, Soda Y, et al. Spectrophotometric assay for serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity [J]. *Clin Chim Acta*, 2000, 296(1–2): 151–161.
- [7] Memon R A, Fuller J, Moser A H, et al. *In vivo* regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(1 Pt 2): R94–R103.
- [8] Elkiran ET, Mar N, Aygen B, et al. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 48.
- [9] Claus RA, Russwurm S, Dohrn B, et al. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in critically ill patients [J]. *Crit Care Med*, 2005, 33(6): 1416–1419.
- [10] Yang J, Zhang Y, Xu J, et al. Serum activity of platelet-activating factor acetylhydrolase is a potential clinical marker for leptospirosis pulmonary hemorrhage [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4181.

收稿日期: 2009-06-12

本文编辑: 王淑平

### (上接第 1151 页)

### 参考文献:

- [1] Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(2): 217–223.
- [2] Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression [J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(3): 108–116.
- [3] Sakaguchi S, Ono M, Setoquchi R, et al. Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease [J]. *Immunol Rev*, 2006, 212(8): 8–27.
- [4] Danese S, Rutella S. The Janus face of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in cancer and autoimmunity [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(6): 649–666.
- [5] Levings MK, Allan S, Hennezel E, et al. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity [J]. *Adv Immunol*, 2006, 92(1): 119–155.
- [6] Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(3): 458–470.
- [7] Mudd PA, Teague BN, Farris AD. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus [J]. *Scand J Immunol*, 2006, 64(3): 211–218.
- [8] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance [J]. *Immunol Rev*, 2001, 182: 18–32.

- [9] Antony PA, Restifo NP. Do CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells hinder tumor immunotherapy [J]? *J Immunother*, 2002, 25(3): 202–206.
- [10] Comes A, Rosso O, Orengo AM, et al. CD25<sup>+</sup> regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL-21-secreting cellular vaccine [J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1750–1758.
- [11] Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality [J]. *Nature Rev Immunol*, 2003, 3(4): 630–641.
- [12] Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of ‘tumor escape’ phenotypes [J]. *Nature Immunol*, 2002, 3(8): 999–1005.
- [13] Walker LS, Ghodos A, Egguna M, et al. Antigen-dependent proliferation CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(2): 249–258.
- [14] Ziegler SF. FOXP3: of mice and men [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 209–226.
- [15] Hooley DA, Larregina AT, Erdos G, et al. Tumor cell loaded type-I polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 10059–10067.
- [16] Chen GJ, Li NL, Yin CQ, et al. Vaccination with selected synovial T cells in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(2): 453–463.

收稿日期: 2009-07-08

本文编辑: 吴洋