

文章编号: 1004-0374(2009)01-0056-06

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的体外扩增 及其在移植物抗宿主病中的应用

丰涛^{1,2}, 杨洁², 范华骅^{2*}

(1 华东师范大学生命科学学院生物医学系, 上海 200062; 2 上海市血液中心血液工程研究室, 上海 200051)

摘要: 同种异基因造血干细胞移植是急、慢性白血病及其他恶性血液病重要的治疗方法, 但急慢性移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD) 作为异基因造血干细胞移植的主要并发症严重影响移植患者的存活率, 阻碍移植的临床推广。很多研究发现, 高表达 Foxp3 的 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg) 不仅能控制急慢性GVHD的发生, 而且不影响移植物抗白血病效应(graft-versus-leukemia, GVL), 在急慢性GVHD发生发展及治疗方面有重要的作用。但 Treg 细胞在体内的数量很少, 不能满足临床应用需求。目前应用外源的 IL-2 联合 TCR、CD28 信号通路共同刺激以及运用树突状细胞(dendritic cell, DC) 刺激均能达到体外有效扩增 Treg 细胞的目的。这些扩增的 Treg 细胞在控制造血干细胞移植过程中急慢性 GVHD 的发生及防治自身免疫性疾病和移植排斥等方面具有明显作用, 在疾病控制和临床应用中具有广阔前景。

关键词: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞; 移植物抗宿主病; 树突状细胞

中图分类号: R392.4 **文献标识码:** A

Expansion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells *in vitro* and application in graft-versus-host disease

FENG Tao^{1,2}, YANG Jie², FAN Hua-hua^{2*}

(1 Department of Biomedical Science, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2 Laboratory for Blood Engineering, Shanghai (Red cross) Blood Center, Shanghai 200051, China)

Abstract: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is an important way to control acute and chronic leukemia and other hematological malignancies, but acute and chronic graft-versus-host diseases (GVHD), which are major complications in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation influence the survival rate severely, and restrict the clinical application of transplantation. A great number of studies found that CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg cell) expressing Foxp3 highly are potential in controlling acute and chronic GVHD, and do not weaken graft versus leukemia (GVL). It plays an important role in acute and chronic GVHD generation, development and therapy. However, the proportion of Treg cell *in vivo* is very small, so it can not meet the clinical requirements. At present, most experiments utilize exogenous IL-2 and TCR, CD28 signaling pathway to expand Treg cells *in vitro*. In addition, dendritic cells can induce Treg cells proliferation effectively *in vivo* and *in vitro*. These expanded Treg cells exert significant effect in control acute and chronic GVHD, as well as the prevention and suppression of autoimmune diseases and transplant rejection, and have broad prospects in disease control and clinical application.

Key words: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells; graft-versus-host disease; dendritic cells

收稿日期: 2008-08-06; 修回日期: 2008-09-22

基金项目: 上海市科委基金(05XD14029)

* 通讯作者: fhh021@hotmail.com

1971年, Gershon和Kondo在裸鼠中诱导抗原特异性耐受实验中发现了所谓的抑制性细胞。但当时, 这个概念并不被人们所接受。直到1995年, Sakaguchi等发现在正常人和小鼠外周血及脾脏组织的CD4⁺T细胞中有一亚群持续高表达CD25分子(IL-2受体 α 链), 并将其命名为CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)。将这种细胞输入实验性自身免疫病动物模型中可以减轻其发病, 反之, 去除该类细胞则可诱导自身免疫病, 这表明Treg细胞是一类重要的免疫调节细胞。

机体内天然的Treg细胞数目很少, 在小鼠体内, Treg细胞占CD4⁺T细胞的5%~10%, 而人的只占1%~2%。因此, 必须建立有效的体内外扩增方法, 扩增出足够的Treg细胞才能满足临床应用。目前, Treg细胞的扩增方法主要有两种, 一种是非特异性的, 即利用CD3、CD28单克隆抗体和外源IL-2刺激其扩增; 另一种是特异性的, 用同源或异源树突细胞(dendritic cell, DC)进行扩增。而且, 扩增以后的Treg细胞仍保持其原有的功能。

近30年来, 同种异体骨髓或外周造血干细胞移植已成为治疗恶性白血病、代谢性疾病、先天免疫缺陷病以及其他自身免疫性疾病最为有效的手段, 但是术后出现的移植物抗宿主病却是导致移植术失败和患者死亡的主要原因。很多研究发现, Treg细胞在控制急慢性GVHD中有广阔的应用前景。

1 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的生物活性

1.1 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的来源 与其他的T细胞亚群一样, Treg细胞也在胸腺中产生。在胸腺中, T细胞根据其表面的TCR对自身抗原的亲和力经过正负选择发育成熟, T细胞通过与MHC复合物的亲和进行正选择, 然后在负选择中, 对自身抗原具有高亲和力的细胞凋亡而被克隆清除。目前有观点认为, 一些正选择得到的CD4⁺T细胞, 对自身抗原存在亲和力却逃避了克隆清除而发展成为CD4⁺CD25⁺调节T细胞。许多研究表明, 出生3d切除胸腺的小鼠会发生多种自身免疫性疾病, 如关节炎、甲状腺炎、胰腺炎。向该小鼠输注同种正常小鼠的CD4⁺CD25⁺T细胞后, 病状可以得到缓解^[1]。

Pillai等^[2]研究发现, Treg细胞不仅可以在胸腺中衍生, 也可以在外周诱导。甚至人类所有CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞和CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞在激活后都有一个瞬时表达Foxp3⁺CD25⁺的阶段, 并能够抑制同源CD4⁺CD25⁺T细胞的增殖。但这些

细胞的Foxp3表达最终会下降, 随之其抑制能力也减弱。

1.2 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的分子标记

Treg细胞除了组成性地表达CD4、CD25分子以外, 还非特异性地带有细胞毒T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4或CD152)、糖皮质激素诱导的TNF受体(glucocorticoid-induced tumornecrosis factor receptor, GITR)、E β 7整合素(α E integrin, CD103)、CD28等分子, 这些分子对Treg细胞的免疫功能的发挥着重要意义。

Fontenot等^[3]研究发现, 叉样转录因子Foxp3可能是Treg细胞一个特征性的标志, 对这些细胞调节功能的诱导起关键作用。研究发现, 将Foxp3基因导入CD4⁺CD25⁻T细胞, 该细胞受到刺激时呈现与自然产生的Treg细胞相同的细胞表型, 而且这些细胞能够在体外抑制T细胞的应答。

研究者发现免疫失调的人或小鼠其自身免疫反应与其Foxp3基因突变有关。Foxp3基因敲除小鼠体内没有Treg细胞, 而Foxp3蛋白的过量表达也会导致严重的免疫抑制。由此可见, Foxp3是Treg细胞发育和功能维持的重要调节因子。由于Foxp3是一种胞内蛋白, 它不能用于分离纯化Treg细胞, 所以, Foxp3在Treg细胞生物功能研究中的应用受到限制。此外, Pillai等^[2]研究发现, 在人体中活化的CD4⁺和CD8⁺T细胞都可以瞬时表达Foxp3, 并瞬时表现出抑制功能。但目前我们所发现的其他几种调节性T细胞(如Tr1细胞、Th3细胞等)不表达Foxp3蛋白, 因此, Foxp3仍是CD4⁺CD25⁺Treg细胞最具特征性的标记。

除了这些分子以外, Liu等^[4]研究发现, 人的Treg细胞低表达IL-7受体(CD127), 以CD4、CD25及CD127为分子标记分离的Treg细胞纯度要比以其他分子标记分离的纯度高很多。Liu等^[4]还指出, Foxp3与CD127的启动子相联系, 对其有抑制作用, 从而导致Treg细胞中CD127的低表达。Yamaguchi等^[5]研究发现, 天然Treg细胞会组成性大量表达叶酸受体4(folate receptor4, FR4), 根据FR4的表达可以区分Treg细胞与其他初始或活化的T细胞亚群。

由此可见, 寻找更多特征性的细胞表面分子是区分天然CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与其他的活化细胞亚群的关键所在。

2 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的体外扩增

体外扩增后的 Treg 细胞仍然高表达 CD25 和 Foxp3 分子,且在体内外的免疫功能没有减退。甚至有研究表明, Treg 细胞经过体外扩增培养后其在体内外的抑制能力要比新鲜分离的 Treg 细胞更强,而且, Treg 细胞经过冻存和融化后仍然能发挥有效的抑制功能。因此,体外扩增 Treg 细胞具有重要意义。

2.1 CD3、CD28 单克隆抗体非特异性扩增 Treg 细胞

最初的一些实验发现,与 CD4⁺CD25⁻T 细胞不同,体外培养的 Treg 细胞仅通过 TCR 刺激很难增殖。但在培养体系中加入 CD3 单克隆抗体及外源 IL-2 后, Treg 细胞可被诱导扩增。实验证明, CD3 单克隆抗体处理过的小鼠其胰腺和肠系淋巴结中 Treg 细胞的比例会大大提高^[6]。

尽管共刺激分子 CD28 在 CD25⁺ 和 CD25⁻T 细胞上的表达水平相差不多,但 CD28/B7 信号通路对 Treg 细胞的发育、外周维持及功能更为重要。CD28 或者 B7 基因缺失的小鼠其 Treg 细胞会骤然减少,而且 CD28 基因缺失的小鼠其 Treg 细胞的功能也会减弱。

IL-2 是 Treg 细胞必需的生长因子,对其发育、维持体内平衡和功能具有重要作用。由 IL-2R β 链向细胞核传递信号的 STAT5a/b 通路缺失后,会阻断 Treg 细胞的发育,并使机体产生自身免疫疾病或炎症疾病^[7]。向正常新生小鼠注射高剂量 IL-2 单克隆抗体也会减少其体内 Treg 细胞量,引发自身免疫疾病^[8]。此外, IL-2 对 Treg 细胞 Foxp3 和 CD25 分子的表达也是必需的,在体外可以增强它的抑制功能。

目前,多数实验应用外源的 IL-2 和 TCR、CD28 信号通路共同刺激,以达到体外扩增 Treg 细胞的目的。Ring 等^[9]利用 CD3、CD28 单克隆抗体结合 IL-2 体外扩增 Treg 细胞,使其 3 周内扩增了 180 倍,扩增的 Treg 细胞在体内外其免疫抑制功能强于新分离的 Treg 细胞。此外,扩增的 Treg 细胞能够冻存数周且不影响其免疫功能,这为 Treg 细胞的大规模应用提供了可能。利用 CD3、CD28 单克隆抗体包被的微球能够更有效地扩增 Treg 细胞,但细胞应用前需要清除微球,因而会对细胞造成不必要的损伤。

虽然体外 CD3、CD28 和 IL-2 的信号刺激能够有效扩增 Treg 细胞,但这种扩增方法却限制了其在体内的应用。因此利用优先或只限于 Treg 细胞表达

的受体作为扩增手段更有利于体内应用。Elpek 等^[10]研究发现, Treg 细胞受 IL-2 刺激后会上调诱导型共刺激受体 4-1BB。利用一种融合了链亲和素的新式 4-1BB 配体(SA-4-1BBL)刺激 Treg 细胞,可使其在 3 周内有效扩增 110 倍。扩增的 Treg 细胞上调 CD25、4-1BB 和膜表面 TGF- β ,能够有效抑制 T 细胞的增殖。

2.2 树突状细胞在 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞诱导及扩增中的作用

作为免疫系统中一种重要的细胞, DC 在刺激 Treg 细胞扩增中起着重要作用。Yamazaki 等^[11]通过研究表明, DC 在体内外都可以诱导 Treg 细胞的增殖。受 DC 刺激后, Treg 细胞在体内外能够以抗原特异性的方式扩增。成熟 DC 扩增的 Treg 细胞高表达 CTLA-4 和 GITR 分子,其免疫抑制功能更强。iDC (immature dendritic cell, iDC) 在稳定状态下能够分泌 IL-10、TGF- β 诱导体内耐受,而 Treg 细胞的增殖依赖于 IL-10。因此, iDC 也能够促进 Treg 细胞的扩增,但其扩增效率不如成熟 DC。在黑色素瘤小鼠模型中,未成熟 DC 主要富集在肿瘤引流淋巴结中,诱导肿瘤中免疫抑制性 Treg 的增殖,从而帮助肿瘤细胞逃逸。同样在肿瘤患者体内也发现了 iDC 的大量扩增,这说明 iDC 通过诱导 Treg 细胞在肿瘤免疫抑制中发挥了重要作用。

此外,一种特殊的耐受性 DC (tolerogenic dendritic cell, tDC) 也可以诱导扩增 Treg 细胞。DC 可以由维生素 D3 (vitamin D3) 刺激产生,也可以由免疫调节因子(IL-10, TGF- β) 诱导产生。与 iDC 相比,它表达低水平的共刺激分子 CD40 和 CD86。通过与 Treg 细胞的相互作用,刺激 Treg 细胞的增殖。Treg 细胞的增殖依赖于色氨酸的分解及其产物的生成,因此 tDC 中含有的吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 可以通过色氨酸降解途径刺激 Treg 细胞的增殖,从而诱导机体的免疫耐受。有研究发现,肿瘤引流淋巴结中的 IDO+DC 能够直接活化淋巴结中的 Treg 细胞,从而抑制了机体抗肿瘤免疫反应^[12]。

存在于血液和次级淋巴器官的浆细胞样树突细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC),通过 TLR-7 或 TLR-9 促成熟后,在无外源 IL-2 存在的情况下,能够有效的逆转 Treg 细胞无反应性,刺激 Treg 细胞的增殖。而且, 50% - 60% 成熟 pDC 诱导的 Treg 细胞高表达 Foxp3。扩增的 Treg 细胞不仅能够有效抑制 CD25⁻T 细胞的增殖,还能抑制其 IL-2 的产生。成熟 pDC 对 Treg 细胞的诱导依赖于细胞间接触,并

需要CTLA-4和CD86分子的参与。尽管其他DC也表达相同水平的CD86,但pDC促进Treg细胞增殖的作用更具优势。这说明pDC可能表达特殊的共刺激分子以促进Treg细胞的增殖。目前在人类pDC细胞表面发现两种共刺激分子——糖皮质激素诱导的TNF受体配体(GITR-L)和可诱导共刺激分子配体(ICOSL),但这两种分子的作用还需要进一步验证^[13]。

最近的研究发现,胸腺小体(Hassall'scorpuscles)表达一种类似于IL-7的胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP),对人的DC具有很强的活化作用。Watanabe等在Hassall'scorpuscles中分离出CD11c⁺CD80⁺CD86⁺和DC-LAMP⁺DC,将这些细胞分离纯化并与CD4⁺CD25⁻胸腺细胞共培养,结果发现这些胸腺细胞表达CD25分子和Foxp3,并在混合淋巴细胞反应中能够抑制T细胞的增殖。同样,如果在普通DC和CD4⁺CD25⁻胸腺细胞共培养体系中加入TSLP,这些胸腺细胞也能够转化为一般的Treg细胞。这就表明,Hassall'scorpuscles产生的TSLP能够活化胸腺中一种DC亚群,使其参与自身反应性T细胞的正选择过程并将这些细胞转化为Treg细胞^[14]。

DC与Treg细胞的作用并不是单方向的,Treg也能反过来影响DC的发育。通过体外共培养实验发现,Treg细胞能够影响DC的成熟状态从而影响其功能。例如,DC与活化的Treg细胞共培养会导致共刺激分子CD80和CD86的表达下降,进而影响DC的成熟。此外,Treg还可以上调DC表面免疫抑制分子B7-H3和B7-H4,通过传递免疫抑制信号对T细胞进行负调控^[15]。

除了表面分子,Treg细胞还可以影响DC细胞因子的分泌从而使其处于耐受状态。例如,DC与CD4⁺CD25⁻T细胞共培养时,DC会分泌大量的前炎性细胞因子IL-16。当培养体系中出现CD4⁺CD25⁺T细胞时,IL-16的表达消失,DC产生免疫抑制因子IL-10。

3 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞在移植物抗宿主病中的作用

骨髓移植、造血干细胞移植已经广泛应用于治疗遗传缺陷、恶性血液肿瘤和骨髓发育不全造成的严重感染。但在临床应用上,这种移植方法存在着严重的同种异体反应,其中危及生命的是由移植物中含有的T淋巴细胞引起的GVHD。目前免疫抑制药物,如环孢素A、加氨甲叶酸是缓解和治疗

GVHD有效的办法,但是患者长期服用容易导致严重感染和肿瘤复发。因此,寻找诱导抗原特异性移植耐受且不影响机体免疫机能的途径是提高异基因造血干细胞移植成功率并将其广泛应用于临床的关键所在。

随着对Treg细胞认识的逐步深入,人们发现它在预防和缓解GVHD方面有广阔的应用前景。Treg细胞可识别自身抗原肽,并分泌抑制性细胞因子,从而抑制自身反应性T细胞和辅助T细胞的活化。Treg细胞的活化是抗原依赖性的,而其发挥功能则是抗原非依赖性的,也就是说它对CD4⁺和CD8⁺T细胞均有抑制作用,因而在维持机体内环境的稳定、控制自身免疫性疾病的发生等方面均能发挥重要作用。

天然Treg细胞在同种异体反应中发挥了重要的免疫调节作用。例如在妊娠期,它可以调节母体对来自于父方同种抗原的耐受。在骨髓移植中,Treg细胞在同种异体反应中的免疫抑制作用也得到了证明。不同的实验动物模型也证实,移植前将T细胞中的Treg细胞清除,会加速GVHD的发生。Taylor等^[16]发现,去除供者淋巴细胞中的Treg细胞或在移植前去除受者Treg细胞都可以增强GVHD,而输注新鲜分离纯化的供者Treg细胞可减轻GVHD。除此之外,临床对外周血淋巴细胞分析显示,与没有GVHD临床症状的患者相比,患有GVHD的患者其淋巴细胞内Foxp3 mRNA的转录水平要低很多^[17]。研究发现,Treg细胞主要通过以下几个途径控制GVHD的发生:(1) Treg细胞能够产生抑制性细胞因子如IL-10、TGF-β等^[18],因而可以抑制异基因T细胞的增生,下调抗原提呈细胞上的T细胞活化必需的分子,减轻GVHD。(2) Treg细胞通过其表面的CTLA-4分子与DC表面的B7分子作用,阻止或减弱了抗原提呈细胞向CD4⁺CD25⁻T细胞传递共刺激信号,并且诱导DC表达IDO,IDO分解色氨酸,降低了靶细胞活化和发挥功能所需的氨基酸浓度,使异基因的T细胞攻击宿主组织的能力减弱。(3) 与静息CD4⁺CD25⁻T细胞相比,活化后Treg细胞更易表达GITR分子,而GITR的刺激不但可以减弱同种异基因CD4⁺CD25⁻T细胞的增殖,还可以促使它通过Fas-FasL途径发生程序性死亡^[19]。(4) 血红素加氧酶(heme oxygenase-1, HO-1)在Treg细胞抑制GVHD中也发挥了重要作用^[20]。HO-1分解亚铁血红素,其中产物一氧化碳(carbon monoxide, CO)对多种细胞(包括T细胞)具有免疫抑制作用。实验证

明, 阻断 HO-1 会减弱 Treg 细胞的抑制功能。

大量动物模型表明 Treg 细胞在同种异基因造血干细胞移植中发挥重要作用, 能够有效地阻止 GVHD 的发生。一些研究表明 Treg 细胞的抑制功能在抗宿主反应还没有完全形成时效果最佳。而另一些研究证明 Treg 细胞的功能在 GVHD 完全成形的状态时最好。与新鲜分离的 Treg 细胞相比, 体外用 IL-2 扩增的 Treg 细胞抑制活性更高。这也为体外扩增 Treg 细胞用于细胞免疫治疗提供依据。

供者的免疫细胞, 尤其是 T 淋巴细胞会被受者细胞表面的抗原活化从而发生急慢性 GVHD。然而, 供者的 T 细胞也可以通过 GVL 作用消除宿主体内残留的肿瘤细胞。因此, 如何平衡 GVL 和 GVHD 效应成为目前移植免疫学的一大挑战。Zorn 等^[21]通过在 C57BL/6 对 BALB/c 不匹配移植过程中过继性输注 Treg 细胞来观察 GVHD 和 GVL 效应, 阐述了 Treg 细胞抑制 GVHD 的同时是否会影响 GVL 作用这一问题。结果发现, 与效应 T 细胞一起输注 Treg 细胞能够成功的抑制 GVHD, 同时又保留了 GVL 功能。在最初的实验中, 骨髓移植时白血病细胞与供者的效应 T 细胞及 Treg 细胞同时输注, 移植后 2 周内受者没有发生致命的 GVHD, 白血病细胞被清除。利用移植前患有白血病的动物模型也得到了同样的结果。Treg 细胞这种选择性抑制 GVHD 而非 GVL 的功能在其他模型中也得到验证。

目前输注 Treg 细胞的最佳时间还没确定。在小鼠模型中的研究发现, 与移植同时输注 Treg 细胞可以减少急性 GVHD 的发生, 这是因为在活化的初始阶段, 效应 T 细胞更容易被抑制。但是一旦完全活化, 效应 T 细胞对 Treg 细胞的抑制作用反应性降低。而且多数移植患者会接受 GVHD 预防治疗, 包括环孢霉素 A、他克莫司和甲氨喋呤。这些免疫抑制药物对效应 T 细胞和 Treg 细胞都会有作用, 因而会影响移植 Treg 细胞的功能。Zorn 等^[21]在小鼠模型中对这一问题进行了完整的研究, 结果发现, 单独输注 Treg 细胞可以有效的阻止 GVH 同时保留了对白血病细胞有效的 GVL 作用。但研究者对 Treg 细胞在 GVHD 和 GVL 间的作用机理并不是很清楚, 为什么 Treg 细胞能够选择性抑制 GVHD 的机制还有待于实验者进行进一步研究。

4 结语与展望

近年来, 人们对 Treg 细胞进行了广泛的研究, 取得了很大的进步。Treg 细胞的免疫调节作用已经

开始应用到抑制移植物抗宿主病、治疗自身免疫性疾病以及感染性疾病中。但是这类细胞作为治疗工具还存在一些不明确的地方, 例如, 虽然 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞在治疗 GVHD 方面能够发挥重要作用, 但它同时与肿瘤的发生也有一定的关系, 回输体外扩增的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞是否会引起肿瘤的复发? 另外如何诱导抗原特异性的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞用于特异性的免疫治疗也是亟待解决的一个问题。尽管如此, 作为免疫调节系统的一类重要细胞亚群, Treg 细胞为抗原特异性的免疫治疗和自身免疫的调节提供了可能性。此外, Treg 细胞还可以缓解病原体感染对机体的损伤。因此, Treg 细胞不仅在免疫学的理论研究上有很大的价值, 同时在临床治疗上也具有广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Pacholczyk R, Kraj P, Ignatowicz L. Peptide specificity of thymic selection of CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol*, 2002, 168(2): 613-20
- [2] Pillai V, Ortega SB, Wang CK, et al. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol*, 2007, 123(1): 18-29
- [3] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003, 4: 330-6
- [4] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *Exp Med*, 2006, 203(7): 1701-11
- [5] Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*, 2007, 07(27): 145-59
- [6] Yi H, Zhang J, Zhao Y. The effects of antibody treatment on regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Transpl Immunol*, 2008, 19: 37-44
- [7] Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, et al. IL-2 receptor β -dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol*, 2007, 178: 280-90
- [8] Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *Exp Med*, 2005, 201: 723-35
- [9] Ring S, Thome M, Pretscher L, et al. Expanded murine regulatory T cells: analysis of phenotype and function in contact hypersensitivity reactions. *J Immunol Methods*, 2007, 326(1-2): 10-21
- [10] Elpek KG, Yolcu ES, Franke DD, et al. *Ex vivo* expansion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol*, 2007, 179(11):

- 7295-304
- [11] Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, et al. Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *Exp Med*, 2003, 198: 235-47
- [12] Piersma SJ, Welters MJ, van der Burg SH. Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients. *Hum Immunol*, 2008, 19(45): 241-9
- [13] Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, et al. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol*, 2008, 180: 5862-70
- [14] Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol*, 2007, 250(1-2): 1-13
- [15] Mahnke K, Johnson TS, Ring S, et al. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *Dermatol Sci*, 2007, 46: 159-67
- [16] Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR, et al. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 2002, 99(10): 3493-9
- [17] Hess AD. Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2006, 12: 13-22
- [18] Pontoux C, Banz A, Papiernik M, et al. Natural CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol*, 2002, 4(2): 233-9
- [19] Yong Z, Chang L, Mei YX, et al. Role and mechanisms of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol*, 2007, 17: 120-9
- [20] Kim CH. Migration and function of FoxP3⁺ regulatory T cells in the hematolymphoid system. *Exp Hematol*, 2006, 34: 1033-40
- [21] Zorn E. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human hematopoietic cell transplantation. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16: 150-9
- [22] Cohen JL, Boyer O. The role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the physiopathogeny of graft-versus host disease. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18: 580-5
- [23] Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(5): 370-5
- [24] Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM. The interaction of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Semin Immunol*, 2006, 18(2): 93-102