

# 天然调节 T 细胞与诱导调节 T 细胞的生物学特性 \*

陈军浩 张 葵<sup>△</sup>

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科 江苏 南京 210008)

**摘要** CD4+CD25+FOXP3<sup>+</sup> 的调节 T 细胞(regulatory T cells ,Treg)在维持机体免疫平衡方面起着重要的作用。体外扩增 Treg 细胞用于治疗自身免疫病、哮喘及诱导器官移植免疫耐受引起人们极大的兴趣。Treg 细胞可分为 2 个亚群 ,分别为 nTreg 和 iTreg ,两者有不同的生物学特性。nTreg 在特定条件下 ,可以分泌具有促进炎症的 IL-17 ;iTreg 在体内可丢失 FOXP3 ,失去其免疫抑制功能。Treg 细胞用于临床治疗 ,还有许多问题需要研究解决。

**关键词** :调节 T 细胞 ,天然调节 T 细胞 ,诱导调节 T 细胞 ,细胞治疗

**中图分类号** :R392.12 **文献分类号** :A **文章编号** :1673-6273(2012)02-389-04

## Characteristics of Natural and Induced Regulatory T Cells\*

CHEN Jun-hao, ZHANG Kui<sup>△</sup>

(Department of Laboratory, Affiliated Hospital of medical College of Nanjing University, Jiangsu Nanjing, 210008)

**ABSTRACT:** CD4+CD25+FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells is more important for keeping the immune system in homeostatic balance. There is more increasing attention in large-scale expansion of regulatory T cells for therapeutic autoimmune disease, asthma and inducing immune tolerance for organ transplant. There are two subgroup in regulatory T cells, named naturally occurring Tregs (nTreg) and inducible Tregs(iTreg), respectively. There are some differences between nTreg and iTreg cells in biology characteristics. The nTreg is able to produce IL-17 cytokine which can promote proinflammatory under specific environment. The iTreg may lose FOXP3 expression and miss its immune suppression. Many questions must be solved before Tregs as cellular therapeutics.

**Key words:** Regulatory T cells; nTreg; iTreg; Cellular therapy

**Chinese Library Classification:** R392.12 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)02-389-04

### 前言

调节性 T 细胞(regulatory T cells ,Treg)具有抑制自身反应性淋巴细胞增殖、维持机体内环境稳定、预防和阻止自身免疫病的发生与发展、减轻机体过度免疫应答引起的组织损伤等作用 ,因此 ,近年来以 Treg 细胞为基础的细胞治疗自身免疫病、过度反应性炎症的研究引起人们的兴趣。体内具有免疫调节的细胞主要包括 :Th<sub>3</sub>、Tr<sub>1</sub>、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> 细胞、NK2 和 Treg 细胞等。表达 FOXP3 的专职调节 T 细胞是维持机体免疫平衡最重要的细胞<sup>[1]</sup>。

Treg 细胞根据其产生部位以及生物学特性上的差异可分为 2 个亚群 ,分别称为天然调节 T 细胞 (naturally occurring Tregs ,nTreg) 和诱导调节 T 细胞 (inducible Tregs, iTreg)。nTreg 在胸腺中自然发育成熟 ,iTreg 在外周淋巴组织中或体外 IL-2 和 TGF-β 条件下 ,由传统的 CD4+FOXP3<sup>-</sup> 细胞转化而来。

### 1 nTreg 和 iTreg 的分化机制

nTreg 细胞的生长发育受胸腺微环境的严格控制。Jordan 等用自身抗原肽在胸腺中诱生出自身反应性 nTreg ,并且发现 ,自身反应性抗原肽 -MHC-II 复合物与 TCR 必须有较高的亲和

力才能成功诱生 ,低亲和抗原不能通过这样的路径激发 nTreg 细胞产生和发育<sup>[2]</sup>。这一过程也需要树突状细胞提供很强的 CD28 共刺激信号<sup>[3]</sup> ,因为在 CD28 缺陷鼠中 nTreg 细胞显著减少<sup>[4]</sup>。自身反应性抗原肽并不是在 T 细胞发育过程中诱导 nTreg 细胞产生 ,是通过淋巴细胞阳性选择和阴性选择而生成的一种特定的细胞品系<sup>[5]</sup> ,nTreg 在胸腺中发育成熟 ,适应胸腺细胞表达的自身抗原 ,所以 ,nTreg 细胞本身就是一种具有免疫调节作用的细胞 ,在其成熟迁移至外周循环过程中 ,其表达 FOXP3 的生物学特性不受所处微环境的影响。

iTreg 细胞是成熟的 naïve CD4 细胞在外周免疫器官中受微环境的影响 ,而逐渐表达 CD25 和 FOXP3 ,因此 ,它是一种诱导型的、具有免疫调节的细胞。naïve CD4 细胞转化为 iTreg 细胞 ,主要依赖外周淋巴器官中树突状细胞和所在的微环境。研究证实 :用微量的抗原适度活化树突状细胞能够诱导 naïve CD4 细胞表达 FOXP3 ,成为有免疫抑制作用的 iTreg ,添加 TGF-β 细胞增殖受到一定的抑制 ,但是转化为表达 FOXP3 细胞的比率大幅上升<sup>[6]</sup> ,这些细胞与机体对外部抗原免疫耐受、肿瘤细胞的免疫逃避及过度的免疫应答密切相关。体内 iTreg 的诱导 ,不需要很强的 TCR 刺激 ,而是需要适度的抗原刺激 ,用 B7 中和抗体阻断 CD28 的作用 ,提高共刺激分子 CTLA-4 和 ICOS 的作用 ,均有利于 iTreg 的发育<sup>[7,8]</sup>。

\* 基金项目 南京市医学发展重点项目(ZKX08030)

作者简介 陈军浩(1966-) ,男 ,本科 ,副主任技师 ,主要从事细胞免疫研究。电话 :025-83304615-10370 ,Email :nj\_cjh@yahoo.com.cn。

△通讯作者 张葵 ,电话 :025-3304616-10360 ,E-mail: zkanghui@yahoo.com.cn。

(收稿日期 2011-04-30 接受日期 2011-05-23)

给 DO11.10 SCID 鼠口服 OVA 抗原 5 天以后在其肠系膜淋巴结发现大量的 iTreg, 对照组服用 BAS, 没有见到 iTreg 增加的现象, 说明适度的抗原刺激能够诱导 iTreg 的产生, 这些 iTreg 细胞可以在肠道固有层中持续分化, 以适应微生物和食物对肠道的刺激, 避免肠道对它们的免疫应答<sup>[9]</sup>。也有研究发现, 用低剂量的 CD28 抗体(JJ316)能诱导体内 Treg 大量产生, 而且并不伴随全身性淋巴细胞增生, 提示 Treg 细胞对 CD28 抗体的刺激比较敏感<sup>[10]</sup>。

TGF- $\beta$  在体内和体外诱导 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞是必须的, 但在 nTreg 的发育中却存在争议。采用敲除 T 细胞 TGF- $\beta$  受体方式的研究发现, TGF- $\beta$  不涉及胸腺中 nTreg 的发育<sup>[11]</sup>。但有学者发现, TGF- $\beta$ 1 受体缺陷小鼠能出现严重的 nTreg 增生缺陷, 因此认为 TGF- $\beta$  与 nTreg 的发育相关<sup>[12]</sup>。

IL-2 对 iTreg 细胞发育是必须的。Naive CD4 细胞用 anti-CD3 和 TGF- $\beta$  刺激得到 iTreg 细胞, 高浓度的 IL-2 能够缓解 TGF- $\beta$  介导的细胞增殖抑制<sup>[13]</sup>。用 IL-2 抗体和 IL-2 缺陷鼠 T 细胞证实, 体外诱导 FOXP3 表达及其抑制活性的发挥, IL-2 是必不可少的<sup>[14]</sup>。有学者发现 HIV 患者经抗病毒和 IL-2 治疗后, 通常会有 CD4 细胞的初步恢复, 但是其免疫缺陷的状态并没有相应的恢复。在对长期接受 IL-2 治疗的 HIV 患者 CD4 细胞分析中发现, 主要存在 2 个不同的细胞亚群, 分别是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup>CD127<sup>lo</sup>FOXP3<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>FOXP3<sup>hi</sup>, 其基因表达也类似健康人的 Treg<sup>[15]</sup>, 这应引起人们的注意, 长期使用 IL-2 可能导致 Treg 细胞增生, 从而抑制机体的免疫状态。

目前, 人们对体内诱导 iTreg 所必需的微环境知之甚少, 但已经认识到无论体内还是体外, iTreg 发育至少需要 TCR 刺激、IL-2 和 TGF- $\beta$  的参与。

## 2 nTreg 和 iTreg 体外扩增

通常外周血中 Treg 细胞数量很少, 一般为 CD4 细胞的 5-10%。为了达到治疗所需的细胞数, 必须体外扩增足量的 nTreg 和 / 或 iTreg 细胞, 尤其是因 iTreg 更容易获得, 且在免疫抑制功能上与 nTreg 接近, 是目前研究的热点。

nTreg 的分离通常有磁珠分离法和流式细胞仪分离法。体外扩增 nTreg 首先需要得到高纯度的 nTreg 细胞, 实验研究中多用流式细胞术分选出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 的细胞, 其细胞纯度可达到 97-99%<sup>[16,17]</sup>。因为 nTreg 没有单一的标识性的免疫标志, 磁珠法分离 nTreg 多采用多次分选法, 通常先阴性选择出 CD4 细胞, 然后再选择出 CD25<sup>+</sup> 细胞, 该方法尚无法区分 CD25<sup>+</sup> 和 CD25<sup>+</sup> 细胞群<sup>[18]</sup>。目前, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim</sup> 的细胞也公认为 Treg 的表面标志, 其中约 90% 的细胞表达 FOXP3<sup>[19]</sup>, 因而阴性选择出 CD4<sup>+</sup>CD127<sup>dim</sup> 细胞, 再选择出 CD25<sup>+</sup> 细胞也可认为是 nTreg 细胞<sup>[20]</sup>。通常认为, 在没有受到抗原刺激的动物体内, 即便是外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 的调节 T 细胞也可认为属于 nTreg 细胞。

nTreg 细胞体外扩增比较简单, 可直接用 1 ng/ml PMA, 200 ng/ml 离子霉素活化细胞, 在 100 IU/ml 重组 IL-2 的条件下, 就可以使 nTreg 细胞得到有效的增殖<sup>[21]</sup>。也有学者在高浓度的 IL-2(2000 IU/ml) 的情况下, 用 anti-CD3/anti-CD28 微球刺

激人外周血分离的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞, 使得 nTreg 细胞扩增 200 倍, 这些细胞体外能够抑制效应 T 细胞增殖, 并且表达 nTreg 的表型, 如: CD62L、HLA-DR、CCR6 和 FOXP3<sup>[22]</sup>。Hoffmann 等用 anti-CD3 和 anti-CD28 抗体刺激细胞, 在 IL-2 及 CD32+L 细胞共存的情况下, 使人外周来源的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞扩增高达 1 万倍<sup>[23]</sup>。

从 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 的细胞诱导 iTreg 细胞, 则需要用 anti-CD3/anti-CD28 微球活化细胞, 在 10 ng/ml TGF- $\beta$  和 100 IU/ml 重组 IL-2 的条件下, 可以得到增殖<sup>[21]</sup>。尽管体内也可以诱导出 iTreg<sup>[6,9]</sup>, 但是目前还没有有效的鉴定方法。体外诱导 iTreg 的优势是可诱导具有抗原特异性的 iTreg 细胞, 回输体内后, 能够以抗原特异性的方式抑制相应的免疫应答<sup>[24]</sup>。体外用 TGF- $\beta$  和 IL-2 结合 TCR 的刺激, 能诱导 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞, 高表达 FOXP3。Selvaraj 等<sup>[25]</sup>较为详细的研究了在诱导过程中细胞动力学的变化, 用 CD3/CD28 刺激 CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 细胞, 加入 TGF- $\beta$  后 2-3 天, FOXP3 就开始明显上调, 90% 以上的细胞发生了转化。他们发现 FOXP3 表达需要严格的 TCR 刺激, 但是不需要共刺激分子的作用, 也不依赖细胞周期的改变。除去 TGF- $\beta$ 4 天后 FOXP3 大多丢失。大部分移植进入鼠体内的 iTreg 细胞, 2 天内后 FOXP3 的表达开始下调。这些 FOXP3<sup>+</sup> 的细胞主要分布在血液、脾、肺和肝内。移植 iTreg 28 天后, 只能检出很少的 FOXP3<sup>+</sup> 细胞, 但是 FOXP3<sup>+</sup> 细胞依然能被检出, 他们主要定位于淋巴结和骨髓。所以, 体外诱导的 iTreg 输入体内后, FOXP3 表达是短暂的, 并且是 TGF- $\beta$  依赖性的。在体内输入的 iTreg 中有一个亚群会长期存在于体内, 提供一个长久调节免疫活性的功能<sup>[25]</sup>。

## 3 nTreg 和 iTreg 的差异

nTreg 和 iTreg 均表达 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, 目前还没有公认的区分两者的方法。一般认为, 在没有受到抗原刺激的情况下, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞大多属于 nTreg, 如果受到抗原刺激, 则在机体内 nTreg 和 iTreg 共存。nTreg 表达 CTLA-4 (细胞毒 T 淋巴细胞抗原 4)、GITR (糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体)、CCR4 (趋化因子受体) 和 CD62L, 绝大多数 nTreg 都是已经活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞 (例如: 鼠 CD45RB<sup>low</sup>, 人表达 CD45RO)。iTreg 需要另外的、适度的抗原刺激, 才能从 naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞转化而来, 表达记忆细胞的某些标志<sup>[26]</sup>。

体内直接分选的 nTreg, 其 FOXP3 基因外显子 1 上游进化保守区 (Treg cell-specific demethylated region, TSDR) 全部去甲基化, 而体外诱导的 iTreg 尽管高表达 FOXP3, 但是其 TSDR 仅部分去甲基化, 而 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞 TSDR 全部甲基化<sup>[27,28]</sup>。TSDR 甲基化能抑制 FOXP3 表达, 干扰 Treg 细胞的发育和免疫抑制功能作用的发挥, TSDR 去甲基化是细胞稳定表达 FOXP3 所必要的<sup>[28]</sup>。所以, 当没有 TGF- $\beta$  存在时, 再次刺激 iTreg 会丧失 FOXP3 的表达, 而 nTreg 则无此现象<sup>[28]</sup>。

体外和体内扩增的 iTreg TSDR 甲基化状态也有显著的差异, nTreg 和体内诱导的 iTreg 一样, 都能保持有效的 TSDR 未甲基化状态, 这与体外诱导的 iTreg 不一样。Polansky 报告了氮胞苷 (azacytidine) 对 DNA 甲基化的抑制作用, 体内用 DEC-205 诱导的 iTreg 可长期存在表达 FOXP3, 显示出有效的

TSDR 去甲基化状态, 可以保持 3 周<sup>[29]</sup>。体外诱导的 iTreg, STDR 去甲基化状态仅仅保持 6 天<sup>[28]</sup>。

FOXP3 基因 TSDR 区的甲基化与否, 控制了 nTreg 和 iTreg 表达 FOXP3 的状态, TSDR 甲基化使其表达 FOXP3 功能丧失, 反之则高表达。nTreg 和 iTreg, 特别是体外诱导的 iTreg 其 TSDR 甲基化状态各不相同, 从而表现出不同的特性。

#### 4 nTreg 和 iTreg 协同作用

nTreg 和 iTreg 都能够保持机体内环境稳定, 预防自身免疫病的发生, 阻止自身免疫病的发展的作用是公认的。TGF- $\beta$ 1 和 TGF- $\beta$  受体基因敲除鼠发生严重的自身免疫病, 尽管此时在胸腺中 nTreg 发育正常, 但其在体外的免疫抑制功能受到很大地限制<sup>[30]</sup>。由于 TGF- $\beta$  缺陷 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞不能转化为 iTreg, 因此, iTreg 和 nTreg 在抑制免疫应答中的相互作用开始引起人们的注意。

Haribhai 等<sup>[30]</sup> 用结肠炎模型比较了 nTreg、体外诱导的 iTreg 体内诱导的 iTreg 的功能。转移 CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 细胞进入 RAG- 缺陷鼠诱导结肠炎模型。如果 naïve T 细胞因 FOXP3 基因突变而不能转变为 iTreg, 则疾病进展很快。当移植具有正常 FOXP3 基因鼠效应 T 细胞之后, nTreg 比体外诱导的 iTreg 能更好的控制疾病的发展。但是, 重要的是, 在 FOXP3 缺陷鼠中, 必须 iTreg 和 nTreg 联合应用, 才能对结肠炎模型鼠有保护作用(移植 FOXP3 缺陷鼠 CD4 细胞诱导的模型)。如果效应细胞来自于 FOXP3 基因正常的鼠, 则只用 nTreg 就能抑制疾病的进程, 主要是在鼠体内, 部分效应细胞可转变为 iTreg 细胞。由此, 在结肠炎模型中, 如果要阻止疾病的进展, nTreg 和 iTreg (体外诱导的或者体内诱导的)两种细胞都是必须的。在通常的实验研究中, nTreg 细胞实际上主要是 nTreg, 同时也包含了一部分体内诱导的 iTreg。

只有 nTreg 与 iTreg 共存时(无论是体内诱导还是体外诱导的 iTreg) 结肠炎模型鼠病情得到有效的控制, 加之 iTreg 与 nTreg 基因表达图谱显著不同<sup>[30]</sup>, 提示 iTreg 与 nTreg 是两类不同的细胞, 两者是相互协同来维持机体的免疫耐受。

#### 5 应用展望

Treg 细胞作为具有免疫抑制能力的细胞, 尽管在动物模型上显示了良好的阻止自身免疫病、哮喘等疾病发生发展的作用。但是大多动物实验效果都是短期观察, 相对于人类慢性自身免疫病、哮喘和器官移植还有许多问题没有得到解决, 如: nTreg 在体内有转变为分泌 IL-17 的可能, 加重疾病的病理损伤, 并且与肿瘤的发生相关<sup>[31]</sup>。Voo 等研究发现 nTreg 在 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-21、IL-23 和人血清条件下, 可以产生 IL-17, 成为具有促进炎症和自身免疫病理作用的细胞。进一步研究发现胸腺中不存在 IL-17<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 细胞, 故外周 IL-17<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 细胞是在外周免疫器官特定微环境发育而成<sup>[32]</sup>, 那么大剂量输入 Treg 细胞, 在体内能否转变为 IL-17<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 细胞尚不清楚。iTreg 在体内也会逐渐丧失 FOXP3 的表达, 失去其免疫抑制的能力, 有转变为效应细胞的潜在危险<sup>[33]</sup>。因此, 调节 T 细胞移植用于临床治疗还需要更多的实验研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice [J]. Nat Immunol, 2007, 8:191-197
- [2] Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ et al. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide[J]. Nat Immunol, 2001, 2(4):301-306
- [3] Tai X, Cowan M, Feigenbaum L et al. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2[J]. Nat Immunol, 2005, 6(2): 152-162
- [4] Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes [J]. Immunity, 2000, 12(4): 431-440
- [5] Larkin J, Rankin AL, Picca CC et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen[J]. J Immunol, 2008, 180(4):2149-2157
- [6] Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen [J]. Nat Immunol, 2005, 6(12):1219-1227
- [7] Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion[J]. J Exp Med, 2004, 199(11):1479-1489
- [8] Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade[J]. J Exp Med, 2001, 193(11):1311-1318
- [9] Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid-dependent mechanism[J]. J. Exp. Med, 2007, 204(8), 1757-1764
- [10] Beyersdorf N, Gaupp S, Balbach K et al. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Exp Med, 2005, 202(3):445-455
- [11] Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- $\beta$  receptor [J]. Immunity, 2006, 25(3): 441-454
- [12] Liu Y, Zhang P, Li J et al. A critical function for TGF- $\beta$  signaling in the development of natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells [J]. Nat Immunol, 2008, 9(6):632-640
- [13] Chen W, Jin W, Hardegen N et al. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor FoxP3 [J]. J Exp Med, 2003, 198(12): 1875-1886
- [14] Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage[J]. Nat Immunol, 2007, 8(5):457-462
- [15] Weiss L, Letimier FA, Carriere M et al. In vivo expansion of naive and activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients [J]. PNAS, 2010, 107(23): 10632-10637
- [16] Eelvaraj RK, Geiger TL. Mitigation of experimental allergic en-

- cephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance [J]. J Immunol, 2008, 180(5):2830-2838
- [17] Tang Q, Henriksen KJ, Bi M. et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes[J]. J Exp Med, 2004, 199(11):1455-1465
- [18] Hong J, Zang YC, Nie H. et al. CD4<sup>+</sup> regulatory T cell responses induced by T cell vaccination in patients with multiple sclerosis [J]. PNAS, 2006, 103(13):5024-5029
- [19] Shen LS, Wang J, Shen DF. et al. CD4(+)CD25(+)CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression [J]. Clin Immunol, 2009, 131(1):109-118
- [20] Tockis J, Colau D, Coulie PG, et al. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(12):3315-3322
- [21] Selvaraj RK, Geiger TL. Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance[J]. Immunol, 2008,180(5):2830-2838
- [22] Earle KE, Tang Q, Zhou X. et al. In vitro expanded human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress effector T cell proliferation [J]. Clin Immunol, 2005, 115(1):3-9
- [23] Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA. et al. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells [J]. Blood, 2004, 104(3):895-903
- [24] Zhang H, Podojil JR, Chang J. et al. TGF-beta-induced myelin peptide-specific regulatory T cells mediate antigen-specific suppression of induction of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2010, 184(12):6629-6636
- [25] Selvaraj RK, Geiger TL. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta[J]. J Immunol, 2007,178(12):7667-7677
- [26] Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other[J]. Trends Immunol, 2008,29(9):429-435
- [27] Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression[J]. Blood, 2009, 114(18):3727-3735
- [28] Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells[J]. PLoS Biol, 2007,5(2):e38
- [29] Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression [J]. Eur J Immunol, 2008 ,38 (6): 1654-1663
- [30] Haribhai D, Lin W, Edwards B, et al. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis [J]. J Immunol, 2009,182(6):3461-3468
- [31] Kryczek I, Wu K, Zhao E, et al. IL-17<sup>+</sup> Regulatory T Cells in the Microenvironments of Chronic Inflammation and Cancer [J]. Immunol, 2011,186(7):4388-4395
- [32] Voo KS, Wang YH, Santori FR, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans [J]. PNAS,2009,106(12): 4793-4798
- [33] O'Connor RA, Leech MD, Suffner J, et al. Myelin-reactive, TGF-beta-induced regulatory T cells can be programmed to develop Th1-like effector function but remain less proinflammatory than myelin-reactive Th1 effectors and can suppress pathogenic T cell clonal expansion in vivo[J]. J Immunol, 2010,185(12):7235-7243