

成熟树突状细胞和转化生长因子β联合体外扩增小鼠调节性T细胞*☆

范莎莎¹, 罗荣城², 段华新³, 石詠中¹, 袁友红¹, 肖佩玲³

Combination of mature dendritic cells and transforming growth factor beta for *in vitro* amplification of regulatory T cells in mice

Fan Sha-sha¹, Luo Rong-cheng², Duan Hua-xin³, Shi Yong-zhong¹, Yuan You-hong¹, Xiao Pei-ling³

¹Institute of Clinical Medicine, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, Hunan Province, China;
²Department of Oncology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China;
³Department of Neoplastic Hematology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, Hunan Province, China

Fan Sha-sha ☆, Studying for doctorate, Physician, Institute of Clinical Medicine, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, Hunan Province, China
fresh0225@126.com

Luo Rong-cheng, Master, Chief physician, Department of Oncology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Fan Sha-sha and Luo Rong-cheng were considered as co-first authors.

Corresponding author: Xiao Pei-ling, Chief physician, Department of Neoplastic Hematology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, Hunan Province, China
fresh0225@sina.com

Supported by: Changsha Municipal Science and Technology Bureau, No. K0902174-31*

Received: 2011-10-07
Accepted: 2011-11-15

Abstract

BACKGROUND: At present, the nature CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are too rare to meet the clinical requirement.

OBJECTIVE: To establish an effective amplification system of murine CD4⁺CD25⁺T cells *in vitro*.

METHODS: Mature dendritic cells from C57/BL6 mouse bone marrow were combined with different doses of transforming growth factor β were used to amplify autologous or allogeneic CD4⁺CD25⁺T cells *in vitro*.

RESULTS AND CONCLUSION: After 2 weeks culture, magnetic bead sorted CD4⁺CD25⁺T cells in the amplification factor for natural regulatory T cells were (17.3±10.6) times, 0.2 and 2 μg/L concentration had the strongest amplification on T cells. The expansion CD4⁺CD25⁺ positive rate was (85.38±1.82)%, CD127 positive rate was (78.86±0.91)%; The expansion of regulatory T cells with high expression of FOXP3 mRNA was 1.5 folds than nature ones *in vitro*. The regulatory T cells inhibitory test showed that regulatory T cells could inhibit the proliferation of auto-and allo-CD4⁺T cells *in vitro* in a cell dose-dependent manner. The inhibitory rate of CD4⁺CD25⁺T cells to autologous CD4⁺T cells was (60.1±0.71)%, the inhibit rate of allogeneic CD4⁺T cells was (35.5±0.57)% (*P* < 0.05). We successfully amplified CD4⁺CD25⁺T cells *in vitro*. The cells expanded have inhibitory effects *in vitro*, and as the method can obtain large quantity and purity cells, which may be used in clinical trials in future.

Fan SS, Luo RC, Duan HX, Shi YZ, Yuan YH, Xiao PL. Combination of mature dendritic cells and transforming growth factor beta for *in vitro* amplification of regulatory T cells in mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2728-2732.

[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前天然 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞稀少, 远远不能满足临床需求。

目的: 建立有效的体外培养扩增小鼠 CD4⁺CD25⁺T 细胞体系。

方法: 从 C57/BL6 小鼠骨髓获得的成熟树突状细胞联合不同剂量转化生长因子 β, 体外扩增同基因或异基因 CD4⁺CD25⁺T 细胞。

结果与结论: 经过 2 周培养, 磁珠分选后的 CD4⁺CD25⁺T 细胞的扩增倍数为自然调节性 T 细胞的(17.3±10.6)倍, 0.2, 2 μg/L 质量浓度对 T 细胞的扩增能力最强; 经扩增后的 T 双阳性率为(85.38±1.82)%, CD127 阳性率(78.86±0.91)%; 体外扩增的调节性 T 细胞高表达 FOXP3 为天然调节性 T 细胞的 1.5 倍; 调节性 T 细胞体外抑制实验结果表明: 调节性 T 细胞对自体或异体 CD4⁺T 细胞抑制能力随着效靶比浓度的降低而降低, 体外扩增的 CD4⁺CD25⁺T 细胞对自体 CD4⁺T 细胞抑制率(60.1±0.71)%, 对异体 CD4⁺T 抑制率为(35.5±0.57)%(*P* < 0.05)。提示在体外成功扩增了 CD4⁺CD25⁺T 细胞, 并且具有免疫抑制功能, 此方法扩增细胞数量多, 细胞纯度有很大提高, 方法简便。

关键词: 成熟树突状细胞; CD4⁺CD25⁺T 细胞; 转化生长因子 β; 体外扩增; 小鼠

缩略语注释: TGF-β: Transforming growth factor beta, 转化生长因子 β

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.015

范莎莎, 罗荣城, 段华新, 石詠中, 袁友红, 肖佩玲. 成熟树突状细胞和转化生长因子 β 联合体外扩增小鼠调节性 T 细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15):2728-2732. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞是天然产生的调节性T细胞的重要亚群之一, 在维持免疫系统稳态中发挥重要的作用。近年来越来越多的证据证明, CD4⁺CD25⁺T细胞在维持机体内环境的稳定、肿瘤免疫监测及自身免疫性疾病的发生中均发挥重要作用。但是机体内天然的T细胞数目很少, 在人体内, 调节T细胞占CD4⁺T细胞的5%~10%, 而小鼠的只占1%~2%。因此, 必须建立有效的T细胞体外扩增方法, 才能满足大量的临床输注需要。目前, 普遍利用CD3、CD28单克隆抗体和外源白细胞介素2体外扩增

T细胞, 但其扩增效率很低, 不能满足临床需求。作者通过成熟树突状细胞联合转化生长因子β(Transforming growth factor beta, TGF-β)体外扩增T细胞, 最终确立一种高效的T细胞体外扩增方法, 为T细胞疗法的临床运用提供理论基础。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2011-01/06在湖南省长沙市临床医学研究所完成。湖南省肝细胞移植中心, 湖南省省级重点实验室 安全防护水平 BSL-2。

材料:

实验动物: SPF级4~6周龄雄性C57/BL6(H2b)小鼠20只, 体质量20~22 g, SPF级两三月龄BABI/C小鼠20只, 由湖南省斯莱克景观公司提供。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
小鼠 CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞磁珠分选试剂盒	Invitrogen 公司
CD4-FITC、CD25PE-Cy5、CD127-PE、CD80-FITC、CD86-PE 单克隆抗体、IgG2bk、IgG1 λ 、IgG2ak、Armenian Hamster igG、IgG2ak	eBioscience 公司
重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(mGM-CSF)、重组 TGF- β 1	PROSPEC 公司
流式细胞仪	BeckMan 公司
小鼠 Ficoll 淋巴细胞分离液	中国科学研究院
CCK-8 检测试剂盒	Dojindo 公司

实验方法:

小鼠骨髓来源成熟树突状细胞的获取: 无菌取C57/BL6(H2b)小鼠的股骨和胫骨的骨髓细胞, 缓慢重悬到Ficoll淋巴细胞分离液上, 离心, 吸取白细胞层, 加入PBS洗涤3次, 调整骨髓细胞浓度为 $1 \times 10^9 L^{-1}$, RPMI 1640完全培养液(含体积分数10%胎牛血清、15 $\mu g/L$ GM-CSF、15 $\mu g/L$ 白细胞介素4)。在37 $^{\circ}C$ 、体积分数5% CO₂及饱和湿度的条件下培养3 d, 3 d后半量换液, 第7天加LPS 1 mg/L诱导12 h收集上清细胞备用。

小鼠脾细胞的分离: 断颈处死C57/BL6或Balb/c小鼠, 取脾脏碾碎, 400目滤网过滤至含肝素50 U/mL的RPMI-1640, 加入等量PBS中稀释混匀, 缓加至Ficoll液面。水平离心3 000 r/min, 20 min, 弃上层血浆, 取中层云雾状单核细胞, PBS洗去多余Ficoll 2次备用。

小鼠CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的分选: 参照Invitrogen试剂盒分选方法, 将 10^8 脾细胞悬于1 mL分离缓冲液加入200 μL FBS和200 μL CD4鼠抗200 μL 混合生物抗体, 充分混匀2~8 $^{\circ}C$ 孵育20 min后加入10 mL预冷分离缓冲液, 放入磁力架分选CD4⁺T细胞; CD4⁺T细胞重悬, 加入25 μL CD25抗体, 混匀, 室温黑暗孵育15 min, 上清为CD4⁺CD25⁺T细胞, 沉淀中加入洗脱液20 min室温离心, 上清为选择获得的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞。

细胞表型的鉴定: 扩增前后的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞及小鼠骨髓来源成熟树突状细胞用PBS洗涤后, 用PBS重悬至 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 。取100 μL , T细胞分别加入2 μL 荧光标记CD4 FITC、CD25 PE-Cy5、CD127 PE 抗体。成熟树突状细胞分别加入2 μL 荧光标记的CD80 FITC、CD86 PE抗体, 每组均设同型对照。避光孵育20 min, 加入200 μL 的PBS用流式细胞仪检测细胞表型, 检测分子表达量以阳性细胞百分比表示。

小鼠CD4⁺CD25⁺调节性T细胞体外扩增: 在96孔圆底反应板中加入小鼠CD4⁺CD25⁺T细胞作为效应细胞T, 调整为 2×10^5 /孔, 再按CD4⁺CD25⁺T细胞与同基因或异基因成熟树突状细胞按5:1比例均匀混合, 加入TGF- β (0, 0.02, 0.2, 2, 20 $\mu g/L$), 37 $^{\circ}C$ 体积分数5%CO₂培养箱共同培养5 d。终止培养4 h前加入CCK-8液, 酶标仪测定490 nm吸光比值。每组均设阳性对照, 即反应孔中加CD4⁺CD25⁺T细胞 2×10^5 /孔。阴性对照, 树突状细胞 4×10^4 /孔。

MTT法检测扩增后的T细胞对自体 and 异体CD4⁺T细胞增殖抑制作用: 在96孔圆底反应板中加入小鼠CD4⁺CD25⁺T细胞作为效应细胞Te, 调整为 2×10^5 /孔, 再按调节T细胞与Te不同比例(0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1)加入新分离的同基因或异基因经过髓样树突细胞和TGF- β 扩增后的调节T细胞, 每孔加入抗CD3、CD28单克隆抗体50 $\mu g/L$ 及白细胞介素2, 300 U/mL 37 $^{\circ}C$ 体积分数5%CO₂培养箱中培养5 d。终止培养4 h前加入CCK-8液, 酶标仪测定。每组均设阳性对照, 即反应孔中加CD4⁺CD25⁺T细胞 2×10^5 /孔, 阴性对照, CD4⁺CD25⁺T细胞 2×10^5 /孔。

体外扩增的T细胞的Foxp3基因表达检测: 收集 10^6 细胞提取细胞RNA, 反转录试剂盒转录后, 目的基因Foxp3上游引物5-AGG AGA AGC TGG GAG CTA TGC-3; 下游引物5-TGG CTA CGA TGC AGC AAG AG-3; 内参引物: 5'-CAA CTC CAT CAT GAA GTG TAA C-3', 下游引物: 5'-CCA CAC GGA GTA CTT GCG CTC-3'。PCR反应条件: 94 $^{\circ}C$ 预变性5 min, 然后于94 $^{\circ}C$ 变性30 s, 56 $^{\circ}C$ 退火30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸45 s, 共38个循环。

主要观察指标: ①小鼠骨髓来源的成熟树突状细胞表型鉴定结果。②新分选小鼠CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表型及纯度鉴定结果。③体外调节性T细胞诱导扩增实验结果。

¹湖南省人民医院临床医学研究所, 湖南省长沙市410005; ²南方医科大学附属南方医院肿瘤中心, 广东省广州市510000; ³湖南省人民医院血液肿瘤科, 湖南省长沙市410005

范莎莎☆, 女, 1982年生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 医师, 主要从事肿瘤生物治疗及靶向治疗研究。
fresh0225@126.com

并列第一作者: 罗荣城★, 男, 1958年生, 广东省潮州市人, 汉族, 1989年解放军第一军医大学小儿血液专业毕业, 硕士, 主任医师, 主要从事肿瘤生物治疗与分子靶向治疗研究。

通讯作者: 肖佩玲, 主任医师, 湖南省人民医院血液肿瘤科, 湖南省长沙市410005
fresh0225@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)15-02728-05

收稿日期: 2011-10-07
修回日期: 2011-11-15
(20110807003/W · C)

④经成树突状细胞和转化生长因子扩增后CD4⁺CD25⁺T细胞表型鉴定结果。⑤实时定量PCR体外扩增的T细胞的FOXP3基因。⑥CD4⁺CD25⁺调节性T细胞免疫抑制功能分析。

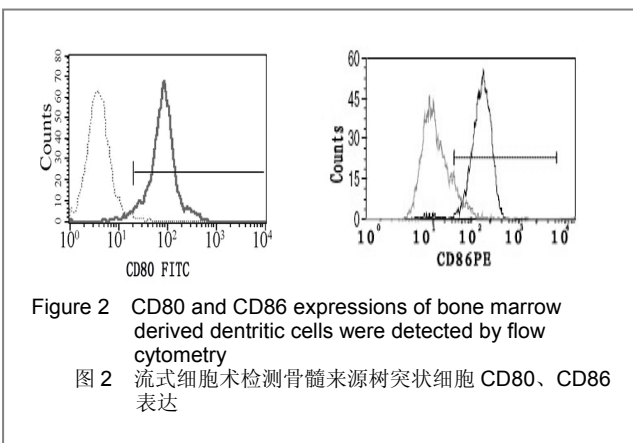
统计学分析: 实验数据分析采用SPSS 13.0软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组间用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

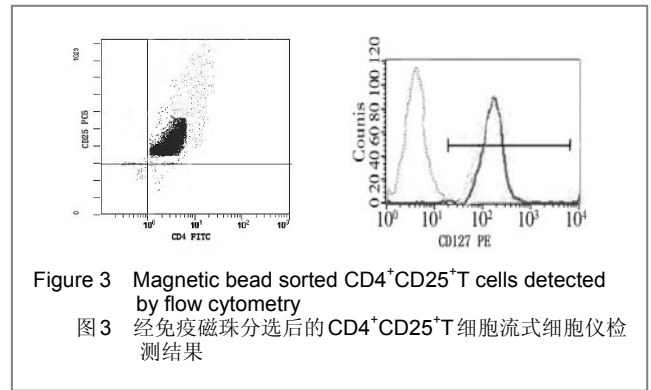
2.1 小鼠骨髓来源的成熟树突状细胞表型鉴定 第3, 5天光学显微镜下细胞形态见图1。



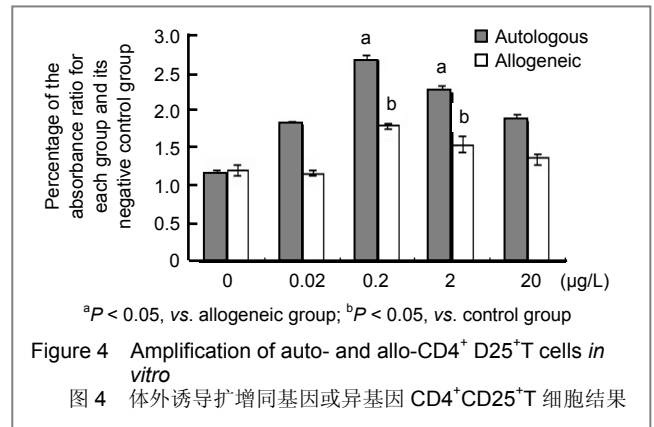
经流式细胞仪检测, 诱导的骨髓来源的细胞均高表达CD80、CD86分子, 由于成熟树突状细胞高表达共刺激分子, 通过流式细胞仪检测了2种髓样树突细胞的共刺激分子CD80、CD86表达, 分别为(60.79±4.36)%、(57.83±7.58)%, 说明骨髓来源的树突状细胞满足实验要求, 见图2。



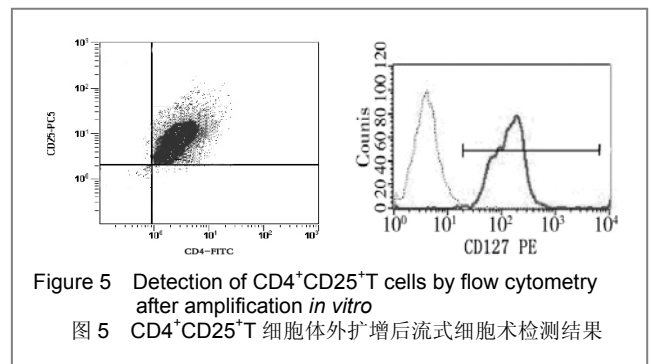
2.2 新分选小鼠CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表型及纯度鉴定 经流式细胞仪检测, MACS分选后的CD4⁺CD25⁺T细胞纯度为天然CD4⁺CD25⁺T纯度的(17.3±10.6)倍, CD4/CD25双阳性率达到(97.38±1.82)%, 且分选的细胞高表达CD127分子($P < 0.05$), 为(93.86±0.91)%, 见图3。



2.3 体外调节性T细胞诱导扩增实验结果 各组CD4⁺CD25⁺T混合髓样树突细胞扩增同基因组的扩增效果具有明显差异($t = -3.94$, $P < 0.05$)其中0.2, 2 μg/L质量浓度对T的扩增能力最强, 分别为对照组(0浓度组)的(2.26±0.26), (1.91±0.38)倍($P < 0.05$), 见图4。

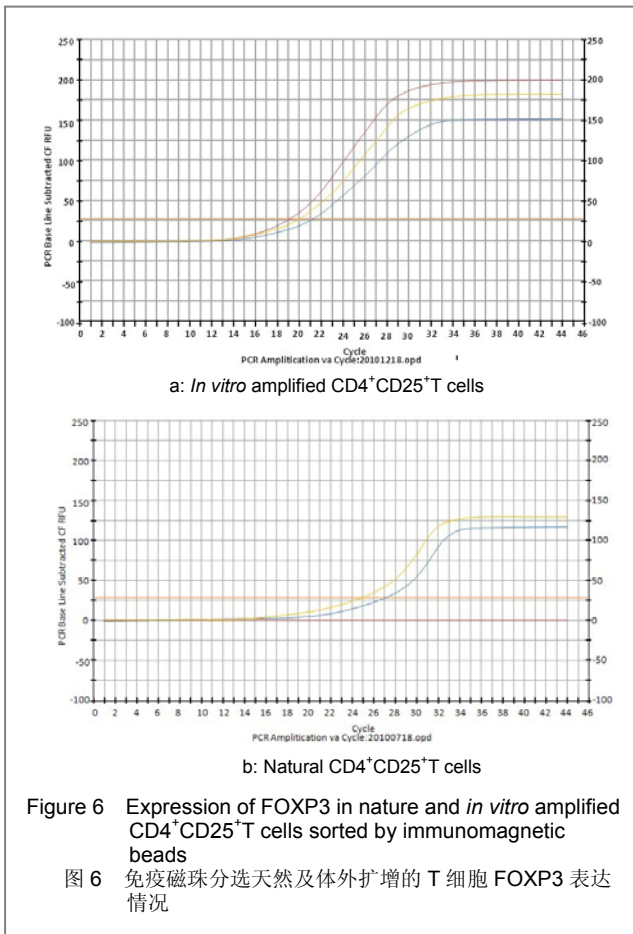


2.4 经成树突状细胞和转化生长因子扩增后CD4⁺CD25⁺T细胞表型鉴定 扩增后的T细胞仍然高表达CD4、CD25分子, 双阳性率为(85.38±1.82)%, 而CD127持续高表达, 为(78.86±0.91)%. 见图5。

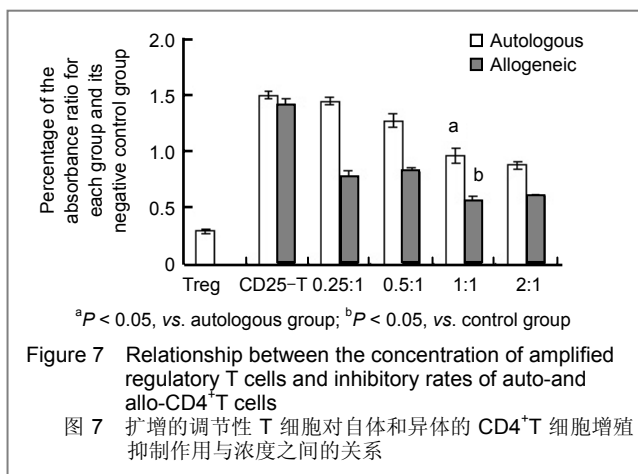


2.5 实时定量PCR体外扩增的T细胞的FOXP3基因见图6。体外扩增组及天然调节T细胞及对照组的内参β-actin Ct值分别为19.3±1.4, 20.2±0.7, 21.5±1.6; FOXP3基因Ct值分别为24.3±2.4, 27±1.3, 0。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 定量公式, 体外扩增组调节性T细胞 mRNA表达量约是自

然调节性T细胞FOXP3表达量的1.5倍($P < 0.05$)。



2.6 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞免疫抑制功能分析 调节T细胞增殖抑制实验表明,与单加效应性T细胞的对照组相比,效应T细胞与不同浓度T混合培养组的吸光值小于对照组吸光值,说明调节T细胞对效应T细胞的增殖有抑制作用。其中,调节T细胞与效应T细胞,与对照组相比抑制效果差异具有显著性意义。结果表明:调节性T细胞对自体或异体的CD4⁺T细胞抑制能力随着效靶比浓度的降低而降低,体外扩增的CD4⁺CD25⁺T细胞对自体CD4⁺T细胞抑制率(60.1±0.71)%,对异体CD4⁺T抑制率为(35.5±0.57)% ($P < 0.05$),见图7。



3 讨论

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞具有免疫抑制作用,在机体内调节免疫反应、对维持机体的内环境稳定和维持自身免疫耐受起重要作用。因此,T细胞的细胞疗法在抑制移植抗宿主病、过敏等多种临床运用中具有巨大潜力^[1]。由于体内存在的天然T数量很少,经体外分离后细胞数量有限,不能满足临床需要。目前,普遍运用抗CD3和CD28单克隆抗体联合白细胞介素2体外扩增T细胞,但是扩增效率不高,且纯度较低,因此不适宜大规模的运用于T的扩增^[2-4]。

树突状细胞作为免疫系统最重要的递呈细胞之一,在一定条件下能刺激T细胞扩增。Yamazaki等^[5-6]的研究表明,成熟树突状细胞表达高水平的CD80/86分子,其在稳定状态下能够分泌白细胞介素10、TGF- β ,且TGF- β 是T细胞扩增的重要因子^[7-8],大量研究显示成熟树突状细胞扩增后的T细胞保留着原有的免疫抑制功能,能获得足量且功能稳定的T细胞来满足输注需求^[9-14]。在TGF- β 和成熟树突状细胞共同刺激下,外周CD4⁺CD25⁺T细胞能够向CD4⁺CD25⁺T细胞转化,在TGF- β 存在的情况下,能够使STAT1分子发生磷酸化并结合到Foxp3基因启动子,诱导Foxp3分子的表达,使幼稚CD4⁺T细胞获得免疫抑制功能,TGF- β 能在体外诱导CD4⁺CD25⁺T细胞Foxp3表达^[8]。目前国内外对于调节性T细胞的研究较多治疗移植抗宿主病、功能研究、肿瘤治疗研究^[15-21],例如调节性T细胞扩增后的肿瘤生物学效应,包括对黑色素瘤等其他实体瘤的治疗效果、或大多为肿瘤治疗相关性研究。目前国内外已有研究报道:运用雷帕霉素、白细胞介素2、白细胞介素15或磁珠分选天然T细胞,CD3/CD28、cGMP(LAP)、白细胞介素1受体I和II(CD121a/CD121b)等方法能够体外或体内扩增调节性T细胞的研究,但是联合成熟树突状细胞及TGF- β 体外扩增调节性T细胞的方法学研究报道还甚少^[22-30]。所以寻求一种扩增效率高而安全并能保持T抑制功能的体外扩增方法是T细胞疗法广泛运用于临床的关键所在。

本实验采用成熟树突状细胞联合TGF- β 体外扩增诱导CD4⁺CD25⁺T细胞,结果显示在成熟树突状细胞联合TGF- β 能在体外扩增CD4⁺CD25⁺T细胞,体外扩增的CD4⁺CD25⁺T细胞高表达,CD127、Foxp3分子;体外抑制实验中调节性T细胞对自体或异体的CD4⁺T细胞抑制能力,并随着效靶比浓度的降低而降低,同基因的各组树突状细胞对其的扩增能力要强于异基因对应组树突状细胞,这可能是由于天然T细胞是在胸腺中针对自身抗原发育形成的对带有自身抗原的同基因树突状细胞更为敏感。因此,在自身免疫疾病的治疗中,同基因

树突状细胞扩增的T细胞将会发挥重要作用。由CD4⁺CD25⁺T细胞诱导转化的诱导型T细胞对外来抗原的反应性更强,由此推测,转基因树突状细胞对诱导型T细胞的扩增能力强于同基因树突状细胞,因而,诱导型T细胞抑制同种转基因移植中移植抗宿主病的作用更为显著。因此,本实验选取了T细胞体外扩增效果最明显的实验组,即T细胞联合同基因成熟树突状细胞组,检测扩增后T细胞表型和功能。结果发现,经同基因成熟树突状细胞扩增后的T细胞能高表达CD4、CD25和Foxp3等标志性分子。同时,扩增后的T细胞高表达CD4和CD25、CD127及Foxp3分子,其对同基因免疫抑制功能强于效应细胞。

综上所述,本研究采用成熟树突状细胞联合TGF- β 体外扩增诱导小鼠CD4⁺CD25⁺T细胞,扩增的CD4⁺CD25⁺T细胞具有免疫抑制功能并且持续高表达CD25分子及FOXP3,为下一步临床输注供者来源的CD4⁺CD25⁺细胞抑制移植抗宿主病提供了实验基础。

4 参考文献

[1] 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): 3493-3499.

[2] Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, et al. IL 2 receptor beta dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. J Immunol. 2007;178(1): 280-290.

[3] Ring S, Thome M, Pretschi L, et al. Expanded murine regulatory T cells: analysis of phenotype and function in contact hypersensitivity reactions. J Immunol Methods. 2007;326(12): 10-21.

[4] Trenado A, Sudres M, Tang Q, et al. Ex vivo expanded CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells prevent graft versus host disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. J Immunol. 2006;176(2):1266-1273.

[5] 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(2): 235-247.

[6] Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD, et al. Natural and TGF- β induced Foxp3⁺CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are not mirror images of each other. Trends Immunol. 2008;29(9): 429-435.

[7] Yang SW, Cao L, Yang SW, et al. Imbalance of immunological functions of T and TGF- β 1 aggravated cerebral ischemia damage in mice. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2011;27(4):408-411.

[8] Godkin A, Gallimore A. Setting the Threshold for Extra-Thymic Differentiation of Foxp3(+) Ts: TGF β -dependent and T-cell autonomous. Eur J Immunol. 2011;41(5):1491-1498.

[9] Mahnke K, Johnson TS, Ring S, et al. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two way relationship. Dermatol Sci. 2007; 46(3): 159-167.

[10] Yi H, Zhang J, Zhao Y, et al. The effects of antibody treatment on regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. Transplant Immunology. 2008; 19(1):37-44.

[11] 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(9): 5862-5870.

[12] Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM, et al. The interaction of dendritic cells with antigen specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. Semin Immunol. 2006;18(2):93-102.

[13] Lal G, Zhang N, Van der, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. Nat Rev Immunol. 2009;9(2):83-89.

[14] Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more question than answers. Biol Direct. 2008;3:6-6.

[15] Veerapathran A, Pidala J, Beato F, et al. Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly. Blood. 2011 Sep 23.

[16] Pahwa R, Jaggaiahgari S, Pahwa S, et al. Isolation and expansion of human natural T regulatory cells for cellular therapy. Immunol Methods. 2010;363(1):67-79.

[17] Rasmussen AM, Borelli G, Hoel HJ, et al. Ex vivo expansion protocol for human tumor specific T cells for adoptive T cell therapy. Immunol Methods. 2010;355(1-2):52-60.

[18] Zeng M, Guinet E, Nouri-Shirazi M, et al. Comparative analysis of dendritic cells and anti-CD3/CD28 expanded regulatory T cells for application in transplantation. Transpl Immunol. 2009;22(1-2): 82-92.

[19] Tran DQ, Andersson J, Hardwick D, et al. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. Blood. 2009;113(21):5125-5133.

[20] Trzonkowski P, Szaryńska M, Mysliwska J, et al. Ex vivo expansion of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells for immunosuppressive therapy. Cytometry A. 2009;75(3):175-188.

[21] Hippen KL, Riley JL, June CH. Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. Semin Immunol. 2011 Aug 4. [Epub ahead of print]

[22] Kujawski M, Zhang C, Herrmann A. Targeting STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their in vivo expansion and antitumor effects. Cancer Res. 2010;70(23):9599-610.

[23] Safinia N, Sagoo P, Lechler R, et al. Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation. Curr Opin Organ Transplant. 2010;15(4):427-34.

[24] Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, et al. Tumor-reactive CD4⁺ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. Exp Med. 2010; 207(3):637-650.

[25] Elinav E, Adam N, Waks T, et al. Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor. Gastroenterology. 2009; 136(5): 1721-1731.

[26] Molling JW, Moreno M, de Groot J, et al. Chronically stimulated mouse invariant NKT cell lines have a preserved capacity to enhance protection against experimental tumor metastases. Immunol Lett. 2008;118(1):36-43.

[27] 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): 7295-7304.

[28] DiGiusto DL, Cooper LJ. Preparing clinical grade Ag-specific T cells for adoptive immunotherapy trials. Cytotherapy. 2007;9(7): 613-629.

[29] Li Y, Yee C. IL-21 mediated Foxp3 suppression leads to enhanced generation of antigen-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. Blood. 2008 ;111(1):229-235.

[30] Dang Y, Knutson KL, Goodell V, et al. Clin Cancer Res. Tumor antigen-specific T-cell expansion is greatly facilitated by in vivo priming. 2007;13(6):1883-1891.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 长沙市科技局课题(k0902174-31)。

作者贡献: 第一作者负责实验实施,并列第一作者为实验设计者,第三作者负责数据分析,第四作者负责结果审核,第五作者为课题评估者,服从盲法评估。第六作者为课题承担者对本课题负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 国内目前还未有成熟树突状细胞体外扩增调节性 T 细胞的报道,零星有半成熟树突状细胞体外扩增调节性 T 细胞的报道,但联合运用转化生长因子 β 的报道还未有。实验首次运用成熟树突状细胞及转化生长因子 β 体外扩增小鼠调节性 T 细胞,克服了抗 CD3 和 CD28 单克隆抗体联合白细胞介素 2 体外扩增 T 细胞,扩增效率不高,且纯度较低的缺点,而且提高了扩增后的细胞生物学效应。