

专
家
介
绍

翟原,加州大学洛杉矶分校戴卫格芬医学院教授,博士生导师。1988 年临床医学专业硕士毕业于北京医科大学(现北京大学医学部),1998 年获得威斯康星大学麦迪逊分校移植免疫学专业医学博士学位,随后至 2002 年在加州大学洛杉矶分校和牛津大学进修博士后。美国免疫学家协会、美国器官移植协会、美国移植外科医生协会等协会会员,国际肝胆胰杂志、《Transplantation Review》等杂志编委。主持美国国家卫生研究院(NHI)R01 项目、美国国家卫生研究院(NHI)R21 项目等 11 项。主要致力于肝脏移植免疫学的研究,其研究成果已在《Nat Rev Gastroenterol Hepatol》、《Hepatology》、《J Hepatol》、《AM J TRANSPLANT》、《J Immunol》、《Transplantation》等国际杂志发表 60 余篇。参编专著 4 部。曾获得美国青年研究学者奖、美国明日之星奖等奖项 6 项。

天然型调节性 T 细胞在胸腺内的分化发育机制

汪瀚,翟原*

(加州大学洛杉矶分校戴卫格芬医学院肝脏和胰腺移植外科,美国 洛杉矶 90095)

[摘要] 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一群胸腺来源的具有免疫抑制功能的 T 淋巴细胞,其与自身免疫疾病的发生、外周免疫耐受以及抗感染免疫、肿瘤免疫、移植免疫、变态反应等许多病理性免疫过程有着极其重要的关系。天然型调节性 T 细胞(natural Treg, nTreg)或称胸腺调节性 T 细胞(thymus regulatory T cell, tTreg)是调节性 T 细胞群中很重要的一个亚群。本文将对这一主要亚群及其分化、发育、增殖等过程和相关调控机制进行综述。

[关键词] 调节性 T 细胞;CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg;免疫抑制;分化发育

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)01-0015-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170103

The differentiation and development mechanism of natural regulatory T cells in the thymus

Wang Han, Zhai Yuan*

(Division of Liver and Pancreas Transplantation, Department of Surgery, David Geffen School of Medicine at University of California-Los Angeles, Los Angeles 90095, USA)

[Abstract] Regulatory T cell(Treg) is a thymus-derived T lymphocyte lineage with the ability of immunosuppression in the periphery, and it plays a key role in autoimmune diseases, immune tolerance, immune system, tumor immunity, transplantation immunity, allergic reaction and many other pathological immune processes. Natural Treg cell (nTreg) or called thymus regulatory T cell (tTreg) is a very important T cell lineage in Treg cells. In this paper,we make a review of this T cell lineage on the process of their differentiation, development and proliferation and the regulatory mechanism of them.

[Key words] regulatory T cells;CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg;immunosuppression;differentiation and development

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01):0015-0019]

调节性 T 细胞主要在体内发挥负调节免疫功能,它既能抑制体内不恰当的免疫反应,又能限定

免疫应答的范围、程度及作用时间,对效应细胞的增殖、免疫活性的发挥起抑制作用。综合掌握其在体内分化发育的过程及各种影响因素将加深我们对自身免疫性疾病、变态反应等疾病发生的理解,为在未

*通信作者(Corresponding author),E-mail:YZhai@mednet.ucla.edu

来治疗这些疾病提供新的方向或治疗策略。根据调节性 T 细胞的表面标记、细胞因子分泌和发挥作用的方式等不同可将其分为:CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞、Tr1、Th3 等多种主要亚型,另外还存在 CD8⁺Treg 等少见亚型。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞又可根据其细胞来源、表面标志、产生的细胞因子等分为:天然型调节性 T 细胞(natural Treg, nTreg)和诱导型调节性 T 细胞(induced Treg, iTreg)。目前对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的研究最为深入,其特征性标志为胞质内特异性表达的叉头翼螺旋转录因子 Foxp3 (forkhead/ winged-helix transcription factor)。本文将就 nTreg 的发育机制进行综述。

1 一般免疫学特征

CD4⁺T 细胞主要分 Th1、Th2 和 Th17 等亚群,然而有 5%~10%不属于其中任何一群,它们被称为 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞,于 1995 年由 Sakaguchi 等^[1]在研究小鼠自身免疫性疾病和免疫耐受时被发现。这种细胞高表达白介素-2(IL-2)受体的 α 链即 CD25 分子,胞质中表达 Foxp3 转录因子。一般来说 Treg 表达的 CD25 分子越多,相应的 CD4⁺CD25⁺Treg 负向调节活性越强^[2],但因为低或中等程度表达 CD25 的 CD4⁺Treg 仍然具有负向调节活性,而且 CD25 分子也可以在非 Treg 细胞上表达,所以不能仅仅以 CD25 来定义 Treg,同样 Treg 还表达 CTLA-4、GITR、TNFR2、CD62L、OX-40L、CD103、TGF- β 1、galectin-1、Ly6-4-1BB、PD1 等分子,这些也不能简单地被用来特征性区分 Treg。而 Foxp3 无论在胸腺或者外周,均为参与 Treg 细胞分化发育的关键调节分子,目前认为其是 Treg 最特异性的标志,所以 CD4⁺CD25⁺Treg 的发育成熟必然也伴随着功能性 Foxp3 的正常表达,因为有研究证明 Foxp3 缺陷的小鼠不能发育 Treg,而人或鼠的非调节性幼稚 T 细胞经过逆转录病毒技术表达 Foxp3 后能有效促使其获得 Treg 表型^[3],即细胞表面表达 CD25 并具有负向调节活性。

nTreg 在胸腺内分化、发育、成熟,并释放至外周血中发挥免疫抑制作用,其在调节自身免疫稳态中发挥着极其重要的作用。小鼠出生 3 d 后,nTreg 从胸腺迁移至外周,胸腺切除的小鼠在出生第 3 天就会发生严重的自身免疫疾病^[4]。小鼠 nTreg 表面还表达特征性标志 LAG3 (lymphocyte activation gene 3),具有负调节功能,可通过细胞接触而抑制静息 T 细胞增殖。Bruder 等^[5]还发现,其他 T 细胞亚群活化时,血管内皮生长因子(VEGF)受体家族成员的共

受体 Nrp1(neuropilin-1)表达显著下调,但 nTreg 细胞表达 Nrp1 不受其活化状态的影响,并且高表达 Nrp1 的 T 细胞也表达高水平的 Foxp3 并抑制 CD4⁺CD25⁺T 细胞,故也可视其为 nTreg 细胞特征性表面标志之一。

2 胸腺内发育及调节机制

nTreg 在胸腺内发育的过程与其他 T 细胞亚群相似,也需经历选择过程,但其产生的速度较 CD4⁺T 细胞慢^[6]。前 T 细胞经历阴性选择时,拥有对自身抗原高亲和力的 T 细胞被克隆清除,但低亲和力的 T 细胞也不能发育为 Treg,所以只有亲和力在一定范围内才能发育为调节性 T 细胞。整个过程受到诸多因素的影响和调控,例如 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)信号、细胞因子的分泌、细胞表面受体及共刺激分子的表达等;各种生理信号可以通过激活相关正向调节转录因子,或抑制相应负调节因子,上调 Foxp3 的转录与表达,从而诱导 Treg 的产生。

2.1 TCR 信号活化对 nTreg 分化发育的作用

我们已经知道在胸腺中 T 细胞表达功能性的 TCR 需经历 β 链和 α 链的基因重排,nTreg 也有同样过程,所以此过程受抑制或者被阻断例如重组激活基因缺失等都会影响 nTreg 的发育成熟;Misako Itoh 等^[7-8]在实验中发现,重组激活基因缺失(RAG^{-/-})的 $\alpha\beta$ TCR 转基因小鼠中,nTreg 不能发育,说明胸腺中 nTreg 的发育需要 TCR 基因重排。另外,不同的 TCR 具有识别相应抗原的特异性,所以重排后的特异性 TCR 本身也可能作为一种选择标志参与 nTreg 在胸腺中的发育过程。

TCR 是 T 细胞在胸腺中发育成熟及接受外周特异性信号的重要结构。TCR 信号对 nTreg 的胸腺发育非常重要,Jordan 等^[6]使用对血凝素(HA)具有特异性的 TCR 转基因鼠与 HA 转基因鼠的杂交小鼠,发现胸腺内的这种高亲和力 TCR 激动可以明显促进 CD4⁺CD25⁺T 细胞的分化发育,数量比例显著增加。然而,另一种 TCR 相似但亲和力减弱到 1%的转基因鼠胸腺中几乎不产生 CD4⁺CD25⁺T 细胞,说明 nTreg 的分化发育需要较高亲和力的 TCR 与胸腺髓质上皮细胞(mTECs)递呈的特异性自身抗原肽的相互作用。Kawahata 等^[8]用对卵清蛋白(OVA)具有特异性的 TCR 转基因鼠与 OVA 特异性老鼠的杂交鼠进行研究也得出了类似的结果,这些都说明了调节性 T 细胞在胸腺内发育过程中是通过这种较高亲和力 TCR 接受特异性激动而逃脱了阴性选

择,才逐渐发育成为 Treg 细胞,从而与经历正常阴性选择过程的 CD4⁺CD25⁺T 细胞区别开来。另外, mTECs 中表达的组织特异性自身抗原受到自身免疫调节基因(AIRE)的调控,AIRE 缺陷型小鼠会自发形成自身免疫疾病,类似于 Treg 缺失表型。AIRE 表达的基质细胞能上调 CD4⁺T 细胞中 Foxp3 的表达,增强 nTreg 发育^[9]。

TCR—CBM—NF- κ B 信号通路是 Treg 在胸腺内诱导分化的重要信号转导通路,CBM 是由 CARMA1 结合 Bcl-10 和 Malt1 形成的复合物,其中 CARMA1 发挥核心性的功能,CBM 在 TCR 到 NF- κ B 的信号转导中起着桥梁性作用。CARMA1 基因敲除的小鼠胸腺内几乎检测不到 nTreg,且在淋巴结和脾脏也没有 Treg,且 CBM 复合物的主要作用是促进胸腺内 Treg 前体细胞的产生^[10-11]。同样 Bcl-10 基因缺陷小鼠的胸腺和脾脏中也几乎检测不到 Treg 细胞^[12]。这些结果说明,CARMA1 复合物对胸腺以及外周 Treg 的分化都是必需的。另外还发现,通路下游信号分子 PKC θ 、IKK α ^[12-13],以及 c-Rel 缺失都会导致实验小鼠胸腺内 nTreg 细胞显著减少^[14-15],c-Rel 通过与 NFAT 形成复合物再结合到 Foxp3 启动子区并募集 p53、Smad、pCREB 等转录因子到相应增强子区位点参与并上调 Foxp3 的转录表达^[15],继而促进 nTreg 发育成熟。

2.2 IL-2 对 nTreg 发育分化的作用

除了 TCR 信号外,IL-2 信号对 nTreg 的胸腺发育也极其重要,前者为分化过程提供了前提条件,而后者则继续强化这种信号,促进 nTreg 的分化发育,甚至起关键作用。许多研究都通过实验证明缺乏 IL-2 或 IL-2R 会显著减少胸腺内 nTreg 的生成;例如 Bayer 等^[16]用抗 IL-2 处理普通 C57BL/6 小鼠和 Tg^{-/-}新生小鼠后发现小鼠胸腺内 CD4⁺CD25⁺T 细胞数量显著降低,Malek 和 Burchill 等^[17-18]用 IL-2R β (CD122) 缺陷小鼠进行试验也得出了相似的结果。但是也有研究认为 IL-2 对于胸腺 nTreg 的发育并不是至关重要的(nTreg 数量仅降低 50%),而是在外周 Treg 的生存维持上扮演着要素作用^[19-20]。虽然 IL-2 对于 Treg 的作用存在着争议,但不可否认的是,这种弱 IL-2 信号的 Treg 细胞中,关键功能分子如 CD25 表达减少,功能相对于野生型也减弱^[21],而且 IL-2R β 敲除小鼠的 nTreg 细胞比例降低的状态可以被胸腺中特异性转染 IL-2R β 而纠正^[22]。这些结果均可说明 nTreg 的活化增殖需要 IL-2 信号的参与。

IL-2R 是由 α (CD25)、 β (CD122)、 γ (CD132) 3

条链组成, α 链是配体特异性结合链,具有较低的亲和性, β 和 γ 链参与信号转导,亲和力较高,只有它们组配成三聚体才拥有很高的亲和力,才能高效介导信号转导至下游的 JAK3 及 STAT5,诱导 Foxp3 的表达。Lio 等^[23]通过实验也证明了这一点,几乎所有 CD25^{hi} CD122^{hi} 细胞都能活化 STAT5,而对于 CD25^{hi} CD122^{lo} 细胞其比例只有 30%, γ 链缺乏会造成 nTreg 本质上的减少^[20], γ 链为公有链,还参与多种细胞因子受体如 IL-7 和 IL-15 受体的构成,当 IL-2 信号缺失时,如 IL-2 敲除或 IL-2R β 敲除,这两种细胞因子对 IL-2 的信号缺失起到代偿性作用,从而仍可使少量 Treg 细胞由胸腺分化^[24],而对于这两种细胞因子的作用目前还是争议较大,实验还证明除 IL-2 外,只有 IL-15 能有效诱导 Foxp3 的表达^[23],而 IL-7 作用很小;Bayer 等^[25]却有相反的实验结果,即 IL-7 的信号对 Treg 的胸腺分化有一定的促进作用,而 IL-15 却几乎不起作用。另外有实验将 IL-7R α 敲除,发现包括 Treg 在内的所有胸腺细胞都会发生分化和发育障碍^[26],所以针对 IL-7 对 nTreg 的分化是否有促进作用,以及是否是由于其对所有胸腺细胞的发育起作用从而促进 nTreg 分化,还有待进一步研究证实。STAT5a/b 缺陷小鼠的 nTreg 数量显著降低^[18,27]。

值得注意的是最近有研究结果显示,从外周循环回到胸腺的 Treg 细胞可以抑制 nTreg 的分化发育,而且是抑制 IL-2 依赖的 nTreg 的分化^[28]。

2.3 免疫细胞表面受体共刺激分子对 nTreg 分化发育的作用

许多 T 或 B 细胞表面受体共刺激分子对 nTreg 的发育、增殖也有重要的调节作用,例如 CD28、TGF- β R、GITR 等。在缺失 CD28 或者 CD80/CD86 (B7) 的小鼠中,具有负调节功能的 CD4⁺CD25⁺Treg 数量显著减少^[29]。但这种作用并不是通过影响 IL-2 及其信号来实现的^[30],CD28 信号是通过结合在 CD28 分子胞内部分末端的 p56lck 将信号传递给下游从而增强 Foxp3 mRNA 的表达,胸腺 Treg 前体细胞最终也逐渐发育成为成熟的 nTreg 细胞^[31]。特异性敲除 LCK 基因会导致 nTreg 分化明显减弱以致出现免疫抑制功能丧失等一系列不正常表型,还会影响一些基因表型的表达例如 GITR、CTLA-4、CD62L 等分子的表达下调^[32]。

胸腺 B 淋巴细胞也可以促进胸腺 Treg 的分化与增殖,实验发现其可以通过 MCH II 类分子以及表面共刺激分子 CD40、CD80/CD86 之间的相互接触

而起作用,但是其只能促进 CD4⁺T 细胞向前 Treg 的分化而不能直接促进成熟的 Treg 细胞产生^[33-34]。

2.4 其他对 nTreg 分化发育的作用

特异性 AT 富集区序列结合蛋白 1 (SATB1) 缺乏会影响 nTreg 的发育, Kondo 等^[35]通过实验发现 SATB1 条件性敲除(cKO)老鼠 nTreg 数量低于对照组,且在出生后 16 周会出现自生免疫性疾病。

很早前就发现雷帕霉素在外周血中可以通过促进 Foxp3 的表达而扩增 iTreg 细胞并发挥相应的免疫抑制功能^[36-40],但是最近一项研究发现在胸腺中雷帕霉素对于 Treg 的作用与外周血中作用相反,它抑制野生型小鼠胸腺内 Treg 的增殖生长,其机制是增加了由 Bim 介导的不成熟前体 Treg 的凋亡^[41]。

通过总结这些研究结果以及 Lio 等^[23]的两步假设理论,nTreg 在胸腺内分化发育过程主要为:①首先是胸腺细胞特异性 TCR 接受自身抗原肽的刺激诱导胸腺 T 细胞向 nTreg 分化,促其高表达 CD25 分子,参与构成高亲和力的功能性 IL-2R;②IL-2R 接受外源性 IL-2 刺激,通过 IL-2R—JAK3—STAT5 信号通路传递信号,并在 CD28 等共刺激分子信号的促进作用下,诱导并稳定 Foxp3 的表达,最后发育为成熟的 nTreg。

3 总结

由于调节性 T 细胞在体内免疫系统中发挥着非常重要的作用,且与许多自身免疫性疾病和外周免疫耐受等密切相关,从 1995 年被发现以来,人们对这群特殊细胞的研究也越来越深入,对调节性细胞的发育分化过程及其调控因素有了一定的认识,对各种免疫性疾病的治疗效果也逐步显现且表现出了很好的应用前景。虽然对天然调节性 T 细胞发育过程的研究已经很深入,但其中还有许多环节仍然不清楚,还有很多影响因素没有被发现,值得去探究,例如 IL-15 和 IL-7 对 nTreg 的作用是协同促进,还是特定环境中的独自作用?它们的作用机制是什么?这些也都可能成为各种免疫性疾病治疗的新方向或者新靶点,为将来临床治疗提供新思路。

[参考文献]

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 1995, 155(3):1151-1164
- [2] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4⁺CD25⁺ high regulatory cells in human peripheral blood[J]. *J Immunol*, 2001, 167(3):1245-1253
- [3] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(4):345-352
- [4] Asano M, Toda M, Sakaguchi N, et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation[J]. *J Exp Med*, 1996, 184(2):387-396
- [5] Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(3):623-630
- [6] Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(4):301-306
- [7] Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance [J]. *J Immunol*, 1999, 162(9):5317-5326
- [8] Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, et al. Generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression[J]. *J Immunol*, 2002, 168(9):4399-4405
- [9] Mathis D, Benoist C. A decade of AIRE[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(8):645-650
- [10] Medoff BD, Sandall BP, Landry A, et al. Differential requirement for CARMA1 in agonist-selected T-cell development[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(1):78-84
- [11] Molinero LL, Yang J, Gajewski T, et al. CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3⁺ regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182(11):6736-6743
- [12] Schmidt-Supprian M, Tian J, Grant EP, et al. Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(13):4566-4571
- [13] Schmidt-Supprian M, Courtois G, Tian J, et al. Mature T cells depend on signaling through the IKK complex[J]. *Immunity*, 2003, 19(3):377-389
- [14] Isomura I, Palmer S, Grumont RJ, et al. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(13):3001-3014
- [15] Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y, et al. Development of Foxp3⁺ (+) regulatory T cells is driven by the c-Rel en-

- hanceosome[J]. *Immunity*, 2009, 31(6):932-940
- [16] Bayer AL, Yu A, Adeegbe D, et al. Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(5):769-777
- [17] Malek TR, Yu A, Vincek V, et al. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2[J]. *Immunity*, 2002, 17(2):167-178
- [18] 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]. *J Immunol*, 2007, 178(1):280-290
- [19] D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11):1152-1159
- [20] Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11):1142-1151
- [21] Yu A, Zhu L, Altman NH, et al. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells [J]. *Immunity*, 2009, 30(2):204-217
- [22] Bayer AL, Yu A, Malek TR. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7):4062-4071
- [23] Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development[J]. *Immunity*, 2008, 28(1):100-111
- [24] Vang KB, Yang J, Mahmud SA, et al. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development [J]. *J Immunol*, 2008, 181(5):3285-3290
- [25] Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, et al. A function for IL-7R for CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells[J]. *J Immunol*, 2008, 181(1):225-234
- [26] Mazzucchelli R, Hixon JA, Spolski R, et al. Development of regulatory T cells requires IL-7 Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP[J]. *Blood*, 2008, 112(8):3283-3292
- [27] Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3 [J]. *Blood*, 2007, 109(10):4368-4375
- [28] Thiault N, Darrigues J, Adoue V, et al. Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(6):628-634
- [29] Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes[J]. *Immunity*, 2000, 12(4):431-440
- [30] 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
- [31] Nazarov-Stoica C, Surls J, Bona C, et al. CD28 signaling in T regulatory precursors requires p56lck and rafts integrity to stabilize the Foxp3 message[J]. *J Immunol*, 2009, 182(1):102-110
- [32] Kim JK, Klinger M, Benjamin J, et al. Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8):e6580
- [33] Lu FT, Yang W, Wang YH, et al. Thymic B cells promote thymus-derived regulatory T cell development and proliferation[J]. *J Autoimmun*, 2015, 61:62-72
- [34] Walters SN, Webster KE, Daley S, et al. A role for intrathymic B cells in the generation of natural regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2014, 193(1):170-176
- [35] Kondo M, Tanaka Y, Kuwabara T, et al. SATB1 Plays a Critical Role in Establishment of Immune Tolerance[J]. *J Immunol*, 2016, 196(2):563-572
- [36] Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells [J]. *Blood*, 2005, 105(12):4743-4748
- [37] Zhao T, Yang C, Qiu Y, et al. Comparison of regulatory T cells and FoxP3-positive T-cell subsets in the peripheral blood of renal transplant recipients with sirolimus versus cyclosporine: a preliminary study[J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(1):148-152
- [38] Prevel N, Allenbach Y, Klatzmann D, et al. Beneficial role of rapamycin in experimental autoimmune myositis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e74450
- [39] Donia M, Mangano K, Amoroso A, et al. Treatment with rapamycin ameliorates clinical and histological signs of protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti rats and induces expansion of peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *J Autoimmun*, 2009, 33(2):135-140
- [40] Lu Y, Wang J, Gu J, et al. Rapamycin regulates iTreg function through CD39 and Runx1 pathways[J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014:989434
- [41] Overall SA, van Driel IR, Gleeson PA. Rapamycin results in Bim-mediated loss of thymic regulatory T cells during development in organ culture[J]. *Int Immunol*, 2016, 28(10):513-518