

· 论 著 ·

CTLA-4Ig 与 ICAM-1 单抗促进供者来源的未成熟树突状细胞诱导移植受体免疫耐受

丁国善*, 王全兴, 张 明, 刘玉杉, 韩 澍, 傅志仁
(第二军医大学长征医院器官移植中心, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 研究细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 融合蛋白(CTLA-4Ig)和细胞间黏附分子 1(ICAM-1)单抗体内注射促进供者未成熟树突状细胞(imDC)诱导受体免疫耐受的可能机制。**方法:** 实验分对照组(仅输注 imDC)、CTLA-4Ig 组、ICAM-1 单抗组和 CTLA-4Ig+ICAM-1 单抗联合组, 每组均以 2×10^6 C57BL/6 供者 imDC 经尾静脉输注受鼠(雄性), 自 imDC 输注之日起连续 2 周向受鼠腹腔内注射 CTLA-4Ig 或(和)ICAM-1 单抗(0.1 mg/d), DC 输注 1 周后 4 组均行异位心脏移植, 于心脏移植后 7 d 和 21 d, 进行免疫学分析。**结果:** CTLA-4Ig 或联合 ICAM-1 单抗治疗后均明显抑制同种 imDC 免疫的移植受体脾脏 T 细胞对同种抗原刺激的增殖反应, 降低淋巴细胞毒活性, 明显抑制血清和 MLR 反应中 Th1 细胞因子 IL-2、IFN- γ 的产生, 显著提高 Th2 细胞因子 IL-10 的水平; 明显降低心脏移植受体同种抗体 IgG 的产生。ICAM-1 单抗治疗组的受体 T 细胞对同种抗原刺激的增殖反应虽有减弱, 但与对照组相比没有显著的差异; 对 MLR 反应上清和血清中 IL-2 的产生有明显的抑制, 而对其他细胞因子的产生没有明显的作用。**结论:** CTLA-4Ig 联合 ICAM-1 单抗治疗可通过诱导受体 T 细胞对同种抗原特异性的低反应性, 抑制淋巴细胞毒活性和 B 细胞的体液免疫反应, 并促进 Th2 细胞的极化来促进 imDC 诱导的同种抗原特异性的免疫耐受。

[关键词] 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 融合蛋白; 细胞间黏附分子 1; 抗体, 单克隆; 树突状细胞; 移植耐受

[中图分类号] R 392.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0253-05

CTLA-4Ig combined with ICAM-1 mAb promotes immune tolerance induced by donor-derived immature dendritic cells in recipient mice

DING Guo-shan*, WANG Quan-xing, ZHANG Ming, LIU Yu-shan, HAN Shu, FU Zhi-ren (Organ Transplantation Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the mechanism of CTLA-4Ig combined with Anti-ICAM-1 mAb in promoting immune tolerance induced by donor-derived immature dendritic cells(imDC) in recipient mice. **Methods:** Male mice were divided into 4 groups: control group (receiving only imDC), CTLA-4Ig group, ICAM-1 mAb group and CTLA-4Ig+ICAM-1 group. Mice were transfused with donor-derived imDC 7 days before they received heart transplantation in company with daily injection of ICAM-1 mAb, CTLA-4Ig or both for the following 2 weeks. Immunological analysis was performed in mice 7 days and 21 days after heart transplantation. **Results:** CTLA-4Ig alone or in combination with ICAM-1 mAb significantly inhibited T cells proliferation to alloantigen stimulation, impaired lymphocyte cytotoxicity, suppressed production of IL-2, IFN- γ by Th1, increased production of IL-10, and obviously decreased the production of alloantibody IgG in recipient mice treated with donor-derived imDC. ICAM-1 mAb alone had no significant effects on T cells proliferation and production of Th-derived cytokines except for IL-2. **Conclusion:** ICAM-1 mAb combined with CTLA-4Ig can enhance immune tolerance induced by donor-derived imDC in recipient mice through induction of T cells hypo-responsiveness, inhibition of lymphocyte cytotoxicity and B cell immunoreaction, and promotion of Th2 polarization *in vivo*.

[KEY WORDS] cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4-Ig; intercellular adhesion molecule-1; antibodies, monoclonal; dendritic cells; transplantation tolerance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3):253-257]

树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内最重要的抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC), 其免疫学功能具有两重性, 既可介导免疫激活, 也可介导免疫耐受^[1]。研究表明, 髓系未成熟 DC 亚群(imature DC subset, imDC)或静息 DC(resting DC)由于表面黏附辅佐分子如 B7、ICAM-1、CD40

等缺乏, 具有免疫耐受性, 可以诱导 T 细胞的失能(anergy)及低反应性, 并诱导调节性 T 细胞(regula-

[基金项目] 国家自然科学基金(39870809)。Supported by National Natural Science Foundation of China (39870809)。

[作者简介] 丁国善, 博士, 副教授、副主任医师, 硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: ading1964@126.com

tory T cells, Treg)的产生,对器官移植的免疫耐受的诱导和稳定态的维持具有重要的作用^[2-5]。因此,已有研究将某些免疫抑制因子如 CTLA-4Ig、IL-10、TGF- β 基因转染 DC,通过抑制 DC 的成熟以及在局部造成免疫抑制微环境从而诱导免疫耐受,取得了一定的效果。为了寻找有效的诱导免疫耐受的方法,我们应用供者 imDC 免疫受者的同时,采用连续注射 CTLA-4Ig 与 ICAM-1 单克隆抗体联合治疗受者后进行器官移植,非常显著地延长了移植物的存活期,使 7/8 的移植物长期存活(100 d 以上),表明 imDC 免疫联合 CTLA-4Ig 与 ICAM-1 单克隆抗体阻断治疗是诱导移植耐受的好方法。本研究将着重探讨 CTLA-4Ig 与 ICAM-1 单克隆抗体体内促进同种 imDC 诱导机体免疫耐受的机制。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 8~12 周雄性 C57BL/6(H-2^b)、BALB/c(H-2^d) 和 C3H(H-2^k) 小鼠,体质量(20±1.5) g,购自上海必凯实验动物有限公司。重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(mGM-CSF)购自 R&D 公司;RPMI 1640 干粉及小牛血清购自 Gibco 公司。CTLA-4Ig 和 ICAM-1 单抗由表达 CTLA-4Ig 融合蛋白杂交瘤(日本札幌大学 Hamada H 教授惠赠)和 ICAM-1 的杂交瘤细胞(CRL-1878, ATCC)产生的腹水,经 G 蛋白亲和柱纯化后制备而成,分装后冻存于-20℃ 备用。

1.2 未成熟树突状细胞(imDC)的制备 参考 Inaba 等^[6]的方法并稍作改进:取 C57BL/6 小鼠(H-2^b)的骨髓细胞,Tris-NH₄Cl 去除红细胞,制成单细胞悬液,37℃ 孵箱中培养 2 h,收集非黏附细胞后,以 1×10⁶/孔加入 24 孔板培养,加 mGM-CSF 2~5 ng/ml,48 h 后,吸去培养基及悬浮细胞,重新加入新鲜培养基及 mGM-CSF,3 d 后,吸取疏松贴壁的增殖性细胞聚集体,置新培养瓶培养,过夜后收取悬浮细胞,以 14.5% metrizamide 梯度离心(1 200×g, 20 min),即获得富集的 imDC。

1.3 实验分组及受者免疫治疗 实验共分 4 组:对照组、CTLA-4Ig 组、ICAM-1 单抗组和 CTLA-4Ig+ICAM-1 单抗联合治疗组,每组 8 只 BALB/c 小鼠。每组均以 2×10⁶ C57BL/6 供者 imDC 经尾静脉输注受鼠。CTLA-4Ig 组和 ICAM-1 单抗组分别自 imDC 输注之日起连续 2 周向受鼠腹腔内注射 CTLA-4Ig、ICAM-1 单抗(0.1 mg/d);联合组以同样剂量两药注射 2 周;对照组则仅输注 imDC 细胞。imDC 输注 1 周后 4 组均行颈部异位心脏移植,应用

Cuff 导管法移植 C57BL/6 小鼠的心脏。

1.4 受者脾脏 T 细胞的同种混合淋巴细胞反应(mixed leukocyte reaction, MLR)活性 收获 BALB/c 受者脾脏细胞,Tris-NH₄Cl 去红细胞后,过尼龙毛柱,获得脾脏 T 淋巴细胞(细胞密度为 1×10⁵/孔),分别以不同的比例与 γ 射线(20 Gy)灭活的 C57BL/6 脾淋巴细胞以及 C3H(H-2^k)小鼠脾淋巴细胞混合,置于 96 孔圆底板内、5%CO₂、37℃ 中培养 3 d。于培养终止时间前 18 h,每孔加入 1 μ Ci 的 [³H]-TdR,用液闪计数器(Wallac 公司)测量待测细胞的 [³H]-TdR 掺入。

1.5 受者脾脏淋巴细胞 CTL 活性 收获移植各组 BALB/c 受者脾脏,制备脾脏 T 淋巴细胞,用作效应细胞;以小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞(H-2^b)为同种抗原特异性靶细胞、小鼠 P815 肥大细胞瘤细胞(H-2^d)为同系对照靶细胞。靶细胞用 10 μ Ci 的 ⁵¹Cr 标记 30 min。将标记的靶细胞洗 3 遍,洗去残存的 ⁵¹Cr,以 1×10⁴/孔的细胞密度接种于 96 孔板,然后加入 2 倍稀释的效应细胞,效靶比(E:T)为 20:1 和 5:1,每孔培养液终体积为 200 μ l。在 5% CO₂ 和 37℃ 的条件下孵育 4 h,测定特异性 ⁵¹Cr 的释放。特异性杀伤活性按如下公式计算:杀伤率(%)=[实验释放(cpm)-自发释放(cpm)]/[最大释放(cpm)-自发释放(cpm)]×100%。

1.6 细胞因子的检测 同种 MLR 上清及血清中 IL-4、IL-10、IL-2 和 IFN- γ 的检测采用 ELISA 检测试剂盒(Endogen)检测,操作按 ELISA 检测试剂盒说明书进行。

1.7 外周血供者特异性体液免疫反应测定 于移植第 7 天和第 21 天,从各组受者的尾静脉收集外周血清 50 μ l,贮存于-80℃ 待用。取供者脾脏淋巴细胞(2×10⁶)与稀释的受体血清在 4℃ 环境下孵育 1 h,洗涤后分别与 PE 或 FITC 标记的大鼠抗小鼠 IgM(rat IgG2a)或 IgG1(rat IgG1)(BD Pharmingen)Fc 的单抗 4℃ 下孵育 45 min, FACS 检测供体特异性的抗体水平。

1.8 统计学处理 数据用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$;采用完全随机方差分析,S-N-K 法检验组间差异, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 移植后受者脾脏 T 细胞 MLR 活性 研究发现,对照组 T 细胞显示强烈的抗原刺激增殖反应;与对照组相比,抗 ICAM-1 治疗组 T 细胞对同种抗原刺激的增殖反应虽有减弱,但无显著差异;CTLA-4Ig 治疗组 T 细胞对同种抗原刺激的增殖反应明显低于

对照组,而 CTLA-4Ig+抗 ICAM-1 联合治疗组更显著地抑制 T 细胞对同种抗原的刺激反应($P<0.01$,

图 1A、1B)。但在接触无关第三组(C3H, H-2^k)抗原时,仍表现明显的抗原刺激增殖反应(图 1C)。

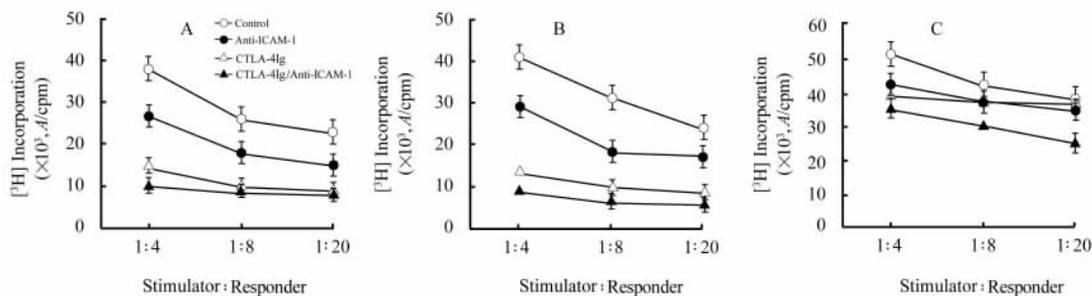


图 1 CTLA-4Ig 与 ICAM-1 单抗治疗后移植受体 T 细胞对同种抗原的增殖反应

Fig 1 T cell proliferation in allogeneic MLR from recipients treated with anti-ICAM-1 and CTLA-4Ig

Splenic T cells (2×10^6 /well) from BALB/c recipients on 7 days (A) and 21 days (B) after transplantation were incubated at a fixed stimulator: responder cell ratio with γ -irradiated (20 Gy; ⁶⁰Co source) allogeneic splenocytes, or with γ -irradiated third-party(C3H) splenocytes on 21 days after transplantation (C). Cultures were maintained in 96-well plates for 72 h, and [³H]TdR (1 μ Ci/well) was added for the final 18 h. $n=4$, $\bar{x} \pm s$; 1 cpm = 6.17×10^8 Bq

2.2 移植后受者血清及 MLR 上清中细胞因子的水平 本研究分析了移植 7 d 后受体血清中以及脾脏淋巴细胞同种 MLR 反应上清中 Th1 和 Th2 来源的细胞因子水平的改变。CTLA-4Ig 治疗可明显抑制 MLR 反应中 Th1 细胞因子 IL-2 的产生($P<0.01$), Th2 细胞因子 IL-4 没有明显改变, IL-10 水平虽升高但无统计学意义; 抗 ICAM-1 治疗对 MLR 反应上清中 IL-2 产生有明显的抑制作用($P<0.05$), 但对 Th1 和 Th2 来源的其他细胞因子(IFN- γ 、IL-4、IL-10)的产生没有明显的作用; CTLA-4Ig 联合 ICAM-1 单抗治疗明显抑制 MLR 反应中 Th1 细胞因子 IL-2($P<0.01$)、IFN- γ ($P<0.05$)的产生, 促进 IL-10 水平明显升高($P<0.05$) (图 2A)。经抗 ICAM-1 治疗后, 受者血清中除 IL-2 产生有明显的抑制作用($P<0.05$), 对 Th1 和 Th2 来源的其他细胞因子的产生没有明显的作用; CTLA-4Ig 单独或联合 ICAM-1 单抗治疗明显抑制血清中 Th1 细胞因子 IL-2、IFN- γ 的产生($P<0.01$, $P<0.05$), Th2 细胞因子 IL-4 也没有明显的改变, 但联合治疗组 IL-10 水平仍明显升高($P<0.05$) (图 2B)。上述结果提示, CTLA-4Ig 联合 ICAM-1 单抗具有促进 imDC 诱导移植受体 Th2 细胞极化的作用。

2.3 移植后受者脾脏淋巴细胞 CTL 活性 CTLA-4Ig 单独治疗组受体术后第 7 天(图 3A)和第 21 天(图 3B)淋巴细胞对 EL-4 细胞的杀伤活性显著地低于 imDC 对照组($P<0.05$, $P<0.01$); 术后 7 d ICAM-1 单抗治疗受者脾脏淋巴细胞对 EL-4 细胞的杀伤活性明显低于对照组($P<0.05$), CTLA-4Ig 单独或联合 ICAM-1 单抗治疗组受体淋巴细胞对

EL-4 细胞的杀伤活性均显著地低于对照组($P<0.01$), 但未见二者联合有协同作用; 术后 21 d 时 ICAM-1 单抗治疗组脾脏淋巴细胞对 EL-4 细胞的杀伤活性的抑制作用减弱, CTLA-4Ig 单独或联合 ICAM-1 单抗治疗组受体淋巴细胞对 EL-4 细胞的杀伤活性均显著地低于对照组($P<0.01$), 也未见有二者联合协同作用。

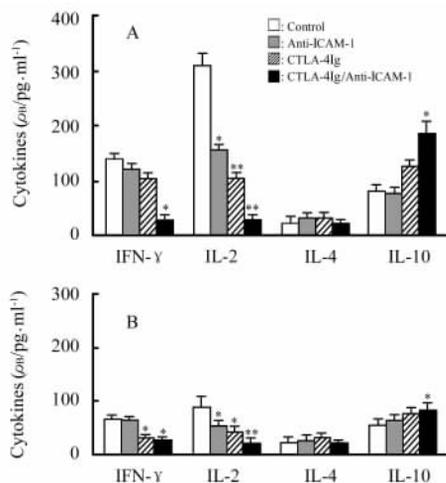


图 2 CTLA-4Ig 与 ICAM-1 单抗治疗后移植受体血清中及淋巴细胞 MLR 上清中细胞因子表达

Fig 2 Cytokine profiles in allogeneic MLR and sera of recipients treated with anti-ICAM-1 and CTLA-4Ig

Splenic T cells (2×10^6 /well) from BALB/c recipients on 7 days after transplantation were incubated at a fixed stimulator: responder cell ratio of 1:20 with γ -irradiated allogeneic splenocytes. A: The supernatants in 3 days MLR were collected. B: The sera of the recipients on 7 days after transplantation were also collected to detect IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10. Cytokines were determined by ELISA kits. $n=6$, $\bar{x} \pm s$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

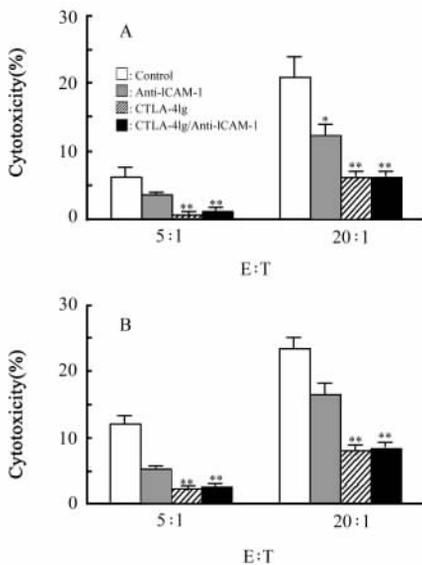


图3 CTLA-4Ig与ICAM-1单抗治疗后移植受体淋巴细胞毒活性

Fig 3 Cytotoxicity of splenic T cells from BALB/c recipients treated with anti-ICAM-1 and CTLA-4Ig

BALB/c recipients were sacrificed 7 days (A) and 21 days (B) after transplantation of C57BL/6 heart. Effectors were prepared by harvesting nylon wool-eluted splenic T cells. The P815 mouse mastocytoma cell line(H-2^d) was used as syngeneic target and the EL-4 lymphoma cell line(H-2^b) was used as specific allogeneic target cells. A standard 4-hour cytotoxicity assay was performed with EL-4 or P815 labeled with ⁵¹chromium as target cells. n = 4, $\bar{x} \pm s$; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group

2.4 移植后供者特异性体液免疫反应 采集移植后第7、21天受者的尾静脉外周血,稀释后与供者脾脏淋巴细胞孵育,以检测不同处理后受体产生抗同种抗原的体液免疫的变化。结果发现,CTLA-4Ig、ICAM-1单抗单独或联合治疗可以明显降低心脏移植7d后的受体同种抗体IgM和IgG的产生,也可以明显抑制心脏移植21d后受体的IgG产生,但二者联合后的作用未见明显增强;21d后移植各组产生的IgM没有明显的变化(表1)。结果表明CTLA-4Ig、ICAM-1单抗单独或联合治疗均可以抑制imDC诱导移植受体T细胞亚群对同种抗原的反应,从而抑制B细胞的体液免疫反应。

3 讨论

未成熟DC在介导抗原特异性的免疫耐受中起重要的作用。虽然表面缺乏共刺激分子的imDC能在体外诱导同种抗原特异性的T细胞无能^[4],但进入体内后,受到炎症细胞因子促成成熟作用,影响DC的耐受性,因此,通过免疫抑制分子的基因如vIL-10、TGF-β等基因修饰能够使未成熟型DC潜在的耐受原性增强,具有一定的延长移植植物存活期的效果^[7-9]。我们采用体内注射CTLA-4Ig单独和ICAM-1单抗体内阻断共刺激分子和黏附分子联合imDC诱导耐受的方法,可以非常明显地延长同种移植植物的存活期,使90%的移植植物长期存活。

表1 CTLA-4Ig与ICAM-1单抗治疗后移植受体供者特异性抗体水平

Tab 1 Donor-specific antibody levels in recipients treated with CTLA-4Ig and ICAM-1 mAb

Antibody	Cytotoxicity (%)							
	7 days after transplantation				21 days after transplantation			
	A	B	C	D	A	B	C	D
IgM	84.17	35.30**	49.02**	39.77**	38.59	33.23	31.42*	35.79
IgG	34.24	29.75*	25.79**	30.99*	73.81	41.35**	47.27**	31.84**

Sera were harvested from all 4 recipients groups 7 and 21 days after transplantation. Splenocytes (2×10⁶) from the donor mice were harvested and were first incubated for 1 h at 4°C with diluted (1/10) heat-inactivated recipient serum samples, then the cells were reacted with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Ab specific for the Fc portion of either IgM (rat IgG2a) or IgG1 (rat IgG1)(BD PharMingen) for 45 min at 4°C. The cells were analyzed in a FACScaliber flow cytometer and the levels of donor-specific Abs were expressed as mode channel fluorescence(%). n = 6, $\bar{x} \pm s$; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs group A; A=Control; B=Anti-ICAM-1; C=CTLA-4Ig; D=CTLA-4Ig+anti-ICAM-1

CTLA-4为表达于活化T细胞表面的、具有与B7有着更高亲和力的膜性免疫分子;ICAM-1/LFA-1为表达于抗原递呈细胞和T细胞表面的重要的免疫共刺激分子,具有促进T细胞活化和增殖作用^[10]。CTLA-4Ig与抗原递呈细胞表面的B7结合能够阻断B7/CD28信号通路,因而能够诱导T细胞的无能。CTLA-4Ig已经在很多的移植模型中被

证明能够延长同种移植植物的存活时间,但在没有系统免疫抑制治疗的情况下把CTLA-4Ig单独应用在临床器官移植中还不能完全避免排斥反应^[11]。ICAM-1为表达于APC或淋巴细胞表面的细胞间黏附分子,与抗原递呈和淋巴细胞的活化有关^[12]。我们的研究提示,在与供体来源的imDC同时应用的情况下,CTLA-4Ig联合ICAM-1单抗治疗能够

显著地延长同种移植物的存活期,其作用机制与受体T细胞对同种抗原的耐受有关。CTLA-4Ig与抗ICAM-1联合治疗后,可更显著地促进imDC诱导的T细胞对同种抗原的低反应性,这种低反应性表现为抗原特异性,即对无关第三者抗原表现为正常的反应。因此,体内注射CTLA-4Ig联合ICAM-1单抗,可以促进未成熟DC在体内非常有效地诱导T细胞的免疫耐受。

CTLA-4Ig单独或联合ICAM-1单抗治疗明显抑制血清和MLR反应中Th1细胞因子IL-2、IFN- γ 的产生,明显提高Th2细胞因子IL-10的水平,表明体内注射CTLA-4Ig和ICAM-1单抗治疗影响imDC诱导的T辅助细胞分化,可以抑制Th1细胞的增殖,促进T辅助细胞向Th2细胞极化,有助于T细胞耐受的形成,已有研究^[13]表明CTLA可以调节Th2的分化;另一方面,CTLA-4Ig或ICAM-1单抗单独治疗均可以明显降低心脏移植的受体同种抗体IgG的产生,二者联合后虽然未见明显增强作用,但两者联合应用显著抑制同种抗体IgG的产生,该结果进一步证实了CTLA-4或ICAM-1不但在T细胞的活化、增殖和分化中的作用,也提示CTLA-4Ig和抗ICAM-1治疗对受体B细胞体液免疫的产生,从而有可能影响器官移植的慢性移植排斥的形成,这对于移植器官的长期存活具有更积极的意义。

本实验发现CTLA-4Ig单独或联合ICAM-1单抗治疗显著抑制淋巴细胞对EL-4细胞的杀伤活性,从而抑制移植排斥反应的效应细胞。这可能与CTLA-4Ig和抗ICAM-1单抗促进未成熟DC体内诱导T细胞耐受作用、以及影响T细胞的分化有关。B7/CTLA-4Ig的结合会对活化的T细胞产生强有力的抑制作用,从而影响T细胞毒活性;另一方面,ICAM-1/LFA-1这一重要的共刺激分子的阻断也可能影响T细胞的细胞毒活性。因此,体内注射CTLA-4Ig与抗ICAM-1联合治疗一方面通过促进imDC体内诱导T细胞耐受发挥作用;另一方面,CTLA-4Ig与抗ICAM-1不但影响T细胞的活化、增殖、分化以及细胞毒活性,也通过抑制B细胞体液免疫的产生,从而有可能影响器官移植的慢性移植排斥的形成,有助于特异性移植耐受状态的维持。

[参考文献]

- [1] Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 621-667.
- [2] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, 392: 245-252.
- [3] Fu F, Li Y, Qian S, et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II⁺, CD80dim, CD86⁻) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients[J]. *Transplantation*, 1996, 62: 659-665.
- [4] Lu L, McCaslin D, Starzl TE, et al. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145⁺, MHC class II⁺, B7-1dim, B7-2⁻) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes[J]. *Transplantation*, 1995, 60: 1539-1545.
- [5] Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, et al. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity[J]. *J Exp Med*, 2002, 196: 217-227.
- [6] Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. *J Exp Med*, 1992, 176: 1693-1702.
- [7] Sun W, Wang Q, Zhang L, et al. TGF-beta(1) gene modified immature dendritic cells exhibit enhanced tolerogenicity but induce allograft fibrosis *in vivo* [J]. *J Mol Med*, 2002, 80: 514-523.
- [8] Lu L, Lee WC, Takayama T, et al. Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig) [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 66: 293-296.
- [9] Zhang M, Wang Q, Liu Y, et al. Effective induction of immune tolerance by portal venous infusion with IL-10 gene-modified immature dendritic cells leading to prolongation of allograft survival[J]. *J Mol Med*, 2004, 82: 240-249.
- [10] Eagar TN, Karandikar NJ, Bluestone JA, et al. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32: 972-981.
- [11] Isobe M, Yagita H, Okumura K, et al. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1[J]. *Science*, 1992, 255: 1125-1127.
- [12] Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation[J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17: 251-258.
- [13] Oosterwegel MA, Mandelbrot DA, Boyd SD, et al. The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation [J]. *J Immunol*, 1999, 163: 2634-2639.

[收稿日期] 2005-08-03

[修回日期] 2005-12-16

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群