

抗原浓度和 DC 数量对 OT-I 小鼠 CD8⁺ T 细胞分化与增殖的影响

田 垒^{1,2}, 陈栋炜², 季业伟², 刘 玺², 张明徽², 陈德坤¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 清华大学 医学院 免疫学实验室, 北京 100084)

[摘要] **【目的】**探讨细胞毒性 T 细胞(CTL)表位肽 SIINFEKL 浓度和树突状细胞(DC)数量对 CD8⁺ T 细胞活化和增殖的影响。**【方法】**用小鼠重组粒细胞集落刺激性生物因子(GM-CSF)和 IL-4 诱导骨髓细胞来源的 DC 增殖和分化,将所得成熟树突状细胞(maDC)和 SIINFEKL 抗原肽,与免疫磁珠法分离的 OT-I 小鼠 CD8⁺ T 细胞共培养。用不同质量浓度的 SIINFEKL(100, 10, 1, 0.1, 0.01 和 0.001 ng/mL)或不同数量的 DC(DC/T 比例分别为 1/20 和 1/5)与 CD8⁺ T 细胞共培养,刺激 CD8⁺ T 细胞增殖分化。于共培养不同时间收集细胞,流式细胞术测定 CD8⁺ T 细胞的数量、分裂速度、细胞表面活化分子的表达丰度,碘化丙啶(PI)染色测定细胞活力。**【结果】**在任一 DC/T 比例下,SIINFEKL 浓度过低,均不能引起 CD8⁺ T 细胞的充分增殖,而高于 CD8⁺ T 细胞最佳增殖浓度的 SIINFEKL 则导致 CD8⁺ T 细胞数量减少;在 SIINFEKL 质量浓度为 0.001~0.1 ng/mL 时,增加 DC 数量能促进 CD8⁺ T 细胞的扩增;而 SIINFEKL 质量浓度为 1~100 ng/mL 时,提高 DC 数量反而导致 CD8⁺ T 细胞数量减少;高浓度抗原和 DC 数量能有效诱导 CD8⁺ T 细胞的活化和分裂增殖,但过量刺激会使细胞死亡,导致 CD8⁺ T 细胞数量减少。**【结论】**CD8⁺ T 细胞的增殖受 DC 数量和抗原肽浓度的共同调节,要获得持久有效的 CD8⁺ T 细胞免疫,必须保证 CD8⁺ T 细胞得到足够的抗原信号,同时避免抗原信号过强导致的细胞活化后死亡。

[关键词] 抗原浓度;树突状细胞;CD8⁺ T 细胞

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)09-0007-06

Influence of antigen dose and DC number on CD8⁺ T cell differentiation and proliferation of OT- I transgenic mice

TIAN Lei^{1,2}, CHEN Dong-wei², JI Ye-wei², LIU Xi², ZHANG Ming-hui², CHEN De-kun¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to investigate the influence of peptide SIINFEKL concentration and Dendritic Cell (DC) number on primary CD8⁺ T cell differentiation and proliferation. **【Method】** Bone marrow-derived DCs were generated from bone marrow cells in the presence of GM-CSF and IL-4. OT-I mice CD8⁺ T cells were isolated by anti-mCD8 conjugated magnetic microbeads, and stimulated by SIINFEKL peptides and mature dendritic cells(maDC). Serial diluted peptides SIINFEKL(100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng/mL) and different amounts of DCs(DC/T ratio of 1/20, 1/5) were co-cultured with CD8⁺ T cells to stimulate the activation of CD8⁺ T cells. Then the cell number, division rate and activated surface marker of co-cultured CD8⁺ T cells were analyzed by flow cytometry, and cell vitality was measured by propidium iodide (PI) stain. **【Result】** Deficient peptides result in insufficient CD8⁺ T cell proliferation, while excess peptides impair live CD8⁺ T cell number. CD8⁺ T cell proliferation was more pronounced when more DCs

* [收稿日期] 2008-12-28

[作者简介] 田 垒(1983—), 女, 河南郑州人, 在读硕士, 主要从事细胞与分子免疫学研究。E-mail: immunol.tian@yahoo.com.cn

[通信作者] 陈德坤(1964—), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail: chendekunmsn@hotmail.com

were used to present peptides ranging from 0.001 ng/mL to 0.1 ng/mL and fewer DCs were used to present peptides ranging from 1 ng/mL to 100 ng/mL. High concentration of peptide antigen or large numbers of DCs lead to the fully activation and division of CD8⁺ T cells but followed a remarkable decrease in CD8⁺ T cell number, which may be caused by activation induced cell death (AICD). 【Conclusion】 Effective CD8⁺ T cell activation and proliferation depend on the optimal intensity of antigenic signals, which is controlled by the amount of both peptide antigen and DCs. To induce effective and prolonged cellular immune responses, the antigenic stimulation should meet the minimum requirement of activation, and elaborately evaluate to avoid AICD.

Key words: antigen concentration; DC; CD8⁺ T cell

细胞毒性 T 细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL),即活化的 CD8⁺ T 细胞,能够通过 TCR 特异性识别细胞表面 MHC-I 类分子结合的抗原肽,在短期内连续杀伤靶细胞。CTL 这种高效、特异性的杀伤功能,使其成为机体抗感染和抗肿瘤免疫的主要效应细胞^[1]。因此,在许多疾病的预防和免疫治疗中,都以人工诱导大量特异性 CTL 为主要手段,增强机体的细胞免疫功能^[2-3]。对影响 CTL 活化和增殖因素的探讨不仅有助于阐明 CD8⁺ T 细胞反应的生物学规律,也有利于优化 CTL 的体外扩增方法,具有重要的临床指导意义。

生理状态下,初始 CD8⁺ T 细胞的增殖和分化,需要一定数量的树突状细胞(Dendritic cell, DC)提供抗原刺激信号^[4-6]。DC 的数量及其表面递呈抗原肽的数量,直接影响着 CD8⁺ T 细胞所接受的抗原信号强度,进而影响 CD8⁺ T 细胞的增殖和分化过程。虽然对影响 CTL 活化和增殖因素的研究已有不少报道^[1,7-10],但是抗原浓度及 DC 数量对 CTL 增殖和分化的影响目前仍不清楚,CTL 的大量体外扩增仍是制约免疫治疗的一个瓶颈。本研究采用不同质量浓度的抗原肽及不同数量的成熟树突状细胞(Mature dendritic cell, maDC)来扩增抗原特异性 CD8⁺ T 细胞,测定 2 种因素对 T 细胞活化和增殖等生物学特性的影响,以期了解 CTL 的反应规律,优化 CTL 的体外扩增条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠 C57BL/6 近交系小鼠和 OT-I 转基因小鼠,6~8 周龄,购自美国 Jaxson 实验室,由清华免疫学实验室饲养保种。OT-I 小鼠 CD8⁺ T 细胞表达 MHC-I 类分子限制性 TCR(V α 2/V β 5)分子,该 TCR 分子特异性识别小鼠 H-2K^b 分子 SIINFEKL 肽复合物。

1.1.2 试剂 抗小鼠 CD8 α (Ly-2) 微球及磁珠分选系统, Miltenyi Biotec 公司产品;各种荧光抗体、同型对照荧光抗体和 CaliBRITE FITC 微球,美国 BD 公司产品;重组小鼠粒细胞集落刺激生物因子(GM-CSF),杭州隆基生物技术有限公司产品;白介素 4(IL-4),Peprotech 公司产品;碘化丙啶(PI)和大肠杆菌脂多糖(LPS),Sigma 公司产品;细胞毒性 T 细胞表位肽 SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) 及其对照肽 KAVYNFATM,杭州中肽公司产品;羧甲基锎倍半氧化物(CFSE),Molecular Probe 公司产品。

1.1.3 仪器 流式细胞仪(BD FACSAria),美国 BD 公司产品;倒置荧光显微镜,德国莱卡公司产品。

1.2 髓系 DC 的制备及鉴定

参照 Inaba 等^[11]的方法制备髓系 DC。冲取 C57BL/6 小鼠股骨骨髓细胞,Tris-NH₄Cl 裂解红细胞。经 PBS 充分洗涤后,用含 10 ng/mL 小鼠 GM-CSF 和 1 ng/mL IL-4 的完全 RPMI1640 培养基悬浮细胞,制备密度为 2×10^6 mL⁻¹ 的细胞悬液,铺 6 孔细胞培养板,每孔 4 mL,置饱和湿度、37 °C CO₂ 培养箱中培养。第 3 天,去除板内悬浮细胞,留贴壁细胞集落继续培养。之后,每隔 2 天进行半量换液,至第 8~10 天时收集悬浮细胞,加入新鲜 DC 培养基和 1 ng/mL 的 LPS 继续培养 24 h,即得成熟树突状细胞。按荧光抗体产品说明,标记 DC 表面 Ia、H-2K^b、CD11b、CD11c、CD16/32、CD40、CD80 和 CD86 分子,流式细胞仪测定荧光强度,FlowJo 软件分析测定结果。

1.3 CD8⁺ T 细胞的制备及体外活化

常规方法制备 OT-I 小鼠脾脏单细胞悬液,按 Miltenyi 产品说明,用抗小鼠 CD8 微球,磁性分选其中的 CD8⁺ T 细胞。取 2×10^5 个细胞,标记抗小鼠 CD8 荧光抗体,流式细胞仪检测其荧光强度,分析 CD8⁺ 细胞纯度,要求 CD8⁺ 细胞纯度达到 90%

以上。然后,将剩余细胞按 1×10^5 /孔的数量铺 96 孔圆底细胞培养板,分别按 DC/T 为 1/5 和 1/20 的比例补加相应数量 maDC,加入梯度稀释的 SIINFEKL 抗原肽,使其质量浓度分别为 100, 10, 1, 0.1, 0.01 和 0.001 ng/mL;对照组加入 KAVYNFATM 抗原肽,使其质量浓度为 100 ng/mL,置 CO₂ 培养箱中培养 72 h。

1.4 CD8⁺ T 细胞数量的流式细胞术测定及分析

收集待测 CD8⁺ T 细胞,按试剂说明标记抗小鼠 CD8 荧光抗体和 0.01 mg/mL 的 DNA 荧光染料 PI,之后参照 Belz 等^[12] 和 Jones 等^[13] 的方法,加入同等数量已知浓度的 CaliBRITE FITC 微球作为内参照,流式细胞仪测定样本荧光强度,FlowJo 软件统计 PI⁻ CD8⁺ 细胞和微球数量,用微球数量校准数量基线后统计各组存活 CD8⁺ T 细胞数量。

1.5 不同浓度抗原肽对 CD8⁺ T 细胞活化的影响

为进一步研究 CD8⁺ T 细胞的活化效果,本试验以效应 CTL 的活化标志为指标,测定了不同浓度抗原肽对 CD8⁺ T 细胞活化的影响。按 1.3 方法培养 CD8⁺ T 细胞,分别于培养 48 和 72 h 收集细胞,标记抗小鼠 CD8 荧光抗体后,再分别标记抗小鼠 CD25、CD44、CD69 和 CD152 荧光抗体,用流式细胞仪测定荧光强度,FlowJo 软件分析测定结果。

1.6 高浓度抗原肽对 CD8⁺ T 细胞分裂增殖的影响

为探讨高浓度抗原肽抑制 CD8⁺ T 细胞增殖的原因,本试验参照 Lyons 等^[14] 的方法,用 CFSE 标记 CD8⁺ T 细胞,研究了较高浓度抗原肽培养的

CD8⁺ T 细胞的分裂情况。按 1.3 方法磁珠分选 OT-I 新鲜小鼠脾脏 CD8⁺ T 细胞,培养前标记 20 mmol/L CFSE,具体操作参考 CFSE 的说明书进行。然后,按 1×10^5 个/孔铺 96 孔圆底细胞培养板,每孔加入 5×10^3 个成熟 DC 及梯度稀释的 SIINFEKL 抗原肽,使 SIINFEKL 质量浓度分别为 100, 10 和 1 ng/mL,置 37 °C CO₂ 培养箱中培养。分别于培养 20 和 48 h 时,收集培养细胞,按 1.4 方法分析存活 CD8⁺ T 细胞的 CFSE 荧光强度。用流式细胞仪获取数据时,CFSE⁺ CD8⁺ T 细胞与 CaliBRITE FITC 微球荧光通道相同,可以根据细胞和微球大小的显著差异,从 FSC、SSC 图中将两者区分开。

1.7 CD8⁺ T 细胞活力的鉴定

按 1.3 节方法,使用平底 96 孔细胞培养板培养 CD8⁺ T 细胞,72 h 时,每孔加入 0.01 mg/mL PI,避光标记 5 min 后,荧光显微镜拍摄不同 SIINFEKL 浓度下培养的 CD8⁺ T 细胞及其 DNA 荧光染色情况,使用 Image-ProPlus 软件叠加拍摄结果。

2 结果与分析

2.1 小鼠骨髓来源 DC 的鉴定

大量研究表明,DC 是激活 CD8⁺ T 细胞免疫的主要抗原递呈细胞^[4-6]。试验结果表明,骨髓细胞经 8~10 d 培养后,可以获得胞质较小,含大量细长伪足的 maDC(图 1A),其中 CD11c⁺ 细胞达 90% 以上,其表面 Ia、H-2K^b、CD11b、CD11c、Fc 受体(CD16/32)和共刺激分子 CD80 高表达(图 1B)。

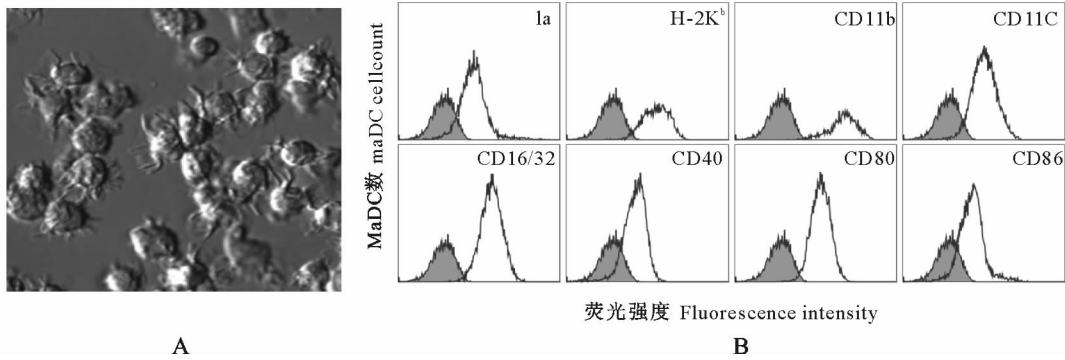


图 1 小鼠 maDC 的形态和表面分子分析

A. 小鼠髓系 maDC 形态(×400);B. 小鼠髓系 DC 表型(灰色峰为同型对照的荧光强度)

Fig. 1 Morphology and phenotypes of mice bone-marrow derived maDC

A. The morphology image of maDC (×400);B. Phenotypes of maDC were analyzed by flow cytometry with isotype (tined)

2.2 抗原肽浓度和 DC 数量对 CD8⁺ T 细胞增殖的影响

试验结果显示,CD8⁺ T 细胞的活化增殖需要一定量的抗原肽;任一 DC/T 比例下,SIINFEKL 浓度

过低,均不能引起 CD8⁺ T 细胞的充分增殖,而高于 CD8⁺ T 细胞最佳增殖浓度的 SIINFEKL 则导致 CD8⁺ T 细胞数量减少。在不同的抗原浓度下,分析 DC 数量对 T 细胞增殖的影响,结果发现在

SIINFEKL质量浓度为 0.001~0.1 ng/mL 时,增加 DC 数量能促进 CD8⁺ T 细胞的扩增;而在 SIIN- FEKL 质量浓度为 1~100 ng/mL 时,提高 DC 数量反而导致 CD8⁺ T 细胞数量减少(图 2)。

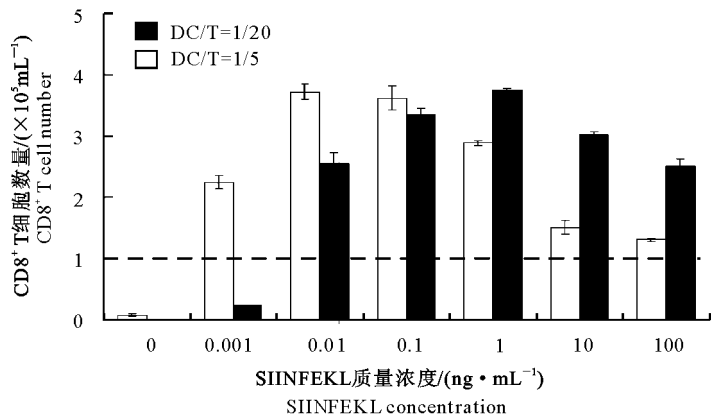


图 2 抗原肽质量浓度和 DC 数量对 CD8⁺ T 细胞增殖的影响
虚线为起始细胞数量

Fig. 2 Influence of peptide concentration and DC number on primary CD8⁺ T cell proliferation
Dashed line represents the original CD8⁺ T cell proliferation

2.3 抗原肽浓度对 CD8⁺ T 细胞活化分子表达丰度的影响

结果显示,在 DC/T 为 1/20、SIINFEKL 质量浓度大于 1 ng/mL 时,培养 48 和 72 h 的 CD8⁺ T

细胞均高表达 CD25、CD44、CD69、CD152 (CTLA-4)等活化性标志,而在 SIINFEKL 质量浓度≤0.1 ng/mL 时,CD8⁺ T 细胞不能被充分活化(图 3)。

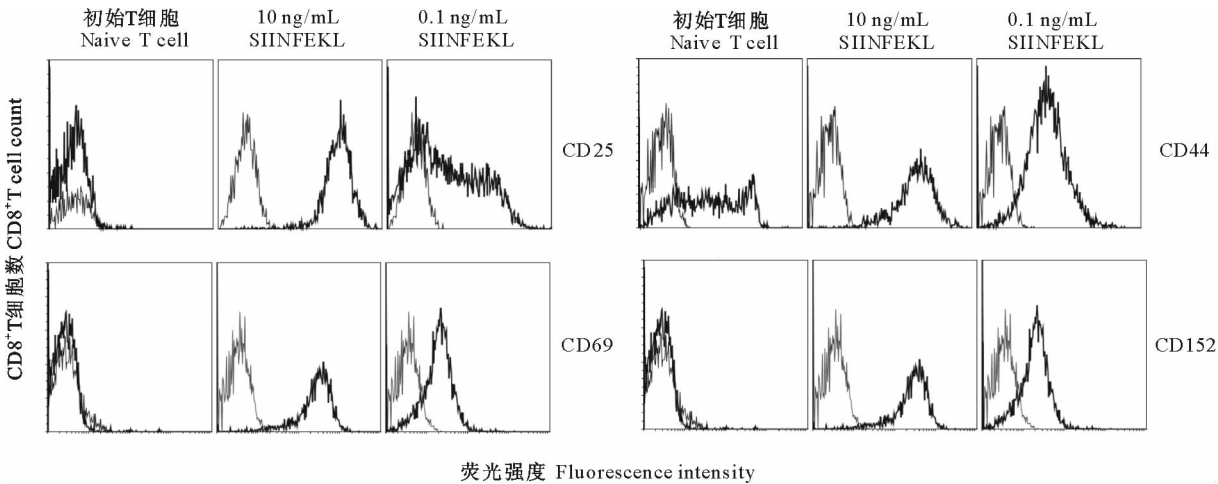


图 3 不同质量浓度 SIINFEKL 对 CD8⁺ T 细胞表面活化分子表达丰度的影响
细线为同型对照的荧光强度

Fig. 3 Influence of SIINFEKL concentration on activated surface markers of antigen activated CD8⁺ T cells
Isotype-hairline

2.4 抗原肽浓度对 CD8⁺ T 细胞分裂速度的影响

结果显示,在不同浓度抗原肽刺激下,CD8⁺ T 细胞的分裂代数相同(图 4),表明高浓度 SIIN- FEKL 并不影响 CD8⁺ T 细胞的分裂速度。

2.5 抗原肽浓度对 CD8⁺ T 细胞活力的影响

对不同 SIINFEKL 浓度作用下的 CD8⁺ T 细胞进行 PI 染色,结果显示,在高浓度 SIINFEKL 多

肽刺激下,细胞培养孔中含大量死亡细胞和裸露细胞碎片 DNA,结合 PI 染料后在荧光激发下呈红色,而在适宜抗原浓度下增殖的 CD8⁺ T 细胞,没有出现 PI 染色(图 5)。可见,在过量抗原肽刺激下,CD8⁺ T 细胞在增殖的同时出现了活化后死亡。因此,高浓度抗原刺激导致的细胞死亡是 CD8⁺ T 细胞数量下降的主要原因。

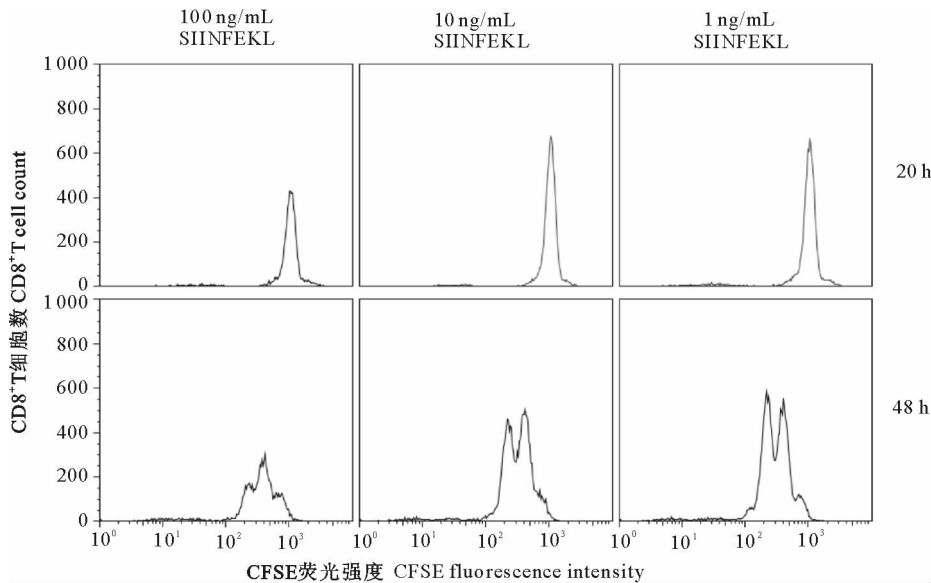


图 4 抗原肽质量浓度对 CD8⁺ T 细胞分裂速度的影响

Fig. 4 Influence of antigen concentration on the CD8⁺ T cells division

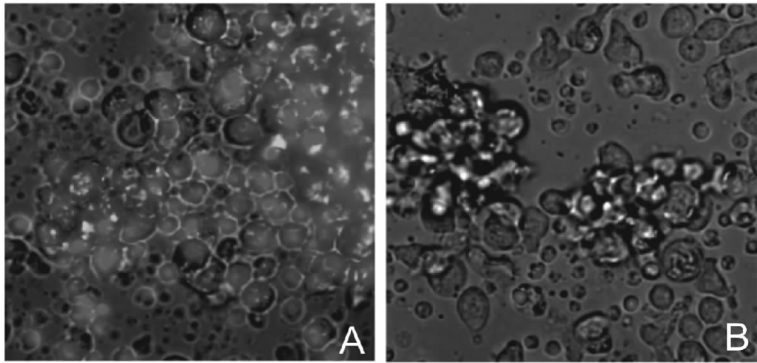


图 5 抗原肽质量浓度对 CD8⁺ T 细胞活力的影响(×400)

A. SIINFEKL 质量浓度 100 ng/mL 时 CD8⁺ T 细胞的 PI 染色情况;B. SIINFEKL 质量浓度 1 ng/mL 时 CD8⁺ T 细胞的 PI 染色情况

Fig. 5 Influence of SIINFEKL concentration on CD8⁺ T cells' vitality(×400)

A. PI staining of CD8⁺ T cultured in 100 ng/mL SIINFEKL peptides;B. PI staining of CD8⁺ T cultured in 1 ng/mL SIINFEKL peptides

3 讨论

初始 CD8⁺ T 细胞需要多种抗原信号刺激,才能分化成为有效的杀伤细胞,在抗病毒和抗肿瘤免疫中发挥其特异性杀伤功能。在生理状态下,CD8⁺ T 细胞与携带抗原的 DC 相互识别和结合,启动初始 CD8⁺ T 细胞的活化增殖过程。体外扩增抗原特异性 CTL 并用于肿瘤及病毒感染性疾病治疗,是目前免疫治疗的重要方向之一,但体外扩增 CTL 时,抗原浓度及抗原递呈细胞(Antigen presentation cell,APC)数量对 CTL 增殖和分化的影响目前仍不清楚,CTL 的大量体外扩增也是制约细胞治疗的一个瓶颈^[2-3]。为研究抗原浓度和 APC 数量对 CTL 扩增的影响,本研究使用特异性抗原肽 SIINFEKL

和骨髓培养 DC 体外刺激 OT-I 小鼠脾脏 CD8⁺ T 细胞作为模型,通过改变抗原肽浓度和 DC 数量,调节抗原信号强度,研究不同条件对 CD8⁺ T 细胞的活化状态、增殖数量、分裂速度和细胞活力的影响。

抗原肽对 CD8⁺ T 细胞反应的调节,必须通过抗原递呈细胞的介导来实现。但早期一些有关抗原肽与 CD8⁺ T 细胞增殖关系的研究,并没有考虑抗原递呈细胞的类型和数量对 T 细胞反应的影响^[7-10]。本研究以确定数量的 maDC,在不同抗原肽浓度下体外刺激 CD8⁺ T 细胞增殖,结果表明,在 DC 数量一定的情况下,一定浓度的 SIINFEKL 肽能使 T 细胞充分活化;而随着培养时间的延长,高浓度多肽抗原会导致细胞死亡,使 CTL 数量减少。因此,要获得理想的 CTL 扩增效果,必须考察最适

的抗原浓度。

DC 与 CD8⁺ T 细胞的相互识别和结合,是诱发 CD8⁺ T 细胞反应的前提。Storni 等^[9]发现,DC 数量越少时,CD8⁺ T 细胞增殖效果越好。而 Ludewig 等^[10]研究认为,仅在一定范围内增加 DC 的数量有利于增强 CD8⁺ T 细胞反应的强度。考虑到抗原肽浓度对 CD8⁺ T 细胞增殖的影响,本研究又探讨了不同抗原肽浓度和不同 DC 数量组合对 CD8⁺ T 细胞增殖的影响。结果显示,在低抗原浓度下,提高 DC 的数量有助于 CD8⁺ T 细胞的扩增;而当抗原浓度较高时,增加 DC 数量会导致 CD8⁺ T 细胞死亡而使其数量减少。本研究结果提示,由抗原肽浓度及 DC 数量变化引起的抗原信号强度变化,能显著影响 CTL 的增殖、活化及存活状态。体外 CTL 的扩增,要同时考虑抗原浓度及所添加的 APC 数量,才能获得良好的扩增效果。

早期免疫学研究发现,过高的免疫剂量往往不能诱发理想的免疫保护效果^[15],这种现象称为高区带耐受。本研究发现,强抗原刺激信号能有效活化 CD8⁺ T 细胞,但部分 CD8⁺ T 细胞出现活化后死亡。过量的抗原引起的效应性 T 细胞死亡,可能是高区带耐受现象的机制所在^[8,16-17]。因此本研究提示,疫苗设计时,要充分考虑抗原的有效浓度及抗原递呈细胞的作用,以获得更持久的细胞免疫效果。

[参考文献]

- [1] Henrickson S E, von Andrian U H. Single-cell dynamics of T-cell priming [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(3): 249-258.
- [2] Tey S K, Bollard C M, Heslop H E. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy [J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84(3): 281-289.
- [3] Leen A M, Heslop H E. Cytotoxic T lymphocytes as immunotherapy in haematological practice [J]. *Br J Haematol*, 2008, 143(2): 169-179.
- [4] Lenz L L, Butz E A, Bevan M J. Requirements for bone marrow-derived antigen-presenting cells in priming cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(8): 1135-1142.
- [5] Sigal L J, Rock K L. Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(8): 1143-1150.
- [6] den Haan J M, Bevan M J. Antigen presentation to CD8⁺ T cells: cross-priming in infectious diseases [J]. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13(4): 437-441.
- [7] Cai Z, Sprent J. Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8⁺ T cells *in vitro* [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(5): 2247-2257.
- [8] Alexander-Miller M A, Leggett G R, Sarin A, et al. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL [J]. *J Exp Med*, 1996, 184(2): 485-492.
- [9] Storni T, Bachmann M F. On the role of APC-activation for *in vitro* versus *in vivo* T cell priming [J]. *Cell Immunol*, 2003, 225(1): 1-11.
- [10] Ludewig B, Krebs P, Junt T, et al. Determining control parameters for dendritic cell-cytotoxic T lymphocyte interaction [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(9): 2407-2418.
- [11] 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(6): 1693-1702.
- [12] Belz G T, Bedoui S, Kupresanin F, et al. Minimal activation of memory CD8⁺ T cell by tissue-derived dendritic cells favors the stimulation of naive CD8⁺ T cells [J]. *Nature Immunology*, 2007, 8(10): 1060-1066.
- [13] Jones N D, Carvalho-Gaspar M, Luo S, et al. Effector and memory CD8⁺ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4⁺ T cell help [J]. *Journal of Immunology*, 2006, 176(4): 2316-2323.
- [14] Lyons A B. Analysing cell division *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243(1-2): 147-154.
- [15] Mitchison N A. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1964, 161: 275-292.
- [16] Alexander-Miller M A, Derby M A, Sarin A, et al. Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bcl-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(8): 1391-1399.
- [17] Kurts C, Sutherland R M, Davey G, et al. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(22): 12703-12707.