

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.008
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190215.1819.006.html(2019-02-18)

人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 DNA 疫苗预防 NOD 小鼠的机制探讨*

喻日成¹, 罗建华^{1△}, 杨冬花², 范元硕¹, 刘波¹, 吕利撒¹, 于瑞萍¹
(贵州省人民医院:1. 内分泌科;2. 干医科, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 探讨人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) DNA 疫苗预防非肥胖糖尿病(NOD)小鼠糖尿病的作用机制。**方法** 4 周龄 NOD 雌鼠随机分为 PBS($n=15$)、PcDNA($n=15$)、GM($n=15$)3 组,由胫前肌分别注射 PBS、质粒 PcDNA3.1、人 GM-CSF DNA 疫苗 100 μg ,1 周后重复 1 次,观察 30 周龄小鼠的累积糖尿病发病率。各组取 12 周龄未发病 NOD 鼠($n=6$)胰腺 HE 染色观察胰岛炎;取 PBS 组未发病 10~12 周龄 NOD 鼠脾脏制成细胞悬液加 GM-CSF(2 ng/mL)培养 72 h;ELISA 法测定血清、脾细胞培养上清液干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-4 和 IL-10 水平。**结果** 30 周龄时,PBS、PcDNA、GM 组糖尿病发病率分别为 80.0%、73.3%和 46.7%;平均发病时间分别为(143.9 $\pm$ 46.1)、(156.9 $\pm$ 40.0)、(188.3 $\pm$ 30.0)d,与 PBS 组和 PcDNA 组比较,GM 组发病时间显著延迟($P=0.004$ 和 $P=0.034$)。12 周龄时 GM 组胰岛炎积分低于 PBS 组($P=0.001$)和 PcDNA 组($P=0.027$),GM 组血清及脾细胞培养上清液 IL-10 水平显著高于 PBS 组和 PcDNA 组,IL-4 水平显著性高于 PBS 组,而 IFN- γ 、IL-1 β 水平则低于 PBS 组和 PcDNA 组。GM 组脾细胞上清液 IL-4 和 IL-10 水平高于 PBS 组;IFN- γ 和 IL-1 β 水平则低于 PBS 组。**结论** 人 GM-CSF DNA 疫苗上调了 IL-10、IL-4 及下调 IFN- γ 、IL-1 β ,使免疫平衡偏向 Th2,而减轻 NOD 鼠胰岛炎,预防和延缓糖尿病发生。

[关键词] DNA 疫苗;粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;糖尿病,1 型;非肥胖糖尿病鼠
[中图法分类号] R587 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)08-1292-05

Mechanisms of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor DNA vaccine in preventing diabetes mellitus in NOD mice*

YU Richeng¹, LUO Jianhua^{1△}, YANG Donghua², FAN Yuanshuo¹, LIU Bo¹, LU Lisa¹, YU Ruiping¹
(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Cadre Medicine, Guizhou People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) DNA vaccine in preventing diabetes mellitus in (non-obese diabetes) NOD mice. **Methods** Female NOD mice aged 4 weeks were randomly divided into the PBS ($n=15$), PcDNA ($n=15$) and GM ($n=15$) group. PBS, plasmid PcDNA3.1 and human GM-CSF DNA vaccine were injected into tibialis anterior muscle respectively. The cumulative incidence of diabetes mellitus at 30 weeks was observed. Pancreas was removed from NOD mice at 12-week age in each group ($n=6$) to score insulinitis severity by HE staining. The spleens of 10 to 12-week-old NOD mice in the PBS group were used to prepare cell suspension and cultured with GM-CSF (2 ng/mL) for 72 hours. The levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-4 and IL-10 in serum and supernatant of spleen cells were determined by ELISA. **Results** At the age of 30 weeks, the incidence of diabetes mellitus was 80.0%, 73.3% and 46.7% in the PBS, PcDNA and GM group, respectively, and the average onset time was (143.9 $\pm$ 46.1), (156.9 $\pm$ 40.0) and (188.3 $\pm$ 30.0)d, respectively. Compared with the PBS and PcDNA groups, the onset time of diabetes mellitus in the GM group was significantly delayed ($P=0.004$ and $P=0.034$). At the age of 12 weeks, the score of insulinitis in the GM group was lower than that in the PBS group ($P=0.001$) and the PcDNA group ($P=0.027$). The levels of IL-10 in serum and spleen cell supernatant of the GM group were significantly higher than those of the PBS group and the PcDNA group, and IL-4 was significantly higher than those of the PBS group, while the levels of IFN- γ and IL-1 β were lower than those of the PBS group and the PcDNA group. The levels of IL-4 and IL-10 in spleen cell supernatant of the GM group

* 基金项目:贵州省贵阳市科学技术计划项目([2009]筑科农合同字第 3-003 号);贵州省人民医院国家自然科学基金培育基金(黔科合平台[2018]5764-05)。 作者简介:喻日成(1976-),副主任医师,博士,主要从事肥胖与糖尿病相关并发症研究。 △ 通信作者, E-mail: luojianhua_gy@163.com。

were higher than those of the PBS group, while the levels of IFN- γ and IL-1 β were lower than those of PBS group. **Conclusion** Human GM-CSF DNA vaccine can up-regulate IL-10, IL-4 and down-regulate IFN- γ and IL-1 β , so as to make the immune balance incline to Th2 which alleviate insulinitis in NOD mice and prevent and delay the occurrence of diabetes.

[Key words] DNA vaccine; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; diabetes mellitus, type 1; non-obese diabetic mice

1 型糖尿病(T1DM)为胰岛 β 细胞特异性自身免疫性疾病,其因为自身免疫耐受障碍,T 细胞介导自身免疫反应致 β 细胞破坏而发生。非肥胖糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠是一种遗传性自身免疫性糖尿病动物模型^[1]。NOD 鼠免疫耐受障碍是因为未成熟树突状细胞(iDC)和 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)的数量及功能缺陷所致。这些缺陷引起 iDC 免疫耐受效率降低,触发持续的 T 细胞反应而致病^[2]。

人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)在 DC 功能调节上具有重要作用^[3-4],因此在体内外通过使用 GM-CSF 增加和维持较高的抗 iDC 数量,促使产生外周免疫耐受,将成为一种有价值的预防自身免疫糖尿病策略。人 GAD65 (hGAD65) DNA 疫苗成功延缓和降低了 NOD 鼠发生糖尿病^[5],但其预防效率仍不够理想。迄今有关人 GM-CSF DNA 疫苗防治 T1DM 尚未见报道。我们拟用 GM-CSF DNA 疫苗预防 NOD 小鼠胰岛炎和 T1DM,为 GM-CSF 基因疫苗用于防治 T1DM 提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 4 周龄 NOD 雌鼠[实验动物质量合格证 No. 006941, 许可证号 SCXH(沪)2007-0005]购自中国科学院上海实验动物中心。在无特定病原体(SPF)环境下饲养,自由饮水及进食营养颗粒饲料。NOD 鼠群糖尿病自然发病率 30 周龄时约 75%。

1.2 主要试剂与仪器 人 GM-CSF 基因表达质粒(即 GM-CSF DNA 疫苗,载体为 pcDNA3.1)由本项目组构建;质粒提取试剂盒(HiSpeed Plasmid Midi Kit)购自德国 Qiagen 公司;GM-CSF 购自美国 Sigma 公司;Hanks 液和 RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司;小鼠 IL-4、IFN- γ 、IL-10 和 IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自美国 R&D 公司。摇床及各种型号高速冷冻离心机为美国 Beckman 公司。

1.3 方法

1.3.1 GM-CSF 质粒的提取与质粒 DNA 的纯化浓缩 从含酵母、选择性抗菌药物的 LB 培养基划痕平板中挑单个克隆。37 °C 摇床(220 r/min)培养 8 h。以选择性 LB 培养基扩增质粒;37 °C 培养至细胞密度约 3×10^9 /mL $\sim 4 \times 10^9$ /mL。按试剂盒操作步骤抽提质粒,测定质粒光密度(OD)值及浓度;在超净台去

除乙醇,加无菌 PBS 溶解,浓度调至 1 μ g/ μ L。-20 °C 保存备用。

1.3.2 实验动物分组、免疫及发病率观察 4 周龄 NOD 雌鼠分为磷酸盐缓冲液(PBS)组、质粒载体 PcDNA3.1 组(PcDNA 组)和 GM-CSF DNA 疫苗组(GM 组)3 组,每组 15 只。以戊巴比妥钠 65 mg/kg 麻醉 NOD 雌鼠,剃除小鼠胫前毛后,肌肉注射 25% 蔗糖 100 μ L,15 min 后于同一部位注射 PBS 或溶于 PBS 缓冲液(pH=7.4)中的质粒 PcDNA3.1 或人 GM-CSF DNA 疫苗,注射量为 100 μ g,1 周重复 1 次,共 200 μ g,饲喂普通营养饲料。10 周龄开始,测尿糖 1 次/周。出现尿糖阳性或有多饮、多尿等症状时,测血糖,连续 2 次血糖大于或等于 16.7 mmol/L,则诊断为糖尿病。观察至糖尿病发生或 30 周龄时处死。

1.3.3 胰岛病理学检查 取 10~12 周龄小鼠,剪尾取血测血糖,颈椎脱臼法处死,PBS、PcDNA、GM 3 组均为 6 只。分离胰腺,布恩氏液固定 24 h,制作常规石蜡切片。切片间相隔 30 μ m,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察胰岛炎,由 2 位实验者采用盲法阅片。胰岛淋巴细胞浸润记分标准:胰岛周围和胰岛内无淋巴细胞浸润记 0 分;胰岛周围有淋巴细胞浸润但未侵入胰岛记 1 分;胰岛内淋巴细胞浸润小于 25% 记 2 分;胰岛内淋巴细胞浸润 25%~75% 记 3 分;胰岛内淋巴细胞浸润大于 75% 记 4 分^[6]。每个胰腺观察 3~4 张不同的切片中 15~30 个胰岛,以胰岛平均积分表示胰岛炎的程度。

1.3.4 NOD 鼠脾细胞的分离和培养 取 1.3.3 小鼠脾脏剪成 2~3 段捻碎,用冷 Hanks 液悬浮细胞,细胞悬液离心(1 000 r/min)5 min,去上清液后加入 6 mL 的 Tri-NH₄Cl,混匀后室温下放置 5 min,1 000 r/min 离心 5 min,去上清液,以 Hanks 液洗涤细胞 3 次(1 000 r/min 离心 5 min)。RPMI-1640 培养液 4~5 mL 悬浮细胞,调整细胞浓度至 2.5×10^6 /mL。取 750 μ L 细胞悬液至 6 孔板,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。培养 72 h 后,1 000 r/min 离心 5 min,留存上清液,收集脾细胞,均 -20 °C 保存待检测。(2)将未处理未发生糖尿病的 10~12 周龄 NOD 雌鼠($n=5$)脾细胞制备悬液(方法同前述),分别加 RPMI-1640 培养液(对照)、GM-CSF pcDNA3.1 及 pcDNA3.1-GM-CSF 质粒处理脾细胞备用(每孔质粒终浓度为 2 ng/mL)培育 72 h,分离上清液存 -20 °C

备检。

1.3.5 细胞因子水平检测 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清及脾细胞培养上清液中干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-4 及 IL-10 水平,实验操作按试剂盒说明书进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人 GM-CSF DNA 疫苗对 NOD 雌鼠糖尿病发病率及发病时间的影响

2.1.1 各组 NOD 鼠 30 周糖尿病累计发病率 PBS、PcDNA 和 GM 3 组 30 周龄糖尿病累计发病率分别为 80.0%、73.3%和 46.7%。GM 组与 PBS 组、PcDNA 组比较,发病率分别下降了 33.3%和 26.6%,但差异无统计学意义($P=0.128$ 和 $P=0.264$)。

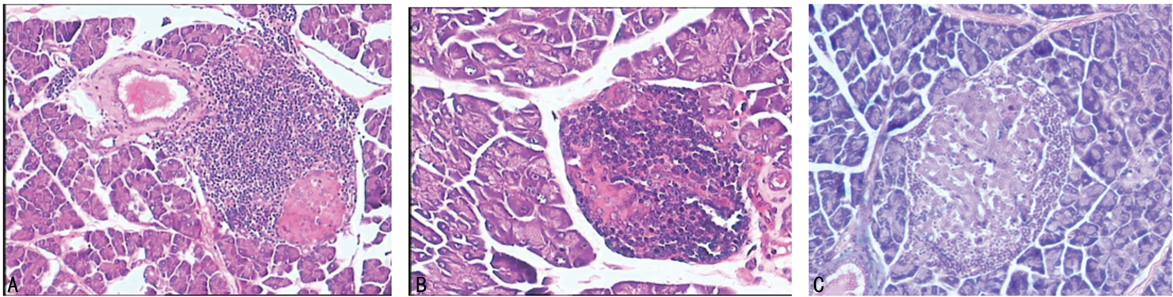
2.1.2 各组 NOD 鼠 30 周发病时间 PBS、PcDNA 及 GM 3 组 30 周龄时平均发病时间分别为(143.9 $\pm$

46.1)、(156.9 $\pm$ 40.0)、(188.3 $\pm$ 30.0)d;GM 组与 PBS 组、PcDNA 组比较,发病时间显著延迟($P=0.004$ 和 $P=0.034$)。

2.2 人 GM-CSF DNA 疫苗对 12 周龄 NOD 雌鼠胰岛炎的影响 PBS、PcDNA 和 GM 3 组 NOD 鼠 10~12 周龄时胰岛炎平均积分分别为(2.82 $\pm$ 0.39)、(2.12 $\pm$ 0.59)、(1.30 $\pm$ 0.70)分。与 PBS 和 PcDNA 组比较,GM 组胰岛炎平均积分显著降低($P=0.001$ 、 0.026),病理学检查见图 1。12 周龄各组 NOD 雌鼠胰岛炎构成比见表 1。

表 1 10~12 周龄时 NOD 雌鼠胰岛炎构成比				
组别	胰岛总数 (<i>n</i>)	胰岛数[<i>n</i> (%)]		
		正常胰岛	胰岛周围炎	胰岛内炎
PBS 组	135	5(3.7)	9(6.7)	121(89.6)
PcDNA 组	141	10(7.1)	28(19.9)	103(73.0)
GM 组	150	42(28.0) ^{ab}	51(34.0) ^{ab}	57(38.0) ^{ab}

^a: $P<0.05$,与 PBS 组比较;^b: $P<0.05$,与 PcDNA 组比较



A:PBS 组;B:PcDNA 组;C:GM-CSF 组

图 1 12 周龄 NOD 鼠胰岛炎(HE 染色 $\times 200$)

表 2 各组血清细胞因子水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IFN- γ	IL-10	IL-4
PBS 组	6	166.3 $\pm$ 28.3	560.2 $\pm$ 60.4	204.8 $\pm$ 38.4	191.7 $\pm$ 36.1
PcDNA 组	6	163.7 $\pm$ 30.7	553.8 $\pm$ 47.7	205.2 $\pm$ 54.1	212.8 $\pm$ 35.3
GM 组	6	110.7 $\pm$ 20.5 ^{ab}	431.7 $\pm$ 49.9 ^{ab}	514.3 $\pm$ 64.4 ^{ab}	255.8 $\pm$ 43.6 ^a

^a: $P<0.05$,与 PBS 组比较;^b: $P<0.05$,与 PcDNA 组比较

表 3 各组脾细胞原代培养上清液细胞因子水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IFN- γ	IL-10	IL-4
PBS 组	6	116.5 $\pm$ 19.9	448.0 $\pm$ 48.4	165.2 $\pm$ 31.2	163.3 $\pm$ 31.1
PcDNA 组	6	114.7 $\pm$ 22.5	443.2 $\pm$ 38.1	167.8 $\pm$ 49.9	191.2 $\pm$ 19.8
GM 组	6	77.3 $\pm$ 14.1 ^{ab}	345.2 $\pm$ 39.9 ^{ab}	411.5 $\pm$ 51.5 ^{ab}	219.7 $\pm$ 40.1 ^a

^a: $P<0.05$,与 PBS 组比较;^b: $P<0.05$,与 PcDNA 组比较

2.3 血清 IL-1 β 、IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的水平 GM 组血清及上清液 IL-10 水平显著高于 PBS 组和 PcDNA 组,IL-4 水平显著性高于 PBS 组;而 IFN- γ 、IL-1 β 水平则低于 PBS 组和 PcDNA 组。见表 2、3。

2.4 未处理的 10~12 周龄未发病 NOD 雌鼠脾细胞 GM-CSF 刺激后上清液细胞因子水平 未处理的 10~12 周龄未发病 NOD 雌鼠脾细胞 GM-CSF DNA 疫苗刺激后上清液 IL-1 β 、IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的水

平较刺激前差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 未处理的 10~12 周龄未发病 NOD 雌鼠脾细胞 GM-CSF 刺激后上清液细胞因子水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

时间	n	IL-1 β	IFN- γ	IL-10	IL-4
刺激前	5	111.0 $\pm$ 21.7	426.6 $\pm$ 28.9	164.8 $\pm$ 32.8	164.2 $\pm$ 33.3
刺激后	5	80.6 $\pm$ 19.2 ^a	341.4 $\pm$ 53.8 ^a	260.8 $\pm$ 51.1 ^a	225.6 $\pm$ 34.9 ^a

^a: $P<0.05$,与对照组比较

3 讨 论

用人 GM-CSF DNA 疫苗免疫 NOD 雌鼠,发现 12 周龄时 GM 组胰岛炎积分较 PBS、PcDNA 组显著性降低;GM 组正常胰岛比例较 PBS、PcDNA 组高,胰岛周围炎及胰岛内炎比例则较 PBS、PcDNA 组降低。提示人 GM-CSF DNA 疫苗可减轻 NOD 雌鼠胰岛炎,一定程度预防和延缓 NOD 鼠糖尿病的发生。

T1DM 为 T 细胞介导破坏 β 细胞的一种自身免疫疾病。CD4⁺T 细胞在 T1DM 患者和 NOD 鼠 β 细胞破坏中扮演着重要角色^[7]。DC 是浸润胰岛的主要抗原递呈细胞(APC)。病理性 T 细胞俘获 APC 上的 β 细胞抗原[正常情况靶细胞不表达组织相容性复合物(MHC)Ⅱ类分子]。活化的 T 细胞识别 APC 上的 β 细胞抗原,并产生自我抗原反应^[8]。大量研究发现 DC 细胞是首先浸润胰岛的炎症细胞,提示 DC 细胞在人类 T1DM 和 NOD 鼠糖尿病的发生发展中起着至关重要的作用^[9]。DC 细胞通过 β 细胞抗原递呈而启动和促进自身免疫。GM-CSF DNA 疫苗减轻 NOD 鼠胰岛炎,减少 NOD 鼠糖尿病的发生说明 GM-CSF 能通过某种途径减轻病理性 T 细胞对胰岛的浸润破坏而保护 β 细胞,阻止 NOD 鼠发生糖尿病。

DC 细胞对维持自身抗原的外周耐受有着重要作用。正常条件下,未成熟和未活化的 DC 细胞可诱导 Treg 细胞活化^[10],通过与 DC 细胞的直接作用来维持人类和鼠正常的 Treg 细胞功能^[11];T1DM 患者和糖尿病动物模型中 DC 细胞和 Treg 细胞功能异常,异常 DC 细胞和 Treg 细胞促使 T1DM 的发生。已有报道显示,人类 T1DM 和 NOD 鼠 DC 细胞功能异常,T1DM 中 DC 细胞的正常功能减弱。NOD 鼠中 DC 细胞不能有效活化 Treg 细胞,其部分原因可能与成熟障碍有关,从而病理性 T 细胞致 β 细胞免疫破坏^[12]。因此,恢复 DC 细胞的免疫耐受和 Treg 细胞功能,抑制针对 β 细胞抗原的自身免疫反应,保护 β 细胞是治疗的途径。

近来研究显示,GM-CSF 在免疫介导的自身免疫模型中能调节 DC 细胞功能,诱导 T 细胞免疫耐受^[13]。其可能通过产生 Treg 细胞来诱导成熟-抵抗耐受的 CD8a-DC 细胞和抑制自身免疫反应。GM-CSF 处理早期胰岛炎 NOD 鼠,明显增加 DC 细胞和 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,而显著延缓糖尿病的发生,

其通过 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞分泌 IL-10 和 TGF1 β 发生保护作用^[14]。

血清及原代脾细胞培养上清液中 GM 组 IL-10 显著高于 PBS、PcDNA 组,而 IL-1 β 和 IFN- γ 低于 PBS、PcDNA 组;GM-CSF 刺激的脾细胞上清液中 IL-10 高于刺激前,IL-1 β 和 IFN- γ 低于刺激前。这说明 GM-CSF 能上调 NOD 鼠 IL-10,下调 IL-1 β 和 IFN- γ ,这些作用是通过脾细胞产生的。

GM-CSF 是 DC 细胞的生长因子,深刻影响 DC 细胞的扩增、成熟和不同亚群功能^[15]。GM-CSF 通过分泌 IL-10 的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞抑制实验性自身免疫甲状腺炎模型(EAT)和实验性自身免疫性肌炎模型(EAG)的进展^[16]。DC 细胞能产生低浓度前炎症细胞因子,不论细胞表面活性标志物水平,均可促使 T 细胞耐受^[17]。前炎症细胞因子通过抑制 Treg 细胞扩增和发展打破免疫耐受,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)下调 Treg 细胞的数量和功能^[18],IL-1 β 则直接增加效应 T 细胞破坏 NOD 鼠免疫耐受^[19]。GM-CSF 增加 IL-Ra 而影响 DC 的成熟,IL-Ra 是外周单核细胞产生的 IL-1 β 抑制剂,能活化 DC 细胞成熟的关键调节因子核因子- κ B(NF- κ B)^[20]。GM-CSF 通过下调细胞因子 IL-1 β 和 IL-12 水平阻止 NOD 鼠发生糖尿病,这些保护作用可能是通过诱导 DC 细胞耐受及增进 Treg 细胞功能实现^[14]。

实验显示人 GM-CSF DNA 疫苗可在小鼠体内较长时间表达。从实验结果推测,GM-CSF DNA 疫苗预防和延缓糖尿病及减轻胰岛炎的机制可能为:GM-CSF DNA 疫苗可在 NOD 鼠体内转录表达 GM-CSF,上调了 IL-10 和 IL-4 等 Th2 细胞因子水平,下调 IFN- γ 和 IL-1 β 等 Th1 细胞因子水平,减轻 NOD 鼠胰岛炎,预防和延缓 NOD 鼠发生糖尿病。GM-CSF DNA 疫苗调节 Th 细胞因子尚有多个环节不清楚,如 GM-CSF 是如何与 DC 细胞发生联系的? 之后是怎样诱导产生分泌 IL-10 的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞等? 这些均需要更深入的研究和探索,以期能揭示 T1DM 发病机制和寻找 T1DM 防治方法。

参考文献

[1] YANG J,WEN X,XU H,et al. Antigen-Specific T cell analysis reveals that active immune responses to β cell antigens are focused on a unique set of epitopes[J]. J Immunol,2017,199(1):91-96.

[2] COQUERELLE C,MOSER M. Are dendritic cells central to regulatory T cell function? [J]. Immunol Lett,2008, 119(1/2):12-16.

[3] DONG Y,ARIF A A,POON G F,et al. Generation and Identification of GM-CSF derived alveolar-like macrophages and dendritic cells from mouse bone marrow[J]. J Vis

- Exp, 2016, 25:112.
- [4] BHATTACHARYA P, THIRUPPATHI M, ELSHABRAWY H A, et al. GM-CSF: an immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity[J]. *Cytokine*, 2015, 75(2): 261-271.
 - [5] 罗建华, 周智广, 蒋铁建, 等. 人 GAD65 DNA 疫苗预防 NOD 鼠糖尿病的机制探讨[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(21): 1791-1795.
 - [6] 裴剑浩, 周智广, 罗建华, 等. 吡格列酮对 NOD 鼠糖尿病的预防作用及机制探讨[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(5): 411-415.
 - [7] PUGLIESE A. Autoreactive T cells in type 1 diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(8): 2881-2891.
 - [8] GOGESCH P, SCHÜLKE S, SCHEURER S, et al. Modular MLV-VLPs co-displaying ovalbumin peptides and GM-CSF effectively induce expansion of CD11b⁺ APC and antigen-specific T cell responses in vitro[J]. *Mol Immunol*, 2018, 101: 19-28.
 - [9] MBONGUE J C, NIEVES H, TORREZ T W, et al. The role of dendritic cell maturation in the induction of Insulin-Dependent diabetes mellitus[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 327.
 - [10] RAKER V K, DOMOGALLA M P, STEINBRINK K. Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 569.
 - [11] MAHNKE K, RING S, ENK A H. Antibody targeting of "Steady-State" dendritic cells induces tolerance mediated by regulatory T cells[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 63.
 - [12] BOUDALY S, MORIN J, BERTHIER R, et al. Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2002, 13(1): 29-37.
 - [13] GANGI E, VASU C, CHEATEM D, et al. IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis[J]. *J Immunol*, 2005, 174(11): 7006-7013.
 - [14] BHATTACHARYA P, THIRUPPATHI M, ELSHABRAWY H A, et al. GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity[J]. *Cytokine*, 2015, 75(2): 261-271.
 - [15] CURTI A, FOGLI M, RATTI M, et al. Stem cell factor and FLT3-ligand are strictly required to sustain the long-term expansion of primitive CD34⁺ DR-dendritic cell precursors[J]. *J Immunol*, 2001, 166(2): 848-854.
 - [16] VASU C, HOLTERMAN M J, PRABHAKAR B S. Modulation of dendritic cell function and cytokine production to prevent thyroid autoimmunity[J]. *Autoimmunity*, 2003, 36(6/7): 389-396.
 - [17] SATO K, UTO T, FUKAYA T, et al. Regulatory dendritic cells[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 410: 47-71.
 - [18] MORRIS G P, KONG Y C. Interference with CD4⁺CD25⁺ T-cell-mediated tolerance to experimental autoimmune thyroiditis by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor monoclonal antibody[J]. *J Autoimmun*, 2006, 26(1): 24-31.
 - [19] O'SULLIVAN B J, THOMAS H E, PAI S, et al. IL-1 beta breaks tolerance through expansion of CD25⁺ effector T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(12): 7278-7287.
 - [20] SUN S C, CHANG J H, JIN J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(6): 282-289.
- (收稿日期: 2019-12-28 修回日期: 2019-02-13)
-
- (上接第 1291 页)
- [11] WANG C, GAO D, GUO K, et al. Novel synergistic anti-tumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 166.
 - [12] CHEN B, XU X, LUO J, et al. Rapamycin enhances the anti-cancer effect of dasatinib by suppressing Src/PI3K/mTOR pathway in NSCLC cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e129663.
 - [13] 贾利刚, 田菲, 张媛. 雷帕霉素对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭转移的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(16): 2225-2228.
 - [14] SOMMARIVA S, TARRICONE R, LAZZERI M A, et al. Prognostic value of the cell cycle progression score in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur Urol*, 2016, 69(1): 107-115.
 - [15] CADONI G, BOCCIA S, PETRELLI L, et al. A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism[J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2012, 32(1): 1-11.
 - [16] XU C, WANG X, ZHU Y, et al. Rapamycin ameliorates cadmium-induced activation of MAPK pathway and neuronal apoptosis by preventing mitochondrial ROS inactivation of PP2A[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 105: 270-284.
 - [17] KO J H, YOON S O, LEE H J, et al. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NF kappa B pathways in autophagy- and p62-dependent manners[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40817-40831.
 - [18] TATEDA S, KANNO H, OZAWA H, et al. Rapamycin suppresses microglial activation and reduces the development of neuropathic pain after spinal cord injury[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(1): 93-103.
- (收稿日期: 2018-12-18 修回日期: 2019-01-25)