

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.10.004

1 型糖尿病小鼠模型中 MZB 和 FoB 细胞的检测 *

爻 洁^{1,2} 孙寒晓¹ 张 洁¹ 李 月¹ 盛慧明^{1,Δ}

(1 上海交通大学医学院附属同仁医院检验科 上海 200050; 2 上海交通大学医学院 上海 200025)

摘要 目的:探究脾脏边缘区 B 细胞(marginal zone B cell, MZB)和滤泡状 B 细胞(follicular B cell, FoB)在链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的 1 型糖尿病小鼠模型中的频率变化。方法:以 C57BL/6 小鼠为研究模型,腹腔注射 STZ 55 mg/kg,连续注射 5 天,建立 1 型糖尿病小鼠模型。选取随机血糖水平 ≥ 200 mg/dL(11.1 mmol/L)的小鼠视为造模成功。期间观察并记录小鼠摄食、饮水情况,监测小鼠体重、空腹血糖情况。造模第 4 周处死小鼠,随后测定小鼠的糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)、谷氨酸脱羧酶抗体(GAD65)、胰岛素自身抗体(IAA)水平。通过对各组小鼠胰腺进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色、免疫组化(immunohistochemistry, IHC)观察胰岛形态变化及胰岛素含量。通过流式细胞术,比较各组小鼠脾脏中 MZB 和 FoB 细胞的频数和表型。结果:与正常对照组小鼠比较,STZ 糖尿病模型组小鼠摄食量、饮水量明显增加,体重减轻,随机血糖显著升高,同时 HbA1c 水平明显增加($P<0.0001$),模型组小鼠血浆 GAD65 和 IAA 水平也明显升高。H&E、IHC 结果显示,与正常对照小鼠比较,STZ 糖尿病小鼠胰岛萎缩、呈不规则;胰岛素颗粒数减少。与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠脾脏 MZB 细胞频数增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠脾脏 FoB 细胞频数无统计学差异。结论:STZ 诱导的 1 型糖尿病小鼠脾脏中 MZB 细胞频数升高, FoB 细胞频数变化无统计学差异。这些 B 淋巴细胞亚群频率失衡可能与 1 型糖尿病的发生有关。

关键词:1 型糖尿病;链脲佐菌素;边缘区 B 细胞;滤泡状 B 细胞

中图分类号:R-33;R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)10-1815-05

Detection of B Cell Subsets in Type 1 Diabetic Mice*

SHU Jie^{1,2}, SUN Han-xiao¹, ZHANG Jie¹, LI Yue¹, SHENG Hui-ming^{1,Δ}

(1 Department of Clinical Laboratory, Shanghai Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200050, China; 2 School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To explore the frequency change of marginal zone B cell (MZB) and follicular B cell (FoB) in streptozocin-induced type 1 diabetes mouse model. **Methods:** C57BL/6 mice were used as the research model, and STZ 55mg/kg was intraperitoneally injected for 5 consecutive days to establish the type 1 diabetes model mouse model. Mice with random blood glucose level ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) were considered as successful model. During this time, diet and drinking water of the mice as well as the body weight and fasting blood glucose of the mice were monitored. Four weeks later from the last injection, mice were sacrificed and then Hemoglobin(HbA1c), glutamic acid decarboxylase(GAD65) antibody and insulin autoantibody (IAA) were measured. Hematoxylin-eosin (H&E) staining and immunohistochemistry (immunohistochemistry, IHC) showed the islet morphology change and insulin content. The changes in frequency and phenotype of MZB and FoB in spleen of each group were detected by flow cytometry. **Results:** Compared with the normal control group, mice of the STZ diabetes model group showed significantly increased food and water intake but body weight, at the same time fasting blood glucose and glucose HbA1c ($P<0.0001$) as well as plasma GAD65 and IAA levels in the model group were also significantly increased. H&E and IHC showed that the islets of STZ diabetic mice were atrophic and irregular compared with normal control mice, meanwhile the number of insulin particles decreased. Compared with the control group, the frequency of MZB cells in the spleen of the model group significantly increased ($P<0.05$), and there was no statistical difference in the frequency of FoB cells in the spleen of the model group. **Conclusions:** The frequency of MZB cells increased in spleen of type 1 diabetic mice induced by STZ, and there was no statistical difference in the frequency of FoB cells. The frequency imbalance of these B lymphocyte subsets may be related to the development of type 1 diabetes.

Key words: Type 1 diabetes; Streptozotocin; Marginal zone B cell; Follicular B cell

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)10-1815-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81672083, 81702071);上海市科委自然科学基金项目(15ZR1437900)

作者简介:爻洁(1994-),女,硕士研究生,主要研究方向:糖尿病与自身免疫, E-mail: shujie947729@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者:盛慧明(1973-),男,硕士生导师,主任技师,主要研究方向:自身免疫与免疫调节研究,

E-mail: shm2783@shtrhospital.com, 电话:021-52039999

(收稿日期:2019-10-28 接受日期:2019-11-23)

前言

1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)是一类由环境因素和遗传因素共同作用,严重危害人类健康的慢性代谢类疾病^[1]。因胰岛 β 细胞功能的破坏而引起持续性高血糖,若未及时治疗会对患者产生严重甚至致命的影响^[2]。近几年,T1DM 的发病率逐年递增,由于对其致病机理的相关研究成果尚不成熟,防治也不完善,因此对研究 T1DM 的发病机制建立相应的动物模型建立研究非常重要^[3]。自 1963 年首次报道^[4],STZ 是对于实验性糖尿病模型诱导试剂的通用选择,其对实验动物的胰岛 β 细胞具有高效、针对性的杀伤作用^[5]。多次低剂量的注射的方法可以使啮齿类动物的 β 细胞长期、大量损伤,其诱导的动物模型所表现出的结构学、功能学以及生物化学方面的病理改变与人 T1DM 非常相似^[6]。

T1DM 亦被称为自身免疫性糖尿病,提示机体早期出现的自身反应性 B 细胞克隆及其自身抗体谱,如抗 IAA、抗 GAD65 等^[7],进一步证明 T1DM 是自身免疫性疾病。B 淋巴细胞在糖尿病的发生、发展中起重要作用。B 细胞在脾脏发育,成熟 B 细胞分为 FoB 和 MZB^[8]。FoB 循环在血循环中并且存在于次级淋巴器官的淋巴结中。MZB 是一群类固有免疫细胞,主要存在于脾脏的边缘区,作为机体抵抗血源性病原体的第一道防线,在糖尿病病人外周血中能够与滤泡型 B 细胞、调节性 B 细胞等亚群被检测到^[9-10]。研究表明,MZB 细胞和 FoB 细胞作为重要的抗原呈递细胞,特别是作为抗原特异性抗原呈递细胞,可以有效激活 CD4⁺ T 细胞,促进其增殖^[10,11]。在自身免疫背景下 MZB 细胞首先在 BCR 信号和固有免疫信号协同下活化,随后递呈自身抗原并活化自身反应性 CD4⁺ T 细胞克隆而引起 T1DM^[12],但是具体机制目前尚不清楚。本研究采用多次腹腔注射 STZ 诱导 C57BL/6 小鼠 1 型糖尿病,同时检测脾脏中 MZB 和 FoB 细胞的频率,进一步探讨其在 T1DM 发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 STZ(Sigma 公司,美国),血糖仪、血糖试纸(Terumo 公司,日本),IAA 试剂盒、GAD65 试剂盒(MyBioSource 公司,美国),FITC 标记的 anti-mouse CD45 抗体、Alexa Fluor 700 标记的 anti-mouse CD3 抗体、APC 标记的 anti-mouse CD19 抗体、PerCP-Cy5.5 标记的 anti-mouse CD21 抗体、PE 标记的 anti-mouse CD23 抗体(eBioscience 公司,美国),FACS Fortessa 流式细胞仪(BD biosciences 公司,美国)。

1.1.2 实验对象 7 周龄 C57BL/6 雄性小鼠购自上海斯莱克公司,饲养于上海交通大学医学院无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级的动物房。室温控制在 20℃左右,相对湿度(55±10)%,照明/黑暗时间为 12 h/12 h,自由饮水。动物处理流程经上海交通大学医学院医学部伦理委员会认证。

1.2 方法

1.2.1 药品溶液配制 将 STZ 溶于 0.1 mol/L, pH 4.5、预冷的柠檬酸钠缓冲液中,并用 0.22 μ m 滤菌器过滤除菌。避光配制,现配现用。

1.2.2 动物分组 雄性 C57BL/6 实验小鼠共 12 只,经 1 周适

应性饲养后随机分为模型组 6 只和正常对照组 6 只,两组分笼饲养。

1.2.3 建立 STZ 糖尿病小鼠模型 前期通过小鼠尾静脉采血测量血糖水平,排除自发高血糖后,造模前 10 h 禁食,腹腔注射预冷且新鲜配制的 STZ 溶液(55 mg/kg)。并选取连续 2 周空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 的小鼠认定为 T1DM 小鼠,监测小鼠体重、血糖动态变化,连续 4 周^[13]。

1.2.4 小鼠 IAA、GAD65 检测 注射 STZ 4 周后摘除小鼠眼球取血 100 μ L,混入抗凝剂,静置 15 min 后离心收集血浆。按照 IAA 和 GAD65 的酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒中操作说明进行操作。

1.2.5 小鼠日常活动状态 观察并记录末次注射 STZ 后小鼠的摄食量、饮水量、尿量、活动情况、精神状态等;每周测定各组小鼠的体重及空腹血糖水平。

1.2.6 流式细胞仪检测膜表面分子的标记 无菌分离小鼠的脾脏后制备脾脏单细胞悬液,裂解其中红细胞,再用 PBS 缓冲液冲洗;加入要标记的流式抗体,4℃孵育 30 min;再用 PBS 缓冲液冲洗;最后用 PBS 缓冲液重悬细胞,经流式细胞仪 GalliosTM 检测分析;应用 FlowJo 7.6 软件分析数据。

1.2.7 小鼠胰腺组织 HE 染色及胰岛素的免疫组化检测 造模成功第 4 周处死各组小鼠,无菌打开小鼠腹腔取胰腺组织,4%中性甲醛溶液固定 24 h 以上,固定液中取出组织后放于脱水盒内酒精脱水。石蜡包埋后制作 4 μ m 厚度的病理切片,石蜡切片脱蜡水洗,常规 H&E 染色,苏木素染细胞核,伊红染细胞质,脱水封片后,光镜下观察。另一部分采用 DAB 显色剂进行胰岛素的免疫组化检测。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计学软件对本文所得实验数据进行处理和分析,采用 t 检验方法,* $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 和 **** $P < 0.0001$ 为有显著统计学意义差异。

2 结果

2.1 STZ 诱导的糖尿病小鼠日常活动状态较差

对各组小鼠的综合指标,包括摄食量、饮水量、尿量、活动情况、精神状态等进行观察后发现,正常对照组小鼠在摄食量、饮水量、尿量的表现正常;活动灵敏,精神状态佳。模型组小鼠表现为摄食量和饮水量均明显高于正常对照组,多食(图 1A)和多饮(图 1A)现象明显,且模型组小鼠笼盒中的垫料湿度比正常对照组大,可得出多尿症状显著,活动减弱,精神差。见图 1。

2.2 STZ 诱导的糖尿病小鼠体重减轻,随机血糖水平升高

体重数据显示(图 2A),模型组小鼠的体重随实验天数增加呈现负增长,正常对照组小鼠的体重增长正常。血糖数据显示(图 2B),与正常对照小鼠相比,模型组小鼠随机血糖水平显著升高,同时糖化血红蛋白 HbA1c 水平明显增加($P < 0.0001$, 图 2C)。据此现象,模型组小鼠的糖尿病"三多一少"症状表现典型。见图 1&2。

2.3 小鼠血浆中 GAD65、IAA 抗体水平升高

有研究表明机体自身抗体经潜在增强效应性 T 细胞的催化下,攻击并破坏胰岛 β 细胞发生自身免疫反应,导致 T1DM

的发生^[14]。胰岛素自身抗体(IAA),谷氨酸脱羧酶抗体(GADA),胰岛细胞抗体(ICA),锌转运体-8 抗体 (ZnT8A)蛋白以及酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2A)等是 T1DM 的自身抗体。小鼠血浆自身

抗体数据显示,造模后第 4 周,模型组小鼠血浆中 GAD65(图 3A)及 IAA(图 3B)抗体浓度明显高于对照组小鼠,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

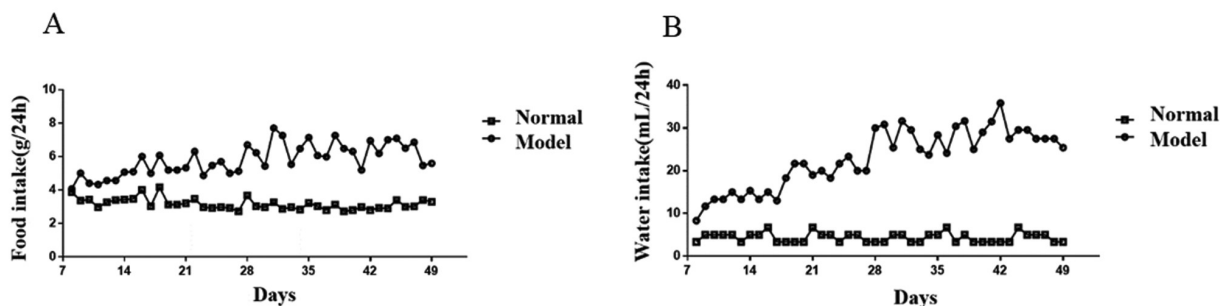


图 1 STZ 诱导 T1DM 样小鼠模型日摄食量、日饮水量随时间变化

Fig.1 The food intake and water intake of in T1DM mice induced by STZ changed with time

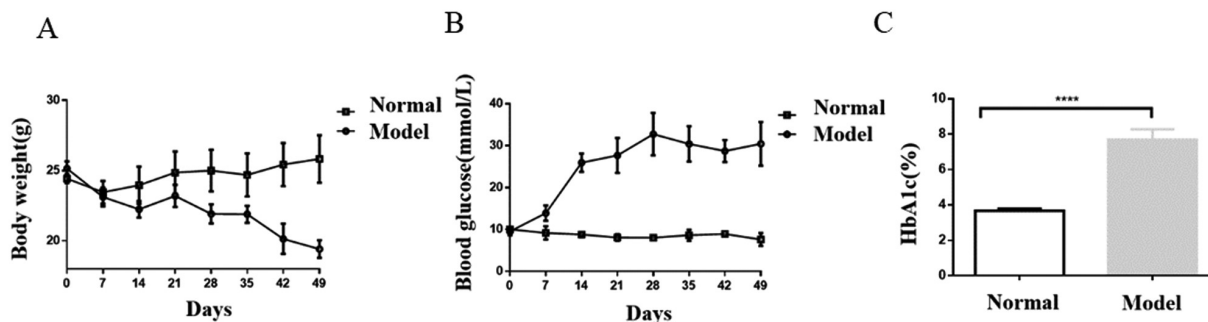


图 2 STZ 诱导 T1DM 样小鼠模型体重、空腹血糖、糖化血红蛋白变化

Fig.2 The changes in body weight, fasting blood glucose and HbA1c in T1DM mice induced by STZ changed with time

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=6$. Compared with the normal group, **** $P<0.0001$.

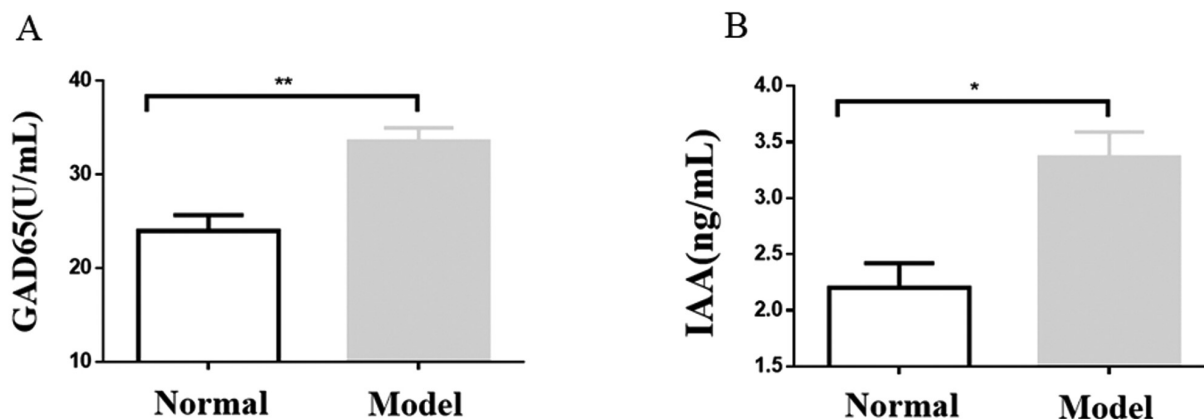


图 3 STZ 诱导 T1DM 样小鼠模型自身抗体变化

Fig.3 Changes of autoantibodies in T1DM mice induced by STZ

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=6$. Compared with the normal group, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

2.4 STZ 诱导的糖尿病小鼠胰岛被破坏

STZ 对胰岛细胞具有损伤作用,因此使用 H&E、IHC 染色观察小鼠胰岛及胰岛素颗粒情况。200 倍光镜下可见,正常对照组小鼠的内分泌腺即胰岛呈现圆形或类圆形状态,且形态规则、分布均匀。模型组小鼠内分泌腺体量明显萎缩,形态表现为不规则,稀疏分布且个数锐减(图 4A)。以胰岛素抗体标识胰岛 β 细胞进行 IHC 染色的结果表现为,胰岛素阳性产物为暗褐色深染,对照组小鼠胰岛素颗粒均匀分布,暗褐色染色数量正常;模型组小鼠的胰岛素分泌锐减,暗褐色深染比正常组数量减少(图 4B)。

2.5 STZ 诱导的糖尿病小鼠脾脏 MZB 细胞比例增加

最近的研究表明在 T1DM 可提呈胰岛自身抗原、且可能能够启动初始 CD4⁺T 细胞活化的是来源于脾脏 MZB 细胞和 FoB 细胞^[15]。对此我们采用流式细胞术对小鼠脾脏免疫细胞进行分析,在本研究中 MZB 表面标记分子为 CD21⁺CD23⁻, FoB 表面标记分子为 CD23⁺CD21⁻。结果显示,与对照组比较,模型组脾脏单细胞悬液中 MZB 细胞比例增加,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组脾脏单细胞悬液中 FoB 细胞比例无统计学差异(图 5)。

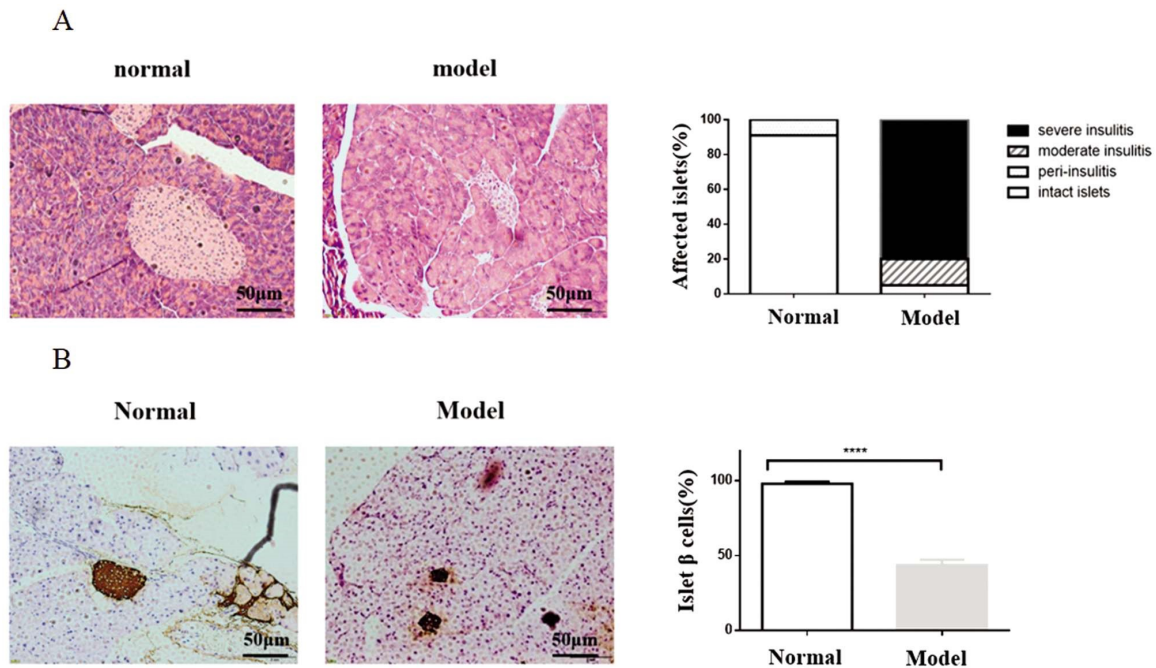


图4 STZ 诱导 T1DM 样小鼠模型病理变化

Fig.4 Pathological changes of T1DM mice model induced by STZ

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=6. Compared with the normal group, **** $P < 0.0001$.

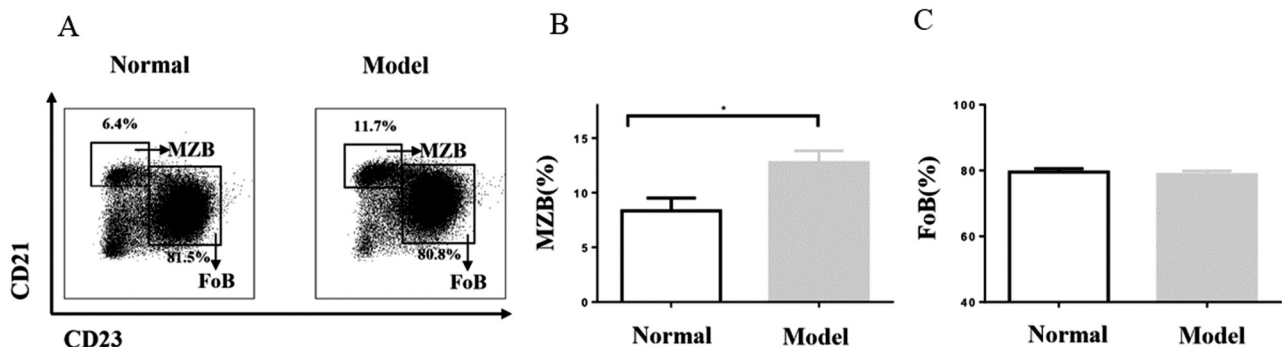


图5 流式细胞术对 STZ 诱导 T1DM 样小鼠模型脾脏 MZB、FoB 细胞的频率及表型分析

Fig.5 Frequency and phenotype analysis of splenic MZB and FoB cells in STZ-induced T1DM mice by flow cytometry

3 讨论

T1DM 属于自身免疫性疾病,其不能合成分泌胰岛素主要是由于胰岛 β 细胞产生自身抗体,如 ICA、IAA、GADA、ZnT8A 抗体等^[16,17],这些异常的自身抗体可能会协助自身免疫系统,进而选择性损伤胰岛 β 细胞,继而引发高血糖表现及 "三多一少" 等一系列临床症^[18]。多种实验动物糖尿病造模方法中,多次低剂量 STZ 注射诱导糖尿病的方法,能引发实验动物机体对胰岛的自身免疫应答,更接近于人类 T1DM 的发病过程^[19]。一分子 STZ 包含一个脱氧葡萄糖基团及一个甲基亚硝脒基团,前者可引导 STZ 进入胰岛 β 细胞,而后者是 STZ 的细胞毒性基团^[20]。STZ 借由葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2)大量蓄积于 β 细胞内对其造成损伤^[21,22]。实验动物因 β 细胞的广泛破坏与胰岛素分泌的绝对不足而产生 T1DM^[23],因此成为目前最为理想的糖尿病模型建立方法。

本研究发现,模型组小鼠表现为多食和多饮现象明显,笼盒中的垫料湿度比正常对照组大,可得出多尿症状显著;且活动减弱,精神差。综合小鼠的体重、血糖数据显示,模型组小鼠

较其余正常对照组体重明显下降,空腹血糖与 HbA1c 水平显著升高。模型组小鼠血浆中 GAD65 及 IAA 抗体浓度明显高于对照组,表明进展为自身免疫倾向的糖尿病,是诊断 T1DM 的重要指标。模型组小鼠的内分泌腺即胰岛呈现明显萎缩,形态不规则,分布稀疏且数量减少。免疫组化结果显示模型组小鼠胰岛中分泌的胰岛素颗粒明显减少。综上提示造模成功,模型组小鼠符合 T1DM 表现。

早期 B 细胞耐受性的破坏是小鼠和人类 T1DM 进展的关键^[24]。随着自身免疫性疾病研究的深入,MZB 和 FoB 细胞因且与糖尿病息息相关从而受到关注^[25]。MZB 细胞表面的 B 细胞受体(BCR)具有低亲和力和多克隆性特征^[26,27],所以对脂类和多糖类 T 细胞非依赖性抗原(TIAg)表位具有较低的活化阈值,迅速被活化并上调 MHC II 类分子和 CD80、CD86 等共刺激分子并迁移到滤泡区作为抗原递呈细胞对同源自身反应性 T 细胞提供激活信号参与了蛋白类 T 细胞依赖性抗原(TDAg)表位的激活,所以 MZB 细胞是机体早期活化的一群免疫效应细胞,表面特异膜分子为 sIgM、CD21,而低表达 CD23、CD11b,有别于其他 B 细胞亚群^[26-28]。且在多种自身免疫性疾病

如 T1DM, Sjogren 综合征 (Sjogren Syndrome, SS), 狼疮和自身甲状腺炎等中都发现 MZB 细胞分化存在缺陷^[9,10]。相关分析表明^[10], 与健康人群对比, T1DM 患者的 MZB 细胞频率增加, 胰岛功能减退, 提示 MZB 细胞可能发挥抗原提呈作用, 进一步导致胰岛萎缩、胰岛功能衰退, 提示 MZB 在 T1DM 中可能发挥负性致病作用。除人群数据外, 动物模型研究表明, 连接先天和适应性免疫反应的 MZB 细胞在糖尿病模型动物脾脏中增多^[29]。Marino 等^[29]报道的 T1DM 动物模型研究显示 MZB 细胞数目在 NOD 鼠中浸润胰腺淋巴结, 参与糖尿病的发生发展, MZB 细胞比 FoB 细胞更好的激活 CD4⁺T 细胞。糖尿病动物模型显示, MZB 可能是糖尿病发病机制中一个重要的 B 细胞亚群^[24-31]。本研究在 STZ 诱导 T1DM 小鼠模型中观察 MZB 和 FoB 细胞频率的变化, 发现小鼠脾脏 MZB 细胞比例升高, FoB 细胞比例无统计学差异。由此论证 MZB 细胞很有可能对 STZ 诱导实验性 T1DM 产生了明显的作用, 本文为今后探讨 MZB 细胞在 T1DM 发病机制中具体起何种作用奠定基础。

综上所述, 本研究初步探讨了脾脏 MZB 和 FoB 细胞在 STZ 诱导的 T1DM 小鼠模型中的表型及频率, 结果发现 STZ 诱导的 T1DM 小鼠脾脏 MZB 细胞频率明显增加, 但 FoB 细胞频率与正常组小鼠相比没有统计学差异。已有研究报道, MZB 细胞与 T1DM 等多种自身免疫性疾病相关, 为研究 T1DM 发病机制提供依据。这群变化的脾脏 MZB 细胞在 STZ 诱导的 T1DM 小鼠中究竟发挥了怎么的免疫调节功能, 如何参与了糖尿病的免疫机制, 具有广阔的研究前景, 也亟需后续实验来进一步讨论。

参考文献(References)

- [1] DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes[J]. Lancet, 2018, 391(10138): 2449-2462
- [2] Katsarou A, Gudbjornsdottir S, Rawshani A, et al. Type 1 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17016
- [3] King A, Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments [J]. Biochem Pharmacol, 2016, 99: 1-10
- [4] Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)[J]. Cancer Chemother Rep, 1963, 29: 91-98
- [5] Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta cell glucotoxicity[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2015, 8: 181-188
- [6] Zhang Y, Wang Y, Luo M, et al. Elabela protects against podocyte injury in mice with streptozotocin-induced diabetes by associating with the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Peptides, 2019, 114: 29-37
- [7] Triolo TM, Fouts A, Pyle L, et al. Identical and Nonidentical Twins: Risk and Factors Involved in Development of Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes[J]. Diabetes Care, 2019, 42(2): 192-199
- [8] Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"[J]. Immunol Rev, 2000, 175: 70-79
- [9] Thompson WS, Pekalski ML, Simons HZ, et al. Multi-parametric flow cytometric and genetic investigation of the peripheral B cell compartment in human type 1 diabetes [J]. Clin Exp Immunol, 2014, 177(3): 571-585
- [10] Deng C, Xiang Y, Tan T, et al. Altered Peripheral B-Lymphocyte Subsets in Type 1 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults[J]. Diabetes Care, 2016, 39(3): 434-440
- [11] Choi SC, Morel L. B cell contribution of the CD4⁺ T cell inflammatory phenotypes in systemic lupus erythematosus[J]. Autoimmunity, 2017, 50(1): 37-41
- [12] Belperron AA, Dailey CM, Booth CJ, et al. Marginal zone B-cell depletion impairs murine host defense against *Borrelia burgdorferi* infection[J]. Infect Immun, 2007, 75(7): 3354-3360
- [13] Zhu D, Zhang X, Niu Y, et al. Cichoric acid improved hyperglycaemia and restored muscle injury via activating antioxidant response in MLD-STZ-induced diabetic mice [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 107(Pt A): 138-149
- [14] Harbers SO, Crocker A, Catalano G, et al. Antibody-enhanced cross-presentation of self antigen breaks T cell tolerance[J]. J Clin Invest, 2007, 117(5): 1361-1369
- [15] Attanavanich K, Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells [J]. J Immunol, 2004, 172(2): 803-811
- [16] Siraj ES, Rogers DG, Gupta MK, et al. A simple screening method for individuals at risk of developing type 1 diabetes: measurement of islet cell autoantibodies (GADA, IA-2A, and IAA) on dried capillary blood spots collected on filter paper [J]. Horm Metab Res, 2012, 44(11): 855-860
- [17] Yi B, Huang G, Zhou Z. Different role of zinc transporter 8 between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus[J]. J Diabetes Investig, 2016, 7(4): 459-465
- [18] Nielens N, Polle O, Robert A, et al. Integration of Routine Parameters of Glycemic Variability in a Simple Screening Method for Partial Remission in Children with Type 1 Diabetes [J]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 5936360
- [19] Laviada-Castillo RE, Segura-Campos MR, Chan-Zapata I, et al. Immunosuppressive effects of protein derivatives from *Mucuna pruriens* on a streptozotocin-induced type 1 diabetes murine model [J]. J Food Biochem, 2019, 43(5): e12834
- [20] Chan DL, Singh S. Current Chemotherapy Use in Neuroendocrine Tumors[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2018, 47(3): 603-614
- [21] Bektur E, Sahin E, Baycu C. Mirtazapine may show anti-hyperglycemic effect by decreasing GLUT2 through leptin and galanin expressions in the liver of type 1 diabetic rats [J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(6): 676-682
- [22] Hinden L, Udi S, Drori A, et al. Modulation of Renal GLUT2 by the Cannabinoid-1 Receptor: Implications for the Treatment of Diabetic Nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(2): 434-448
- [23] El-Badawy RE, Ibrahim KA, Hassan NS, et al. *Pterocarpus santalinus* ameliorates streptozotocin-induced diabetes mellitus via anti-inflammatory pathways and enhancement of insulin function[J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(8): 932-939
- [24] Felton JL, Maseda D, Bonami RH, et al. Anti-Insulin B Cells Are Poised for Antigen Presentation in Type 1 Diabetes [J]. J Immunol, 2018, 201(3): 861-873

- 2019, 35(11): 995-998
- [12] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 43(5): 380-393
- [13] Liu Shi-wei, Duan Ruixue, Wu Ya-ru, et al. Effects of Vaspin on Insulin Resistance in Rats and Underlying Mechanisms [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13542
- [14] Liu Shi-wei, Li Xin, Wu Ya-ru, et al. Effects of vaspin on pancreatic beta cell secretion via PI3K/Akt and NF-kappa B signaling pathways [J]. PLo S One, 2017, 12(12): e0189722
- [15] Kameshima S, Sakamoto Y, Okada M, et al. Vaspin prevents elevation of blood pressure through inhibition of peripheral vascular remodelling in spontaneously hypertensive rats [J]. Acta Physiol (Oxf), 2016, 217(2): 120-129
- [16] Lin Ying, Zhuang Jian-hui, Li Hai-ling, et al. Vaspin attenuates the progression of atherosclerosis by inhibiting ER stress-induced macrophage apoptosis in apo E/ mice [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1509-1516
- [17] 肖平喜, 谭明娟, 万芳, 等. 血清缺血修饰白蛋白在冠心病患者中的临床应用价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(4): 374-377
- [18] Kameshima S, Yamada K, Morita T, et al. Visceral adipose tissue derived serine protease inhibitor augments acetylcholine induced relaxation via the inhibition of acetylcholine esterase activity in rat isolated mesenteric artery[J]. Acta Physiol(Oxf), 2016, 216(2): 203-210
- [19] Phalitakul S, Okada M, Hara Y, et al. Vaspin prevents TNF-alpha-induced intracellular adhesion molecule-1 via inhibiting reactive oxygen species-dependent NF-kappaB and PKCtheta activation in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. Acta Physiol, 2013, 209(3): 493-500
- [20] Zahradka P. Inhibition of NADPH oxidase by vaspin may prevent progression of atherosclerosis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2013, 209(3): 195-198
- [21] Jung CH, Lee WJ, Hwang JY, et al. Vaspin protects vascular endothelial cells against free fatty acid-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase /Akt pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 413(2): 264-269
- [22] 柯旋, 李宾公, 郝艳琴, 等. Vaspin 在糖尿病心肌病中的作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1403-1408
- [23] 彭春丽, 梁东辉, 黄曾艳, 等. 冠心病患者血瘀证积分联合超敏C反应蛋白对动脉粥样硬化斑块性质的初步评价 [J]. 广东医学, 2018, 11(1): 143-147
- [24] 贺中正, 王宏, 龙乾发, 等. 血清 Vaspin 与 2 型糖尿病合并颈动脉粥样硬化病变的关系[J]. 海南医学, 2017, 28(13): 2080-2082
- [25] Mao L, Geng GY, Han WJ, et al. Interleukin-6 (IL-6) -174G/C genomic polymorphism contribution to the risk of coronary artery disease in a Chinese population[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2)
- [26] Jabir NR, Firoz CK, Kamal MA, et al. Assessment of genetic diversity in IL-6 and RANTES promoters and their level in Saudi coronary artery disease patients[J]. J Clin Lab Anal, 2017, 31(5)
- [27] Sepehriz Z, Masoumi M, Ebrahimi N, et al. Atorvastatin, Losartan and Captopril Lead to Upregulation of TGF-beta, and Downregulation of IL-6 in Coronary Artery Disease and Hypertension [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168312
- [28] Tajfard M, Latiff LA, Rahimi HR, et al. Serum concentrations of MCP-1 and IL-6 in combination predict the presence of coronary artery disease and mortality in subjects undergoing coronary angiography[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 435(1-2): 37-45
- [29] 李燕屏, 江慧琳, 陈晓辉, 等. 急性心肌梗死与再灌注后血浆肿瘤坏死因子、白细胞介素-1的变化[J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(4): 233-235
- [30] 张福春, Josef N, Yu Jiang-tao. 心力衰竭时的炎症介质 [J]. 中国心血管杂志, 2001, 6(6): 511-517

(上接第 1819 页)

- [25] Case JB, Bonami RH, Nyhoff LE, et al. Bruton's Tyrosine Kinase Synergizes with Notch2 To Govern Marginal Zone B Cells in Nonobese Diabetic Mice[J]. J Immunol, 2015, 195(1): 61-70
- [26] Stolp J, Marino E, Batten M, et al. Intrinsic molecular factors cause aberrant expansion of the splenic marginal zone B cell population in nonobese diabetic mice[J]. J Immunol, 2013, 191(1): 97-109
- [27] Hwang IY, Boularan C, Harrison K, et al. Galphai Signaling Promotes Marginal Zone B Cell Development by Enabling Transitional B Cell ADAM10 Expression[J]. Front Immunol, 2018, 9: 687
- [28] Yu J, Zanotti S, Walia B, et al. The Hajdu Cheney Mutation Is a Determinant of B-Cell Allocation of the Splenic Marginal Zone[J]. Am J Pathol, 2018, 188(1): 149-159
- [29] Marino E, Batten M, Groom J, et al. Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells [J]. Diabetes, 2008, 57(2): 395-404
- [30] Grasseau A, Boudigou M, Le Pottier L, et al. Innate B Cells: the Archetype of Protective Immune Cells[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2019
- [31] Wilson CS, Elizer SK, Marshall AF, et al. Regulation of B lymphocyte responses to Toll-like receptor ligand binding during diabetes prevention in non-obese diabetic (NOD) mice[J]. J Diabetes, 2016, 8(1): 120-131