

人 ZnT-8 作为 1 型糖尿病新型免疫调节剂的研究

刘宝英¹, 姜友昭², 梁干雄¹, 陈 兵²

(1. 中山市人民医院内分泌科, 广东 528400; 2. 第三军医大学第一附属医院内分泌科, 重庆 400038)

【摘要】目的:构建人锌转运体 8(Zinc transporter 8, ZnT-8)羧基端原核表达载体, 表达和纯化人 ZnT-8 羧基端(ZnT-8-COOH)重组蛋白, 为寻找 1 型糖尿病新型免疫调节剂创造条件。**方法:**人 ZnT-8-COOH cDNA 克隆入 pET-32a 载体, 在大肠杆菌 BL21 中利用异丙基-硫代-β-D-半乳糖苷(isopropyl-thio-β-D-galactoside, IPTG)诱导表达, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 鉴定表达产物, 镍离子亲和层析纯化重组蛋白。40 只 4 周龄的雌性非肥胖型糖尿病(non obese diabetic, NOD)小鼠随机分为 ZnT-8 重组蛋白预处理组及生理盐水对照组, 分别腹腔注射 ZnT-8 重组蛋白和生理盐水, 每周测量各组 NOD 小鼠体重, 检测血糖、血清 C 肽水平。**结果:**经 PCR 扩增后得到 306 bp 的 DNA 片段, 成功构建到 pET-32a 表达载体上, 经测序分析序列正确; ZnT-8 重组蛋白在大肠杆菌 BL21 中获得成功表达, 并得以有效纯化。ZnT-8 重组蛋白预处理组 NOD 小鼠与生理盐水

对照组相比, 28 周龄时 ZnT-8 重组蛋白预处理组的体重高于生理盐水对照组($P<0.05$)。28 周龄时 ZnT-8 重组蛋白预处理组的血糖低于生理盐水对照组($P<0.05$); 28 周龄时 ZnT-8 重组蛋白预处理组的血清 C 肽水平高于生理盐水对照组($P<0.05$)。**结论:**成功制备人 ZnT-8-COOH 重组蛋白, 并初步证实了其对 1 型糖尿病的免疫调节作用。

作者介绍:刘宝英, Email: lby0809@aliyun.com,

研究方向: 1 型糖尿病发病机制。

通信作者:陈 兵, Email: chenbing3@medmail.com.cn。

基金项目:重庆市 2014 年度科技计划资助项目(编号: cstc2014yyk-fa110004)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150711.1738.003.html>
(2015-07-11)

参 考 文 献

- [1] Kahler P, Grevstad B, Almdal T, et al. Targeting intensive versus conventional glycaemic control for type 1 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomised clinical trials[J]. *BMJ Open*, 2014, 4(8): e004806.
- [2] Li M, Ikehara S. Stem cell treatment for type 1 diabetes[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2014(2): 9.
- [3] Lin PY, Hung SH, Yang YC, et al. A synthetic peptide -acrylate surface for production of insulin-producing cells from human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(4): 372-379.
- [4] Zhu FF, Zhang PB, Zhang DH, et al. Generation of pancreatic insulin-producing cells from rhesus monkey induced pluripotent stem cells[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(9): 2325-2336.
- [5] Jaramillo M, Banerjee I. Endothelial cell co-culture mediates maturation of human embryonic stem cell to pancreatic insulin producing cells in a directed differentiation approach[J]. *J Vis Exp*, 2012(61): 3759.
- [6] Mao GH, Chen GA, Bai HY, et al. The reversal of hyperglycaemia in diabetic mice using PLGA scaffolds seeded with islet-like cells derived from human embryonic stem cells[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(9): 1706-1714.
- [7] Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, et al. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells[J].

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(25): 16105-16110.

- [8] 彭红梅, 陈贵安. 单细胞克隆胚胎干细胞系的建立及其生物学特性的鉴定[J]. *中华妇产科杂志*, 2005, 40(8): 521-524.

- [9] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets[J]. *Science*, 2001, 292(5520): 1389-1394.

- [10] D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(11): 1392-1401.

- [11] Wen PY, Lee EQ, Reardon DA, et al. Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma[J]. *Neuro Oncology*, 2012, 14(7): 819-829.

- [12] Nauck MA. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications[J]. *Am J Med*, 2011, 124(s1): 3-18.

- [13] Aoki K, Miyazaki T, Nagakura J, et al. Effects of pre-meal versus post-meal administration of miglitol on plasma glucagon-like peptide-1 and glucosedependent insulinotropic polypeptide levels in healthy men[J]. *Endocr J*, 2010, 57(8): 673-677.

- [14] Park S, Hong SM, Sung SR. Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats[J]. *Life Sciences*, 2008, 82(9-10): 503-511.

(责任编辑: 唐秋姗)

【关键词】锌转运体 8;原核表达;蛋白纯化;免疫调节剂

【中图分类号】R589.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-04-10

Study of human ZnT-8 as novel immunomodulator for type 1 diabetes mellitus

Liu Baoying¹, Jiang Youzhao², Liang Ganxiong¹, Chen Bing²

(1. Department of Endocrinology, Zhongshan People's Hospital; 2. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of the Third Military Medical University)

【Abstract】**Objective:** To lay a foundation for screening novel immunomodulator for type 1 diabetes mellitus by generating human Zinc transporter 8 (of ZnT-8, a novel type 1 diabetes autoantigen) recombinant protein using a prokaryotic expression system. **Methods:** The COOH-terminal cDNA of the human ZnT-8 gene was subcloned into the pET-32a vector and transformed into competent *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 cells. After transformation *E. coli* was induced using isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; human recombinant of ZnT-8 protein was extracted, purified by Nickel sepharose affinity chromatography, and was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot. Forty female non obese diabetic (NOD) mice of four weeks old were divided into 2 groups in random. In ZnT-8 recombinant protein group, mice were given recombinant protein of ZnT-8; in control group, mice were given saline. The body mass, blood glucose levels and serum C-peptide levels were recorded every week. **Results:** The cDNA of the carboxyl terminal of ZnT-8 (306 bp) was successfully amplified by PCR. The sequence matched completely with the sequence of ZnT-8-COOH in GeneBank. The recombinant ZnT-8-COOH was successfully expressed in a soluble form in *E. coli* BL21 and purified. Compared with those of control group, the body mass in ZnT-8 recombinant protein group was higher at 28 weeks old ($P < 0.05$); the glucose levels in ZnT-8 recombinant protein group were lower at 28 weeks old ($P < 0.05$); the serum C-peptide levels in ZnT-8-COOH group were higher at 28 weeks old ($P < 0.05$). **Conclusion:** Human recombinant of ZnT-8-COOH protein is successfully prepared. The recombinant protein can be used as immunomodulator in type 1 diabetes mellitus.

【Key words】Zinc transporter 8; prokaryotic expression; protein purification; immunomodulator

1型糖尿病是一种以胰岛 β 细胞进行性损害为特征的自身免疫性疾病。由于从早期胰岛炎症发展到出现显性糖尿病可长达数年,使得 1 型糖尿病的早期干预和治疗成为可能。一些随机、临床对照试验研究表明免疫调节剂在预防和延缓人类 1 型糖尿病中的作用明显。锌转运体 8 (Zinc transporter 8, ZnT-8) 是锌转运蛋白家族成员之一,由 SLC30A8 编码,包括 6 个跨膜区和 1 个存在于第 5、第 6 跨膜区之间的富含组氨酸的样组成,并且有较长的羧基末端^[1]。ZnT-8 主要表达于胰岛 β 细胞,已被证实是 1 型糖尿病新型自身抗原^[2]。我国学者已建立了锌转运体 8 抗体 (ZnT-8A) 的检测方法^[3]。ZnT-8A 对 1 型糖尿病的预测、鉴别诊断、治疗监控有着重要的临床意义^[4-5]。有研究示 IL-1、INF- γ 等细胞因子可以下调胰岛 β 细胞中 ZnT-8 的表达^[6]。ZnT-8 的表达减少导致胰岛 β 细胞功能的衰竭^[7]。ZnT-8 抗原的暴露可以加剧机体的免疫反应。理论上 ZnT-8 可以作为 1 型糖尿病的免疫调节剂。本研究利用大肠杆

菌系统原核表达 ZnT-8 重组蛋白,并得到纯化的重组蛋白。4 周龄的雌性非肥胖型糖尿病 (non obese diabetic, NOD) 小鼠腹腔注射 ZnT-8 重组蛋白,观察不同时间点 NOD 小鼠体质量、血糖、血清 C 肽水平,了解 ZnT-8 重组蛋白对 NOD 小鼠糖尿病发生发展的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

pET-32a 载体、大肠杆菌 BL21 菌种为本室保存;PCR 引物由上海生工公司合成;Ex Taq 酶购自大连宝生物工程有限公司;PCR 产物纯化试剂盒为 Omega 公司产品;限制性核酸内切酶购自大连宝生物工程有限公司;小鼠抗人 His 抗体和镍离子亲和层析系统购自德国 Qiagen 公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉公司;发光试剂购自北京中山生物技术有限公司;硝酸纤维素膜 (NC 膜) 购自 Roche 公司;人 pZnT-8 质粒为法国 Mellitech 研究所 Chimienti 教授惠赠。NOD 小鼠购自南京大学模式动物研

究所。

1.2 方法

1.2.1 pET-32a-ZnT-8-COOH 重组质粒的构建 以 PCR 自 pZnT-8 质粒中扩增 ZnT-8-COOH cDNA 片段^[1], 两端分别加上 *Bam* H I 和 *Not* I 酶切位点。ZnT-8-COOH 5' 引物: 5'-CGGGATCCAAGGACTTCTCCATCTTACTCATGGA-3'; 3' 引物: 5'-GAATGCGGCCCGCCTAGTCACAGGGGTCTTCACAGA-AA-3'。1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 回收 ZnT-8-COOH 目的片段及经 *Bam* H I 和 *Not* I 双酶切的 pET-32a 线性载体。回收产物在 T4 DNA 连接酶的作用下连接 4 ℃ 连接过夜, 连接产物转化感受态 *E. coli* BL21 菌株 (CaCl₂ 法制备), 涂布于含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 培养基培养皿中, 于 37 ℃ 培养过夜。挑取单菌落抽提质粒, 用 *Bam* H I 和 *Not* I 双酶切鉴定。鉴定阳性质粒测序证实。

1.2.2 人 ZnT-8-COOH 重组蛋白的诱导表达 将经鉴定正确含 pET-32a-ZnT-8-COOH 原核表达载体的 BL21 菌接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基内, 转化 pET-32a 的细菌为对照。培养至 A_{600nm}=0.6, 加 IPTG 使其终浓度达到 1.0 mmol/L, 在 37 ℃ 诱导培养分别诱导 1、2、3、4 h。将诱导菌液置于冰上 5 min, 10 000 g 离心 30 s, 收集沉淀, 以 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-氯 (trihydroxymethylaminomethane-cl, Tris-CL) (pH6.8) 悬浮, 再加入等体积 2×SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min 后离心取上清。样品以 12% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色观察。

1.2.3 Western blot 鉴定重组 ZnT-8-COOH 蛋白 人 ZnT-8-COOH 蛋白行 SDS-PAGE 电泳后转移至 NC 膜, 然后经 3% 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜, 次日与抗-His 单抗 (1:1 000 稀释) 孵育 1 h, 洗涤后加 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:500 稀释) 孵育 1 h, 每步完成后均需严格洗膜, 最后加发光试剂结合 5 min 后曝光照相。

1.2.4 人 ZnT-8-COOH 重组蛋白的大量制备 用 2 L 的 LB 培养基于 37 ℃ 培养, 在菌液浓度 A_{600nm}=0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 37 ℃ 继续培养 4 h 收获菌体。将菌体反复冻融 3 次后, 以 0.1 mol/L 的 Tris-CL 缓冲 (pH7.6) 重悬菌体, 超声破碎菌体, 离心。分别收集沉淀和上清。SDS-PAGE 胶分析, 发现融合蛋白在沉淀中。沉淀重悬于含 6 mol/L 尿素的 Tris-CL 缓冲液中, 镍柱亲和层析纯化重组蛋白, 蛋白分析试剂盒测定纯化蛋白浓度, SDS-PAGE 分析蛋白纯度。

1.2.5 人 ZnT-8-COOH 重组蛋白免疫 NOD 小鼠动物的分组与处理 选取体质量 10~15g 的 4 周龄雌性 NOD 小鼠 40 只经随机编号后进入各组: ① ZnT-8 重组蛋白预处理组 (n=20); 4 周龄起予浓度为 2.52 mg/L 的 ZnT-8 重组蛋白, 100 μg/10 g 腹腔注射, 连续 5 d。② 生理盐水对照组 (n=20); 4 周龄起予同等剂量 (100 μg/10g) 的生理盐水, 连续 5 d。分别于 4、12、28 周龄比较 2 组小鼠的体质量、血糖变化及血清 C 肽变化。观察指标测定: ① 血糖, 取尾静脉血, 以血糖 ≥ 13.3 mmol/L 且持续一周以上诊断为糖尿病, 统计发病率。② 血清 C 肽: 取血清 100 μL, 参照试剂盒说明书由放免法测定。

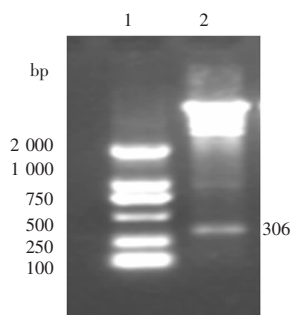
1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同时间点比较采用重复测量方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-32a-ZnT-8-COOH 的构建

pET-32a-ZnT-8-COOH 经 *Bam* H I + *Not* I 双酶切后可见大小约 306 bp 的目的片段, 表明原核表达载体构建成功 (图 1)。



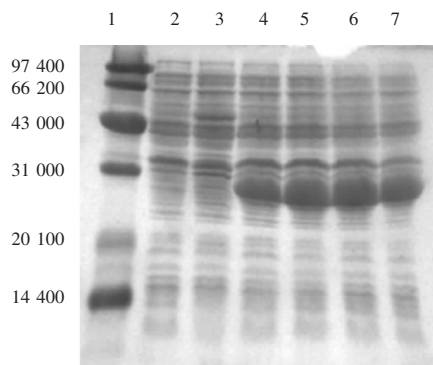
1. DL 2000 Marker; 2. pET-32a-ZnT-8-COOH 经 *Bam* H I + *Not* I 双酶切

图 1 pET-32a-ZnT-8-COOH 经 *Bam* H I + *Not* I 酶切

Fig.1 Recombinant plasmid pET-32a-ZnT-8-COOH digested with *Bam* H I and *Not* I

2.2 SDS-PAGE 分析 ZnT-8-COOH 的表达

将重组原核表达质粒 pET-32a-ZnT-8-COOH 转化至大肠杆菌 BL21 后, 经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析, 显示所表达的目的蛋白相对分子质量约为 30 000 (图 2), 和预计的相对分子质量大小相符, 在诱导 4 h 后蛋白表达量达最高。



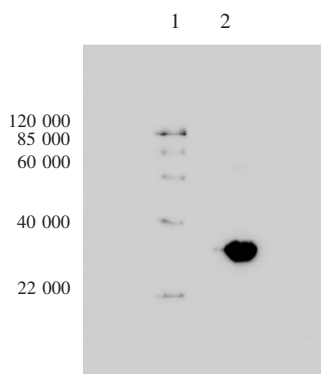
1. 低分子量蛋白标准; 2. pET-32aa 经 IPTG 诱导 4 h; 3. pET-32a-ZnT-8-COOH 诱导前; 4~7. pET-32a-ZnT-8-COOH 分别经 IPTG 诱导 1、2、3、4 h 后

图 2 SDS-PAGE 分析 ZnT-8-COOH 的表达

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed ZnT-8-COOH

2.3 Western blot 鉴定重组 ZnT-8-COOH 蛋白

纯化后的 ZnT-8-COOH 蛋白在分子量约 30 000 处出现了目的条带(图3)。



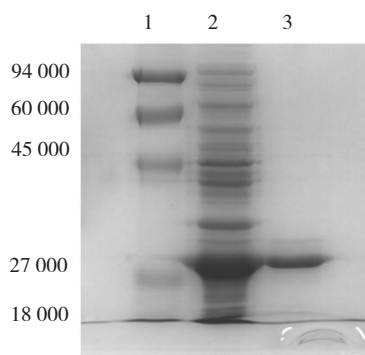
1. 低分子量蛋白标准;2. 纯化后的 ZnT-8-COOH 蛋白

图3 Western blot 鉴定 ZnT-8-COOH

Fig.3 Western blot analysis of ZnT-8-COOH

2.4 镍离子亲和层析纯化人 ZnT-8-COOH 蛋白

重组蛋白经镍离子亲和层析纯化及分步透析后进行 SDS-PAGE,结果仅在分子量约 30 000 处见单一条带(图4)。



1. 低分子量蛋白标准;2. 纯化前;3. 经镍离子亲和层析后纯化后的 ZnT-8-COOH 蛋白

图4 SDS-PAGE 分析纯化的 ZnT-8-COOH

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified ZnT-8-COOH

2.5 2 组小鼠体重变化

2 组小鼠不同时间点体重比较有统计学差异($P<0.05$)。28 周龄时 2 组小鼠体重相比 ZnT8 重组蛋白预处理组明显高于生理盐水对照组,有统计学差异($P<0.05$),见表 1。

表 1 2 组小鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s$, g)

Tab.1 Comparison of body mass between two groups ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	4周龄	12周龄	28周龄
ZnT8重组蛋白预处理组	13.29 ± 0.78	15.17 ± 0.67	22.32 ± 0.70 ^a
生理盐水对照组	13.26 ± 0.79	14.51 ± 0.73	10.21 ± 0.69
组间	$F=314.682$	$P=0.000$	
不同时间点	$F=741.653$	$P=0.000$	
组间 × 不同时间点	$F=987.317$	$P=0.000$	

注:a, 与生理盐水对照组比较, $t=12.836$, $P=0.000$

2.6 2 组小鼠血糖变化

2 组小鼠不同时间点血糖比较有统计学差异($P<0.05$)。28 周龄时 2 组小鼠血糖相比 ZnT8 重组蛋白预处理组明显低于生理盐水对照组,有统计学差异($P<0.05$),见表 2。ZnT-8 重组蛋白预处理组有 3 只发生糖尿病,发病率 15%(3/20)。对照组有 18 只发生糖尿病,发病率 90%(18/20)。ZnT-8 重组蛋白处理可降低 NOD 小鼠的发病率。

表 2 2 组小鼠血糖变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab.2 Comparison of glucose between two groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	4周龄	12周龄	28周龄
ZnT8重组蛋白预处理组	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.5	5.1 ± 0.9 ^a
生理盐水对照组	3.5 ± 0.4	3.9 ± 0.6	14.3 ± 11.0
组间	$F=43.378$	$P=0.000$	
不同时间点	$F=84.803$	$P=0.000$	
组间 × 不同时间点	$F=49.948$	$P=0.000$	

注:a, 与生理盐水对照组比较, $t=8.492$, $P=0.000$

2.7 2 组小鼠血清 C 肽变化

2 组小鼠不同时间点血清 C 肽比较有统计学差异($P<0.05$)。28 周龄时 2 组小鼠血清 C 肽相比 ZnT8 重组蛋白预处理组明显高于生理盐水对照组,有统计学差异($P<0.05$),见表 3。

表 3 2 组小鼠血清 C 肽变化 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

Tab.3 Comparison of serum C-peptide between two groups ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	4周龄	12周龄	28周龄
ZnT8重组蛋白预处理组	2.55 ± 0.40	2.60 ± 0.52	1.66 ± 0.44 ^a
生理盐水对照组	2.61 ± 0.40	2.54 ± 0.53	0.72 ± 0.18
组间	$F=17.051$	$P=0.000$	
不同时间点	$F=135.967$	$P=0.000$	
组间 × 不同时间点	$F=15.713$	$P=0.000$	

注:a, 与生理盐水对照组比较 $t=7.803$, $P=0.000$

3 讨 论

1 型糖尿病是一种复杂的多致病因素性疾病,以胰岛 β 细胞功能的衰竭为特点,而导致 β 细胞损害的最主要机制很可能是免疫介导的炎症损伤。多数 1 型糖尿病患者出现胰岛素缺乏的临床症状之前的几年中,已经出现了潜在的免疫异常。由于 1 型糖尿病患者 β 细胞的损伤是一个渐进的过程,理论上强效的免疫抑制剂或免疫调节剂可能会减缓 β 细胞的破坏进程。

有研究表明使用人类抗 CD3 单克隆抗体能改善新诊断的 1 型糖尿病病人胰岛素的分泌^[8]。作为 1 型糖尿病的自身抗原之一的谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 其介导的细胞特异的免疫反应在 1 型糖尿病发病过程中起一定作用。研究证实 GAD65 (GAD 的亚型) 可以作为免疫调节剂用于 1 型糖尿病的治疗, 在成人迟发自身免疫性糖尿病病人中 GAD65 给药可以提高 C 肽水平^[9]。此外 GAD65 作为疫苗目前已进入 2 期临床实验阶段^[10]。

研究表明早期注射外源性自身抗原可诱导 NOD 小鼠外周淋巴细胞发生免疫耐受, 自身反应性淋巴细胞产生减少, 可减低胰岛炎, 及减轻胰岛 β 细胞的破坏。ZnT-8 作为 1 型糖尿病的新的自身抗原, 特异表达于胰腺组织, 且主要位于胰岛 β 细胞, 也有作为 1 型糖尿病免疫调节剂的前景。有研究证实当 NOD 小鼠受到免疫攻击时 ZnT-8 反应性的 T 细胞会参与到 NOD 小鼠糖尿病的发生过程中来^[11]。ZnT-8 为 6 次跨膜蛋白, 有一短的氨基端和一较长的羧基端。已有研究证实其氨基端的抗原性很弱, 而羧基端至少存在 2 个以上的抗原表位^[12-13], 因此我们选择 ZnT-8 羧基端 268-369 位氨基酸制备其重组蛋白。

本研究中采用基因重组技术, 成功建立了在大肠杆菌中诱导性表达和镍离子亲和层析纯化人 ZnT-8-COOH 蛋白的实验方法, 获得了高纯度的重组人 ZnT-8-COOH 蛋白。本研究证实 ZnT-8 重组蛋白预处理组 NOD 小鼠与生理盐水对照组相比, 28 周龄时 NOD 小鼠的体质量高于生理盐水对照组, 血糖水平低于生理盐水对照组, 血清 C 肽水平高于生理盐水对照组。ZnT-8 重组蛋白腹腔注射可降低 NOD 小鼠 1 型糖尿病发病率。其机理可能为 ZnT-8 蛋白在疾病前期诱导免疫耐受, 并在未来预防部分 1 型糖尿病的发生。本研究为揭示 1 型糖尿病的发病机制及探索 1 型糖尿病新的免疫调节剂创造了条件。不足之处是本研究只观察了体质量、血糖、血清 C 肽水平, 后续的研究将从组织病理、细胞因子水平、淋巴细胞亚群分类等方面继续进行。

参 考 文 献

- [1] Chimienti F, Devergnas S, Favier A, et al. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules[J]. Diabetes, 2004, 53(9): 2330-2337.
- [2] Han S, Donelan W, Wang H, et al. Novel autoantigens in type 1 diabetes[J]. Am J Transl Res, 2013, 5(4): 379-392.
- [3] 黄干, 罗说明, 杨琳, 等. 锌转运体 8 自身抗体的放射配体检测法[J]. 中国糖尿病杂志, 2009(9): 658-661.
- [4] Debora BA, Hanna S, Bianca B, et al. Zinc transporter 8 autoantibodies in patients with type 1 diabetes from a multiethnic population and their first degree relatives[J]. Arq Bras Endocrinol Metab, 2014, 58(7): 737-743.
- [5] 冯晓燕, 宋晓国, 王国华. 人 ZnT8 抗原在 1 型糖尿病诊断中的初步应用[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(1): 102-106.
- [6] Egefjord L, Jensen JL, Bang-Berthelsen CH, et al. Zinc transporter gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines; a potential role for zinc transporters in b-cell apoptosis?[J]. BMC Endocr Disord, 2009, 25(9): 7.
- [7] El Muayed M, Billings LK, Raja MR, et al. Acute cytokine-mediated downregulation of the zinc transporter ZnT8 alters pancreatic β -cell function[J]. Endocrinol, 2010, 206(2): 159-169.
- [8] Skyler JS. The compelling case for anti-CD3 in type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2013, 62(11): 3656-3657.
- [9] Agardh CD, Cilio CM, Lethagen A, et al. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes[J]. J Diabetes Complications, 2005, 19(4): 238-246.
- [10] Agardh CD, Lynch KF, Palmer M, et al. GAD65 vaccination; 5 years of follow-up in a randomised dose-escalating study in adult-onset autoimmune diabetes[J]. Diabetologia, 2009, 52(7): 1363-1368.
- [11] Nayak D, Calderon B, Vomund A, et al. ZnT8-reactive T cells are weakly pathogenic in NOD mice but can participate in diabetes under inflammatory conditions[J]. Diabetes, 2014, 63(10): 3438-3448.
- [12] Wenzlau JM, Moua O, Sarkar SA, et al. Slc30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008(1150): 256-259.
- [13] Wenzlau JM, Moua O, Liu Y, et al. Identification of a major humoral epitope in Slc30A8 (ZnT8)[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008(1150): 252-255.

(责任编辑: 唐秋姗)