T1DM患者外周血记忆性T细胞表面PD-1表达水平与其疾病发生发展的初步研究

周小斌[1],费小蔷[2],叶　军[3],郭鹏飞[4],周成林[1*]

[1]泰州市人民医院检验科,[2]内分泌科,[3]中心实验室,江苏　泰州　225300;[4]上海市第十人民医院检验科,上海　200070

[摘　要]　**目的**:通过检测1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus,T1DM)、2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)患者以及健康对照外周血T细胞亚群免疫负调控分子程序性死亡蛋白1(programmed cell death protein 1,PD-1)mRNA相对表达水平和记忆性T细胞(memory T cells,Tm)表面PD-1表达情况,从分子生物学、细胞免疫学等多种角度研究记忆性T细胞PD-1表达异常与以胰岛β细胞破坏为主要机制的T1DM发生发展的相关性。**方法**:分离T1DM、T2DM患者以及健康对照组外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs);从PBMCs中分离出$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞,使用荧光定量PCR分别检测其细胞内PD-1 mRNA相对表达水平;将PBMCs分别标记荧光抗体CD4-FITC、CD45RO-PE、CCR7-APC、CD8-FITC、PD-1-PerCp,应用流式细胞术分别检测$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞、$CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞、$CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞、$CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞表面免疫负调控分子PD-1的表达水平。**结果**:①T1DM组患者外周血中$CD4^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平低于T2DM组和正常对照组,差异有统计学意义;②T1DM组患者外周血中$CD8^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平未见明显异常;③T1DM组患者外周血中$CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群与$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群PD-1表达水平均显著低于正常对照组和T2DM组患者,差异有统计学意义;④T1DM组患者外周血中$CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群与$CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群PD-1表达水平均无明显异常。**结论**:胰岛β细胞可通过细胞表面PD-L1与$CD4^+$Tm细胞表面PD-1结合从而负调节后者细胞免疫作用,因此当$CD4^+$Tm细胞PD-1表达异常而失去负调控作用时,细胞效应则会进一步增强,最终可能通过破坏胰岛β细胞而导致T1DM的发生发展。

[关键词]　1型糖尿病;2型糖尿病;PD-1;记忆性T细胞

[中图分类号]　R587.1　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2018)04-476-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180410

Preliminary research on the expression levels of PD-1 on memory T cells in the peripheral blood from T1DM patients with the development and progression of disease

Zhou Xiaobin[1], Fei Xiaoqiang[2], Ye Jun[3], Guo Pengfei[4], Zhou Chenglin[1*]

[1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Endocrinology, [3]Department of Central Laboratory, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300; [4]Department of Clinical Laboratory, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200070, China

[**Abstract**]　**Objective**: Through the detection of the relative abundance of immune negative control molecules programmed cell death protein 1(PD-1) mRNA in T-cell subsets and the PD-1 expression on memory T cells from peripheral blood in type 1 diabetes mellitus (T1DM) patients, type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients and healthy control separately, to further study the relationship of abnormal expression of PD-1 on memory T cells with the development and progression of T1DM which is characterized by pancreatic β-cell destruction. **Methods**: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from health control, T1DM patients, and T2DM patients separately; PBMCs were further sorted into $CD4^+$T cells and $CD8^+$T cells, then the relative abundance of PD-1 mRNA was analyzed by fluorescence quantitative PCR; PBMCs were marked by fluorescent antibody CD4-FITC, CD45RO-PE, CCR7-APC, CD8-FITC and PD-1-PerCp separately, then analyzed the expression of PD-1 on $CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm cells, $CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem cells, $CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm cells and $CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem cells by flow cytometry (FCM). **Results**: ① The relative

[基金项目]　泰州市人民医院院级课题(ZL201614)

*通信作者(Corresponding auther),E-mail:jszhoucl@126.com

abundance of PD-1 mRNA in $CD4^+$T cells from the peripheral blood of the T1DM group was significantly lower than that of the T2DM group and the healthy control group; ②There was no abnormality for the relative abundance of PD-1 mRNA in $CD8^+$T cells from the peripheral blood of the T1DM group, compared with the T2DM and healthy control groups; ③The expression levels of PD-1 on $CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem cells and $CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm cells in the peripheral blood from T1DM patients were significantly lower than those of the healthy control and T2DM group; ④There was no significant difference for the expression of PD-1 on $CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem cells and $CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm cells between the T1DM group, the T2DM group and the healthy control group. **Conclusion**: For PD-L1 which is expressed on islet β cells can combine with PD-1 on CD4+Tm cells to negatively regulate cell immunity, so when the expression of PD-1 on CD4+Tm cells is abnormal, cell effect will be further enhanced for the loss of negative regulation, so it may eventually lead to the development of T1DM by destroying islet β cells.

[**Key words**] type 1 diabetes mellitus; type 2 diabetes mellitus; PD-1; memory T cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(04): 476-481]

1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus，T1DM)是一种慢性自身免疫性疾病，好发于儿童和青少年，特点为体内胰岛素分泌绝对不足，且易发生糖尿病酮症酸中毒(diabetic ketoacidosis，DKA)，患者须使用胰岛素治疗才能获得满意疗效[1-2]。

以往研究显示T1DM发病可能是由于胰岛β细胞被自身反应性T细胞所破坏，进而引起机体内胰岛素分泌绝对不足所致[3-6]。随后有研究发现健康者外周血中同样存在自身反应性T细胞，不同的是健康者体内的自身反应性T细胞表达初始细胞表型，而在T1DM患者体内则表达记忆性细胞表型；此类自身反应性记忆T细胞(memory T cells，Tm)不但寿命更长，并且针对抗原刺激的免疫应答反应也更为强烈[7]。目前Tm主要分为两个亚型：中央记忆性T细胞(central memory T cells，Tcm)和效应记忆性T细胞(effector memory T cells，Tem)[7]。诸多研究通过实验模型证实了PD-1及其配体功能异常与某些自身免疫病的发生发展密切相关[8]。此外，Fujisawa等[9]发现日本T1DM患者外周血$CD4^+$T细胞PD-1表达下降。本课题旨在通过研究T1DM患者外周血Tm细胞PD-1表达情况进而为深入探讨T1DM患者自身免疫破坏机制提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

T1DM患者26例，女12例，男14例，年龄16~49岁，平均31岁；T2DM患者31例，女13例，男18例，年龄24~76岁，平均34岁，均为2016年3月至2017年3月期间泰州市人民医院内分泌科门诊及住院患者，所有患者均符合世界卫生组织(WHO)和美国糖尿病协会(ADA)的分型标准，排除其他内分泌系统疾病；健康志愿者(health control，HC)36例，与T1DM、T2DM患者性别和年龄匹配，否认相关疾病史。

1.1.2 试剂和仪器

Ficoll液(天津灏洋生物制品有限公司)；人$CD4^+$T细胞磁珠分选试剂盒、人$CD8^+$T细胞磁珠分选试剂盒、LD型细胞分选柱(Miltenyi公司，德国)；CD4-FITC、CD45RO-PE、CCR7-APC、CD8-FITC、PD-1-PerCp鼠抗人单克隆荧光抗体及其同型对照抗体及FACSCalibur流式细胞仪(BD公司，美国)；M-MLV逆转录试剂盒(Invitrogen公司，美国)；TriPure分离试剂、FastStart Universal SYBR Green Master(Roche公司，瑞士)；2720 Thermal Cycler PCR仪(Thermo公司，美国)；7300荧光定量PCR仪(ABI公司，美国)。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞分离

患者入院当天无菌采集T1DM组、T2DM组及正常对照组外周静脉血10 mL置于肝素钠抗凝管中混匀，采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMCs)。

1.2.2 免疫磁珠法分选细胞

通过免疫磁珠分离法分别分选出$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞，应用流式细胞术(FCM)检测其纯度>95%。

1.2.3 荧光定量PCR检测mRNA相对表达水平

经分选所得$CD4^+$和$CD8^+$T细胞分别加入TriPure分离试剂，待细胞裂解后提取总RNA，经逆转录得到cDNA后进行荧光定量PCR，检测PD-1 mRNA相对表达水平。人PD-1引物序列为：Sense：5′-CCAGGATGGTTCTTAGACTCCC-3′和Anti-sense：5′-TTTAGCACGAAGCTCTCCGAT-3′，扩增片段大小为

137 bp；内参β-actin引物序列为：Sense：5′-GGACCTGACCGACTACCTCATG-3′和Anti-sense：5′-CGACGTAGCAGAGCTTCTCCTT-3′，扩增片段大小为110 bp。

1.2.4 FCM检测细胞表面分子标记

将上述分离出的PBMCs细胞悬液调整为5×10^6~1×10^7个/mL，每管加入100 μL细胞悬液，随后加入5 μL CD45RO-PE、5 μL CCR7-APC、5 μL PD-1-PerCp、5 μL CD4-FITC或5 μL CD8-FITC并设立同型对照管，于4 ℃冰箱避光孵育30 min。经PBS洗涤2次后，用300 μL PBS重悬细胞，应用流式细胞仪检测。采用Flowjo7.6.5软件分析数据。

1.3 统计学方法

应用SPSS16.0统计软件分析数据。数值变量以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用q检验，$P \leqslant 0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 T1DM组患者外周血中$CD4^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平低于T2DM组和正常对照组，而$CD8^+$T细胞则无明显异常

通过检测$CD4^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平发现，T1DM组外周血$CD4^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平明显低于正常对照组和T2DM组，差异有统计学意义[(0.23 ± 0.31) *vs.* (0.37 ± 0.18)、(0.35 ± 0.22)，$P < 0.01$，图1]。

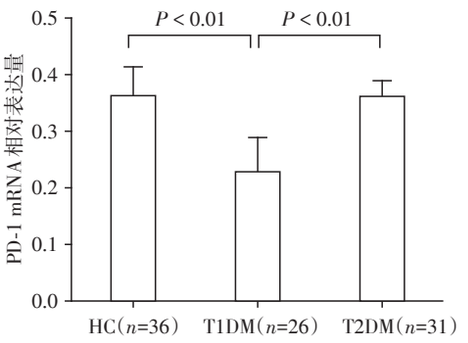


图1 正常对照组与T1DM组、T2DM组患者外周血$CD4^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平

Figure 1 PD-1 mRNA relative abundance in $CD4^+$T cells from peripheral blood in the control group, the T1DM group and the T2DM group separately

进一步检测$CD8^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平发现，T1DM组与正常对照组和T2DM组无明显差异[(0.29 ± 0.22) *vs.* (0.33 ± 0.41) *vs.* (0.30 ± 0.28)，$P > 0.05$，图2]。

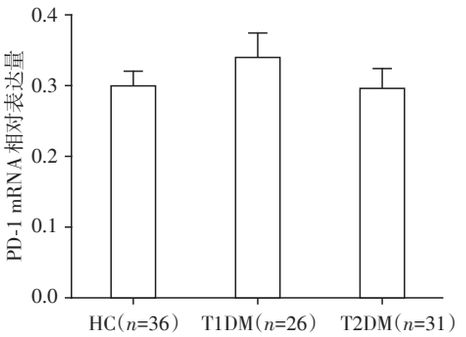


图2 正常对照组与T1DM组、T2DM组患者外周血$CD8^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平

Figure 2 PD-1 mRNA relative abundance in $CD8^+$T cells from peripheral blood in the control group, the T1DM group and the T2DM group separately

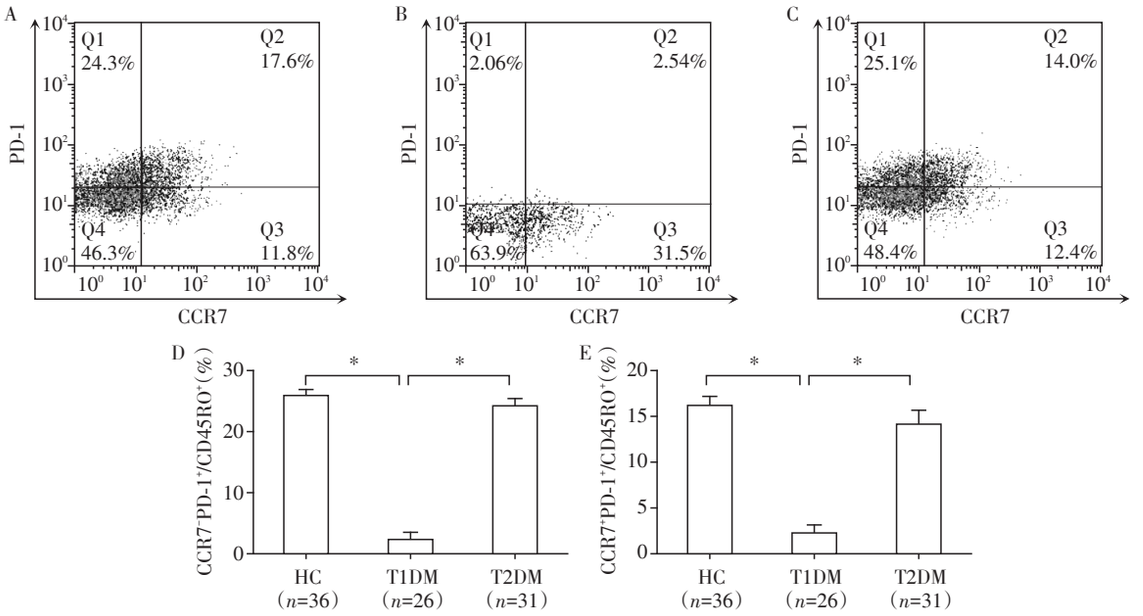
2.2 T1DM组患者外周血中$CD4^+CD45RO^+CCR7^-$ Tem细胞亚群与$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群PD-1表达水平均显著低于正常对照组和T2DM组患者，而$CD8^+$T细胞未见明显异常

通过流式细胞术检测T1DM组患者外周血PBMCs中$CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群PD-1的表达情况发现，相比于正常对照组和T2DM组，T1DM组患者外周血$CD4^+$ T细胞亚群$CCR7^-PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值明显偏低，差异有统计学意义[(26.32 ± 1.06)% *vs.* (2.44 ± 1.13)% *vs.* (24.83 ± 1.25)%，$P < 0.01$]；与此同时，T1DM组患者外周血$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞PD-1表达水平亦明显偏低，差异有统计学意义[(16.93 ± 2.10)% *vs.* (2.13 ± 1.81)% *vs.* (14.48 ± 3.63)%，$P < 0.01$，图3]。

进一步检测T1DM组患者外周血PBMCs中$CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群和$CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群PD-1表达水平发现，相比于正常对照组和T2DM组，T1DM组患者外周血$CD8^+$ T细胞亚群$CCR7^-PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值和$CCR7^+PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值均无明显异常[(17.32 ± 1.26)% *vs.* (20.56 ± 1.33)% *vs.* (18.83 ± 1.95)%，$P > 0.05$]、[(8.93 ± 1.37)% *vs.* (9.13 ± 3.15)% *vs.* (11.48 ± 2.43)%，$P > 0.05$，图4]。

3 讨 论

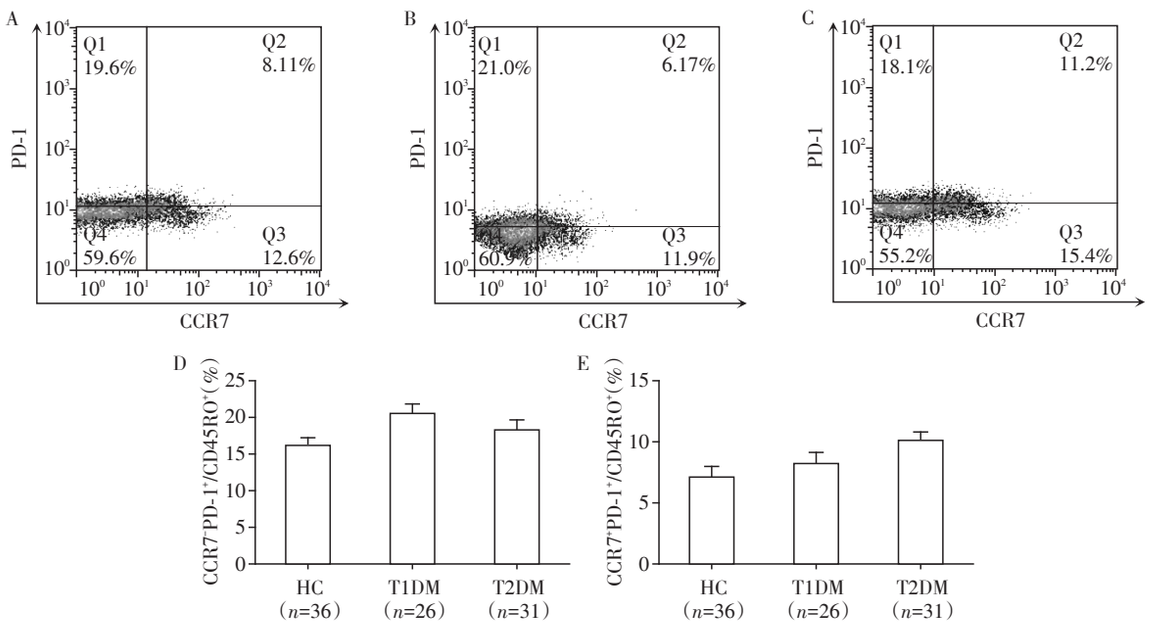
非肥胖型（non-obese diabetic，NOD）小鼠可以自发糖尿病，有利于深入研究T1DM潜在的病理学和分子生物学机制。Yadav等[10]通过研究发现，相比于正常小鼠，NOD小鼠淋巴器官特征性低表达程序性死亡配体1（programmed cell death ligand 1，PD-



A、B、C：正常对照组、T1DM组、T2DM组患者外周血$CD4^+$T细胞亚群$CCR7^+PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值以及$CCR7^-PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值FCM代表性检测结果；D：3组外周血$CD4^+$T细胞亚群$CCR7^-PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值的比较，$^{**}P < 0.01$；E：3组外周血$CD4^+$T细胞亚群$CCR7^+PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值的比较，两组比较，$^{**}P < 0.01$。

图3　正常对照组与T1DM组、T2DM组患者外周血$CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群和$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群表面PD-1表达情况

Figure 3　The expression of PD-1 on $CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem cells and $CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm cells in the control group, the T1DM and the T2DM group separately



A、B、C：正常对照组、T1DM组、T2DM组外周血$CD8^+$T细胞亚群$CCR7^+PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值以及$CCR7^-PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值FCM代表性检测结果；D：3组外周血$CD8^+$T细胞亚群$CCR7^-PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值的比较；E：3组外周血$CD8^+$T细胞亚群$CCR7^+PD\text{-}1^+/CD45RO^+$T细胞比值的比较。

图4　正常对照组与T1DM组、T2DM组患者外周血$CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群和$CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群表面PD-1表达情况

Figure 4　The expression of PD-1 on $CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem cells and $CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm cells in the control group, the T1DM and the T2DM group separately

L1）和程序性死亡配体2（programmed cell death ligand 2，PD-L2）。PD-L1可表达于NOD小鼠胰岛细胞、血管内皮细胞、淋巴细胞、抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）等，而PD-L2仅表达于活化的APCs上。有研究显示，若NOD小鼠体内抗原特异性$CD41^+$T细胞PD-1表达缺失，则可导致脾脏、胰淋巴结以及胰腺内T细胞数量不断增加，进一步诱发T1DM。NOD小鼠约在14~30周发生糖尿病，血糖不断升高的同时伴随胰岛炎[11]。有研究将NOD和非NOD小鼠来源的T细胞分别转移至经辐照的小鼠，结果显示后者可以控制糖尿病的发生发展[12]。从NOD小鼠模型的研究中可以发现，PD-1和PD-L1均与T1DM的发病机制相关。表达于胰岛β细胞的PD-L1的功能可能为限制靶向正常组织的自身反应性T细胞活化；当NOD小鼠PD-1表达缺陷时，其体内T细胞向1型辅助性T细胞（helper T cell，Th）极化作用加强并浸润胰岛，T1DM的发生发展速度加快，并且这种现象在雄性动物中更明显[11]。NOD-$pdcd1^{-/-}$小鼠糖尿病的发生发展由5个遗传基因座控制，包括胰岛素依赖的糖尿病（insulin-dependent diabetes，idd）1、idd17、idd20以及隐性基因[1]。Ansari等[13]通过实验发现，使用PD-1或PD-L1相应的抗体（J43或MIH6）阻断PD-1/PD-L1信号通路时，可以加速NOD小鼠糖尿病的发生发展；而使用PD-L2相应抗体（clone TY25）阻断PD-1/PD-L2信号通路时，则不能改变NOD小鼠糖尿病的进程，提示PD-1/PD-L1信号通路对T1DM的发生发展有阻遏作用。

本研究通过荧光定量PCR检测发现，T1DM组患者外周血中$CD4^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平低于T2DM和正常对照组，且差异有统计学意义；而相比于正常对照组和T2DM组，T1DM组患者外周血中$CD8^+$T细胞内PD-1 mRNA相对表达水平未见明显异常，与Fujisawa等[9]所得结论一致，即T1DM患者外周血中$CD4^+$T细胞亚群PD-1表达可能存在缺陷。

Tm是由某些经抗原刺激后的前体T淋巴细胞分化而成，其可被低水平的抗原、细胞因子以及协同刺激分子所激活。当抗原被清除后，Tm可以功能沉寂和缓慢细胞周期的形式在宿主体内存活多年。Tm的产生和存活机制至今尚不明了。Tcm是一群寿命较长的Tm，表达归巢受体CCR7和CD62L，可迁移至次级淋巴器官，当遭遇抗原时，该类细胞直接效应能力不强，但可以迅速增殖并产生大量效应细胞；Tem细胞不能持续表达CCR7和CD62L，但是可表达趋化因子和黏附因子受体，能够迅速迁移至炎症组织发挥细胞免疫效应，在抗原刺激下，该类细胞可分泌干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）等细胞因子，但增殖能力相对较弱[14]。Tm表面免疫负调控分子PD-1的异常表达在肿瘤的发生发展中具有重要作用，有研究发现，外周组织中的肿瘤渗透淋巴细胞（tumour-infiltrating lymphocytes，TIL）分泌的IFN-γ可使肿瘤细胞PD-L1表达增加，从而导致表达PD-1的效应T细胞免疫抑制，进而肿瘤细胞得以生长[15]。有研究发现健康者外周血中亦存在自身反应性T细胞，提示T1DM的免疫病理学非常复杂[4,6]。此外，亦有研究发现NOD小鼠体内具有中央记忆表型的$CD8^+CD122^+$T细胞PD-1表达降低[16]。人类胰岛自身反应性Tm细胞的确切表型尚不清楚，但是根据其效应功能，推测此类细胞可能为Tem[17]。Orban等[18]通过研究发现$CD4^+$Tcm细胞与T1DM有关。此类$CD4^+$和$CD8^+$自身反应性Tm细胞不但寿命更长，并且针对抗原刺激的免疫应答反应也更为强烈，但是其在T1DM患者体内的免疫失衡机制目前尚未完全明了[7]。此外，Perri等[19]发现T1DM患者外周血调节性T细胞经刺激后扩增不明显，并且PD-1^+、PD-1^{low}以及PD-1^{high}的细胞比例偏低。

由于Tm不但寿命更长，并且针对抗原刺激的免疫应答反应也更为强烈，因此本课题组进一步研究Tm亚群表面PD-1的表达情况。通过检测外周血中$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞、$CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞、$CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞、$CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞表面免疫负调控分子PD-1的表达水平发现，T1DM组患者外周血中$CD4^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群与$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群PD-1表达水平均显著低于正常对照组和T2DM组患者，差异有统计学意义；T1DM组患者外周血中$CD8^+CD45RO^+CCR7^-$Tem细胞亚群与$CD8^+CD45RO^+CCR7^+$Tcm细胞亚群PD-1表达水平均无明显异常。

$CD4^+$Tm细胞再次接受抗原刺激后，即成为活化的效应性Th细胞。Th细胞可以分为Th1细胞和Th2细胞，分别分泌不同的细胞因子，发挥不同的免疫效应。Th1细胞可通过分泌IFN-γ、IL-2、IL-12等来调控其他免疫细胞，增强细胞免疫应答，尤其对于$CD8^+$CTL细胞的分化增殖密切相关[20]。此外，有研究显示T1DM体内存在胰岛β细胞自身抗体[21]，亦可能与此述经Tm再次活化后形成的Th2细胞进一步诱导B细胞产生抗体相关。

综上所述,胰岛β细胞可通过细胞表面PD-L1与$CD4^+$Tm表面PD-1结合从而负调节其细胞免疫作用,因此当$CD4^+$Tm细胞PD-1表达异常而失去负调控作用,细胞效应则会进一步增强,最终可能通过破坏胰岛β细胞而导致T1DM的发生发展。

[参考文献]

[1] Wu YL, Ding YP, Gao J, et al. Risk factors and primary prevention trials for type 1 diabetes[J]. Int J Biol Sci, 2013,9(7):666-679

[2] Westerberg DP. Diabetic ketoacidosis: evaluation and treatment[J]. Am Fam Physician,2013,87(5):337-346

[3] Danke NA, Yang J, Greenbaum C, et al. Comparative study of GAD65-specific $CD4^+$T cells in healthy and type 1 diabetic subjects[J]. J Autoimmun,2005,25(4):303-311

[4] Oling V, Reijonen H, Simell O, et al. Autoantigen-specific memory $CD4^+$ T cells are prevalent early in progression to type 1 diabetes[J]. Cell Immunol, 2012, 273(2): 133-139

[5] Monti P, Scirpoli M, Rigamonti A, et al. Evidence for *in vivo* primed and expanded autoreactive T cells as a specific feature of patients with type 1 diabetes[J]. J Immunol, 2007,179(9):5785-5792

[6] Skowera A, Ladell K, McLaren JE, et al. β-cell-specific $CD8^+$ T cell phenotype in type 1 diabetes reflects chronic autoantigen exposure[J]. Diabetes, 2015, 64(3): 916-925

[7] Ehlers MR, Rigby MR. Targeting memory T cells in type 1 diabetes[J]. Curr Diab Rep,2015,15(11):84

[8] Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, et al. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship[J]. Cell Immunol,2016,310(1):27-41

[9] Fujisawa R, Haseda F, Tsutsumi C, et al. Low programmed cell death-1(PD-1)expression in peripheral $CD4^+$T cells in Jpanese patients with autoimmune type 1 diabetes[J]. Clin Exp Immunol,2015,180(3):452-457

[10] Yadav D, Hill N, Yagita H, et al. Altered availability of PD-1/PD ligands is associated with the failure to control autoimmunity in NOD mice[J]. Cell Immunol,2009,258(2): 161-171

[11] Pauken KE, Jenkins MK, Azuma M, et al. PD-1, but not PD-L1, expressed by islet-reactive $CD4^+$ T cells suppresses infiltration of the pancreas during type 1 diabetes[J]. Diabetes,2013,62(8):2859-2869

[12] Herbelin A, Gombert JM, Lepault F, et al. Mature mainstream TCR $\alpha\beta^+CD4^+$ thymocytes expressing L-selectin mediate "active tolerance" in the nonobese diabetic mouse[J]. J Immunol,1998,161(5):2620-2628

[13] Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, et al. The programmed death-1(PD-1)pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic(NOD)mice[J]. J Exp Med,2003,198(1):63-69

[14] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation and maintenance[J]. Annu Rev Immunol,2014,22:745-763

[15] Zheng P, Zhou Z. Human cancer immunotherapy with PD-1/PD-L1 blockade[J]. Biomark Cancer, 2015, 7(Suppl 2):15-18

[16] Arndt B, Witkowski L, Ellwart J, et al. $CD8^+CD122^+PD\text{-}1^-$ effector cells promote the development of diabetes in NOD mice[J]. J Leukoc Biol,2015,97(1):111-120

[17] Vendrame F, Pileggi A, Laughlin E, et al. Recurrence of type 1 diabetes after simultaneous pancreas-kidney transplantation, despite immunosuppression, is associated with autoantibodies and pathogenic autoreactive $CD4^+$T-cells[J]. Diabetes,2010,59(4):947-957

[18] Orban T, Beam CA, Xu P, et al. Reduction in $CD4^+$ central memory T-cell subset in costimulation modulator abatacept-treated patients with recent-onset type 1 diabetes is associated with slower C-peptide decline[J]. Diabetes,2014,63(10):3449-3457

[19] Perri V, Russo B, Crino A, et al. Expression of PD-1 molecule on regulatory T lymphocytes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9):22584-22605

[20] Tamura T, Shimohakamada Y, Makino M. Towards novel tuberculosis and leprosy vaccine development: the role of Th1-inducing peptide in cytotoxic T cell differentiation[J]. Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi,2013,82(3):111-117

[21] Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, et al. Type 1 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Dis Primers,2017,30(3): 17016

[收稿日期] 2017-05-16