

· 基础研究 ·

人锌转运体8嵌合抗原受体表达载体的构建与初步应用

石毓雯¹, 王星², 张玲玉¹, 胡启桢¹, 秦瑶¹, 高威³, 张梅^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; ²南通市第一人民医院内分泌科, 江苏 南通 226001; ³南京医科大学细胞生物学系, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的: 构建人锌转运体8(zinc transporter 8, ZnT8)嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的慢病毒表达载体, 为研究抗原特异性调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)在1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)自身免疫中的调节作用提供实验基础。方法: 通过分子克隆及基因重组技术构建PLVX-EGFP-ZnT8 scfv慢病毒表达载体质粒, 并制备ZnT8 scfv-CAR慢病毒; 利用ZnT8 scfv-CAR慢病毒感染Tregs, 流式细胞术检测绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达确定慢病毒感染效率; 细胞计数评估Tregs细胞增殖能力; 流式细胞术检测增殖细胞中CD4、CD25、Foxp3和Helios的表达。结果: 酶切鉴定和基因测序结果显示PLVX-EGFP-ZnT8 scfv慢病毒表达载体构建成功; 质粒共转染293T细胞后制备浓缩慢病毒滴度为 2.4×10^8 TU/ μ L; ZnT8 scfv-CAR慢病毒转染Tregs后GFP表达率为 $43.2\% \pm 4.1\%$; 体外培养14 d后ZnT8特异性Tregs增殖(634.3 ± 92.5)倍, 且高表达Foxp3($60.4\% \pm 3.5\%$)和Helios($64.3\% \pm 4.8\%$)。结论: 成功构建了包含CAR结构的PLVX-EGFP-ZnT8 scfv慢病毒载体并被包被ZnT8 scfv-CAR慢病毒; 慢病毒感染后的CAR-Tregs体外扩增14 d仍能够维持ZnT8-CAR结构表达; CAR-Tregs为一群CD4⁺CD25⁺细胞且高表达Foxp3和Helios。

[关键词] 锌转运体8; 嵌合抗原受体; 1型糖尿病; 抗原特异性; 调节性T细胞

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)07-945-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20200703

Construction and application of human ZnT8 chimeric antigen receptor expression vector

SHI Yuwen¹, WANG Xing², ZHANG Lingyu¹, HU Qizhen¹, QIN Yao¹, GAO Wei³, ZHANG Mei^{1*}

¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029;

²Department of Endocrinology, Nantong First People's Hospital, Nantong 226001; ³Department of Cell Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to construct zinc transporter 8(ZnT8)chimeric antigen receptor(CAR)expression vector, so as to provide experimental basis for studying the role of antigen-specific regulatory T cells(Tregs)in the autoimmunity of type 1 diabetes. **Methods:** PLVX-EGFP-ZnT8 scfv lentivector was constructed by molecular cloning technique to produce ZnT8 scfv-CAR lentivirus; the expression of green fluorescent protein(GFP)in Tregs was detected by flow cytometry to determine the efficiency of lentivirus; the proliferation of Tregs was evaluated by cell counting; the expression of CD4, CD25, Foxp3 and Helios in proliferated cells were detected by flow cytometry. **Results:** The PLVX-EGFP-ZnT8 scfv lentivector was successfully constructed. The titer of concentrated ZnT8 scfv-CAR lentivirus was 2.4×10^8 TU/ μ L. The expression rate of GFP was $43.2\% \pm 4.1\%$ in Tregs infected with ZnT8 scfv-CAR lentivirus. After being cultured *in vitro* for 14 days, the ZnT8-specific Tregs proliferated (634.3 ± 92.5)times, along with high expression of Foxp3($60.4\% \pm 3.5\%$)and Helios($64.3\% \pm 4.8\%$). **Conclusion:** We obtained the PLVX-EGFP-ZnT8 scfv lentivector and synthesized ZnT8 scfv-CAR lentivirus successfully; Tregs infected with ZnT8 scfv-CAR lentivirus could maintain the CAR expression; CAR-Tregs were a group of CD4⁺CD25⁺ cells with high expression of Foxp3 and Helios.

[Key words] zinc transporter 8; chimeric antigen receptor; type 1 diabetes; antigenic specificity; regulatory T cells

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(07):945-949, 974]

[基金项目] 国家自然科学基金(81370939, 81670756, 81974103); 江苏省“333高层次人才培养工程”(LGY2016007); 江苏省重点研发项目(BE2018748)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangmei@njmu.edu.cn

1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)是一种由T细胞介导的针对胰岛β细胞选择性破坏的自身免疫性疾病。调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)是一群CD4⁺CD25⁺T细胞且特异性表达转录因子Foxp3的免疫负调控细胞,在体内通过一系列机制维持自身免疫耐受^[1]。动物模型和临床研究都显示多克隆Tregs可以起到治疗T1DM的作用,但是多克隆Tregs治疗面临着所需细胞数量多、抗原非特异性、感染和肿瘤风险增加等难题。因此,针对特定器官或抗原的特异性免疫抑制才能在治疗的同时避免不良反应的发生,抗原特异性Tregs是免疫调控治疗的关键。

人锌转运体8(zinc transporter 8, ZnT8)是特异性表达于胰岛β细胞胰岛素分泌囊泡膜的一种锌转运蛋白,其生理功能是负责囊泡内的锌离子富集,在胰岛素的合成与分泌过程中发挥重要作用^[2]。ZnT8不仅具有维持细胞内锌稳态的作用,也是体内免疫系统针对胰岛β细胞的潜在靶标之一。深入研究ZnT8特异性Tregs参与T1DM自身免疫反应的调控作用,对于明确T1DM发病机制、寻找临床免疫治疗靶点具有重要的临床价值和意义。

本课题组在前期研究中已建立了体外高效扩增人调节性T细胞技术^[3],并构建全人源型噬菌体库,筛选、表达与鉴定了人源抗ZnT8的单链抗体(single chain fragment variable, scfv)^[4]。本研究拟构建ZnT8 scfv-CAR Tregs,评估其功能和表型,为进一步研究抗原特异性Tregs在T1DM中的机制和免疫治疗提供研究手段。

1 材料和方法

1.1 材料

健康人血液标本来源于江苏省血液中心献血志愿者,均已签署“献血者科研用血知情同意书”。*E.coli* stab3感受态细胞、人肾胚上皮细胞株293T由南京医科大学细胞生物学系实验室保存。

琼脂糖凝胶回收试剂盒(上海索宝生物科技有限公司),PCR引物(南京金斯瑞生物科技有限公司),淋巴细胞分离液(Stem Cell公司,美国),CD4-PerCP cy5.5抗体、流式细胞仪FACS Aria、FACSCalibur(BD公司,美国),CD127-PE抗体、CD25-APC抗体、Helios-PE抗体、Foxp3-Alexa Fluor 488抗体(BioLegend公司,美国),RPMI 1640、DMEM、人CD3/CD28磁珠、胎牛血清、青链霉素、Opti-MEM、PEI(Gibco公司,美国),重组人白细胞介素2(IL-2,江苏四环生物制药公司),X-Vivo无血清培养基(Lonza公

司,瑞士),限制性核酸内切酶*Nde* I和*Not* I(NEB公司,美国)。CAR慢病毒载体PLVX-EGFP-YP7质粒、病毒包装质粒pSPAX.2与PMD2.G(南京医科大学细胞生物学系实验室储存),含ZnT8-scfv质粒(本实验室储存)。

1.2 方法

1.2.1 ZnT8 scfv-CAR慢病毒载体质粒的构建

根据载体酶切位点和ZnT8特异性scfv序列设计引物,F:5'-CCAGGCCGGCGCCGCTATGACCCAGTCTCCATCCTC-3',R:5'-GTGGTCATATGTGAGGAGACGGTGACCAGG-3'。以含ZnT8 scfv的质粒为模板,PCR扩增ZnT8 scfv序列并回收目的条带,反应体系与反应条件如下:5×ps buffer 10 μL、dNTP 4 μL、模板1 μL、正向引物1 μL、反向引物1 μL、primer star 0.5 μL、ddH₂O 32.5 μL;扩增程序为:98℃ 10 s、65℃ 5 s、72℃ 1 min,共40个循环,72℃终延伸5 min。

将scfv DNA在37℃下2 h进行*Nde* I/*Not* I双酶切,回收酶切产物后16℃过夜连接到载体PLVX-EGFP-CAR中。连接产物转化*E.coli* stab3感受态细胞,挑选阳性克隆并测序分析,结果正确的PLVX-EGFP-ZnT8 scfv质粒用于包被慢病毒。

1.2.2 慢病毒制备并感染293T细胞

将293T细胞接种至10 cm培养皿中,待细胞密度为70%~80%时将PLVX-EGFP-ZnT8质粒(10 μg)与pMD2.G(5 μg)质粒、pSPAX2(7.5 μg)质粒通过Opti-MEM(1 mL)与PEI(67.5 μg)共转染至293T细胞。转染后8 h换液,24 h和48 h后分别收取培养上清。将上清超速离心(4℃、20 000 r/min、2 h),沉淀溶解在DMEM培养液中,分装于-80℃冻存备用。

293T细胞铺到24孔板中(2×10⁵个/孔),24 h后分别加入1、2、5、10 μL ZnT8-CAR慢病毒。感染24 h后换液,48 h后收取细胞流式检测绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)阳性细胞比例。

1.2.3 流式分选Tregs

淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),无菌PBS溶液重悬至细胞密度1×10⁸个/mL后加入CD4-PerCP cy5.5抗体、CD25-APC抗体、CD127-PE抗体,混匀后4℃避光孵育30 min。离心后弃上清,用含有10%胎牛血清的PBS溶液重悬细胞,流式分选收集CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞,即Tregs。

1.2.4 ZnT8 scfv-CAR Tregs的构建与扩增

含10%胎牛血清、1%青链霉素的X-Vivo培养基

重悬 Tregs (1×10^6 个/mL), 按照细胞数:磁珠数 1:1 的比例加入人 CD3/CD28 磁珠, 并加入 IL-2 (终浓度为 300 U/mL) 100 μ L/孔, 将细胞接种于 96 孔板内。37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h, 实验组 CAR-Tres 以 MOI=15 加入 ZnT8 scfv-CAR 慢病毒和硫酸鱼精蛋白 (4 μ g/mL), 对照组 Tregs 加入相同体积 PBS 溶液离心 (4 $^{\circ}$ C, 1 000 r/min, 1 h, 缓升缓降)。离心结束后放入培养箱静置 3 h, 实验组与对照组均补充 100 μ L 含 IL-2 的 X-Vivo 培养基, 继续培养 24 h 后将 96 孔板内细胞转移至 48 孔板。分别在转染后 3 d、5 d 进行离心换液, 实验组在病毒转染后 7 d 收集细胞流式分选 GFP⁺ Tregs, 再次按 1:1 比例加入人 CD3/CD28 磁珠, 继续培养 GFP⁺ Tregs, 培养期间每次离心换液时对实验组和对照组细胞进行计数以便评估两组细胞增殖能力。

1.2.5 ZnT8 scfv-CAR Tregs 体外扩增后表型检测

收集扩增后 Tregs, 计数后用无菌 PBS 重悬细胞 (1×10^7 个/mL)。每管加入 100 μ L 细胞, 用 CD4-PerCP 抗体、CD25-APC 抗体进行表面染色, 并于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。2 mL PBS 洗涤细胞后离心弃上清。1 mL 破膜液重悬后 4 $^{\circ}$ C 破膜 1 h, 加入 2 mL 洗涤液 1 500 r/min 5 min 离心清洗 2 遍。200 μ L PBS 重悬后加入 Foxp3-Alexa Fluor 488 抗体、Helios-PE 抗体进行核内染色, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。离心后弃上清, 200 μ L PBS 重悬细胞后流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

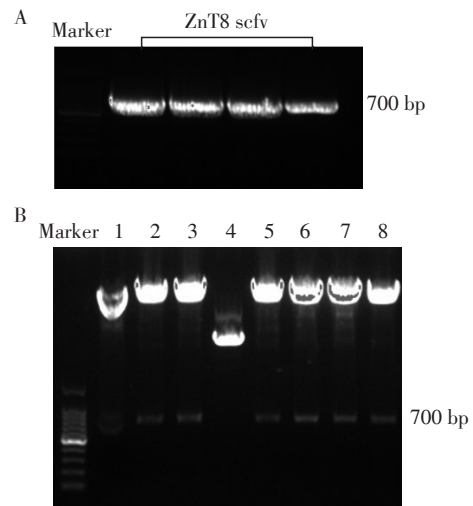
运用 SPSS23.0 统计软件进行统计分析, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。采用 FlowJo 10.0 制作流式图, GraphPad Prism7.0 绘制增殖曲线。实验均独立重复 3 次。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体的构建与鉴定

PCR 扩增获得 ZnT8-scfv DNA 序列 (图 1A), *Nde* I/*Not* I 双酶切鉴定成功筛选出阳性克隆 (图

1B), 基因测序结果与质粒图谱一致。



A: PCR 扩增 ZnT8 scfv 序列电泳图; B: 目的基因与 PLVX 载体连接后重组质粒 PCR 酶切鉴定图, 1~8: 重组质粒酶切产物, 其中 2、3、5~8 为阳性克隆。

图 1 PLVX-EGFP-ZnT8 scfv 慢病毒载体的构建

Figure 1 Integration of PLVX-EGFP-ZnT8 scfv lentiviral vector

2.2 ZnT8 scfv-CAR 慢病毒成功转染 293T 细胞

流式细胞术检测 ZnT8 scfv-CAR 慢病毒感染 293T 后 GFP 表达。结果显示, 随着加入病毒量的增加 GFP 阳性率逐渐增高, ZnT8 scfv-CAR 浓缩慢病毒成功转染 293T 细胞 (图 2)。

2.3 ZnT8 scfv-CAR Tregs 的鉴定

分离健康人外周血 PBMC 中的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T 细胞亚群, 纯度 > 95% (图 3A、B)。转染 CAR 慢病毒 7 d 后流式细胞术检测 GFP 荧光表达率为 43.2% \pm 4.1% (图 3C)。分选出的 GFP⁺ Tregs (即 ZnT8 scfv-CAR Tregs) 体外继续培养 7 d 后 GFP 阳性率为 98.3% \pm 1.2% (图 3D), 证明慢病毒转染的 CAR 结构能够随着 Tregs 增殖在细胞内稳定表达。

2.4 ZnT8 scfv-CAR Tregs 能在体外高效扩增

体外扩增 14 d 后靶向 ZnT8 抗原的特异性 CAR-

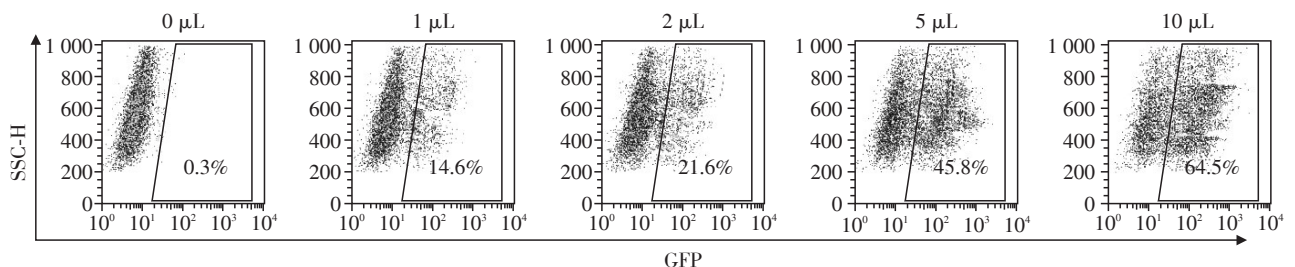


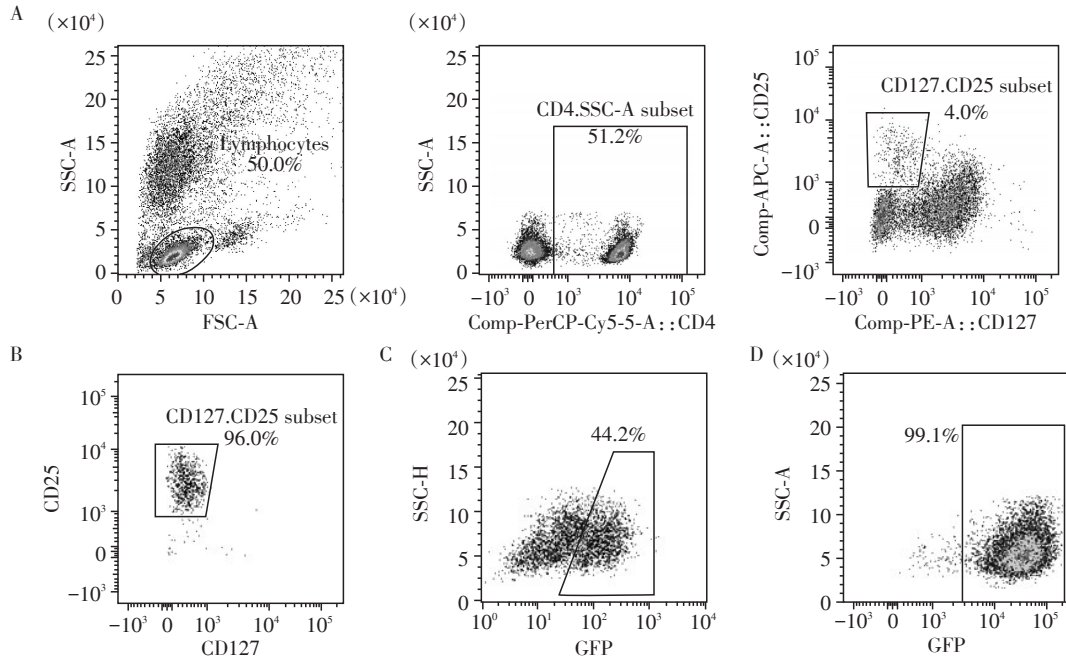
图 2 ZnT8 scfv-CAR 慢病毒感染 293T 细胞

Figure 2 ZnT8 scfv-CAR lentivirus infects 293T cells

Tregs 扩增 (634.3 ± 92.5) 倍, 对照组多克隆 Tregs (未转染慢病毒) 扩增 (643.7 ± 195.1) 倍, 两组细胞的增殖能力无统计学差异 ($P > 0.05$, 图 4A)。

流式检测扩增 14 d 后 ZnT8 特异性 CAR-Tregs

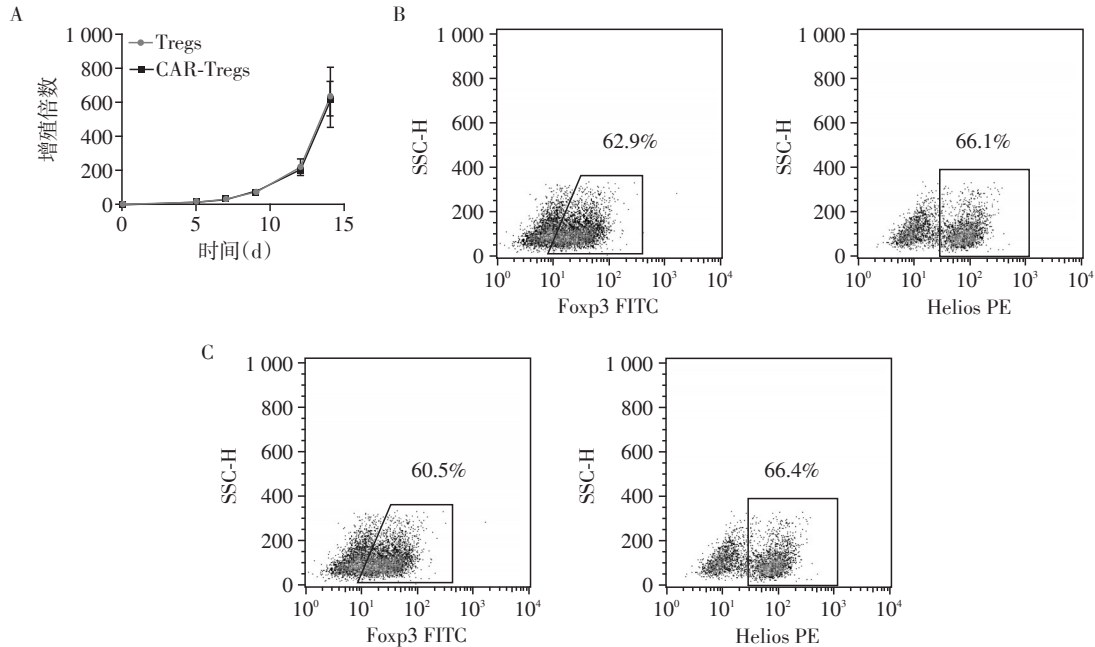
表型, 结果显示: 与对照组相比, CAR-Tregs 为 $CD4^+ CD25^+ T$ 细胞同时高表达 Foxp3 ($60.4\% \pm 3.5\%$ vs. $61.7\% \pm 5.5\%$, $P > 0.05$) 和 Helios ($64.3\% \pm 4.8\%$ vs. $65.3\% \pm 2.9\%$, $P > 0.05$) (图 4B、C)。



A: 分选 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low}$ T 细胞 (Tregs); B: Tregs 分选纯度大于 95% ($n=3$); C: 病毒转染 7 d 后检测 CAR 的阳性表达率 ($43.2\% \pm 4.1\%$) ($n=3$); D: 体外培养 14 d 后, ZnT8 特异性 CAR-Tregs 维持 CAR 高表达 ($98.3\% \pm 1.2\%$) ($n=3$)。

图3 ZnT8特异性CAR-Tregs的构建

Figure 3 Construction of ZnT8-specific CAR-Tregs



A: 体外培养 14 d 后 ZnT8 特异性 CAR Tregs 增殖 (634.3 ± 92.5) 倍, 对照组 Tregs 增殖 (643.7 ± 195.1) 倍 ($P > 0.05$, $n=3$); B: 体外培养 14 d, 扩增后的对照多克隆 Tregs 为 $CD4^+ CD25^+ T$ 细胞, 并且高表达 Foxp3 ($61.7\% \pm 5.5\%$)、Helios ($65.3\% \pm 2.9\%$) ($n=3$); C: 体外培养 14 d, 扩增后的 ZnT8 特异性 CAR-Tregs 为 $CD4^+ CD25^+ T$ 细胞, 并且高表达 Foxp3 ($60.4\% \pm 3.5\%$)、Helios ($64.3\% \pm 4.8\%$) ($n=3$)。

图4 ZnT8特异性CAR-Tregs的功能与表型

Figure 4 ZnT8-specific CAR-Tregs efficiently amplify and maintain the original phenotype of Tregs *in vitro*

3 讨 论

T1DM 患者需要终身依赖外源性胰岛素治疗,而长期的胰岛素治疗无法阻止糖尿病的进展和并发症的发生。因此在疾病早期调控自身反应T细胞对胰岛的杀伤并保护T1DM患者残存的胰岛功能成为探索T1DM免疫新疗法的关键。Tregs是一类具有免疫负调节功能的CD4⁺T细胞,国外已有临床试验证明了多克隆Tregs回输治疗的有效性与安全性^[5-6]。NOD小鼠模型中的研究表明Tregs参与T1DM的发病^[7];临床研究发现将体外扩增的多克隆Tregs回输到T1DM患者体内可使胰岛素使用剂量下降,C肽水平上升^[8]。NOD小鼠中的研究还显示用胰岛抗原特异性肽段刺激生成的抗原特异性Tregs具有更好的逆转T1DM进展的作用,提示抗原特异性Tregs比多克隆Tregs具有更高的临床治疗价值^[9]。因此,人抗原特异性Tregs是研究免疫调控治疗临床自身免疫性疾病的重要方向。

近年来利用CAR技术构建的肿瘤抗原特异性T细胞在肿瘤治疗方面取得了重大进展^[10],CAR-T在肿瘤方面的成功为构建抗原特异性Tregs提供了新思路。已有研究证明HLA-A2特异性CAR-Tregs能够在体外稳定扩增并保留了Foxp3表达和免疫抑制功能,对移植排斥反应具有比多克隆Tregs更强的抑制作用^[11]。然而目前尚无胰岛抗原相关的人源性Tregs的报道,因此利用CAR技术构建T1D特异性的CAR-Tregs有助于进一步探索Tregs在T1DM自身免疫应答中发挥的作用。

目前已知胰岛β细胞特异性抗原包括胰岛素抗原、谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)、酪氨酸磷酸酶(tyrosine phosphatase, IA-2)和ZnT8。80%初发T1DM患者可检测到ZnT8抗体的存在^[12],研究报道T1DM高危患者最早在2岁时即能检测到ZnT8A,且抗体水平不断增加并维持到T1DM确诊^[13],提示ZnT8与糖尿病的发病与进展相关。ZnT8抗原还是一种在胰腺β细胞特异性高表达的非分泌型抗原^[14],因此ZnT8是构建胰腺抗原特异性Tregs,进而研究其对T1DM免疫调节功能的良好靶标。在课题组的前期研究中,通过噬菌体展示技术筛选并鉴定了一株靶向人ZnT8的单链抗体并证明了该抗体能够特异性识别人ZnT8羧基端氨基端融合蛋白和人胰岛β细胞^[4],为构建ZnT8-CAR Tregs进而研究ZnT8的靶向治疗提供了研究基础。

CAR-Tregs的抗原特异性依赖于基因修饰,因

此基因修饰的稳定性决定了Tregs体外扩增后回输治疗的效果。因此,使用染色体整合载体例如逆转录病毒或慢病毒比DNA瞬时转染更适合对Tregs基因组进行修饰。目前大多数CAR-T疗法中均使用慢病毒进行基因修饰,一方面慢病毒可以对分裂状态与非分裂状态的细胞均具有感染效果,另一方面慢病毒比逆转录病毒具有更高的载体容量。本研究使用含有41BB共刺激信号的第二代CAR慢病毒载体,该载体中包含表达增强型GFP荧光信号的序列,转染成功的细胞可通过流式检测GFP荧光信号进行鉴定,同时载体中包含的CD8铰链区可确保与之相连的ZnT8 scfv片段在细胞膜上表达从而保证抗原与抗体能够在细胞膜表面有效识别。

ZnT8 scfv-CAR慢病毒载体的成功构建为研究靶向ZnT8抗原的Tregs奠定了实验基础。本研究初步探索了ZnT8 scfv-CAR慢病毒感染人Tregs的效率,评估了感染后Tregs的体外扩增能力以及扩增后细胞表型,为进一步探索T1DM的发病机制、研究T1DM抗原特异性Tregs治疗奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] FERREIRA R C, SIMONS H Z, THOMPSON W S, et al. Cells with Treg-specific FOXP3 demethylation but low CD25 are prevalent in autoimmunity [J]. *J Autoimmun*, 2017, 84: 75-86
- [2] BIN B H, SEO J, KIM S T. Function, structure, and transport aspects of ZIP and ZnT zinc transporters in immune cells [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 9365747
- [3] 王 星, 吴 倩, 王悦舒, 等. 体外高效扩增人外周血调节性T细胞技术的建立 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(8): 1034-1038
- [4] WU Q, WANG X, GU Y, et al. Screening and identification of human ZnT8-specific single-chain variable fragment (scFv) from type 1 diabetes phage display library [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(7): 686-693
- [5] BLUESTONE J A, BUCKNER J H, FITCH M, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(315): 189r-315r
- [6] MAREK-TRZONKOWSKA N, MYSLIWIEC M, DOBYSZUK A, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+) CD25 (high) CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up [J]. *Clin Immunol*, 2014, 153(1): 23-30
- [7] ZHENG Q, XU Y, LIU Y, et al. Induction of Foxp3 demethylation increases regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells and prevents the occurrence of diabetes in mice [J]. *J Mol*

(下转第974页)

and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(11): L1239-L1272

[3] LECARPENTIER Y, GOURRIER E, GOBERT V, et al. Bronchopulmonary dysplasia: crosstalk between PPARgamma, WNT/beta-catenin and TGF-beta pathways; The potential therapeutic role of PPARgamma agonists[J]. *Front Pediatr*, 2019, 7:176

[4] NAEEM A, AHMED I, SILVEYRA P. Bronchopulmonary dysplasia: an update on experimental therapeutics [J]. *Eur Med J(Chelmsf)*, 2019, 4(1):20-29

[5] HADCHOUEL A, DELACOURT C. Bronchopulmonary dysplasia and genetics [J]. *Med Sci (Paris)*, 2013, 29(10):821-823

[6] DIAZ-LAGARES A, CRUJEIRAS A B, LOPEZ-SERRA P, et al. Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(47):E7535-E7544

[7] VIERECK J, THUM T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury [J]. *Circ Res*, 2017, 120(2):381-399

[8] LU W, HUANG S Y, SU L, et al. Long noncoding RNA LOC100129973 suppresses apoptosis by targeting miR-4707-5p and miR-4767 in vascular endothelial cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:21620

[9] ZENG Q, WANG Q, CHEN X, et al. Analysis of lncRNAs expression in UVB-induced stress responses of melanocytes[J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 81(1):53-60

[10] WANG J, YIN J, WANG X, et al. Changing expression profiles of mRNA, lncRNA, circRNA, and miRNA in lung tissue reveal the pathophysiological of bronchopulmonary dysplasia (BPD) in mouse model [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6):9369-9380

[11] BAO T P, WU R, CHENG H P, et al. Differential expression of long non-coding RNAs in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia [J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(5):299-309

[12] 张 媛,程怀平,包天平,等. 高氧诱导肺损伤新生小鼠肺组织中长链非编码RNANANCI的表达及对NKX2.1的调控作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(2):215-221

[13] ENGREITZ J M, HAINES J E, PEREZ E M, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing [J]. *Nature*, 2016, 539(7629):452-455

[14] 张 喆,贾立周,唐 奇,等. TROP2和VEGFR2在三阴性乳腺癌中的表达及与临床病理因素的相关性研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(10):1453-1458

[15] MENG L, ZHAO X, ZHANG H. HIPK1 interference attenuates inflammation and oxidative stress of acute lung injury via autophagy[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:827-835

[16] REY C, SOUBEYRAN I, MAHOUCHE I, et al. HIPK1 drives p53 activation to limit colorectal cancer cell growth [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(12):1879-1891

[17] SHANG Y, DOAN C N, ARNOLD T D, et al. Transcriptional corepressors HIPK1 and HIPK2 control angiogenesis via TGF-beta-TAK1-dependent mechanism[J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(4):e1001527

[18] SUCRE J M, VIJAYARAJ P, AROS C J, et al. Posttranslational modification of beta-catenin is associated with pathogenic fibroblastic changes in bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312(2):L186-L195

[19] SCHMITZ M L, RODRIGUEZ-GIL A, HORNUNG J. Integration of stress signals by homeodomain interacting protein kinases[J]. *Biol Chem*, 2014, 395(4):375-386

[收稿日期] 2019-10-29

(上接第949页)

Med(Berl), 2009, 87(12):1191-1205

[8] GITELMAN S E, BLUESTONE J A. Regulatory T cell therapy for type 1 diabetes: May the force be with you[J]. *J Autoimmun*, 2016, 71:78-87

[9] TARBELL K V, PETIT L, ZUO X, et al. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(1):191-201

[10] ZHAO L, CAO Y J. Engineered T cell therapy for cancer in the clinic[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2250

[11] MACDONALD K G, HOEPPLI R E, HUANG Q, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4):1413-1424

[12] ANDERSSON C, VAZIRI-SANI F, DELLI A, et al. Triple specificity of ZnT8 autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in childhood and adolescent type 1 diabetes[J]. *Pediatr Diabetes*, 2013, 14(2):97-105

[13] STECK A K, DONG F, WAUGH K, et al. Predictors of slow progression to diabetes in children with multiple islet autoantibodies[J]. *J Autoimmun*, 2016, 72:113-117

[14] WILLIAMS C L, LONG A E. What has zinc transporter 8 autoimmunity taught us about type 1 diabetes?[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(11):1969-1976

[收稿日期] 2020-01-13