

# 酶联免疫斑点直接法与预孵育法检测胰岛抗原特异性 T 细胞反应的比较

唐维 梁慧迎 袁娇 超晨 黄干 周智广 杨琳

中南大学湘雅二医院代谢内分泌科 中南大学糖尿病免疫学教育部重点实验室 国家代谢性疾病临床医学研究中心,长沙 410011

唐维现在怀化市第一人民医院代谢内分泌科,怀化 418000

通信作者:杨琳,Email: yanglin\_nfm@csu.edu.cn

**【摘要】** 目的 探讨酶联免疫斑点(ELISPOT)加速树突状细胞成熟的预孵育法(acDCs)和直接检测法检测 1 型糖尿病(T1DM)患者外周血中胰岛全长抗原特异性 T 细胞反应的优劣。方法 选取 2012 年 3 月至 2014 年 8 月中南大学湘雅二医院代谢内分泌科就诊的 T1DM 患者 16 例(男 9 例,女 7 例),年龄( $28.5 \pm 9.4$ )岁,病程 6.0(2.8~8.3)个月;另纳入年龄、性别匹配的健康对照 12 名;ELISPOT-acDCs 法和直接检测法检测 3 种胰岛抗原谷氨酸脱羧酶 65(GAD<sub>65</sub>)、C 肽、胰岛素(INS)特异性干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )分泌性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应的斑点数,比较不同检测方法下各种胰岛抗原及联合 3 种抗原特异性 T 细胞反应的阳性比例。结果 ELISPOT-acDCs 法检测 T1DM 患者 GAD<sub>65</sub> 特异性 IFN- $\gamma$  分泌性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应的阳性比例为 1/16,INS 反应阳性比例为 6/16,C 肽反应阳性比例为 4/16,其中 INS 反应阳性比例高于健康对照组的 0/12( $P=0.024$ );联合 3 种抗原的 T 细胞阳性比例为 9/16,明显高于健康对照组的 1/12( $P=0.016$ )。ELISPOT 直接法检测 GAD<sub>65</sub> 特异性 T 细胞反应阳性比例为 2/16,INS 反应阳性比例为 1/16,C 肽反应阳性比例 7/16,其中 C 肽反应阳性比例高于健康对照组的 1/12,但差异无统计学意义( $P=0.088$ )。联合 3 种抗原检测 T 细胞反应阳性比例 8/16,高于健康对照组的 1/12( $P=0.039$ );与直接法比较,仅 acDCs 法检测下的 INS 特异性 T 细胞反应阳性比例较高( $P=0.041$ );两种方法在余各抗原间比较差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。结论 多种全长胰岛抗原 ELISPOT-acDCs 法及直接法检测胰岛抗原特异性 T 细胞反应均可可为 T1DM 患者提供细胞免疫学分型诊断价值;ELISPOT-acDCs 法检测 INS 特异性 T 细胞反应的灵敏度优于 ELISPOT 直接检测法。

**【关键词】** 糖尿病,1 型; 酶联免疫斑点检测; T 细胞; 诊断

**基金项目:**国家重点研发计划项目课题(2018YFC2001005);欧洲糖尿病研究基金(EFSD/CDS/Lilly2009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20191128-02591

## Comparison of islet autoantigen-specific T cell response detected by direct enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay and accelerated co-cultured dendritic cells (acDCs) assay

Tang Wei, Liang Huiying, Yuan Jiao, Chao Chen, Huang Gan, Zhou Zhiguang, Yang Lin

Department of Metabolism and Endocrinology, Key Laboratory of Diabetes Immunology, Ministry of Education, the Second Xiangya Hospital, Central South University, National Clinical Research Center for Metabolic Diseases, Changsha 410011, China

Tang Wei is working in the Department of Metabolism and Endocrinology, the First People's Hospital of Huaihua, Huaihua 418000, China

Corresponding author: Yang Lin, Email: yanglin\_nfm@csu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of enzyme-linked immunospot (ELISPOT) on accelerated co-cultured dendritic cells (acDCs) and direct detection of islet full-length antigen-specific T cell response in peripheral blood of patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM). **Methods** Sixteen patients with T1DM[9 males, 7 females, mean age( $28.5 \pm 9.4$ )years] and 12 age-and sex-matched healthy controls were selected in the Department of Metabolism and Endocrinology, the Second Xiangya Hospital between March 2012 and August 2014. The numbers of IFN- $\gamma$  secreting CD4<sup>+</sup> T cells responding to glutamic acid decarboxylase 65 (GAD<sub>65</sub>), C-peptide (CP) and insulin (INS) were detected by ELISPOT-acDCs and

ELISPOT-direct assays, respectively. The positive rate of islet autoantigen and associated antigen reactive T cells under different detection assays were compared. **Results** The positive rate for GAD<sub>65</sub>, INS, and CP antigen reactive T cells detected by ELISPOT-acDCs was 1/16, 6/16 and 4/16, respectively, and T cells positive for INS in T1DM patients were higher than that in the controls (0/12) ( $P=0.024$ ). Combining GAD<sub>65</sub>, CP and INS-ELISPOT-acDCs detection, the positive rate for CD4<sup>+</sup> T cells in T1DM patients was higher than that in the controls (9/16 vs 1/12,  $P=0.016$ ). The positive rate for GAD<sub>65</sub>, INS, and CP antigen reactive T cells detected by ELISPOT-direct detection was 2/16, 1/16 and 7/16, respectively, and T cells positive for CP was higher than that in the controls (1/12), but the difference was not statistically significant ( $P=0.088$ ). Likewise, the positive rate for CD4<sup>+</sup> T cells was higher in T1DM patients than that in the controls by combined GAD<sub>65</sub>, CP and INS-ELISPOT-direct detection (8/16 vs 1/12,  $P=0.039$ ). Compared with the ELISPOT-direct assay, the positive rate of INS antigen specific T cell response detected by ELISPOT-acDCs was higher ( $P=0.041$ ). No statistical differences of other antigens were found between the two groups (all  $P>0.05$ ). **Conclusions** Both multiple islet antigens-combined CD4<sup>+</sup>-ELISPOT-acDCs and direct assays could provide diagnostic value of cellular immunology for T1DM patients. The ELISPOT-acDCs assay is superior to the ELISPOT-direct assay in the detection of INS antigen-specific T cell response.

**【Key words】** Diabetes mellitus, type 1; Enzyme-linked immunospot assay; T cells; Diagnosis

**Fund program:** National Key R&D Program of China (2018YFC2001005); European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/CDS/Lilly2009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20191128-02591

经典 1 型糖尿病 (T1DM) 是在遗传易感基础上, 由环境因素触发, 从而引发的 T 细胞介导的胰岛  $\beta$  细胞自身免疫破坏的疾病。研究表明, 从发病机制角度使用高敏感的酶联免疫斑点法 (ELISPOT) 检测胰岛谷氨酸脱羧酶 65 (GAD<sub>65</sub>) 反应性 T 细胞, 可以有效地提高该病的诊断效率<sup>[1]</sup>, 基于人类白细胞抗原 (HLA)-II 类易感基因与 T1DM 之间的密切关系, CD4<sup>+</sup> T 细胞在 T1DM 发病中的核心作用。而外周血中自身反应性 T 细胞的数量极少, 限制了 T 细胞检测的发展。ELISPOT 是目前国际上公认的灵敏度及特异度均高的 T 细胞检测方法, 既能反映细胞频率, 又能兼顾其免疫活性<sup>[2]</sup>。全长的胰岛抗原蛋白可以覆盖更多的表位信息, 可同时检测各种基因型的患者, 显著扩大了检测人群; 由于传统的 ELISPOT 对某些全长的胰岛抗原蛋白敏感性低, 多限于抗原肽段的检测<sup>[3]</sup>。近年来新兴的 ELISPOT 预孵育法即细胞因子鸡尾酒法加速树突状细胞成熟的预孵育方法 (accelerate co-culture dendritic cells assays, acDCs)<sup>[4]</sup>, 较传统的预孵育法大大提升了检测的灵敏度, 具备较好的应用前景。本研究比较了两种方法检测 T1DM 患者胰岛抗原特异性干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 分泌性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应的差异, 旨在探讨何种方法更利于 T1DM 的细胞免疫分型诊断。

## 对象与方法

### 一、研究对象

1. T1DM 患者: 16 例, 来源于 2012 年 3 月至

2014 年 8 月中南大学湘雅二医院代谢内分泌科就诊的患者。其中男 9 例, 女 7 例, 年龄 (28.5 $\pm$ 9.4) 岁, 病程 6.0 (2.8~8.3) 个月。纳入标准: (1) 根据 1999 年世界卫生组织 (WHO) 提出的诊断标准诊断为糖尿病; (2) 胰岛自身抗体阳性; (3) 胰岛素 (INS) 依赖治疗。排除特殊类型糖尿病及妊娠糖尿病, 急性感染及其他自身免疫相关性疾病。

2. 健康对照: 12 名, 来源于健康体检者, 其中男 7 名, 女 5 名, 年龄 (29.0 $\pm$ 5.7) 岁, 无糖尿病及自身免疫性疾病家族史, 75 g 口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 空腹血糖 < 6.1 mmol/L, 糖负荷后 2 h 血糖 < 7.8 mmol/L, 胰岛自身抗体阴性。

本研究为基于横断面研究的诊断试验, 通过中南大学湘雅二医院伦理委员会批准, 批件号: 2010-S(001), 所有研究对象均签署知情同意书。

### 二、研究方法

1. 谷氨酸脱羧酶抗体 (GADAb)、酪氨酸磷酸酶抗体 (IA2Ab) 及锌转运体 8 抗体 (ZnT8Ab) 检测及阳性判定: 采用中南大学代谢内分泌研究所建立的放射配体法<sup>[5-6]</sup>。

2. 人外周血中单个核细胞 (PBMC) 的分离纯化及培养: 抽取空腹新鲜肝素抗凝血 10 ml, 利用密度梯度离心法, 淋巴细胞分离液 (美国 Sigma 公司) 分离 PBMCs, 加入 AIM-V 培养基 (美国 Invitrogen 公司) 重悬细胞浓度到  $3.8 \times 10^6$ /ml, 用于接下来的 ELISPOT 检测。

3. IFN- $\gamma$  分泌性 CD4<sup>+</sup> T 细胞 ELISPOT 检测:

(1) 直接检测法: IFN- $\gamma$  抗体包被聚偏氟乙烯

(PVDF)膜板(荷兰 U-CyTech 公司)4℃过夜,加入 200 μl/孔的 RPMI1640(美国 Gibco 公司)+10% 人血清封闭,分别加入每孔 20 μl 的 GAD<sub>65</sub>、内对照(25 μg/ml;瑞典 Diamed 公司),C 肽[0.1 μmol/ml, 吉尔生化(上海)有限公司],INS(25 μg/ml,丹麦诺和诺德公司)及阳性对照 Pentaxim 五联疫苗(1 μg/ml, 法国赛诺菲公司),每孔加入 3×10<sup>5</sup> 个 PBMC 及白细胞介素(IL)-2(2.5 U/ml,美国 R&D 公司),设 2~3 个平行孔。37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 20~24 h。充分洗板后先后加入 90 μl/孔生物素标记的二抗及酶标记的抗生物素抗体(荷兰 U-CyTech 公司),孵育洗板后加入显色剂(德国 Roch 公司),室温至斑点出现;ELISPOT 读板仪自动计算斑点数及其他参数。(2)预孵育检测(acDCs 法):第 1 天 48 孔 PVDF 膜板加入 AIM-V+粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(1 000 U/ml)+IL-4(500 U/ml)重悬的 PBMC(1.0×10<sup>6</sup>/100 μl, 100 μl/孔),分别加入 1 μl/孔的抗原 GAD<sub>65</sub>、内对照、INS(10 μg/ml)及阳性对照 Pentaxim 五联疫苗(1 μg/ml),37℃培养箱过夜;第 2 天加入 100 μl/孔的 AIM-V+肿瘤坏死因子 α(TNF-α)(1 000 U/ml)+IL-1β(10 ng/ml)+前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)(1 μmol/ml)+IL-7(0.5 ng/ml),加入抗原 C 肽(10 μmol/ml),培养箱继续过夜;第 3 天收集离心非贴壁细胞,加至 IFN-γ 抗体包被过夜的 96 孔 PVDF 膜板,培养箱孵育 6 h,洗板、显色、斑点读数同直接检测法。

T 细胞反应阳性的判定方法:净斑点数>自身内对照的均数+3 个标准差。净斑点数=实验抗原孔斑点数-内对照孔斑点数。

### 三、统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件包完成所有数据分析。计量资料若服从正态分布采用  $\bar{x} \pm s$  表示,不服从正态分布采用中位数(范围)表示;计数资料用阳性数或构成比表示,两组间比较采用 Fisher 确切概率法( $n < 40$ )。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. ELISPOT-acDCs 法检测各胰岛抗原特异性 T 细胞反应的阳性比例:ELISPOT-acDCs 法检测 GAD<sub>65</sub> 特异性 T 细胞反应阳性比例为 1/16,INS 特异性 T 细胞反应阳性比例为 6/16,C 肽特异性 T 细胞反应阳性比例为 4/16;健康对照组 GAD<sub>65</sub> 和 INS 特异性 T 细胞反应阳性比例均为 0/12,C 肽阳性比例

为 1/12。与健康对照组相比,T1DM 组 INS 特异性 T 细胞反应阳性比例较高( $P=0.024$ )。T1DM 组中对任一种抗原阳性,即联合 3 种抗原联合检测的 T 细胞阳性反应比例为 9/16,明显高于健康对照的 1/12( $P=0.016$ ),其中 GAD<sub>65</sub>、C 肽及 INS 3 种抗原特异性 T 细胞反应均阳性患者 1 例。因此,联合抗原 ELISPOT-acDCs 法检测的灵敏度及特异度分别为 0.563(9/16)及 0.917(11/12)。

2. ELISPOT 直接法检测各胰岛抗原特异性 T 细胞反应的阳性比例:ELISPOT 直接法检测 GAD<sub>65</sub> 特异性 T 细胞反应阳性比例为 2/16,INS 特异性 T 细胞反应阳性比例为 1/16,C 肽特异性 T 细胞反应阳性比例为 7/16;健康对照组直接法检测 GAD<sub>65</sub> 和 INS 特异性 T 细胞阳性反应比例均为 0/12,C 肽阳性比例为 1/12;与健康对照组相比,T1DM 组 C 肽抗原特异性 T 细胞阳性反应比例较高,但差异无统计学意义( $P=0.088$ )。在 T1DM 组,ELISPOT 直接法 3 种抗原联合检测的 T 细胞阳性反应比例为 8/16,高于健康对照组的 1/12( $P=0.039$ ),其中 GAD<sub>65</sub>、C 肽及 INS 3 种抗原特异性 T 细胞均阳性反应患者 1 例。因此,联合抗原 ELISPOT 直接法检测的灵敏度及特异度分别为 0.500(8/16)及 0.917(11/12)。

3. 两种 ELISPOT 检测方法下 T 细胞阳性反应比例的比较:在 16 例 T1DM 患者中,ELISPOT 直接法有 8 例呈任一抗原 T 细胞反应阳性(8/16),ELISPOT-acDCs 法有 9 例呈任一抗原 T 细胞反应阳性(9/16),二者比较差异无统计学意义( $P=0.723$ )。acDCs 法检测 INS 特异性 T 细胞阳性反应比例为 6/16,高于直接法中的 INS 特异性 T 细胞阳性反应比例 1/16( $P=0.041$ )。GAD<sub>65</sub> 及 C 肽的 T 细胞阳性反应比例在两种方法间差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

## 讨 论

T1DM 是胰岛自身抗原反应性 T 细胞介导的胰岛遭受特异性破坏所致的自身免疫疾病。胰岛自身抗体只是胰岛免疫破坏的体液免疫学标志物,而 T 细胞是核心致病因素<sup>[7]</sup>。其中 CD4<sup>+</sup> T 细胞在抗原识别、激活过程中通过分泌炎症细胞因子,活化吞噬细胞吞噬及直接细胞毒性作用导致胰岛 β 细胞损害。自身反应性 T 细胞的检测在发病机制层面反映了患者体内的免疫状态,在免疫诊断分型、免疫耐受评估及预测胰岛功能等科研中广泛应

用<sup>[8-10]</sup>。ELISPOT 直接检测法具备用时少、需血量少、操作相对简单的优势,但检测抗原限制在胰岛抗原上的 HLA- II 类分子肽段,检测人群有限<sup>[3]</sup>,故诊断灵敏度亦报道不一。而全长的胰岛自身抗原可以覆盖更广的表位信息,对基因型的无限制性可显著扩大检测人群,有效地提高检测的灵敏度。从方法学上进一步提高 ELISPOT 灵敏度和特异度关键还在于提高信噪比,即增加特异性斑点数,减少非特异性斑点数。传统的预孵育法虽然能促进 ELISPOT 特异性斑点的形成,提高 T 细胞对全长抗原的识别,但其费时、耗材、需血量多。近年提出的 acDCs,克服了传统树突状细胞预孵育法的缺陷,其在加入的细胞因子刺激下加速树突状细胞的成熟,经过 48 h 的预孵育即可使得树突状细胞成熟从而发挥递呈抗原作用,增加了抗原识别位点,在提高检测灵敏度的同时可增加特异性斑点,不仅检测人群不受限,需血量较少,而且明显缩短了细胞培养时间<sup>[4]</sup>。

INS 原 (proinsulin, PI) 及其裂解产物 INS 及 C 肽抗原,是胰岛自身抗原中特异性最高的靶抗原<sup>[11]</sup>。Mallone 等<sup>[12]</sup>在创建的 CD8<sup>+</sup>T 细胞-IFN- $\gamma$  ELISPOT 基础上首次探讨了 acDCs 法检测胰岛全长抗原自身反应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞-IFN- $\gamma$  ELISPOT,其研究表明联合 GAD<sub>65</sub>、PI、C 肽及 INS 等抗原对 T1DM 的诊断灵敏度可达 83.3%<sup>[4]</sup>。该法的优势在于对基因型的无限制性,可明显扩大检测的人群。本课题组前期研究探讨了 ELISPOT 直接检测法检测全长胰岛抗原自身反应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞对我国 T1DM 患者的免疫分型诊断价值,并在方法学上进行了优化方案探讨,研究结果显示 T1DM 患者无论是联合抗原还是针对单独的 GAD<sub>65</sub>、C 肽,其 T 细胞反应阳性率均明显高于健康对照组,具备较高的灵敏度及特异度<sup>[13-15]</sup>。运用此法本课题组在抗体阴性的 T2DM 患者中筛查出了一部分呈胰岛自身抗原 T 细胞反应阳性的患者,这部分患者胰岛功能更差。本研究结果再次表明联合抗原检测的情况下,无论是 acDCs 法还是直接法,其 T 细胞阳性比例均明显大于健康对照组,这提示 acDCs 法与直接法一样具有对 T1DM 患者细胞免疫学分型的诊断价值,同时本研究发现仅 1 例患者表现为两种检测方法下,对 3 种胰岛抗原的 T 细胞反应均呈阳性。进一步分析该患者的临床资料,发现该患者具有病程很短、胰岛功能极差及 GAD-Ab 滴度高等特点,是否提示该临床特征人群表现为更明显的细胞免疫紊

乱有待扩大样本量进一步探讨。

ELISOPT 直接检测法 INS 特异性 T 细胞阳性比例仅 1/16, acDCs 法检测的 INS 反应性 T 细胞阳性比例(6/16)明显高于直接检测法,与 Martinuzzi 等<sup>[4]</sup>报道结果相似(40.9%),依据此研究结果推测改良的 acDCs 法在检测包括 INS 在内的全长胰岛抗原蛋白上可能占有优势,分析可能与 ELISPOT 直接检测法中采用的 INS 抗原大多为十几个氨基酸长度的 INS 肽段有关。作为相对较为复杂的全长胰岛蛋白抗原,INS 中含有 51 个氨基酸,远超过 C 肽的长度,而直接检测法略过了 48 h 的预孵育及细胞因子刺激树突状细胞增殖成熟时间,可能在某种程度上限制了抗原提呈细胞对胰岛抗原的充分提呈,短时间内尚不足以将全长的复杂蛋白 INS 的表位信息提呈供胰岛自身反应性 T 细胞识别,故检出率偏低。有待扩大研究对象对比后进一步验证。

综上所述,多种胰岛抗原 ELISPOT-acDCs 法检测胰岛自身反应性 T 细胞作为新型的 T 细胞检测方法,亦可为 T1DM 细胞免疫学分型诊断提供一定价值;且 ELISPOT-acDCs 法在检测 INS 反应性 T 细胞上可能优于 ELISPOT 直接检测法,但联合 3 种抗原检测的情况下,两种方法的灵敏度及特异度差异无统计学意义,且 acDCs 法在试剂成本和耗材上花费较多,操作时间和工序均明显较直接法繁琐复杂,故总的性价比仍以直接法更优。若将该技术推广应用于临床糖尿病的免疫分型诊断,仍然首推 ELISPOT 直接检测法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] 张翼,周智广,杨琳,等.部分特发性 1 型糖尿病存在谷氨酸脱羧酶 65 反应性 T 细胞[J].中华医学杂志,2007,87(16):1102-1105. DOI: 10.3760/j.issn:0376-2491.2007.16.007.
- [2] Schloot NC, Meierhoff G, Karlsson Faresjö M, et al. Comparison of cytokine ELISpot assay formats for the detection of islet antigen autoreactive T cells. Report of the third immunology of diabetes society T-cell workshop[J]. J Autoimmun, 2003, 21(4):365-376. DOI: 10.1016/s0896-8411(03)00111-2.
- [3] Petrich de Marquesini LG, Fu J, Connor KJ, et al. IFN-gamma and IL-10 islet-antigen-specific T cell responses in autoantibody-negative first-degree relatives of patients with type 1 diabetes[J]. Diabetologia, 2010, 53(7):1451-1460. DOI: 10.1007/s00125-010-1739-3.
- [4] Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault MC, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses[J]. Blood, 2011, 118(8):2128-2137. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326231.
- [5] Huang G, Yin M, Xiang Y, et al. Persistence of glutamic acid

- decarboxylase antibody (GADA) is associated with clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in adults: a prospective study with 3-year follow-up[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, 32(6):615-622. DOI: 10.1002/dmrr.2779.
- [6] Xiang Y, Huang G, Zhu Y, et al. Identification of autoimmune type 1 diabetes and multiple organ-specific autoantibodies in adult-onset non-insulin-requiring diabetes in China: a population-based multicentre nationwide survey[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2019, 21(4):893-902. DOI: 10.1111/dom.13595.
- [7] Thrower SL, James L, Hall W, et al. Proinsulin peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man phase I safety study[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 155(2): 156-165. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03814.x.
- [8] 罗说明, 李霞, 周智广. 自身免疫性 1 型糖尿病前期的精准诊断[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(18): 1365-1368. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.18.002.
- [9] Herold KC, Brooks-Worrell B, Palmer J, et al. Validity and reproducibility of measurement of islet autoreactivity by T-cell assays in subjects with early type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2009, 58(11):2588-2595. DOI: 10.2337/db09-0249.
- [10] 刘颖丰, 刘芳. 1 型糖尿病预测新进展[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(4): 313-316. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.04.017.
- [11] So M, Elso CM, Tresoldi E, et al. Proinsulin C-peptide is an autoantigen in people with type 1 diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(42): 10732-10737. DOI: 10.1073/pnas.1809208115.
- [12] Mallone R, Martinuzzi E, Blancou P, et al. CD8<sup>+</sup> T-cell responses identify beta-cell autoimmunity in human type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2007, 56(3): 613-621. DOI: 10.2337/db06-1419.
- [13] 袁娇, 崔秋燕, 唐维, 等. IL-2 和 IL-7 对优化检测 I 型糖尿病患者谷氨酸脱羧酶 65 特异性 T 细胞反应的比较[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017, 42(11):1257-1262. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2017.11.003.
- [14] Wang Z, Zheng Y, Tu Y, et al. Immunological aspects of fulminant type 1 diabetes in Chinese[J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016:1858202. DOI: 10.1155/2016/1858202.
- [15] Liang H, Cheng Y, Tang W, et al. Clinical manifestation and islet  $\beta$ -cell function of a subtype of latent autoimmune diabetes in adults (LADA): positive for T cell responses in phenotypic type 2 diabetes[J]. *Acta Diabetol*, 2019, 56(11): 1225-1230. DOI: 10.1007/s00592-019-01391-w.

(收稿日期:2019-11-28)

(本文编辑:郭瑞)

·读者·作者·编者·

## 本刊“医药卫生策略探讨”栏目征稿

该栏目主要对我国医药卫生事业的现状、存在的问题和发展趋势并结合本单位的工作提出评论和探讨。通过本栏目的交流为我国医药卫生事业的发展与改变提出新思路、新方法和新经验,以进一步推动我国医药卫生事业的发展。

1. 撰稿内容:(1)临床诊疗模式、医院管理模式的探索和创新;(2)医疗政策、法规及医学哲学、伦理学的研究与阐述;(3)临床医学与公共卫生如何整合,基础研究与临床实践如何结合;(4)医学教育、科研管理、医疗保险、社区医疗、农村医疗改革等;(5)医学教学和临床诊治与信息工程技术的结合;(6)重大疾病或灾难发生时的预防应急问题;

(7)药物开发、药事管理;(8)中西医结合研究的新思路和新经验;(9)医疗服务与医疗事故等。

2. 写作要求:(1)文题要醒目,有针对性,避免立题太泛,可以设立副标题;(2)根据国内外现状开门见山提出见解进行论述,要结合本单位的实际工作提出建设性措施,提出解决问题的方法;(3)文章要有个人的独特见解,进行导向性指引或提出理论假说;(4)侧重政策性、方向性或者改革方面的内容和变化;(5)文章要求简洁明了,观点鲜明,语言精炼,避免泛泛而谈;(6)字数一般不超过 4 000 字。

欢迎广大医药卫生工作者踊跃投稿和提供组稿线索。