

基于谷氨酸脱羧酶 65 的口服疫苗对链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病小鼠的治疗作用

吴伊玲, 尤 琪, 吴 洁*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198)

摘 要 探讨基于谷氨酸脱羧酶 65(GAD65)的口服疫苗对链脲佐菌素(STZ)诱导的 1 型糖尿病(T1D)模型小鼠的治疗作用。采用小剂量多次腹腔注射 STZ 建立 T1D 模型。使用溶剂扩散法制备融合蛋白 CTB-GADIII 与海藻酸钙纳米疫苗(Ca-Alg-GADIII), 灌胃 T1D 小鼠, 1 周 1 次, 连续 5 周, 每周记录小鼠血糖和体重。通过糖耐量测定(OGTT)和胰腺组织病理分析研究口服疫苗抗 T1D 药效学。通过 ELISA 检测血清中谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)和胰岛素自身抗体(IAA)、相关细胞因子 IL-4、IFN- γ 和 TGF- β 1 的含量, 流式检测 CD4⁺T 细胞分型情况, 对口服疫苗抗 T1D 作用的免疫学机制进行初步探讨。结果显示, 疫苗免疫后的小鼠空腹血糖有一定的改善, 糖耐量提高, 胰腺损伤减少, 胰岛素分泌增加, GADA 及 IAA 滴度显著下降, 肠系膜淋巴结和胰腺淋巴结中 CD4⁺T 细胞免疫平衡有一定的改善。实验结果表明 Ca-Alg-GADIII 口服疫苗对 STZ 诱导的 T1D 小鼠具有一定的治疗作用。

关键词 1 型糖尿病; 谷氨酸脱羧酶 65; 海藻酸钙; 口服疫苗; 免疫耐受

中图分类号 R967 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2021)05-0614-08

doi: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 20210515

引用本文 吴伊玲, 尤琪, 吴洁. 基于谷氨酸脱羧酶 65 的口服疫苗对链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病小鼠的治疗作用[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(5): 614–621.

Cite this article as: WU Yiling, YOU Qi, WU Jie. Therapeutic effect of oral vaccine based on glutamate decarboxylase 65 on streptozotocin-induced type 1 diabetic mice[J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(5): 614–621.

Therapeutic effect of oral vaccine based on glutamate decarboxylase 65 on streptozotocin-induced type 1 diabetic mice

WU Yiling, YOU Qi, WU Jie*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract To investigate the therapeutic effect of oral vaccine based on glutamate decarboxylase 65 (GAD65) on streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetic (T1D) mice, the mice model of T1D was established by intraperitoneal injection of low dose multiple STZ. CTB-GADIII encapsulated with calcium alginate (Ca-Alg-GADIII) was formulated using crosslinking technology with sodium alginate and calcium chloride, and was administered intragastric to T1D mice once a week for 5 consecutive weeks. Blood glucose and body weight of the mice were recorded weekly, and pharmacodynamics against T1D of Ca-Alg-GADIII were investigated by glucose tolerance assay (OGTT) and pancreatic histopathological analysis. The levels of glutamic acid decarboxylase antibody (GADA), and insulin autoantibody (IAA) and related cytokines (IL-4, IFN- γ , TGF- β 1) in serum were detected by ELISA, and the CD4⁺T cell subsets were detected by flow cytometry. The immunological mechanism of oral vaccine against T1D was preliminarily discussed. The results showed that the disease-related indicators improved in immunized mice: fasting blood glucose improved, glucose tolerance and insulin secretion increased, pancreatic injury decreased, autoantibodies like GADA and IAA titers significantly decreased, and CD4⁺T cell immune balance in mesenteric lymph node (MLN) and pancreatic lymph node (PLN) improved to some extent. The results suggest that oral vaccine Ca-Alg-GADIII has some therapeutic effect on STZ-induced T1D mice.

Key words type 1 diabetes; glutamic acid decarboxylase; calcium alginate; oral vaccine; immune tolerance

1 型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)是一种自身免疫性疾病,表现为机体对胰腺抗原成分免疫耐受,自身反应性 T 细胞对胰腺 β 细胞产生免疫性破坏,导致胰岛素分泌绝对不足^[1-2]。一旦发病,患者需要终身使用外源胰岛素并定期监测血糖水平。重建机体对自身抗原的免疫耐受是研制相关疫苗防治 T1D 的关键。

在疫苗开发方面,抗原表位的选择十分重要,需要选择相关抗原分子上合适的抗原肽。谷氨酸脱羧酶 65(glutamic acid decarboxylase 65, GAD65)为 T1D 自身抗原,谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)是 T1D 最早出现且阳性率最高的自身抗体,是非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠由外周胰腺炎发展为内部浸润的关键靶点^[3]。给雌性 NOD 小鼠注射外源性 GAD65,可以明显降低其 T1D 发病率^[4]。GAD65 敲除的 NOD 小鼠发生 T1D 的概率显著降低且发病时间明显推后^[5]。临床研究显示,GAD65 明矾制剂(或联合维生素 D)免疫可以维持患者 β 细胞功能,改善 T1D 的临床指标^[6-7]。

实验室前期选择 GAD65 中与疾病发生相关的关键表位肽段(p217 ~ 236, p524 ~ 538, p290 ~ 306)形成的靶抗原组合肽 GADIII 作为分子组分,使用霍乱毒素 B 亚基(cholera toxin subunit B, CTB)作为佐剂分子,成功构建得到原核表达重组菌株 *E. coli* BL21-pET28a: CTB-GADIII^[8],诱导表达获得的融合蛋白 CTB-GADIII 滴鼻免疫 NOD 小鼠可以显著降低 T1D 发病率。

临床上疫苗的给药方式大多为注射,其次为滴鼻,而口服制剂由于胃肠道复杂的生理环境限制了其开发,但近年来也有很多成功的尝试和报道^[9-10]。

海藻酸钠(sodium alginate, SA)分子中含有大量的羧基,具有一定的生物黏附性,属于黏膜黏附性纳米材料,能够保护多肽蛋白不受胃酸的破坏。此外,制备成的纳米粒能够持续缓慢地在肠黏膜部位释放,通过 M 细胞将树突延伸至腔内捕获抗原^[11],这为药物或疫苗的靶向输送提供了可能性。本研究尝试应用海藻酸盐作为载体制备口服纳米疫苗制剂,靶向肠道进行免疫诱导,进而防治 T1D。参考相关研究^[12],使用溶剂扩散法制备了 GADIII-海藻酸钙纳米粒(Ca-Alg-GADIII)。以多次小剂量腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导的 T1D 小鼠模型

为研究对象,考察口服疫苗 Ca-Alg-GADIII 对 T1D 小鼠的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

STZ(美国 Sigma 公司);抗小鼠胰岛素抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);小鼠 ELISA 试剂盒(GADA、GADA-IgG1、GADA-IgG2a、GADA-IgG2b、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1, 上海通蔚生物科技有限公司);流式抗体(FITC-CD4、PE-CD25、PE-Cy7-RoR γ t、Percp-Foxp3、APC-GATA3、PE-T-bet, 美国 Biolegend 公司);破膜固定剂(美国 BD 公司);红细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

5D-1 型血糖仪(台湾博仕珑公司);Spark 多功能微孔板检测仪(瑞士 Tecan 公司);流式细胞仪 AccuriTM C6 FCM(美国 BD 公司);Zetasizer Nano 粒度电位仪(马尔文仪器公司)。

1.3 菌种

诱导型表达菌株 *E. coli* BL21-pET28a: CTB-GADIII, 具有卡那霉素抗性,本实验室保存。

1.4 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,4 ~ 5 周龄,购自浙江省医学科学院,合格证号:20200610Abzz0118000762。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 融合蛋白 CTB-GADIII 的纯化及 Ca-Alg-GADIII 的制备

GADIII 融合蛋白的纯化^[8]及海藻酸钙纳米粒的制备^[12]分别参考相关文献进行。

2.2 T1D 小鼠模型的建立及动物免疫

4 ~ 5 周龄的 C57BL/6 小鼠适应 1 周后,禁食 14 h,按 50 mg/kg 的剂量腹腔注射 STZ 0.1 mL,每天 1 次,连续 5 d。连续 14 d 监测血糖,以空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 为造模成功标准,选取造模成功小鼠,随机分成 4 组:模型组、空载体对照组(Vehicle 组),融合蛋白 CTB-GADIII 低剂量组(20 μ g),融合蛋白 CTB-GADIII 高剂量组(100 μ g),一周给药 1 次,共 5 次。

2.3 血糖、体重、糖耐量检测

自造模起使用血糖仪动态监测各只小鼠的尾静脉血糖水平,同时记录相应时间点的各只小鼠的准确体重。

给药结束后,各组选取5~6只小鼠用于葡萄糖耐量试验。小鼠禁食过夜,期间自由饮水。次日测定小鼠基础血糖,之后立即灌胃新鲜配制的葡萄糖生理盐水溶液,按照每20 g体重灌胃40 mg葡萄糖的量,分别经口给予葡萄糖,0,15,30,60,90,120 min测定小鼠尾静脉血糖,观察血糖变化趋势。

2.4 胰腺病理切片的制作及免疫组化分析

给药结束后,每组分别选取3只小鼠,无菌条件下取胰腺组织,于组织固定液中固定24 h。胰腺切片制作、HE染色及免疫组化均由中国药科大学病理与PDX药效评价平台完成。

选取3~4张小鼠胰腺切片进行HE染色,对整个切片进行全视野扫描,记录整个切片中胰岛数目及其病理情况。

小鼠胰腺切片用胰岛素抗体染色,检测胰岛素分泌情况。将制备好的不同组别小鼠胰腺切片(每组3只小鼠,每只3~4张切片)进行全视野扫描,每张切片随机选择截取5个视野,通过Image Pro Plus圈出各个视野图片中胰岛素阳性染色区域,以正常组对应像素点为对照,计算出各组胰岛素阳性面积。

2.5 血清中相关自身抗体及细胞因子的检测

每两周对小鼠进行一次眼眶取血,于4 000 r/min条件下离心5 min取上清液,所得血清于-80℃条件下冷冻保存。具体实验步骤按照试剂盒说明书要求进行。

2.6 流式细胞术检测T1D小鼠外周免疫器官CD4⁺T细胞

给药结束后,每组分别取3只小鼠处死,无菌条件下取出小鼠脾脏,肠系膜淋巴结(MLN)和胰腺淋巴结(PLN)浸泡于含胎牛血清(FBS)的缓冲液(PBS+1% FBS)的平皿中,于200目筛网上研磨,收集细胞悬液,加入总体积1/3的红细胞裂解液裂解红细胞。离心后加入含FBS的缓冲液洗涤并计数,调整各管细胞浓度,并进行表面染色,相应抗体:CD4-FITC(0.5 μL)和CD25-PE(0.5 μL),4℃下避光孵育40 min。用含FBS的缓冲液清洗后加入破膜液,4℃避光孵育40 min。进行核内转

录因子特异性染色,相应抗体:Foxp3-APC/T-bet-PE(0.5 μL)和RoRγt-APC/GATA3-APC(1 μL)。4℃下避光孵育30 min。加入含FBS的缓冲液,过200目筛网,转移至流式管后使用流式细胞仪检测,实验数据采用Flowjo软件进行分析。

2.7 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。如无特殊说明所有显著性均采用独立样本 t 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 融合蛋白CTB-GADIII的纯化及Ca-Alg-GADIII的制备

通过对工程菌*E. coli* BL21-pET28a: CTB-GADIII的培养、乳糖诱导及使用阳离子交换树脂,诱导表达并纯化了融合蛋白CTB-GADIII。如图1所示,12% SDS-PAGE电泳显示无明显其他杂蛋白条带,使用Image J图像处理软件计算目的蛋白条带灰度与泳道总蛋白灰度比值,分析可得蛋白纯度约为96%。非还原条件下可以看到复性后的冻干蛋白溶液在约35、50 kD处有条带,由于CTB易形成五聚体结构,目的蛋白主要为非共价结合形成的多聚体,电泳过程中容易被SDS解离成单一亚基,所以在单体相对分子质量17 kD处条带更浓。

通过溶剂扩散法,成功制备了Ca-Alg-GADIII。经检测,Ca-Alg-GADIII的Zeta电位为-67 mV,说

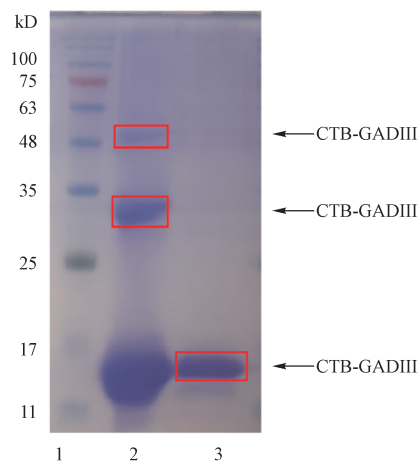


Figure 1 Renaturation of fusion protein CTB-GADIII (cholera toxin subunit B-glutamic acid decarboxylase)
Lane 1: Marker; Lane 2-3: CTB-GADIII under non-reducing/reducing conditions

明融合蛋白 CTB-GADIII 已经被成功包被形成纳米制剂。Ca-Alg-GADIII 的粒径约为 277 nm,符合纳米粒的粒径范围。

3.2 T1D 小鼠血糖、体重监测及糖耐量测定

给药结束后,对不同组别小鼠进行血糖检测,如图 2 所示:给药组小鼠血糖有明显改善(图 2-A),部分小鼠血糖恢复正常。同时,通过比较给药前后不同组别小鼠体重(图 2-B 左侧),发现每组小鼠体重都有不同程度的增长,但高剂量疫苗组小鼠的体重的增长率明显大于模型组及空载体对照组

(图 2-B 右侧, $P < 0.01$)。结果表明:口服疫苗有助于改善 T1D 小鼠的血糖,同时高剂量疫苗免疫有利于小鼠体重的增加。

给药结束后,通过 OGTT 检测 T1D 小鼠的葡萄糖代谢能力。结果如图 2-C 所示,各组小鼠血糖都呈现先升后降的趋势。通过计算曲线下面积(AUC)发现,高剂量疫苗组小鼠的 AUC 与空载体对照组($P < 0.05$)和模型组($P < 0.01$)存在显著差异,说明高剂量疫苗免疫可以明显提高 T1D 小鼠葡萄糖耐量。

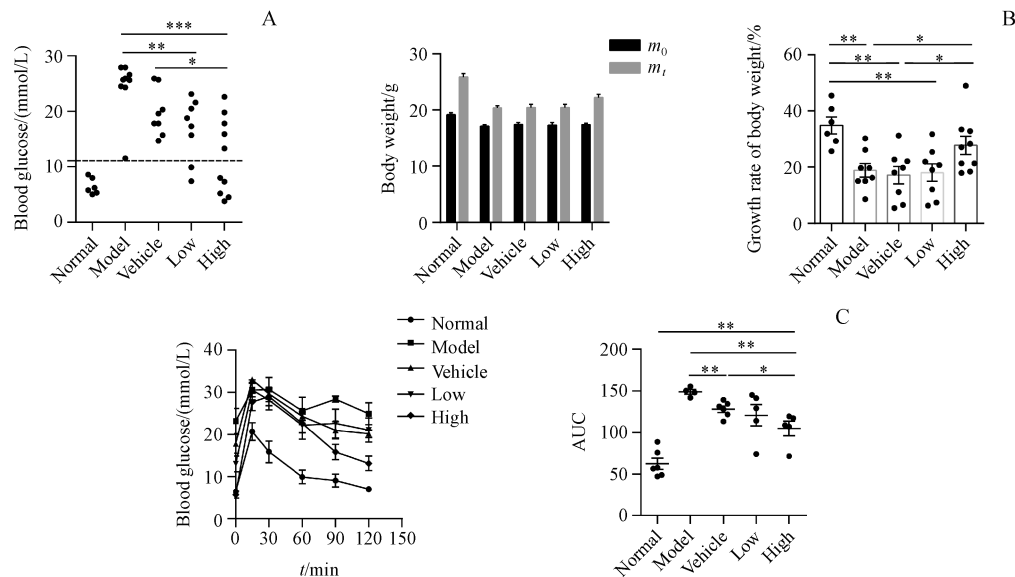


Figure 2 Ca-Alg-GADIII play a therapeutic effect on T1D mice ($\bar{x} \pm s, n = 4 - 8$)

A: Mice fasting glucose after immunization; B: Changes in body weight; C: Blood glucose regulation tested by OGTT

Low: Ca-Alg-GADIII (20 μ g); High: Ca-Alg-GADIII (100 μ g)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.3 T1D 小鼠胰腺 HE 染色及免疫组化

HE 染色结果及免疫组化结果如图 3-A, B 所示,免疫结束后,正常组小鼠胰岛多为圆形和椭圆形,胰岛面积较大,界限清楚;空载体对照组小鼠胰岛面积明显缩小,形态不规则,分布稀疏。疫苗组小鼠胰腺组织相较于空载体对照组病理情况有所改善。

通过对切片的观察,发现给药与否,不同组别小鼠胰岛个数及面积存在明显差异,因此按“2.4”项下方法将图像数据化。结果如图 3-C 所示,免疫结束后,高剂量疫苗组小鼠的胰岛个数相较于低剂量疫苗组略高,二者显著优于空载体对照组($P < 0.05$),而空载体对照组小鼠胰岛个数明显小于正常组($P < 0.001$)。胰岛素免疫组化分析结果表明

(图 3-D):疫苗免疫后小鼠胰腺中胰岛素阳性面积较空载体对照组明显升高($P < 0.05$)。结果表明:Ca-Alg-GADIII 可以降低发病过程中的胰腺损伤,促进胰岛素分泌,保护 T1D 小鼠残存胰岛的功能。

3.4 T1D 小鼠血清相关抗体及细胞因子的检测

血清中 T1D 相关自身抗体检测结果如图 4 所示:与空载体对照组和低剂量疫苗组相比,高剂量疫苗组小鼠血清中 GADA 含量明显降低($P < 0.05$),说明 Ca-Alg-GADIII 能够诱发 T1D 小鼠重建特异性的体液免疫耐受(图 4-A)。进一步对 GADA 的抗体分型进行分析,相比于空载体对照组和低剂量疫苗组,高剂量疫苗组小鼠血清中 GADA-IgG1 的含量明显下降(图 4-B),且与空载体对照组相比, GADA-IgG2a 的含量显著降低(图 4-C, $P <$

0.01)。3组小鼠血清中GADA-IgG2b(图4-D)含量均无差异。临床实验中常用IgG1/IgG2a的变化来判断疫苗诱导免疫应答的类型,如图4-E所示,

给药组小鼠血清中IgG1/IgG2a的比值均显著提高($P < 0.05$)。此外,本研究检测了血清中抗胰岛素抗体,考察免疫后是否发生了扩展耐受。如图4-F

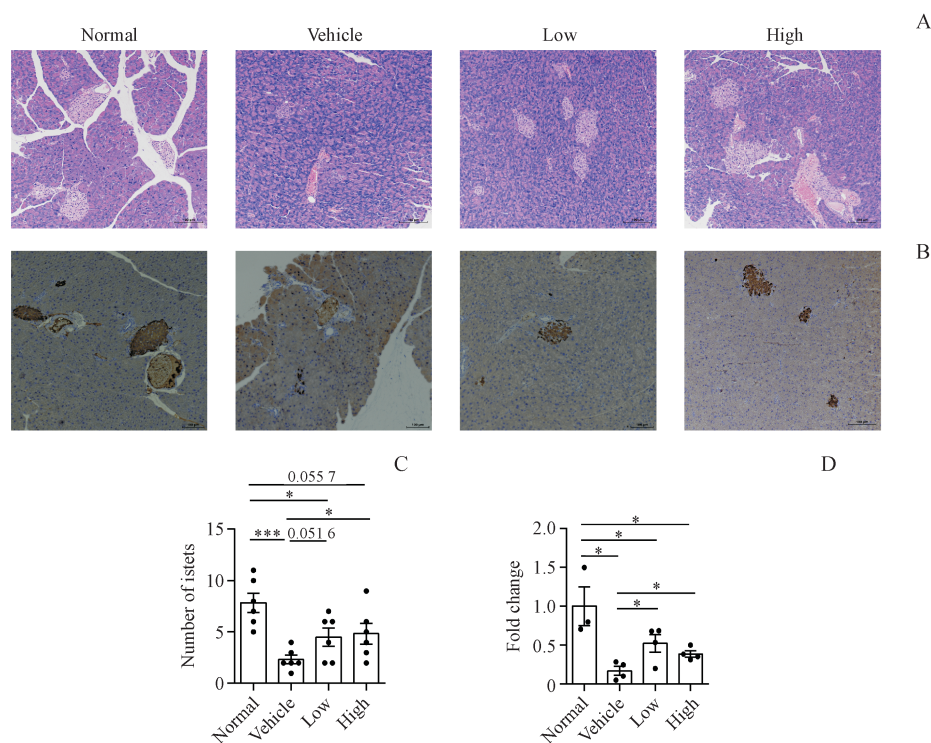


Figure 3 Ca-Alg-GADIII can sustain islet function of T1D mice ($\bar{x} \pm s, n = 3 - 6$)

A: Images of HE staining from the pancreatic islet ($\times 200$); B: Images of insulin immunohistochemistry from the pancreatic islet (brown, $\times 200$); C: Number of islets in different groups; D: Relative insulin-positive area

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

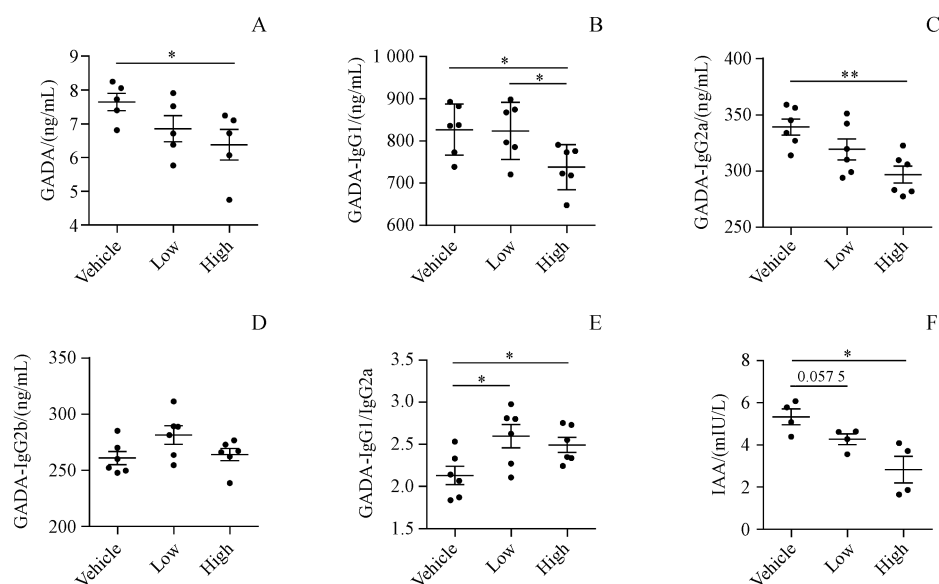


Figure 4 Ca-Alg-GADIII modulate the serum level of autoantibodies in T1D mice ($\bar{x} \pm s, n = 4 - 6$)

A: Glutamic acid decarboxylase antibody(GADA); B: GADA-IgG1; C: GADA-IgG2a; D: GADA-IgG2b; E: GADA-IgG1/IgG2a; F: Insulin autoantibody (IAA)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

所示:与空载体对照组相比,高剂量疫苗组抗胰岛素抗体明显下降($P < 0.05$),低剂量疫苗组也有所下降。

小鼠血清中相关细胞因子的含量如图 5 所示:

相较于空载体对照组,疫苗免疫组 IL-4 的含量未出现显著变化,高剂量疫苗组小鼠血清中 IFN- γ 的含量明显下降($P < 0.05$),而 TGF- $\beta 1$ (主要由 Treg 细胞产生)明显上升($P < 0.05$)。

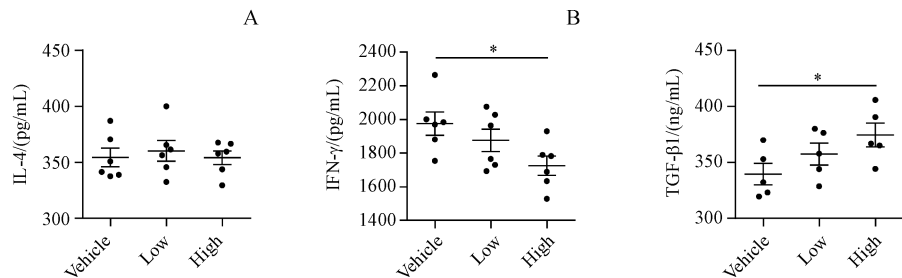


Figure 5 Ca-Alg-GADIII modulate the serum cytokine content of T1D mice ($\bar{x} \pm s, n = 5 - 6$)

A: IL-4; B: IFN- γ ; C: TGF- $\beta 1$

* $P < 0.05$

3.5 流式检测 T1D 小鼠 MLN、PLN 免疫平衡

在免疫耐受诱导的实验中, Th1/Th2, Th17/Treg 被视为反应机体免疫与炎症状态变化的重要

指标。本研究利用流式细胞术对 3 组小鼠 MLN、PLN 中 Th 细胞的几种亚型比例进行了分析,实验结果如图 6 和图 7 所示:5 次免疫后,相较于空载体

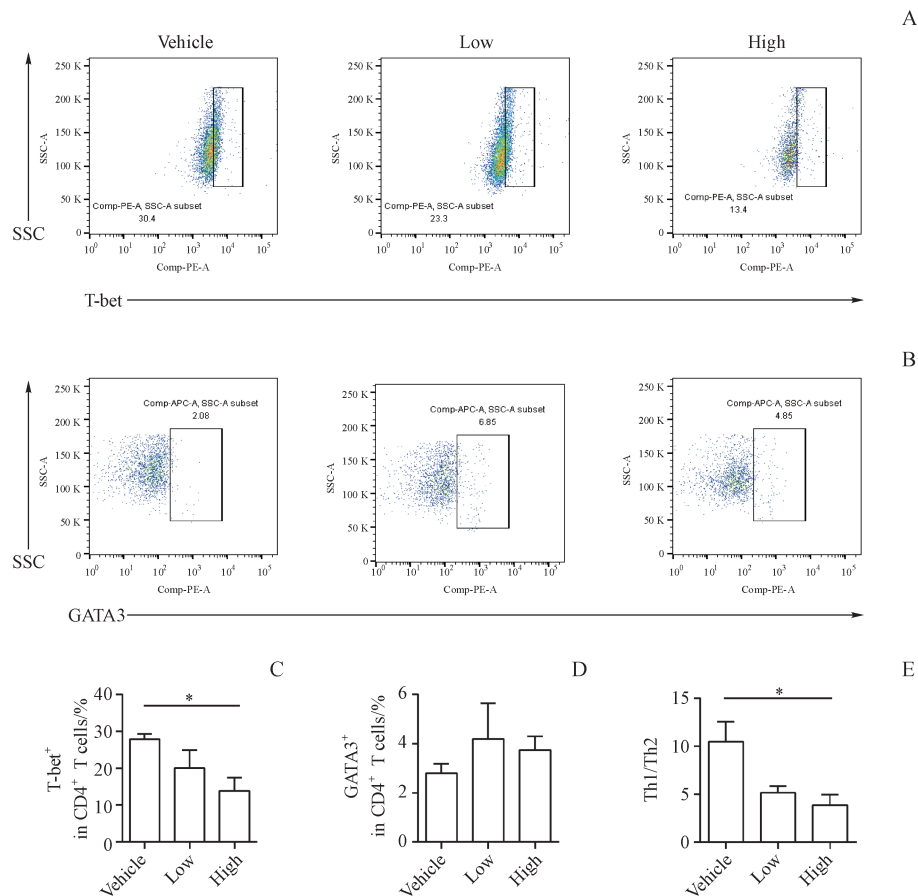


Figure 6 Ca-Alg-GADIII improves immunomodulatory balance of Th1 and Th2 in the mesenteric lymph node(MLN) of T1D mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A-B: Representative flow cytometry plots of the percentage show Th1 (A, T-bet $^+$ in CD4 $^+$ T cells) and Th2 (B, GATA3 $^+$ in CD4 $^+$ T cells) from MLN;

C-E: Statistical analysis results of Th1 (C), Th2 (D) and Th1/Th2 (E) from MLN

* $P < 0.05$

对照组,高剂量疫苗免疫小鼠MLN中促炎性Th1细胞及Th1/Th2的比例明显降低($P < 0.05$)。PLN中呈现相似的结果,相较于空载体对照组和低剂量蛋白组,高剂量疫苗组小鼠的促炎性Th1细胞比例(图7-C, $P < 0.05$)及Th1/Th2的比例(图7-E,

$P < 0.05$)也明显降低,Th2细胞没有明显变化。不过各组小鼠MLN和PLN中Th17/Treg数值差别不大(结果未显示)。实验结果表明:Ca-Alg-GADIII口服疫苗主要是通过抑制Th1型细胞分化、调控细胞免疫平衡介导免疫保护作用。

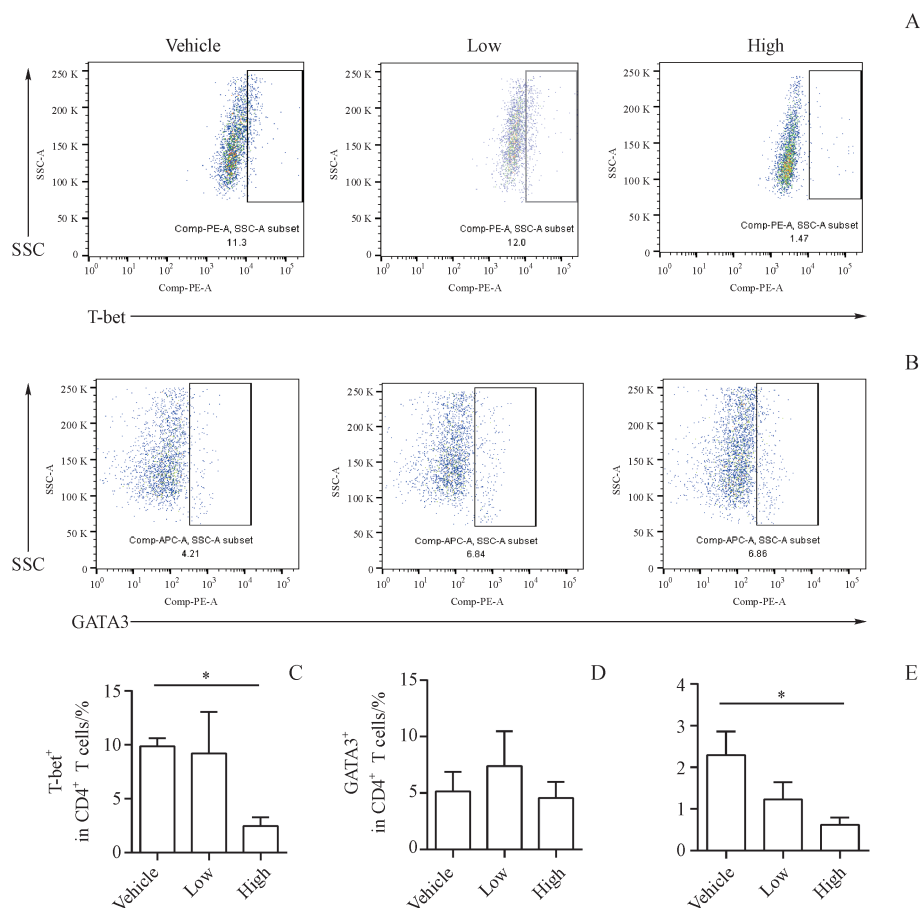


Figure 7 Ca-Alg-GADIII improves immunomodulatory balance of Th1 and Th2 in the pancreatic lymph node (PLN) of T1D mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A-B: Representative flow cytometry plots of the percentage show Th1 (A, T-bet⁺ in CD4⁺ T cells) and Th2 (B, GATA3⁺ in CD4⁺ T cells) from PLN; C-E:

Statistical analysis results of Th1 (C), Th2 (D) and Th1/Th2 (E) from PLN

* $P < 0.05$

4 讨论

疫苗免疫结果显示 Ca-Alg-GADIII 能缓解 T1D 小鼠的疾病进程,能改善胰腺组织的病理情况,保护胰岛 β 细胞的功能,具有一定的治疗作用。

正常个体中,Th1、Th2 型细胞处于相对平衡状态,但 T1D 个体中,内源性的 Th1 型细胞因子占据主导地位^[13-14],导致大量自身反应性 T 淋巴细胞浸润胰岛破坏 β 细胞。其中 Th1 与 Th17 可产生多种炎症细胞因子,也是 T1D 的刺激因素^[15-16];而 Th2 细胞可抑制 Th1 分化^[17],Treg 细胞与 Th17 相互拮抗,也

可抑制自身反应性 T 细胞对胰岛的攻击^[18]。它们之间的平衡是维持机体炎症与抗炎以及免疫平衡的重要因素^[19]。Ca-Alg-GADIII 疫苗免疫后小鼠体内自身免疫攻击相关的 Th1 被抑制,Th1/Th2 的比例降低,同时相关的自身抗体水平下降,显示口服疫苗能调节 T1D 小鼠体内的细胞及体液免疫平衡,从而缓解并逆转了胰岛炎症及胰岛 β 细胞的损伤。

虽然疫苗的剂量和免疫方案还有待优化,但本研究证明了以 T1D 自身抗原为基础制备的疫苗可以通过肠道黏膜免疫的方式发挥作用,同时也

验证了海藻酸钙作为一种安全有效的口服疫苗载体,克服了蛋白药物在胃肠道不稳定的缺点,可用于蛋白疫苗的肠黏膜免疫。

References

- [1] Smith EL, Peakman M. Peptide immunotherapy for type 1 diabetes-clinical advances[J]. *Front Immunol*, 2018, **9**:392.
- [2] Arneth B, Arneth R, Shams M. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(10):2467.
- [3] Rolandsson O, Hampe CS, Sharp SJ, et al. Autoimmunity plays a role in the onset of diabetes after 40 years of age[J]. *Diabetologia*, 2020, **63**(2):266-277.
- [4] Tisch R, Yang XD, Liblau RS, et al. Administering glutamic acid decarboxylase to NOD mice prevents diabetes[J]. *J Autoimmun*, 1994, **7**(6):845-850.
- [5] Yamamoto T, Yamato E, Tashiro F, et al. Development of autoimmune diabetes in glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) knockout NOD mice[J]. *Diabetologia*, 2004, **47**(2):221-224.
- [6] Casas R, Dietrich F, Barcenilla H, et al. Glutamic acid decarboxylase injection into lymph nodes: beta cell function and immune responses in recent onset type 1 diabetes patients[J]. *Front Immunol*, 2020, **11**:564921.
- [7] Ludvigsson J. Autoantigen treatment in type 1 diabetes: unsolved questions on how to select autoantigen and administration route[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(5):1598.
- [8] Wang HQ, Zhang HY, Yang J, et al. Preparation of a glutamate decarboxylase 65-related peptide fusion protein and its efficacy in the treatment of type 1 diabetes mellitus[J]. *Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2009, **16**(4):296-301.
- [9] Chen YL, Wu J, Wang JJ, et al. Targeted delivery of antigen to intestinal dendritic cells induces oral tolerance and prevents autoimmune diabetes in NOD mice[J]. *Diabetologia*, 2018, **61**(6):1384-1396.
- [10] Wu J, Liu XR, Yang X, et al. Hypoglycemic effect of *Lactococcus lactis* vaccine containing HSP65-6P277 on streptozotocin-induced type 1 diabetic mice[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2014, **45**(1):106-110.
- [11] Li M, Wang Y, Sun Y, et al. Mucosal vaccines: strategies and challenges[J]. *Immunol Lett*, 2020, **217**:116-125.
- [12] Xu H, Hu FQ, Ying XY, et al. Preparation of insulin-loaded sodium alginate nanoparticles and its pharmacodynamics study on diabetic rats[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2006, **41**(6):434-437.
- [13] Yang JHM, Khatri L, Mickunas M, et al. Phenotypic analysis of human lymph nodes in subjects with new-onset type 1 diabetes and healthy individuals by flow cytometry[J]. *Front Immunol*, 2019, **10**:2547.
- [14] Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, **101**:287-292.
- [15] Zheng ZH, Zheng F. A complex auxiliary: IL-17/Th17 signaling during type 1 diabetes progression[J]. *Mol Immunol*, 2019, **105**:16-31.
- [16] Tavira B, Barcenilla H, Wahlberg J, et al. Intralymphatic glutamic acid decarboxylase-alum administration induced Th2-like-specific immunomodulation in responder patients: a pilot clinical trial in type 1 diabetes[J]. *J Diabetes Res*, 2018, **2018**:9391845.
- [17] Turner MS, Isse K, Fischer DK, et al. Low TCR signal strength induces combined expansion of Th2 and regulatory T cell populations that protect mice from the development of type 1 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2014, **57**(7):1428-1436.
- [18] Bellemore SM, Nikoopour E, Schwartz JA, et al. Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice[J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, **182**(3):261-269.
- [19] Clark M, Kroger CJ, Ke Q, et al. The role of T cell receptor signaling in the development of type 1 diabetes[J]. *Front Immunol*, 2020, **11**:615371.