

PDR患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞和相关基因 FOXP3 的变化及临床意义

吴文一,唐罗生,陈慧慧,李芳

基金项目:国家自然科学基金(No. 81371036)

作者单位:(410008)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科

作者简介:吴文一,中南大学湘雅二医院眼科在读研究生,研究方向:糖尿病视网膜病。

通讯作者:唐罗生,毕业于中南大学湘雅二医院,医学博士,主任医师,主任,研究方向:眼底病. tangls57@gmail.com

收稿日期:2014-10-29 修回日期:2015-02-12

Changes and clinical significance of CD4⁺ CD25⁺ T cells and expression of FOXP3 mRNA in peripheral blood mononuclear cell from patients with PDR

Wen-Yi Wu, Luo-Sheng Tang, Hui-Hui Chen, Fang Li

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81371036)

Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Luo-Sheng Tang. Department of Ophthalmology, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China tangls57@gmail.com

Received:2014-10-29 Accepted:2015-02-12

Abstract

• **AIM:** To investigate changes and significance of CD4⁺ CD25⁺ T cells and expression of FOXP3 mRNA in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) and observe its clinical significance on pathogenesis of PDR.

• **METHODS:** Flow cytometry was used to analyze the proportion of CD4⁺ CD25⁺ T cells in PBMC with PDR and normal control, the expression of FOXP3, IL-17, CTLA-4 mRNA in patients with PDR, diabetes and normal control were detected by Q-PCR. The clinical data of glycosylated hemoglobin (HbA1c), age, blood lipid, renal function and the degree of their relevance were analysed by Wilcoxon rank and inspection, Linear correlation analysis.

• **RESULTS:** CD4⁺ T cells decreased, CD4⁺ CD25⁺ T with no significant difference, FOXP3 and CLAT-4 decreased in PDR, IL-17 increased in PDR patients. CD4⁺ T cells associated with age, the level of CD4⁺ CD25⁺ T was positive

correlation with the patient's serum creatinine (Cr), but had no significant with age, HbA1c, blood lipid, Cr and urea nitrogen (BUN). HbA1c, triglyceride (TG), cholesterol, low density lipoprotein (LDL) were higher than normal value in PDR patients.

• **CONCLUSION:** CD4⁺ CD25⁺ T cells may be involved in the pathogenesis of PDR. In addition, abnormal blood lipid indicate that PDR may be associate with blood lipid level.

• **KEYWORDS:** proliferatiion diabetic retinopathy; flow cytometry; CD4⁺ CD25⁺ T cells; FOXP3

Citation: Wu WY, Tang LS, Chen HH, *et al.* Changes and clinical significance of CD4⁺ CD25⁺ T cells and expression of FOXP3 mRNA in peripheral blood mononuclear cell from patients with PDR. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(3):398-402

摘要

目的:探讨增殖性糖尿病视网膜病(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞及相关基因 FOXP3 表达变化意义,观察其在 PDR 发病中的临床意义。

方法:采用流式细胞术检测 PDR 患者及正常对照外周血 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞比例, Q-PCR 测 PDR 患者、糖尿病和正常人中 FOXP3, IL-17 和 CTLA-4 的 mRNA 表达,并用 Wilcoxon 秩和检验和直线相关分析法分析 PDR 患者糖化血红蛋白、年龄、血脂、肾功能的临床资料及它们之间相关度。

结果: PDR 患者 CD4⁺ T 细胞降低, CD4⁺ CD25⁺ T 无显著差异, FOXP3 和 CTLA-4 在 PDR 中下降, IL-17 增高。 CD4⁺ T 细胞与年龄相关, CD4⁺ CD25⁺ T 与患者的血肌酐存在正相关性, CD4⁺ CD25⁺ T 细胞水平与年龄、糖化血红蛋白、血脂、血肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)均无明显相关性。 PDR 患者糖化血红蛋白、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白均高于正常值。

结论: CD4⁺ CD25⁺ T 细胞可能参与 PDR 的发病机制,并且血脂异常提示 PDR 可能与血脂相关。

关键词: 增殖性糖尿病视网膜病变; 流式细胞术; CD4⁺ CD25⁺ T 细胞; FOXP3

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.3.05

引用: 吴文一,唐罗生,陈慧慧,等. PDR 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞和相关基因 FOXP3 的变化及临床意义. 国际眼科杂志 2015;15(3):398-402

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一类胰岛素相对或绝对缺乏所致的疾病,发病逐年上升。糖尿病视网膜病(diabetic retinopathy, DR)在DM人群中的总患病率为34.6%,增殖性糖尿病视网膜病变(proliferation diabetic retinopathy, PDR)的总患病率为6.96%,随着糖尿病发病率增高,25a后发生DR的糖尿病患者为42.9%^[1,2]。并且,PDR在年轻患者中发病较老年人严重,影响患者生活质量,所以有必要对其发病机制进行深入探讨,寻找合适的靶点。PDR其发病机制至今未明。血管和神经病变是引起DR的主要原因。近年,逐渐发现T细胞数量及功能紊乱在1型糖尿病患者中起作用,某些CD4⁺T细胞如调节性T细胞和Th17在免疫紊乱所致的炎症反应中起重要作用^[3]。

CD4⁺Th可分化为Th1, Th2, Treg, Th17。Th1主要产生INF- γ 介导细胞免疫,而Th2主要介导体液免疫,并抑制Th1的免疫反应。研究发现,在许多自身免疫相关的疾病中,如类风湿性关节炎、糖尿病、葡萄膜疾病,不仅有Th1/Th2的失衡,而且还存在Treg/Th17的失衡^[4,5]。Th17细胞可分泌IL-17, TNF- α 和IL-6,增加自身免疫性疾病的炎症反应^[6]。起免疫抑制作用的Treg细胞则主要通过产生一些抗炎因子如IL-10和TGF- β 来维持免疫内稳态和免疫耐受^[7]。最近,有报道研究表明Treg/Th17的失衡在2型糖尿病以及其并发症也起作用^[5]。但是在PDR中CD4⁺CD25⁺T细胞和Th1, Th2, Th17的改变尚未有研究表明。本研究就PDR患者体内外周血CD4⁺CD25⁺T细胞数量和功能进行初步观察,间接观察Th17,结合患者临床资料观察Treg与年龄、糖化血红蛋白和血脂是否有相关性,探讨其在PDR发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 共纳入欲行手术治疗的玻璃体体积血DR患者39例,年龄29~73(平均54)岁。糖尿病病程约为9a以上,文化程度均为高中或以下,PDR诊断与分期按修订版Airlie House糖尿病视网膜病变分级(ETDRS),均为重度PDR,5期。2型糖尿病无PDR患者10例,来自我院内分泌科住院患者,年龄51~77(平均62.58)岁;糖尿病病程约7a以上,诊断根据世界卫生组织(WHO)1999年推荐的糖尿病诊断标准,但是眼底未见明显出血及渗出;所有患者行一般情况调查问卷调查,自动血压计测量血压,并行抽血查糖化血红蛋白、血脂、肝肾功能等常规生化检查,并且在入院1mo内未口服或静脉应用糖皮质激素和其他免疫抑制剂,1wk内无急性上呼吸道感染史。健康志愿者10例,男5例,女5例,年龄26~79(平均54)岁,无糖尿病、高血压及其他慢性病史,1wk内无急性感染,无长期用药史,无眼部其他病史;全部对象均抽取静脉血5mL, EDTA抗凝。

1.1.2 主要试剂 CD4-FITC单克隆抗体、CD25-PE单克隆抗体、同型抗人IgG Fc-FITC、抗人IgG Fc-PE均为美国Biolegend公司产品。Trizol试剂、逆转录PCR试剂盒,荧光定量PCR试剂盒购自北京康为世纪有限公司。人淋巴细胞分离液购自天津灏洋有限公司生物制品科技有限责任公司。RPMI 1640培养液购自Hyclone公司,胎牛血清购自杭州四季青有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及细胞分离 抽取入选研究对象的外周静脉血5mL(EDTA抗凝)。Ficoll密度梯度离心法2000g,20min,分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),吸取白膜层,到5mL PBS中洗涤,1000g离心5min,计数板计数单个核细胞的数量,调整PBMC密度至 2×10^6 /mL。悬浮于RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清,100U/mL青霉素和0.1mg/mL链霉素)。

1.2.2 流式细胞术检测外周血CD4⁺CD25⁺T细胞数量 取PBMC悬液(2×10^6 /mL)分同型对照管和实验管。洗涤后细胞重悬于100 μ L PBS中,加入CD4-FITC和CD25-PE及同型抗体避光孵育30min。洗涤后加入4%多聚甲醛液固定待流式上机,以CD4设门区分出CD4⁺CD25⁺T细胞,并以散点图表示。用Cell Quest软件获取并分析散点表达的频率。

1.2.3 采用Q-PCR检测FOXP3, IL-17和CTLA-4的mRNA表达 取 1×10^5 个细胞,用Trizol法抽提RNA,用DEPC处理过的水将RNA稀释为1g/L。琼脂糖凝胶检测RNA质量,超微量紫外分光光度计测量RNA浓度及OD值并定量逆转录。FOXP3引物为:forward:5'-TCCAGAG AAGCAGCGGACACT, reverse:5'-AGACTCAGGTTGTGGC GGATG;IL-17A;forward:5'-GGACTACCACATGAAGTCTG, reverse:5'-ACGGACACCAGTATCTTCTC;CTLA-4;forward:5'-GCTGGTGGTATCTGAGTTGACT, reverse:5'-CTGCTG CCTTCTTCTGTCCAT;GAPDH;forward:5'-GAAGGTGAA GGTCCGAGTC, reverse:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC。反应条件:逆转录37 $^{\circ}$ C 15min,95 $^{\circ}$ C 5s 灭活逆转录酶;Q-PCR循环条件为:95 $^{\circ}$ C 10min,60 $^{\circ}$ C 1min,循环次数为45,95 $^{\circ}$ C 10s;65 $^{\circ}$ C 5s;95 $^{\circ}$ C 50s。同时设GAPDH作为内参照,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值。

统计学分析:采用SPSS 19.0软件对所有数据进行统计学分析,先行F检验及正态性检验,对于符合正态的方差齐性采用t检验,三组时采用单因素方差分析(one-way ANOVA),对于方差不齐或非正态分布的数据采用非参数分析中的Kruskal-Wallis检验,关联分析采用计算Spearman值进行相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。图形分析和处理使用Graphpad Prism Version 5.0。

2 结果

2.1 患者资料分析 收集的PDR患者男:女=17:22,年龄在54岁左右,DM患者男:女=4:6,年龄在65岁左右,其余指标见表1。收集的患者在年龄、性别均与正常人无明显差异,PDR患者的临床资料数据:糖尿病病程为 $8.34 \pm 4.0a$,糖化血红蛋白(HbA1c)为 $(7.88 \pm 2.04)\%$,明显高于正常值6.1%,差别具有统计学意义($P < 0.01$);甘油三酯为 $1.93 \pm 1.42\text{mmol/L}$,总胆固醇为 $5.34 \pm 1.19\text{mmol/L}$,高于正常值 (5.2mmol/L) ,差别具有统计学意义($P < 0.05$);低密度脂蛋白为 $3.71 \pm 1.0\text{mmol/L}$,也高于正常值 (3.12mmol/L) ,差别具有统计学意义($P < 0.001$);高密度脂蛋白为 $1.14 \pm 0.25\text{mmol/L}$,高于正常值 (1.04mmol/L) 。说明PDR患者近期血糖控制不佳,且血脂紊乱。患者的收缩压和舒张压由于药物的控制,大部分在正常范围内。39例PDR患者中有23例患有高脂血症,12例患者存在血肌酐及尿素氮的升高,13例合并尿蛋白阳性。

表1 糖尿病视网膜病变和正常对照组的临床资料

项目	PDR组(n=39)	DM组(n=10)	正常对照组(n=20)	正常参考值
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	54.56±11.71	62.58±9.26	51.92±7.28	-
性别(男/女)	17/22	4/6	12/8	-
收缩压($\bar{x}\pm s$,mmHg)	129±33.22	142±29.23	115±4.31	90~140
舒张压($\bar{x}\pm s$,mmHg)	79±10.74	81±14.05	72±7.23	60~90
空腹血糖($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	8.67±3.49	7.83±2.24	4.87±1.56	3.89~6.1
糖化血红蛋白($\bar{x}\pm s$,%)	7.88±2.04 ^d	8.64±2.93	4.18±0.92	3.9~6.1
甘油三酯($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	1.93±1.42 ^a	1.84±0.65	0.96±0.28	<1.71
总胆固醇($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	5.34±1.19 ^a	4.55±1.51	3.15±1.07	2.9~5.2
低密度脂蛋白($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	3.71±1.0 ^b	2.89±1.36	1.68±0.76	<3.12
高密度脂蛋白($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	1.14±0.25 ^a	0.96±0.38	4.16±2.11	>1.04
肌酐($\bar{x}\pm s$,μmol/L)	111.84±74.49	86.91±49.66	64±18	44~133
尿素氮($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	7.77±2.91	6.96±3.22	3.62±1.31	2.9~7.14

^a $P<0.05$ vs 正常值;^b $P<0.001$ vs 正常值;^d $P<0.01$ vs 正常值。

2.2 外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量 选取10例PDR患者,用FACS对细胞表面标志检测显示,结果非正态分布,采用非参数分析中的Kruskal-Wallis检验增殖性糖尿病视网膜病患者外周血中CD4⁺T细胞的比例是18.00%±6.4%,低于正常对照组(28.67%±8.5%),差别具有统计学意义($P<0.05$)。CD4⁺CD25⁺细胞在PDR外周血中比例是2.1%±1.5%,和正常对照组2.3%±2.2%差异较小(图1),差别无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 外周血 FOXP3, IL-17 和 CTLA-4 的 mRNA 表达 外周血5mL经淋巴细胞分离液提取单个核细胞,计数约为 6×10^6 。提取RNA后琼脂糖凝胶电泳可见明显28S:18S约为2:1,分光光度计测得RNA浓度为 $354\pm 46\text{ng}/\mu\text{L}$,OD值为 18.9 ± 1.7 。经Q-PCR扩增的FOXP3,IL-17,CTLA-4与GAPDH的mRNA,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,采用单因素方差分析,Graphpad 5.0统计结果可见PDR外周血单个核细胞表达FOXP3和CTLA-4的mRNA的量明显低于正常对照组和糖尿病组,差异具有统计学意义($P<0.001$),IL-17的表达在PDR组和DM组均升高,差异具有统计学意义($P<0.01$,图2)。

2.4 相关性分析 根据相关性分析发现,CD4⁺T细胞与年龄相关($r=0.786, P<0.05$,图3),CD4⁺CD25⁺T调节性T细胞与年龄之间无相关。糖化血红蛋白可以反映患者近3mo血糖控制的水平,CD4⁺T细胞和CD4⁺CD25⁺T调节性T细胞与糖化血红蛋白无相关性。进一步分析发现,CD4⁺CD25⁺与患者的血肌酐存在正相关性($r=0.571, P<0.05$),总胆固醇和低密度脂蛋白也有相关性($r=0.957, P<0.001$),但是与甘油三酯无明显相关性。Treg与病程、糖化血红蛋白、空腹血糖、血脂(甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白)、尿素氮等无明显相关性。

3 讨论

内皮细胞机能丧失是原发衰老的一个重要标志,而糖尿病视网膜病的发生主要是血管内皮细胞和周细胞的受损。临床发现,PDR并非在老年人群中发病,相反许多年轻糖尿病患者PDR发生率更高,所以患者内皮细胞的功能受损并非单纯衰老所致,还有其他致病危险因素。除了高血糖、炎症和遗传等危险因素外,最近越来越多的人认识到免疫紊乱在糖尿病和DR中的作用,免疫细胞参与炎

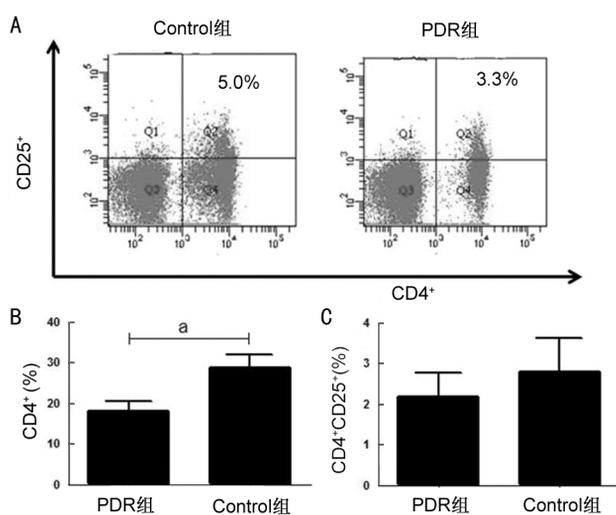


图1 PDR和正常组外周血中CD4⁺T与CD4⁺CD25⁺T的表达分析 A:流式检测外周血CD4⁺CD25⁺T,PDR组为3.3%,对照组为5.0%;B:PDR组CD4⁺T较对照组低;C:PDR与对照组外周血CD4⁺CD25⁺T的量无明显差异(^a $P<0.05$ vs 对照组)。

症反应的过程^[8]。T细胞在PDR的发生过程中起重要作用,虽然现在对PDR的发病机制还不清楚。Treg和Th17的变化是PDR所导致的结果还是促使PDR发生的原因有待进一步研究证明。

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T细胞是T细胞的一种,主要抑制自身免疫反应^[9],Treg细胞特异性表达核转录因子FOXP,FOXP3对Treg的发育和功能都起至关重要的作用,目前认为转录FOXP3⁺的是Treg细胞活化的标志^[10,11]。Treg细胞通过抑制自身反应性T细胞的活化、增殖而抑制B细胞的活化和细胞因子的异常表达,从而维持机体的免疫平衡^[12]。Treg胞膜上还高表达细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4),又名CD152,参与免疫反应的负调节。其表达的下降提示Treg功能的下降。有研究表明,糖尿病患者体内存在免疫紊乱,Treg细胞的数量及功能的下降,胰岛自身抗原的活化^[13]。那么,对于2型糖尿病或糖尿病微血管并发症如PDR是否也存在类似的免疫紊乱,促进PDR的发生、发展有待进一步研究证实。本研究发现PDR患者的CD4⁺T显

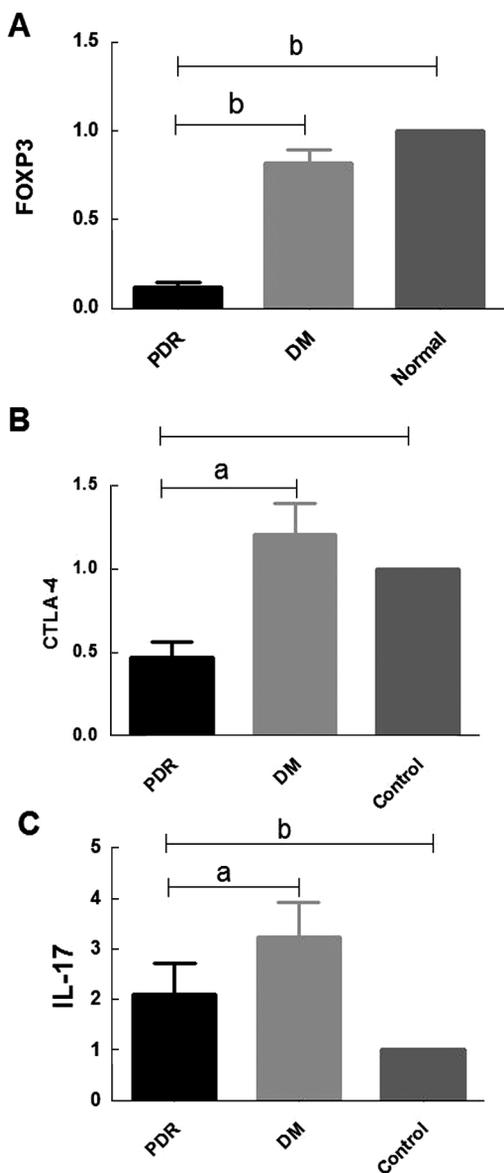


图2 PDR和DM与对照组PBMC中FOXP3,CTLA-4,IL-17的表达水平 A:FOXP3表达在PDR组较糖尿病组和正常组下降;B:CTLA-4表达在PDR组较糖尿病组和正常对照组下降;C:IL-17表达较正常组升高(^a $P<0.05$ vs 对照组;^b $P<0.01$ vs 对照组)。

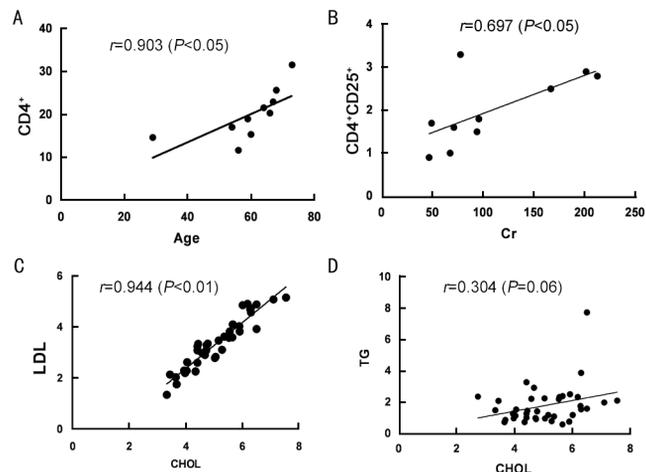


图3 相关性研究计算Spearman等级相关值 A:CD4⁺与年龄的相关性;B:CD4⁺CD25⁺与血肌酐的相关性;C:血浆总胆固醇与低密度脂蛋白的相关性;D:血浆总胆固醇与甘油三酯的相关性无显著差异。

著少于健康对照组,CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性T细胞数量稍低于健康对照组,但差异未有明显统计学意义,但PBMC中FOXP3和CTLA-4的表达显著下降,因此可推断CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性T功能受损,且可能促进PDR的发生。

Th17在人体内发挥的生物学效应与其所分泌的IL-17密切相关,并已证实能够募集、激活中性粒细胞,在自身免疫性疾病和感染性疾病中的炎症过程发挥关键作用^[14, 15]。最近发现,在糖尿病患者体内,发现Th17促进胰岛炎症和糖尿病肾病的发生^[16, 17]。并且糖尿病患者随着病程的增加,体内都存在低度的慢性炎症反应,在这些患者体内同样存在Treg细胞的下降和Th17的升高,这一现象被认为可能参与在局部炎症的发生,而炎症的发生又促进了糖尿病相关并发症的发生^[18]。糖尿病视网膜病变是一种微血管病变,炎症参与其发生、发展,但是Th17是否参与其中还未有研究表明。本实验表明,在PDR患者外周血mRNA中IL-17⁺显著高于糖尿病组和健康对照组,具有统计学差异,结果表明Th17可能与PDR的进展密切相关。

糖化血红蛋白(HbA1c)测试通常可以反应患者近3mo的血糖控制情况,被认为是糖尿病视网膜病变发生和进展的危险因素之一。几乎所有PDR患者血脂及糖化血红蛋白异常,约一半的患者合并糖尿病肾病,提示血脂紊乱可能与炎症有一定关系。有研究表明1型糖尿病患者外周血的CD4⁺CD25⁺Tregs与HbA1c有密切的联系^[18],但是本研究显示患者外周血CD4⁺CD25⁺Treg细胞的减少与糖化血红蛋白、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白以及病程无明显关,所以高血糖或高血脂或许与不能直接影响Treg细胞的变化。可能由于本研究样本太小,未能得出有统计学意义的相关性。有研究表明,Treg细胞的减少可促进高胆固醇血症和动脉粥样硬化^[19]。但到底是炎症诱发血脂代谢紊乱还是血脂紊乱引起炎症反应,目前还不清楚,有待进一步研究。

我们的研究发现,CD4⁺细胞与患者的年龄有正相关性。随着糖尿病病程的增加,患者体内免疫抑制系统逐渐减弱,局部炎症因素加强,免疫应答的增强促使微血管病变、新生血管的形成。本研究说明在PDR体内另一种主要免疫抑制机制减弱,即Treg降低,但是其是否与新生血管的形成相关需要进一步的实验证实。

综上所述,在糖尿病视网膜病的发病中,除了一些促血管生成因子促进疾病的发生外,免疫调节紊乱也参与其中,CD4⁺CD25⁺Treg细胞和Th17细胞的免疫应答也起着重要作用。本研究并中CD4⁺CD25⁺T细胞的数量并未显著下降,但Q-PCR显示FOXP3的表达是显著下调的。所以不排除CD4⁺CD25⁺Treg功能下降在DR中起作用。由于PDR中Th17细胞应答增强,CD4⁺CD25⁺Treg表达及功能减弱,PDR严重程度或许与外周血Th17/Treg免疫应答失衡密切相关。PDR中Th17/Treg应答失衡的调节机制和与促血管生成因子之间的联系则有待于进一步的研究。

参考文献

1 Rajalakshmi R, Amutha A, Ranjani H, et al. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in Asian Indians with young onset Type 1 and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Complications* 2014;28(3):291-297

- 2 Scanlon PH, Aldington SJ, Stratton IM. Epidemiological issues in diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2013;20(4):293-300
- 3 Zhang Y, Bandala-Sanchez E, Harrison LC. Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19(4):271-278
- 4 Boissier MC, Assier E, Falgarone G, et al. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/Treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 2008;75(4):373-375
- 5 Zeng C, Shi X, Zhang B, et al. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl)* 2012;90(2):175-186
- 6 Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8(4):345-350
- 7 Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27
- 8 Wohlfart P, Lin J, Dietrich N, et al. Expression patterning reveals retinal inflammation as a minor factor in experimental retinopathy of ZDF rats. *Acta Diabetol* 2014;51(4):553-558
- 9 Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010;11(1):7-13
- 10 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-336
- 11 Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8(5):457-462
- 12 Corsini E, Oukka M, Pieters R, et al. Alterations in regulatory T-cells: rediscovered pathways in immunotoxicology. *J Immunotoxicol* 2011;8(4):251-257
- 13 Santamaria P. The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity* 2010;32(4):437-445
- 14 Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010;140(6):845-858
- 15 Hirota K, Martin B, Veldhoen M. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol* 2010;32(1):3-16
- 16 Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, et al. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009;39(1):216-224
- 17 Zhang C, Xiao C, Wang P, et al. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. *Hum Immunol* 2014;75(4):289-296
- 18 Ryba-Stanislawowska M, Skrzypkowska M, Mysliwiec M, et al. Loss of the balance between CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and CD4⁺IL17A⁺ Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol* 2013;74(6):701-707
- 19 Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, et al. Depletion of FOXP3⁺ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2013;123(3):1323-1334