

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.025

Graves 病患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞上的 PD-1/PD-L1 的表达及意义*

丁静雅 秦露丹 徐勇[△] 郭曼 陈青

(西南医科大学附属医院 四川 泸州 646000)

摘要 目的:探究 Graves 病患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞上的 PD-1/P-L1 的表达及意义。**方法:**收集 2017 年 6 月至 2017 年 12 月就诊于西南医科大学附属医院内分泌科的 Graves 病、Graves 眼病及体检中心的健康者的外周血进行流式检测。**结果:**与正常对照组相比,Graves 病及 Graves 眼病组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例明显降低(P<0.05);PD-1⁺Treg、PD-L1⁺Treg、PD-1⁺/PD-L1⁺Treg 细胞比例均较正常组明显降低(P<0.05);此外,Graves 眼病组的结果较 Graves 病组更低(P<0.05)。**结论:**CD4⁺CD25⁺Treg 的降低会导致 Graves 病和 Graves 眼病患者的免疫状态活化,甲状腺自身抗体的增加和活化,促进疾病的发生。此外于 PD-1 和 PD-L1 阳性细胞比例的减少对于其对免疫的负向调节有所减弱,从而导致患者体内免疫耐受的降低和免疫稳态的打破,可能导致机体对甲状腺抗原的耐受消失,导致 GD 及眼病的发生发展。

关键词:Graves 病;调节性 T 细胞;免疫;PD-1;PD-L1;自身抗体

中图分类号:R581.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-718-06

Expression and Significance of PD-1/PD-L1 on CD4⁺CD25⁺Treg Cells in Peripheral Blood of Patients with Graves Disease*

DING Jing-ya, QIN Lu-dan, XU Yong[△], GUO Man, CHEN Qing

(The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression and significance of PD-1/PD-L1 on CD4⁺CD25⁺Treg cells in peripheral blood of patients of Graves Disease. **Methods:** This study recruited voluntary patients of Graves Disease and Graves ophthalmopathy and healthy volunteer from June 2017 to December 2017 in Southwest Medical University Affiliated hospital, and took samples of blood of them and use Flow cytometry to identify PD-1 and PD-L1 on CD4⁺CD25⁺Treg. **Results:** The frequency of CD4⁺CD25⁺Treg among PBMC in GD patient and GO patient decreased significantly (P<0.05), compared with normal control group. The PD-1 and PD-L1 expression on CD4⁺CD25⁺Treg in GD group and GO group was lower than that in normal control group(P<0.05) and them in GO group was lower than GD group (P<0.05). **Conclusion:** Decreased CD4⁺CD25⁺Treg will lead activation of immune response, to increase and activate thyroid autoantibodies and contributes to development of Graves disease and Graves Ophthalmopathy. Moreover, decreased expression of PD-1 and PD-L1 can reduce their negative regulation, and lead to immune tolerance lowering and the disruption of immune homeostasis in vivo, and result in occurrence of Graves disease and Graves Ophthalmopathy.

Key words: Graves Disease;regulatory T cells; Immunity; PD-1; PD-L1; Autoimmune antibody

Chinese Library Classification(CLC): R581.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)04-718-06

前言

Graves 病(Graves Disease, GD)是一种常见的发病机制不太明确的器官特异性自身免疫疾病,其最直接的原因是由于自身抗原免疫耐受的消失,特别是促甲状腺激素受体(TSHR)。部分辅助性 T 细胞(主要的 Th2 细胞)将自身抗原识别为外来的抗原,同时诱导细胞因子(IL-2、IL-4、IL-5)的产生刺激 B 细胞产生 TSHR 自身抗体。在结合了 TSHR 后激活腺苷酸环化酶同时

刺激甲状腺产生激素,导致甲状腺功能亢进^[1,2]。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)是具有免疫调节功能的淋巴细胞, Treg 细胞表面主要表达 CD4 和 CD25 分子,该细胞具有维持免疫稳态的作用,同时抑制免疫反应过度活跃以及防止自身免疫疾病的发生^[3]。

PD-1(CD279)是 B7-CD28 超家族一员,是具有负性协同刺激作用的免疫抑制受体,由 PDCD1 基因编码,人类的基因定位于染色体 2q37.3,是一个由 288 个氨基酸组成的相对分子质量

* 基金项目:四川省教育厅重大培育项目(17CZ0041)

作者简介:丁静雅(1992-),硕士研究生,主要从事甲状腺疾病的研究,电话:18715798411, E-mail: 80239396@qq.com

△ 通讯作者:徐勇(1969-),硕士,教授,硕士生导师,主要从事糖尿病血管病变研究,电话:13980255895, E-mail: xywyll@aliyun.com

(收稿日期:2018-04-27 接受日期:2018-05-23)

为 50-55 KDa 的 I 型免疫球蛋白超家族 I 型跨膜蛋白^[4]。到目前为止,有超过 30 个 PD-1 单核苷酸多态性(SNPs)被发现,而且 PD-1 与多种自身免疫病相关,如多发性硬化症、肿瘤、1 型糖尿病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化形成等^[5-11]。PD-1 可以与其受体 PD-L1(CD274)和 PD-L2(CD273)结合进行调节免疫反应。

本研究旨在检测 Graves 病患者、Graves 眼病 (Graves ophthalmopathy, GO)患者外周血单个核细胞中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例以及 PD-1⁺Treg, PD-L1⁺Treg 以及 PD-1⁺/PD-L1⁺Treg 的比例,以探究 PD-1 以及 PD-L1 与 Graves 病发病的关系。

1 材料与方法

1.1 对象

本研究共为 3 组,分别为 GD 组、GO 组、正常对照组(NC)组。GD 组为 2017 年 6 月至 2017 年 12 月于西南医科大学附属医院内分泌科住院治疗的诊断为 GD 患者,其中男女各 10 人,年龄 35 至 54 岁之间,符合 2008 年中华医学会内分泌学会制定的《中国甲状腺疾病诊治指南 - 甲状腺功能亢进》中 GD 的诊断标准^[12]。GO 组为 2017 年 6 月至 2017 年 12 月于西南医科大学附属医院内分泌科住院治疗的诊断为 GO 患者,其中男性 9 名,女性 11 名,年龄在 34 至 55 岁之间,符合 2006 年欧洲 Graves 眼病专家共识(EUGOGO)的诊断标准^[13]。以下情况不纳入研究:怀孕;其他甲状腺疾病及自身免疫性疾病;肝肾疾病;恶性肿瘤及严重感染性疾病;使用免疫调节药物、免疫抑制剂及含硒制剂的患者。NC 组为 2017 年 6 月至 2017 年 12 月健康体检中心就诊志愿者,年龄在 36 至 52 岁之间,其中男性 10 名,女性 10 名,甲状腺功能正常且无甲状腺疾病及其他自身免疫性疾病史以及相关家族史。

所有参与本实验的患者与志愿者均签署知情同意书,其信息严格保密。本实验通过西南医科大学附属医院伦理委员会审核通过,并与中国临床试验中心进行注册,注册号为(ChiCTR-ROC-17014053)。

1.2 主要仪器与试剂

流式细胞仪 FACSVerseTM 为美国 Becton Dickinson 公司产品, FACSuite 软件获取实验数据, FACSuite 软件分析数据。

流式抗体: FITC 鼠抗人 CD4、PE 鼠抗人 CD25、PE-Cy7 鼠抗人 CD274、APC 鼠抗人 CD279(均购自美国 BD 公司);人全血单个核细胞分离液(Ficoll 配置)购自天津灏祥华科生物技术有限公司, PBS 购于 Solarbio 公司。

1.3 方法

使用 EDTA-K2 抗凝的真空采血管收集研究对象清晨空腹外周静脉血 3 mL,采血后立即摇匀,血标本在采集 3 h 内进行密度梯度离心得到人单个核细胞 (PBMC),然后用 PBS 重悬 PBMC,并将细胞数目调整在 300 μ L 细胞悬液中细胞数为 1X10⁶ 个。首先取 7 支流式试管,其中试管 1 中不加抗体,作为空白管,另外 4 支试管分别加入 4 种单独抗体调节荧光通道补偿用,再取 1 支试管为同型对照,其余试管同时加入 FITC 鼠抗人 CD4 20 μ L、PE 鼠抗人 CD25 20 μ L、PerCP-Cy7 鼠抗人 CD274 5 μ L、APC 鼠抗人 CD279 5 μ L,将抗体与细胞悬液充分混匀,常温避光孵育 20 min 后,上流式细胞仪进行检测。对流式检测数据分析时,先做散点图,以 FSC 为 X 轴,SSC 为 Y 轴。对淋巴细胞圈门为 P1;以 FITC-CD4 为 X 轴,PE-CD25 为 Y 轴,获得 CD4⁺CD25⁺T 细胞群,圈为 P2;以 PerCP-Cy7- CD274 为 X 轴,以 APC-CD279 为 Y 轴,获得散点图,并分别做直方图。各组志愿者甲状腺激素水平(FT3、FT4、TSH)以及甲状腺自身抗体(aTPO、aTG)采用化学发光法检测。

1.4 统计学方法

所有数据均使用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。连续变量数据用均数加减标准差表示,采用单因素方差分析进行三组间比较。两组之间采用独立样本 T 检验进行比较,两变量之间相关性采用 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组基本临床资料的比较

三组对象之间在年龄、性别之间没有差异(P>0.05)。GD 组患者和 GO 组患者的甲状腺功能(FT3, FT4, TSH)与 NC 组之间有统计学差异(P<0.05),而 GO 组患者的 T3、T4 明显高于 GD 组(P<0.05);而 GO 组甲状腺自身抗体(aTPO, aTG)明显高于 GD 组,而 GD 组明显高于 NC 组,且三组之间有统计学差异(P<0.05)(表 1)。

表 1 Graves 病及 Graves 眼病及健康对照组的基本信息

Table 1 Information of Group of GD, GO, NC

Clinical data	GD Group	GO Group	NC Group
FT3(pg/d)	16.150 \pm 4.581*	10.375 \pm 3.951*	2.332 \pm 0.451
FT4(ng/L)	4.919 \pm 0.951*	3.740 \pm 0.852*	1.167 \pm 0.107
TSH(mIU/L)	0.10 \pm 0*	0.018 \pm 1.198*	2.212 \pm 1.027
aTG(IU/mL)	262.980 \pm 235.328*	548.938 \pm 273.312*	5.530 \pm 8.330
aTPO(IU/mL)	144.014 \pm 67.139*	577.129 \pm 317.268*	0.677 \pm 1.183
Age(year)	44.13 \pm 10.162	47.80 \pm 11.001	44.53 \pm 7.963

注:* 与 NC 组相比 P<0.05。

Note: *P<0.05 vs control group.

2.2 三组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例的比较

三组外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 比例比较有统计学差异,

GO 组中 CD4⁺CD25⁺Treg 比例明显低于其于 GD 组 (GO 组 3.342 \pm 1.070%, GD 组 5.054 \pm 0.757%, P<0.05), GD 组又明显

低于 NC 组(NC 组 7.173± 1.249%, P<0.05)(表 2、图 1、图 5)。

2.3 三组 PD-1⁺Treg 细胞比例的比较

GO 组中 PD-1⁺Treg 比例明显低于其余两组 (GO 组 3.145± 0.765%, GD 组 7.321± 1.655%, P<0.05), GD 组又明显低于 NC 组(NC 组 14.222± 2.445% P<0.05)(表 2、图 2, 图 6)。

2.4 三组 PD-L1⁺Treg 细胞比例的比较

GO 组中 PD-L1⁺Treg 比例明显低于其余两组 (GO 组 9.920± 2.487%, GD 组 16.472± 2.101%, P<0.05), GD 组又明显低于 NC 组(22.411± 3.039, P<0.05)(表 2、图 3, 图 6)。

2.5 三组 PD-1⁺/PD-L1⁺Treg 细胞比例的比较

GO 组中 PD-1⁺/PD-L1⁺Treg 细胞比例明显低于其余两组 (GO 组 6.984± 1.693%, GD 组 2.397± 1.027%, P<0.05), GD 组又明显高于 NC 组(NC 组 0.699± 0.328%, P<0.05)(表 2、图 4,

图 6)。

2.6 PD-1⁺ 以及 PD-L1⁺Treg 细胞比例与甲状腺自身抗体的相关性

对 Graves 病患者和 GO 患者合并进行 PD-1⁺Treg 和 PD-L1⁺Treg 细胞比例与甲状腺自身抗体进行相关性分析,发现在 PD-1⁺Treg 上的比例与血清中 aTPO 浓度存在相关性,但相关性较低(Pearson 相关系数为 -0.463, P<0.05); PD-1⁺Treg 上的比例与血清中 aTG 浓度不存在相关性(Pearson 相关系数为 -0.350, P<0.05); PD-L1⁺Treg 细胞比例与血清中 aTPO 浓度呈正相关性 (Pearson 相关系数为 -0.372, P<0.05), PD-L1⁺Treg 细胞比例与血清中 aTG 浓度呈正相关性(Pearson 相关系数为 -0.240, P>0.05)。

表 2 各组流式结果

Table 2 Results of Flow cytometry

Index	GD Group	GO Group	NC Group
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%)	5.054± 0.757*	3.342± 1.070**	7.173± 1.249
PD-1 ⁺ Treg(%)	7.321± 1.655*	3.145± 0.765**	14.222± 2.445
PD-L1 ⁺ Treg(%)	16.472± 2.101*	9.920± 2.487**	22.411± 3.039
PD-1 ⁺ /PD-L1 ⁺ Treg(%)	2.397± 1.027*	0.699± 0.328**	6.984± 1.693

注:* 与 NC 组相比, P<0.05; # 与 GD 组相比, P<0.05。

Note: * P<0.05 vs control group; # P<0.05 vs GD group.

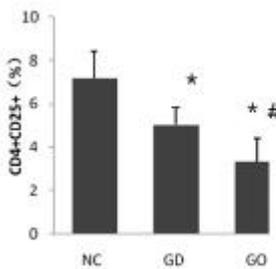


图 1 CD4⁺CD25⁺ 细胞比例(%)
Fig.1 Percentage of CD4⁺CD25⁺Treg(%)

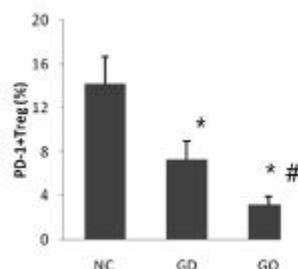


图 2 PD-1⁺Treg 细胞比例(%)
Fig.2 Percentage of PD-1⁺Treg

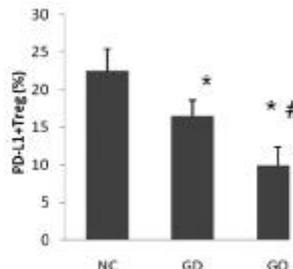


图 3 PD-L1⁺Treg 细胞比例(%)
Fig.3 Percentage of PD-L1⁺Treg(%)

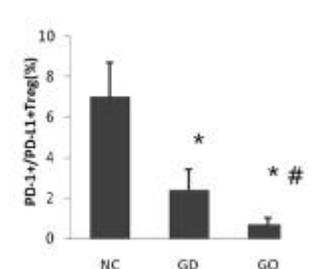
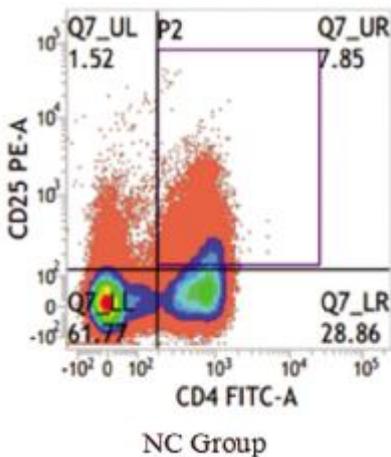
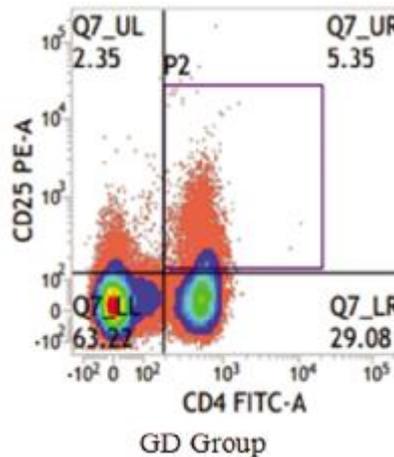


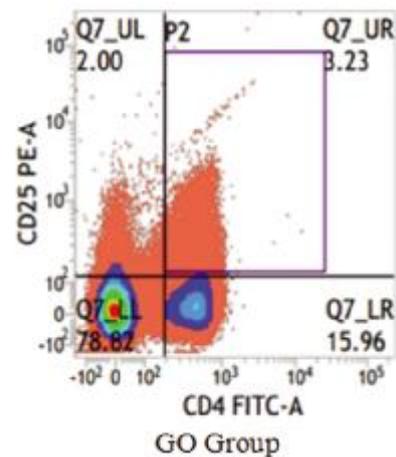
图 4 PD-1⁺/PD-L1⁺Treg 细胞比(%)
Fig.4 Percentage of PD-1⁺/PD-L1⁺Treg(%)



NC Group



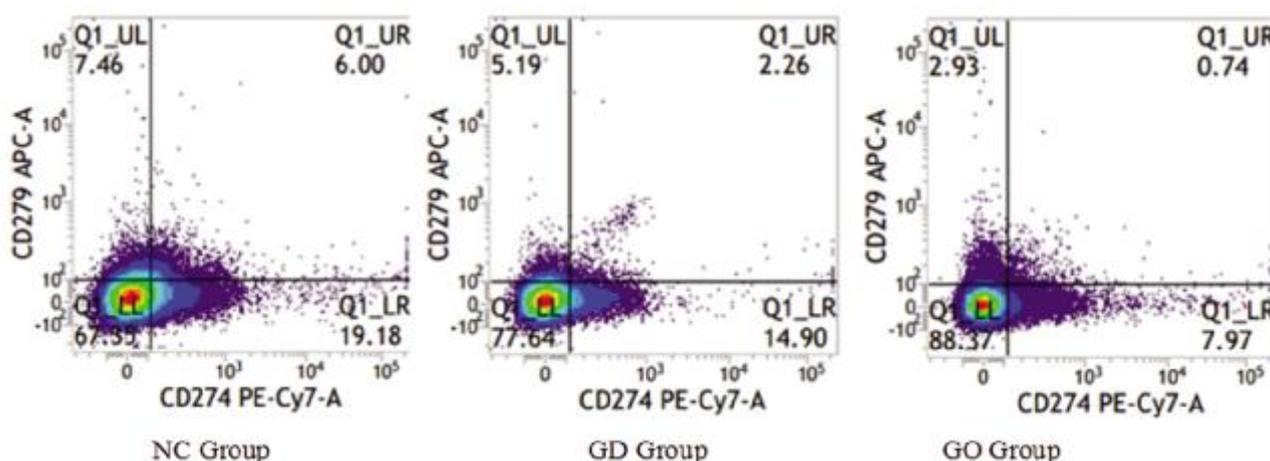
GD Group



GO Group

图 5 Treg 细胞在外周血单个核细胞中的比例

Fig.5 Percentage of Treg in PBMC(%)

图 6 PD-1⁺, PD-L1⁺, PD-1⁺/PD-L1⁺Treg 细胞比例Fig.6 Percentage of PD-1⁺, PD-L1⁺, PD-1⁺/PD-L1⁺Treg

3 讨论

PD-1(CD279)属于 B7-CD28 超家族一员,是具有负性协同刺激作用的免疫抑制受体,是一个相对分子质量为 50-55KDa 的免疫球蛋白超家族的 I 型跨膜蛋白,其分子结构的特点就是胞浆区分别存在氮端和碳端两个酪氨酸残基,氮端的残基参与构成一个免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM),碳端的残基则参与构成一个免疫受体酪氨酸转换基序(ITSM),其中 ITSM 在 PD-1 的负性调节中起重要作用^[4]。在活化的 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞和 DC 细胞等表面,PD-1 主要以单体形式表达。PD-1 并不像酶一样发挥作用而是往胞内传递适应性的信号^[14]。PD-1 有两个配体 PD-L1(CD274)和 PD-L2(CD273),两者具有 37%的相似性。PD-L1 持续表达于 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、巨噬细胞、间充质干细胞等细胞表面;PD-L2 仅表达于活化的 DC 细胞、巨噬细胞、骨髓源性细胞和静息的腹膜 B1 细胞^[4,15]。多种细胞因子可调节 PD-L1 和 PD-L2 的表达,如干扰素(IFN)和白细胞介素 4(IL-4)能分别上调 PD-L1 和 PD-L2 的表达。

在人类,PD-1 编码基因 PDCD1 的单核苷酸多态性与自身免疫性疾病如 1 型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、Graves 病、强直性脊柱炎之间的高风险也是存在一定的联系^[16-18]。另有关于人类自身免疫性疾病的研究显示 PD-1/PD-L1 信号通路在 1 型糖尿病、红斑狼疮和类风湿性关节炎之间存在重要的调节功能,表明 PD-1 在维持自身免疫耐受中的重要作用^[19,20]。

Graves 病是一种病因不明的器官特异性自身免疫紊乱的甲状腺疾病,也是目前最常发生的自身免疫性疾病^[21]。GD 确切的发病机制到目前为止不确切,研究表明细胞免疫与体液免疫的紊乱都与其发病相关。GD 很可能是由于 2 类辅助 T 细胞引起的应答反应,伴随促甲状腺素受体自身抗体(TRAb)的产生和腺体的增生,最终导致甲亢的发生^[22]。而 Graves 眼病是 GD 最常见的一种甲状腺以外表现,由于过度的炎症反应导致眼外肌及眼眶结缔组织的纤维化,导致眼眶内容组织增大,引起复视、眼眶疼痛、眼球的突出、眼睑的退缩、球结膜水肿、视神经受压甚至全眼炎等情况^[23]。而 Treg 细胞具有免疫抑制功能,能发挥负向免疫调节,在许多自身免疫性疾病中有关键作用,其不仅可

以通过直接接触、分泌细胞因子等方式调节免疫,还能通过 Foxp3 在转录水平调控效应性 T 细胞的活化过程^[24]。Treg 细胞表面分子表达的缺失,细胞抑制功能的受损或细胞数量的降低,均可能导致自身免疫病的发生,包括自身免疫甲状腺疾病的发生^[24]。

本研究旨在探究 GD 和 GO 患者外周血中 Treg 细胞数目及其 Treg 表面 PD-1 阳性以及 PD-L1 阳性细胞比例,通过其变化来探究 Graves 病的发病机制。结果显示 GD 以及 GO 患者外周血中 Treg 细胞数量明显低于正常对照组,这与大多数研究中的结果是一致的^[25,26]。Hu 等人发现 GD 患者的 Treg 细胞数量较健康人有所减少,同时 Treg 细胞表面 Foxp3 表达量下降^[27]。Nakano 等对甲状腺炎的研究中同样发现 Treg 细胞的比例低于健康对照组^[28]。然而,也有研究者有不同的观点,虽然 Graves 病外周血中 Treg 细胞高于正常对照组,但细胞的抑制功能确明显下降^[29]。这些的结果表明由于 Treg 细胞可能具有对于免疫应答的负向调节作用,在维持免疫稳态方面具一定作用。Treg 细胞主要通过产生 IL-10、TGF- β 而发挥生物学效应^[30]。而当 Treg 细胞数量明显降低时,对效应 T 细胞的抑制能力降低,机体出现免疫紊乱导致免疫耐受的消失和免疫稳态的破化,免疫功能活化,自身抗体活跃,导致自身免疫性疾病出现,包括 GD 和 GO 的发生。我们也发现 GO 组的 Treg 细胞数目较 GD 组也明显减少,这与之前的研究结果基本一致^[29]。这表示 GO 组的机体免疫状态较 GD 组更为活跃,导致自身抗体数目的增加与活跃,进而沉积于眶周组织导致眶周及眶后组织的炎症发生。

此外,本研究还观察了 Treg 细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达,发现在 GD 组外周血中 Treg 细胞表面的 PD-1 和 PD-L1 阳性的细胞低于对照组,同时 GO 组细胞表面 PD1/PD-L1 低于对照组和 GD 组。到目前为止,关于 PD-1 和 PD-L1 在 Graves 病中的研究极少,而 Graves 病的发病与自身抗体的产生有关系,与系统性红斑狼疮的发病机制有相同点,而有研究显示 PD-1/PD-L1 在 SLE 的发生过程中有重要影响。其中有两项研究表明在 SLE 病人中 CD4⁺T 细胞表面 PD-1 有所降低。Kristjansdottir 等人也发现在 SLE 病人中 PD-1⁺ 细胞也明显减少,这

与本次在 Graves 病中的研究结果基本一致的^[31]。我们也发现在 GO 组和 GD 组中甲状腺自身抗体的变化趋势与 PD-1 及 PD-L1 的变化趋势是一致的。这可能说明由于 PD-1 和 PD-L1 阳性细胞比例的减少对于其对免疫的负向调节有所减弱,从而导致患者体内免疫耐受的降低和免疫稳态的打破,有可能导致机体对甲状腺抗原的免疫耐受消失,使甲状腺自身抗体的产生和活化,尤以针对甲状腺细胞 TSH 受体的 TRAb 最为重要,导致 GD 生长眼病的发生。

GO 的发生主要是由于眶后的炎症,而眼眶的纤维母细胞是炎症活化的,而纤维母细胞的活化很有可能是由于继发性自身抗体的激活,如 TSHR 抗体的激活和胰岛素样生长因子(IGF-1)^[32]。同样,由于在 GO 患者外周血 Treg 细胞中 PD-1⁺ 与 PD-L1⁺ 的细胞比例较正常人明显降低,而免疫失衡所导致。Kitazawa 和 Li 研究发现 Treg 细胞表面的 PD-1 可能通过与树突状细胞(DC)表面的受体结合而向 DC 细胞传递负向信号,降低 DC 细胞表面的成熟标志物 CD40、CD80、CD86 的表达,从而引起 DC 成熟障碍并抑制 DC 抗原递呈功能,最终诱导外周耐受的破坏^[33,34]。GO 组 PD-1 与 PD-L1 较 GD 组更低,这提示 GO 组患者免疫抑制的程度更重,TSHR 的活化会调节 GO 中眼眶成纤维细胞的中透明质酸的合成,参与 GO 的发病,从而出现大量淋巴细胞浸润、氨基葡聚糖(GAG)沉积及水肿,晚期可能出现眼球后组织纤维化^[35]。

此外,本研究对 PD-1⁺ 以及 PD-L1⁺Treg 细胞比例与甲状腺自身抗体的相关性进行分析,发现甲状腺自身抗体 aTPO 和 aTG 均与 PD-1 表达呈负相关,但相关性较弱;而 aTPO 与 PD-L1 呈负相关,但 aTG 没有发现与 PD-L1 表达相关。Segundo 等人提出 GD 病人甲状腺组织中存在一类 B 细胞与淋巴滤泡生发中心的 B 细胞相同,其中的 B 细胞数量与血中 aTPO 水平有关^[36]。aTPO 与 aTG 的出现与增加都表示了机体免疫状态的活跃,其存在明显与甲状腺自身免疫性疾病的发生密切相关;而且甲状腺自身免疫性疾病患者的血清中 aTG 与 aTPO 的阳性率明显升高。此次研究发现 PD-1 与 PD-L1 的表达均与 TPO 抗体水平呈负相关,说明 PD-1 和 PD-L1 的降低可能通过对免疫稳态的打破或者其他某些途径间接刺激甲状腺自身抗体的出现和增加,PD-1 和 PD-L1 可能通过诱发甲状腺自身抗体的产生而促进疾病的发生。

总之,本次研究主要探究了 Graves 病及 GO 病病人外周血中 Treg 细胞表面的 PD-1 和 PD-L1 阳性细胞的比例,发现不仅这些患者的 Treg 细胞与正常人相比明显降低,同时 treg 细胞表面的 PD-1 和 PD-L1 也均降低。GD 最直接的发病机制是对于自身抗原的耐受的消失,特别是促甲状腺激素受体的出现。Treg 的特点是具有免疫应答低下和免疫抑制的特性,在维持机体免疫耐受和免疫应答稳态方面具有重要的作用,所以 Treg 细胞的下降会导致 Graves 病和 GO 病患者的免疫状态活化,甲状腺自身抗体的增加和活化。此外 PD-1 和 PD-L1 阳性细胞比例的减少对于其对免疫的负向调节有所减弱,从而导致患者体内免疫耐受的降低和免疫稳态的打破,有可能导致机体对甲状腺抗原的免疫耐受消失,使甲状腺自身抗体的产生

和活化,尤以针对甲状腺细胞 TSH 受体的 TRAb 最为重要,导致 GD 及眼病的发生发展。但是目前对于 Graves 病与 PD-1 级 PD-L1 的研究较少,希望在以后的研究中能够更深入的探究两者之间的关系,也能为 Graves 病的治疗提供新的思路与新的方法。

参考文献(References)

- [1] Płoski R, Szymański K, Bednarczuk T. The Genetic Basis of Graves' Disease[J]. *Current genomics*, 2011, 12(8): 542
- [2] Hen K, Czarnywojtek A, Florek E, et al. The etiology of Graves' disease-current state of knowledge [J]. *Przegląd lekarski*, 2012, 69(10): 1132-1134
- [3] Liu W, Putnam AL, Zhou X, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺T reg cells [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203(7): 1701
- [4] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity [J]. *Annual review of immunology*, 2008, 26(1): 677
- [5] Helms C, Cao L, Krueger JG, et al. A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis[J]. *Nature genetics*, 2003, 35(4): 349-356
- [6] Karasek M, Lewinski A. Etiopathogenesis of Graves' disease [J]. *Przegląd Dermatologiczny*, 2003, 5(1): 15-21
- [7] Kroner A, Mehling M, Hemmer B, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis [J]. *Annals of Neurology*, 2005, 58(1): 50
- [8] Lee SH, Lee YA, Woo DH, et al. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population[J]. *Arthritis research & therapy*, 2006, 8(6): 1-6
- [9] Nielsen C, Hansen D, Husby S, et al. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes[J]. *Tissue Antigens*, 2003, 62(6): 492-497
- [10] Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application[J]. *International immunology*, 2007, 19(7): 813
- [11] Prokunina L, Castillejo López C, Oberg F, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans[J]. *Nature genetics*, 2002, 32(4): 666-669
- [12] 中华医学会内分泌学分会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组. 中国甲状腺疾病诊治指南 -- 甲状腺功能亢进症 [J]. *中华内科杂志*, 2007, 46(10): 876-882
- [13] Orbitopathy EGOG, Wiersinga WM, Perros P, et al. Clinical assessment of patients with Graves' orbitopathy: the European Group on Graves' Orbitopathy recommendations to generalists, specialists and clinical researchers[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2006, 155(3): 387-389
- [14] Kong YM, Flynn JC. Opportunistic Autoimmune Disorders Potentiated by Immune-Checkpoint Inhibitors Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5(5): 206
- [15] Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection [J]. *Nature immunology*, 2007, 8(3): 239
- [16] Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Im-

- munity[J]. Current Topics in Microbiology & Immunology, 2011, 350 (350): 17
- [17] Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1217(1): 45-59
- [18] Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity[J]. Autoimmunity reviews, 2013, 12(11): 1091-100
- [19] Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy [J]. Journal of leukocyte biology, 2013, 94(1): 25-39
- [20] Dai S, Jia R, Zhang X, et al. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases[J]. Cellular immunology, 2014, 290(1): 72-79
- [21] McLeod DSA, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity[J]. Endocrine, 2012, 42(2): 252
- [22] Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, et al. Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor[J]. Journal of Clinical Investigation, 2002, 110(2): 209
- [23] Rasmussen AK, Nygaard B, Feldt-Rasmussen U. (131)I and thyroid-associated ophthalmopathy [J]. European Journal of Endocrinology, 2000, 143(2): 155
- [24] Mchugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor[J]. Immunity, 2002, 16(2): 311
- [25] 党珊, 施秉银. Graves病患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的变化[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23(3)
- [26] 辛梦, 王强, 张磊, 等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在 Graves 眼病患者外周血中的表达[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(11): 2188-2291
- [27] Hu Y, Tian W, Zhang LL, et al. Function of regulatory T-cells improved by dexamethasone in Graves' disease [J]. European Journal of Endocrinology, 2012, 166(4): 641-646
- [28] Nakano A, Watanabe M, Iida T, et al. Apoptosis-induced decrease of intrathyroidal CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases [J]. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association, 2007, 17(1): 25-31
- [29] Marazuela M, Garcíalópez MA, Figueroavega N, et al. Regulatory T Cells in Human Autoimmune Thyroid Disease [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(9): 3639
- [30] Cai H, Kong W, Zhou T, et al. Radiofrequency ablation versus resection in treating recurrent hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. Medicine, 2014, 93(22): e122
- [31] Kristjansdottir H, Steinsson K, Gunnarsson I, et al. Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4⁺CD25⁺T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis & Rheumatism, 2010, 62(6): 1702
- [32] Smith TJ, Hegedüs L, Douglas RS. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy[J]. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012, 26(3): 291
- [33] Li S, Chen S, Yang L, et al. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2013, 6(1): 74
- [34] Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, et al. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses[J]. Transplantation, 2007, 83(6): 774
- [35] Bahn RS. Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy [J]. International Archives of Allergy & Immunology, 1997, 114(1): 101-102
- [36] Segundo C, Rodríguez C, Aguilar M, et al. Differences in thyroid-infiltrating B lymphocytes in patients with Graves' disease: relationship to autoantibody detection[J]. Thyroid Official Journal of the American Thyroid Association, 2004, 14(5): 337