

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.06.0704

## 甲状腺相关性眼病患者外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及细胞表面程序性死亡蛋白 1 表达的改变及其意义

夏晓玲, 汤 玮, 孙亮亮, 倪 奇, 刘浩琪, 陆晓敏, 孙 政, 石勇铨\*

第二军医大学长征医院内分泌科, 甲状腺相关性眼病诊治中心, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 观察甲状腺相关性眼病(TAO)患者外周血单个核细胞(PBMC)中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及细胞表面程序性死亡蛋白 1(PD-1)的表达水平, 探索这两者变化在 TAO 发病机制及疾病诊断中的意义。**方法** 收集 21 例 TAO 患者、21 例 Graves 病(GD)无眼病患者及 20 例健康对照者资料, 采用流式细胞术检测所有受试者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 的表达率, 比较组间差异, 分析其与患者病程、甲状腺功能、甲状腺相关抗体及 TAO 疾病活动性和严重程度之间的关系。**结果** (1) TAO 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比分别为(35.9±14.5)%、(22.2±8.4)%, GD 患者分别为(33.1±13.0)%、(18.6±9.2)%, 均高于健康对照者[(17.4±7.4)%、(7.7±4.8)%],  $P<0.01$ 。(2) TAO 及 GD 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达率分别为(8.3±6.4)%、(28.0±26.6)%, 均低于健康对照者[(52.2±28.6)%],  $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ], 且 TAO 患者低于 GD 患者( $P<0.05$ ); TAO 患者 PBMC 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达率低于健康对照者[(12.7±13.4)% vs (38.2±24.2)%],  $P<0.01$ 。(3) TAO 患者 PBMC 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比与病程呈正相关( $r=0.478$ ,  $P<0.05$ )。(4) TAO 患者活动期组与非活动期组、轻度组与中重度组间 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** TAO 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及细胞表面 PD-1 表达存在异常, 可能参与 TAO 的自身免疫过程。

**[关键词]** 甲状腺相关性眼病; Graves 眼病; 程序性死亡蛋白 1; 共刺激分子; 自身免疫

**[中图分类号]** R 581.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)06-0704-07

## Changes of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cell proportions and cell surface programmed death-1 level in peripheral blood mononuclear cells of patients with thyroid-associated ophthalmopathy

XIA Xiao-ling, TANG Wei, SUN Liang-liang, NI Qi, LIU Hao-qi, LU Xiao-min, SUN Zheng, SHI Yong-quan\*

Department of Endocrinology, Diagnosis and Treatment Center of Thyroid-Associated Ophthalmopathy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the changes of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cell proportions and the level of cell surface programmed death-1 (PD-1) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO), and to explore their roles in the pathogenesis and diagnosis of TAO. **Methods** The clinical data of 21 TAO patients, 21 Graves disease (GD) patients without ophthalmopathy and 20 healthy volunteers were collected. The proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells in PBMCs and cell surface PD-1 expressions were tested by flow cytometry and were compared between different groups; and their correlation with disease course, thyroid functions, thyroid associated antibodies and severity of TAO were analyzed. **Results** (1) The proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells in PBMCs of TAO patients ([35.9±14.5]% and [22.2±8.4]%, respectively) and GD patients ([33.1±13.0]% and [18.6±9.2]%, respectively) were both significantly higher than those in the healthy volunteers ([17.4±7.4]% and [7.7±4.8]% respectively, both  $P<0.01$ ). (2) The expression of PD-1 on CD4<sup>+</sup>T cells in TAO and GD patients were (8.3±6.4)% and (28.0±26.6)%, respectively, with both being significantly lower than those in the healthy volunteers ([52.2±28.6]%,  $P<0.01$  and  $P<0.05$ , respectively), and that in TAO patients was significantly lower than that in GD patients ( $P<0.05$ ). The expression of PD-1 in CD8<sup>+</sup>T cells was significantly lower in TAO patients than that in the healthy volunteers ([12.7±13.4]% vs [38.2±24.2]%,  $P<0.01$ ). (3) Correlation analysis showed

**[收稿日期]** 2016-02-18 **[接受日期]** 2016-03-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81170728). Supported by National Natural Science Foundation of China (81170728).

**[作者简介]** 夏晓玲, 硕士生. E-mail: 675062388@qq.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885373, E-mail: young.stone@163.com

that there was a positive correlation between disease course and CD8<sup>+</sup>T cell proportion in PBMCs of TAO patients ( $r=0.478$ ,  $P<0.05$ ). (4) There was no significant difference in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells proportions or their PD-1 expressions between active and inactive, mild and moderate-to-severe TAO patients ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The aberrant proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells in PBMCs and cell surface PD-1 expression may participate in the autoimmune process of TAO.

**[Key words]** thyroid-associated ophthalmopathy; Graves ophthalmopathy; programmed death-1; costimulatory molecules; autoimmunity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(6): 704-710]

甲状腺相关性眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy, TAO) 是一种以炎症反应紊乱为特征的器官特异性自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>, 与 Graves 病 (Graves disease, GD) 密切相关, 是 GD 最常见、最重要的甲状腺外器官损害。TAO 活动期主要病理特征为眼外肌和球后结缔组织中大量淋巴细胞浸润, 其中大多数为 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 其次为 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 并伴随少量 B 细胞、巨噬细胞等浸润, 提示 T 淋巴细胞在 TAO 发病中起重要作用<sup>[2]</sup>。程序性死亡蛋白1 (programmed death-1, PD-1) 属于负性共刺激分子, 主要表达在活化的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞表面, 它通过与其配体结合从而发挥负性调控 T 细胞的活化及维持免疫耐受的作用<sup>[3]</sup>。Newby 等<sup>[4]</sup>对英国高加索人群进行单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 检测后发现, PD-1 基因的多态性可能与 GD 发病相关, 但是关于 PD-1 在 TAO 中的表达及其意义尚不明确。本研究通过观察 TAO 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比和细胞表面 PD-1 表达水平的改变及其与病程、实验室指标、疾病活动性、疾病严重程度之间的关系, 初步探讨 PD-1 在 TAO 发病机制中的意义与诊断价值。

## 1 资料和方法

1.1 研究对象 TAO 组: 2015 年 3 月至 2015 年 10 月在第二军医大学长征医院内分泌科初诊住院的 TAO 患者, 均符合 Bartley 诊断标准, 根据 EUGOGO 标准<sup>[5]</sup>进行临床活动性评分 (CAS 评分) 及严重程度分级。GD 组: 同期经本院门诊初诊且未接受药物治疗的 GD 患者, 临床诊断符合美国甲状腺学会标准, 眼眶 MRI 排除眼部改变。健康对照组: 同期在本院体检的健康者。3 组人群在采集标本前 3 个月内均未接受过免疫抑制剂和糖皮质激素的治疗, 且排除其他自身免疫性疾病、过敏性疾病

和严重感染等情况; 育龄女性尿妊娠试验阴性。本研究经第二军医大学长征医院医学伦理委员会批准, 所有受试者均签署知情同意书。

1.2 TAO 活动性及严重程度评价方法 TAO 活动性临床评分标准 (EUGOGO CAS 评分, 7 分法): (1) 自发性眼球疼痛; (2) 眼球凝视时疼痛; (3) 眼睑水肿; (4) 眼睑红斑; (5) 结膜充血; (6) 球结膜水肿; (7) 肉阜肿胀。上述每项临床表现积 1 分, CAS 评分  $\geq 3$  分为 TAO 疾病活动期。TAO 严重程度分级标准 (EUGOGO): (1) 轻度, 即眼睑挛缩  $< 2$  mm, 轻度软组织受累, 眼球突出度  $< 25$  mm, 无或一过性复视, 无角膜外露或视神经受累; (2) 中重度, 即眼睑挛缩  $\geq 2$  mm, 或中重度软组织受累, 或眼球突出度  $\geq 25$  mm, 或持续性、非持续性复视, 或角膜轻度外露, 无视神经受累; (3) 威胁视力, 即重度角膜外露或视神经受累。

1.3 主要仪器与试剂 FITC 标记的抗人 CD4、CD8a 抗体、PE 标记的抗人 PD-1 抗体均购自美国 eBioscience 公司, 人淋巴细胞分离液购自美国 CEDARLANE 公司, Accuri C6 流式细胞仪购自美国 BD 公司。人游离三碘甲状腺原氨酸 (FT3)、游离甲状腺素 (FT4)、促甲状腺激素 (TSH) 检测试剂盒 (电化学发光法) 及人促甲状腺素受体抗体 (TRAb)、过氧化物酶抗体 (TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体 (TgAb) 检测试剂盒 (电化学发光法) 和 Cobas E601 型全自动电化学发光免疫分析仪均购自德国 Roche 公司。

### 1.4 实验方法

1.4.1 PBMC 悬液的制备 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管收集各组受试者清晨空腹状态下外周静脉血 2 mL, 加入 2 mL PBS 稀释, 轻轻混匀后加到预先加有 4 mL 人淋巴细胞分离液的离心管上层,  $2560 \times g$  离心 10 min。取中间白膜层 (即 PBMC 层), PBS 清洗 3 次, 加入 1 mL 含 1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞, 即得 PBMC 悬液。

1.4.2 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞及其表面 PD-1 的流式检测 对 PBMC 悬液进行细胞计数, PBS 稀释,调整待测细胞密度为 10<sup>6</sup>/mL。取 200 μL 细胞悬液,853×g 离心 5 min(4℃),取沉淀用预冷 PBS 1 mL 润洗 2 次,重悬于 100 μL PBS;分别加入相应的抗体 5 μL,轻轻混匀,4℃避光孵育 1~2 h,同时以不加抗体作为阴性对照。2 560×g 离心 10 min,弃上清,沉淀加入 200 μL PBS 重悬,用流式细胞仪进行检测。

1.4.3 FT3、FT4、TSH 与 TRAb、TPOAb、TgAb 的检测 使用 FT3、FT4、TSH、TRAb、TPOAb、TgAb 电化学发光法检测试剂盒,严格按照试剂盒说明书操作,用第二军医大学长征医院生化实验室 Cobas E601 型全自动电化学发光免疫分析仪进行检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件完成所有统计分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  描述,分类变量以百分率(%)描述。计量资料的组间比较,如果数据资料为正态分布且方差齐采用方差分析或 *t* 检验,否

则采用秩和检验;计数资料的组间比较采用  $\chi^2$  检验。为了控制混杂因素的影响应用偏相关进行分析,采用 Pearson 法进行相关性分析。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 病例一般资料 TAO 组患者 21 例,GD 组患者 21 例,健康对照组受试者 20 例,3 组人群性别构成、年龄、眼病病程、吸烟情况、甲状腺功能、甲状腺相关抗体水平等见表 1。3 组组间性别构成、年龄、吸烟情况比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。TAO 组与健康对照组受试者之间眼病病程、FT3、TSH、TRAb、TPOAb 水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ );GD 组与健康对照组之间 FT3、FT4、TSH、TRAb、TPOAb、TGAb 水平差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );TAO 组与 GD 组之间眼病病程、FT3、FT4、TSH、TPOAb、TGAb 水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 3 组研究对象基线特征比较

Tab 1 Baseline characteristic of the participants in three groups

General data	Healthy volunteer group N=20	GD group N=21	TAO group N=21
Age (year), $\bar{x} \pm s$	44.9 ± 12.4	41.5 ± 15.7	44.8 ± 12.7
Female <i>n</i> (%)	12(60.0)	16(76.2)	16(76.2)
Smoking <i>n</i> (%)	7(35.0)	5(23.8)	4(19.0)
Duration of TAO <i>t</i> /month, $\bar{x} \pm s$	0	0	27 ± 52* $\Delta$
FT3 <i>c<sub>B</sub></i> /(pmol · L <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	4.40 ± 0.72	18.71 ± 11.81*	11.54 ± 13.06* $\Delta$
FT4 <i>c<sub>B</sub></i> /(pmol · L <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	16.02 ± 1.92	46.73 ± 22.21*	31.42 ± 31.07 $\Delta$
TSH <i>z<sub>B</sub></i> /(mIU · L <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	1.94 ± 0.99	0.01 ± 0.01*	5.07 ± 19.25* $\Delta$
TRAb <i>z<sub>B</sub></i> /(IU · L <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	0.45 ± 0.21	12.31 ± 12.15*	14.94 ± 12.46*
TPOAb <i>z<sub>B</sub></i> /(IU · L <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	12.95 ± 7.46	302.21 ± 226.73*	108.97 ± 193.19* $\Delta$
TGAb <i>z<sub>B</sub></i> /(IU · mL <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	32.62 ± 25.47	473.25 ± 643.12*	570.43 ± 225.28 $\Delta$

GD: Graves disease; TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; FT3: Free 3,5,3-triiodothyronine; FT4: Free thyroxine; TSH: Thyroid stimulating hormone; TRAb: Thyroid-stimulating hormone receptor antibody; TPOAb: Anti-thyropoxidase antibody; TGAb: Anti-thyroglobulin antibody. \*  $P < 0.05$  vs healthy volunteer group;  $\Delta P < 0.05$  vs GD group

2.2 3 组人群 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比 TAO 组患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞所占百分比分别为(35.9 ± 14.5)%、(22.2 ± 8.4)%, GD 组分别为(33.1 ± 13.1)%、(18.6 ± 9.2)%,均高于健康对照组[(17.4 ± 7.4)%、(7.7 ± 4.8)%],差异有统计学意义( $P < 0.01$ );TAO 组与 GD 组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 1)。

2.3 3 组受试者 PBMC 和 CD 组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 PD-1 的表达 TAO 组和 GD 组患者 PBMC

中 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面 PD-1 的表达率分别为(8.3 ± 6.4)%和(28.0 ± 26.6)%,均低于健康对照组[(52.2 ± 28.6)%],且 TAO 组低于 GD 组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ , $P < 0.05$ )。TAO 组和 GD 组患者 PBMC 中 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 PD-1 的表达率为(12.7 ± 13.4)%,低于健康对照组[(38.2 ± 24.2)%],差异有统计学意义( $P < 0.01$ );GD 组为(26.6 ± 23.2)%,与 TAO 组及健康对照组之间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 2)。

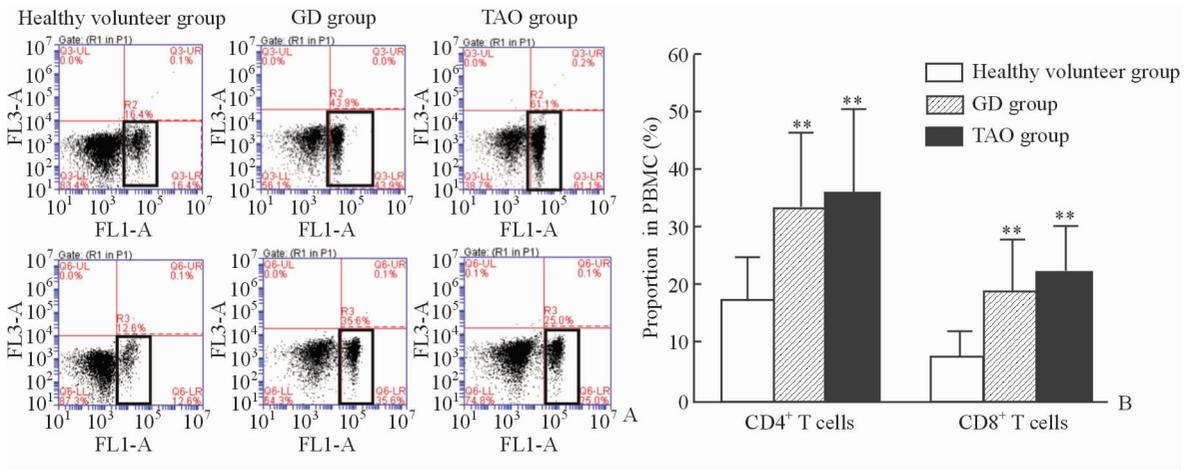


图 1 3 组受试者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比

Fig 1 Proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells of PBMC in three groups

A: Flow charts of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells proportions in PBMC. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells were treated with 5 μL FITC labeled anti-human CD4, CD8α antibodies for 1-2 h, and the numbers of positive cells were determined by flow cytometry. The top row is CD4<sup>+</sup>T cells and the bottom row is CD8<sup>+</sup>T cells. Cells in black box were positive. FL1-A corresponds to FITC labeled antibodies. FL3-A corresponds to blank. B: Statistical charts of proportions of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in three groups. PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; FITC: Fluorescein isothiocyanate; GD: Graves disease; TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy. \*\*  $P < 0.01$  vs healthy volunteer group.  $n = 20$  for healthy volunteer group,  $n = 21$  for GD group and TAO group.  $\bar{x} \pm s$

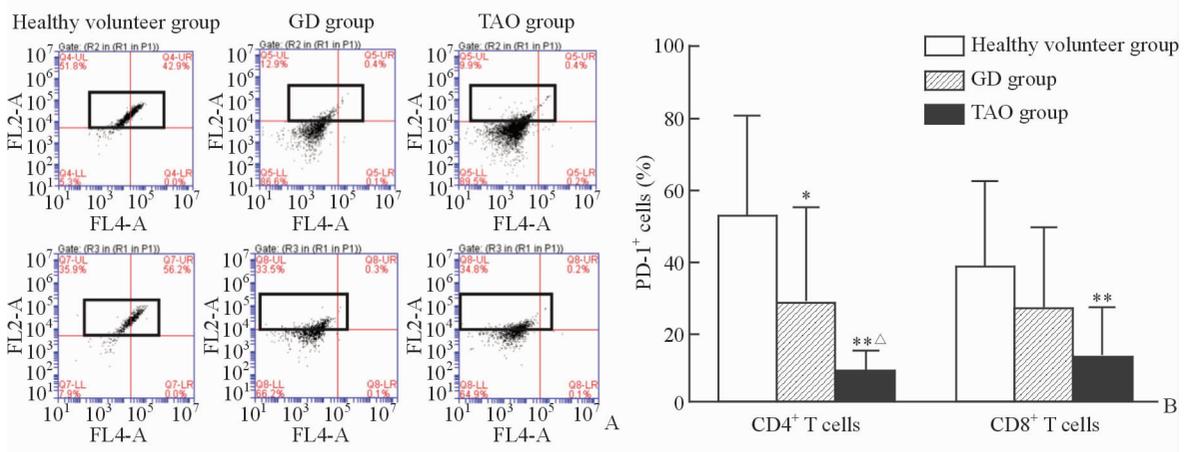


图 2 3 组受试者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达率

Fig 2 PD-1 expression in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells of PBMC in three groups

A: Flow charts of PD-1 expression on CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells in PBMC. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells were separated and treated with 5 μL PE labeled anti-human PD-1 antibodies for 1-2 h, and the numbers of positive cells were determined by flow cytometry. The top row is CD4<sup>+</sup>T cells and the bottom row is CD8<sup>+</sup>T cells. Cells in black box were positive. FL2-A corresponds to PE labeled antibodies. FL3-A corresponds to blank. B: Statistical charts of PD-1 expression on CD4<sup>+</sup>T cells and CD8<sup>+</sup>T cells in three groups. PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; PD-1: Programmed death-1; PE: Phycoerythrin; GD: Graves disease; TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy. \*\*  $P < 0.01$  vs healthy volunteer group; △  $P < 0.05$  vs GD group.  $n = 20$  for healthy volunteer group,  $n = 21$  for GD group and TAO group.  $\bar{x} \pm s$

2.4 3 组受试者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率与病程、甲状腺功能及甲状腺相关抗体的关系 3 组受试者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率与其病程、甲状腺功能及甲状腺相关抗体水平之间的相关性采用偏相关分析,结果(表 2)显示,3 组受试者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率与其病程、FT3、FT4、TSH、TRAb、TPOAb 及 TGAb 水平均无相关性( $P > 0.05$ )。

2.5 TAO 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率与患者病程、甲状腺功能及甲状腺相关抗体的关系 TAO 患者 PBMC 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比与患者病程呈正相关( $r = 0.478, P = 0.028$ ),与甲状腺功能及甲状腺相关抗体无相关性( $P > 0.05$ );CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达率、CD4<sup>+</sup>T 细胞百分比及其细胞表面 PD-1 表达率与患者病程、甲状腺功能及甲状腺相关抗体之间均无相关性(表 3)。

表 2 3组受试者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞及其表面 PD-1 表达率与病程、甲状腺功能、甲状腺相关抗体的偏相关分析

Tab 2 Partial correlation analysis between the proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells in PBMC, PD-1 expression on cell surface in TAO patients and disease course, thyroid functions and levels of thyroid antibodies

	CD4 <sup>+</sup> T cells		CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T cells		CD8 <sup>+</sup> T cells		CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T cells	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Duration of TAO	-0.108	>0.05	0.002	>0.05	0.240	>0.05	0.023	>0.05
FT3	0.114	>0.05	-0.087	>0.05	0.011	>0.05	-0.132	>0.05
FT4	0.097	>0.05	-0.081	>0.05	-0.017	>0.05	-0.078	>0.05
TSH	0.042	>0.05	-0.049	>0.05	0.157	>0.05	-0.082	>0.05
TRAb	0.125	>0.05	-0.160	>0.05	0.071	>0.05	-0.150	>0.05
TPOAb	0.028	>0.05	-0.105	>0.05	0.051	>0.05	-0.107	>0.05
TGAb	-0.041	>0.05	-0.041	>0.05	-0.092	>0.05	-0.047	>0.05

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; PD-1: Programmed death-1; TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; FT3: Free 3, 5, 3-triiodothyronine; FT4: Free thyroxine; TSH: Thyroid stimulating hormone; TRAb: Thyroid-stimulating hormone receptor antibody; TPOAb: Anti-thyropoxidase antibody; TGAb: Anti-thyroglobulin antibody

表 3 TAO 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞及其表面 PD-1 表达率与病程、甲状腺功能、甲状腺相关抗体的相关性

Tab 3 Correlation analysis between the proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells in PBMC, PD-1 expression on cell surface in TAO patients and disease course, thyroid functions and levels of thyroid antibodies

	CD4 <sup>+</sup> T cells		CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T cells		CD8 <sup>+</sup> T cells		CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T cells	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Duration of TAO	-0.083	>0.05	-0.049	>0.05	0.478	<0.05	-0.048	>0.05
FT3	-0.228	>0.05	-0.121	>0.05	-0.371	>0.05	-0.241	>0.05
FT4	-0.186	>0.05	-0.084	>0.05	-0.296	>0.05	-0.195	>0.05
TSH	0.117	>0.05	-0.282	>0.05	0.307	>0.05	-0.198	>0.05
TRAb	-0.089	>0.05	-0.330	>0.05	-0.018	>0.05	-0.209	>0.05
TPOAb	-0.053	>0.05	-0.265	>0.05	0.185	>0.05	-0.309	>0.05
TGAb	-0.015	>0.05	-0.148	>0.05	-0.072	>0.05	0.048	>0.05

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; PD-1: Programmed death-1; TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; FT3: Free 3, 5, 3-triiodothyronine; FT4: Free thyroxine; TSH: Thyroid stimulating hormone; TRAb: Thyroid-stimulating hormone receptor antibody; TPOAb: Anti-thyropoxidase antibody; TGAb: Anti-thyroglobulin antibody

2.6 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率与 TAO 疾病活动性和严重程度的关系 根据 CAS 评分结果将 TAO 患者分为 2 个亚组,其中活动期组 10 例、非活动期组 11 例,2 组患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率差异均无统计学意义( $P>0.05$ ,表 4)。

根据 TAO 严重程度分级标准将 TAO 患者分为轻度组和中重度组 2 个亚组,其中轻度组 11 例、中重度组 10 例,2 组患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率差异也均无统计学意义( $P>0.05$ ,表 4)。

表 4 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 表达率与 TAO 患者疾病活动性和严重程度的关系

Tab 4 Relationship between the proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T cells in PBMC, PD-1 expression on cell surface and activity and severity of TAO

	CD4 <sup>+</sup> T cells	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T cells	CD8 <sup>+</sup> T cells	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T cells
%, $\bar{x}\pm s$				
CAS				
Active group <i>n</i> =10	34.5±13.3	9.6±7.3	22.3±9.2	8.4±7.5
Inactive group <i>n</i> =11	37.2±16.1	7.1±5.6	22.0±8.1	16.7±16.5
<i>P</i>	0.573	0.549	0.888	0.597
Severity				
Mild group <i>n</i> =11	35.3±14.2	7.6±6.4	21.5±8.7	14.6±14.9
Moderate-to-severe group <i>n</i> =10	35.3±15.6	9.3±6.6	22.4±8.9	12.2±12.9
<i>P</i>	0.849	0.621	0.970	1.000

TAO: Thyroid-associated ophthalmopathy; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; PD-1: Programmed death-1; CAS: Clinical activity score

### 3 讨论

TAO 是一种具有潜在致盲性的严重眼眶疾病,多发生于 GD 患者或既往有 GD 病史的患者中,因此又称为 Graves 眼病 (Graves ophthalmopathy, GO)<sup>[6]</sup>。据报道 GD 患者中 TAO 患病率可高达 25%~50%<sup>[7]</sup>。两病在发病机制上有一定联系,存在共同抗原,由遗传、环境及免疫因素相互作用、共同致病<sup>[8]</sup>。

目前普遍认为免疫因素在 TAO 的发病机制中占主导地位,其中以 T 细胞免疫为主,其免疫学基础是在 TAO 患者眼眶组织中发现大量 CD4<sup>+</sup>T 细胞浸润,其次为 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[2]</sup>。浸润的 T 细胞活化后可释放干扰素 (IFN)- $\gamma$ 、白介素 (IL)-1 $\beta$ 、IL-2、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  等细胞因子及白细胞调节素,诱导眼眶成纤维细胞合成并释放透明质酸,参与 TAO 患者眼眶组织病理改变<sup>[6]</sup>。同样,T 细胞免疫在 GD 的发病中也具有重要作用<sup>[9]</sup>。其中一个主要环节是抗原提呈细胞识别抗原并呈递给 T 细胞,T 细胞活化后进一步增殖、分化为辅助性 CD4<sup>+</sup>T 细胞及细胞毒性 CD8<sup>+</sup>T 细胞,发挥分泌炎性因子及攻击靶细胞等作用,参与炎症反应及组织损伤<sup>[10]</sup>。既往研究也发现 GD 患者外周血与甲状腺组织中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比升高<sup>[11]</sup>,但有关 TAO 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比改变的报道较少。本研究发现 GD 组患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比均高于健康对照组 ( $P < 0.01$ ),与以往研究相一致,进一步佐证 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞的激活参与了 GD 的发病;而 TAO 组患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比也高于健康对照组 ( $P < 0.01$ ),且与 GD 组之间差异无统计学意义,提示 TAO 与 GD 存在相似的全身免疫紊乱状态。PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞激活与 TAO 发病相关,其发挥作用的机制可能和 GD 相同,与目前普遍认同的两病存在共同自身免疫发病机制的学说相一致。该研究结果具有一定的临床意义,PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞比值升高可作为 TAO 及 GD 疾病诊断的一个重要免疫学指标,提示患者的全身免疫紊乱状态。

TAO 与 GD 在发病上虽然有相似的免疫机制,但并不是所有 GD 患者均发生 TAO,而 TAO 也可

发生在其他自身免疫性甲状腺疾病的患者中<sup>[1]</sup>。因此,虽然 TAO 患者眼眶组织与 GD 发病过程中甲状腺病理改变之间存在联系,但是发病机制并不完全相同,TAO 发病机制中可能有其独特的免疫学异常。为进一步探讨 TAO 与 GD 两病中 T 细胞免疫紊乱的特点,本研究对 TAO 与 GD 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达率进行了检测。PD-1 是近年发现的负性共刺激分子之一,主要在活化的 T 细胞表面表达,在 B 细胞及树突状细胞表面亦有表达。PD-1 通过与其配体 PD-L1、PD-L2 结合,阻断 T 细胞增殖活化、减少细胞因子合成,但不增加细胞死亡,从而发挥免疫抑制作用<sup>[12]</sup>。近年来,多项动物实验研究证实 PD-1 通路在阻断免疫反应中发挥重要作用<sup>[3]</sup>,而基因组学研究发现人类某些种族人群 PD-1 基因 SNP 与其自身免疫性疾病高发风险相关<sup>[12]</sup>,提示 PD-1 在自身免疫性疾病中具有重要作用。本研究结果显示 TAO 组及 GD 组患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达率、TAO 组患者 PBMC 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达率低于健康对照组,提示 PD-1 表达异常可能是 TAO 及 GD 的发病机制之一。缺乏 PD-1 的负性调控作用,外周血 T 细胞“逃逸”免疫耐受而过度活化增殖,对自身抗原产生持续的免疫应答,通过释放炎性因子和增强细胞溶解作用促进炎症反应的发生,导致机体组织损伤;其中 TAO 患者 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞均参与致病过程,而 GD 患者以 CD4<sup>+</sup>T 细胞免疫为主。同时,TAO 组患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达率低于 GD 组,其中 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示 TAO 患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞生物学活性更强,自身免疫紊乱可能更严重、更持久。PBMC 中 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达率的下调水平可以作为鉴别 TAO 和 GD 的一项参考指标。

此外,在对 TAO 组进行相关性分析时发现,TAO 组患者 PBMC 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比与患者病程呈正相关,提示随着 TAO 患者病程的延长,其 PBMC 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比增加,在细胞免疫中发挥的作用越大,尽早干预治疗可能有助于控制病情的发展。然而,TAO 组患者 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比及其表面 PD-1 的表达率与患者 TAO 疾病活动性及严重程度无明显相关,表明 PD-1 表达率不

能作为 TAO 病情严重程度及活动性的指标。但以上结果尚需要大样本研究进一步证实。

本研究仍存在一定的局限性,研究检测的 T 细胞来源于患者外周血循环中,而 TAO 患者眼眶组织中浸润的 T 细胞在细胞来源及分布上均与外周血有所差异,且受不同微环境因素的影响,其表面共刺激分子的表达亦可能不同。下一步研究将检测 TAO 患者眼眶组织中浸润的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比及其表面 PD-1 的表达水平,进一步明确 PD-1 与 TAO 眼部病理改变机制之间的关系。

综上,本研究结果显示 TAO 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比升高、其表面 PD-1 的表达下调,提示 TAO 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比及其表面 PD-1 的表达参与 TAO 的自身免疫过程。PBMC 中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比升高、CD4<sup>+</sup> T 细胞表面 PD-1 表达率下调均可作为了解患者疾病状态的重要免疫学指标,对其深入研究将有助于我们进一步明确 TAO 的发病机制,为 TAO 疾病的治疗和预防提供新靶点。

#### [参考文献]

- [1] BAHN R S. Graves' ophthalmopathy[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362: 726-738.
- [2] PAPPA A, LAWSON J M, CALDER V, FELLS P, LIGHTMAN S. T cells and fibroblasts in affected extraocular muscles in early and late thyroid associated ophthalmopathy[J]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84: 517-522.
- [3] YAO S, CHEN L P. PD-1 as an immune modulatory receptor[J]. *Cancer J*, 2014, 20: 262-264.
- [4] NEWBY P R, ROBERTS-DAVIES E L, BRAND O J, HEWARD J M, FRANKLYN J A, GOUGH S C, et al. Tag SNP screening of the *PDCD1* gene for

association with Graves' disease[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007, 67: 125-128.

- [5] BARRIO-BARRIO J, SABATER A L, BONET-FARRIOL E, VELÁZQUEZ-VILLORIA, GALOFRÉ J C. Graves' ophthalmopathy: VISA versus EUGOGO classification, assessment, and management [J]. *J Ophthalmol*, 2015, 2015: 249125.
- [6] BAHN R S. Current insights into the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy[J]. *Horm Metab Res*, 2015, 47: 773-778.
- [7] LYER S, BAHN R. Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of the TSH receptor[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012, 26: 281-289.
- [8] BAHN R S. Clinical review 157: pathophysiology of Graves' ophthalmopathy: the cycle of disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 1939-1946.
- [9] BAGNASCO M, VENUTI D, PRIGIONE I, TORRE G C, FERRINI S, CANONICA G W. Graves' disease: phenotypic and functional analysis at the clonal level of the T-cell repertoire in peripheral blood and in thyroid [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1988, 47: 230-239.
- [10] WIERSINGA W M. Thyroid autoimmunity [J]. *Endocr Dev*, 2014, 26: 139-157.
- [11] BEN-SKOWRONEK I, SZEWCZYK L, KULIK-RECHBERGER B, KOROBOWICZ E. The differences in T and B cell subsets in thyroid of children with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis[J]. *World J Pediatr*, 2013, 9: 245-250.
- [12] GIANCACCCHI E, DELFINO D V, FIERABRACCI A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity [J]. *Autoimmun Rev*, 2013, 12: 1091-1100.

[本文编辑] 曾奇峰