“拨乱反正”谈甲功异常

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003118

初发 Graves 病患者外周血调节性 T 细胞及滤泡调节性 T 细胞检测的临床研究

冯文文，杨艳丽，陈诗颖，胡译方，蒋　琳，徐宽枫，崔　岱
（南京医科大学第一附属医院内分泌科，南京　210029）

【摘　要】目的：检测 Graves 病（Graves' disease，GD）患者外周血调节性 T 细胞（regulatory T cells，Tregs）、滤泡调节性 T 细胞（follicular regulatory T cells，Tfrs）、滤泡辅助性 T 细胞（follicular helper T cells，Tfhs）数量及其表面分子肿瘤坏死因子受体超家族成员 4（tumor necrosis factor receptor superfamily member 4，OX40）、程序性死亡因子 1（programmed-death 1，PD-1）的表达。**方法：**纳入初发 GD 患者 23 例（GD 组）和健康对照者 22 例（NC 组），通过流式细胞术检测 2 组外周血 Tregs（$CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$）、Tfrs（$CD4^+Foxp3^+PD\text{-}1^+$ $CXCR5^+$）及 Tfhs（$CD4^+Foxp3^-PD\text{-}1^+CXCR5^+$）细胞比例及其表面分子 OX40、PD-1 表达，分析 GD 发病与 Tregs、Tfrs、Tfhs 及其 OX40、PD-1 表达的关系，同时分析各检测指标与临床指标的相关性，初步探讨其临床意义。**结果：**与 NC 组相比，GD 组 Tregs 数量明显升高，Tregs 上 PD-1 表达降低，Tregs 上 PD-1 表达与 TRAb 水平呈显著负相关；初发 GD 患者 Tfrs 数量明显降低，且 Tfrs 上 OX40 表达上调，Tfrs 数量与 TRAb 呈显著负相关。**结论：**PD-1 在 Tregs 上的低表达可能通过影响 Tregs 功能参与 GD 发病，GD 患者体内 Tfrs 数量明显减少，且其 OX40 表达明显升高，OX40 可能通过影响 Tfrs 与 Tfhs 稳态参与 GD 发病，这为临床上关于 GD 的治疗提供了新思路。

【关键词】Graves 病；调节性 T 细胞；滤泡调节性 T 细胞；滤泡辅助性 T 细胞
【中图分类号】R581.1　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2022-06-06

Clinical study on regulatory T cells and follicular regulatory T cells detection of peripheral blood in patients with newly-diagnosed Graves' disease

Feng Wenwen, Yang Yanli, Chen Shiying, Hu Yifang, Jiang Lin, Xu Kuanfeng, Cui Dai
(*Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the number of regulatory T cells (Tregs), follicular regulatory T cells (Tfrs), follicular helper T cells (Tfhs), and the expression of their surface molecules tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 (OX40) and programmed-death factor 1 (PD-1) in peripheral blood of patients with Graves' disease (GD). ***Methods*:** A total of 23 newly-diagnosed GD patients (GD group) and 22 normal controls (NC group) were enrolled in this study. The proportions of Tregs ($CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$), Tfrs ($CD4^+Foxp3^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$) and Tfhs ($CD4^+Foxp3^-PD\text{-}1^+CXCR5^+$), and the expression of their surface molecules OX40 and PD-1 in peripheral blood of the two groups were detected by flow cytometry. The relationship between the pathogenesis of GD and Tregs, Tfrs, Tfhs, OX40 and PD-1 was analyzed. The correlations between the detection indexes and clinical indexes were also analyzed, and the clinical significance was preliminarily discussed. ***Results*:** Compared with the NC group, the number of Tregs in the GD group was significantly increased, and the expression of PD-1 on Tregs was decreased. PD-1 expression on Tregs was significantly negatively correlated with TRAb level. The number of Tfrs was significantly decreased in newly-diagnosed GD patients, and OX40 expression was up-regulated on Tfrs. The number of Tfrs was negatively correlated with TRAb. ***Conclusion*:** The low expression of PD-1 on Tregs may be involved in the pathogenesis of GD by affecting the function of Tregs. The number of Tfrs in GD patients is significantly reduced, and the expression of OX40 is significantly increased. OX40 may be involved in the pathogenesis of GD by affecting Tfrs and Tfhs homeostasis. These results may provide some new ideas for the clinical treatment of GD.

【Key words】Graves' disease; regulatory T cell; follicular regulatory T cell; follicular helper T cell

作者介绍：冯文文，Email：1620022160@qq.com，
研究方向：自身免疫性甲状腺疾病。
通信作者：崔　岱，Email：cui_dai@163.com。
基金项目：中国健康促进基金会 2020 甲状腺中青年医生资助项目。
优先出版：https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20221114.0851.002.html（2022-11-15）

Graves病（Graves' disease，GD）又称弥漫性毒性甲状腺肿，是常见的器官特异性自身免疫性疾病。GD多见于30~60岁女性，发病率为1%~1.5%[1]。目前，GD的确切发病机制尚未完全明确，主要认为与遗传、环境因素有关，上述因素共同作用导致机体免疫平衡失调[2]。研究发现，T淋巴细胞功能异常参与多种自身免疫性甲状腺疾病的发病[3]。调节性T细胞（regulatory T cells，Tregs）是一类经典的具有免疫抑制功能的$CD4^+$T细胞亚群，在诱导自身抗原免疫耐受、防止过度炎症反应方面发挥重要作用[4]。滤泡辅助性T细胞（follicular helper T cells，Tfhs）是一种$CD4^+$辅助性T细胞新亚群，在生发中心反应及体液免疫中发挥重要作用。而滤泡调节性T细胞（follicular regulatory T cells，Tfrs）可抑制Tfhs介导的B细胞活化和抗体产生[5]。研究发现Tregs数量和（或）功能异常、Tfhs与Tfrs平衡失调参与多种自身免疫性疾病的发病，如系统性红斑狼疮、风湿性疾病等[6-10]。同样地，在GD的相关研究中发现，Tregs数量和（或）功能缺陷可能参与其发病[11-13]，但研究结论存在一定矛盾。关于Tfhs与Tfrs的研究较少。有研究指出，Tfhs可能与GD发病有关[14]。肿瘤坏死因子受体超家族成员4（tumor necrosis factor receptor superfamily member 4，OX40）、程序性死亡因子1（programmed-death 1，PD-1）是2种重要的细胞表面分子，OX40信号通路在T细胞活化尤其是后期介导的免疫反应中必不可少，PD-1信号通路可阻断效应T细胞（effector T cells，Teffs）介导的炎症活动并促进Tregs功能。本研究旨在比较初发GD患者和健康人群中Tregs、Tfrs、Tfhs数量及其OX40、PD-1表达差异，分析各检测指标与临床资料的相关性，并研究$CD4^+CD25^+$T细胞上OX40与Foxp3表达的相关性，初步探索GD发病的相关免疫学机制，从而为临床治疗GD提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象

招募2021年1月至2022年3月于南京医科大学第一附属医院内分泌科就诊的初发GD患者，共纳入23例GD，所有患者均符合《内科学》（第8版）诊断标准。其中，男性5例，女性18例，年龄19~56岁。另外，同期选取门诊健康体检者22例为正常对照（normal control，NC）组。其中，男性4例，女性18例，年龄20~69岁，甲状腺无肿大，甲状腺功能正常，且无自身免疫性甲状腺疾病个人史及家族史。排除标准：①使用抗甲状腺药物或其他免疫抑制剂治疗；②合并其他自身免疫性疾病，如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等；③严重肝、肾、胃肠道、血液系统、脑、循环系统疾病；④妇女怀孕、哺乳或者6个月内计划怀孕的；⑤恶性肿瘤病史。本研究已获得南京医科大学第一附属医院（江苏省人民医院）伦理委员会审查和批准，伦理批号为2020-SR-466。

1.2 主要试剂及仪器

APC-H7鼠抗人CD3抗体、BV510鼠抗人CD4抗体、PE-cy7鼠抗人CD25抗体、BB700鼠抗人CD134抗体和BB515鼠抗人CXCR5抗体均购自美国BD公司，Alexa Fluor 647鼠抗人Foxp3抗体和PE鼠抗人PD-1抗体均购自美国BioLegend公司；Fixation/Permeabilization Concentrate、Fixation/Permeabilization Diluent和Permeabilization Buffer（10×）均购自美国eBioscience公司；RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司；人淋巴细胞分离液购自爱必信（上海）生物科技有限公司；PBS购于美国proteinbio公司。FACSAria™流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 实验方法

空腹采集患者外周静脉血，分别收集于普通干燥管及肝素抗凝管中。普通干燥管中血清送检，采用电化学发光免疫法测定游离三碘甲状腺原氨酸（free triiodothyronine，FT3）、游离甲状腺素（free thyroxine，FT4）、促甲状腺激素（thyroid stimulating hormone，TSH）、甲状腺过氧化物酶抗体（thyroid peroxidase antibody，TPOAb）、甲状腺球蛋白抗体（thyroglobulin antibody，TGAb）、促甲状腺激素受体抗体（thyrotrophin receptor antibody，TRAb）水平，配套试剂盒均由德国Roche公司提供，肝素抗凝静脉血取3 mL于6 h内采用密度梯度法分离外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC），通过PBS重悬PBMC，调整细胞浓度约1×10^6个/100 μL。首先取9支流式管，每管加入细胞悬液100 μL，其中试管1不加抗体，作为空白管，试管2~4、6~8分别加入CD3、CD4、CD25、OX40、PD-1、CXCR5抗体3 μL，作为单标管，试管9同时加入上述6种抗体，混匀，室温避光孵育30 min；每管加入2 mL PBS，混匀，离心（3 000 r/min，4℃，5 min），弃上清，洗涤2次；每管加入预先配置的固定破膜液（破膜液∶稀释液=1∶3）1 mL，混匀，4℃避光保存45 min；每管加入预先配置的破膜缓冲液（破膜缓冲液∶去离子水=1∶9）2 mL，混匀，离心（3 000 r/min，4℃，5 min），弃上清；对试管5、9进行Foxp3抗体染色，每管4 μL，试管5为单标管，混匀，室温避光孵育30 min；每管加入预先配置的破膜缓冲液2 mL，混匀，离心（3 000 r/min，4℃，5 min），弃上清，洗涤2次；每管加入300 μL 4%甲醛固定液，混匀，流式细胞仪上机检测。上机时，通过空白管、单标管调节荧光通道补偿。使用Flow Jo 10.0软件进行流式数据分析，通过前向散射光（forward scattered light，FS）和侧向散射光（side scattered light，SS）圈群淋巴细

胞，再通过各分子标志物的表达逐级圈群 $CD3^+CD4^+$ T 细胞、$CD25^+Foxp3^+$ Tregs、$CD25^-Foxp3^-$ Teffs、$Foxp3^+PD\text{-}1^+CXCR5^+$ Tfrs、$Foxp3^-PD\text{-}1^+CXCR5^+$Tfhs，分析各细胞比例以及 PD-1、OX40 表达，各 T 细胞亚群及分子表达圈群策略典型流式图如图 1 所示。

1.4 统计学处理

所有数据采用 SPSS 26.0 和 Graph-Pad Prism 8.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，行两独立样本 t 检验。不符合正态分布的计量资料以 $M_d(P_{25}, P_{75})$ 表示，行两独立样本非参数检验。计数资料用百分比表示，行卡方检验。计量资料的相关性分析，若符合正态分布，采用 Perason 相关检验，否则采用 Spearman 相关检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 基本临床资料

本研究纳入符合标准的 GD 患者 23 例，NC 组 22 例。2

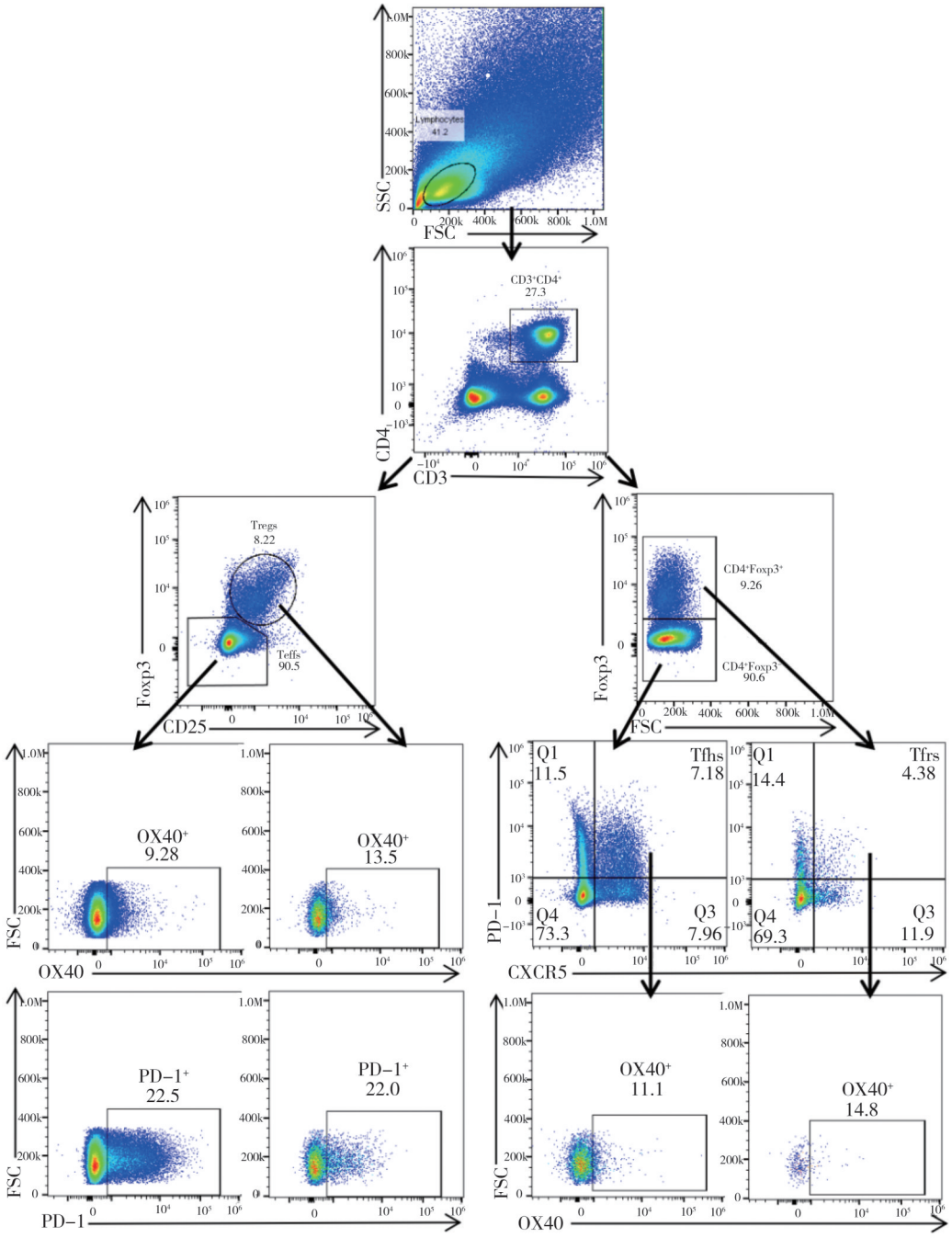


图 1 外周血 Tregs、Teffs、Tfrs、Tfhs 细胞及其 OX40、PD-1 表达比例圈群策略及典型流式图

组在年龄、性别上无统计学差异（P>0.05）。GD 组 FT3、FT4 水平明显高于 NC 组，TSH 水平明显低于 NC 组，TPOAb、TGAb 及 TRAb 水平均明显高于 NC 组（P<0.05），见表 1。

2.2 2 组人群外周血 Tregs、Teffs、Tfrs、Tfhs 细胞比例比较

与 NC 组相比，GD 组的 Tregs 细胞比例明显升高（P=0.004），见图 2A；Teffs 细胞比例明显下降（P=0.002），见图 2B；Tfrs 细胞比例明显下降（P=0.015），见图 2C；Tfhs 细胞比例无明显变化（P=0.208），见图 2D；Tfrs/Tfhs 比值有下降的趋势，但无统计学差异（P=0.570），见图 2E。

2.3 2 组人群外周血各 T 细胞亚群上 OX40、PD-1 表达比较

与 NC 组相比，GD 组 Tregs 上 OX40 表达无统计学差异（P=0.742），见图 3A；Tregs 上 PD-1 表达明显下降（P=0.002），见图 3B。与 NC 组相比，GD 组 Teffs 上 OX40 表达无统计学差异（P=0.742），见图 3C；Teffs 上 PD-1 表达无统计学差异（P=0.233），见图 3D。与 NC 组相比，GD 组 Tfrs 上 OX40 表达明显升高（P=0.025），见图 3E。与 NC 组相比，GD 组 Tfhs 上 OX40 表达无统计学差异（P=0.186），见图 3F。

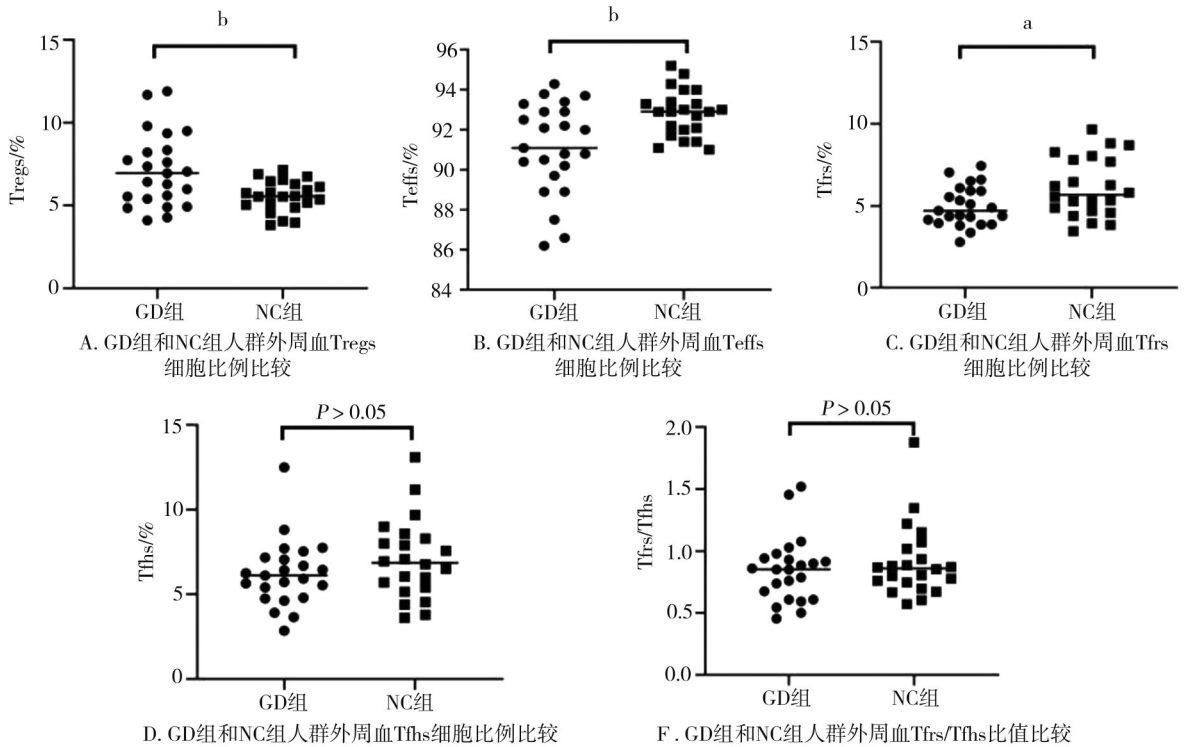
2.4 各检测指标与甲状腺功能及 TRAb 的相关性分析

Tfrs 细胞比例与 FT3、FT4 及 TRAb 水平呈显著负相关，而与 TSH 水平呈显著正相关。Tfhs 细胞比例与 FT3、TRAb 水平呈显著负相关，与 TSH 水平呈显著正相关，与 FT4 水平无显著相关性。PD-1 在 Tregs 上的表达与 FT3、FT4 及 TRAb 水平均呈显著负相关，与 TSH 水平呈显著正相关。PD-1 在 Teffs 上的表达与 TSH 水平呈显著正相关，与 FT3、FT4 及 TRAb 水平无显著相关性。OX40 在 Tfrs 上的表达与 FT3 水平呈显著正相关，与 TSH 水平呈显著负相关，而与 FT4 及 TRAb 水平无显著相关性。OX40 在 Tfhs 上的表达与 TSH 水平亦呈显著负相关，与 FT3、FT4 及 TRAb 水平无显著相关

表 1 临床资料

指标	GD 组（n=23）	NC 组（n=22）	$t/Z/\chi^2$ 值	P 值
性别（男/女）	5/18	4/18	0.089	0.766
年龄/岁	30.00（22.00，48.00）	39.00（22.00，52.75）	−0.967	0.334
FT3/（pmol·L^{-1}）	27.82[a]（14.61，36.96）	4.63（3.78，4.95）	−5.152	0.000
FT4/（pmol·L^{-1}）	61.22 ± 27.47[a]	15.59 ± 1.29	7.953	0.000
TSH/（mIU·L^{-1}）	0.005[a]（0.005，0.005）	1.59（1.200，2.900）	−5.452	0.000
TPOAb/（IU·mL^{-1}）	105.75[a]（52.08，568.03）	9.20（6.85，12.65）	−3.962	0.000
TGAb/（IU·mL^{-1}）	162.61[a]（30.75，353.15）	13.70（12.35，15.70）	−3.633	0.000
TRAb/（IU·L^{-1}）	10.51[a]（5.95，19.94）	0.80（0.80，0.87）	−3.720	0.000

注：a，与 NC 组相比，P < 0.05

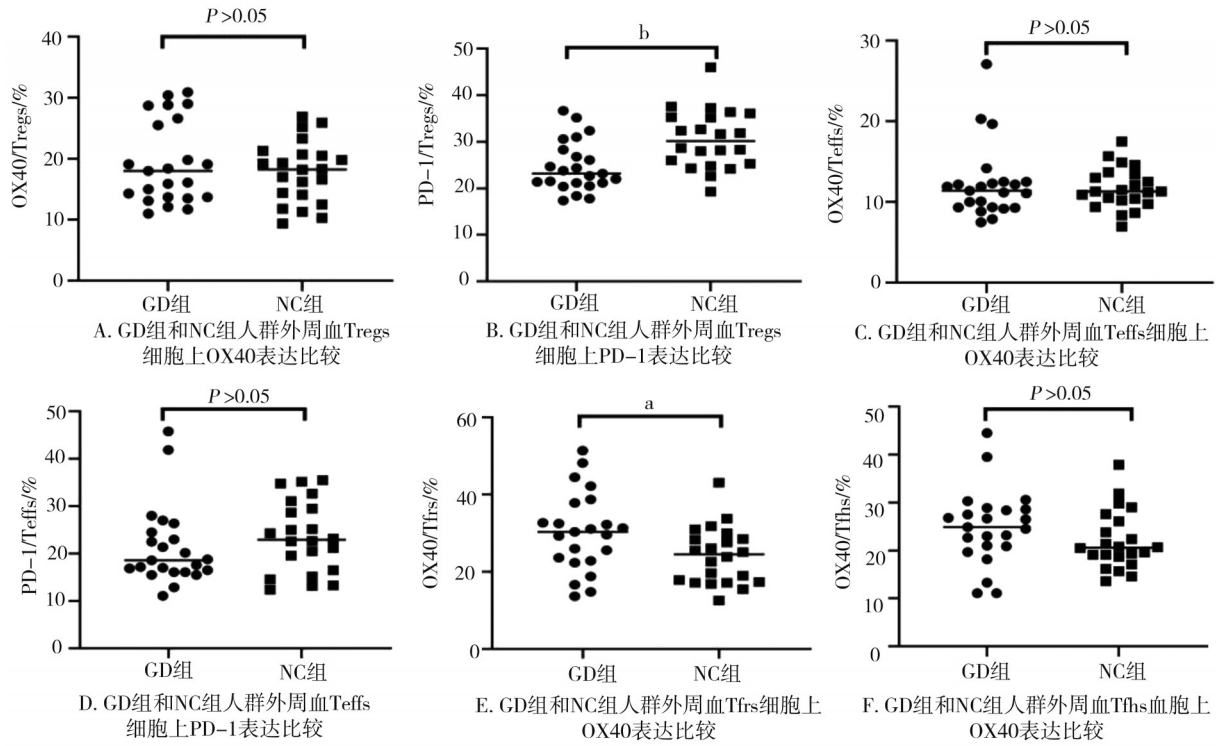


A. GD组和NC组人群外周血Tregs细胞比例比较　B. GD组和NC组人群外周血Teffs细胞比例比较　C. GD组和NC组人群外周血Tfrs细胞比例比较

D. GD组和NC组人群外周血Tfhs细胞比例比较　F . GD组和NC组人群外周血Tfrs/Tfhs比值比较

注：a，P<0.05；b，P<0.01

图 2 GD 组和 NC 组人群外周血 Tregs、Teffs、Tfrs、Tfhs、Tfrs/Tfhs 比值比较



注：a，$P<0.05$；b，$P<0.01$

图3　GD组和NC组人群外周血各T细胞亚群上OX40、PD-1表达比较

性。其余T细胞亚群细胞比例及其OX40、PD-1表达与甲状腺功能及TRAb水平均无显著相关性，见表2。

表2　各检测指标与患者临床资料的相关性

指标	FT3	FT4	TSH	TRAb
Tregs	r=0.171	r=0.206	r=−0.250	r=−0.003
	P=0.305	P=0.216	P=0.129	P=0.987
Teffs	r=−0.175	r=−0.185	r=0.277	r=0.021
	P=0.292	P=0.267	P=0.092	P=0.915
Tfrs	r=−0.447[a]	r=−0.336[b]	r=0.542[a]	r=−0.481[a]
	P=0.005	P=0.039	P=0.000	P=0.008
Tfhs	r=−0.326[b]	r=−0.238	r=0.344[b]	r=−0.462[b]
	P=0.046	P=0.151	P=0.034	P=0.012
OX40/Tregs	r=−0.239	r=−0.208	r=0.073	r=−0.206
	P=0.149	P=0.211	P=0.662	P=0.283
PD-1/Tregs	r=−0.454[a]	r=−0.341[b]	r=0.525[a]	r=−0.565[a]
	P=0.004	P=0.036	P=0.001	P=0.001
OX40/Teffs	r=−0.182	r=−0.245	r=0.167	r=−0.212
	P=0.273	P=0.139	P=0.315	P=0.269
PD-1/Teffs	r=−0.216	r=−0.158	r=0.332[b]	r=−0.303
	P=0.194	P=0.344	P=0.042	P=0.111
OX40/Tfrs	r=0.455[a]	r=0.277	r=−0.387[b]	r=0.339
	P=0.004	P=0.092	P=0.016	P=0.072
OX40/Tfhs	r=0.207	r=0.003	r=−0.346[b]	r=0.203
	P=0.213	P=0.984	P=0.033	P=0.290

注：a，$P<0.01$；b：$P<0.05$

2.5　$CD4^+CD25^+$T细胞上OX40与Foxp3表达的相关性分析

在$CD4^+CD25^+$T细胞上，OX40表达为13.70%（9.41%，18.80%），Foxp3表达为35.90%（28.90%，42.85%）。相关性分析发现，OX40与Foxp3表达呈负相关（r=−0.337，P=0.024），见图4。

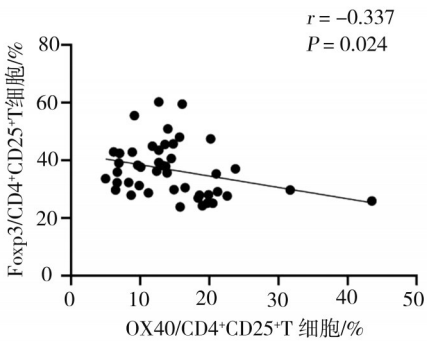


图4　$CD4^+CD25^+$T细胞上OX40表达与Foxp3表达的相关性

3　讨　论

作为免疫系统的重要组成部分，Tregs在维持免疫耐受和稳态方面至关重要。Tregs可通过多种途径发挥抑制性功能，包括分泌抑制性细胞因子，如IL-10、TGF-β、IL-35；通过IL-2或CD73和CD39进

行代谢调节、细胞溶解、调节抗原提呈细胞等[15]。研究发现，多种危险因素（主要是遗传因素和环境因素）可通过调节 Tregs 数量和功能参与自身免疫性疾病的发生发展，这提示靶向作用于 Tregs 是一种治疗自身免疫性疾病的新思路。已有临床研究发现 Tregs 输注在控制多种自身免疫性疾病（如移植物抗宿主病、Ⅰ型糖尿病等）活动度方面具有积极作用[16-17]。在自身免疫性甲状腺疾病相关研究中也发现患者存在 Tregs 数量和功能异常，本课题组前期研究报道了 Tregs 异常可能参与桥本甲状腺炎发病[18]。关于 Tregs 异常在 GD 患者的研究也有一些报道，但由于 Tregs 细胞表型的异质性、不同研究采用不同的分离方法等，导致研究结论存在一定争议。Qin J 等[19]研究报道，初发 GD 患者 Tregs 数量明显降低伴功能缺陷，Th17/Tregs 比值明显高于对照组，而 Pan DS 等[13]在 GD 患者中未发现 Tregs 数量或功能异常。Rodríguez-Muñoz A 等[12]报道 GD 患者中 Tregs 数量相较于对照组明显增高，推测可能与机体自身免疫炎症反应致体内 Tregs 代偿性升高有关，这些 Tregs 的免疫抑制功能明显缺陷。本研究检测初发 GD 患者 Tregs、Teffs 水平及相关表面分子 OX40、PD-1 的表达情况，发现与对照组相比，GD 患者 Tregs 数量明显升高，但 Tregs 上 PD-1 表达明显降低。进一步分析 Tregs 上 PD-1 表达与 TRAb 水平的相关性，发现 Treg 上 PD-1 表达与 TRAb 水平呈显著负相关。有研究报道，PD-1 通路可通过增强 Tregs 免疫抑制功能维持外周免疫耐受[20]。Asano T 等[21]发现低剂量 IL-2 可通过提高 Tregs 上 PD-1 的表达增强 Tregs 功能，从而改善慢性移植物抗宿主病患者的临床症状。据此推测 GD 患者中 PD-1 在 Tregs 上表达的下调可能影响 Treg 细胞功能，Tregs 数量代偿性增加，这些增加的 Tregs 并不能正常发挥免疫抑制功能。上述结果提示 PD-1 在 Tregs 上的异常表达可能与 GD 发病相关，提高 PD-1 在 Tregs 上的表达可能改善 GD 患者的临床症状，减少复发。近期有研究报道，过高的甲状腺激素可通过降低 Tregs 上 PD-1 表达导致 Tregs 功能缺陷[22]，其因果关系需进一步探讨。另外，在 GD 组并未发现 OX40 在 Tregs、Teffs 上的表达差异。大量研究证实，异常的 OX40 信号通路参与多种自身免疫性疾病的发生，如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等[23-24]，对 Tregs 功能也有显著影响，OX40 可能通过降低 Foxp3 表达抑制 Tregs 功能[25]。有学者在初发 GD 患者中发现 $CD4^+$T 细胞上 OX40 表达异常上调。Wang Q 等[26]发现，在 GD 病患者外周血中，OX40、OX40L 可共表达在 $CD4^+$T 细胞上，且表达水平和 TRAb 相关。进一步分析揭示 OX40 与 OX40L 可形成具有功能性的复合体，促进 OX40 信号传导，通过增强 $CD4^+$T 细胞介导的免疫反应参与 GD 发病。本研究的阴性结果一方面考虑和 OX40 表达水平低、流式分群不明显相关，另一方面也和样本量少、差异不显著相关。进一步分析 $CD4^+CD25^+$T 细胞上 OX40 表达与 Foxp3 表达的相关性，发现 OX40 表达与 Foxp3 表达呈负相关，提示 OX40 可能通过抑制 Tregs 细胞上 Foxp3 表达影响其功能，这提示针对 OX40/OX40L 信号通路的阻断性单克隆抗体可能通过提高 Foxp3 表达增强 Tregs 功能，从而有望应用于疾病的治疗。

近年来，关于 Tfrs/Tfhs 比例失衡在多种自身免疫性疾病发病中的作用得到国际广泛关注，作为 $CD4^+$T 细胞新亚群，Tfhs 在机体对抗外来抗原促进 B 淋巴细胞活化及分化成浆细胞方面发挥关键作用。T 细胞与 B 淋巴细胞相互作用的场所主要位于次级淋巴器官淋巴滤泡的生发中心（germinal center，GC）[27]。在淋巴滤泡的 T-B 细胞边界，B 细胞提呈抗原给 Tfhs，仅有具有高亲和力的 B 细胞才能获取 Tfhs 帮助并进入 GC，GC 中的 Tfhs 在滤泡亮区识别抗原，并提供促进 GC 中 B 细胞增殖及迁移至滤泡暗区的信号，迁移至暗区的 B 细胞在这里发生体细胞高频突变。同时，Tfhs 促进 B 细胞分化成记忆 B 细胞和高亲和力浆细胞，参与体液免疫反应。Tfrs 是 Tregs 的一个亚群，与传统 Tregs 和 Tfhs 拥有一致的表型特征，Tfrs 表达 PD-1、CXCR5，同样也表达 CD25、Foxp3。Tfrs 位于 GCs，通过抑制 Tfhs 数量和功能抑制 GC 反应。因此，Tfrs 与 Tfhs 平衡失调在抗体介导的自身免疫性疾病中发挥不可忽视的作用。本研究观察比较 GD 患者与健康人群的 Tfrs、Tfhs 细胞数量及其比例，发现 GD 患者 Tfrs 数量明显降低，差异具有统计学意义，而 Tfrs/Tfhs 比值低于健康人群，但无统计学差异，相关性分析发现，Tfrs 数量与 TRAb 水平成负相关，这提示 Tfrs 与 Tfhs 平衡失调可能参与 GD 发病。Xu BH 等[9]在系统性红斑狼疮患者的研究中同样发现 Tfrs 数量明显降低，存在 Tfr/Tfhs 平衡失调，与本研究结果一致。类似地，也有研究发现在风湿性疾病患者中活化的 Tfhs 数量明显升高，Tfhs 和 Tfrs 细胞平衡失调。OX40/OX40L 信号可以促进 Tfhs 分化、维持细胞生存并增强 Tfhs 对 B

细胞的功能。有研究报道，上调的OX40信号通过影响Tfhs活动参与自身免疫性疾病的发生[28]。本研究同样比较分析了GD组与健康对照组中Tfhs、Tfrs上OX40的表达，发现在Tfrs上OX40表达上调，提示OX40可能通过影响Tfr与Tfh稳态参与GD发病。

综上所述，在初发GD患者中存在Tregs细胞数量及功能异常、Tfrs/Tfhs平衡失调，上述免疫调节失衡可能共同参与GD发病，PD-1、OX40的异常表达可能参与上述机制，这为临床上关于GD的治疗提供了新思路。本研究亦存在一定的局限性：首先，各组的研究样本量较少；其次，初诊GD患者的纳入未排除TPOAb、TGAb抗体阳性的人群；最后，未对患者外周血Tregs、Tfrs及Tfhs进行功能试验。今后需要扩大样本量，排除TPOAb、TGAb阳性人群，并补充相关功能试验，进行深入研究。

参 考 文 献

[1] Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedüs L, et al. 2018 European thyroid association guideline for the management of Graves' hyperthyroidism[J]. Eur Thyroid J, 2018, 7(4): 167-186.

[2] Wémeau JL, Klein M, Sadoul JL, et al. Graves' disease: introduction, epidemiology, endogenous and environmental pathogenic factors[J]. Ann Dendocrinol, 2018, 79(6): 599-607.

[3] Antonelli A, Ferrari SM, Ragusa F, et al. Graves' disease: epidemiology, genetic and environmental risk factors and viruses[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2020, 34(1): 101387.

[4] Qiao YC, Pan YH, Ling W, et al. The Yin and Yang of regulatory T cell and therapy progress in autoimmune disease[J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(10): 1058-1070.

[5] Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells[J]. Immunol Rev, 2016, 271(1): 246-259.

[6] Bonelli M, Savitskaya A, von Dalwigk K, et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus(SLE)[J]. Int Immunol, 2008, 20(7): 861-868.

[7] Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(3): 710-713.

[8] Nie H, Zheng YX, Li RS, et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-α in rheumatoid arthritis[J]. Nat Med, 2013, 19(3): 322-328.

[9] Xu BH, Wang S, Zhou MJ, et al. The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Immunol, 2017, 183: 46-53.

[10] Deng J, Wei YB, Fonseca VR, et al. T follicular helper cells and T follicular regulatory cells in rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(8): 475-490.

[11] Wang Z, Fan XH, Zhang RR, et al. Integrative analysis of mRNA and miRNA array data reveals the suppression of retinoic acid pathway in regulatory T cells of Graves' disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(12): E2620-E2627.

[12] Rodríguez-Muñoz A, Vitales-Noyola M, Ramos-Levi A, et al. Levels of regulatory T cells $CD69^+NKG2D^+IL\text{-}10^+$ are increased in patients with autoimmune thyroid disorders[J]. Endocrine, 2016, 51(3): 478-489.

[13] Pan DS, Shin YH, Gopalakrishnan G, et al. Regulatory T cells in Graves' disease[J]. Clin Endocrinol, 2009, 71(4): 587-593.

[14] Liu Y, Yuan XW, Li XF, et al. Constitutive changes in circulating follicular helper T cells and their subsets in patients with Graves' disease [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 8972572.

[15] Zhang R, Miao JL, Zhu P. Regulatory T cell heterogeneity and therapy in autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(5): 102715.

[16] Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(9): 543-551.

[17] Sharabi A, Tsokos MG, Ding Y, et al. Regulatory T cells in the treatment of disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(11): 823-844.

[18] Hu YF, Zhang LJ, Chen HH, et al. Analysis of regulatory T cell subsets and their expression of helios and PD-1 in patients with Hashimoto thyroiditis[J]. Int J Endocrinol, 2019, 2019: 5368473.

[19] Qin J, Zhou J, Fan CL, et al. Increased circulating Th17 but decreased $CD4^+Foxp3^+$ treg and $CD19^+CD1d^{hi}CD5^+$ breg subsets in new-onset Graves' disease[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 8431838.

[20] Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity[J]. Immunol Rev, 2010, 236(1): 219-242.

[21] Asano T, Meguri Y, Yoshioka T, et al. PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy[J]. Blood, 2017, 129(15): 2186-2197.

[22] Zhong Y, Lu TT, Liu XM, et al. High levels of thyroid hormone impair regulatory T cell function via reduced PD-1 expression[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2021, 106(9): 2738-2753.

[23] Yoshioka T, Nakajima A, Akiba H, et al. Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(10): 2815-2823.

[24] Patschan S, Dolff S, Kribben A, et al. CD134 expression on $CD4^+$T cells is associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 145(2): 235-242.

[25] Vu MD, Xiao X, Gao WD, et al. OX40 costimulation turns off $Foxp3^+$ Tregs[J]. Blood, 2007, 110(7): 2501-2510.

[26] Wang Q, Shi BM, Xie F, et al. Enhancement of $CD4^+$ T cell response and survival via coexpressed OX40/OX40L in Graves' disease[J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 430: 115-124.

[27] Craft JE. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(6): 337-347.

[28] Fu NN, Xie F, Sun ZW, et al. The OX40/OX40L axis regulates T follicular helper cell differentiation: implications for autoimmune diseases [J]. Front Immunol, 2021, 12: 670637.

（责任编辑：唐秋姗）