

· 论著 ·

SOCS1 对 CD4⁺ T 细胞分化的影响及其在桥本甲状腺炎中的作用

郑应麟 周希 杨治芳

【摘要】 目的 探讨细胞因子信号抑制因子(SOCS)1对桥本甲状腺炎CD4⁺T细胞分化的影响。**方法** 从桥本甲状腺炎(HT)患者中分离CD4⁺T淋巴细胞和B淋巴细胞,分为pEF-FLAG-1空载体对照组、SOCS1转染组、信号转导与转录激活因子3(STAT3)沉默组、SOCS1转染+STAT3沉默组。在CD4⁺T细胞中采用基因转染技术上调SOCS1的表达,沉默STAT3基因,流式细胞术检测辅助性T细胞17(Th17)、调节性T细胞(Treg)和滤泡辅助性T细胞(Tfh)。荧光定量PCR检测CD4⁺T细胞视黄酸相关的孤儿受体(ROR) γ t mRNA、转录因子叉头蛋白3(FoxP3) mRNA、B细胞淋巴瘤分子6(Bcl6) mRNA。ELISA检测白细胞介素(IL)-6、IL-17、IL-23、IL-21、转化生长因子(TGF) β 1的水平。Western印迹法检测SOCS1和STAT3的蛋白水平。**结果** SOCS1转染CD4⁺T细胞后,抑制Th17和Tfh($t=8.63, 7.66, P$ 均 <0.01)。SOCS1抑制ROR γ t mRNA和Bcl6 mRNA,同时促进FoxP3 mRNA的表达($t=14.38, 8.86, 9.46, P$ 均 <0.01)。与SOCS1转染组和pEF-FLAG-1空载体对照组相比,SOCS1转染+STAT3沉默组对IL-6、IL-17、IL-23、IL-21的抑制和对TGF β 1的促进更明显($t=8.64, 11.02, 9.76, 12.18, 14.08, P$ 均 <0.01)。SOCS1转染组STAT3蛋白水平下降($t=5.12, P<0.05$),SOCS1转染+STAT3沉默组STAT3蛋白水平显著低于pEF-FLAG-1空载体对照组($t=4.78, P<0.05$)。**结论** SOCS1通过抑制STAT3调控T细胞的分化,可能与HT的发病机制有关。

【关键词】 桥本甲状腺炎;细胞因子信号抑制因子1;信号转导与转录激活因子3;T细胞分化

基金项目:国家自然科学基金(81260125);江西省卫计委科技计划项目(20171024)

Effects of SOCS1 on CD4⁺ T cell differentiation and its role in Hashimoto's thyroiditis Zheng Yinglin, Zhou Xi, Yang Zhifang. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: Yang Zhifang, Email: yzf1977728@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of cytokine signaling inhibitor (SOCS)1 on T cell differentiation in Hashimoto's thyroiditis (HT). **Methods** CD4⁺ T lymphocytes and B lymphocytes were isolated from HT patients and divided into pEF-FLAG-1 empty vector control group, SOCS1 vector group, signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3) gene silencing group, and SOCS1 vector + STAT3 gene silencing group. The level of SOCS1 expression in CD4⁺ T cells was up-regulated by gene transfection technique; STAT3 was silenced; T helper cell 17 (TH17), regulatory cells (Treg) and follicular helper T cells (Tfh) were detected by flow cytometry. Fluorescent quantitative PCR was used to detect the mRNA level of retinoic acid-related orphan receptor γ t (ROR γ t), forkhead box protein 3 (FoxP3) and B cell lymphoma 6 (Bcl6) in CD4⁺ T cells. ELISA was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), interleukin-23 (IL-23), interleukin-21 (IL-21) and transforming growth factor β 1 (TGF β 1). Western blotting was used to detect the levels of SOCS1 and STAT3 protein. **Results** After transfection of CD4⁺ T cells with SOCS1, TH17 and Tfh were inhibited ($t=8.63, 7.66, all P<0.01$). SOCS1 inhibited the expression of ROR γ t mRNA and Bcl6 mRNA, while promoted the expression of FoxP3 mRNA ($t=14.38, 8.86, 9.46, all P<0.01$). Compared with SOCS1 vector group and pEF-FLAG-1 empty vector control group, the suppression of IL-6, IL-17, IL-23, IL-21 and the promotion of TGF β 1 were greater

in SOCS1 vector + STAT3 silencing group ($t=8.64, 11.02, 9.76, 12.18, 14.08$, all $P<0.01$). The level of STAT3 protein was decreased in SOCS1 group ($t=5.12, P<0.05$), and the STAT3 protein level in SOCS1 vector + STAT3 silencing group was significantly down-regulated compared with that in pEF-FLAG-1 empty vector control group ($t=4.78, P<0.05$). **Conclusion** SOCS1 regulates T cell differentiation by inhibiting STAT3, which may be related to the pathogenesis of HT.

【Key words】 Hashimoto's thyroiditis; Cytokine signaling inhibitor 1; Signal transduction and activator of transcription 3; T cell differentiation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81260125); Science and Technology Project of the Jiangxi Provincial Health and Family Planning Commission(20171024)

桥本甲状腺炎(HT)是一种自身免疫性疾病,可引起甲状腺组织损伤和功能低下,在其发病过程中,伴随淋巴细胞浸润和甲状腺特异性自身抗体的产生。Suciu-Foca 等^[1]研究表明,HT 患者甲状腺侵袭细胞主要为 CD4⁺T 细胞。CD4⁺T 细胞亚群辅助性 T 细胞 17(Th17)和调节性 T 细胞(Treg)的失衡可能是 HT 的主要发病机制之一^[2]。近期研究还发现,HT 患者外周血和甲状腺组织中滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)数量增加,表明 Tfh 可能参与 HT 的发病过程^[3-4]。细胞因子信号抑制因子(SOCS)是一类负向调节蛋白,由细胞因子诱导产生,是 Janus 激酶-信号转导与转录激活因子(JAK-STAT)信号通路中重要的负调控蛋白。SOCS1 是 SOCS 家族的重要成员,在 T 细胞介导的免疫反应和免疫调节中起负性作用^[5]。因此,在本研究中,笔者探讨 SOCS1 及 STAT3 对 CD4⁺T 细胞亚群分化的影响,希望进一步了解 HT 的免疫发病机制。

1 材料和方法

1.1 CD4⁺T 细胞和 CD19⁺B 细胞的获取 本研究共招募了 50 例 HT 患者[甲状腺球蛋白抗体(TgAb)和甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)水平增加,病理学确诊]。收集 5 ml 外周静脉血,并通过 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单核细胞(PBMC)。使用免疫磁珠分离 CD4⁺T 细胞和 CD19⁺B 细胞,进行细胞计数并通过台盼蓝染色法检测其活性。

1.2 SOCS1 慢病毒载体构建及转染 CD4⁺T 细胞 构建 pEF-FLAG-1/ mSOCS1 载体。包装病毒: Brie fly, 293T, 感染率 70%~80% 时用于转染。将重组质粒转染入 293T 细胞,8 h 后,弃去含有转染混合物残留物的培养基,加入新鲜培养基,48 h 后收集细胞上清液,通过离心除去细胞碎片,然后将 0.45 μm 聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)用于过滤和收获包装的病毒颗粒。分离的外周血 CD4⁺T 细胞用 CD3/CD28 抗体刺激 24 h 后,用含有病毒颗粒的上清液替换培养基。分为 pEF-FLAG-1 空载体对照组、SOCS1 转染组、STAT3 沉默组、SOCS1 转染 + STAT3 沉默组。

1.3 Th17、Treg、Tfh 的体外极化和流式细胞仪检测

转染后,加入白细胞介素(IL)-2(10 U/ml)、IL-1β(10 μg/L)、转化生长因子(TGF)-β(30 μg/L)、抗 IL-4 抗体(1 mg/L)、干扰素-γ抗体(1 mg/L)用于 Th17 极化,加入 IL-2(10 U/ml)和 TGF-β(30 μg/L)用于 Treg 极化,IL-6(10 U/ml)和 IL-21(10 U/ml)用于 Tfh 极化。将它们与 CD19⁺B 细胞共培养 3 d。用 PMA(50 μg/L)、离子霉素(500 μg/L)和 1X Golgi Stop 刺激 Th17 和 Tfh 4 h。收集所有细胞用于流式细胞术检测。细胞内 IL-17A 用 BD Perm/Wash 缓冲液染色,核 FoxP3 用 Biolegend foxp3 fx/perm 染色。CD4⁺CXCR5⁺ICOS^{high} 是 Tfh 表面的特征标志。

1.4 RT-PCR 检测视黄酸相关的孤儿受体 γt (RORγt)、转录因子叉头蛋白 3(FoxP3)和 B 细胞淋巴瘤分子 6(Bcl6) mRNA 用无 RNase 的 PBS 洗涤收获的细胞。使用 RNeasy Mini 试剂盒根据制造商的方案提取总 RNA。它们的浓度和纯度用 Qubit 荧光计检测。使用逆转录试剂盒(Promega)对 1 μg RNA 进行逆转录。使用 SYBR Green PCR Master Mix(Qigen)进行实时 PCR。本研究使用的引物见表 1。95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 45 s,在 72℃ 延伸 30 s,进行 40 个循环。用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对 mRNA 表达水平。

1.5 ELISA 检测 IL-6、IL-17、IL-21、IL-23 和 TGF-β 根据说明书用 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中 IL-6、IL-17、IL-21、IL-23 和 TGF-β 的水平。通过 ELISA 测定 450 nm 处的 OD 值。

表 1 RT-PCR 中使用的引物

引物	序列	产物大小 (bp)
GAPDH	上游序列: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	452
	下游序列: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	
FoxP3	上游序列: 5'-CACCCAGGAAAGACAGCAACC-3'	314
	下游序列: 5'-GCAAGAGCTCTGTCTCCATTGA-3'	
RORγt	上游序列: 5'-ACCTCCACTGCCAGCTGTGTGCTGTC-3'	383
	下游序列: 5'-TCATTCTGCACTTCTGCATGTAGACTG TCCC-3'	
Bcl6	上游序列: 5'-GACGTTGTCTATCGTGGTGAG-3'	109
	下游序列: 5'-GGTTGCATTTCAACTGGTCA-3'	

注: GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; RORγt: 视黄酸相关的孤儿受体 γt; FoxP3: 转录因子叉头蛋白 3; Bcl6: B 细胞淋巴瘤分子 6

1.6 Western 印迹检测 SOCS1、STAT3 的蛋白表达

用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞,提取总蛋白并用 SDS-PAGE 电泳分析。然后将其电转移至 PVDF 膜。跨膜后,用 TBS 漂洗 PVDF 膜 10~15 min,置于含有 5% (w/v) 脱脂奶粉的 TBST 封闭缓冲液中,并在室温下摇动 1 h。在加入适当稀释度的一抗[用含有 1% (w/v) 脱脂奶粉的 TBST 稀释 1:5 000]后,将其在室温下温育 2 h。然后用 TBST 冲洗膜 3 次(5~10 min 1 次)。将膜在室温下用含有 0.05% (w/v) 脱脂奶粉的 TBST 稀释的 HRP 标记的二抗(1:10 000)孵育 1 h,并用 TBST 漂洗 3 次(每次 5~10 min)。扫描蛋白质条带并定量作为与 β -肌动蛋白的比率。

1.8 统计学处理 正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 软件分析,两组间均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

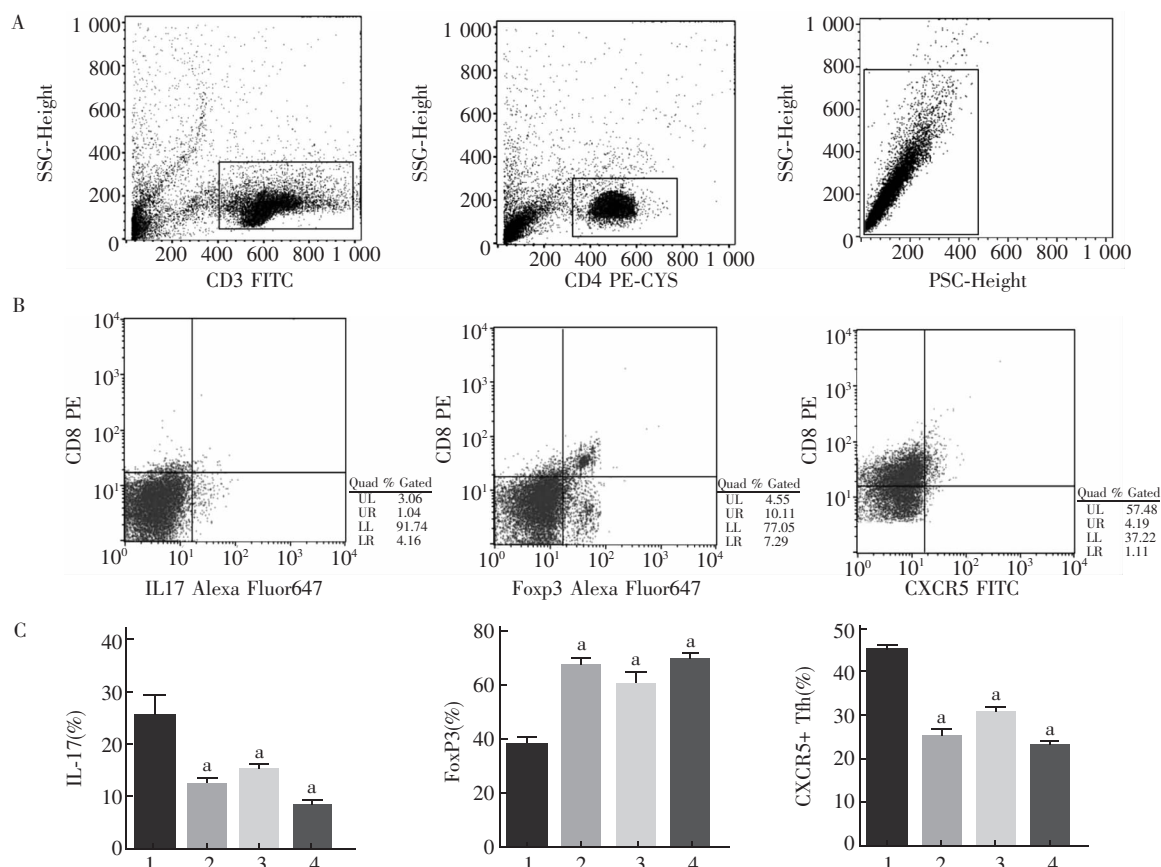
2 结果

2.1 SOCS1 和 STAT3 与 T 细胞亚群的关系 用基因转染技术构建 SOCS1-Tg-CD4⁺ T 细胞(图 1A)。如图 1B 所示:CD4⁺ T 细胞在体外转染 SOCS1 并极化 72 h 后, IL-17 的表达降低而 FoxP3 的表达增加($t = 8.63, 9.06, P$ 均 < 0.01)。如图 1C 所示,与 SOCS1 转染组相比,STAT3 沉默组对 Th17 的抑制及对

Treg 的分化促进更显著($t = 12.01, 9.28, P$ 均 < 0.01)。与 pEF-FLAG-1 空载体对照组相比, SOCS1 转染组和 STAT3 沉默组的 Th17 比例明显降低($t = 7.66, 12.56, P$ 均 < 0.01),与 SOCS1 转染组和 STAT3 沉默组相比, SOCS1 + STAT3 沉默组明显降低($t = 9.14, P < 0.01$)。

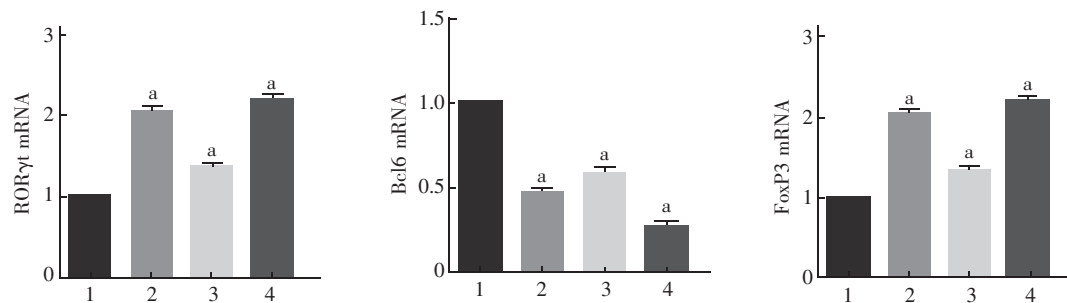
荧光定量 PCR 结果如图 2 所示。与 pEF-FLAG-1 空载体对照组相比, SOCS1 转染组和 STAT3 沉默组 ROR γ t mRNA 的表达升高, Bcl6 mRNA 的表达明显降低,并且 FoxP3 mRNA 的表达增加($t = 14.38, 8.86, 9.46, P$ 均 < 0.01),在 SOCS1 转染 + STAT3 沉默组这种影响进一步增强($t = 12.14, 14.17, 8.26, P$ 均 < 0.01)。

2.2 SOCS1 转染组 IL-6、IL-17、IL-23、IL-21 和 TGF- β 1 的变化 ELISA 结果如图 3 所示,与 pEF-FLAG-1 空载体对照组相比, SOCS1 转染组和 STAT3 沉默组 IL-6、IL-17、IL-21、IL-23 水平降低,而 TGF- β 1 水平升高(SOCS1 转染组比 pEF-FLAG-1 空载体对照组, $t = 9.63, 12.02, 8.96, 10.57, 11.48, P$ 均 < 0.01 ; STAT3 沉默组比 pEF-FLAG-1 空载体对照组, $t = 8.72, 11.03, 9.01, 11.39, 10.07, P$ 均 < 0.01)。在 SOCS1 转染 + STAT3 沉默组这种改变进一步增强($t = 8.64, 11.02, 9.76, 12.18, 14.08, P$ 均 < 0.01)。



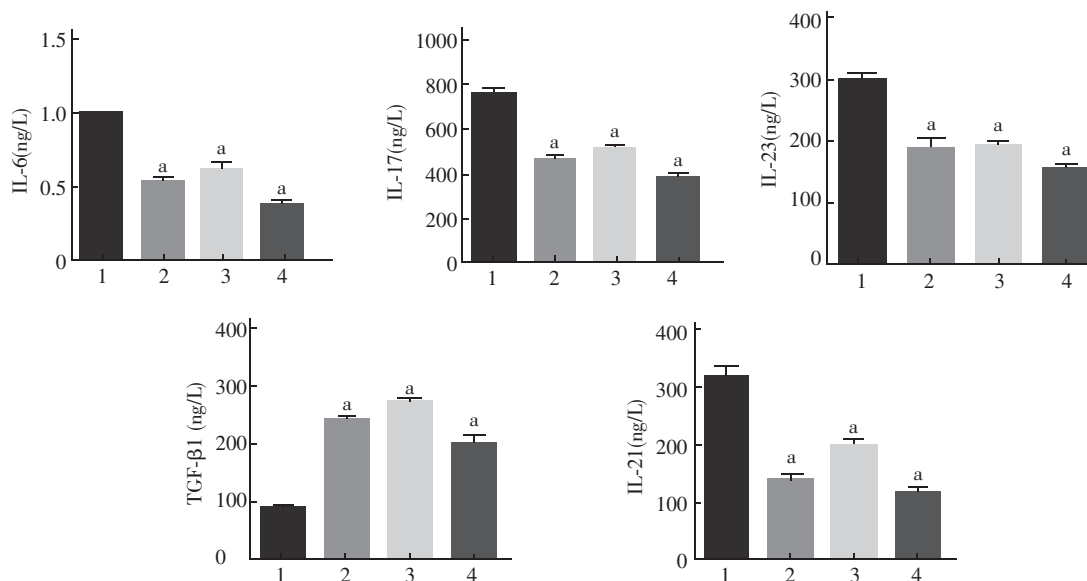
注:1:pEF-FLAG-1 空载体对照组; 2:SOCS1 转染组; 3:STAT3 沉默组; 4:SOCS1 转染+STAT3 沉默组; CXCR5⁺Tfh:CXC 趋化因子 5⁺滤泡辅助性 T 细胞; 与 pEF-FLAG-1 空载体对照组相比, * $P < 0.01$; SOCS1: 细胞因子信号抑制因子; STAT: 信号转导与转录激活因子; Th17: 辅助性 T 细胞 17; Treg: 调节性 T 细胞; Tfh: 滤泡辅助性 T 细胞

图 1 SOCS1 对 Th17、Treg 和 Tfh 分化的影响



注:1;pEF-FLAG-1 空载体对照组;2;SOCS1 转染组;3;STAT3 沉默组;4;SOCS1 转染+STAT3 沉默组;与 pEF-FLAG-1 空载体对照组相比,* $P < 0.01$;SOCS1:细胞因子信号转导抑制因子 1;STAT3:信号转导与转录激活因子 3;ROR γ t:视黄酸相关的孤儿受体 γ t;FoxP3:转录因子叉头蛋白 3;Bcl6:B 细胞淋巴瘤分子 6

图 2 荧光定量 PCR 检测 CD4⁺T 细胞 FoxP3、ROR γ t、Bcl6mRNA 水平



注:1;pEF-FLAG-1 空载体对照组;2;SOCS1 转染组;3;STAT3 沉默组;4;SOCS1 转染+STAT3 沉默组;IL-6: 白细胞介素-6;IL-17: 白细胞介素-17; IL-23: 白细胞介素-23; TGF- β 1: 转化生长因子 β 1; IL-21: 白细胞介素-21;SOCS1: 细胞因子信号抑制因子 1; STAT3: 信号转导与转录激活因子 3;与 pEF-FLAG-1 空载体对照组相比,* $P < 0.01$

图 3 SOCS1 对 T 细胞分化的影响

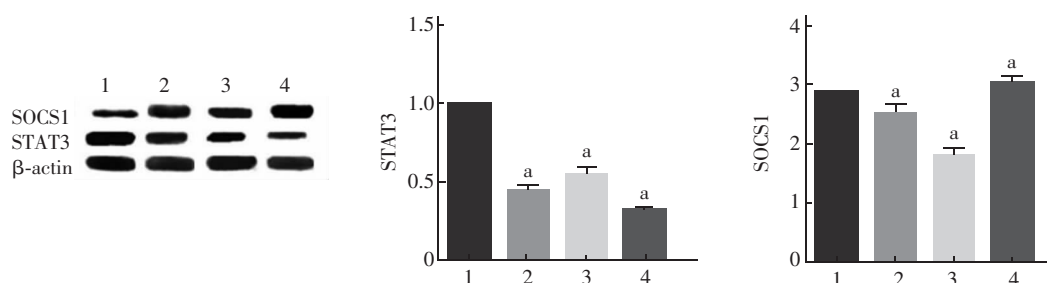
2.3 SOCS1 转染组中 STAT3 蛋白的变化 SOCS1 转染组 STAT3 蛋白水平明显低于 pEF-FLAG-1 空载体对照组 ($t = 5.12, P < 0.05$), 与 pEF-FLAG-1 空载体对照组相比, SOCS1 蛋白水平明显升高 ($t = 4.47, P < 0.05$)。在 SOCS1 转染 + STAT3 沉默组中, STAT3 蛋白含量明显降低, SOCS 蛋白水平明显高于 pEF-FLAG-1 空载体对照组 ($t = 4.78、6.36, P$ 均 < 0.05), 见图 4。

3 讨论

既往研究表明, HT 患者存在 T 细胞亚群的数量和功能异常, 但导致免疫功能异常的具体机制尚不清楚^[6]。在本研究中, 笔者观察了负调控因子 SOCS1 对 HT 患者 CD4⁺T 细胞亚群分化的影响, 从而探讨 HT 的分子发病机制。

本研究发现, HT 患者 CD4⁺T 细胞 SOCS1 的过表达可以抑制 Th17 和 Tfh 的分化, 促进 Treg 的分化,

沉默 STAT3 后 SOCS1 对 T 细胞分化的影响更为显著。SOCS1 是重要的负调节分子, 可以通过抑制 STAT3 信号通路参与调控 Th17 和 Treg 的动态平衡^[7-8]。Th17 在各种疾病中具有促炎作用, 而 Treg 具有抑制炎症反应的作用。先前的研究表明, HT 患者 Th17 比例升高, Treg 比例降低, 这些变化与 HT 患者的甲状腺功能和发病过程密切相关^[9-10]。本研究结果显示, SOCS1 过表达或 STAT3 沉默可以抑制 Th17 的分化并促进 Treg 的分化, 表明对 SOCS1 或 STAT3 表达的特异性干预可能改善甲状腺炎。目前通过动物实验已经证实, SOCS 可以治疗许多有细胞因子信号通路参与的感染性和免疫性疾病, 推测 SOCS 对自身免疫性疾病的治疗具有一定作用^[11-12]。高表达 SOCS1 蛋白可抑制 STAT3, 进而影响 IL-23 和 IL-17 的分泌, 并影响其他免疫功能, 对实验性过敏性脑脊髓膜炎动物起治疗效果^[13]。



注:1;pEF-FLAG-1 空载体对照组;2;SOCS1 转染组;3;STAT3 基因沉默组;4;SOCS1 转染+STAT3 沉默组;与 pEF-FLAG-1 空载体对照相比,* $P < 0.01$;SOCS1:细胞因子信号抑制因子 1;STAT3:信号转导与转录激活因子 3

图 4 CD4⁺ T 细胞的 SOCS1、STAT3 的蛋白表达

T 细胞分化过程中需要多种细胞因子的参与,并且有些特殊的细胞因子在细胞亚群的分化中起重要作用。IL-6 在诱导 Th17 和 Tfh 的过程中起重要作用,TGF- β 是一种主要由 Treg 分泌的免疫抑制因子。既往研究表明,HT 患者 Treg 比例低于正常人群,并且其功能受损^[9-10]。同时自身免疫性甲状腺炎患者外周血中 Tfh 比例明显升高^[14]。笔者发现 CD4⁺ T 细胞过表达 SOCS1 后,IL-6 水平显著降低,同时 TGF- β 水平升高。IL-21 主要由 Tfh 分泌,在 Tfh 的分化和发育中起重要作用,IL-21 能诱导 B 细胞的转化,影响其抗体的分泌,从而调节 B 细胞功能。笔者发现 SOCS1 过度表达后 IL-21 水平显著降低。结果提示,SOCS1 可以维持免疫的动态平衡,通过调节细胞因子的表达来防止自身免疫性疾病的发生。

总之,笔者发现 SOCS1 是调节 T 细胞分化和功能的重要因素,可能通过抑制 STAT3 产生作用。SOCS1 可以抑制炎症因子 IL-17 的分泌,促进 Treg 的分化。SOCS1 对 STAT3 的抑制也导致 Tfh 比例的减少,并抑制 B 细胞产生抗体,减少自身免疫反应的发生。因此,特异性干预 SOCS1 的表达或沉默 STAT3 可能对 HT 的免疫治疗有一定作用。

参 考 文 献

- [1] Suci-Foca N, Manavalan JS, Scotto L, et al. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5 (1): 7-11. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2004. 09. 003.
- [2] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation[J]. Cell, 2010, 140 (6): 845-858. DOI: 10. 1016/j. cell. 2010. 02. 021.
- [3] Wang S, Baidoo SE, Liu Y, et al. T cell-derived leptin contributes to increased frequency of T helper type 17 cells in female patients with Hashimoto's thyroiditis[J]. Clin Exp Immunol, 2013, 171 (1): 63-68. DOI: 10. 1111/j. 1365-2249. 2012. 04670. x.
- [4] Qin Q, Liu P, Liu L, et al. The increased but non-predominant expression of Th17- and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease[J]. Braz J Med Biol Res,

2012, 45 (12): 1202-1208.

- [5] Mahony R, Ahmed S, Diskin C, et al. SOCS3 revisited: a broad regulator of disease, now ready for therapeutic use[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73 (17): 3323-3336. DOI: 10. 1007/s00018-016-2234-x.
- [6] Morris GP, Brown NK, Kong YC. Naturally-existing CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells are required for tolerance to experimental autoimmune thyroiditis induced by either exogenous or endogenous autoantigen[J]. J Autoimmun, 2009, 33 (1): 68-76. DOI: 10. 1016/j. jaut. 2009. 03. 010.
- [7] Korn T, Oukka M, Kuchroo V, et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties[J]. Semin Immunol, 2007, 19 (6): 362-371. DOI: 10. 1016/j. smim. 2007. 10. 007.
- [8] Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, Benedicto I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95 (2): 953-962. DOI: 10. 1210/jc. 2009-1719.
- [9] Montagna G, Imperiali M, Agazzi P, et al. Hashimoto's encephalopathy: a rare proteiform disorder[J]. Autoimmun Rev, 2016, 15 (5): 466-476. DOI: 10. 1016/j. autrev. 2016. 01. 014.
- [10] Bossowski A, Moniuszko M, D browska M, et al. Lower proportions of CD4⁺ CD25⁺ (high) and CD4⁺ FoxP3⁺, but not CD4⁺ CD25⁺ CD127⁺ (low) FoxP3⁺ T cell levels in children with autoimmune thyroid diseases[J]. Autoimmunity, 2013, 46 (3): 222-230. DOI: 10. 3109/08916934. 2012. 751981.
- [11] Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Regulation of suppressors of cytokinesignaling as a therapeutic approach in autoimmune diseases, with an emphasis on multiple sclerosis[J]. J Signal Transduct, 2011, 2011: 635721. DOI: 10. 1155/2011/635721.
- [12] Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function[J]. Trends Immunol, 2009, 30 (12): 592-602. DOI: 10. 1016/j. it. 2009. 09. 009.
- [13] Jager LD, Dabelic R, Waiboci LW, et al. The kinase inhibitory region of SOCS-1 is sufficient to inhibit T-helper 17 and other immune functions in experimental allergic encephalomyelitis[J]. J Neuroimmunol, 2011, 232 (1-2): 108-118. DOI: 10. 1016/j. jneuroim. 2010. 10. 018.
- [14] Zhu C, Ma J, Liu Y, et al. Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97 (3): 943-950. DOI: 10. 1210/jc. 2011-2003.

(收稿日期:2018-01-11)