短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)01-0082-03

# 血清可溶性共刺激因子 CTLA-4 和 CD28 在乙型肝炎患者血清中的表达及意义

彭文丽,毕小云 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科)

[摘要] **目的** 探讨慢性乙肝患者血清中可溶性共刺激分子的表达,并评价其临床意义。**方法** 应用 ELISA 法检测 81 例慢性乙肝患者和 41 例健康体检者(对照组)血清 sCTLA-4、sCD28、sCD80 和 sCD86 的浓度。**结果** 慢性乙肝患者血清 sCTLA-4 和 sCD28 浓度均显著高于对照组($P$ 值均 $<0.005$),而血清 sCD80 和 sCD86 的浓度无显著性差异。sCTLA-4 和 sCD28 与慢性乙肝患者体内丙氨酸氨基转氨酶水平高度相关,但与 HBV DNA 病毒载量无关。乙肝患者血清中 sCTLA-4 和 sCD28 浓度存在正相关。**结论** 可溶性共刺激分子的异常产生反映了 T 细胞活化的调节异常,且与慢性乙肝的严重性相关。

[关键词] 共刺激分子;乙肝;感染;免疫反应
[中图法分类号] R392.3; R446.12; R512.62 [文献标志码] A

HBV 慢性感染过程中抗原递呈细胞(antigen-presenting cell,APC)将 HBV 抗原加工成肽段与 MHC 结合形成的复合物与 TCR/CD3 复合体相互作用提供 T 细胞活化第一信号[1-2],进而 APC 与 T 细胞表面的共刺激分子相互作用提供第二信号[3-5]。T 细胞上的 CD28 /CTLA-4 与 APC 表面的共同配体 CD80 和 CD86 是目前发现的最为重要的共刺激分子。

研究[6-13]显示,可溶性 CD28 (sCD28)、CTLA4 (sCTLA4)、CD80 (sCD80) 或 CD86 (sCD86)等因子在 SLE、关节炎、哮喘和糖尿病等患者血清中含量异常,但其在慢性 HBV 感染中的临床意义和免疫病理学作用尚未阐明。本研究旨在通过对慢性 HBV 感染患者血清中 sCTLA-4、sCD28、sCD80 和 sCD86 等可溶性共刺激分子浓度的检测,进一步探讨 T 细胞共刺激分子的免疫病理作用,并发现慢性 HBV 感染潜在的疾病标志物。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取 2010 年 1 月至 2011 年 1 月之间于重庆医科大学附属第一医院住院的 81 例慢性 HBV 感染患者(HBV 组,其中 HBeAg 阳性组 41 例,HBeAg 阴性组 40 例)和 41 例性别与年龄匹配的健康志愿者(对照组)。81 例患者均为 HBs Ag 阳性,且已排除 HCV 病毒、HDV 病毒、HIV-1 型和 HIV-2 型等其他慢性肝损伤原因。所有患者无任何并发症,且未出现任何自身免疫疾病的血清标志物。取样 6 个月之内患者未接受过任何 HBV 抗体试剂。以上程序经过了重庆医科大学附属第一医院临床研究伦理委员会的批准,且所有参与者均提交了知情同意书,并符合赫尔辛基宣言的要求。慢性乙肝组和健康对照组临床特征(包括年龄、性别、白蛋白、病毒、ALT、AST、TB、DB 和 AFP 等)如表 1 所示。

### 1.2 病毒学评估和肝生化检验

HBsAg、HBeAg、anti-HBs、anti-HBc 和 anti-HBe 经商业化酶免疫分析试剂盒 (AXSYM System, Abbott, Wiesbaden, Germany)进行检测;HBV DNA 水平经实时荧光定量 PCR 在 ABI 7000 系统上检测 (Applied Biosystems, Foster City, CA),检测限为 $1\times10^3$ 拷贝/mL; Beckman Coulter synchron LX 20 (Beckman Coulter Inc., USA)全自动生化分析仪检测血清 ALT 和 AST 水平。

### 1.3 sCTLA-4、sCD28、sCD80 和 sCD86 检测

分别抽取 HBV 组与对照组空腹 静脉血 4 mL,3 000 r/min 离心 7 min ,分离 0.5 ~ 1.0 mL 血清标本,置于 -80 ℃冰冻保存待测。采用 Bender Medsystems Diagnostics 公司(Vienna, Austria)生产的 ELISA 试剂盒检测血清 sCTLA-4、sCD28、sCD80 和 sCD86 浓度。实验操作严格按厂家说明书进行。检测限分别为 0.13、0.18、0.1、0.14 ng/mL。

### 1.4 统计学分析

Mann - Whitney 秩和检验分析 HBV 组和正常组 sCTLA-4、sCD28、sCD80 和 sCD86 的差异表达;Spearman 相关分析比较 sCTLA-4、sCD28、sCD80 和 CD86 浓度与 ALT 和 HBV DNA 水平的相关性。数据分析均由 SPSS 19.0 统计软件处理。

**表 1 健康对照组和慢性乙肝组的临床和血清学特征**

| 组别 | $n$ | 年龄(岁) | 女/男 | 白蛋白[g/dL, 中位数(IQ 范围)] | 乙肝抗原抗体阳性例数 | | | | 血清检查指标[中位数(IQ 范围)] | | | | HBV DNA lg (拷贝/mL) | HBV 基因型 (B/C) | 自身免疫性疾病 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | HBsAg | HBeAg | HBeAb | HBcAb | ALT (U/mL) | AST (U/mL) | TB (μmol/L) | DB (μmol/L) | | | |
| 健康对照组 | 41 | 31.1 ±15.6 | 18/23 | 4.1(3.5 ~4.8) | 0 | 0 | 0 | 0 | <30 | <20 | <20 | <10 | 0 | 0/41 | 无 |
| 慢性乙肝组 | 81 | 32.2 ±12.8 | 38/43 | 3.0(1.8 ~4.1) | 81 | 41 | 40 | 81 | 191(32 ~589) | 185(46 ~638) | 62(27 ~226) | 51(16 ~158) | 5.8 ±1.9 | 36/45 | 无 |

[通信作者] 毕小云,电话:(023)89012744, E-mail:Bxy20061963@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121207.1023.006.html(2012-12-07)

## 2 结果

### 2.1 血清 sCTLA-4、sCD2、sCD80 和 sCD86 水平比较

大部分健康对照者血清 sCD28 水平低于最低检测限(0.18 ng/mL),慢性乙肝感染患者组 sCD28 阳性(中位数为3.56 ng/mL, 范围为0~69.5 ng/mL)和阴性患者组(中位数为3.13 mg/mL, 范围为0~52.5 ng/mL)sCD28 浓度无显著差异。慢性乙肝感染患者(中位数为 3.17 ng/mL, 范围为 0~9.67 ng/mL)血清 sCTLA4 浓度亦显著高于健康对照组(中位数为0.68 ng/mL, 范围为 0~5.91 ng/mL, $P<0.001$),而 HBeAg 阳性和阴性患者血清 sCTLA4 无显著性差异。此外,患者组和对照组血清 sCD80 和 sCD86 浓度亦无显著差异($P>0.05$),慢性乙肝感染患者组 sCD80 中位数为 0.17 ng/mL(范围为0~0.43 ng/mL),对照组血清 sCD80 中位数为0.18 ng/mL(范围为0~0.43 ng/mL);而慢性乙肝感染患者组 sCD86 中位数为 1.33 ng/mL(范围为 0.52~1.71 ng/mL),对照组血清 sCD86 中位数为 1.37 ng/mL (范围为0.49~1.81 ng/mL)。

### 2.2 慢性乙肝患者血清 sCTLA-4、sCD28 和 ALT 水平的相关性

通过分析慢性乙肝患者血清 ALT 和 sCTLA-4 或 sCD28 之间的联系,我们发现血清 ALT 与 sCD28 或 sCTLA-4 均呈正相关($r=0.552\,6$, $P=0.001$;$r=0.369\,9$, $P=0.026\,4$)。而相反,血清 sCD80 和 sCD86 均不与 ALT 相关($P>0.05$)。此外,慢性乙肝患者血清 sCTLA-4、sCD28、sCD80 或 sCD86 均不与白蛋白、AST、TB 和 DB 等其他肝功能指标相关。

### 2.3 血清 sCTLA-4 和 sCD28 浓度与乙肝患者 HBV-DNA 水平无相关性

32 例乙肝患者中血清 sCTLA-4 和 sCD28 浓度均与乙肝患者中 HBV-DNA 水平无相关($P>0.05$);此外,sCD80 和 sCD86 表达亦与乙肝患者中 HBV-DNA 无相关性($P>0.05$)。这些结果说明乙肝患者病毒复制水平与 sCTLA-4、sCD28、sCD80 或 sCD86 分子的表达水平无关。

### 2.4 可溶性共刺激分子水平间相关性分析

32 例乙肝患者血清中 sCTLA-4 和 sCD28 水平、sCD28 和 sCD86 水平间均具有相关性($r=0.430\,6$, $P=0.013\,9$;$r=0.436\,2$, $P=0.012\,6$),而慢性乙肝患者血清 CD28 和 sCD8、sCTLA-4 和 sCD8、sCTLA-4 和 sCD86、sCD80 和 sCD86 之间均无相关性($P>0.05$)。这些结果说明乙肝病毒感染的情况下,来源于 T 细胞的 sCTLA-4 和 sCD28 存在正相关性,而来源于抗原递呈细胞的 sCD86 和 sCD28 表达水平亦存在正相关。

## 3 讨论

T 细胞和 APC 的相互作用启动对乙肝感染的特定免疫反应。乙肝感染过程中存在 T 细胞和 APC 的功能失调以及免疫调节分子(包括细胞因子和趋化因子)的表达失常,但慢性乙肝感染患者体内共刺激分子的表达情况尚未阐明。

本研究结果显示,慢性乙肝患者血清 sCTLA-4 和 sCD28 水平显著高于健康人,而 HBeAg 阴性和阳性患者间血清 sCTLA4 和 sCD28 浓度无显著差异,提示 HBeAg 并非控制这些共刺激分子表达的主要因素。此外,鉴于 ALT 常被用于作为肝病进展的指标,而本研究结果显示,sCTLA4 和 sCD28 与慢性乙肝患者血清 ALT 水平高度正相关,因而显示:sCTLA-4 和 sCD28 可作为间接衡量慢性乙肝疾病活动的指标。但血清 sCTLA-4 和 sCD28 浓度与血清 HBV-DNA 水平却并不相关。此外,慢性乙肝患者体内血清 sCTLA-4 和 sCD28,以及 sCTLA-4 和 sCD28 之间有显著正相关。鉴于 sCTLA-4 和 sCD28 主要由 T 细胞产生,而 sCD86 则由 APC 产生[3],因此以上相关性与它们的细胞来源相一致,体现了它们在调节 T 细胞免疫反应方面的细胞功能相近。

在其他某些慢性炎症疾病中,如 RA、SLE 和白血病患者中,研究者们也观察到了 sCTLA4 和 sCD28 的异常表达[6-13],提示 sCTLA4 和 sCD28 水平的升高不仅仅见于慢性乙肝感染,sCTLA4 和 sCD28 可能是慢性炎症而非某种特定疾病的标志物。在慢性乙肝所致的炎症过程中,乙肝抗原的持续存在可能导致慢性乙肝患者体内 T 细胞的持续激活,进而导致血清 CTLA4 和 sCD28 升高。尽管慢性乙肝患者中 CTLA4 和 sCD28 的浓度与白蛋白,AST,TB 和 DB 等肝功能指标没有相关性,但它们却与肝损伤的重要标志物 ALT 高度相关,说明 sCTLA4 和 sCD28 的升高幅度在一定程度上反映了肝损伤的严重程度,可能作为判断药物治疗和预后情况的血清标志物。我们将进一步收集大样本,根据患者病情轻重差异分层分析以更加明确 CTLA-4 和 CD28 在乙型肝炎患者血清中的临床意义,并深入探讨 T 细胞功能与可溶性共刺激分子之间的相关性。

目前,慢性乙肝感染患者体内 sCTLA-4 和 sCD28 上调的分子机制尚未完全阐明。近期 1 项研究显示,HBsAg 可能影响 Th 细胞分化并调节 TH 免疫反应[14],而 HBcAg 刺激可能促进 IL-17, IL-22、IL-23 和 IL-6 产生,并转变慢性乙肝患者体内 PBMC 的增长因子(TGF)-β 与 IL-10,但健康组不受影响[15]。另有研究[16]显示,乙肝 X 抗原能够上调肝细胞中共刺激分子的表达。因此,本次研究中观察到的可溶性共刺激分子的异常产生有可能受到了不同乙肝抗原的调节。

综上所述,本研究展示了慢性乙肝感染患者体内可溶性共刺激分子的异常表达,为进一步探讨慢性乙肝感染机制提供了生化学基础,可能为慢性乙肝疗效评估和预后判断提供诊断标志。后续研究将采集肝脏炎症部位或附近部位样本对共刺激分子的生物学功能进行研究。

## 参考文献：

[1] Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts[J]. N Engl J Med, 2000, 343(10): 702 - 709.

[2] Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts[J]. N Engl J Med, 2000, 343(11): 782 - 786.

[3] Chambers C A, Allison J P. Co-stimulation in T cell responses[J]. Curr Opin Immunol, 1997, 9(3): 396 - 404.

[4] Keir M E, Sharpe A H. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity[J]. Immunol Rev, 2005, 204: 128 - 143.

[5] Walunas T L, Bakker C Y, Bluestone J A. CTLA-4 ligation blocks CD28$^-$ dependent T cell activation[J]. J Exp Med, 1996, 183(6): 2541 - 2550.

[6] Hebbar M, Jeannin P, Magistrelli G, *et al*. Detection of circulating soluble CD28 in patients with systemic lupus erythematosus, primary Sjogren's syndrome and systemic sclerosis[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(2): 388 - 392.

[7] McHugh R S, Ratnoff W D, Gilmartin R, *et al*. Detection of a soluble form of B7-1 (CD80) in synovial fluid from patients with arthritis using monoclonal antibodies against distinct epitopes of human B7-1[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1998, 87(1): 50 - 59.

[8] Hock B D, Patton W N, Budhia S, *et al*. Human plasma contains a soluble form of CD86 which is present at elevated levels in some leukaemia patients[J]. Leukemia, 2002, 16(5): 865 - 873.

[9] Faas S J, Giannoni M A, Mickle A P, *et al*. Primary structure and functional characterization of a soluble, alternatively spliced form of B7-1[J]. J Immunol, 2000, 164(12): 6340 - 6348.

[10] Wong C K, Ho A W, Tong P C, *et al*. Aberrant expression of soluble co-stimulatory molecules and adhesion molecules in type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. J Clin Immunol, 2008, 28(1): 36 - 43.

[11] Wong C K, Lun S W, Ko F W, *et al*. Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma[J]. Clin Exp Immunol, 2005, 141(1): 122 - 129.

[12] Chen Z, Zhou F, Huang S, *et al*. Association of cytotoxic T lymphocyte associated antigen - 4 gene (rs60872763) polymorphism with Crohn's disease and high levels of serum sCTLA-4 in Crohn's disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(5): 924 - 930.

[13] Erfani N, Razmkhah M, Ghaderi A. Circulating soluble CTLA4 (sCTLA4) is elevated in patients with breast cancer[J]. Cancer Invest, 2010, 28(8): 828 - 832.

[14] Jan R H, Lin Y L, Chen L K, *et al*. Hepatitis B virus surface antigen can activate dendritic cells and modulate T helper type immune response[J]. Microbiol Immunol, 2011, 55(1): 51 - 59.

[15] Li J, Wu W, Peng G, *et al*. HBcAg induces interleukin-10 production, inhibiting HBcAg-specific Th17 responses in chronic hepatitis B patients[J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88(8): 834 - 841.

[16] Tang Y, Chen Y, Ni B, *et al*. Up-regulation of the expression of costimulatory molecule CD40 in hepatocytes by hepatitis B virus X antigen[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384(1): 12 - 17.


(**收稿**:2012-07-12;**修回**:2012-10-15)

(编辑　邓强庭)

# 短篇论著

**文章编号**:1000-5404(2013)01-0084-04

## 滑车上动脉蒂额部皮瓣在颜面部整形中的应用及其设计技巧

谢义德,詹明坤,郭志辉,李　铭,江成鸿,陈小松,周亚宽,黄拔瑞　(350001 福州，福建医科大学附属协和医院整形外科)

[**摘要**] **目的**　探索滑车上动脉蒂额部岛状皮瓣修复额、鼻及眼睑皮肤软组织大面积缺损及鼻再造的方法并总结相关经验。**方法**　运用扩张和非扩张的不同解剖层次、不同形状的滑车上动脉蒂额部岛状皮瓣修复额、鼻、睑大面积皮肤软组织缺损及鼻再造共32例。**结果**　所有病例皮瓣成活良好,其中扩张皮瓣为12例,术中面部缺损修复面积为8 mm × 35 mm ~ 30 mm × 40 mm,随访时间为3个月至2年，平均13个月,缺损修复后局部外形及功能恢复良好,扩张后的额部皮瓣所获得的修复效果更佳。**结论**　滑车上动脉蒂额部岛状皮瓣血运良好、设计灵活,供瓣面积大,扩张后皮瓣薄、供区可拉拢缝合,是额、鼻及眼睑皮肤软组织大面积缺损的修复及鼻再造的最佳选择。

[**关键词**]　滑车上动脉;皮瓣;缺损修复

[**中图法分类号**]　R622.12　　[**文献标志码**]　A

额部皮瓣在颜面部整形中的临床应用十分广泛,由于额部皮瓣具有良好的质地,与周围颜面部皮肤色泽接近,血供丰富,运用设计十分灵活,可根据厚薄需要设计成单纯、菲薄的皮瓣及携带额肌较厚的皮瓣,根据缺损创面形状的需要设计成不同形状的岛状皮瓣,是鼻、面、眼睑的皮肤软组织缺损的优良材料,额部皮瓣特别是扩张后的滑车上动脉蒂额部皮瓣已成为鼻再造的首选[1-4]。我科自1985年7月至2011年12月以来应用滑车上动脉蒂额部岛状皮瓣修复鼻、额、面及

[**通信作者**]　谢义德,E-mail:13805058416@163.com

[**优先出版**]　http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1741.019.html(2012-12-19)