

慢性乙型肝炎患者红细胞天然免疫黏附功能与血清 sCR1 变化的相关性研究

罗丽莎¹, 张继万¹, 周建丽¹, 何鹏飞¹, 隆 莉¹, 张晓芳¹, 赵志勇¹, 刘 嫻¹, 王海滨² (1. 武警四川总队医院, 四川乐山 614000; 2. 解放军三〇二医院临检中心, 北京 100039)

【摘要】 目的 研究乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) 阳性慢性乙型肝炎患者红细胞天然免疫黏附功能 (RNIAF) 与血清可溶性 I 型补体受体 (sCR1) 的浓度变化, 分析二者的相关性, 并探讨其临床意义。**方法** 选择 48 例肝功能正常、血清 HBV DNA 大于 10^6 U/mL 的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者作为肝功能正常组, 48 例转氨酶高于正常值 2 倍以上的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者作为肝功能异常组。检测 RNIAF, 同时采用酶联免疫定量检测试剂盒测定血清 sCR1 含量。**结果** 肝功能异常组的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 较肝功能正常组及健康对照组显著下降, 而 sCR1 含量显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。动态观察持续肝功能异常的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 与血清 sCR1 含量变化, 显示二者呈明显负相关 ($r = -0.91$)。HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者血清 sCR1 含量与凝血酶原活动度也呈明显负相关 ($r = -0.87$)。**结论** HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 与血清 sCR1 的含量变化与肝脏功能损伤严重程度密切相关, 可作为临床判断肝病患者病情严重程度及预后的参考指标。

【关键词】 乙型肝炎病毒 e 抗原; 慢性乙型肝炎; 红细胞; 免疫黏附; 可溶性补体 I 型受体
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.09.022 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)09-1069-03

Relationship between the red cell nature immune adhesion function and the concentrations of soluble complement receptor type 1 in patients with e antigen positive LUO Li-sha¹, ZHANG Ji-wan¹, ZHOU Jian-li¹, HE Peng-fei¹, LONG Li¹, ZHANG Xiao-fang¹, ZHAO Zhi-yong¹, LIU Xian¹, WANG Hai-bin² (1. Si Chuan Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Leshan 614000, China; 2. 302 military hospital of china, beijing, 100039, China)

【Abstract】 Objective To study the changes and significance of red cell nature immune adhesion function (RNIAF) and the concentrations of soluble complement receptor type 1 (sCR1) in patients with e antigen positive. **Methods** 48 cases of e antigen positive with normal hepatic function and HBV DNA much more 10^6 IU/mL in serum have been used in this study. Equal cases of ALT twice over normal level with or without jaundice have been used as abnormal hepatic function groups. The function of red cells nature immune-adhering tumor cell assay was performed and the concentration of sCR1 was detected by ELISA. **Results** The RNIAF of patients e antigen positive with abnormal hepatic function was obviously lower than that of patients with normal hepatic function and healthy individuals ($P < 0.01$). But the concentration of sCR1 was significantly higher ($P < 0.01$). The RNIAF was evidently related with the changes of sCR1 in patients of e antigen positive with continually abnormal hepatic function ($r = -0.91$). The sCR1 concentrations of patients with e antigen positive were negatively related with PTA ($r = -0.87$). **Conclusion** There is a good relationship between RNIAF, serum sCR1 and the degree of liver damage. The two parameter may be as an important marker for judging the degree and prognoses of liver diseases.

【Key words】 e antigen positive; chronic hepatitis B; erythrocyte; immune adhesion; soluble complement receptor type 1

进入血液中的病原体或机体产生的抗原抗体复合物将直接或间接激活补体 C3, 产生 C3b、C4b 等补体片段, 这些片段将病原颗粒或循环免疫复合物与红细胞表达的补体受体 1 型分子 (CR1) 连接成免疫复合体, 然后通过 FC 段或补体 C 端与吞噬细胞的 FCR 或 CR 结合, 从而活化吞噬细胞^[1], 释放蛋白水解酶, 将 CR1 连同黏附的抗原或病原体一同切下形成可溶性 CR1 (sCR1)。sCR1 作为大颗粒抗原复合体最终要在肝脏和脾脏中被彻底代谢, 因此循环中 sCR1 水平的升高及其程度不但是免疫清除的标志, 同时也是评估肝脏代谢功能的指标。

有文献报道肝病患者血清 sCR1 含量的变化是评价肝脏功能损伤程度的直接标志^[2-3]。作者对 96 例乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) 阳性慢性乙型肝炎患者红细胞天然免疫黏附功能 (RNIAF) 与血清 sCR1 浓度变化进行比较, 并观察其动态变化, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 样本选择 2009 年 4~6 月解放军三〇二医院门诊或住院确诊为慢性乙型肝炎的患者 96 例, 乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、HBeAg、乙型肝炎病毒核心抗体 (抗-HBc) 均为阳

性,血清 HBV DNA 均大于 10^6 U/mL。其中 48 例肝功能正常患者作为肝功能正常组,48 例转氨酶高于正常值 2 倍以上的患者作为肝功能异常组。96 例患者均排除肝硬化、肝癌及其他原因所致的肝功能异常,近 3 个月内均未使用抗病毒及保肝等药物治疗。两组一般资料相近,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。健康对照组 30 例来自同期解放军三〇二医院门诊体检人员。所有待测血清皆冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,试验前 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻。

1.2 RNIAF 测定^[4]

1.2.1 肿瘤细胞悬液的配制 将小鼠艾氏腹腔积液瘤细胞用生理盐水洗涤 1 次,配成 1×10^6 /mL 浓度悬液,备用。

1.2.2 RNIAF 试验 取肿瘤细胞悬液 100 μL 、患者自身血浆 100 μL 及枸橼酸钠抗凝全血底部红细胞 1 μL 混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。轻轻摇匀,取混匀液 150 μL 加 50 μL 瑞-吉氏染液混匀,悬浮涂片,分上、下、左、右、中 5 个区阅片,每个区阅读 15~25 个肿瘤细胞,结合 5 个及以上红细胞的肿瘤细胞为一个结合单位,计算结合率。

1.3 血清 sCR1 浓度测定^[5]

1.3.1 红细胞的制备 将“O”型健康人枸橼酸钠抗凝全血 1 mL(采血当日试验),2 000 r/min,离心 5 min,取中下层沉淀红细胞 10 μL 加入到含有生理盐水 10 mL 的玻璃试管内混匀,洗涤 2 次(水平离心 2 000 r/min,5 min),保证每次洗涤无红细胞丢失。最后一次洗涤后弃净上清液,加 1% S/牛血清清蛋白 90 μL 和固定液 10 μL ,振荡混匀,室温固定 30 min。再用 5 mL 1% S/BSA 洗涤 1 次,弃净上清液。加 1% S/BSA 1 mL 制成红细胞悬液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 测定方法 将标准品、空白对照(用抗体稀释液代替)、待测血清各 100 μL 加入空白 V 型板中,加入配制好的定量鼠抗人 CR1 单克隆抗体 10 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。每孔加入 20 μL 定量配制的“O”型红细胞悬液,振荡混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用 1% S/BSA 洗涤 2 次,1 500 r/min,板式水平离心 2 min。每孔加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 10 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。1% S/BSA 洗涤 2 次。每孔加入 120 μL 配制好的底物液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,水平离心,吸取上清液显色液 100 μL 移于另一 U 型比色板,在酶联免疫检测仪 450 nm 读取数值,同时用标准曲线计算其浓度。

1.4 统计学方法 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件及 t 检验进行统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RNIAF 试验结果 见图 1。

2.2 肝功能正常组与异常组 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 与血清 sCR1 的变化 见表 1。肝功能异常组的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者其 RNIAF 明显低于肝功能正常组和健康对照组,其血清 sCR1 则明显高于肝功能正常组和健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。肝功能正常组的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者其 RNIAF 虽然低于健康对照组平均水平,血清 sCR1 含量高于健康对照组,但二者差异亦无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 与血清 sCR1 随肝功能损伤程度的动态变化 对肝功能持续异常超过半年的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者,每月间隔动态观察

RNIAF 的变化。结果显示,在肝功异常初期其 RNIAF 显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),随着病程的延长,其 RNIAF 呈逐渐下降趋势,在肝脏功能恢复正常水平后,其 RNIAF 明显回升,但仍低于健康对照组。而血清 sCR1 则随着病程延长逐渐上升,待肝脏功能恢复后,sCR1 随之下降,但仍高于健康对照组水平。持续肝功能异常的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 与血清 sCR1 含量变化呈明显负相关($r=-0.91$),见图 2。

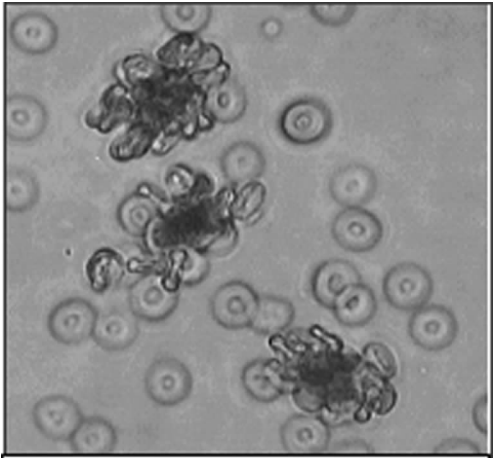


图 1 RNIAF 试验结果瑞吉染色 $\times 400$ 倍
(花环中心为肿瘤细胞)

表 1 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 与血清 sCR1 浓度的变化

组别	<i>n</i>	RNIAF(%)	血清 sCR1($\mu\text{g/L}$)
健康对照组	30	$66.8\pm 8.4^*$	$31.5\pm 8.6^*$
肝功能正常组	48	$61.5\pm 9.7^{\Delta*}$	$42.1\pm 13.2^{\Delta*}$
肝功能异常组	48	49.8 ± 10.6	88.4 ± 39.7

注:与健康对照组比较, $\Delta P>0.05$;与肝功能异常组比较, $* P<0.01$ 。

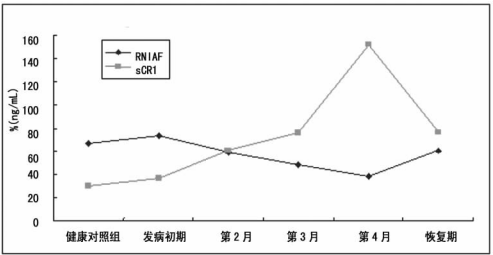


图 2 持续肝脏功能异常 HBeAg 阳性患者 RNIAF 与血清 sCR1 的动态变化

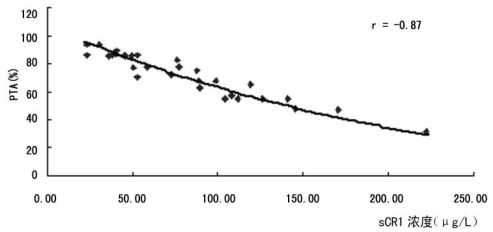


图 3 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者血清 sCR1 浓度与 PTA 的相关性

2.4 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者血清 sCR1 浓度与 PTA 的相关性比较 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者血清 sCR1 浓度与 PTA 呈明显负相关($r = -0.87$), 见图 3。结合临床资料, 4 例血清 sCR1 浓度大于 $400 \mu\text{g/L}$ 的患者均发展为重型肝炎, 预后较差。由此提示 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者血清 sCR1 水平变化与肝功能损伤严重程度密切相关。

3 讨 论

红细胞表面有多种与免疫功能有关的物质, 但红细胞的免疫黏附功能是以 CR1 为基础来实现的^[6-9]。CR1 既是重要的补体活化抑制因子, 又是补体 C3b/C4b 的天然受体, 在黏附补体结合的循环免疫复合物及抗原等并将其运输至肝脏降解过程中具有非常重要的作用^[10-11]。红细胞表面广泛表达的 CR1 分子可被蛋白水解酶水解为 sCR1 而进入血液循环, 并主要存在于血浆中; 肝病患者血液循环中的绝大多数致病物质、免疫复合物必须经 CR1 结合后才能被运输至脾脏吞噬系统降解^[12-13]。因此循环 sCR1 的含量与需经肝脏代谢的免疫复合物含量呈正比, 即血清 sCR1 在血液循环中的积聚意味着肝脏代谢功能损伤程度的加重。

HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者临床大多分为免疫耐受型及免疫应答型。免疫耐受型 HBeAg 阳性乙型肝炎患者肝脏中的 HBV 虽持续复制, 但与机体处于共生状态, 肝细胞亦未受到免疫损伤, 此时红细胞 CR1 无消耗, 不存在明显的 RNIAF 下降和血清 sCR1 含量升高; 免疫应答型患者在出现肝功能异常的同时, 循环免疫反应产物相应升高, 由于 CR1 的消耗导致 RNIAF 的下降, 因肝脏功能的损伤而血清 sCR1 在循环积压而升高。本研究结果显示, 肝功能异常组 RNIAF 较肝功能正常组及健康对照组显著下降, 而 sCR1 含量则显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); RNIAF 随着肝功能损伤程度的加重逐渐下降, 而 sCR1 含量则逐渐上升, 二者呈明显负相关。直接反映肝脏损伤程度的灵敏指标, 凝血酶原活动度的下降($<40\%$)是临床诊断慢性重型肝炎的重要标准。本研究结果显示, HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者血清 sCR1 含量随 PTA 的下降而上升, 二者呈明显负相关。结合临床研究, 4 例血清 sCR1 浓度大于 $400 \mu\text{g/L}$ 的患者均发展为慢性重型乙型肝炎, 预后较差。

综上所述, HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 RNIAF 及血清 sCR1 的含量变化与肝功能损伤严重程度直接相关, 可作为临床判断肝病患者病情严重程度及预后的重要参考指标。

参考文献

[1] 薛拥志, 王爱华, 利凯. 红细胞免疫研究进展[J]. 安徽农(上接第 1068 页)

[4] 谷小林, 彭茗婷. 二级标准血液分析仪的质量控制与应用[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(4): 237.

[5] Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu J, et al. Accuracy precision and clinically acceptable level of complete blood cell count by an automated multi - channel hematology analyzer[J]. Jpn J Clin Pathol, 1999, 47(4): 343-352.

业科学, 2007, 35(12): 3558-3560.

[2] 董格峰, 刘典勇, 王晶波, 等. 重型肝炎患者血清可溶性补体受体 I 型的变化及临床意义[J]. 中华肝病杂志, 2004, 12(2): 108-109.

[3] 王晗, 王雪飞, 杨丽华, 等. 不同肝病患者血清 sCR1 浓度变化及临床意义研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1757-1758.

[4] 王海滨, 张继万, 郭静霞, 等. 红细胞天然免疫黏附功能在肝病不同病期的变化及意义[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(6): 455-458.

[5] 王海滨, 周建丽, 李永利, 等. 血清 sCR1 测定方法的建立及临床意义[J]. 中国医学检验杂志, 2002, 3(4): 240-242.

[6] Denomme GA. The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens[J]. Transfuse Med Rev, 2004, 18(3): 203-231.

[7] Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function[J]. Semin Hematol, 2004, 41(2): 93-117.

[8] McLare CA, Williamson JF, Stewart BJ, et al. Indels and imperfect duplication have driven the evolution of human Complement Receptor 1 (CR1) and CR1-like from their precursor CR1 alpha: importance of functional sets[J]. Hum Immunol, 2005, 66(3): 258-273.

[9] 李晋飞, 李宏全, 巩红霞, 等. 红细胞免疫黏附功能及其检测技术的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007, 6(1): 10-11.

[10] 李绪斌, 杨文东. 肝脏疾病患者红细胞免疫功能临床研究进展[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(2): 104-106.

[11] 张乃红. 红细胞 CR1 的研究进展[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 2005, 28(6): 494-498.

[12] 任吉莲, 王桂琴. 肝病患者红细胞免疫功能的研究[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(6): 618-619.

[13] 翟瑄. 红细胞免疫功能研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(20): 2365-2367.

(收稿日期: 2011-12-22)

[6] 贺端明, 林该胃, 任婷婷. 新鲜全血对不同血细胞分析仪的比对试验[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 145-147.

[7] 李健茹. 不同型号血细胞分析仪检测结果比较分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(4): 291-292.

(收稿日期: 2011-12-18)