

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 17. 002

可溶因子的表达与肝移植后 HBV 的相关性研究^{*}

杨旭洁, 陈捷[△], 蔡蓓, 苏真珍, 吴晓娟, 石明巧

(四川大学华西医院实验医学科, 成都 610041)

摘要:目的 探讨可溶性共刺激分子在肝移植后乙型肝炎复发与慢性乙型肝炎(CHB)的表达差异及 2 种感染免疫状态的差异。方法 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法分析比较肝移植后乙型肝炎复发与未复发者, CHB 患者与健康对照者 sCTLA-4、sCD28、sCD80、sCD86、 γ 干扰素(IFN- γ)的表达差异。结果 CHB 患者 sCTLA-4、sCD80、sCD86、IFN- γ 显著高于健康对照者($P < 0.05$), 但肝移植后乙型肝炎复发者 IFN- γ 显著低于未复发者($P < 0.05$), 其他差异无统计学意义($P > 0.05$)。CHB 患者 sCTLA-4 及 sCD86 水平与病毒复制相关, sCD80 及 IFN- γ 水平与肝脏损伤有关。结论 负性可溶性共刺激分子可作为反映 CHB 感染的标志物, 但肝移植后乙型肝炎复发者仅 IFN- γ 可作为反映感染的标志物。

关键词:慢性乙型肝炎; 复发; 肝移植; 可溶性共刺激分子

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)17-2529-04

Soluble costimulatory molecules and HBV infection after liver transplantation^{*}

YANG Xujie, CHEN Jie[△], CAI Bei, SU Zhenzhen, WU Xiaojuan, SHI Mingqiao

(Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan

University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: **Objective** To explore the association of cellular immune markers and the development of hepatitis B recurrent after liver transplantation (LT) recipients and chronic hepatitis B (CHB) patients. **Methods** Soluble Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen-4 (CTLA-4), sCD28, sCD80, sCD86 and IFN- γ were measured by ELISA in patients with HBV recurrence and no recurrence after LT. **Results** IFN- γ significantly decreased in hepatitis B recurrent patients ($P < 0.05$). While in CHB, sCTLA-4, sCD80, sCD86 and IFN- γ significantly increased than in the control ($P < 0.05$). In the patients of CHB, sCTLA-4 was correlated with hepatitis B virus (HBV)-DNA, sCD86 was correlated with HBeAg and HBeAb, sCD80 was correlated with Aspartate Aminotransferase (AST), IFN- γ was correlated with AST and γ -glutamyltransferase (GGT). **Conclusion** Negative co-stimulatory molecules may have more important function in the immunity of CHB. sCTLA-4, sCD80, sCD86 and IFN- γ could be new markers for HBV infection. IFN- γ could be marker for re-infection after LT.

Key words: CHB; recurrent; liver transplantation; soluble co-stimulatory molecules

慢性乙型肝炎(CHB)严重危害人类健康, 全球约有 3.5 亿携带者, 每年约 50 万人感染乙型肝炎病毒(HBV)而病死。我国约有 1.3 亿的 HBV 携带者, 2 300 万 CHB 患者。HBV 相关的肝脏疾病是造成终末期肝病的主要原因, 而肝移植是终末期肝病唯一的有效治疗手段。但移植后再次感染是严重影响肝移植成功率的因素, 最终可导致移植物失去功能, 快速发展至肝硬化和肝纤维化, 所以监测 HBV 感染者的免疫调控状态, 分析肝移植后感染复发的免疫标志物尤为重要^[1]。现探讨肝移植后乙型肝炎复发与 CHB 患者可溶性免疫标志物的差异, 研究反映 HBV 感染

的免疫新指标。

有研究证实, HBV 特异的细胞毒性 T 细胞(CTL), 辅助性 T 细胞 T-helper cells (Th) 是控制 HBV 病毒感染的关键免疫细胞, 但持续携带 HBV 者无法正常发挥细胞免疫功能。CHB 患者体内诱导 T 淋巴细胞免疫耐受的机制目前还未完全阐明, 阴性选择、外周致敏, 以及淋巴因子合成异常都可能导致宿主细胞的低反应性, 同时 CHB 患者抗原呈递细胞的功能缺陷也与感染免疫有关。探讨这些因素的作用有助于发现新的靶点或免疫标志物, 有效控制病毒的持续感染^[2]。HBV 感染结局与宿主免疫状态密切相

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81401666 和 81301507)。

作者简介: 杨旭洁, 女, 技师, 主要从事临床免疫检验的相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: chenjie_wch@163.com。

关,而免疫状态与抗原呈递细胞(APCs)的抗原识别功能、淋巴细胞功能,以及共刺激分子的第2信号有关,B7是最重要的共刺激分子,包括B7-1(CD80)和B7-2(CD86),其通过与CD28结合,在诱导免疫反应中发挥重要作用。可溶性共刺激分子的异常表达与HBV感染后炎症进展中T细胞的活化密切相关^[3]。本研究通过分析参与HBV感染免疫的调控分子(共刺激分子)的表达变化,研究移植者和普通HBV感染者状态的区别,寻找更有意义和更有针对性的免疫新标志物,为移植后乙型肝炎复发及HBV慢性持续感染提供新的诊疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入四川大学华西医院HBV感染相关的终末期肝病患者81例,于2005年4月至2013年3月接受肝移植手术的患者,均使用钙调磷酸酶抑制剂为主的免疫抑制方案(FK506+MMF),术后3~6个月停用类固醇激素,患者均处于稳定期,排除酒精性肝病、急性排斥或慢性排斥者。排除丙型肝炎、丁型肝炎,供者均为HBV阴性。移植后患者均采用肌肉内注射低剂量丙种球蛋白(HBIG),结合拉米夫定(LAM)100 mg/d防止HBV再次感染。术后追踪16~96个月,HBsAg阳性或HBV-DNA>1×10³ copy/mL被认为HBV感染复发。收集2016年3月至2017年3月该院就诊的CHB患者40例,同时收集36例健康体检者作为健康对照者。CHB患者为HBsAg和/或HBV-DNA阳性持续6个月,排除甲型肝炎、丙型肝炎、戊型肝炎患者,以及人类免疫缺陷病

毒和梅毒感染者;排除肝硬化、肝细胞癌、自身免疫性疾病、原发性肝癌患者。经该院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 实验方法 收集所有研究对象的空腹静脉血,采用eBioscience公司酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测血清sCTLA-4、sCD28、sCD80、sCD86、 γ 干扰素(IFN- γ)水平。HbsAg、抗-HBs、抗-HBc、HbeAg、抗-Hbe、抗-HCV、抗-HDV、抗-HGV、抗-HIV使用罗氏化学发光法检测,病毒载量HBV-DNA应用罗氏荧光定量PCR法检测。严格按厂家说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,使用Mann-Whitney秩和检验分析sCTLA-4、sCD28、sCD80、sCD86、IFN- γ 在各组血清中的表达差异;应用Spearman相关分析比较sCTLA-4、sCD28、sCD80、sCD86、IFN- γ 水平与转氨酶、HBeAg、HBV-DNA的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各类研究对象可溶性共刺激分子表达水平的结果比较 CHB患者sCTLA-4、sCD80、sCD86、IFN- γ 表达水平显著高于健康对照者($P<0.05$);肝移植后乙型肝炎复发者IFN- γ 表达水平显著低于未复发者($P<0.05$),其他指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$);肝移植后乙型肝炎复发者sCTLA-4、sCD86和IFN- γ 表达水平显著低于CHB患者($P<0.05$)。见表1~3。

表 1 CHB 患者和健康对照者血清可溶性共刺激分子表达水平的结果比较[$M(P_{25}, P_{75})$, ng/mL]

类别	sCD28	sCTLA-4	sCD80	sCD86	IFN- γ
CHB	0.653(0.4, 319)	0.758(0.571, 1.582)*	0.663(0.308, 1.298)*	2.303(2.166, 2.386)*	5.768(3.775, 13.54)*
健康对照	0.150(0.9, 764)	0.123(0.04, 0.279)	0.278(0.205, 0.458)	2.034(1.758, 2.154)	2.359(1.314, 4.176)

注:与健康对照比较,* $P<0.05$

表 2 肝移植后乙型肝炎复发者和未复发者血清可溶性共刺激分子表达水平的结果比较[$M(P_{25}, P_{75})$, ng/mL]

类别	sCD28	sCTLA-4	sCD80	sCD86	IFN- γ
复发	0.849(0.6, 481)	0.173(0.057, 0.329)	0.673(0.402, 0.897)	1.322(1.043, 1.514)	1.322(0.869, 2.066)*
未复发	0.231(0.29, 75)	0.302(0.122, 0.435)	0.616(0.433, 0.831)	1.519(1.278, 1.662)	2.116(1.487, 3.655)

注:与未复发比较,* $P<0.05$

表 3 乙型肝炎复发者和 CHB 患者血清可溶性共刺激分子表达水平的结果比较[$M(P_{25}, P_{75})$, ng/mL]

类别	sCD28	sCTLA-4	sCD80	sCD86	IFN- γ
复发	0.849(0.6, 481)	0.173(0.057, 0.329)*	0.673(0.402, 0.897)	1.322(1.043, 1.514)*	1.322(0.869, 2.066)*
CHB	0.653(0.4, 319)	0.758(0.571, 1.582)	0.663(0.308, 1.298)	2.303(2.166, 2.386)	5.768(3.775, 13.54)

注:与CHB比较,* $P<0.05$

2.2 可溶性共刺激因子和病毒复制及肝脏损伤的相关性 HBV感染者sCTLA-4水平与HBV-DNA显著相关,sCD86水平与HBeAg定量结果显著相关,

sCD80水平与天门冬氨酸氨基转移酶(AST)显著相关,IFN- γ 水平与AST和谷氨酰转肽酶(GGT)显著相关。其他指标之间无相关性。见表4。

表 4 血清可溶性共刺激分子水平与肝功损伤及病毒复制的相关性(*r*)

检测指标	ALT	AST	ALP	GGT	HBV-DNA	HBsAg
sCD80	0.280	0.006*	0.832	0.958	0.840	0.533
sCD28	0.792	0.797	0.146	0.870	0.446	0.315
sCD86	0.489	0.134	0.186	0.820	0.245	0.033*
sCTLA-4	0.998	0.262	0.982	0.062	0.024*	0.377
IFN-γ	0.582	0.024*	0.955	0.031*	0.415	0.593

注:ALT 表示丙氨酸氨基转移酶;ALP 表示碱性磷酸酶;* *P* < 0.05

3 讨 论

HBV 感染是威胁全球的健康问题,HBV 病毒发生免疫逃逸导致宿主慢性持续感染的机制仍不清楚,HBV 特异的 CD4⁺ Th 和 CD8⁺ Th 淋巴细胞在病毒清除过程中起重要作用^[4-5]。Th1 反应不仅对细胞毒性 T 细胞(CTL)活化十分重要,而且对抗体生成也重要。由 HBV 导致的肝脏损伤是由于宿主相关免疫反应功能不足,未能清除病毒感染细胞造成。针对 HBV 感染的抗体反应通过与病毒颗粒结合形成免疫复合物而清除病毒,该特异细胞免疫反应是造成病毒持续感染者肝细胞坏死的主要原因,该功能主要由活化的 CTL 细胞执行。Th 和 Treg 也参与免疫反应过程。Th1 型细胞因子可活化免疫应答而抑制病毒复制,而 Th2 型细胞因子抑制免疫炎症反应而有利于病毒的持续存在。病毒会刺激宿主环境的改变,有利于 Treg 的招募和活化,为自身存活创造有利条件^[6-7]。

T 细胞活化依赖抗原呈递细胞 APCs 的作用,而活化信号的传递离不开共刺激因子的作用。T 淋巴细胞的活化需要双重信号刺激,HBV 表面抗原(HB-sAg)是胸腺依赖抗原,其产生免疫应答必须依赖 APC 主要组织相容性复合体与 T 细胞受体(TCR)/CD3 结合所产生的第 1 信号,以及由 APC 共刺激分子与 T 细胞相应受体结合产生的第 2 信号共同作用^[8]。B7 分子是重要的共刺激分子,主要包括 B7-1(CD80)和 B7-2(CD86),与其受体 CD28 作用,产生正性共刺激信号,促进免疫活化及免疫应答反应,增强 CD4⁺ T 细胞活性,促进白细胞介素-2(IL-2)、IFN-γ 产生,引起肝组织产生明显的坏死性炎症反应^[9-10]。

T 淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)是免疫球蛋白超家族成员,结构上与 CD28 同源。CTLA-4 仅表达活化的 Th 细胞,是负性抑制性共刺激分子。CD80 和 CD86 通过与 CTLA-4 结合而促进 Treg 功能,对 HBV 特异性 CTL 免疫应答起负性调控作用^[11-12]。可溶形式 sCTLA-4 表达未刺激的 T 细胞,刺激后释放至血浆。有研究证实,免疫反应的早期阶段 sCTLA-4 起着比膜 mCTLA-4 更为重要的作用,因为 sCTLA-4 可以在未刺激 T 细胞持续表达,而膜 mCT-

LA-4 只在 T 细胞活化时才表达,且体外试验显示 sCTLA-4 还具有免疫调节作用。CD80/CD86 与 CD28 结合,提供正性共刺激信号,可使 T 细胞活化,产生 IFN-γ,从而产生坏死性炎症损伤,CD80/CD86 与 CTLA-4 配对作用,降低 Th1 反应,活化 CD8⁺ T,减少杀伤性免疫反应^[13]。

本研究结果提示,CHB 患者 sCTLA-4、sCD80、sCD86、IFN-γ 显著高于健康对照者(*P* < 0.05),但肝移植后乙型肝炎复发者 IFN-γ 显著低于未复发者(*P* < 0.05),sCTLA-4、sCD86 水平与病毒复制相关,sCD80、IFN-γ 水平与肝脏损伤相关。可能由于 sCTLA-4 升高并不能上调 CTL,相反诱导了免疫耐受,病毒复制增加。2 种 HBV 感染的可溶性因子表达水平的差异提示 CTL 功能存在差异,IFN-γ 水平可以证实。IFN-γ 是一种抗病毒的细胞因子,由 HBV 特异的 CTL 产生,CD8⁺ T 下调可导致 IFN-γ 减少。有研究表明,免疫反应的早期阶段 sCTLA-4 阻断 CD28/B7 下调 T 细胞活化,而在免疫反应过程中,sCTLA-4 阻断 mCTLA-4/B7,上调 T 细胞活化^[14]。本研究结果推测,HBV 感染者存在 Th17/Treg 平衡紊乱,是由于 mCTLA-4 等负性调节分子增加,造成 Th17 减少和 Treg 增加,Treg 诱导免疫耐受致使 HBV 感染持续。肝移植后复发者的 sCTLA-4 和 sCD86 降低造成 mCTLA-4/CD86 相互作用的增加,下调 Th1 反应,活化 CD8⁺ T,减少杀伤反应。上述 2 种情况的 CD28 信号均未起主要作用。免疫抑制剂的长期使用造成肝移植者免疫杀伤功能极大地减弱,共刺激分子介导的信号通路无法正常调节免疫反应,表现为多种因子较 CHB 患者降低。由于本研究移植后乙型肝炎复发者和未复发者均接受钙调磷酸酶抑制剂和丙种球蛋白预防性治疗,因此这些因素是同时影响,结果具有一定的临床意义。

综合上述,HBV 感染存在免疫平衡向负性共刺激分子诱导免疫耐受的方向偏倚,而肝移植患者由于使用免疫抑制剂,细胞免疫功能状态与 CHB 患者存在差异。如果能找到一些途径阻断负性共刺激通路活性,或许能为控制 HBV 感染提供新的防治靶点,同时,负性可溶性共刺激分子 sCTLA-4、sCD80、sCD86、IFN-γ 可作为反映 CHB 感染免疫状态的标志物,但移植后乙型肝炎复发者仅 IFN-γ 可作为反映感染免疫状态的标志物。

参考文献

[1] ANDRIAMANDIMBY S F, OLIVE M M, SHIMAKAWA Y A, et al. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection and infrastructure for its diagnosis in Madagascar: implication for the WHO's elimination strategy[J]. BMC Public Health, 2017, 17(1): 636. (下转第 2535 页)

综上所述, MPP 患儿病情轻重与血清抗体滴度无相关性。急性期检测 CRP、ESR 可作为病情判断的指标, 且 CRP、ESR 越升高患儿病情越严重。

参考文献

- [1] 崔娟, 王佳, 姚慧, 等. 2006—2010 年儿童肺炎支原体感染流行病学分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6): 446-448.
- [2] YANG E, ALTES T, ANUPINDI S A. Early Mycoplasma pneumoniae infection presenting as multiple Pulmonary masses: an unusual presentation in a child[J]. *Pediatr Radiol*, 2008, 38(4): 477-480.
- [3] POLKOWSKA A, HARJUNPAA A, TOIKKANEN S, et al. Increased incidence of Mycoplasma pneumoniae infection in Finland, 2010 — 2011[J]. *Eur Comm Dis Bull*, 2012, 17(5): 8-11.
- [4] 耿凌云, 陈慧中, 黄荣妍. 不同年龄儿童肺炎支原体肺炎的临床特征[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(16): 1255-1257.
- [5] GENDREL D, BISCARDI S, MARC E, et al. Mycoplasma pneumoniae, community-acquired pneumonia and asthma[J]. *Arch Pediatr*, 2005, 12(Suppl): S7-S11.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)(上)[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 745-752.
- [7] 胡亚美, 江载芳. 诸福堂实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民

卫生出版社, 2002.

- [8] 俞珍惜, 刘秀云, 彭芸, 等. 儿童重症肺炎支原体肺炎的临床特点及预后[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(8): 715-719.
- [9] 吴良霞. 肺炎支原体肺炎肺外并发症[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(16): 1210-1213.
- [10] 陈志敏, 赵顺英, 王颖项, 等. 肺炎支原体感染的若干问题[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(2): 84-88.
- [11] MIYASHITA N, KAWAI Y, INAMURA N, et al. Setting a standard for the initiation of steroid therapy in refractory or severe Mycoplasma pneumoniae pneumonia in adolescents and adults[J]. *J Infect Chemother*, 2015, 21(3): 153-160.
- [12] 李美香, 李荣香, 曲政海, 等. 社区获得性肺炎支原体肺炎儿童血清抗体滴度的变化[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(21): 1642-1645.
- [13] 韦勇, 唐建英. 被动凝集法检测肺炎支原体抗体在儿科的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1148-1149.
- [14] 方丽. C 反应蛋白与小儿支原体肺炎病程病情的相互关系[J]. 中国现代医生, 2011, 49(26): 91-92.
- [15] DAXBOECK F, EISL B, BURGHUBER C, et al. Fatal Mycoplasma pneumoniae pneumonia in a previously healthy 18-year-old girl[J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2007, 119(12): 379-384.

(收稿日期: 2018-01-05 修回日期: 2018-03-08)

(上接第 2531 页)

- [2] ZHONG B, HUANG M P, YIN G Q, et al. Effects of co-stimulation on intrahepatic immunopathogenesis in patients with chronic HBV infection[J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(3): 217-229.
- [3] WONGJITRAT C, SUKWIT S, CHUENCHITRA T, et al. CTLA-4 and its ligands on the surface of T- and B-lymphocyte subsets in chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Med Assoc Thai*, 2013, 96(Suppl 1): S54-S59.
- [4] XU W Q, YU J, WONG V W. Mechanism and prediction of HCC development in HBV infection[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3): 291-298.
- [5] BOEIJEN L L, HOOGEVEEN R C, BOONSTRA A, et al. Hepatitis B virus infection and the immune response: the big questions[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3): 265-272.
- [6] LI M H, ZHANG D, ZHANG L, et al. Ratios of T-helper 2 cells to T-helper 1 cells and cytokine levels in patients with hepatitis B[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(15): 1810-1815.
- [7] NOSRATABADI R, ALAVIAN S M, ZARE-BIDAK M, et al. Innate immunity related pathogen recognition receptors and chronic hepatitis B infection[J]. *Mol Immunol*, 2017, 90(11): 64-73.
- [8] 张群, 庞国进, 谌双君, 等. 慢性乙肝患者 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞对外周血树突状细胞成熟的作用[J]. 临床和实验医

学杂志, 2014, 13(8): 601-607.

- [9] CHEN J H, YU Y S, CHEN X H, et al. Enhancement of CTLs induced by DCs loaded with ubiquitinated hepatitis B virus core antigen[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(12): 1319-1327.
- [10] 吕丽君, 汪晓莺, 汤伟, 等. 慢性乙肝患者树突状细胞对 Treg 分化为 Th17 细胞的影响[J]. 现代免疫学, 2011, 31(4): 296-300.
- [11] CAO J U, ZHANG L P, HUANG S F, et al. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4 and CD28 in patients with chronic hepatitis B[J]. *Microb Pathog*, 2011, 51(4): 262-267.
- [12] 汪云, 李红霞, 冯涛, 等. 不同病毒载量慢性乙型肝炎患者树突状细胞 B7-H1 表达及对免疫功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(6): 1029-1032.
- [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] CHEN Z T, 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.

(收稿日期: 2018-03-03 修回日期: 2018-05-06)