

论著·基础研究

HBV 慢性患者外周血单个核细胞 CD28/B7 家族共刺激分子 mRNA 表达及其意义*

王琳, 赵春楠, 史进方, 彭群新, 顾国浩[△]

(苏州大学附属第一医院检验科, 江苏苏州 215006)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)慢性化病变患者外周血单个核细胞共刺激分子 CD28、CTLA-4 及其配体 CD80、CD86 mRNA 的表达及其意义。方法 采用 Taqman 探针实时荧光定量 PCR 方法分别检测 24 例慢性乙型肝炎(CHB 组)、24 例肝硬化(LC 组)、28 例原发性肝癌(HCC 组)和 30 例健康人(对照组)外周血单个核细胞的共刺激分子 CD28、CTLA-4、CD86、CD80 mRNA 的水平。结果 与对照组相比,CD28 mRNA 表达在 CHB 组下降显著($t = -2.11, P < 0.05$);CTLA-4 mRNA 在疾病各组表达均有不同程度的显著下降:CHB 组($t = -2.52, P < 0.05$),LC 组($t = -2.11, P < 0.05$),HCC 组($t = -2.56, P < 0.05$);CD86 mRNA 在疾病各组表达也有不同程度的显著下降:CHB 组($t = -3.68, P < 0.01$),LC 组($t = -2.99, P < 0.01$),HCC 组($t = -4.42, P < 0.01$);CD28/CTLA-4 mRNA 表达在 HCC 组显著升高($t = 2.12, P < 0.05$);CD80/CD86 mRNA 表达随着 HBV 的慢性化进程出现不同程度显著升高:CHB 组($t = 2.10, P < 0.05$),LC 组($t = 2.59, P < 0.05$),HCC 组($t = 3.74, P < 0.01$)。结论 HBV 感染患者 CD28/B7 家族共刺激分子的表达异常与其免疫功能紊乱和慢性化病变发生、发展密切相关。

关键词:肝炎病毒,乙型;白细胞,单核;共刺激分子;聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.02.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)02-0196-04

Expression and significance of CD28/B7 family costimulatory molecules mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with HBV chronic change*

Wang Lin, Zhao Chunnan, Shi Jinfang, Peng Qunxin, Gu Guohao[△]

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: Objective To analyze and evaluate the expression and significance of costimulatory molecules CD28, CTLA-4, CD86, CD80 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of the patients with HBV chronic change. **Methods** The levels of costimulatory molecules CD28, CTLA-4, CD86, CD80 mRNA in peripheral blood mononuclear cells were detected in 24 cases of chronic hepatitis B (CHB), 24 cases of liver cirrhosis (LC), 28 cases of hepatocellular cancer (HCC) and 30 normal control (NC) subjects by real time quantitative PCR. **Results** Compared with the NC group, costimulatory molecule CD28 mRNA level in the CHB group was significantly decreased ($t = -2.11, P < 0.05$); CTLA-4 mRNA level in different diseases groups was decreased to different degrees; the CHB group ($t = -2.52, P < 0.05$), the LC group ($t = -2.11, P < 0.05$) and the HCC group ($t = -2.56, P < 0.05$); CD86 mRNA level in different diseases groups was decreased to different degrees too; the CHB group ($t = -3.68, P < 0.01$), the LC group ($t = -2.99, P < 0.01$) and the HCC group ($t = -4.42, P < 0.01$); CD28/CTLA-4 mRNA level was significantly increased in the HCC group ($t = 2.12, P < 0.05$); CD80/CD86 mRNA level was significantly increased to different degrees with the progress of HBV chronic change; the CHB group ($t = 2.10, P < 0.05$), the LC group ($t = 2.59, P < 0.05$) and the HCC group ($t = 3.74, P < 0.01$). **Conclusion** The expression abnormality of CD28/B7 family costimulatory molecules mRNA in HBV infectious patients may be closely related with the immune dysfunction and the development and progression of the chronic change.

Key words: hepatitis B virus; leukocytes, mononuclear; costimulatory molecules; polymerase chain reaction

我国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)高发区,急性乙型肝炎(ABH)中有 20% 会转为慢性乙型肝炎(CHB),进而可能发展为肝硬化(LC)和肝癌(HCC),我国每年大约有 50 万人死于 HBV 引起的晚期 LC 和 HCC^[1-2]。目前大部分学者认为乙型肝炎患者的肝细胞损伤主要不是 HBV 直接造成的,而是机体对 HBV 表达产物的免疫反应所导致的^[3]。目前乙型肝炎慢性化的主要原因认为是细胞免疫功能紊乱,不能有效清除病毒,其中 T 淋巴细胞起着举足轻重的作用^[4]。CD28/B7 家族是 T 淋巴细胞活化过程中起重要调节作用的共刺激分

子,这些共刺激分子不仅提供 T 细胞分化、增殖、发生效应功能所必需的正向辅助信号,同时也提供限制、下调 T 细胞应答的重要负性调节信号^[5-6],其主要包括 B7-1 (CD80) 和 B7-2 (CD86),与其受体 CD28 组成了第二信号分子。目前,多数学者采用流式细胞技术检测单个核细胞上 CD28/B7 分子的蛋白质表达,本实验采用实时荧光定量 PCR 技术从 mRNA 的表达水平进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 76 例乙型肝炎患者选自 2012 年 8~12 月在

* 基金项目:国家“十二五”科技重大专项子课题资助项目(2012ZX10002-004-008)。 作者简介:王琳(1982-),主管检验师,硕士,主要从事乙肝免疫功能方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: guguohao@yahoo.com.cn。

苏州大学附属第一医院感染科住院,男 51 例,女 25 例;其中 CHB 组 24 例(男 17 例,女 7 例),平均年龄(58.41±2.95)岁;LC 组 24 例(男 14 例,女 10 例),平均年龄(46.30±3.61)岁;HCC 组 28 例(男 20 例,女 8 例),平均年龄(44.13±2.56)岁。诊断符合 2010 年中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会联合修订的“慢性乙型肝炎防治指南”诊断标准^[7]。对照组(NC 组)30 例:本院保健科体检结果健康的人群,男 15 例,女 15 例,平均年龄(44.39±2.45)岁,无肝炎病史、乙型肝炎标志物测定均为阴性。

1.2 试剂和仪器 Gene Amp PCR System9700 扩增仪(美国 ABI 公司),light Cycler Real Time PCR 扩增仪(Roche Diagnostics 公司),Thermo Spectronic 紫外分光光度计(美国 Spectronic),GRP-9160 型隔水式恒温培养箱(上海民仪电子有限公司),eppendorf-centrifuge 5430 台式高速离心机(德国 eppendorf 公司),eppendorf-centrifuge 5430R 低温高速离心机(德国 eppendorf 公司),-80 ℃低温冰箱。

1.3 方法

1.3.1 外周血标本单个核细胞的分离 Ficoll 淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司)3 mL,将稀释好的外周血用一次性滴管吸取后,小心沿管壁缓缓加入淋巴细胞分离液(不要摇晃、震动),水平离心机 2 000 r/min 离心 20 min 后,取出,用一次性滴管吸取中间层云雾状单个核细胞,加入 1.5 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 1.5 min,弃上清液,加入 1 mL 生理盐水,颠倒混匀,10 000 r/min 离心 1.5 min,弃上清液,加入 RNA isoRegent 混匀,-80 ℃低温冰箱保存备用。

1.3.2 总 RNA 的提取 加 200 μL 氯仿,猛烈颠倒 20 次,冰浴 5 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 6 min,转移上清液至 1.5 mL EP 管中,加入异丙醇 500 μL 混匀,冰浴 5 min 后,4 ℃,12 000 r/min 离心 6 min。弃上清液,加 1 000 μL 75%乙醇[0.1%焦

碳酸二乙酯(DEPC)水配制]混匀,4 ℃,12 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,倒置室温干燥。加 20 μL 0.1%DEPC 水溶解。所提取的总 RNA 以 1:50 稀释,用紫外分光光度计检测其在 260、280 nm 处光密度值(OD 值)比值为 1.9,在浓度为 1.5%琼脂糖凝胶的平板上进行电泳,完整性良好。

1.3.3 逆转录 检测提取的总 RNA 的完整性,将 RNA 逆转录为 cDNA,反应体系见表 1。将上述各试剂混匀,于 Gene-Amp PCR System9700 扩增仪上 42 ℃ 60 min,95 ℃ 5 min,4 ℃ 1 min 进行反应,合成的 cDNA 置-80 ℃保存备用。

表 1 逆转录反应体系

试剂种类	用量(μL)
第一链缓冲液(5×)	8
M-MLV 逆转录酶(200 U/μL)	1
RNAsafe(20×)	2
dNTP 混合液(10 mmol/L)	2
Random Octamem(200 U/μL)	2
去 RNA 酶 ddH ₂ O	23
逆 RNA	2
总体积	40

1.3.4 标准品制备 采用本实验室自备的 β-actin 质粒标准品,分别为 3.34×10⁸、3.34×10⁷、3.34×10⁶、3.34×10⁵、3.34×10⁴ copy/mL。

1.3.5 引物与探针设计及合成 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站上搜索 CD28、CTLA-4、CD80、CD86 的序列,引物与探针由上海闪晶生物技术研究所设计及合成。见表 2。

表 2 引物序列和探针序列

目的片段	上游引物	下游引物	探针
CD28	5'-TCCATGTGAAAGGGAACACC-3'	5'-AGCCAGGACTCCACCAACC-3'	5'-CACCAGCACCCAAAAGGGCTTAGAA-3'
CTLA-4	5'-GCATCTCCAGGCAAAGCC-3'	5'-GGTCAACTCATTCGCCATCAT-3'	5'-GCATCTCCAGGCAAAGCC-3'
CD80	5'-TATGGCCCAGTACAAGAACC-3'	5'-CTCGTATGTGCCCTCGTCAG-3'	5'-CGCAGAGCCAGGATCACAATGGAGA-3'
CD86	5'-TTCCATCAGCTTGTCTGTTTCA-3'	5'-CGCGTCTGTGTCAGTTTCCAG-3'	5'-TCCCTGATGTTACGAGCAATATGACCATC-3'
β-actin	5'-ACCGAGCGCGGTACAG-3'	5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	5'-TTCACCACCAGGCCGAGC-3'

表 3 Taqman 探针法反应体系

试剂种类	用量(μL)
realMasterMix(2.5×)	8
正向引物(5 pmol/μL)	1
反向引物(5 pmol/μL)	1
探针(5 pmol/μL)	1
探针增强液(×20)	1
模板	2
ddH ₂ O	6

1.3.6 PCR 将逆转录的 cDNA、质粒标准品、阴性对照及空白对照利用 LightCycler 480 II 扩增仪进行扩增,反应体系见表 3。反应条件为:94 ℃预变性 1 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,68 ℃ 1 min,40 个循环。根据空白对照调整基线,扩增仪自带软件根据标准品浓度形成的扩增曲线计算出每个标本的基因表达量。

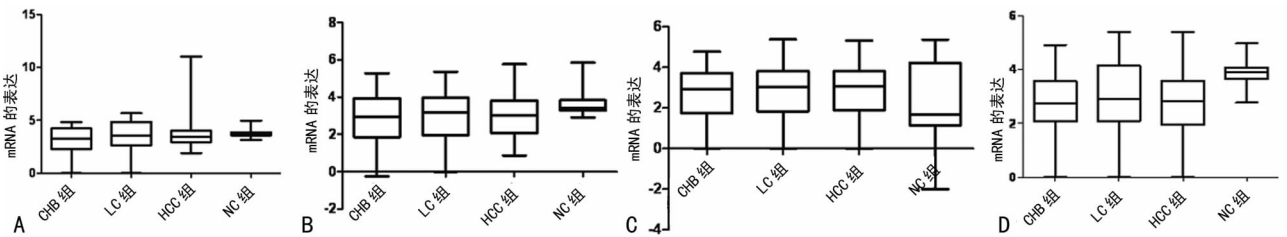
1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,两组样本比较采用独立样本资料的 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

结果显示,与 NC 组相比,CD28 mRNA 表达在 CHB 组下降显著($t = -2.11, P < 0.05$);CTLA-4 mRNA 在疾病各组表

表 4 各组外周血单个核细胞 CD28/B7 家族刺激分子 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD28	CTLA-4	CD80	CD86	CD28/CTLA-4	CD80/CD86
CHB 组	24	3.02±0.30	2.77±0.32	2.69±0.30	2.73±0.29	1.16±0.13	0.93±0.09
LC 组	24	3.53±0.31	2.94±0.31	2.90±0.29	2.94±0.29	1.25±0.11	0.94±0.05
HCC 组	28	3.69±0.31	2.95±0.23	2.86±0.24	2.77±0.23	1.54±0.23	1.04±0.03
NC 组	30	3.76±0.07	3.64±0.13	2.56±0.33	3.86±0.09	1.05±0.02	0.67±0.09



A: CD28; B: CTLA-4; C: CD80; D: CD86。

图 1 各组外周血单个核细胞 CD28/B7 家族共刺激分子 mRNA 的表达(Log copy/mL)

达均有不同程度的显著下降: CHB 组($t = -2.52, P < 0.05$), LC 组($t = -2.11, P < 0.05$), HCC 组($t = -2.56, P < 0.05$); CD86 mRNA 在疾病各组表达也有不同程度的显著下降: CHB 组($t = -3.68, P < 0.01$), LC 组($t = -2.99, P < 0.01$), HCC 组($t = -4.42, P < 0.01$); CD28/CTLA-4 mRNA 表达在 HCC 组升高显著($t = 2.12, P < 0.05$); CD80/CD86 mRNA 表达随着 HBV 的慢性化进程出现不同程度升高: CHB 组($t = 2.10, P < 0.05$), LC 组($t = 2.59, P < 0.05$), HCC 组($t = 3.74, P < 0.01$); CD80 mRNA 表达在疾病各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4、图 1。

3 讨论

乙型肝炎是一种复杂的疾病,其发病机制至今尚未完全阐明,目前认为宿主免疫系统功能紊乱是其病理损伤及发病的主要机制或主要原因^[7-8],在一系列免疫应答中,细胞免疫应答是决定 HBV 感染机体后转归的最重要因素^[1]。T 细胞作为细胞免疫功能的重要组成部分,CD4⁺T 淋巴细胞,主要是辅助型 T 淋巴细胞(Th)和 CD8⁺T 细胞,主要包括细胞毒性 T 细胞(Tc)和抑制性 T 细胞(Ts)组成,Th 细胞受抗原刺激后分化为 Th1 和 Th2 两种类型。Th1 细胞主要分泌白细胞介素(IL)-2、干扰素(IFN)- γ 、IL-12 等细胞因子,促进细胞介导的免疫应答。Th2 细胞主要分泌血清 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等细胞因子,参与抗体介导的免疫应答^[9]。有研究显示 Th1/Th2 细胞功能失衡可能是 HBV 感染慢性化的重要原因^[10],Th1 细胞占优势,倾向于发生急性自限性感染和 HBV 清除;而 Th2 细胞占优势,则倾向于发生持续的慢性 HBV 感染^[11]。

T 细胞的激活需要两个不可或缺的刺激信号:即由 T 细胞受体与抗原提呈细胞提呈的 MHC-抗原多肽复合物相结合所产生的第一信号(识别信号),和由 APC 表面协同刺激分子与 T 细胞表面对应受体分子相结合所产生的第二信号(协同刺激信号/激活信号)^[12]。T 细胞只有同时识别这两个刺激信号,才能活化、增殖并发挥免疫效应;相反,若缺乏识别信号,则为无效刺激;若缺乏激活信号,则 T 细胞不能充分活化,甚至可诱导免疫无反应性或细胞凋亡。共刺激分子中最重要的是 CD28、CTLA-4、CD80、CD86。

实验结果显示,与 NC 组相比,CD28 分子表达下降,尤其是 CHB 下降显著,这与蔡洁等^[13]运用流式细胞术检测 CD28 分子在 CHB 上的表达下降相一致,分析结果可能是 T 细胞不能有效活化,导致特异性杀伤带有致敏抗原靶细胞的作用减弱,不足以清除病毒,病毒能逃避免疫识别而持续存在导致肝脏的慢性病变。乙型肝炎患者不同阶段 CD80 的表达,与 NC 组比较有所升高,但差异无统计学意义,这与刘翠雪等^[14]研究 CHB CD80 蛋白质表达结果基本相似,同时 CD86 的表达出现不同程度的明显下降,这与文献报道有所不同,分析原因可能是文献中运用流式细胞术检测淋巴细胞表面 CD86 蛋白质的表达显著升高,推测 CD86 分子在转录水平与蛋白质水平的表达不同或除淋巴细胞以外的其他单个核细胞 CD80 呈高表达。疾病各组 CD80 与 CD86 比值随着 HBV 慢性化进程出现不同程度的升高,分析原因可能是由于 CD80 是 CTLA-4 的主要配体,CD86 是 CD28 的主要配体^[15],当 CD80 的表达水平较 CD86 高时,CD80-CTLA-4 的作用则较 CD86-CD28 的作用占优势,CTLA-4 分子表达量在乙型肝炎患者体内均明显低于对照组,且与病情有一定的相关性,结果提示乙型肝炎患者的 T 细胞中存在 CTLA-4 分子的表达缺陷,因 CTLA-4 有抑制 Th1/Th2 平衡向 Th2 方向偏移的作用^[16],CTLA-4 分子的表达缺陷则可导致乙型肝炎患者体内 Th1/Th2 平衡向 Th2 方向偏移而呈现 Th2 优势状态,并通过 Th2 细胞因子的过量分泌引起体液免疫异常和肝细胞的病理损害,易发生持续化的慢性病变。

综上所述,从 CHB 进展至 LC、HCC 不同时期患者外周血单个核细胞 CD28/B7 家族共刺激分子 mRNA 表达均有异常表达,结果提示其与免疫功能紊乱和慢性化病变发生、发展密切相关,如能跟踪调查 HBV 感染者从急性感染至慢性化发展的整个动态进程,并将 T 细胞和单核细胞分离后研究共刺激分子 mRNA 的表达,对进一步阐明乙型肝炎的发病机制、疾病的诊断、治疗及预后具有一定意义。

参考文献:

[1] Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus in-

- fection[J]. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2(7): 395-403.
- [2] Sun Z, Ming L, Zhu X, et al. Prevention and control of hepatitis B in China[J]. *J Med Virol*, 2002, 67(3): 447-450.
- [3] Wursthorn K, Wedemeyer H, Manns MP. Managing HBV in patients with impaired immunity[J]. *Gut*, 2010, 59(10): 1430-1445.
- [4] Hu SJ, Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat[J]. *Pain*, 1998, 77(1): 15-23.
- [5] Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy[J]. *Headache*, 2004, 44(1): 35-42.
- [6] Blumenfeld A. Botulinum toxin type A as an effective prophylactic treatment in primary headache disorders[J]. *Headache*, 2003, 43(8): 853-860.
- [7] Bang G, Kim KH, Guarnieri M, et al. Effect of mutating the two cysteines required for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion[J]. *Virology*, 2005, 332(1): 216-224.
- [8] 龙昭华, 朱慧, 苏杭, 等. 乙型肝炎病毒携带孕妇外周血 T 淋巴细胞亚群水平分析[J]. *国际医药卫生导报*, 2009, 15(13): 4-5.
- [9] 毛卫林, 陈瑜. T 细胞亚群对乙型肝炎发病机制的作用[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2007, 34(2): 128-130.
- [10] Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and cross-regulation in hepatitis B virus infection[J]. *J Viral Hepat*, 1997, 4 Suppl 2: 48-59.
- [11] 王媛媛, 韩涛. 慢性乙型肝炎患者的细胞免疫[J]. *武警医学院学报*, 2008, 17(4): 341-343.
- [12] Djukanmic R. The role of co-stimulation in airway inflammation[J]. *Clin Exp Allerg*, 2000, 30 Suppl 1: 46-50.
- [13] 蔡洁, 刘源, 韩亚萍, 等. 慢性乙肝患者外周血淋巴细胞表面 CD28 的表达[J]. *放射免疫学杂志*, 2008, 21(5): 467-468.
- [14] 刘翠雪, 陈群伟, 赵国根, 等. 慢性乙型重型肝炎患者外周血单个核细胞 B7/CD28 分子的表达及意义[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(12): 943-944.
- [15] 蒋敏, 刘冬梅, 史进方, 等. 强直性脊柱炎患者外周血单个核细胞中共刺激分子的表达及其意义[J]. *广东医学*, 2011, 32(22): 2988-2990.
- [16] 周树录, 李幼姬, 叶任高. SLE 患者 Th1/Th2 平衡状态及与外周血淋巴细胞 CD28 及 CTLA-4 分子表达的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(8): 1610-1615.

(收稿日期: 2013-09-05 修回日期: 2013-10-03)

(上接第 195 页)

- 细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(10): 1817-1821.
- [6] He CL, Ji GL, Liu WY, et al. Human bone morphogenetic protein-2 recombinant adenovirus expression vector transfection of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2012, 16(10): 1817-1821.
- [7] Sandhu HS, Kanim LE, Kabo JM, et al. Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 1996, 21(18): 2115-2122.
- [8] Carlo Stella C, Giann MA. Biology and clinical applications of marrow mesenchymal stem cells[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, 53(3): 162-164.
- [9] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(2): 295-303.
- [10] Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 9): 1827-1835.
- [11] Hosoi TB. Bone and collagen related metabolites. Structure and metabolisms of collagen[J]. *Clin Calcium*, 2006, 16(6): 971-977.
- [12] 李建军, 许晓军, 杨军, 等. 骨形态发生蛋白 2 基因转染对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(1): 69-70.
- [13] Li JJ, Xu XJ, Yang J, et al. Effect of bone morphogenetic protein-2 gene transfection on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *J China Med Univ*, 2006, 35(1): 69-71.
- [14] McCullough KA, Waits CA, Garimella R, et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 6, and 7 during induced heterotopic bone formation[J]. *J Orthop Res*, 2007, 25(4): 465-472.
- [15] Zhang Y, Song J, Shi B, et al. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(31): 4635-4642.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-05)