·论　著·

外周血可溶性 CD28 浓度与 Graves 疾病的相关性研究*

孙中文[1,2△]，陶　鸿[1]，孙　静[2]，黄静芳[1]，易丽娴[1]，陈　蕾[3]（1. 江苏省苏州市检验医学生物技术中心重点实验室；2. 苏州卫生职业技术学院医学技术学院，江苏苏州　215009；3. 江苏省苏州市立医院内分泌科　215002）

【摘要】　目的　探讨 Graves 病患者外周血中可溶性 CD28（sCD28）分子浓度与三碘甲状腺原氨酸（FT3）、游离甲状腺素（FT4）、敏感促甲状腺激素（sTSH）和促甲状腺激素受体抗体（TRAb）等实验室参数的相关性，以分析外周血 sCD28 分子水平测定对 Graves 病的临床辅助诊断价值。**方法**　采用双单抗夹心酶联检测法分析 Graves 病患者血液中 sCD28 分子的水平；化学发光免疫法检测血液中甲状腺功能指标 FT3、FT4、sTSH 的浓度；酶联免疫吸附法（ELISA）测定血液中 TRAb 的水平。**结果**　Graves 病患者血液中 sCD28 分子水平［（3.42±0.74）ng/mL］明显高于健康对照组［（0.83±0.29）ng/mL］，比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；患者体内 sCD28 分子的表达水平与 FT3、FT4 和 TRAb 浓度均呈正相关关系（$P<0.01$），r 分别为 0.786、0.746 和 0.734，但 sCD28 分子浓度与血清 sTSH 表达呈显著负相关（$P<0.01$），r 为 −0.719；外周血液中 sCD28 分子与 Graves 病患者甲状腺的肿大程度（$P<0.05$）和突眼症（$P<0.01$）均具有显著的正相关关系。**结论**　sCD28 分子参与了 Graves 病发生发展的病理过程，与 FT3、FT4、sTSH 和 TRAb 均具有较好的相关性，可作为 Graves 病临床辅助诊断和疗效评估的重要生物学参数。

【关键词】　毒性弥漫性甲状腺肿；　可溶性 CD28 分子；　相关性

DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.004　**文献标志码：**A　**文章编号：**1672-9455(2014)23-3240-03

Correlation analysis between plasma soluble CD28 level and Graves′ disease*

SUN Zhong-wen[1,2,△], *TAO Hong*[1], *SUN Jing*[2], *HUNG Jing-fang*[1], *YI Li-xian*[1], *CHEN Lei*[3] (1. *Key Laboratory of Lab Medicine and Biotechnology in Suzhou, Suzhou, Jiangsu* 215009, *China*; 2. *Department of Lab Medicine, Suzhou Health College, Suzhou, Jiangsu* 215009, *China*; 3. *Department of Endocrinology, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu* 215002, *China*)

【Abstract】　Objective　To explore the correlation between plasma soluble CD28 (sCD28) level and laboratory parameters, including free triiodothyronine (FT3), free thyroxine (FT4), sensitive thyroid stimulating hormone (sTSH) and thyroid stimulating hormone receptor antibody (TRAb), and analyze diagnostic value of plasma sCD28 level for Graves′ disease. **Methods**　The double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect sCD28, the chemiluminescence assay was used to detect serum FT3, FT4 and sTSH levels, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum TRAb level. **Results**　The level of sCD28 in patients with Graves′ disease［(3.42±0.74) ng/mL］were obviously higher than that in healthy subjects［(0.83±0.29) ng/L］, with significant difference ($P<0.01$). There were significant positive correlation between the serum sCD28 level and FT3, FT4 and TRAb levels ($P<0.01$), and the correlation coefficients were 0.786, 0.746 and 0.734. The serum sCD28 level was significantly and negatively correlated with sTSH level ($P<0.01$). And there were significant positive correlation between sCD28 level and the degrees of struma ($P<0.05$), exophthalmia ($P<0.01$). **Conclusion**　sCD28 might be involved in the pathological process of the occurrence and development of Graves′ disease; and FT3, FT4, sTSH and TRAb, which were correlated with sCD28, could be significant parameters in diagnosis and curative effect evaluation of Graves′ disease.

【Key words】　Graves′ disease;　soluble CD28;　correlation

毒性弥漫性甲状腺肿又称 Graves 病，是甲状腺功能亢进（简称甲亢）中最常见的类型，也是一种伴甲状腺激素分泌增多的器官特异性自身免疫性疾病[1-2]。研究认为，其免疫致病机制与自身反应性 T 细胞的活化及相关共刺激分子的免疫调节有关。有文献报道，共刺激分子 CD28 与其配体相互作用参与了类风湿性关节炎和实验性自身脑脊髓膜炎等自身免疫性疾病的病理过程。在各种慢性炎症状态下，如多发性硬化症、不稳定性心绞痛、类风湿性关节炎、肉芽肿性血管炎（Wegener 肉芽肿病）和强直性脊柱炎等患者的外周血中均有异常 $CD4^+CD28^-$ T 细胞的高频存在[3-5]。但 Graves 病患者血液中 $CD4^+$ T 细胞表面 CD28 分子及血液中可溶性 CD28（sCD28）分子的表达变化及生物学意义，至今仍不清楚。本文在成功建立双单抗夹心酶联法检测生物样本中 sCD28 分子的基础上，对 Graves 病患者血液中 sCD28 水平及游离三碘甲状腺原氨酸（FT3）、游离甲状腺素（FT4）、敏感促甲状腺激素（sTSH）和促甲状腺激素受体抗体（TRAb）的表达水平进行测定，以探讨

*　**基金项目：**国家自然科学基金资助项目（31100626）；江苏省卫生职业技术教育研究立项资助（J201101）。

作者简介：孙中文，男，博士，副教授，主要从事自身免疫性疾病方面研究。　△　**通讯作者**，E-mail：zhwsun@szhct.edu.cn。

sCD28 分子对 Graves 病的临床辅助诊断价值，并为疾病治疗过程中的疗效评估提供有价值的生物学参数。

1　资料与方法

1.1　一般资料　苏州市市立医院本部提供的确诊 Graves 病患者血液标本 83 例，其中男 21 例、女 62 例，年龄 27～52 岁。Graves 病诊断标准：高代谢症候群，触诊和 B 超检查证实有弥漫性甲状腺肿，伴或不伴突眼，高甲状腺素血症，促甲状腺激素受体抗体阳性或核素扫描显示甲状腺吸碘率弥漫性增强。苏州市中心血站提供健康人血液标本 55 份作为健康对照组，其中男 23 例、女 32 例，年龄 21～48 岁。所有研究对象均排除合并其他自身免疫性疾病、肺部疾患、肿瘤和感染性疾病等。

1.2　仪器和试剂　sCD28 检测试剂盒（本科室自行研制）；G 蛋白（Protein G）免疫亲和层析柱（瑞典 Pharmacia 公司）；重组人 CD28 蛋白（rhCD28/Fc 重组蛋白）（美国 R&D 公司）；琥珀酰羟基生物素（美国 Sigma 公司）；辣根过氧化物酶标记链霉亲和素（streptavidin-HRP）（瑞士 Roche 公司）；avidin-PE（法国 Immunotech 公司）；酶标测定板（8×12 孔，美国 Costar 公司）；酶标测定仪（美国 Bio-Rad 公司）；TMB 底物（英国 KPL 公司）；人促甲状腺激素（hTSH）试剂盒（美国 Biological 公司）；甲状腺功能 FT3、FT4、TSH 检测试剂盒（德国 Bayer 公司）和 TRAb 酶联检测试剂盒（美国 Diagnostic 公司）。

1.3　方法

1.3.1　sCD28 分子水平检测　sCD28 检测试剂盒由本科室自行研制[6]。具体方法是取预先包被 CD28 抗体的酶联检测板，反应孔内加入 Graves 病患者、健康人待测血浆及标准品各 100 μL，37 ℃水浴反应 2 h；充分洗涤后，加入标记抗体 CD28-Biotin，再于 37 ℃水浴反应 1 h 后，充分洗涤，加入 Streptavidin-HRP，反应洗涤后，加入临时配制的底物三甲基硼（TMB）；室温反应 15 min 后，用 2 mol/L H_2SO_4 终止酶与底物的反应，使用 450 nm 波长于全自动酶标仪测定 A 值。每个样本设置 3 个复孔，同时用 rhCD28/Fc 重组蛋白标准品制作线性标准曲线，以分析 Graves 病患者血浆中 sCD28 水平。

1.3.2　甲状腺功能测定　酶联免疫吸附法（ELISA）检测血液标本中 TRAb 浓度，全自动化学发光免疫分析法测定血液中 FT3、FT4、sTSH 水平，上述实验室指标的测定均按照试剂盒说明书进行。

1.4　统计学处理　SPSS10.0 统计学软件进行数据处理；计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间样本均数比较采用 t 检验，各实验室指标间的相关性进行 Pearson 相关分析，采用 Kruskal-Wallis 检验进行非参数组间比较，以 $\alpha=0.05$ 为检验水准，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　两组血液中 sCD28 分子水平分析　健康对照组血液中 sCD28 水平为（0.83±0.29）ng/mL，Graves 病患者为（3.42±0.74）ng/mL，明显高于健康对照组，比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；并发现具有甲状腺肿大、眼球突出等伴随症状的个别患者体内 sCD28 浓度超过 5 ng/mL。见图 1。

2.2　Graves 病患者血液中 sCD28 与 FT3、FT4、sTSH 和 TRAb 水平的相关性分析　患者体内 sCD28 浓度与疾病诊断的重要临床实验室指标的相关性分析表明，患者体内 sCD28 水平与 FT3、FT4 和 TRAb 均呈正相关（$P<0.01$），r 分别为 0.786、0.746 和 0.734；sCD28 浓度与血清 sTSH 呈显著负相关（$P<0.01$），$r=-0.719$。见图 2。

2.3　sCD28 浓度与临床体征呈正相关　为了进一步了解外周血 sCD28 与病情的相关性，患者按其甲状腺肿大的程度和突眼症存在与否进行分组，采用非参数 Kruskal-Wallis 检验进行组间比较。结果提示，外周血液中 sCD28 与 Graves 病患者的两大主要体征，甲状腺的肿大程度（$P<0.05$）和突眼症（$P<0.01$）均具有显著的正相关，提示 sCD28 与疾病的严重程度呈明显正相关。

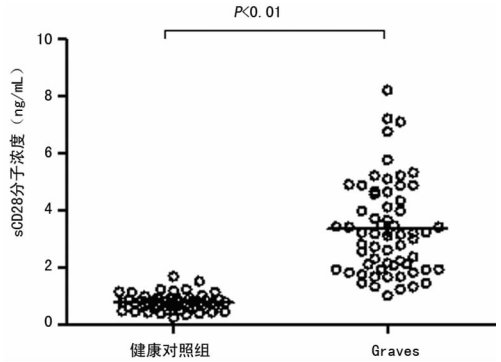

图 1　Graves 病患者血液中 sCD28 分子浓度测定

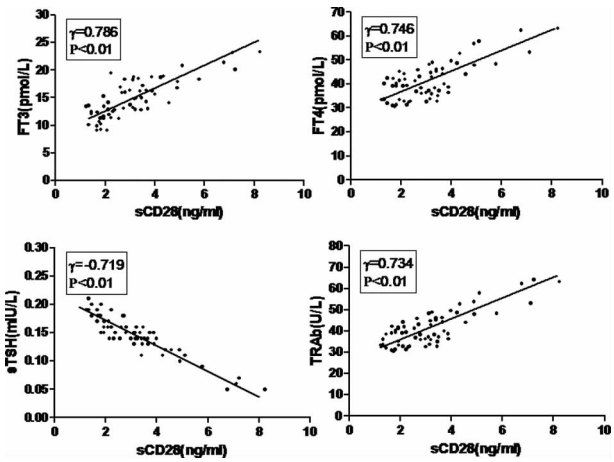

图 2　Graves 病患者血液中 sCD28 与甲状腺功能指标的相关性分析

3　讨　　论

近年来研究发现，共刺激分子在体内有膜型和可溶性两种存在形式，膜型共刺激分子在免疫应答的启动、调节和效应产生等方面发挥重要作用，也参与了临床上肿瘤、自身免疫性疾病、超敏反应和器官移植等疾病的病理过程，但共刺激分子可溶性形式的有关研究相对较少[7-8]。sCD28 分子在系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎患者体内水平异常升高，但 Graves 病患者血液中 sCD28 表达水平仍不清楚[9]。本文在自行成功研制 sCD28 检测试剂盒的基础上，对器官特异性自身免疫性疾病 Graves 病患者体内 sCD28 水平进行了分析，结果提示，Graves 病患者血液中 sCD28 水平[（3.42±0.74）ng/mL]明显高于健康对照组[（0.83±0.29）ng/mL]，并与甲状腺肿大和突眼等临床体征有明显相关性，表明 sCD28 分子参与了 Graves 病发生发展的病理过程，并与疾病的严重程度密切相关。有文献报道，系统性红斑狼疮患者血液中 sCD28 分子的表达水平与系统性红斑狼疮的活动度和疾病的严重程度密切相关，随疾病的严重程度呈现进行性增高，与本文结果基本一致[10]。

Graves 病临床诊断的主要实验室参数分别是血液中 FT3、FT4、sTSH 和 TRAb，Graves 病患者体内 FT3、FT4、sTSH 和 TRAb 浓度明显高于正常参考值。本文通过对 Graves 病患者血液 sCD28 分子水平测定，经 Pearson 相关性分

析表明，患者体内 sCD28 分子浓度与 FT3、FT4 和 TRAb 均呈正相关关系，r 分别为 0.786、0.746 和 0.734，但患者血液 sCD28 水平却与血清 sTSH 呈显著负相关，r 为 −0.719。初步实验表明，对 Graves 病患者血液 sCD28 及 TRAb 联合检测，对提高 Graves 病诊断的准确率，明显优于单独检测，但尚需扩大样本量后再进行统计分析比较。由此可知，患者血液中 sCD28 的浓度是诊断 Graves 病的重要生物学参数，对 Graves 病的临床辅助诊断和疗效评估具有重要的临床价值。文献报道，哮喘患者体内 sCD28 分子浓度与趋化因子 RANTES 血浆浓度、血清 IgE 总浓度均呈正相关，而与膜型 CTLA-4 和膜型 CD28 阳性百分率呈负相关；在活动性和非活动性系统性红斑狼疮患者体内 sCD28 浓度与可溶性 CTLA-4、CD86 的血浆浓度均呈正相关[11]。因此，sCD28 分子参与了 Graves 病、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病和哮喘病的病理过程，但 sCD28 参与自身免疫性疾病和过敏反应的免疫病理机制，值得进一步深入探讨。

综上所述，Graves 病患者外周血中 sCD28 水平异常增高，并与患者血液中 FT3、FT4 和 TRAb 浓度呈正相关。因此，sCD28 水平测定将为临床诊断 Graves 病提供又一个有价值的实验室参数，也将为 Graves 病的治疗、预后判断及寻找新的免疫干预手段提供实验依据和理论基础。

参考文献

[1] Laurberg P，Nygaard B，Andersen S，et al. Association between TSH-Receptor autoimmunity，hyperthyroidism，goitre，and orbitopathy in 208 patients included in the remission induction and sustenance in graves′ disease Study[J]. J Thyroid Res，2014：165487.

[2] Zuhur SS，Ozel A，Kuzu I，et al. The diagnostic utility of color doppler ultrasonography，Tc-99m pertechnetate uptake，and TSH-Receptor antibody for differential diagnosis of graves′ disease and silent thyroiditis：a comparative study[J]. Endocr Pract，2014，20(4)：310-319.

[3] Pinto-Medel MJ，García-León JA，Oliver-Martos B，et al. The CD4+ T-cell subset lacking expression of the CD28 costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis[J]. J Neuroimmunol，2012，243(1/2)：1-11.

[4] Link A，Selejan S，Hewera L，et al. Rosuvastatin induces apoptosis in CD4(+)CD28 (null) T cells in patients with acute coronary syndromes[J]. Clin Res Cardiol，2011，100(2)：147-158.

[5] Shi B，Du X，Wang Q，et al. Increased PD-1 on CD4(+)CD28(-) T cell and soluble PD-1 ligand-1 in patients with T2DM：association with atherosclerotic macrovascular diseases[J]. Metabolism，2013，62(6)：778-785.

[6] 孙中文，邱玉华，马泓兵，等. 可溶性人细胞分化抗原 28 分子酶联免疫试剂盒的研制及应用[J]. 中华检验医学杂志，2006，29(6)：518-521.

[7] Wang H，Wang K，Zhong X，et al. Plasma sCD28，sCTLA-4 levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse[J]. J Neuroimmunol，2012，243(1/2)：52-55.

[8] Wk IK，Wong CK，Leung TF，et al. Elevation of plasma soluble T cell costimulatory molecules CTLA-4，CD28 and CD80 in children with allergic asthma[J]. Int Arch Allergy Immunol，2005，137(1)：45-52.

[9] Sakthivel P，Shively V，Kakoulidou M，et al. The soluble forms of CD28，CD86 and CTLA-4 constitute possible immunological markers in patients with abdominal aortic aneurysm[J]. J Intern Med，2007，261(4)：399-407.

[10] Wong CK，Lit LC，Tam LS，et al. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4，CD28，CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology (Oxford)，2005，44(8)：989-994.

[11] Wong CK，Lun SW，Ko FW，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.

（收稿日期：2014-04-20　　修回日期：2014-08-12）

（上接第 3239 页）

实验医学杂志，2011，10(13)：1022-1023.

[2] 鲁鸿昊，高静，董振南，等. 终点法测定缺血修饰清蛋白(IMA)的评价及其应用研究[J]. 标记免疫分析与临床，2012，19(1)：44-46.

[3] 陈志晓，王前，郑磊，等. 改良缺血修饰清蛋白测定方法(清蛋白-钴结合试验)的建立[J]. 检验医学，2010，25(5)：372-375.

[4] 黄湘宁，郑春苏. Roche cobas e411 全自动化学发光分析仪性能评价[J]. 检验医学与临床，2011，8(16)：2028-2029.

[5] 蔡会欣，曹永献，曹辉彩. 缺血修饰清蛋白 IMA 检测方法的建立及评价[J]. 医学研究与教育，2009，26(4)：20-21.

[6] 张明艳，陈玉敏，崔玉英，等. 缺血修饰清蛋白的检测与临床意义[J]. 河北职工医学院学报，2008，25(1)：67-69.

[7] 郭宗强，王晓菲. 缺血修饰清蛋白诊断急性心肌缺血价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2010，4(5)：511-513.

[8] 王凡，蒋红君. 罗氏 2010 免疫分析仪检测甲胎蛋白的性能验证[J]. 现代预防医学，2012，39(15)：3911-3914.

[9] 张佳. 缺血修饰蛋白与重度子痫前期及其新生儿早期神经系统损伤的相关性研究[D]. 石家庄：河北医科大学，2013.

[10] Gaze DC，Crompton L，Collinson P. Ischemia-modified albumin concentrations should be interpreted with caution in patients with low serum albumin concentrations[J]. Med Princ Pract，2006，15(4)：322-324.

[11] Aylin Hakligör，Arzu Kösem，Mehmet Şeneş，et al. Effect of albumin concentration and serum matrix on ischemia-modified albumin[J]. Clin Biochem，2010，43(3)：345-348.

[12] 肖柯. 缺血修饰蛋白联合半小时内心电图变化对 ACS 早期鉴别诊断价值[D]. 衡阳：南华大学，2012.

（收稿日期：2014-02-19　　修回日期：2014-07-12）