

# CD40 表达及其配体血清水平的动态变化对慢加急性肝衰竭预后的评估价值

郑玉宝 谢仕斌 谢冬英 林炳亮 赵志新 崇雨田 高志良

**【摘要】 目的** 研究慢加急性肝衰竭(ACLF)不同病程 CD40L 血清水平以及外周血单个核细胞(PBMCs) CD40 表达的动态变化,旨在探讨 CD40L 血清水平及单核细胞上 CD40 的表达对慢加急性肝衰竭病情的预测价值。**方法** 采用流式细胞术(FACS)分别对慢加急性肝衰竭早期(ACLF-E)和晚期(ACLF-L)组(25例)、慢性乙型肝炎(CHB)组(28例)、肝炎肝硬化(LC)组(13例)及健康对照(HC)组(20例)的PBMCs上CD40的表达进行检测,同时血清中可溶CD40L(即sCD154)的水平采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定。**结果** 与HC组比较,CHB组、LC组、ACLF-E组及ACLF-L组PBMCs的CD40表达水平呈逐渐增加趋势,ACLF-E组增加尤其明显;ACLF-E组中血清可溶性CD40L浓度也明显高于HC组、CHB组、LC组及ACLF-L组;ACLF死亡组病程早期与晚期CD40及CD40L表达的水平均高于存活组。**结论** 血清CD40L浓度及CD40表达与ACLF病情及预后密切相关,血清CD40L水平及PBMC上CD40表达水平可以作为ACLF病情评估和预后判断的重要标志之一。

**【关键词】** 慢加急性肝衰竭;血清CD40L水平;CD40表达;预后评估

**Prognosticating value of altered serum-soluble CD40L level and CD40 expression on monocytes in acute-on-chronic liver failure** ZHENG Yu-bao, XIE Shi-bin, XIE Dong-ying, LIN Bing-liang, ZHAO Zhi-xin, CHONG Yu-tian, GAO Zhi-liang. Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: GAO Zhi-liang, Email: gaozl@21cn.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the altered states of CD40 expression on monocytes and serum-soluble CD40L levels in different stages of patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF) and their clinical prognosticating value in patients with ACLF. **Methods** Patients with ACLF ( $n = 25$ ), chronic hepatitis B (CHB) ( $n = 28$ ), liver cirrhosis (LC) ( $n = 13$ ) and healthy controls (HC) ( $n = 20$ ) were

基金项目:广东省科技计划项目(2006B36005004);“十一五”科技重大专项分题(2008ZX10202)

作者单位:510630 广州市,中山大学附属第三医院感染科

通讯作者:高志良,Email:gaozl@21cn.com

studied and CD40 expression on monocytes were detected by fluorescence activated cell sorting (FACS). Serum-soluble CD40L was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with healthy controls, the levels of CD40 expression on monocytes in patients with chronic hepatitis B, liver cirrhosis and ACLF were gradually increased, especially in the early stage of ACLF. The concentration of serum-soluble CD40L level in ACLF early-stage was significantly higher than HC, CHB and LC and ACLF late-stage. CD40 expression and serum-soluble CD40L level in dead patients were significantly higher than those survived in early and late stages of ACLF. **Conclusions** An altered level of serumr-soluble CD40L and CD40 expression might be closely related to the severity of ACLF and may be valuable prognostic markers for survival in patients with ACLF.

**【Key words】** Acute-on-chronic liver failure; Serum-soluble CD40L level; CD40 expression; Prognostic evaluation

目前,我国慢性乙型肝炎患者约 2800 万;每年因慢加急性肝衰竭、肝细胞癌和终末期肝硬化导致死亡的患者约 50 万<sup>[1,2]</sup>,其中慢加急性肝衰竭(ACLF)具有较高的病死率<sup>[3]</sup>,成为我国肝病死亡的主要原因之一。ACLF 发病主要是在慢性肝病基础上,并发严重细菌感染、重叠其他肝炎病毒感染、酒精、肝细胞毒性药物或躯体心理创伤等诱因而发病<sup>[4]</sup>。ACLF 发病的分子机制尚未完全探明,然而肝脏内的过激免疫炎性反应被认为是肝衰竭发病的重要机制之一<sup>[5]</sup>;研究表明在肝衰竭早期肝脏局部的免疫细胞分子表达上调,主要有 CD40-CD40L 的相互作用,通过增加抗原递呈<sup>[6]</sup>和促进 B 细胞表面共刺激分子 CD80/CD86 的过表达来激活 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等免疫细胞<sup>[7]</sup>;动物实验表明 CD40-CD40L 相互作用是肝衰竭中免疫炎性反应的关键启动因素之一<sup>[8]</sup>;虽然 CD40L 和 CD40 在肝衰竭中已研究多年,但其在 ACLF 不同病程的动态变化及对预后的评估价值尚无研究;本研究拟观察 CD40L 血清浓度及 CD40 表达水平在 ACLF 发病不同时相的动态变化,旨在探明 CD40L 血清水平及单核细胞上 CD40 的表达对 ACLF 病情的预测价值。

## 资料与方法

### 一、研究对象

在患者知情同意下收集外周血样本,患者均为 2007 年 5 月~2008 年 9 月中山大学附属第三医院感染科住院者,其中包括 ACLF 患者(25 例)、慢性乙型肝炎患者(28 例)和肝炎肝硬化患者(13 例)及来自本院体检中心健康对照(20 例),研究对象的一般临床特征见表 1。

表1 研究对象的一般临床特征

分组	男/女	平均年龄( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	ALT( $\bar{x} \pm s$ , U/L)	HBV DNA ( $\bar{x} \pm s$ , log <sub>10</sub> 拷贝/ml)	PT( $\bar{x} \pm s$ , s)	ALB( $\bar{x} \pm s$ , g/L)	TBil( $\bar{x} \pm s$ , μmol/L)
ACLF	17/8	43 ± 11	396 ± 217	5.1 ± 2.2	22.9 ± 8.3	29.5 ± 5.4	417.5 ± 156.4
CHB	22/6	39 ± 6	264 ± 118	6.0 ± 2.6	83.3 ± 9.1	39.4 ± 6.3	117.7 ± 58.9
LC	10/3	47 ± 14	146 ± 74	3.7 ± 1.5	54.2 ± 12.7	29.7 ± 5.2	36.3 ± 19.3
HC	16/4	33 ± 8	28 ± 9	N. T	N. T	N. T	N. T

注: ALT:丙氨酸氨基转移酶;ALB:白蛋白;PT:凝血酶时间;TBil:总胆红素;N. T:未检测

慢性乙型肝炎和肝炎肝硬化诊断标准根据2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会制定的“病毒性肝炎防治方案”<sup>[9]</sup>;ACLF诊断标准根据2006年中华医学会感染病学分会、肝病学分会的肝衰竭诊疗指南<sup>[10]</sup>。根据诊疗指南,ACLF晚期诊断的标准为:肝衰竭基础上出现Ⅱ度以上肝性脑病或出血/腹水均诊断为ACLF晚期。研究对象的排除标准:近6个月内有抗病毒或免疫调节治疗及合并有甲型、丙型、丁型、戊型肝炎病毒及HIV病毒感染的均被排除。

本研究已得到中山大学伦理委员会的批准。

## 二、外周血单个核细胞(PBMC)的分离

PBMC分离于肝素抗凝的外周血,分离液为Percoll分离液(购自Sigma公司),具体方法见文献<sup>[11]</sup>;分离出的PBMC用无菌的磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液,pH 7.2,浓度10 mmol/L)洗涤两次,重悬于RPMI-1640培养液+10%胎牛血清(BSA)(购自Invitrogen)中培养2~3 d备用。

## 三、PBMC上CD40表达检测

单核细胞上CD40表达用流式细胞仪(FACS Calibur,美国BD biosciences公司)检测;具体步骤为:收集至少 $2 \times 10^5$ 个单核细胞,重悬于0.1 ml包含1% BSA的PBS中;用相应的荧光染料异硫氰酸荧光素标记FITC-CD40抗体(鼠-抗人单克隆抗体,1:100稀释,购自美国Santa Cruz公司)室温孵育30 min;离心(1000 r/min,5 min)洗涤后,重悬于500 μl PBS液,振荡,流式细胞仪检测并分析。

## 四、血清CD40L水平的检测

血清中CD40L(sCD154)浓度检测采用定量人CD40L ELISA检测试剂盒(美国Biosource公司);具体操作方法根据说明书,血清CD40L浓度检测敏感度在4 pg/ml,吸光度在450 nm波长。

## 五、统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果用SPSS 16.0统计软件进行分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),配对资料采用 $t$ 检验; $P < 0.05$ 有统计学意义。

# 结 果

## 一、外周血单个核细胞CD40的表达

与HC组[(5.3 ± 1.9)%]相比,CHB组PBMCs CD40表达水平增高[(28.9 ± 9.3)%]( $P < 0.05$ );LC组、ACLF-L及ACLF-E组中PBMCs的CD40表

达水平较 HC 组亦增高[(分别为 $(32.5 \pm 6.7)\%$ 、 $(45.8 \pm 9.9)\%$ 和 $(67.3 \pm 16.2)\%$ ],且呈逐渐增加趋势( $P$ 均 $<0.01$ ), ACLF-E 组增加尤其明显(如图 1a); ACLF 死亡组病程早期和晚期的 CD40 表达水平[分别为 $(72.2 \pm 12.1)\%$ 和 $(59.8 \pm 10.5)\%$ ]均高于存活组早期和晚期[分别为 $(58.2 \pm 11.9)\%$ 和 $(40.7 \pm 9.8)\%$ ]( $P$ 均 $<0.05$ )(见图 1b)。ACLF 组、CHB 组及 LC 组患者 PBMCs 的 CD40 表达水平均高于健康对照组;而且在 ACLF 组中早期 CD40 表达水平也是高于晚期的,这提示 ACLF 病程早期免疫反应是过激的,并且 CD40L 表达对 ACLF 病情严重程度是有预测作用的。

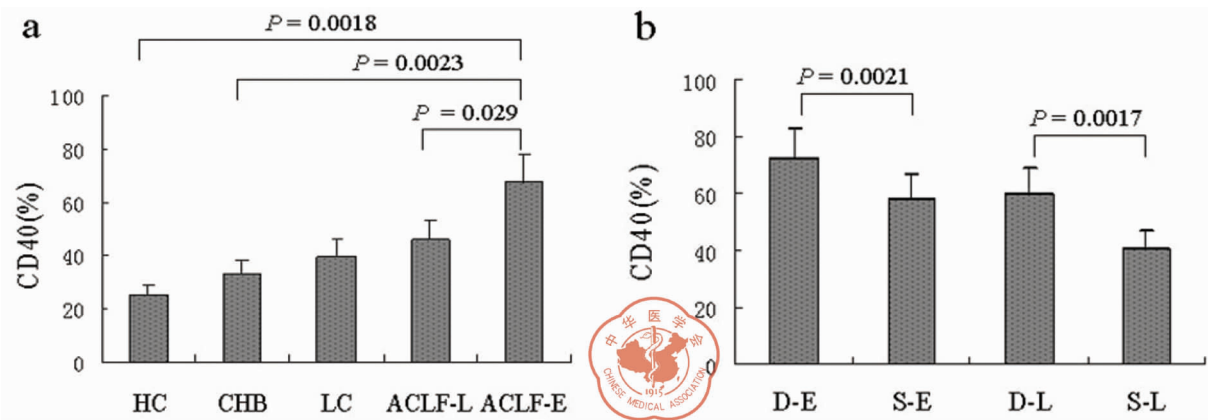


图1 单核细胞上 CD40 表达率比较

注: D-E:慢加急性肝衰竭死亡组-早期; S-E:慢加急性肝衰竭存活组-早期; D-L:慢加急性肝衰竭死亡组-晚期; S-L:慢加急性肝衰竭存活组-晚期

## 二、血清可溶性 CD40L 水平

ACLF-E 组( $2464.9 \pm 374.5$  pg/ml)的血清可溶性 CD40L 浓度明显高于 HC 组、CHB 组、LC 组(分别为 $1254.2 \pm 174.6$  pg/ml、 $1434.5 \pm 273.9$  pg/ml 和 $1721.4 \pm 284.3$  pg/m,  $P$ 均 $<0.01$ )以及 ACLF-L 组( $1989.5 \pm 297.7$  pg/ml,  $P < 0.05$ )(见图 2a);但 CHB 组与 ACLF-L 组差异无统计学意义;同样, ACLF 死亡组病程早期血清 CD40L 水平高于存活组早期(分别为 $2798.9 \pm 395.5$  pg/ml 和 $2215.3 \pm 331.8$  pg/ml,  $P < 0.01$ ); ACLF 死亡组病程晚期的血清 CD40L 水平高于存活组晚期(分别为 $2178.5 \pm 232.5$  pg/ml 和 $1836.7 \pm 208.6$  pg/ml,  $P < 0.05$ )(见图 2b)。与 PBMCs CD40 表达相对应的血清可溶性 CD40L 浓度在 ACLF-E 组明显高于其他各组,这提示血清 CD40L 在对肝病病情严重程度评估中具有一定的参考价值。

## 讨 论

本研究显示 ACLF 早期患者血清中 CD40L 水平和 PBMC 表面 CD40 表达率明显高于健康对照和慢性乙型肝炎及肝硬化组,尤其在 ACLF 死亡患者的早期和晚期均分别高于其存活组;即 ACLF 病例中血清 CD40L 水平和单核细胞 CD40 的

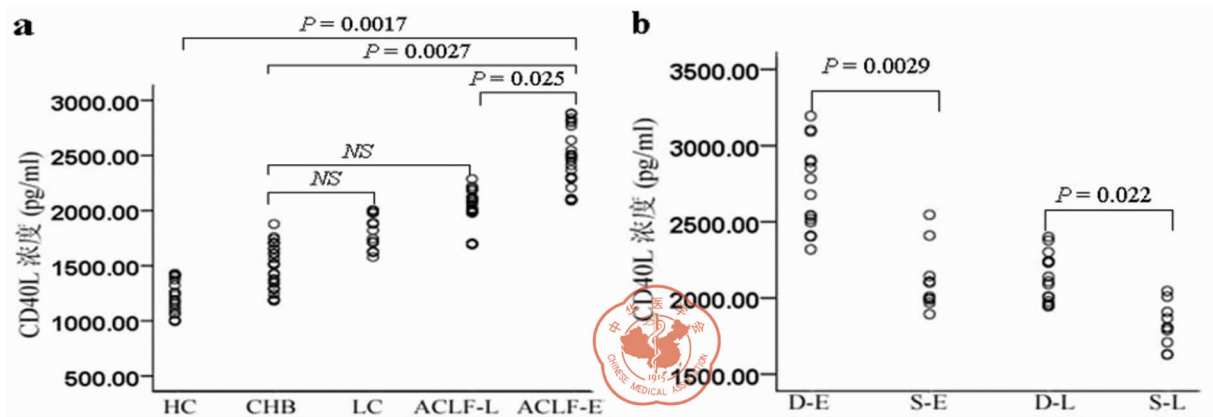


图2 血清可溶性 CD40L 水平变化

注:D-E:慢加急性肝衰竭死亡组-早期;S-E:慢加急性肝衰竭存活组-早期;D-L:慢加急性肝衰竭死亡组-晚期;S-L:慢加急性肝衰竭存活组-晚期;NS:无统计学意义

表达与其病情严重程度是密切相关的;这也支持了血清 CD40L 水平和单核细胞 CD40 的表达可为 ACLF 的预后提供预测价值的假说。

ACLF 发病是在慢性乙型肝炎基础上,可重叠其他嗜肝病毒感染、乙型肝炎病毒本身复制水平增加、使用肝损害与细胞毒药物、免疫抑制剂和糖皮质激素或者核苷(酸)类似物等抗病毒药物的不恰当停药等因素而使肝脏发生大块或亚大块坏死出现慢加急性肝衰竭<sup>[12]</sup>;但最终的病理机制仍是启动过激的免疫炎症反应,导致肝细胞大量坏死,超过肝细胞自身再生能力而出现肝功能衰竭<sup>[13]</sup>。过表达 CD40 基因的小鼠模型实验显示,CD40-CD40L 相互作用在暴发型肝衰竭发展中发挥关键作用<sup>[8]</sup>。另有研究提示 CD40 与 CD40L 的相互作用是启动细胞免疫的共刺激调节通路上关键的分子之一,而且在各种肝衰竭诱因的启动下导致肝细胞和 Kupffer 细胞 CD40 表达增加,最终导致大量肝脏细胞凋亡和坏死<sup>[3]</sup>。Mayo 等<sup>[14]</sup>还报道 CD40-CD40L 信号通路参与慢性肝病中免疫球蛋白的产生,从而证明 CD40 在慢性肝病发病机制中亦起着重要作用。最近实验显示<sup>[15]</sup>在体外共培养人源肝脏巨噬细胞与胆管上皮细胞可以诱导 CD40 依赖凋亡通路以及炎症细胞因子的分泌,提示 CD40 在胆管疾病发生发展中也有重要作用。有研究还发现<sup>[16]</sup>,利用 C4b 结合蛋白片段结合 CD40L 可以阻止 CD40 介导的胆管细胞凋亡坏死,也为将来肝病分子靶向治疗提供新的方向;这些都支持本研究结果,即单核细胞 CD40 表达及血清中 CD40L 水平动态变化与 ACLF 的病情密切相关,对其预后的判断具有重要指导意义。

本实验显示单核细胞 CD40 表达及血清中 CD40L 浓度在 ACLF 不同病程呈动态变化,在 ACLF 早期明显高于晚期,表明此时的 CD40L 和 CD40 表达是增强的,为过激免疫炎症反应的启动阶段。研究结果显示 ACLF 死亡组 CD40 参与的免疫炎症反应均较激烈,死亡组晚期过激免疫炎症反应没有明显下调而继续攻击肝脏细胞,最终导致病情恶化甚至死亡的结局;表明了 ACLF 早期和晚期的单核细胞 CD40 表达及血清中 CD40L 水平对 ACLF 预后的判定均有重要价值。有

学者研究发现<sup>[17]</sup>可溶性 CD40 在肝病患者血清中表达高于正常对照,在慢性肝炎患者血清中有一定升高,与本实验部分结果是相似的;但本实验是在 ACLF 发病不同时期来研究体内免疫炎性反应动态变化。近来有学者研究发现<sup>[4,20]</sup> CHB 患者发展到 ACLF 以及 ACLF 病程不同时期体内的免疫状态呈现动态变化,而这种变化标志着肝病病情的变化。在本实验中单核细胞 CD40 表达及血清中 CD40L 水平与 ACLF 患者 PT 之间也有相关性(具体数据未显示)。CD40-CD40L 作用与免疫反应是密切相关的,CD40-CD40L 表达水平在一定程度可以反映 ACLF 患者体内免疫状态的动态变化,可能是其与 ACLF 病情及预后判断密切相关的原因。

终末期肝病病情的评价方法较多,有研究发现<sup>[18]</sup>采用动态观察 MELD 评分系统来评估终末期肝病病情具有较高的准确性,这也提示动态观察肝衰竭病情对预后判断具有较高准确性。但有学者<sup>[19]</sup>对 MELD 用于慢加急性乙型肝炎肝衰竭预后评估的敏感性和特异性进行比较发现,MELD 评价终末期肝病死亡风险的评分取值范围较宽,仅涉及肝功能衰竭的 3 个临床指标,所应用指标与免疫功能也是密切相关的,且运算较为复杂,对评价我国慢加急性肝衰竭患者的特异性、敏感性尚需要进一步探讨和验证;近来研究表明<sup>[4,20]</sup>免疫变化在肝衰竭病程演变中具有重要意义。

本研究发现 CD40 表达与血清 CD40L 水平在 ACLF 动态变化对病情及预后评估极为重要,特别在病情早期就能做出相应的评估对指导下一步的治疗方案具有重要的临床价值。目前采用的 PT 和凝血酶原活动度(PTA)多数是在肝脏细胞功能严重损伤后才表现出来,而在发病早期大多处于正常范围,因此在早期对患者预后的预测价值欠佳。而 CD40 表达与血清 CD40L 水平在 ACLF 的动态变化使肝衰竭早期即可对病情及预后进行评估和预测,但仅靠单一 CD40 表达和 CD40L 血清水平也不能完全取代 MELD 及其他评分系统,将 CD40-CD40L 表达水平与 MELD 评分系统结合起来评价终末期肝病病情也许能进一步提高其准确性和特异性,尤其对早期肝衰竭病情的评估具有独特的敏感性,对决定 ACLF 下一步选择肝移植还是继续内科治疗具有重要的临床指导价值;至于其他免疫细胞在慢加急性肝衰竭发病中的作用仍需进一步深入研究和探讨。

### 参 考 文 献

- 1 王融冰,周桂琴,江宇泳,等. 799 例重型肝炎的临床病原学与实验室分析. 中华肝脏病杂志,2006,14: 655-675.
- 2 张定凤. 加强对重型肝炎的研究. 中华肝脏病杂志,2006,14:641-642.
- 3 Zhou F, Ajuebor MN, Beck PL, et al. CD154-CD40 interactions drive hepatocyte apoptosis in murine fulminant hepatitis. *Hepatology*,2005,42:372-380.
- 4 Xing T, Li L, Cao H, et al. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. *Clin Exp Immunol*,2007,147:184-188.
- 5 Leifeld L, Dumoulin FL, Purr I, et al. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *J Pathol*,2003, 199:335-344.
- 6 Ke B, Shen XD, Gao F, et al. The CD154-CD40 T-cell co-stimulation pathway in liver ischemia and reperfusion inflammatory re-

- sponses. *Transplantation*,2005,79:1078-1083.
- 7 Ludger L, Christian T, Franz LD, et al. Enhanced expression of CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40 and their ligands CD28 and CD154 in fulminant hepatic failure. *Am J Pathol*,1999,154:1711-1720.
  - 8 Schmitz V, Dombrowski F, Prieto J, et al. Induction of murine liver damage by overexpression of CD40 ligand provides an experimental model to study fulminant hepatic failure. *Hepatology*,2006,44: 430-439.
  - 9 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *肝脏*,2000,5:257.
  - 10 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 2006年肝衰竭诊疗指南. *中华肝脏病杂志*,2006,14:643-646.
  - 11 Zheng YB, Gao ZL, Chong YT, et al. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. *Cell Biol Int*,2008,32:1439-1448.
  - 12 郑树森, 徐骁. 积极推进中国肝移植的发展. *中华肝胆外科杂志*,2005,11:437-439.
  - 13 Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, et al. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*,2000,119:446-460.
  - 14 Mayo MJ, Mosby JM, Jeyarajah R, et al. The relationship between hepatic immunoglobulin production and CD154 expression in chronic liver diseases. *Liver Int*,2006,26:187-196.
  - 15 Edward B. Alabraba, Vincent Lai, Louis Boon, et al. Coculture of human liver macrophages and cholangiocytes leads to CD40-Dependent apoptosis and cytokine secretion. *Hepatology*,2008,47:552-562.
  - 16 Williams KT, Young SP, Negus A, et al. C4b binding protein binds to CD154 preventing CD40 mediated cholangiocyte apoptosis: a novel link between complement and epithelial cell survival. *PLoS One*,2007,2:159.
  - 17 刘慧, 戚春建, 庄羽美, 等. 可溶性 CD40 在肝病患者血清中的表达及其临床意义. *细胞与分子免疫学杂志*,2006,22: 738-741.
  - 18 Gheorghe L, Iacob S, Iacob R, et al. Variation of the MELD score as a predictor of death on the waiting list for liver transplantation. *J Gastrointest Liver Dis*,2007,6:267-272.
  - 19 厉新妍, 柯伟民, 高志良, 等. 乙型肝炎慢加急性肝衰竭严重程度简易评分系统. *中华医学杂志*,2009,47:3353-3355.
  - 20 Zhang JY, Zhang Z, Wang Fs, et al. Interleukin-17-producing CD4-T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*,2010,51:81-91.

(收稿日期:2009-08-13)

(本文编辑:孙荣华)

郑玉宝, 谢仕斌, 谢冬英, 等. CD40 表达及其配体血清水平的动态变化对慢加急性肝衰竭预后的评估价值[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2010,4(1): 20-26.