

Correlation Analysis of Concentration of Plasma Soluble CD28 and Graves Disease

Zhongwen Sun^{1,2*}, Hong Tao¹, Jing Sun², Jingfang Huang¹, Lixian Yi¹, Lei Chen³

¹Key Laboratory of Medical Biotechnology Center Test in Suzhou City, Suzhou

²Department of Lab Medicine of Suzhou Health College, Suzhou

³Division of Endocrinology of Suzhou Municipal Hospital, Suzhou

Email: *zhwsun@szhct.edu.cn

Received: Mar. 7th, 2014; revised: Apr. 7th, 2014; accepted: Apr. 14th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: We did this research to discuss the clinical importance of measuring plasma soluble CD28 in Graves' disease, and explore correlation of soluble CD28 and FT3, FT4, sTSH, TRAb of plasma from Graves disease, and analyze diagnostic value of soluble CD28 in Graves' disease. **Methods:** Using the sandwich ELISA for detecting soluble CD28 and TRAb levels in plasma from healthy donors and patients with Graves' disease, we analyze the concentrations of FT3, FT4, sTSH through chemiluminescence immunoassay, simultaneously. **Results:** Our results have suggested that mean concentrations of soluble CD28 detected in patients with Graves' disease (3.34 ± 0.62 ng/ml) were significantly higher than those in healthy subjects (0.76 ± 0.21 ng/ml) ($p < 0.01$). Moreover, there was a significantly positive correlation between the concentrations of soluble CD28 in plasma and levels of FT3 ($r = 0.786$, $p < 0.01$), FT4 ($r = 0.746$, $p < 0.01$), and TRAb ($r = 0.734$, $p < 0.01$) in plasma, but negative correlation was found between sCD28 levels and serum TSH ($r = -0.719$, $p < 0.01$). High soluble CD28 levels (>5 ng/ml) in plasma of peripheral blood of some Graves patients had significant positive correlation with goiter ($p < 0.05$) and exophthalmos ($p < 0.01$). **Conclusion:** The soluble CD28 had higher levels in patients with Graves' disease than those in healthy donors, and revealed positive correlation with FT3, FT4, TRAb. Therefore, soluble CD28 can be considered as an important biological parameter to support the diagnosis of Graves' disease.

Keywords

Graves' Disease, Soluble CD28, Correlation

*通讯作者。

外周血可溶性CD28含量与Graves疾病的相关性研究

孙中文^{1,2*}, 陶 鸿¹, 孙 静², 黄静芳¹, 易丽娟¹, 陈 蕾³

¹苏州市检验医学生物技术中心重点实验室, 苏州

²苏州卫生职业技术学院医学技术学院, 苏州

³苏州市立医院内分泌科, 苏州

Email: zhwsun@szhct.edu.cn

收稿日期: 2014年3月7日; 修回日期: 2014年4月7日; 录用日期: 2014年4月14日

摘 要

目的: 探讨Graves病患者外周血中可溶性CD28分子浓度与FT3、FT4、sTSH和TRAb等实验室参数的相关性, 以分析外周血可溶性CD28分子含量测定对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病患者血液中可溶性CD28分子的含量; 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; ELISA法测定血液中TRAb的含量。结果: Graves病人血液中可溶性CD28分子含量(3.42 ± 0.74 ng/ml)明显高于健康对照组(0.83 ± 0.29 ng/ml) ($p < 0.01$); 患者体内可溶性CD28分子的表达水平与FT3、FT4和TRAb浓度均呈正相关关系, 相关系数 γ 分别为0.786、0.746和0.734, 但可溶性CD28分子浓度与血清TSH表达呈显著负相关, 相关系数 γ 为-0.719; 外周血液中可溶性CD28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: 可溶性CD28分子参与了Graves疾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

Graves病, 可溶性CD28分子, 相关性

1. 引言

Graves 病又称毒性弥漫性甲状腺肿, 是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]。近年来研究认为, 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、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]-[7]。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 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可溶性 CD28 分子的基础上, 对 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量及 FT3、FT4、sTSH 和 TRAb 的表达水平进行测定, 以探讨可溶性 CD28 分子对 Graves 病的临床辅助诊断价值和疾病治疗过程中的疗效评估提供有价值的生物学参数。

2. 材料和方法

2.1. 标本来源

苏州市市立医本部提供确诊 Graves 病患者(83 例, 其中男性 21 例, 女性 62 例, 年龄 27~52 岁)血液标本。所有 Graves 病患者诊断标准: 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(男 23 名, 女 32 名, 年龄 21~48 岁)作为正常对照组。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。

2.2. 试剂和仪器

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

2.3. 方法

2.3.1. 可溶性 CD28 分子含量检测

可溶性人 CD28 检测试剂盒由本科室自行研制建立[8]。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 病人、正常健康人待测血浆及标准品各 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2 h, 充分洗涤后, 加入标记抗体 CD28-Biotin, 再于 37 $^{\circ}$ C 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 TMB, 室温反应 15 min 后, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止酶与底物的反应, 使用 450 nm 波长于全自动酶标仪测定 OD 值。每个样本设置三个复孔, 同时用 rhCD28/Fc 重组蛋白标准品制作线性标准曲线, 以分析 Graves 病人血浆中可溶性 CD28 含量。

2.3.2. 甲状腺功能测定

ELISA 方法检测血液标本中 TRAb 浓度, 全自动化学发光免疫分析法测定血液中 FT3、FT4、sTSH 含量, 上述实验室指标的测定均按照试剂盒说明书进行。

2.4. 统计学分析

数据资料通过 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. Graves 病人血液中可溶性 CD28 分子含量显著升高

Graves 病人血液中可溶性 CD28 浓度检测结果表明, Graves 病人血液中可溶性 CD28 含量(3.42 ± 0.74 ng/ml)明显高于健康对照组(0.83 ± 0.29 ng/ml) ($p < 0.01$), 并发现具有甲状腺肿大、眼球突出等伴随症状的个别病人体内可溶性 CD28 浓度超过 5 ng/ml。结果提示, 可溶性 CD28 在 Graves 病人体内明显增高, 可能参与了 Graves 病的发生发展等病理过程(见图 1)。

3.2. Graves 病人血液中可溶性 CD28 与 FT3、FT4、sTSH 和 TRAb 含量的相关性分析

患者体内可溶性 CD28 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可溶性 CD28 水平与 FT3、FT4 和 TRAb 均呈正相关，相关系数 γ 分别为 0.786、0.746 和 0.734，可溶性 CD28 浓度与血清 TSH 呈显著负相关，相关系数 γ 为 -0.719，提示可溶性 CD28 的浓度是 Graves 病的重要生物学参数(见图 2)。

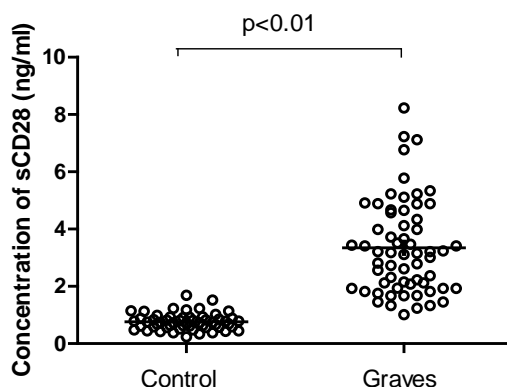


Figure 1. Detection of plasma soluble CD28 with Graves patients

图 1. Graves 病人血液中可溶性 CD28 分子浓度测定

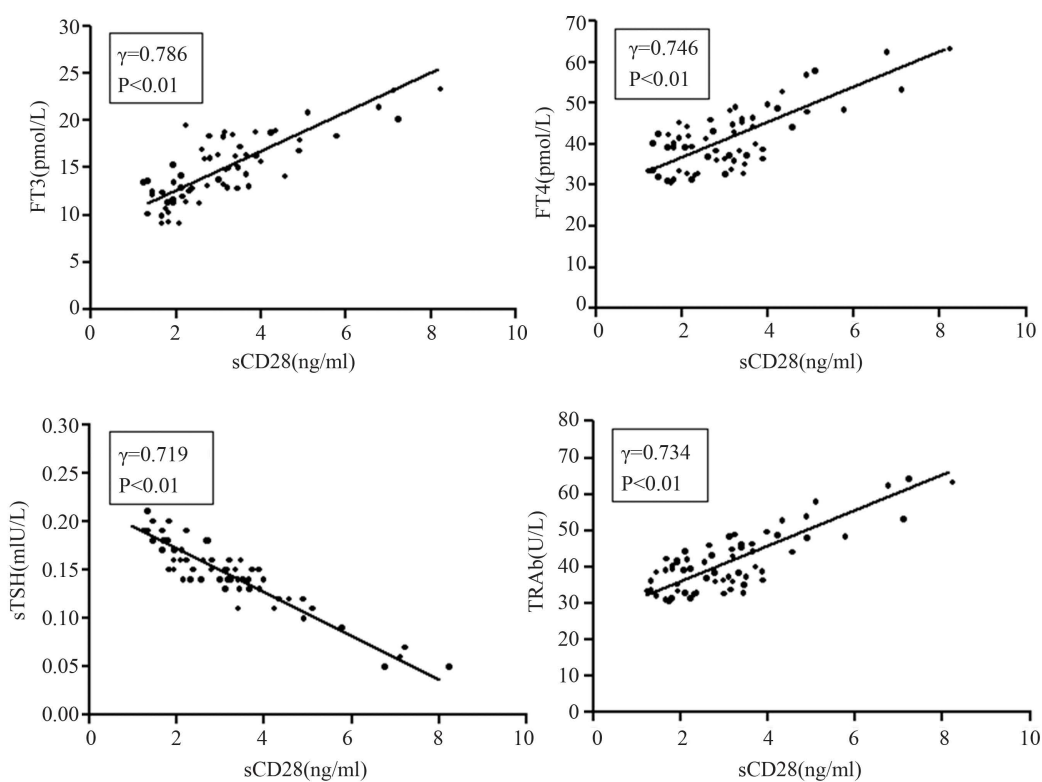


Figure 2. Correlation analysis of thyroid gland parameters and plasma soluble CD28 in patients with Graves disease

图 2. Graves 病人血液中可溶性 CD28 与甲状腺功能指标的相关性分析

3.3. 可溶性 CD28 浓度与临床体征呈正相关

为了进一步了解外周血可溶性 CD28 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,外周血液中可溶性 CD28 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,提示可溶性 CD28 与疾病的严重程度呈明显正相关。

4. 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[9] [10],但共刺激分子可溶性形式的有关研究相对较少。可溶性 CD28 分子在系统性红斑狼疮、类风湿关节炎患者体内含量异常升高,但 Graves 病患者血液中可溶性 CD28 表达水平仍不清楚[11]。本文在自行成功研制可溶性 CD28 检测试剂盒的基础上,对器官特异性自身免疫性疾病 Graves 病患者体内可溶性 CD28 含量进行了分析,结果提示,Graves 病患者血液中可溶性 CD28 含量(3.42 ± 0.74 ng/ml)明显高于健康人群对照组(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,表明可溶性 CD28 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可溶性 CD28 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[12]。

众所周知,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 病患者血液可溶性 CD28 分子含量测定,经 Pearson 相关性分析表明,患者体内可溶性 CD28 分子浓度与 FT3、FT4 和 TRAb 均呈正相关关系,相关系数 γ 分别为 0.786、0.746 和 0.734,但患者血液可溶性 CD28 含量却与血清 TSH 呈显著负相关,相关系数 γ 为 -0.719。初步实验表明,对 Graves 病患者血液可溶性 CD28 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,患者血液中可溶性 CD28 的浓度是诊断 Graves 病的重要生物学参数,将对 Graves 病的临床辅助诊断和疗效评估的具有重要的临床价值。文献报道,哮喘患者体内可溶性 CD28 分子浓度与 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可溶性 CD28 浓度与可溶性 CTLA-4、CD86 的血浆浓度均呈正相关[13]。因此,可溶性 CD28 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,但可溶性 CD28 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 病患者外周血中可溶性 CD28 含量异常增高,并与患者血液中 FT3、FT4 和 TRAb 浓度呈正相关,因此,可溶性 CD28 含量测定将为临床诊断 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。

项目基金

本项目研究由以下基金项目资助:国家自然科学基金项目资助(31100626);江苏省卫生职业技术教育研究立项课题(J201101);江苏省卫生厅医学研究基金立项资助(Z201015)。

参考文献 (References)

- [1] Graves, P.N., Vlase, H., Bobovnikova, Y., et al. (1996) Multimeric complex formation by the thyrotropin receptor in solubilized thyroid membranes. *Endocrinology*, **137**, 3915-3920.

- [2] Tada, H., Mizuta, L., Takano, T., et al. (2003) Blocking-type anti-TSH receptor antibodies and relation to responsiveness to anti-thyroid drug therapy and remission in Graves' disease. *Clinical Endocrinology*, **58**, 403-408.
- [3] Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.P., et al. (2001) CD4⁺CD28⁻ costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, **108**, 1185-1194.
- [4] Nakajima, T., Schulte, S., Warrington, K.J., et al. (2002) T-Cell-Mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation*, **105**, 570-575.
- [5] Komocsi, A., Lamprecht, P., Csernok, E., et al. (2002) Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis. *American Journal of Pathology*, **160**, 1717-1724.
- [6] Duftner, C., Goldberger, C., Falkenbach, A., et al. (2003) Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4⁺CD28⁻ T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Research & Therapy*, **5**, R292-R300.
- [7] 史进芳, 顾国浩, 孙中文, 等 (2006) 膜型和可溶性 CD28 分子在衰老过程中的调节性表达. *中华老年医学杂志*, **25**, 288-289.
- [8] 孙中文, 邱玉华, 马泓兵, 等 (2006) 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. *中华检验医学杂志*, **29**, 518-521.
- [9] Hebbbar, M., Jeannin, P., Magistrelli, G., et al. (2004) Detection of circulating soluble CD28 in patients with systemic lupus erythematosus, primary Sjögren's syndrome and systemic sclerosis. *Clinical & Experimental Immunology*, **136**, 388-392.
- [10] Ip, W.K., Wong, C.K., Leung, T.F., et al. (2005) Elevation of plasma soluble T cell costimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in children with allergic asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, **137**, 45-52.
- [11] Sakthivel, P., Shively, V., Kakoulidou, M., et al. (2007) The soluble forms of CD28, CD86 and CTLA-4 constitute possible immunological markers in patients with abdominal aortic aneurysm. *Journal of Internal Medicine*, **261**, 399-407.
- [12] Wong, C.K., Lit, L.C., Tam, L.S., et al. (2005) Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, **44**, 989-994.
- [13] Wong, C.K., Lun, S.W.M., Ko, F.W.S., et al. (2005) Increased expression of plasma and cell surface costimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma. *Clinical & Experimental Immunology*, **141**, 122-129.