

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.029

肝纤维化相关细胞因子的血清学检测对慢性乙型肝炎肝纤维化进程的诊断价值

李小溪 李 波 李筱涵 郭晓东 陈伟蛟 陈 澎 孙志强

(解放军第 302 医院 北京 100039)

摘要 目的:检测慢性乙型肝炎患者血清中相关细胞因子的水平,为慢性乙型肝炎肝纤维化的分期提供诊断依据。**方法:**选择 175 例在我院接受治疗的慢性乙型肝炎患者作为研究对象,采用 ELISA 方法检测患者血清中基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1、TIMP-2)、脂连素及其受体(AdipoQ)、瘦素(Leptin)、生长因子(PDGF)、骨桥蛋白(OPN) 6 项指标的含量,并利用 ROC 曲线对各指标与肝纤维化分期之间的关系进行相关性分析。**结果:**TIMP-1、TIMP-2、Leptin 在不同纤维化组中呈差异性表达,且 AUROC 高于其他指标($P<0.05$);其余指标无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**TIMP-1、TIMP-2、Leptin 这 3 项指标对慢性乙型肝炎肝纤维化分期具有一定的辅助诊断价值,与其他指标相结合可获得更好的诊断效能。

关键词:血清学指标;慢性乙型肝炎;肝纤维化;诊断价值

中国分类号:R512.62;R575.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)16-3109-03

Diagnostic Values of Relative Markers in Serum of Patients with HBV on the Progression of Liver Fibrosis

LI Xiao-xi, LI Bo, LI Xiao-han, GUO Xiao-dong, CHEN Wei-jiao, CHEN Peng, SUN Zhi-qiang

(302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the diagnostic values of serum markers in liver fibrosis stages of chronic hepatitis B. **Methods:** The concentrations of TIMP-1, TIMP-2, AdipoQ, Leptin, PDGF and OPN in serum of 175 CHB patients were detected by means of ELISA and the relationships between the serum levels of markers and the liver fibrosis stages were analyzed by ROC curve. **Results:** There were statistically significant differences about the levels of TIMP-1, TIMP-2 and Leptin in serum of patients on different liver fibrosis stages ($P<0.05$), and the AUROCs were higher than others. The other three markers had no statistically significant differences ($P>0.05$). **Conclusion:** TIMP-1, TIMP-2 and Leptin had some diagnostic values in liver fibrosis stages of CHB patients. It is better to be detected with other markers in serum for the diagnostic of liver fibrosis.

Key words: Serum biomarker; Chronic hepatitis B; Liver fibrosis; Diagnosis value

Chinese Library Classification (CLC): R512.62; R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3109-03

前言

乙型肝炎病毒感染易呈慢性化过程,相当一部分病人经反复肝脏炎症后发展至肝纤维化,各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生,肝组织内细胞外基质过度增生与异常沉积所致肝脏结构和肝功能异常改变^[1-3]。在肝纤维化进程中,肝脏星形细胞的激活、增殖及细胞外基质的沉积是重要环节。许多细胞因子,如转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子(PDGF)等相关细胞因子及其受体能够强烈的刺激肝星形细胞的增殖、迁移,促使其胶原的产生和沉积,在肝纤维化发生发展中起着非常重要的作用。因此,检测血清中各种细胞因子及细胞外基质成分浓度是判断肝纤维化程度的理想指标,为肝纤维化的诊断、逆转及治疗提供依据^[4-7]。本研究对慢性乙型肝炎患者血清中的肝纤维化相关细胞因子进行检测,分析各项指标在肝纤维化进程中的作用,为肝纤维化分期的临床诊断提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集 2008 年 5 月到 2012 年 10 月 175 例乙肝病例,所有病例均进行肝组织活检确定 GS 分级分期,其中男 117 例,女 58 例,平均年龄 34 ± 12 岁。样本取患者清晨空腹状态采集静脉不抗凝血,分离血清,置于 -70°C 冰箱保存,集中专人同批检测。

1.2 检测方法

采用 ELISA 方法检测血清脂联素(AdipoQ)、骨桥蛋白(OPN)、瘦素(Leptin)、血小板衍生生长因子(PEDF)、金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)、金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)六项指标。ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司,严格按照说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析,根据肝组织活检结果将所有病例分为 2 组,轻度纤维化组($S\leq 2$)104 例,显著纤维化组($S>2$)71 例,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,各组数据先进行正态性检验及方差检验,分布用 t 检验或 Wilcoxon 秩和检验,检验水准取 $\alpha=0.05$,绘制 ROC 曲线评价各指标在肝纤维化诊断中的价值。

作者简介:李小溪(1981-),女,硕士研究生,研究方向:临床检验等方面研究

(收稿日期:2013-12-10 接受日期:2013-12-30)

2 结果

2.1 各项指标在不同肝纤维化分期中的变化

轻度纤维化组与显著纤维化组比较,瘦素、TIMP-1 和 TIMP-2 两组均数比较具有统计学差异($P<0.05$),其余各项组间比较无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 各项指标在乙肝肝纤维化分期中的变化

ROC 曲线下各指标的面积 AUROC 显示,各指标对肝纤维化诊断价值均不显著 ($AUROC<0.75$); 但 Leptin、TIMP-1 和 TIMP-2 诊断价值相对较高($AUROC=0.589, 0.642, 0.647$); PDGF 对肝纤维化分期无诊断价值($AUROC=0.5$)。(见图 1、表 2)。

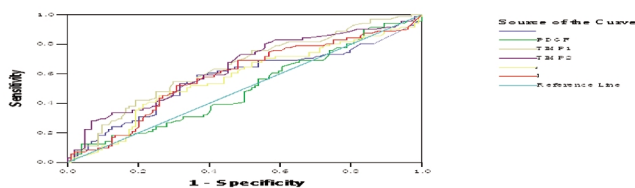


图 1 各项指标诊断价值的 ROC 曲线图

Fig. 1 ROC curve of the markers for diagnosis

表 1 不同纤维化分期患者血清中各指标的含量

Table 1 Changes of the markers in serum of patients with different fibrosis stages

Indicators	Mild($S\leq 2$)	Significant($S>2$)
Cases	104	71
TIMP-1(ng/mL)	1.13 $\pm$ 0.07	1.47 $\pm$ 0.09
TIMP-2(ng/mL)	2.45 $\pm$ 0.06	2.79 $\pm$ 0.09
AdipoQ(ng/mL)	121.1 $\pm$ 6.7	137.8 $\pm$ 8.5
Leptin(pg/mL)	124.9 $\pm$ 14.1	163.1 $\pm$ 19.5
PDGF(pg/mL)	138.8 $\pm$ 6.3	143.3 $\pm$ 9.0
OPN(ng/mL)	1.09 $\pm$ 0.87	1.45 $\pm$ 0.15

表 2 各指标对肝纤维化诊断价值的 ROC 曲线分析

Table 2 ROC analysis of the markers on the diagnosis of liver fibrosis

Item	AUROC	SD	95% CI	
			Min	Max
TIMP-1(ng/mL)	0.647	0.042	0.564	0.730
TIMP-2(ng/mL)	0.642	0.043	0.558	0.726
AdipoQ(ng/mL)	0.569	0.045	0.481	0.658
Leptin(pg/mL)	0.589	0.044	0.501	0.676
PDGF(pg/mL)	0.5	0.045	0.412	0.588
OPN(ng/mL)	0.57	0.046	0.48	0.660

Note: compared between two groups, * $P<0.05$.

3 讨论

肝脏纤维化是许多慢性肝病的共同病理过程,主要是由于各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生,肝内弥漫性细胞外基质过度沉淀而引起。肝星状细胞(HSC)的激活是纤维化形成过程中的中心环节,在肝纤维化病程中,一系列细胞因子通过旁分泌和自分泌方式作用于邻近的 HSC,影响其增殖、趋化、代谢及凋亡^[89]。

脂联素是脂肪组织分泌的含 224 个氨基酸的活性多肽,它具有抗糖尿病、抑制肥胖、抗动脉粥样硬化与抗炎作用^[101]。脂联素通过 2 型脂联素受体对肝细胞发挥直接作用,并通过 TNF- α 发挥抗炎作用,提示脂联素在抗肝纤维化和肝硬化方面发挥了肝保护作用^[12]。陈万琼等^[13]对慢性乙型肝炎肝纤维化及肝硬化患者血清脂联素水平以及肝组织中 mRNA 表达水平进行了检测,结果显示其在肝纤维化的各个阶段均有表达,且与纤维化分级呈正相关。我们的实验结果显示,显著纤维化期($S>2$)血清脂联素浓度高于轻度纤维化组($S\leq 2$),其浓度分别为(137.8 $\pm$ 8.5) ng/mL 和(121.1 $\pm$ 6.7) ng/mL,但无统计学差异($AUROC=0.569$)。

OPN 是一种带负电的非胶原性骨基质糖蛋白,由多种组织细胞合成与分泌。PatourauxS 等^[14]研究血清中的骨桥蛋白水平与酒精性肝病患者纤维化的关系,结果显示血清 OPN 水平随着肝脏炎症程度增加而轻度增加,而其随着纤维化程度加重而明显增加,并提出血清 OPN 升高是显著纤维化($F\geq 2$)评估的独立危险因素。我们的数据主要针对慢性乙肝患者纤维化,结果表明显著纤维化患者($S>2$)血清浓度升高,但无统计学意义($AUROC=0.57$),这与既往研究结果存在一定差异,主要原因在于研究对象的差异,该项目在酒精性肝病导致的纤维化诊断中有很好的应用价值,但对病毒性肝炎肝纤维化的诊断价值仍需要进一步证实。

PDGF 能强烈刺激 HSC 的增殖和迁移,促使其胶原的产生和沉积,在肝纤维化的发生和发展中作用非常重要^[15,16]。另外,PDGF 是一种重要的促分裂剂,与多种细胞因子,如 TGF- β 和 ECM 等相互作用可促进肝纤维化的发生和发展。有研究表明,PDGF 与肝纤维化指标 HA、LN、Pill NP 和 IV.C 含量呈正相关^[17]。但在我们的实验中并未体现其相关性,这可能与检测试剂的特异性和操作规范等因素有关。我们仍需进行更加标准化方法及丰富的组织学证据来完善此项研究,以获得更为确切的纤维化检测指标。

瘦素是近年来发现的调节机体内分泌和能量代谢的重要的脂肪源性肽类激素,具有细胞因子的特性^[18]。正常肝组织不表达瘦素,但在病理性因素刺激下,可发生肝纤维化,且随纤维化程度加重,瘦素、瘦素受体表达增加,研究显示血清瘦素水平与肝纤维化血清学指标呈正相关^[19]。提示血清瘦素水平可在一定程度上反映肝纤维化的程度。这与我们的研究结果基本一致,但如果要取得具有临床价值的诊断意义,该项目需要和其他纤维化指标进行组合,以进一步提高其诊断效能。

TIMP 主要由 HSC、肝细胞等产生,可在原位抑制 MMP 活性,使 ECM 降解减少,有利于肝纤维化的形成。TIMP 水平随肝病进展而逐渐升高,其水平可反映肝组织病变程度^[20]。在前期研究中,我们发现 TIMP-1 和 TIMP-2 与肝纤维化分期具有很好的相关性,并与其他各项结合制成诊断模型,准确率可达 77.9%。在研究中,TIMP-1 和 TIMP-2 同样表现出较高的诊断价值($AUROC=0.674, 0.672$),明显高于其余项目。

综上所述,我们认为金属蛋白酶组织抑制因子具有一定的诊断肝纤维化的价值,瘦素也与肝纤维化具有相关性。TIMP-1、TIMP-2 和瘦素与其他指标组合可取得不错的诊断价值,而 PDGF、骨桥蛋白和脂联素在肝纤维化诊断中的意义有待商榷。

参考文献(References)

[1] 郭晓东,陆薇,李瑞生,等. 大鼠肝纤维化病理分期与肝纤维化血清

- 标志物相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(02): 210-212
- Guo Xiao-dong, Lu Wei, Li Rui-sheng, et al. The Relationship between the Pathological Degree of Fibrosis and Serum Hepatic Fibrosis in HF Rats [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13 (02): 210-212
- [2] 梁新宇, 田鹏飞, 段正军, 等. 化学发光法检测慢性乙型肝炎病毒感染者肝纤维化四项指标结果分析 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(2): 110-111
- Liang Xin-yu, Tian Peng-fei, Duan Zheng-jun, et al. Analysis on result of liver fibrosis markers detected by chemoluminescence method for chronic hepatitis B [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases, 2012, 22 (2): 110-111
- [3] Zheng L, Chu J, Shi Y, et al. Bone marrow-derived stem cells ameliorate hepatic fibrosis by down-regulating interleukin-17[J]. Cell Biosci, 2013, 3(1):46
- [4] 段军, 蒋永芳. TGF- β 1 表达与乙肝患者肝纤维化的关系及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(7): 1328-1330
- Duan Jun, Jiang Yong-fang. The relationship between the TGF- β 1 expression and liver fiber for hepatitis B patients and its clinical significance [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10 (7): 1328-1330
- [5] Korah TE, El-Sayed S, Elshafie MK, et al. Significance of serum leptin and adiponectin levels in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus associated hepatic steatosis and fibrosis [J]. World J Hepatol, 2013, 5(2): 74-81
- [6] 郭晓东, 熊璐, 张红萍, 等. 肝纤维化进程中 miRNA-19b 表达变化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(04): 611-612+606
- Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zhang Hong-ping, et al. Expression of miRNA-19b on the progression of the Hepatic Fibrosis[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(04): 611-612+606
- [7] Zeng DW, Liu YR, Zhang JM, et al. Serum Ceruloplasmin Levels Correlate Negatively with Liver Fibrosis in Males with Chronic Hepatitis B: A New Noninvasive Model for Predicting Liver Fibrosis in HBV-Related Liver Disease[J]. PLoS One, 2013, 8(10): 77942
- [8] 张峰, 雷娜, 张晓平, 等. 血小板衍生生长因子体外对大鼠肝星状细胞表达细胞外基质的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1): 48-53
- Zhang Feng, Lei Na, Zhang Xiao-ping, et al. Impacts of PDGF on extracellular matrix secretion in rat hepatic stellate cells in vitro[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2012, 28(1): 48-53
- [9] Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zou L, et al. L1 cell adhesion molecule overexpression in hepatocellular carcinoma associates with advanced tumor progression and poor patient survival [J]. Diagn Pathol, 2012, 13, 7: 96
- [10] Tibaldi E, Zonta F, Bordin L, et al. The tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits proliferation of activated hepatic stellate cells by impairing PDGF receptor signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1843(2): 288-298
- [11] Saad Y, Ahmed A, Saleh DA, et al. Adipokines and insulin resistance, predictors of response to therapy in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus genotype 4 [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2013, 25(8):920-925
- [12] Klironomos S, Notas G, Sfakianaki O, et al. Octreotide modulates the effects on fibrosis of TNF- α , TGF- β and PDGF in activated rat hepatic stellate cells[J]. Regul Pept, 2013, 188C:5-12
- [13] 陈万琼, 阳惠湘. 脂联素与慢性乙型肝炎病毒感染肝纤维化发生发展的关系[J]. 医学临床研究, 2012, 29(4): 650-651,654
- Chen Wan-qiong, Yang Hui-xiang. Relationship Between Adipone
- ctin and Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis B Virus Infection [J]. Journal of Clinical Research, 2012, 29(4): 650-651,654
- [14] Patouraux S, Bonnafous S, Voican CS, et al. The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease[J]. PLoS One, 2012, 7(4): 35612
- [15] Fan B, Ma L, Li Q, et al. Correlation between platelet-derived growth factor signaling pathway and inflammation in desoxycorticosterone-induced salt-sensitive hypertensive rats with myocardial fibrosis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(11): 2468-2475
- [16] 陈莲香, 舒建昌. PDGF 与肝纤维化关系的研究新进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(1): 95-98
- Chen Lian-xiang, Shu Jian-chang. Relationship between PDGF and hepatic fibrosis [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2011, 20(1): 95-98
- [17] 李东, 李新宇, 龚钰清, 等. PDGF-BB、TGF- β 1 与肝纤维化的相关性研究[J]. 海南医学, 2012, 23(21): 99-100
- Li Dong, Li Xin-yu, Gong Yu-qing, et al. PDGF-BB, TGF beta 1 and liver fibrosis[J]. Hainan Medical Journal, 2012, 23(21): 99-100
- [18] 袁聪, 郑城婷, 许保, 等. 瘦素、脂联素和抵抗素在肝纤维化中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(2): 149-154
- Yuan Cong, Zheng Cheng-ting, Xu Bao, et al. Advances in understanding the role of leptin, adiponectin and resistin in liver fibrogenesis [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2010, 18(2): 149-154
- [19] 孟磊, 张丽, 李潜, 等. 肝纤维化对结肠癌肝转移的影响及 TIMP-1、CTGF 在其过程中的机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21 (9): 1937-1941
- Meng Lei, Zhang Li, Li Qian, et al. The effect of hepatic fibrosis inhibiting liver metastasis of colon cancer and the roles of TIMP-1 and CTGF in the process [J]. Journal of Modern Oncology, 2013, 21 (9): 1937-1941
- [20] 李波, 孙志强, 李伯安, 等. 血清学指标在慢性乙型肝炎肝纤维化诊断中的应用评价及神经网络纤维化诊断模型的建立[J]. 传染病信息, 2010, 23(4): 209-213
- Li Bo, Sun Zhi-qiang, Li Bo-an, et al. Evaluation of serum markers in the diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B and the development of an artificial neural network diagnosis model for liver fibrosis [J]. Infectious Diseases Information, 2010, 23 (4): 209-213
- [21] 宋向芹, 司秀文, 张芳, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者血清血管内皮生长因子的研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(4): 234-235,250
- Song Xiang-qin, Si Xiu-wen, Zhang Fang, et al. Clinical study on serum vascular endothelial growth factor in patients infected by chronic hepatitis B virus[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases, 2012, 22(4): 234-235,250
- [22] 许波实, 韩双印, 孙长义, 等. 乙型肝炎病毒感染者血清中丁型肝炎病毒标志物检测分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2012, 26 (4): 307-309
- Xu Po-shi, Han Huang-yin, Sun Chang-yi, et al. The analysis of hepatitis delta virus infective markers in the hepatitis B virus infective people [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2012, 26(4): 307-309
- [23] 李浩, 李俊, 黄成, 等. 瘦素及转化生长因子- β 1 与四氯化碳诱导大鼠肝纤维化模型逆转恢复的相关性研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4): 473-477
- Li Hao, Li Jun, Huang Cheng, et al. Correlative research between leptin and TGF- β 1 and the recovery on CCl4 induced hepatic fibrosis in rats[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2011, 27(4): 473-477