

透明质酸及其相关蛋白在慢性肝病病程进展中的变化

吴吉文¹, 王 玮¹, 林寿榕² (1. 福建医科大学人体解剖学与组织胚胎学系, 福州 350004;
2. 福建医科大学附属第一医院检验科, 福州 350004)

【摘要】 目的 探讨透明质酸(HA)及其相关蛋白(SHAP-HA)等血清学指标在肝纤维化、肝硬化及所继发的原发性肝癌演变过程中的作用。**方法** 应用酶联免疫法观察 HA 及其相关蛋白等血清学指标,并分析 HA 和 SHAP-HA 与血清甲胎蛋白(AFP)、清蛋白(Alb)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和血小板计数(PLT)的关系。**结果** 慢性肝炎组和肝硬化组之间血清 HA、SHAP-HA 水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),肝硬化组和肝癌组之间血清 SHAP-HA 水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清 SHAP-HA 和 HA 与 AST、ALT、AFP 呈正相关,血清 SHAP-HA 和 HA 与 Alb、PLT 呈负相关。**结论** SHAP-HA 与 HA 相比更能表明与肝组织炎症坏死及纤维化发展的阶段性一致。

【关键词】 透明质酸; 肝纤维化; 肝硬化; 肝癌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.07.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)07-0777-03

Change of hyaluronan and hyaluronan associated proteins in the development of chronic liver diseases and its significance

WU Ji-men¹, WANG Wei¹, LIN Shou-rong² (1. Division of Anatomy, Histology and Embryology, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated First Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of hyaluronan and hyaluronan associated proteins in the development of chronic liver diseases. **Methods** The levels of fibrosis marker in serum were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The total bilirubin (TB), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and serum albumin (ALB) were examined by automatic biochemical analyzing system. **Results** Significant positive correlations were found between the levels of the SHAP-HA complex and HA at all stages in both HBV- and HCV groups. The serum levels of the SHAP-HA complex and HA showed a significant negative correlation with Alb and Plt, while there was a positive correlation with AST, ALT and AFP. **Conclusion** The serum HA and SHAP-HA levels reflect the inflammatory and cirrhotic processes. The serum levels of the SHAP-HA complex may be an useful index for monitoring functional changes of the liver in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis, where it is superior to using the serum level of HA.

【Key words】 hyaluronan; hepatic fibrosis; liver cirrhosis; hepatocellular carcinoma

慢性肝病多以肝炎病毒尤其是乙型肝炎病毒感染引起,持续的病毒感染将不同程度引起肝脏的炎症损伤、肝纤维化,甚至进展到原发肝癌,其中 25%~40% 最终发展为肝硬化(LC)及肝细胞癌(HCC)。本研究以慢性肝病患者血清的透明质酸(HA)及其相关蛋白(SHAP-HA)为研究对象,观察 HA 和 SHAP-HA 血清水平与炎症损伤、肝纤维化直至原发肝癌的动态变化,探讨透明质酸及其相关蛋白在慢性肝病演变过程中变化及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 2 月至 2013 年 3 月福建医科大学附属第一医院门诊及住院患者 392 例,其中男 262 例,女 130 例,年龄 16~78 岁,平均年龄 39.6 岁。入选病例符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》的诊断标准^[1]。其中慢性病毒性乙型肝炎患者 46 例(B-CH 组),慢性病毒性丙型肝炎患者 101 例(C-CH 组),乙型肝炎病毒感染致肝硬化及肝癌患者分别是 47 例(B-LC 组)和 24 例(B-HCC 组),丙型肝炎病毒感染致肝硬化及肝癌患者分别是 105 例(C-LC 组)和 69 例(C-HCC 组)。本院同期 27 例健康献血者设为健康对照组。

1.2 实验材料 采用酶联免疫法检测(试剂盒由日本爱知医科大学分子医科学研究所卓丽圣博士惠赠),严格按操作说明测定。RT-2100 酶标仪由深圳雷杜公司生产。

1.3 血清学指标检测 简要步骤为:加标准品及待测样品(其中待测样品用磷酸盐缓冲液作 1:100 稀释),加入包被孔内,50 微升/孔,37℃ 1 h。分别加第一抗体,第二抗体 100 μL,每加一种试剂均孵育 37℃ 1 h,最后用磷酸盐缓冲液冲洗,加发色液(TMB),50 微升/孔,37℃ 10~15 min。加停止液(1NHCL),50 微升/孔。以 0 ng/mL 标准溶液样品孔调零,测 A₄₅₀ 值。以 A₄₅₀ 为纵坐标,标准溶液浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线,并计算出各样品中的 HA 和 SHAP 浓度。在标准曲线上查出相应 HA 和 SHAP 值。每次测定均带 HA 和 SHAP 质控血清及标准品,作标准曲线。

1.4 其他血清生化指标 清蛋白(Alb)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、甲胎蛋白(AFP)和血小板计数(PLT)。

1.5 统计学处理 采用 SAS 软件进行统计学处理。检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示并代入统计,两组间计量资料比较用 t 检验,计

数资料用比较用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 B-CH 组、B-LC 组和 B-HCC 组中患者血清 SHAP-HA 和 HA 含量逐渐升高,较健康对照组明显增高,与健康对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。B-LC 组与 B-CH 组相比,血清 SHAP-HA 和 HA 差异均有统计学意义($P<0.01$)。B-HCC 组与 B-LC 组相比,血清 SHAP-HA 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 C-CH 组、C-LC 组和 C-HCC 组中患者血清 SHAP-HA 和 HA 含量明显升高,较健康对照组亦明显增高,与健康对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。C-LC 组与 C-CH 组相比,血清 SHAP-HA 和 HA 差异均有统计学意义($P<0.01$)。C-HCC 组与 C-LC 组相比,血清 SHAP-HA 差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

2.3 相关分析表明 B-CH、B-LC、B-HCC、C-CH、C-LC、C-HCC 组患者血清 SHAP-HA 和 HA 之间 r 分别为 0.56、0.62、0.62、0.64、0.77、0.56,表明在慢性肝病病程进展中 SHAP-HA 和 HA 两者之间密切相关,其中尤以在 C-LC 组、C-CH 组相关性更好。血清 SHAP-HA 与 AST、ALT、AFP 呈正相关,与 ALB、PLT 呈负相关,其中以 PLT、AFP 相关性最好。血清 HA 与 AST、ALT、AFP 呈正相关,与 ALB、PLT 呈负相关,其中以 PLT、ALB 相关性最好,见表 2。

表 1 各组中血清 SHAP-HA 和 HA 水平变化

组别	<i>n</i>	SHAP-HA($\mu\text{g/mL}$)	HA($\mu\text{g/L}$)
健康对照组	27	14 $\pm$ 3	52 $\pm$ 11
B-CH 组	46	29 $\pm$ 18 ^a	228 $\pm$ 229 ^a
B-LC 组	47	60 $\pm$ 56 ^{ab}	841 $\pm$ 811 ^{ab}
B-HCC 组	24	101 $\pm$ 77 ^{ac}	1 170 $\pm$ 1 436 ^{ad}
C-CH 组	101	36 $\pm$ 25 ^a	403 $\pm$ 485 ^a
C-LC 组	105	62 $\pm$ 48 ^{ae}	1 280 $\pm$ 1 421 ^{ae}
C-HCC 组	69	110 $\pm$ 89 ^{af}	1 374 $\pm$ 1 364 ^{fg}

注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与 B-CH 组相比,^b $P<0.01$;与 B-LC 组相比,^c $P=0.03$,^d $P=0.31$;与 C-CH 组相比,^e $P<0.01$;与 C-LC 组相比,^f $P<0.01$;与 C-LC 组相比,^g $P=0.49$ 。

表 2 血清 SHAP-HA 和 HA 与其他生化指标相关系数(r)

名称	Alb	AST	ALT	AFP	PLT
SHAP-HA	-0.57 ^a	0.11	0.16	0.62 ^a	-0.64 ^a
HA	-0.44 ^b	0.10	0.18	0.35	-0.47 ^a

注:^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

在各种病因所致肝纤维化患者中发现血清 HA 水平升高^[2-5]。HA 在临床上可以作为慢性肝病肝纤维化诊断的一项有用指标^[6-7]。作者前期研究发现血清中 HA 并非游离,而是和 α 胰蛋白酶抑制剂(inter α trypsin inhibitor,ITI)的重链共价结合形成 SHAP-HA 复合物。随着病变的发展,血清中 HA 的浓度似乎不再变化,相反,SHAP-HA 复合物明显增高。研究 HA 与 SHAP-HA 在肝炎-肝硬化-肝癌的发展中有如何

变化? 确定这些蛋白在肝纤维化诊断中的临床应用价值,对于进一步探讨其发病机制及相关的检测指标具有重要的临床意义。同时通过测定血液中 HA 与 SHAP-HA 含量,还可对肝病严重性进行病程监控和疗效评价。

研究结果发现,各组患者血清 HA、SHAP-HA 水平与健康对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。慢性肝炎组和肝硬化组之间血清 HA、SHAP-HA 水平之间差异有统计学意义($P>0.05$),肝硬化组和肝癌组之间血清 HA 水平之间差异无统计学意义,肝硬化组和肝癌组之间血清 SHAP-HA 水平之间差异有统计学意义($P<0.05$)。这表明血清 HA、SHAP-HA 水平与慢性肝病病程发展的阶段性是一致的,均随着肝组织炎症坏死及纤维化程度加重而升高,均在肝硬化及肝癌阶段水平最高,且血清 HA 水平能很好反映肝组织炎症坏死及纤维化过程,而非肿瘤转移。血清 SHAP-HA 与 HA 相比更能表明与肝组织炎症坏死及纤维化发展的阶段性一致,在肝硬化-肝癌的发展中,血清 SHAP-HA 更有监测意义。

血清 SHAP-HA 和 HA 相关分析表明,不同组别患者血清 SHAP-HA 和 HA 之间呈显著正相关,在慢性肝病病程进展中 SHAP-HA 和 HA 两者之间密切相关,其中尤以在 C-LC 组、C-CH 组相关性更好。在乙型肝炎病毒感染慢性化过程中,SHAP-HA 和 HA 更能反映炎症和纤维化过程。

血清 SHAP-HA 和 HA 与反映肝功能其他生化指标相关分析表明,血清 SHAP-HA 和 HA 与 AST、ALT、AFP 呈正相关,SHAP-HA 和 HA 均与肝组织内炎症坏死及纤维化相关,且与纤维化相关性均高于与炎症坏死相关性。血清 SHAP-HA 和 HA 与 Alb、PLT 呈负相关,表明 SHAP-HA 和 HA 均同时与肝功能受损程度相关。从相关系数表明这种差异并不明显,这反映了炎症坏死时胶原纤维的降解或活动性纤维化的改建过程,既有细胞外基质合成增加,亦有降解增加,故肝组织炎症坏死也影响血清 SHAP-HA 和 HA 变化。在肝硬化-肝癌的发展阶段,SHAP-HA 与 AFP 的相关系数明显高于 HA 与 AFP 的相关系数,表明 SHAP-HA 在肿瘤转移中的意义优于 HA。

在慢性肝病进展至肝纤维化过程中,血清 HA 水平升高一方面是由于肝星状细胞(HSC)对其合成增加,另一方面可能是由于肝血窦毛细血管化,肝窦内皮细胞(SEC)受损伤导致肝脏对血清中 HA 的摄取和降解减少所致。虽然哪一方面占优势还不清楚,但 HA 合成增加,无疑会影响 SHAP-HA 的生成。前期研究表明在酶的作用下,通过酯基连接方式 ITI 的重链(SHAP)与透明质酸的结合形成 SHAP-HA 复合物,这一过程伴随 bikunin(ITI 的轻链)的释放^[8-11]。因此,可以认定 HA 生成进入血窦后,在相当于转移酶的血清因子参与下,与 ITI 的重链结合形成 SHAP-HA。在正常情况下,血清中 HA 的合成和降解是快速且保持平衡的,无法形成 SHAP-HA 复合物^[12]。当肝功能受损,肝脏对血清中 HA 的摄取和降解减少,同时对其合成增加,SHAP-HA 复合物形成的机会可能就多。假设情形是如此,那么 SHAP-HA 形成过程中的副产物 bikunin 也具有一定的生物学意义。事实上 Lin 等^[13]就从小尿中发现的胰蛋白酶抑制剂(UTI),与 bikunin 是同一物质,这也是反映肝病进程一个非常有意义的指标。

临床上为避免反复肝穿刺,急需建立可靠的、重复性高的

非创伤性监测肝纤维化的指标,最好是一种血清学标志物,这说明了血清学标志物对诊断肝纤维化有很重要的意义。本文结果说明,血清 HA、SHAP-HA 水平与慢性肝炎发展的阶段性一致,与肝组织内炎症坏死及纤维化程度一致。测定血清 HA、SHAP-HA 水平或动态观察有助于肝纤维化的诊断。在慢性肝病肝纤维化进展至肝癌过程中,测定血清 SHAP-HA 指标优于 HA。

参考文献

- [1] 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[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(5): 324-329.
- [2] Gibson PR, Fraser JR, Brown TJ, et al. Hemodynamic and liver function predictors of serum hyaluronan in alcoholic liver disease[J]. Hepatology, 1992, 15(6): 1054-1059.
- [3] Grzeszczuk A, Chlabicz S, Panasiuk A. Serum hyaluronan as a possible biomarker of liver insufficiency in cirrhotic patients[J]. Roczn Akad Med Białymst, 2002, 47(1): 80-85.
- [4] Das BC, Isaji S, Kawarada Y. Analysis of 100 consecutive hepatectomies; risk factors in patients with liver cirrhosis or obstructive jaundice[J]. World J Surg, 2001, 25(3): 266-273.
- [5] McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(8): 945-951.
- [6] 柴明胜, 陈铁河, 彭武林, 等. ELISA 法检测血清透明质酸在肝病诊断中的应用[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2003, 24(5): 303-305.

- [7] 赵树清, 冬荣辉, 王艳红. 乙型肝炎肝硬化患者血清透明质酸和可溶性白细胞介素 2 受体测定的意义[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(1): 43.
- [8] Yoneda M, Suzuki S, Kimata K. Hyaluronic acid associated with the surfaces of cultured fibroblasts is linked to a serum-derived 85-kDa protein[J]. J Biol Chem, 1990, 265(9): 5247-5257.
- [9] Zhuo L, Salustri A, Kimata K. A physiological function of serum proteoglycan bikunin; the chondroitin sulfate moiety plays a central role[J]. Glycoconj J, 2003, 19(4-5): 241-247.
- [10] Zhuo L, Yoneda M, Zhao M, et al. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice[J]. J Biol Chem, 2001, 276(11): 7693-7696.
- [11] Yingsung W, Zhuo L, Morgelin M, et al. Molecular heterogeneity of the SHAP-hyaluronan complex. Isolation and characterization of the complex in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(35): 32710-32718.
- [12] Shen L, Zhuo L, Okumura A, et al. The SHAP-hyaluronan complex in serum from patients with chronic liver diseases caused by hepatitis virus infection[J]. Hepatol Res, 2006, 34(3): 178-186.
- [13] Lin SD, Endo R, Sato A, et al. Plasma and urine levels of urinary trypsin inhibitor in patients with acute and fulminant hepatitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(2): 140-147.

(收稿日期: 2012-09-03 修回日期: 2012-11-12)

(上接第 776 页)

- [1] [J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(2): 119-123.
- [2] Bekeris LG, Tworek JA, Walsh MK, et al. Trends in blood culture contamination; a College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions[J]. Arch Pathol Lab Med, 2005, 129(10): 1222-1225.
- [3] 郑立华, 鲁辛辛. 降钙素原的临床研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(1): 137-139.
- [4] 郭安臣, 左萍萍. 一种新的由感染引发的系统炎症的标记物-前降钙素[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(10): 993-994.
- [5] 任丽娟, 郑文亮, 艾根伟. 降钙素原与真菌血流感染的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24): 5122-5124.
- [6] 李志夫, 姜加陶, 李惠珍, 等. 降钙素原与血流感染的相关性[J]. 医学临床研究, 2011, 28(12): 2239-2241.

- [7] van Nieuwkoop C, Bonten TN, van't Wout JW, et al. Procalcitonin reflects bacteremia and bacterial load in urosepsis syndrome; a prospective observational study[J]. Crit Care, 2010, 14(6): R206.
- [8] 张有江, 王欢, 罗燕萍, 等. 定量降钙素原测定在血流感染诊断中的应用[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(12): 1219-1221.
- [9] Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis; clinical utility and limitations[J]. Crit Care Med, 2008, 36(3): 941-952.
- [10] Cockerill FR 3rd, Wilson JW, Vetter EA, et al. Optimal testing parameters for blood cultures[J]. Clin Infect Dis, 2004, 38(12): 1724-1730.

(收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-12-18)