

外周循环 CK18 及 A-FABP 联合诊断 NAFLD 的研究现状

夏 谨, 张文锋 综述, 龚建平[△] 审校(重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010)

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病; 细胞角蛋白 18; 脂肪细胞脂肪酸结合蛋白

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 04. 039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)04-0522-02

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是与胰岛素抵抗和遗传易感因素相关的代谢性肝脏损伤疾病,疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(NAF)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌^[1]。NAFLD的发生机制主要是“双重打击”学说。“第一次打击”为高糖和高脂饮食使血液中游离脂肪酸增加,肝细胞内毒素及脂质累积,使机体产生胰岛素抵抗作用。“第二次打击”是依附于肝脏血窦的巨噬细胞(Kupffer细胞)等受到过多的脂毒性和内毒素性刺激,产生一系列的炎症反应,促进肝细胞脂肪变性、纤维化等不可逆转的病变。目前NAFLD不仅仅在西方及日本、韩国发达国家中的发病率较高,并且随着国内城市居民生活条件的日益提高,高热量、高脂肪饮食习惯使NAFLD已成为国内城市居民面临的新型慢性肝脏疾病之一^[2]。一方面,NAFLD预防知识的普及程度远远不如其他慢性肝脏疾病,很难引起人们对NAFLD的重视;另一方面,由于目前诊断NAFLD的临床方法准确性及灵敏性欠佳,使得临床对NAFLD的诊断水平偏低。因此,定期身体检查以及尽早准确的诊断,对NAFLD所致肝脏脂肪变性的转归以及早期预防、护理指导和治疗有重要意义。

1 NAFLD 常规诊断及不足

目前常用的NAFLD诊断方法包括肝穿刺组织活检、影像学检查、肝功能检测等。国际上通用的金标准是肝穿刺组织活检^[3]。然而,肝穿刺组织活检费用高,穿刺组织有限,有可能在取材过程中出现麻醉意外、穿刺局部疼痛、头晕、出血、感染等情况,如果出血量大,甚至可能出现失血性休克。即使是进行超声引导下穿刺,上述并发症的发病风险仍比较高。因此,国内外在诊断NAFLD时,已极少使用肝穿刺组织活检的方法。可用于NAFLD诊断的影像学检查主要依赖超声、计算机断层扫描(CT)、磁共振(MR)等。影像学检查的优势是无侵入性、普遍使用,但费用仍相对较高,而且不易发现早期肝脏纤维变性和脂肪变性^[3]。影像学检查结果表明肝脏出现脂肪变性及纤维化时,患者可能已处于NASH或肝硬化阶段。此时再进行临床护理及治疗,很难实现肝脏病变的逆转。肝功能检测指标主要包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)等,费用低,而且操作简便、快捷。但是,影响肝功能检测结果的疾病较多,易导致检测结果出现一定的差异,对临床诊断以带来一定的干扰。因此,上述肝功能指标检测对NAFLD的诊断意义较小。越来越多的研究更专注于寻找NAFLD患者体内具有高敏感性与特异性的血清学标志物,例如细胞角蛋白18(CK18)、脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(A-FABP)等^[3]。

2 血清 CK18 及其裂解物在 NAFLD 诊断中的研究现状

CK18 属于 I 型细胞角蛋白,生理情况下可与 II 型细胞角

蛋白形成异聚物,表达于消化器官的简单上皮细胞,对维持细胞结构具有重要作用。CK18 是与细胞凋亡相关的蛋白,在细胞凋亡或坏死后,CK18 及其裂解物可出现在外周循环中。外周循环中的 CK18 与细胞坏死有关,而 CK18 的裂解物与细胞凋亡有关。由于最早是在肿瘤患者外周血中发现 CK18 呈高水平,因此 CK18 一度被认为具有较高的肿瘤敏感性及特异性,而随后的研究发现,在早期 NAFLD 患者中,CK18 及其裂解物的水平亦呈特异性增高^[4-5]。Lavallard 等^[6]的研究发现,在 143 名重度饮酒患者中,肝脏重度纤维化的患者血清 CK18 与 CK18 裂解物水平均明显高于肝脏轻度纤维化的患者,而且 CK18 与 CK18 的裂解物预测肝细胞纤维化的受试者工作特征曲线下面积(AUROC)分别是 0.84 和 0.76。NAFLD 的进展与肝实质细胞变性、坏死和凋亡密切相关,而外周循环 CK18 有望成为诊断 NAFLD 的生物标志物。Maliken 等^[7]证实了 NAFLD 患者肝细胞氧化应激作用与血清 CK18 水平的关系,其研究结果显示,NAFLD 患者血清丙二醛、CK18 及其裂解物水平升高,硫氧化还原蛋白水平下降,表明氧化应激作用能够促进 NAFLD 的进展,而血清 CK18 及其裂解物的水平随着肝细胞坏死、凋亡程度增加而升高。外周循环 CK18 及其裂解物水平与肝细胞坏死水平呈正相关,而 NAFLD 患者肝细胞在“双重打击”的作用下,其纤维化及坏死程度更严重。

一项荟萃分析显示,外周循环 CK18 水平诊断 NAFLD 的 AUROC、敏感度及特异度分别为 0.82、0.78、0.87,只有结合肝穿刺组织活检,才能对患者是否存在肝纤维化坏死进行诊断^[8]。另一项研究纳入了 121 例 NAFLD 患者,检测结果显示,血清 CK18 与 CK18 裂解物的水平在肝脏轻、中、重度纤维化的患者间有明显的差异,但是只有 CK18 能够区分肝脏轻度纤维化与重度纤维化的程度;轻微肝脏脂肪变性的 NASH 患者血清 CK18 与 CK18 裂解物水平与健康者比较均存在一定的差异,而且 CK18 水平的差异更加明显,说明与血清 CK18 裂解物相比,血清 CK18 水平对 NAFLD 患者肝脏轻微脂肪变性和健康者轻微脂肪变性的鉴别能力更强^[4]。NAFLD 具有不确定的遗传倾向,进展为 NASH 的儿童患者 CK18 及其裂解物水平显著高于非 NASH 的 NAFLD 患儿,说明 CK18 有望成为 NASH 患儿非侵入性诊断标志物之一^[9]。也有证据表明,NASH 患者血清中的 CK18 裂解物演变物凋亡蛋白 3、可溶性凋亡蛋白、可溶性凋亡蛋白配体水平均明显高于非 NASH 患者,CK18 裂解物与 sFas 诊断 NASH 的敏感度和准确度分别为 88% 和 89%,二者联合检测则可进一步提高对 NASH 的诊断效能^[10]。有研究报道,短期的规律运动能够降低 NAFLD 患者血清 ALT、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、

[△] 通讯作者, E-mail: gongjianping11@126.com。

CK18、可溶性凋亡蛋白和可溶性凋亡蛋白配体的水平,其中血清 CK18 水平与 ALT 水平存在一定的相关性($r=0.55, P<0.05$),说明逆转 NAFLD 患者肝脏脂肪变性程度,可降低患者血清 CK18 水平^[11-12]。

外周循环 CK18 水平在 NAFLD 早期即可出现特异性变化,对早期诊断 NAFLD 有重要意义。但是由于现有研究提出的 NAFLD 诊断标准不一致,不同研究中的患者外周循环 CK18 水平升高程度也无法比较,价值尚缺乏严格的随机对照临床试验,导致目前尚没有可用于衡量肝脏脂肪变性程度的统一标准。因此,在 NAFLD 的相关诊断、治疗指南中,并不推荐以外周循环 CK18 水平作为诊断标准^[3]。如何制定统一的衡量肝脏脂肪变性的标准,以及通过涉及 NAFLD 患者治疗转归的随机对照试验探讨外周循环 CK18 水平的变化,尚需进一步研究。

3 血清 A-FABP 对 NAFLD 的诊断意义

一旦肝脏出现脂肪变性及坏死,外周循环 CK18 水平即可出现非特异性升高,需要联合检测其他具有较高特异性及敏感性的标志物以提高 NAFLD 的早期诊断阳性率。摄入过量的脂肪酸或者所摄入的高能量物质不能消耗而完全聚集于体内,很容易引起脂毒性作用。机体自我防卫系统产生的脂肪酸结合蛋白(FABP)与长链脂肪酸结合,而 A-FABP 是其中的一种^[13]。A-FABP 是脂质结合蛋白的分子伴侣,主要在脂肪细胞和激活的巨噬细胞中表达。A-FABP 的主要作用是调节细胞内外脂质的交换,进而调节脂质代谢水平以及相关基因的表达。外周循环 A-FABP 水平与肥胖相关疾病,如 1 型和 2 型糖尿病、冠心病、血管粥样硬化等密切相关。在脂质代谢异常患者体内,A-FABP 和血管假性血友病因子(vWF)存在正相关关系。A-FABP 在血管内皮功能失调过程中的作用可以解释肥胖在心血管疾病的作用机制。此外,A-FABP 还被认为代谢综合征外周循环标志物之一^[14-17]。A-FABP 通过 Jun-氨基末端激酶(JNK)和激活蛋白 1(AP-1)的负反馈作用增强脂多糖(LPS)诱导的脂毒性,从而使机体产生更多的促炎因子和细胞因子^[18]。持续性炎症刺激可激活肝细胞及巨噬细胞固有免疫反应,最终促进肝脏脂肪变性及纤维化等不可逆的病变。

在肥胖人群中,A-FABP 水平与胰岛素抵抗能力密切相关,因此 A-FABP 被认为是肥胖相关疾病及胰岛素抵抗的外周循环标志物之一^[13]。NAFLD 是与胰岛素抵抗和遗传易感因素相关的代谢性肝脏损伤,危险因素包括肥胖相关性血管粥样硬化、胰岛素抵抗、血脂异常等。Kim 等^[19]的研究发现,血清 A-FABP 水平升高与 NAFLD 明显呈正相关,而且与年龄、性别、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、内环境稳态模型评估胰岛素抵抗指数、代谢综合征等也明显相关;在 2 型糖尿病伴 NAFLD 患者中,血清 A-FABP 水平明显升高,而与其他危险因素,如体质量指数(BMI)、腰围、内环境稳态模型评估胰岛素抵抗指数、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇和急性反应蛋白无相关性。Yoon 等^[20]的研究则表明,内脏器官 A-FABP 表达水平升高有可能导致血脂异常,肝脏累积大量脂肪可刺激 A-FABP 的高表达,从而促进 NAFLD 向 NASH 进展。Hoo 等^[18]研究报道,在由 LPS 诱导的急性肝损伤和 NAFLD 模型中,A-FABP 通过增强 Kupffer 细胞的固有免疫应答,促进炎症反应,并加重肝细胞损伤、坏死、纤维化等病变程度,从而促

进 NAFLD 向不可逆的方向进展;此外,通过药理机制抑制 A-FABP 的表达,可以明显减轻急性肝损伤和 NAFLD 病变程度。由此可见,A-FABP 极有可能成为诊断 NAFLD 的重要生物标志物。

4 小 结

目前对于联合检测外周循环 CK18 及 A-FABP 水平以诊断 NAFLD 的随机对照诊断性实验尚无报道,而上述的研究已证实外周循环 CK18 与 A-FABP 的水平与 NAFLD 患者肝脏炎症反应和纤维化程度均密切相关,有望成为诊断 NAFLD 的生物标志物。

参考文献

- [1] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2006, 43(2): 99-112.
- [2] Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(1): 204-210.
- [3] Chalasani N, Yoanossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterology Association[J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 2005-2023.
- [4] Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin18[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1751-1756.
- [5] Joka D, Wahl K, Moeller S, et al. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2012, 55(2): 455-464.
- [6] Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, et al. Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease[J/OL]. *PLoS One*, 2011-03-18[2013-12-27], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445263>.
- [7] Maliken BD, Nelson JE, Klintworth HM, et al. Hepatic reticuloendothelial system cell iron deposition is associated with increased apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2013, 57(5): 1806-1813.
- [8] Musso G, Gambino R, Cassader M, et al. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity[J]. *Annals Medicine*, 2011, 43(8): 617-649.
- [9] Feldstein AE, Alkhouri N, De Vito R, et al. Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children[J]. *Am Gastroenterol*, 2013, 108(9): 1526-1531.
- [10] Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhouri N. (下转第 525 页)

步提高细胞的抗瘤功能,进而达到更好的抗瘤效果。

总而言之,随着研究的不断深入,细胞因子诱导杀伤细胞的抗肿瘤效果将不断提高,其他的病毒细胞载体也在不断被发现和应用;靶向治疗的细胞载体也将能够更加安全、高效地发挥运载病毒的功能,具有更加理想的抗瘤效果。

参考文献

[1] 王树斌,袁飞,武云. 纳米载体在肿瘤靶向治疗中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(29): 5739-5742.

[2] 刘杏娥,孙晓东,吴金民. MAGE-3 DNA 疫苗的构建及其免疫效果的观察[J]. 生物工程学报, 2004, 20(2): 165-169.

[3] 杨文字,黄宗海. 肿瘤基因治疗阳离子载体应用中的问题与策略[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(2): 191-194.

[4] 戴维德. LDL 受体在光动力学治疗肿瘤过程中对靶细胞吸收光敏剂的影响[J]. 中国激光医学杂志, 2004, 13(1): 67.

[5] 肖樟生. 由肿瘤特异性启动子 mTERT promotor 驱动的 m4-1BBL 基因治疗小鼠肝细胞肝癌的实验研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.

[6] 倪芳,鲁茁壮,王立生. 靶向性腺病毒载体的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(2): 188-191.

[7] 宋现让,迟伟玲,魏玲,等. 慢病毒 shRNA 表达载体介导人肿瘤细胞基因稳定沉默的影响因素[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(2): 19-23.

[8] 曹利民,潘宇红. 受体介导的基因转移治疗肿瘤的研究现状[J]. 南通医学院学报, 2003, 23(1): 109-111.

[9] 刘海峰,房殿春. 肿瘤靶向治疗[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(16): 1491-1493.

[10] 张明明,邱峰. 基因治疗载体的研究进展[J]. 科技资讯, 2011, 8(17): 225.

[11] 葛葵葵. NK 细胞活化受体 CD226 的表达及功能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2009.

[12] 张婷,赵迎泽,罗进勇,等. HBX 基因逆转录病毒载体的构建及在 LO2 细胞内的稳定表达[J]. 南方医科大学学报, 2010, 5(7): 1526-1529.

[13] 李跃萍,宋丽萍,邱曙东. 慢病毒载体在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(12): 1614-1617.

[14] 贾玉. Herceptin-NKG2D 配体融合蛋白的抗肿瘤研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2010.

[15] 范黎. 壳聚糖智能靶向抗肿瘤药物运载系统研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2010.

[16] 林凤秋. 基因治疗及其在遗传性血液病中的应用[J]. 国际输血及血液学杂志, 2010, 8(4): 371-373.

[17] 陈娟,余英豪. 淋巴瘤基因治疗相关技术的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2010, 4(1): 88-90.

[18] 丁凡,邵增务. 骨肉瘤基因治疗研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 16(17): 1326-1328.

[19] 陆晓. 阳离子聚合物 PC 偶联小分子药物协同基因的抗肿瘤活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.

[20] 曾宪成,陈伟,张彤. 人类白细胞抗原-G RNA 干扰载体的构建及效应检测[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012, 9(7): 712-717.

(收稿日期: 2013-07-23 修回日期: 2013-09-29)

(上接第 523 页)

et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis[J]. J Hepatol, 2011, 54(6): 1224-1229.

[11] Fealy CE, Haus JM, Solomon TP, et al. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Appl Physiol, 2012, 113(1): 1-6.

[12] Choromanska B, Mysliwiec P, Dadan J, et al. The clinical significance of fatty acid binding proteins[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2011, 65(4): 759-763.

[13] Koh JH, Shin YG, Nam SM, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels are associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Care, 2009, 32(1): 147-152.

[14] Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Bednarz-Misa I, et al. Circulating adipocyte fatty acid-binding protein, juvenile obesity, and metabolic syndrome[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2011, 24(7): 921-928.

[15] Huang CL, Wu YW, Wu CC, et al. Association between serum adipocyte fatty-acid binding protein concentrations, left ventricular function and myocardial perfusion abnormalities in patients with coronary artery disease[J/OL]. Cardiovasc Diabetol, 2013-07-17 [2013-12-27], ht-

tp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23866022.

[16] Kim TN, Won JC, Kim YJ, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels are independently associated with sarcopenic obesity [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2013, 101(2): 210-217.

[17] Karasek D, Vaverkova H, Frysak Z, et al. Relationship between serum adipocyte fatty acid-binding protein and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2012, 33(2): 26-31.

[18] Hoo RL, Lee IP, Zhou M, et al. Pharmacological inhibition of adipocyte fatty acid binding protein alleviates both acute liver injury and non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. J Hepatol, 2013, 58(2): 358-364.

[19] Kim YC, Cho YK, Lee WY, et al. Serum adipocyte-specific fatty acid-binding protein is associated with nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy subjects[J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(3): 289-292.

[20] Yoon MY, Sung JM, Song CS, et al. Enhanced A-FABP expression in visceral fat potential contributor to the progression of NASH [J]. Clin and Mol Hepatol, 2012, 18(3): 279-286.

(收稿日期: 2013-09-12 修回日期: 2013-12-02)