

乙肝肝硬化患者血清 CTHRC1 及 TGF- β_1 相关性研究^{*}

张 华¹, 龚心德², 江道龙¹, 顾 翔¹, 李 毅¹, 刘兴晖^{3△} (湖北医药学院附属东风医院: 1. 检验科; 2. 超声科, 湖北十堰 442008; 3. 上海市浦东新区公利医院检验科 200135)

【摘要】 目的 研究乙肝病毒(HBV)致肝硬化患者血清胶原三股螺旋重复蛋白 1(CTHRC1)表达水平, 分析其与疾病病程的关系。**方法** HBV 感染确诊肝硬化患者, 测定总胆红素(TBIL), 清蛋白(ALB), 凝血酶原时间(PT), 根据测定结果对患者进行评分, 分级为 A、B、C 三级, 分为三组, 测定各组透明脂酸酶(HA), 层粘连蛋白(LN), Ⅲ型前胶原氨基端肽(PⅢNP), Ⅳ型胶原(CⅣ)血清浓度以了解各组患者肝纤维化状态, B 超检测三组患者门静脉内径以了解各组肝脏功能状态, 采用 ELISA 法检测三组患者血清 CTHRC1, 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 浓度。**结果** B、C 组 HA、LN、PⅢNP、CⅣ均明显高于 A 组和对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), A 组与对照组各指标浓度差别不大, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 各组肝硬化患者门静脉内径均明显大于对照组, B 组与 A 组, C 组与 A 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); A、B、C 组 CTHRC1 及 TGF- β_1 浓度均高于对照组, 且随着临床分期分值升高而升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 随着肝硬化患者临床分期进展及肝功能下降, 血清 CTHRC1 及 TGF- β_1 浓度上升, 两者具有一定的相关性, 其机制需要进一步研究。

【关键词】 胶原三股螺旋重复蛋白 1; 乙肝肝硬化; 相关性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.05.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)05-0583-03

Correlation between serum level of CTHRC1 and TGF- β_1 in patients with hepatitis B cirrhosis^{*} ZHANG Hua¹, GONG Xin-de², JIANG Dao-long¹, GU Xiang¹, LI Yi¹, LIU Xing-hui^{3△} (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Ultrasound, Affiliated Dongfeng Hospital of Hubei Medical University, Shiyan, Hubei 442008, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Gongli Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200135, China)

【Abstract】 Objective To research the serum expression level of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) in the patients with HBV caused cirrhosis, and to analyze its relationship with disease course. **Methods** TBIL, ALB and PT were detected in the patients with definitely diagnosed cirrhosis caused by HBV infection. Then the patients were scored according to the detecting results and divided into the grade A, B and C. The serum levels of HA, LN, PⅢNP and CⅣ were detected in 3 groups for understanding the liver fibrosis status. B-ultrasound was performed to detect the portal vein diameter for understanding the liver function state in each group. The serum CTHRC1 and TGF- β_1 levels were detected by ELISA. **Results** The levels of HA, LN, PⅢNP and CⅣ in the group B and C were significantly higher than that in the group A and the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$), but which had little differences between the group A and the control group, showing no statistical significance ($P > 0.05$); the portal vein diameter of the liver cirrhosis patients in each group was significantly greater than that in the control group, which had statistical difference between the group B and A and between the group C and A ($P < 0.05$); the CTHRC1 and TGF- β_1 levels in the group A, B and C were higher than those in the control group, moreover which were increased with the clinical stage elevation, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Along with the clinical staging progress and liver function decline in the patients with liver cirrhosis, serum CTHRC1 and TGF- β_1 levels are increased, both has certain correlation, but its mechanism needs further research.

【Key words】 collagen triple helix repeat containing 1; HBV related cirrhosis; correlation

哺乳动物胶原三股螺旋重复蛋白 1(CTHRC1)基因最先是在健康大鼠动脉和球状损伤动脉的差异表达序列筛选中发现^[1]。本研究检测乙肝病毒(HBV)致肝硬化患者体内 CTHRC1 表达水平, 结合肝纤维化检查结果和影像资料, 分析其与疾病进程的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年确诊为 HBV 致肝硬化患者 67

例, 根据 Child-Pugh 分级, 将 67 例患者分组为 CP 分级 A 级(A 组)31 例, CP 分级 B 级(B 组)22 例, CP 分级 C 级(C 组)14 例。选择同期健康体检者 20 例作为健康对照组, 所有患者及健康体检者均排除心、脑、肾等重要器官疾病及其他嗜肝病毒的感染。

1.2 仪器与试剂 总胆红素(TBIL)试剂购自上海德赛, 清蛋白(ALB)试剂为贝克曼原装试剂, 凝血酶原时间(PT)试剂来

^{*} 基金项目: 湖北省教育厅资助项目(D20122404); 十堰市科技局资助项目(2014DY34); 浦东新区卫生系统重点学科项目(PWZx2014-03)。

作者简介: 张华, 男, 硕士, 主管技师, 主要从事生物化学检验方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: syliuxh@163.com。

自日本第一化学,三个指标均采用 BIO-RAD 室内质控品,当天室内质控均在控。CTHRC1 抗体购自 Santa cruz 公司。CTHRC1 和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 检测采用 ELISA 法, TBIL 和 ALB 均用贝克曼 DXC800 自动生化分析仪,PT 检测用 STAGO 血凝分析仪,肝纤维化指标[透明脂酸酶(HA),层粘连蛋白(LN),Ⅲ型前胶原氨基端肽(PⅢNP),Ⅳ型胶原(CⅣ)]的检测应用 MAGNUM12000 检测系统。腹部 B 超测量门静脉主干内径,采用 PHILIPS 彩超 HD9 系统。

1.3 方法

1.3.1 血清 CTHRC1 检测 采用 ELISA 法将采集的患者及健康者血清按 1:20 稀释,加入 96 孔高结合力酶标板(购自 JETPLATES 公司),每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C,1 h,1 $\times$ PBS 洗涤 3 次,质量分数 5%脱脂奶粉封闭,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C,1 h,1 $\times$ PBS 洗涤 3 次;每孔加 1:600 稀释的 CTHRC1 多克隆抗体 100 μ L,37 $^{\circ}$ C,1 h,1 $\times$ PBS 洗涤 5 次,每孔加 1:2 000 稀释的二抗 100 μ L,37 $^{\circ}$ C,30 min,1 $\times$ PBS 洗涤 5 次,然后加入底物显色液,37 $^{\circ}$ C,20 min,然后终止反应,测 OD_{450} 值。

1.3.2 血清 TGF- β_1 检测 采用 ELISA 法,试剂由美国 Rapid Bio 公司提供已稀释血清与标准品一起加入已包被抗人 TGF- β_1 单抗的酶标板上混匀 10 s,加入 Biotin anti-TGF-Betal 混匀 30 s,37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,反复洗涤 5 次,加入辣根过氧化物酶混匀 10 s,37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 洗板 5 次,然后加入四甲基联苯胺显色液混匀 10 s 后置于暗处温育 20 min,最后加入终止

液混匀后 15 min 内测 OD_{450} 值。以上均严格按照操作步骤进行。
1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数比较采用方差分析。以 $\alpha=0.05$ 为检验标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组临床生化指标比较 对照组 TBIL、ALB 与 A 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),B、C 组 TB 均大于对照组;B、C 组 ALB 均小于对照组;对照组 PT 与 A、B、C 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),A、B、C 组 PT 与对照组比较均明显延长。见表 1。

表 1 各组临床生化指标比较($\bar{x}\pm s$)						
指标	对照组	A 组	B 组	C 组	F	P
TB(μ mol/L)	13.4 $\pm$ 2.3	28.0 $\pm$ 3.16	49.4 $\pm$ 2.97	165.0 $\pm$ 28.2	178.54	0.000
ALB(g/L)	37.6 $\pm$ 1.82	37.2 $\pm$ 1.64	29.4 $\pm$ 2.7	27.0 $\pm$ 1.58	39.25	0.000
PT(s)	13.0 $\pm$ 0.71	14.8 $\pm$ 0.84	17.6 $\pm$ 0.89	24.8 $\pm$ 1.48	116.82	0.000

2.2 肝纤维化结果 肝硬化各评分组及健康对照组血清 HA、LN、PⅢNP、CⅣ浓度 B、C 组各指标均明显高于 A 组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);A 组与对照组各指标浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组血清浓度比较($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组	A 组	B 组	C 组	F	P
HA(ng/mL)	63.2 $\pm$ 14.0	62.2 $\pm$ 17.8	170.8 $\pm$ 28.6	433.9 $\pm$ 57.7	131.75	0.000
LN(ng/mL)	71.6 $\pm$ 17.1	74.5 $\pm$ 15.5	196.5 $\pm$ 38.5	322.8 $\pm$ 53.8	58.14	0.000
PⅢNP (ng/mL)	64.0 $\pm$ 14.5	66.0 $\pm$ 16.6	174.6 $\pm$ 35.9	263.4 $\pm$ 68.7	28.43	0.000
CⅣ(ng/mL)	52.8 $\pm$ 13.8	52.4 $\pm$ 13.0	101.5 $\pm$ 21.1	193.5 $\pm$ 41.0	35.53	0.000

2.3 门静脉内径比较 对照组门静脉内径为(10.00 $\pm$ 0.11)mm,A 组为(11.50 $\pm$ 0.03)mm,B 组为(13.50 $\pm$ 0.06)mm,C 组为(14.30 $\pm$ 0.14)mm,各组肝硬化患者门静脉内径均明显大于对照组,B 组与 A 组,C 组与 A 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),证明门静脉主干内径越宽,肝功能分级越差。

2.4 血清 CTHRC1 及 TGF- β_1 浓度 肝硬化各评分组及健康对照组血清 CTHRC1、TGF- β_1 浓度见表 3。A、B、C 组 CTHRC1 及 TGF- β_1 浓度均高于对照组,且随着临床分期分值升高而升高,差异有统计学意义($P<0.05$),运用 Pearson 相关统计血清 CTHRC1 及 TGF- β_1 浓度之间的相关性表明,两者之间有一定的相关性($r=0.729$)。

表 3 各组血清 CTHRC1 及 TGF- β_1 浓度比较($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

指标	对照组	A 组	B 组	C 组	F	P
CTHRC1	32.8 $\pm$ 3.9	36.8 $\pm$ 2.8	41.2 $\pm$ 3.7	43.4 $\pm$ 2.2	10.53	0.000
TGF- β_1	59.2 $\pm$ 14.8	128.6 $\pm$ 18.0	208.0 $\pm$ 31.8	412.2 $\pm$ 58.2	94.58	0.000

3 讨 论

本研究中,血清 CTHRC1 与 TGF- β_1 浓度在各期慢性乙肝肝硬化患者均升高且随着肝硬化程度加重而明显升高。

CTHRC1 被确定为受特定表达于受损的动脉内外膜的 TGF- β_1 家族的调控的新基因,其表达水平与 TGF- β_1 、骨成型蛋白-4(BMP4)有关,序列分析发现在 CTHRC1 的启动子区域有一个 SMAD 位点,该位点与 TGF- β_1 和 BMP4 的调控有关,同时作为一种 TGF- β_1 细胞特异性的抑制子,它可以反过来通过逆转 TGF- β_1 的某些作用影响胶原蛋白 I 和Ⅲ的沉积,新生血管的形成以及平滑肌细胞的分化^[2-4]。

研究证明,在大鼠主动脉损伤处新生内膜平滑肌细胞及新生动脉外膜成纤维细胞都有短暂表达 CTHRC1 基因^[5]。结扎小鼠颈动脉可以引起动脉外膜胶原蛋白沉积,但是以巨细胞病毒启动子调控过度表达 CTHRC1 的转基因小鼠被结扎颈动脉后这一反应减弱^[2]。在大鼠成纤维细胞中该基因的高表达会促进细胞迁移并抑制 I 型胶原的合成,从而提示 CTHRC1 通过限制胶原基质沉积和促进细胞迁移参与了血管的损伤修复。Yoo 等^[6]研究发现,HBV 病毒能在感染的早期就导致 TGF- β_1 表达升高,并且 HBV 感染后的一系列并发症,包括肝硬化、肝癌等,均与 TGF- β_1 的表达有关^[7-9]。对肝纤维化发病机制的研究结果表明,肝星状细胞的激活与转化是促进细胞外基质(ECM)沉积的主要因素,TGF- β_1 诱导 α -平滑肌肌动蛋白的生物合成除了需要信号转导蛋白 3(Smad3)的参与外,还包括局

部黏着斑激酶,c-Jun 氨基末端激酶,TGF- β_1 激活蛋白激酶和 PI3K/Akt 等通路;除了在纤维原细胞转分化过程中发挥作用外,TGF- β_1 还可以加速 ECM 合成和改变 ECM 合成-分解之间信号的平衡,从而促进 ECM 的沉积,同时通过 Smad3 途径强烈地刺激 I 型胶原蛋白的合成^[10]。Wang 等^[11] 在研究 CTHRC1 浓度在人类胃癌进程中发现,TGF- β_1 会导致 CTHRC1 基因和蛋白表达均升高。CTHRC1 被视为是 TGF- β_1 细胞特异性抑制因子,在瘢痕组织中,TGF- β_1 刺激胶原蛋白 I 蛋白产生而 CTHRC1 能逆转该过程^[12]。

本研究中,CTHRC1 与 TGF- β_1 血清水平均升高,有可能是因为 HBV 病毒感染导致 TGF- β_1 水平升高,进而导致 CTHRC1 水平升高,这一观点需要进一步研究。

参考文献

[1] Tang L,Dai DL,Su M,et al. Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid[J]. Clin Cancer Res,2006,12(12):3716-3722.

[2] Leclair RJ,Durmus T,Wang Q,et al. CTHRC1 is a novel inhibitor of transforming growth factor-beta signaling and neointimal lesion formation[J]. Circ Res,2007,100(6):826-833.

[3] Durmus T,Leclair RJ,Park KS,et al. Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 [J]. Gene Expr Patterns,2006,6(8):935-940.

[4] Leclair R,Lindner V. The role of collagen triple helix repeat containing 1 in injured arteries, collagen expression, and transforming growth factor beta signaling[J]. Trends Cardiovasc Med,2007,17(6):202-205.

[5] Pygay P,Heroult M,Wang Q,et al. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured [J]. Circ Res,2005,96(2):261-268.

[6] Yoo YD,Ueda H,Park K,et al. Regulation of transfor-

ming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator[J]. J Clin Invest,1996,97(2):388-395.

[7] Perez ARC,Honore SM,Genta SB,et al. Hepatic fibrogenesis and transforming growth factor/Smad signaling activation in rats chronically exposed to low doses of lead [J]. J Appl Toxicol,2014,34(12):1320-1331.

[8] Feng T,Dzieran J,Gu X,et al. Smad7 regulates compensatory hepatocyte proliferation in damaged mouse liver and positively relates to better clinical outcome in human hepatocellular carcinoma[J]. Clin Sci,2015,128(11):761-774.

[9] Dhanasekaran R,Nakamura I,Hu C,et al. Activation of the transforming growth factor- β /SMAD transcriptional pathway underlies a novel tumor-promoting role of sulfatase 1 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2015,61(4):1269-1283.

[10] Dobaczewski M,Bujak M,Li N,et al. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction[J]. Circ Res,2010,107(3):418-428.

[11] Wang P,Wang YC,Chen XY,et al. CTHRC1 is upregulated by promoter demethylation and transforming growth factor- β_1 and may be associated with metastasis in human gastric cancer[J]. Cancer Sci,2012,103(7):1327-1333.

[12] Li J,Cao J,Li M,et al. Collagen triple helix repeat containing-1 inhibits transforming growth factor-b1-induced collagen type I expression in keloid[J]. Br J Dermatol,2011,164(5):1030-1036.

(收稿日期:2015-07-25 修回日期:2015-09-28)

(上接第 582 页)

定的参考测量系统。在有条件的情况下,要使患者在不同测量系统的测量结果都能达到准确可比的目标,最终测量结果还是应溯源至一级参考方法的结果。

参考文献

[1] 杨振华. 临床酶学展望与标准化[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(12):726-728.

[2] 徐国宾,吴南,王清涛. 要重视血清酶学测定的标准化工作[J]. 临床检验杂志,2007,25(3):161-164.

[3] 黄亨建,李增安,李萍,等. 替代评价方法评价定量分析结果的一致性[J]. 临床检验杂志,2006,24(5):380-381.

[4] 陈宝荣. 临床检验结果量值溯源存在的问题与思考[J]. 临床检验杂志,2012,30(12):943-945.

[5] 孙慧颖,陈宝荣,邵燕,等. 北京市临床实验室 GGT、CK、LDH 及 α -AMY 测量结果的正确度调查[J]. 临床检验杂

志,2013,31(6):459-463.

[6] Panteghini M,Forest JC. Standardization in laboratory medicine:new challenges[J]. Clin Chim Acta,2005,355(1/2):1-12.

[7] Thienpont LM, Van Uytanghe K,De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry[J]. Clin Chim Acta,2002,323(1/2):73-87.

[8] 张秀明,庄俊华,徐宁,等. 不同检测系统 4 种心肌酶测定结果的比对与临床可接受性评价[J]. 临床检验杂志,2005,23(6):404-407.

[9] 陈宝荣. “方法学比较”法评价临床检验定量测量方法正确度时应注意的问题与对策[J]. 临床检验杂志,2012,30(10):821-825.

(收稿日期:2015-06-28 修回日期:2015-09-10)