

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.02.001

外周血 ALDH7A1 mRNA 表达水平对乙肝后肝硬化患者 Child 分级和预后的评估价值

詹有芳¹, 张 珏^{1△}, 王 鹏²

1. 上海中医药大学附属曙光医院检验科, 上海 200021; 2. 上海市浦东新区妇幼保健院检验科, 上海 201206

摘 要:目的 研究外周血乙醛脱氢酶(ALDH7A1)mRNA 表达水平对乙肝后肝硬化患者 Child 分级和预后的评估价值。方法 收集健康志愿者(健康对照组)30 例, 乙肝后肝硬化患者 90 例(Child A、B、C 级各 30 例)作为研究对象, 检查临床生化指标, 记录患者并发症发生情况, 采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应检测外周血 ALDH7A1 mRNA 表达水平。结果 乙肝后肝硬化各 Child 分级组患者 ALDH7A1 mRNA 表达水平均较健康对照组明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与 Child A 级组比较, Child B 级组和 Child C 级组 ALDH7A1 mRNA 表达水平均明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ALDH7A1 与丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、清蛋白、总胆红素、透明质酸、Child 得分等多项指标有明显相关性($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, ALDH7A1 mRNA 表达水平识别 Child A 级和 B 级的能力较强, ROC 曲线下面积(AUC)为 0.859, 识别 Child B 级和 C 级的能力较弱, AUC 为 0.681。同时出现食管胃底静脉曲张、消化道出血、自发性腹膜炎、脾大等并发症的患者 ALDH7A1 mRNA 表达水平明显低于无这些并发症的患者, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ALDH7A1 可能是乙肝后肝硬化疾病进展监控和预后判断的一项潜在生物标志物, 对乙肝后肝硬化的早期 Child 分级诊断和预后指导具有重要参考价值。

关键词: 乙醛脱氢酶; 乙肝后肝硬化; Child 分级

中图分类号: R446.1; R575.2

文章编号: 1672-9455(2020)02-0145-04

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The value of peripheral blood ALDH7A1 mRNA in evaluation on Child grading and prognosis in HBV-related liver cirrhosis patients

ZHAN Youfang¹, ZHANG Jue^{1△}, WANG Peng²

1. Department of Clinical Laboratory, Shuguang Hospital of Shanghai Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Pudong District, Shanghai 201206, China

Abstract: Objective To explore the value of acetaldehyde dehydrogenase (ALDH7A1) mRNA on Child grading and prognosis in liver cirrhosis patients. **Methods** A total of 30 healthy controls (control group) and 90 liver cirrhosis patients were recruited. In patients, Child A, B and C had 30 patients respectively. Clinical parameters were collected, and complications were recorded. QRT-PCR was performed to detect the mRNA level of ALDH7A1. **Results** Compared with control group, ALDH7A1 mRNA were significantly lower in Child A, B and C groups ($P < 0.05$). Compared with Child A group, ALDH7A1 mRNA of Child B and C groups were significantly lower ($P < 0.05$). ALDH7A1 had correlation with alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, albumin, total bilirubin, hyaluronic acid and Child score ($P < 0.05$). ROC analysis showed that ALDH7A1 had a higher AUC value (0.859) in differential diagnosis of Child A and Child B, and had a lower AUC value (0.681) in differential diagnosis of Child B and Child C. Furthermore, ALDH7A1 mRNA levels of patients with esophageal and gastric varice, gastrointestinal hemorrhage, spontaneous peritonitis and splenomegaly were significantly lower than those without complications ($P < 0.05$). **Conclusion** ALDH7A1 may be a potential biomarker for Child grading and prognosis in liver cirrhosis patients which has important diagnostic value.

Key words: acetaldehyde dehydrogenase; liver cirrhosis; Child grading

肝硬化是我国常见疾病之一, 它是由不同病因引起的慢性进行性弥漫性肝病, 病理上以肝脏弥漫性纤

维化、再生结节和假小叶形成为特征^[1-2]。肝硬化患者起病较为隐匿, 病程持续较长, 发展缓慢^[3], 是导致

肝移植、肝癌及肝病相关死亡的重要危险因素^[4]。由于肝硬化病变较难控制,使患者生存质量和生存时间都受到严重影响。因此,准确评估肝硬化患者的严重程度对监测疾病进展和判断疾病预后具有重要参考价值^[5]。本研究检测了外周血乙醛脱氢酶(ALDH7A1)家族成员 ALDH7A1 mRNA 在不同 Child 分级乙肝后肝硬化患者中的表达水平,分析其与临床生化指标的相关性,进一步考察 ALDH7A1 对 Child 分级的诊断识别能力,以及与不同并发症的关系,旨在评估 ALDH7A1 在乙肝后肝硬化患者疾病进展和预后中的临床意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取乙肝后肝硬化患者 90 例,其中 Child A、B 和 C 级各 30 例作为乙肝后肝硬化组,参照《病毒性肝炎防治方案》^[6]中有关乙肝后肝硬化的诊断标准确诊并分级,其中男 60 例,女 30 例,年龄 37~62 岁,平均(50.05±1.21)岁。乙肝后肝硬化为慢性乙肝发展的结果,肝组织病理学表现为弥漫性肝纤维化及结节形成,二者必须同时具备才能诊断。(1)代偿性肝硬化指早期肝硬化,一般属 Child A 级,可有轻度乏力、食欲减弱或腹胀症状,尚无明显肝功能衰竭表现。血清清蛋白(ALB)水平降低,但仍≥35 g/L,血清总胆红素(TBIL)≤35 μmol/L,凝血酶原活动度>60%。血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平轻度升高,AST 水平可高于 ALT,γ-谷氨酰转移酶水平可轻度升高。可有门静脉高压,如轻度食管静脉曲张,但无腹水、肝性脑病或上消化道出血。(2)失代偿性肝硬化指中、晚期肝硬化,一般属 Child B、C 级,有明显肝功能异常及失代偿征象,如血清 ALB<35 g/L,明显黄疸,血清 TBIL>35 μmol/L,ALT 和 AST 水平升高,凝血酶原活动度<60%。患者可出现腹水、肝性脑病及门静脉高压引起的食管、胃底静脉明显曲张或破裂出血。Child 评分标准见表 1,将所记分数相加,根据总分为 A、B、C 级。A 级≤6 分;B 级>6~9 分;C 级>9 分。另选取健康志愿者 30 例作为健康对照组,其中男 20 例,女 10 例,年龄 35~60 岁,平均(47.63±12.37)岁。两组研究对象性别和年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

表 1 Child 肝功能分级评分标准

评分 (分)	腹水	血清 TBIL (μmol/L)	血清 ALB (g/L)	凝血酶原时间较正 常延长秒数(s)	肝性脑病
1	无	<34.2	>35	0~<4	无
2	少量	34.2~51.3	28~35	4~6	1~2 级
3	中等量以上	>51.3	<28	>6	3~4 级

1.2 排除标准 合并严重心、胆、肾、内分泌、造血系统及精神神经疾病者;妊娠或哺乳期妇女。

1.3 方法 标本及信息收集:采集各研究对象清晨空腹乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝静脉血 5 mL,用淋巴细胞分离液获取外周血单个核细胞,采用 TRIzol 试剂(Thermo,美国,型号:15596026)提取细胞总 RNA,−80 ℃保存待测。另抽取各研究对象静脉血 5 mL,分离血清,检测 ALT、AST、ALB、TBIL、透明质酸(HA)等临床指标水平。同时记录肝硬化患者食管胃底静脉曲张、消化道出血、自发性腹膜炎、脾大等并发症信息。实时荧光定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测:将总 RNA 反转录为 cDNA,采用 qRT-PCR 进行扩增,以 GAPDH 作为内参。ALDH7A1 上游引物序列:5'-CAT GGC GTG AGT GAA GGA C-3',下游引物序列:5'-CAG GGC AAT AGG TCG TAA TAA CC-3';GAPDH 上游引物序列:5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3',下游引物序列:5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'。PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min,然后进行 40 个循环(94 ℃变性 30 s,53 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s),最后 72 ℃延伸 5 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 ALDH7A1 mRNA 的相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐性则采用 t 检验或 One-Way ANOVA 方差分析进行比较,两组变量相关性采用 Pearson 相关分析,考察指标的诊断识别能力采用 ROC 曲线分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康对照组和乙肝后肝硬化组不同 Child 分级患者 ALDH7A1 mRNA 表达水平比较 见表 2。与健康对照组比较,乙肝后肝硬化组不同 Child 分级的患者 ALDH7A1 mRNA 表达水平均明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 Child A 级组比较,Child B 级组和 Child C 级组 ALDH7A1 mRNA 表达水平均明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 Child B 级组比较,Child C 级组 ALDH7A1 mRNA 表达水平虽有所下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 健康对照组和乙肝后肝硬化组不同 Child 分级的患者 ALDH7A1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

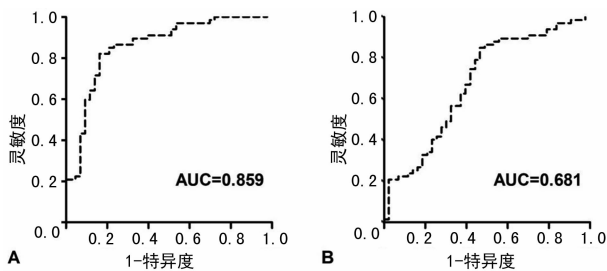
组别	<i>n</i>	年龄(岁)	ALDH7A1 mRNA
健康对照组	30	47.63±12.37	1.00±0.09
Child A 级组	30	45.71±8.62	0.57±0.12 [*]
Child B 级组	30	55.32±6.11	0.31±0.08 ^{*#}
Child C 级组	30	52.66±9.48	0.22±0.11 ^{*#}

注:与健康对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 Child A 级组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2 乙肝后肝硬化患者 ALDH7A1 mRNA 与临床生化指标的相关性分析 乙肝后肝硬化患者 ALT 水平为(102.51±62.07)U/L,AST 水平为(138.70±

72.35)U/L, ALB 水平为 (32.31 ± 15.46) g/L, TBIL 水平为 (58.18 ± 34.72) μ mol/L, HA 水平为 (218.16 ± 133.98) ng/mL, Child 得分为 (8.57 ± 4.32) 分。ALDH7A1 mRNA 表达水平与肝损伤指标 ALT、AST 呈负相关($r = -0.57$ 、 -0.59 , $P < 0.05$),与肝脏生物合成能力指标 ALB 呈正相关($r = 0.37$, $P < 0.05$),与肝脏解毒能力指标 TBIL 呈负相关($r = -0.72$, $P < 0.05$),与纤维化指标 HA 呈负相关($r = -0.64$, $P < 0.05$),与 Child 得分呈负相关($r = -0.539$, $P < 0.05$)。

2.3 ALDH7A1 mRNA 在不同 Child 分级的乙肝后肝硬化患者中 ROC 曲线分析 为衡量 ALDH7A1 mRNA 对不同 Child 分级的乙肝后肝硬化患者的诊断识别能力,对相邻 Child 分级之间进行 ROC 曲线分析见图 1,即 Child A 级组和 Child B 级组及 Child B 级组和 Child C 级组之间比较。ALDH7A1 mRNA 对 Child A 级和 Child B 级的识别能力较强,ROC 曲线下面积(AUC)为 0.859,而对 Child B 级和 Child C 级的识别能力较弱,AUC 仅为 0.681。



注:A 为 Child A 级和 Child B 级比较;B 为 Child B 级和 Child C 级比较。

图 1 乙肝后肝硬化患者不同 Child 分级间 ROC 曲线分析

2.4 乙肝后肝硬化患者有无并发症时 ALDH7A1 mRNA 表达水平比较 见图 2。90 例乙肝后肝硬化患者中出现食管胃底静脉曲张 58 例,消化道出血 48 例,自发性腹膜炎 29 例,脾大 33 例,与无并发症肝硬化患者比较,有并发症患者 ALDH7A1 mRNA 表达水平均明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

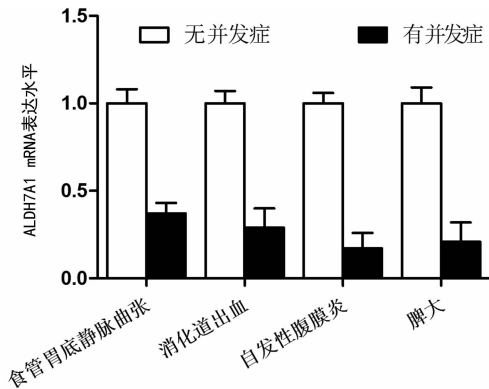


图 2 乙肝后肝硬化患者有无并发症时 ALDH7A1 mRNA 表达水平比较

3 讨论

肝硬化是一种严重的肝脏疾病,该类患者的疾病

进展监控和预后判断一直是临床研究的重要课题。早期肝硬化患者症状不甚明显,发展至后期则会出现肝功能衰竭、肝酶水平逐渐升高、门静脉高压等症状,甚至出现出血倾向^[7]。另一方面,肝硬化患者 5 年生存率高达 85% 以上,但发生腹水、肝肾综合征、肝性脑病等不良事件后会导致患者病情快速恶化,大幅度降低患者 5 年生存率^[8]。因此,对肝硬化患者进行早期诊断和改善预后是目前急需解决的问题。

ALDH7A1 是乙醛脱氢酶家族成员之一^[9],乙醛脱氢酶家族与生物氧化关系密切,是线粒体内重要的醛类氧化酶,能够氧化多种有害的芳香醛和脂肪醛,防止其对细胞膜的脂质过氧化,是机体重要的保护因子之一^[10]。脂质过氧化反应在 Kuffer 细胞和 Ito 细胞的激活及其胶原基因的表达,以及肝纤维化、肝硬化的形成过程中起重要作用,脂质过氧化反应可能是连接组织损伤、肝纤维化及肝硬化的纽带^[11]。有研究显示,ALDH7A1 能够缓解乙醛等醛类和氧化应激导致的细胞毒性^[12]。还有学者发现,ALDH7A1 在药物诱导的肝脂质变性中呈时间/剂量依赖性增加^[13]。

本研究采用 qRT-PCR 检测不同 Child 分级的乙肝后肝硬化患者外周血 ALDH7A1 mRNA 表达水平发现,随着 Child 分级增加,ALDH7A1 mRNA 表达水平逐渐下降,且 ALDH7A1 表达水平与肝损伤程度、肝生物合成能力、肝解毒能力、肝纤维化程度等多项临床指标具有相关性。进一步分析发现,ALDH7A1 mRNA 表达水平对乙肝后肝硬化早期的 Child A 级和 Child B 级识别能力较强,具有一定的早期诊断价值。同时,ALDH7A1 mRNA 低表达患者预后较差,可能出现食管胃底静脉曲张、消化道出血、自发性腹膜炎、脾大等多种并发症,说明 ALDH7A1 对乙肝后肝硬化的预后也具有一定指导意义。

综上所述,ALDH7A1 可能是乙肝后肝硬化疾病进展监控和预后判断的一项潜在生物标志物,在临床上具有重要参考价值。

参考文献

- [1] 王芳,王强,王莹,等.乙型肝炎肝硬化患者血清嗜酸性粒细胞趋化因子的变化及临床意义[J].中国卫生检验杂志,2018,28(18):2273-2275.
- [2] 张文忠.155 例肝硬化患者流行病学特征分析[J].实用肝脏病杂志,2012,15(1):55-56.
- [3] ROMANELLI R G, STASI C. Recent advancements in diagnosis and therapy of liver cirrhosis[J]. Current Drug Targets, 2016, 17(15):1804-1817.
- [4] TSOCHATZIS E A, BOSCH J, BURROUGHS A K. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2014, 383(9930):1749-1761.
- [5] 周文红,颜华东.乙型肝炎肝硬化流行病学调查及预后影响因素分析[J].中国预防医学杂志,2018,19(12):3-6.
- [6] 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(6):324-329.

(下转第 150 页)

庭男性精液检查结果,对不孕不育家庭的 182 例男性进行精液质量分析和精子畸形率检查,与进入 IVF 周期的男性和孕前检查结果均正常已正常生育的男性进行比较,结果显示,不育组精液量、精子浓度、精子总数、精子总活力、精子前向运动百分率均低于正常组,而精子畸形率明显高于正常组。精子浓度、精子活力、精子形态直接影响妊娠结局^[5-7],有学者发现,精子浓度、精子活力低和精子畸形率偏高会导致较高的早期流产率^[8]。另外,作者还发现,不育组年龄、精液 pH 值、精液液化时间、精子浓度、精子总数、精子总活力、精子前向运动百分率和精子畸形率均与 IVF 组结果相近,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

临床还尚未完全明确男性不育的发病机制^[9]。有研究显示,男性不育的防治较为困难,加上各地区男性不育患者表现亦存在一定差异,给临床治疗带来一定的困难^[10]。本研究旨在调查长沙市不孕不育家庭男性精液参数,为临床不孕不育的防治提供参考依据。本研究结果显示,义诊中接待的 182 例不育男性与本院纳入试管婴儿治疗的男性比较,精液质量和精子畸形率等参数结果相近,而精液质量分析和精子畸形率检查是评价男性生育力的有效指标,显而易见,长沙市不育不孕家庭男性生育力已接近于试管婴儿治疗的男性。同时,临床可将上述资料作为评估长沙市不育不孕家庭男性生育力的有效依据,正如王锐^[11]报道社会工作介入不孕不育家庭的意义,因此,对不孕不育家庭的早发现、早治疗十分必要。

参考文献

[1] 包华琼,孙岚,伊宏亮,等. 精子 DNA 损伤与男性精液常规质量参数的关系[J]. 中国男科学杂志,2016,31(2):55-

56.
[2] GIWERCMAN A,LINDSTEDT L,LARSSON M,et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo:a case-control study[J]. Int J Androl,2010,33(1):e221-e227.
[3] SULIGA E,GLUSZEK S. The relationship between diet, energy balance and fertility in men[J]. Int J Vitam Nutr Res,2019,10(4):1-13.
[4] KOTHARI R P,CHAUDHARI A R. Zinc levels in seminal fluid in infertile males and its relation with serum free testosterone[J]. J Clin Diagnost Res,2016,10(5):5-8.
[5] 刘思瑶,曾咏梅,孟祥黔,等. 女方因素及排卵前后前向运动精子总数与宫腔内人工授精临床妊娠率的关系研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2017,25(7):1-3.
[6] 喻海芬,熊毅刚. 精液复苏后前向运动精子总数对 AID 周期妊娠率的影响[J/CD]. 实用妇科内分泌杂志(电子版),2017,4(26):68-69.
[7] 王艳红,田秀珠,王治鸿,等. 精子形态与体外受精-胚胎移植妊娠结局的研究[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(16):1-3.
[8] 蔡昌明,张宁媛,徐志鹏. 精液质量对宫腔内人工授精技术临床妊娠结局的影响[J]. 临床医药文献杂志,2017,4(75):14701-14704.
[9] 黄君艳,庞敏,仲远,等. 宿迁地区 2012—2014 年 1 068 例育龄期男性精液质量和不孕不育的关系研究[J]. 中国性科学,2016,25(8):80-82.
[10] 徐鸿毅,邓锴,罗清炳,等. 手术取卵日偶发 ED 男性不同取精方式对助孕结局的影响[J]. 中华男科学杂志,2015,21(12):1093-1097.
[11] 王锐. 社会工作介入试管助孕困境家庭刍议[J]. 现代交际,2018,32(8):85-86.

(收稿日期:2019-03-10 修回日期:2019-08-12)

(上接第 147 页)

[7] 时振华,吴伟伟,茆亚东,等. 肝硬化患者严重程度和早期诊断血浆生化标志物水平的临床研究[J/CD]. 临床检验杂志(电子版),2018,7(2):211-212.
[8] 司大,谢航. 血清 HCY 水平在乙型肝炎肝硬化患者预后中的诊断价值分析[J/CD]. 临床检验杂志(电子版),2018,7(2):318-319.
[9] LIU P F,DU Y,MENG L,et al. ALDH7A1 is a protein that protects atlantic salmon against aeromonas salmonicida at the early stages of infection[J]. Fish Shellfish Immunol,2017,70(11):30-39.
[10] RODRIGUEZ-TORRES M,ALLAN A L. Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors[J]. Clin Exp Metastasis,2016,33(1):97-113.

[11] GALICIA-MORENO M,ROSIQUE-ORAMAS D,MEDINA-AVILA Z,et al. Behavior of oxidative stress markers in alcoholic liver cirrhosis patients[J]. Oxid Med Cell Longev,2016,2016:9370565.
[12] BROCKER C,CANTORE M,FAILLI P,et al. Aldehyde dehydrogenase 7A1(ALDH7A1)attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity[J]. Chem Biol Interact,2011,191(1/3):269-277.
[13] AGUAYO-OROZCO A,BOIS F Y,BRUNAK S,et al. Analysis of time-series gene expression data to explore mechanisms of chemical-induced hepatic steatosis toxicity[J]. Front Genet,2018,18(9):396-399.

(收稿日期:2019-05-15 修回日期:2019-08-26)