

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.010

慢性乙型肝炎患者血清脂联素、基质金属蛋白酶-2 与肝纤维化的关系研究^{*}

郭瑞雪,魏新亮,魏思忱

河北省沧州市中心医院消化二科,河北沧州 061000

摘要:目的 探索乙型肝炎肝硬化患者血清脂联素(APN)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)水平与肝纤维化的关系。**方法** 选取 2018 年 3 月至 2019 年 3 月于该院诊断的慢性乙型肝炎(CHB)患者 60 例,其中肝纤维化患者 30 例(肝纤维化组),肝硬化患者 30 例(肝硬化组),同时选取 30 例健康体检者作为对照组。对肝纤维化组及肝硬化组患者给予恩替卡韦抗乙型肝炎病毒治疗,分别于入组当日(0 周)、24 周、48 周检测所有受试者肝功能、APN、MMP-2、透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ),比较各组各指标水平,评价 APN 及 MMP-2 与天门冬氨酸氨基转移酶/丙氨酸氨基转移酶(AST/ALT)、肝纤维化指标间的相关性。**结果** 3 组受试者治疗 0、24、48 周时 APN 及 MMP-2 水平比较,由高至低依次为肝硬化组、肝纤维化、对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);APN、MMP-2 水平与 AST/ALT、肝纤维化指标间呈正相关($P<0.05$);改善组 APN 及 MMP-2 水平明显低于未改善组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 血清 APN 及 MMP-2 水平随肝纤维化、肝硬化病程发展而升高,二者水平与肝功能恶化程度、肝纤维化指标均有明显相关性。APN 及 MMP-2 可作为预测及评价肝纤维化严重程度的指标。

关键词:脂联素; 基质金属蛋白酶-2; 慢性乙型肝炎; 肝纤维化; 肝硬化**中图法分类号:**R512.6+2**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)12-1666-04

Relationship between serum adiponectin, matrix metalloproteinase-2 and liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B^{*}

GUO Ruixue, WEI Xinliang, WEI Sichen

The Second Department of Gastroenterology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei 061001, China

Abstract: **Objective** To explore the relationship between serum adiponectin (APN), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) levels and liver fibrosis in patients with hepatitis B. **Methods** Totally 60 patients with chronic hepatitis B in our hospital from March 2018 to March 2019 were enrolled in the study, in which 30 patients with liver fibrosis and 30 patients with cirrhosis diagnosed were served as liver fibrosis group and cirrhosis group, and 30 healthy subjects were selected as the control group meanwhile. Entecavir was given to the patients in the liver fibrosis group and cirrhosis group for antiviral therapy. Liver function and levels of APN, MMP, HA and PCⅢ of all the subjects were tested and compared on the day of enrollment(0 week), 24 weeks and 48 weeks, respectively. The correlation between APN, MMP, AST/ALT and liver fibrosis markers were evaluate. **Results** The APN and MMP-2 levels of the three groups at 0, 24 and 48 weeks treatment were compared, with the liver cirrhosis group, liver fibrosis group and control group in descending order, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). APN and MMP-2 levels were positively correlated with AST/ALT and liver fibrosis markers ($P<0.05$). The APN and MMP-2 in the improvement group were significantly lower than non-improvement group ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of serum APN and MMP-2 increase with the progression of liver fibrosis and cirrhosis, and the levels of both were significantly correlated with the degree of liver function deterioration and liver fibrosis. APN and MMP-2 can be used as indicators for predicting and assessing the the severity of liver fibrosis.

Key words: adiponectin; matrix metalloproteinase-2; chronic hepatitis B; liver fibrosis; cirrhosis

全球约有 2.4 亿慢性乙型肝炎(CHB)患者,其中大部分分布在亚洲及非洲,我国 CHB 患者每年发展

为肝硬化的发生率约为 2.1%,同时有报道指出每年有约 65 万 CHB 患者死于肝硬化、肝细胞癌及肝功能

^{*} 基金项目:河北省沧州市重点研发计划指导项目(183302054)。

作者简介:郭瑞雪,女,主治医师,主要从事肝胆疾病的诊断与治疗。

衰竭^[1]。肝纤维化是 CHB 患者发展为肝硬化前的初始阶段,该过程在一定程度上可被逆转,早期诊断肝纤维化可使 CHB 患者受益颇多,肝脏组织学检测为诊断肝纤维化的确诊标准,但该检查为有创检查,患者痛苦大,不易接受,应用具有很大的局限性^[2]。因此,找到一个与之相关的无创生物学标记物,对评估、控制肝纤维化乃至肝硬化均具有重大价值。脂联素(APN)是脂肪组织特异分泌的脂肪因子具有调节糖脂代谢及抗炎作用,在肝硬化进程中发挥着重要作用。基质金属蛋白酶-2(MMP-2)具有明显降解 I、IV、V 型胶原及纤维连接蛋白的作用,在肝纤维化肝硬化发生、发展进程中具有重要意义。本文主要通过酶联免疫吸附试验(ELISA)对 CHB 肝纤维化程度不同的患者进行 APN、MMP-2 检测,探讨二者与 CHB 肝纤维化的相关性,现将详细情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 3 月至 2019 年 3 月于本院诊断的 CHB 患者 60 例,均排除其他类型肝炎病毒感染,肝硬化及肝纤维化诊断参考《病毒性肝炎防治方案》相关标准确定。其中肝纤维化组 30 例,男 20 例,女 10 例,年龄 28~55 岁,平均(41.5±6.2)岁;肝硬化组 30 例,男 17 例,女 13 例,年龄为 36~67 岁,平均(46.2±5.8)岁。另选择同期在本院体检健康者 30 例作为对照组,男 20 例,女 10 例,平均年龄(56.2±6.5)岁。纳入标准:血清学检测无任何类型肝炎病毒感染,肝功能处于正常状态,且无糖尿病、肾脏病、心脏病、肥胖症、肿瘤、自身免疫性及合并严重感染等疾病,均无烟酒不良嗜好。本研究经医院伦理委员会批准,患者及家属同意并签署知情同意书。

1.2 标本采集 采集 3 组研究对象隔夜空腹 8 h 以上肘静脉血 3 mL,4 000 r/min 离心 5 min 后留取上清液,-70 ℃保存备用检测。

1.3 检测方法 APN 及 MMP-2 均采用 ELISA 检

测,试剂盒购自北京方程生物科技有限公司;血清肝纤维化指标透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)试剂盒均购自武汉博士德,均按照说明书进行操作;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)使用日立 7600 全自动生化分析仪检测,试剂盒均购自四川迈克生物有限公司;所有受试者均接受肝脏超声检查,记录肝脏门静脉主干宽度及脾脏大小及厚度。

1.4 治疗方法 肝纤维化组及肝硬化组患者入组后当天(0 周)均接受恩替卡韦抗乙型肝炎病毒治疗。恩替卡韦购自正大天晴药业集团有限公司,剂量为 0.5 mg,每天 1 次,晚饭后 2 h 服用,持续治疗 48 周。

1.5 研究方法 于 0、24、48 周分别比较 APN 及 MMP-2 水平,明确二者在 CHB 不同阶段的差异;分析 APN、MMP-2 水平与 AST/ALT、肝纤维化指标间相关性,明确二者评价 CHB 患者病变程度的可行性;治疗 48 周时,将肝纤维化组和肝硬化组 60 例患者划分为改善组及未改善组,通过比较明确 APN、MMP-2 对治疗效果的评估效果。改善标准:(1)HA 及 PCⅢ下降 60%以上;(2)肝门脉主干内径恢复正常或接近正常,或脾脏缩小。

1.6 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计学软件进行数据处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用率或构成比(%)表示,分别采用 *t* 检验、 χ^2 检验进行组间比较,相关性应用 Pearson 相关分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组受试者各时期 APN、MMP-2 比较 3 组受试者 0、24、48 周 APN、MMP-2 水平由高至低均为肝硬化组、肝纤维化组、对照组,两两比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05);组内各时期对比,肝硬化组、肝纤维化组随时间延续,APN、MMP-2 水平均下降,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 3 组患者各时期 APN、MMP-2 比较($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组(<i>n</i> =30)			肝纤维化组(<i>n</i> =30)			肝硬化组(<i>n</i> =30)		
	0 周	24 周	48 周	0 周	24 周	48 周	0 周	24 周	48 周
APN(μg/mL)	6.6±0.5	6.6±0.6	6.7±0.5	12.4±1.2 [*]	10.2±1.2 [*]	8.5±1.4 [*]	22.4±1.4 ^{*#}	20.6±1.7 ^{*#}	18.6±1.9 ^{*#}
MMP-2(ng/mL)	155.1±18.2	156.1±17.5	156.5±16.7	553.9±33.7 [*]	446.9±42.4 ^{*△}	355.7±34.5 ^{*#▲}	801.1±43.6 ^{*#}	706.9±33.3 ^{*#△}	618.9±31.6 ^{*#△▲}

注:与对照组同期相比,^{*}*P*<0.05;与肝纤维化组同期相比,[#]*P*<0.05;与同组 0 周时相比,[△]*P*<0.05;与同组 24 周时相比,[▲]*P*<0.05。

2.2 APN、MMP-2 与肝功能、肝纤维化指标间相关性分析 90 例受试者(0、24、48 周)3 个时间点所有数据行相关性分析,结果显示 APN、MMP-2 与 AST/ALT、HA 及 PCⅢ呈正相关(*P*<0.05)。见表 2。

2.3 APN、MMP-2 对治疗效果的评估情况 以 60 例肝纤维化及肝硬化患者为研究对象,治疗 48 周时,改善组 29 例,未改善组 31 例,改善组 APN、MMP-2 见表 3。

表 2 APN、MMP-2 与肝功能、肝纤维化指标间相关性

指标	项目	AST/ALT	HA	PCⅢ
APN	<i>r</i>	0.441	0.583	0.639
	<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05
MMP-2	<i>r</i>	0.873	0.918	0.889
	<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 APN、MMP-2 对治疗效果的评估情况

指标	n	APN($\mu\text{g/mL}$)		MMP-2(ng/mL)	
		0 周	48 周	0 周	48 周
改善组	29	19.0 $\pm$ 4.5	10.5 $\pm$ 3.5 ^{*#}	730.6 $\pm$ 40.3	398.4 $\pm$ 49.6 ^{*#}
未改善组	31	19.6 $\pm$ 4.5	16.4 $\pm$ 4.5 [*]	734.2 $\pm$ 47.9	655.3 $\pm$ 48.5 [*]

注:与同组 0 周时比较, ^{*} $P < 0.05$; 未改善组 48 周时比较, [#] $P < 0.05$ 。

3 讨 论

根据 2013 年全球疾病负担 (GBD) 研究,肝硬化是世界不同地区患者 10 种最常见的死亡原因之一,也是发达国家患者死亡的第 6 位原因^[3]。我国是乙型肝炎大国,约有 1.2 亿 CHB 患者,其中有 20%~30% 发展为肝硬化,2%~5% 肝硬化患者最终发展为肝细胞癌。这提示乙型肝炎患者若得不到及时治疗,将经历“肝炎—肝纤维化—肝硬化—肝癌”的病程。肝纤维化是肝炎发展为肝硬化的必经过程,在一定程度上可被逆转,早期诊断治疗甚至可避免肝硬化的发生、发展,肝组织活检被定义为肝纤维化的“金标准”,但肝穿刺为有创检查,患者多不易接受,此外肝纤维化在结构分布上是不均匀的,活组织检查取得的样本少,可能并不代表主要的肝脏病理学,出现漏诊^[4]。目前有研究提出了一系列生化和血液学血清标志物作为肝纤维化的预测因子,包括基质金属蛋白酶 (MMPs)、胶原蛋白亚型、血小板计数、AST、ALT、AST/ALT、APN 等,这些标志物的各种组合被用于肝脏疾病的诊断,其中 AST/ALT 越高,说明肝脏损伤越重^[5]。

APN 是一种含有 244 个氨基酸的脂肪细胞因子,具有增强胰岛素敏感性、调节糖脂代谢、抑制炎症反应、抗动脉粥样硬化等多重作用,目前在肝纤维化相关研究中已证实,APN 可上调 NO^[6],以及抑制增殖细胞核抗原 (PCNA) 和 α 平滑肌肌动蛋白 (α SMA) 的表达, α SMA 是肝星状细胞 (HSC) 激活的标志物,用来维持 HSC 处于静止状态^[7]。近来有研究指出,APN 可预测具有较轻组织学发现的患者的坏死性炎症分级和纤维化分期,其水平的持续升高可能反映了肝功能的进行性恶化^[8]。既往已知 HA 是 HSC 合成的黏多糖,是目前发现反映肝纤维化最具价值的指标,PCⅢ与肝脏炎症坏死程度相关。本研究结果显示,APN 水平在肝硬化组高于肝纤维化组,并均显著高于对照组,且与 HA、PCⅢ呈正相关,进一步证实了 APN 水平的升高可以反映肝脏的持续恶化,与肝纤维化发生、发展关系密切。这一点在其他学者的研究中得到了支持,KALAFATELI 等^[9]以酒精性肝硬化患者为研究对象,发现患者中 APN 水平随肝硬化 Child-Pugh 分期及终末期肝病模型 (MELD) 评分升高而升高,且 APN 水平持续升高,患者生存期明显缩短。此外,肝脏病变时高 APN 水平可能与肝硬化时 APN

清除减少,以及肝硬化时胆汁淤积,胆汁排泄减少相关^[10]。

肝纤维化是一个复杂的动态过程,实质是细胞外基质 (ECM) 合成大于降解。MMPs 是含锌内肽酶家族,其负责在病理和生理条件下降解 ECM 蛋白。MMP-2 又名明胶酶-A,在人体内被发现是最敏感的,也是临床上慢性肝病的标记物,因为其活性在肝硬化的所有阶段都增加,故其表达水平对肝病患者病情进展的评估有一定的临床价值^[11]。MMP-2 在肝患者的肝组织中表达很强,其中 HSC 被认为是 MMPs 的主要来源,肝病患者 HSC 被活化,MMP-2 生成增加,活化的 MMP-2 降解变性胶原及纤维连接蛋白,裂解 I 型胶原,同时促进 HSC 的增殖,在肝纤维化的启动和形成中起到重要作用。本研究结果显示,肝硬化组及肝纤维化组 MMP-2 水平均显著高于对照组,以肝硬化组尤甚,HA、PCⅢ呈正相关,证实了 MMP-2 水平可用于反映肝脏的持续恶化。闫瑞斌等^[12]的研究证实了这一点,他指出慢性肝炎患者中 MMP-2 和 TIMP-2 随肝纤维化加重而表达增加。此外,肝硬化本身是一个持续炎症反应过程,随 Child-Pugh 分级升高,炎症活动更为明显,在此过程中 MMP-2 增强许多促炎细胞因子的活性,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、CXC 趋化因子配体 8 (CXCL-8),所以在各种肝脏疾病中观察到 MMP 水平的波动,且随 Child-Pugh 分级升高而升高^[13]。

对乙型肝炎患者进行核苷类似物治疗的研究表明,肝脏组织学可在抗病毒后明显改善。在本研究中,60 例患者接受抗病毒药物治疗后,其中 29 例治疗 48 周时的 APN、MMP-2 明显降低,且 APN、MMP-2 与肝功能、肝纤维化指标间呈正相关。因此,APN、MMP-2 不仅可作为 CHB 肝纤维化患者的标记物,对筛选肝硬化患者起到一定作用,同时还可作为评估抗病毒治疗疗效的指标。

总之,APN、MMP-2 在 CHB 患者肝纤维化进展中作用较大,与肝功能等指标联合检测有助于肝纤维化、肝硬化的诊断,并且可用于抗病毒治疗后的疗效评估,或许可以为临床工作提供新的思路。

参考文献

[1] World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection[R]. Geneva: World Health Organization, 2015.

[2] EBRAHIMI H, NADERIAN M, SOHRABPOUR A A. New concepts on pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis: a review article[J]. Middle East J Dig Dis, 2016, 8(3): 166-178.

[3] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the global (下转第 1672 页)

帮助诊断 APL^[14-15], 与本研究结果相似, 同时本研究发现 CD64 的作用也非常重要, CD9⁺ CD64⁺ CD11b⁻ HLA-DR⁻ 综合判断对诊断 APL 具有重要参考意义。

综上所述, APL 的免疫表型与非 APL 相比有其独特特点, APL 患者免疫表型特点主要表现为表达高 SSC、CD13⁺ CD9⁺ CD38⁺ CD33⁺ CD117⁺ CD64⁺ CD11b⁻ CD34⁻ HLA-DR⁻, 可以为临床提供快速诊断, 为患者的早期治疗提供帮助。

参考文献

[1] 沈志祥, 王鸿利, 胡翊群. 血液疾病诊断学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 114-135.

[2] 许文荣, 王建中. 临床血液学与检验[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 259-260.

[3] 刘茵, 陈苑婷, 李俊勋. 71 例急性早幼粒细胞白血病患者白血病细胞免疫表型分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(4): 806-811.

[4] 李军民, 任雨虹. 急性早幼粒细胞白血病出血并发症的机制及治疗进展[J]. 临床血液学杂志, 2015, 28(3): 190-193.

[5] 陈芳, 胡延平, 王孝会. 急性早幼粒细胞白血病免疫表型特点[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(2): 321-325.

[6] WEIR E G, BOROWITZ M J. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia[J]. Semin Hematol, 2001, 38(2): 124-138.

[7] 边程, 何平, 王畅. AML1-ETO 阳性急性髓系白血病 CD19 的表达及其预后的意义[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(12): 1809-1814.

[8] GORCZYCA W. Acute promyelocytic leukemia: four dis-

tinct patterns by flow cytometry immunophenotyping[J]. Pol J Pathol, 2012, 63(1): 8-17.

[9] ROHRS S, SCHERR M, ROMANI J, et al. CD7 in acute myeloid leukemia: correlation with loss of wild-type CEB-PA, consequence of epigenetic regulation[J]. J Hematol Oncol, 2010, 14(3): 15-19.

[10] CHANG H, BRANDWEIN J, YI Q L, et al. Extramedullary infiltrates of AML are associated with CD56 expression, 11q23 abnormalities and inferior clinical outcome[J]. Leuk Res, 2004, 28(10): 1007-1011.

[11] TESTA U, LO-COCO F. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: strategies to define high-risk patients[J]. Ann Hematol, 2016, 95(5): 673-680.

[12] 王迪, 肖敏, 朱莉. NPM1 基因突变的急性髓系白血病免疫表型研究[J]. 淋巴瘤·白血病, 2012, 21(4): 193-196.

[13] SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype[J]. Blood, 2005, 106(12): 3733-3739.

[14] HORNA P, ZHANG L, SOTOMAYOR E M, et al. Diagnostic immunophenotype of acute promyelocytic leukemia before and early during therapy with all-trans retinoic acid[J]. Am J Clin Pathol, 2014, 142(4): 546-552.

[15] REN F, ZHANG N, XU Z, et al. The CD9⁺ CD11b⁻ HLA-DR⁻ immunophenotype can be used to diagnose acute promyelocytic leukemia[J]. Int J Lab Hematol, 2019, 41(2): 168-175.

(收稿日期: 2019-09-20 修回日期: 2020-03-08)

(上接第 1668 页)

burden of disease study 2013 [J]. Lancet, 2015, 385 (9963): 117-171.

[4] AFDHAL N H, NUNES D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(6): 1160-1174.

[5] JAMALI R, ARJ A, RAZAVIZADE M, et al. Prediction of nonalcoholic fatty liver disease via a novel panel of serum adipokines[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(5): e2630.

[6] DONG Z X, SU L, ESMAILI S, et al. Adiponectin attenuates liver fibrosis by inducing nitric oxide production of hepatic stellate cells[J]. J Mol Med, 2015, 93(12): 1327-1339.

[7] HAGHGOO S M, SHARAFI H, ALAVIAN S M. Serum cytokines, adipokines and ferritin for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver disease: a systematic review[J]. Clin Chem Lab Med, 2019, 57(5): 577-610.

[8] JAMALI R, RAZAVIZADE M, ARJ A, et al. Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(21): 5096-5103.

[9] KALAFATELI M, TRIANTOS C, TSOCHATZIS E, et al. Adipokines levels are associated with the severity of liver disease in patients with alcoholic cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(10): 3020-3029.

[10] BUECHLER C, HABERL E M, REIN-FISCHBOECK L A. Adipokines in liver cirrhosis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (7): e1392.

[11] PRYSTUPA A, BOGUSZEWSKA-CZUBARA A, BOJARSKA-JUNAK A, et al. Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, Eastern Poland[J]. Ann Agr Env Med, 2015, 22(2): 325-328.

[12] 闫瑞斌, 马淑梅, 卓玛. 慢性乙型肝炎患者血清 MMP-2 和 TIMP-2 水平及超声检查指标评估肝纤维化分期意义探讨[J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(4): 506-509.

[13] MADRO A, CZECHOWSKA G, SLOMKA M, et al. The influence of serum MMP-2 activity on the development or liver fibrosis in patients with alcoholic liver cirrhosis[J]. Gastroenterology, 2011, 140(5 Suppl 1): S461-S467.

(收稿日期: 2019-10-09 修回日期: 2020-04-07)