

· 综述 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.02.025

非酒精性脂肪性肝病常见诊断标志物的研究进展*

丁 山¹, 王金灿², 王钰钦²综述, 许 丽³, 刘义庆^{1△}审校

1. 山东第一医科大学附属省立医院临床医学检验部, 山东济南 250021; 2. 山东第一医科大学公共卫生与健康管理学院, 山东济南 250117; 3. 山东大学第二医院感染性疾病科/肝病科, 山东济南 250033

摘要: 据统计, 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是世界范围内最常见的慢性肝病, 是一种以肝脂肪变性为特征的临床病理综合征。由于 NAFLD 发病机制不明确且诊疗方法局限, 其缺乏高效、准确的疾病分型以及进展程度判断的方法, 发病率近年来仍持续上升, 现已成为世界公共卫生问题。该文主要以当下热点标志物为切入点, 从不同诊疗思路出发, 重点叙述了血清学、微生物学相关标志物以及循环生物标志物与 NAFLD 发病之间可能的因果关系, 总结了不同标志物的诊断原理和预期诊疗实施方法。虽然目前大多数新型标志物在实际应用中多未达到预期, 且寻找新的技术突破难度较大, 但随着技术的不断进步, 蛋白质-转录组学等各种新兴方向会为临床提供巨大帮助。由于现有实验数据的不足, 该文所汇总的热点标志物的诊断应用可行性有待进一步实验考证。该文希望通过总结血清学标志物、微生物相关生物标志物以及循环生物标志物, 为后续研究及临床应用提供有效参考。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 血清学标志物; 微生物相关生物标志物; 循环生物标志物; 诊断
中图分类号: R446.1; R575.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2025)02-0276-04

Research progress on common diagnostic biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease*

DING Shan¹, WANG Jincan², WANG Yuchin², XU Li³, LIU Yiqing^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Ji'nan, Shandong 250021, China; 2. School of Public Health, Shandong First Medical University, Ji'nan, Shandong 250117, China; 3. Department of Infectious Disease and Hepatology, Second Hospital of Shandong University, Ji'nan, Shandong 250033, China

Abstract: According to statistics, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease worldwide and a clinical pathological syndrome characterized by hepatic steatosis. Due to its unclear pathogenesis and limited diagnosis and treatment methods, there is a lack of efficient and accurate methods to classify the disease and determine the degree of progression, and its incidence rate has continued to increase in recent years, and has become a public health problem in the world. This article mainly takes the current hot markers as the starting point, mainly focuses on the possible causal relationship between serological and microbiology related markers as well as circulating biomarkers and the pathogenesis of NAFLD, and summarizes the diagnostic principles and expected diagnosis and treatment implementation methods of different markers. Although most of the new markers do not meet expectations in practical applications, moreover it is difficult to find new technological breakthroughs, with the continuous advancement of technology, various emerging directions such as protein-transcriptomics will provide clinic with great help. Due to the lack of existing experimental data, the feasibility of the diagnostic application of the hot spot markers summarized in this article needs to be further experimentally verified. This paper hopes to provide an effective reference for follow-up research and clinical application by summarizing serological markers, microbial-related biomarkers and circulating biomarkers.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease; serological markers; microbial-related biomarkers; circulating biomarkers; diagnosis

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 现已成为世界范围内最常见的慢性肝病病因, 它是包括非酒精性脂肪

肝 (NAFL) 和非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 的一系列疾病的总称^[1]。NASH 的发病率预计将在未来 10 年增

* 基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2020MH316; ZR2016HM52); 山东第一医科大学校级大学生创新创业训练计划项目 (2024104390451)。

△ 通信作者, E-mail: yqliu1979@163.com。

加 56%^[2]。对 NAFLD 致病机制的认知不足和缺乏准确的生物标志物可能是目前临床医生无法准确获得临床评估指导和无有效治疗 NAFLD 药物的主要原因^[3-4]。近年来,对 NAFLD 的诊疗研究越发受到重视,本文主要总结现有 NAFLD 诊断标志物的研究情况,以期研究出便捷、高效的无创诊断 NAFLD 的技术做出贡献。

1 血清学标志物

1.1 维生素 B₁₂ 相关标志物 在维生素 B₁₂ 相关生物标志物中,红细胞叶酸与 NAFLD 风险升高独立相关。有研究强调了维生素 B₁₂ 代谢产物的临床诊断价值以及维生素 B₁₂ 代谢可能成为 NASH 治疗靶点的可能性^[5]。

1.2 血浆细胞角蛋白(CK) CK18 片段水平是肝细胞凋亡的标志,研究证实血清 CK18 与肝脏炎症损伤及纤维化程度有良好的相关性^[6]。但最近有研究显示单独检测 CK18 水平似乎不足以准确诊断 NASH,尽管其诊断性能远远优于血清天冬氨酸转氨酶(AST)^[7]。不过不可否认的是,与 CK18 结合的联合诊断疗法仍具有诊断价值,例如有研究提出由 CK18、糖化血红蛋白 A1c 和血清 AST 水平组成的复合评分指标 MACK-3 组合区分纤维化改善而 NASH 不恶化的患者的曲线下面积(AUC)为 0.755^[8]。

1.3 高尔基体 73(GP73) GP73 是分布于 GP 的 II 型跨膜蛋白,在健康的肝细胞内不表达,当肝细胞坏死时,体内 GP73 呈高表达。NASH 患者血清 GP73 水平随着肝坏死炎症反应的加重而升高,与此一致的是,肝组织中 GP73 蛋白的原位表达也逐渐增加,与坏死炎症反应活动的严重程度增加平行。血清 GP73 与肝组织蛋白表达强度有良好的相关性。因此,血清 GP73 是反映 NASH 患者肝坏死炎症反应严重程度的一种有价值的血清标志物^[9]。

1.4 血硒 硒是人体必需的微量元素之一,对人体健康起着至关重要的作用。有研究显示血硒水平与振动控制瞬态弹性成像诊断的 NAFLD 呈显著正相关,血硒水平越低,晚期肝纤维化的比例越高。血硒更容易引起 NAFLD 和肝纤维化,并且血硒水平的异常是由于体内稳态失衡,而非硒摄入量的原因,这为 NAFLD 和晚期纤维化的发病机制及初步诊断提供了新的视角^[10]。

1.5 炎症生物标志物 甘油三酯(TG)的前体或中间体棕榈酸酯、甘油二酰基和神经酰胺可引起线粒体功能障碍和内质网应激,导致肝细胞损伤和促炎性细胞因子的释放。因此,炎症因子可能是 NASH 患者的诊断性生物标志物。包括炎症因子的模型诊断准确性高,但临界值需进一步优化^[11]。

1.6 纤维化生物标志物 有研究对 NAFLD 患者血清血小板反应蛋白 2(TSP-2)水平进行了检测,结果显示,NASH 患者血清 TSP-2 水平明显高于 NAFL 患者,并且随着纤维化阶段的升高而升高;受试者工

作特征(ROC)曲线分析结果显示,血清 TSP-2 预测 NASH 和晚期肝纤维化的 AUC 分别为 0.776 和 0.856,与晚期肝纤维化诊断中的纤维化-4 指数、血清透明质酸(HA)水平和肝纤维化评分(NFS)相当^[12]。血清 TSP-2 水平和血小板计数是 NASH 和晚期肝纤维化的独立预测因子。TSP-2 可能是 NASH 和晚期肝纤维化诊断的有用生物标志物^[12]。

1.7 血清基质金属蛋白酶-7(MMP-7) 有研究通过对 228 例 NAFLD 患者血清 MMP-7 水平进行检测,采用 Logistic 回归模型分析 MMP-7、肝硬度测量(LSM)、Enhanced Liver Fibrosis 增强肝纤维化(ELF)评分和临床参数之间的关系,结果显示血清 MMP-7 与临床显著纤维化(LSM \geq 8.2)相关,与年龄、性别、体质量指数和糖尿病无关,MMP-7 检测项目添加到 ELF 评分中,显著提高了 ELF 测试的诊断性能^[13]。血清生物标志物的组合有可能提高 NAFLD 高危患者晚期肝纤维化检测的灵敏度和特异度,且血清 MMP-7 与临床显著肝纤维化独立相关^[13]。

2 微生物相关生物标志物

现有研究表明,微生物对 NAFLD 的发生与发展存在重要联系,其中主要以肠道微生物为主。肠道菌群可以通过改变肠道代谢产物影响宿主能量代谢、影响肠道和肝脏免疫功能,由此实现对 NAFLD 的促进^[14]。NAFLD 患者与健康人群相比,其细菌类型显著减少,且菌群构成变化明显。健康人体内厚壁菌门和拟杆菌门数量约占总微生物群的 99%,但 NAFLD 患者体内厚壁菌门细菌(瘤胃球菌、乳酸杆菌)丰度显著减少,拟杆菌、变形杆菌、肠杆菌等革兰阴性菌丰度显著增加,成为主要菌群^[15-16]。菌群改变带来的代谢产物改变也会影响到 NAFLD 的发生与发展。

2.1 肠道菌群 肠道菌群可以将抑制肠道微生物生长的初级胆汁酸(PBAs)代谢为次级胆汁酸(SBAs),NAFLD 患者的肠道菌群失衡会影响此代谢,进而影响胆汁酸池的构成,其影响方式包括调节能量代谢、肝葡萄糖和脂质的法尼醇 X 受体(FXR)、G 蛋白偶联胆汁酸受体 5(TGR5,也称 GPBAR1)的活化等,这种相互作用可作为 NAFLD 肠道菌群靶向治疗的基础证据^[16]。FXR 和 TGR5 已经成为肥胖和 NAFLD 的假定治疗靶点^[17]。

2.2 饱和脂肪酸(SCFAs) 拟杆菌门可以产生乙酸、丙酸,厚壁菌门可以产生丁酸,这些 SCFAs 能够作用于肠上皮细胞上的 G 蛋白偶联受体 GPR41 和 GPR43,两者分别促进肠内分泌细胞分泌胰高血糖素样肽 1 和肽 YY (PYY),实现肠动力下降、营养吸收增强、脂肪细胞分化抑制、肝脏脂肪生成增加,促进 NAFLD 的发展^[17]。

2.3 脂多糖 革兰阴性菌群外膜的主要成分脂多糖诱导肝细胞中大量表达的 Toll 样受体 4(TLR4)活化,从而诱导 Kupffer 细胞分泌炎症细胞因子和趋化因子,通过刺激形状细胞导致肝脏炎症和纤维

化^[18-20]。脂多糖在微生物干扰多种 TLR4 相关通路中发挥重要作用,可以作为后续研究的切入点。

2.4 内源性乙醇 肠道微生物发酵可以产生内源性乙醇,目前临床已确定 NAFLD 患者肠道含量较高的产乙醇细菌有肠杆菌科(包括大肠埃希菌)和肺炎克雷伯菌。乙醇可导致自由基释放、线粒体功能障碍、肝细胞中 TG 积累,从而引发肝损伤;乙醇代谢产物可间接引发肠道屏障功能损伤、肠道菌群的易位,最终加重肝脏炎症和促进 NAFLD 的发生、发展^[16]。

2.5 胆碱 胆碱在脂质的转运中发挥重要作用,胆碱的缺乏会抑制极低密度脂蛋白(VLDL)的合成与分泌,肝细胞内脂质过氧化增加,由此引起的肝脏 TG 蓄积和肝脂肪变性会引发肥胖^[21],胆碱的失调也会导致脂质积累和慢性炎症状态^[22]。肠道菌群可将胆碱转化为三甲胺(TMA),肝脏可以将 TMA 氧化形成三甲胺 N-氧化物(TMAO),这被认为是早期代谢综合征的新型生物标志物^[23]。这种转化会降低体内胆碱生物利用度、模仿胆碱缺乏状态并导致代谢紊乱。由于现有研究证实遗传变异对胆碱合成途径、胆碱缺乏有影响^[24],因此该方面的研究干扰条件较多,研究存在一定挑战。

NAFLD 患者的肠道微生物检测可以通过对粪便微生物或者血清代谢物检验而实现,由此避免了穿刺活检对患者带来的病理损伤,理论上更具有应用优势。但由于肠道菌群的干扰因素很多,不同个体之间的差异较大,现阶段的研究基数相对较小。需要进行大规模、多样本的对照实验对以上研究做进一步补充证明。

3 循环生物标志物

NAFLD 的循环生物标志物包括了循环细胞外囊泡中包含的蛋白质、mRNA、miRNA 和 DNA 等多种细胞分子^[25],其中 miRNA 应用于临床诊断的前景相对较好^[26]。

miRNA 是一类长度为 18~24 个核苷酸的短非编码 RNA 分子,它在广泛的生物活动中发挥重要作用,尤其是细胞间通信中的活动^[27]。它参与了 NAFLD 的发病过程,并且在 NASH 相关的肝纤维化中也发挥作用。研究表明 miRNA 在肝脏疾病的诊断、预后及治疗方面有临床应用前景^[28-29]。但很少有研究评估循环 miRNA 能否作为 NAFLD 人群肝纤维化的生物标志物。

综合先前多项研究成果,可以认为 NAFLD 患者 miR-122、miR-192 和 miR-34a 的上调是 NAFLD 进展的普遍特征,由此推测未来有可能在临床实践中应用这些相关的标志物识别出由 NAFL 向 NASH 进展风险较高的患者^[26]。miRNA 在不同程度肝纤维化的 NAFLD 患者的表达情况尚存在争议,虽然认为 miRNA 具有比透明质酸等其他纤维化生物标志物更高的诊断准确性,但现仍无明确的评估标准^[26]。

在 miRNA 的检测方法方面,传统的 miRNA 检

测方法包括反转录聚合酶链反应、northern 印迹法、微阵列技术等,他们普遍存在灵敏度不高的缺点^[30]。目前多种不同的 miRNA 已有个性化的高灵敏度检测方法,如针对 miR-21 可以通过基于链位移响应的信号放大方法结合基于 G-四链体(G-quadruplex)的信号产生实现高灵敏度检测^[30]。但 miRNA 作为 NAFLD 诊断的生物标志物尚无统一检测标准,亟待解决。

此外,细胞外囊泡蛋白和循环蛋白作为 NAFLD 生物标志物的研究现已取得一定成果,酰胺水解酶 Vanin-1、髓系细胞触发受体 2 (TREM2)、ADAMTSL2、IL13RA1 已被证明在 NAFLD 进展过程中发挥重要作用或具有明显变化,现已评价为新兴 NAFLD 生物标志物。他们有望克服当前诊断方法的局限性,但其在广大患者中的诊断与预后价值还需要进一步验证^[31]。

4 结论与展望

目前全球 NAFLD 患者的数量不断增加,但 NAFLD 的诊断与治疗相关研究进展缓慢。目前肝活检仍然为 NAFLD 筛查的“金标准”,由于其取样具有误差、局限性,实施过程相对痛苦。所以,建立非侵入性的有效生物标志物识别脂肪性肝炎和分级活性非常重要。本文所综述的血清学生物标志物、微生物标志物及循环生物标志物为当下研究热点,这些标志物的检测方式具有无创、非侵入性的特点,能够对高危人群做好发病前干预,辅助疾病进展分期和诊疗方案选择。另外,近年来,基于蛋白质-转录组学特征的高危 NASH 非侵入性诊断策略开始逐渐用于临床研究^[32]。新的血液生物标志物 TREM2 的可溶性形式(sTREM2)有助于区分脂肪肝的不同阶段,也被确定为判断脂肪肝状态的极佳生物标志物^[33]。随着蛋白组学和测序技术的发展,临床上会出现更多的诊断标志物用于 NAFLD 的分期诊断和治疗预后,从而改善 NAFLD 患者的不良临床结局和降低患者病死率。

参考文献

- [1] ZEIGERER A. NAFLD: a rising metabolic disease[J]. *Mol Metab*, 2021, 50: 101274.
- [2] HUANG D Q, EL-SERAG H B, LOOMBA R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(4): 223-238.
- [3] NASSIR F. NAFLD: mechanisms, treatments, and biomarkers[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(6): 824.
- [4] RINELLA M E, NEUSCHWANDER-TETRI B A, SIDDIQUI M S, et al. AASLD practice guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2023, 77(5): 1797-1835.
- [5] LI L, HUANG Q, YANG L J, et al. The association between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced fibrosis with serological vitamin B12 markers: re-

- sults from the NHANES 1999 – 2004 [J]. *Nutrients*, 2022, 14(6):1224.
- [6] FELDSTEIN A E, WIECKOWSKA A, LOPEZ A R, et al. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study[J]. *Hepatology*, 2009, 50(4):1072-1078.
- [7] ZHANG H, RIOS R S, BOURSIER J, et al. Hepatocyte apoptosis fragment product cytokeratin-18 M30 level and non-alcoholic steatohepatitis risk diagnosis: an international registry study[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2023, 136(3):341-350.
- [8] DAVISON B A, EDWARDS C, LOOMBA R, et al. Non-invasive measure of treatment response in non-alcoholic steatohepatitis: insights from EMMINENCE and Meta-analysis[J]. *JGH Open*, 2021, 5(7):740-749.
- [9] WANG L, YAO M, LIU S, et al. Serum golgi protein 73 as a potential biomarker for hepatic necroinflammation in population with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Dis Markers*, 2020, 2020:6036904.
- [10] LIU J, TAN L, LIU Z Y, et al. The association between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced fibrosis with blood selenium level based on the NHANES 2017 – 2018[J]. *Ann Med*, 2022, 54(1):2259-2268.
- [11] 袁敏, 陆益花, 季菊玲, 等. 基于炎症标志物构建肝细胞癌术后预后预测模型[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29(16):1211-1220.
- [12] KOZUMI K, KODAMA T, MURAI H, et al. Transcriptomics identify thrombospondin-2 as a biomarker for NASH and advanced liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2021, 74(5):2452-2466.
- [13] IRVINE K M, OKANO S, PATEL P J, et al. Serum matrix metalloproteinase 7 (MMP7) is a biomarker of fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):2858.
- [14] FANG J, YU C H, LI X J, et al. Gut dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis, diagnosis, and therapeutic implications [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:997018.
- [15] VALLIANOU N, CHRISTODOULATOS G S, KARAMPELA I, et al. Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in non-alcoholic fatty liver disease: current evidence and perspectives[J]. *Biomolecules*, 2021, 12(1):56.
- [16] 李永强, 唐文娟, 周永健. 肠道菌群及其代谢产物在非酒精性脂肪性肝病发生发展及治疗中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(8):1805-1810.
- [17] OH T G, KIM S M, CAUSSY C, et al. A universal gut-microbiome-derived signature predicts cirrhosis [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(5):901.
- [18] MOHAMMAD S, THIEMERMANN C. Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:594150.
- [19] TAKATA N, ISHII K A, TAKAYAMA H, et al. LECT2 as a hepatokine links liver steatosis to inflammation via activating tissue macrophages in NASH[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):555.
- [20] XU D Q, ZHAO W H, FENG Y T, et al. Pentoxifylline attenuates nonalcoholic fatty liver by inhibiting hepatic macrophage polarization to the M1 phenotype[J]. *Phyto-medicine*, 2022, 106:154368.
- [21] PARLATI L, RÉGNIER M, GUILLOU H, et al. New targets for NAFLD[J]. *JHEP Rep*, 2021, 3(6):100346.
- [22] CHEN J Z, VITETTA L. Gut microbiota metabolites in NAFLD pathogenesis and therapeutic implications[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15):5214.
- [23] BARREA L, ANNUNZIATA G, MUSCOGIURI G, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) as novel potential biomarker of early predictors of metabolic syndrome [J]. *Nutrients*, 2018, 10(12):1971.
- [24] CHAI C, CHEN L, DENG M G, et al. Dietary choline intake and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in U. S. adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2017 – 2018 [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2023, 77(12):1160-1166.
- [25] MALHI H. Emerging role of extracellular vesicles in liver diseases[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317(5):G739-G749.
- [26] DI MAURO S, SCAMPORRINO A, FILIPPELLO A, et al. Clinical and molecular biomarkers for diagnosis and staging of NAFLD [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21):11905.
- [27] FANG Z, DOU G, WANG L. MicroRNAs in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(7):1851-1863.
- [28] LONG J K, DAI W, ZHENG Y W, et al. miR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Mol Med*, 2019, 25(1):26.
- [29] MAHMOUDI A, BUTLER A E, JAMIALAHMADI T, et al. The role of exosomal miRNA in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(4):2078-2094.
- [30] ZHANG H, LI J, HUANG H, et al. Simple, sensitive, and label-free miRNA analysis through strand displacement reaction integrating with G-quadruplex-based signal generation[J]. *J Anal Sci Technol*, 2023, 14(46):46.
- [31] GARCIA N A, MELLERGAARD M, GONZALEZ-KING H, et al. Comprehensive strategy for identifying extracellular vesicle surface proteins as biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17):13326.
- [32] SANYAL A J, SHANKAR S S, YATES K P, et al. Diagnostic performance of circulating biomarkers for non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Nat Med*, 2023, 29(10):2656-2664.
- [33] HENDRIKX T, PORSCH F, KISS M G, et al. Soluble TREM2 levels reflect the recruitment and expansion of TREM2+ macrophages that localize to fibrotic areas and limit NASH[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(5):1373-1385.