

MANF 蛋白在乙型肝炎病毒慢性感染后 肝纤维化进展中的无创监测价值

马双双¹, 王殷秋¹, 郝玉峰¹, 沈玉君², 沈玉先²

摘要 目的 探索中脑星形胶质细胞源神经营养因子(MANF)在乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染后肝纤维化进展中的表达差异及无创诊断价值。方法 对169例慢性HBV感染者进行肝脏穿刺病理学检查,并于穿刺当日检测患者肝功能等临床指标计算FIB-4和APRI指数,采用酶联免疫吸附方法检测健康对照和169例接受肝穿病理检查的慢性HBV感染患者外周血中MANF蛋白的表达水平,以肝脏病理结果为金标准,分别绘制MANF蛋白的受试者工作曲线(AUC),计算曲线下面积、特异度和敏感度,并与FIB-4、APRI指数等无创肝纤维化预测模型进行比较,评价MANF蛋白对显著肝纤维化和严重肝纤维化的预测价值。结果 健康对照组、轻微肝纤维化(S0-1)组、显著肝纤维化(S2)组和严重肝纤维化(S3-4)组4组间MANF蛋白的表达差异有统计学意义($F=17.55, P=0.00$);进一步组间两两分析显示,除S0-1和S2组两组间差异无统计学意义外,其余组间

两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。随着肝纤维化程度的加重,MANF蛋白水平与肝纤维化呈正相关性($r_s=0.431, P<0.001$),与APRI指数和FIB-4肝纤维化的相关性基本一致。MANF蛋白在诊断慢性HBV感染者显著肝纤维化($S\geq S2$)的AUC为0.670,灵敏度和特异度分别为64.5%和68.7%,诊断严重肝纤维化($S\geq S3$)的AUC分别为0.736,灵敏度和特异度分别为92.9%和46.6%。结论 MANF蛋白表达水平随肝纤维化程度加重逐渐升高,对慢性HBV感染患者肝纤维化程度的预测有一定临床价值。

关键词 中脑星形胶质细胞源神经营养因子;肝纤维化;乙型肝炎病毒;无创诊断

中图分类号 R 512.6;R 446.62;R 446.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0920-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.032

肝纤维化是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性感染后疾病进展的必经阶段,阐明肝纤维化的进展及保护机制对治疗有着重要的临床意义^[1]。HBV感染后分泌的相关蛋白可以触发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),ERS在慢性HBV感染后的病情进展中发挥致病作用,但调控机制尚未阐明^[2]。中脑星形胶质细胞源神经营养因子(mesencephalic astrocyte-derived neuro-

2017-02-05 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1608085MH164);国家自然科学基金(编号:81673438)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院肝病科,合肥 230601

²安徽医科大学基础医学院,合肥 230032

作者简介:马双双,女,硕士研究生;

郝玉峰,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aygyf@126.com

implantable collamer lens with central hole to correct myopia. **Methods** 111 eyes of 58 patients were evaluated, including uncorrected (UCVA) and best corrected (BCVA) visual acuities, spherical equivalent(SE), cylindrical equivalent(CE), contrast sensitivity, intraocular pressure evaluated preoperatively. 75 eyes of 41 patients were implanted with ICL V4c(ICL group) while 36 eyes of 21 patients were implanted with Toric ICL V4c(TICL group). Postoperative observation and adverse events were evaluated over 3 months follow-up. **Results** 3 months after surgery, the mean UCVA in ICL group was 1.0 or better in 58.67%. The UCVA of 61 eyes (95.31%) was more than BCVA before operation. The mean SE was (-0.26 ± 1.16) D, 66.67% of 50 eyes were within ± 0.50 D. The safety and efficacy indices were 1.37 and 1.31, respectively. The mean UCVA in TICL group was 1.0 or better in 86.11%. The UCVA of 32 eyes (96.97%) was more than BCVA before operation. The mean SE was (0.08 ± 0.84) D, 63.89% of 23 eyes were within ± 0.50 D. And the mean CE was (-0.34 ± 0.54) D, 66.67% of 24 eyes were within ± 0.50 D. The safety and efficacy indices were 1.32 and 1.30, respectively. The postoperative contrast sensitivity values in two groups were found significantly higher than those of the preoperative eyes. The IOP remained stable over time. **Conclusion** Implantation of the posterior chamber ICL with a central hole is effective, safe, predictable, and stable for the correction of high myopia.

Key words myopia; astigmatism; ICL; TICL

trophic factor, MANF) 基因编码的蛋白是一种分泌性蛋白, 主要位于高尔基体和内质网(endoplasmic reticulum, ER)^[3]。目前研究^[4-5]认为, ERS 可以上调 manf 基因的表达和蛋白的分泌, MANF 蛋白高表达可能有助于抑制肝脏受到损伤后的过度炎症及纤维化反应, 但 MANF 蛋白表达水平是否与慢性 HBV 感染后肝脏纤维化的发生发展密切相关目前鲜有报道。因此, 该研究通过检测接受肝脏病理检查的慢性 HBV 感染患者外周血 MANF 蛋白的表达情况, 以肝脏穿刺为金标准进行探索研究, 以明确 MANF 蛋白与慢性 HBV 感染后肝纤维化进展的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2013 年 1 月~2015 年 9 月就诊于安徽医科大学第二附属医院肝病科行肝脏穿刺检查的 169 例慢性 HBV 感染患者为研究对象, 其中男 124 例, 女 45 例, 26~51 (38.53 ± 11.89) 岁, 所有患者诊断符合中华医学会《慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)》^[6], 入组患者需要符合: ① HBV 慢性感染病史 > 6 个月; ② 排除合并其他嗜肝病毒感染、酒精性肝病、自身免疫性肝病、脂肪肝或其他因素引起的肝功能异常; ③ 排除严重的心、肺、肾疾病, 风湿免疫系统疾病, 代谢性疾病如糖尿病、甲亢等。同时选取 44 例体检健康者作为对照, 其中男 28 例, 女 16 例, 25~50 (37.67 ± 12.22) 岁。入组患者及健康对照者均签署知情同意书, 并经医院伦理委员会审核讨论通过。并按照肝纤维化程度分为轻度肝纤维化(S0-1)组、显著肝纤维化(S2)组、严重肝纤维化(S3-4)组进行分析。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 法检测 MANF 蛋白水平 采集 HBV 感染者及健康体检者空腹外周血 5 ml, 分离血清, -80 °C 冰箱保存。采用美国 Cloud-clone 公司的 MANF 检测试剂盒进行样品检测, 实验步骤如下: ① 检测标本分别设标准孔、空白孔、待测样品孔, 每个检测孔分别加入相应待测标本 100 μl, 37 °C 温育 2 h, 然后弃去残余液体并甩干; ② 每孔加入检测溶液 A 100 μl, 37 °C 温育 1 h; ③ 弃去孔内液体, 每孔加 350 μl 洗涤液, 浸泡 1~2 min, 吸去或甩掉酶标板内液体, 重复洗涤 3 次; 每孔加检测溶液 B 100 μl, 37 °C 温育 30 min; 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 5 次; ④ 每孔加底物溶液 90 μl, 37 °C 避光显色(反应时间控制在 15~25 min), 每孔加终止液

50 μl, 终止反应, 蓝色立转为黄色; ⑤ 用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度值。

1.2.2 生化指标和病毒学指标检测 乙肝五项定量采用雅培化学发光法检测, HBV DNA 采用实时荧光定量 PCR 检测, 采用美国 Beckman 公司全自动生化分析仪及其试剂分别检测肝功能: 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT, 正常值 ≤ 40 U/L)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST, 正常值 ≤ 40 U/L)、血清总胆红素(total bilirubin, TBil, 正常值 ≤ 17.1 μmol/L), 采用美国 Beckman LH750 血球分析仪进行血小板(platelet, PLT)检测(正常值 100 × 10⁹/L ~ 300 × 10⁹/L)。

1.2.3 肝脏活组织检查和病理学诊断 在超声引导下采用一秒钟快速穿刺活检术穿刺获取肝脏组织, 长度 1.5~2.0 cm, 甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 经 HE 染色及网状纤维和(或) Masson 三色染色, 光学显微镜观察, 分别由两名病理医师进行阅片诊断。肝脏炎症活动度分级(G)和纤维化分期(S)参照《2000 年病毒性肝炎防治方案》的诊断标准^[7]。

1.2.4 多参数无创诊断模型的计算 APRI 评分计算方法: $APRI = [(AST/ULN \times 100) / PLT (10^9/L)]^{[8]}$, 其中 ULN 为 AST 正常参考值上限。FIB-4 指数基于 ALT、AST、PLT 和患者年龄进行计算, $FIB-4 = (年龄 \times AST) / (PLT \times ALT \text{ 的平方根})^{[9]}$ 。

1.3 统计学处理 所有数据均用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。部分定量资料进行对数转换, 相关性采用 Spearman 相关分析, 采用独立样本 *t* 检验进行两组之间资料的比较, 采用单因素方差分析 S0-1、S2 和 S3-4 组资料的差异, 采用 LSD 检验比较三组中的两两差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评价 MANF 蛋白无创诊断肝纤维化的灵敏度和特异度。

2 结果

2.1 不同肝纤维化程度的慢性 HBV 感染者外周血 MANF 蛋白的表达 首先按照肝纤维化程度对 S0-1 组、S2 组、S3-4 组进行分析, 结果显示: 健康对照组、S0-1、S2 和 S3-4 组 4 组之间 MANF 蛋白的表达差异有统计学意义($F = 17.55, P < 0.05$), 进一步组间两两分析显示, 与健康对照组比较, S0-1 组、S2 组和 S3-4 组 MANF 蛋白的表达水平差异均有统计学意义($t = 2.11, 3.48, 6.89, P < 0.05$), 与 S0-1 组比较, S3-4 组 MANF 蛋白的表达水平差异

有统计学意义($t = 5.60, P < 0.01$), 与 S2 组比较, S3-4 组 MANF 蛋白的表达水平差异有统计学意义($t = 3.72, P < 0.01$), 但 S2 组与 S0-1 组之间比较差异无统计学意义, 见图 1。

2.2 慢性 HBV 感染者 MANF 蛋白水平与肝脏纤维化指标相关性 肝脏纤维化程度 S0-1、S2、S3-4 的患者 MANF 蛋白的表达水平分别为 (2.00 ± 0.53)、(2.17 ± 0.54)、(2.57 ± 0.47), 差异有统计学意义($F = 17.55, P < 0.05$), 见图 1。MANF 蛋白与肝纤维化的相关性分析结果显示, 患者 MANF 蛋白水平与肝纤维化程度呈正相关性($r = 0.431, P < 0.05$), 另外 FIB-4 和 APRI 指数与肝纤维化程度也呈正相关性($r = 0.424, 0.428, P < 0.05$)。

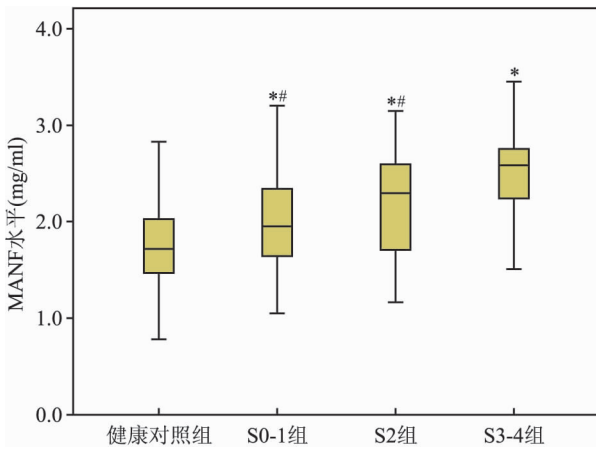


图 1 不同肝纤维化程度的慢性 HBV 感染者 MANF 蛋白水平表达比较

与健康对照组比较: * $P < 0.05$; 与 S3-4 组比较: # $P < 0.01$

2.3 外周血 MANF 蛋白的表达水平与临床指标的相关性 将 169 例慢性 HBV 感染者的临床资料根据其乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 水平、乙型肝炎 E 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg) 状态、HBV-DNA、ALT 水平、AST 水平及 TBil 水平分别进行分组, 结果显示 MANF 蛋白的表达水平在不同临床指标分组进行比较时, 不同 ALT、AST 水平组间差异有统计学意义($P < 0.05$), 但其它指标组间差异均无统计学意义, 见表 1。

2.4 MANF 蛋白无创诊断肝纤维化各期的预测价值 将 169 例慢性 HBV 感染者以肝脏病理结果为金标准进行分组: ① $S \geq S2$ (显著肝纤维化) 期 93 例; ② $S \geq S3$ (严重肝纤维化) 42 例。利用 ROC 曲线分别评价 MANF 蛋白、APRI 指数和 FIB-4 对肝纤维化的预测价值, 并计算出显著纤维化和严重纤维

化相对应的敏感度和特异度。在 169 例患者中, 诊断显著肝纤维化时 MANF 蛋白、APRI、FIB-4 的 AUC (95% CI) 值分别为 0.670 (0.622 ~ 0.784)、0.725 (0.642 ~ 0.807)、0.685 (0.603 ~ 0.766), 敏感度分别为 64.5%、73.1%、53.8%, 特异度分别为 68.7%、71.6%、76.1%。诊断严重肝纤维化时 MANF 蛋白、APRI、FIB-4 的 AUC 值 (95% CI) 分别为 0.736 (0.655 ~ 0.818)、0.742 (0.662 ~ 0.823)、0.687 (0.584 ~ 0.790), 敏感度分别为 92.9%、83.3%、47.6%, 特异度分别为 46.6%、57.6%、92.4%, 见图 2。

表 1 慢性 HBV 感染者 MANF 蛋白表达水平与临床特征的相关性 ($n = 169, \bar{x} \pm s$)

变量	MANF 值 (mg/L)	F/t 值	P 值
HBsAg (IU/ml)			
< 1 000	2.10 ± 0.58		
1 000 ~ 20 000	2.27 ± 0.57	1.976	0.142
> 20 000	2.21 ± 0.54		
HBeAg			
阳性	2.21 ± 0.56		
阴性	2.23 ± 0.57	0.200	0.841
ALT (U/ml)			
< 80	2.18 ± 0.57		
80 ~ 250	2.14 ± 0.54	5.955	0.003
> 250	2.22 ± 0.63		
AST (U/ml)			
< 80	2.13 ± 0.54		
80 ~ 250	2.43 ± 0.60	4.908	0.009
> 250	2.61 ± 0.31		
HBV-DNA (copies/ml)			
< 10 ³	2.14 ± 0.56		
10 ³ ~ 10 ⁵	2.15 ± 0.62	0.311	0.734
> 10 ⁵	2.23 ± 0.52		

3 讨论

目前大量研究^[10-11]证实, HBV 可以诱导肝脏细胞 ERS 反应, ERS 参与了 HBV 感染后病毒复制、细胞损伤等肝脏非可控性炎症的发生发展, 并与肝细胞的恶性转化有关, 但 HBV 感染诱导 ERS 的确切调控机制尚未明确。本研究已经证实, MANF 基因是 ERS 相关基因, ERS 通过未折叠蛋白反应信号通路上调 MANF 蛋白的表达。Chen et al 研究^[12]已经证实 MANF 蛋白对 ERS 诱导的细胞凋亡具有保护作用, 推测 MANF 蛋白在肝脏慢性损伤中可能抑制肝纤维化的发生和发展。MANF 蛋白是一种分泌性蛋白, 其在外周血中的表达水平是否与慢性 HBV 感染后肝纤维化的进展密切相关国内外尚未见报道。因此, 本研究对不同肝纤维化阶段的慢性

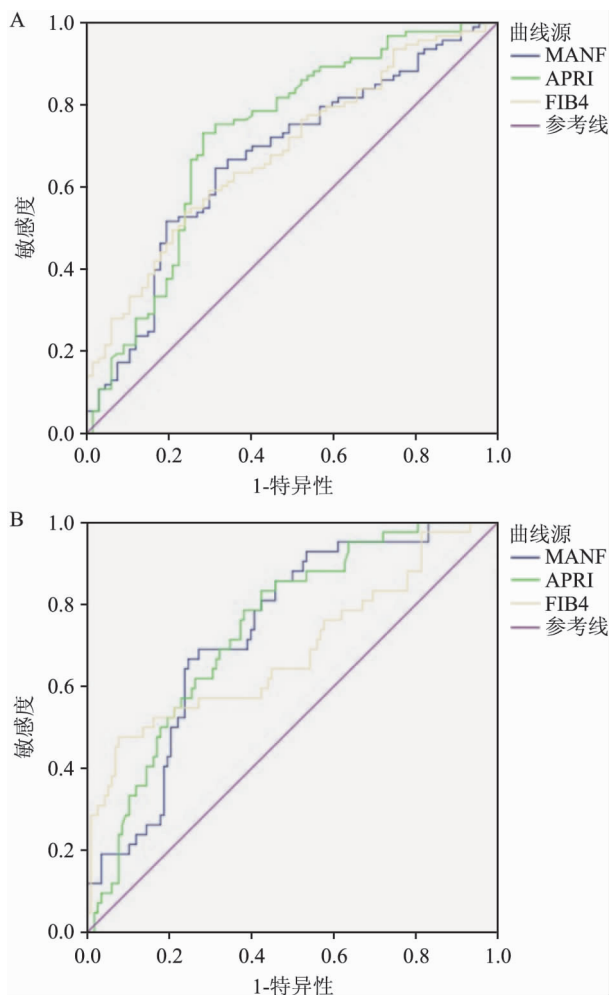


图2 MANF 蛋白、APRI 指数、FIB-4 值无创诊断显著肝纤维化和严重肝纤维化的 ROC 曲线分析
A: 显著肝纤维化; B: 严重肝纤维化

HBV 感染者外周血中 MANF 蛋白的表达水平进行了检测,结果显示肝脏 ALT 和 AST 水平的升高程度与 MANF 蛋白的表达水平呈正相关性。与健康对照组比较 S0-1 组、S2 组和 S3-4 组的 MANF 表达水平逐步增加,提示 MANF 蛋白与肝纤维化的进展密切相关。本研究前期表明,MANF 蛋白在慢性 HBV 感染后的肝纤维化阶段表达最高,但疾病进展至肝硬化失代偿期和肝癌阶段时均明显低表达,为何到了肝硬化失代偿期和肝癌阶段 MANF 蛋白的表达水平反而降低尚不明确^[13-14]。本研究推测 ERS 诱导的凋亡等作为一种刺激因素参与了组织损伤和纤维化的发生发展^[15]。适度的 ERS 为细胞的一种自我保护反应,但如果肝脏持续的损伤导致过度的 ERS 则细胞呈过度凋亡。肝硬化和肝硬化基础上的肝癌是慢性 HBV 感染的严重疾病阶段,因此推测在慢性 HBV 感染的早期肝脏炎症和纤维化阶

段,ERS 诱导的 MANF 蛋白表达水平较高是对肝纤维化发生发展的一种保护作用,但当 HBV 感染引起的免疫损伤持续存在导致广泛假小叶形成,肝细胞则呈过度凋亡状态,ERS 不再是其疾病进展的主要机制,因此,MANF 蛋白表达呈下降趋势。

近年来无创纤维化模型和瞬时弹性成像检测手段快速发展,在无创纤维化模型中主要以多参数血清学模型为研究热点,研究^[16-17]表明,APRI 和 FIB-4 能够较好的用于慢性乙型肝炎肝纤维化程度的评估,APRI 及 FIB-4 在肝纤维化各期具有良好的敏感性和特异性,可用于治疗决策和监控纤维化的进展。因此,本研究探讨了 MANF 蛋白水平对肝纤维化的无创诊断价值,并与 APRI 和 FIB-4 血清学无创评估模型进行了比较,结果显示 MANF 蛋白无创诊断显著肝纤维化的敏感度和特异度分别为 64.5% 和 68.7%,而用于诊断严重肝纤维化的敏感度增加至 92.9%,特异度为 46.6%,特异度相对较差,但与 APRI 指数和 FIB-4 指数能形成一定的互补,值得进一步扩大样本量进行证实。

参考文献

- [1] Ganem D, Prince A M. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences [J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-29.
- [2] Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases [J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1752-63.
- [3] Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, et al. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons [J]. J Mol Neurosci, 2003, 20(2): 173-88.
- [4] Lindholm P, Peränen J, Andressoo J O, et al. MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(3): 356-71.
- [5] Glembotski C C. Functions for the cardiomyokine, manf, in cardioprotection, hypertrophy and heart failure [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(4): 512-7.
- [6] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版) [J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(2): 65-80.
- [7] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-9.
- [8] Wai C T, Greenson J K, Fontana R J, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C [J]. Hepatology, 2003, 38(2): 518-26.
- [9] Teshale E, Lu M, Rupp L B, et al. APRI and FIB-4 are good predictors of the stage of liver fibrosis in chronic hepatitis B: the

- chronic hepatitis cohort study (CHeCS) [J]. *J Viral Hepat*, 2014, 21(12):917-20.
- [10] 潘高峰, 郜玉峰, 叶娇娇, 等. 慢性 HBV 感染者外周血白细胞 GRP78、CHOP 和 XBP1 mRNA 水平变化 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2015, 18(2): 136-40.
- [11] Lazar C, Uta M, Branza-Nichita N. Modulation of the unfolded protein response by the human hepatitis B virus [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5:433.
- [12] Chen L, Feng L, Wang X, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is involved in inflammation by negatively regulating the NF- κ B pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8133.
- [13] 叶娇娇, 马双双, 郜玉峰, 等. 中脑星形胶质细胞源性神经营养因子蛋白表达水平与乙型肝炎病毒慢性感染后疾病进展的相关性 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(22): 3532-7.
- [14] 潘高峰, 郜玉峰, 叶娇娇, 等. MANF 蛋白表达水平与肝纤维化程度的相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2015, 50(1): 78-82.
- [15] Lenna S, Trojanowska M. The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2012, 24(6):663-8.
- [16] 殷宏娟, 郜玉峰, 叶 珺, 等. FIB-4 指数对 ALT 小于 2 倍正常值上限的慢性 HBV 感染患者肝纤维化的诊断价值 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6): 812-5.
- [17] Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(34): 12031-8.

Association between the expression level of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protein and liver fibrosis progression after chronic hepatitis B virus infection

Ma Shuangshuang, Wang Yinqiu, Gao Yufeng, et al

(Dept of Hepatopathy, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the difference of endoplasmic reticulum stress related mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) protein expression level and its non-invasive diagnosis value for liver fibrosis in chronic hepatitis B virus (HBV) infection patients. **Methods** The severity of liver fibrosis in 169 chronic hepatitis B infection patients was assessed by liver biopsy, the routine laboratory indicators were examined to calculate APRI and FIB-4 index. The expression level of MANF protein in peripheral blood plasma was measured by ELISA method. The diagnostic value of MANF protein, APRI and FIB-4 index in significant fibrosis and advanced fibrosis were assessed according to the area under the receiver operating characteristic curves (ROC), the sensitivity (SN) and specificity (SP). **Results** The expression level of MANF protein between the health control (HC) group, S0-1 group, S2 group and S3-4 group patients had a statistically significant difference ($F = 17.55, P < 0.05$). Further data analysis showed that the expression levels of MANF protein had a statistically significant difference in the pairwise comparison of the HC group, S0-1 group, S2 group and S3-4 group patients ($P < 0.05$), beside S0-1 group and S2 group. With the severity of liver fibrosis, the significant correlation was found between the expression level of MANF protein and liver fibrosis ($r_s = 0.431, P < 0.001$), the correlation was similar with APRI and FIB-4 indexes, The area under ROC curve of MANF protein for significant fibrosis ($S \geq S2$) were 0.670, the sensitivity and specificity of MANF protein for significant fibrosis were 64.5% and 68.7%. The area under ROC curve of MANF protein for advanced fibrosis ($S \geq S3$) were 0.736, the sensitivity and specificity of MANF protein for advanced fibrosis were 92.9% and 46.6%. **Conclusion** The expression level of MANF protein gradually increase with the fibrosis progression after chronic HBV infection, it may have a better predictive value for the degree of liver fibrosis.

Key words mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor; hepatitis B virus; liver fibrosis; noninvasive diagnosis