

MANF 蛋白表达水平与肝纤维化程度的相关性研究

潘高峰¹, 郇玉峰¹, 叶娇娇¹, 姜同翠², 沈玉君², 沈玉先²

摘要 目的 探讨中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 (MANF) 蛋白在慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染患者肝纤维化发生发展中的作用及其与临床特点的相关性。方法 采用相对和绝对定量同位素标记 (ITRAQ) 蛋白质组学和免疫组化法检测肝脏穿刺组织中 MANF 蛋白的表达, 分析其表达水平与肝脏炎症纤维化分期的关系; 采用实时荧光定量 PCR 技术检测正常对照 (NC)、乙肝病毒携带者 (ASC)、慢性乙型肝炎患者 (CHB) 及乙肝后肝硬化患者 (LC) 外周血白细胞中 MANF mRNA 的表达水平, 分析其与不同阶段慢性 HBV 感染者的临床病毒学和生化学指标的相关性。结果 MANF 蛋白主要在肝细胞质中表达, 其表达水平随着肝脏炎症及纤维化的程度加重而升高。NC 组、ASC 组和 CHB 组分别与 LC 组比较, MANF mRNA 的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。MANF mRNA 的表达水平在乙肝病毒表面抗原

(HBsAg) $< 1.5 \times 10^6$ IU/L、($1.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$) IU/L 和 $> 2.0 \times 10^7$ IU/L 3 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在乙肝病毒 e 抗原 (HBeAg) 阳性组与阴性组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 在胆红素正常组与异常组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 MANF 蛋白可能参与了慢性 HBV 感染者肝纤维化的发生发展, 并与其临床特点相关。

关键词 MANF; 内质网应激; 慢性乙型肝炎; 肝纤维化
中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0078-05

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染在慢性乙型肝炎-肝纤维化-肝硬化转化中起着重要的作用, 但确切机制尚未完全阐明。大量研究^[1]证实, 持续的 HBV 复制和表达可触发内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激, ER 应激与 HBV 感染后肝脏非可控性炎症的发生发展和恶性转化密切相关, 但确切的调控机制尚未阐明。中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, MANF) 基因编码的蛋白主要位于 ER 和高尔基体, 是一种分泌性蛋白^[2]。目

2014-09-27 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2014A107)

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: 潘高峰, 男, 硕士研究生;

郇玉峰, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: aygyf@126.com

Correlation between plasma omentin-1 levels and colorectal cancer

Chen Yan¹, Zhao Xiaotong¹, Chen Mingwei^{1,2}, et al

(¹Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Provincial Laboratory of Endocrinology & Metabolism, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the relationship between plasma adipocytokine omentin-1 levels and colorectal cancer (CRC). **Methods** This study was conducted among 42 patients with pathologically diagnosed CRC after operation as the case group, and 42 healthy subjects who underwent total colonoscopy because of a voluntary health check-up as the control group. The above two groups were matched between age and sex. After participants had fasted overnight, their blood samples were collected. Fasting plasma omentin-1 was measured using ELISA methods.

Results The omentin-1 levels in patients with CRC were significantly higher than in controls ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that plasma omentin-1 was positively correlated with high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ($r = 0.57$, $P < 0.01$), and negatively correlated with serum triglyceride (TG), fasting insulin (FINS), waist hip ratio (WHR), HOMA model insulin resistance index (HOMA-IR) ($r = -0.668$, -0.493 , -0.395 , -0.371 , respectively, $P < 0.05$). Multiple stepwise regression analysis showed that TG, HDL-C, WHR were the influencing factors of plasma omentin-1 in CRC patients. **Conclusion** The plasma omentin-1 level may correlate with the development of CRC.

Key words adipocytokine; omentin-1; colorectal cancer

前研究^[3-5]表明,ER 应激可以上调 MANF 基因的表达和蛋白的分泌,在帕金森病、脑缺血、心肌缺血等多种病理状态下发挥细胞保护作用。ER 应激上调 MANF 蛋白表达的作用可能在于抑制 ER 应激引起的过度炎症和纤维化反应,但 MANF 蛋白与慢性 HBV 感染后炎症和纤维化发展的相关性尚未见报道。因此,拟对不同阶段的慢性 HBV 感染者肝脏组织和外周血 MANF mRNA 的表达水平进行研究,探讨 MANF 在乙型肝炎-肝纤维化-肝硬化进程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2012 年 1 月~3 月在中国人民解放军 123 医院住院并行肝脏穿刺活检的慢性 HBV 感染患者 20 例进行蛋白质组学研究,其中 G1S1、G2S2、G3S3、G4S4 各 5 例,男 12 例,女 8 例,年龄 25~54 (33.7 ± 12.4) 岁,分别作为 G1S1 组、G2S2 组、G3S3 组及 G4S4 组。选取 2013 年 5 月~2014 年 3 月就诊于安徽医科大学第二附属医院肝病科的乙肝表面抗原携带者(asymptomatic hepatitis B virus surface antigen carriers, ASC) 44 例作为 ASC 组,慢乙肝(chronic hepatitis B, CHB)患者 56 例作为 CHB 组,乙肝后肝硬化(liver cirrhosis, LC)患者 49 例作为 LC 组,进行实时荧光定量 PCR 研究,同时选取 40 例体检健康者(normal healthy controls, NC)作为 NC 组。所有病例无重叠其他肝炎病毒感染、药物性肝病、酒精性肝病、自身免疫性肝病及其他疾病。研究方案经医院伦理委员会审批通过,所有患者签署知情同意书。

1.2 病理组织检查 采用 1 s 快速穿刺活检术获取长度在 1.5~2.0 cm 的肝脏组织,按以下步骤处理样本:4% 的甲醛固定,乙醇溶液脱水,石蜡包埋,组织切片,HE 及网状纤维染色。在光学显微镜下($\times 200$)多视野观察,病理分级参照 2010 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[6]。

1.3 蛋白质组学研究 肝穿组织先经胰蛋白酶裂解、烷基化、酶解为肽段,得到的肽段用相对和绝对定量同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantitation, ITRAQ)试剂进行差异标记,再将标记样本相混合,最后用液相-二级质谱联用(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)设备进行分析,具体委托上海中科新生命生物科技有限公司完成。

1.4 免疫组化法 石蜡切片常规脱蜡至水。用

0.3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶。用 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复。4℃ 条件下用 5% 的山羊血清进行封闭,加一抗(1:200 的 MANF 抗体,英国 Abcam 公司)后 4℃ 过夜。滴加生物素化二抗(B 液)37℃ 孵育 1 h,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色。苏木精复染,乙醇脱水,中性树胶封片后显微镜下观察。

1.5 免疫组化结果判断 显微镜下观察肝脏组织,肝细胞胞质内褐色颗粒为阳性结果。按染色强度及阳性细胞比例进行半定量分析^[7],二者综合后评定结果:阴性、弱阳性、阳性、强阳性。见图 1。

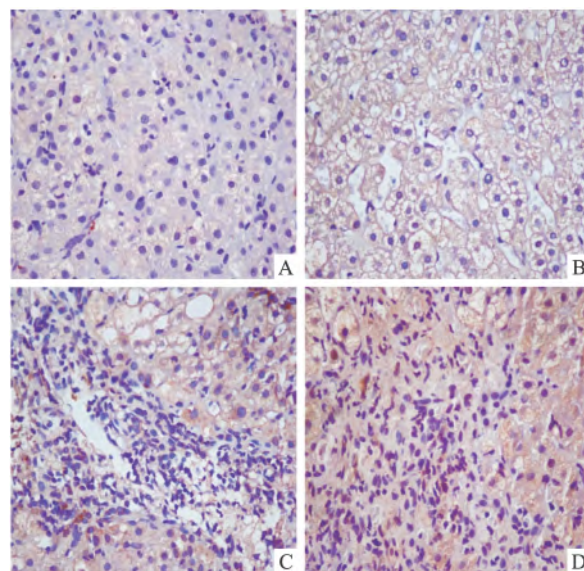


图 1 肝脏穿刺组织 MANF 蛋白的表达 DAB $\times 200$

A: 阴性表达; B: 弱阳性表达; C: 阳性表达; D: 强阳性表达

1.6 实时荧光定量 PCR 采集 HBV 感染者及健康体检者的空腹外周血 1 ml,4 h 内加入红细胞裂解液,混匀后离心弃上清液留白细胞沉淀,加入 TRIzol 混匀后按照说明书提取 RNA。1% 的琼脂糖电泳鉴定 RNA。RNA 的浓度及纯度用分光测量仪 Quawell Q5000 测定。反转录反应按照 TaKaRa PrimScript 逆转录试剂盒说明书进行,总体系为 10 μ l,反应条件为 37℃ 15 min,85℃ 15 s。按照 GenBank 数据库提供的 MANF、GAPDH 基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件分别设计人源引物,委托上海生工公司合成引物,GAPDH 引物:上游 5'-CCACTCCTCCAC-CTTTG-3',下游 5'-CACCACCCTGTTGCTGT-3'; MANF 引物:上游 5'-TCACATTCTCACCAGCCACT-3',下游 5'-CAGGTCGATCTGCTTGTTCATAC-3'。按照 SYBR Green PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)说

说明书使用 PR0961201846 (美国 Thermo 公司) 实时定量 PCR 仪进行反应,反应条件如下:95 ℃ 30 s 预变性→(95 ℃ 5 s →60 ℃ 30 s) 40 个循环。1% 的琼脂糖电泳鉴定目的基因片段,GAPDH 作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。定量资料进行对数转换后采用秩和检验,分类资料采用 Spearman 秩相关检验进行分析。诊断分组之间的两两比较检验水准为 $\alpha = 0.0083$ 和 $P < 0.0083$ 差异具有统计学意义,余比较检验水准 $\alpha = 0.05$ 和 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝穿组织蛋白质组学研究结果 在对不同炎症和纤维化分级的慢性乙型肝炎患者肝穿组织各 5 例进行 ITRAQ 蛋白组学定量研究时发现,随着肝脏炎症纤维化加剧,MANF 蛋白的表达逐步增加,与肝脏炎症和纤维化程度呈密切正相关。

2.2 肝穿标本中 MANF 蛋白表达的免疫组化结果

为了进一步证实蛋白质组学的初步发现,再次对上述标本的石蜡切片进行了 MANF 蛋白表达的免疫组化验证,结果显示 G1S1 组多呈阴性及弱阳性表达,G2S2 组多呈弱阳性及阳性表达,G3S3 及 G4S4 组多呈阳性及强阳性表达,与蛋白质组学的研究结果一致。

2.3 不同阶段的慢性 HBV 感染患者外周血 MANF mRNA 的表达 结果显示:4 组之间 MANF mRNA 的表达差异有统计学意义($P = 0.00$)。进一步进行两两组间分析显示,与 LC 组相比,NC 组、ASC 组和 CHB 组 MANF mRNA 的表达水平差异均有统计学意义($P < 0.01$),其余任意两组之间比较差异均无统计学意义。见图2。采用秩相关检验示

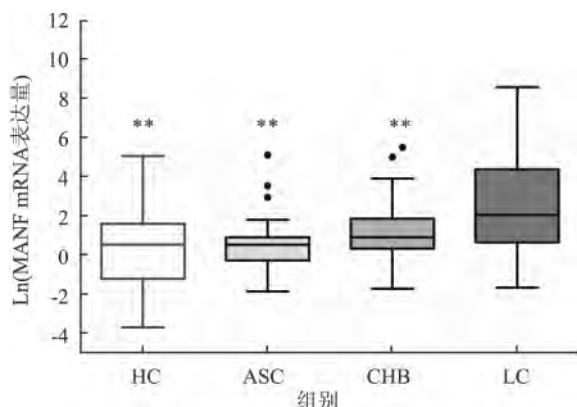


图2 按诊断分组时 MANF mRNA 表达量的差异
与 LC 组比较: ** $P < 0.01$

外周血白细胞中 MANF mRNA 表达与肝脏疾病进展存在正相关($r_s = 0.376$, $P = 0.00$)。

2.4 外周血白细胞 MANF mRNA 的表达水平与临床指标的相关性 将 149 例 HBV 感染者根据乙肝病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)水平、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)水平、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平、乙肝病毒 e 抗原(hepatitis B e-antigen, HBeAg)定性、HBV-DNA 以及总胆红素(total bilirubin, TBIL)水平分别进行分组,结果表明,MANF mRNA 的表达水平在不同水平的 HBsAg 分组间差异有统计学意义($P = 0.043$),但任意两组间差异无统计学意义;HBeAg 阳性组与阴性组外周血白细胞 MANF mRNA 表达差异有统计学意义($P = 0.001$);TBIL 正常组与异常组之间 MANF mRNA 表达差异有统计学意义($P = 0.001$);但 MANF mRNA 表达水平在不同 ALT、AST 和 HBV-DNA 分组间差异均无统计学意义。见表 1。

3 讨论

MANF 基因是从 30 000 个基因中筛选出来的并对 ER 应激最敏感的基因,是一种分泌性蛋白。课题组在前期研究^[8]已经证实,MANF 蛋白是一种 ER 应激相关的分泌性蛋白,ER 应激上调 MANF 表达。而大量研究^[13-14]已经证实,HBV 持续感染可以导致 ER 应激,对 MANF 蛋白是否参与 HBV 慢性感染后肝脏炎症和纤维化进展尚未见报道。推测,MANF 很可能在肝炎到肝硬化的转变中起着重要的作用。因此,首先选取了不同炎症和纤维化分级的肝脏穿刺组织进行 ITRAQ 蛋白质组学的探索性研究,结果显示,MANF 随炎症和纤维化的加重而表达逐步增加,提示 MANF 蛋白参与了肝脏炎症和纤维化的进展。为进一步证实蛋白质组学的初步结果,再次对进行蛋白质组学的肝脏穿刺石蜡标本进行了免疫组化研究,结果同样证实 MANF 蛋白的表达随着炎症和纤维化程度的加重逐渐增加。目前认为,ER 应激诱导的凋亡、炎症和上皮细胞间质转化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^[9]。未折叠蛋白反应(UPR)反应诱导的凋亡可以导致转化生长因子 β (TGF- β) 的释放,进一步刺激纤维化的发生发展^[10]。结合前期体外研究^[11]证实 MANF 对 ER 应激诱导的细胞凋亡具有保护作用。另外,通过对过表达 HBx 蛋白的人肝癌细胞株 HepG2 研究^[12]表明,糖调节蛋白 78(GRP78/BiP)

表1 不同阶段慢性 HBV 感染者外周血 MANF mRNA 水平与临床指标的相关性

项目	n	性别(男/女, n)	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	Ln(MANF mRNA) M(min ~ max)	χ^2/Z 值	P 值
HBsAg(IU/L)						
<1.5 × 10 ⁶	53	41/12	46.8 ± 13.0	0.73(-1.67 ~ 7.13)	6.297	0.043
1.5 × 10 ⁶ ~ 2.0 × 10 ⁷	67	48/19	41.3 ± 13.4	1.18(-1.87 ~ 8.58)		
>2.0 × 10 ⁷	29	23/6	32.6 ± 9.8	0.59(-1.4 ~ 8.44)		
HBeAg						
阳性	102	75/27	39.7 ± 13.4	1.14(-1.87 ~ 8.58)	-3.265	0.001
阴性	47	37/10	45.2 ± 13.3	0.48(-1.73 ~ 5.50)		
ALT (U/L)						
<80	88	66/22	43.4 ± 13.8	0.76(-1.87 ~ 8.44)	3.714	0.156
80 ~ 250	34	24/10	39.7 ± 11.8	1.21(-1.33 ~ 3.90)		
>250	27	22/5	38.7 ± 13.3	0.57(-0.52 ~ 8.58)		
AST (U/L)						
<80	106	81/25	40.9 ± 13.4	0.81(-1.87 ~ 8.44)	2.071	0.355
80 ~ 250	23	16/7	40.9 ± 15.5	1.37(-1.33 ~ 6.43)		
>250	20	15/5	43.8 ± 11.8	0.75(-0.17 ~ 8.58)		
HBV DNA(IU/L)						
<10 ⁶	44	33/11	46.5 ± 14.9	1.25(-1.67 ~ 5.98)	5.328	0.070
10 ⁶ ~ 10 ⁸	33	23/10	41.9 ± 10.7	0.49(-1.73 ~ 4.99)		
>10 ⁸	72	54/18	37.8 ± 12.9	1.06(-1.87 ~ 8.58)		
TBIL (μmol/L)						
<17.1	73	52/24	38.0 ± 12.3	0.59(-1.87 ~ 5.11)	-3.446	0.001
≥17.1	76	60/13	44.5 ± 14.0	1.40(-1.67 ~ 8.58)		

和 MANF 在稳转 HBx 蛋白的 HepG2 细胞中表达升高,这一结论从理论上支持以上观点。MANF 在多种疾病中可以保护相关细胞免受损伤,推测 MANF 蛋白在 HBV 感染后疾病进程中可能起着保护肝细胞免受损伤,其在肝硬化中的高表达很可能是机体抗纤维化的一个自我保护反应,当然也不能排除 MANF 本身就是一个肝纤维化的标志或促肝纤维化的指标,有待于进一步研究证实。

HBV 病毒本身,HBV 相关蛋白及病程中产生的炎症及氧化应激均可触发 ER 应激^[13-14]。ER 应激蛋白 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP) 很可能通过上调 TGF-β1、α-平滑肌肌动蛋白及胶原蛋白的表达来促进肝纤维化^[15]。研究^[14]证实: HBsAg 在肝细胞内的聚集均会诱发 ER 应激,鉴于 MANF 蛋白是一种分泌性蛋白,因此,对不同阶段的慢乙肝患者外周血 MANF mRNA 的表达水平进行了进一步的研究,结果表明,MANF mRNA 水平随着疾病进展表达逐渐增加,也同样支持 MANF 蛋白参与了肝纤维化进展。临床证据显示 HBsAg 和 HBV DNA 水平越高的患者,肝纤维化程度相对较低,研究也证实 MANF 蛋白随着 HBsAg 和 HBV DNA 水平的增高而表达逐步降低。本研究表明 HBeAg 阳性组与阴性组间 MANF mRNA 的表达存在差异,且阳性组 MANF mRNA 的表达量要高于阴性组,这可能与

HBeAg 阳性者肝脏受损较重,所诱导的 ER 应激也越激烈,从而导致 MANF 的高表达,而这种高表达可能是为了减轻肝细胞炎症及纤维化。胆红素是反映肝功能的一项重要指标,HBV 感染者可因为肝细胞的损伤引起胆红素的升高,其持续的升高往往提示肝脏损伤也在持续的加重,即可以发生严重的 ER 应激,最终导致 ER 应激相关基因 MANF 的高表达。这可以解释 TBIL 异常组 MANF mRNA 的表达量要高于与 TBIL 正常组。一般而言,转氨酶水平越高,肝细胞受损越重,但研究却未发现外周血中 MANF mRNA 的表达水平与转氨酶水平存在相关性,有待进一步扩大样本研究。

综上所述,本研究首次证实 MANF 蛋白参与了肝脏炎症和纤维化的进展,但确切的机制尚不明确,推测 MANF 蛋白可能起到对抗促肝纤维化机制的作用,MANF 蛋白作为一种分泌性蛋白有可能作为一个监测肝纤维化的潜在指标,进一步阐明 MANF 蛋白的作用机制有待进一步通过改变 MANF 蛋白表达量来观察肝纤维化程度的改变程度来明确。

参考文献

- [1] Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases[J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1752-63.
- [2] Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, et al. MANF: a new mesence-

- phalic , astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons [J]. *J Mol Neurosci* , 2003 , 20(2) : 173 – 88.
- [3] 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 Neurosci* , 2008 , 39(3) : 356 – 71.
- [4] Glembotski C C. Functions for the cardiomyokine , manf , in cardioprotection , hypertrophy and heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol* , 2011 , 51(4) : 512 – 7.
- [5] Voutilainen M H , Bäck S , Pörsti E , et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of parkinson's disease [J]. *J Neurosci* , 2009 , 29(30) : 9651 – 9.
- [6] 贾继东 , 李兰娟. 慢性乙型肝炎防治指南 (2010 年版) [J]. 临床肝胆病杂志 , 2011 , 27(1) : 113 – 28.
- [7] Chia C S , Ban K , Ithnin H , et al. Expression of interleukin-18 , interferon- γ and interleukin-10 in hepatocellular carcinoma [J]. *Immunol Lett* , 2002 , 84(3) : 163 – 72.
- [8] Lindholm P , Saarna M. Novel cdnf/manf family of neurotrophic factors [J]. *Dev Neurobiol* , 2010 , 70(5) : 360 – 71.
- [9] 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.
- [10] Baek H A , Kim do S , Park H S , et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* , 2012 , 46(6) : 731 – 9.
- [11] 陈 滢 , 李成锦 , 杨 文 , 等. MANF 对 ER 应激诱导的细胞凋亡的保护作用 [J]. 安徽医科大学学报 , 2013 , 48(11) : 1308 – 12.
- [12] 陆 鹏 , 姜同翠 , 陈 露 , 等. 乙型肝炎 HBx 基因稳转细胞系的建立及其诱导的 ER 应激 [J]. 安徽医科大学学报 , 2014 , 49(3) : 283 – 7.
- [13] Montalbano R , Di Fazio P , Quint K , et al. Induction of endoplasmic reticulum-mediated stress pathways in liver cancer cell lines after overexpression of hepatitis B virus envelope proteins [J]. *Z Gastroenterol* , 2012 , 50(1) : 539.
- [14] Wang L H , Huang W , Lai M D , et al. Aberrant cyclin a expression and centrosome overduplication induced by hepatitis B virus pre-s2 mutants and its implication in hepatocarcinogenesis [J]. *Carcinogenesis* , 2012 , 33(2) : 466 – 72.
- [15] Mencin A , Seki E , Osawa Y , et al. Alpha-1 antitrypsin Z protein (piz) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis [J]. *Hepatology* , 2007 , 46(5) : 1443 – 52.

Study on correlation between MANF expression levels and the grade of liver fibrosis

Pan Gaofeng , Gao Yufeng , Ye Jiaojiao , et al

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

Abstract Objective To explore the role of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor(MANF) protein in the development of liver fibrosis and clinical significance in the patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **Methods** The expression of MANF protein in liver biopsy tissues was detected by isobaric tags for relative and absolute quantitation (ITRAQ) and immunohistochemical method , and then the relationship of MANF expression and the degree of inflammation and fibrosis of liver were analyzed. The levels of MANF mRNA in peripheral leukocytes were measured by real-time polymerase chain reaction (PCR) , and analyzed its correlation between clinical virological and biochemical data in asymptomatic hepatitis B virus surface antigen carriers(ASC) , chronic hepatitis B(CHB) , and liver cirrhosis(LC) . **Results** MANF protein was mainly localized in the cytoplasm of liver cells. The expression levels of MANF were gradually increased with the aggressive inflammation and fibrosis of liver. The expression levels of MANF mRNA in the patients with NC , ASC , CHB had a statistically significant difference compared to LC , respectively($P < 0.01$) . The expression levels of MANF mRNA had a statistically significant difference among three hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) levels groups (HBsAg $< 1.5 \times 10^6$ IU/L , 1.5×10^6 IU/L $\sim 2.0 \times 10^7$ IU/L and $> 2.0 \times 10^7$ IU/L , $P < 0.05$) . The difference of MANF mRNA expression levels was statistical significance between hepatitis B e-antigen (HBeAg) -positive group and HBeAg-negative group($P < 0.01$) , between normal and abnormal bilirubin group ($P < 0.01$) . **Conclusion** For the patients with HBV infection , MANF protein may be involved in the development of liver fibrosis and associated with its clinical significance. **Key words** MANF; endoplasmic reticulum stress; chronic hepatitis B; liver fibrosis