

肝功能正常慢性乙肝患者肝组织 GP73 表达与纤维化及炎症分级关系

奚经巧, 林枝, 赵春, 陈建欧, 王莹琮, 蔡文品

温州市中医院, 浙江 温州 325000

摘要: **目的** 调查肝功能正常慢性乙肝患者肝组织高尔基体蛋白 73 表达与病理活检结果相关性及其影响因素。 **方法** 按中华医学会传染病学会制定的 2015 年版《慢性乙型肝炎防治指南》为诊断标准选取 69 例肝功能正常慢性乙肝患者, B 超定位下行肝活检, 常规病理检测肝组织病理变化, 免疫组化法测定组织 GP73 的表达, 同时检测患者外周血 HBV-DNA、乙肝三系定量、常规肝功能指标, 统计分析组织纤维化 S0-S2 级与 S3-4 级间、炎症程度 G0-G1 级与 G2-G3 级间 GP73 表达的差异, 组织 GP73 表达与 HBV-DNA、肝功能指标间的相关性。 **结果** 肝功能正常慢性乙肝患者肝组织 GP73 阳性表达率为 81.16%, 呈细胞胞浆弥散和胞膜浓染的特征。显著纤维化患者(S3 级以上)GP73 表达显著高于不显著纤维化(S2 级以下), 中重度炎症反应肝组织 GP73 表达强于轻度炎症反应患者, 中高 HBV-DNA($>10^3$ IU/ml)复制患者 GP73 表达显著高于低复制($>10^3$ IU/ml)患者, 差异均有统计学意义(均 $P<0.001$); 组织 GP73 表达与血清 ALT、AST、HBV-DNA 间存在正相关($r=0.421, 0.414, 0.371, P=0.002, 0.002, 0.047$), 与 γ -GT 间的相关系数为 0.263($P=0.058$)。 **结论** 肝功能正常慢性乙肝患者组织纤维化与炎症反应依然存在, GP73 蛋白表达一定程度上反映了纤维化与炎症反应的程度。

关键词: 慢性乙型肝炎; 高尔基体蛋白 73; 肝活检; 纤维化

中图分类号: R512.6⁺2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)09-1125-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.09.030

随着乙肝疫苗注射接种的普及中国新发乙肝患者已经大幅度下降,但目前中国乙型肝炎病毒感染者仍然有 9 300 万,其中慢性乙肝患者约 2 000 万例^[1]。肝硬化与肝细胞肝癌是慢性乙肝最常见的持续病变,在我国肝硬化与肝细胞肝癌由乙肝感染引起的分别占 60%和 80%^[2],因此对慢性乙肝患者的纤维化准确评估和及时干预显得非常重要。肝活检是评估肝脏纤维化的金标准,但由于其创伤性及短时间内无法多次检查等缺陷限制了临床上的广泛运用,寻找新的血清生物学标志物评估肝脏组织纤维化是临床研究热点之一。高尔基体蛋白 73(Golgi protein 73, GP73)是定位于细胞高尔基体的一种跨膜糖蛋白,在多种肿瘤组织呈高表达如肝癌、前列腺癌、肺癌、肾癌^[3-4],尤其在肝细胞肝癌有较多报道,表明 GP73 与肝癌肿块大小、肿瘤分期、肿瘤分化及血管浸润密切相关^[5]。在慢性乙肝患者肝组织 GP73 的表达与肝脏病理相关性目前研究较少,而肝功能正常的慢乙肝血清与肝组织 GP73 水平的表达变化在评估肝组织纤维化和炎症状况尚不清楚。

基金项目:温州市科技局公益性科技计划项目(Y20150315)

作者简介:奚经巧(1964-),男,浙江平阳人,本科学历,副主任技师,研究方向:肿瘤生物分子标志物检验。

通信作者:蔡文品, E-mail: cwp1820@163.com。

1 对象与方法

1.1 研究对象 以中华医学会传染病学会制定的 2015 年版《慢性乙型肝炎防治指南》为诊断标准^[6],收集 2016 年 1 月-2017 年 5 月温州市中医院感染科门诊就诊且行肝活检的慢性乙型肝炎患者 69 例,其中男 35 例,年龄(40.63 \pm 8.73)岁,女 34 例,年龄(36.74 \pm 8.80)岁,本研究通过温州市中医院医学伦理委员会审核同意,征得研究对象同意并签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 肝组织 GP73 表达测定 采用免疫组化 SP 法检测,主要步骤蜡块肝组织切片脱蜡至水、阻断内源性过氧化物酶 10 min、抗原修复、pH7.2~7.6 PBS 缓冲液冲洗 3 次、擦去多余的缓冲液加入一抗(原液 200 倍稀释)后放 4℃冰箱过夜、PBS 缓冲液冲洗 3 次加二抗 37℃ 30 min、PBS 缓冲液冲洗 3 次加显色剂 DAB 6 min、水洗 3 次、苏木素淡染,蓝化,脱水,透明,封固。GP73 一抗购买自美国 Abcam 公司,批号 ab22209,二抗试剂购买自 Dako 公司,批号 20039541。

1.2.2 活检肝组织镜检 B 超定位下经皮穿刺法切取小块肝组织,常规苏木素伊红染色,光学显微镜 400 倍观察 5 个视野,按 2015 年《慢性乙型肝炎防治指南》标准判断患者肝组织的纤维化与炎症活动程度,纤维化分期包括 0、1、2、3 等四期,炎症活动度分期包

括 0、1、2、3 等四期。

1.2.3 肝组织 GP73 结果判断 参照和海玉等^[7]报道的标准由两位病理医师分别双盲阅片,按阳性细胞率和着色强度分别计算积分。细胞染色强度记分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞率记分:每张切片随机选取 10 个 400 倍视野观察,平均阳性细胞数占每视野平均细胞数 0%~5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分;染色强度分数和阳性细胞百分率分数之和为最后得分。0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性表达,4~5 分为阳性表达,6~7 分为强阳性表达。

1.2.4 血清常规生化指标、定量乙肝三系、HBV-DNA 的检测 生化肝功能指标包括总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(γ -GT);定量乙肝三系包括 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 等 5 项,上述指标在生化流水线一体机 Cobas 8000 上检测完成。HBV-DNA 用实时荧光定量 PCR 一步法测定,试

剂购买自湖南圣湘生物科技有限公司,批号为 2016009,所有操作严格按项目 SOP 进行。

1.3 统计分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。所有患者按性别分组后统计分析基本临床信息与肝功能指标的差异,比较分析不同 HBV-DNA 复制程度间、HBeAg 阳性与阴性患者间、不同肝组织纤维化程度间、不同肝组织炎症反应间的组织 GP73 表达差异;分析组织 GP73 表达与肝功能指标、HBV-DNA、HBsAg 和 HBeAg 定量结果相关性。正态分布数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,等级分布数据比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本临床特征 69 例慢性乙肝患者 HBV-DNA 低程度复制者($< 10^3$ IU/ml) 37 例,中高强度复制者($> 10^3$ IU/ml) 32 例;HBeAg 阳性患者 38 例,阴性患者 31 例。入选患者按性别分组的基本临床信息与肝功能指标,见表 1。

表 1 69 例慢性乙型肝炎患者临床信息与血清肝功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	TBIL(IU/L)	DBIL(IU/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ALP(IU/L)	γ -GT(IU/L)
男性	35	40.63 \pm 8.73	14.27 \pm 6.10	5.56 \pm 3.58	72.73 \pm 6.31	44.12 \pm 4.27	47.94 \pm 5.22	34.97 \pm 8.41	80.36 \pm 9.84	38.85 \pm 5.83
女性	34	36.74 \pm 8.80	10.75 \pm 4.29	4.16 \pm 1.46	72.88 \pm 5.22	42.59 \pm 2.91	31.39 \pm 6.32	30.76 \pm 7.51	63.97 \pm 8.96	18.57 \pm 6.34
t 值		1.84	2.02	2.68	0.106	1.68	1.65	0.76	3.29	3.04
P 值		0.07	0.047	0.009	0.916	0.098	0.104	0.45	0.002	0.003

2.2 肝组织炎症反应程度与纤维化程度 肝组织活检显示炎症反应程度为 G0 级 3 例、G1 级 31 例、G2 级 29 例、G3 级 6 例,G0、G1 为轻度炎症反应,G2 为中度炎症反应,G3 为重度炎症反应;纤维化程度为 S0 级 11 例、S1 级 17 例、S2 级 27 例、S3 级 9 例、S4 级 5 例,S2 级以下为不显著纤维化,S3 级以上为显著纤维化。

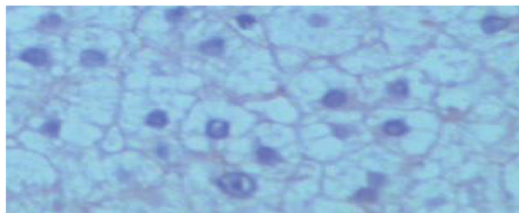


图 1 肝组织 GP73 阴性表达(HE 染色, $\times 400$)

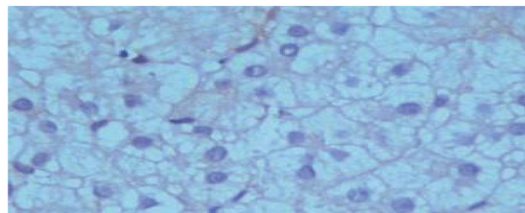


图 2 肝组织 GP73 弱阳性表达(HE 染色, $\times 400$)

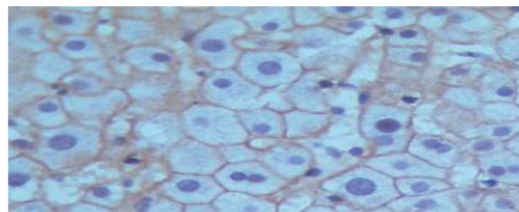


图 3 肝组织 GP73 阳性表达(HE 染色, $\times 400$)

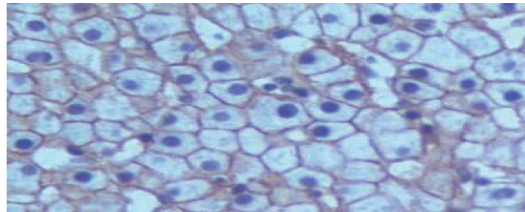


图 4 肝组织 GP73 强阳性表达(HE 染色, $\times 400$)

2.3 肝组织 GP73 表达为阴性 13 例、弱阳性 12 例、阳性 31 例、强阳性 13 例,阳性率为 81.16%(56/69),强阳性表达占比 18.84%(13/69)。GP73 蛋白主要表达在肝细胞的细胞浆与细胞膜部位,细胞膜表达更显著,棕黄色或黄褐色,强阳性表达会呈条块状。见图 1~图 4。

2.4 不同 HBV-DNA、不同 HBeAg、不同纤维化程度、不同炎症反应间肝组织 GP73 表达差异比较 HBV-DNA 分为低复制与中高复制,HBeAg 分为阳性患者阴性患者,组织纤维化程度分为显著纤维化(S3 级以上)与不显著纤维化(S2 级以下),不同炎症反应分为轻度炎症反应与中重度炎症反应,结果见表 2。HBV-DNA 中高复制、肝组织显著纤维化、肝组织中重度炎症反应 GP73 表达得分也高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表 2 不同 HBV-DNA、HBeAg 及肝组织不同病理变化间组织 GP73 表达得分比较

参数	分级	例数	GP73(分, $\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
HBV-DNA	低复制	37	2.11 \pm 0.56	10.64	<0.001
	中高复制	32	3.82 \pm 0.77		
HBeAg	阴性	31	3.16 \pm 0.72	0.47	0.64
	阳性	38	3.24 \pm 0.69		
纤维化程度	无显著纤维化	55	1.85 \pm 0.47	10.68	<0.001
	显著纤维化	14	3.71 \pm 0.91		
炎症程度	轻度反应	34	2.49 \pm 0.66	4.37	<0.001
	中重度反应	35	3.31 \pm 0.88		

2.5 肝组织 GP73 与血清其他检验指标相关性分析 显示与 ALT、AST、 γ -GT、HBV-DNA 间的相关系数 r 值分别为 0.421、0.414、0.263、0.371,对应的 P 值为 0.002、0.002、0.058、0.047。

3 讨论

高尔基体蛋白 73(Golgi protein 73)是定位于细胞高尔基体的一种跨膜蛋白,又称为 II 型高尔基体膜蛋白,因为在 SDS-PAGE 中显示的相对分子量为 73 000,所以被命名为 GP73。正常生理状况下 GP73 主要表达于上皮细胞,正常肝脏中 GP73 主要表达于汇管区的胆管上皮细胞,而肝细胞基本不表达或者极少量肝细胞低表达 GP73。它的生物学功能尚不十分清楚,目前相关研究主要集中在肿瘤诊断及预后中的价值,尤其是在肝细胞肝癌国内外有较多报道^[8-10],其敏感性特异性均优于甲胎蛋白(AFP),有望成为肝细胞肝癌早期诊断新的血清分子标志物。

Kladney 等^[11]用 WB 法研究不同病因所致肝硬化与正常肝脏中 GP73 表达差异发现,肝硬化组织中表达量显著高于正常对照肝组织,表达量与肝硬化程度有关而与病因无关。Ifikhar 等^[12]与 Maitra 等^[13]学者在对自身免疫性肝病、慢性丙型肝炎、酒精性肝炎相关研究得到同样的结论,可见在肝病的病因学诊断与分期方面 GP73 不具有显著的临床价值,但对病情评估与预后判断可能有一定价值。

关于慢性乙肝 GP73 表达相关研究国内较多学者

分析了血清中浓度与慢性乙肝临床分期及纤维化程度相关性或在抗病毒治疗方面的价值^[14-15],而慢性乙肝肝组织中 GP73 表达情况较少报道。本实验中纳入的肝功能正常慢性乙肝患者肝活检发现显著纤维化患者 14 例,占比 20.28%(14/69),中重度炎症反应 35 例,占比 50.72%(35/69),而他们外周血中临床生化指标基本处于正常参考范围内,因此临床上需要其他新的标志物来评估肝组织病理情况。

在实验中 GP73 在正常肝功能慢性乙肝患者呈高阳性率表达,且在 HBV-DNA 高复制患者、显著纤维化患者、中重度炎症反应患者中表达更强;相关分析显示肝组织 GP73 与血清 ALT、AST、HBV-DNA 间存在正相关,上述这些结果均提示 GP73 高表达与高病毒复制程度及显著纤维化密切相关,在彭桦等^[16]学者最新研究中证实乙肝病毒可能通过激活 Notch1 信号通路上调 GP73 的表达;学者王萃等^[17]在体外细胞培养实验分子机制研究中发现过表达 GP73 能激活 NF- κ B 的转录,进而促进炎症反应导致肝组织损伤。

总之,通过本实验得到慢性乙型肝炎患者肝组织 GP73 呈高表达,且与纤维化程度密切相关,两者变化方向一致,乙肝病毒的复制可能是促发 GP73 表达的启动因素,对于肝功能正常的慢性乙肝患者组织 GP73 具有一定临床价值,为后续外周血中 GP73 水平检测奠定基础。

参考文献

- [1] Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(1): 3-4.
- [2] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2099-2018.
- [3] 郭振英, 张爱霞, 曹伯良. GP73 在肿瘤诊断中的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(5): 469-471.
- [4] 黎晓武, 李金强, 罗向波, 等. 血清 GP73、HSP27 联合 AFP 检测在 HBV 相关早期肝细胞癌诊断的价值[J]. 实用预防医学, 2016, 23(11): 1319-1321.
- [5] 黄凤玲, 杨颖, 张瑞丽, 等. 肝细胞癌组织中高尔基体蛋白 73 和转化生长因子 β 1 及 Smad2 的表达水平及其意义[J]. 中国全科医学, 2016, 19(26): 3191-3195.
- [6] 中华医学会肝脏病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 321-340.
- [7] 和海玉, 路明亮, 黄华, 等. GP73 在慢性乙型肝炎、肝硬化、原发性肝癌血清及组织中的表达[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(4): 41-44.
- [8] Hou SC, Xiao MB, Ni RZ, et al. Serum GP73 is complementary to AFP and GGT- Γ for the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2013, 6(4): 1152-1158.
- [9] Jing JS, Ye W, Jiang YK, et al. The value of GPC3 and GP73 in clinical diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Lab, 2017, 63(11): 1903-1909.
- [10] 黄飞, 贺新祥, 刘文俊, 等. II 型高尔基体膜蛋白 73 在肝细胞肝癌中的水平及与肝细胞肝癌预后的相关性[J]. 实用预防医学, 2017, 24(7): 882-885.
- [11] Kladney RD, Cui X, Bulla GA, et al. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein in viral and nonviral liver disease[J]. Hepatology, 2002, 35(6): 1431-1440.