

巨噬细胞抑制因子-1 在慢性丙型肝炎患者外周血中的表达及意义

叶松道 叶宣梅 王晓欧 林巍

【摘要】目的 探讨慢性丙型肝炎(CHC)患者巨噬细胞抑制因子-1(MIC-1)水平的变化及其与体内病毒载量、肝脏损害程度及 PR 方案(聚乙二醇干扰素 α + 利巴韦林)抗病毒疗效的关系。方法 选取 CHC 患者 57 例及同期健康体检者 26 例,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定其血浆 MIC-1 水平,采用速率法、化学发光分析及实时荧光定量聚合酶链反应测定 CHC 患者血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性、四型胶原(C-IV)水平及丙型肝炎病毒(HCV) RNA 水平。结果 治疗前 CHC 患者血浆 MIC-1 水平为 369.84(193.51, 830.62) pg/ml,明显高于对照组的 258.77(138.03, 441.12) pg/ml,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CHC 患者中 ALT 升高组血浆 MIC-1 水平高于 ALT 正常组, C-IV 升高组血浆 MIC-1 水平高于 C-IV 正常组, HCV RNA 高水平组血浆 MIC-1 水平高于 HCV RNA 低水平组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。CHC 患者血浆 MIC-1 水平与 ALT 活性、C-IV 水平及 HCV RNA 水平均呈正相关($r = 0.322, 0.423$ 和 0.333 , 均 $P < 0.05$)。干扰素治疗后,应答组和无应答组患者治疗前后血浆 MIC-1 水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);应答组治疗后血浆 MIC-1 水平低于治疗前,差异有统计学意义($P < 0.05$),无应答组治疗前后血浆 MIC-1 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 CHC 患者血浆 MIC-1 水平升高,其水平变化在一定程度上可反映患者体内 HCV 病毒载量、肝脏损害程度及 PR 方案治疗效果,但治疗前尚不能对 PR 方案疗效进行预测。

【关键词】慢性丙型肝炎 丙型肝炎病毒 巨噬细胞抑制因子-1

Plasma macrophage inhibitory cytokine-1 levels in patients with chronic hepatitis C and its clinical significance YE Songdao, YE Xuanmei, WANG Xiaou, et al. Center of Medical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

【Abstract】Objective To investigate the plasma macrophage inhibitory cytokine-1(MIC-1) levels in patients with chronic hepatitis C(CHC) and its clinical significance. Methods The levels of plasma MIC-1 was detected by ELISA in 57 CHC patients and 26 healthy controls. ALT activity, Collagen-IV (C-IV) level and HCV RNA in plasma of CHC patients were also detected. Results The plasma MIC-1 levels in CHC patients[369.84(193.51, 830.62)] were higher than those in healthy controls[258.77(138.03, 441.12)]($P < 0.05$). The MIC-1 level in patients with high HCV-RNA was significantly higher than that in patients with low HCV-RNA($P < 0.05$), the MIC-1 level in patients with high ALT activity was higher than that in those with low ALT activity($P < 0.05$); the MIC-1 level in patients with high C-IV level was higher than those with low C-IV level($P < 0.05$). The MIC-1 level in CHC patients was positively correlated with ALT activity, C-IV level and HCV RNA level($r = 0.322, 0.423, 0.333$, all $P < 0.05$). There was no significant difference of the MIC-1 level between the response patients and non-response patients before and after interferon treatment (both $P > 0.05$). The MIC-1 level in the response patients decreased significantly after treatment ($P < 0.05$), while the MIC-1 level in the non-response patients showed no significant changes after treatment ($P > 0.05$). Conclusion The plasma MIC-1 levels are elevated in the patients with chronic hepatitis C, and it may reflect the changes in HCV RNA load, liver damage degree and response to interferon treatment to some extent, but there is no significant predictive value for efficacy of interferon before treatment.

【Key words】Chronic hepatitis C Hepatitis C virus Macrophage inhibitory cytokine-1

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2020.42.5.2019-3531

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYB191)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院检验医学学科(叶松道、叶宣梅、王晓欧),感染内科(林巍)

通信作者:叶松道, E-mail: ysd955022@163.com

丙型肝炎是一种由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染而导致的传染性疾病,我国 HCV 感染者约有 1 476.5 万,居全球首位^[1]。HCV 感染后不能及时清除而发展为慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC),是肝硬化、肝细胞癌的主要致病原因之一,因此对丙型肝炎慢性化机制的研究以及如何预测并提高干扰素(IFN)治疗应答率仍然是目前关注的热点^[2]。巨噬细胞抑制因子-1(macrophage inhibitory cytokine-1, MIC-1)又称生长分化因子-15, 是转化生长因子- β 超家族的成员之一。研究表明, MIC-1 在健康人体内低表达,但在炎症与外伤等病理或应激作用下表达上调^[3]。近来有研究发现 MIC-1 在慢性乙型肝炎、肝硬化及小细胞肝癌组织中表达升高^[4]。本研究通过测定 CHC 患者血浆 MIC-1 水平,探讨其与 CHC 患者体内病毒载量、肝脏损害程度及 PR 方案[聚乙二醇干扰素 α (Peg IFN- α)+利巴韦林(RBV)]抗病毒疗效的关系。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2017 年 9 月至 2018 年 8 月在本医院感染内科就诊的 CHC 患者 57 例,男 32 例,女 25 例;年龄 10~76 (39.26 $\pm$ 9.22)岁。所有患者均符合《丙型肝炎防治指南(2015 年更新版)》诊断标准^[5],艾滋病病毒(HIV)抗体阴性,能接受 PR 治疗方案,即 Peg IFN- α 联合 RBV 治疗。排除合并慢性乙型肝炎等其他病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝损伤、自身免疫性肝炎等其他肝病患者。选取本院健康体检者 26 例作为对照组,男 15 例,女 11 例;年龄 13~74 (38.55 $\pm$ 10.06)岁。所有健康体检者均无肝肾疾病、血液病、自身免疫性疾病和心脑血管疾病,肝功能正常,经检测排除甲、乙、丙、丁、戊型肝炎病毒和巨细胞病毒等感染,HIV 抗体阴性。本研究经医院医学伦理委员会审批通过,所有研究对象均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法与疗效判断 所有患者就诊后均应用 PR 治疗方案,用法:Peg IFN- α -2a 皮下注射,180 μ g/次,1 周/次;RBV 口服,800~1 000mg/d,基本疗程为 48 周。治疗前及治疗 4、12、24、48 周监测 HCV RNA,评估病毒应答情况并据此调整剂量。疗效判断^[5]:(1)快速应答(RVR):治疗第 4 周 HCV RNA 不可测;(2)早期应答:治疗第 12 周 HCV RNA 较治疗前下降 $>2\text{Log}$;(3)部分应答:治疗第 12 周 HCV RNA 较治疗前下降 $>2\text{Log}$,且第 12 周和第 24 周 HCV RNA 可测;(4)延迟应答:治疗第 12 周 HCV RNA 较治疗前下降 $>2\text{Log}$,但仍可测,第

24 周 HCV RNA 不可测;(5)无应答:治疗第 12 周 HCV RNA 较治疗前下降 $<2\text{Log}$;(6)持续应答:治疗结束后第 12 周和第 24 周 HCV RNA 不可测。根据疗效将 CHC 患者分为应答组(包括快速应答、早期应答、部分应答、延迟应答和持续应答)和无应答组。

1.2.2 标本采集 所有患者于就诊后次日早晨空腹采集静脉血 3~4ml,置于 EDTA-K₂ 抗凝管中并立刻上下颠倒混匀 10 次,3 000rpm 离心 5min,及时分离血浆于-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用来检测血浆 MIC-1、HCV RNA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、四型胶原(C-IV)等指标,采集标本之前均未进行抗病毒治疗,未使用免疫调节剂。基本疗程结束(48 周)后再次采集静脉血,检测 MIC-1 水平。

1.2.3 血浆 MIC-1 水平测定 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法,严格按照试剂盒(苏州晶美生物科技有限公司)说明书进行操作,采用 Anthos 2010 型酶标仪(上海博赛思科技有限公司)检测样本及标准品光密度(OD)值,通过绘制标准曲线求待测样本 MIC-1 水平。个别样本 OD 值高于标准曲线上限,用样本稀释液适当稀释后重测,计算浓度时应乘以稀释倍数。

1.2.4 血浆 ALT 活性测定 采用速率法,在 Siemens ADVIA2400 全自动生化分析仪(美国西门子公司)上完成检测,采用原装试剂及校准品,正常参考范围为 10~49U/L。

1.2.5 血浆 C-IV 水平测定 采用化学发光免疫分析,在 MAGLUMI 2000 全自动化学发光免疫分析仪(深圳新产业生物有限公司)上完成检测,采用原装试剂及校准品,正常参考范围为 5.0~30.0ng/ml。

1.2.6 HCV RNA 定量分析 采用实时荧光定量聚合酶链反应,试剂盒购自深圳匹基生物工程公司,在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上完成检测,以 HCV RNA $\geq 5.0\times 10^2$ 拷贝/ml 为异常。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间和组内比较均采用 Mann-Whitney U 检验。CHC 患者血浆 MIC-1 水平与 ALT 活性、C-IV 水平及 HCV RNA 水平的相关性分析采用 Spearman 秩相关。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHC 患者治疗前血浆 MIC-1 水平与对照组比较 治疗前 CHC 患者血浆 MIC-1 水平为 369.84 (193.51, 830.62) pg/ml,明显高于对照组的 258.77 (138.03, 441.12) pg/ml,差异有统计学意义($Z=-2.801, P<0.05$)。

2.2 CHC 患者不同 ALT 水平、C-IV 活性及 HCV RNA 水平组血浆 MIC-1 水平比较 根据血浆 ALT 活性将 CHC 患者分为 ALT 升高组(>49U/L)29 例和 ALT 正常组(10~49U/L)28 例,ALT 升高组血浆 MIC-1 水平高于 ALT 正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。根据血浆 C-IV 水平将 CHC 患者分为 C-IV 升高组(>30ng/ml)和 C-IV 正常组(5.0~30.0ng/ml),C-IV 升高组血浆 MIC-1 水平高于 C-IV 正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。根据血浆 HCV RNA 水平将 CHC 患者分为 HCV RNA 低水平组($<2\times 10^6$ 拷贝/ml)和 HCV RNA 高水平组($\geq 2\times 10^6$ 拷贝/ml),HCV RNA 高水平组血浆 MIC-1 水平高于 HCV RNA 低水平组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 CHC 患者不同 ALT 水平、C-IV 活性及 HCV RNA 水平组血浆 MIC-1 水平比较(pg/ml)

组别	n	MIC-1	Z 值	P 值
ALT 升高组	29	711.09(224.19,830.62)	-2.027	0.043
ALT 正常组	28	235.34(150.27,664.94)		
C-IV 升高组	25	615.23(215.51,1088.99)	-2.219	0.026
C-IV 正常组	32	302.52(150.27,460.02)		
HCV RNA 高水平组	26	631.04(217.83,1079.61)	-2.307	0.021
HCV RNA 低水平组	31	261.99(121.30,686.61)		

2.3 CHC 患者血浆 MIC-1 水平与 ALT 活性、C-IV 水平及 HCV RNA 水平的相关性分析 CHC 患者血浆 MIC-1 水平与 ALT 活性、C-IV 水平及 HCV RNA 水平均呈正相关($r=0.322, 0.423$ 和 0.333 , 均 $P<0.05$)。

2.4 CHC 患者血浆 MIC-1 水平与 PR 方案疗效的关系 57 例 CHC 患者中,有 7 例患者治疗后无法随访。随访的 50 例患者中,应答组 37 例,无应答组 13 例。两组患者治疗前后血浆 MIC-1 水平比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);应答组治疗后血浆 MIC-1 水平低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$),无应答组治疗前后血浆 MIC-1 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 CHC 患者不同疗效组血浆 MIC-1 水平比较(pg/ml)

组别	n	MIC-1		Z 值	P 值
		治疗前	治疗后		
应答组	37	515.65 (203.34,977.31)	255.51 (120.22,676.75)	-2.285	0.023
无应答组	13	395.34 (181.33,843.56)	321.92 (158.45,487.32)	-1.021	0.155
Z 值		-1.202	-0.152		
P 值		0.131	0.826		

3 讨论

据世界卫生组织统计,全球 HCV 的感染率约为 2.8%^[6],其中 20%~30%的感染者可自发清除病毒,而 70%~80%的感染者会呈持续感染,约 30%的 CHC 最终发展成肝硬化和肝细胞癌。丙型肝炎肝损害的主要原因是 HCV 感染后引起的免疫学应答,其中细胞毒性 T 淋巴细胞起重要作用^[7]。丙型肝炎慢性化机制还尚未阐明,一般认为是宿主免疫、遗传易感性和病毒共同作用的结果。

MIC-1 最早由 Bootcov 等^[8]在 1997 年从活化的巨噬细胞系克隆发现,主要参与器官生长、分化与发育。研究表明,MIC-1 通过调节炎症反应和细胞凋亡途径参与了多个器官的损伤和多种疾病的进展,比如心血管疾病^[9]、恶性肿瘤^[10]和糖尿病^[11]等。Hsiao 等^[12]发现当肝脏损伤时,MIC-1 水平明显上升。卢莺燕等^[4]研究了 MIC-1 在慢性乙型肝炎和肝硬化中的表达,发现慢性乙型肝炎与肝硬化组患者血清 MIC-1 水平均明显增高,肝硬化组肝组织中 MIC-1 的表达明显高于慢性乙型肝炎组,且 MIC-1 水平与肝硬化程度呈正相关。Si 等^[13]在研究 MIC-1 与 HCV 复制的关系时发现,MIC-1 可通过改变宿主肝细胞的信号传导和生长促进 HCV 的复制,并与 HCV 所致的原发性肝癌密切相关。张建等^[14]发现 CHC 患者血清 MIC-1 水平与心脏左房内径、左室后壁厚度呈正相关,与射血分数呈负相关,检测 MIC-1 有助于评估患者心血管损害。

本研究显示,CHC 患者血浆 MIC-1 水平明显高于正常人群,而且血浆 MIC-1 水平与患者 HCV RNA 载量、血浆 ALT 活性及 C-IV 水平均呈正相关。血清 ALT 活性在一定程度上可以反映患者肝细胞的损伤程度及病情严重程度,血浆 C-IV 水平与肝脏纤维化程度的密切相关,是反映肝纤维化较为特异和灵敏的指标,高灵敏度的 HCV-RNA 定量检测不仅是判断 HCV 感染的主要依据,也是丙型肝炎患者 IFN 疗效观察的重要参数^[15]。研究结果表明, MIC-1 可能参与了 HCV 的复制、肝细胞的损伤及肝纤维化过程,升高的血浆 MIC-1 水平或可作为 HCV 感染的潜在诊断标志物。然而,MIC-1 在 HCV 感染中的具体作用机制并不明确,尚需更多的研究来证实。目前 PR 方案仍然是我国治疗 CHC 的重要手段^[5],与疗效有关的因素包括病毒因素(病毒载量、病毒基因型等)^[16-17]和宿主因素(年龄、性别、种族、肝脏组织学及机体免疫状态等)^[18]。本研究发现,应答组治疗后血浆 MIC-1 水平明显下降,而无应答组治疗前后血浆 MIC-1

水平比较差异无统计学意义,提示血浆 MIC-1 水平或可作为 PR 方案疗效的标志。然而,应答组与无应答组患者在治疗前血浆 MIC-1 水平比较差异无统计学意义,表明血浆 MIC-1 水平对 PR 方案治疗效果的预测没有显著意义。

总之,血浆 MIC-1 水平和 CHC 患者体内病毒载量、临床病情有着较为密切的关系,其水平测定或可作为体内 HCV 病毒载量、肝脏损害程度及 PR 方案抗病毒疗效的评价指标,但治疗前尚不能对 PR 方案疗效进行预测。

4 参考文献

- [1] Gower E, Estes C, Blach S, et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection[J]. J Hepatol, 2014, 61(1 Suppl): S45–S57. DOI:10.1016/j.jhep. 2014.07.027.
- [2] Li D, Long Y, Wang T, et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection in highly endemic HBV areas in China[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54815. DOI:10.1371/journal.pone. 0054815.
- [3] Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, et al. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury[J]. Shock, 2005, 23(6): 543–548.
- [4] 卢莺燕,陶晓东,周林福.生长分化因子-15在慢性乙型肝炎和肝硬化中的表达[J].中华临床感染病杂志,2014,7(3): 250–252. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2014.03.015.
- [5] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.丙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J].中华肝脏病杂志,2015,23(12): 906–923. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2015.12.003.
- [6] WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection[EB/OL].[2014-04].http://www.who. Int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines/en/.
- [7] Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(44): 7896–7909. DOI:10.3748/wjg.v19.i44. 7896.
- [8] Bootcov MR, Bauskin AR, VMenzuela SM, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- β superfamily[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(21): 11514–11519. DOI: 10.1073/pnas.94.21.11514.
- [9] Zhu ZD, Sun T. Association between growth differentiation factor-15 and chronic heart failure in coronary atherosclerosis patients[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1): 2225–2233. DOI:10.4238/2015.March.27.8.
- [10] Arfsten H, Cho A, Freitag C, et al. GDF-15 in solid vs non-solid treatment-naïve malignancies[J]. Eur J Clin Invest, 2019, 49(11): e13168. DOI:10.1111/eci.13168.
- [11] Adela R, Banerjee SK. GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective[J]. J Diabetes Res, 2015, 2015: 490842. DOI:10.1155/2015/490842.
- [12] Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, et al. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(10): 3742–3751. DOI:10.1128/mcb.20.10. 3742–3751.2000.
- [13] Si Y, Liu X, Cheng M, et al. Growth differentiation factor 15 is induced by hepatitis C virus infection and regulates hepatocellular carcinoma-related genes[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19967. DOI:10.1371/journal.pone.0019967.
- [14] 张建,郭兆霞,苏少慧.生长分化因子-15在慢性丙型肝炎患者的表达及意义[J].肝脏,2018,23(7): 629–631. DOI:10.14000/j.cnki. issn.1008-1704.2018.07.022.
- [15] Sarzin C, Shiffman ML, Hadziyannis SJ, et al. Definition of rapid Virologic response with a highly sensitive real-time PCR-based HCV RNA assay in peginterferon alfa-2a plus ribavirin response-guided therapy[J]. J Hepatol, 2010, 52(6): 832–838. DOI:10.1016/j.jhep.2010.01.030.
- [16] European Association for Study of Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection[J]. J Hepatol, 2014, 60(2): 392–420. DOI:10.1016/j.jhep.2013.11.003.
- [17] Brady RR, Ventham NT, Roberts DM, et al. Open transversus abdominis plane block and analgesic requirements in patients following right hemicolectomy[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2012, 94(5): 327–330. DOI:10.1308/003588412X13171221589856.
- [18] 尚佳,徐小元,陈新月,等.聚乙二醇干扰素 α -2a联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎无应答患者的疗效及影响因素[J].中华临床感染病杂志,2015,8(3): 232–237. DOI:10.3760/cma.j. issn.1674-2397.2015.03.012.

(收稿日期:2019-11-27)

(本文编辑:陈丽)