

• 临床检验研究论著 •

CHB 患者 MCP-1 表达与肝活检组织学积分相关性研究

鹿 永¹, 沈红艳^{1,2}, 邵先安^{1△}, 李 娜¹, 武晓茜¹

(1. 中国人民解放军第一二三医院检验病理科, 安徽蚌埠 233015;
2. 徐州市中心医院检验科, 江苏徐州 221009)

摘 要:目的 研究单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)在慢性乙型病毒性肝炎(CHB)患者肝脏活检组织和血清的表达。方法 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)对 124 例 CHB 炎患者和 20 例对照组血清 MCP-1 水平进行检测,采用免疫组化和实时荧光定量 PCR 检测 CHB 患者肝组织中 MCP-1 蛋白和 mRNA 表达。结果 对照组和 CHB 组血清中 MCP-1 水平分别是(265±44)ng/L 和(157±80)ng/L,CHB 组血清 MCP-1 水平显著低于对照组($t=5.355, P<0.01$)。CHB 患者血清 MCP-1 水平与肝组织炎症分级($r=0.353, P=0.011$)和纤维化分期($r=0.496, P<0.01$)呈正相关。肝组织中 MCP-1 mRNA 水平与炎症分级和纤维化分期呈正相关($r=0.465, P<0.01; r=0.493, P<0.01$)。肝组织中 MCP-1 蛋白表达与炎症分级和纤维化分期呈正相关($r=0.486, P=0.001; r=0.542, P<0.01$)。结论 CHB 患者血清中 MCP-1 水平下调, MCP-1 表达水平与肝组织炎症分级、纤维化分期呈正相关。

关键词:乙型肝炎病毒; 单核细胞趋化蛋白-1; 聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.024 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2014)08-0994-03

Investigation of correlation between expression of chemokine MCP-1 and histological index in the liver biopsies in patients with chronic hepatitis B

Lu Yong¹, Shen Hongyan^{1,2}, Shao Xian'an^{1△}, Li Na¹, Wu Xiaolian¹

(1. Department of Clinical Laboratory and pathology, the 123 Hospital of PLA, Bengbu, Anhui 233015, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221009, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) in serum and liver biopsies of patients with chronic hepatitis B(CHB). **Methods** 124 patients with CHB and 20 normal controls were explored. MCP-1 was detected by ELISA, real time PCR and immunologic histochemistry, respectively. The concentrations of MCP-1 in serum were measured by ELISA. Real-time PCR and immunohistochemistry were applied to detect mRNA and protein expression of MCP-1 in the liver biopsy, respectively. **Results** The concentrations of MCP-1 were (157±80)ng/L in serum of CHB patients and (265±44)ng/L in control groups. There were significantly different between the two groups($t=5.355, P<0.01$). There was positive correlations between MCP-1 concentration in serum and grading of inflammation($r=0.353, P=0.011$), staging of fibrosis($r=0.496, P<0.01$) in CHB patients. And positive correlations were also found between mRNA levels of MCP-1 and grading of inflammation($r=0.465, P<0.01$), staging of fibrosis($r=0.493, P<0.01$) in liver biopsies of patients with CHB. At the same time positive correlations was observed between immunohistochemistry score and grading of inflammation($r=0.486, P=0.001$), staging of fibrosis($r=0.542, P<0.01$). **Conclusion** Concentrations of MCP-1 are decreased in the sera of CHB patients. Positive correlation lies between the expression of MCP-1 and histological grading and staging of CHB.

Key words: hepatitis B virus; monocyte chemoattractant protein-1; polymerase chain reaction

乙型肝炎是广泛流行的传染性疾病,该病严重威胁人类健康。乙型肝炎大部分是感染乙型肝炎病毒(HBV)引起的,该病的临床转归主要决定于 HBV 与宿主之间的相互作用,如病毒不能及时被清除可引起慢性肝炎、肝硬化乃至肝癌等不良后果。慢性乙型病毒性肝炎(CHB)的病理改变主要是肝脏正常组织结构的破坏和大量单个核细胞浸润。有资料研究显示单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)在抗病毒免疫中扮演着重要作用^[1-4],但 MCP-1 在 CHB 患者血清和肝组织中的表达水平如何及是否参与了肝脏病理损伤时单个核细胞的浸润,目前尚未见报道。因此,作者以 CHB 患者血清和肝活检组织为研究对象,观察 MCP-1 表达情况及其与肝脏组织学分级、分期的关

系,现分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 3 月到 2011 年 6 月中国人民解放军第一二三医院的 CHB 患者 124 例,其中,男性 81 例,女性 43 例,年龄 21~65 岁。患者符合 CHB 诊断标准^[5]。对照组为乙肝表面抗原阴性且体检正常的健康者,其中,男性 12 例,女性 8 例,平均年龄 38.2 岁。
1.2 仪器与试剂 Trizol(美国 Invitrogen 公司),实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),MCP-1 单克隆抗体、人 MCP-1 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司)。DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗公司),WD-94BB 凝胶成像

分析仪(北京六一仪器厂),DA 7600 荧光定量 PCR 仪(广州达安公司)。

1.3 标本收集 采集 CHB 患者和对照组人群血液,室温自然凝固,3 000 r/min 离心 15 min,收集血清后于-20 ℃保存待测。采用 B 超引导下经皮穿刺获取肝活检组织,一部分用 10%甲醛固定,用于免疫组化或病理检查;另一部分-70 ℃保存,用于实时荧光定量 PCR。

1.4 ELISA 检测血清中的 MCP-1 水平 按试剂说明书操作,标准品采用双复孔,以标准浓度曲线计算出待测血清 MCP-1 水平。

1.5 免疫组化检测 MCP-1 在肝组织中的表达水平 用 10%甲醛固定肝活检组织 12~16 h,石蜡包埋,4 μm 连续切片。经过烤片、脱蜡、梯度乙醇水化,然后以 3% H₂O₂ 室温 10 min, PBS 冲洗 3 min,连续 3 次;1% BSA 室温 10 min,甩去 BSA 后加 MCP-1 单抗 50 μL(1:25 稀释),4 ℃过夜;第 2 天 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;加辣根过氧化物酶标记二抗 50 μL,37 ℃孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;最后经 DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明和中性树脂封片再镜检。免疫组化结果参照文献[6]进行半定量分析。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测肝组织 MCP-1 基因表达 首先按试剂说明书操作提取总 RNA,进行 cDNA 的合成,根据 MCP-1 和 β-actin 特异基因序列设计引物,β-actin 上游引物 5'-AGC AAG AGA GGC ATC CTC AC-3',β-actin 下游引物 5'-AAC ATG ATC TGG GTC ATC TTC-3';MCP-1 上游引物 5'-CTC ATA GCA GCC ACC TTC ATT C-3',MCP-1 下游引物 5'-CAC AGC TTC TTT GGG ACA CTT G-3'。引物由上海鼎安生物科技有限公司合成。

1.7 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组血清 MCP-1 表达水平比较 对照组和 CHB 组血清 MCP-1 水平分别是(265±44) ng/L 和(157±80) ng/L,CHB 患者血清中 MCP-1 水平显著低于对照组,差异有统计学意义($t=5.355, P < 0.01$)。

2.2 MCP-1 在肝活检组织中的表达 RT-PCR 结果显示:CHB 患者肝组织 MCP-1 的基因相对表达量是 0.034 3±0.032 3(β-actin 为参照基因)。免疫组化结果显示:肝细胞、胆管上皮细胞、汇管区浸润的炎性细胞及窦周隙单个细胞均表达 MCP-1。在病变部位附近的肝细胞,特别是增生的肝细胞 MCP-1 表达较强。胆管上皮细胞 MCP-1 也呈阳性表达;窦周隙散在的细胞 MCP-1 呈强阳性表达,从存在位置和形态学上分析,可能为星状细胞;汇管区和纤维形成区的浸润细胞 MCP-1 表达各异,大部分细胞不表达,形态学上判断可能主要为淋巴细胞;有部分细胞呈中度阳性表达,形态学判断可能为单核细胞,部分散在细胞 MCP-1 呈强阳性表达,与窦状隙散在的 MCP-1 阳性细胞相似。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 CHB 患者 MCP-1 水平与肝组织炎症分级、纤维化分期的关系 按病毒性肝炎分级、分期标准^[5],肝组织纤维化分期

为 1~4 期,炎症分级为 1~4 级。经统计学分析,CHB 患者血清中 MCP-1 水平与肝组织炎症分级、纤维化分期呈正相关($r=0.353, P=0.011; r=0.496, P < 0.01$)。肝组织 MCP-1 mRNA 表达与炎症分级、纤维化分期呈正相关($r=0.465, P < 0.01; r=0.493, P < 0.01$)。肝组织 MCP-1 蛋白表达与炎症分级、纤维化分期呈正相关($r=0.486, P=0.01; r=0.542, P < 0.01$)。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

MCP-1 作为配体主要趋化表面携带其相应受体的单核/巨噬细胞,后者是机体抗感染的关键成分^[7]。相关实验数据显示,MCP-1 在抗病毒感染^[8-9]及多种疾病中发挥着重要作用^[10]。

HBV 感染后,细胞免疫应答对病毒清除起关键作用,如机体不能有效清除病毒,将引起不良后果。有研究显示 CHB 患者存在免疫功能失调^[11-12]。本研究发现 CHB 患者外周血 MCP-1 水平低于对照组,表明 HBV 可能影响宿主细胞 MCP-1 表达以利于其自身生存。

普遍认为趋化因子具有多源性^[13-14]。本研究发现 CHB 患者肝活检组织的肝细胞、胆管上皮细胞、汇管区浸润细胞和窦状隙散在的细胞均不同程度的表达 MCP-1,这与其他学者发现 CHB 患者肝细胞 MCP-1 表达呈阴性存在差异^[14]。本研究也发现,病变部位肝细胞表达 MCP-1 较强,提示 MCP-1 表达可能受局部因素影响。

CHB 患者肝脏炎症坏死区有大量淋巴细胞和单核细胞浸润,它们在活化状态下也可分泌大量细胞因子,这些细胞因子可能会诱导 MCP-1 表达。CHB 患者肝脏病变特征为不同程度的炎症坏死和纤维化。本研究结果显示 CHB 患者血清中 MCP-1 水平及肝活检组织中 MCP-1 水平与肝组织炎症分级、纤维化分期均呈正相关,提示 MCP-1 在 CHB 致病机制中可能扮演着重要作用。

活化的星状细胞在肝组织纤维化形成中起重要作用^[15],体外培养人肝脏星状细胞表现出肌成纤维细胞样表型,且 MCP-1 以剂量依赖方式可刺激星状细胞迁移^[16],因此可以认为 MCP-1 在体内影响纤维化形成。纤维形成区和窦状隙浸润的星状细胞 MCP-1 表达呈强阳性,进一步证实其在促纤维化中的作用。

CHB 的发病机制很复杂,机体在与病毒相互作用过程中能否有效清除病毒是决定 CHB 患者转归的关键因素。本研究结果提示 HBV 可能通过下调宿主 MCP-1 表达以利于其自身生存, MCP-1 与肝脏组织学积分相关,参与了肝组织的病理损伤过程,在 CHB 的致病机制中起着非常重要的作用。

参考文献

- [1] Almansa R, Socias L, Andaluz-Ojeda D, et al. Viral infection is associated with an increased proinflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Viral Immunol*, 2012, 25(4): 249-253.
- [2] Zanin V, Delbue S, Marcuzzi A, et al. Specific protein profile in cerebrospinal fluid from HIV-1-positive cART-treated patients affected by neurological disorders[J]. *J Neurovirol*, 2012, 18(5):

416-422.

[3] Khiati A, Chaloin O, Muller S, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1/CCL2) gene expression by human immunodeficiency virus-1 Tat in human astrocytes is CDK9 dependent[J]. *Neurovirol*, 2010, 16(2):150-167.

[4] Corsten MF, Schroen B, Heymans S. Inflammation in viral myocarditis: friend or foe[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(7):426-437.

[5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华传染病杂志*, 2001, 19(1):56-62.

[6] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. *Cancer*, 2000, 89(12):2637-2645.

[7] Jin L, Getahun A, Knowles HM, et al. STING/MPYS mediates host defense against *Listeria monocytogenes* infection by regulating Ly6C(hi) monocyte migration[J]. *J Immunol*, 2013, 190(6):2835-2843.

[8] Sun L, Cornell TT, LeVine A, et al. Dual role of interleukin-10 in the regulation of respiratory syncytial virus(RSV)-induced lung inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 172(2):263-279.

[9] Kok WL, Denney L, Benam K, et al. Pivotal advance: invariant NKT cells reduce accumulation of inflammatory monocytes in the lungs and decrease immune-pathology during severe influenza A virus infection[J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 91(3):357-368.

[10] Chaaitanya IK, Muruganandam N, Sundaram SG, et al. Role of

proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection[J]. *Viral Immunol*, 2011, 24(4):265-271.

[11] Chang J, Block TM, Guo JT. The innate immune response to hepatitis B virus infection: implications for pathogenesis and therapy[J]. *Antiviral Res*, 2012, 96(3):405-413.

[12] Rawat S, Clippinger AJ, Bouchard MJ. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein[J]. *Viruses*, 2012, 4(11):2945-2972.

[13] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1): an overview[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2009, 29(6):313-326.

[14] Almajhdi FN, Al-Qudari AY, Hussain Z. Differential expression of transforming growth factor- β 1 and HBx enhances hepatitis B virus replication and augments host immune cytokines and chemokines[J]. *Ann Hepatol*, 2013, 12(3):408-415.

[15] Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, et al. Hepatic stellate cell(vitamin A-storing cell) and its relative-past, present and future[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(12):1247-1272.

[16] Tsukamoto H, Zhu NL, Wang J, et al. Morphogens and hepatic stellate cell fate regulation in chronic liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27 Suppl 2:94-98.

(收稿日期:2013-11-25)

(上接第 993 页)

活化,使血液呈高凝状态,随着患者病情的进展,凝血因子被消耗,患者血液呈低凝状态而导致出血。除此之外,一些白血病细胞还可释放促凝物质,这些都是引起患者凝血功能紊乱的原因。故血液科医生应对白血病患者的凝血进行连续监测以评估患者凝血功能受疾病影响情况,检验人员也要对患者连续检测结果进行回顾分析,以便及时向临床报告危急值。

综上所述,凝血功能检查已成为广泛使用的临床常规检测项目,随着检验诊断技术的不断发展,可用于为临床服务的凝血项目会不断增加,不同类型疾病与凝血功能变化间的关系会更加明确。因此,临床医生和检验人员都应高度重视凝血功能检查,加强沟通,有效使用这些项目为患者服务,保证疾病的治疗更合理、更安全。

参考文献

[1] 王振义,李家增,阮长耿,等. 血栓与止血基础理论与临床[M]. 3 版. 上海:上海科学技术出版社,2004:81-111.

[2] 熊立凡. 临床检验基础[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003:73-101.

[3] 余悦能,龚江锋. 凝血功能常规检查临床应用的分析和体会[J]. *检验医学*, 2009, 24(4):323-324.

[4] Kuo JR, Chou TJ, Chio CC. Coagulopathy as a parameter to predict the outcome in head injury patients—analysis of 61 cases[J]. *J Clin Neurosci*, 2004, 11(7):710-714.

[5] 朱琳, 卡米拉. 心脑血管病、糖尿病与肝病凝血功能检测结果分析[J]. *血栓与止血学*, 2010, 16(2):90-91.

[6] 周明权. 冠心病患者凝血四项及纤维蛋白原多态性分析[J]. *中国实用医药*, 2012, 7(5):70-71.

[7] 邓碧兰, 庄燕玲. 肝病患者出血四项和 D-D 的检测分析[J]. *海南医学*, 2011, 22(8):117-119.

[8] 孟红兵. 肝病患者凝血四项检测变化及临床意义探析[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2013, 34(13):1958-1958.

[9] 孙中华. 探讨临产孕妇凝血四项检查的必要性[J]. *中国社区医师:医学专业*, 2012, 14(10):278.

[10] 刘刚英. 孕妇妊娠不同时期血浆 D-二聚体和凝血四项的变化情况[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(20):3255-3257.

[11] 李守玮. 肾综合征患者凝血功能检测的结果分析[J]. *临床血液学杂志:输血与检验版*, 2011, 24(6):717-719.

[12] 赵早云. 急性白血病凝血指标的分析[J]. *血栓与止血学*, 2010, 16(2):86-87.

(收稿日期:2013-11-18)