

• 论 著 •

HBV 感染者血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平与疾病进展的相关性*

向 焰, 向 婷, 张正娟, 李 溶

广元市精神卫生中心检验科, 四川广元 628000

摘 要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)感染者血清巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)和程序性死亡受体 1(PD-1)水平与疾病进展的相关性。方法 选取该院 2019 年 1 月至 2020 年 1 月收治的 108 例 HBV 感染者作为研究对象,根据肝组织病理检查结果判断慢性乙型肝炎(CHB)的严重程度,将其分为 A 组(无症状 HBV 携带者,20 例)、B 组(轻中度 CHB,42 例)、C 组(重度 CHB,16 例)、D 组(乙型肝炎肝硬化,30 例)。另选取同期健康体检的肝功能指标正常且乙型肝炎表面抗体阳性的健康人 30 例作为对照组。采用放射免疫法检测各组血清 M-CSF 水平,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清 DNMT1 水平,采用流式细胞仪检测血清 PD-1 水平,采用多元线性回归分析各指标与疾病进展的相关性。结果 血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平由高到低依次为 D 组、C 组、B 组、A 组、对照组,各组血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);多元线性回归分析结果显示,疾病进展与 HBV 感染者血清 DNMT1 和 PD-1 水平均存在相关性($P < 0.001$)。结论 不同疾病进展期的 HBV 感染者血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平存在差异,血清 DNMT1 和 PD-1 水平均与 HBV 感染者疾病进展存在相关性。

关键词:乙型肝炎病毒; 巨噬细胞集落刺激因子; DNA 甲基转移酶 1; 程序性死亡受体 1; 疾病进展

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.16.013

中图法分类号:R512.6+2

文章编号:1673-4130(2022)16-1980-04

文献标志码:A

Correlation between serum levels of M-CSF, DNMT1, PD-1 and disease
progression in patients infected with HBV*

XIANG Yan, XIANG Ting, ZHANG Zhengjuan, LI Rong

Department of Clinical Laboratory, Guangyuan Mental Health Center,
Guangyuan, Sichuan 628000, China

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between serum levels of macrophage colony stimulating factor (M-CSF), DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and programmed death receptor 1 (PD-1) and disease progression in patients infected with hepatitis B virus (HBV). **Methods** A total of 108 patients infected with HBV admitted to our hospital from January 2019 to January 2020 were selected as research subjects. According to the severity of CHB diagnosed by liver histopathological examination results, they were divided into group A (asymptomatic HBV carriers, 20 cases), group B (mild to moderate CHB, 42 cases), group C (severe CHB, 20 cases) and group D (hepatitis B cirrhosis, 30 cases). At the same time, another 30 healthy subjects with normal liver function index and positive hepatitis B surface antibody were selected as the control group. The serum M-CSF level was detected by radioimmunoassay, the serum DNMT1 level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the serum PD-1 level was detected by flow cytometry respectively. Multiple linear regression was used to analyze the correlation between each index and disease progression. **Results** The levels of serum M-CSF, DNMT1 and PD-1 from high to low were group D, group C, group B, group A and control group. There were statistically significant differences on serum M-CSF, DNMT1 and PD-1 levels among all groups ($P < 0.05$). Multiple linear regression analysis showed that disease progression was correlated with serum DNMT1 and PD-1 levels in patients infected with HBV ($P < 0.001$). **Conclusion** The serum levels of M-CSF, DNMT1 and PD-1 are different in HBV infected patients with different stages of disease progression, and the serum levels of DNMT1 and PD-1 in HBV infected patients correlate with disease progression in HBV patients.

* 基金项目:国家重点研发计划重点专项(2019YFF0216500)。

作者简介:向焰,女,副主任技师,主要从事生化检验研究。

Key words: hepatitis B virus; macrophage colony-stimulating factor; DNA methyltransferase 1; programmed death receptor 1; disease progression

乙型肝炎病毒(HBV)感染是世界上一个非常严重的公共卫生问题。目前,全世界约有 2.5 亿 HBV 感染者,HBV 感染后如果不及时治疗,会造成肝细胞反复损伤,逐渐发展为慢性乙型肝炎(CHB),增加肝硬化和肝癌的风险,严重威胁患者的生命安全和健康^[1]。肝活检是诊断乙型肝炎肝硬化的金标准,但其具有侵入性和无法重复检查的缺点,在疾病监测和疗效评定方面有一定的局限性^[2]。传统的影像学检查对乙型肝炎肝硬化的早期诊断价值较低,对晚期出现并发症患者往往具有较高的敏感性和特异性,但延误了最佳治疗时机^[3]。血清学指标具有检测方便、快速、廉价等优点,受到临床研究者的高度关注^[4]。巨噬细胞是肝脏炎症反应的主要效应细胞,能调节、聚集和激活肝星状细胞。巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)介导炎症和免疫反应,参与肝硬化的病理过程^[5]。DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)是人类细胞中含量最多的甲基转移酶,能维持 DNA 甲基化;DNMT1 的异常表达会破坏基因组的稳定性,在许多疾病的发生、发展中起重要作用^[6]。程序性死亡受体 1(PD-1)是近年来发现的一种相对分子质量为 55 000 的 I 型跨膜蛋白,其是 CD28 家族的一员,能与程序性死亡配体-1 结合,阻断 CD28 介导的磷酸肌醇-3 激酶途径的激活,进而抑制 T 细胞的增殖和分化,降低 T 细胞的功能^[7]。本文拟分析不同疾病进展期 HBV 感染者血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平差异及其相关性,旨在为临床诊断和治疗 HBV 感染提供新的方法和参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2019 年 1 月至 2020 年 1 月收治的 108 例 HBV 感染者作为研究对象,根据肝组织病理检查结果判断 CHB 的严重程度,并将其分为 A 组(无症状 HBV 携带者)20 例,B 组(轻中度 CHB)42 例,C 组(重度 CHB)16 例,D 组(乙型肝炎肝硬化)30 例。另选取同期行健康体检的 30 例健康人作为对照组。HBV 感染者纳入标准:(1)符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年最新版)》^[8]中 CHB 的诊断标准;(2)一般资料完整;(3)存在乙型肝炎病史;(4)大于半年的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性。对照组纳入标准:肝功能指标正常且乙型肝炎表面抗体(HBsAb)阳性,其余 HBV 血清学标志物及 HBV 基因检测结果均无异常。排除标准:(1)合并其他类型病毒性肝炎;(2)存在酒精、药物和自身免疫性肝病;(3)合并肝脏良、恶性肿瘤;(4)合并严重心、肺、肾等其他脏器疾病;(5)合并其他部位恶性肿瘤。各组性

别、年龄、体质量指数比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。本研究经医院伦理委员会批准,所有研究对象对本研究知情同意并签署知情同意书。

表 1 各组一般资料比较

组别	n	性别(男/女,n/n)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	体质量指数($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)
A 组	20	12/8	38.22 $\pm$ 5.06	22.13 $\pm$ 2.06
B 组	42	26/16	38.13 $\pm$ 6.03	21.06 $\pm$ 2.13
C 组	16	10/6	37.99 $\pm$ 5.32	22.14 $\pm$ 2.19
D 组	30	18/12	38.06 $\pm$ 5.04	21.77 $\pm$ 2.24
对照组	30	17/13	38.16 $\pm$ 6.22	21.87 $\pm$ 2.29

1.2 方法

1.2.1 M-CSF 检测 空腹采集各组患者肘静脉血 5 mL,静置 30 min,采用上海卢湘仪离心机仪器有限公司提供的 TG20.5 台式高速大容量离心机离心,取上清液,分别置于无菌、无 RNA 酶的离心管,然后于-80℃冰箱冷冻保存备测。采用 AutoLumo A1000 全自动化学发光免疫分析仪,以放射免疫法检测血清 M-CSF 水平,试剂盒购自上海纪宁实业有限公司。

1.2.2 DNMT1 检测 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组受试者血清 DNMT1 水平。采用纯化的人 DNMT1 抗体包被微孔板,将 DNMT1 加入包被的微孔板中,与辣根过氧化物酶标记的 DNMT1 抗体结合形成抗体-抗原-酶标记的抗体复合物,加入底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺,3,3',5,5'-四甲基联苯胺在辣根过氧化物酶催化下呈蓝色,在酸的作用下液体呈黄色,颜色深浅与 DNMT1 水平呈正比。用微孔板读卡器测量 450 nm 处的吸光度,用标准曲线计算 DNMT1 水平。

1.2.3 PD-1 检测 取各组受检者的新鲜乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血,加入 PD-1 单克隆抗体或相应的同型对照抗体(上海纪宁实业有限公司),于 4℃避光孵育 20 min,然后添加 500 μ L 的红细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司),再于 4℃避光孵育 10 min,并添加 1 000 μ L 磷酸盐缓冲液,500 $\times$ g 离心 5 min,洗涤后用流式细胞仪(常州必达生物科技有限公司)检测血清 PD-1 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件对数据进行统计分析,计数资料以例数或构成比表示,采用 χ^2 检验进行比较,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,影响因素分析采用多元线性回归分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 各组血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平比较
血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平由高到低依次为 D 组、C 组、B 组、A 组、对照组, 各组血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	M-CSF (pg/mL)	DNMT1 (μg/L)	PD-1 (%)
A 组	20	290.13 ± 50.16	25.16 ± 6.04	10.11 ± 2.07
B 组	42	305.13 ± 50.03	31.62 ± 3.07	15.22 ± 3.55
C 组	16	322.46 ± 50.17	39.22 ± 3.21	18.26 ± 3.19
D 组	30	379.12 ± 50.22	48.16 ± 4.01	22.17 ± 3.06
对照组	30	280.12 ± 50.13	20.22 ± 5.17	6.42 ± 1.03
<i>F</i>		17.624	184.127	137.544
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 HBV 感染者血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平与疾病进展的相关性
以疾病进展 (定义: “A 组”=1, “B 组”=2, “C 组”=3, “D 组”=4) 作为因变量, 将各组感染者血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平作为自变量, 纳入多元线性回归模型, 结果显示, 血清 DNMT1 和 PD-1 水平均与 HBV 感染者疾病进展存在相关性 ($P < 0.001$)。见表 3。

表 3 HBV 感染者血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平与疾病进展的相关性

变量	β	标准误	β'	<i>t</i>	<i>P</i>	VIF
M-CSF	0.001	0.001	0.057	1.349	0.180	1.223
DNMT1	0.073	0.007	0.620	10.782	<0.001	2.278
PD-1	0.064	0.011	0.335	5.874	<0.001	2.237

注: VIF 为方差膨胀系数。

3 讨论

CHB 是由 HBV 长期反复作用引起的弥漫性肝损伤, 大量炎性单核细胞聚集在肝脏, 进一步分化为促纤维化的巨噬细胞, 诱导肝星状细胞、肝巨噬细胞和胞外基质的产生, 打破基质产生与降解的平衡, 使其在肝脏中积聚, 最终涉及多个系统受累, 使肝脏变形硬化, 进展为肝硬化^[9]。乙型肝炎肝硬化早期的主要病变是肝纤维化, 是对肝损伤的应激性愈合反应, 肝脏结缔组织的增生和沉积是非常普遍的现象。在长期的临床实践中发现, 乙型肝炎肝硬化患者的病情程度存在很大差异, 一般早期仅出现厌食、身体乏力、肝功能异常等症状, 至晚期才出现腹水、门脉高压、肝性脑病等并发症^[10]。因此, 及时诊断 CHB 非常重要, 临床上需综合、精准地判断 CHB 病情, 为患者及

时治疗和改善预后提供参考依据。

M-CSF 是由单核-巨噬细胞、成纤维细胞、成骨细胞和血管内皮细胞分泌的细胞因子, 其能通过与其受体调节单核-巨噬细胞系细胞的分化和增殖。M-CSF 作为一种促炎因子, 参与了炎症反应。M-CSF 表达升高可激活基质金属蛋白酶, 促进胶原纤维的沉积, 促进炎症因子在肝脏的浸润; M-CSF 能抑制自然杀伤细胞合成和分泌抗纤维蛋白, 可减少肝星状细胞凋亡, 促进肝硬化的进展^[11]。DNA 甲基化是一种非常重要的表观遗传修饰形式, 其中 DNA 甲基转移酶是 DNA 甲基化的关键调控因子, DNMT1 属于一种 DNA 甲基转移酶。DNMT1 在乙型肝炎中的作用已引起广泛关注。DNMT 的表达与 HBV 感染密切相关。有研究发现, HBV X 蛋白的转录激活 DNMT1 启动子, 而上调 DNMT1 的表达, DNMT1 在 CHB 患者中过度表达。此外, DNMT1 还可以调控 CHB 患者线粒体 DNA 甲基化^[12]。PD-1 是一种跨膜蛋白, 存在于程序性死亡 T 细胞中, 可诱导其在活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞上表达。相关研究表明 PD-1 能抑制 T 细胞, 诱导免疫耐受, PD-1 与程序性死亡配体-1 结合可增强 T 细胞线粒体的氧化反应, 提高活性氧和过氧化氢水平, 抑制 T 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 减弱机体对 HBV 的免疫应答^[13]。

本文研究结果显示, 各组血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示随着疾病的持续进展, HBV 感染者的血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平也会随之发生变化。另外, 相关性分析结果显示, 疾病进展与 HBV 感染者血清 DNMT1 和 PD-1 水平均存在相关性 ($P < 0.001$)。分析原因在于: DNMT1 是 DNA 甲基转移酶家族的成员, DNMT1 表达上调使甲基化后宿主基因功能减弱, 导致 HBV 感染加重^[14]。PD-1/程序性死亡配体-1 通路影响 T 细胞的增殖和分化, 随着 PD-1 水平的升高, 机体的免疫力也随之降低, 有助于 HBV 复制, HBV 感染加重, T 细胞功能受限加重。长期 HBV 抗原刺激可诱导 PD-1 表达上调, 通过与同时诱导程序性死亡配体-1 高表达形成抑制性信号通路阻断机体的强免疫反应, 导致病毒的活跃复制和疾病的持续性^[15]。HBV 感染疾病进展的不同阶段, 患者的机体免疫状态存在差异性, PD-1 的表达水平也不同。有研究发现, 免疫耐受组和非活动携带组 CD8⁺ T 细胞 PD-1 表达均高于免疫清除组 ($P < 0.05$), 提示 PD-1 表达水平可反映机体的免疫功能状态^[16]。HBV 感染的免疫活化阶段 CD8⁺ 可以下调 PD-1 的表达, 激活 T 细胞增殖, 从而清除病毒; HBV 还可通过此通路上调 PD-1, 抑制 T 细胞活化应答, 使病毒持续感染^[17]。MAD-EDDU 等^[18]研究发现, CHB 患者 DNMT1 可调节线

粒体 DNA 甲基化状态,表明 DNMT1 参与乙型肝炎的发病过程。薛立芝等^[19]研究发现,乙型肝炎血清 DNMT1 水平高于对照组,乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性组 DNMT1 水平高于 HBeAg 阴性组,CHB 患者血清 DNMT1 水平与肝组织炎症活动和肝纤维化存在紧密的关系,DNMT1 可能参与 CHB 的发病过程,血清 DNMT1 水平可反映肝功能损伤、炎症活动及肝纤维化程度等。上述研究与本研究结果基本一致。

综上所述,不同疾病进展期的 HBV 感染者血清 M-CSF、DNMT1 和 PD-1 水平存在差异,且 HBV 感染者血清 DNMT1 和 PD-1 水平与疾病进展存在相关性。

参考文献

- [1] SARMATI L, MALAGNINO V. HBV infection in HIV-driven immune suppression[J]. *Viruses*, 2019, 11(11): 1077.
- [2] 杨秀珍,耿爱文,肖丽,等.慢性乙型肝炎合并脂肪肝临床与肝组织病理学分析[J]. *实用肝脏病杂志*, 2017, 20(1): 101-102.
- [3] 宋雪,阮冰.无创影像学评估慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2020, 40(5): 433-437.
- [4] 鲁凤民,王杰,陈香梅,等.新型血清指标在乙型肝炎创新药物研发中的应用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2020, 28(8): 649-653.
- [5] LEE S, SHI X Q, FAN A, et al. Targeting macrophage and microglia activation with colony stimulating factor 1 receptor inhibitor is an effective strategy to treat injury-triggered neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2018, 14: 1744806918764979.
- [6] HAN Y, LIU D, LI L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3): 727-742.
- [7] 蔡本强,贺劲松,邢宇峰.补肾解毒方阻断程序性死亡受体 1/程序性死亡配体 1 信号通路对辅助慢性乙型肝炎树突状细胞疫苗抗乙型肝炎病毒的免疫效果与机制研究[J]. *河北中医*, 2019, 41(9): 1391-1396.
- [8] 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(2015 年更新版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(12): 1941-1960.
- [9] 黄刚,程莹.恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎(CHB)肝硬化失代偿期的临床分析[J]. *中国继续医学教育*, 2017, 9(27): 101-102.
- [10] 康瑜,陈建芳,曾甜.慢性乙型肝炎肝硬化患者 Th22 细胞和 IL-22 的表达及意义[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(2): 147-151.
- [11] DRAIJER C, PENKE L, PETERS-GOLDEN M. Distinctive effects of GM-CSF and M-CSF on proliferation and polarization of two major pulmonary macrophage populations[J]. *J Immunol*, 2019, 202(9): 2700-2709.
- [12] LUO Y, XIE C, BROCKER C N, et al. Intestinal PPAR α protects against colon carcinogenesis via regulation of methyltransferases DNMT1 and PRMT6 [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(3): 744-759.
- [13] MISHIMA Y, BRUECKNER L, TAKAHASHI S, et al. Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3[J]. *Genes Cells*, 2020, 25(1): 22-32.
- [14] 张海涛,赵晓飞,李宁,等.肝癌组织中 HBV 感染与甲基化转移酶表达的相关性研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2017, 27(4): 205-208.
- [15] 谢巍,赵川,王容,等.慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞程序性死亡受体 1 表达与 HBV-DNA 水平的相关性[J]. *昆明医科大学学报*, 2020, 41(2): 82-86.
- [16] 赵金花,李俊峰,毛小荣. T 淋巴细胞表型对慢性 HBV 感染免疫状态的影响及应用价值[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(5): 1019-1023.
- [17] 陆小凡,夏欢,计云霞,等. HIV-1 慢性感染者 CD8⁺ Tscm 异常免疫活化对 T 细胞耗竭的影响[J]. *北京医学*, 2018, 40(4): 323-327.
- [18] MADEDDU G, ORTU S, GARRUCCIU G, et al. DNMT1 modulation in chronic hepatitis B patients and hypothetical influence on mitochondrial DNA methylation status during long-term nucleos(t)ide analogs therapy [J]. *J Med Virol*, 2017, 89(7): 1208-1214.
- [19] 薛立芝,张思泉.慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(12): 119-122.
- [20] (收稿日期:2021-09-30 修回日期:2022-06-20)
- (上接第 1979 页)
- [21] WAGNER S, PRIGGE E S, WUERDEMANN N, et al. Evaluation of p16^{INK4a} expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation[J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(7): 1114-1122.
- [22] 杨亮,许文婷,赵倩,等.腋窝淋巴结转移与无转移乳腺浸润性导管癌患者癌组织中差异表达蛋白的筛选与验证[J]. *山东医药*, 2019, 59(29): 5-8.
- [23] 宋艳亭. 宫颈上皮内瘤样变及宫颈癌中 p16^{INK4a} 甲基化及蛋白过表达的研究[D]. 泰安:泰山医学院, 2011.
- [24] 肖银平,陶祥,赵晨燕,等. LEEP 标本的切缘状态与全子宫标本中 HSIL 及以上病变残留关系的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2019, 54(1): 19-23.
- (收稿日期:2021-12-09 修回日期:2022-06-21)