

· 论 著 ·

原发性胆汁性肝硬化患者血浆可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的表达及临床意义

梁 艳, 杨再兴, 王 燕, 李 畅, 曹伟娟, 仲人前*

(第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**检测原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者血浆可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(sTRAIL)水平并探讨其临床意义。**方法:**采用 ELISA 法检测 30 例 PBC、25 例慢性肝炎肝硬化及 30 例正常对照者血浆 sTRAIL 水平,同时检测血浆 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)浓度,分析 sTRAIL 与 GGT、ALP 的相关性。**结果:**PBC 患者血浆 sTRAIL 水平为 $(1\ 543.9 \pm 344.2)$ pg/ml,显著高于正常对照组 $[(1\ 098.5 \pm 264.7)$ pg/ml, $P < 0.01$];肝炎肝硬化患者血浆 sTRAIL 水平为 $(1\ 624.1 \pm 415.8)$ pg/ml,也较正常对照组明显升高($P < 0.05$)。PBC 患者血浆 sTRAIL 水平与 GGT、ALP 呈正相关($r = 0.63, 0.71, P < 0.01$);肝炎肝硬化患者血浆 sTRAIL 与 GGT、ALP 均不相关($r = 0.43, 0.31, P > 0.05$)。**结论:**PBC 患者血浆 sTRAIL 水平升高,且与 GGT、ALP 呈正相关,提示 sTRAIL 可能参与 PBC 患者肝内胆管损伤,且与疾病活动度相关。

[关键词] 肿瘤坏死因子类;肝炎;肝硬化,胆汁性

[中图分类号] R 575.22

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)02-0151-03

Plasma level of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in patients with primary biliary cirrhosis: expression and clinical significance

LIANG Yan, YANG Zai-xing, WANG Yan, LI Chang, CAO Wei-juan, ZHONG Ren-qian* (Department of Laboratory Diagnostics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To determine the plasma level of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (sTRAIL) in patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and to explore its clinical significance. **Methods:** The plasma levels of sTRAIL were examined in 30 patients with PBC, 25 patients with chronic hepatitis and cirrhosis, and 30 healthy donors with ELISA. Meanwhile, the concentrations of plasma gamma-glutamyltransferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) were examined and their correlation with sTRAIL was analyzed. **Results:** The plasma level of sTRAIL in PBC patients was $(1\ 543.9 \pm 344.2)$ pg/ml, which was significantly higher than that of healthy donors $[(1\ 098.5 \pm 264.7)$ pg/ml, $P < 0.01$]; sTRAIL level in patients with chronic hepatitis and cirrhosis was $(1\ 624.1 \pm 415.8)$ pg/ml, which was significantly higher than that of control $[(1\ 098.5 \pm 264.7)$ pg/ml, $P < 0.05$). We also found that sTRAIL level was positively correlated with GGT and ALP concentrations in PBC patients ($r = 0.63, 0.71, P < 0.01$), but not with those in patients with chronic hepatitis and cirrhosis ($r = 0.43, 0.31, P > 0.05$). **Conclusion:** Plasma sTRAIL level is elevated in PBC patients and is correlated with GGT and ALP concentrations, indicating that sTRAIL may contribute to the impair of the intrahepatic bile ducts and is associated with the mobility of PBC.

[KEY WORDS] tumor necrosis factors; hepatitis; liver cirrhosis, biliary

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 151-153]

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是 1995 年^[1]发现的 TNF 超家族成员,又称 Apo-2L,具有膜结合型与可溶性(sTRAIL)两种形式。TRAIL 具有诱导各种肿瘤细胞凋亡,参与机体的免疫调节、免疫自稳和免疫监视等多种作用。TRAIL 的异常表达与类风湿性关节炎^[2]、1 型糖尿病^[3]、系统性红斑狼疮^[4]等多种自身免疫性疾病的发病有关,但 TRAIL 在原发性胆汁性肝硬化(PBC)中作用的研究,国内外尚未见文献报道。本研究应用 ELISA 法检测 sTRAIL 在 PBC 患者中的表达水平,旨在进一步了解 TRAIL 在 PBC 中的作用,为今后诊断、治疗和预

防该病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料 本院门诊及住院的 PBC 患者 30

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2006AA02Z496);国家自然科学基金(30471616);上海市科委重大科技攻关基金(04DZ19116)。Supported by National High-tech R&D Program (“863” Program) (2006AA02Z496), National Natural Science Foundation of China(30471616) and Grants for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (04DZ19116)。

[作者简介] 梁 艳,硕士生。

* Corresponding author. E-mail: rqqzhong@yahoo. com. cn

例,男9例,女21例,中位年龄54(34~65)岁,纳入标准参照2000年美国肝病学会诊断指南^[5]:(1)血清碱性磷酸酶等胆汁淤积指标升高;(2)腹部B超或CT排除其他胆道梗阻因素;(3)血清AMA或AMA-M2亚型阳性;(4)AMA阴性患者肝脏组织学检查,符合PBC的病理改变。慢性肝炎肝硬化患者25例,男15例,女10例,平均年龄50(40~64)岁,诊断符合2000年全国传染病与寄生虫病学术会议修订的肝炎肝硬化诊断标准^[6]。正常对照组30例,男10例,女20例,中位年龄49(30~55)岁,均来自我院健康查体中心,所有肝功能指标正常,各肝炎病毒学指标阴性。

1.2 标本采集和检测 空腹抽取EDTA-K₂抗凝血3 ml,3 000 r/min($r=7.5$ cm)离心15 min,分离血浆后,置-20℃冰箱保存。采用法国DIACLONE公司TRAIL/Apo2L ELISA KIT试剂盒检测人血浆sTRAIL。将血浆标本、标准品和空白对照分别加入包被抗人TRAIL单克隆抗体的酶标板各孔(100 μl/孔)中,再加入稀释的生物素化抗体,50 μl/孔,室温3 h,洗板3次;加入酶结合物,100 μl/孔,室温30 min,洗板3次;底物显色15~20 min,加入终止液,酶标仪读取450 nm处光密度(D)值。以上步骤严格按说明书操作规程进行。GGT、ALP浓度经德国Bayer 1650型全自动生化分析仪进行检测。

1.3 统计学处理 各检测指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS11.0统计软件进行正态性及方差齐性检验,

组间比较采用两样本均数 t 检验。各指标间相关分析采用Pearson相关检验。

2 结果

2.1 ELISA检测TRAIL方法学评价 将标准品对倍稀释为3 000、1 500、750、375、187.5、93.75 pg/ml等浓度,检测其D值,作出本批次的检测标线,相关系数0.992,见图1。

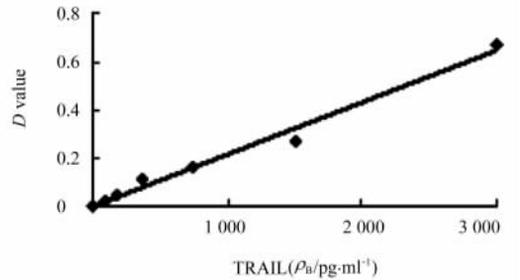


图1 ELISA检测sTRAIL的标准曲线

Fig 1 Standard curve of sTRAIL as determined by ELISA

2.2 各组血浆sTRAIL及GGT、ALP水平 如表1所示,PBC患者血浆sTRAIL水平高于正常对照组,差异有统计学意义($t=3.20, P<0.01$);慢性肝炎肝硬化患者血浆sTRAIL水平也高于正常对照组($t=2.91, P<0.05$);而PBC患者与肝炎肝硬化患者sTRAIL水平比较,差异无统计学意义($t=0.29, P>0.05$)。PBC组GGT及ALP浓度明显高于正常对照组($P<0.01$)。

表1 PBC患者及慢性肝炎肝硬化患者血浆sTRAIL、GGT和ALP水平

Tab 1 sTRAIL, GGT and ALP levels in patients with PBC and chronic hepatitis and cirrhosis

Group	n	sTRAIL ($\rho_B/pg \cdot ml^{-1}$)	GGT ($z/U \cdot L^{-1}$)	ALP ($z/U \cdot L^{-1}$)
Chronic hepatitis and cirrhosis	25	1 624.1 ± 415.8*	102.5 ± 55.4	120.7 ± 36.4
Primary biliary cirrhosis	30	1 543.9 ± 344.2**	407.7 ± 141.6**	367.5 ± 93.8**
Control	30	1 098.5 ± 264.7	19.1 ± 5.4	38.5 ± 8.6

* $P<0.05, ** P<0.01$ vs control

2.3 PBC患者及肝炎肝硬化患者血浆sTRAIL与GGT、ALP相关性分析 PBC患者血浆sTRAIL水平与GGT、ALP呈正相关($r=0.63, 0.71, P<0.001$),见图2;慢性肝炎肝硬化患者血浆sTRAIL与GGT、ALP均无显著相关($r=0.43, 0.31, P=0.24, 0.55$)。

3 讨论

PBC是一种原因不明的慢性炎症性和胆汁淤积性自身免疫性肝病,以小叶内和间隔小胆管损伤为

主要特征,并可进一步发展为肝硬化和肝衰竭,多见于中老年女性,近年来患病率有明显增加的趋势。PBC的病因和发病机制尚不明确,可能与免疫系统对自身抗原的免疫识别异常和自身抗原性改变而引起肝胆管损伤有关。TNF-TNF受体家族在调节淋巴细胞活化、凋亡、免疫自稳和耐受方面发挥重要作用,因此在自身免疫性疾病的发病机制中颇受关注。

TRAIL是TNF超家族成员,人TRAIL基因定位于染色体3q26,编码281个氨基酸。编码产物

TRAIL 蛋白是一种 II 型糖蛋白,其 C-末端的胞外区能形成可溶性的三聚体或二聚体,与 TNF 家族的其他成员有较高的同源性。已鉴定出的 TRAIL 受体类型有 5 种: TRAIL-R1/DR4 和 TRAIL-R2/DR5 介导凋亡信号;而诱骗受体 TRAIL-R3/DcR1 和 TRAIL-R4/DcR2 缺乏功能性结构域,不参与凋亡介导。此外, TNFR 同源分泌型骨保护素(OPG)亦能结合 TRAIL,但亲和力较低。研究表明 TRAIL 主要引起肿瘤细胞凋亡,亦可以特异性诱导正常人类肝细胞凋亡,而对其他种属的肝细胞无损伤作用^[7]。此外,胆汁淤积可以增加 TRAIL-R2/DR5 的表达并提高肝组织对 TRAIL 介导的细胞毒性的敏感性^[8],因此推测 PBC 等胆汁淤积性肝病的发病与 TRAIL 有关。然而, TRAIL 与肝脏疾病的相关性尚未见更多深入的研究报道。

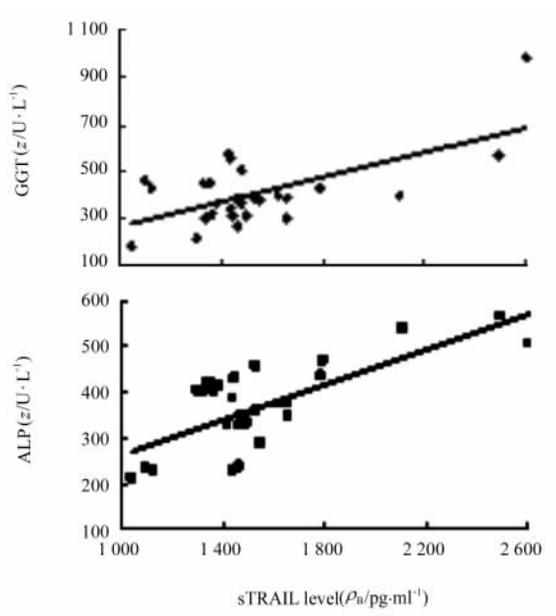


图 2 PBC 患者血浆 sTRAIL 与 GGT、ALP 相关性

Fig 2 Correlation of sTRAIL level with GGT and ALP in patients with PBC

本研究应用 ELISA 法检测了 PBC、慢性肝炎肝硬化患者以及健康者血浆 sTRAIL 水平,方法简便、快速,且检测结果均在线性范围内,准确可靠。GGT 和 ALP 主要反映肝内胆汁淤积的情况,是衡量 PBC 严重程度的重要指标。因此,本研究同时还对 GGT 和 ALP 水平进行了相关分析和比较,结果发现:(1)慢性肝炎肝硬化患者血浆 sTRAIL 明显高于正常对照组,提示肝炎肝硬化的肝细胞损伤可能与 TRAIL 过度表达有关,与文献报道相似^[9];(2)PBC 患者血浆 sTRAIL 水平亦明显高于健康对照,进一步证实 PBC 患者肝胆管损伤与 TRAIL 的异常表达相关;(3)肝病患者血浆 sTRAIL 水平改变无显

著疾病特异性,肝炎病毒或各种免疫损伤等多种因素都可能导致血浆 sTRAIL 的升高,本研究仅显示升高程度的差别;(4)尽管 PBC 和肝炎肝硬化患者血浆 GGT 和 ALP 浓度均明显高于健康对照,但 PBC 患者升高更为显著,且 PBC 患者血浆 sTRAIL 与 GGT、ALP 的浓度呈正相关,而肝炎肝硬化患者无此相关性。提示 PBC 患者胆汁淤积以及胆管细胞和(或)门管区肝细胞损伤的严重程度与 sTRAIL 的异常表达有关。

综上所述,本研究首次发现 PBC 患者血浆 sTRAIL 水平明显增高,而且与 PBC 患者胆汁淤积的严重程度密切相关,这一研究发现对揭示和探索 PBC 发病机制,sTRAIL 在其中的作用提供了重要的实验依据,进一步的研究还将有助于发现更有临床早期诊断价值、更特异、简便的 PBC 诊断指标。

[参考文献]

- [1] Ying S, Durham S R, Corrigan C J, et al. Phenotype of cells expressing mRNA for Th2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and Th1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, 12: 477-487.
- [2] Morel J, Audo R, Hahne M, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 15709-15718.
- [3] Lamhamedi-Cherradi S E, Zheng S, Tisch R M, et al. Critical roles of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2003, 52: 2274-2278.
- [4] Lub-de Hooqe M N, de Vries E G, de Jong S, et al. Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64: 854-858.
- [5] Heathcote E J. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases Practice Guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31: 1005-1013.
- [6] 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]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8: 324-329.
- [7] Jo M, Kim T H, Seol D W, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [J]. *Nat Med*, 2000, 6: 564-567.
- [8] Higuchi H, Bronk S F, Taniai M, et al. Cholestasis increases tumor necrosis factor-related apoptotic-inducing ligand (TRAIL)-R2/DR5 expression and sensitizes the liver to TRAIL-mediated cytotoxicity [J]. *J Pharmacol Exp Therapeut*, 2002, 303: 461-467.
- [9] 岳凤娥, 宋修光, 杜文军, 等. sTRAIL 在肝炎肝硬化和原发性肝癌患者血清中的表达及与肝损伤指标关系的临床研究[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12: 255-256.

[收稿日期] 2006-11-08

[修回日期] 2007-01-07

[本文编辑] 孙岩