

血清肝纤维化标志物对慢性乙型肝炎肝纤维化诊断价值的研究

侯丽 李艳红 唐婧 牛瑶 朱有森

基金项目: 新疆医科大学大学生科研创新基金项目(XYDCX201513)

作者单位: 830054 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院医学检验中心

通讯作者: 朱有森, Email: houlijsyh@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.04.012

【摘要】 目的 探讨血清肝纤维化标志物透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)、Ⅳ型胶原(CⅣ)、层粘连蛋白(LN)对慢性乙型肝炎(CHB)肝纤维化的诊断价值。**方法** 选择 119 例行肝组织病理学检查的 CHB 患者,检测其肝纤维化血清学标志物,比较不同肝组织炎症活动度分级和纤维化程度分期患者的 4 项血清肝纤维化标志物水平,根据受试者工作特征曲线(ROC)探讨联合检测对 CHB 肝纤维化的诊断价值。**结果** 随着肝脏炎症和纤维化程度不断加重,HA、CⅣ、PⅢP 均不断升高(均 $P < 0.05$),而 LN 在不同分期肝脏炎症和纤维化患者中无显著差异(均 $P > 0.05$)。Spearman 相关性分析显示,HA、CⅣ、PⅢP 与肝脏炎症活动度和肝纤维化程度呈正相关(炎症 r 值为 0.568、0.461、0.490,纤维化 r 值为 0.609、0.475、0.403,均 $P < 0.01$)。多因素非条件 Logistic 回归分析显示,随着 HA、CⅣ、PⅢP 的升高,肝脏炎症、纤维化的风险也升高[炎症优势比(OR)的 95% 可信区间(95%CI)为 1.038 (1.012 ~ 1.065)、1.038 (1.010 ~ 1.066)、1.025 (1.004 ~ 1.047),纤维化 OR (95%CI) 为 1.065 (1.030 ~ 1.100)、1.035 (1.006 ~ 1.065)、1.022 (1.000 ~ 1.045)]。ROC 曲线下面积(AUC)分析显示,HA+CⅣ+PⅢP 联合检测的 AUC 大于各单项检测的 AUC (0.877 比 0.820、0.734、0.744,均 $P < 0.01$),联合检测的敏感度为 70.2%,特异度为 90.3%。**结论** 联合检测 HA、CⅣ、PⅢP 对诊断 CHB 纤维化的敏感度、特异度均较单项指标高,有助于诊断 CHB 患者肝纤维化,且联合检测的特异度好于灵敏度,可适当用于肝纤维化的筛查,但用于临床诊断还存在局限性。

【关键词】 慢性乙型肝炎; 肝脏纤维化; 透明质酸; Ⅲ型前胶原肽; Ⅳ型胶原; 层粘连蛋白

The diagnostic value of serum liver fibrosis markers for liver fibrosis of chronic hepatitis B

Hou Li, Li Yanhong, Tang Jing, Niu Yao, Zhu Yousen. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhu Yousen, Email: houlijsyh@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value of serum liver fibrosis markers Hyaluronic acid (HA), procollagen Ⅲ (P Ⅲ P), collagen Ⅳ (C Ⅳ), laminin (LN) in liver fibrosis of chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Hepatic biopsies were performed on 119 CHB patients, and detected serum liver fibrosis markers, compared 4 indexes of serum liver fibrosis in different group degree of hepatic inflammation and fibrosis. To evaluate the diagnostic value of combined detection for CHB liver fibrosis by receiver operating characteristic curve (ROC). **Results** With the serious degree of liver inflammation and fibrosis, the level of hyaluronic acid, pro collagen Ⅲ, collagen Ⅳ rising (all $P < 0.05$), but there was not statistically significant in the level of LN ($P > 0.05$). Spearman correlation analysis showed that HA, C Ⅳ, P Ⅲ P were positively associated with the degree of liver inflammatory activity and fibrosis (r value of inflammation was 0.568, 0.568, 0.461, r value of fibrosis was 0.609, 0.475, 0.403, respectively, all $P < 0.01$). Multivariate logistic regression analysis showed that with the HA, C Ⅳ, P Ⅲ P increased, the risk of liver inflammation and fibrosis also increased [inflammation odds ratio (OR) 95% confidence interval (95% CI) was 1.038 (1.012–1.065), 1.038 (1.010–1.066), 1.025 (1.004–1.047), fibrosis OR (95% CI) was 1.065 (1.030–1.100), 1.035 (1.006–1.065), 1.022 (1.000–1.045)]. Area under the ROC curve (AUC) analysis showed that HA+ C Ⅳ+ P Ⅲ P combined detection of AUC was greater than the individual the AUC (0.877 vs. 0.820, 0.734, 0.744, all $P < 0.01$), the combined detection sensitivity was 70.2%, specificity was 90.3%. **Conclusion** The sensitivity and specificity of combined detection is higher than single index in CHB liver fibrosis, it is helpful to the diagnosis of

CHB with liver fibrosis, the specificity of combined detection is better than sensitivity, it can be appropriately used for screening of liver fibrosis, used for clinical diagnosis of still have limitations.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Hepatic fibrosis; Hyaluronic acid; Procollagen III; Collagen IV; Laminin

乙型肝炎病毒(HBV)感染是引起慢性乙型肝炎(乙肝)^[1]、肝硬化^[2]、肝癌^[3]的重要原因之一。当机体感染 HBV 后,病毒持续在体内进行复制,机体启动自身免疫应答清除体内的病毒,导致肝脏细胞持续损伤,刺激肝脏发生纤维化^[4]。肝纤维化是肝内纤维异常增生,以细胞外基质过度沉积为特征的各种急慢性肝病的病理转归,是慢性肝炎发展至肝硬化、肝癌的必经过程。早期肝纤维化可通过临床干预在一定程度上逆转,从而防止肝硬化和肝癌的发生,降低病死率。肝脏组织活检虽一直被认为是诊断肝纤维化的金标准,但取样误差以及严重的并发症等限制了其广泛应用,早期采用无创手段筛查可提高检查效率^[5-6]。本研究选择接受过肝脏组织活检的慢性乙型肝炎(CHB)患者,检测其血清肝纤维化指标,如透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PⅢP)、Ⅳ型胶原(CⅣ)、层粘连蛋白(LN),与组织学结果进行对比性研究,分析肝脏穿刺组织学病理分期、分级与血清中肝纤维化指标之间的相关性,为临床上早期诊断肝纤维化提供无创性检测平台。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 5 月至 11 月在新疆医科大学第一附属医院确诊为 CHB 并接受肝脏穿刺活检术的 119 例患者作为研究对象,诊断标准参照《慢性乙型肝炎防治指南 2010》^[7]。其中男性 72 例,女性 47 例;年龄 23~63 岁,平均(41±8.7)岁。符合入选标准的病例按肝脏炎症活动度分为 G1~G4,纤维化程度分为 S0~S4。

1.1.1 入选标准 ① 临床诊断为 CHB; ② 乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)阳性或阴性。

1.1.2 排除标准 ① 合并人类免疫缺陷病毒(HIV)者; ② 合并活动性甲、丙、丁、戊型肝炎病毒感染; ③ 有其他导致慢性肝病病史或证据者(如酒精性肝硬化、自身免疫性肝病和药物性肝炎等); ④ 肝细胞癌患者。

1.2 检测方法 采用化学发光法检测 HA、PⅢP、Ⅳ-C、LN 等血清学指标,试剂盒均由深圳市新产业生物医学工程有限公司提供。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件处理数据,

计量资料用中位数(四分位数)[$M(Q_L \sim Q_U)$]表示,组间比较采用 Kruskal-Wallis 非参数检验方法;采用 Spearman 等级相关分析血清肝纤维化指标与肝脏炎症活动度和纤维化程度的相关性,将单因素分析中有统计学意义的因素作为自变量,将肝脏炎症分级、纤维化分期作为因变量,进行多因素非条件 Logistic 回归分析,绘制受试者工作特征曲线(ROC)探讨肝纤维化血清指标对 CHB 纤维化的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHB 肝脏病理分期、分级与肝纤维化血清指标的关系 随着肝脏炎症活动度和纤维化程度不断加重,HA、CⅣ、PⅢP 均不断升高(均 $P < 0.05$);而 LN 在不同分期肝脏炎症及纤维化患者中无显著差异(均 $P > 0.05$)。见表 1。

2.2 CHB 肝脏病理分期、分级与肝纤维化血清指标的相关性 Spearman 相关性分析发现,HA、CⅣ、PⅢP 与炎症活动度及纤维化程度均呈正相关(均 $P < 0.05$),LN 与炎症活动度及纤维化程度均无相关性(均 $P > 0.05$)。见表 2。

表 2 CHB 肝脏病理分期、分级与肝纤维化血清指标相关性分析

统计量	HA (μg/L)	CⅣ (μg/L)	LN (μg/L)	PⅢP (μg/L)
肝脏炎症				
r 值	0.568	0.461	0.111	0.490
P 值	0.000	0.000	0.229	0.000
肝纤维化				
r 值	0.609	0.475	0.144	0.403
P 值	0.000	0.000	0.118	0.000

2.3 CHB 肝脏病理分期、分级与肝纤维化血清指标关系的多因素 Logistic 回归分析 以 $G \geq 2$ 作为诊断肝脏炎症的分界点, $S \geq 2$ 作为诊断纤维化的分界点,分别以肝脏炎症及肝纤维化为因变量,HA、CⅣ、PⅢP、LN 为自变量作单因素非条件 Logistic 分析。结果表明, LN 在肝脏炎症、纤维化中差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。将有统计学意义的变量作为自变量,采用 Enter 法进行多因素非条件 Logistic 分析发现,血清 HA、CⅣ、PⅢP 在肝脏炎症、纤维化中的差异均有统计学意义,随着 HA、CⅣ、

表 1 CHB 肝脏病理分期、分级与肝纤维化 4 项指标的关系 [$M(Q_L, Q_U)$]

指标	肝脏炎症 (G, $n = 119$)				统计量	P 值
	G1 ($n = 62$)	G2 ($n = 32$)	G3 ($n = 14$)	G4 ($n = 11$)		
HA ($\mu\text{g/L}$)	96.550 (86.182 ~ 107.448)	105.890 (96.578 ~ 120.385)	124.075 (109.593 ~ 146.628)	156.230 (132.580 ~ 236.400)	40.317	0.000
C IV ($\mu\text{g/L}$)	74.980 (67.568 ~ 84.863)	85.465 (71.365 ~ 107.885)	93.960 (87.363 ~ 142.538)	98.900 (75.930 ~ 109.680)	26.076	0.000
LN ($\mu\text{g/L}$)	103.455 (90.138 ~ 124.608)	113.260 (83.345 ~ 135.190)	97.300 (92.045 ~ 115.885)	123.120 (98.620 ~ 169.400)	5.162	0.160
PC III ($\mu\text{g/L}$)	83.055 (75.478 ~ 124.608)	97.415 (86.663 ~ 117.030)	117.445 (100.040 ~ 154.333)	111.420 (102.630 ~ 136.900)	29.294	0.000

指标	肝纤维化 (S, $n = 119$)				统计量	P 值
	S0 ($n = 32$)	S1 ($n = 30$)	S2 ($n = 28$)	S3 ($n = 16$)		
HA ($\mu\text{g/L}$)	96.595 (85.440 ~ 105.410)	96.710 (77.130 ~ 105.505)	101.375 (94.285 ~ 113.640)	131.465 (121.090 ~ 150.213)	51.752	0.000
C IV ($\mu\text{g/L}$)	71.140 (62.710 ~ 83.883)	78.585 (69.030 ~ 87.893)	83.380 (71.960 ~ 90.823)	94.755 (83.973 ~ 119.823)	27.434	0.000
LN ($\mu\text{g/L}$)	100.665 (84.153 ~ 111.758)	119.215 (86.603 ~ 132.338)	107.860 (96.288 ~ 128.883)	108.130 (95.545 ~ 121.173)	4.942	0.293
PC III ($\mu\text{g/L}$)	90.125 (78.055 ~ 99.775)	80.490 (74.913 ~ 97.868)	95.900 (86.638 ~ 117.235)	106.345 (97.840 ~ 132.905)	24.617	0.000

P III P 的升高, 肝脏炎症、纤维化的风险也升高。见表 3。

表 3 CHB 肝脏病理分期、分级的多因素非条件 Logistic 分析

变量	β 值	s_e 值	Wald 值	P 值	OR 值	95%CI
肝脏炎症						
HA	0.037	0.013	8.202	0.004	1.038	1.012 ~ 1.065
CIV	0.037	0.014	7.123	0.008	1.038	1.010 ~ 1.066
P III P	0.025	0.011	5.313	0.021	1.025	1.004 ~ 1.047
肝纤维化						
HA	0.063	0.017	14.002	0.000	1.065	1.030 ~ 1.100
CIV	0.034	0.014	5.724	0.017	1.035	1.006 ~ 1.065
P III P	0.022	0.011	3.947	0.047	1.022	1.000 ~ 1.045

注: OR 为优势比, 95%CI 为 95% 可信区间

2.4 肝纤维化血清指标诊断 CHB 纤维化的 ROC 曲线分析 各指标 ROC 曲线下面积 (AUC) 依次为 $\text{HA} > \text{P III P} > \text{CIV}$ 。经逐步 Logistic 回归得到方程: $y_1 = 1/[1 + \text{Exp}(11.767 - 0.063x_1 - 0.034x_2 - 0.022x_3)]$; 其中生成的新变量 y_1 为 3 项肝纤维化血清指标联合检测诊断 CHB 纤维化的预测概率, $x_1 = \text{HA}$, $x_2 = \text{CIV}$, $x_3 = \text{P III P}$, 3 项肝纤维化血清指标及联合检测 Logistic 回归曲线转化参数 y_1 , 绘制 ROC 曲线, 发现 3 项肝纤维化血清指标联合检测的 AUC 大于各单项检测的 AUC, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且联合检测的敏感度和特异度均最高。见表 4, 图 1。

表 4 肝纤维化血清指标诊断 CHB 纤维化的 ROC 曲线分析

血清学指标	AUC	敏感度 (%)	特异度 (%)	约登指数
HA	0.820	64.9	87.1	0.520
CIV	0.734	64.9	77.4	0.423
P III P	0.744	63.2	74.2	0.374
HA+CIV+P III P	0.877	70.2	90.3	0.605

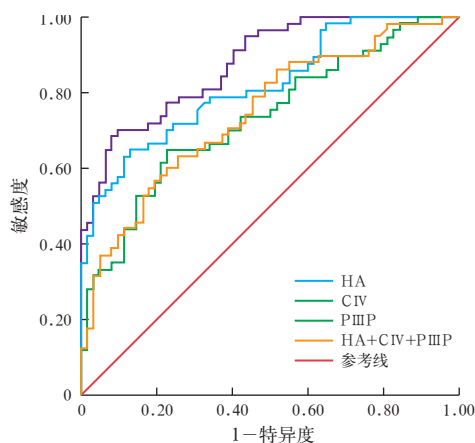


图 1 血清纤维化指标联合诊断 CHB 纤维化的 ROC 曲线

3 讨论

CHB 患者早期就可伴有肝功能受损、免疫功能降低^[1], 随着疾病的进展, 可发生肝纤维化甚至肝硬化, 肝功能严重受损可累积其他器官, 发生肝性脑病、肝硬化急性肾损伤及肝肾综合征^[2, 8]。虽然有动物实验表明, 骨髓间充质干细胞可以治疗大鼠肝纤维化^[9], 但目前临床上尚无有效治疗肝纤维化的手段, 肝移植是晚期肝硬化患者的无奈选择, 但术后仍有 CHB 复发以及合并新发自身免疫性肝炎的可能^[10]。

肝脏活检及病理学检查是目前诊断肝纤维化的金标准, 肝活检可客观地反映肝纤维化的进程, 但肝脏穿刺因其为有创性检查, 目前不能被大部分患者接受, 反复取材更是难上加难, 而血液标本获取方便、可重复性高, 更易于监测疾病的动态变化。因此, 近年来诊断肝纤维化及肝硬化的无创性

检查获得了大量的研究关注,成为临床研究中的热点^[11-12]。

CHB 纤维化患者肝纤维化分期与组织炎症分级具有明显的正相关性,即随着肝脏炎症活动度的增加,其肝纤维化程度加重^[13]。单项指标中 HA 的诊断价值最高,其阴性预测值明显高于阳性预测值,因此,HA 目前主要用于排除进展期肝纤维化和肝硬化患者^[14]。有研究称血清 HA 水平与肝功能密切相关,肝纤维化经治疗好转后其水平降低,肝纤维化加重时其水平升高,且晚期肝硬化时其水平更高^[15]。肝脏纤维化形成时血清中胶原含量增加,但在肺炎、胰腺炎、风湿性疾病等患者中胶原含量也会升高,因此,胶原酶类诊断肝纤维化的特异性不高^[16];LN 的沉积可导致肝窦毛细血管化,主要与门静脉高压的形成相关,研究也表明胶原酶类对肝纤维化的诊断价值有限^[17]。

本研究显示,CHB 肝纤维化患者血清中 HA、PⅢP 和 CⅣ水平随肝纤维化程度加重逐渐升高,但 LN 在肝脏炎症、纤维化中差异均无统计学意义,这与以往的研究结果^[18]不一致,还应扩大病例数进一步验证其临床价值。AUC 显示 3 项血清学指标单独用于诊断 CHB 纤维化的准确性均在 90% 以下,用于诊断 CHB 纤维化准确性中等,均不能作为肝纤维化较好的诊断指标;3 项血清指标联合诊断的准确性略高于各单项指标检测,联合检测比单项血清学指标有助于 CHB 纤维化的诊断,但仍不能作为 CHB 纤维化诊断的理想指标。3 项血清纤维化指标与肝纤维化病理分期及分级存在显著的相关性,表明血清纤维化标志物能在一定程度上反映肝纤维化的进展。3 项血清学指标单独诊断 CHB 纤维化的敏感度均不高,低于 70%,HA 在 3 项血清学指标中特异度最高(为 87.1%),而联合检测诊断 CHB 纤维化的敏感度、特异度均高于单项指标,但敏感度仍然不高(为 70.2%)。联合检测的特异度为 90.3%,在一定程度上可用于临床 CHB 患者肝纤维化的排除。目前对于肝纤维化诊断尚无理想的单项指标,联合检测可以提高检测效率,因此寻找理想的肝纤维化指标或者联合多项指标检测是未来肝纤维化无创性检测的发展趋势。

综上所述,对于 CHB 患者,HA、PⅢP、CⅣ血清学标志物联合检测有助于 CHB 患者肝纤维化的诊断,虽然其敏感度低于特异度,但也可适当用于肝纤维化的筛查,同时用于临床诊断均存在不同程度的

局限性,肝纤维化早期诊断和防治对于阻止肝纤维化发展为肝硬化具有重要意义,当其水平持续升高时,还应及时进行肝脏活检来评估肝脏病理分期及分级,以便早期发现并治疗。

参考文献

- 1 苗静,袁晨翼,李秋伟,等.慢性乙型肝炎病毒感染患者外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的表达与 HBsAg 定量的相关性分析[J].中国中西医结合急救杂志,2016,23(4):399-403.
- 2 胡爱荣,蒋素文,胡耀仁.肝硬化急性肾损伤及肝肾综合征的诊治路径[J].中华危重病急救医学,2016,28(3):193-199.
- 3 王冠文,杨爽,张全胜.肝癌动物模型研究进展[J].实用器官移植电子杂志,2016,4(2):97-101.
- 4 陆伦根,胡俊杰.2012 年肝纤维化领域的研究进展[J].中华肝脏病杂志,2013,21(2):84-86.
- 5 巢浩界,张铭.时间分辨荧光免疫分析技术检测乙肝病毒标志物优越性的探讨[J].实用检验医师杂志,2016,8(4):209-211.
- 6 王书锋,周丽莉.血清 AFP、FER 和 CA19-9 联合检测在原发性肝癌诊断中的意义[J].实用检验医师杂志,2015,(1):39-41.
- 7 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
- 8 郑卫萍.肝硬化急性肾损伤患者的肾脏生物学标志物与鉴别诊断[J/CD].实用器官移植电子杂志,2014,(3):156-156.
- 9 刘凯.硫代乙酰胺(TAA)诱导的肝硬化大鼠模型中骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的效果[J/CD].实用器官移植电子杂志,2016,4(2):87.
- 10 王旭,陈虹.肝移植术后乙肝复发合并新发自身免疫性肝炎的诊治体会[J/CD].实用器官移植电子杂志,2014,2(2):74.
- 11 传龙,王坤,高人焘.肝纤维化无创性诊断技术的临床应用[J].临床肝胆病杂志,2015,31(3):332-336.
- 12 康华,田亚琼,张磊,等.乙肝相关肝细胞肝癌血清蛋白标志物的筛选[J].实用检验医师杂志,2015,(2):79-85.
- 13 丁贤君,李世波,李绍佐,等.慢性肝病患者肝纤维化血清学指标与肝组织纤维化分期的量化关系[J].中华肝脏病杂志,2005,13(12):911-914.
- 14 Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests [J]. Clin Chim Acta, 2007, 381(2):107-113.
- 15 Tan Y, Ye Y, Zhou X, et al. Age as a predictor of significant fibrosis features in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection with persistently normal alanine aminotransferase [J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0123452.
- 16 Baranova A, Lal P, Bircardinc A, et al. Non-invasive markers for hepatic fibrosis [J]. BMC Gastroenterol, 2011, 11:91.
- 17 Suk KT, Kim DY, Sohn KM, et al. Biomarkers of liver fibrosis [J]. Adv Clin Chem, 2013, 62:33-122.
- 18 丁红兵,陈永鹏,冯筱榕,等.慢性乙型肝炎肝纤维化分期与血清肝纤维化标志物的相关性分析[J].中华肝脏病杂志,2001,9(2):78-80.

(收稿日期:2017-09-21)

(本文编辑:杨程伍 张耘菲)