

慢性乙型肝炎肝纤维化患者外周血单个核细胞中 TET3 水平与纤维化程度的关系

安红杰 耿 华 葛志胜 徐金凤 何文艳 赵崇山 高美丽 陈俊红

【摘要】 目的 探究慢性乙型肝炎(CHB)肝纤维化患者外周血单个核细胞中 10-11 转位酶 3(TET3)与纤维化程度的关系。方法 选择 2017 年 9 月至 2019 年 12 月在河北中石油中心医院确诊的 137 例 CHB 肝纤维化患者作为研究对象。采用蛋白质印迹法检测单个核细胞中 TET3 的表达水平。采用 ROC 曲线评价 TET3 诊断肝纤维化程度的效能。结果 CHB 肝纤维化患者中 S1 期 28 例, S2 期 36 例, S3 期 30 例, S4 期 43 例。S1 期、S2~S3 期和 S4 期外周血单个核细胞中 TET3 水平分别为 2.17 ± 0.71 、 3.39 ± 1.18 和 5.75 ± 1.40 , 3 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。S4 期外周血单个核细胞中 TET3 水平高于 S1 期和 S2~S3 期, S2~S3 期外周血单个核细胞中 TET3 水平高于 S1 期, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。Spearman 秩相关分析显示, 外周血单个核细胞中 TET3 水平与肝纤维化病理分期呈正相关 ($P < 0.05$)。外周血单个核细胞中 TET3 诊断 \geq S2 期、 \geq S3 期和 S4 期的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.873、0.940 和 0.930, 均大于 AST/血小板比值指数 (APRI) 及肝纤维化指数 (FIB-4) 的 AUC, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。结论 外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平越高, 提示肝纤维化程度越严重。检测 CHB 肝纤维化患者外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平可辅助判断肝纤维化程度。

【关键词】 慢性乙型肝炎; 肝纤维化; 10-11 转位酶 3; 单个核细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2021.03.007

Relationship between TET3 level in peripheral blood mononuclear cells and fibrosis degree of patients with chronic hepatitis B liver fibrosis AN Hongjie, GENG Hua, GE Zhisheng, XU Jinfeng, HE Wenyan, ZHAO Chongshan, GAO Meili. Department of Infection, Hebei Petro China Central Hospital, Langfang 065000, China; CHEN Junhong. Department of Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine, Hebei Petro China Central Hospital, Langfang 065000, China

【Abstract】 Objective This paper aims to explore the relationship between ten-eleven-translocation proteins 3 (TET3) in peripheral blood mononuclear cells and fibrosis degree of patients with chronic hepatitis B (CHB) liver fibrosis. **Methods** A total of 137 patients with CHB liver fibrosis diagnosed in Hebei Petro China Central Hospital from September 2017 to December 2019 were selected as the research subjects. Western blotting was used to detect TET3 levels in monocytes. The receiver operating characteristic curve (ROC) was used to evaluate the efficacy of TET3 in diagnosis of liver fibrosis. **Results** In CHB patients with liver fibrosis, there were 28 cases of stage S1, 36 cases of stage S2, 30 cases of stage S3, and 43 cases of stage S4. The levels of TET3 in peripheral blood mononuclear cells of stage S1, stage S2 to S3, and stage S4 were 2.17 ± 0.71 , 3.39 ± 1.18 , and 5.75 ± 1.40 , respectively, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The TET3 level in peripheral blood mononuclear cells in stage S4 was higher than that in stage S1 and S2 to S3 while that in peripheral blood

mononuclear cells in stage S2 to S3 was higher than that in stage S1, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was a positive correlation between TET3 levels in peripheral blood mononuclear cells and pathological stages of liver fibrosis ($P < 0.05$). The AUC of TET3 diagnosis \geq S2, \geq S3, and S4 in peripheral blood mononuclear cells were 0.873, 0.940, and 0.930, respectively, which were all higher than that of aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI) and Fibrosis-4 (FIB-4) diagnosis \geq S2, \geq S3 and S4, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** A high TET3 level in peripheral blood mononuclear cells indicates a severe degree of liver fibrosis. Detection of TET3 level in peripheral blood mononuclear cells of CHB patients can assist in determining the degree of liver fibrosis.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Liver fibrosis; Ten-eleven-translocation proteins 3; Mononuclear cells

慢性乙型肝炎(CHB)患者随病程进展多伴有肝纤维化^[1]。肝纤维化是 CHB 病程进展的重要病理过程,若不及时进行干预,易发展为肝硬化,甚至肝细胞癌^[2]。中国每年约有 60 万人因 CHB 肝硬化及肝细胞癌死亡^[3]。探究肝纤维化的发病及进展机制对于抑制肝纤维化进展尤为重要。已有多项研究表明肝纤维化与肝星状细胞激活有关^[4-6]。HBV 诱发肝损伤可激活肝星状细胞,增加细胞外基质分泌,还可诱使活化的肝星状细胞转化为成纤维细胞,导致肝纤维化发生及进展。早期了解肝纤维化程度并及时进行干预可有效抑制肝纤维化进展^[7-9]。目前,肝穿刺活组织检查是确诊肝纤维化程度的金标准^[10],但由于其为有创性检查,且检查耗时较长,不利于临床广泛应用。因此,需探究便利、准确的生物标志物或检查手段以评估肝纤维化程度。

10-11 转位酶 3(TET3)是一种 DNA 去甲基化酶,可将 5-甲基胞嘧啶氧化为 5-羟甲基胞嘧啶^[11]。有研究表明,TET3 可靶向长链非编码 RNA HIF1A-AS1 介导肝星状细胞活化^[12];此外,TET3/转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的正反馈回路可促进肝纤维化进展^[13]。由此推测 TET3 参与了肝纤维化的进展过程,其表达水平与肝纤维化程度有关。外周血单个核细胞可反映肝纤维化程度,且在外周血中含量较高,易于采集^[14]。本文探究了 CHB 肝纤维化患者外周血单个核细胞中 TET3 水平与肝纤维化程度的关系,以期为评估肝纤维化程度提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 9 月至 2019 年 12 月在河北中石油中心医院确诊的 137 例 CHB 肝纤维化患者作为研究对象。根据《慢性乙型肝炎防治指南(2015 更

新版)》^[14]诊断 CHB。纳入标准:(1)接受肝穿刺活组织病理检查,并诊断为肝纤维化;(2)未接受抗病毒和抗纤维化治疗;(3)能够配合完成相关检查;(4)签署了知情同意书。排除标准:(1)合并自身免疫性肝炎、慢性丙型肝炎、酒精性肝炎或非酒精性脂肪性肝病等;(2)合并肝细胞癌;(3)除 HBV 感染之外,合并其他严重感染性疾病。137 例 CHB 肝纤维化患者中男性 85 例,女性 52 例,年龄 20~66 岁,平均年龄为(45.78 \pm 11.02)岁;其中 S1 期 28 例,S2 期 36 例,S3 期 30 例,S4 期 43 例。本研究经医院医学伦理委员会批准(批件号 KYLL-2019-06)。

1.2 临床信息收集及处理

收集年龄、性别等信息,使用 7600 型全自动生化分析仪(日本日立公司)检测肝穿刺活组织检查前 1 日或当日 AST 和 ALT 水平,使用 DxH 600 血细胞分析仪[贝克曼库尔特实验系统(苏州)有限公司]检测血小板(PLT)水平。计算 AST/PLT 比值指数(APRI)和肝纤维化指数(FIB-4), $APRI = AST$ (/正常值上限,U/L)/ $PLT(\times 10^9/L) \times 100$, $FIB-4 = 年龄 \times AST(U/L) / [PLT(\times 10^9/L) \times ALT(U/L)^{1/2}]$ 。

1.3 肝纤维化程度判断

超声引导下将活组织穿刺针插入 CHB 肝纤维化患者肝部,取出约 2 cm 的肝组织,由本院病理科 2 名副主任医师评估肝纤维化程度。肝纤维化程度分为 S1 期、S2 期、S3 期和 S4 期。S1 期 汇管区肝纤维化扩大,局限窦周或肝小叶内纤维化;S2 期 肝汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,但肝小叶结构保留;S3 期 纤维间隔及肝小叶结构紊乱,但未进展至肝硬化;S4 期 肝硬化^[14]。

1.4 外周血单个核细胞中 TET3 表达水平检测

抽取 CHB 肝纤维化患者肝穿刺活组织检查前

1 日或当日的空腹肘部静脉血 10 mL,采用密度梯度离心法提取外周血中单个核细胞^[15]。步骤如下:25 ℃ 800 r/min 离心 15 min,离心半径为 8 cm,取离心后下层血细胞,置入 10 mL Ficoll 分离液中,提取外周血单个核细胞。

采用蛋白质印迹法检测单个核细胞中 TET3 的表达水平^[16]。步骤如下:取上述实验获取的外周血单个核细胞,滴加 RIPA 裂解液至装有单个核细胞的试管中,裂解细胞,获取总蛋白,然后使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量。80 V 凝胶电泳 15 min,然后加压至 120 V,直至溴酚蓝跑出胶面,转膜,然后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,滴加兔抗人 TET3 单克隆抗体,4 ℃ 孵育过夜,滴加二抗,室温下孵育 2 h。采用电化学发光法(ELC)曝光显影。应用 ImageJ 1. 8. 0 软件读取蛋白质印迹实验的条带灰度值。

1. 5 统计学方法

应用 SPSS 23. 0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组间比较采用 F 检验,组间两两比较采用 S-N-K 检

验;非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 $[M(Q_R)]$ 表示,3 组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Spearman 秩相关分析探讨 TET3 与肝纤维化程度的关系。采用 ROC 曲线评价 TET3、APRI 指数和 FIB-4 指数诊断肝纤维化程度的效能。 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 各组基本资料比较

S1 期、S2~S3 期和 S4 期患者在年龄、性别方面比较,差异均无统计学意义(P 均 $> 0. 05$);在 AST、ALT、PLT、APRI 指数和 FIB-4 指数方面比较,3 组间差异均有统计学意义(P 均 $< 0. 05$)。S4 期 AST 水平、APRI 指数和 FIB-4 指数均高于 S1 期和 S2~S3 期,差异均有统计学意义(P 均 $< 0. 05$)。S4 期 ALT 水平高于 S1 期,PLT 水平低于 S1 期,差异均有统计学意义(P 均 $< 0. 05$)。S2~S3 期 AST、ALT 和 APRI 指数均高于 S1 期,差异均有统计学意义(P 均 $< 0. 05$)。见表 1。

表 1 各组基本资料比较

项目	S1 期(n=28)	S2~S3 期(n=66)	S4 期(n=43)	统计值	P 值
年龄/岁	45. 21±11. 37	46. 61±10. 56	44. 88±11. 65	$F = 0. 361$	0. 698
性别/例(%)				$\chi^2 = 3. 204$	0. 202
男	15(53. 57)	46(69. 70)	24(55. 81)		
女	13(46. 43)	20(30. 30)	19(44. 19)		
AST/U·L ⁻¹	45. 22(32. 49)	73. 08(64. 72) ^a	97. 85(68. 74) ^{ab}	$Z = 27. 826$	$< 0. 001$
ALT/U·L ⁻¹	74. 31(74. 73)	151. 15(113. 74) ^a	188. 86(138. 24) ^a	$Z = 25. 384$	$< 0. 001$
PLT/×10 ⁹ ·L ⁻¹	133. 88±34. 84	125. 67±26. 57	115. 25±20. 11 ^a	$F = 4. 349$	0. 015
APRI 指数	0. 42±0. 17	0. 66±0. 39 ^a	0. 95±0. 36 ^{ab}	$F = 21. 160$	$< 0. 001$
FIB-4 指数	0. 42±0. 21	0. 62±0. 33	1. 05±0. 87 ^{ab}	$F = 13. 077$	$< 0. 001$

注:与 S1 期比较,^a $P < 0. 05$;与 S2~S3 期比较,^b $P < 0. 05$

2. 2 各组 TET3 水平比较

S1 期、S2~S3 期和 S4 期外周血单个核细胞中 TET3 水平分别为 $2. 17 \pm 0. 71$ 、 $3. 39 \pm 1. 18$ 和 $5. 75 \pm 1. 40$,3 组间比较差异有统计学意义($F = 89. 023, P < 0. 001$)。S4 期外周血单个核细胞中 TET3 水平高于 S1 期和 S2~S3 期,差异均有统计学意义(P 均 $< 0. 05$)。S2~S3 期外周血单个核细胞中 TET3 水平高于 S1 期,差异有统计学意义($P < 0. 05$)。

2. 3 TET3 水平与肝纤维化程度的关系

外周血单个核细胞中 TET3 水平与肝纤维化病理分期呈正相关关系($r_s = 0. 811, P < 0. 001$)。

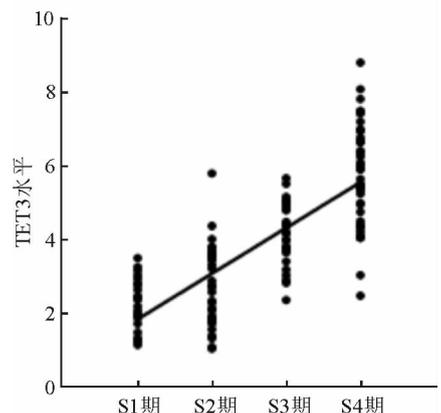


图 1 TET3 与肝纤维化病理分期的散点图

2.4 TET3 诊断肝纤维化程度的效能

外周血单个核细胞中 TET3 诊断 \geq S2 期、 \geq S3 期和 S4 期的 AUC 分别为 0.873、0.940 和 0.930，均大于 APRI 指数和 FIB-4 指数的 AUC，差异均有

统计学意义 [APRI ($Z = 2.037, P = 0.042; Z = 4.560, P < 0.001; Z = 3.161, P < 0.001$), FIB-4 ($Z = 3.124, P = 0.002; Z = 5.976, P < 0.001; Z = 4.670, P < 0.001$)]。见表 2、图 2。

表 2 TET3 诊断肝纤维化程度的效能比较

分期	项目	AUC	95%CI	约登指数	最佳截断值	敏感度/%	特异度/%
\geq S2 期	TET3	0.873	0.806~0.924	0.698	3.26	73.39	96.43
	APRI 指数	0.778	0.699~0.845	0.527	0.57	66.97	85.71
	FIB-4 指数	0.701	0.617~0.776	0.358	0.82	35.78	100.00
\geq S3 期	TET3	0.940	0.886~0.973	0.769	3.68	86.30	90.62
	APRI 指数	0.736	0.654~0.807	0.427	0.85	52.05	90.62
	FIB-4 指数	0.638	0.552~0.718	0.329	0.82	43.84	89.06
S4 期	TET3	0.930	0.873~0.966	0.773	4.04	95.35	81.91
	APRI 指数	0.782	0.704~0.848	0.460	0.83	65.12	80.85
	FIB-4 指数	0.643	0.557~0.723	0.319	1.08	37.21	94.68

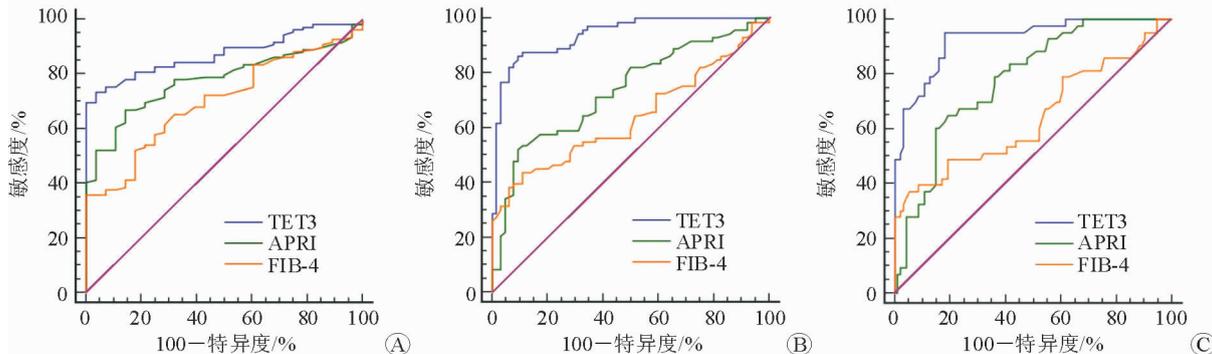


图 2 TET3 诊断肝纤维化程度的 ROC 曲线 A 肝纤维化程度 \geq S2 期 B 肝纤维化程度 \geq S3 期 C 肝纤维化程度为 S4 期

3 讨论

研究表明，下调 DJ-1 蛋白表达可降低肝细胞、肝脏库普弗细胞氧自由基水平，同时减少中性粒细胞和吞噬细胞浸润，抑制肝纤维化进展^[17]。及时了解 CHB 患者肝纤维化程度并进行干预，对于改善患者预后意义重大。肝脏病理学活组织检查是评价肝纤维化程度的金标准，但由于其为有创性检查，难以动态评估肝纤维化程度；此外，若取样不足，无法进行评估^[18]。瞬时弹性成像技术是无创性评估肝纤维化程度的方法之一，具有较高的价值^[19]，但对有腹水、肥胖或肋间隙较小的患者，其评估结果的效能较低^[20]；此外，该检查费用较高，对于操作技术也有一定要求，因此临床大规模应用受限。

TET3 在人肝纤维化组织和小鼠肝纤维化组织中均高表达。TET3/TGF- β 1 的正反馈回路不仅可促使肝星状细胞表达纤维化相关基因，还可诱使肝细胞大量表达 TGF- β 1，促进了肝纤维化的进展。

有研究表明，抑制 TET3 表达，可改善四氯化碳诱导的肝纤维化^[13]。由此推测，TET3 可通过上述机制参与 CHB 患者肝纤维化的发生及发展过程，检测其在外周血单个核细胞中的表达水平有望评估肝纤维化程度。

本研究比较了 S1 期、S2~S3 期和 S4 期患者外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平，结果显示 S4 期外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平高于 S1 期和 S2~S3 期，S2~S3 期外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平高于 S1 期，表明随 CHB 肝纤维化程度加重，外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平也随之升高，提示外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平与肝纤维化关系密切。随后，本研究进一步分析了 CHB 肝纤维化患者外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平与肝纤维化程度的关系，结果显示外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平与肝纤维化病理分期呈正相关，提示检测 CHB 肝纤维化

患者外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平有助于评估肝纤维化程度。

APRI 指数和 FIB-4 指数的计算较为简便,相关指标的检测费用也较为低廉,已被欧洲肝病指南推荐为评估慢性丙型肝炎肝纤维化的指标,尤其适用于医疗技术不发达的地区^[21]。多项研究表明,APRI 指数和 FIB-4 指数对于评估 CHB 肝纤维化程度具有较高价值^[22-23]。本文构建了 TET3、APRI 指数和 FIB-4 指数诊断肝纤维化程度 \geq S2 期、 \geq S3 期和 S4 期的 ROC 曲线,结果显示外周血单个核细胞中 TET3 诊断 \geq S2 期、 \geq S3 期和 S4 期的 AUC 分别为 0.873、0.940 和 0.930,均大于 APRI 指数和 FIB-4 指数的 AUC,提示外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平可辅助评估 CHB 肝纤维化程度。

综上所述,CHB 肝纤维化患者外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平与肝纤维化程度关系密切。CHB 肝纤维化患者外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平越高,提示肝纤维化程度越严重。检测 CHB 患者外周血单个核细胞中 TET3 的表达水平可辅助评估肝纤维化程度,有利于临床动态评估抗纤维化治疗方案的疗效。本研究的不足之处在于为单中心研究,纳入样本均为同一地区患者,为避免对实验结果造成偏倚,今后还需进一步开展多中心、跨地域的深入研究。

参 考 文 献

- Yan LT, Wang LL, Yao J, et al. Total bile acid-to-cholesterol ratio as a novel noninvasive marker for significant liver fibrosis and cirrhosis in patients with non-cholestatic chronic hepatitis B virus infection [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(8): e19248.
- Xiong M, Li J, Yang S, et al. Influence of gender and reproductive factors on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B infection[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2019, 10(10): e00085.
- Li X, Jin Q, Zhang H, et al. Changes in liver stiffness and its associated factors during oral antiviral therapy in Chinese patients with chronic hepatitis B[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(3): 1169-1175.
- Petrescu AD, Grant S, Williams E, et al. Coordinated targeting of galanin receptors on cholangiocytes and hepatic stellate cells ameliorates liver fibrosis in multidrug resistance protein 2 knockout mice[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(3): 586-601.
- Zhang X, Xie X, Wang Y, et al. Interleukin-26 promotes the proliferation and activation of hepatic stellate cells to exacerbate liver fibrosis by the TGF- β 1/Smad2 signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(12): 4271-4279.
- Yuan BY, Chen YH, Wu ZF, et al. MicroRNA-146a-5p attenuates fibrosis-related molecules in irradiated and TGF-beta1-Treated human hepatic stellate cells by regulating PTPRA-SRC signaling[J]. *Radiat Res*, 2019, 192(6): 621-629.
- 夏翊夫, 张春清. 抗凝治疗抑制肝纤维化进程的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(10): 2224-2226.
- 郑虹, 肖海, 吴雄健. 肝纤维化的发病机制及治疗的最新进展[J]. *赣南医学院学报*, 2019, 39(3): 298-302, 308.
- 钱川, 张红燕, 雷素云. 慢性乙型肝炎肝纤维化患者的血浆 CCL24 水平及意义[J]. *国际消化病杂志*, 2021, 41(2): 129-134.
- 蒋丽娜, 赵景民. 肝组织学评估在非酒精性脂肪性肝病临床研究及实践中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(12): 2303-2306.
- 王超, 徐国良. TET 双加氧酶介导的主动去甲基化分子机制及功能研究[J]. *生命科学*, 2017, 29(10): 919-925.
- Zhang QQ, Xu MY, Qu Y, et al. TET3 mediates the activation of human hepatic stellate cells via modulating the expression of long non-coding RNA HIF1A-AS1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7744-7751.
- Xu Y, Sun X, Zhang R, et al. A positive feedback loop of TET3 and TGF- β 1 promotes liver fibrosis[J]. *Cell Rep*, 2020, 30(5): 1310-1318. e5.
- 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 更新版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(12): 888-905.
- 张子豪, 王昌生, 黎雄, 等. 急性胰腺炎患者外周血单个核细胞中 PRDM3 水平与预后的关系[J]. *国际消化病杂志*, 2021, 41(1): 66-69.
- Zheng S, Chen Y, Zheng S, et al. Inhibition of Mastermind-like 1 alleviates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(14): 1099-1108.
- 李军, 陈攀, 陈孝, 等. 以 DJ-1 蛋白为靶点治疗肝纤维化的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(3): 309-312.
- 沈崔琴, 李万斌, 雷洁雯, 等. γ -谷氨酰转肽酶与血小板比率对慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断效能[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(9): 984-988.
- 肝脏硬度评估小组. 瞬时弹性成像技术诊断肝纤维化专家意见[J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(6): 420-424.
- 孙华, 陈晓蓉. 瞬时弹性成像在肝纤维化无创诊断中的临床应用[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2015, 34(1): 116-120.
- European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398.
- 丁德平, 刘平, 陈琳莉, 等. FibroScan、AAR、APRI、FIB-4 及其联合应用对乙型肝炎患者肝纤维化程度诊断效价的意义[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2016, 26(5): 267-269, 286.
- 何丽华, 钮志林, 叶扬. FIB-4 及 APRI 指数对慢性乙型肝炎患者肝纤维化严重程度的评估价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(15): 2076-2078, 2081.

(收稿日期:2020-05-11)

(本文编辑:周骏)