

高尔基糖蛋白73在各种良性终末期肝病肝组织中的表达★

单 珊, 陈 虹, 王乐天

Expression of Golgi protein-73 in the liver tissue of patients with benign end-stage liver diseases

Shan Shan, Chen Hong, Wang Le-tian

文章亮点:

提示在不同的病毒和非病毒两种调节途径引起的高尔基糖蛋白 73 表达水平升高无明显差异。高尔基糖蛋白 73 在自身免疫性肝炎依赖的非病毒途径中的表达可能高于其在 HBV 病毒途径中的表达。

Abstract

BACKGROUND: Golgi protein-73 is a glycoprotein which discovered with the proteomics technology development. It has close relation with acute and chronic hepatitis and hepatocellular cancer.

OBJECTIVE: To investigate the expression of Golgi protein-73 in liver tissue of the patients with benign end-stage liver diseases and normal liver tissue, and to analyze their clinical significance and prognostic value.

METHODS: 113 specimens of liver transplantation for patients with benign end-stage liver disease and 10 normal liver specimens were included in the study. The expressions of Golgi protein-73 in these specimens were detected by immunohistochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: Golgi protein-73 expression levels in specimens of liver transplantation for patients with benign end-stage liver diseases were higher than those in normal liver specimens without liver disease. Golgi protein-73 expression levels in specimens of autoimmune hepatitis cirrhosis were higher than those in hepatitis B cirrhosis. There was no significant difference of Golgi protein-73 expression among all other groups. Golgi glycoprotein 73 expression in autoimmune hepatitis depended non-viral pathway was higher than that in HBV viral way.

Shan S, Chen H, Wang LT. Expression of Golgi protein-73 in liver tissue of patients with benign end-stage liver diseases. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(31): 5833-5836. [http://www.crtcr.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 高尔基糖蛋白 73 是随着蛋白质组学技术发展而新近发现的糖蛋白, 与各种急慢性肝炎及肝癌关系密切。

目的: 观察高尔基糖蛋白 73 在各种终末期良性肝病行肝移植的病肝组织和正常肝脏组织中的表达及其意义, 并分析与预后的关系。

方法: 采用免疫组织化学染色 SP 法检测 113 例因各种终末期良性肝病行肝移植的石蜡标本及 10 例供肝正常肝脏组织中高尔基糖蛋白 73 的表达。

结果与结论: 高尔基糖蛋白 73 在因各种终末期良性肝病行肝移植的病肝组织中均有表达且表达水平高于正常肝脏组织。高尔基糖蛋白 73 在自身免疫性肝炎所致肝硬化中的表达水平高于其在乙型肝炎肝硬化中的表达水平, 高尔基糖蛋白 73 在其他各组病肝组织中表达均无差异。提示高尔基糖蛋白 73 在自身免疫性肝炎依赖的非病毒途径中的表达可能高于其在 HBV 病毒途径中的表达。

关键词: 高尔基糖蛋白 73; 肝移植; 良性终末期肝病; 免疫组织化学

缩略语: 高尔基糖蛋白 73: Golgi protein-73, GP73

单珊, 陈虹, 王乐天. 高尔基糖蛋白 73 在各种良性终末期肝病肝组织中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(31): 5833-5836. [http://www.crtcr.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

高尔基糖蛋白 73(Golgi protein-73, GP73)是随着蛋白质组学技术发展而新近发现的糖蛋白, 研究结果显示 GP73 与肝脏病变

有着密切联系。目前, 大量研究集中于 GP73 在肝癌患者血清学中研究上, GP73 在良性肝病中的免疫组化研究报道较少。本实验进一步深入研究 GP73 在各种终末期良性肝病的表达情况并探讨其与肝移植术后患者生存期的关系。

Department of Transplantation, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China

Shan Shan★, Master, Physician, Department of Transplantation, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China 33shanshan007@163.com

Corresponding author: Chen Hong, Doctor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Transplantation, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China ch61520@163.com

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.31.028

Received:2012-01-17 Accepted:2012-05-12

武警警察部队总医院移植科, 北京市 100039

单珊★, 女, 1981年生, 黑龙江省双鸭山市人, 汉族, 2010年贵阳医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事肝移植内科、移植随访工作。33shanshan007@163.com

通讯作者: 陈虹, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 武警警察部队总医院移植科, 北京市 100039 ch61520@163.com

中图分类号:R318 文献标识码:B 文章编号:2095-4344 (2012)31-05833-04

收稿日期:2012-01-17 修回日期:2012-05-12 (20111117009W · C)

1 对象和方法

设计: 单中心抽样, 回顾性病例分析。

时间及地点: 取武警总医院2002-01/2008-12因各种终末期良性肝病行肝移植手术的病肝标本113例。

对象: 乙肝肝硬化20例, 丙肝肝硬化20例, 酒精性肝硬化20例, 慢性重型肝炎20例, 胆汁淤积性肝硬化15例, 自身免疫性肝炎10例, 肝豆状核变性8例。全部乙肝肝硬化及8例重型肝炎患者经血清与组织学证实乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阳性, 所有病例临床资料完整。本组资料中, 男76例, 女37例, 年龄11~66岁(平均年龄46岁)。所有入组受者均签署知情同意书, 本组观察经医院伦理委员会批准均知情同意。

诊断标准: 肝炎、肝硬化诊断参照2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”中病毒性肝炎诊断标准、肝硬化诊断标准^[1]。

纳入标准: ①符合诊断标准的。②行肝移植治疗。

排除标准: ①病毒重叠感染者。②因乙肝、丙肝、酒精肝、慢性重型肝炎、胆汁淤积、自身免疫性肝炎、肝豆状核变性所致的肝硬化外原因所致的肝硬化。③肝癌患者。

方法: 免疫组化二步法脱蜡水化; 高压加热柠檬酸盐抗原修复; 切片浸于体积分数3%双氧水10 min以阻断内源性过氧化物酶; 滴加一抗, 于恒温箱4℃过夜; PBS冲洗, 滴加二抗, 室温下孵育30 min; PBS冲洗, 新配制DAB显色液显色; 自来水冲洗, 苏木精复染; 自来水冲洗, 氨水返蓝; 常规脱水, 干燥, 封固; 用PBS代替第一抗体作为阴性对照。

主要观察指标: 肝细胞中GP73的表达情况。

统计学分析: 应用SPSS 17.0统计软件进行分析, GP73在各肝病间的表达差异采用多个独立样本比较的秩和检验, 以 $P < 0.0024$ 为差异有显著性意义; 等级资料两独立样本比较的秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义; 电话或信访的方式分别对113例患者生存期随访, 生存期以患者接受手术的日期为起点, 以周为单位计算, 至统计日仍存活及失访者为截尾值处理, 采用Cox回归模型进行预后多因素分析并绘制生存曲线, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

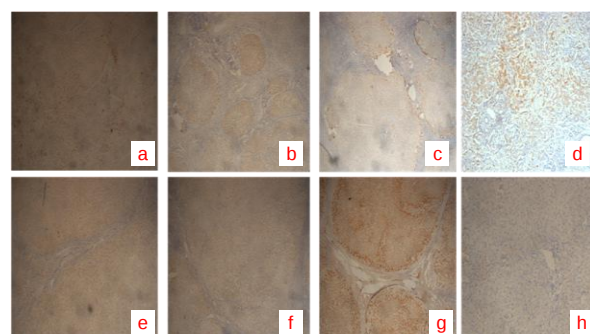
2 结果

2.1 参与者数量分析 纳入患者113例, 按意向性处理

分析, 全部进入结果分析。

2.2 结果观察与判定 染色切片由2名事先未了解患者临床资料的病理医师光镜下观片, 计数阳性细胞, 双盲法统计结果。在20个无重叠的视野中计数GP73阳性细胞数, 每个视野1 mm × 1 mm, 接近400个肝细胞, 肝细胞内有呈棕黄色颗粒即为阳性表达, 与强度和免疫反应的亚细胞结构无关(取两人计数结果的平均值)。20个视野(近8 000个细胞)中所有GP73阳性表达的肝细胞百分比累加之和为GP73计分。

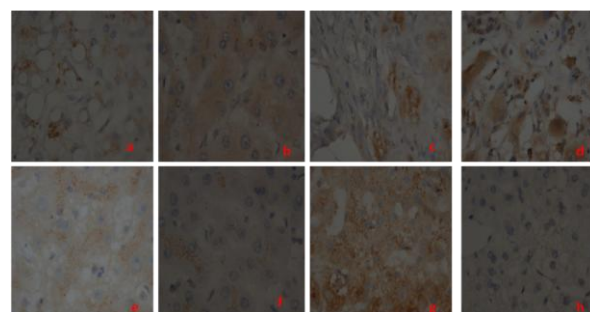
2.3 GP73在各种病肝组织中的表达 GP73在因丙肝肝硬化、酒精性肝硬化、胆汁淤积性肝硬化、乙肝肝硬化及肝豆状核变性、重型肝炎、自身免疫性肝炎所致的肝硬化中表达水平高于正常肝组织, 见图1, 2, 表1。



a: Hepatitis C cirrhosis; b: Alcoholic cirrhosis; c: Cholestatic cirrhosis; d: Hepatitis B cirrhosis; e: Hepatolenticular degeneration caused cirrhosis; f: Severe hepatitis; g: Autoimmune hepatitis caused cirrhosis; h: Normal liver tissue

Figure 1 Expression of Golgi protein-73 in normal liver tissue and other diseased liver tissue (Streptavidin-peroxidase, ×25)

图 1 高尔基糖蛋白 73 在正常肝组织及各种病肝组织中的表达(SP法×25)



a: Hepatitis C cirrhosis; b: Alcoholic cirrhosis; c: Cholestatic cirrhosis; d: Hepatitis B cirrhosis; e: Hepatolenticular degeneration caused cirrhosis; f: Severe hepatitis; g: Autoimmune hepatitis caused cirrhosis; h: Normal liver tissue

Figure 2 Expression of Golgi protein-73 in normal liver tissue and other diseased liver tissue (Streptavidin-peroxidase, ×400)

图 2 高尔基糖蛋白 73 在正常肝组织及各种病肝组织中的表达(SP法×400)

表 1 高尔基糖蛋白 73 在各组肝病组别中的表达情况
Table 1 Expression of Golgi protein-73 in different diseased liver tissue

Liver tissue	n	Positive number (n/%)	$\bar{x} \pm s$
Donor liver	10	2/20	0.30±0.67
Hepatitis C cirrhosis	20	4/20 ^a	1.00±2.05 ^a
Hepatitis B cirrhosis	20	6/30 ^a	15.50±26.25 ^a
Alcoholic cirrhosis	20	9/45 ^a	16.00±20.37 ^a
Severe hepatitis	20	10/50 ^b	24.75±27.36 ^b
Cholestatic cirrhosis	15	13/87 ^a	12.44±19.58 ^a
Autoimmune hepatitis	10	9/90 ^b	35.00±26.35 ^b
Hepatolenticular degeneration	8	7/88 ^a	13.89±18.96 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. donor liver

GP73在自身免疫性肝炎所致肝硬化中的表达水平高于其在乙肝肝硬化中的表达水平, 两者存在显著性差异($P < 0.0024$), GP73在其他各组肝病肝组织中表达差异均无显著性意义($P > 0.0024$)。

3 讨论

GP73是存在于高尔基体的一种Ⅱ型跨膜蛋白,其相对分子质量为 7.3×10^4 , 故称GP73。GP73基因位于第9号染色体, 全长3 042 bp。其氨基端易于N-联糖基化(N-glycanGP73), 主要表达于人类多种组织(前列腺, 肠, 乳腺, 甲状腺和中枢神经系统)的上皮细胞, 在人体正常肝组织中GP73主要由胆管上皮细胞表达, 而肝细胞表达很少甚至不表达, 主要是粗面内质网在蛋白生产中起翻译修饰作用, 协助蛋白通过高尔基体。GP73的分布与高尔基体的分布一致, GP73的表达可能与维持高尔基体结构的完整性相关^[2]。GP73在急性肝病和肝硬化病人的肝细胞表达上调^[3-4], 与肝脏疾病关系密切, 在前列腺癌、小细胞肺癌、肾癌患者体内也异常表达, 可能为重要的功能蛋白^[5-7]。

一项研究GP73在肝脏疾病诊断价值的结果显示其特异度和敏感度分别为74%, 95%, 优于甲胎蛋白和异常凝血酶原^[8], 在比较GP73与其他肝病血清标志物在肝病诊断中的表达的研究显示, GP73在肝病中的阳性率要高于谷丙转氨酶、谷氨酰转肽酶^[9]。大量研究显示GP73可提高肝癌诊断的灵敏度和特异性^[10-11]。

本组应用免疫组化方法检测113例因各种终末期良性肝病行肝移植手术的病肝石蜡标本及10例对照组正常肝组织GP73的表达情况, 结果显示GP73主要定位于各种良性肝病病肝组织肝细胞的细胞浆内, 在正常肝组织细胞浆内表达甚少; 本组同时提示各种终末期良性肝病的病肝组织GP73的表达水平高于正常肝脏组织($P <$

0.05), 提示GP73可能参与肝脏慢性病变过程, 与国外文献相符合。陈文莉等^[12]研究显示血清GP73升高与肝功能相关, GP73联合其他指标检测可提高各种肝病诊断的准确率。

本组发现, GP73在自身免疫性肝炎所致肝硬化中的表达水平高于其在乙肝肝硬化中的表达水平, 两者差异有显著性意义($P < 0.0024$)。自身免疫性肝炎的组织病理学特点为界面性肝炎, 以浆细胞和淋巴细胞浸润为主。对于自身免疫性肝炎的发病机制, 目前尚未阐明。40%~50%的患者发现自身免疫性肝炎时即已存在肝硬化^[13]。有研究显示, GP73的表达水平与自身免疫性肝病的治疗进程呈相关性, 在治疗后GP73的表达可降低, GP73的高表达是可逆的, 但在自身免疫性肝炎的各个阶段, 从纤维间隔形成前的疾病早期至肝硬化期均可出现界面性肝炎(碎屑样坏死), 肝细胞的免疫损害仍在持续存在, 皮质激素的免疫调节仅可使活动性肝硬化得到缓解, 位于窦周Diss间隙的肝星状细胞是肝纤维化时细胞外基质的最主要来源细胞, 而肝星状细胞的活化却是肝纤维化发生的关键^[14]。GP73在激活的星状细胞中过度表达, 提示这种蛋白参与控制肝脏纤维化的起始和进程。在非病毒调节机制中, γ 干扰素和肿瘤坏死因子 α 这两种多向性的细胞因子对GP73起主要调节作用。最后导致大约100个基因开始转录, 从而导致对病毒感染、细胞生长和凋亡调节起重要作用。GP73为高尔基体中的一个固定糖蛋白, 导致乙肝病毒的复制增加, 乙肝病毒的复制又激发了GP73蛋白的表达。GP73在乙肝肝硬化和自身免疫性肝炎所致肝硬化的病肝组织中表达差异可能由GP73在这两种肝病中增高途径不同, 即与自身免疫性肝炎依赖的非病毒途径引起的GP73表达增高要高于HBV病毒途径。

有报道GP73水平在自身免疫性肝炎治疗后下降, 提示在其可逆性表达中必然存在使其在表达机制调点改变的因子, 多向性因子 γ 干扰素和肿瘤坏死因子 α 是否因治疗及疾病进展发生表达方向改变, 在本研究中与其他良性肝病所致的肝硬化行肝移植术的病肝组织中GP73的表达水平相比, 在自身免疫性肝炎所致的肝硬化行肝移植术的病肝组织中, GP73表达水平最高, 本组病例在病程中均经治疗, 是否为在自身免疫性肝炎进展过程中多向性因子 γ 干扰素和肿瘤坏死因子 α 多次发生变化, 是否能据其变化及时阻断向肝炎后肝硬化和原发性肝癌的发展, 为探索治疗提供新的思路, 需进一步探讨自身免疫性肝炎患者机体对自身的肝脏成分产生抗体导致肝硬化的进程中, 肝星状细胞的激活与损伤机

制及 γ 干扰素和肿瘤坏死因子 α 这两种多向性的细胞因子的具体变化方向。如增大样本量多次检测后, GP73在自身免疫性肝炎所致的肝硬化中仍有较高表达水平, 因此, 是否可将GP73作为自身免疫性肝炎致肝硬化继而发生HCC的预警标志物, 还需要进一步研究。

在本组中除GP73在乙肝肝硬化和自身免疫性肝炎所致的肝硬化的病肝组织中表达存在显著性差异外, GP73在其他各组因不同病因所致肝硬化而行肝移植的病肝组织间表达水平差异无显著性意义($P > 0.0024$), 提示在不同的病毒和非病毒调节途径两种机制引起的GP73表达水平升高无明显差异。非病毒调节机制是在慢性肝炎中肝细胞的重塑和纤维化可能是GP73表达的主要触发点, 说明肝脏疾病引起GP73升高是多因素引起的结果。

研究显示, GP73在肝豆状核变性所致的肝硬化中有较高的表达水平, 与国内外文献报道相符, Wright等^[15]比较了由Wilson病导致的肝损害和神经损害两组患者肝组织中GP73的表达情况, 结果显示前者的阳性率(79%)明显高于后者(30%)。GP73在肝豆状核变性肝组织中普遍表达, 并与炎症反应、发育不良和肝纤维化有关。

近年来国内肝移植飞速发展, 全国每年可以完成肝移植的例数超过2 000例, 中国肝移植注册系统统计结果显示中国大陆的10 170例肝移植中, 1, 3, 5年生存率分别达84%, 80%, 76%^[16]。一项来自四川华西医院自1999-02/2003-10间施行肝移植患者统计结果, 长期随访显示良性肝病1、3年生存率为87.46%及80.59%^[17]。但中国开展肝移植的时间较短, 临床肝移植经验及患者生存预后的评估尚在摸索和积累中。本组通过对113例因各种终末期良性肝病行肝移植手术患者的生存期随访, 结合年龄、性别与GP73的表达, 采用Cox回归模型进行预后多因素分析并绘制生存曲线, 结果显示性别、年龄和GP73表达水平均不是患者长期生存的独立影响因素。

GP73在各种终末期良性肝病肝移植的病肝组织中的表达水平可能在病因诊断中无临床意义, 但可以作为判断肝脏损伤程度的标志物; 更好地认识GP73的功能可对肝脏疾病的发展过程乃至治疗提供新思路, 为努力提高肝移植患者的生存率提供有价值的参考依据。由于时间、病例的限制, 今后尚需扩大样本量并联合其他方法进一步探讨GP73的临床应用价值。

4 参考文献

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会 肝病学会, 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝病杂志, 2000, 8: 249-250.
- [2] Wei S, Dunn TA, Isaacs WB, et al. GOLPH2 and MYO6: putative prostate cancer markers localized to the Golgi apparatus. Prostate. 2008;68:1387-1395.
- [3] Kladney RD, Cui X, Bulla GA, et al. Expression of GP73, resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. Hepatology. 2002;35:1431-1440.
- [4] Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, et al. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. Am J Gastroenterol. 2004;99:1087-1095.
- [5] Laxman B, Morris DS, YU J, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. Cancer Res. 2008;68(3):645-649.
- [6] Fritzsche FR, Kristiansen G, Riener MO, et al. GOLPH2 expression may serve as diagnostic marker in seminoma. BMC Urol. 2010;10:4.
- [7] Katada T, Ishiguro H, Kimura M, et al. GP73 contributes to the sensitivity of cisplatin in esophageal cancer. Esophagus. 2009; 6:173-176.
- [8] Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, et al. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2005;41:634-642.
- [9] Gu Y, Chen W, Zhao Y, et al. Quantitative analysis of elevated serum Golgi protein-73 expression in patients with liver diseases. Ann Clin Biochem. 2009;46(Pt 1):38-43.
- [10] Liu SY, Du Z, Shao XH, et al. Guangdong Yixue, 2010 ;31(3) : 309-311.
刘树业, 杜智, 邵新华, 等. 高尔基体蛋白73在肝癌诊断中的意义[J]. 广东医学, 2010,31(3):309-311.
- [11] Li LJ, Li XF, Wang GF. Shijie Xiahua Zazhi. 2009;17(29): 3056-3060.
李利军, 李新丰, 王高峰. GP73联合AFP、VEGF检测对原发性肝癌的诊断价值[J]. 世界消化杂志, 2009, 17(29):3056-3060.
- [12] Chen WL, Peng T, Chen XP, et al. Zhonghua Jianyan Zazhi, 2010, 33(4):333-336.
陈文莉, 彭涛, 陈小苹, 等. 血清GP73检测在肝脏疾病诊断中的临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(4): 333-336.
- [13] Stark GR, Kerr IM, Williams BR, et al. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem. 1998;67:227-234.
- [14] Czaja AJ, Freese DK; American Association for the Study of Liver Disease. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. Hepatology, 2002, 36(2):479-497.
- [15] Wright LM, Huster D, Lutsenko S, et al. Hepatocyte GP73 expression in Wilson disease. J Hepatology. 2009;51: 557-564.
- [16] Zheng SS. Zhonghua Putong Waik Zazhi, 2007,22: 641-642.
郑树森. 肝移植研究进展[J]. 中华普通外科杂志, 2007,22(9): 641-642.
- [17] Yan LN. Zhonghua Gandan Waik Zazhi, 2004,10(9):577-578.
严律南. 努力提高我国肝移植术后长期生存率[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004,10(9):577-578.