

论著 · 临床研究

非酒精性脂肪性肝病儿童血清 TIMP-1 和 TIMP-2 检测及临床意义

李毓雯¹ 朱传龙² 高人焘² 潘家华¹

(安徽医科大学附属省立医院 1. 儿科; 2. 感染病科, 安徽 合肥 230001)

[摘要] 目的 了解非酒精性脂肪性肝病患儿基质金属蛋白酶组织抑制物(TIMP)-1 和 TIMP-2 的水平及价值。方法 根据诊断标准将 105 例肥胖儿童分为单纯性肥胖($n=44$)、单纯性非酒精性脂肪肝(SNAFL, $n=25$) 和非酒精性脂肪肝炎(NASH, $n=36$) 3 组, 采用酶联免疫吸附方法(ELISA)测定血清 TIMP-1、TIMP-2, 全自动酶法测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)和 γ -谷氨酸转氨酶(γ -GT)。结果 随着单纯性肥胖向 SNAFL 和 NASH 发展, TIMP-1 和 γ -GT 水平逐步升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); TIMP-1、TIMP-2 两者均与 γ -GT 水平呈显著正相关($r=0.534, P<0.01; r=0.351, P<0.05$)。NASH 组 TIMP-1 阳性率明显高于 SNAFL 组($P<0.05$), 而 TIMP-2 阳性率两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 血清 TIMP-1 和 TIMP-2 指标均可不同程度地反映肝脏的纤维化程度, 其中以 TIMP-1 更为可靠、有效。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(6):455-458]

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; 基质金属蛋白酶组织抑制物; 儿童
[中图分类号] R725; R446.11 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)06-0455-04

Determination and clinical significance of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in serum of children with nonalcoholic fatty liver disease

LI Yu-Wen, ZHU Chuan-Long, GAO Ren-Tao, PAN Jia-Hua. Department of Pediatrics, Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China (Zhu C-L, Email: zhuchuanlong@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To examine serum tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 levels in children with nonalcoholic fatty liver disease and to investigate possible roles of the two markers. **Methods** One hundred and five obese children were classified into 4 groups: simple obesity ($n=44$), simple nonalcoholic fatty liver (SNAFL, $n=25$), and nonalcoholic steatohepatitis (NASH, $n=36$). Serum TIMP-1 and -2 levels were measured using ELISA. Serum ALT and γ -GT levels were measured with totally automatic enzymatic method. **Results** Serum levels of TIMP-1 and γ -GT increased with the disease development from simple obesity to SNAFL and NASH ($P<0.05$). Both serum TIMP-1 and -2 levels were positively correlated with γ -GT levels ($r=0.534, P<0.01; r=0.351, P<0.05$, respectively). Ninety-seven percent of children in the NASH group had serum TIMP-1 levels over 2 standard deviations of healthy controls ($83.35 \mu\text{g/L}$) compared with 76% in the SNAFL group ($P<0.05$). There were no significant differences in the case proportion with TIMP-2 levels over 2 standard deviations of healthy controls between the NASH and the SNAFL groups. **Conclusions** Both TIMP-1 and -2 may reflect the state of liver fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease, and serum TIMP-1 appears to be more reliable. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(6):455-458]

Key words: Nonalcoholic fatty liver disease; Tissue inhibitor of metalloproteinase; Child

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种临床病理综合征,它的范畴从单纯性脂肪肝到非酒精性脂肪性肝炎、纤维化和终末期肝病。近年来随着生活方式的改变,儿童 NAFLD 发病率有逐年升高的趋势^[1]。肝纤维化是发展成肝硬化和终末期肝病的必经阶段,早期发现肝纤维化,及时阻断疾病进程可以减少肝硬化和终末期肝病的发生。诊断肝纤维化的金标准是肝活检,但因其创伤性很难在肥胖儿童中常规开展。因此,寻找新的肝纤维化指标以早期发现肝纤维化倾向有重要意义。研究表明 TIMPs 在肝纤维化的发生过程中起重要作用,检测血清 TIMP-1 和 TIMP-2 水平可以判断肝纤维化程度^[2-3],

[收稿日期]2009-11-15;[修回日期]2010-01-02
[基金项目]国家自然科学基金(30800973),安徽省科技攻关项目(07010302195)。
[作者简介]李毓雯,女,硕士,医师。
[通信作者]朱传龙,主治医师。

但其在肥胖儿童 NAFLD 的进程中有何临床意义尚不清楚。本研究检测分析了 105 例肥胖儿童血清的 TIMP-1、TIMP-2 以及反映肝功能的 ALT 和 γ -GT 含量,报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

本院 2007 年 6 月至 2009 年 2 月的住院和部分门诊患儿共 105 例,其中男性 78 例,女性 27 例;年龄 8 ~ 15 岁,平均年龄 11.5 ± 3.3 岁;BMI 为 (27.96 ± 3.87) kg/m²。105 例患儿均经各项检查排除了内分泌、遗传代谢疾病及药物引起的继发性肥胖,符合文献中肥胖儿童诊断标准^[4]。

参考非酒精性脂肪性肝病诊疗指南^[5]将 105 例患儿分为以下 3 组:①单纯性肥胖组 44 例:B 超不能诊断弥漫性脂肪肝,肝生物化学检查基本正常;②单纯性非酒精性脂肪肝(SNAFL)组 25 例:B 超诊断弥漫性脂肪肝,肝生物化学检查基本正常;③非酒精性脂肪肝炎(NASH)组 36 例:B 超诊断弥漫性脂肪肝,存在代谢综合征或不明原因性血清 ALT 水平升高持续 4 周以上。NASH 组和 SNAFL 组患儿均无饮酒史,且排除病毒性肝炎、药物性肝病、全胃肠外营养、肝豆状核变性等可导致脂肪肝的特定疾病。正常对照组为 2008 年 1 月至 2008 年 12 月在本院体检的健康儿童 20 例,经常规检查排除心、肝、肾、肺等疾病,其中男性 13 例,女性 7 例;年龄 9 ~ 15 岁,平均 12.3 ± 2.6 岁;BMI 为 17.51 ± 2.01 kg/m²。4 组患儿的性别构成及平均年龄差异均无统计学意义($P > 0.05$)。所有受试者空腹 8 ~ 12 h,晨起抽肘静脉血 2 mL,分离血清,保存于 -80℃ 冰箱待统一检测。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 检测 TIMP-1 和 TIMP-2 操作步骤如下:用包被液为 0.05 M 碳酸盐缓冲液,pH 9.6,将稀释成一定浓度的 TIMP-1 或 TIMP-2 单克隆抗体(McAb)分别滴加在 96 孔聚苯乙烯板微孔内,

100 μ L/孔,4℃ 过夜,次日甩尽包被液,用 0.05% Tween-20 PBS(PBST)洗板 3 次,每次 3 min,拍干后加封闭液(含 15% 小牛血清的 PBS) 200 μ L/孔,37℃ 1 h,4℃ 过夜,次日弃之,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min;将标准品及待测血清(其中待测样品用 PBS 作 1:100 稀释)加于包被孔内,并设阴性对照、空白对照,37℃ 水浴 1 h,PBST 洗板 5 次,拍干后加 HRP2 抗 TIMP-1 或 TIMP-2 二抗 100 μ L/孔,37℃ 30 min,PBST 洗板 5 次,彻底拍干后加入 TMB 显色剂,50 μ L/孔,37℃ 15 min,加 2M H₂SO₄ 50 μ L/孔终止反应;酶标仪 450 nm 处测量吸光度 A 值(OD 值,以空白对照孔调零),通过标准曲线查得待测血清 TIMP-1 和 TIMP-2 含量。自动酶标仪为 Elx800 型(BIO-TEKINSTRUMENTS. INC)。

1.2.2 肝脏 B 超检查 患儿空腹 8 ~ 12 h 后,采用 TOSHIBA 公司 SSA-660A 彩超行肝脏 B 超检查。

1.2.3 ALT 和 γ -GT 测定 采用全自动生化分析仪测定。

1.2.4 统计学处理 所有资料采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,测定值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验及直线相关分析,计数数据采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清检测结果

与对照组相比,单纯性肥胖组 TIMP-1、TIMP-2、ALT 和 γ -GT 差异均无统计学意义;与单纯性肥胖组比较,SNAFL 和 NASH 组儿童 TIMP-1、TIMP-2 和 γ -GT 血清水平均显著升高($P < 0.05$),NASH 组儿童 ALT 水平亦显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 SNAFL 组比较,NASH 组儿童 TIMP-1、ALT 和 γ -GT 血清水平均显著升高($P < 0.05$);随着单纯性肥胖向脂肪肝、脂肪肝炎发展,TIMP-1 和 γ -GT 水平逐步升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组肝纤维化指标的检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TIMP-1 (μ g/L)	TIMP-2 (μ g/L)	ALT (IU/L)	γ -GT (IU/L)
对照组	20	55.3 $\pm$ 14.0	132.1 $\pm$ 18.2	26.9 $\pm$ 5.2	32.2 $\pm$ 17.4
单纯性肥胖组	44	69.3 $\pm$ 17.5	129.7 $\pm$ 39.9	25.2 $\pm$ 11.4	41.2 $\pm$ 15.5
SNAFL 组	25	98.3 $\pm$ 23.6 ^{a,b}	163.7 $\pm$ 28.4 ^{a,b}	28.0 $\pm$ 20.2	72.2 $\pm$ 13.8 ^{a,b}
NASH 组	36	131.3 $\pm$ 49.0 ^{a,b,c}	172.7 $\pm$ 39.8 ^{a,b}	117.0 $\pm$ 34.6 ^{a,b,c}	164.1 $\pm$ 34.2 ^{a,b,c}

a:与对照组比较, $P < 0.05$;b:与单纯性肥胖组比较, $P < 0.05$;c:与 SNAFL 组比较, $P < 0.05$

2.2 相关结果分析

经 Pearson 直线相关分析发现:在所有的非酒精性脂肪性肝病患儿中,TIMP-1、TIMP-2 两者均与 γ -GT 水平呈显著正相关($r = 0.534, P < 0.01; r = 0.351, P < 0.05$),而与 ALT 水平无相关性($r = 0.178, P > 0.05; r = 0.234, P > 0.05$);另外 TIMP-1 与 TIMP-2 呈显著正相关($r = 0.512, P < 0.01$)。

2.3 各组血清 TIMP-1 与 TIMP-2 阳性率的比较

TIMP-1、TIMP-2 分别以健康人 $\bar{x} + 2s$ (即 $83.35 \mu\text{g/L}$ 和 $168.4 \mu\text{g/L}$) 为上限,大于此界限为阳性。SNAFL 组患儿 TIMP-1 阳性率明显高于单纯性肥胖组($\chi^2 = 46.2, P < 0.01$),但低于 NASH 组($\chi^2 = 4.9, P < 0.05$);SNAFL 组 TIMP-2 阳性率明显高于单纯肥胖患者($\chi^2 = 27.4, P < 0.01$),而与 NASH 组相比两者差异无统计学意义($\chi^2 = 3.1, P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组肝纤维化指标阳性率比较 [例(%)]

组别	总例数	TIMP-1 阳性	TIMP-2 阳性
对照组	20	0(0)	0(0)
单纯性肥胖组	44	1(2)	2(5)
SNAFL 组	25	19(76) ^{a,b}	15(60) ^a
NASH 组	36	35(97)	29(81)

a: 与单纯性肥胖组比较, $P < 0.01$; b: 与 NASH 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

NAFLD 是肥胖儿童常见的并发症之一,是造成青少年无症状转氨酶增高的主要原因,肥胖人群中的患病率为 57.5% ~ 74.0%。而且部分 NASH 儿童最终可发展为肝纤维化,甚至肝硬化^[6]。因此,利用现有的实验室指标早期发现 NAFLD 肝纤维化倾向并及时干预非常重要。肝纤维化是一组临床和病理学综合征,是肝脏对慢性损伤的一种修复反应,是慢性肝病共有的病理改变。慢性肝病-肝纤维化-肝硬化这一疾病发展过程已得到公认,肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展的必经之路^[7-8]。一般认为肝纤维化为一动态过程,属可逆性病变。长期以来,肝活检一直被视为评价肝纤维化的黄金方法,但由于此方法是创伤性的,并且有 40% 的患者出现疼痛,0.5% 的患者出现严重并发症^[9],很大程度上限制了临床肝活检的开展。此外临床较常用的透明质酸(HA)、III 型前胶原(PC-III)、IV 型胶原(CIV)及层粘蛋白(LN)HA、PC III、CIV 和 LN 四项血清生化指标,由于病例选择、检测方法、试剂等方面的差异,

在评估血清标志物与坏死炎症活动度和肝纤维化的诊断价值上结果常不一致。加之 HA、PC III、CIV 和 LN 四项指标不仅与纤维化过程有关,而且与肝组织的炎症坏死程度关系密切,给临床上正确评估肝纤维化的程度带来一定的困难。

近年来,随着分子生物学和细胞周期的调控学说的进一步发展,肝纤维化研究已有进一步发展,目前的研究已从细胞外基质(ECM)生成机制转移到重视 ECM 降解的研究,任何原因造成 ECM 形成过多或降解减少,打破 ECM 形成及降解的稳态机制均可导致 ECM 过度沉积,从而导致肝纤维化。在 ECM 降解过程中起主导作用的是基质金属蛋白酶(MMPs),它是一组锌离子依赖酶,它通过降低胶原螺旋结构的稳定性,改变底物的二级结构,为其他蛋白酶作进一步降解创造条件。基质金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs)是一组具有抑制 MMPs 功能的活性多肽,它通过与 MMPs 非共价结合抑制 MMPs 的活性,也可与酶原结合阻止其活化,从而抑制 ECM 的降解,造成 ECM 的过度沉积^[10]。已发现的 4 种 TIMP 仅有 TIMP-1、TIMP-2 存在于肝组织中,且血清与肝组织中 TIMP1、TIMP-2 有明显的相关性^[11-12],因此检测血清 TIMP-1、TIMP-2 可作为诊断肝纤维化的有用指标。

本研究发现单纯性肥胖组与对照组相比,TIMP-1、TIMP-2、ALT 和 γ -GT 水平差异均无统计学意义,随着单纯性肥胖向 SNAFL 和 NASH 发展,TIMP-1 和 γ -GT 水平逐步升高,差异有统计学意义;SNAFL 组和脂肪肝炎组之间血清 TIMP-2 水平差异无统计学意义,但均高于对照组和单纯肥胖组;ALT 水平仅在脂肪肝炎组升高,所以它不能反应肝脏纤维化程度。相关分析结果显示:TIMP-1 与 TIMP-2 之间呈显著正相关,且两者均与 γ -GT 呈显著正相关,其中尤以 TIMP-1 与 γ -GT 相关性更好;TIMP-1 阳性率 NASH 组高于 SNAFL 组,而 TIMP-2 阳性率两组之间差异无统计学意义,因此血清 TIMP-1 作为诊断脂肪肝肝纤维化的血清学指标要优于 TIMP-2。

综上所述,血清 TIMP-1、TIMP-2 尤其是 TIMP-1 在诊断 NAFLD 肝纤维化进展程度上具有较好的可靠性和有效性。目前,在脂肪肝肝纤维化非创伤性诊断方面,还没有任何单一指标能完全正确判定肝纤维化进展状况。若结合两者并通过肝活检比较,有可能发现敏感性和特异性更高的早期诊断肝纤维化的非创伤性指标。

[参 考 文 献]

[1] Loomba R, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2009, 50(4):1282-1293.

[2] Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(2):282-287.

[3] 邵彬, 聂青和. 基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的基础及临床研究现状[J]. 实用肝脏病杂志, 2005, 8(3):182-186.

[4] 季成叶. 中国学生超重肥胖 BMI 筛查标准的应用[J]. 中国学校卫生, 2004, 25(1):125-128.

[5] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病学杂志, 2006, 14(3):161-163.

[6] Pacifico L, Celestre M, Anania C, Paolantonio P, Chiesa C, Laghi A. MRI and ultrasound for hepatic fat quantification; relationships to clinical and metabolic characteristics of pediatric non-alcoholic fatty liver disease[J]. Acta Paediatr, 2007, 96(4):542-547.

[7] 中华医学会传染病学与寄生虫学分会、肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病学杂志, 2005, 13(12):881-891.

[8] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2):209-218.

[9] 滕光菊, 聂青和. 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(6):775-776.

[10] 聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 罗新栋, 罗红, 程勇前. 毒素型及免疫型大鼠肝纤维化肝组织中金属蛋白酶组织抑制因子定位及表达差异[J]. 肝脏, 2005, 10(2):82-85.

[11] Nie QH, Zhang YF, Xie YM, Luo XD, Shao B, Li J, et al. Correlation between TIMP-1 expression and liver fibrosis in two rat liver fibrosis models [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(19):3044-3049.

[12] Murawaki Y, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1[J]. Clin Chim Acta, 1999, 281(1-2):109-120.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

小儿急性呼吸道感染诊治指南系列解读研讨学习班通知

为了更好地系统解读小儿急性呼吸道感染的一系列诊治指南,对该领域热点问题和进展作剖析,推广合理使用抗菌药物的理念,上海交通大学附属儿童医院联合上海市医学会儿科学分会按计划于2010年6月下旬在上海市举办为期4天的小儿急性呼吸道感染诊治热点和进展研讨学习班。本班系国家级继续医学教育项目(项目编号:2010-06-01-030),由陆权教授负责,授课教师均为全国及本院著名专家教授,学习结束授国家级继续医学教育I类学分10分。主要授课内容:结合指南,重点在上下呼吸道感染、临床肺炎、社区获得性肺炎、医院获得性肺炎、呼吸机相关肺炎、难治性肺炎等诊治热点和进展;呼吸道病毒、细菌、非典型微生物、真菌、结核等病原的地位和诊治对策;感染和机体免疫等领域。学习班将对我国儿科现已制定的相关系列指南作系统解读。招生对象:儿科呼吸及感染专业医师,基层医院儿科医师。学费960元。有意参加者请与上海交通大学附属儿童医院科教邱琳、何丽联系。因办班时间适逢2010上海世博会,名额受到控制,欲报名者从速。

联系方式:上海市北京西路1400弄24号上海交通大学附属儿童医院,200040
电话:021-62474880*84083 传真:021-62790494 E-mail: qiulin@sina.com; heoin29@126.com
报名确认后将寄出正式通知。

上海交通大学附属儿童医院
2010年3月18日