

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.12.022
文章编号: 1005-8982 (2020) 12-0119-04

慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平及临床意义

薛立芝¹, 张思泉²

(杭州市西溪医院 1. 检验科, 2. 重症医学科, 浙江 杭州 310023)

摘要: 目的 探讨慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平及临床意义。**方法** 选取 2019 年 1 月—2019 年 12 月在杭州市西溪医院就诊的慢性乙型肝炎患者 120 例作为乙型肝炎组, 选取同期 120 例健康体检者作为对照组。测定谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TBIL)、对数乙型肝炎病毒 (Log HBV)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及 DNMT1 水平。**结果** 乙型肝炎组血清 AST、ALT、TBIL、TNF- α 及 DNMT1 水平高于对照组 ($P < 0.05$)。乙型肝炎患者血清 DNMT1 与 AST、ALT、TBIL 及 TNF- α 呈正相关 ($r = 0.524, 0.573, 0.559$ 和 $0.519, P < 0.05$)。乙型肝炎 E 抗原 (HBeAg) 阳性组 AST、ALT、TBIL、TNF- α 、Log HBV 及 DNMT1 高于 HBeAg 阴性组 ($P < 0.05$)。HBeAg 阳性患者血清 DNMT1 与 AST、ALT、TBIL、TNF- α 及 Log HBV 呈正相关 ($r = 0.602, 0.615, 0.584, 0.565$ 和 $0.631, P < 0.05$)。重度炎症组血清 DNMT1 水平高于轻度炎症组 ($P < 0.05$)。重度纤维化组血清 DNMT1 水平高于轻度纤维化组 ($P < 0.05$)。**结论** 慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平升高, 其水平与肝功能、肝炎症程度和纤维化程度关系密切。

关键词: 肝炎, 乙型; 纤维化; 肝功能试验

中图分类号: R575.1

文献标识码: A

Levels and clinical significance of DNA methyltransferase 1 in serum of patients with chronic hepatitis B

Li-zhi Xue¹, Si-quan Zhang²

(1. Department of Laboratory Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310023, China; 2. Department of Intensive Medicine, Xixi Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310023, China)

Abstract: Objective To investigate the serum DNA methylation transferase 1 (DNMT1) level and its clinical significance in patients with chronic hepatitis B. **Methods** One hundred and twenty patients with chronic hepatitis B admitted to Hangzhou Xixi Hospital from January 2019 to December 2019 were selected as the hepatitis B group, and 120 healthy people who were examined during the same period were used as the control group. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL), log hepatitis B virus (Log HBV), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and DNMT1 were measured. **Results** The serum AST, ALT, TBIL, TNF- α and DNMT1 levels in the hepatitis B group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The serum DNMT1 level of patients with hepatitis B was positively correlated with AST ($r = 0.524$), ALT ($r = 0.573$), TBIL ($r = 0.559$) and TNF- α ($r = 0.519$) ($P < 0.05$). The AST, ALT, TBIL, TNF- α , Log HBV and DNMT1 levels in HBeAg positive group were higher than those in HBeAg negative group ($P < 0.05$). The serum DNMT1 level in HBeAg-positive patients was positively correlated with AST ($r = 0.602$), ALT ($r = 0.615$), TBIL ($r = 0.584$), TNF- α ($r = 0.565$) and Log HBV ($r = 0.631$) ($P < 0.05$). The serum DNMT1 level in the severe inflammation group was higher than that

in the mild inflammation group ($P < 0.05$). The serum DNMT1 level in severe fibrosis group was higher than that in mild fibrosis group ($P < 0.05$). **Conclusions** Chronic hepatitis B patients have elevated serum DNMT1 levels, which are closely related to liver function, liver inflammation and fibrosis.

Keywords: hepatitis B; fibrosis; liver function tests

乙型肝炎病毒感染在世界范围内流行,慢性乙型肝炎患者中有约 1/3 患者最终会发展为肝硬化或肝细胞癌等严重并发症。我国是乙型肝炎病毒感染率比较高的国家之一,我国 $\geq 50\%$ 肝癌是由长期慢性乙型肝炎病毒感染所致。慢性乙型肝炎发病机制复杂,表观遗传学在慢性乙型肝炎的发病中具有重要作用,DNA 甲基化为表观遗传学的重要组成部分,为基因转录表达的调控方式之一;在慢性乙型肝炎发病中存在 DNA 异常甲基化^[1]。DNMT1 为体细胞内最丰富的甲基转移酶之一,其具有维持 DNA 甲基化的作用;DNMT1 异常可导致基因组稳定性下降、原癌基因活性增高、抑癌基因功能丧失,从而在多种疾病及恶性肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[1-2]。

研究发现,原发性肝癌患者肝组织中 DNMT1 表达升高,肝组织中 DNMT1 表达与患者乙型肝炎、肿瘤复发和转移等临床病理特征关系密切^[3]。介于乙型肝炎为肝癌发病的主要原因,DNMT1 在乙型肝炎中的表达及意义值得探讨。本文对慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平及其临床意义进行研究,为临床治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月—2019 年 12 月在杭州市西溪医院就诊的慢性乙型肝炎患者 120 例作为乙型肝炎组,同期 120 例健康体检者作为对照组。乙型肝炎组男性 71 例,女性 49 例;年龄 (46.37 ± 9.61) 岁。对照组男性 68 例,女性 52 例;年龄 (45.93 ± 10.52) 岁。纳入标准:①乙型肝炎组患者有乙型肝炎病史;② >6 个月乙肝表面抗原阳性史;③对照组肝功能、乙肝两对半及乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) DNA 均正常。排除标准:①自身免疫性肝炎、酒精性肝炎、药物性肝炎等其他肝病;②丙型肝炎、丁型肝炎及戊型肝炎等其他类型肝炎;③并发肝癌,严重心、肺、肾等脏器疾病;④恶性肿瘤。本研究通过医院伦理委员会批准所有患者知情同意参与研究。两组年龄、性别比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 肝脏活检 对慢性乙型肝炎患者进行常规肝脏活检,参照 Metavir 评分系统进行肝炎症程度和肝纤维化程度评估:肝炎活动度为 $\leq G2$ 为轻度炎症活动, $G3$ 及 $G4$ 为重度炎症;肝纤维化分期为 $\leq S2$ 期为轻度肝纤维化, $S3$ 期和 $S4$ 期为重度肝纤维化。根据上述评估将慢性乙型肝炎患者分为轻度炎症组 52 例和重度炎症组 68 例;轻度纤维化组 56 例和重度纤维化组 64 例。

1.2.2 各指标测定 谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、对数乙肝病毒 (log hepatitis B virus, Log HBV) 由杭州市西溪医院检验科检验;血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、DNMT1 水平采用 ELISA 法测定 (试剂盒购自美国 Sigma 公司),具体方法:用纯化人 TNF- α 、DNMT1 抗体包被微孔板,往包被微孔中加入 TNF- α 、DNMT1,与辣根过氧化物酶标记的 TNF- α 、DNMT1 抗体结合形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,加入底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色,3,3',5,5'-四甲基联苯胺在辣根过氧化物酶的催化下转为蓝色;在酸的作用下最终转化为黄色,颜色深浅与 TNF- α 、DNMT1 含量呈正相关。采用酶标仪测定 450 nm 波长处光密度值,通过标准曲线计算 TNF- α 、DNMT1 水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用 t 检验;相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组生物化学指标和血清 DNMT1 水平比较

两组血清 AST、ALT、TBIL、TNF- α 和 DNMT1 水平比较,经 t 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),乙型肝炎组高于对照组。见表 1。

2.2 乙型肝炎患者血清 DNMT1 与 AST、ALT、TBIL 及 TNF- α 的相关性分析

乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平与 AST、ALT、

表 1 两组生物化学指标和血清 DNMT1 水平比较 ($n=120, \bar{x} \pm s$)

组别	AST/ (u/L)	ALT/ (u/L)	TBIL/ (μmol/L)	TNF-α/ (nmol/L)	DNMT1/ (μg/L)
对照组	15.12 ± 2.26	16.34 ± 2.64	8.42 ± 1.05	1.12 ± 0.24	24.46 ± 5.74
乙型肝炎组	52.61 ± 2.86	85.31 ± 3.02	20.53 ± 1.22	3.14 ± 0.33	35.71 ± 6.02
<i>t</i> 值	112.665	188.353	82.416	54.229	14.816
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

TBIL 及 TNF-α 呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 乙型肝炎 E 抗原阳性组与阴性组生物化学指标和血清 DNMT1 水平比较

乙型肝炎 E 抗原 (HBeAg) 阳性组与 HBeAg 阴性组 AST、ALT、TBIL、TNF-α、Log HBV 和 DNMT1 比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HBeAg 阳性组高于 HBeAg 阴性组。见表 3。

表 2 乙型肝炎患者血清 AST、ALT、TBIL 及 TNF-α 与 DNMT1 的相关性

指标	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
AST	0.524	0.000
ALT	0.573	0.000
TBIL	0.559	0.000
TNF-α	0.519	0.000

表 3 HBeAg 阳性组与阴性组生物化学指标和血清 DNMT1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AST/ (u/L)	ALT/ (u/L)	TBIL/ (μmol/L)	TNF-α/ (nmol/L)	Log HBV	DNMT1/ (μg/L)
HBeAg 阴性组	71	36.57 ± 2.65	44.12 ± 3.24	19.65 ± 3.71	2.49 ± 0.41	2.77 ± 0.32	31.51 ± 4.32
HBeAg 阳性组	49	65.64 ± 3.07	122.61 ± 3.78	21.03 ± 3.87	3.82 ± 0.47	5.64 ± 0.38	44.19 ± 4.18
<i>t</i> 值		55.341	121.799	2.110	16.447	44.706	16.023
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.037	0.000	0.000	0.000

2.4 HBeAg 阳性患者血清 DNMT1 与 AST、ALT、TBIL、TNF-α 及 Log HBV 的相关性分析

HBeAg 阳性患者血清 DNMT1 水平与 AST、ALT、TBIL、TNF-α 及 Log HBV 呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 HBeAg 阳性患者血清 AST、ALT、TBIL、TNF-α 及 Log HBV 与 DNMT1 的相关性

指标	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
AST	0.602	0.000
ALT	0.615	0.000
TBIL	0.584	0.000
TNF-α	0.565	0.000
Log HBV	0.631	0.000

2.5 不同肝组织炎症程度患者血清 DNMT1 水平比较

轻度炎症组与重度炎症组患者血清 DNMT1 水平分别为 (29.16 ± 3.13)、(40.36 ± 3.21) μg/L, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=19.145, P=0.000$), 重度炎症组高于轻度炎症组。

2.6 不同肝纤维化程度患者血清 DNMT1 水平比较

轻度纤维化组与重度纤维化组患者血清 DNMT1 水平分别为 (31.62 ± 3.27) 和 (39.17 ± 3.38) μg/L, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=12.394, P=0.000$), 重度纤维化组高于轻度纤维化组。

3 讨论

表观遗传指在未改变基因序列的情况下基因表达发生改变, 即细胞内遗传信息外的遗传物质发生了改变, 更重要的是这种遗传物质的改变在细胞的增殖、生长中可以稳定传递给子代^[4]。目前发现的非基因序列变化的表观遗传分子机制有 DNA 甲基化、组蛋白修饰、RNA 干扰及组蛋白乙酰化等^[5]。DNA 甲基化为表观遗传学研究最多的机制之一, 在哺乳动物中 DNA 甲基化主要通过 DNMT1、DNMT3 等进行调节^[6]。

DNA 甲基化为重要的表观遗传学修饰形式之一, 其中 DNMT 为催化 DNA 甲基化的重要调控分子^[7]。DNMT 催化 DNA 甲基化可沉默抑癌基因, 从而促进恶性肿瘤的发生、发展, DNMT1 为 DNMT 的一种类型,

在多种恶性肿瘤中过表达^[8-10]。研究发现, DNMT1 在肝癌中也存在过表达^[11]。乙型肝炎病毒感染为肝癌发病的主要原因, DNMT 在乙型肝炎中的作用也受到关注, 如 LI 等^[11] 研究发现, 肝细胞癌中乙型肝炎病毒感染与 DNMT 表达关系密切, 肝细胞癌组织中乙型肝炎病毒感染可上调 DNMT 表达^[12]。康艳红等^[13] 研究发现, 乙型肝炎病毒 X 蛋白转录激活细胞 DNMT 启动子, 而上调 DNMT 表达。KOSTYUSHEV 等^[14] 研究发现, 慢性乙型肝炎患者 DNMT 过表达。MADEDDU 等^[15] 研究发现, 慢性乙型肝炎患者 DNMT1 对线粒体 DNA 甲基化状态具有调节作用。上述研究均表明 DNMT 参与乙型肝炎的发病过程。

本研究对慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平进行研究, 发现乙型肝炎组血清 DNMT1 水平高于对照组; HBeAg 阳性组 DNMT1 水平高于 HBeAg 阴性组; 慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平与 AST、ALT、TBIL、TNF- α 及 Log HBV 呈正相关, 与肝组织炎症活动程度和肝纤维化程度关系密切。慢性乙型肝炎患者 HBeAg 血清学转化 (即由阳性转化为阴性) 为血清学的转折点, 其转化提示患者慢性乙型肝炎病程发展缓慢、远期预后良好及肝硬化发病率降低, 患者经过治疗后 HBeAg 血清学转化表示抗病毒治疗效果良好。AST、ALT、TBIL 为肝功能的常用指标, 其水平升高表明患者肝功能异常。TNF- α 为常用的炎症指标, 其水平升高表明机体炎症反应程度升高。由此可见, DNMT1 可能参与慢性乙型肝炎的发病过程, 血清 DNMT1 水平在一定程度上可反映患者的肝功能损伤程度、炎症活动程度和纤维化程度、预后及疗效。

综上所述, 慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平升高, 检测血清 DNMT1 水平在患者肝功能损伤、炎症程度、纤维化程度和预后评估中具有一定参考价值。

参 考 文 献:

- [1] LEE H, JEONG H, LEE S Y, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates virus replication via DNA methylation of the C-1619 in covalently closed circular DNA[J]. Mol Cells, 2019, 42(1): 67-78.
- [2] WANG X Z, GU J L, GAO M, et al. Peperomin E induces promoter hypomethylation of metastatic-suppressor genes and attenuates metastasis in poorly differentiated gastric cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(6): 2341-2364.
- [3] 方钦亮, 谢程融, 赵文秀, 等. DNA 甲基化转移酶 1/3b 与肝癌临床病理特征和预后相关性研究 [J]. 中华普通外科学文献 (电子版), 2015, (4): 261-266.
- [4] HU X Q, ZHOU Y, CHEN J, et al. DNA methylation and snps in VCX are correlated with sex differences in the response to chronic hepatitis B[J]. Virol Sin, 2019, 34(5): 489-500.
- [5] 马丽, 杨宇, 郑秀丽. DNA 甲基化在慢性乙型肝炎中的研究进展 [J]. 肝脏, 2018, 23(12): 1135-1137.
- [6] JIN J, XU H, WU R, et al. Aberrant DNA methylation profile of hepatitis B virus infection[J]. J Med Virol, 2019, 91(1): 81-92.
- [7] AGBARIA S, HAIM A, FARES F, et al. Epigenetic modification in 4T1 mouse breast cancer model by artificial light at night and melatonin - the role of DNA-methyltransferase[J]. Chronobiol Int, 2019, 36(5): 629-643.
- [8] SEGOVIA C, SAN JOSÉ-ENÉRIZ E, MUNERA-MARAVILLA E, et al. Inhibition of a G9a/DNMT network triggers immune-mediated bladder cancer regression[J]. Nat Med, 2019, 25(7): 1073-1081.
- [9] POOMIPARK N, FLATLEY J E, HILL M H, et al. Methyl donor status influences dnmt expression and global dna methylation in cervical cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(7): 3213-3222.
- [10] FAN X P, JI X F, LI X Y, et al. Methylation of the glutathione-s-transferase p1 gene promoter is associated with oxidative stress in patients with chronic hepatitis B[J]. Tohoku J Exp Med, 2016, 238(1): 57-64.
- [11] LI H P, YANG F M, GAO B, et al. The association of HBV infection with DNA methyltransferases expression in hepatocellular carcinoma[J]. Acta Virol, 2015, 59(3): 311-313.
- [12] LI H P, YANG F M, GAO B, et al. Hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma tissues upregulates expression of DNA methyltransferases[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3): 4175-4185.
- [13] 康艳红, 杨林, 朱建芸, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白转录激活细胞 DNA 甲基转移酶基因启动子而上调其表达 [J]. 中华传染病杂志, 2016, 34(5): 297-301.
- [14] KOSTYUSHEV D S, ZUEVA A P, BREZGIN S A, et al. Overexpression of DNA-methyltransferases in persistency of cccDNA pool in chronic hepatitis B[J]. Ter Arkh, 2017, 89(11): 21-26.
- [15] MADEDDU G, ORTU S, GARRUCCIU G, et al. DNMT1 modulation in chronic hepatitis B patients and hypothetic influence on mitochondrial DNA methylation status during long-term nucleo(t)side analogs therapy[J]. J Med Virol, 2017, 89(7): 1208-1214.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 薛立芝, 张思泉. 慢性乙型肝炎患者血清 DNMT1 水平及临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(12): 119-122.