

临床研究

血清起始识别复合物蛋白1对HBV相关
肝纤维化进程的诊断价值分析

梁红倩, 黄龙, 任澳丽, 苏明华, 胡伯斌, 黎清梅, 苏土梅, 殷倩冰, 李爱宁, 江建宁

(广西医科大学第一附属医院感染性疾病科 教育部区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室, 南宁 530021)

摘要 目的: 探讨人血清起始识别复合物蛋白1(ORC1)检测对乙型肝炎病毒(HBV)相关肝纤维化程度的诊断价值与意义。方法: 选择2017年11月至2023年10月就诊于广西医科大学第一附属医院感染性疾病科并长期随访的269例HBV患者, 采用瞬时弹性成像系统FibroScan检测患者的肝脏硬度值(LSM), 按LSM值分为无肝纤维化组($n=69$ 例)、轻度肝纤维化组($n=107$ 例)、进展期肝纤维化组($n=43$ 例)和肝硬化组($n=50$ 例)。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中ORC1水平。采用多重线性回归分析影响慢性HBV感染者血清ORC1水平的相关因素, 有序多分类logistic回归分析影响肝纤维化程度的因素, 受试者工作特征(ROC)曲线分析血清ORC1对肝硬化的预测价值。结果: 进展期肝纤维化组血清ORC1水平高于无肝纤维化组, 肝硬化组高于无肝纤维化组和轻度肝纤维化组(均 $P<0.05$), 无肝纤维化组与轻度肝纤维化组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。血清ORC1水平与LSM值呈正相关关系($P<0.05$)。Logistic回归分析结果显示: 年龄增长, 天冬氨酸转氨酶(AST)和血清ORC1水平升高, 均为肝纤维化进展的危险因素($P<0.05$); 血清ORC1诊断肝硬化的ROC曲线下面积为0.644($P<0.05$), 截断值为1 000.46 ng/L, 灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及一致率分别为56.0%、76.3%、35.0%、88.4%、72.5%。结论: 慢性HBV感染者血清ORC1水平与肝纤维化进程相关, 其水平升高增加肝纤维化进展的风险性, 有望成为动态监测和辅助诊断HBV相关肝纤维化进展及肝硬化的潜在血清学标志物之一。

关键词 起始识别复合物蛋白1; 乙型肝炎病毒; 肝纤维化; 肝硬化

中图分类号: R512.62 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)12-1614-05

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.005

Diagnostic value of serum origin recognition complex protein 1 in the progression of HBV-related liver fibrosis

LIANG Hongqian, HUANG Long, REN Aoli, SU Minghua, HU Bobin, LI Qingmei, SU Tumei, YIN Qianbing, LI Aining, JIANG Jianning. (Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High Frequency Tumor, Ministry of Education, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To explore the diagnostic value and significance of human serum origin recognition complex protein 1 (ORC1) in the degree of hepatitis B (HBV)-related liver fibrosis. **Methods:** A total of 269 patients with HBV infection admitted to the Department of Infectious Diseases of the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University from November 2017 to October 2023 were enrolled in the long-term follow-up cohort. The transient elastography system FibroScan was used to detect liver stiffness value (LSM). According to the LSM value, they were divided into non-liver fibrosis group ($n=69$ cases), mild liver fibrosis group ($n=107$ cases), advanced liver fibrosis group ($n=43$ cases) and cirrhosis group ($n=50$ cases). The level of ORC1 in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Multiple linear regression was used to analyze the related factors affecting serum ORC1 level in chronic HBV patients, multi-classification logistic regression was

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81960115; No. 82260124; No. 82160123); 区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室自主课题(No. GKE-ZZ202107); 广西区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室资助项目(No. GKE-ZZ202218)

[通信作者] 江建宁, E-mail: jjianing@163.com

[收稿日期] 2024-06-08

used to analyze the factors affecting the degree of liver fibrosis, and receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive value of serum ORC1 in liver cirrhosis. **Results:** The serum ORC1 level in the advanced liver fibrosis group was higher than that in the non-liver fibrosis group ($P<0.05$). The level of serum ORC1 in the liver cirrhosis group was higher than that in the non-liver fibrosis group and mild liver fibrosis group (all $P<0.05$). There was no significant difference between the non-liver fibrosis group and mild liver fibrosis group ($P>0.05$). The level of serum ORC1 was positively correlated with LSM level ($P<0.05$). The result of logistic regression analysis showed that the increasing age, increased aspartate aminotransferase (AST) and serum ORC1 levels were risk factors for the progression of liver fibrosis ($P<0.05$). The area under the ROC curve of serum ORC1 in the diagnosis of liver cirrhosis was 0.644 ($P<0.05$), the cutoff value was 1,000.46 ng/L and the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and consistency rate were 56.0%, 76.3%, 35.0%, 88.4%, and 72.5%, respectively. **Conclusion:** The level of serum ORC1 in patients with chronic HBV infection is related to the progression of liver fibrosis, and its elevated level increases the risk of progression of liver fibrosis. It is expected to become one of the potential serological markers for monitoring dynamically and diagnosing helpfully of HBV-related progression of liver fibrosis and liver cirrhosis.

Keywords origin recognition complex protein 1; hepatitis B virus; liver fibrosis; liver cirrhosis

据报道,超过70%的肝癌由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)导致^[1],病毒长期破坏肝脏,通常经历慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)一肝硬化一肝癌的演变过程^[2]。因此,早期发现肝纤维化并进行治疗对于预防肝硬化进展及肝癌具有重要意义。常规超声、CT、磁共振成像在早期肝纤维化无特征性发现,对早期诊断意义不大。肝组织活检准确性高但因有创性、重复性低等限制其普遍应用^[3]。血清肝纤维化4项水平升高可反映肝纤维化持续进展,但有研究认为,肝纤维化进展至肝硬化后,血清肝纤维化4项水平升高会减慢或停止,导致肝纤4项水平下降,因此单独以血清肝纤维化4项作为诊断肝纤维化程度可能存在误诊风险^[4],FIB-4和APRI指数结果受到转氨酶水平的影响较大^[5]。瞬时弹性成像系统FibroScan应用广泛,结果相对准确,可联合血清学模型提高肝纤维化诊断效能^[6]。起始识别复合物(origin recognition complex, ORC)蛋白1是形成DNA复制前复合物的关键因子,已有报道提出ORC1过表达与肝癌的发生密切相关^[7]。本课题组前期研究发现,ORC1启动子附近形成HBV S-ORC1整合基因频率较高,为进一步探讨ORC1过表达与HBV相关肝纤维化的发生相关,本研究以FibroScan测出的肝脏硬度测定(liver stiffness measurements, LSM)值为诊断肝纤维化参考标准,探讨血清ORC1是否能反映HBV相关肝纤维化程度以及其诊断肝硬化的潜在功能,为指导临床抗病毒治疗后是否需要进一步抗纤维化治疗提供重

要参考意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2017年11月至2023年10月就诊于广西医科大学第一附属医院感染性疾病科并规律随访的HBV感染队列,征求患者知情同意并为其建立完整的基线相关信息与临床资料数据档案。以《慢性乙型肝炎防治指南(2022年版)》^[8]标准筛选CHB、乙型肝炎肝硬化患者入组。本研究经广西医科大学第一附属医院医学伦理委员会审查批准。病例纳入标准:研究对象均为慢性HBV感染者,其血清HBsAg阳性,丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST) <2 倍正常值上限,总胆红素(TBIL) $<51.2\text{ }\mu\text{mol/L}$;同时检测患者肝脏硬度,结果以LSM表示,单位为kPa。排除标准:(1)合并丙型肝炎、丁型肝炎、艾滋病等其他传染性疾病及恶性肿瘤;(2)合并自身免疫性肝炎、酒精性脂肪肝、药物性肝损伤等其他肝病;(3)有抗肝纤维化治疗史;(4)FibroScan测定肝脏脂肪变受控衰减参数(CAP)值 $>290\text{ dB/m}$,即重度肝脂肪变性;(5)肝衰竭或肝硬化失代偿期者。

将患者分为4组,分组标准参考《肝纤维化诊断及治疗共识(2019年)》^[3],即无肝纤维化组(LSM值 $<6\text{ kPa}$)、轻度肝纤维化组($6\text{ kPa}\leq\text{LSM值}<9\text{ kPa}$)、进展期肝纤维化组($9\text{ kPa}\leq\text{LSM值}<12\text{ kPa}$)、肝硬化组(LSM值 $\geq 12\text{ kPa}$)。

1.2 检测项目 采用Echosens公司(法国)瞬时弹性扫描仪检测患者肝脏硬度。在行FibroScan检查当天抽取患者空腹静脉血3~5 mL,采用雅培全自动生化免疫分析流水线系统(美国)及其配套试剂电化学发光法检测ALT、AST、TBIL等。同时留取患者外周静脉血5 mL,室温下4 000 r/min离心5 min,取上层血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测患者血清ORC1水平。ORC1检测试剂盒购自江莱生物技术(上海)有限公司(生产批号:L04WOR07)。

1.3 统计学方法 采用SPSS 25.0统计学软件对数据资料进行统计分析。服从正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,偏态分布的数据采用中位数(M)和四分位数间距($P_{25} \sim P_{75}$)表示,组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验。计数资料用率或者构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验。影响血清ORC1水平的因素采用多重线性回归分析进行。采用有序多分类logistic回归模型分析患者肝纤维化程度的影响因素。用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评价血清ORC1对肝硬化发生的诊断价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4组患者一般临床资料比较 269例患者中,男199例,女70例,平均年龄(44.63 ± 10.02)岁,其中无肝纤维化组69例,占25.65%;轻度肝纤维化组107例,占39.78%;进展期肝纤维化组43例,占15.99%;肝硬化组50例,占18.59%。

各组间年龄、TBIL、ALT、AST比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。进展期肝纤维化组年龄高于无肝纤维化组、轻度肝纤维化组,肝硬化组年龄高于无肝纤维化组、轻度肝纤维化组(均 $P < 0.05$);肝硬化组TBIL水平高于无肝纤维化组、轻度肝纤维化组(均 $P < 0.05$);进展期肝纤维化组ALT水平高于无肝纤维化组,肝硬化组ALT水平高于无肝纤维化组、轻度肝纤维化组(均 $P < 0.05$);进展期肝纤维化组AST水平高于无肝纤维化组、轻度肝纤维化组,肝硬化组AST水平高于无肝纤维化组、轻度肝纤维化组、进展期肝纤维化组(均 $P < 0.05$),见表1。

2.2 各组患者血清ORC1水平比较 4组患者血清ORC1水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中进展期肝纤维化组($840.49(590.27 \sim 1\,280.05)$ ng/L)血清ORC1水平高于无肝纤维化组($723.13(511.89 \sim 907.26)$ ng/L),肝硬化组($1\,080.25(663.45 \sim 1\,732.57)$ ng/L)血清ORC1水平高于无肝纤维化组、轻度肝纤维化组($812.08(588.97 \sim 1\,028.95)$ ng/L)($P < 0.05$)。

2.3 影响血清ORC1水平的多重线性回归分析
血清ORC1水平与LSM值呈正相关关系($P < 0.001$),见表2。

2.4 影响患者肝纤维化程度的有序多分类logistic回归分析 以4组不同肝纤维化程度为因变量,以血清ORC1水平及可能的影响因素为自变量,进行有序多分类logistic回归分析,结果显示:年龄增长,AST和血清ORC1水平升高,均为肝纤维化进展的危险因素(均 $P < 0.001$),见表3。

表1 4组患者一般临床资料比较

指标	无肝纤维化组($n=69$)	轻度肝纤维化组($n=107$)	进展期肝纤维化组($n=43$)	肝硬化组($n=50$)	F/χ^2	P
年龄/岁, $\bar{x} \pm s$	41.10±9.33 ^b	43.83±9.75 ^{bc}	47.33±9.09	48.90±10.37 ^a	7.679	<0.05
性别(男/女), n	46/23	79/28	34/9	40/10	3.438	>0.05
TBIL/(μ mol/L), $\bar{x} \pm s$	16.51±7.09 ^c	16.82±6.74 ^c	18.98±7.03	21.38±10.97	4.991	<0.05
ALT/(U/L), $\bar{x} \pm s$	23.49±11.86 ^b	24.47±10.92 ^c	28.26±12.04	30.88±11.52 ^a	5.314	<0.05
AST/(U/L), $\bar{x} \pm s$	28.09±6.77 ^b	28.94±6.97 ^{bc}	33.07±8.36 ^c	39.04±12.17 ^a	21.231	<0.05

与无肝纤维化组比较,^a $P < 0.05$;与进展期肝纤维化组比较,^b $P < 0.05$;与肝硬化组比较,^c $P < 0.05$ 。

表2 影响慢性HBV感染者血清ORC1水平的多重线性回归分析结果

影响因素	β	SE	标准化系数	t	P	95% CI
常量	701.560	65.937		10.640	<0.001	571.737~831.382
LSM	26.173	6.305	0.246	4.151	<0.001	13.760~38.586

表3 患者肝纤维化程度影响因素有序多分类logistic回归分析结果

因素	β	SE	Wald	P	OR	OR的95% CI
年龄	0.045	0.012 4	12.964	<0.001	1.046	1.021~1.071
性别	0.335	0.288 4	1.351	0.245	1.398	0.795~2.461
TBIL	0.017	0.016 8	0.984	0.321	1.017	0.984~1.051
ALT	0.003	0.013 2	0.064	0.800	1.003	0.978~1.030
AST	0.089	0.018 0	24.598	<0.001	1.093	1.055~1.132
ORC1	0.001	0.000 2	30.411	<0.001	1.001	1.001~1.002

2.5 血清ORC1诊断HBV相关肝硬化的ROC曲线分析结果 以LSM值 ≥ 12 kPa的患者为肝硬化组,LSM值 < 12 kPa的患者为非肝硬化组,ROC曲线分析显示,血清ORC1判断肝硬化的曲线下面积(AUC)为0.644($P<0.05$),截断值为1 000.46 ng/L,灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和一致性分别为56.0%、76.3%、35.0%、88.4%、72.5%,见图1。

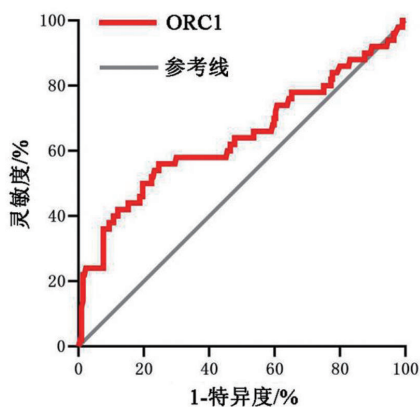


图1 血清ORC1诊断HBV相关肝硬化效能的ROC曲线

3 讨论

病毒性肝炎引起慢性炎症,大量非可溶性细胞外基质弥漫性过度沉积与异常分布的修复反应^[3],导致肝纤维化进展。本研究中,各组间年龄、ALT、AST、TBIL存在差异可能与CHB疾病进展、肝纤维化进展有关。CHB—肝硬化—肝癌的演化过程还与HBV基因组整合^[9-10]、表观遗传机制、HBV编码蛋白的作用等有关。

本课题组前期的基因测序结果显示,ORC1启动子附近形成HBV S-ORC1整合基因频率较高,并进行免疫组化和ELISA实验,发现HBV相关肝炎、肝硬化、肝癌各组组织和血清中ORC1的表达水平

上升趋势一致,故推测HBV感染者可能发生HBV S-ORC1基因整合,促进ORC1的表达,导致血清ORC1水平升高;同时,发现HBV S基因与外纺锤体极样蛋白1基因(extra spindle poles-like 1 protein, ESPL1)整合频率升高,本课题组已验证HBV S-ESPL1整合基因高表达与CHB进展到肝癌密切相关^[11-13],推测HBV S-ORC1整合后与HBV S-ESPL1整合基因协同导致细胞增殖失控、功能异常,仍需进一步探讨与验证。

ORC1具有ATP酶活性,启动真核细胞的DNA复制,推动细胞周期由G0期进入G1期,并向S期转化。ORC1过表达可促进细胞增殖,并诱导细胞周期停滞于G2期,干扰细胞正常分裂与增殖,导致细胞功能异常,还能影响细胞迁移、侵袭、凋亡信号通路,抑制细胞凋亡,与肿瘤的发生密切相关^[14-17]。ORC1还是中心粒和中心体再复制的直接调节因子,参与有丝分裂中纺锤体的形成^[18]。有研究指出,ORC1是血管平滑肌细胞增殖或增生信号与细胞周期之间信号转导的重要调节因子^[19],具体机制未明。而ORC1与肝纤维化、肝硬化相关研究鲜有报道。FibroScan技术具有方便快捷、无创、重复性高等优势,本研究以LSM值为诊断肝纤维化程度的参考标准,进一步探讨不同肝纤维化进程中血清ORC1水平的差异,结果提示血清ORC1随着肝纤维化的进展,其水平总体呈现上升的趋势,与前期实验结果一致,且血清ORC1诊断肝硬化的AUC为0.644,具有潜在的诊断价值。因此推测,ORC1与HBV相关肝纤维化、肝硬化的进展密切相关。ORC1过表达可能与肝纤维化进展过程中的血管增殖、肝细胞结节性再生等病理性修复反应和细胞有丝分裂的异常有关,肝细胞更新速度加快和突变积累可促进肝纤维化、肝硬化进展,导致LSM值升高。同时,肝纤维化程度随着年龄增长、血清ORC1水平升高而进展,AST统计学有差异可能与患者存在炎症或其他原因导致AST轻微升高有关。另外,血清ORC1水平不受年龄、性别、ALT、AST、TBIL等因素的影响,独立参与肝纤维化进展的过程。

综上所述,血清ORC1水平在一定程度上能反映出HBV相关肝纤维化进展的程度,有望成为动态观察和辅助诊断肝纤维化程度、判断肝硬化、评估疗效的潜在血清学标志物之一,指导临床抗病毒治

疗的同时及早启动抗纤维化治疗,对延缓肝纤维化进展、预防肝癌具有重要意义。今后,将扩大样本量并结合肝穿刺活检结果,深入细胞学、分子机制等方面进一步探讨和验证 ORC1 与肝纤维化的相关机制。

参考文献:

- [1] 姜林,张依娜,付君.多项肿瘤标志物联合应用对肝癌的诊断价值[J].癌症进展,2018,16(2):199-201, 238.
- [2] DUBERG A S, LYBECK C, FÄLT A, et al. Chronic hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma by age and country of origin in people living in Sweden: A national register study[J]. Hepatology Communications, 2022, 6(9): 2418-2430.
- [3] 陆伦根,尤红,谢渭芬,等.肝纤维化诊断及治疗共识(2019年)[J].实用肝脏病杂志,2019,22(6):793-803.
- [4] 宋晨,朱庆焰,陈婷.血清肝纤四项与肝功能联合检测评估慢性乙型肝炎肝纤维化程度的价值[J].中国医学创新,2023,20(15):132-137.
- [5] 安红杰,耿华,葛志胜,等.瞬时弹性成像技术在慢性乙型肝炎肝纤维化诊断及预后评估中的价值[J].中华医院感染学杂志,2020,30(22):3443-3447.
- [6] 侯海生,王秋艳,陈少川.血清学指标和瞬时弹性成像技术联合诊断慢性乙型肝炎肝纤维化和预测肝硬化食管静脉曲张程度的价值[J].肝脏,2019,24(4):432-435.
- [7] WANG X K, WANG Q Q, HUANG J L, et al. Novel candidate biomarkers of origin recognition complex 1, 5 and 6 for survival surveillance in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Journal of cancer, 2020, 11(7): 1869-1882.
- [8] 尤红,王福生,李太生,等.慢性乙型肝炎防治指南(2022年版)[J].实用肝脏病杂志,2023,26(3):457-478.
- [9] AN P, XU J, YU Y, et al. Host and viral genetic variation in HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. Frontiers in genetics 2018, 9:261.
- [10] ZHAO L H, LIU X, YAN H X, et al. Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma[J]. Nature communications, 2016, 7:12992.
- [11] HU B, HUANG W, WANG R, et al. High rate of detection of human ESPL1-HBV S fusion gene in patients with HBV-related liver cancer: a chinese case-control study [J]. Anticancer research, 2020, 40(1): 245-252.
- [12] 邓德丽.评估血清 ESPL1 对 HBV 相关肝细胞癌的诊断及预测复发的价值[D].南宁:广西医科大学,2021.
- [13] 胡伯斌,王荣明,梁衡恺,等.ESPL1 基因在肝细胞癌组织中的表达及其在预后评估中的作用[J].肝脏,2023,28(3):285-289.
- [14] 恽朝晖,王晓蓉,徐进.真核生物 DNA 复制起始识别复合物的功能[J].生命的化学,2020,40(11):1962-1970.
- [15] BURGERS P M J, KUNKEL T A. Eukaryotic DNA replication fork[J]. Annual review of biochemistry, 2017, 86: 417-438.
- [16] COULOMBE P, NASSAR J, PEIFFER I, et al. The ORC ubiquitin ligase OBI1 promotes DNA replication origin firing[J]. Nature communications, 2019, 10(1):2426.
- [17] XIONG W, XIE C, QIU Y, et al. Origin recognition complex subunit 1 regulates cell growth and metastasis in glioma by altering activation of ERK and JNK signaling pathway[J]. Molecular and cellular probes, 2020, 49: 101496.
- [18] HEMERLY A S, PRASANTH S G, SIDDIQUI K, et al. Orc1 controls centriole and centrosome copy number in human cells[J]. Science, 2009, 323(5915): 789-793.
- [19] 江宏宏,舒茂琴,覃跃龙,等.起始识别复合物 1 对血管平滑肌细胞增殖活性的影响[J].医学研究生学报,2011,24(2):131-134.

本文引用格式:

梁红倩,黄龙,任澳丽,等.血清起始识别复合物蛋白 1 对 HBV 相关肝纤维化进程的诊断价值分析[J].广西医科大学学报,2024,41(12):1614-1618.DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.005

LIANG H Q, HUANG L, REN A L, et al. Diagnostic value of serum origin recognition complex protein 1 in the progression of HBV-related liver fibrosis[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024, 41(12): 1614-1618. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.005