

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.11.002

· 论 著 ·

## 慢性重型乙型肝炎患者血清 Slit2 蛋白的临床意义

周扬梅, 李 宁, 黄 燕, 范学工

(中南大学湘雅医院 病毒性肝炎湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410008)

**[摘要]** **目的** 探讨慢性重型乙型肝炎患者血清中 Slit2 蛋白水平, 以及其与患者肝脏损伤程度、预后的关系。**方法** 将某院感染病科 2014 年 2—7 月住院及门诊收治的病毒性肝炎慢性乙型(慢性肝炎组)患者、病毒性肝炎慢性重型乙型(慢性重型肝炎组)患者纳入研究, 健康志愿者为正常对照组, 慢性重型肝炎组患者根据病情恢复情况再细分为恢复组和未恢复组, 比较血清中 Slit2 蛋白、凝血酶原活动度(PTA)、总胆红素(TBIL)、谷丙转氨酶(ALT)水平, 并进行相关性分析。**结果** 共纳入慢性乙型肝炎患者 157 例(其中慢性肝炎组 93 例、慢性重型肝炎组 64 例)和健康志愿者 10 例(健康对照组), 3 组之间 Slit2 蛋白水平比较, 差异有统计学意义( $F = 5.596, P = 0.004$ ), 慢性肝炎组和慢性重型肝炎组患者血清中 Slit2 蛋白分别为  $(4.90 \pm 1.07) \text{ ng/mL}$ 、 $(3.09 \pm 1.00) \text{ ng/mL}$ , 均高于健康对照组 [ $(2.10 \pm 0.60) \text{ ng/mL}$ ] (均  $P < 0.05$ ); 慢性重型肝炎组患者血清 Slit2 蛋白水平低于慢性肝炎组 ( $P < 0.05$ )。慢性重型肝炎未恢复组患者血清 Slit2 蛋白水平为  $(1.88 \pm 0.67) \text{ ng/mL}$ , 低于慢性重型肝炎恢复组 [ $(2.96 \pm 1.32) \text{ ng/mL}$ ], 差异有统计学意义 ( $t = 2.319, P = 0.032$ )。慢性乙型肝炎患者血清 Slit2 蛋白水平与 PTA 呈正相关 ( $r = 0.33, P < 0.05$ ); 与 TBIL 水平、ALT 水平呈负相关 ( $r$  值分别为  $-0.46, -0.32$ , 均  $P < 0.05$ )。**结论** 血清 Slit2 蛋白水平是反映慢性重型肝炎患者预后的重要指标, 低水平 Slit2 预示着预后不佳。

**[关键词]** 肝炎, 乙型, 慢性; 肝炎病毒; 肝功能; Slit2 蛋白**[中图分类号]** R512.6<sup>+</sup>2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)11-0726-04

## Clinical significance of serum Slit2 protein in patients with chronic severe hepatitis B

ZHOU Yang-mei, LI Ning, HUANG Yan, FAN Xue-gong (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate serum Slit2 protein level in patients with chronic severe hepatitis B, and the relation with extent of liver damage and prognosis of patients. **Methods** In February-July 2014, patients with chronic hepatitis B(chronic hepatitis group) and chronic severe hepatitis B(chronic severe hepatitis group) in an infectious department were observed, healthy volunteers were as control group, and patients in chronic severe hepatitis group were subdivided into recovery subgroup and non-recovery subgroup based on whether patients had recovered. Serum Slit2 protein, prothrombin activity(PTA), total bilirubin(TBIL), and alanine transaminase(ALT) levels were detected and compared. **Results** A total of 157 patients (chronic hepatitis group,  $n = 93$ ; chronic severe hepatitis group,  $n = 64$ ) and 10 healthy volunteers were included in the study. Slit2 protein levels were significantly different among three groups ( $F = 5.596, P = 0.004$ ), serum Slit2 protein levels in chronic hepatitis group and chronic severe hepatitis group were  $(4.90 \pm 1.07) \text{ ng/mL}$  and  $(3.09 \pm 1.00) \text{ ng/mL}$  respectively, both were higher than  $(2.10 \pm 0.60) \text{ ng/mL}$  in healthy control group (both  $P < 0.05$ ); serum Slit2 protein level in chronic severe hepatitis group was significantly lower than chronic hepatitis group ( $P < 0.05$ ). Serum Slit2 protein level in non-recovery subgroup of chronic severe hepatitis group was significantly lower than recovery subgroup [ $1.88 \pm 0.67 \text{ ng/mL}$  vs  $2.96 \pm$

**[收稿日期]** 2015-04-12**[基金项目]** 国家国际科技合作专项(s2015ZR1028); 湖南省国际科技合作计划项目(2012WK2001)**[作者简介]** 周扬梅(1989-), 女(汉族), 湖南省衡阳市人, 博士研究生, 主要从事感染病学研究。**[通信作者]** 范学工 E-mail: xgfan@hotmail.com

1.32]ng/mL,  $t = 2.319, P = 0.032$ ). Serum Slit2 protein level in patients with chronic hepatitis B was positively correlated with PTA level ( $r = 0.33, P < 0.05$ ), but negatively correlated with serum TBIL level ( $r = -0.46, P < 0.05$ ) and ALT level ( $r = -0.32, P < 0.05$ ). **Conclusion** Serum Slit2 protein level is an important index which can reflect the prognosis of patients with chronic severe hepatitis, low serum Slit2 level suggests the poor clinical prognosis.

**[Key words]** chronic hepatitis B; hepatitis B virus; liver function; Slit protein

[Chin Infect Control, 2015, 14(11): 726 - 729]

Slit2 蛋白是一种分泌性糖蛋白,是 Slit 蛋白家族成员之一,最早在果蝇中枢神经系统中发现。Slit2 蛋白具有重要的生物学功能:诱导神经元轴突跨越中线、诱导血管内皮细胞迁移、抑制炎症、促进肿瘤血管新生等。许多实质细胞可以合成和分泌 Slit2 蛋白,组织器官发生炎症损伤时 Slit2 蛋白水平较正常状态时有明显改变。本研究拟通过检测慢性乙型肝炎患者的 Slit2 蛋白水平,探索 Slit2 蛋白对该病的临床意义。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 纳入对象为中南大学湘雅医院感染病科 2014 年 2—7 月住院及门诊收治的病毒性肝炎慢性乙型(慢性肝炎组)患者、病毒性肝炎慢性重型乙型(慢性重型肝炎组)患者。诊断标准参考 2000 年 9 月中华医学会传染病和寄生虫病学分会、肝病学分会西安会议标准<sup>[1]</sup>。另纳入健康志愿者为正常对照组。排除标准:急性乙型肝炎病毒(HBV)感染,其他病因所致的肝病,合并有严重感染、全身炎症反应综合征、恶性肿瘤、终末期肾病、近期接受过免疫调节治疗、血浆置换治疗的患者。

**1.2 分组标准** 依据西安会议标准<sup>[1]</sup>,根据患者的肝功能、凝血功能、是否出现肝性脑病、腹腔积液、自发性腹膜炎、肾综合征、肝肺综合征、消化道出血等并发症将入组患者分为慢性肝炎组、慢性重型肝炎组。慢性重型肝炎组患者继续治疗及追踪 1 个月,根据临床转归情况分为恢复组和未恢复组。恢复组:患者的临床症状,如乏力,纳差,腹胀,黄疸,凝血功能,腹腔积液,肝性脑病,肠道功能紊乱等症状有明显改善,根据 2001 年国际人工肝会议标准<sup>[2]</sup>,实验室指标表现为总胆红素下降 1/3~1/2 或凝血酶原活动度上升至 60% 以上,则认为临床好转;未恢复组:患者临床症状和实验室指标无明显好转,或出现恶化,或在治疗过程中患者死亡。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本采集** 清晨空腹状态下分别抽取患者、

健康志愿者 10 mL 静脉血置于血清管,室温下静置 30~60 min,1 500 r/min 室温下离心 10 min,提取上清液, -20℃ 冰箱保存。

**1.3.2 Slit2 蛋白检测** 使用武汉华美生物工程有 限公司生产的人 Slit2 蛋白检测 Elisa 试剂盒检测人血清中 Slit2 蛋白含量。

**1.3.3 肝炎相关指标检测** 采用 DIRUI-CS400b 全自动生化仪检测谷丙转氨酶(ALT)和总胆红素(TBIL),Destiny max 全自动凝血分析仪检测凝血酶原时间(PT),并计算凝血酶原活动度(PTA)。

**1.4 统计分析** 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差表示,采用方差分析 LSD 法比较 3 组之间 Slit2 水平的差异,独立样本  $t$  检验比较重型肝炎组与普通肝炎组之间 PTA、TBIL 的差异, $\chi^2$  检验进行构成比比较;Spearman 相关分析 Slit2 蛋白水平与重型肝炎预后指标 ALT、TBIL、PTA 的关系。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般资料** 共纳入慢性乙型肝炎患者 157 例,其中慢性肝炎组 93 例(包括慢性肝炎轻度 57 例、中度 19 例和重度 17 例),慢性重型肝炎组 64 例;男性 126 例,女性 31 例,年龄 25~45 岁。对照组纳入 10 例健康者(男性 8 例,女性 2 例)。3 组实验对象性别构成比较,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.068, P = 0.967$ )。见表 1。

表 1 3 组实验对象性别构成(例)

Table 1 Constitute of genders of three groups (No. of subjects)

组别	男性	女性	合计
慢性肝炎组	74	19	93
慢性重型肝炎组	52	12	64
健康对照组	8	2	10
合计	134	33	167

**2.2 血清 Slit2 蛋白及肝炎相关指标水平** 慢性肝炎组、慢性重型肝炎组、健康对照组 3 组之间 Slit2

蛋白水平比较,差异有统计学意义( $P = 0.004$ ),慢性肝炎组和慢性重型肝炎组患者血清中 Slit2 蛋白分别为( $4.90 \pm 1.07$ ) ng/mL、( $3.09 \pm 1.00$ ) ng/mL,均高于健康对照组[( $2.10 \pm 0.60$ ) ng/mL](均  $P < 0.05$ );慢性重型肝炎组患者血清 Slit2 蛋白水平低于慢性肝炎组( $P < 0.05$ )。慢性重型肝炎组患者血清 PTA 水平[( $39.11 \pm 16.06$ )%]  
低于慢性肝炎组[( $86.61 \pm 21.33$ )%]( $P < 0.001$ ),而 TBIL 水平[( $383.13 \pm 152.13$ )  $\mu$ mol/L]和 ALT 水平[( $388.37 \pm 155.31$ ) U/L]均高于慢性肝炎组[分别为( $44.09 \pm 42.40$ )  $\mu$ mol/L、( $189.70 \pm 98.33$ ) U/L](均  $P < 0.001$ )。见表 2。

**表 2** 慢性肝炎组和慢性重型肝炎组 Slit2 蛋白及肝炎相关指标水平

**Table 2** Levels of Slit2 protein, PTA, TBIL, and ALT in chronic hepatitis group and chronic severe hepatitis group

组别	Slit2 蛋白 (ng/mL)	PTA (%)	TBIL ( $\mu$ mol/L)	ALT (U/L)
慢性肝炎组	$4.90 \pm 1.07$	$86.61 \pm 21.33$	$44.09 \pm 42.40$	$189.70 \pm 98.33$
慢性重型肝炎组	$3.09 \pm 1.00$	$39.11 \pm 16.06$	$383.13 \pm 152.13$	$388.37 \pm 155.31$
健康对照组	$2.10 \pm 0.60$	-	-	-
F/t	5.596	8.372	-5.439	-3.038
P	0.004	<0.001	<0.001	0.003

**2.3 不同预后慢性重型肝炎患者血清 Slit2 蛋白及肝炎相关指标水平** 64 例慢性重型肝炎患者继续治疗及追踪 1 个月,能获得追踪结果的共 21 例,其中 11 例患者恢复(恢复期组),10 例患者未恢复(未恢复组)。未恢复组患者血清 Slit2 水平为( $1.88 \pm 0.67$ ) ng/mL,低于慢性重型肝炎恢复组[( $2.96 \pm 1.32$ ) ng/mL],差异有统计学意义( $P = 0.032$ )。恢复组 PTA 水平高于未恢复组( $P = 0.039$ ),而 TBIL 水平低于未恢复组( $P < 0.001$ ),ALT 在两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。

**表 3** 不同预后慢性重型肝炎患者 Slit2 蛋白及肝炎相关指标水平

**Table 3** Levels of Slit2 protein, PTA, TBIL, and ALT in patients with chronic severe hepatitis of different prognosis

组别	Slit2 蛋白 (ng/mL)	PTA (%)	TBIL ( $\mu$ mol/L)	ALT (U/L)
恢复组	$2.96 \pm 1.32$	$64.65 \pm 33.73$	$206.44 \pm 88.65$	$64.65 \pm 33.73$
未恢复组	$1.88 \pm 0.67$	$40.43 \pm 16.13$	$431.00 \pm 96.82$	$101.09 \pm 116.97$
t	2.319	2.213	-5.560	1.756
P	0.032	0.039	0.000	0.334

**2.4 慢性乙型肝炎患者血清 Slit2 蛋白水平与常规预后指标的关系** 慢性乙型肝炎患者血清 Slit2 蛋白水平与 PTA 呈正相关( $r = 0.33, P < 0.05$ );与 TBIL 水平、ALT 水平呈负相关( $r$  值分别为  $-0.46, -0.32$ ,均  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

1984 年首次于果蝇胚胎发现 Slit 蛋白<sup>[3]</sup>。1988 年 Rothberg 等发现果蝇的中枢神经系统中线处胶质细胞可合成 Slit 蛋白,Slit 蛋白缺乏可导致纵行传导通路和交叉(联合)神经元轴突在中线的聚集异常<sup>[4]</sup>。在黑色素瘤细胞系 A357 中肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白介素  $-1\beta$  可以上调 Slit2 蛋白的表达<sup>[5]</sup>,后续研究<sup>[5-7]</sup>发现 Slit 蛋白与其受体 Robo 在肿瘤、血管新生与血管形成、炎症等中发挥重要作用。Slit2 蛋白作为 Slit 家族主要成员,其主要生理学意义为促进钙粘蛋白黏附于血管内皮细胞,抑制 VEGF 诱导的内皮细胞迁移、成管,增强血管的稳定性<sup>[6]</sup>,减少因炎症细胞因子所致的血管渗漏<sup>[8]</sup>;间接抑制细胞趋化因子诱导的白细胞趋化,减少局部炎症<sup>[7]</sup>。Slit2 蛋白被认为在炎症的发生、发展中起重要的保护作用。研究<sup>[9]</sup>表明,外源性给予肾损伤模型大鼠 Slit2 蛋白,其症状及组织学病理上较未给予 Slit2 蛋白的模型大鼠均有好转。研究<sup>[10]</sup>发现,在许多感染性疾病动物模型如禽流感、肺炎等动物模型中血清 Slit2 蛋白水平与疾病的预后相关。但其在病毒性肝炎中的临床意义鲜有报道。

HBV 感染所致重型肝炎肝脏功能严重恶化,出现黄疸、肝性脑病、凝血功能障碍等临床表现,病情凶险,病死率高。慢性重型乙型肝炎患者多原有慢性乙型肝炎或隐匿性 HBV 感染病史,由于劳累、饮酒、药物、不规范抗病毒治疗、合并其他病毒感染、HBV 变异等诱因,患者体内免疫平衡机制被打破,病毒复制活跃,造成大量肝细胞坏死,肝脏功能急剧恶化,出现一系列并发症,如脑水肿、肝性脑病、肝肾综合征、肝肺综合征。慢性重型乙型肝炎作为炎症相关性疾病,患者的免疫功能被过度激活,产生炎症因子并释放入外周血<sup>[11]</sup>。作为炎症相关因子 Slit2 蛋白在重型肝炎发病过程中是否起到作用,是否与预后相关,目前尚未有相关报道。

本研究结果显示,慢性肝炎组及慢性重型肝炎组患者血清 Slit2 蛋白水平均高于健康对照组,慢性重型肝炎患者血清 Slit2 蛋白水平低于慢性肝炎组;

慢性重型肝炎恢复组患者血清中 Slit2 蛋白水平高于未恢复组,提示血清 Slit2 蛋白水平与慢性乙型肝炎有密切关系,这一结果与 Doi 等<sup>[12]</sup>在 NO 诱导的肺纤维化形成研究中 Slit2 表达水平上调的结果是一致的。研究<sup>[13-14]</sup>发现,发生肝炎时各种炎症细胞因子合成分泌增多,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等,而 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  可以上调 Slit2 的表达。由此推测,慢性乙型肝炎患者血清 Slit2 蛋白浓度高于健康人群的原因可能为肝炎发生时,体内细胞因子风暴促进 Slit2 蛋白的表达;而重型肝炎患者肝脏功能损伤程度严重,机体合成和分泌 Slit2 蛋白的能力降低,同时在抑制炎症时更多的 Slit2 蛋白被消耗,因此慢性重型肝炎组患者的血清 Slit2 蛋白浓度较慢性肝炎组明显下降。慢性重型肝炎恢复组患者随着病情好转,机体合成和分泌功能开始恢复,组织细胞合成 Slit2 蛋白的能力增强,同时抑制炎症所消耗的 Slit2 蛋白的量减少;而未恢复组患者由于肝脏损伤严重,机体合成和分泌功能降低,同时患者需要消耗更多的 Slit2 蛋白以抑制炎症,因此,使得慢性重型肝炎恢复组患者血清 Slit2 蛋白浓度高于未恢复组。

PTA、TBIL 和 ALT 是目前公认的判定乙型肝炎患者病情严重程度和预后的常规指标。我们的研究发现慢性重型肝炎组患者 Slit2 蛋白浓度与 PTA、TBIL 和 ALT 相关,提示人外周血中 Slit2 蛋白浓度与肝炎患者病情严重程度密切相关,在一定程度上可以反映肝炎患者预后情况。因此作者认为,对慢性重型肝炎患者而言,Slit2 蛋白水平是一个新的判断肝脏损害严重程度并高度警示预后的指标。

鉴于 Slit2 蛋白在不同病情及预后的乙型肝炎患者的血清中存在差异,及与 PTA、TBIL、ALT 之间的相关性,Slit2 蛋白在重型肝炎的发生发展中可能起着重要作用,而这也正是该研究下一步所要探索的。

#### [参考文献]

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 肝脏, 2000, 5(4): 257-262.
- [2] 李兰娟, 黄建荣, 杨芊. 2001 年国际人工肝学术会议纪要[J].

中华肝病杂志, 2001, 9(6): 383-384.

- [3] Nusslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*[J]. Roux's Arch Dev Biol, 1984, 193(5): 267-282.
- [4] Rothberg JM, Hartley DA, Walther Z, et al. Slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system[J]. Cell, 1988, 55(6): 1047-1059.
- [5] Wang B, Xiao Y, Ding BB, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity[J]. Cancer Cell, 2003, 4(1): 19-29.
- [6] Suchting S, Heal P, Tahtis K, et al. Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration[J]. FASEB J, 2005, 19(1): 121-123.
- [7] London NR, Li DY. Robo4-dependent Slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm[J]. Curr Opin Hematol, 2011, 18(3): 186-190.
- [8] Prasad A, Qamri Z, Wu J, et al. Slit-2/Robo-1 modulates the CXCL12/CXCR4-induced chemotaxis of T cells[J]. J Leukoc Biol, 2007, 82(3): 465-476.
- [9] Kanellis J, Garcia GE, Li P, et al. Modulation of inflammation by Slit protein in vivo in experimental crescentic glomerulonephritis[J]. Am J Pathol, 2004, 165(1): 341-352.
- [10] Ye BQ, Geng ZH, Ma L, et al. Slit2 regulates attractive eosinophil and repulsive neutrophil chemotaxis through differential srGAP1 expression during lung inflammation [J]. J Immunol, 2010, 185(10): 6294-6305.
- [11] Schuurhuis DH, Ioan-Facsinay A, Nagelkerken B, et al. Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo[J]. J Immunol, 2002, 168(5): 2240-2246.
- [12] Doi T, Hajduk P, Puri P. Upregulation of Slit-2 and Slit-3 gene expressions in the nitrofen-induced hypoplastic lung[J]. J Pediatr Surg, 2009, 44(11): 2092-2095.
- [13] Liu LM, Zhang JX, Luo J, et al. A role of cell apoptosis in lipopolysaccharide (LPS)-induced nonlethal liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized rats[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(5): 1316-1324.
- [14] Nowak M, Gaines GC, Rosenberg J, et al. LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 278(5): R1202-R1209.

(本文编辑:周鹏程)