

## · 临床论著 ·

## 肝组织内性甾体激素受体与慢性乙型肝炎肝组织病理状态的相关性

王荣芋<sup>1</sup> 张小楠<sup>2</sup> 张占卿<sup>1</sup> 陆伟<sup>1</sup> 沈芳<sup>3</sup> 冯艳玲<sup>4</sup>

**【摘要】目的** 探讨肝组织内性雄激素受体(AR) mRNA和雌激素受体- $\alpha$ (ER $\alpha$ ) mRNA表达水平对慢性乙型肝炎(CHB)肝组织病理学状态的影响。**方法** 收集135例CHB患者,其中HBeAg阳性患者80例,HBeAg阴性患者55例。肝组织内AR mRNA和ER $\alpha$  mRNA采用反转录定量PCR检测。**结果** HBeAg阳性患者的平均年龄在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均具有统计学意义( $P$ 均 $< 0.01$ );肝组织内平均AR mRNA和ER $\alpha$  mRNA含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.01$ )。HBeAg阴性患者的平均年龄在肝组织不同炎症分级之间的差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ ),在不同纤维化分期之间的差异具有统计学意义( $P$ 均 $< 0.01$ );肝组织内平均AR mRNA和ER $\alpha$  mRNA含量在不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。根据有序Logistic回归分析结果,HBeAg阳性患者,只有肝组织内AR mRNA含量有预测肝组织炎症分级和纤维化分期的意义( $P$ 均 $< 0.01$ );HBeAg阴性患者,仅肝组织内AR mRNA含量有预测肝组织炎症分期的意义( $P$ 均 $< 0.01$ )。**结论** 肝组织内AR mRNA含量是影响CHB肝组织病理学状态的一个独立因素。

**【关键词】** 雄激素受体; 雌激素受体- $\alpha$ ; 肝炎, 乙型, 慢性; 病理学; 炎症分级; 纤维化分期

**Correlation of androgen receptor and estrogen receptor- $\alpha$  with pathological status in liver tissue in patients with chronic hepatitis B** WANG Rongyu<sup>1</sup>, ZHANG Xiaonan<sup>2</sup>, ZHANG Zhanqing<sup>1</sup>, LU Wei<sup>1</sup>, SHEN Fang<sup>3</sup>, FENG Yanling<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>The Division II of Hepatitis Department, <sup>2</sup>Scientific Research Center, <sup>3</sup>Department of Medical Laboratory, <sup>4</sup>Department of Pathology, Shanghai Public Health Clinical Center of Fudan University, Shanghai 201508, China

Corresponding author: ZHANG Zhanqing, Email: doctorzzqsphe@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the influences of androgen receptor (AR) and estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) on pathological status in liver tissue in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Total of 135 patients with CHB were enrolled, among which, 80 patients and 55 patients were HBeAg-positive and HBeAg-negative, respectively. AR mRNA and ER $\alpha$  mRNA were assayed by reverse quantitative PCR. **Results** In HBeAg-positive patients, there were significant differences of the mean ages among different inflammatory grading and fibrotic staging in liver tissue ( $P$  all  $< 0.01$ ); there were significant differences in both the mean AR mRNA and ER $\alpha$  mRNA levels in liver tissue among different inflammatory grading and fibrotic staging in liver tissue ( $P$  all  $< 0.01$ ). In HBeAg-negative patients, there were no significant differences in the mean ages among different inflammatory grading ( $P > 0.05$ ), and there were significant differences in the mean ages among different fibrotic staging in liver tissue ( $P$  all  $< 0.01$ ); there were significant differences in both the mean AR mRNA and ER $\alpha$  mRNA levels among different inflammatory grading and fibrotic staging in liver tissue ( $P$  all  $< 0.05$ ). According to the ordinal Logistic regression analyses, only AR mRNA level in liver tissue had significance for predicting inflammatory grading and fibrotic staging in liver tissue in HBeAg-positive patients ( $P$  all  $< 0.01$ ), and only AR mRNA level in liver tissue had significance for predicting inflammatory grading in patients with HBeAg-negative ( $P$  all  $< 0.01$ ). **Conclusion** AR in liver tissue is an independent factor of influencing pathological status in liver tissue in patients with chronic hepatitis B.

**【Key words】** Androgen receptor; Estrogen receptor- $\alpha$ ; Chronic hepatitis B; Pathology; Inflammatory grading; Fibrotic staging

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.01.006

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划生物和医药领域重大/重点项目(No. 2006AA02A411); 上海市卫生和计划生育委员会重点科研项目(No. 20134032)

作者单位: 201508 上海, 上海市公共卫生临床中心肝炎二科<sup>1</sup>、科研中心<sup>2</sup>、检验科<sup>3</sup>、病理科<sup>4</sup>

通讯作者: 张占卿, Email: doctorzzqsphe@163.com

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)肝组织病理状态是机体针对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的免疫应答效度的集中体现,在一定程度上能够反映机体免疫应答效度与HBV复制及其抗原表达水平之间的动态平衡。体外实验、动物实验和临床研究指出,性甾体激素分泌及其受体表达水平和基因多态性对HBV复制及其蛋白表达水平和机体免疫应答效能均有重要影响<sup>[1-3]</sup>。本文根据135例CHB患者肝组织内雄激素受体(androgen receptor, AR) mRNA和雌激素受体- $\alpha$ (estrogen receptor- $\alpha$ , ER $\alpha$ ) mRNA测定的结果,参照肝组织病理学诊断,探讨肝组织内性甾体激素受体表达水平对CHB发病和进展的影响。

## 资料与方法

### 一、研究对象

未接受过干扰素类和核苷(酸)类药物治疗的CHB患者135例,均系2011年10月至2012年9月上海市公共卫生临床中心住院患者,其中男性89例,女性46例,男:女=1.93:1;年龄14~72岁,平均年龄为(38.01 $\pm$ 12.12)岁。诊断均符合2010年中华医学会肝病学分会、感染病学分会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》中的标准。合并妊娠、其他病毒性肝炎、药物性肝病、遗传性肝病、自身免疫性肝病、血吸虫性肝病以及肾脏疾病、内分泌与代谢疾病、血液系统疾病的患者被排除。所有患者均无肝脏失代偿的临床表现和实验室依据,并且近3个月内无输血或血制品史。135例患者中,HBeAg阳性和阴性患者分别为80例和55例,平均年龄分别为(34.26 $\pm$ 10.76)岁和(43.45 $\pm$ 12.00)岁,两者比较差异具有统计学意义( $t=4.651$ ,  $P=0.000$ )。

### 二、肝组织病理学诊断

肝组织活检采用1 s经皮肝穿刺法,标本( $\geq 1.0$  cm)采集后置入塑料标本管内,立即冰冻送检。肝组织标本置塑料包埋盒中,中性甲醛固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸入和包埋、切片,苏木素-伊红染色和网状纤维染色。肝组织标本的质量评价和病理学诊断由1名资深病理学医师独立

完成。肝组织病理学诊断参照2000年西安全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的标准。炎症分级(grading, G)包括G0、G1、G2、G3和G4五级,纤维化分期(staging, S)包括S0、S1、S2、S3和S4五期。

### 三、肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$ mRNA 测定

1. 肝组织标本采集、保存和总RNA提取:肝组织标本( $\geq 0.2$  cm)采集后置入预存RNA later的塑料标本管内,  $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。标本置入1.5 ml EP管中,加入Triol试剂500  $\mu\text{l}$ ,充分匀浆,室温放置2 min;加入氯仿100  $\mu\text{l}$ ,震荡15 s,室温放置2~3 min,  $4^{\circ}\text{C}$  13 000 r/min离心15 min(离心半径 $r=11$  cm);取上层水相置入放有1  $\mu\text{l}$ 糖原的1.5 ml EP管中;弃上层水相,加入异丙醇100  $\mu\text{l}$ ,混匀,过夜沉淀,  $4^{\circ}\text{C}$  13 000 r/min离心10 min;弃上层水相,加入85%预冷乙醇(用DEPC水配)500  $\mu\text{l}$ ,混匀,洗涤,  $4^{\circ}\text{C}$  13 000 r/min离心5 min;弃上层水相,留沉淀,空气干燥5 min,待沉淀变透明后溶于20  $\mu\text{l}$  DEPC水。获得的总RNA使用Nanodrop核酸定量仪进行定量。

2. 肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 测定: (1) 引物设计:从美国生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的GenBank中获得AR(NM\_001011645.1)和ER $\alpha$ (NM\_001122742.1)基因。应用Primer 5.0设计AR和ER $\alpha$ 引物,设计的引物均跨一个内含子,目的基因长度分别为103 nt和95 nt。AR和ER $\alpha$ 引物及内参基因(GAPDH、UBC、HPRT1和HMBS)引物均由英潍捷基贸易有限公司合成,详见表1。

(2) 反转录PCR:反应体系为10  $\mu\text{l}$ ,内含RNA模板120 ng,混合引物[随机引物+Oligo(dT) Primer] 0.5  $\mu\text{l}$ ,  $5\times$  RT缓冲液2  $\mu\text{l}$ (反应缓冲液+ $\text{MgCl}_2$ +dNTPs),反转录酶混合物(Revers TraAce反转录酶+RNA酶抑制剂) 0.5  $\mu\text{l}$ 。反应条件为 $37^{\circ}\text{C}$ 反转录15 min,  $98^{\circ}\text{C}$ 酶失活5 min。

(3) PCR:反应体系为20  $\mu\text{l}$ ,内含cDNA模板1  $\mu\text{l}$ ,上游引物(20  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.8  $\mu\text{l}$ ,下游引物(20  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.8  $\mu\text{l}$ ,SYBR qPCR混合物(SYBR Green I、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $r\text{Taq}$ 聚合酶、dNTPs、抗-DNA聚合酶抗

表1 AR 和 ER $\alpha$  及内参基因引物

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
AR	GCCTTGCTCTCTAGCCTCAA	GGTCGTCCACGTGTAAGTTG
ER $\alpha$	GCATAAGAAGACAGTCTCTGAGTGAT	GTCCCGGAGAATGTGAAGAG
GAPDH	TGCACCACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
UBC	CCTGGTGCTCCGTCTTAGAG	TTTCCCAGCAAAGATCAACC
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGC	GGTCCTTTTCACCAAGCAAGCT
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC

体的2 × 预混液) 10 μl, 50 × Rox 0.4 μl。反应条件 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s; 延伸: 60 °C延伸60 s。共40个循环。

(4) 结果分析: 肝组织内AR mRNA和ERα mRNA含量采用CNRQ (calibrated normalized relative quantity) 表示, CNRQ计算采用qBASEplus软件。

四、统计学处理

统计学分析采用SPSS 16.0软件。肝组织内AR mRNA和ERα mRNA含量对数转换前后的正态性检验采用单样本K-S检验。肝组织内AR mRNA和ERα mRNA含量在HBeAg阳性与阴性患者之间、在男性和女性患者之间的差异比较采用两独立样本的t检验。肝组织内AR mRNA和ERα mRNA含量与年龄之间的相关性采用Pearson线性相关分析。肝组织内AR mRNA和ERα mRNA含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异比较采用单因素方差分析。性别和年龄、肝组织内AR mRNA和ERα mRNA含量预测肝组织炎症分级和纤维化分期的有效性采用有序Logistic回归分析, 连接函数选择Logit, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

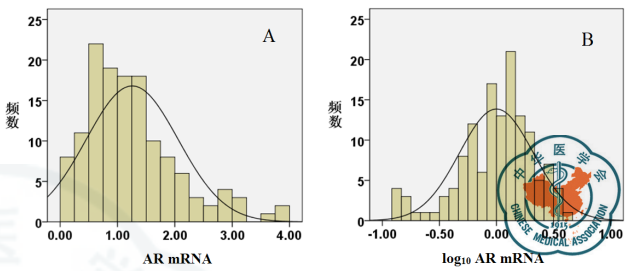
结 果

一、肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量的正态分布转换

对数转换前, 肝组织内 AR mRNA 含量呈正态分布 ( $Z = 1.352$ ,  $P = 0.052$ ), ERα mRNA 含量呈

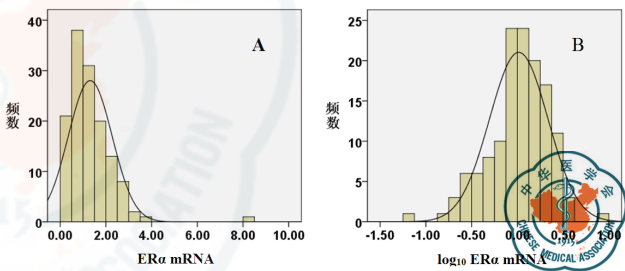
非正态分布 ( $Z = 1.376$ ,  $P = 0.045$ )。对数转换后, 肝组织内  $\log_{10}$  AR mRNA 和  $\log_{10}$  ERα mRNA 含量均呈正态分布 ( $Z = 1.164$ ,  $P = 0.133$  和  $Z = 1.074$ ,  $P = 0.199$ ), 见图 1 ~ 2。

二、性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量在 HBeAg 阳性与阴性患者之间的差异性比例在 HBeAg 阳性与阴性患者之间差异



注: A: 对数转换前, B: 对数转换后

图 1 肝组织内 AR mRNA 含量在对数转换前后的频数分布



注: A: 对数转换前, B: 对数转换后

图 2 肝组织内 ERα mRNA 含量在对数转换前后的频数分布

表 2 性别和年龄在 HBeAg 阳性与阴性患者之间的差异比较

HBeAg 状态	例数	性别 [例 (%)]		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )
		男性	女性	
阳性	80	55 (68.75)	25 (31.25)	34.26 ± 10.76
阴性	55	34 (61.82)	21 (38.18)	43.45 ± 12.00
统计量		$\chi^2 = 0.697$		$t = 4.651$
P		0.404		0.000

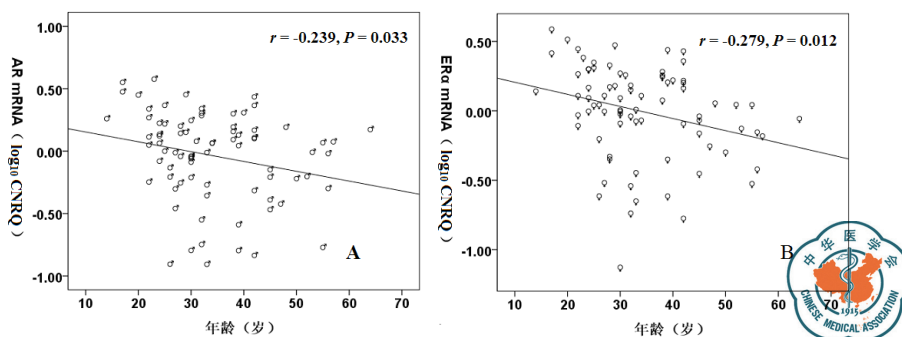
表 3 肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量在 HBeAg 阳性与阴性患者间的比较 ( $\log_{10}$ CNRQ,  $\bar{x} \pm s$ )

HBeAg 状态	例数	AR mRNA	ERα mRNA
阳性	80	-0.038 ± 0.354	-0.006 ± 0.336
阴性	55	0.054 ± 0.267	0.045 ± 0.295
t		1.713	0.897
P		0.089	0.371

表 4 肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量在男性与女性患者间的比较 ( $\log_{10}$ CNRQ,  $\bar{x} \pm s$ )

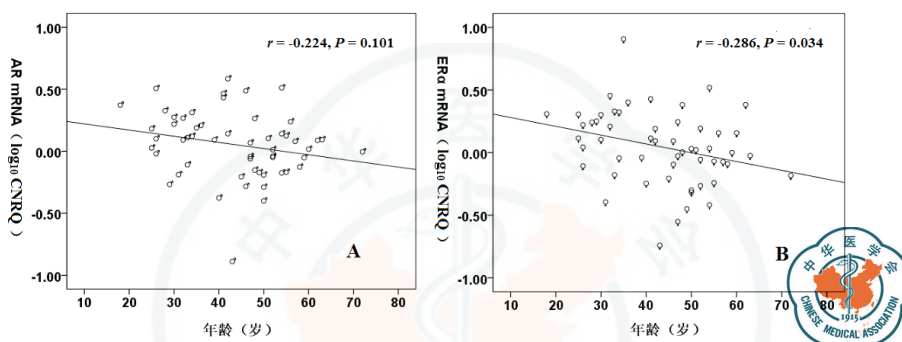
组别	例数	AR mRNA	ERα mRNA
HBeAg 阳性			
男性	55	-0.082 ± 0.355	-0.059 ± 0.321
女性	25	0.058 ± 0.340	0.111 ± 0.347
t		1.657	2.137
P		0.102	0.036
HBeAg 阴性			
男性	34	0.003 ± 0.276	-0.048 ± 0.306
女性	21	0.135 ± 0.236	0.194 ± 0.206
t		1.815	3.196
P		0.075	0.002





注: A: ERα mRNA 含量与年龄之间的相关性; B: ERα mRNA 含量与年龄之间的相关性

图3 HBeAg 阳性患者肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量与年龄之间的相关性



注: A: ERα mRNA 含量与年龄的相关性; B: ERα mRNA 含量与年龄的相关性

图4 HBeAg 阴性患者肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量与年龄的相关性

无统计学意义 ( $P = 0.404$ ); 平均年龄在 HBeAg 阳性与阴性患者之间的差异有统计学意义 ( $P = 0.000$ ), HBeAg 阳性患者的平均年龄显著低

于 HBeAg 阴性患者, 见表 2。肝组织内平均 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量在 HBeAg 阳性与阴性患者差异均无统计学意义 ( $P = 0.089$  和  $P = 0.371$ ),

表5 性别和年龄在肝组织不同炎症分级和纤维化分期间的比较

组别	例数	性别 [例 (%)]		年龄 ( $\bar{x} \pm s$ )
		男性	女性	
HBeAg 阳性				
分级				
1	33	20 (60.61)	13 (39.39)	32.52 ± 10.92 <sup>a</sup>
2	16	11 (68.75)	5 (31.25)	28.69 ± 7.02 <sup>b</sup>
3	31	24 (77.42)	7 (22.58)	39.00 ± 10.49 <sup>ab</sup>
统计量		$\chi^2 = 2.103$		$F = 6.342$
P		0.349		0.003
分期				
1	25	13 (52.00)	12 (48.00)	33.44 ± 9.00 <sup>c</sup>
2	19	12 (63.16)	7 (36.84)	28.47 ± 11.45 <sup>d</sup>
3	11	9 (81.82)	2 (18.18)	30.55 ± 8.94 <sup>e</sup>
4	25	21 (84.00)	4 (16.00)	41.12 ± 9.28 <sup>de</sup>
统计量		—		$F = 7.004$
P		0.077		0.000
HBeAg 阴性				
分级				
1	26	15 (57.69)	11 (42.31)	40.77 ± 11.84
2	16	10 (62.50)	6 (37.50)	42.44 ± 11.38
3	13	9 (69.23)	4 (30.77)	50.08 ± 11.40
统计量		—		$F = 2.872$
P		0.882		0.066
分期				
1	17	7 (41.18)	10 (58.82)	36.82 ± 10.67 <sup>fg</sup>
2	15	10 (66.67)	5 (33.33)	47.00 ± 12.60 <sup>f</sup>
3	9	6 (66.67)	3 (33.33)	40.44 ± 8.96
4	14	11 (78.57)	3 (21.43)	49.64 ± 10.89 <sup>g</sup>
统计量		—		$F = 4.241$
P		0.191		0.009

注: “—” 为精确检验, 无具体统计量值; <sup>a</sup> $P = 0.012$ , <sup>b</sup> $P = 0.001$ , <sup>c</sup> $P = 0.007$ , <sup>d</sup> $P = 0.000$ , <sup>e</sup> $P = 0.004$ , <sup>f</sup> $P = 0.012$ , <sup>g</sup> $P = 0.002$

见表3。

三、肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量在男性与女性患者间差异和与年龄的相关性

HBeAg 阳性患者, 肝组织内 AR mRNA 含量在男性与女性患者间差异无统计学意义 ( $P = 0.102$ ), ER $\alpha$  mRNA 含量在男性与女性患者间差异具有统计学意义 ( $P = 0.036$ ); 肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量与年龄均呈显著负相关关系 ( $r = -0.239$ 、 $P = 0.033$  和  $r = -0.279$ 、 $P = 0.012$ )。HBeAg 阴性患者, 肝组织内 AR mRNA 含量在男性与女性患者间差异无统计学意义 ( $P = 0.075$ ), ER $\alpha$  mRNA 含量在男性与女性患者间差异具有统计学意义 ( $P = 0.002$ ); 肝组织内 AR

mRNA 与年龄间无显著相关性 ( $r = -0.224$ 、 $P = 0.101$ ), ER $\alpha$  mRNA 含量与年龄之间呈显著负相关关系 ( $r = -0.286$ 、 $P = 0.034$ ), 见表4和图3~4。

四、性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期间的差异

HBeAg 阳性患者, 性别比例在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均无统计学意义 ( $P = 0.349$  和  $P = 0.077$ ); 平均年龄在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均有统计学意义 ( $P = 0.003$  和  $P = 0.000$ )。HBeAg 阴性患者, 性别比例在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均无统计学意义 ( $P = 0.882$  和  $P = 0.191$ ); 平均

表6 肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期间的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	AR mRNA ( $\log_{10}$ CNRQ)	ER $\alpha$ mRNA ( $\log_{10}$ CNRQ)
HBeAg 阳性			
分级			
1	33	0.194 $\pm$ 0.189 <sup>a</sup>	0.168 $\pm$ 0.191 <sup>c</sup>
2	16	0.027 $\pm$ 0.246 <sup>b</sup>	0.111 $\pm$ 0.290 <sup>d</sup>
3	31	-0.319 $\pm$ 0.346 <sup>ab</sup>	-0.250 $\pm$ 0.339 <sup>cd</sup>
<i>F</i>		29.345	20.115
<i>P</i>		0.000	0.000
分期			
1	25	0.190 $\pm$ 0.184 <sup>e</sup>	0.170 $\pm$ 0.200 <sup>g</sup>
2	19	0.092 $\pm$ 0.220 <sup>f</sup>	0.117 $\pm$ 0.198 <sup>h</sup>
3	11	-0.166 $\pm$ 0.367	-0.133 $\pm$ 0.469
4	25	-0.308 $\pm$ 0.369 <sup>ef</sup>	-0.218 $\pm$ 0.336 <sup>gh</sup>
<i>F</i>		14.557	9.074
<i>P</i>		0.000	0.000
HBeAg 阴性			
分级			
1	26	0.193 $\pm$ 0.226 <sup>ij</sup>	0.154 $\pm$ 0.244 <sup>k</sup>
2	16	-0.024 $\pm$ 0.188 <sup>i</sup>	-0.005 $\pm$ 0.277
3	13	-0.129 $\pm$ 0.290 <sup>j</sup>	-0.113 $\pm$ 0.339 <sup>k</sup>
<i>F</i>		9.588	4.325
<i>P</i>		0.000	0.018
分期			
1	17	0.212 $\pm$ 0.199 <sup>lm</sup>	0.190 $\pm$ 0.249 <sup>n</sup>
2	15	0.057 $\pm$ 0.241	0.068 $\pm$ 0.260 <sup>o</sup>
3	9	-0.004 $\pm$ 0.260 <sup>l</sup>	0.025 $\pm$ 0.258
4	14	-0.104 $\pm$ 0.285 <sup>m</sup>	-0.144 $\pm$ 0.323 <sup>no</sup>
<i>F</i>		4.479	3.861
<i>P</i>		0.007	0.015

注: <sup>a</sup> $P = 0.000$ , <sup>b</sup> $P = 0.001$ , <sup>c</sup> $P = 0.000$ , <sup>d</sup> $P = 0.002$ , <sup>e</sup> $P = 0.000$ , <sup>f</sup> $P = 0.000$ , <sup>g</sup> $P = 0.000$ , <sup>h</sup> $P = 0.001$ , <sup>i</sup> $P = 0.005$ , <sup>j</sup> $P = 0.000$ , <sup>k</sup> $P = 0.007$ , <sup>l</sup> $P = 0.037$ , <sup>m</sup> $P = 0.001$ , <sup>n</sup> $P = 0.001$ , <sup>o</sup> $P = 0.042$

表7 HBeAg 阳性患者性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量预测肝组织炎症分级和纤维化分期的参数估计

因变量	组间阈值	<i>P</i>	95%CI	自变量	回归系数	<i>P</i>	95%CI
[G = 1]	0.329	0.719	-1.462~2.121	年龄 (岁)	0.028	0.250	-0.019~0.075
[G = 2]	1.678	0.073	-0.158~3.513	AR mRNA ( $\log_{10}$ CNRQ)	-6.432	0.000	-9.916~-2.949
				ER $\alpha$ mRNA ( $\log_{10}$ CNRQ)	1.121	0.500	-2.140~4.382
				性别 = 女	-0.298	0.597	-1.404~0.808
因变量	组间阈值	<i>P</i>	95%CI	自变量	回归系数	<i>P</i>	95%CI
[S = 1]	-0.163	0.842	-1.763~1.437	年龄 (岁)	0.034	0.113	-0.008~0.077
[S = 2]	1.279	0.124	-0.349~2.906	AR mRNA ( $\log_{10}$ CNRQ)	-5.342	0.000	-8.262~-2.423
[S = 3]	2.219	0.010	0.541~3.897	ER $\alpha$ mRNA ( $\log_{10}$ CNRQ)	1.863	0.188	-0.909~4.634
				性别 = 女	-1.036	0.041	-2.028~-0.044

注: 设回归模型预测 HBeAg 阳性患者病理学分级 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、G<sub>3</sub> 的概率分别为  $P_{G1}$ 、 $P_{G2}$ 、 $P_{G3}$ , 则  $P_{G1} = e^{0.329 + X} / (1 + e^{0.329 + X})$ ,  $P_{G1} + P_{G2} = e^{1.678 + X} / (1 + e^{1.678 + X})$ ,  $P_{G3} = 1 - (P_{G1} + P_{G2})$ ;  $X = 6.432 \times \text{AR mRNA } (\log_{10} \text{ CNRQ})$

年龄在肝组织不同炎症分级之间的差异无统计学意义 ( $P = 0.066$ )，在不同纤维化分期之间的差异有统计学意义 ( $P = 0.009$ )，见表 5。

HBeAg 阳性患者，肝组织内平均 AR mRNA 含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均有统计学意义 ( $P = 0.003$  和  $P = 0.000$ )，平均 ERα mRNA 含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均具有统计学意义 ( $P = 0.003$  和  $P = 0.000$ )。HBeAg 阴性患者，肝组织内平均 AR mRNA 含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期差异均有统计学意义 ( $P = 0.000$  和  $P = 0.007$ )，平均 ERα mRNA 含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期差异均具有统计学意义 ( $P = 0.018$  和  $P = 0.015$ )，见表 6。

五、性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量预测肝组织炎症分级和纤维化分期的有效性

HBeAg 阳性患者，以性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量作为自变量，肝组织炎症分级和纤维化分期作为因变量，进行有序 Logistic 回归分析。结果显示，预测病炎症分级的回归模型成立 (Likelihood 检验:  $\chi^2 = 46.630$ ,  $P = 0.000$ )，并且模型拟合良好 (Pearson 检验:  $\chi^2 = 149.095$ ,  $P = 0.597$ ; Deviance 检验:  $\chi^2 = 122.095$ ,  $P = 0.973$ )；预测纤维化分期的回归模型成立 (Likelihood 检验:  $\chi^2 = 41.862$ ,  $P = 0.000$ )，并且模型拟合良好 (Pearson 检验:  $\chi^2 = 216.514$ ,  $P = 0.774$ ; Deviance 检验:  $\chi^2 = 172.732$ ,  $P = 0.999$ )，详见表 7。

HBeAg 阴性患者，以性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量作为自变量，肝组织炎症分级和纤维化分期作为因变量，进行有序 Logistic 回归分析。结果显示，预测炎症分级的回归模型成立 (Likelihood 检验:  $\chi^2 = 20.332$ ,  $P = 0.000$ )，并且模型拟合良好 (Pearson 检验:  $\chi^2 = 114.887$ ,  $P = 0.219$ ; Deviance 检验:  $\chi^2 = 95.642$ ,  $P = 0.709$ )；预测纤维化分期的回归模型成立

(Likelihood 检验:  $\chi^2 = 17.822$ ,  $P = 0.001$ )，并且模型拟合良好 (Pearson 检验:  $\chi^2 = 155.139$ ,  $P = 0.549$ ; Deviance 检验:  $\chi^2 = 131.970$ ,  $P = 0.935$ )，详见表 8。

## 讨 论

顺应机体免疫应答效度的演变，慢性 HBV 感染经历免疫耐受期、免疫激活期和免疫控制期，部分患者经历免疫逃避期；其中免疫耐受期和免疫激活期表现为 HBeAg 阳性，免疫控制期和免疫逃避期表现为 HBeAg 阴性<sup>[4-6]</sup>。血清 HBsAg 水平和 HBV DNA 载量在慢性 HBV 感染的不同阶段之间存在差异<sup>[7-9]</sup>；血清 HBsAg 水平和 HBV DNA 载量、肝组织 HBsAg 和 HBeAg 表达形式在 CHB 肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间也有所不同<sup>[10-11]</sup>。但是，慢性 HBV 感染宿主免疫应答的主流机制尚未充分阐明<sup>[12]</sup>，影响 CHB 发病和进展的宿主因素也不完全清楚<sup>[13]</sup>。社区和临床流行病学研究显示，CHB 的发病和进展存在显著的性别和年龄差异<sup>[14-16]</sup>。张占卿等<sup>[17]</sup>研究指出，CHB 患者肝组织炎症分级和纤维化分期随年龄增加而增加，并且在不同炎症分级和纤维化分期之间存在显著差异；本文也得出类似结果。说明性别和年龄是影响 CHB 的发病和进展的一个重要因素。

动物实验和临床研究指出，性甾体激素分泌及其受体表达水平存在性别差异和增龄变化<sup>[18-22]</sup>；但是，健康人群肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量的性别和年龄差异很少有文献报道。性别和年龄影响 CHB 的发病和进展可能与性甾体激素分泌及其受体表达水平的性别差异和增龄变化有关。史慧慧等<sup>[23]</sup>研究显示，虽然女性 CHB 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量非显著高于男性，但 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量均与年龄呈显著负相关关系。本研究结果显示，无论 HBeAg 阳性或阴性，女性 CHB 患者肝组织内 AR

表 8 HBeAg 阴性患者性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ERα mRNA 含量  
预测肝组织炎症分级和纤维化分期的参数估计

因变量	组间阈值	P	95%CI	自变量	回归系数	P	95%CI
[G = 1]	1.389	0.246	-0.958~3.735	年龄 (岁)	0.037	0.136	-0.012~0.086
[G = 2]	3.104	0.014	0.629~5.579	AR mRNA (log <sub>10</sub> CNRQ)	-4.808	0.006	-8.205~-1.410
				ERα mRNA (log <sub>10</sub> CNRQ)	-0.091	0.949	-2.858~2.676
				性别=女	0.498	0.440	-0.766~1.762
因变量	组间阈值	P	95%CI	自变量	回归系数	P	95%CI
[S = 1]	0.342	0.748	-1.741~2.425	年龄 (岁)	0.038	0.093	-0.006~0.083
[S = 2]	1.779	0.105	-0.372~3.930	AR mRNA (log <sub>10</sub> CNRQ)	-2.559	0.068	-5.306~0.189
[S = 3]	2.671	0.018	0.462~4.880	ERα mRNA (log <sub>10</sub> CNRQ)	-0.716	0.576	-3.226~1.794
				性别=女	-0.402	0.484	-1.525~0.722



mRNA 非显著高于男性, ER $\alpha$  mRNA 含量显著高于男性; HBeAg 阳性患者, 肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量均与年龄呈显著负相关关系; HBeAg 阴性患者, 肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量与年龄分别呈非显著和显著负相关关系。提示肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量存在性别差异, 并随年龄增长而逐步减少。

性甾体激素分泌及其受体表达水平对 CHB 发病和进展的影响可能表现在两方面: 病毒复制及其抗原表达水平与宿主的免疫应答效度性别和年龄差异。早期的动物实验显示, 雄性激素和雌性激素分别通过 AR 和 ER, 促进和抑制 HBV 复制及其抗原表达<sup>[24-26]</sup>。最近, Tian 等<sup>[27]</sup>研究认为, 雄激素促进 HBV 复制及其抗原表达由 HBV 基因组中的雄激素反应元件 (androgen response elements, AREs) 介导。Wang 等<sup>[28-30]</sup>的进一步研究证实, AR 促进和 ER 抑制 HBV 复制及其抗原表达的 AREs 位于 HBV 基因组的增强子 I; 其中 ER 抑制 HBV 复制及其抗原表达不依赖雌性激素, ER 通过抑制肝细胞核因子 4 $\alpha$  与增强子 I 的结合而发挥作用。早期一些研究认为, 睾酮对细胞和体液免疫均有抑制作用, 而雌二醇对细胞免疫和体液免疫分别有抑制和增强作用<sup>[31]</sup>; 脱氢表雄酮能促进 Th1 型细胞因子如白细胞介素 (IL)-2 和干扰素- $\gamma$  的产生, 而雌激素能够促进 Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-6 和 IL-10 的产生<sup>[32]</sup>。最近, Michalek 等<sup>[33-34]</sup>研究指出, 雌激素相关受体 (estrogen related receptor  $\alpha$ , ERR $\alpha$ ) 对 CD $_4^+$  T 细胞的代谢有重要的调节作用; 不同的 T 细胞亚群有不同的代谢需求, Th1、Th2、Th17 等效应 T 细胞 (effector T cells, Teff) 的活化和维持有赖于糖酵解, 而调节性 T 细胞 (regulatory T cells) 增殖和分化有赖于脂氧化; ERR $\alpha$  受抑可减少 T 细胞的糖摄取和线粒体代谢, 进而减少 T 细胞增殖和 Teff 的产生。

不同性甾体激素之间及其与不同性甾体激素受体之间的调节网络尚未阐明, 因此, 性甾体激素及其受体对 CHB 患者 HBV 复制及其抗原表达和宿主免疫应答影响的整体效应也不明确。但是, 性甾体激素分泌及其受体表达水平对 CHB 发病和进展的影响最终表现在性甾体激素分泌及其受体表达水平对 CHB 患者肝组织病理状态的影响。史慧慧等<sup>[23]</sup>研究指出, PBMCs 内 AR mRNA 含量是影响 CHB 肝组织炎症分级和纤维化分期的一个独立因素。本文显示, HBeAg 阳性患者, 年龄在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均有统计学意义; HBeAg

阴性患者, 年龄在肝组织不同纤维化分期之间的差异有统计学意义; 无论 HBeAg 阳性或阴性患者, 肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量在肝组织不同炎症分级和纤维化分期之间的差异均有统计学意义。为筛选影响肝组织炎症分级和纤维化分期的优势因素, 本研究采用有序 Logistic 回归进一步分析了性别和年龄、肝组织内 AR mRNA 和 ER $\alpha$  mRNA 含量预测肝组织炎症分级和纤维化分期的有效性, 结果显示, 无论 HBeAg 阳性或阴性患者, 只有肝组织内 AR mRNA 含量有预测肝组织炎症分级和纤维化分期的意义。

根据本文和本课题组前期的研究结果, 肝组织内和 PBMCs 内 AR 的表达水平均为影响 CHB 发病和进展的独立因素<sup>[23]</sup>。但是, AR 影响 CHB 发病和进展的机制是基于其病毒学或免疫学效应还不能确定。全面了解性甾体激素受体对 CHB 发病和进展的影响, 尚需要进一步探讨肝组织内和 PBMCs 内性甾体激素受体表达水平与血清和肝组织内病毒学指标以及外周血和肝组织内免疫学指标的相关性。

## 参考文献

- 1 Baig S. Gender disparity in infections of hepatitis B virus[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2009, 19(9):598-600.
- 2 Wang SH, Yeh SH, Lin WH, et al. Estrogen receptor represses transcription of HBV genes via interaction with hepatocyte nuclear factor 4[J]. Gastroenterology, 2012, 142(4):989-998.
- 3 Zhang TT, Zhang ZH, Gao YF, et al. T29C genotype polymorphism of estrogen receptor alpha is associated with initial response to interferon-alpha therapy in chronic hepatitis B patients[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9(3):275-279.
- 4 Chen CJ, Yang HI. Natural history of chronic hepatitis B Revealed[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(4):628-638.
- 5 张占卿, 张志勇. 慢性乙型肝炎的疾病状态评估[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(20):6195-6198.
- 6 Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis virus infection and long-term outcome under treatment[J]. Liver Int, 2009, 29(Suppl 1):100-107.
- 7 Chan HLY, Wong VWS, Wong GLH, et al. A Longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2010, 52(4):1232-1241.
- 8 Jaroszewicz J, Serrano BC, Wursthorn K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective[J]. J Hepatol, 2010, 52(4):514-522.
- 9 Nguyen T, Thompson AJV, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: A perspective on Asia[J]. J Hepatol, 2010, 52(4):508-513.
- 10 张占卿, 陆伟, 王雁冰, 等. 血清 HBsAg 和 HBV DNA 对慢性乙型肝炎肝组织病理状态的判别评价[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(15):6841-6847.
- 11 张玉果, 王泰龄. 慢性乙型肝炎肝组织内 HBsAg、HBeAg 的表达及临床研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2010, 19(2):189-

- 192.
- 12 Revill P, Yuan Z. New insights into how HBV manipulates the innate immune response to establish acute and persistent infection[J]. *Antivir Ther*,2013,18(1):1-15.
- 13 Chatzidaki V, Kouroumalis E, Galanakis E. Hepatitis B virus acquisition and pathogenesis in childhood: host genetic determinants[J]. *J Pediatr Gastr Nutr*,2011,52(1):3-8.
- 14 Blumberg BS, Sumick AI, London W, et al. Sex distribution of Australia antigen[J]. *Arch Intern Med*,1972,130(2):227-231.
- 15 London WT, Drew JS. Sex differences in response to hepatitis B infection among patients receiving chronic dialysis treatment[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1977,74(6):2561-2563.
- 16 Chu CM, Liaw YF, Sheen IS, et al. Sex difference in chronic hepatitis B virus infection: an appraisal based on the status of hepatitis B e antigen antibody[J]. *Hepatology*,1983,3(6):947-950.
- 17 张占卿, 陆伟, 王雁冰, 等. 性别和年龄对慢性乙型肝炎肝组织病理学状态的判别价值[J]. *现代中西医结合杂志*,2011,20(32):4050-4052.
- 18 Travison TG, Araujo AB, O'Donnell AB, et al. A population-level decline in serum testosterone levels in American men[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2007,92(1):196-202.
- 19 Igarashi H, Kouro T, Yokota T, et al. Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98(26):15131-15136.
- 20 Buzek SW, Sanborn BM. Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat[J]. *Biol Reprod*,1988,39(1):39-49.
- 21 Shirai M, Yamanaka M, Shiina H, et al. Downregulation of androgen, estrogen and progesterone receptor genes and protein is involved in aging-related erectile dysfunction[J]. *Int J Impot Res*,2003,15(6):391-396.
- 22 González-Morán MG, Guerra-Araiza C, Campos MG, et al. Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature, and aged chickens[J]. *Domest Anim Endocrinol*,2008,35(4):371-379.
- 23 史慧慧, 张小楠, 张占卿, 等. 外周血单个核细胞内性甾体激素受体与慢性乙型肝炎肝组织病理状态的相关性[J]. *肝脏*,2013,18(8):510-516.
- 24 Farza H, Salmon AM, Hadchouel M, et al. Hepatitis B surface antigen gene expression is regulated by sex steroids and glucocorticoids in transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1987,84(5):1187-1191.
- 25 Breidbart S, Burk RD, Saenger P. Hormonal regulation of hepatitis B virus gene expression: influence of androgen receptor[J]. *Pediatr Res*,1993,34(3):300-302.
- 26 Almog Y, Klein A, Adeler R, et al. Estrogen suppresses hepatitis B virus expression in male athymic mice transplanted with HBV transfected Hep G-2 cells[J]. *Antiviral Res*,1992,19(4):285-293.
- 27 Tian Y, Kuo CF, Chen WL, et al. Enhancement of hepatitis B virus replication by androgen and its receptor in mice[J]. *J Virol*,2012,86(4):1904-1910.
- 28 Wang SH, Yeh SH, Lin WH, et al. Identification of androgen response elements in the enhancer I of hepatitis B virus: a mechanism for sex disparity in chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*,2009,50(5):1392-1402.
- 29 Wang SH, Yeh SH, Lin WH, et al. Estrogen receptor  $\alpha$  represses transcription of HBV genes via interaction with hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ [J]. *Gastroenterology*,2012,142(4):989-998.
- 30 Tong S. Hepatitis B virus, a sex hormone-responsive virus[J]. *Gastroenterology*,2012,142(4):696-699.
- 31 Da Silva JAP. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses[J]. *Ann Rheum Dis*,1995,54(1):6-16.
- 32 Wilder RL. Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*,1996,23(1):10-12.
- 33 Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets[J]. *J Immunol*,2011,186(6):3299-3303.
- 34 Michalek RD, Gerriets VA, Nichols AG, et al. Estrogen-related receptor- $\alpha$  is a metabolic regulator of effector T-cell activation and differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2011,108(45):18348-18353.

(收稿日期: 2014-05-22)

(本文编辑: 孙荣华)

王荣芋, 张小楠, 张占卿, 等. 肝组织内性甾体激素受体与慢性乙型肝炎肝组织病理状态的相关性[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2015, 9(1): 19-26.