肝癌患者血清中黄曲霉毒素白蛋白加合物与肝肾功能的关系

车轶群,王迪,沈迪,罗扬

(国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,北京 100021)

摘要:[目的]评价肝癌患者 AFB1-alb 加合物的暴露水平以及与肝肾功能的关系。[方法]采用 ELISA 试剂盒分析 82 例肝癌患者、31 例肝炎患者和 51 名健康人血清中的 AFB1-alb 加合物,同时使用全自动生化仪检测不同 AFB1-alb 加合物水平肝癌患者的肝肾功能,核磁共振成像(MRI)验证肝损伤。[结果] AFB1-alb 加合物在肝癌患者血清中的水平高于健康人,两者之间差别有统计学意义 ($P<0.05$)。肝癌和肝炎两组患者之间 AFB1-alb 加合物水平无明显差异。AFB1-alb 加合物的暴露水平与身体质量指数有关,而与年龄、性别及居住地无关。血清中的 AFB1-alb 加合物与总胆红素、谷酰转氨酶、肌酐、尿酸、甘油三脂、胆固醇相关,而与白蛋白、转氨酶、碱磷酶、尿素无明显相关。AFB1-alb 加合物高水平组 MRI 显示脂肪变性的比例高于低水平组(48.8% vs 25.6%),两组之间差异有统计学意义。[结论]肝癌患者血清中的 AFB1-alb 加合物高暴露水平影响肝肾功能,AFB1-alb 加合物可能成为肝癌诊断的血清学潜在标志物。

关键词:AFB1-alb 加合物;肝肿瘤;肝肾功能

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2017)06-0490-04

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2017.06.A014

Detection of Serum AFB1-alb Adduct and Its Association with Hepatic and Renal Functions in Patients with Hepatocellular Carcinoma

CHE Yi-qun, WANG Di, SHEN Di, et al.

(National Cancer Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the level of AFB1-alb adduct in serum samples from hepatocellular carcinoma patients and its association with hepatic and renal functions. [Methods] Blood samples were collected from 82 hepatocellular carcinoma patients, 31 hepatitis patients and 51 healthy controls. The level of AFB1-alb adduct was detected by ELISA. AFB1-alb adduct, albumin, total bilirubin, AST, ALT, ALP, GGT, creatinine, TG, CHOL and Urea were detected by automatic biochemical analyzer, and hepatic lesion was evaluated by magnetic resonance imaging (MRI). [Results] Hepatocellular carcinoma patients had higher AFB1-alb adduct levels than healthy control, with significant difference ($P<0.05$). There was no remarkable difference between hepatocellular carcinoma and hepatitis patients. AFB1-alb adduct levels did not show significant correlations with age, gender and residence. Additionally, there was significant relationship between body mass index and AFB1-alb adduct. Patients with AFB1-alb adduct levels greater than average had significantly elevated level of total bilirubin, GGT, creatinine, Uric, TG and CHOL. Nevertheless, the level of albumin, ALT, AST, ALP and Urea showed no correlation with the level of AFB1-alb adduct. High AFB1-alb adduct level group by MRI showed that the proportion of hepatic lesion was higher than that of the low group (48.8% vs 25.6%), with significant difference ($P<0.05$). [Conclusions] High exposure levels of serum AFB1-alb adduct could affect the functions of liver and kidney in hepatocellular carcinoma patients. It implies that AFB1-alb adduct might be a potential biomarker in the diagnosis of hepatocellular carcinoma.

Key words: AFB1-alb adduct; hepatocellular neoplasms; hepatic and renal functions

黄曲霉毒素 (AFs) 可通过污染食品、饲料和中

药材等,对人类健康造成严重损伤,而一般的烹饪过程中很难将其破坏,是迄今发现最稳定且毒性最强的一类真菌毒素,被国际癌症研究机构(IARC)划定为 I 类致癌物。目前已发现 AFs 及其衍生物有 20

收稿日期:2017-02-10;修回日期:2017-04-04

基金项目:北京市自然科学基金(7162164);首都卫生发展科研专项(首发 2014-4-4028)

通讯作者:罗扬, E-mail: dryangluo@163.com

多种,其中,以外源性毒物黄曲霉毒素 B (aflatoxin B) 的 AFB1 的毒性最强。在 AFs 检测中,一般也以 AFB1 作为主要检测指标,血清 AFB1-白蛋白(AFB1-alb) 加合物通常被作为人类和动物暴露于 AFB1 研究的标志物。

开展临床生物样本中黄曲霉毒素及其代谢产物的研究,有助于快速高效地诊断出病患的中毒特征,并针对性采取治疗措施。临床样本中黄曲霉毒素及其代谢物的研究远不及食品、中药、饲料等基质中的研究深入和广泛。此外,临床样本中 AFs 多为痕量检测(ppb 或更低水平),并且临床生物样本种类较多,对应基质也较复杂,增大了检测难度。酶联免疫吸附法(ELISA)作为大量样本中真菌毒素检测的初筛方法,对于快速诊断并协助治疗病患具有非常重要的可操作性。本文就选用 ELISA 和核磁共振成像(MRI)对肝癌患者血清中的黄曲霉毒素白蛋白加合物及肝肾功能的关系进行初步探讨。

1 资料与方法

1.1 临床资料

标本采集来自中国医学科学院肿瘤医院门诊肝癌患者 82 例、肝炎患者 31 例和健康体检者 51 名。肝癌组纳入标准包括:①病理确诊为肝细胞癌;②年龄大于 18 周岁;肝功能 Child-pugh 分级 A 级;ECOG 评分为 0~1 分;BCLC 分期 A~B 期;③均未进行任何治疗;④无严重心肺、肾功能障碍;无严重凝血功能障碍;无门静脉主干瘤栓者;无大量腹水;无恶病质;均未合并严重感染。肝炎组纳入标准:经血清学乙肝病毒定性和定量检测确诊为 HBV 感染,肝炎活动度病理学分级为 G0~G3 级。正常对照组为健康体检者,无肝癌或其他肿瘤及明确诊断的疾病。肝癌组、肝炎组与正常对照组三组间性别、年龄及体重相匹配。早晨空腹抽取静脉血 4ml,常规检测肝肾功能后剩余血清用于检测 AFB1-alb 加合物,3000r/g 离心 10min,血清-80℃冻存。

1.2 方法

肝肾功能检测用全自动生化仪(Roche cobas 8000)。用于检测 AFB1-alb 加合物的 ELISA 试剂盒

购自上海钰博生物科技有限公司(Cata#95193),检测限 6~220pg/ml。肝脏脂肪变性用核磁共振成像(GE3.0T)评价。

1.3 统计学处理

应用 SPSS20.0 软件进行统计分析。计数资料比较采用 Fisher 精确检验,计量资料的比较采用 *t* 检验。两均值之差的参数检验采用 Mann-Whitney *U* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌患者血清中 AFB1-alb 加合物的水平及其相关因素

肝癌患者血清中 AFB1-alb 加合物水平较健康对照人群高,两者之间差别有显著意义($P=0.043$);肝癌患者血清中 AFB1-alb 加合物较肝炎组高,但两者之间差别无统计学意义($P=0.077$)(Table 1)。AFB1-alb 加合物的暴露水平与身体质量指数(BMI)有关,而与年龄、性别及居住地等人群特征无关(Table 2)。血清中的 AFB1-alb 加合物与总胆红素、谷酰转氨酶、肌酐、尿酸、甘油三脂、胆固醇有关,而与白蛋白、转氨酶、碱磷酶、尿素无关(Table 3)。肝癌患者血清中的 AFB1-alb 加合物高暴露水平导致肝肾功能标志物升高。

Table 1 Comparison of serum AFB1-alb adduct between hepatocellular carcinoma, hepatitis patients and healthy persons

Groups	N	AFB1-alb adduct (pg/ml)	<i>t</i>	<i>P</i>
Hepatocellular carcinoma group	82	98.6±76.0		
Hepatitis group	31	70.2±39.3	1.828	0.077
Healthy	51	45.5±37.1	2.253	0.043

Note: compared with hepatocellular carcinoma group.

2.2 MRI 评价 AFB1-alb 加合物不同水平组的肝脂肪变性

为了验证上述结果,进一步从影像学检查对上述患者进行评估。AFB1-alb 加合物高于均值组核磁共振成像(MRI)呈现肝脂肪变性 48.8%(21/43),脂肪成分在 T1WI 正相位呈高信号,反相位信号减低可见脂肪肝,更可见肝癌病灶内脂肪变性。AFB1-alb 加合物低于均值组 MRI 呈现肝脂肪变性 25.6%(10/39)。两组之间比较差异有统计学意义($\chi^2=4.680, P=0.041$)。

Table 2 Level of AFB1-alb adduct based on demographic characteristics

Demographic characteristics	N	AFB1-alb adduct (pg/ml)	t	P
Age(years)				
≥50	45	101.3±40.5	0.073	0.825
<50	37	92.8±38.6		
Gender				
Male	51	99.1±39.4	0.203	0.782
Female	31	87.5±48.1		
BMI				
Underweight+normal	37	82.7±41.4	2.211	0.046
Overweight+obesity	45	99.3±32.9		
Residence				
Rural	52	97.3±44.5	0.412	0.676
Urban	30	93.6±48.1		

Table 3 Serum liver and kidney biomarkers based on the level of AFB1-alb adduct

Index	Reference range	AFB1-alb adduct		P
		Below average (n=39)	Above average (n=43)	
Albumin (g/L)	40.0~55.0	49.6±5.8	46.1±7.3	0.875
Total bilirubin (μmol/L)	1.71~17.1	9.1±2.3	17.6±6.4	0.033
AST (U/L)	13.0~35.0	21.0±5.6	23.1±4.2	0.182
ALP (U/L)	50.0~135.0	86.4±19.2	92.7±21.0	0.161
ALT (U/L)	7.0~40.0	23.8±11.3	28.4±7.2	0.076
GGT (U/L)	7.0~45.0	19.1±11.3	30.4±15.6	0.043
Urea(mmol/L)	2.6~7.5	4.1±3.3	4.7±2.8	0.139
Creatinine (μmol/L)	41.0~73.0	65.8±9.6	89.0±14.2	0.027
Uric (μmol/L)	142.8~339.2	203.6±96.1	289.6±115.4	0.046
CHOL(mmol/L)	2.85~5.69	4.7±3.1	6.1±4.6	0.038
TG(mmol/L)	0.45~1.69	1.9±0.8	2.5±1.2	0.041

Note: values were presented as mean±standard error mean. Average value of AFB1-alb adduct=98.6pg/ml. P-value obtained from Mann-Whitney U test.

3 讨论

由于 AFB1 的代谢过程主要发生在肝脏, 其与原发性肝癌的关系比较密切, 因此对 AFB1 在人体内暴露的相关生物标志物的检测具有重要意义。AFB1-alb 加合物可以作为机体接触 AFB 的直接生物标记。并且 AFB1-alb 加合物与尿中 AFB1-N7-GUA 的排出呈高度相关, 而后者是肝癌早期筛查的重要指标, 而且血清中 AFB1-alb 加合物的半衰期较尿中 AFB1-N7-GUA 的半衰期长, 所以血清中 AFB1-alb 加合物水平更能够反映个体的 AFB1 暴露程度^[1]。

AFB1 可以通过氧化应激 TNF-α/IL-α 通路促进

肿瘤的形成。AFB1 能诱导 SOD1 抑制, 促进 IL-α 升高, IL-α 能促进 TNF-α 的合成和分泌, 因此这两种因子可以相互补充, 促进肿瘤发生和进展。在大鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-α 的表达水平明显升高。PCNA 是 DNA 合成酶的辅助蛋白, 其表达水平在快速增殖细胞核中明显升高。AFB1 使 PCNA 表达明显增加^[2]。并且体内试验表明, 暴露于致突变的 AFB1 并不会导致强烈的细胞周期阻滞和细胞凋亡, 最终结果是感染 AFB1 的细胞缺乏细胞生长控制, 这种有缺陷的反应可能有助于 AFB1 的致癌作用^[3]。这些结果表明, AFB1 可能通过上调肝癌细胞中的 miR-34a, 从而下调 Wnt/β-catenin 信号通路, 促进肝癌发生发展^[4]。

AFB1 能降低淋巴细胞活性。攻击机体后, DNA 损伤大量蓄积, 使得具有修复 DNA 系统的蛋白质降低修复能力。Fisetin 可以使 AFB1 诱导的肝癌的炎症信号通路恢复正常, 调节抗氧化酶及促炎因子从而抑制肿瘤发展^[5]。对免疫系统的损伤, 巨噬细胞的活化作用和噬菌作用通常伴随呼吸而暴发, 在这个过程中机体合成有毒的含氧代谢产物如过氧化氢、超氧化物阴离子等, 因此 ROS 和活性氮的产生是巨噬细胞的作用特征。人 P450 3A4 在 AFB1 氧化成 exo-AFBO 中发挥作用, 后者可

致细胞损伤或基因损伤, 对机体产生危害^[6]。若黄曲霉素 B1 和赫曲毒素两种致癌的霉菌毒素协同作用, 可干扰应对诱变剂的检查反应而使转化的肿瘤细胞的存活, 另一方面由于肿瘤抑制因子 p53 水平下降, 无细胞周期阻滞的突变转化细胞生存增强, 从而给肿瘤患者带来更大的风险^[7]。

本研究结果显示 AFB1-alb 加合物与总胆红素和肌酐水平及尿酸、甘油三酯、胆固醇含量相关。这些标志与 AFB1-alb 加合物之间的关系都显示黄曲霉毒素对肝肾功能的影响。而且从影像学角度验证上述结果, AFB-alb 高于均值组 MRI 显示肝脂肪变性比例显著高于低于均值组, 可能表明 AFB-alb 对肝肾有潜在的毒性作用。黄曲霉毒素具有致癌、致

畸、致突变和免疫抑制等危害,危害最严重的是肝脏,可引起肝脏出血、脂肪变性、胆管增生等甚至可导致肝癌的发生。AFs 中毒的临床症状主要有:肝增大、苍白、变脆、脂肪肝、胆管上皮增生、腺胃和肌胃发生炎症、肠胃功能障碍、生殖能力下降、贫血、黄疸、影响动物血液成分及造血功能,黄曲霉毒素可降低血清总蛋白、白蛋白、球蛋白水平及尿酸、甘油三酯、胆固醇含量、骨髓造血功能受损,红细胞脆性增加、抑制动物免疫系统,使其对疾病的敏感性增强,导致疫苗接种失败等。本实验结果显示 AFB1-alb 加合物与 BMI 有明显相关。以尿酸(Uric)为例,Uric 水平与肥胖成年人非酒精性脂肪性肝病的风险增加呈线性关系^[8]。AFB1 主要是在动物肝脏和小肠中代谢,CYP450s 系统在代谢过程中起关键性作用,尤其是 CYP3A4。现有的研究主要是通过添加抗氧化物以提高 II 相药物代谢酶的活性实现解毒作用,但实际应用中的效果不稳定。根据 CYP3A4 参与 AFB 的代谢机理,可以考虑寻找合适的致癌物激活酶的抑制剂和解毒酶类的诱导剂,减轻基因毒性对动物的损伤^[5]。

用 ELISA 法测定水解后的白蛋白加合物,用 HPLC 荧光检测法测定白蛋白水解后用免疫亲和层析纯化的 AFB-Lys,结果具有很好的相关性^[9]。虽然 ELISA 灵敏度较高,但其特异性相对 HPLC 较差,ELISA 法可能会检测到除 AFB-Lys 外的其他蛋白加合物。但 HPLC 法由于样品处理过程中对白蛋白消化不完全,因此其样本量需求较大,临床样本不易获取。可能用 ELISA 法对大样本进行筛查,再用 HPLC 荧光检测对 ELISA 结果呈阳性的样本进一步分析验证是更精准的方案。综上,本实验验证了 AFB1-alb 加合物可能成为肝癌诊断的血清学潜在标志物,更为研究黄曲霉毒素加合物与肝脏和肾脏损伤之间的关系提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Jager AV, Tonin FG, Baptista GZ, et al. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: a pilot study[J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2016, 219(3):294-300.
- [2] Qin H, Li H, Zhou X, et al. Effect of superoxide and inflammatory factor on aflatoxin B1 triggered hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(9):4003-4008.
- [3] Gursoy-Yuzugullu O, Yuzugullu H, Yilmaz M, et al. Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation[J]. *Liver Int*, 2011, 31(4):561-571.
- [4] Zhu L, Gao J, Huang K, et al. miR-34a screened by miRNA profiling negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway in Aflatoxin B1 induced hepatotoxicity[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:16732.
- [5] Maurya BK, Trigun SK. Fisetin modulates antioxidant enzymes and inflammatory factors to inhibit aflatoxin-B1 induced hepatocellular carcinoma in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:1972793.
- [6] Rawal S, Yip SS, Coulombe RA Jr. Cloning, expression and functional characterization of cytochrome P450 3A37 from turkey liver with high aflatoxin B1 epoxidation activity[J]. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23(8):1322-1329.
- [7] Kim J, Park SH, Do KH, et al. Interference with mutagenic aflatoxin B1-induced checkpoints through antagonistic action of ochratoxin A in intestinal cancer cells: a molecular explanation on potential risk of crosstalk between carcinogens[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26):39627-39639.
- [8] Liu CQ, He CM, Chen N, et al. Serum uric acid is independently and linearly associated with risk of nonalcoholic fatty liver disease in obese Chinese adults[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38605.
- [9] Mohd Redzwan S, Rosita J, Mohd Sokhini AM, et al. Detection of serum AFB1-lysine adduct in Malaysia and its association with liver and kidney functions [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2014, 217(4-5):443-451.

启 事

每期杂志出版后,本刊都将给作者/通讯作者通过邮局,以印刷品挂号形式寄赠当期杂志 2 册。如未能及时收到杂志,请登录 <http://www.chinaoncology.cn>

⇒ 点击中国肿瘤

再点击

信息公告

MORE

查找 2017 年第 X 期《中国肿瘤》

杂志作者邮寄名单,按“挂号号”可在当地邮局查询。