

# YKL-40 在肝纤维化病人血清中含量升高

**研究背景与目标:** YKL-40, 是哺乳动物类几丁质酶家族的一个成员, 同时也是一种植物凝血素, 可结合肝素和甲壳素。目前 YKL-40 的功能还不太清楚, 但它可能在组织重塑中发挥作用。本研究的目标是评估各种不同类型和程度的慢性肝病患者血清 YKL-40 的表达水平, 以及它与肝纤维化可能存在的关联。

**方法:** 总共收集 129 例可能有肝病的患者血液和肝脏组织的穿刺样本。病人的疾病状态由组织学的结果来确定。血清中 YKL-40 的含量, 采用放射免疫分析法 (radioimmunoassay) 进行了检测, 同时, 利用免疫组化 (immunohistochemical) 的方法对相应穿刺组织样本的 YKL-40 水平进行了检测。

**结果:** 平均血清 YKL-40 含量在酒精性肝硬化患者 (532ug/l) 中最高的, 尤其是额外酒精性肝炎患者 (740ug/l)。酒精性肝硬化患者、后肝硬化 (425pg/l) 和非肝硬化纤维化患者 (330ug/l) 血清中 YKL-40 的含量较正常人 (102 pg/l)、脂肪肝患者 (195ug/l) 或无纤维化病毒性肝炎患者 (174ug/l) 有显著增高。血清中 YKL-40 的含量与肝纤维化程度有显著相关 ( $P < 0.001$ ), 从中度纤维化 (466ug/l) 到重度 (676ug/l) 纤维化, 血清 YKL-40 含量依次升高。轻度纤维化患者 (270ug/l) 血清中 YKL-40 的含量明显高于无纤维化患者 ( $P = 0.018$ )。免疫组化分析显示纤维化区域, 尤其是纤维化生成活跃区域 YKL-40 抗原阳性结果。肝细胞中未见 YKL-40 阳性结果。

**讨论:** 本研究表明不同程度和病理学的肝脏疾病患者血清中 YKL-40 含量的增加似乎反映出的是纤维化和纤维生成的情况。

**关键字:** 酒精性肝病; HC gp-39; 肝纤维生成; 肝纤维化; YKL-40

肝纤维化 H 是一个复杂和动态的过程, 涉及活化细胞产生基质材料, 改变细胞外基质成分和组织重塑 (1)。常规生化和血清学试验在诊断肝纤维化和纤维生成活动程度上没多大价值, 因此, 通常利用皮肤肝穿刺活组织检查来评估肝纤维化及纤维化的程度 (1,2)。然而, 肝活组织检查的价值也很有争议, 因为在肝脏病理变化的分布不均匀。多年来一直在寻找利用生化或血清学指标来反映肝病的纤维化加工过程。在出现不可逆损伤之前的早期检测持续纤维化患者的标志物有了进一步的发展, 这为临床医生在诊断和预后上又增加了一个可能 (1-3)。

YKL-40 是哺乳动物类几丁质酶家族的一员 (家族 1%糖基水解酶) (4-13) YKL-40 的生理功能目前还不太清楚, 但其在正常和疾病状态下的表达图案说明,

它可在细胞外基质的重塑或组织发炎中发挥作用 (4-16)。在人类肝脏中发现 YKL-40 的 mRNA 有表达 (5)。我们最近报道了, 慢性肝病患者血浆中 YKL-40 水平升高, 可能与肝纤维化程度有关 (17)。此外, YKL-40 是从肝内脏系统中释放出来的 (17)。

本研究的目的是评估血清 YKL-40 水平是否反映肝纤维化的严重性。我们检测了各种肝病患者血清中 YKL-40、原骨胶原 III 型 (PIIINP) 氨基端前肽和透明质酸的水平。我们对照了随着肝穿刺活检中组织学的改变, 血清中 YKL-40 水平的变化。尤其在肝穿刺活检中, 纤维化和持续纤维化的程度与血清中 YKL-40 含量变化以及 YKL-40 免疫组化的显色程度都是相关的。

## 材料和方法

### 患者

这项研究包括连续 129 例活检患者 (82 男和 47 名女性, 年龄中位数为 49 岁 (范围 26-80 岁)) 涉及消化科 1992 年 12 月到 1994 年 11 月间疑似肝脏疾病。每一个病人的血样和肝活检是同时进行的。肝脏疾病的诊断依据组织学和公认的生化和临床指标。4 例没有肝脏疾病或其他疾病的迹象; 16 例患者有脂肪肝, 31 例患者非肝硬化肝纤维化 (26 例患者酗酒, 1 人重度肥胖, 1 人氟烷中毒, 和 3 人有隐源性肝纤维化); 51 例酒精性肝硬化, 17 例非肝硬化性病毒性肝炎 (急性病毒性肝炎 A 型 (n=2), 慢性活动性肝炎或迁延性肝炎 (B 型病毒 (n=3), C 型病毒 (n=7), 同时具有 B 型和 C 病毒 (n=5))) 和 10 例患者肝炎后肝硬化 (B 型病毒 (n=2), C 型病毒 (n=2), 或同时具有 B 型和 C 病毒 (n=6))。主要形态诊断以及患者有关的临床和生化参数, 见表 1。研究材料的收集经当地伦理委员会批准。

表 1 根据病理解剖诊断患者的生化特性

Group	n	Age (years)	Serum ASAT (10-40 U/l)*	Serum AP (50-275 U/l)†	Serum bilirubin (3-17 μmol/l)†	Serum albumin (540-800 μmol/l)†	Factors (2,7,10) (0.7-1.3)†	Serum creatinine (49-121 μmol/l)†
Normal	4	39 (26-59)	58 (28-100)	323 (142-609)	15 (9-26)	644 (639-655)	0.96 (0.86-1.3)	78 (56-86)
Fatty liver	16	47 (28-62)	52 (18-326)	313 (153-1078)	8 (5-18)	547 (402-714)	1.12 (0.54-1.3)	70 (48-128)
Viral hepatitis	17	41 (24-64)	55 (8-800)	200 (134-655)	13 (6-212)	637 (479-729)	0.92 (0.50-1.3)	72 (56-95)
Non-cirrhotic fibrosis	31	49 (25-78)	59 (28-499)	265 (120-1299)	14 (4-46)	583 (234-741)	1.01 (0.56-1.3)	67 (46-113)
Post-hepatitic cirrhosis	10	45 (26-80)	86 (42-249)	249 (139-1302)	9 (4-55)	608 (423-671)	0.93 (0.46-1.18)	67 (54-127)
Alcoholic cirrhosis	51	53 (30-74)	88 (22-1120)	372 (167-1672)	25 (6-233)	499 (328-694)	0.81 (0.38-1.3)	73 (34-566)

数值为中位数(范围)。ASAT=天门冬氨酸氨基转移酶; AP=碱性磷酸酶。†=正常范围

## 组织学方法

依据 Menghini 技术，所有肝活检经皮用 1.6 毫米直径的针获得 (18)。活检材料分为两部分，其中一部分固定在中性福尔马林中，另一部分立即冷冻与 -80°C。福尔马林固定的组织嵌入 Paraplast<sup>®</sup>，切 5 $\mu$ m 厚的连续切片 (54 片)。129 例患者的 129 个活检由两名调查员 (PC&JSJ) 的紧密合作进行评估，无临床知识，生化或血清学调查结果。PC 是具有特殊经验的肝病理学专家。

所有活检样本通过下面方法着色：苏木精-伊红，Van Gieson 染色，淀粉酶后进行 PAS 染色，地衣红，Gomori 银浸渍网状纤维，Perl 染色和甲基绿派洛宁。组织学研究结果评估如先前所述 (19)。对于每个活检样本，纤维化程度通过半定量和分级进行评估分为 0-3 级：0，代表任何部位的活检没有增加；1，可疑的/轻微的增加，即在存在几个粗窦周纤维的小叶中央有增强型结缔组织染色，但具有保存完好架构。2，中度增加，适度的增长，即不同的细胞和窦周粗纤维最终伴随着中等门和门静脉周围纤维化的发生，但保留肝小叶结构；3，重度增加，伴有桥接纤维化和广泛性门静脉和门静脉周围纤维化。此外软组织和成熟的结缔组织之间，不成熟结缔组织边缘正在发生纤维化，半定量分级为 0-3：0，即没有发生未成熟的结缔组织；1，轻微；2，中度；3，重度发生。

## 生化和血清学方法：

血清样品，收集于早晨与肝活检同时，保存于 -20°C 直至分析。常规生化检查（血红蛋白，血清碱性磷酸酶，血清谷草转氨酶，胆红素，凝血因子 II，VII，X 指数，血清白蛋白和血清肌酐）同时自动检测 (SMAC)。

**YKL-40 的测定：**血清 YKL-40 是由放射免疫测定 (RIA)，采用兔抗人 YKL40 抗体，如先前所描述。批内和批间变异系数分别小于 6.5% 和小于 12%，检出限为 20 $\mu$ g/l。260 名健康成人 (144 名女性 116 名男性，中位年龄为 48 岁 (范围为 18 -79 岁)) 的平均血清 YKL40 水平为 102 $\mu$ g/l，(前 95% = 247 $\mu$ g / L) 关于这些健康成人的进一步详情在别处给出 (20)。

**PIIINP 检测：**血清 PIIINP 是由市售的 RIA (Orion Diagnostica, Espoo, Finland) (21) 测定。批内和批间变异系数分别为 4.5% 和 5.5%。260 名健康成人 (如上所述) 的平均血清 PIIINP 为 3 $\mu$ g/l (前 95% = 5.4 $\mu$ g / l)。

**透明质酸测定：**血清透明质酸是由市售放射测定法 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 进行测量，基于使用从牛软骨中分离出来的特定的透明质酸结合蛋白。批内和批间变异系数分别为 10% 和 8%。247 名健康成人的平均血清透明质酸为 28 $\mu$ g/L (前 95% = 97 $\mu$ g / l) (22)。

## YKL-40 的免疫组化方法

冷冻的肝组织样品切成 5 微米并用苏木精和曙红进行常规染色，以确立该组织较好的保存，相邻区域用特定抗体对 YKL40 抗原特异性血清免疫定位。免疫染色切片前进行甲醇固定， $-20^{\circ}\text{C}$ ，5 分钟。如先前所述我们应用多克隆抗体常规碱性磷酸酶染色技术 (17)。主要包括以下步骤 (所有步骤在室温下进行)：用 4% 的牛血清白蛋白 (BSA, Sigma 公司 A-4503) (溶于 Tris 缓冲盐水 (TBS)) 封闭非特异性结合，孵育 5 分钟；用兔抗人 YKL-40 的一抗结合 30 分钟，一抗用含有 4% 牛血清白蛋白 TBS 稀释 (YKL-40 中 IgG 含量为 66ug/ml)。非免疫兔血清 (Dako X936, Copenhagen, Denmark) 作为阴性对照，IgG 含量为 66ug/ml 用含有 4% BSA 的 TBS 稀释。然后 slides 用 TBS 洗涤 3 次，并孵育 30 分钟，碱性磷酸酶缀合的猪抗兔免疫球蛋白 (Dako 公司 D306) 用含有 4% BSA 的 TBS 1:20 稀释，然后用 TBS 中洗涤两次，用 0.05M 的 Tris /HCl, pH 值 7.6, 孵育 10 分钟。用 0.2M 的 Tris-HCl, pH 值 9.5 洗涤两次，然后用 0.75mg/ml 的左旋咪唑 (Sigma L-9756)(0.2M 的 Tris-HCl 稀释)pH 值 9.5, 孵育 5 分钟。接下来用含有 0.75mg/ml 左旋咪唑 (0.2M Tris /HCl 稀释) 的 Sigma FAST TM BCIP / NBT (Sigma 公司 B-5655) pH 值 9.5, 染色 20 分钟。用流动的自来水冲洗来终止颜色反应，slides 安装在 Glycergel (Dako 公司)。

每个肝脏标本在显微镜下盲目检查，并对 YKL-40 表达的存在进行打分，如下：0 分=没有 YKL-40 染色, 1 分=稀疏的 YKL40 染色; 2 分=中度到强烈的 YKL-40 染色。

### 统计分析

统计分析用 SigmaStat 软件 (SPSS, Chicago, IL, USA) 和 SAS@ (SAS Institute, Cary, NC, USA) 完成。结果以中位数和范围给出。组间对不成对差异用非参数 Mann-Whitney 秩和检验或 Kruskal-Wallis 检验进行比较。相关性分析基于 Spearman  $\beta$  测试。P-值小于 0.05 认为差异显著。原始数据血清 YKL-40, PIIINP 和透明质酸是通过多元回归模型对数转换进行分析，肝纤维化程度 (视为四个类别的有序变量) 通过比例优势回归模型进行分析 (23)。

### 结果

病人个体血清 YKL-40、PIIINP 与透明质酸浓度与各种肝病疾病的关系，通过组织病理学和临床决定标准，如图 1 所示 (a, b 和 c) 和中位数水平列于表 2。血清 YKL-40 的水平在酒精性肝病肝硬化病人中最高 (中位数 532  $\mu\text{g/L}$ ，相比于年龄匹配对照的正常对照有 5 倍的升高)，肝炎肝硬化 (425 $\mu\text{g/L}$ ) 和非肝硬化纤维化 (330  $\mu\text{g/L}$ )，并且这些血清 YKL-40 水平与年龄匹配的对照血清相比显著升

高 ( $p < 0.01$ - $p < 0.001$ ) 年龄匹配的正常对照 YKL-40 的值 ( $102 \mu\text{g/L}$ , 前 95% 对照值  $247 \mu\text{g/L}$ ), 脂肪肝患者 ( $195 \mu\text{g/L}$ ), 在慢性病毒无肝炎肝硬化中 ( $174 \mu\text{g/L}$ )。对不同的病人肝病之间的多重比较表明, 酒精性肝硬化患者有显著较高的血清 YKL-40, PIIINP 和透明质酸浓度相比于非肝硬化纤维化, 病毒性肝炎和脂肪肝 (表 2) (秩和检验单因素方差分析与 Dunn's 法:  $P < 0.05$ )。血清 PIIINP 水平在酒精性肝硬化和肝炎肝硬化之间差异显著。

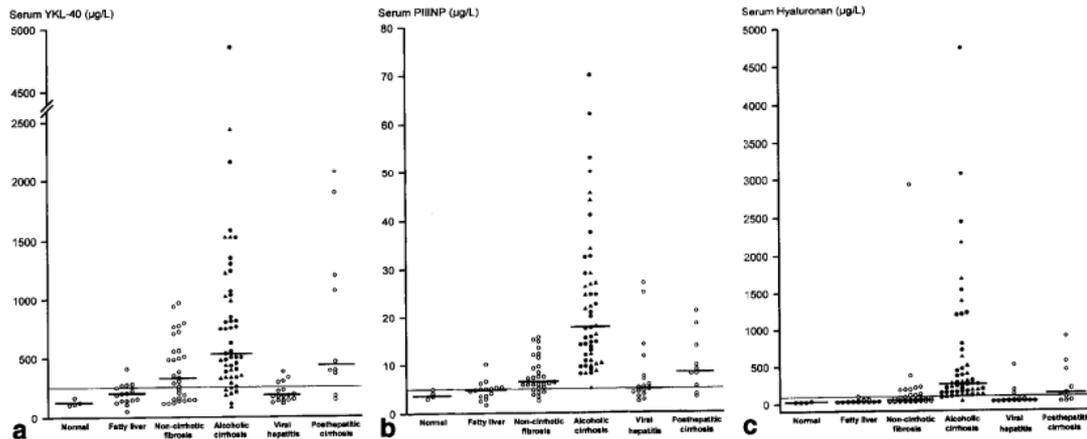


Fig. 1. Serum concentrations of YKL-40 (a), PIIINP (b) and hyaluronan (c) in patients with different liver diseases. The bars represent median values. The horizontal lines represent the upper limit (95th percentile) of the normal range of serum YKL-40 ( $247 \mu\text{g/l}$ ), serum PIIINP ( $5.4 \mu\text{g/l}$ ) and serum hyaluronan ( $97 \mu\text{g/l}$ ). (●) patients with alcoholic cirrhosis in combination with alcoholic hepatitis and (▲) patients without alcoholic hepatitis. (○) all other patients.

TABLE 2

Serum YKL-40, PIIINP and hyaluronan concentrations in patients with different liver diseases

	Serum YKL-40 ( $\mu\text{g/l}$ )	Serum PIIINP ( $\mu\text{g/l}$ )	Serum hyaluronan ( $\mu\text{g/l}$ )
Normal	118* (105-165)	3.9* (3.0-5.0)	25* (25-36)
Fatty liver	195* (50-408)	4.9* (1.7-10.1)	26* (21-93)
Viral hepatitis	174* (111-380)	5.2* (2.4-27.0)	30* (25-508)
Non-cirrhotic fibrosis	330* (115-967)	6.4* (2.6-15.6)	54* (25-2920)
Posthepatic cirrhosis	425 (145-2070)	8.4* (3.2-21.0)	127 (25-894)
Alcoholic cirrhosis	532 (82-4850)	17.6 (5.1-70.0)	258 (30-4730)

Values are medians (range). PIIINP=N-terminal propeptide of type III procollagen.

Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks with multiple comparisons, Dunn's method: \* $p < 0.05$  vs. alcoholic cirrhosis.

血清 YKL-40 水平在既有酒精性肝硬化患者又有酒精性肝炎的病人群中尤其高 ( $p=0.014$ ) (中位数  $740 \mu\text{g/L}$ , 这 31 例患者中有 30 例的血清 YKL-40 高于 (前 95% 的对照水平, 即大于  $247 \mu\text{g/L}$ )), 与有酒精性肝硬化且无肝炎的病人相比 (中位数  $338 \mu\text{g/L}$ ; 20 例患者中有 14 例血清 YKL-40 水平升高)。这两个病人组在血清 PIIINP ( $17.4$  与  $19.7 \mu\text{g/L}$ ,  $p = 0.7$ ) 或血清透明质酸 ( $258$  与  $238 \mu\text{g/L}$ ,  $p=0.3$ ) 水平上无明显差异。31 例中有 16 例 (52%) 的酒精性肝硬化病人同时有酒精性肝炎有严重纤维化, 只有 4 例 (20%) 的酒精性肝硬化患者无酒精性肝炎。

个体血清 YKL-40, PIIINP 和透明质酸水平与肝纤维化程度由组织学定义如

图 2 所示 (a, b, c)。所有这三个生化指标随着肝纤维化 (Spearman's 秩和相关,  $P < 0.001$ )。重症纤维化患者的血清 YKL-40 浓度最高 (中位数 676  $\mu\text{g/L}$ ), 随后是中度纤维化的患者 (466  $\mu\text{g/L}$ ) (秩和检验单因素方差分析对四个不同的纤维化病人群体之间,  $P < 0.001$ )。此外, 有轻微纤维化的患者与无纤维化患者相比, 血清 YKL-40 显著升高 (270 与 174  $\mu\text{g/L}$ ,  $p = 0.0018$ )。血清 PIIINP 和透明质酸浓度分别也是重症纤维化患者与中度纤维化患者最高。这两项生化指标也可以区分有轻微纤维化患者和无纤维化患者 (血清 PIIINP: 5.9 对 5.0  $\mu\text{g/L}$ ,  $p = 0.021$ ; 血清透明质酸: 42.0 对比 27.5  $\mu\text{g/L}$ ,  $P = 0.005$ )。然而, 平均血清透明质酸水平在无纤维化患者和有轻微纤维化患者中都正常, 而患者血清中 PIIINP 的升高情况在无纤维化患者中占 56%, 在有轻微纤维化的患者中占 79%。

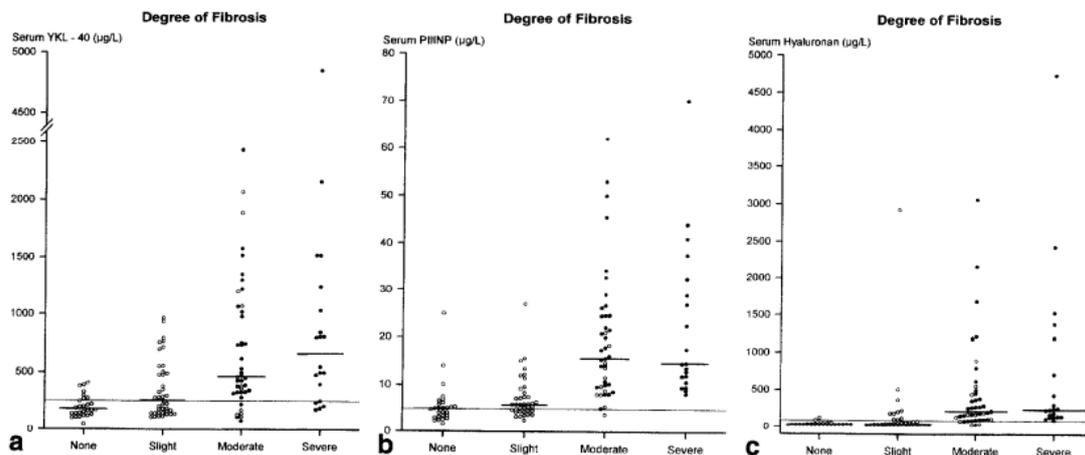


Fig. 2. Serum concentrations of YKL-40 (a), PIIINP (b), and hyaluronan (c) in patients with liver diseases and different histological degree of liver fibrosis. The definition of liver fibrosis grade is described in the Methods section. The bars represent median values. The horizontal lines represent the upper limit (95th percentile) of the normal range of serum YKL-40 (247  $\mu\text{g/L}$ ), serum PIIINP (5.4  $\mu\text{g/L}$ ) and serum hyaluronan (97  $\mu\text{g/L}$ ). (●) patients with alcoholic cirrhosis. (○) all other patients.

肝纤维化的程度也被视为一个四类有序变量, 通过比例优势回归模型与血清 YKL-40、PIIINP 和透明质酸浓度相关产生有序数据 (23)。当单独评价时, 转化为对数后每个标记发现预测纤维化的阶段的效果更好。在一个多元回归模型中, 所有对数转换标志物均具有独立的贡献 (所有肝纤维化的程度在 1% 的水平显著) 和比值比 (OR), 对应增加一倍每个标记的分别为: 透明质酸 (OR = 1.5, 95% 置信限值 = 1.1-2.1); YKL-40 (OR = 1.7, 95% 置信限值 = 1.2-2.4) 和 PIIINP (OR = 2.3, 95% 置信区间 = 1.4-3.8)。

表 3 显示出了血清 YKL-40、PIIINP、透明质酸浓度和生化肝功能测试之间的关联。血清 PIIINP 和血清透明质酸浓度之间有高的相关性 ( $\rho = 0.81$ ,  $p < 0.001$ ) 和血清 YKL-40 和血清透明质酸之间 ( $\rho = 0.57$ ,  $P < 0.001$ )。血清 YKL-40 与血

清 PIIINP，碱性磷酸酶，天门冬氨酸氨基转移酶相关（尽管具有较低的相关系数），同时和血清白蛋白和凝血因子 II、VII、X 成负相关。

TABLE 3  
Correlation between serum YKL-40, PIIINP, hyaluronan and parameters of liver function in patients with liver disease

	Serum YKL-40 ( $\mu\text{g/l}$ )	Serum PIIINP ( $\mu\text{g/l}$ ) Spearman's rho	Serum hyaluronan ( $\mu\text{g/l}$ )
Serum PIIINP ( $\mu\text{g/l}$ )	0.44***	-	0.81***
Serum hyaluronan ( $\mu\text{g/l}$ )	0.57***	0.81***	-
Serum aspartate aminotransferase (U/l)	0.34***	0.34***	0.28**
Serum alkaline phosphatase (U/l)	0.32***	0.49***	0.48***
Serum bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	0.22	0.42***	0.44***
Serum albumin ( $\mu\text{mol/l}$ )	-0.52***	-0.52***	-0.69***
Coagulation factors II, VII, and X	-0.25**	-0.36***	-0.49***

Values are Spearman's rho: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . PIIINP = N-terminal propeptide of type III procollagen.

### 免疫组织化学研究

YKL-40 阳性染色从来没有在肝细胞或者正常肝的结缔组织中出现过（图 3a）。从肝病患者活检染色来看 YKL-40 抗原被发现在轻微纤维化的区域无论是细胞外或窦周或者在中度或重度肝纤维化的区域，并沿着产生纤维化的纤维间隔发展（图 3b 和图 3c）。如果纤维间隔仅由老熟胶原而无纤维形成的迹象，那么没有 YKL-40 抗原的表达被检测到（图 3d）。部分患有“脂肪肝”的病人，YKL-40 抗原阳性染色被发现在结缔组织包围肝门束的位置。在患有慢性活动性丙型肝炎的患者，强烈的 YKL-40 阳性染色出现在零碎坏死区域，但不出现在淋巴细胞（图 3E）的区域。在所有的肝活检有纤维化和/或纤维产生的情况下，YKL-40 阳性染色在细胞外无细胞区和细胞区均有发现。在细胞区域中无法区分细胞内的染色范围。

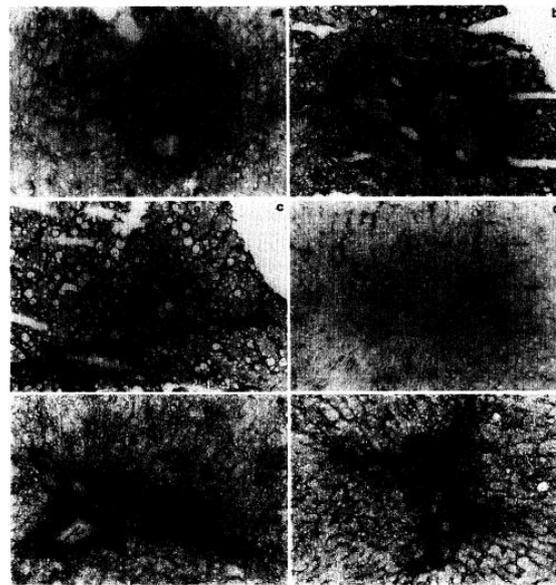


Fig. 3. Representative light micrographs of immunohistochemical staining of YKL-40 in six cryostat liver biopsies stained with an affinity-purified polyclonal rabbit antibody against human YKL-40. a) normal liver (serum YKL-40=105  $\mu\text{g/l}$ ): no staining for YKL-40 in hepatocytes and slight positive staining for YKL-40 is limited to mesenchymal structures within the portal tract. b) non-cirrhotic liver fibrosis (205  $\mu\text{g/l}$ ): positive staining for YKL-40 in areas with fibrosis along the portal tracts. c) alcoholic cirrhosis with fibrogenesis and alcoholic hepatitis (2160  $\mu\text{g/l}$ ): intense staining for YKL-40 in areas with active fibrogenesis and slight staining along the sinusoids. d) inactive alcoholic cirrhosis (532  $\mu\text{g/l}$ ): slight YKL-40 staining on the surface of the fibrotic septa and no staining inside the septa with mature collagen. e) chronic active hepatitis C virus (175  $\mu\text{g/l}$ ): staining for YKL-40 in areas with fibrosis along the portal tracts and in areas with piecemeal necrosis. f) liver necrosis in a patient with forward failure (490  $\mu\text{g/l}$ ): strong YKL-40 staining in areas with neutrophils and necrosis. All are magnification  $\times 250$ .

同一块切片中 YKL-40 在肝活检, 肝纤维化程度和成纤维起源之间的关系如表 4 所示。90% 的中度或者重度纤维化的活检中有轻微的 YKL-40 染色阳性 (33%), 或中度到严重 YKL-40 阳性染色 (57%)。86% 的轻微纤维化的肝活检有阳性化的 YKL-40 抗原 (59% 有轻微和 27% 有中度/剧烈 YKL-40 染色)。90%

TABLE 4  
Relationship between the expression of YKL-40 in liver biopsies and the degree of liver fibrosis and fibrogenesis

	Fibrosis			Fibrogenesis		
	No n=14	Slight n=29	Moderate/Severe n=49	No n=16	Slight n=32	Moderate/Severe n=44
No YKL-40 staining	22%	14%	10%	44%	3%	9%
Slight YKL-40 staining	57%	59%	33%	50%	72%	23%
Moderate to Intense YKL-40 staining	21%	27%	57%	6%	25%	68%

The values shown represent the percentage value of sections with a YKL-40 staining score (no, slight or moderate/intense) out of the total number of sections described with no fibrosis, slight fibrosis or moderate/severe fibrosis and no fibrogenesis, slight fibrogenesis or moderate/severe fibrogenesis (as defined in "Materials and Methods").

以上的与纤维化的活检在纤维生成区域有 YKL-40 的阳性染色。

## 讨论

我们目前的研究结果证实, 血清 YKL40 浓度在慢性肝病患者增加。大多数有酒精性肝硬化或肝炎后肝硬化患者的血清 YKL40 升高, 且在同时患有酒精性肝硬化与酒精性肝炎患者的血清 YKL40 水平最高。这些患者血清 YKL-40 的中值平均为正常水平的 3 倍, 并且许多已超过 5 倍。非肝硬化纤维化患者的血清 YKL40 含量范围由正常开始范围逐渐增加。血清 YKL40 与纤维化程度密切相关, 由病理患者的中度至重度纤维化最高水平来确定。轻微纤维化患者血清 YKL-40 升高到较小程度, 但这种升高是仍然显著大于无纤维化患者。

我们还利用免疫组织化学染色研究低温恒温器中肝活检标本 YKL40 的定位。阳性染色的 YKL-40 被发现在肝纤维化的细胞外基质中, 但在肝细胞或正常肝没有被发现。在同一活检程度 YKL40 阳性染色程度和肝纤维化和纤维化相关。在轻微纤维化患者的肝门束周围增加结缔组织区域发现 YKL-40 阳性染色。肝活检证实酒精性肝硬化伴随酒精性肝炎, YKL40 抗原的强染色被发现在持续纤维化领域。在老熟纤维间隔并未发现染色 YKL-40, 这区域缺乏纤维化的迹象。这些发现表明, 血清 YKL40 变异肝脏疾病的病因无关, 但依赖于肝纤维化和持续纤维化的程度。

血清 YKL-40 和血清碱性磷酸酶或血清天冬氨酸氨基转移酶相关性较低, 血清白蛋白和凝血因子的逆相关性也较低。血清白蛋白和凝血因子等反映肝细胞的功能, 但可能间接地反映纤维化的程度, 因为窦周毛细血管创建一个扩散阻挡层从而限制由肝细胞合成的蛋白质的运输。血清 YKL40 和血清透明质酸与血清

PIIINI 之间发现最高的相关系数。透明质酸是一种多糖，在几乎所有的结缔组织（24）和肝纤维化透明质酸中存在，是细胞外基质的组分。PIIINP 是原胶原 III 转化成胶原 III 的 N-末端裂解产物，肝纤维化细胞外基质的组分。在肝脏中 PIIINP 和乙酰透明质酸都是由肝星状细胞合成和参与内皮肝细胞的代谢（24-27）。根据其他研究中，我们发现大多数肝硬化患者的血清中 PIIINP 和血清透明质酸水平增加（28-41）。血清透明质酸通常存在于正常的脂肪肝与非肝硬化肝纤维化患者，而这些患者的血清 PIIINP 水平分别增加 45% 和 79%，分别多元回归分析表明，血清 YKL-40、PIIINP 和透明质酸跟肝纤维化程度的自主信息相关。

我们的研究结果表明，血清 YKL-40 提供纤维化的信息，纤维化跟血清 PIIINP 和血清透明质酸的不同。血清 YKL40 在酒精肝硬化伴有酒精性肝炎患者中显著升高，而血清 PIIINP 和透明质酸都没有升高。此外，血清 YKL40 浓度似乎是区分轻微纤维化患者和无纤维化患者最好的三个血清学标志之一。这表明，血清 YKL40 可能是早期纤维化和纤维形成过程中较好的标记物。我们先前报道，YKL-40 是从肝脏-系统（17）释放。这是相对于血清 PIIINP 和肝功能正常患者和酒精性肝病患者肝内脏提取的透明质酸而言。肝硬化患者发现的高血清 PIIINP 和透明质酸水平可能在部分纤维化部位合成增加，在部分肝功能障碍代谢减少，从而降低肝窦内皮细胞功能。

肝细胞 YKL-40 的细胞来源是未知的。我们认为，肝星状细胞可能是在肝纤维化过程中分泌 YKL-40 的来源。这些细胞在肝纤维化中起（42-44）核心作用，存在于肝细胞和内皮细胞紧密接触的狄氏空间。大多数的细胞外基质蛋白（胶原%非胶原结构的糖蛋白，葡萄糖胺聚糖，蛋白聚糖，弹性蛋白）和降解金属蛋白酶是由肝星状细胞在肝纤维化（3,42-44）的形成过程中合成的。此外，肝星状细胞在功能上和形态上与分泌的 YKL-40 的细胞相关（42 - 44），如平滑肌细胞（12）和肌成纤维细胞（Johansen 的 JS，个人观察）。在某些情况下 YKL40 也可由分化（7,13,15）的晚期阶段巨噬细胞分泌，和活化的嗜中性粒细胞（16）分泌的。我们发现，YKL-40 抗原在肝细胞坏死和酒精性肝炎的区域强表达，在这些情况下，YKL-40 还可以起源于活化的嗜中性粒细胞和巨噬细胞。

YKL-40 的生物学功能是未知的。该蛋白由各种细胞类型产生，特别是位于增加的重塑/降解或细胞外基质（4,5,7,9,11,12,15,16）炎症的组织细胞。由于其几丁质和肝素结合特性（12,13），YKL-40 可能具有在细胞外基质蛋白的粘附性的功能，它可能在组织重塑和细胞迁移中起作用。哺乳动物未发现甲壳素，并没有研究能够证明几丁质酶或 YKL-40（5,6,13）的透明质酸酶的活性。近日，脊椎动物合酶已经确定（45-47），能产生短期绵延几丁质，为启动透明质酸合成所必

需 (46)。可能是 YKL-40 识别透明质酸前体作为底物并干扰其合成，从而影响局部透明质酸水平。YKL-40 的肝素结合位点的生理配体可以是串珠素，它是基底膜主要的硫酸乙酰肝素蛋白多糖，也在细胞外基质表达 (48)。串珠素被认为参与细胞的迁移和增殖，并作为细胞外基质分子粘附细胞。研究表明，串珠素可以存储，激活或抑制生长因子和细胞因子 (48)，在纤维形成中发挥重要作用。人肝星状细胞和内皮细胞表达串珠素，而肝细胞和枯否细胞却没有 (49-51) 。免疫组织化学研究已经证实串珠素在正常人肝中肝门束 (49,50) 的正弦信号和血管中的染色。在受损的大鼠肝与肝硬化，在肝窦周围地区，在纤维间隔，并在坏死区发现串珠素阳性染色 (51)，即在肝硬化样本中，在串珠素同一领域发现 YKL40 阳性染色。

总之，本研究的结果表明血清 YKL-40 浓度可为肝脏疾病患者提供肝纤维化和持续纤维化的信息。未来的纵向研究应评估血清 YKL-40 与其他血清学指标，如血清 PIIINP，血清透明质酸和金属蛋白酶组合可用于检测 (酒精) 病人是否有高风险发展趋势，能否从脂肪肝转化成更严重的肝脏损害，尤其是针对一些早期纤维化。