

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003888

VWF:Ag 在 HBV 相关性肝脏疾病中的临床作用研究

程 瑜¹, 余 爽¹, 代震宇², 蒋婷婷³, 白 莹³, 黄佳佳¹, 李 月¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010; 2. 重庆两江新区中医院关节与运动创伤科, 重庆 401120;

3. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

【摘要】目的: 评估血浆血管性血友病因子(von willebrand factor, VWF)及其血管性血友病因子裂解酶(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, member 13, ADAMTS13)在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)相关肝病(慢性肝炎、肝硬化、肝衰竭、肝癌)中的诊断价值及临床意义, 分析 VWF 对肝癌细胞的影响。**方法:** 检测患者及健康人群 VWF 抗原(von willebrand factor antigen, VWF:Ag)、ADAMTS13 及相关临床指标, 通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)确定诊断阈值, 并分析不同治疗策略对肝癌患者 VWF:Ag 水平的影响。利用细胞计数试剂盒-8(cell counting Kit-8, CCK-8)实验检测 VWF 蛋白对 HepG2.2.15 肝癌细胞增殖的影响, 并分析其对甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)分泌的影响。**结果:** ①除肝炎组外, 各肝病组的 VWF:Ag 均明显高于健康组($P<0.001$), 而 ADAMTS13 在各组均升高($P<0.001$); ②VWF:Ag 与丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、纤维蛋白或纤维蛋白原降解产物(fibrin/fibrinogen degradation product, FDP)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)/白蛋白(albumin, ALB)呈正相关, 与血小板计数(platelet count, Plt)、ALB、ALT/AST 呈负相关; ③VWF:Ag 诊断截断值: 肝炎组 74.5%(AUC=0.604)、肝硬化代偿组 162.5%(AUC=0.784)、失代偿组 203.5%(AUC=0.999)、肝衰竭组 227.1%(AUC=0.999)、肝癌组 182.5%(AUC=0.945); ④肝癌患者 VWF:Ag 与肝功能分级相关(失代偿>代偿, $P<0.05$), 与治疗方式无关; ⑤0.04 $\mu\text{g/mL}$ VWF 抑制肝癌细胞增殖($P<0.05$)。**结论:** VWF:Ag 是 HBV 相关肝病进展的有效生物标志物, 其水平反映肝功能损伤程度, 且低浓度 VWF 能抑制肝癌细胞增殖, 但 ADAMTS13 水平升高与疾病严重性无明确关联。

【关键词】 血管性血友病因子; 血管性血友病因子裂解酶; 乙型肝炎病毒; 生物标志物; 临床研究

【中图分类号】 R733

【文献标志码】 A

Clinical role of von Willebrand factor antigen in HBV-related liver diseases

Cheng Yu¹, Yu Shuang¹, Dai Zhenyu², Jiang Tingting³, Bai Ying³, Huang Jijia¹, Li Yue¹

(1. Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Joint and Sports Traumatology, Chongqing Liangjiang New Area Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: This study aimed to evaluate the diagnostic value and clinical significance of plasma von Willebrand factor (VWF) and its cleaving protease ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, member 13) in hepatitis B virus (HBV)-associated liver diseases (chronic hepatitis, cirrhosis, hepatic failure, hepatocellular carcinoma), and to investigate the effects of VWF on hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods:** VWF antigen (VWF:Ag), ADAMTS13 levels, and clinical parameters were measured in patients and healthy controls. Diagnostic thresholds were determined through ROC curve analysis. The impact of different therapeutic strategies on VWF:Ag levels in HCC patients was assessed. CCK-8 assays were employed to examine the effects of VWF protein on HepG2.2.15 cell proliferation and alpha-fetoprotein (AFP) secretion. **Results:** ① VWF:Ag levels were significantly elevated in all liver disease groups compared to controls ($P<0.001$), except in hepatitis patients. ADAMTS13 antigen levels increased across all disease groups ($P<0.001$). ② VWF:Ag demonstrated positive correlations with alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), AFP, fibrin/fibrinogen degradation products (FDP), prothrombin time (PT), and TBIL/albumin (ALB) ratio (all $P<0.05$), while showing negative correlations with platelet count (PLT), ALB, and ALT/AST ratio. ③ Diagnostic cutoff values for VWF:Ag were estab-

作者简介:程 瑜, Email: 305462@hospital.cqmu.edu.cn,

研究方向:肝病的早期诊断预防。

通信作者:李 月, Email: 300922@hospital.cqmu.edu.cn。

基金项目:重庆市自然科学基金面上资助项目(编号:CSTB2022 NSCQ-MSX0060, CSTB2023NSCQ-MSX0342)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250618.1608.003>

(2025-06-19)

lished: 74.5% (AUC=0.604) in hepatitis group, 162.5% (AUC=0.784) in liver cirrhosis compensatory group, 203.5% (AUC=0.999) in decompensated group, 227.1% (AUC=0.999) in liver failure group, 182.5% (AUC=0.945) in liver cancer group. ④HCC patients exhibited VWF: Ag levels correlating with hepatic functional reserve (decompensated > compensated, $P<0.05$), independent of treatment modalities. ⑤Low-dose VWF (0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly inhibited HCC cell proliferation ($P<0.05$). **Conclusion:** VWF: Ag serves as a robust biomarker for monitoring HBV-related liver disease progression, with levels reflecting hepatic functional impairment. The antiproliferative effect of low-concentration VWF on HCC cells suggests potential therapeutic implications. However, ADAMTS13 elevation showed no definitive association with disease severity.

【Key words】 von Willebrand factor; a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, member 13; hepatitis B virus; biomarker; clinical study

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种临床常见、传染性较强的 DNA 病毒, 属于嗜肝病毒科, HBV 引起的乙型肝炎在全世界广泛流行, 其感染具有潜伏性。HBV 感染引起的肝炎, 肝硬化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 依旧是全球性严重的公共卫生问题^[1]。据世界卫生组织报道, 全球约有 20 亿人曾感染过 HBV, 其中约有 3.6 亿为慢性乙型病毒肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者, 其中 10%~20% 可发展为肝硬化, 而肝硬化患者若不能及时干预最终有 1%~5% 可发展为 HCC^[2]。因此, CHB 被广泛认为是导致 HCC 发生的主要高危因素之一。我国 80% 的 HCC 患者合并 HBV 感染, HBV 感染者较正常人群发生 HCC 的概率更高^[3]。HCC 发病隐匿, 恶化迅速, 早期缺乏典型症状, 一旦发现多于中晚期, 近 80% 的 HCC 患者就诊时已失去根治性手术治疗的最佳时机^[4]。因此, 寻求 HBV 相关性肝脏疾病的早期诊断和预测标志物显得尤为重要。近年来, 许多生物标志物已被开发用于评估肝硬化、肝癌的进展及预后, 包括血清肿瘤标志物、中性粒细胞、淋巴细胞比值、甲胎蛋白、透明质酸等^[5-9], 但其存在许多不足, 例如缺乏公认的诊断阈值, 早期诊断敏感性不佳, 容易受到其他因素 (如炎症) 影响等, 因此亟需发现一种更为高效稳定, 能评估 HBV 相关性肝脏疾病发展的生物标志物。

血管性血友病因子 (von willebrand factor, VWF) 是一种多聚体糖蛋白。正常情况下, VWF 主要由血管内皮细胞和巨核细胞合成, 血小板也可以合成少量 VWF^[10]。肝损伤时, 肝窦内皮细胞也可表达 VWF, VWF 可引起血小板在血管损伤部位黏附聚集形成微血栓^[11-13], 是反映血管内皮受损的标志物之一^[14]。血管性血友病因子裂解酶 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, member 13, ADAMTS13) 是 VWF 的特异性裂解酶,

血浆中 ADAMTS13 主要来源于肝星状细胞和血管内皮细胞, ADAMTS13 的异常将影响 VWF 的分子大小^[15]。近年来, 围绕血管性血友病因子抗原 (von willebrand factor antigen, VWF:Ag) 作了很多的研究。Curakova Ristovska E 等^[16]发现 VWF:Ag 可预测肝硬化患者的死亡率, Schwarzer R 等^[17]研究发现 VWF:Ag 与血小板的比值较 VWF:Ag 更好地预测肝硬化患者的失代偿与死亡率, Takaya H 等^[18]研究发现 VWF:Ag 与 VWF 的裂解酶 ADAMTS13 可用于观察肝细胞癌患者进行索拉非尼靶向药物治疗的疗效, 该课题组利用 VWF:Ag 与 ADAMTS13 也观察了肝细胞癌患者进行肝动脉灌注化疗的疗效^[19]。Driever EG 等^[20]研究了 VWF/ADAMTS13 的不平衡会导致患者凝血与纤溶的异常, 从而影响急性肝衰竭患者的预后。

HepG2.2.15 是人肝癌细胞 HepG2 的衍生株。该细胞株由 2 个头尾相连的 HBV-DNA 全基因的重组质粒转染受体细胞 HepG2 而成, 可在体外无性繁殖, 能够长期稳定地在细胞培养上清中分泌 HBsAg、HBeAg 和完整的 Dane 颗粒, 而且还能产生大量的复制中间体, 是目前研究 HBV 复制、肝细胞免疫应答的细胞株。

VWF:Ag 是临床检测 VWF 表达水平的指标。大量证据表明^[16-19], 血浆 VWF:Ag 在肝硬化的转归、肝癌的疗效观察中具有重要研究价值, 但 VWF:Ag 对 HBV 感染的原发性肝细胞癌的作用, 目前研究甚少。本研究旨在观察 VWF:Ag 在 CHB、HBV 相关肝硬化、肝衰竭、HBV 相关 HCC 中的表达情况, 了解 VWF:Ag 在 HBV 感染相关性肝脏疾病演变中的作用。分析经各种治疗策略干预后的肝细胞癌患者血浆 VWF:Ag 与 ADAMTS13 的水平, 探讨差异出现的临床意义。进一步研究 VWF 对 HepG2.2.15 肝癌细胞增殖的影响, 以及对肝癌标志物甲胎蛋白 (alpha-

fetoprotein, AFP)表达的影响,评估 VWF 在由 HBV 感染引起的原发性肝细胞癌中的作用,为原发性肝细胞癌的诊断、治疗以及预后探索新的研究思路。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2020 年 9 月至 2023 年 4 月重庆医科大学附属第二医院健康人群 108 例、CHB 128 例、HBV 相关肝硬化代偿组 48 例、HBV 相关肝硬化失代偿组 98 例、HBV 相关肝衰竭组 130 例、HBV 相关肝癌组 471 例。纳入标准:①患者为 HBV 感染或 HBV 相关性肝脏疾病;②患者或患者家属自愿参与并签署知情同意书。排除标准:①合并其他类型肝炎;②精神系统疾病,无法正常沟通交流;③因药物或乙醇导致的肝脏疾病;④妊娠期或哺乳期患者。本研究经重庆医科大学附属第二医院伦理委员会审查批准[批件号:2024 年伦审第(125)号]。

1.2 研究方法

1.2.1 仪器与试剂 检测纳入研究的患者及对照组的实验室指标包括,反映肝功能的标志物:白蛋白(albumin, ALB)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、TBIL/ALB、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、ALT/AST;反映凝血与纤溶功能的标志物:血小板计数(platelet count, PLT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、纤维蛋白或纤维蛋白原降解产物(fibrin/fibrinogen degradation product, FDP);肿瘤标志物:甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP);血浆 VWF:Ag。空腹静脉血置于不同真空采血管中。SYSMEX XN 系列全自动血细胞分析流水线、日立 7600-210 全自动生化分析仪、STAGO 全自动血凝仪、索灵化学发光仪、罗氏 411 化学发光检测仪,使用配套的定标品、质控品或者佰乐的定标品、质控品。样本检测前均确保室内质控在控。

1.2.2 血浆 ADAMTS13 含量测定 收集 CHB、HBV 相关肝硬化、肝衰竭、HCC 患者以及正常对照组的枸橼酸钠抗凝的抗凝血,3 550 r/min 离心 15 min,收集上层血浆,置于-80 °C 冰箱保存,使用过程中避免反复冻融。在开始测定时,需提前将血浆置于 37 °C 孵箱复融。采用 ADAMTS13 酶联免疫吸附实验试剂盒(江苏酶免实业有限公司 Jiangsu Meimian industrial Co.Ltd,批号:202112),对患者和健康对照组的血浆 ADAMTS13 含量进行测定,酶标仪读板,检测结果以 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表示。

1.2.3 评价 VWF:Ag 作为肝病生物标志物的诊断效能

1.2.3.1 HBV 相关性肝病各亚组间 VWF:Ag 的差异性分析 将 2020 年 9 月至 2023 年 4 月入组的 983 例样本,包括健康人群组与 HBV 相关性肝病各组患者样本,检测血浆 VWF:Ag 的水平,并进行组间差异分析。

1.2.3.2 VWF:Ag 与临床肝病相关生物标志物的相关性分析 分析各组 VWF:Ag 水平与肝功能相关指标 ALT、AST、ALT/AST、TBIL、ALB、TBIL/ALB、AFP、PLT、FDP、PT 在诊断 CHB、HBV 相关肝硬化(代偿与失代偿)、肝衰竭、HCC 病理状态下的相关性,计算 Spearman 相关系数。

1.2.3.3 确定 VWF:Ag 作为肝病生物标志物的诊断效能 绘

制 VWF:Ag 在 CHB、HBV 相关肝硬化(代偿与失代偿)、肝衰竭、HCC 下的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC),确定最佳阈值,并计算该阈值下的准确率、灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值。

1.2.3.4 比较各生物标志物对 HBV 相关性肝病的诊断效能 比较 VWF:Ag 与 ALT、AST、ALT/AST、TBIL、ALB、TBIL/ALB、AFP、PLT、FDP、PT 对 HBV 相关性肝病的诊断效能。

1.2.3.5 HBV 相关性肝病患者 ADAMTS13 含量的差异分析 比较分析 CHB、HBV 相关肝硬化(代偿与失代偿)、肝衰竭、HCC 患者的 ADAMTS13 含量。

1.2.3.6 HBV 相关性 HCC 患者的 VWF:Ag 与 ADAMTS13 的差异分析 步骤如下:①临床医生根据肝细胞癌患者的分期选择不同的治疗方式,本研究将肝细胞癌患者根据治疗方式分成肝切除+其他治疗组(早期肝癌)、经导管动脉化疗栓塞(transarterial chemoembolization, TACE)+其他治疗组(中晚期)、综合治疗组(晚期),分析比较各组间 VWF:Ag 与 ADAMTS13 含量。②将所有肝细胞癌患者根据其肝脏功能的代偿状态进一步分为肝癌患者肝硬化失代偿组与肝癌患者肝硬化代偿组。评价 2 组间的 VWF:Ag 与 ADAMTS13 抗原含量。

1.2.4 VWF 纯蛋白对 HepG2.2.15 细胞作用影响的增殖实验 将 HepG2.2.15 细胞计数后分别以 2×10^4 个/mL,每孔加入 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板中并放入含 5% CO_2 , 37 °C 的培养箱中培养。培养 24 h 后更换培养基并将 VWF 纯蛋白分别以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度加入培养基中,设不加 VWF 纯蛋白组为对照组,随后放入含 5% CO_2 , 37 °C 的培养箱中培养。分别在加入 VWF 纯蛋白 24、48、72 h 后弃去培养基并用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤 1 次加入 100 μL 新的培养基,向待检测孔中每孔加入 10 μL 细胞计数试剂盒-8(cell counting Kit-8, CCK-8)溶液,随后将 96 孔板放入含 5% CO_2 , 37 °C 的培养箱孵育 1.5 h 后测定其吸光度。

1.2.5 细胞上清 AFP 指标检测 将 HepG2.2.15 细胞培养 24 h 后更换培养基并将 VWF 纯蛋白分别以 0.00、0.04、0.20、0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度加入培养基中。以不加 VWF 纯蛋白组为对照组,分别处理细胞 24、48、72 h 后检测细胞上清中 AFP 含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析数据。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用 t 检验或方差分析;非正态分布计量资料使用中位数及四分位数[$M_d(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis H 检验,采用 Dunn 法进行多重比较组间差异;多重比较显著性以 Benjamini-Hochberg 方法校正。非正态数据计算 Spearman's 相关系数。

VWF 纯蛋白对 HepG2.2.15 细胞增殖和 AFP 含量的影响采用重复测量设计,分别考察加入 VWF 的浓度和作用时间对细胞增殖和上清液 AFP 含量的影响。采用重复测量方差分析考察干预因素,使用 Mauchly 检验评估球形假设,当违反时采用 Greenhouse-Geisser 校正。采用 Dunnett 法以未加入 VWF 样本为基准,进行多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 患者的临床特征

2020 年 9 月至 2023 年 4 月共入组 983 例,健康人群有 108 例(11%),肝炎有 128 例(13%),肝硬化代偿有 48 例(4.9%),肝硬化失代偿有 98 例(10%),肝衰竭有 130 例(13.2%),肝癌有 471 例(47.9%)。各肝病亚组基线特征见表 1。年龄、性别以及以下纳入的临床常用于反映肝脏功能的生物标志物,在 5 个肝病亚组间差异有统计学意义。

2.2 各组人群 VWF:Ag 检测值的差异分析

健康人群与肝脏疾病各组血浆 VWF:Ag 的水平见表 2,组间差异分析见图 1。Kruskal-Wallis H 检验提示各组检测

值差异有统计学意义($P < 0.001$)。进一步以 Dunn 法将各组分别与健康组比较,显著性采用 Benjamini-Hochberg 校正。结果显示肝硬化代偿组、肝硬化失代偿组、肝衰竭组、肝癌组 VWF:Ag 的含量均显著高于健康人群组,差异有统计学意义($P < 0.001$),提示 VWF:Ag 随着肝病严重程度增加而递增。

2.3 VWF:Ag 与临床肝病相关生物标志物的相关性分析

分析各组 VWF:Ag 水平与 ALT、AST、ALT/AST、TBIL、ALB、TBIL/ALB、AFP、PLT、FDP、PT 在肝炎、HBV 相关肝硬化(代偿与失代偿)、肝衰竭、肝癌多种病理状态下的相关性,计算 Spearman's 相关系数,结果见表 3。VWF:Ag 与 ALT、AST、TBIL、AFP、FDP、PT 以及 TBIL/ALB 呈正相关,与 PLT、ALB 成负相关。其中,VWF:Ag 与 AST、TBIL、ALB、TBIL/ALB 中度相关。

表 1 各肝病亚组患者的基线特征[n,%; $M_d(P_{25},P_{75})$]

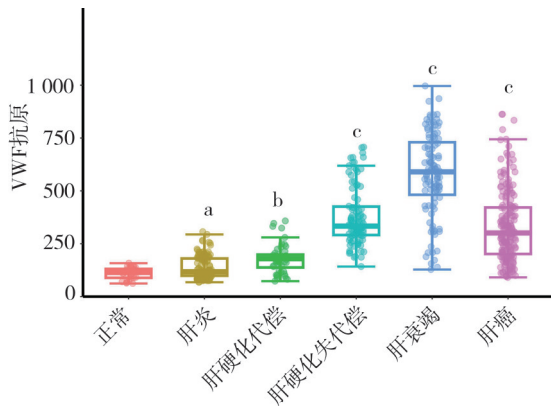
变量	肝炎	肝硬化代偿	肝硬化失代偿	肝衰竭	肝癌	χ^2 值	P 值
病例数(例)	128	48	98	130	471		
年龄(岁)	42(15,73)	48(27,67)	52(15,79)	49(15,85)	55(18,80)	164.40	<0.001
性别(男:女)	84:44	37:11	65:33	75:13	407:62	32.08	<0.001
ALT(U/L)	27(18,43)	27(21,37)	32(20,52)	81(50,345)	44(23,86)	181.72	<0.001
AST(U/L)	25(19,33)	28(23,34)	42(33,73)	111(71,245)	66(37,104)	225.03	<0.001
TBIL($\mu\text{mol/L}$)	11.40(8.50,17.30)	13.60(9.20,26.50)	29.10(17.00,61.40)	196.10(123.75,317.15)	33.75(15.10,71.05)	317.65	<0.001
ALB(g/L)	46.30(43.30,48.50)	44.30(39.00,47.90)	31.50(29.20,35.60)	31.75(29.00,33.80)	34.80(28.45,37.60)	311.04	<0.001
AFP(ng/L)	3.59(2.73,6.03)	3.59(2.73,6.03)	3.59(2.73,6.03)	3.59(2.73,6.03)	3.59(2.73,6.03)	256.32	<0.001
Plt($\times 10^4/\text{mm}^3$)	177(145,219)	127(82,168)	57(37,91)	83(49,119)	67(34,104)	258.55	<0.001
FDP($\mu\text{g/mL}$)	1.91(1.12,2.92)	2.85(1.78,5.80)	7.81(2.10,16.09)	6.50(3.50,19.30)	10.05(4.56,17.60)	208.96	<0.001
PT(s)	14.40(13.10,16.60)	17.60(16.70,18.80)	17.90(16.15,19.75)	20.95(19.25,23.40)	18.30(16.35,20.80)	149.87	<0.001

表 2 各组人群 VWF:Ag 检测值的差异分析[n,%; $M_d(P_{25},P_{75})$]

组别	例数	VWF:Ag	Z 值	P 值
健康人群	108	114.00(88.75,131.00)		
肝炎	128	117.50(98.50,180.50)	1.14	0.254
肝硬化代偿	48	179.50(137.75,198.50)	2.57	0.013
肝硬化失代偿	98	333.50(291.50,425.75)	8.48	<0.001
肝衰竭	130	590.00(481.50,730.00)	11.40	<0.001
肝癌	471	301.00(201.50,421.50)	7.43	<0.001

表 3 VWF:Ag 与其他生物标志物的相关性分析

r_s	VWF:Ag	PLT	ALT	AST	TBIL	ALB	AFP	FDP	PT	ALT/AST	TBIL/ALB
VWF:Ag	1.000	-0.377	0.350	0.563	0.519	-0.584	0.381	0.414	0.441	-0.282	0.576
PLT	-0.377	1.000	-0.082	-0.222	-0.413	0.417	-0.136	-0.190	-0.497	0.200	-0.447
ALT	0.350	-0.082	1.000	0.775	0.410	-0.205	0.384	0.074	0.220	0.383	0.415
AST	0.563	-0.222	0.775	1.000	0.573	-0.487	0.476	0.293	0.354	-0.211	0.609
TBIL	0.519	-0.413	0.410	0.573	1.000	-0.487	0.278	0.304	0.680	-0.159	0.980
ALB	-0.584	0.417	-0.205	-0.487	-0.487	1.000	-0.311	-0.471	-0.591	0.369	-0.630
AFP	0.381	-0.136	0.384	0.476	0.278	-0.311	1.000	0.179	-0.006	-0.116	0.312
FDP	0.414	-0.190	0.074	0.293	0.304	-0.471	0.179	1.000	0.359	-0.292	0.349
PT	0.441	-0.497	0.220	0.354	0.680	-0.591	-0.006	0.359	1.000	-0.131	0.716
ALT/AST	-0.282	0.200	0.383	-0.211	-0.159	0.369	-0.116	-0.292	-0.131	1.000	-0.203
TBIL/ALB	0.576	-0.447	0.415	0.609	0.980	-0.630	0.312	0.349	0.716	-0.203	1.000



注:a,与正常对照组比较, $P=0.254$;b,与正常对照组比较, $P=0.013$;c,与正常对照组比较, $P<0.001$

图1 各个疾病亚组 VWF 抗原的差异分析

2.4 确定 VWF:Ag 作为肝病生物标志物的诊断效能

绘制 VWF:Ag 在肝炎组、HBV 相关肝硬化(代偿与失代偿)组、肝衰竭组、HBV 相关肝癌组下的 ROC 曲线,确定最佳阈值,并计算该阈值下的准确率、灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值,见图 2。在 5 种 HBV 相关肝脏疾病状态下,

血浆 VWF:Ag 均表现出不俗的诊断效能,肝癌组的诊断效能较高($AUC=0.945$),肝硬化失代偿组、肝衰竭组表现出最高诊断效能($AUC=0.999$)。

2.5 比较其余生物标志物对 HBV 相关性肝病的诊断效能

比较 PLT、ALT、AST、TBIL、ALB、AFP、FDP、PT 在 HBV 相关性肝病的诊断效能,发现 PT 能有效预测 HBV 相关性肝脏疾病的发展,与其他临床肝病相关生物标志物相比,PT 在各组中的诊断效能均最高($AUC>0.900$),肝硬化代偿组、肝衰竭组表现出最高诊断效能($AUC=0.999$)。结果见表 4。

2.6 HBV 相关性肝病患者 ADAMTS13 的差异分析

共入组 610 例病例,其中健康人群 30 例(4.92%),肝炎 128 例(20.98%),肝硬化代偿期 48 例(7.87%),肝硬化失代偿期 98 例(16.07%),肝衰竭 107 例(17.54%),肝癌 199 例(32.62%)。各组的 ADAMTS13 抗原含量分别为:健康人群 2.26(1.91, 2.54) $\mu\text{g/mL}$,肝炎 4.18(3.14, 5.99) $\mu\text{g/mL}$,肝硬化代偿期 3.51(2.92, 6.57) $\mu\text{g/mL}$,肝硬化失代偿期 6.43(4.00, 8.44) $\mu\text{g/mL}$,肝衰竭 7.84(4.85, 9.07) $\mu\text{g/mL}$,肝癌 5.92(2.77, 8.12) $\mu\text{g/mL}$ 。结果显示肝炎组、肝硬化代偿组、肝硬化失代偿组、肝衰竭组、肝癌组 ADAMTS13 均显著高于健康人群组,差异具有统计学意义($P<0.001$)。见图 3。

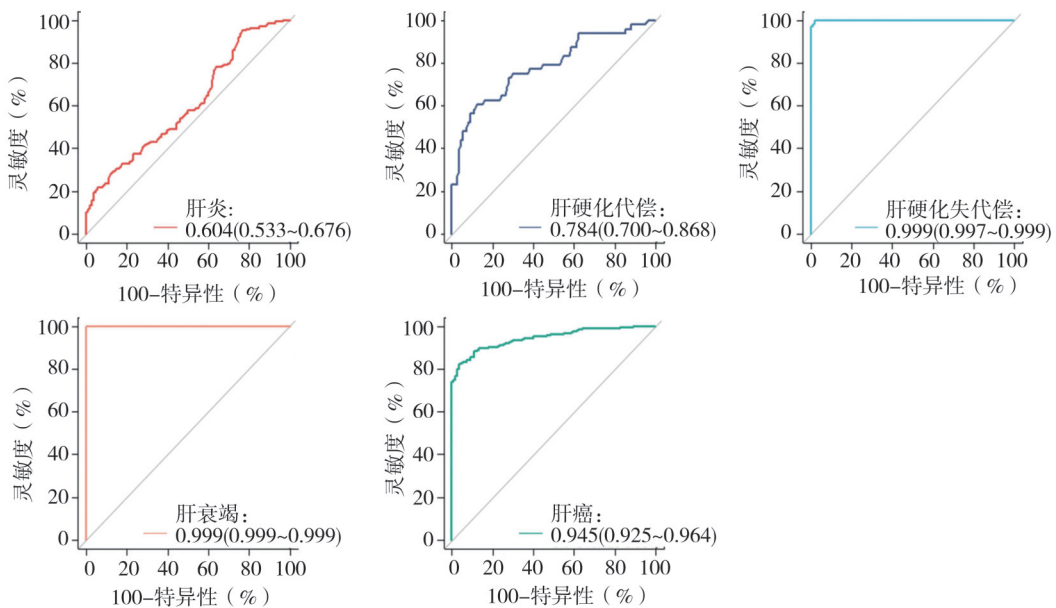
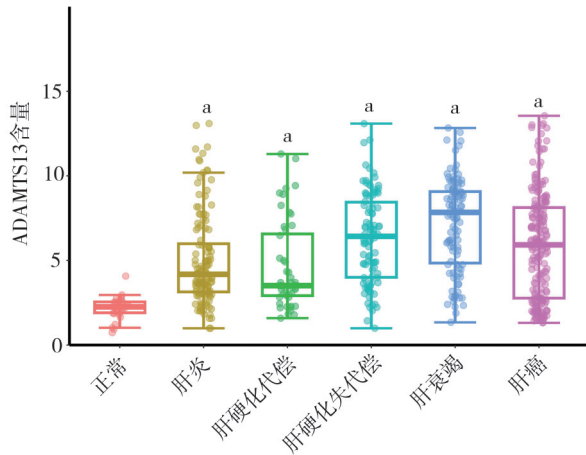


图2 VWF:Ag 在各个疾病亚组的 ROC 曲线

表 4 其他生物标志物在各个疾病亚组的诊断效能[AUC(95%CI)]

项目	肝炎	肝硬化代偿	肝硬化失代偿	肝衰竭	肝癌
PLT($\times 10^4/\text{mm}^3$)	0.736(0.693~0.778)	0.895(0.864~0.927)	0.976(0.967~0.986)	0.966(0.953~0.978)	0.871(0.850~0.893)
ALT(U/L)	0.745(0.689~0.800)	0.781(0.700~0.862)	0.785(0.726~0.845)	0.940(0.902~0.979)	0.853(0.822~0.883)
AST(U/L)	0.683(0.624~0.743)	0.808(0.729~0.887)	0.917(0.887~0.957)	0.986(0.966~0.999)	0.933(0.912~0.953)
TBIL($\mu\text{mol/L}$)	0.617(0.554~0.682)	0.702(0.613~0.791)	0.920(0.881~0.959)	0.999(0.993~0.999)	0.695(0.651~0.739)
ALB(g/L)	0.515(0.451~0.580)	0.609(0.525~0.694)	0.974(0.958~0.990)	0.989(0.978~0.999)	0.892(0.861~0.923)
AFP(ng/L)	0.605(0.550~0.659)	0.674(0.600~0.748)	0.572(0.497~0.647)	0.806(0.737~0.876)	0.738(0.699~0.778)
FDP($\mu\text{g/L}$)	0.615(0.488~0.741)	0.829(0.704~0.954)	0.823(0.755~0.891)	0.926(0.880~0.973)	0.856(0.812~0.901)
PT(s)	0.926(0.868~0.984)	0.999(0.999~0.999)	0.998(0.991~0.999)	0.999(0.999~0.999)	0.962(0.946~0.978)



注:a,与正常对照组比较, $P<0.001$

图3 各个疾病亚组ADAMTS13含量的差异分析

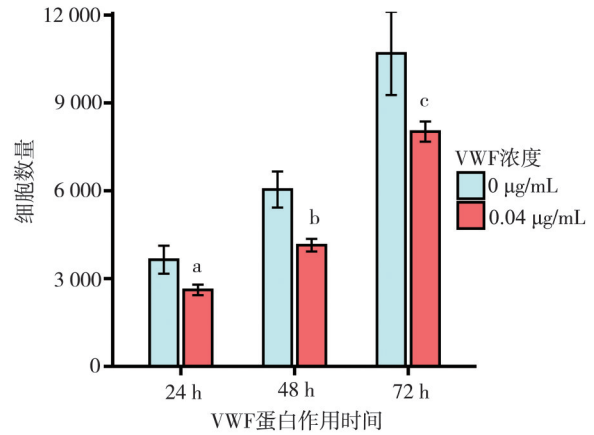
2.7 HBV相关性HCC患者的VWF:Ag与ADAMTS13的差异分析

2.7.1 根据肝细胞癌患者的分期选择不同的治疗方式分组比较 将肝细胞癌患者根据治疗方式分成肝切除组(早期肝癌)、肝动脉介入治疗(TACE)(中晚期)、综合治疗组(晚期),分析各组间VWF:Ag与ADAMTS13水平,见表5。不同治疗组间的VWF:Ag水平,差异无统计学意义($P=0.055$),不同治疗组间的ADAMTS13水平,差异无统计学意义($P=0.586$)。

2.7.2 根据肝细胞癌患者肝硬化代偿状态分组比较 将所有肝细胞癌患者根据其肝硬化的代偿状态进一步分为肝癌患者肝硬化失代偿组与肝癌患者肝硬化代偿组,见表6。肝癌患者中失代偿组比代偿组的VWF:Ag显著增高,差异有统计学意义($P=0.021$)。肝癌患者中失代偿组比代偿组的ADAMTS13含量稍增高,差异无统计学意义($P=0.305$)。

2.7.3 低浓度VWF蛋白对HepG2.2.15细胞增殖的影响 分别加入终浓度为0 $\mu\text{g/mL}$ 和0.04 $\mu\text{g/mL}$ 的VWF蛋白,作用24、48、72 h后,对HepG2.2.15细胞的增殖活性进行分析。Mauchly球形检验,差异有统计学意义($P=0.011$),采用Greenhouse-Geisser校正自由度。分析结果显示,低浓度VWF对HepG2.2.15细胞增殖影响显著($F=16.512, P=0.015$, 广义 $\eta^2=0.735$),且低浓度VWF对细胞增殖的影响与培养时

间无关(交互效应 $F=4.355$,校正 $P=0.088$,广义 $\eta^2=0.263$)。进一步对24、48、72 h的2组细胞增殖进行比较,发现低浓度VWF对HepG2.2.15细胞增殖有持续抑制作用,但作用24 h差异无统计学意义($P=0.091$),作用48 h和72 h后抑制增殖,差异有统计学意义($P=0.005, P<0.001$)(图4)。



注:a,与VWF蛋白作用24 h的空白对照组比较, $P=0.021$;b,与VWF蛋白作用48 h的空白对照组比较, $P=0.007$;c,与VWF蛋白作用72 h的空白对照组比较, $P=0.033$

图4 VWF蛋白作用不同时间后HepG2.2.15细胞活力间的差异性分析

2.7.4 VWF蛋白对HepG2.2.15细胞上清中AFP水平的影响 分别向培养基中加入0、0.04、0.2、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 的VWF蛋白,随后分别作用24、48、72 h,以观察不同浓度和时间对细胞的影响。HepG2.2.15细胞上清中AFP的水平变化进行分析。Mauchly球形检验差异有统计学意义($P<0.001$),采用Greenhouse-Geisser校正自由度。分析结果显示,加入VWF的浓度和作用时间均对上清液AFP水平的影响差异有统计学意义(VWF浓度: $F=54.062, P<0.001$ 、广义 $\eta^2=0.887$;作用时间: $F=4\ 912.146$ 、校正 $P<0.001$ 、广义 $\eta^2=0.997$),且浓度和作用时间有显著交互效应($F=31.437$ 、校正 $P<0.001$ 、广义 $\eta^2=0.879$)。AFP浓度随VWF的作用时间而增加(图5);而在相同作用时间下,进一步的多重比较表明,加入VWF后,细胞上清液AFP的浓度相比未加入VWF时均降低,且作用48h和72 h时,差异有统计学意义(P 均 <0.05)(图6)。

表5 不同治疗组间VWF:Ag和ADAMTS13的Kruskal-Wallis H检验[$M_d(P_{25}, P_{75})$]

项目	肝切除组($n=20$)	肝动脉介入治疗($n=118$)	综合治疗组($n=18$)	Kruskal-Wallis H检验	
				H值	P值
VWF:Ag	263.00(195.50, 350.25)	322.00(234.00, 451.00)	337.00(257.00, 504.75)	7.606	0.055
ADAMTS13	6.15(4.70, 7.29)	5.09(2.49, 8.05)	6.09(4.05, 7.42)	1.936	0.586

表6 肝癌患者失代偿与代偿组VWF:Ag和ADAMTS13比较[$M_d(P_{25}, P_{75})$]

项目	代偿组($n=48$)	失代偿组($n=98$)	两样本Mann-Whitney U检验	
			Z值	P值
VWF:Ag	298.00(215.25, 357.50)	334.50(226.25, 520.25)	-3.012	0.021
ADAMTS13	4.90(2.64, 7.74)	6.60(3.08, 8.08)	1.403	0.305

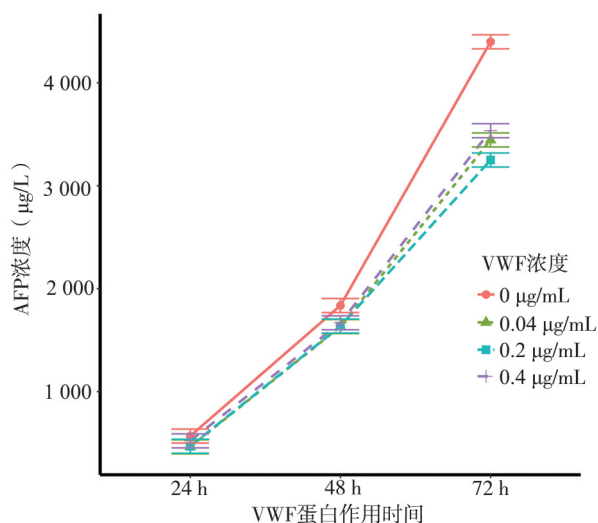


图5 VWF 蛋白不同作用时间对 HepG2.2.15 细胞上清 AFP 水平的影响

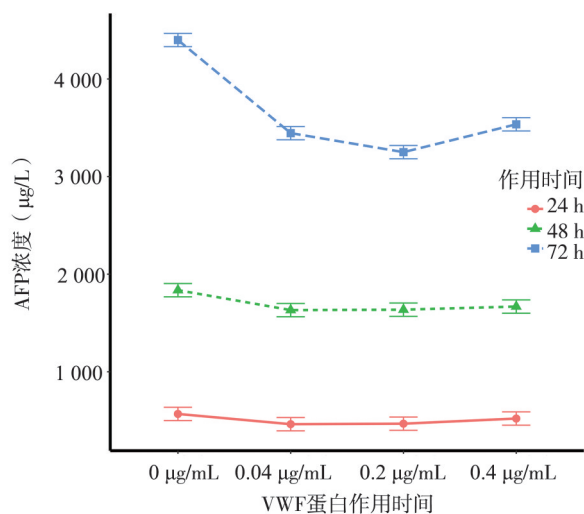


图6 不同 VWF 作用时间对 HepG2.2.15 细胞上清 AFP 水平的影响

3 讨论

VWF 是一种多聚糖蛋白,多聚体相对分子量在 500~20 000 kDa 间。由 1 个信号肽、前肽和成熟 VWF 蛋白组成。主要合成部位是血管内皮细胞,巨核细胞、血小板亦可合成少量 VWF。VWF 介导血小板黏附聚集于损伤的血管内皮,且与糖蛋白 II b/III a (glycoprotein II b/III a, GP II b/III a) 结合,参与血小板聚集;VWF 作为凝血因子 VIII (clotting factor VIII, FVIII) 的载体蛋白,避免 FVIII 被蛋白 C 灭活,延长 FVIII 的活性,支持凝血系统的持续活化。在肝脏疾病中,VWF 参与肝脏微循环障碍、调节血管再生、调控肿瘤细胞凋亡及转移,肝脏疾病时,受肝炎病毒、细菌衍生产物、免疫因素、内毒素等多种因素刺激

VWF 合成增加,VWF 大量释放入血。近年来的研究表明,血浆 VWF:Ag 在肝硬化的转归与肝癌的疗效观察中具有重要研究价值,但 VWF:Ag 对 HBV 感染的原发性肝细胞癌的作用,还需进一步研究。

本研究结果可以看出,VWF:Ag 随着 HBV 相关性肝脏疾病的严重程度增加,检测值越高。VWF 的表达水平有以下趋势:肝衰竭组>肝硬化失代偿组>肝癌组>肝硬化代偿组>肝炎组。肝脏疾病的血浆 ADAMTS13 的表达水平较正常人群上调:正常人群<肝硬化代偿组<肝炎组<肝癌组<肝硬化失代偿组<肝衰竭组。VWF:Ag 在 CHB 患者血浆中轻度增高,随着肝脏损伤的加重,VWF:Ag 含量逐渐增高,肝衰竭时含量最高。肝衰竭常伴随门脉高压,导致血管内皮细胞承受异常剪切力,触发 VWF 的释放;全身性炎症(如内毒素血症、细胞因子风暴)刺激内皮细胞分泌 VWF。肝衰竭、肝硬化失代偿组、肝癌组的 VWF 合成明显增加,内皮细胞或血小板可能代偿性分泌 ADAMTS13,以应对 VWF 的过度积累;全身性炎症激活内皮细胞,促进其对 ADAMTS13 的释放;同时肝脏对 ADAMTS13 的清除能力下降,可能导致血浆中 ADAMTS13 抗原水平升高。

相关性分析显示,VWF:Ag 与其他临床肝病生物标志物高度相关。当患者的肝脏功能越差,ALT、AST、TBIL、AFP、FDP、PT 以及 TBIL/ALB 检测值越高,PLT、ALB 以及 ALT/AST 比值则越低,VWF:Ag 含量越高。临床上,严重肝损伤患者血浆凝血因子活性检查时常显示,除 FVIII 外,其余凝血因子因为肝脏功能的降低会出现明显降低。而作为 FVIII 载体蛋白的 VWF:Ag 含量的增高,使 FVIII 出现不降反升的情况。

VWF:Ag 对 HBV 相关性肝脏疾病的诊断效能可以看出,VWF:Ag 能有效预测 HBV 相关性肝脏疾病的发展。肝癌组的诊断效能较高(AUC=0.945),肝硬化失代偿组、肝衰竭组表现出最高诊断效能(AUC=0.999),VWF:Ag 在肝硬化失代偿组的诊断效能高于本研究涉及的所有其它临床肝病相关的生物标志物。VWF:Ag 在肝衰竭组的诊断效能与 TBIL、PT 相同,高于其余标志物。除 VWF:Ag 外,PT 在肝脏疾病中的诊断效能最高,这与 PT 作为肝衰竭的诊断标准之一相符合。本研究的结果显示,VWF:Ag 有望成为肝硬化的转归、肝衰竭的诊断标准之一。

HBV 相关性 HCC 患者的 VWF:Ag 水平与其患者本身的肝功能相关,而与肿瘤的分期、临床治疗处理无关。HBV 相关性 HCC 患者的 ADAMTS13 抗原水平与其患者本身的肝功能无关,与肿瘤的分期、临床处理方式无关。不同治疗组间的 VWF:Ag 水平($P=0.055$)与不同治疗组间的 ADAMTS13 水平($P=0.586$)差异均无统计学意义。在本实验中

VWF:Ag 与肝癌病情严重程度无关。本研究将 HBV 相关性 HCC 患者根据其肝硬化的代偿状态分组,其中失代偿组比代偿组的 VWF:Ag 显著增高 ($P=0.021$)。但 HCC 患者中失代偿组与代偿组的 ADAMTS13 相比,差异无统计学意义 ($P=0.305$),该现象说明 HCC 患者血浆 VWF:Ag 的水平变化比 ADAMTS13 抗原水平的变化有统计意义,在 HCC 人群中检测 VWF:Ag 相比 ADAMTS13 更有临床意义。这与前面各组间 VWF:Ag、ADAMTS13 的差异分析的结论亦符合。

从本研究的临床患者结果显示,随着 HBV 相关性肝脏疾病的严重程度增加,肝癌组 VWF:Ag 并没有如预期升至最高。本课题进一步研究 VWF 与肝癌细胞的作用,结果显示,低浓度 VWF 蛋白对 HepG2.2.15 细胞增殖有明显的抑制作用,这可能是导致肝癌组 VWF:Ag 增高不如预期的原因:肝癌细胞增殖受到抑制,进一步减少细胞分泌 VWF:Ag。HepG2.2.15 细胞上清中 AFP 水平随着培养时间的延长而升高,但加入低浓度 VWF 蛋白后,AFP 的表达受到抑制。AFP 是肝癌的重要标志物,结果表明 VWF 可能抑制 HepG2.2.15 的 AFP 表达。后期,本课题将提高 VWF 蛋白的浓度,使其与血浆水平一致,再进一步研究 VWF 对肝癌细胞表达 AFP、乙肝标志物的影响。

综上,VWF:Ag 有助于判断慢性乙肝相关性肝病的发展,可能与原发性肝细胞癌的转归有关。且该生物标志物有望成为继凝血酶原时间后,肝硬化的转归、肝衰竭的诊断标准之一。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 程瑜、李月:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写;余爽:数据收集;代震宇:实验技术指导;蒋婷婷、白莹、黄佳佳:研究方案设计、论文修改

参 考 文 献

- [1] Howell J, Seaman C, Wallace J, et al. Pathway to global elimination of hepatitis B: HBV cure is just the first step[J]. *Hepatology*, 2023, 78(3):976-990.
- [2] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360):1345-1362.
- [3] Wang XR, Xiao L, Zhang CM, et al. Limitations and cautions of a family history of HBV-related cirrhosis/hepatocellular carcinoma as a condition for initiating antiviral therapy in patients with HBV infection. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2023, 31(11):1217-1219.
- [4] Sankar K, Gong J, Osipov A, et al. Recent advances in the management of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2024, 30(1):1-15.
- [5] Song T, Wang LL, Xin RP, et al. Evaluation of serum AFP and DCP levels in the diagnosis of early-stage HBV-related HCC under different backgrounds[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(10):300060520969087.
- [6] Jeng KS, Sheen IS, Lin SS, et al. The role of endoglin in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6):3208.
- [7] Shi K, Hou J, Zhang Q, et al. Neutrophil-to-high-density-lipoprotein-cholesterol ratio and mortality among patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Front Nutr*, 2023, 10:1127913.
- [8] Norman JS, Li PJ, Kotwani P, et al. AFP-L3 and DCP strongly predict early hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(6):1469-1477.
- [9] Xie L, Luo X. Diagnostic value of combined serum marker tests in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Altern Ther Health Med*, 2024, 30(5):168-173.
- [10] Atiq F, O'Donnell JS. Novel functions for von willebrand factor[J]. *Blood*, 2024, 144(12):1247-1256.
- [11] Shahidi M. Thrombosis and von willebrand factor[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 906:285-306.
- [12] Brehm MA. Von willebrand factor processing[J]. *Hamostaseologie*, 2017, 37(1):59-72.
- [13] Favalloro EJ, Henry BM, Lippi G. Increased VWF and decreased ADAMTS-13 in COVID-19: creating a milieu for (micro)thrombosis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2021, 47(4):400-418.
- [14] Seidizadeh O, Eikenboom JCJ, Denis CV, et al. Von willebrand disease[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10(1):51.
- [15] Ercig B, Arfman T, Hrdinova J, et al. Conformational plasticity of ADAMTS13 in hemostasis and autoimmunity[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(4):101132.
- [16] Curakova Ristovska E, Genadieva-Dimitrova M, Caloska-Ivanova V, et al. Von-Willebrand factor as a predictor of three-month mortality in patients with liver cirrhosis compared to MELD score[J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2019, 82(4):487-493.
- [17] Schwarzer R, Reiberger T, Mandorfer M, et al. The von Willibrand Factor antigen to platelet ratio (VITRO) score predicts hepatic decompensation and mortality in cirrhosis[J]. *J Gastroenterol*, 2020, 55(5):533-542.
- [18] 中国研究型医院学会感染与炎症放射学专业委员会,中华医学会放射学分会传染病学组,中国科技产业化促进会数字健康专业委员会,等.肝细胞癌诊断的影像学组模型推荐专家共识[J].*中华肝脏病杂志*, 2024, 32(7):631-636. Infectious and Inflammatory Radiology Professional Committee of Chinese Research Hospital Association, Infectious Disease Group of Chinese Society of Radiology of Chinese Medical Association, Digital Health Professional Committee of China Association for Promotion of Science and Technology Industrialization, et al. Expert consensus on recommendations for radiomics models for the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Hepatol*, 2024, 32(7):631-636.
- [19] Takaya H, Namisaki T, Moriya K, et al. Association between ADAMTS13 activity-VWF antigen imbalance and the therapeutic effect of HAIC in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(45):7232-7241.
- [20] 李昱瑾,李俊峰,陈煜.肝细胞癌发病风险的评价和早期诊断的研究进展[J].*中华肝脏病杂志*, 2025, 33(5):505-510. Li YJ, Li JF, Chen Y. Research progress on risk assessment and early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Hepatol*, 2025, 33(5):505-510.
- [21] Hametner S, Ferlitsch A, Ferlitsch M, et al. The VITRO score (von willebrand factor antigen/thrombocyte ratio) as a new marker for clinically significant portal hypertension in comparison to other non-invasive parameters of fibrosis including ELF test[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0149230.

(收稿:2025-01-14;修回:2025-05-13;录用:2025-05-29)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

程瑜,余爽,代震宇,等. VWF:Ag 在 HBV 相关性肝脏疾病中的临床作用研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(2):271-278.