



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R575.22

U D C 616.3

密 级 公开

硕士学位论文

原发性胆汁性肝硬化患者血清维生素 D 水平
与疾病病情及 UDCA 应答的相关性研究

郭冠亚

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 内科学(消化系病)

研 究 方 向 慢性肝病的综合防治

指 导 教 师 周新民 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京医院消化内科

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表学术论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

| | |
|--|----|
| 缩略语表 | 1 |
| 中文摘要 | 4 |
| ABSTRACT | 7 |
| 前 言 | 9 |
| 文献回顾 | 11 |
| 正 文 | 24 |
| 引 言 | 24 |
| 方 法 | 26 |
| 结 果 | 30 |
| 1 患者基本情况 | 30 |
| 2 患者血清维生素 D 水平 | 31 |
| 2.1 总体治疗前血清维生素 D 水平 | 31 |
| 2.2 维生素 D 水平与 PBC 病理分级密切相关 | 32 |
| 2.3 维生素 D 水平与 PBC 患者胆汁淤积程度呈负相关 | 33 |
| 2.4 维生素 D 与其他基线临床指标的关系 | 33 |
| 2.5 维生素 D 缺乏与充足患者各临床指标的比较 | 34 |
| 3 UDCA 治疗应答情况及其与基线维生素 D 水平的关系 | 35 |
| 3.1 治疗应答评价 | 35 |
| 3.2 UDCA 应答者基线维生素 D 水平高于不应答者 | 36 |
| 3.3 治疗前维生素 D 缺乏的患者 UDCA 应答率低 | 37 |
| 3.4 UDCA 应答者与应答不佳者各基线临床指标的比较 | 37 |
| 3.5 基线维生素 D 水平与 UDCA 治疗应答独立相关：应答相关基线因素的单-多因素 Logistic 回归 | 38 |
| 3.6 基线维生素 D 水平对 UDCA 治疗应答不佳的预测 | 41 |
| 3.7 亚组分层分析：晚期患者中应答与不应答间维生素 D 水平的差异更明显 | 41 |
| 4 患者远期预后及与基线维生素 D 水平的关系 | 42 |
| 4.1 长期随访情况 | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 发生肝病终点事件患者的基线维生素 D 水平更低 | 42 |
| 4.3 维生素 D 缺乏患者的长期生存相对维生素 D 充足者更差 | 43 |
| 4.4 UDCA 治疗无应答者的长期生存比应答者差 | 43 |
| 4.5 基线维生素 D 缺乏且治疗一年无应答者长期生存最差 | 44 |
| 讨 论 | 45 |
| 小 结 | 54 |
| 参考文献 | 55 |
| 个人简历和研究成果 | 66 |
| 致 谢 | 67 |

缩略语表

| 缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
|---------|-----------------------------------|-------------------|
| PBC | Primary Biliary Cirrhosis | 原发性胆汁性肝硬化 |
| 25(OH)D | 25-hydroxyvitamin D | 25 羟维生素 D |
| UDCA | Ursodeoxycholic Acid | 熊去氧胆酸 |
| ALP | Alkaline Phosphatase | 碱性磷酸酶 |
| VDR | Vitamin D Receptor | 维生素 D 受体 |
| AST | Aspartate Aminotransferase | 天门冬氨酸转氨酶 |
| OR | Odds Ratio | 比值比 |
| FDA | Food and Drug Administration | 美国食品及药物管理局 |
| CI | Confidence Interval, | 可信区间 |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism | 单核苷酸多态性 |
| SLE | Systemic Lupus Erythematosus | 系统性红斑狼疮 |
| IBD | Inflammatory Bowel Disease | 炎症性肠病 |
| NAFLD | Non-alcoholic Fatty Liver Disease | 非酒精性脂肪肝病 |
| CHC | Chronic Hepatitis C | 慢性丙型肝炎 |
| SVR | Sustained Virological Response | 持续病毒学应答 |
| AMA | Anti-mitochondrial Antibody | 抗线粒体抗体 |
| GWAS | Genome-wide Association Study | 全基因组关联分析 |
| GGT | Gamma-glutamyl Transpeptidase | γ -谷氨酰基转移酶 |

| | | |
|-------------------------|---|--------------------|
| INR | International Normalized Ratio | 国际标准化比值 |
| ULN | Upper Limit of Normal | 正常值上限 |
| ALB | Albumin | 白蛋白 |
| TBIL | Total Bilirubin | 总胆红素 |
| AASLD | American Association for the Study of Liver Disease | 美国肝病研究协会 |
| PT | Prothrombin Time | 凝血酶原时间 |
| EASL | European Association for the Study of the Liver | 欧洲肝病学会 |
| PPAR | Peroxisome proliferator-activated receptor | 过氧化物酶体增殖剂激活受体 |
| ALT | Alanine aminotransferase | 丙氨酸氨基转移酶 |
| FXR | Farnesoid X Receptor | 法尼醇 X 受体 |
| PLT | Platelet | 血小板 |
| CYP7A1 | 7 Alpha-hydroxylation of Cholesterol | 胆固醇 7 α 羟化酶 |
| OCA | Obeticholic acid | 奥贝胆酸 |
| 1,25(OH) ₂ D | 1, 25-Dihydroxyvitamin D | 1,25 二羟维生素 D |
| MS | Multiple Sclerosis | 多发性硬化 |
| CHB | Chronic Hepatitis B | 慢性乙型肝炎 |
| DC | Dendritic cells | 树突状细胞 |
| Tfh | Follicular helper T cells | 滤泡性辅助 T 细胞 |
| Treg | Regulatory T cell | 调节性 T 细胞 |
| HSC | Hepatic stellate cell | 肝星状细胞 |
| IFN | Interferon | 干扰素 |

| | | |
|---------|--|-------------|
| ALD | Alcoholic liver disease | 酒精性肝病 |
| Th | Helper T cells | 辅助性 T 细胞 |
| ALT | Alanine aminotransferase | 丙氨酸氨基转移酶 |
| CYP27A1 | Cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1 | 胆固醇 27-羟化酶 |
| BUN | Blood Urea Nitrogen | 血尿素氮 |
| APRI | Aspartate aminotransferase-to-Platelet Ratio Index | 谷草转氨酶与血小板比值 |
| IgM | Immunoglobulin M | 免疫球蛋白 M |
| CRE | Creatinine | 肌酐 |
| BMI | Body Mass Index | 身体质量指数 |
| ECLI | Electrochemiluminescence immunoassay | 电化学发光免疫测定 |
| IOM | Institute of Medicine of the National Academies | 美国国家医学科学研究院 |
| ROC | Receiver Operating Characteristic | 受试者工作特征曲线 |

原发性胆汁性肝硬化患者血清维生素 D 水平 与疾病病情及 UDCA 应答的相关性研究

硕士研究生：郭冠亚

导 师：周新民 教授

辅 导 教 师：韩 英 教授

时永全 教授

第四军医大学西京医院消化内科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81370519）

陕西省科技统筹创新工程项目（2012KTCL03-04）

陕西省科技惠民项目（2013HM-01）

西京医院学科助推项目（XJZT13Z02）

中文摘要

背景与目的：

原发性胆汁性肝硬化（primary biliary cirrhosis, PBC）是一种免疫介导的慢性胆汁淤积性肝病，其病因尚不明确。熊去氧胆酸（ursodeoxycholic acid, UDCA）是目前唯一被证实可延缓 PBC 进展并改善患者生存的药物，但约 1/3 患者对 UDCA 应答不佳，如何尽早发现这些无应答者并开展有效的联合治疗是 PBC 临床诊治中的难点。

近年 PBC 的病因学研究发现维生素 D 系统的缺陷参与了 PBC 的发病，而基础研究也显示维生素 D 可调控自身免疫、胆汁淤积和肝纤维化等多个与 PBC 发生发展密切相关的病理生理过程，且与 UDCA 的药理作用存在潜在的协同性，提示维生素 D 在 PBC 中可能具有重要的临床意义。

本研究的目的是探索 PBC 患者血清维生素 D 水平与疾病病情、UDCA 应答和远期预后的相关性，以进一步明确维生素 D 与 PBC 发生发展的联系，并为解决 UDCA 应答评价及无应答者治疗的临床难题探索新的思路。

方法:

本研究纳入于我中心 PBC 生物样本库中冻存有治疗前血清样本, 且随访超过一年的 PBC 患者 98 名, 收集其基线、治疗一年后及长期生存的随访数据。UDCA 应答情况采用巴黎-I 和巴塞罗那标准进行评价, 使用电化学发光法检测患者治疗前血清中的 25 羟维生素 D (25-hydroxyvitamin D, 25 (OH) D) 来确定维生素 D 水平。使用直线回归分析维生素 D 水平与基线各生化指标的相关性, 使用单因素和多因素 Logistic 回归来分析与 UDCA 应答独立相关的基线指标, 及通过生存分析来探讨维生素 D 缺乏对 PBC 远期预后的影响。

结果:

(1) 98 名 PBC 患者的平均血清 25 (OH) D 水平为 17.9 ± 7.6 ng/mL, 其中有 56 人 (57%) 低于 20ng/mL, 为维生素 D 缺乏。

(2) 25 (OH) D 水平随组织学分期增加而降低, 晚期患者血清 25 (OH) D 值显著低于早期患者, 分别为 15.4 ± 6.3 ng/mL 和 19.8 ± 7.7 ng/mL, $p < 0.01$ 。并且, 晚期患者中伴有维生素 D 缺乏的比率也显著高于早期患者 (74% vs. 49%, $p = 0.038$)。随着 25 (OH) D 水平的升高, 胆汁淤积相关指标碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 和胆红素逐渐降低, 直线回归 r 值分别为 -0.38 和 -0.37, p 值均小于 0.001; Mayo 风险评分和谷草转氨酶也随着 25 (OH) D 水平的升高而逐渐降低呈负相关, 而白蛋白的值则逐渐升高与维生素 D 水平呈正相关。维生素 D 缺乏的患者 ALP、胆红素、Mayo 评分和国际标准化比值均高于维生素 D 充足的患者, 白蛋白水平更低, 且病理为晚期的比率更高。

(3) 治疗一年后, 根据巴黎-I 和巴塞罗那标准, 分别有 68.4% 和 62.2% 的患者获得了较好的生化应答, 这部分患者的基线维生素 D 水平要高于无应答者 (巴黎-I 标准: 19.3 ± 7.5 vs. 14.8 ± 6.4 ng/mL, $p = 0.005$; 巴塞罗那标准: 19.7 ± 7.7 vs. 14.9 ± 6.3 ng/mL, $p = 0.002$)。根据巴黎-I 标准, 治疗前即伴有维生素 D 缺乏的患者中, 有 41% 无法获得生化应答, 显著高于维生素 D 充足患者的 19% ($p = 0.028$)。多因素 Logistic 回归显示维生素 D 缺乏患者发生 UDCA 治疗应答不佳的风险是维生素 D 充足者的 3.93 倍 (OR=3.93, 95%CI=1.02-15.19, $p = 0.047$), 独立于极高 ALP 值、异常胆红素和病理晚期等; 且 25 (OH) D 每增加 1ng/mL, 患者发生 UDCA 不应答的

风险约降低 10% (OR=0.90, 95%CI=0.81-0.99, p=0.026)。使用巴塞罗那标准进行 UDCA 应答评价获得的结果与上述一致。

(4) 长期随访结果显示, 发生死亡等终点事件的患者基线维生素 D 水平更低 (12.1±4.6 vs. 18.4±7.6 ng/mL, p=0.023)。与维生素 D 充足者相比, 基线时伴维生素 D 缺乏的患者长期生存情况较差 (p=0.063)。并且, 以患者基线维生素 D 状态和治疗后 UDCA 应答情况联合作生存分析显示: 与维生素 D 充足和/或 UDCA 应答好的患者相比, 基线时维生素 D 缺乏且治疗一年后 UDCA 应答不佳的患者生存最差。

结论:

PBC 患者的维生素 D 水平与组织学分期及胆汁淤积程度呈负相关, 基线维生素 D 缺乏是治疗后 UDCA 应答不佳的独立危险因素, 且与患者的远期生存密切相关。

我们的结果进一步表明维生素 D 系统的缺陷与 PBC 的发生发展联系密切, 检测基线维生素 D 水平对评价患者疾病病情, 和预测 UDCA 疗效及远期预后具有重要的价值, 且补充维生素 D 或可作为 UDCA 应答不佳者联合治疗的新思路。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 熊去氧胆酸; 维生素 D; 25 (OH) D

Serum Vitamin D Level is Associated with Disease Severity and Response to UDCA in PBC

Candidate for master: Guanya Guo

Supervisor: Prof. Xinmin Zhou

Tutor: Prof. Ying Han

Prof. Yongquan Shi

Xijing Hospital of Digestive Disease, Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation of China (81370519)

Foundation of Shaanxi Province (2012KTCL03-04 & 2013HM-01)

Science and Technology Projects of Xijing Hospital (XJZT13Z02)

Abstract

Background and Aims: Primary biliary cirrhosis (PBC) is an immune-mediated chronic cholestatic liver disease characterised by ongoing intrahepatic bile-duct destruction, eventually leading to the development of biliary cirrhosis. The incidence of primary biliary cirrhosis has increased over recent decades, while mechanisms underlying the development of the disease are still controversial and largely undefined. Ursodeoxycholic acid (UDCA) is the only FDA-approved drug for PBC, but up to nearly one-third of patients failed to achieve a complete treatment response. Recently, many studies indicate that vitamin D is associated with the development of PBC. Increasing evidence also suggests a protective role of vitamin D in autoimmunity, cholestasis, and fibrosis, both of which are crucial for the progress of PBC. This study aimed to investigate the clinical relevance of vitamin D levels in PBC, especially their association with the therapeutic effects of UDCA.

Methods: 98 consecutive PBC patients who have been regularly followed up more than

one year were retrospectively reviewed. 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels were determined in frozen serum samples collected before initiation of UDCA treatment with a full-automatic Electro-chemiluminescence binding assay. Response to UDCA was evaluated by Paris-I and Barcelona criteria. Logistic regressions were performed to identify the treatment response-associated parameters.

Results: Among 98 patients, the mean serum 25(OH)D concentration was 17.9 ± 7.6 ng/mL. 25(OH)D levels decreased with increasing histological stage ($p=0.029$) and were negatively correlated with bilirubin and alkaline phosphatase levels, as well as Mayo risk scores. After one year of UDCA therapy, 31 patients failed to achieve complete response according to Paris-I criteria. The baseline 25(OH)D level was significantly lower in non-responders (14.8 ± 6.4 vs. 19.3 ± 7.6 ng/mL, $p=0.005$). Vitamin D deficiency at baseline was associated with an increased risk of incomplete response (OR=3.93, 95% CI=1.02-15.19, $p=0.047$) independent of advanced stages, extreme alkaline phosphatase levels, and abnormal bilirubin value. Similar results were obtained when biochemical response was evaluated by Barcelona criteria. Furthermore, 25(OH)D levels were lower in patients who subsequently suffered death or liver transplantation (12.1 ± 4.6 vs. 18.4 ± 7.6 ng/mL, $p=0.023$). The Kaplan-Meier curve showed a trend towards decreased transplantation-free survival among patients with vitamin D deficiency ($p=0.063$). And combining the pre-treatment vitamin D status and response to UDCA after one year of therapy, we found that the patients who was vitamin deficient at baseline and recognized as non-responder after treatment would have the worst long-term transplant-free survival ($p=$ with Paris-I criteria; $p=$ with Barcelona criteria).

Conclusions: 25(OH)D level is associated with biochemical and histological features in PBC. Pre-treatment vitamin D status is independently related to subsequent response to UDCA. Our results suggest that vitamin D status may have important clinical significance in PBC.

Keywords: Primary biliary cirrhosis; PBC; Ursodeoxycholic acid; UDCA; Vitamin D; 25(OH)D

前 言

原发性胆汁性肝硬化（Primary Biliary Cirrhosis, PBC）是一种自身免疫介导的胆汁淤积性肝脏疾病，主要累及中老年女性，在欧美国家 40 岁以上女性中发病率可达到千分之一，在我国其检出率也呈逐年增高的趋势。^[1-3] PBC 的发病机制尚不明确，病因学研究表明该病的发生可能是遗传、环境和代谢等多种因素共同作用的结果。^[4, 5] 其主要病理学特征为渐进性肝内小胆管损伤，患者如不进行有效治疗，将最终进展为肝硬化和肝功能衰竭。^[6] 熊去氧胆酸（Ursodeoxycholic Acid, UDCA）是目前美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）唯一批准用于治疗 PBC 的药物，它能显著改善患者的生化、减缓组织学进展并延长生存期。但临床研究发现，即使应用最大推荐剂量后，仍有约 1/3 的患者生化指标无好转，长期生存难以得到改善。^[7-11] 如何及早发现这部分 UDCA 应答不佳的患者，并进行有效的治疗是目前 PBC 研究中关注的热点。

在 PBC 患者中，由于慢性肝内胆汁淤积，肠道脂溶性维生素吸收障碍，常并发各种脂溶性维生素的不足，其中维生素 D 不足可出现于近半数患者中。由于维生素 D 在钙磷、骨代谢中发挥着至关重要的作用，既往研究中主要关注它与 PBC 肝性骨病的联系。^[12-15] 近年来，维生素 D 的多种骨外作用陆续被发现，大量研究表明维生素 D 在自身免疫、胆汁代谢和脏器纤维化等多种与 PBC 有关的病理生理过程中发挥着重要的作用。^[16-21] 同时，PBC 的遗传易感性研究发现维生素 D 受体（Vitamin D receptor, VDR）的单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）不仅与骨并发症相关，还与 PBC 疾病本身有一定联系。^[22-26] 而且，一项最新的研究显示维生素 D 缺乏可能会增加 PBC 的发病风险^[27]。这提示维生素 D 与 PBC 的联系不仅仅局限于肝性骨病，它可能作为一种重要的遗传和环境因素在 PBC 的发生发展中扮演着重要的角色，这需要进一步在 PBC 的临床队列中进行研究。

近几年一系列临床研究发现维生素 D 与多种免疫性疾病和肝脏疾病的病情轻重、药物疗效和疾病进展等密切相关，包括系统性红斑狼疮（Systemic Lupus Erythematosus, SLE）、炎症性肠病（Inflammatory Bowel Disease, IBD）、病毒性肝

炎和非酒精性脂肪性肝病等。^[28-31] 其中，慢性丙型肝炎（Chronic Hepatitis C, CHC）患者的血清维生素 D 水平不仅与肝脏炎症程度和病理分级密切相关，而且可能影响抗病毒治疗的效果。^[31] 多项观察性研究和系统分析均提示：治疗前伴有维生素 D 缺乏的 CHC 患者持续病毒学应答（Sustained Virological Response, SVR）显著低于维生素 D 充足的患者，并且基线维生素 D 水平可以作为 CHC 抗病毒治疗 SVR 的独立预测指标。^[31-33]

那么在 PBC 中，患者的维生素 D 水平是否也与疾病病情和 UDCA 治疗预后有类似的关系呢，目前尚不明确。探讨这一问题，将有助于在病因学上进一步理解维生素 D 与 PBC 的关系；同时，也将为 PBC 临床诊治中 UDCA 疗效评价，和不应答者的治疗这两大难题提供新的思路。因此本研究纳入我中心 PBC 生物样本库中登记入册的初治 PBC 患者，探究其治疗前血清维生素 D 水平与其他基线指标、治疗后 UDCA 应答情况及远期无移植生存等的相关性。

文献回顾

1 原发性胆汁性肝硬化

1.1 原发性胆汁性肝硬化的概述：疾病预后差而发病率和患病率逐渐升高

随着人们生活习惯和环境的改变，过去半个世纪以来，各种自身免疫性疾病的发病率和患病率急剧增长，已成为一类严重危害人类健康的疾病。

原发性胆汁性肝硬化（Primary Biliary Cirrhosis, PBC）是肝脏最为常见的自身免疫性疾病之一，以血清抗线粒体抗体（Anti-mitochondrial antibody, AMA）阳性和肝内小胆管的非化脓性破坏为主要特征，好发于中老年女性。^[6] 来自全球多个国家的流行病学数据表明 PBC 的患病率呈逐年增高的趋势，^[2, 34] 在英格兰北部地区，PBC 的患病率由 1987 年的 20.2 例/十万人增长到 1994 年的 33.5 例/十万人，^[35] 而在加拿大，PBC 的患病率则于 1996 至 2002 年间升高了约一倍^[36]。其发病率上也呈同样的上升趋势，冰岛连续 20 年的全国健康监测数据显示，PBC 的发病率由 1990-2000 年间的 2.0 例/十万人增加到了 2000-2010 年间的 2.5 例/十万人。^[37] 我国尚缺乏完善的 PBC 流行病学数据，2010 年 Liu 等通过对广州健康体检人群进行筛查，估算我国南方居民的患病率约为 49 例/十万人，在 40 岁以上的中年女性中可以达到千分之一点五^[3]，这一结果也与部分西方国家的数据相近^[38, 39]。

PBC 典型的病理特点为肝内小胆管的非化脓性破坏，并且周围伴有大量淋巴细胞浸润。与病毒性肝炎等肝病中肝损伤可因病毒等的控制而呈间歇性进展不同，PBC 的小胆管破坏为渐进性发生，随着汇管区炎症和胆汁淤积的加重，逐渐累及肝实质并引发纤维化，最终进展为肝硬化。^[6]

该病早期常无明显症状，许多患者确诊时已处于较晚的阶段甚至已发展为肝硬化，而且由于病理损伤的特点，PBC 发生肝硬化时其预后较一般的肝硬化患者更差。此外，虽然自然病程较长，但 PBC 的疾病进展个体间差异较大，导致部分患者常可由无症状迅速进展为肝功能衰竭，走向死亡。^[40, 41] 由于 PBC 治疗困难预后差，其一直是欧美国家肝移植最常见的病因，约占所有肝硬化患者的一半。目前，随着有效药物熊去氧胆酸的广泛应用，这一数字已经下降，但 PBC 仍占肝硬化移植总人数的 9%。^[42, 43]

1.2 PBC 的病因学研究进展：遗传和环境因素共同发挥着重要作用

虽然血清 AMA 对于 PBC 的诊断具有较高的特异性，但目前，导致患者免疫系统发生紊乱和最终疾病发生的确切原因尚不明确。研究发现，1%-6%的 PBC 患者至少有一位一级亲属同为 PBC；^[44, 45] 而且与异卵双胞胎相比，同卵双生子的 PBC 发病具有高度的一致性，^[46] 这表明 PBC 的发病具有强烈的遗传易感性。近些年 PBC 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)及全基因组关联分析(Genome-wide association study, GWAS)研究进一步证实遗传因素在 PBC 的发病中至关重要。^[47-50] 除基因等遗传因素外，一些生活习惯等环境因素也被认为与 PBC 的发生密切相关。Gershwin 等在 1032 名 PBC 患者和 1041 名健康对照中发现患者中吸烟、泌尿系感染、染发和雌激素替代治疗史的比率明显更高，可能为 PBC 的危险因素，^[51] Corpechot 等、Prince 等及 Lammert 等在不同的 PBC 人群中均得到了一致的结果^[52-54]。环境因素的研究中进一步发现，多种病原微生物的感染与 PBC 密切相关，包括 E. coli、N. aro 和 Lactobacillus delbrueckii 等，而且它们能与 AMA 抗原中的保守序列及克隆自 PBC 患者的反应性 T 细胞发生交叉反应，并且分子模拟只有在特定遗传背景的人群、特殊的免疫状态下才会致病。由此，学者们提出了 PBC 发病的分子模拟学说，认为具有独特 PBC 易感遗传背景的易感人群，因其某些生活习惯或泌尿系感染等接触了一些能与 AMA 抗原进行分子模拟的异源性物质或微生物，打破了机体的免疫耐受，进而诱导疾病发生。^[1, 55, 56] 可见，遗传和环境因素在 PBC 的发病中扮演着至关重要的角色。

1.3 PBC 的临床表现：病情及预后的准确评估意义重大但临床实际中存在困难

该病无特征性的临床表现，可表现为乏力、皮肤瘙痒、黄疸、门脉高压、皮肤黄疣，以及复发性无症状尿路感染等。其中乏力和瘙痒是较为常见的非特异性症状，可出现于超过一半的患者。黄疸一般于晚期患者中才出现，但约 20%的早期患者也可出现胆红素血症。门脉高压相关症状体征如食管静脉曲张比其他肝病出现的较早，部分患者甚至在无任何 PBC 相关症状和生化异常时以静脉曲张而就诊。骨质疏松或骨软化，也可出现于 10~30%的患者，为重要的肝性骨病并发症。^[6, 41, 57]

相较于有较大非特异性和异质性的临床症状/体征，血清生化在 PBC 的临床诊

治中更为重要。并且由于小胆管进行性损伤的特点，胆汁淤积性指标 ALP、GGT 和胆红素的实用价值更高于传统的转氨酶等肝功指标。其中 ALP 和 GGT 在疾病早期小胆管开始受到损伤时即可升高，是诊断 PBC 的关键指标之一。

由于 PBC 患者较差的远期预后，以及临床表现与疾病进展的不一致，如何正确评价疾病病情至关重要。肝穿组织学检查是直接评价肝脏损伤的最直接的手段，根据小胆管损伤和肝纤维化进展的程度，Ludwig 等将 PBC 分为四期，^[58] 如图 1 所示，这也是目前 PBC 的临床诊治和临床试验研究对象选择最常用的患者分级方法。^[41, 59, 60] 研究发现，病理晚期的患者其治疗预后和远期生存差。^[61, 62] 但肝穿组织学检查毕竟为有创性检查，存在一定的风险。而且因为肝穿取材的局限性，其仅能反映占肝脏不到百分之一的局部损伤程度。^[63] 胆汁淤积性指标碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP）和胆红素能反映患者胆汁淤积的程度，特别是胆红素，常常在疾病进展到较晚时才出现，能一定程度上反映疾病的轻重。最近，Lammers 等对既往报道的欧美队列中的 4845 位患者进行了系统分析，发现基线时的血清 ALP 和胆红素与无移植生存密切相关，且这种相关性独立于治疗和病理分期等；其中胆红素的界值为 1mg/dL，ALP 的界值为 2 或 3 倍正常上限（upper limits of normal, ULN）。^[64] 除去胆汁淤积指标外，转氨酶对 PBC 疾病病情判断的价值较差，与预后的关系也不确定，Corpechot 等发现基线 AST 以 2 倍 ULN 为界值时在单因素分析中与生存相关，但进行多因素分析时被剔除。^[7] 白蛋白由于是肝硬化时肝脏合成功能的重要指标，也具有一定的意义，但与 AST 一样没有明确的数据表明其余疾病进展的关系，除此之外还包括间接反映门脉高压脾亢的血小板，及凝血指标 INR 和 PT 等。^[7] Mayo 评分是最常用的 PBC 基线预后评分，它将年龄、胆汁淤积指标、白蛋白、凝血和患者水肿情况结合起来进行评分，能系统性地反映患者的疾病病情，并能较好的预测预后。^[59, 65, 66] 但由于其中各生化指标在不同中心均有差异，因而并没有一个统一的标准来进行界定。而且重要参数水肿程度的主观性较大，综合运用起来比较繁琐，在临床的实际应用中并不广泛，更多的是用于临床试验和一些涉及 PBC 患者的相关研究。^[59, 60]

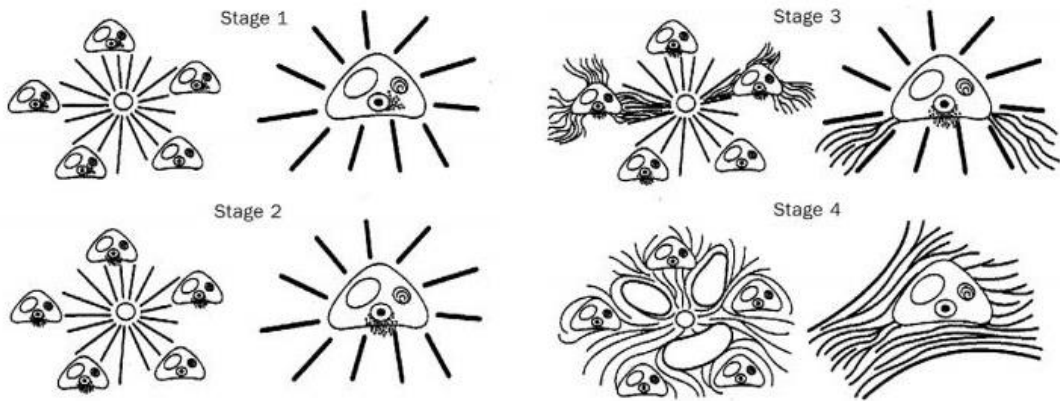


图 1: PBC 组织学分期模式图 (Ludwig 标准) [41]

I 期: 主要为小胆管慢性非化脓性炎症, 汇管区扩张伴胆管周围淋巴细胞浸润, 肝实质未受累; II 期: 胆管周围炎症开始侵犯实质, 可出现界板性肝炎; III 期: 纤维化发生, 汇管区间有纤维瘢痕形成; IV 期: 各汇管区间纤维间隔相互延展、连接, 假小叶形成, 可有小再生结节形成。

1.4 PBC 的治疗: 熊去氧胆酸的应答判定和无应答者的治疗是当前研究的重点

熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 是唯一为被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于 PBC 治疗的药物。根据美国肝病学会 (AASLD) 和欧洲肝病学会 (EASL) 的指南推荐, 每日口服每公斤体重 13-15mg 的 UDCA 为 PBC 的标准治疗。[59, 67] UDCA 治疗 PBC 的主要机制尚不十分明确, 目前认为主要包括: 改变淤积胆汁中胆汁酸的成分增加亲水性从而降低胆汁的毒性, 稳定胆管上皮细胞膜从而增强其抵抗细菌等毒性物质的能力, 抑制实质细胞和胆管上皮细胞的凋亡, 和参与对患者紊乱的自身免疫反应的调控。大量随机对照研究表明, UDCA 不仅能使 PBC 患者异常的血清生化得到改善, 并能延缓疾病组织学进展, 最终改善患者的生存。[68, 69]

1.4.1 UDCA 的应答判定: 缩短评价周期至关重要

虽然 UDCA 的疗效确切, 但约 40% 的患者即使在应用最大推荐剂量的 UDCA 进行治疗后, 仍无法获得较好的生化应答, 其疾病进展的风险也相应更高。目前有多种应答判定的标准来评价 UDCA 治疗的生化应答, 如表 1 所示。这些标准大多是基于患者的长期生存数据, 比照其治疗一或两年后生化指标的改善情况而制定的。[7-11]

在鹿特丹标准的研究中,研究者通过巴黎-I,巴塞罗那,和鹿特丹三种标准前瞻性地分析了应答者和无应答者的生存情况,其结果显示处于早期并应答好患者能获得与健康对照相同的长期生存,并且在晚期患者中,应答者也能获得比无应答者更好的生存,^[11] 这表明 UDCA 应答与否是患者病情轻重之外影响患者进展的重要因素。

既往欧美学者制定的这些应答判定标准都需要经过一年以上的治疗,而有研究表明大部分的患者确诊后若未得到有效治疗将发生组织学进展,^[62] 因此尽早识别无应答者并进行二线药物的联合治疗至关重要。最近,我国学者提出了一种在治疗 6 个月后判定疗效的方法,具有重要的意义,也为后续的相关研究提供了思路。^[70]

表 1: 目前国际上提出的 UDCA 应答评价标准

| 标准 | 判定时间 | 应答良好的定义 | 依据的治疗终点事件 |
|-------|---------|--|----------------------|
| 巴塞罗那 | 治疗 1 年后 | ALP 下降 >40% 或恢复正常 | 死亡或肝移植 |
| 巴黎-I | 治疗 1 年后 | ALP ≤ 3ULN, AST ≤ 2ULN, 胆红素 ≤ 1mg/dL | 死亡或肝移植 |
| 鹿特丹 | 治疗 1 年后 | 异常的胆红素和/或白蛋白恢复正常 | 死亡或肝移植 |
| 多伦多 | 治疗 2 年后 | ALP < 1.67ULN | 组织学发生一级以上进展 |
| 巴黎-II | 治疗 1 年后 | 适用于早期患者, ALP 及 AST < 1.5ULN 胆红素 < 1mg/dL | 死亡或肝移植, 及肝性脑病和肝癌等并发症 |

1.4.2 UDCA 无应答者的治疗: 长期有效性和患者耐受性是关键

对于 UDCA 应答不佳者该如何进行治疗是 PBC 临床研究中最受关注的问题,近些年一系列的药物被尝试用来治疗不佳者,其中研究最多的包括激素、贝特类和奥贝胆酸等。皮质激素和免疫抑制剂是最早提出用于应答不佳者治疗的方案,其中布地奈德为第二代糖皮质激素,其口服制剂的代谢主要在肝脏完成,大大减少了全身反应,研究显示其与 UDCA 的联合治疗能改善生化并减缓组织进展。^[71] 但有研究显示对 UDCA 应答不佳的患者经布地奈德治疗后,虽血生化有一过性的改善,但 Mayo 评分和肝硬化并发症的发生率却显著增高,并且也无确切的证据证实这些疗法能改善患者

的远期生存^{[72] [73]}。免疫抑制剂甲氨蝶呤的联合治疗也并未发现有明显的效果。^[74]

近年, 两类核受体激活物成为 UDCA 应答不佳者联合治疗的研究热点, 即过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (PPAR α) 激动剂贝特类, 和法尼醇 X 受体 (FXR) 激动剂奥贝胆酸等。苯扎贝特和非诺贝特是研究最多的两种 PPAR α 激动剂, 最早由日本学者提出用于 PBC 的治疗, 它们能下调胆汁酸合成的关键酶 CYP7A1, 并调节多种涉及胆汁转运的关键分子 MDR3、MDR1 和 MRP2 等,^[75] 一系列的研究表明联合应用贝特类药物可以促进不应答者生化指标的改善^[76-80]。但是, 这些研究样本量均比较小且多集中在日本, 而且根据最近两项研究的报道, 贝特类对 PBC 远期生存的影响也存在争议, 甚至可能会引起肾功能的异常, 尚需在更大样本量和更长随访时间的队列中验证。^[81, 82] 奥贝胆酸 (Obeticholic acid, OCA), 又称 6-乙基鹅去氧胆酸, 是 Roberto 等最早合成并报道的一类 FXR 底物鹅去氧胆酸的衍生物, 其对 FXR 的激活能力是鹅去氧胆酸的 100 倍, 并且很早就被发现具有很强的抗胆汁淤积作用。^[83] 所以自其临床试验正式开展以来, 就备受学者的广泛关注。最近, 奥贝胆酸的随机对照双盲研究显示它与 UDCA 的联合治疗能使无应答者的 ALP 平均下降 1/4, 远高出仅接受 UDCA 治疗患者的 3%, 而且联用奥贝胆酸的患者中 69% 治疗后 ALP 下降幅度超过 20%, 同时, 联合治疗后患者的血清 GGT 平均下降也超过了 50%。^[84] 这一结果为奥贝胆酸的进一步研究和应用提供了强有力的依据, 但是也需要注意到当奥贝胆酸的剂量较高时其致瘙痒副作用可出现于超过 80% 的患者, 而且受到随访限制, 本研究的主要终点和次要终点均为生化指标, 将来使用硬终点的研究数据将更有说服力。^[84]

2 维生素 D 与肝脏疾病和自身免疫性疾病联系密切

2.1 维生素 D 与人类健康的关系: 全球关注的热点

Mellanby 和 McCollum 于上世纪 20 年代发现了鱼肝油中具有独特抗佝偻病作用的成分——维生素 D, 并因此获得了诺贝尔奖。维生素 D 制剂也在随后被广泛用于各种骨病的治疗及预防, 其主要的形式和体内的代谢过程也逐渐被阐明。食物和自身合成的维生素 D 在肝脏转化为 25 羟维生素 D, 即 25 (OH) D, 并进一步在肾脏进行第二步羟化转化成 1,25 二羟维生素 D, 即 1,25 (OH) 2D。^[85-88] 其中 25 (OH) D 是循环中维生素 D 的主要存在形式, 也是检测评估维生素 D 状态的依据; 而 1,25(OH)

2D 是维生素 D 发挥作用的主要形式，为维生素 D 的活性成分。^[86, 88]

随着 70 年代初其作用的核受体维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 被发现以来，维生素 D 更多的骨骼之外的作用被认识。它可作为一种激素参与机体的各种生理过程，在其中发挥着重要的作用，如皮肤屏障、心血管功能、免疫稳定、肾脏功能、胰岛素分泌及作用、和肌肉强度等；同时，也在细菌感染、自身免疫、炎症转归及肿瘤发生等多种病理过程中起到重要的保护作用。^[18, 19, 89, 90]

近些年来，在多项研究总体健康人群生存情况的前瞻性队列中，伴有维生素 D 缺乏的人群的生存情况明显较维生素 D 充足的人群差。^[91-95] 而根据一项纳入 18 个 RCT 研究的系统分析，每日接受 300-2000 国际单位维生素 D 补充的绝经后女性其死亡风险比未补充维生素 D 的同龄人低 7% (RR, 0.93; 95% CI, 0.87-0.99)。^[96] 现如今，除对健康人群的影响之外，维生素 D 与肿瘤、心脏病和糖尿病等多种慢性疾病的关系，和它与这些疾病的发病、发展、转归，及最终生存的联系也逐渐受到学者们的广泛关注。^[97-103]

2.2 维生素 D 与多种肝病和免疫性疾病的发生发展及治疗预后密切相关

近年来，大量的研究表明维生素 D 与自身免疫性疾病及肝脏疾病联系密切，并且维生素 D 的水平在这两大类疾病中具有重要的临床意义。在多发性硬化 (Multiple Sclerosis, MS)、系统性红斑狼疮 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)、炎症性肠病 (Inflammatory Bowel Disease, IBD)、丙型肝炎 (Chronic Hepatitis C, CHC)、乙型肝炎 (Chronic Hepatitis B, CHB)、酒精性肝病和肝癌等多种免疫性疾病/肝病中，维生素 D 水平不仅与疾病的炎症反应和组织损伤程度密切相关，还可能会影响治疗结局和临床预后。如在 MS 中，Simpson 等和 Runia 等均发现维生素 D 水平能影响 MS 患者的复发风险。^[104, 105] 在 IBD 中，Ananthakrishnan 等的两项多中心研究则表明维生素 D 水平过低是 IBD 患者手术或住院的危险因素，同时能增加患者癌变的风险。^[29, 106] 而在丙肝中，多项回顾性队列研究和系统分析表明伴有维生素 D 缺乏的患者持续病毒学应答 (Sustained Virological Response, SVR) 显著低于维生素 D 充足的患者，并且基线维生素 D 水平可以作为丙肝患者抗病毒治疗 SVR 的独立预测指标。^[31-33] 肝癌和酒肝中的研究数据则显示维生素 D 缺乏是患者发生肝病相关死亡等终点事件的危险因素。^[30, 107]

表 2: 部分近年维生素 D 与其他自身免疫性疾病的相关性研究

| 研究者 | 疾病 | 研究设计 | 样本量 | 主要结果 |
|---|-----|----------|------|------------------------------|
| Correale 等 ^[108] , 2009 | MS | 回顾性研究 | 132 | 低维生素 D 水平与 MS 患者病情发生恶化相关 |
| Ritterhouse 等 ^[28] , 2011 | SLE | 横断面研究 | 32 | 维生素 D 缺乏与 SLE 患者的炎症活动密切相关 |
| Simpson 等 ^[104] , 2010 | MS | 回顾性研究 | 145 | 较高维生素 D 水平的 MS 患者复发率更低 |
| Runia 等 ^[105] , 2012 | MS | 前瞻性队列研究 | 75 | 较低维生素 D 水平的 MS 患者发生复发的风险更高 |
| Garg 等 ^[109] , 2013 | IBD | 回顾性研究 | 71 | 维生素 D 水平是严重肠道炎症的独立相关因素 |
| Ananthakrishnan 等 ^[29] , 2013 | IBD | 多中心回顾性研究 | 3217 | 较低维生素 D 水平的 IBD 患者手术/住院的风险增加 |
| Ananthakrishnan 等 ^[106] , 2014 | IBD | 多中心回顾性研究 | 2809 | 维生素 D 水平低是 IBD 患者癌变的危险因素 |

表 3: 部分近年维生素 D 与其他肝脏疾病的相关性研究

| 研究者 | 疾病 | 研究设计 | 样本量 | 主要结果 |
|---------------------------------------|-----|-------|------|-------------------------------------|
| Petta 等 ^[31] , 2010 | CHC | 回顾性研究 | 197 | 维 D 水平与纤维化程度关系密切, 且与抗病毒治疗的应答情况独立相关 |
| Alvarez 等 ^[32] , 2014 | CHC | 荟萃分析 | 14 项 | 维生素 D 水平低的患者纤维化程度更高, 抗病毒治疗的应答情况更差 |
| Villar 等 ^[33] , 2013 | CHC | 荟萃分析 | 11 项 | 具有较高维 D 水平或进行了维 D 补充的患者抗病毒治疗的应答情况更好 |
| Farnik 等 ^[110] , 2013 | CHB | 回顾性前瞻 | 203 | 较低维生素 D 水平的乙肝患者体内 HBV 病毒复制更高 |
| Trepo 等 ^[30] , 2013 | 酒肝 | 回顾性研究 | 324 | 维生素 D 缺乏的酒肝患者肝损伤更严重, 且生存情况更差 |
| Finkelmeier 等 ^[107] , 2014 | 肝癌 | 前瞻性队列 | 200 | 维生素 D 缺乏与疾病晚期相关, 并可作为较差预后的判断指标 |

3 PBC 与维生素 D 的关系

PBC 作为一个发生于肝脏的自身免疫性疾病，它与维生素 D 又是怎样的关系呢？目前除了一些早期的关注 PBC 患者中维生素 D 缺乏比率，以及维生素 D 受体与 PBC 的骨病和疾病发生关系的少量研究之外，并没有太多的报道，对于维生素 D 与 PBC 治疗预后和疾病转归关系的研究更是空白。基础研究提示维生素 D 在胆汁淤积、自身免疫调节和纤维化发生等与 PBC 密切相关的病理生理过程中发挥着重要作用，并且其与 UDCA 的治疗机制存在潜在的协同性，这提示我们有必要进一步深入探讨维生素 D 与 PBC 的关系，特别是它与 UDCA 治疗应答和患者远期预后是否具有一定的联系。

3.1 PBC 患者的维生素 D 水平：约 20%---73%的患者伴有维生素 D 缺乏

由于维生素 D 在骨代谢中的关键作用，而 PBC 患者又常发生骨病并发症，因此 PBC 患者维生素 D 的状态很早就被关注到。而且，维生素 D 作为脂溶性维生素的一种，其食物来源依赖于肠道胆盐的乳化作用而吸收，因而当 PBC 患者因胆汁淤积而胆盐分泌不足时可出现包括维生素 D 在内的多种脂溶性维生素缺乏。有确切维生素 D 状态报道的 PBC 研究多在 80 年代到 90 年代初，各研究间的数据差异比较大，维生素 D 缺乏的比例为 20%---73%。如 Hodgson 等在 15 例 PBC 患者中观察到 25(OH)D 的水平为 $18 \pm 3.5 \text{ ng/mL}$ ，且 53% 的患者伴有维生素 D 缺乏^[14]；而在 Munoz 的研究中，维生素 D 缺乏的比例为 23%^[111]。这些早期的研究都关注的是维生素 D 作为脂溶性维生素的缺乏状况，以及它与骨质疏松等骨并发症的关系，并且 25(OH)D 的检测方法和维生素 D 缺乏的定义等各不相同。近二十年有报道维生素 D 水平的 PBC 研究较少，在近年 Malham 等的一项研究不同肝硬化患者维生素 D 水平的研究中，34 名 PBC 患者的中位 25(OH)D 水平为 18 ng/mL ，缺乏的比率为 60%。^[112]

3.2 维生素 D 系统的缺陷可能作为重要的遗传-环境因素参与 PBC 的发病

维生素 D 受体 VDR 是维生素 D 发挥其正常功能所必须的核受体，维生素 D 受体基因的改变将导致维生素 D 系统的功能缺陷。2000 年以来，学者们陆续在德国、匈牙利、意大利和日本等国的人群中发现 VDR 的基因多态性与 PBC 患者的骨并发症密切相关，并且部分研究显示其与 PBC 疾病本身的发生和发展也有关。^[23-26] 我

们课题组对这些研究中共计 1322 例 PBC 患者和 2264 例健康对照的结果进行了系统分析,确定了 VDR 限制性内切酶 TaqI (rs731236)的基因多态性与 PBC 的发病风险密切相关^[113]。

最近, Ramagopalan 等基于英国 1999-2011 年全国住院及死亡数据和近千万的参考人群进行了 record-linkage 研究,发现维生素 D 缺乏能增加包括 PBC 在内的多种自身免疫性疾病的发病风险,其中 PBC 的发病风险增加了 2.9 倍,RR 的 95%CI 为 1.2 到 6.0。^[27] 这进一步表明维生素 D 系统的缺陷与 PBC 的发病关系密切。

由于个体的维生素 D 水平受遗传,及生活习惯、季节气候和户外活动等多种环境因素控制,而 VDR 的基因多态性更是直接受由遗传所决定并影响着维生素 D 系统的功能,因此维生素 D 系统的缺陷可能作为一种重要的遗传和环境因素参与了 PBC 的发生。

3.3 维生素 D 可调控多种与 PBC 发生发展密切相关的病理生理过程

PBC 的发生和发展过程中涉及到多个病理生理过程。其中免疫耐受的打破是 PBC 发病的关键环节,而失衡的自身免疫也是 PBC 特异性渐进性损伤小胆管的重要因素,其表现为自身抗体的生成和汇管区杀伤性 T 细胞聚集等,近些年的研究表明树突状细胞 (DC)、调节性 T 细胞 (Treg)、Th17 细胞和滤泡性辅助 T 细胞 (Tfh) 细胞等多种免疫细胞在 PBC 的发生发展中发挥着重要的作用。^[114-116] 胆汁淤积则是 PBC 最为明显的临床表现,同时也是造成疾病逐渐加重的首因。目前 UDCA 治疗 PBC 的确切机制并不十分明确,但是可是肯定的是大部分是通过减轻胆汁淤积时胆汁的毒性,并稳定胆管上皮细胞的细胞膜以避免其因胆汁的毒性作用而被破坏。^[117] 当免疫紊乱造成的炎症反应或毒性胆汁侵犯实质,损伤肝细胞并致使其反复修复再生将导致纤维化的发生。一旦纤维化逐渐进展假小叶行成,PBC 患者将迈入晚期,此时患者的治疗效果不理想,生存预后也较差。^[41]

近些年维生素 D 骨外生理或病理功能的研究表明:维生素 D 在免疫细胞分化和平衡的调节,胆汁代谢及转运的调控,以及纤维化发生时星状细胞炎症通路的调控等过程中发挥着重要作用。因而它可能通过对自身免疫、胆汁淤积和纤维化产生的作用,从而影响 PBC 的发生与发展。

2.5.1 维生素 D 与免疫调节

维生素 D 对免疫系统的调节体现在多个方面, 最早的研究集中在它与白细胞介素等细胞因子水平的联系, 研究表明维生素 D 对 IL-2、TNF- α 、INF- γ 、IL-4、IL-10 和 IL-21 等的表达具有极强的调控作用。^[118] 而维生素 D 对免疫细胞的作用中比较明显的是其对树突状细胞的作用, 表明其能在适应性免疫启动过程中能起到重要作用。Penna 等发现维生素 D 不仅可以抑制不成熟 DC 向成熟 DC 的分化, 并能下调成熟 DC 的共刺激分子 CD40、CD80 和 CD86, 以及 MHC-II 类分子的表达, 来减弱其诱导病理 T 细胞应答的作用, 同时也能促进成熟 DC 的凋亡, 大量研究进一步证实了这些结果。^[119-121] 而随着近些年 T 细胞亚群研究的进步, 越来越多的研究也表明维生素 D 可以影响着多种 T 细胞的分化、增殖与功能发挥。如研究显示维生素 D 能诱导 Treg 的产生, 而经维生素 D 由初始 T 细胞诱导而来的 Treg 细胞迁移至炎症部位发生免疫抑制的能力极强, 同时维生素 D 对 Treg 的功能本身也具有一定的作用, 包括上调 Treg 细胞特异性转录因子 Foxp3+, 影响 Treg 的细胞周期进程, 并在 Treg 下调效应 T 细胞炎性细胞因子的过程中扮演着重要角色。^[122, 123] 除 Treg 外, 维生素 D 对 Th1 和 Th2 细胞平衡的作用也是既往研究中较多报道的, 它能促进 Th2 型免疫应答并抑制 Th1 型免疫应答, 这对 Th1 占主导作用的 PBC 来说具有重要意义。^[124-126] 维生素 D 对 Th17 细胞的作用尚不明确, 但也有研究表明其能下调 Th17 发挥功能的各关键细胞因子 IL-17、IL-21 和 IL-22 等, 及 Th17 的特异性转录因子 ROR γ t,^[127-129] 而对于 B 细胞, 早期研究显示维生素 D 能下调 B 细胞的功能和免疫球蛋白的表达, 一度学者们认为维生素 D 的这一功能可能是通过影响辅助性 T 细胞间接实现的, 但近年有研究表明维生素 D 也能直接调节 B 细胞的分化和功能, 并能调控其向记忆性细胞转变的过程。^[130, 131] 除此之外, 维生素 D 同样能对 CD8+T 细胞, 及固有免疫中的 NK 和 NKT 细胞起到重要作用。^[132-135]

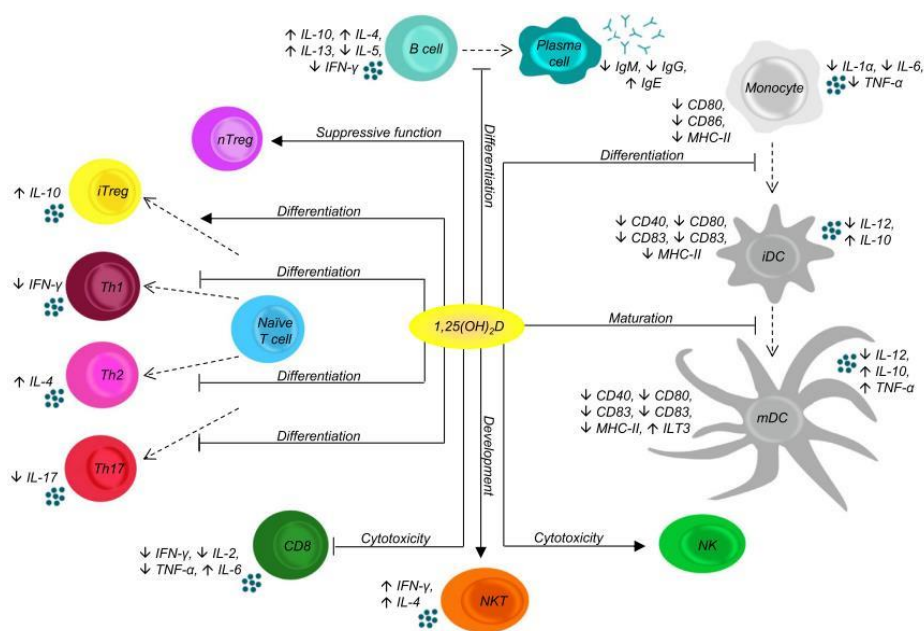


图 2: 维生素 D 对各免疫细胞及其相关细胞因子的作用^[136]

从维生素 D 对免疫系统的这些调节作用可以看出，其对 PBC 患者胆管局部及系统的自身免疫状态可能起到重要的保护作用，它可以对最初抗原提呈细胞的免疫启动，到适应性杀伤性和辅助性淋巴细胞的产生、Th1 及 Th17 等各种炎性细胞的分化和功能维持，和 B 细胞抗体生成及免疫球蛋白类别的转换等 PBC 自身免疫状态产生和发展全过程中每一个关键步骤产生影响，从而减轻其紊乱的免疫状态，使得免疫系统对胆管上皮的适应性攻击减弱甚至终止。

2.5.2 维生素 D 与胆汁淤积

维生素 D 在胆汁淤积中的作用与 UDCA 对 PBC 的治疗机制存在很多潜在的协同性，并且维生素 D 受体与近年备受关注的奥贝胆酸作用的受体 FXR 一样，都是调节机体胆酸平衡的关键核受体之一，具有重要的研究前景。

胆汁淤积的治疗的原则包括减少胆汁酸的合成，促进其羟化和结合以减轻毒性，以及促进胆汁转运分子的分泌或加强其对底物的作用等。^[137] 维生素 D 受体是直接调节胆汁分泌的几大核受体之一，能够直接调节胆汁合成中的关键限速酶胆固醇-7 α 羟化酶 (CYP7A1) 和胆固醇 27-羟化酶 (CYP27A1)，以及胆酸第一步羟化过程中的关键酶 CYP3A4 的分泌，因而在胆汁酸的合成与代谢中扮演着重要角色。^[138-140] 在发生胆汁淤积时，维生素 D 能调控机体的适应性反应，包括胆汁合成酶类的分泌，

以及胆汁转运分子 Bsep 和 Mrp2 等。^[141] 最近, Firrincieli 等发现慢性维生素 D 补充, 而不是活性的 1,25 (OH) D 短期应用, 能通过调节胆汁转运分子、局部炎症反应和胆汁的合成分泌来改善胆汁淤积动物的肝损伤。^[142] 并且他们通过维生素 D 受体敲除小鼠, 证实维生素 D 在胆汁淤积时胆管上皮细胞间的正常紧密连接的维持至关重要, 敲除老鼠不仅维生素 D 对转运分子等的作用减弱, 而且胆红素血症更重, 组织学损伤也更重。^[142]

这些最近的结果表明维生素 D 系统的正常功能对胆汁淤积的治疗是至关重要的, 并且它对胆管上皮的保护作用、对胆汁合成酶和转运分子表达调节的作用可以为 UDCA 治疗胆汁淤积提供潜在的协同作用, 这对于 PBC 患者 UDCA 的有效治疗具有重要意义。

2.5.3 维生素 D 与脏器纤维化

虽然很早就有学者注意到维生素 D 与肝脏纤维化的相关性, 但直到近几年维生素 D 影响纤维化进程的具体机制才逐渐被认识, 并且为肝纤维化的研究提供了新的切入点。最早的间接证据来自维生素 D 对星状细胞间缝隙连接的影响^[143], 进一步的研究显示维生素 D 能抑制活化的肝星状细胞的增殖, 和纤维化相关因子细胞周期蛋白及 D1 金属蛋白酶 1 的作用, 并下调 I 型胶原 $\alpha 1$ 的表达^[144]。2013 和 2014 年, 连续两篇 cell 文章分别报道维生素 D 能对肝星状细胞和胰腺星状细胞的炎性因子网络起到调控作用, 并进而影响肝纤维化和胰腺癌的进程。^[16, 145] 其中 Ding 等观察到了维生素 D 受体敲除老鼠自发性肝纤维化的发生, 并进一步明确了正是通过影响维生素 D 系统的作用, TGF β 1/SMAD 通路才能激活星状细胞进而启动纤维化^[16], 表明正常维生素 D 系统的功能在纤维化发生过程中起到关键的保护作用, 这对今后纤维化的研究具有重要的意义。

PBC 患者的纤维化发生于中晚期, 而且不同于病毒性肝炎等其他慢性肝病, PBC 患者一旦纤维化起始, 由于小胆管的大量破坏、汇管区的弥漫炎症和长期慢性胆汁毒性作用, 将极易进展到肝硬化甚至肝衰竭。而且, 纤维化的发生也是 UDCA 治疗难以获得理想应答的重要因素, 进一步提示 PBC 患者维生素 D 系统抗纤维化作用的强弱也可能会影响到患者的治疗转归和预后。

正 文

PBC 患者血清维生素 D 水平与疾病病情及 UDCA 应答的相关性研究

引 言

原发性胆汁性肝硬化（primary biliary cirrhosis, PBC）是一种自身免疫介导的胆汁淤积性肝脏疾病，以肝内小胆管进行性破坏为特征，最终可发展为肝硬化与肝衰竭。^[1] 其发病机制复杂，目前的研究认为遗传和环境因素发挥着重要的作用。^[4,5] 熊去氧胆酸（ursodeoxycholic acid, UDCA）是目前 FDA 唯一批准用于治疗 PBC 的药物，但约 1/3 的患者效果不佳。目前有多种标准用于 UDCA 疗效的评价，但均需要一年以上的时间。^[7-11] 如何尽早发现对 UDCA 应答不佳的患者，并进行联合治疗至关重要。

近年来，多个国家的 PBC 遗传易感性研究发现维生素 D 受体（vitamin D receptor, VDR）的单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）与 PBC 的发病有关；^[22-26] 而且，维生素 D 缺乏人群的 PBC 发病风险显著增高^[27]，提示维生素 D 可能作为一种重要的遗传和环境因素参与了 PBC 的发生。

最近大量基础研究表明维生素 D 在自身免疫、胆汁代谢和脏器纤维化等多种与 PBC 有关的病理生理过程中发挥着重要的作用，^[16, 142, 145, 146] 并且与 UDCA 的治疗机制存在间接或直接的协同作用^[142, 147]。在多种免疫性疾病和肝脏疾病中，包括系统性红斑狼疮、炎症性肠病、病毒性肝炎和非酒精性脂肪性肝病等，维生素 D 水平不仅与炎症程度和疾病轻重密切相关，而且可以影响这些疾病的治疗转归和长期生存。^[28-31]

那么在 PBC 中，患者的维生素 D 水平是否也具有类似的临床相关性呢？探讨这一问题，将有助于在病因学上进一步理解维生素 D 与 PBC 的关系；同时，也将为

PBC 临床诊治中 UDCA 疗效评价, 和不应答者的治疗这两大难题提供新的思路。为此, 我们进行了本研究的设计, 即检测初治 PBC 患者基线维生素 D 水平, 并分析其与其他基线指标的关系, 探讨其对治疗后 UDCA 应答的影响, 以及与长期生存的关系。我课题组长期从事 PBC 的相关研究, 已建成 PBC 及其一级家属的生物样本库多年,^[148, 149]为基于初治患者的血清维生素 D 水平, 来探讨维生素 D 与 PBC 基线病情、治疗预后甚至长期生存的关系提供了先决条件。

方 法

1 研究对象

根据纳入排除标准，选择纳入在第四军医大学西京消化病医院就诊的 PBC 患者 98 例进行研究。该研究经西京医院伦理委员会批准通过，所有患者均签署了知情同意书。

1.1 PBC 诊断标准

依据 2009 年 AASLD 及 EASL 发布的 PBC 诊疗指南，基于以下标准：i) 患者存在胆汁淤积的生化证据，主要基于 ALP 升高；ii) 患者自身抗体检查示 AMA 阳性；iii) 患者肝脏穿刺活检示非化脓性胆管炎及小或中等胆管破坏的组织病理学证据；当患者符合上述三项标准中的两项或以上时，可诊断为 PBC。

1.2 纳入标准

- 1) 符合 PBC 诊断标准；
- 2) 年龄 ≥ 18 岁；
- 3) 患者确诊时登记入我中心 PBC 生物样本库，并留有初诊血样；
- 4) 患者服用 UDCA 后随访时间满 1 年。

1.3 排除标准

- 1) 就诊时处于妊娠或哺乳期；
- 2) 合并自身免疫性肝炎、原发性硬化性胆管炎和病毒性肝炎等肝病；
- 3) 合并恶性肿瘤或主要脏器功能衰竭；
- 4) 就诊时已出现肝性脑病、肝肾综合征、肝肺综合征、顽固性腹水或自发性腹膜炎等严重并发症；
- 5) 既往存在肾脏功能不全或肾结石等可能影响维生素 D 代谢的基础肾病；
- 6) 患者就诊前 3 月内已规律服用 UDCA 进行治疗，或于就诊前 3 月内使用维生素 D 制剂；
- 7) 血清生化等随访资料无法获取。

2 随访与数据收集

2.1 治疗及随访

所有患者经我中心诊断为 PBC 后均给予口服熊去氧胆酸胶囊 (Dr. Falk Pharma GmbH, Freiburg, Germany) 进行规范化治疗 (13-15 mg/kg/day)。

两名医师负责 PBC 队列的预约随访, 一名临床科研护士和一名生物样本库技师负责记录患者的相关临床数据及收集其血液样本。患者初诊后第一年内的第 3、6 和 12 月, 和之后的每年进行连续性随访, 所有纳入本研究的患者均有基线和治疗后一年的随访数据。

2.2 数据收集

基线资料包括: 年龄性别等一般情况, 相关临床症状体征, ALP、GGT、ALT、ALB、TBIL、BUN 及 CRE 等反应肝肾功能的血清生化指标, APRI 值 (AST/PLT 分数), 免疫学指标及自身抗体系列, 凝血检查, 反映 PBC 患者预后的 Mayo 评分 (1989 年 Dickson et al. 原始版^[65]), 和组织病理学资料 (按 Ludwig 标准^[58]进行组织学分期) 等。患者治疗一年后的随访数据主要包括血常规、免疫学指标和血清生化等。

2.3 UDCA 疗效评价

目前, 国际上有多种 UDCA 治疗应答的评价标准, 其中巴黎-I 及巴塞罗那标准被 AASLD 的 PBC 临床诊治指南和 PBC 临床研究指南推荐作为最佳的评价标准^[59, 60], 故本课题采用这两种标准来进行研究。巴黎-I 标准: UDCA 治疗一年后 ALP \leq 3 倍正常上限, AST \leq 2 倍正常上限, 及 TBIL \leq 1 mg/dL, 可认为应答良好; 巴塞罗那标准: UDCA 治疗一年后 ALP 水平较治疗前下降超过 40% 或降至正常。^[7, 8]

2.4 长期生存数据

本研究的长期生存以患者的无移植存活作为观察指标, 随访截止时间为 2014 年 12 月 31 日。患者的起点事件定义为确诊 PBC, 确诊时间为计算生存时间的启示时间点; 生存终点事件定义为随访过程中发生 PBC 相关肝病死亡或肝移植; 总体生存时间定义为从起始事件即确诊 PBC 到发生生存终点事件之间所经历的时间跨度, 单位为月, 对于失访或到截止时间仍未出现终点事件的删失患者, 其生存时间定义为起始事件到发生截尾时 (末次随访日或截止时间) 所经历的时间跨度 (月)。

3 血清维生素 D 检测

3.1 样品准备

患者于我中心确诊 PBC 并知情同意后,由一名技师遵我中心 PBC 生物样本库标准化流程(SOP)采集血清、DNA 和肝穿组织等于液氮中冻存。血清的具体处理流程为:快速法取血将新鲜血液静置 2-4h 后进行离心,转速 2500-3000rpm/min,时间为 15-20min;将离心获得的血清分成五管(1.5ml 收集管 2 管,每管约 100 μ l; 0.5ml 收集管 3 管,每管约 60 μ l;若血清量太少,可减少管数,但不可每管少于 30 μ l),编号打码后分别冻存并记录。

待本研究开始,确定研究对象后,依据患者的初治血清编号收集相应的冻存血清进行检测。

3.2 维生素 D 检测方法

25(OH)D 是人体维生素 D 的主要储存形式,也是美国内分泌协会和美国国家医学科学研究院(Institute of Medicine of the National Academies, IOM)指南推荐用来评价维生素 D 水平的血清指标。^[150, 151]

本研究采用全自动电化学发光法检测血清总 25(OH)D 水平,基于罗氏 Elecsys 免疫检验平台,配套 25(OH)D 检测试剂盒(Elecsys 25(OH)D Total Assay, Roche diagnosis, Switzerland)和血清标准品,将全部待检血清样品于同一批次进行检测。该方法批次内差异为 5.6%,检测范围为 4-100ng/mL。

由于体内维生素 D 水平可受日照水平差异的影响,考虑到本研究中患者绝大多数为中国西北部陕西地区,北纬 33°-39°之间,参照 Webb 等^[152]的方法并结合陕西地区的气候特点,将血清样品采集时间分成冬-春季(11 月-4 月)和夏秋季(5 月-10 月)。

3.3 维生素 D 状态的定义

依据美国内分泌协会和 IOM 的指南意见,根据血清 25(OH)D 水平将患者分为维生素 D 充足(25(OH)D \geq 20ng/mL)和维生素 D 缺乏(25(OH)D<20ng/mL)。

[150, 151]

4 统计学分析

本研究数据统计分析采用 SPSS19.0(IBM, Armonk, NY, USA)和 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) 软件进行, 并且双尾 $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

所有的连续变量均进行 Kolmogorov-Smirnov 正态性检验, 呈正态分布的连续变量包括年龄、Mayo 评分、血小板和 25 (OH) D 等记录为均值±标准差, 两两比较采用 Student's t 检验; 呈偏态分布的连续变量如 ALT、AST、ALP、GGT、白蛋白和胆红素等记录为中位数和四分位区间 (25th-75th), 两两比较采用 Mann-Whitney U 检验。分类变量表如性别、AMA、组织学期、UDCA 应答和维生素 D 状态等描述为频数和百分比, 两两比较采用卡方和 Fisher's 精确检验。四个病理分期指标的比较采用 One-Way ANOVA 或 Kruskal-Wallis H 检验。直线回归用于 25 (OH) D 水平与其他各基线指标的相关性分析, 其中 ALP、ALT、AST、GGT 和胆红素经 Log_e 转换以确保呈正态分布。25 (OH) D 水平与组织学四期采用 Spearman 秩相关进行分析。单因素和多因素 Logistic 回归用于分析与 UDCA 应答相关的因素, 单因素分析中达到统计学差异的变量进入到步退多元 Logistic 回归模型中, 多元回归的进入和剔除 P 值分别为 0.1 和 0.15, 并进行性别年龄和季节等因素的校正。APRI 和 Mayo 评分等复合变量不纳入多元回归。以 Kaplan-Meier 法进行生存分析, 并在各组间进行 log-rank 检验。

结 果

1 患者基本情况

共 98 例 PBC 患者纳入到本项研究，其基线资料如表 1 所示。患者初诊时平均年龄为 53.1 ± 9.4 岁，其中女性患者 85 名，占 87%。AMA 阳性率为 90%，基线时的平均 Mayo 评分为 4.8 ± 0.8 。

表 1: 98 名患者的基线情况 (N=98)

| 变量 | |
|-------------------------|-----------------|
| 年龄 (岁) | 53.1±9.4 |
| BMI | 23.3±1.9 |
| 女性 (%) | 85(87%) |
| AMA 阳性 (%) | 88(90%) |
| ALT (IU/L) | 58(35-91) |
| AST (IU/L) | 61(37-73) |
| ALP (IU/L) | 245(163-410) |
| GGT (IU/L) | 290(156-437) |
| 总胆红素(mg/dL) | 1.1(0.9-1.7) |
| 白蛋白 (g/L) | 40.4(37.7-43.7) |
| 血小板 ($\times 10^9/L$) | 151±72 |
| IgM (g/L) | 4.3±2.5 |
| Mayo 评分 | 4.8±0.8 |
| 组织学分期 (%，n=84) | |
| I | 16(19%) |
| II | 37(44%) |
| III | 21(25%) |
| IV | 10(12%) |
| 晚期 (III, IV) | 34(37%) |
| 维生素 D | |
| 血清 25(OH)D (ng/mL) | 17.9±7.6 |
| 维生素 D 缺乏 (%) | 56(57%) |
| 冬-春季 (%) | 42(43%) |

共有 84 位患者于初次就诊时进行了肝穿活检检查，根据 PBC 的 Ludwig's 组织学分期标准，其中 16 人为 I 期、37 人为 II 期、22 人为 III 期、10 人为 IV 期，晚期

(III-IV 期) 患者占比 37%。各期患者的生化指标如表 2 所示, 随分期增加, 患者 ALP 和胆红素等生化指标逐渐增高, 白蛋白和血小板降低, Mayo 评分也逐渐增高。患者的平均年龄和男性构成比也有随着分期增加而增加的趋势, 但统计学分析显示各组间无显著性差异。

表 2: 各病理分期患者生化指标 (p<0.05 记为*)

| | I 期 (n=16) | II 期 (n=37) | III 期 (n=21) | IV 期 (n=10) |
|---------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 年龄 (岁) | 50.9±7.9 | 52.3±9.8 | 53.3±10.1 | 56.8±7.5 |
| 女性 (%) | 16 (100%) | 33 (89%) | 17 (81%) | 7 (70%) |
| AMA 阳性 (%) | 16 (100%) | 32 (86%) | 17 (81%) | 9 (90%) |
| ALT (IU/L) | 34 (19-44) | 55 (36-93) | 80 (43-91) | 48 (27-102)* |
| AST (IU/L) | 31 (21-37) | 59 (44-73) | 67 (35-76) | 53 (42-73) |
| ALP (IU/L) | 130 (100-211) | 228 (157-374) | 316 (233-449) | 472 (224-554)* |
| GGT (IU/L) | 90 (65-190) | 302 (124-425) | 282 (152-577) | 358 (173-438)* |
| 胆红素 (mg/dL) | 0.91 (0.6-1.2) | 1.02 (0.8-1.7) | 1.06 (0.9-1.5) | 1.25 (1.0-2.1)* |
| 白蛋白 (g/L) | 41.1 (40.2-43.4) | 41.3 (38.4-44.7) | 40.3 (38.0-42.3) | 34.7 (31.4-40.0)* |
| 血小板 (x10 ⁹ /L) | 201±53 | 160±86 | 113±56 | 110±53* |
| INR | 0.98±0.08 | 0.99±0.08 | 0.99±0.11 | 1.0±0.15 |
| Mayo 评分 | 4.4±0.4 | 4.6±0.7 | 4.8±0.8 | 5.4±1.0* |

2 患者血清维生素 D 水平

2.1 总体治疗前血清维生素 D 水平

本研究中所有 98 名患者基线的平均 25 (OH) D 水平为 17.9±7.6 ng/mL, 其中 56 名患者的 25 (OH) D 水平低于 20ng/mL, 根据美国内分泌协会和 IOM 的指南意见, 认为是维生素 D 缺乏, 占总患者人数的 57%。(表 1) 由于因季节变换导致的日照等因素能影响机体血清维生素 D 水平, 参照 Webb 等^[152]的方法, 本研究根据初诊收取血样的时间将患者分为冬-春和夏-秋两个季节。有 43% 的患者于冬-春季就诊并收取血样, 其相应的血清 25 (OH) D 水平也低于初诊时为夏-秋季的患者 (14.4±5.4 vs. 20.5±7.9 ng/mL, p<0.01)。既往部分研究认为性别差异也能导致维生素 D 水平的差异, 本研究中男性和女性患者的 25(OH)D 水平分别为 17.7±8.0 ng/mL 和 17.9±7.5 ng/mL, 两组间无统计学差异。

2.2 维生素 D 水平与 PBC 病理分级密切相关

根据 PBC 的 Ludwig's 组织学分期标准, I-IV 期各期的血清 25(OH)D 水平逐渐降低, 分别为 21.8 ± 7.5 ng/mL、 18.9 ± 7.8 ng/mL、 15.9 ± 6.3 ng/mL 和 14.3 ± 6.4 ng/mL, one-way ANOVA 分析 $p=0.029$ 。(图 1) 各组织学分期内维生素 D 缺乏率随分期的增加也有增加的趋势, I-IV 期分别为 37%、54%、71%和 80%, 但因 IV 期样本量相对较小且卡方检验时组内期望值过小, 四期间维生素 D 缺乏率无统计学差异, $p=0.088$ 。

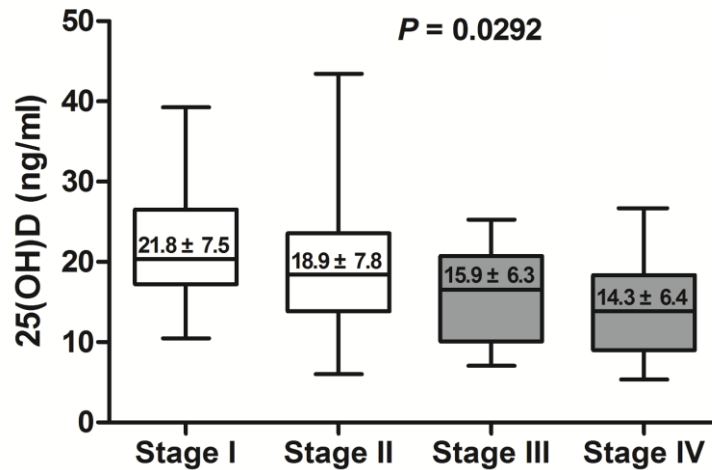


图 1: 各病理分期血清 25(OH)D 水平

根据组织学进展情况, PBC 的 I-II 期又称为早期, III-IV 期称为晚期, 有研究表明早期 PBC 患者的药物治疗应答和远期预后显著优于晚期患者, 甚至能获得与健康人群相近的长期生存^[11, 61, 62], 因此我们进一步比较了早晚期患者维生素 D 水平与维生素 D 缺乏比率的差异。结果显示, 早期患者的血清 25(OH)D 水平为 19.8 ± 7.7 ng/mL, 显著高于晚期患者的 15.4 ± 6.3 ng/mL, $p<0.01$ (图 2-A)。并且, 早期患者中伴有基线维生素 D 缺乏的比率也显著低于晚期患者 (74% vs. 49%, $p=0.038$)。(图 2-B)

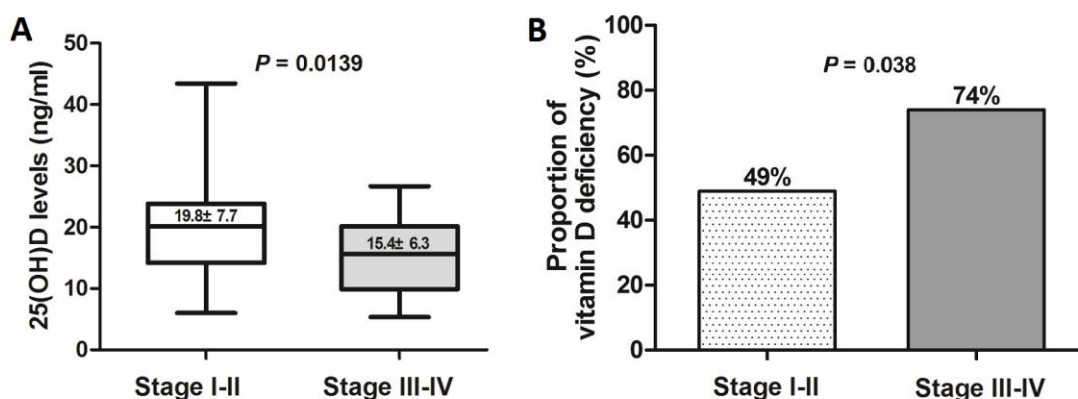


图 2: 早晚期 25 (OH) D 水平及维生素 D 缺乏比率的差异

2.3 维生素 D 水平与 PBC 患者胆汁淤积程度呈负相关

胆汁淤积是 PBC 的重要临床和病理特征, 并参与 PBC 的进展, 影响预后。总胆红素和 ALP 水平是反映 PBC 患者胆汁淤积程度的最理想的生化指标。本研究中患者总胆红素和 ALP 的血清值经 Log_e 转换后与血清 25 (OH) D 水平的关系如图 3 所示。总胆红素和 ALP 的值均随血清 25 (OH) D 水平升高而下降, r 值分别为 -0.38 和 -0.37, p 值均小于 0.001。

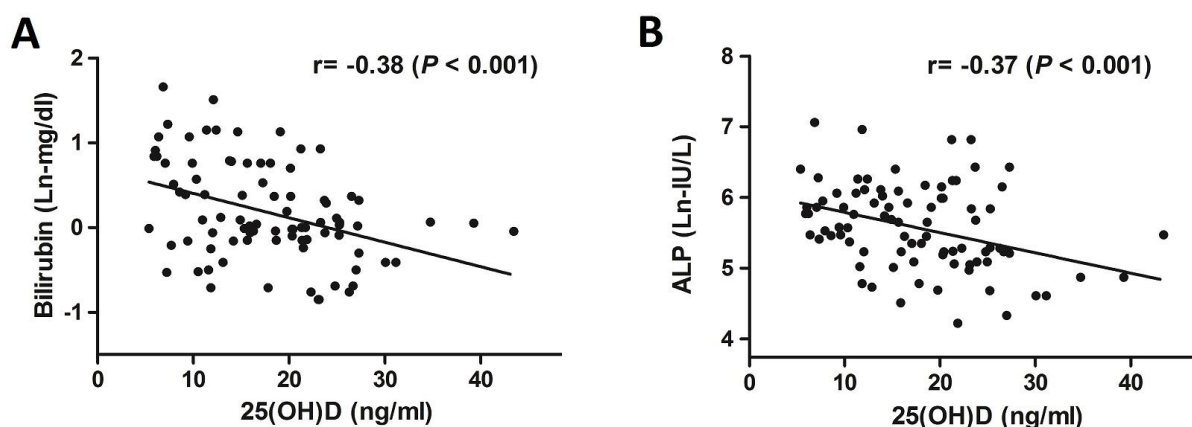


图 3: 血清 25 (OH) D 水平与胆汁淤积指标呈负相关

2.4 维生素 D 与其他基线临床指标的关系

其他重要的基线临床指标与维生素 D 水平的相关分析如表 3 所示。对数化后的

AST 和 GGT 值随着血清 25(OH)D 水平的升高而逐渐下降, r 值分别为-0.25 和-0.33; 而 ALT 随 25(OH)D 变化发生的改变不明显, $r=-0.17$, $p=0.098$, 无统计学意义。同时, 反映肝脏合成功能的白蛋白值则随着 25(OH)D 的升高而逐渐升高, $r=0.35$ 。APRI 值和预后评价指标 Mayo 评分也随着 25(OH)D 的增加而降低, r 值为-0.22 和-0.33。另外, 血小板计数和凝血指标 INR 与 25(OH)D 也成一定的相关性趋势, p 值分别为 0.069 和 0.053。血清 25(OH)D 水平与组织学四期的 Spearman 秩相关系数为-0.31, 二者呈显著负相关, 与上述 25(OH)D 在各组织分期间均值的比较结果一致。

表 3: 血清 25(OH)D 水平与基线各指标的相关性分析

| | ALT | AST | ALP | GGT | 胆红素 | 白蛋白 | 血小板 | INR | APRI | 分期 | Mayo 评分 | |
|---------|-----|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|---------|-------|
| 25(OH)D | r | -0.17 | -0.25 | -0.37 | -0.33 | -0.38 | 0.35 | 0.20 | -0.18 | -0.22 | -0.31 | -0.33 |
| | p | 0.098 | 0.012 | <0.001 | 0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.053 | 0.069 | 0.028 | 0.004 | 0.001 |

2.5 维生素 D 缺乏与充足患者各临床指标的比较

在 98 名患者中, 共有 56 人伴有维生素 D 缺乏, 基线时这部分患者与其他维生素 D 充足患者各指标的比较如表 4 所示。两组患者的血清 25(OH)D 水平分别为 $12.4 \pm 4.1 \text{ ng/mL}$ 和 $24.9 \pm 4.9 \text{ ng/mL}$, 年龄、性别比率、AMA 阳性率和体质指数等指标无显著性差异。转氨酶 ALT 和 AST 两组间均无明显差异。维生素 D 缺乏患者的 ALP 分布为 313 (217-430) IU/L 显著高于充足的患者 187 (163-357) IU/L, $p=0.005$, 胆红素值的分布 $1.7 (0.9-2.2) \text{ mg/dL}$ 也高于充足者的 $1.0 (0.7-1.2) \text{ mg/dL}$, $p=0.001$ 。白蛋白值的分布在缺乏患者和充足患者中分别为 $39.8 (36.8-43.4) \text{ g/L}$ 和 $41.4 (40.3-43.9) \text{ g/L}$, $p=0.008$ 。维生素 D 缺乏的患者具有更高的的基线 Mayo 评分 5.0 ± 0.9 , 与充足患者的 4.5 ± 0.6 具有显著性差异。同时, 晚期患者比率和 INR 值等在两组患者间也具有显著性差异, p 值均小于 0.05。此外, 维生素 D 缺乏患者 GGT 值的分布、血小板计数和 APRI 值和充足患者也有一定的差异, 统计学分析显示 p 值分别为 0.071、0.057 和 0.080。

表 4: 维生素 D 缺乏与充足患者各基线指标的比较

| | Vitamin D deficiency (25(OH)D<20ng/mL) n=56 | Vitamin D adequate (25(OH)D≥20ng/mL) n=42 | p-value |
|--------------------------------------|---|---|---------|
| Age (years) | 52.2±9.5 | 54.3±8.9 | n.s. |
| BMI | 23.4±1.9 | 23.1±1.9 | n.s. |
| Female gender (%) | 49 (88%) | 36 (86%) | n.s. |
| Serum 25(OH)D (ng/mL) | 12.4±4.1 | 24.9±4.9 | <0.001 |
| ALT (IU/L) | 57 (34-91) | 60 (38-93) | n.s. |
| AST (IU/L) | 63 (35-78) | 59 (37-73) | n.s. |
| ALP (IU/L) | 313 (217-430) | 187 (163-357) | 0.005 |
| GGT (IU/L) | 353 (174-505) | 231 (95-378) | 0.072 |
| Total bilirubin (mg/dL) | 1.7 (0.9-2.2) | 1.0 (0.7-1.2) | 0.001 |
| Albumin (g/L) | 39.8 (36.8-43.4) | 41.4 (40.3-43.9) | 0.008 |
| Platelet count (x10 ⁹ /L) | 139±69 | 167±73 | 0.057 |
| APRI | 0.62±0.44 | 0.46±0.42 | 0.080 |
| INR | 1.00±0.11 | 0.96±0.08 | 0.038 |
| IgM(g/L) | 4.4±2.7 | 4.2±2.2 | n.s. |
| Mayo risk score | 5.0±0.9 | 4.5±0.6 | 0.002 |
| Late stage (III, IV) | 47% | 23% | 0.038 |

3 UDCA 治疗应答情况及其与基线维生素 D 水平的关系

3.1 治疗应答评价

患者治疗一年后的各项指标的情况如表 5 所示。经过 UDCA 的治疗，患者总体的各项肝功能指标如 ALT、AST、ALP、GGT、胆红素和白蛋白，以及血小板和免疫球蛋白等均得到了显著改善。

根据巴黎-I 标准和巴塞罗那标准分别有 68.4%和 62.2%的患者在 UDCA 治疗一年后获得了较好的生化应答，称为应答者，其他的患者则称为应答不佳或不应答者。两种评价标准的配对 McNemar 检验 p 值为 0.11，其判定应答的一致性较好 (Kappa=0.78)。

表 5: UDCA 治疗一年后患者的生化改善情况
($p < 0.05$ 记为*, $p < 0.01$ 记为**)

| | At Baseline | After 1 year |
|------------------------------------|------------------|-------------------|
| ALT (IU/L) | 58 (35-91) | 33 (24-56)** |
| AST (IU/L) | 61 (37-73) | 31 (21-47)** |
| ALP (IU/L) | 245 (163-410) | 163 (117-245)** |
| GGT (IU/L) | 290 (156-437) | 117 (62-251)** |
| Total bilirubin (mg/dL) | 1.1 (0.9-1.7) | 0.8 (0.7-1.1)** |
| Albumin (g/L) | 40.4 (37.7-43.7) | 41.6 (40.1-45.3)* |
| Platelet count ($\times 10^9/L$) | 151 \pm 72 | 164 \pm 84* |
| IgM(g/L) | 4.3 \pm 2.5 | 3.4 \pm 1.6** |
| UDCA response | | |
| Responders-Paris I criteria (%) | | 67 (68.4%) |
| Responders-Barcelona criteria (%) | | 61 (62.2%) |

3.2 UDCA 应答者基线维生素 D 水平高于不应答者

UDCA 治疗一年后应答者和不应答者基线 25(OH)D 水平的比较如图 4 所示。采用巴黎-I标准所判定的 67 名 UDCA 应答者治疗前的基线 25(OH)D 水平为 19.3 ± 7.5 ng/mL, 显著高于另外 31 名应答不佳者的 14.8 ± 6.4 ng/mL, p 值为 0.005。在巴塞罗那标准判定的应答者中, 基线血清 25(OH)D 水平是 19.7 ± 7.7 ng/mL, 同样显著高于不应答者的 14.9 ± 6.3 ng/mL, p 值为 0.002。

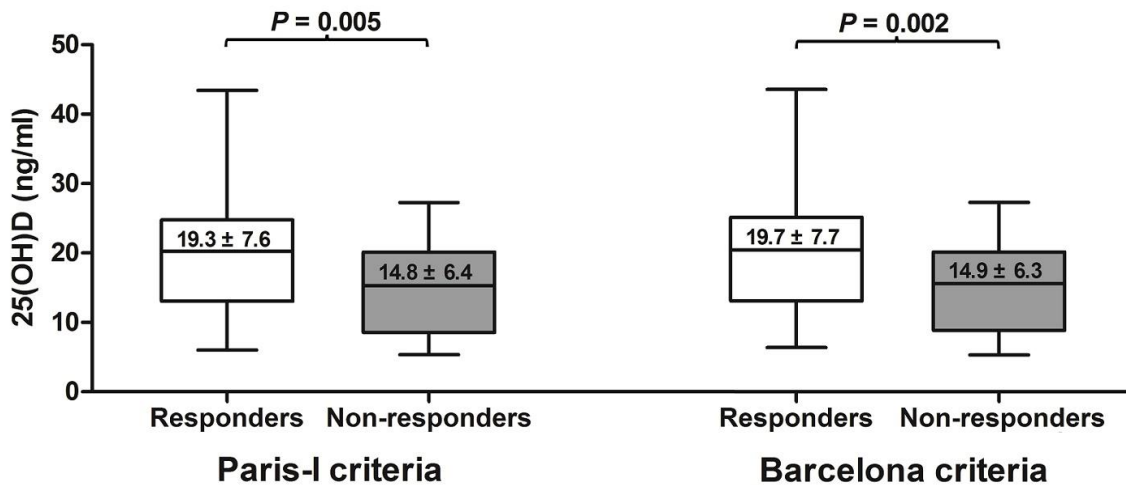


图 4: UDCA 应答者和不应答者基线维生素 D 水平的差异

3.3 治疗前维生素 D 缺乏的患者 UDCA 应答率低

比较基线时处于不同维生素 D 状态下的 PBC 患者经 UDCA 治疗一年后的生化应答情况,如图 5 所示:本研究中基线时伴有维生素 D 缺乏(25(OH)D 小于 20 ng/mL)的患者总共 56 名,根据巴黎-I 标准 UDCA 治疗一年后,其中有 23 人(41%)无法获得有效的生化应答,判定为不应答者,这一不应答率显著高于维生素 D 充足患者的 19%;并且,使用巴塞罗那标准来判定疗效也能得到相同的结果,其不应答率在基线维生素 D 缺乏患者和充足患者中分别为 48%和 24%,差异有统计学意义。

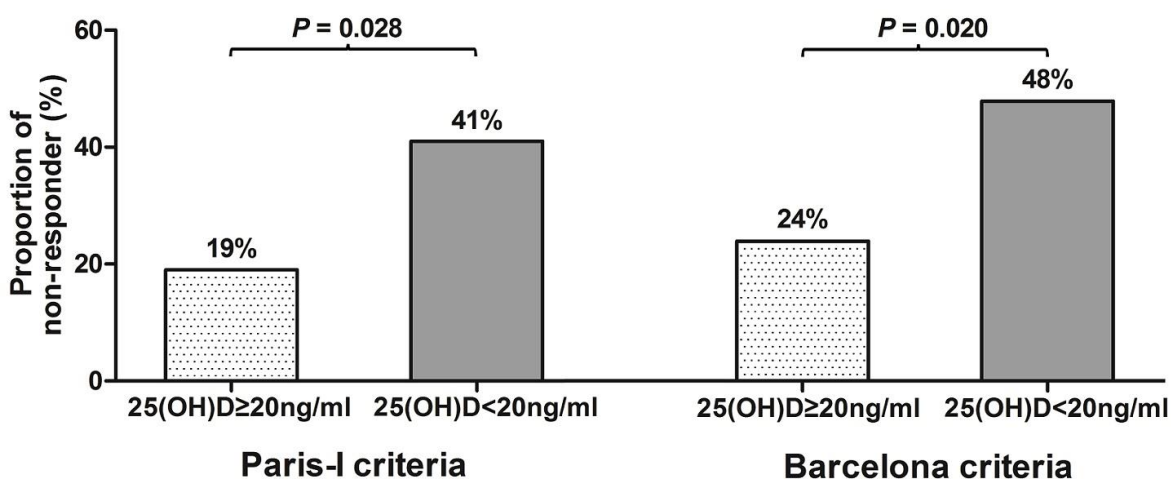


图 5: 基线维生素 D 缺乏和充足患者的治疗后 UDCA 应答情况

3.4 UDCA 应答者与应答不佳者各基线临床指标的比较

如表 6 所示,将 UDCA 应答者和应答不佳者的基线时的年龄、性别、转氨酶、胆红素、白蛋白、血小板、凝血指标、Mayo 评分和组织学期等临床指标进行对比。其结果示性别、年龄、AMA 阳性率、IgM 等指标在两组间无显著性差异,两种评价标准所确定的应答不佳患者的基线转氨酶、ALP、胆红素和 Mayo 评分均显著高于应答者,白蛋白低于应答者,并且组织学期处于晚期的比率更高。

表 6: UDCA 应答者与应答不佳者各基线临床指标

| | 巴黎-I 标准 | | | 巴塞罗那标准 | | |
|--------------------------|------------------|------------------|----------|------------------|------------------|----------|
| | 应答者 n=67 | 应答不佳者 n=31 | <i>p</i> | 应答者 n=61 | 应答不佳者 n=37 | <i>p</i> |
| 年龄(岁) | 53.7±9.5 | 51.8±9.0 | 0.363 | 53.9±9.6 | 51.7±8.9 | 0.258 |
| 女性(%) | 61 (91%) | 24 (77%) | 0.106 | 55 (90%) | 30 (81%) | 0.229 |
| BMI | 23.2±2.0 | 23.4±1.6 | 0.792 | 23.2±2.0 | 23.4±1.7 | 0.730 |
| AMA 阳性(%) | 61 (91%) | 27 (87%) | 0.721 | 56 (92%) | 32 (87%) | 0.496 |
| ALT(IU/L) | 48 (34-86) | 70 (45-95) | 0.049 | 48 (34-81) | 77 (42-96) | 0.017 |
| AST(IU/L) | 54 (35-72) | 69 (52-101) | 0.005 | 54 (36-71) | 71 (47-100) | 0.008 |
| ALP(IU/L) | 197 (151-343) | 374 (262-525) | 0.001 | 189 (150-304) | 374 (257-519) | 0.000 |
| 胆红素(mg/dL) | 0.94 (0.7-1.2) | 1.7 (1.1-2.5) | 0.000 | 0.91 (0.7-1.1) | 1.8 (1.1-2.4) | 0.000 |
| 白蛋白(g/L) | 41.1 (39.1-44.5) | 40.2 (34.7-42.3) | 0.012 | 41.2 (39.1-44.2) | 40.2 (36.5-42.3) | 0.031 |
| 血小板(x10 ⁹ /L) | 164±75 | 124±56 | 0.010 | 161±74 | 134±65 | 0.072 |
| IgM(g/L) | 4.1±2.1 | 4.6±3.2 | 0.395 | 4.2±2.0 | 4.6±3.1 | 0.425 |
| INR | 0.97±0.08 | 1.01±0.13 | 0.059 | 0.98±0.08 | 1.00±0.13 | 0.202 |
| Mayo 风险评分 | 4.6±0.7 | 5.3±0.7 | 0.000 | 4.6±0.7 | 5.2±0.8 | 0.000 |
| 病理晚期(I%) | 15 (26.3%) | 16 (59.3%) | 0.007 | 12 (23.5%) | 19 (57.6%) | 0.002 |

3.5 基线维生素 D 水平与 UDCA 治疗应答独立相关: 应答相关基线因素的单-多因素 Logistic 回归

3.5.1 与 UDCA 应答相关的单因素分析

针对 98 例患者, 以是否 UDCA 应答不佳为应变量, 分析患者的各人口学指标、生化指标及维生素 D 状态等与治疗应答的关系, 为下一步多因素分析做准备。纳入单因素分析的各变量为应答者与不应答者的对比中 *p* 小于 0.05 的各参数、既往文献报道的与 UDCA 应答相关的高 ALP 水平和组织学分期等、以及年龄性别等指标。回归分析中的维生素 D 状态及 25 (OH) D 水平均进行季节校正。两种应答标准单因素 Logistic 回归的结果如表 7 所示, 病理晚期、高 AST 水平、胆红素异常、高 ALP、低白蛋白和维生素 D 缺乏是 UDCA 应答不佳的危险因素, 比值比 (Odds Ratio, OR) 均大于 1 且 *p* 小于 0.05。25 (OH) D 水平为保护性因素, 其在两种应答评价标准中

的 OR 值均为 0.91，95%可信区间（confidence interval, CI）巴黎-I 标准是 0.84-0.98，巴塞罗那标准是 0.85-0.97，*p* 均小于 0.01。

表 7：与 UDCA 应答相关基线指标的单因素分析

| | 巴黎-I 标准 | | 巴塞罗那标准 | |
|---|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | Odds Ratio (95% CI) | <i>p</i> -value | Odds Ratio (95% CI) | <i>p</i> -value |
| 年龄 | | | | |
| <50 岁 vs. ≥50 岁 | 2.08 (0.86-5.04) | 0.105 | 1.97 (0.84-4.65) | 0.121 |
| 性别 | | | | |
| 男 vs. 女 | 2.96 (0.90-9.73) | 0.073 | 2.14 (0.66-6.95) | 0.206 |
| 病理 | | | | |
| 晚期 vs. 早期 | 2.31 (1.32-4.04) | 0.003 | 2.37 (1.36-4.11) | 0.002 |
| AST | | | | |
| ≥2ULN vs. <2ULN | 2.66 (1.11-6.39) | 0.029 | 2.81 (1.20-6.57) | 0.017 |
| 胆红素 | | | | |
| ≥1mg/dL vs. <1mg/dL | 6.41 (2.19-18.72) | 0.001 | 9.86 (3.37-28.86) | 0.001 |
| ALP | | | | |
| ≥3ULN vs. <3ULN | 4.77 (1.84-12.41) | 0.001 | 6.28 (2.35-16.79) | 0.001 |
| 白蛋白 | | | | |
| <40g/L vs. ≥40g/L | 3.30 (1.10-9.87) | 0.033 | 3.10 (1.06-9.05) | 0.039 |
| 血小板 | | | | |
| <100x10 ⁹ /L vs. ≥100x10 ⁹ /L | 2.01 (0.81-5.03) | 0.134 | 1.66 (0.68-4.05) | 0.265 |
| INR | | | | |
| ≥1.1 vs. <1.1 | 1.66 (0.57-4.88) | 0.255 | 1.19 (0.41-3.46) | 0.349 |
| 维生素 D 缺乏 | | | | |
| 是 vs. 否 | 3.11 (1.12-8.63) | 0.029 | 2.80 (1.07-7.29) | 0.036 |
| 25(OH)D, ng/mL | 0.91 (0.84-0.98) | 0.008 | 0.91 (0.85-0.97) | 0.006 |

3.5.2 与 UDCA 应答相关的多因素分析

将单因素分析中 $p < 0.1$ 的变量纳入步退 Logistic 回归模型中进行多因素分析，不纳入 APRI 和 Mayo 评分等复合变量。多远回归的进入和剔除 p 值分别为 0.1 和 0.15，并进行年龄、性别和季节混杂因素的校正。巴黎-I 和巴塞罗那两种应答标准多元分析的结果分别如表 8 和表 9 所示，维生素 D 以缺乏与否和 25 (OH) D 水平两种变

量分别进行多元分析。在最终的巴黎-I 标准模型中，维生素 D 缺乏是应答不佳的独立危险因素，OR 值为 3.93，95%CI 为 1.02-15.19， $p=0.047$ ，独立于高 ALP、异常胆红素和病理晚期；并且 25(OH)D 作为连续变量时，OR=0.90 (0.81-0.99)， p 为 0.026，即 25(OH)D 每增加 1ng/mL，患者发生 UDCA 不应答的风险降低 10%。应用巴塞罗那标准判定应答时，维生素 D 缺乏和 25(OH)D 均进入了各自最终的回归模型，维生素 D 缺乏的 OR=3.40 (0.84-13.81)， $p=0.088$ ；25(OH)D 水平的 OR=0.89 (0.81-0.99)， $p=0.028$ ，均独立于高 ALP、胆红素和病理分期。

表 8：巴黎-I 标准应答不佳的多因素分析

| | 维生素 D - 缺乏与否 | | 维生素 D - 25(OH)D 值 | |
|-------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|
| | Odds Ratio (95% CI) | p-value | Odds Ratio (95% CI) | p-value |
| 病理晚期 | 1.70 (0.83-3.52) | 0.151 | 1.70 (0.87-3.31) | 0.205 |
| AST \geq 2ULN | Removed | n.s. | Removed | n.s. |
| 胆红素 \geq 1mg/dL | 4.97 (1.40-17.61) | 0.013 | 5.34 (1.50-19.02) | 0.010 |
| ALP \geq 3ULN | 3.48 (0.98-12.32) | 0.054 | 2.77 (0.81-9.49) | 0.104 |
| 白蛋白 $<$ 40g/L | Removed | n.s. | Removed | n.s. |
| 维生素 D 缺乏 | 3.93 (1.02-15.19) | 0.047 | - | |
| 25(OH)D, ng/mL | - | | 0.90 (0.81-0.99) | 0.026 |

表 9：巴塞罗那标准应答不佳的多因素分析

| | 维生素 D - 缺乏与否 | | 维生素 D - 25(OH)D 值 | |
|-------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|
| | Odds Ratio (95% CI) | p-value | Odds Ratio (95% CI) | p-value |
| 病理晚期 | 1.77 (0.81-3.90) | 0.155 | 1.72 (0.84-3.52) | 0.235 |
| AST \geq 2ULN | Removed | n.s. | Removed | n.s. |
| 胆红素 \geq 1mg/dL | 10.07 (2.65-38.25) | 0.001 | 11.33 (2.92-44.02) | 0.002 |
| ALP \geq 3ULN | 5.06 (1.28-20.00) | 0.021 | 3.90 (1.03-14.82) | 0.046 |
| 白蛋白 $<$ 40g/L | Removed | n.s. | Removed | n.s. |
| 维生素 D 缺乏 | 3.40 (0.84-13.81) | 0.088 | - | |
| 25(OH)D, ng/mL | - | | 0.89 (0.81-0.99) | 0.028 |

3.6 基线维生素 D 水平对 UDCA 治疗应答不佳的预测

由于基线维生素 D 与 UDCA 治疗一年后的生化应答相关，且独立于异常的生化值和病理分期，拟通过受试者工作曲线（ROC 曲线）来分析基线维生素 D 水平和公认的维生素 D 缺乏标准对 UDCA 应答的预测价值。血清 25（OH）D 水平预测 PBC 患者 UDCA 治疗一年后应答不佳的 ROC 曲线如图 6 所示。巴黎-I 和巴塞罗那两种应答标准的曲线下面积分别为 0.68 ± 0.06 ($p=0.006$) 和 0.69 ± 0.05 ($p=0.003$)。曲线中，25（OH）D 的水平处于维生素 D 缺乏的界值时（即 20ng/mL），维生素 D 状态预测 UDCA 应答不佳的敏感性为 81%（巴黎-I 标准）和 78%（巴塞罗那标准），特异性则为 51%（巴黎-I 标准）和 53%（巴塞罗那标准）。

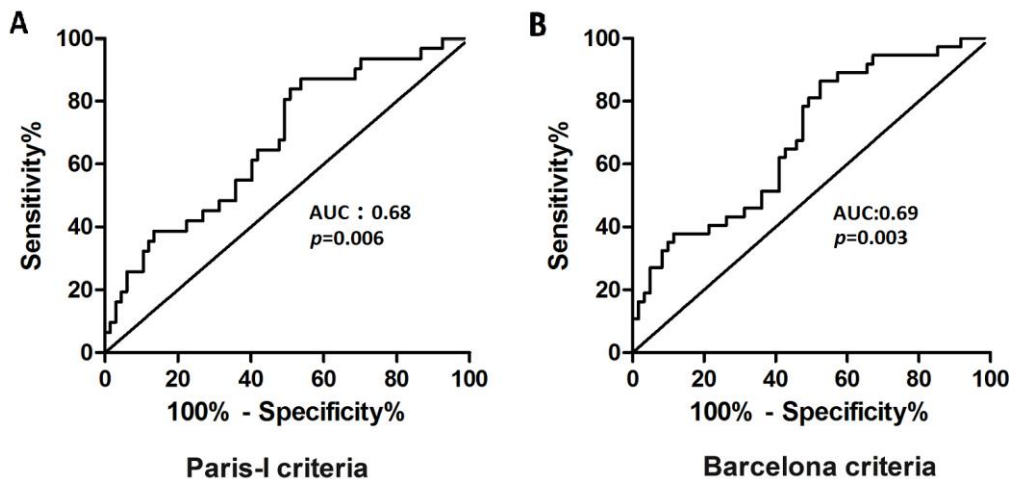


图 6: 基线维生素 D 水平预测 UDCA 治疗应答不佳的 ROC 曲线

3.7 亚组分层分析：晚期患者中应答与不应答间维生素 D 水平的差异更明显

由于病理分级是最常用于 PBC 分级的方法，既往报道认为早、晚期患者的 UDCA 应答存在差异，我们的多因素分析结果也证实了这一点。那么对于分别处于早期与晚期的患者来说，UDCA 应答与维生素 D 的水平关系又是怎样的呢？为了回答这一问题，我们对本研究中具有组织学数据的 84 名患者进行了病理分级的亚组分层分析。如图 7 所示，在巴黎-I 标准下，晚期患者中应答者与不应答者维生素 D 水平的差异显著 (18.0 ± 6.7 ng/mL vs. 12.9 ± 4.8 ng/mL, $p=0.023$)，而这一差异在早期患者中并未达到统计学意义 (20.5 ± 8.0 ng/mL vs. 17.2 ± 6.1 ng/mL, $p=0.217$)。应用巴塞罗那标准时，这一现象同样存在，早、晚期的 p 值分别为 0.060 和 0.049。

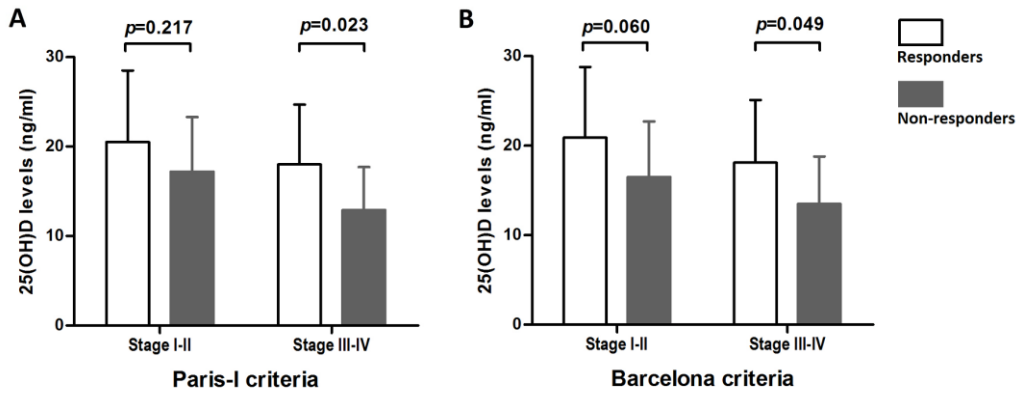


图 7: 应答者与不应答者维生素 D 水平的早晚期分层分析

4 患者远期预后及与基线维生素 D 水平的关系

4.1 长期随访情况

以 2014 年 12 月 31 日为随访的截止时间，98 名患者的总体中位随访时间为 66 个月（四分位区间，55-76 个月）。随访期间，共有 8 名患者为发生了终点事件：7 名患者因 PBC 引起的严重肝病去世（6 名因肝硬化引起的肝衰竭死亡，1 名死于肝癌），另有 1 名患者在随访过程中接受了肝移植，这 8 人从确诊到发生肝病相关终点事件的时间即生存时间中位数为 58 个月（范围，26-78 个月）。

4.2 发生肝病终点事件患者的基线维生素 D 水平更低

如图 8 所示，8 名发生了终点事件的患者确诊时平均基线 25(OH)D 水平为 12.1 ± 4.6 ng/mL，显著低于其他未发生肝病相关重点事件患者的平均基线 25(OH)D 水平 (18.4 ± 7.6 ng/mL)，p 值为 0.023。

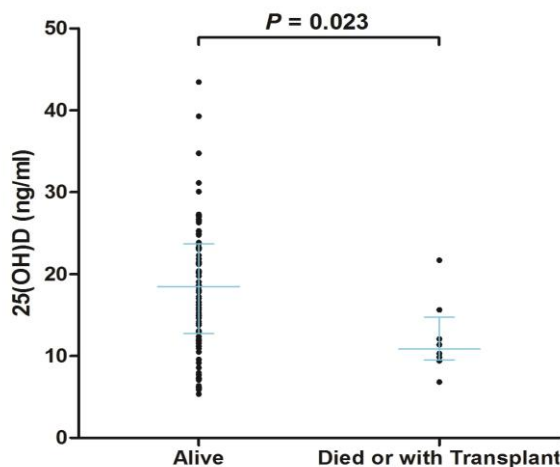


图 8: 获得长期无移植生存的患者基线维生素 D 水平更高

4.3 维生素 D 缺乏患者的长期生存相对维生素 D 充足者更差

在发生了终点事件的 8 名患者中，有 7 人的基线 25(OH)D 水平小于 20ng/mL，为维生素 D 缺乏，并且其中有 3 人的 25(OH)D 水平低于 10ng/mL，为维生素 D 严重缺乏。如图 9-A 所示，按照基线维生素 D 缺乏和不缺乏分组进行无移植生存分析，其中缺乏组 56 人（57%），充足组 42 人（43%）。基线维生素 D 充足的 PBC 患者表现出比伴有维生素 D 缺乏的患者更好的无移植生存的趋势，Log-rank 检验 $p=0.063$ 。由于发生终点事件的患者中近半数（3/8）伴有维生素 D 严重缺乏（小于 10ng/mL），将维生素 D 状态将 98 名患者以 10ng/mL 和 20ng/mL 分为严重缺乏、缺乏和充足三类进行无移植生存分析，每组分别有 16 人（16%）、40 人（41%）和 42 人（43%）。三组患者生存分析结果如图 9-B 所示，患者的长期无移植生存情况随着维生素 D 水平的降低而变差，Log-rank 检验 $p=0.016$ 。

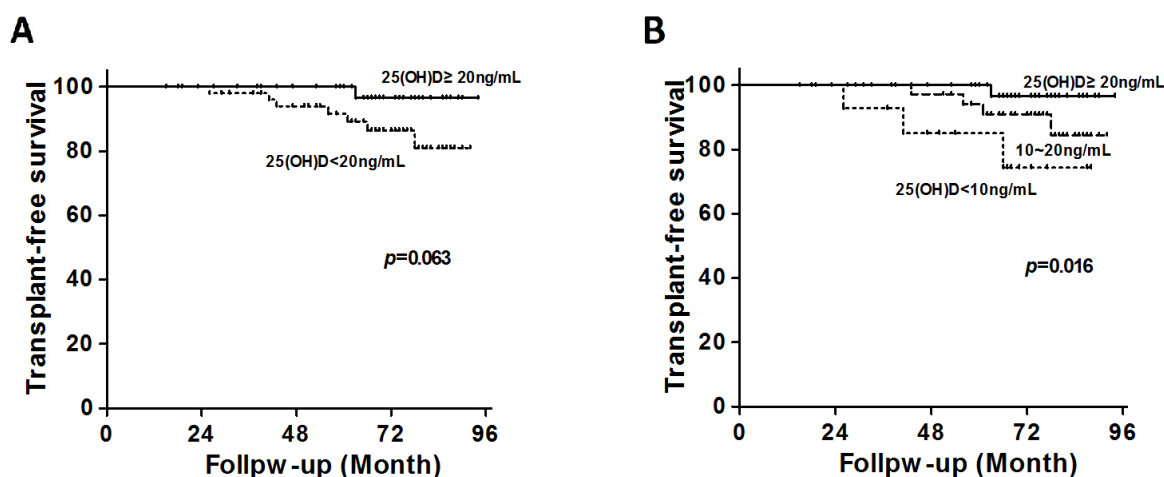


图 9：治疗前处于不同维生素 D 状态下患者的无移植生存情况

4.4 UDCA 治疗无应答者的长期生存比应答者差

既往研究发现 PBC 患者在 UDCA 治疗一年后，其生化应答情况与患者的长期生存密切相关，如图 10 所示，本研究中，按患者一年生化应答情况将患者分为应答者和无应答者，两种应答标准均显示在治疗一年后获得良好生化应答的患者的长期无移植生存更好， p 值均小于 0.05。

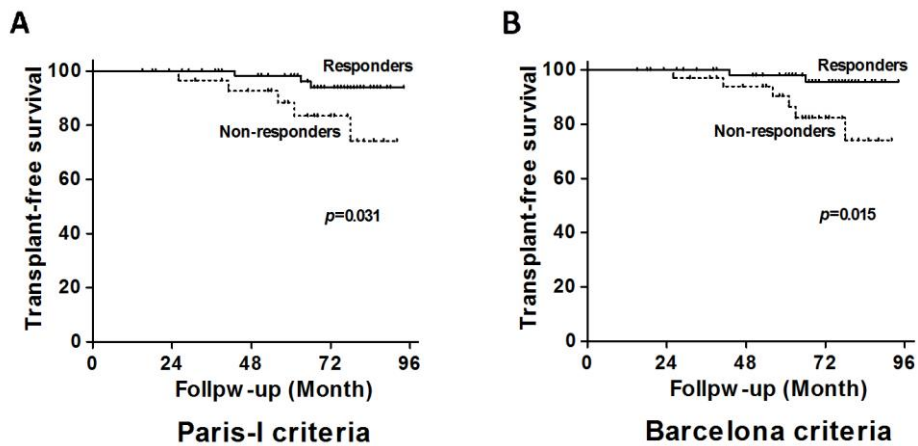


图 10: UDCA 应答者和无应答者的无移植生存情况

4.5 基线维生素 D 缺乏且治疗一年无应答者长期生存最差

基于前述结果，按基线维生素 D 状态和 UDCA 治疗一年后的生化应答情况将患者分为高风险、中度风险和低风险三组进行生存分析，分组的具体标准为 - 高风险组：基线维生素 D 缺乏且 UDCA 不应答；中度风险组：基线维生素 D 缺乏而治疗后 UDCA 应答良好，或基线维生素 D 充足而 UDCA 应答不佳；低风险组：基线维生素 D 充足且 UDCA 生化应答良好。如图 11 所示，三组患者中，维生素 D 缺乏且无应答的高风险患者的长期生存最差，巴黎-I（图 11-A）和巴塞罗那（图 11-B）两种标准结果一致，Log Rank 检验 p 值分别为 0.010 和 0.006，两两比较结果也表明高风险组相较于中、低风险组长期生存更差。

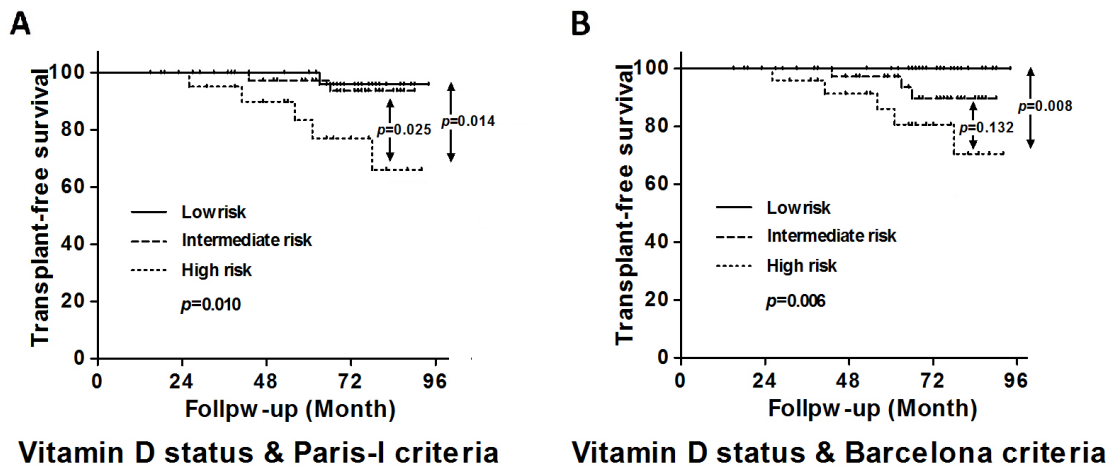


图 11: 联合维生素 D 和 UDCA 应答的生存分析

(高风险组:基线维生素 D 缺乏且 UDCA 治疗无应答;中度风险组:维 D 缺乏 UDCA 应答/维 D 充足 UDCA 无应答;低风险组: 维生素 D 充足且 UDCA 应答良好)

讨 论

一. 回顾本研究结果

维生素 D 缺乏是 PBC 患者常伴发的一类脂溶性维生素缺乏症, 由于维生素 D 在骨代谢中的关键作用, 既往早期的 PBC 研究中多将其与 PBC 患者的肝性骨病并发症联系起来。^[12-15]而近年来, 维生素 D 被发现在炎症发生、胆固醇代谢及胆汁转运、脏器纤维化、免疫调节和肿瘤生长等多种病理生理过程中发挥着重要的作用^[16-21], 由于这些过程中如免疫调节和胆汁转运等是 PBC 发生和发展的关键环节, 因此维生素 D 在 PBC 中可能扮演着更为重要的角色。基于匈牙利、德国、意大利和日本等多个人群的病因学研究发现维生素 D 受体的单核苷酸基因多态性与 PBC 的发病存在关联^[22-26], 我课题组前期也对这些研究的结果进行了荟萃分析, 进一步探究并明确了这一相关性^[113]; 而最近一项基于英国全国健康数据的研究进一步发现维生素 D 缺乏能增加 PBC 的发病风险^[27], 这些研究均提示维生素 D 可能作为一种重要的遗传和环境因素参与了 PBC 的发生。那么, 维生素 D 与 PBC 疾病本身的临床表现、治疗应答情况及远期预后等又有怎样的联系? 明确这一问题, 一方面, 在病因学层面上对于深入探究维生素 D 与 PBC 的关系至关重要。另一方面, 更可以为相关的临床问题的解决提供新的思路, 具有重要的临床意义。因此, 基于我中心十年来所建立的 PBC 初诊患者临床队列和 PBC 及其一级亲属生物样本库, 我们设计了本研究, 这也是目前国际上首次对维生素 D 与 PBC 的骨外相关性特别是与 UDCA 疗效的关系这一问题进行探索和回答。本研究的主要结论有: (1) 采用目前国际通行维生素 D 缺乏的定义和国内最常用的检测方法, 约半数 PBC 患者确诊时伴有维生素 D 缺乏; (2) PBC 患者的血清维生素 D 水平随疾病组织学进展逐渐降低, 并且与胆汁淤积的严重程度呈负相关; (3) 确诊时伴有维生素 D 缺乏的患者生化异常更明显, 组织学损伤更严重, Mayo 风险评分更差; (4) UDCA 应答不佳者的治疗前维生素 D 水平显著低于应答者, 治疗前伴有维生素 D 缺乏的患者 UDCA 应答率低于充足的患者; (5) 维生素 D 缺乏是 UDCA 应答不佳的独立危险因素; (6) 发生肝病相关事件患者的基线维生素 D 水平更低, 维生素 D 缺乏可能是 PBC 远期预后的危险因素; (7) 与维生素 D 充足和/或 UDCA 应答良好的患者相比, 治疗前伴有维生素 D 缺乏并且治疗一年后 UDCA 应答不佳的 PBC 患者预后最差。

二. 主要结果的解释, 及与既往研究的关系

A. PBC 患者的维生素 D 水平

本研究所检测到的 PBC 患者维生素 D 水平及缺乏的比率与较早的研究略有差异, 而与最近十年仅有的两项研究比较一致 (见表 10)。早期的关于 PBC 维生素 D 状态的报道主要关注的是脂溶性维生素缺乏或肝性骨病并发症, 而且样本量均较小, 很多都没有提供具体 25 (OH) D 浓度的数值, 根据这些报道, 维生素 D 缺乏出现于 14%-73% 的 PBC 患者。最近 20 年相关报道较少, 直到 2011 年 Malham 等在 34 名 PBC 患者中发现有 60% 的患者血清 25 (OH) D 水平低于 20ng/mL^[112], 而最近欧洲的一项纳入 79 名 PBC 患者的多中心横断面研究则发现维生素 D 缺乏 (定义为 $\leq 10\text{ng/mL}$) 的比率为 33%^[153]。如表 10 所示, 这些研究中维生素 D 水平的检测方法各不相同, 界定维生素 D 状态的标准也不一样, 晚期患者比率也存在差异, 而且很多研究对象已经接受过治疗甚至使用过激素或维生素 D, 这些因素都可能是导致各研究间结果不统一的原因。最近十几年, 25 (OH) D 水平的检测方法学领域有了革命性的进步, 全自动化学发光法和液相色谱质谱联用法被广泛采用, 特别是这几年随着统一的血清 25 (OH) D 标准品的开发和使用, 各中心的检测结果有了横向比较和参考的可能。本研究中 PBC 患者的 25 (OH) D 水平与近年 Malham 等和 Levin 等的结果一致, 维生素 D 缺乏的比率也相近。并且在本研究的设计中, 所有患者都是 treatment-naïve, 患者均长期居住于中国西北部北纬 33-39 度之间而且确诊时的季节也呈均匀分布, 这些都确保了本研究中测得的 25 (OH) D 水平能更好地反映 PBC 患者的维生素 D 状态, 为研究结果进一步的分析和解读打下了良好的基础。除此之外, 由于本研究中维生素 D 的检测方法临床实际应用的前景更广, 特别对于中国人群而言, 我们的结果更具有临床实用价值。

表 10: 既往研究中 PBC 患者的血清维生素 D 水平及缺乏的比率

| 研究者 | 人数 | 平均 25(OH)D (ng/mL) | 缺乏率 (%) | 缺乏定义 | 检测方法 | 晚期 比率 |
|-------------------------------------|----|-----------------------|------------|------------|----------------|----------|
| Herlong 等 ^[13] , 1982 | 15 | 11.9±2.0 | 73% | 小于 15ng/mL | 放射性免疫法 | 60% |
| Hodgson 等 ^[14] , 1985 | 15 | 18 ±3.5 | 53% | 小于 20ng/mL | 高压液相法 | 67% |
| Munoz 等 ^[111] , 1989 | 45 | 无 | 23% | 小于 12ng/mL | 放射性免疫法 | 无 |
| Malham 等 ^[112] , 2011 | 34 | 18 (中位数) | 60% | 小于 20ng/mL | 液相色谱质谱联用法 | N/A |
| Levin 等 ^[153] , 2015 | 79 | 16.8 ±9 | 33% | 小于 10ng/mL | 化学发光, DiaSorin | 20% |
| 本研究 | 98 | 17.9±7.6 | 57% | 小于 20ng/mL | 电化学发光, Roche | 37% |

B. 初诊患者维生素 D 水平与病情轻重的关系

本研究结果显示维生素 D 水平随着组织学损伤加重而降低, 而且在维生素 D 缺乏的患者中, 近半数已进展到晚期。最近 Levin 等的结果也显示维生素 D 与疾病分期密切相关。^[153] 但该研究中有 75% 的患者已接受了规范化 UDCA 治疗, 而且晚期的定义不是基于病理结果, 晚期患者数量也过少, 其结果对临床中初诊患者的实际意义较差。PBC 维生素 D 水平与组织学损伤的关系是对之前维生素 D 受体 SNP 与 PBC 发病关系研究的一种补充; 同时, 这一结果也与近年在其他如病毒性肝炎、酒精性肝病、代谢性肝病、肝癌、SLE、炎症性肠病和 MS 等疾病中的相似发现具有高度的一致性 (特别是最近一项自身免疫性肝炎与维生素 D 关系的研究^[154], 文献回顾部分表 2、表 3), 进一步提示维生素 D 与肝病/免疫性疾病的损伤程度有关, 可能在这两大类疾病的发生发展中发挥着重要的作用。

除组织学损伤之外, 本研究同样发现了维生素 D 与其他 PBC 重要基线指标的密切联系, 特别是与胆汁淤积程度和 Mayo 预后风险评分的负相关性。胆汁淤积是 PBC 发生发展及纤维化等过程中的关键环节, ALP 和胆红素是 PBC 中反映胆汁淤积程度的主要指标, 研究表明, 初诊时胆红素升高和/或 ALP 异常高的 PBC 患者远期生存较差。Mayo 风险评分是目前最常用的 PBC 预后评价系统, 基于患者的年龄、胆汁

淤积程度、肝脏合成功能、凝血功能和门脉高压情况综合计算，其评分越高，患者的生存越差。本研究中所发现的维生素 D 与胆红素及 Mayo 评分的关系，和组织学层面的发现一起进一步说明了维生素 D 与 PBC 病情轻重的关系，对深入理解维生素 D 与 PBC 的关系和探讨其临床应用具有一定的意义。

C. 维生素 D 水平与 UDCA 治疗应答的关系

本研究中最有价值的工作是对维生素 D 与 PBC 治疗效果的相关性进行了探讨，这部分的结果可以从 UDCA 药理机制和维生素 D 骨外作用的一些基础研究来得到支持。虽然 UDCA 治疗 PBC 的临床疗效确切，但其机制并不十分明确，目前认为主要包括：改变淤积胆汁中胆汁酸的成分增加亲水性从而降低胆汁的毒性，稳定胆管上皮细胞膜从而增强其抵抗细菌等毒性物质的能力，抑制实质细胞和胆管上皮细胞的凋亡，和参与对患者紊乱的自身免疫反应的调控。^[117] 而近年的维生素 D 在胆汁淤积及免疫/炎症调控方面的研究则提示，维生素 D 部分新发现的功能可与 UDCA 的这些药理作用有重叠，或可形成直接或间接的协同作用。如在胆汁淤积小鼠模型中，补充活性维生素 D 能抑制胆汁酸分泌及促进胆汁的排泄；而维生素 D 受体敲除后，小鼠的胆管上皮细胞间的紧密连接受损易于受到毒性物质的损伤，而且发生胆汁淤积时肝脏无法完成一些适应性改变如胆汁转运分子的代偿性分泌等，导致敲除小鼠比正常小鼠的胆汁淤积更加严重。^[141, 142] 因此，一旦 PBC 患者的维生素 D 水平过低维生素 D 系统的正常功能受损，可能会限制 UDCA 对胆管上皮的保护作用及其对胆汁成分的改善作用，从而影响后者的疗效。并且，维生素 D 系统还能诱导树突状细胞免疫耐受、抑制某些促炎效应 T 细胞的分化、促进 Treg 细胞的分化和功能、以及调节 B 细胞的功能^[136]，这些都是改善 PBC 局部和全身紊乱的免疫反应的有效途径。除此之外，我们的研究结果还可以从维生素 D 与 UDCA 的一些直接的协同作用来得到支持。有研究表明 UDCA 和维生素 D 能协同参与加强胆管局部的固有免疫屏障，它们能通过协同激活维生素 D 受体促进胆管上皮细胞强力抗菌肽 cathelicidin 的分泌，并且单独的 UDCA 这一调控效果远差于维生素 D 同时存在时。^[147] 由于胆管上皮固有免疫的加强能降低淤积胆汁中细菌繁殖和内毒素积聚的风险，是降低胆汁淤积时胆汁毒性和避免胆管上皮细胞受损的重要免疫屏障^[155]，因此维生素 D 对固有免疫的这种协同加强对于 UDCA 发挥其正常药理作用---降低胆汁的毒性和保护胆管

上皮细胞等---具有重要的意义。这不仅有助于我们结果的分析 and 理解，而且和我们所观察到的维生素 D 与 UDCA 应答的关系一起，提示联合补充维生素 D 和 UDCA 来治疗 PBC 是个值得探索的问题。

十分有意思的是，在分层分析中，晚期患者应答和不应答间维生素 D 水平的差异比早期更明显。在 PBC 中，晚期患者最重要的特点是肝脏纤维化的发生，而 UDCA 对已伴纤维化的患者作用不佳。^[11] 我们的结果则提示一旦晚期患者伴有维生素 D 水平下降，其不应答的风险将更高，根据前述结果，这可以理解为维生素 D 越低，患者的病理损伤比其他同处于晚期的患者相对更重因而应答困难。近两年连续两篇 cell 文章分别报道维生素 D 正常功能的缺失在肝星状细胞和胰腺星状细胞炎性网络激活中发挥着重要作用，并进而导致了肝脏和胰腺后续的纤维化及肿瘤的发生发展。^[16, 145] 这一重要发现可以为我们的结果做出另一种解释：在晚期 PBC 患者中，由于维生素 D 功能低下，其纤维化相关炎性网络更活跃，从而促进了肝硬化的发生于发展，进而导致 UDCA 难以取得理想的疗效。这一推测需要在其他 PBC 队列中进一步验证，考虑到其对于所有导致纤维化疾病均具有重要的启示意义，很值得进一步探讨。

D. 维生素 D 水平与生存的关系

Mayo 评分、病理晚期、胆红素血症和 ALP 极高这些与维生素 D 密切相关的基线指标都与 PBC 的生存密切相关，其中 Mayo 评分更是国际上通用的评价 PBC 自然病程条件下远期预后的最佳方法。^[59, 60, 64] 而且，UDCA 治疗的生化应答即是根据 UDCA 治疗后患者的生存改善情况而制定的。^[7-11] 由此，我们进一步对基线维生素 D 水平和远期生存的关系做了探讨。研究发现随访过程中死亡或移植的患者维生素 D 水平更低，而维生素 D 缺乏患者的无移植生存比充足的患者差。我们接着验证了 UDCA 应答与生存的关系，并且发现治疗前伴维生素 D 缺乏且治疗一年无应答的患者最终的生存最差。这些结果提示，维生素 D 与 PBC 的关系不仅仅局限于基线和治疗一年后，甚至可以影响到最终的生存。虽然受限于样本量，我们无法进行多因素分析来确定维生素 D 是通过影响 UDCA 应答来影响生存还是独立发挥作用，但基于维生素 D 与 UDCA 应答联合能提高它们单一与生存的相关性这一结果，我们可以推测维生素 D 状态至少能发挥部分的独立作用来影响生存。这一结果是对维生素 D 与 UDCA 应答结果的进一步的支持和延伸，需要在今后的研究中进一步证实。

三. 临床意义

本研究第一次探讨了 PBC 患者维生素 D 水平与疾病病情、UDCA 应答以及远期生存的相关性,有助于进一步理解维生素 D 与 PBC 的关系,同时为临床中的实际问题提供了新的思路,即:开展维生素 D 水平的检测作为疾病病情、UDCA 应答和预后评价的 marker;和探索补充维生素 D 作为联合治疗来提高 UDCA 应答不佳患者的疗效。

A. 检测维生素 D 水平用于疾病病情、UDCA 应答和预后的判断

在病毒性肝炎等肝脏疾病中,肝脏炎症可因机体免疫状态等因素自发稳定或耐受;与之不同的是,PBC 的肝脏损伤为慢性进行性,根据自然史研究,大部分患者都在确诊后两年内发生组织学进展,且几乎都最终进展为肝硬化。^[62, 156, 157]因此,确诊时明确患者肝脏的损伤程度以及在治疗过程中随访其进展,对 PBC 的诊断和治疗具有重要的临床意义。肝穿组织学检查是评价肝脏损伤最直接的手段,病理分级处于晚期的患者其治疗预后和远期生存差。^[61, 62]但肝穿组织学检查为有创性检查,且受制于取材的局限性其仅能反映局部的损伤程度^[63]。基于本研究所发现的维生素 D 水平与组织学损伤程度的关系,及其与胆汁淤积指标等其他生化参数的高度相关性,于患者初诊时检测其血清维生素 D 水平将有助于辅助疾病的病情判断。特别对于部分不适合做肝穿,或肝穿结果与生化指标明显不一致的患者来说,维生素 D 的水平或许具有重要的参考价值。

UDCA 是目前唯一证实能延缓 PBC 的进展并改善生存的药物,对 UDCA 治疗的生化应答情况决定了患者的预后。目前有多种应答的评价标准来判断 UDCA 治疗的效果,包括巴黎-I、巴黎-II、巴塞罗那、多伦多和鹿特丹标准等^[7-11],如文献回顾部分表 1 所示。这些标准虽然侧重的生化指标各不相同,但均需要在患者治疗一年后来进行判断,其中多伦多标准甚至需要两年。研究表明,若未得到有效治疗,大部分 PBC 患者将于确诊后两年内发生组织学进展,因而若能缩短疗效判定期,提早找出对 UDCA 应答不佳的患者,并尝试联合其他药物进行治疗来延缓疾病进展具有重要的临床意义。^[62, 158]本研究基于巴黎-I 和巴塞罗那标准发现了基线维生素 D 是治疗一年后生化应答的独立相关因素,伴维生素 D 缺乏的患者发生不应答的风险是充足者的 3 倍。这一结果一方面为补充维生素 D 联合治疗提供了较强的依据,同时,

也提示将基线维生素 D 作为疗效预测指标的可能。在维生素 D 水平预测 UDCA 应答的 ROC 曲线中, 两种标准的曲线下面积分别为 0.68 和 0.69, 表明维生素 D 水平能预测 UDCA 疗效, 但准确性可能不是很高, 这可能与维生素 D 容易受到分期、性别和季节等因素影响有关。而维生素 D 与生存的关系则进一步支持了其对 UDCA 应答的影响, 根据我们的结果, 临床工作中若能把基线时维生素 D 的状态与 UDCA 应答情况联合起来作风险评估, 可能将更全面地分析患者的远期预后。

近些年, 随着对维生素 D 与生存和各种疾病的关系研究的深入, 越来越多的医生和学者开始关注到维生素 D 检测的临床意义上。^{[97, 100] [159-161]} 而对于 PBC 来讲, 由于其脂溶性维生素缺乏并发症, 维生素 D 检测本身即有一定的需求, 我们的研究结果中超过一半的维生素 D 缺乏率则更加明确了这一点。目前国内常规开展 25(OH)D 检查的医院相对较少, 但在已开展的一些大型独立实验室如艾迪康医学检验中心、康圣全球和西安友谊医学检验所等, 所采用的均为本研究中的 Roche 电化学发光法, 而这一方法所基于的 Elecsys/Cobas 免疫检验平台其实在各大医院都是具备的, 相信随着维生素 D 检测的逐渐普及, 本研究的结果将为其在 PBC 中的应用提供重要依据。

B. 维生素联合 UDCA 治疗应答不佳者

维生素 D 水平与 PBC 的关系除了提示其作为判断病情和预后的 marker 外, 由于维生素 D 的水平可以而且易于进行干预, 而且考虑到维生素 D 与目前在研中的多个 UDCA 联合治疗候选药物特别是奥贝胆酸的药理作用上具有一致性, 我们的结果同样为 UDCA 应答不佳者的治疗提供了新的思路。

目前, UDCA 应答不佳者的治疗是 PBC 临床研究中最受关注的问题。皮质激素和免疫抑制剂是最早提出用于应答不佳者治疗的方案, 主要包括布地奈德和甲氨蝶呤等, 但其效果存在争议, 如有研究显示对 UDCA 应答不佳的患者经布地奈德治疗后, 虽血生化有一过性的改善, 但 Mayo 评分和肝硬化并发症的发生率却显著增高,^[72] 并且也无确切的证据证实这些疗法能改善患者的远期生存^[74]。近些年, 两类核受体激活物成为 UDCA 应答不佳者联合治疗的研究热点, 即过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (PPAR α) 激动剂贝特类, 和法尼醇 X 受体 (FXR) 激动剂奥贝胆酸 (即 6-乙基鹅去氧胆酸) 等。它们分别通过自己作用的核受体, 下调胆汁酸合成的关键酶 CYP7A1 和 CYP27A1, 并调节多种涉及胆汁转运的关键分子 MDR3、MDR1 和 MRP2

等改善胆汁淤积。^[75, 162] 临床研究表明, 这两类药物均能不同程度的改善无应答患者生化指标, 特别是奥贝胆酸, 随机对照研究显示它能使无应答者的 ALP 平均下降 1/4, 使 GGT 下降超过一半。^[84, 163, 164] 但目前也仍缺乏与长期生存受益有关的数据, 甚至有报道提示长期应用贝特类可能会引起肾功能的异常^[82], 而奥贝胆酸较高剂量时瘙痒副作用可出现于超过 80% 的患者^[84]。

与奥贝胆酸作用的核受体 FXR 一样, 维生素 D 受体 VDR 也是参与胆汁酸合成调控和胆汁转运分子分泌调节的关键核受体之一^[140, 165], 而且维生素 D 也能通过调节 CYP7A1 和 CYP3A4 等代谢关键酶, 及 MRP3 等胆汁转运分子的表达来调控胆汁淤积肝脏的代偿性反应, 减轻胆汁淤积的损伤^[141, 142, 166]。我们的研究为维生素 D 对 PBC 的治疗潜力提供了来自临床病人的证据, 并且我们所观察到的维生素 D 与 UDCA 应答的关系, 也体现了基础研究中所发现的维生素 D 与 UDCA 协同参与稳定胆管上皮固有免疫屏障的作用^[147], 为提出补充维生素 D 联合 UDCA 用于治疗 PBC 提供了直接的依据。

目前, AASLD 和 EASL 的 PBC 诊治指南中均建议日补充维生素 D1000IU 作为预防患者骨质疏松并发症的措施, 但这也只是基于维生素 D 的生理功能而不是从临床试验中得出, 其推荐等级均仅为 Level C。^{[59] [67]} 对于大部分的中国患者而言, 单纯为了预防骨并发症而长期应用维生素 D 其治疗花费过大, 毕竟 PBC 治疗的长期性已经是较大的负担, 所以目前国内患者真正完全遵执这一建议的并不多。除此之外, 根据近几年维生素 D 生理功能的研究和美国内分泌协会的推荐, 对于伴有慢性疾病的患者, 特别是像大部分 PBC 患者这种年龄超过 40 岁的, 维生素 D 骨外作用的发挥需要保证每日至少摄入 2000IU。^[97, 150] 我们的结果为 PBC 指南使用维生素 D 提供了更多的依据, 也提示我们应当重新审视这一指南推荐, 是否可以扩大其适应症, 以及是否可以考虑增加推荐剂量等。

四. 本研究的局限性

尽管我们的研究设计考虑到多个方面, 使选择的研究对象和检测到的维生素 D 值能体现总体初治 PBC 患者的特点, 也选用了最合理的统计学方法进行分析, 并进行了分层和多因素分析等, 但本研究仍然存在很多局限性: 首先, 本研究的回顾性和观察性的背景导致研究证据的力度有限, 而且缺乏独立验证队列, 研究结论需要

前瞻性队列的数据来证实；第二，虽然在 PBC 研究中由于受到较长病程的限制，样本量常难以达到理想情况，而本研究队列的大小在其中已属于较大规模，但仍需要更大样本量的研究来证实我们的结果，特别是多因素分析的相关结论；第三，虽然 25(OH)D 是循环维生素 D 的主要形式，也是通用的评判维生素 D 水平的指标，但缺乏活性维生素 D 的数据限制了我们对其结果的进一步理解；第四，由于研究设计的目的不同，本研究无法提供进行维生素 D 补充和不补充 UDCA 应答情况的相关数据，这需要独立进行另一项研究来实现；第五，由于 PBC 的漫长病程，我们的随访时间有限，很多患者未出现终点事件导致生存分析中删失数据较多，这也是 PBC 研究中经常碰到的问题，也限制了我们难以就生存情况进行更深入的分析。

小 结

1. 维生素 D 与 PBC 的发生发展密切相关, PBC 患者的血清维生素 D 水平能够反映疾病的病情轻重。
2. 基线维生素 D 水平与 UDCA 治疗的效果存在紧密的联系, 维生素 D 缺乏是 UDCA 应答不佳的独立危险因素, 初诊时检测血清维生素 D 水平可用于预测患者的 UDCA 应答情况。
3. 维生素 D 缺乏可能会影响 PBC 患者的长期生存, 若患者同时存在基线维生素 D 缺乏和 UDCA 应答不佳, 其生存情况最差。

参考文献

- [1] Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 2011;377:1600-1609
- [2] Boonstra K, Beuers U, Ponsioen CY. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: A systematic review. *J Hepatol*. 2012;56:1181-1188
- [3] Liu H, Liu Y, Wang L, Xu D, Lin B, Zhong R, Gong S, Podda M, et al. Prevalence of primary biliary cirrhosis in adults referring hospital for annual health check-up in southern china. *BMC gastroenterology*. 2010;10:100
- [4] Bianchi I, Carbone M, Lleo A, Invernizzi P. Genetics and epigenetics of primary biliary cirrhosis. *Seminars in liver disease*. 2014;34:255-264
- [5] Juran BD, Lazaridis KN. Environmental factors in primary biliary cirrhosis. *Seminars in liver disease*. 2014;34:265-272
- [6] Bowlus CL, Gershwin ME. The diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity reviews*. 2014;13:441-444
- [7] Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, Chretien Y, Andreani T, Johanet C, Chazouilleres O, Poupon R. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2008;48:871-877
- [8] Pares A, Caballeria L, Rodes J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 2006;130:715-720
- [9] Kumagi T, Guindi M, Fischer SE, Arenovich T, Abdalian R, Coltescu C, Heathcote EJ, Hirschfield GM. Baseline ductopenia and treatment response predict long-term histological progression in primary biliary cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105:2186-2194
- [10] Corpechot C, Chazouilleres O, Poupon R. Early primary biliary cirrhosis: Biochemical response to treatment and prediction of long-term outcome. *J Hepatol*. 2011;55:1361-1367
- [11] Kuiper EM, Hansen BE, de Vries RA, den Ouden-Muller JW, van Ditzhuijsen TJ, Haagsma EB, Houben MH, Witteman BJ, et al. Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 2009;136:1281-1287
- [12] Wagonfeld JB, Nemchausky BA, Bolt M, Horst JV, Boyer JL, Rosenberg IH. Comparison of vitamin d and 25-hydroxy-vitamin-d in the therapy of primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1976;2:391-394
- [13] Herlong HF, Recker RR, Maddrey WC. Bone disease in primary biliary cirrhosis: Histologic features and response to 25-hydroxyvitamin d. *Gastroenterology*. 1982;83:103-108
- [14] Hodgson SF, Dickson ER, Wahner HW, Johnson KA, Mann KG, Riggs BL. Bone loss and reduced osteoblast function in primary biliary cirrhosis. *Annals of internal medicine*. 1985;103:855-860
- [15] Matloff DS, Kaplan MM, Neer RM, Goldberg MJ, Bitman W, Wolfe HJ. Osteoporosis in primary biliary cirrhosis: Effects of 25-hydroxyvitamin d3 treatment. *Gastroenterology*. 1982;83:97-102

- [16] Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, Leblanc M, Coulter S, et al. A vitamin d receptor/smad genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*. 2013;153:601-613
- [17] Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B. The effects of calcium and vitamin d supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care*. 2007;30:980-986
- [18] Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory t cells, inflammation and the allergic response-the role of glucocorticoids and vitamin d. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;120:86-95
- [19] Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin d signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7:684-700
- [20] Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin d: New perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 2008;4:80-90
- [21] Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: Vitamins a and d take centre stage. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8:685-698
- [22] Halmos B, Szalay F, Cserniczky T, Nemesanszky E, Lakatos P, Barlage S, Schmitz G, Romics L, et al. Association of primary biliary cirrhosis with vitamin d receptor bsmi genotype polymorphism in a hungarian population. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45:1091-1095
- [23] Lakatos LP, Bajnok E, Hegedus D, Toth T, Lakatos P, Szalay F. Vitamin d receptor, oestrogen receptor-alpha gene and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in hungarian patients with primary biliary cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2002;14:733-740
- [24] Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin d receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2002;35:126-131
- [25] Tanaka A, Nezu S, Uegaki S, Kikuchi K, Shibuya A, Miyakawa H, Takahashi S, Bianchi I, et al. Vitamin d receptor polymorphisms are associated with increased susceptibility to primary biliary cirrhosis in japanese and italian populations. *Journal of Hepatology*. 2009;50:1202-1209
- [26] Kempinska-Podhorecka A, Wunsch E, Jarowicz T, Raszeja-Wyszomirska J, Loniewska B, Kaczmarczyk M, Milkiewicz M, Milkiewicz P. Vitamin d receptor polymorphisms predispose to primary biliary cirrhosis and severity of the disease in polish population. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012
- [27] Ramagopalan SV, Goldacre R, Disanto G, Giovannoni G, Goldacre MJ. Hospital admissions for vitamin d related conditions and subsequent immune-mediated disease: Record-linkage studies. *BMC medicine*. 2013;11:171
- [28] Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, Kamen DL, Macwana SR, Roberts VC, Dedeke AB, Harley JB, et al. Vitamin d deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2011;70:1569-1574
- [29] Ananthakrishnan AN, Cagan A, Gainer VS, Cai T, Cheng SC, Savova G, Chen P, Szolovits P, et al. Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin d is associated with reduced risk of surgery in crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19:1921-1927
- [30] Trepo E, Ouziel R, Pradat P, Momozawa Y, Quertinmont E, Gervy C, Gustot T, Degre D, et al. Marked 25-hydroxyvitamin d deficiency is associated with poor prognosis in patients with

- alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2013;59:344-350
- [31] Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, Cabibi D, Licata G, et al. Low vitamin d serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis c. *Hepatology.* 2010;51:1158-1167
- [32] Garcia-Alvarez M, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Fernandez-Rodriguez A, Guzman-Fulgencio M, Resino S. Relationship of vitamin d status with advanced liver fibrosis and response to hepatitis c virus therapy: A meta-analysis. *Hepatology.* 2014;60:1541-1550
- [33] Villar LM, Del Campo JA, Ranchal I, Lampe E, Romero-Gomez M. Association between vitamin d and hepatitis c virus infection: A meta-analysis. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2013;19:5917-5924
- [34] Boonstra K, Kunst AE, Stadhouders PH, Tuijnman HA, Poen AC, van Nieuwkerk KM, Witteman EM, Hamann D, et al. Rising incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis: A large population-based study. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2014
- [35] James OF, Bhopal R, Howel D, Gray J, Burt AD, Metcalf JV. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the united kingdom? *Hepatology.* 1999;30:390-394
- [36] Myers RP, Shaheen AA, Fong A, Burak KW, Wan A, Swain MG, Hilsden RJ, Sutherland L, et al. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a canadian health region: A population-based study. *Hepatology.* 2009;50:1884-1892
- [37] Baldursdottir TR, Bergmann OM, Jonasson JG, Ludviksson BR, Axelsson TA, Bjornsson ES. The epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis: A nationwide population-based study. *European journal of gastroenterology & hepatology.* 2012;24:824-830
- [38] Kim WR, Lindor KD, Locke GR, 3rd, Therneau TM, Homburger HA, Batts KP, Yawn BP, Petz JL, et al. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a us community. *Gastroenterology.* 2000;119:1631-1636
- [39] Metcalf JV, Bhopal RS, Gray J, Howel D, James OF. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis in the city of newcastle upon tyne, england. *International journal of epidemiology.* 1997;26:830-836
- [40] Kaplan MM. Primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine.* 1987;316:521-528
- [41] Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2003;362:53-61
- [42] Raczynska J, Habior A, Paczek L, Foroniewicz B, Pawelas A, Mucha K. Primary biliary cirrhosis in the era of liver transplantation. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society.* 2014;19:488-493
- [43] Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, Otte JB, Rolles K, Ringe B, Sloop M. Hepatic transplantation in europe. First report of the european liver transplant registry. *Lancet.* 1987;2:674-676
- [44] Tanaka A, Borchers AT, Ishibashi H, Ansari AA, Keen CL, Gershwin ME. Genetic and familial considerations of primary biliary cirrhosis. *The American journal of gastroenterology.* 2001;96:8-15
- [45] Jones DE, Watt FE, Metcalf JV, Bassendine MF, James OF. Familial primary biliary cirrhosis reassessed: A geographically-based population study. *J Hepatol.* 1999;30:402-407
- [46] Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish RG, Gordon SC, Wright HI, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: Genetics, epigenetics, and

- environment. *Gastroenterology*. 2004;127:485-492
- [47] Hirschfield GM, Liu X, Xu C, Lu Y, Xie G, Lu Y, Gu X, Walker EJ, et al. Primary biliary cirrhosis associated with hla, il12a, and il12rb2 variants. *The New England journal of medicine*. 2009;360:2544-2555
- [48] Hirschfield GM, Liu X, Han Y, Gorlov IP, Lu Y, Xu C, Lu Y, Chen W, et al. Variants at irf5-tnpo3, 17q12-21 and mmell are associated with primary biliary cirrhosis. *Nature genetics*. 2010;42:655-657
- [49] Mells GF, Floyd JA, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin SY, Heneghan MA, Neuberger JM, et al. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nature genetics*. 2011;43:329-332
- [50] Liu JZ, Almarri MA, Gaffney DJ, Mells GF, Jostins L, Cordell HJ, Ducker SJ, Day DB, et al. Dense fine-mapping study identifies new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nature genetics*. 2012;44:1137-1141
- [51] Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, Gold EB, Watnik M, Utts J, Lindor KD, Kaplan MM, et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: A controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology*. 2005;42:1194-1202
- [52] Corpechot C, Chretien Y, Chazouilleres O, Poupon R. Demographic, lifestyle, medical and familial factors associated with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2010;53:162-169
- [53] Prince MI, Ducker SJ, James OF. Case-control studies of risk factors for primary biliary cirrhosis in two united kingdom populations. *Gut*. 2010;59:508-512
- [54] Lammert C, Nguyen DL, Juran BD, Schlicht E, Larson JJ, Atkinson EJ, Lazaridis KN. Questionnaire based assessment of risk factors for primary biliary cirrhosis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2013;45:589-594
- [55] Bogdanos DP, Baum H, Grasso A, Okamoto M, Butler P, Ma Y, Rigopoulou E, Montalto P, et al. Microbial mimics are major targets of crossreactivity with human pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2004;40:31-39
- [56] Bogdanos D, Pusl T, Rust C, Vergani D, Beuers U. Primary biliary cirrhosis following lactobacillus vaccination for recurrent vaginitis. *J Hepatol*. 2008;49:466-473
- [57] Wariaghli G, Allali F, El Maghraoui A, Hajjaj-Hassouni N. Osteoporosis in patients with primary biliary cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2010;22:1397-1401
- [58] Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology*. 1978;379:103-112
- [59] Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa NV, Heathcote EJ, American Association for Study of Liver D. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2009;50:291-308
- [60] Silveira MG, Brunt EM, Heathcote J, Gores GJ, Lindor KD, Mayo MJ. American association for the study of liver diseases endpoints conference: Design and endpoints for clinical trials in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2010;52:349-359
- [61] Roll J, Boyer JL, Barry D, Klatskin G. The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine*. 1983;308:1-7
- [62] Locke GR, 3rd, Therneau TM, Ludwig J, Dickson ER, Lindor KD. Time course of histological

- progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1996;23:52-56
- [63] Zein CO, Angulo P, Lindor KD. When is liver biopsy needed in the diagnosis of primary biliary cirrhosis? *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2003;1:89-95
- [64] Lammers WJ, van Buuren HR, Hirschfield GM, Janssen HL, Invernizzi P, Mason AL, Ponsioen CY, Floreani A, et al. Levels of alkaline phosphatase and bilirubin are surrogate end points of outcomes of patients with primary biliary cirrhosis: An international follow-up study. *Gastroenterology*. 2014;147:1338-1349 e1335; quiz e1315
- [65] Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: Model for decision making. *Hepatology*. 1989;10:1-7
- [66] Murtaugh PA, Dickson ER, Van Dam GM, Malinchoc M, Grambsch PM, Langworthy AL, Gips CH. Primary biliary cirrhosis: Prediction of short-term survival based on repeated patient visits. *Hepatology*. 1994;20:126-134
- [67] European Association for the Study of the L. Easl clinical practice guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol*. 2009;51:237-267
- [68] Lindor KD, Therneau TM, Jorgensen RA, Malinchoc M, Dickson ER. Effects of ursodeoxycholic acid on survival in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1996;110:1515-1518
- [69] Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1997;113:884-890
- [70] Zhang LN, Shi TY, Shi XH, Wang L, Yang YJ, Liu B, Gao LX, Shuai ZW, et al. Early biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis of primary biliary cirrhosis: Results of a 14-year cohort study. *Hepatology*. 2013;58:264-272
- [71] Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Pikkarainen P, Nuutinen H, Farkkila M. Budesonide combined with udca to improve liver histology in primary biliary cirrhosis: A three-year randomized trial. *Hepatology*. 2005;41:747-752
- [72] Angulo P, Jorgensen RA, Keach JC, Dickson ER, Smith C, Lindor KD. Oral budesonide in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid. *Hepatology*. 2000;31:318-323
- [73] Hempfling W, Grunhage F, Dilger K, Reichel C, Beuers U, Sauerbruch T. Pharmacokinetics and pharmacodynamic action of budesonide in early- and late-stage primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2003;38:196-202
- [74] Combes B, Emerson SS, Flye NL, Munoz SJ, Luketic VA, Mayo MJ, McCashland TM, Zetterman RK, et al. Methotrexate (mtx) plus ursodeoxycholic acid (udca) in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2005;42:1184-1193
- [75] Honda A, Ikegami T, Nakamuta M, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Saito Y, Takikawa H, et al. Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. *Hepatology*. 2013;57:1931-1941
- [76] Kurihara T, Niimi A, Maeda A, Shigemoto M, Yamashita K. Bezafibrate in the treatment of primary biliary cirrhosis: Comparison with ursodeoxycholic acid. *The American journal of gastroenterology*. 2000;95:2990-2992
- [77] Ohira H, Sato Y, Ueno T, Sata M. Fenofibrate treatment in patients with primary biliary cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*. 2002;97:2147-2149

- [78] Akbar SM, Furukawa S, Nakanishi S, Abe M, Horiike N, Onji M. Therapeutic efficacy of decreased nitrite production by bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of gastroenterology*. 2005;40:157-163
- [79] Hazzan R, Tur-Kaspa R. Bezafibrate treatment of primary biliary cirrhosis following incomplete response to ursodeoxycholic acid. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44:371-373
- [80] Lens S, Leoz M, Nazal L, Bruguera M, Pares A. Bezafibrate normalizes alkaline phosphatase in primary biliary cirrhosis patients with incomplete response to ursodeoxycholic acid. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34:197-203
- [81] Tanaka A, Hirohara J, Nakanuma Y, Tsubouchi H, Takikawa H. Biochemical responses to bezafibrate improve long-term outcome in asymptomatic patients with primary biliary cirrhosis refractory to udca. *Journal of gastroenterology*. 2014
- [82] Hosonuma K, Sato K, Yamazaki Y, Yanagisawa M, Hashizume H, Horiguchi N, Kakizaki S, Kusano M, et al. A prospective randomized controlled study of long-term combination therapy using ursodeoxycholic acid and bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis and dyslipidemia. *The American journal of gastroenterology*. 2015;110:423-431
- [83] Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, Morelli A, Parks DJ, et al. 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ecdca), a potent and selective fxr agonist endowed with anticholestatic activity. *Journal of medicinal chemistry*. 2002;45:3569-3572
- [84] Hirschfield GM, Mason A, Luketic V, Lindor K, Gordon SC, Mayo M, Kowdley KV, Vincent C, et al. Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 2015;148:751-761 e758
- [85] Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin d3 metabolically active in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68:803-804
- [86] Holick MF, DeLuca HF, Kasten PM, Korycka MB. Isotachysterol-3 and 25-hydroxyisotachysterol-3: Analogs of 1,25-dihydrox vitamin d3. *Science*. 1973;180:964-966
- [87] Holick MF, DeLuca HF. Vitamin d metabolism. *Annual review of medicine*. 1974;25:349-367
- [88] Holick MF, Clark MB. The photobiogenesis and metabolism of vitamin d. *Federation proceedings*. 1978;37:2567-2574
- [89] Holick MF. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin d3 and clinical applications. *Bone*. 1995;17:107S-111S
- [90] Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, et al. Vitamin d and human health: Lessons from vitamin d receptor null mice. *Endocrine Reviews*. 2008;29:726-776
- [91] Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin d levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med*. 2008;168:1629-1637
- [92] Ginde AA, Scragg R, Schwartz RS, Camargo CA, Jr. Prospective study of serum 25-hydroxyvitamin d level, cardiovascular disease mortality, and all-cause mortality in older u.S. Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2009;57:1595-1603
- [93] Holick MF, Chen TC. Vitamin d deficiency: A worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87:1080S-1086S
- [94] de Boer IH, Levin G, Robinson-Cohen C, Biggs ML, Hoofnagle AN, Siscovick DS, Kestenbaum

- B. Serum 25-hydroxyvitamin d concentration and risk for major clinical disease events in a community-based population of older adults: A cohort study. *Annals of internal medicine*. 2012;156:627-634
- [95] Grober U, Reichrath J, Holick MF. Live longer with vitamin d? *Nutrients*. 2015;7:1871-1880
- [96] Autier P, Gandini S. Vitamin d supplementation and total mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 2007;167:1730-1737
- [97] for G, insufficiency patvDda, revisitedRosen CJ. Clinical practice. Vitamin d insufficiency. *The New England journal of medicine*. 2011;364:248-254
- [98] Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, Lichtenstein AH, Lau J, et al. Systematic review: Vitamin d and cardiometabolic outcomes. *Annals of internal medicine*. 2010;152:307-314
- [99] McGreevy C, Williams D. New insights about vitamin d and cardiovascular disease: A narrative review. *Annals of internal medicine*. 2011;155:820-826
- [100] Plum LA, DeLuca HF. Vitamin d, disease and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*. 2010;9:941-955
- [101] Grober U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin d: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermato-endocrinology*. 2013;5:331-347
- [102] Holick MF. Nutrition: D-iabetes and d-eath d-efying vitamin d. *Nature reviews. Endocrinology*. 2012;8:388-390
- [103] Wobke TK, Sorg BL, Steinhilber D. Vitamin d in inflammatory diseases. *Frontiers in physiology*. 2014;5:244
- [104] Simpson S, Jr., Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, Dwyer T, Gies P, et al. Higher 25-hydroxyvitamin d is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;68:193-203
- [105] Runia TF, Hop WC, de Rijke YB, Buljevac D, Hintzen RQ. Lower serum vitamin d levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. *Neurology*. 2012;79:261-266
- [106] Ananthakrishnan AN, Cheng SC, Cai T, Cagan A, Gainer VS, Szolovits P, Shaw SY, Churchill S, et al. Association between reduced plasma 25-hydroxy vitamin d and increased risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12:821-827
- [107] Finkelmeier F, Kronenberger B, Koberle V, Bojunga J, Zeuzem S, Trojan J, Piiper A, Waidmann O. Severe 25-hydroxyvitamin d deficiency identifies a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma - a prospective cohort study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;39:1204-1212
- [108] Correale J, Ysrraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of vitamin d in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132:1146-1160
- [109] Garg M, Rosella O, Lubel JS, Gibson PR. Association of circulating vitamin d concentrations with intestinal but not systemic inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19:2634-2643
- [110] Farnik H, Bojunga J, Berger A, Allwinn R, Waidmann O, Kronenberger B, Keppler OT, Zeuzem S, et al. Low vitamin d serum concentration is associated with high levels of hepatitis b virus replication in chronically infected patients. *Hepatology*. 2013;58:1270-1276

- [111] Munoz SJ, Heubi JE, Balistreri WF, Maddrey WC. Vitamin e deficiency in primary biliary cirrhosis: Gastrointestinal malabsorption, frequency and relationship to other lipid-soluble vitamins. *Hepatology*. 1989;9:525-531
- [112] Malham M, Jorgensen SP, Ott P, Agnholt J, Vilstrup H, Borre M, Dahlerup JF. Vitamin d deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17:922-925
- [113] Li YJ, Tang YW, Shi YQ, Han S, Wang JB, Zhou XM, Chen Y, Wu ZD, et al. Polymorphisms in the vitamin d receptor gene and risk of primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29:706-715
- [114] Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annual review of pathology*. 2013;8:303-330
- [115] Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, Parodi A, Kalli F, Negrini S, De Palma R, Invernizzi P, et al. Th17 and regulatory t lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases. *Autoimmunity reviews*. 2012;12:300-304
- [116] Wang L, Sun Y, Zhang Z, Jia Y, Zou Z, Ding J, Li Y, Xu X, et al. Cxcr5(+) cd4(+) t follicular helper cells participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2015;61:627-638
- [117] Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: Linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clinical science*. 2011;121:523-544
- [118] Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin d3: A novel immunoregulatory hormone. *Science*. 1984;224:1438-1440
- [119] Penna G, Adorini L. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin d3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive t cell activation. *Journal of immunology*. 2000;164:2405-2411
- [120] Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 1,25-dihydroxyvitamin d3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology*. 2007;178:145-153
- [121] Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprini C, Rocchi G, Bergamini A. 1alpha,25-dihydroxyvitamin d3 inhibits cd40l-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine*. 2009;45:190-197
- [122] Baeke F, Korf H, Overbergh L, Verstuyf A, Thorrez L, Van Lommel L, Waer M, Schuit F, et al. The vitamin d analog, tx527, promotes a human cd4+cd25highcd127low regulatory t cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation. *Journal of immunology*. 2011;186:132-142
- [123] Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, et al. 1,25-dihydroxyvitamin d3 and il-2 combine to inhibit t cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory t cells expressing ctla-4 and foxp3. *Journal of immunology*. 2009;183:5458-5467
- [124] Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive cd4(+) t cells to enhance the development of th2 cells. *Journal of immunology*. 2001;167:4974-4980
- [125] Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin d3 inhibits ifn-gamma and il-4 levels

- during in vitro polarization of primary murine cd4+ t cells. *Journal of immunology*. 2002;168:1181-1189
- [126] Harada K, Nakanuma Y. Biliary innate immunity and cholangiopathy. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2007;37 Suppl 3:S430-437
- [127] Ikeda U, Wakita D, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Iwakura Y, Nishimura T. 1 α ,25-dihydroxyvitamin d3 and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of th17 cells. *Immunology letters*. 2010;134:7-16
- [128] Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AM, van Driel M, Hazes JM, van Leeuwen JP, Lubberts E. 1,25-dihydroxyvitamin d3 modulates th17 polarization and interleukin-22 expression by memory t cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62:132-142
- [129] Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM, Weaver CT. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin d(3) on the development of effector cd4 t cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:997-1004
- [130] Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1 α ,25-dihydroxyvitamin d3-binding macromolecules in human b lymphocytes: Effects on immunoglobulin production. *Journal of immunology*. 1986;136:2734-2740
- [131] Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin d3 on human b cell differentiation. *Journal of immunology*. 2007;179:1634-1647
- [132] Hewison M. Vitamin d and the immune system: New perspectives on an old theme. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39:365-379, table of contents
- [133] Yu S, Cantorna MT. The vitamin d receptor is required for inkt cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:5207-5212
- [134] Yu S, Bruce D, Froicu M, Weaver V, Cantorna MT. Failure of t cell homing, reduced cd4/cd8 α α intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut of vitamin d receptor ko mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:20834-20839
- [135] Balogh G, de Boland AR, Boland R, Barja P. Effect of 1,25(oh)(2)-vitamin d(3) on the activation of natural killer cells: Role of protein kinase c and extracellular calcium. *Experimental and molecular pathology*. 1999;67:63-74
- [136] Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J. Effects of vitamin d on the peripheral adaptive immune system: A review. *Autoimmunity reviews*. 2011;10:733-743
- [137] Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *British journal of pharmacology*. 2009;156:7-27
- [138] Han S, Chiang JY. Mechanism of vitamin d receptor inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2009;37:469-478
- [139] Bodin K, Lindbom U, Diczfalusy U. Novel pathways of bile acid metabolism involving cyp3a4. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1687:84-93
- [140] Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: Pathogenetic and therapeutic considerations. *Molecular*

- pharmaceutics*. 2006;3:231-251
- [141] Ogura M, Nishida S, Ishizawa M, Sakurai K, Shimizu M, Matsuo S, Amano S, Uno S, et al. Vitamin d3 modulates the expression of bile acid regulatory genes and represses inflammation in bile duct-ligated mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2009;328:564-570
- [142] Firrincieli D, Zuniga S, Rey C, Wendum D, Lasnier E, Rainteau D, Braescu T, Falguieres T, et al. Vitamin d nuclear receptor deficiency promotes cholestatic liver injury by disruption of biliary epithelial cell junctions in mice. *Hepatology*. 2013;58:1401-1412
- [143] Fischer R, Reinehr R, Lu TP, Schonicke A, Warskulat U, Dienes HP, Haussinger D. Intercellular communication via gap junctions in activated rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2005;128:433-448
- [144] Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, Reif S. Vitamin d inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut*. 2011;60:1728-1737
- [145] Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriach H, Collisson EA, Connor F, et al. Vitamin d receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell*. 2014;159:80-93
- [146] von Essen MR, Kongsbak M, Schjerling P, Olgaard K, Odum N, Geisler C. Vitamin d controls t cell antigen receptor signaling and activation of human t cells. *Nature immunology*. 2010;11:344-349
- [147] D'Aldebert E, Biyeyeme Bi Mve MJ, Mergey M, Wendum D, Firrincieli D, Coilly A, Fouassier L, Corpechot C, et al. Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium. *Gastroenterology*. 2009;136:1435-1443
- [148] Li Y, Wang W, Tang L, He X, Yan X, Zhang X, Zhu Y, Sun J, et al. Chemokine (c-x-c motif) ligand 13 promotes intrahepatic chemokine (c-x-c motif) receptor 5+ lymphocyte homing and aberrant b-cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2015
- [149] Wang Q, Selmi C, Zhou X, Qiu D, Li Z, Miao Q, Chen X, Wang J, et al. Epigenetic considerations and the clinical reevaluation of the overlap syndrome between primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Journal of autoimmunity*. 2013;41:140-145
- [150] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin d deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96:1911-1930
- [151] Del Valle HB, Yaktine AL, Taylor CL, Ross AC. *Dietary reference intakes for calcium and vitamin d*. National Academies Press; 2011.
- [152] Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin d3: Exposure to winter sunlight in boston and edmonton will not promote vitamin d3 synthesis in human skin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1988;67:373-378
- [153] Agmon-Levin N, Kopilov R, Selmi C, Nussinovitch U, Sanchez-Castanon M, Lopez-Hoyos M, Amital H, Kivity S, et al. Vitamin d in primary biliary cirrhosis, a plausible marker of advanced disease. *Immunologic research*. 2015;61:141-146
- [154] Efe C, Kav T, Aydin C, Cengiz M, Imga NN, Purnak T, Smyk DS, Torgutalp M, et al. Low serum

- vitamin d levels are associated with severe histological features and poor response to therapy in patients with autoimmune hepatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2014
- [155] Sasatomi K, Noguchi K, Sakisaka S, Sata M, Tanikawa K. Abnormal accumulation of endotoxin in biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. 1998;29:409-416
- [156] Wang L, Wang FS, Chang C, Gershwin ME. Breach of tolerance: Primary biliary cirrhosis. *Seminars in liver disease*. 2014;34:297-317
- [157] Corpechot C, Carrat F, Bonnard AM, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on liver fibrosis progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2000;32:1196-1199
- [158] Poupon RE, Lindor KD, Pares A, Chazouilleres O, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2003;39:12-16
- [159] Thacher TD, Clarke BL. Vitamin d insufficiency. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. 2011;86:50-60
- [160] Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin d in reducing cancer risk and progression. *Nature reviews. Cancer*. 2014;14:342-357
- [161] LeBlanc ES, Zakher B, Daeges M, Pappas M, Chou R. Screening for vitamin d deficiency: A systematic review for the u.S. Preventive services task force. *Annals of internal medicine*. 2015;162:109-122
- [162] Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, Sabatino G, Russo G, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid x receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005;313:604-612
- [163] Levy C, Peter JA, Nelson DR, Keach J, Petz J, Cabrera R, Clark V, Firpi RJ, et al. Pilot study: Fenofibrate for patients with primary biliary cirrhosis and an incomplete response to ursodeoxycholic acid. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;33:235-242
- [164] Takeuchi Y, Ikeda F, Fujioka S, Takaki T, Osawa T, Yasunaka T, Miyake Y, Takaki A, et al. Additive improvement induced by bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis showing refractory response to ursodeoxycholic acid. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26:1395-1401
- [165] Trauner M, Halilbasic E, Kazemi-Shirazi L, Kienbacher C, Staufer K, Traussnigg S, Hofer H. Therapeutic role of bile acids and nuclear receptor agonists in fibrosing cholangiopathies. *Digestive diseases*. 2014;32:631-636
- [166] Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JY. A novel bile acid-activated vitamin d receptor signaling in human hepatocytes. *Molecular endocrinology*. 2010;24:1151-1164

个人简历和研究成果

个人简历

- 郭冠亚，男，1990年5月出生，湖北黄冈人
- 2007.09 – 2012.06 中南大学-湘雅医学院 获医学学士学位
- 2012.09 – 2015.06 第四军医大学 攻读硕士学位

研究成果

1. **Guanya Guo**, Yongquan Shi, Lu Wag, Xiaoli Ren, Zheyi Han, Changcun Guo, Lina Cui, Jingbo Wang, Jiangyi Zhu, Na Wang, Jingwen Zhang, Yun Cai, Ying Han*, Xinmin Zhou*, Daiming Fan. Serum vitamin D level is associated with disease severity and response to ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutic*. 2015 May 18. doi:10.1111/apt.13244. (IF=5.478)
2. Lu Wang, **Guanya Guo**, Jingbo Wang, Xinmin Zhou, Qiong Yang, Zheyi Han, Qiang Li, Jingwen Zhang, Yun Cai, Xiaoli Ren, Xia Zhou, Ruirui Chen, Yongquan Shi*, Ying Han*, Daiming Fan. A decline of LAMP-2 predicts ursodeoxycholic acid response in primary biliary cirrhosis. *Scientific Reports*. 2015 Apr 20;5:9772. doi: 10.1038/srep09772. (共同第一作者, IF=5.078)
3. **Guanya Guo**, Ying Han, Yongquan Shi, Xinmin Zhou*. Pre-treatment serum vitamin D status is associated with subsequent response to UDCA in PBC. Poster presentation, P1154, *The 50th ILC of EASL*, 2015. (2015年欧肝会, 壁报交流)

致 谢

衷心感谢我的导师周新民教授三年来在学习与工作中的谆谆教诲和悉心指导，是您让学生明白作一名懂科研、会科研的临床医生是多么重要，并通过言传身指引着我在慢性肝病研究这条道路上探索自己的方向，让学生受益良多。衷心感谢我的指导老师韩英教授和时永全教授，从我的课题选择、研究对象的确定、血清样本收集、数据分析、结果解释到最后的论文投稿，每一步您们都倾注了大量的心血，并通过您们丰富的临床经验和严谨的学术作风，深深的影响着我。在肝病组各位老师的帮助下，这三年里，我不仅夯实了科研基础、掌握了慢性肝病的研究方法，也得到了大量的锻炼机会来全面提升自己的综合素质。

衷心感谢樊代明院士和历代西京消化前辈，是您们的不懈努力，为我们搭建了顶尖的科研平台，特别是对我们 PBC 生物样本库和临床队列的建设给予的大力支持，极大的方便了本课题的进行。

衷心感谢西京医院消化八科、九科全体医护对本课题的支持和帮助。特别感谢韩者艺副教授、王敬博副教授、陈瑜主治医师、郭长存主治医师、朱疆依主治医师和董旭昶主治医师对课题设计、研究结果解释和文章撰写的帮助，感谢贾桂护士、张亚维护士和王娜技师对于课题中 PBC 患者随访管理、数据收集及样本收集的帮助。

特别感谢西京消化科各位同学在学习、工作上的无私帮助和生活上的悉心关怀。衷心感谢王璐博士、崔丽娜博士和李强博士为课题组建立的良好学术氛围，感谢您们为师弟师妹们树立的优秀榜样，您们永远是我学习的楷模。衷心感谢张静雯硕士、任晓丽硕士、蔡云硕士、周霞硕士、杨琼硕士、张哲硕士、陈迪硕士、余鹏飞硕士、李想硕士、王刚硕士、曹海超硕士、蔡维乐硕士和侯宇硕士在三年里的关心和帮助，与你们在实验室里朝夕相处的三年时光将是我一辈子珍藏的回忆。

由衷地感谢所有关心我的亲人们，感谢你们多年来始终站在我身后，给予我最强有力的支持，让我有勇气和信心来面对工作和生活中的各种压力与困难。离家求学三年，父母年岁渐长我却无法陪伴在身旁，祝愿亲爱的爸爸、妈妈身体健康、开心幸福！感谢我亲爱的哥哥，你是我不竭动力的源泉，真心愿你能作生活的强者，我永远支持你。