

• 临床检验研究论著 •

# 肝硬化患者血浆内毒素、内皮素-1 和一氧化氮水平变化及相关性研究

张 艳, 雷 鸣, 孙庆芳  
(常德市第一人民医院, 湖南常德 415000)

**摘 要:**目的 探讨肝硬化患者血浆内毒素(LPS)、内皮素-1(ET-1)以及一氧化氮(NO)水平的变化,了解三者之间及它们与肝功能损害程度的关系。方法 用鲎试验定量检测法,放射免疫法和硝酸酶还原法,测定 65 例肝硬化患者(其中 Child A、B、C 级分别为 19、26、20 例)和 29 例健康人血浆 LPS、ET-1 以及 NO 水平。结果 肝功能 Child A、B、C 级组血浆 NO 水平分别为  $(31.27 \pm 9.55)$ 、 $(53.29 \pm 10.68)$ 、 $(77.35 \pm 9.63)$  mmol/L, ET-1 水平分别为  $(51 \pm 15)$ 、 $(75 \pm 18)$ 、 $(103 \pm 16)$  ng/L, LPS 水平分别为  $(0.063 \pm 0.037)$ 、 $(0.203 \pm 0.079)$ 、 $(0.398 \pm 0.105)$  Eu/mL。肝硬化患者血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平随肝功能恶化逐渐升高。另外,随着腹水量增加,血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平也呈递增性变化。相关性分析显示,肝硬化患者血浆 LPS、ET-1 和 NO 三者之间呈正相关。结论 联合监测血浆 LPS、ET-1 与 NO 水平有助于判断肝硬化腹水患者病情,对于指导治疗,改善预后可能具有重要的临床价值。

**关键词:**肝硬化; 内毒素; 内皮素-1; 一氧化氮

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.21.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)21-2572-02

## Plasma endotoxin, endothelin-1 and nitric oxide level changes and correlation studies of patients with cirrhosis

Zhang Yan, Lei Ming, Sun Qingfang

(the First People's Hospital of Changde, Changde, Hunan 415000, China)

**Abstract:** Objective To study endotoxin(LPS), plasma endothelin-1(ET-1) and nitric oxide(NO) level changes of patients with liver cirrhosis plasma, understand the relationship between the three and their relationship between the liver function damage degree. **Methods** The plasma levels of endotoxin, endothelin-1 and nitric oxide of 65 cirrhotic patients which were divided into group A( $n=19$ ), B( $n=26$ ), and C( $n=20$ ) according to the Child-Pugh liver function classification standard and health people( $n=29$ ). All groups were measured by osis Limulus lysate test, radioimmunoassay and Griess, respectively. **Results** In Liver function Child A, B, C level respectively, plasma NO levels were  $(31.27 \pm 9.55)$ 、 $(53.29 \pm 10.68)$ 、 $(77.35 \pm 9.63)$  mmol/L; ET-1 levels were  $(51 \pm 15)$ 、 $(75 \pm 18)$ 、 $(103 \pm 16)$  ng/L; LPS levels were  $(0.063 \pm 0.037)$ 、 $(0.203 \pm 0.079)$ 、 $(0.398 \pm 0.105)$  Eu/mL. Patients with cirrhosis plasma NO, ET-1 and LPS levels were increased with deterioration. In addition to that, with the increase of ascites plasma NO, ET-1 and LPS levels increased. Correlation analysis showed that plasma LPS, ET-1 and NO levels of patients with cirrhosis had obvious positive correlation. **Conclusion** Joint detecting the levels of LPS, ET-1 and NO helps diagnosis, treatment and improvement of patients' prognosis with liver cirrhosis and may have important clinical value.

**Key words:** liver cirrhosis; endotoxin; endothelin-1; nitric oxide

肝硬化是多种致病因素长期或反复作用于肝脏引起的肝实质弥漫性损害,使肝细胞变性、坏死、再生,导致肝小叶和肝血管结构的紊乱,最终形成假小叶及血管重建,进一步引起一系列肝功能损害和门静脉高压的临床表现。腹水是肝硬化门脉高压症常见的病理状态,若并发自发性细菌性腹膜炎,常严重影响肝硬化腹水患者预后<sup>[1]</sup>,腹水一旦发生提示肝硬化由代偿期进入失代偿期。一氧化氮(NO)和内皮素-1(ET-1)是体内两种重要的血管活性因子,前者具有强烈的血管舒张作用,而后者是作用很强的血管收缩剂,它们共同影响肝硬化进程,参与各种并发症的发展<sup>[2]</sup>。内毒素(LPS)是革兰阴性细菌荚膜脂多糖,肝硬化时内毒素血症发生率甚高。本研究对肝硬化患者血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平的变化,及其与肝功能受损程度的关系进行探讨,同时对上述三者间的关系作初步分析。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本院确诊的肝硬化患者 65 例,其中男 43 例,女 22 例。年龄 41~77 岁,平均  $(60.2 \pm 9.9)$  岁,诊断均符合 2000 年西安全国传染病寄生虫学术会议的标准<sup>[4]</sup>。排除标准为:合并有糖尿病、高血压或心、肺、肾疾病者;曾行门体分流或断流术及内镜下食管曲张者静脉套扎或硬化治疗者;进入试验前 1 周内用过垂体后叶素、生长抑素或心得安等药物的患者。入选患者中肝炎后肝硬化 57 例,酒精性肝硬化 5 例,胆汁淤积

性肝硬化 3 例;按肝功能 Child-pugh 分级, A 级 19 例, B 级 26 例, C 级 20 例;无腹水者 13 例,腹水者 52 例(其中少量腹水 18 例,中-大量腹水 36 例,顽固性腹水 11 例)。健康对照组 29 例,男 20 例,女 9 例。年龄 31~76 岁,平均  $(55.1 \pm 15.6)$  岁。

**1.2 仪器与试剂** 鲎试剂由湛江博康海洋生物有限公司提供, NO 硝酸还原酶法检测试剂盒由南京冷泉港科技中心提供; ET-1 放射免疫法检测试剂由北京东亚免疫技术研究所提供。

**1.3 方法** 肝硬化患者在受检前停用利尿剂和其他血管活性药物,健康对照组无特殊处理。受检者禁食 12 h,早晨 6~8 时于平卧位自肘静脉采血 4 mL, 1 mL 注入专用无热原试管内送检 LPS,另 3 mL 注入装有 10% EDTA- $\text{Na}_2$  和抑肽酶的塑料试管中,送检 NO 及 ET-1。LPS 的测定采用鲎试验法(LAL)检测,所有试验用物品均经去热原处理; LPS、NO、ET-1 的检测均由专人专机统一检测,用同一批试剂盒,操作严格按照试剂盒说明书进行。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。各参数以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料两组间比较采用单因素方差分析,相关分析采用 Spearman 相关分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 肝硬化患者血浆 NO、ET-1 以及 LPS 与肝功能的关**

肝硬化 Child A、B、C 级中血 LPS 水平均显著高于健康对照组 ( $P<0.05$ ), 且随 Child 分级的提高而升高, Child A、B 和 C 级组间比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。血 ET-1 水平随肝功能恶化逐渐升高, Child A 级和健康对照组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), Child B 级和 C 级明显高于健康对照组 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), A、B 和 C 级组间比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。Child A 级、B 级和 C 级血中 NO 水平与对照组比较明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 且 Child A、B、C 级中呈递增性变化, Child A、B 和 C 级组间比较差异有统计学意义

( $P<0.05$ )。见表 1。

**2.2 肝硬化患者血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平与腹水量的关系**

肝硬化患者无腹水组和少量腹水组血浆 LPS 水平比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 而血浆 NO、ET-1 水平无腹水组和少量腹水组组间比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 中-大量腹水组和顽固性腹水组血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平显著高于无腹水组 ( $P<0.01$ ) 且随着腹水量增加, 血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平呈递增性变化。见表 2。

表 1 65 例肝硬化患者血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平与肝功能关系 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别         | <i>n</i> | NO(mmol/L)    | ET-1(ng/L)    | LPS(Eu/mL)    |
|------------|----------|---------------|---------------|---------------|
| 健康对照组      | 29       | 19.82±7.21    | 47.00±12.00   | 0.031±0.026   |
| Child A 级组 | 19       | 31.27±9.55*■  | 51.00±15.00■  | 0.063±0.037*■ |
| Child B 级组 | 26       | 53.29±10.68*■ | 75.00±18.00*■ | 0.203±0.079*■ |
| Child C 级组 | 20       | 77.35±9.63*   | 103.00±16.00* | 0.398±0.105*  |

\*:  $P<0.01$ ; \*\*:  $P<0.05$ , 与健康对照组比较; ■:  $P<0.01$ ; ■■:  $P<0.05$ , 与 Child C 级组比较。

表 2 65 例肝硬化患者 NO、ET-1 以及 LPS 与腹水量的关系 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | <i>n</i> | NO( $\mu$ mol/L) | ET-1(ng/L)      | LPS(Eu/mL)    |
|---------|----------|------------------|-----------------|---------------|
| 无腹水组    | 13       | 33.59±9.67■      | 50.00±17.00■    | 0.077±0.032■  |
| 少量腹水组   | 18       | 48.27±10.05**■   | 68.00±18.00**■  | 0.095±0.035■  |
| 中-大量腹水组 | 36       | 71.86±10.90**■■  | 93.00±16.00**■■ | 0.269±0.068*■ |
| 顽固性腹水组  | 11       | 82.61±11.58*     | 112.00±19.00*   | 0.415±0.103*  |

\*:  $P<0.01$ ; \*\*:  $P<0.05$ , 与无腹水组比较; ■:  $P<0.01$ ; ■■:  $P<0.05$ , 与顽固性腹水组较。

**2.3 肝硬化患者血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平的相关性分析**

采用 Spearman 相关性分析结果为血浆 NO、ET-1 及 LPS 水平相互之间呈正相关 (LPS 与 NO:  $r=0.513$ ,  $P<0.05$ ; LPS 与 ET-1:  $r=0.695$ ,  $P<0.05$ ; NO 与 ET-1:  $r=0.729$ ,  $P<0.05$ )。

3 讨 论

近年来血管活性物质与肝硬化的关系受到广泛关注, 特别是 NO 和 ET-1 对肝硬化患者肝损害和门脉血流动力学的影响成为研究的热点。NO 是扩张血管因子, ET-1 是缩血管物质, 在正常情况下 ET-1 和 NO 作为机体重要的血管活性物质, 它们之间存在着反馈调节机制: ET-1 与血管内皮的肾脏内皮素 B(ETB)受体结合, 可促进 NO 释放, 而 NO 又可抑制 ET 释放, 它们之间相互作用, 相互依赖, 维持着动态平衡, 共同精确调节血管的舒张和收缩, 一旦这种平衡被打破, 就可能促进疾病的发生和发展。NO 作为一种强有力的血管内皮细胞舒张因子具有强烈的扩张血管作用, 广泛参与生理机能的调节。调节过程中 NO 作为一种细胞传导信使, 以扩散的方式到达靶细胞, 在许多组织中发挥重要的生理和病理作用, 如介导血管平滑肌扩张。肝硬化时肝脏解毒功能下降, 侧支循环形成, 引起的肠源性内毒素血症会刺激产生细胞因子, 特别是肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )。TNF- $\alpha$  可激活一氧化氮合酶(iNOS), 导致全身或局部 NO 水平升高。ET-1 是由血管内皮细胞分泌的一种强烈持久的缩血管物质, 是迄今所知体内最强的血管收缩肽[3-4], 肝脏门脉系统有丰富的 ET 受体, 故 ET-1 与肝脏疾病及并发症有重要关系。目前多数资料表明肝硬化患者血浆 ET-1 水平明显升高。有研究指出肝硬化患者血浆 ET-1 水平升高与内毒素血症有关, 内毒素损害了内皮细胞的结构、代谢和渗透性, 刺激 ET 的合成[5]。本研究表明, 肝硬化患者血浆 NO 水平显著高于健康对照组, 且在肝功能分级中, 呈现逐级增高的规律, 血浆 ET-1 水平 Child A 级与健康对照组间无显著差异, 但 Child B 级和 C 级均明显高于健康对照组, 且 Child A、B、C 各级呈递增变化, 表明随肝功能的恶化, 血 NO、ET-1

水平逐渐升高, 这与相关文献报道一致[6]。

内毒素是存在于革兰阴性菌细胞壁内的特有结构, 在细菌快速生长或死亡时释放, 其主要成份为脂多糖。肝硬化时由于肠腔内细菌过度生长, 内毒素产生增加, 且肠壁黏膜充血, 肠壁通透性增加, 因此内毒素吸收也增加, 而肝硬化时肝脏对内毒素的清除功能减退, 容易发生内毒素血症[7]。肝硬化失代偿期时, 由于肝实质细胞与库普弗细胞功能严重受损, 门体静脉分流和侧支循环及肠道黏膜屏障功能受损, 肠道菌群失调或移位, 来自肠道的革兰阴性菌细胞壁外层的 LPS 易进入体循环而导致肠源性内毒素血症[8]。内毒素除直接损害肝细胞外, 主要作用于单核巨噬系统, 使之产生大量细胞因子及炎症介质如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等[9], 触发细胞因子网络级联反应, 导致肝细胞损害[10]。本研究显示肝硬化 Child A、B、C 级中血 LPS 水平均高于健康对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 且随 Child 分级水平的增高逐渐升高。A 级、B 级和 C 级组间比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

本研究结果同时显示肝硬化患者血 NO、ET-1、LPS 水平在肝硬化无腹水组和少量腹水组间比较无统计学差异, 但随腹水量的增加 NO、ET-1 及 LPS 水平均明显增高。分析其原因如下: 肝硬化时, 内毒素等因素刺激使 NO 和 ET-1 的释放增加, 在早期二者保持动态平衡, 这在肝硬化代偿期可能具有重要意义。随着肝硬化病情加重进而发展至失代偿期, 机体的内毒素和细胞调节会产生大量 NO 以试图拮抗 ET 的作用, 但由于肝内血管和外周动脉 NO/ET 的不平衡, 结果一方面肝内血管收缩, 血管阻力增加; 另一方面, 外周动脉扩张, 高动力循环状态形成, 从而引发门脉高压, 随着疾病的发展, 外周动脉进一步扩张, 血容量不足, 通过体液, 神经反射影响肾血流, 同时肾脏产生大量 ET 收缩肾血管床, 综合其他因素, 于是腹水形成。本研究同时检测肝硬化腹水患者 NO、ET 及 LPS 水平, 结果显示随着腹水量增加, 血 NO、ET-1、LPS 水平均显著增加。

综上所述, 肝硬化患者血中 NO、ET 及 (下转第 2575 页)

(37/38)高于对照组的57.89%(22/38),两者比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 观察组与对照组的一般情况比较

| 组别  | n  | 性别(男/女, n/n) | 年龄(岁)    | 伴随疾病[n(%)] |           |          |
|-----|----|--------------|----------|------------|-----------|----------|
|     |    |              |          | 血行播散型肺结核   | 浸润型肺结核    | 骨结核      |
| 观察组 | 38 | 21/17        | 28.3±7.2 | 16(42.11)  | 14(36.84) | 8(21.05) |
| 对照组 | 38 | 20/18        | 26.9±6.4 | 13(34.21)  | 19(50.00) | 6(15.79) |
| P 值 |    | >0.05        | >0.05    | >0.05      | >0.05     | >0.05    |

3 讨 论

结核性脑膜炎多发于 3 岁以下的小儿,且在结核菌感染后的 1 年内发病,若不及时发现与治疗,可导致严重的后遗症甚至死亡,给患者家庭及社会带来巨大的损失。结核性脑膜炎患者一般临床症状明显<sup>[5]</sup>,但是也存在一部分患者症状不典型。以往的结核性脑膜炎诊断主要方法为涂片抗酸染色镜检法及结核菌培养法,涂片法敏感性及特异性均较差,结核菌培养法敏感性低,诊断周期长,许多患者在送检期就出现了疾病的不可逆性进展<sup>[6]</sup>,损害脑组织功能,故此两种方法均不符合结核性脑膜炎早期诊断,早期治疗的要求。

随着科技的发展,更多更优质的检测方法不断出现,为结核性脑膜炎的早期确诊提供了可能,实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法就是目前较新的快速确诊方式<sup>[7]</sup>。实时荧光定量 PCR 将寡核苷酸探针用荧光标记,与产物杂交后可以提高其检测的特异性,其灵敏度可达到 5~100 fg。另外,该技术在封闭状态下进行,避免了因扩增产物污染而导致的假阳性<sup>[8]</sup>。噬菌体生物扩增法是在 1997 年新建立的快速检测结核分枝杆菌的全新技术,噬菌体感染具有活性的结核分枝杆菌后,在其内部大量增殖,并裂解菌体释放出子代噬菌体,之后又重新感染新加入的细胞后使之裂解,此时可在琼脂培养板上看到透亮的噬菌斑。噬菌斑的出现情况及出现的个数可用来判断具有活性的结核分枝杆菌的存在情况<sup>[9]</sup>。

本文主要分析联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法在结核性脑膜炎诊断中的意义,在对 76 例肺结核患者的检测中,实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法观察组阳性检出率为 97.37%(37/38),涂片法对照组阳性检出率为 57.89%(25/38),二者差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。可见联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法诊断疑似结

核性脑膜炎患者,具有较高的灵敏度及较强特异性,能够快速、简便地进行检测,且真阳性率较高,有助于患者的早期治疗,避免出现后遗症。而且该方法只需进行标准的微生物学操作,无需昂贵的自动化仪器,值得在临床广泛应用。

参考文献

[1] 李国钊. 实时荧光定量 PCR 技术及在结核病诊断实验室的研究和应用[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(10): 1315-1317.  
[2] 李洪敏, 王志伟, 张霞. 探讨荧光定量 PCR 在结核菌检测中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(11): 1438.  
[3] 彭丽, 罗永艾, 王国治. 噬菌体生物扩增法快速检测结核分枝杆菌标准化研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 27(12): 806-810.  
[4] 张华生, 施浩, 林健雄, 等. 噬菌体裂解法与 TaqMan-PCR 法检测结核分支杆菌的比较[J]. 中国误诊杂志, 2004, 4(9): 1401-1403.  
[5] Wilson SM, Al-Suwaidi Z, McNerney R, et al. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis[J]. Nat Med, 2010, 3(4): 465-468.  
[6] 薛长江, 刘慧. PCR 等 3 种检测技术在结核菌检测中的应用及评价[J]. 齐鲁医学检验, 2010, 16(1): 311-321.  
[7] 王邦松, 李庆兴, 卢明芹, 等. 荧光定量 PCR 诊断结核性脑膜炎的临床价值[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 17(4): 314.  
[8] Alcaide F, Gali N, Dominguez J, et al. Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2008, 41(7): 2867-2871.  
[9] 向成玉, 邓正华, 邓剑, 等. 荧光定量 PCR 检测 TB-DNA 与抗酸染色阳性率的比较[J]. 实用预防医学, 2009, 11(5): 101.

(收稿日期: 2012-05-09)

(上接第 2573 页)

LPS 水平的升高与肝功能障碍密切相关,且反映肝硬化损害的程度,联合检测肝硬化患者血浆中 NO、ET-1 和 LPS 含量的变化,对观察病情,指导治疗,改善预后均具有十分重要的临床价值。

参考文献

[1] 杜兰霞, 褚燕君, 贾百灵. 肝硬化腹水患者血清二胺氧化酶、内毒素和 IL-18 水平的改变及其临床意义[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(14): 2547-2548.  
[2] 郑玉宝, 徐希岳, 王启之. 一氧化氮及内皮素对肝硬化患者动脉血氧分压的影响[J]. 实用全科医学, 2006, 4(2): 140-141.  
[3] 赵鑫杰. 七氟醚和丙泊酚全身麻醉对腹腔镜手术患者血浆一氧化氮/内皮素-1 的影响[J]. 中国基层医药, 2010, 17(5): 640-641.  
[4] 王颖琦, 韩运锋, 苏诚坚. 感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠血浆血管紧张素 II 和内皮素的变化[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2009, 1(4): 207-210.  
[5] 韦光龙, 李龙. 肝硬化患者血浆降钙素基因相关肽和内皮素水平

的观察[J]. 临床荟萃, 2005, 20(4): 200-201.

[6] 刘冬, 周力, 邱秉胜, 等. 肝硬化门脉血流动力学与一氧化氮、内皮素[J]. 临床肝胆杂志, 2002, 18(2): 93-98.  
[7] Bauer TM, Schwacha H, Steinbrückner B, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(9): 2364-2370.  
[8] 周华坚, 曾宏, 温帆渊. 肝硬化患者血清内毒素与一氧化氮、肿瘤坏死因子-α 水平及其相关性[J]. 广东医学, 2004, 25(7): 817-818.  
[9] Frances R, Rodriguez E, Munoz C, et al. Intracellular cytokine expression in peritoneal monocyte/macrophages obtained from patients with cirrhosis and presence of bacterial DNA[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(1): 45-51.  
[10] Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, et al. The role of the liver in the response to Lps: experimental and clinical findings. J Endotoxin Res, 2002, 8(5): 319-327.

(收稿日期: 2012-05-24)