

# <sup>13</sup>C- 美沙西丁呼气试验与非酒精性脂肪肝病理改变的相关性研究

郭秀丽, 张 磊, 杨昭徐

郭秀丽, 张磊, 杨昭徐, 首都医科大学附属天坛医院消化内科  
北京市 100050

郭秀丽, 女, 生于 1979 年, 现为首都医科大学附属天坛医院消化内科 02 级  
在读研究生。

项目负责人: 郭秀丽, 100050, 北京市天坛西里 6 号, 天坛医院消化内科。  
guoxiliu@tom.com

电话: 010-67016611-2359, 010-67050530.

收稿日期: 2004-06-30 接受日期: 2004-07-27

## Correlation between <sup>13</sup>C-methacetine breath test and pathological changes of non-alcoholic fatty liver

Xiu-Li Guo, Lei Zhang, Zhao-Xu Yang

Xiu-Li Guo, Lei Zhang, Zhao-Xu Yang, Department of Digestion, Tiantan  
Hospital, Beijing 100050, China

Correspondence to: Xiu-Li Guo, Department of Digestion, Tiantan  
Hospital, Beijing 100050, China. guoxiliu@tom.com

Received: 2004-06-30 Accepted: 2004-07-27

### Abstract

AIM: To investigate and assess <sup>13</sup>C-methacetine breath test as a method to evaluate the degree of pathological lesion in liver of non-alcoholic steatohepatitis.

METHODS: High fat diet was adopted to establish an animal model. Forty male Wistar rats, weighing 200±20 g, were randomly assigned into two groups, high fat diet group (test group) and normal diet group (control group). Liver puncture biopsy was performed in two groups of mice at 2, 4, 6, 8 wk respectively. The pathological changes were observed and graded according to Brunt System. At the same time, the isotope-selective nondispersive infrared spectrometer (NDIRS), was applied to practice the <sup>13</sup>C-methacetine breath test and peak value of breathing (DOB), the duration to peak (T), cumulative expiration within 60 min (CU/60 min) were determined. Then, correlation between the dynamic and pathological changes of all parameters in the breath test was analyzed.

RESULTS: The values of DOB in the test and control groups before the test were 34.9±3.9%, 35.4±3.8% respectively. The results in the test group at 2, 4, 6, 8 wk were 32.2±3.0%, 21.0±2.5%, 16.1±2.8%, 11.6±2.2% respectively, and 34.7±3.8%, 35.3±3.7%, 35.1±4.3%, 35.0±3.5% in the control group respectively. Significant differences existed among the different period of time in the test group ( $P < 0.01$ ), but not in the control group. The differences between the test group and the control group at the same period of time were also significant. The breath test (DOB) negatively related to the pathological scores ( $r = 0.89$ ,  $P = 0.00$ ,  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: <sup>13</sup>C-methacetine breath test can be a non-invasive method to evaluate the pathological changes of non-alcoholic steatohepatitis.

Guo XL, Zhang L, Yang ZX. Correlation between <sup>13</sup>C-methacetine breath test and pathological changes of non-alcoholic fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2356-2359

### 摘要

目的: <sup>13</sup>C-美沙西丁(methacetine)呼气试验评价非酒精性脂肪肝肝细胞损害程度的方法及意义。

方法: 自行设计大鼠 <sup>13</sup>C-美沙西丁呼气试验检测程序与方法; 采用高脂饲料喂养方法建立脂肪肝模型; Wistar ♂ 大鼠 40 只, 重量 200 ± 20 g, 随机分为高脂饲料喂养组(试验组)及普通饲料喂养组(正常对照组)。于实验的 2, 4, 6, 8 wk 分别对二组大鼠进行肝穿, 观察其病理改变, 根据 Brunt 积分系统评分; 同时应用红外线能谱分析仪(IRIS)进行 <sup>13</sup>C-美沙西丁呼气试验检测, 观察呼气峰值(DOB)、达峰时间(T)和 60 min 累积呼气量(CU 60 min)各参数的动态变化, 并结合动物的生理学特征分析; 观察呼气试验中各参数的动态变化与病理变化的相关性。

结果: 试验组, 对照组实验前的 DOB 分别为 34.9 ± 3.9% 和 35.4 ± 3.8%, 试验组 2, 4, 6, 8 wk 的 DOB 分别为 32.2 ± 3.0%, 21.0 ± 2.5%, 16.1 ± 2.8% 和 11.6 ± 2.2%, 对照组 2, 4, 6, 8 wk 的 DOB 分别为 34.7 ± 3.8%, 35.3 ± 3.7%, 35.1 ± 4.3% 和 35.0 ± 3.5%; 试验组各时间段之间的差别有显著性意义( $P = 0.00$ ,  $P < 0.01$ ); 与同期正常对照组大鼠相比, 差别有统计学意义。而正常对照组各时间段之间差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。呼气试验结果(DOB)与同期的病理积分负相关( $r = 0.89$ ,  $P = 0.00$ ,  $P < 0.01$ )。

结论: <sup>13</sup>C-美沙西丁呼气试验有可能作为非酒精性脂肪肝病病变程度无创性评价方法。

郭秀丽, 张磊, 杨昭徐. <sup>13</sup>C-美沙西丁呼气试验与非酒精性脂肪肝病理改变的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2356-2359

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2356.asp>

### 0 引言

目前, 脂肪肝的发病率呈上升趋势。在脂肪肝的早期阶段其临床表现不明显且缺乏特异性, 临床诊断有一定

困难<sup>[1]</sup>. 肝脏的病理组织学检查是脂肪肝诊断的金标准, 但其属有创检查, 受检者的依从性差, 尤其是更难进行反复多次的检查. 生化检查、B超、CT是目前临床诊断脂肪肝有关的常用方法, 但这些检查均不能定量的反映肝细胞功能. 呼气试验可作为无创地、实时地反映肝细胞功能的检测方法<sup>[2-5]</sup>他在肝病的临床应用已经有30 a的历史<sup>[6]</sup>, 主要用于终末期肝病、肝移植的预后评估<sup>[7-9]</sup>, 但在脂肪肝的临床应用报道很少. 本研究旨在评价 $^{13}\text{C}$ -美沙西丁(methacetine)呼气试验作为定量检测非酒精性脂肪肝肝细胞功能的方法及其意义.

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康♂, Wistar大鼠, 40只, 质量 $200 \pm 20$  g. 红外线能谱分析仪(IRIS)由德国瓦格纳公司生产, Menghini—秒钟肝穿由美国SFBSIDINARY of TROMES公司提供.  $^{13}\text{C}$ -美沙西丁由德国瓦格纳公司生产. 以4 g/L的浓度用蒸馏水充分溶解.

1.2 方法 Wistar大鼠随机分为两组机分为高脂饲料喂养组(试验组), 用高脂饲料喂养8 wk及普通饲料喂养组(正常对照组). 高脂饲料配方 基础饲料加2%胆固醇, 10%猪油, 5%蔗糖, 0.5%胆酸钠<sup>[10-11]</sup>. 将大鼠放入一个体积为1.5 L的玻璃瓶内, 瓶的两端均带有直径为1 cm的开口, 一端与IRIS相连, 一端与大气相通; 利用IRIS的软件系统<sup>[12]</sup>, 设置出符合大鼠生理特征的参数指标(Inlet time 200 s, Waiting time 35 s, Flushing time 35 s, measurement 60 s). 试验前将大鼠放入上述模型中30 min适应新环境, 然后取出含 $^{13}\text{C}$ -美沙西丁呼气试验用的底物药液灌胃, 按人体剂量(1.5 mg/kg)的6倍即4 mg. 并立即放回瓶中开始试验, 当DOB值降到本底时结束试验. 并于当天或第2 d对大鼠进行肝脏穿刺. 用

10%水和氯醛3 mL/kg腹腔内注射麻醉, 取剑突下, 右锁中线肋弓上缘, 右腋前线肋弓上缘3点进行穿刺, 取出肝脏组. 标本立即置于40 g/L甲醛液中固定, HE染色. 根据肝脏脂肪变性程度以及炎症程度的分级进行Brunt评分<sup>[13-14]</sup>. 对两组大鼠于实验前, 2, 4, 6, 8 wk分别进行上述检查项目操作与观察. 观察呼气峰值(DOB)、达峰时间(T)和60 min累积呼气量(CU<sub>60 min</sub>)各参数的动态变化, 并分析呼气试验中各参数变化与肝组织病理变化的相关性<sup>[15]</sup>.

**统计学处理** 用SPSS11.5统计软件包进行分析. 数据用均数 $\pm$ 标准差  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 各组数据之间的比较采用单因素方差分析, 与肝组织病理变化的关系采用Pearson相关分析.

## 2 结果

2.1 肝脏病理组织改变 实验组2 wk的病理显示肝小叶结构清晰, 肝细胞轻度浊肿, 可见少量脂滴浸润(图1A评分1分); 4 wk显示肝小叶结构欠清晰, 肝细胞内充满大小不等, 数量不一的脂滴, 以腺泡3区明显, 部分脂滴融合成片, 汇管区与肝窦内有少量中性粒细胞, 单核细胞浸润(图1B评分3分); 6 wk显示肝细胞变性较前严重, 并伴有部分肝细胞灶状坏死, 大量炎细胞浸润(图1C评分6分); 8 wk显示肝细胞坏死明显, 在汇管区少量纤维组织生成, 肝小叶结构不清, 部分肝界板消失. 尚未形成假小叶(图1D评分8分).

2.2 呼气实验结果 脂肪肝组4, 6, 8 wk各时间段与2 wk的DOB值比较有显著性差异; 脂肪肝组各时间段与同期正常对照组DOB值比较亦有显著性差异(表1). 但正常对照组各时间段之间DOB值之间的比较无显著性差异. 脂肪肝组4, 6, 8 wk各时间段与2 wk的CUM

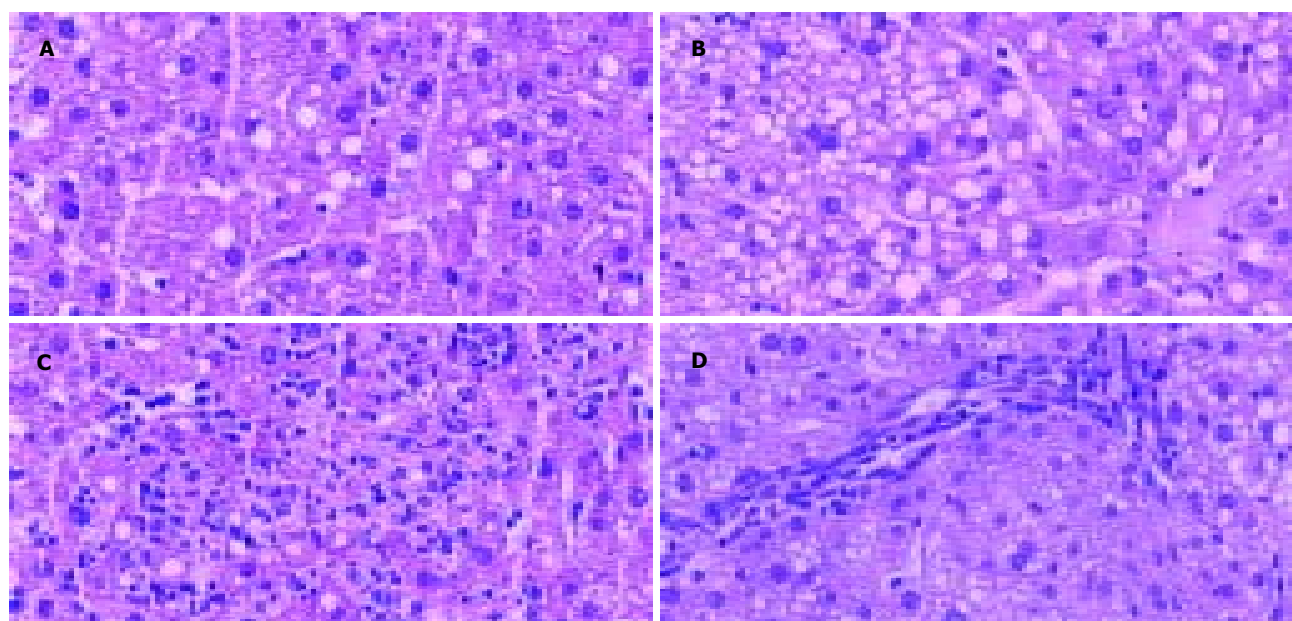


图1 A: 试验组2 wk的病理改变肝细胞内可见少量脂滴, HE染色 $\times 20$ , 评分1分; B: 试验组4 wk的病理改变肝细胞内明显的脂滴浸润, HE染色 $\times 20$ , 评分3分; C: 试验组6 wk的病理改变肝小叶内明显的炎细胞浸润, HE染色 $\times 20$ , 评分6分; D: 试验组8 wk的病理改变可见少量纤维组织增生, HE染色 $\times 20$ , 评分8分.

值比较有显著性差异:脂肪肝组各时间段与同期正常对照组 CUM 值比较亦有显著性差异(见表1).但正常对照组各时间段之间CUM值之间的比较无显著性差异.脂肪肝组,正常组各时间段之间的达峰时间(T)差别均无统计学意义.

将肝穿标本的病理组织学检查脂肪肝严重程度分级积分统计,与同期呼气实验的DOB值对照(见表2),进行Pearson统计学分析,二者呈显著负相关( $r=0.89$ ,  $P<0.01$ ).

### 3 讨论

我们成功地建立了高脂性脂肪肝的大鼠模型(如图1所示).其病理改变显示处于肝硬化前期阶段的脂肪肝.我们对模型病理变化的观察时限加以改良,即通过定期肝穿取材而不处死动物(大鼠)的方法,可连续动态观

察脂肪肝的病理变化进展过程,有助于消除个体间的差异对病理变化结果观察的影响,使对病理变化的观察更具有可比性,也有利于同步进行呼气试验的相关检测.高脂饲养组2 wk病理组织学检查仅见少量的脂肪浸润,4 wk时可见脂肪浸润,6 wk炎性细胞成灶状分布,8 wk已有少量纤维组织增生.说明高脂饲料喂养组脂肪肝病理变化的严重程度与高脂饲料喂养的周期长短呈正相关. $^{13}\text{C}$ -methacetine 呼气试验原理为 $^{13}\text{C}$ -methacetine 标记在肝细胞微粒体细胞色素P450多种酶系统的作用下,发生O-位脱甲基,生成对乙酰氨基酚和甲醛,后者在继续氧化生成 $\text{CO}_2$ ,用排出的速率及丰度来反映肝细胞的实时功能<sup>[16-18]</sup>.呼气试验对终末期肝病,尤其在肝移植前后,很有实用价值.研究发现肝移植前呼气试验的丰度为 $3.3 \pm 1.6\%$ 无肝期降为 $0.1\%$ 而1 mo后则升为 $15.1 \pm 5.4\%$ ,移植前丰度越低

表1 大鼠呼气实验检测

指标	组别	0 wk	2 wk	4 wk	6 wk	8 wk
DOB	正常对照	$35.4 \pm 3.8$	$34.7 \pm 3.8$	$35.3 \pm 3.7$	$35.1 \pm 4.3$	$35.0 \pm 3.5$
	脂肪肝	$34.9 \pm 3.9$	$32.2 \pm 3.0^a$	$21.0 \pm 2.5^{ab}$	$16.1 \pm 2.8^{bd}$	$11.6 \pm 2.2^{cd}$
CUM <sub>60 min</sub>	正常对照	$21.1 \pm 2.0$	$20.5 \pm 1.8$	$20.9 \pm 1.9$	$20.9 \pm 1.8$	$20.8 \pm 1.9$
	脂肪肝	$21.0 \pm 1.8$	$16.1 \pm 2.1^a$	$11.4 \pm 1.8^{ab}$	$7.1 \pm 1.1^{bd}$	$4.7 \pm 0.8^{bd}$

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常对照; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 脂肪肝组2 wk.

表2 不同时间段DOB与病理积分关系

2 wk		4 wk		6 wk		8 wk	
DOB	病理积分	DOB	病理积分	DOB	病理积分	DOB	病理积分
32.5	1	25.9	3	15.8	7	10.5	8
30.2	0	21.5	4	20.2	6	12.6	8
35.8	1	23.5	5	16.5	8	15.8	8
36.2	1	19.5	3	14.8	6	14.6	8
35.1	1	18	2	21.5	7	12.5	8
32	1	24.5	5	22.3	7	9.5	8
32.7	1	21.6	5	15.4	8	8.7	7
31.5	1	19.1	6	12.6	7	12.6	8
34.5	1	19.8	4	11.5	5	10.3	8
37	1	20.4	5	15.6	4	7.9	7
30.1	1	19.6	3	15.8	5	10.6	8
27.8	1	18.7	5	16.3	6	14.6	8
34.2	1	20.5	4	17.8	7	13.5	7
26	1	19.8	5	12.9	7	11.5	7
30.5	1	25.8	3	14.9	6	9.5	8
30.5	2	24.5	5	17	7	10.6	7
31.5	2	20.6	4	12.6	6	14.6	8
27.9	1	21.5	5	14.6	7	11.3	7
35	1	17.5	3	15.9	8	9.8	8
32.8	1	18.6	5	17	7	10.6	7

的患者, 移植后死亡的危险性越大<sup>[19]</sup>。我们将此项检查方法用于脂肪肝阶段肝细胞功能的判定。脂肪肝组呼气试验 2 wk 为  $32.2 \pm 3.0\%$ , 而 8 wk 时就递减为  $11.6 \pm 2.2\%$ , 而且其值的变化与同步病理组织学检查脂肪肝严重程度呈负相关( $r=0.89$ ,  $P<0.01$ )说明呼气试验是一项较为敏感的检测方法。本研究结果表明,  $^{13}\text{C}$ -美沙西丁呼气试验可以作为脂肪肝肝细胞功能无创的检测方法。可望对临床开展呼气试验用于脂肪肝肝功能定量评估, 药物疗效的评价, 脂肪性肝病的预后判断等有参考价值。

目前国内尚无有关呼气试验动物模型方面的研究报道, 而国外相关的动物模型均以静脉方式进行检测<sup>[20]</sup>, 试剂的质量要求高, 费用高, 操作复杂。我们采用了经口灌胃底物的途径改良呼气试验, 更符合药物的体内代谢特点; 为呼气试验更广泛的用于研究带来方便。

#### 4 参考文献

- 1 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 2 Suzuki S, Ishii Y, Asai S, Kohno T, Mazaki T, Takahashi Y, Iwai S, Ishikawa K. [1-(13)C] breath test of galactose and fructose for quantitative liver function. *J Surg Res* 2001;96:90-95
- 3 Saadeh S, Behrens PW, Parsi MA, Carey WD, Connor JT, Grealis M, Barnes DS. The utility of the  $^{13}\text{C}$ -galactose breath test as a measure of liver function. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:995-1002
- 4 Ishii T, Furube M, Hirano S, Takatori K, Iida K, Kajiwaru M. Evaluation of  $^{13}\text{C}$ -phenylalanine and  $^{13}\text{C}$ -tyrosine breath tests for the measurement of hepatocyte functional capacity in patients with liver cirrhosis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001;49:1507-1511
- 5 Schneider AR, Caspary WF, Stein J. (13)C-breath tests for the assessment of liver function. *Z Gastroenterol* 2004;42:269-275
- 6 Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Andreoli A, De Lorenzo A, Nista EC, Miele L, Cremonini F, Cazzato IA, Grieco A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Review article: breath testing for human liver function assessment. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1977-1996
- 7 唐恭顺, 匡安仁.  $^{14}\text{C}$ -氨基比林呼气试验在肝脏疾病中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12:1184-1187
- 8 骆子义, 谌取鼎, 关丽娟, 何清, 杨山麦. 碳 14 氨基比林呼气试验对肝硬化患者的肝储备功能及预后的评价. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:5:277-278
- 9 Di Campli C, Angelini G, Armuzzi A, Nardo B, Zocco MA, Candelli M, Santoliquido A, Cavallari A, Bernardi M, Gasbarrini A. Quantitative evaluation of liver function by the methionine and aminopyrine breath tests in the early stages of liver transplantation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:727-732
- 10 戴宁, 曾民德, 李继强, 范竹萍, 茅益民, 彭延伸, 邱德凯. 非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 II E1 的表达与氧化抗氧化的关系. 中华肝脏病杂志 1999;7:104-106
- 11 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. 世界华人消化杂志 2002;10:392-396
- 12 Mana F, Georges B, Reynaert H, Ham HR, Urbain D. Evaluation of the  $^{13}\text{C}$ -aminopyrine breath test using nondispersive infrared spectrometry. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:328-330
- 13 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3-16
- 14 Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474
- 15 严惟力, 孙大裕, 林祥通, 蒋义斌, 孙旭, 卢洪洲, 刘兴党, 林海. L-[1- $^{13}\text{C}$ ]苯丙氨酸呼气试验定量检测肝功能研究. 核技术 2003;5:362-366
- 16 Candelli M, Cazzato IA, Zocco MA, Nista EC, Fini J, Armuzzi A, Camise V, Santoro M, Miele L, Grieco A, Gasbarrini G, Gasbarrini A.  $^{13}\text{C}$ -breath test in the study of mitochondrial liver function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:23-31
- 17 Nista EC, Fini L, Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Cazzato IA, Merra G, Finizio R, Miele L, Grieco A, Gasbarrini G, Gasbarrini A.  $^{13}\text{C}$ -breath tests in the study of microsomal liver function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:33-46
- 18 Perri F, Marras RM, Ricciardi R, Quitadamo M, Andriulli A.  $^{13}\text{C}$ -breath tests in hepatology (cytosolic liver function). *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:47-49
- 19 Petrolatit A, Festi D, De Berardinis G, Colaiocco-Ferrante L, Di Paolo D, Tisone G, Angelico M.  $^{13}\text{C}$ -Methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:785-790
- 20 Ishii Y, Asai S, Kohno T, Ito A, Iwai S, Ishikawa K. Recovery of liver function in two-thirds partial hepatectomized rats evaluated by L-[1- $^{13}\text{C}$ ]phenylalanine breath test. *Surgery* 2002;132:849-856