

不能太多(本实验中用 100 μL),多了会影响裂解液的效果.但这个用量,在常温下无法保证 RNA 酶被完全抑制,必须将样品放入 -70°C 冰箱中冻存才能达到理想的效果.

组织的匀浆过程,是 RNA 提取成功与否的关键步骤,而彻底匀浆是提高获得率和降低降解的关键.我们采取了以下措施:(1)在 -70°C 冰箱中制作含有 300 mL/L 乙醇溶液的冰盒:因为在普通冰箱中制作的冰盒,温度不够低,无法保证组织在加入裂解液后不溶化;冰盒中含有 300 mL/L 的乙醇一方面可以使冰松软,EP 管可以插入,以达到更好的冷冻效果,另一方面,乙醇可以有效抑制局部环境中的 RNA 酶,防止操作过程中的外源性污染.(2)用于组织剪切的眼科剪在使用前,必须放在酒精灯上充分灼烧,并完全冷却后使用.(3)剪切要迅速、充分,时间约需 3-5 min,直至组织成均一的混悬液.(4)通过控制 EP 管插入冰中的时间,保持组织既不溶解,裂解液也不被冻结.当然,如果有条件,用电动匀浆器会比手工剪切效果更好.

总之,改良法在很大程度上简化了组织 RNA 抽提的

过程,而且非常稳定,即使是从富含 RNA 酶的组织中提取 RNA,其提取效率及 RNA 的完整性也可以达到理想的效果,值得推广应用.

4 参考文献

- 1 董凌燕,刘超,张梅,刘翠萍,覃又文.不同浓度葡萄糖对大鼠胰岛 β 细胞胰岛素基因表达的影响.南京医科大学学报 2003;23:318-321
- 2 王晓谦.大鼠心肌总 RNA 的提取.河南科技大学学报(医学版) 2004;22:85-86
- 3 Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-5299
- 4 Samuelson LC, Keller PR, Darlington GJ, Meisler MH. Glucocorticoid and developmental regulation of amylase mRNAs in mouse liver cells. *Mol Cell Biol* 1988;8:3857-3863
- 5 Gadbois DM, Salo WL, Ann DK, Downing SW, Carlson DM. The preparation of poly(A)⁺ mRNA from the hagfish slime gland. *Prep Biochem* 1988;18:67-76
- 6 张勇,郭永章,曹西南,李立.实验性胰腺炎大鼠胰腺总 RNA 的提取.昆明医学院学报 2003;24:29-31
- 7 夏璐,楼恺娴,龚自华,涂水平,翟祖康,袁耀宗,徐家裕.生长抑素类似物对急性胰腺炎大鼠胰腺组织表皮生长因子基因表达的影响及其机制.胃肠病学 2000;5:216-219

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

乙型肝炎肝硬化并腹水患者肝功能评估时的部分相关因素分析

赖力英,杨旭,龚国忠,蒋永芳,邹文

赖力英,杨旭,龚国忠,蒋永芳,邹文,中南大学湘雅二医院肝病研究中心
湖南省长沙市 410011

项目负责人:赖力英,410011,湖南省长沙市芙蓉区人民路,中南大学湘雅二医院肝病研究中心. lailiying@mail.csu.edu.cn
电话:0731-5524222-2263 传真:0731-5533525

收稿日期:2005-01-17 接受日期:2005-02-02

摘要

目的:分析乙型肝炎肝硬化并腹水患者肝功能评估时的相关因素,寻找对判断病情有指导意义的非创伤性指标.

方法:收集在本院住院的乙型肝炎肝硬化并腹水病例共 126 例,排除合并其他病毒感染,按 Child-Pugh 肝功能评分法评分并分级,分析患者血清常用生化指标 ALT、AST、ALB、GLB、TBIL、TBA 与不同肝功能级别的关系

结果:126 例乙型肝炎肝硬化并腹水患者中 A 级 15 例、B 级 73 例、C 级 38 例.血清 ALT、AST、ALB、GLB、TBIL、TBA 的异常率依次为 39.68%、84.21%、89.68%、70.16%、95.32%、91.26%, P 值依次为 0.25-0.5、 <0.005 、 <0.005 、0.1-0.25、

<0.005 、 <0.005 ，敏感性从高到低依次为 TBA、TBIL、ALB、AST、GLB、ALT。ALT、AST、ALB、GLB、TBA 均值在男性和女性患者之间差异无显著性($P>0.05$)；TBIL 在男性和女性患者之间差异有极显著性($P=0.001$)。ALT 均值在 C 级与 A 级之间的差异有显著性；AST、TBA、TBIL 均值在 A 与 B 级、B 与 C 级、C 与 A 级之间的差异均有显著性($P<0.05$)，其中 A 与 B 级、C 与 A 级之间的差异有极显著性($P<0.01$)；ALB 均值在各级之间的差异均有极显著性($P<0.01$)；GLB 在各级之间的差异均无显著性($P>0.05$)。

结论：在乙型肝炎肝硬化并腹水患者中，按 Child-Pugh 肝功能评分法评分并分级后，常用生化指标敏感性从高到低依次为 TBA、TBIL、ALB、AST、ALT，血清 AST 及 TBA 数值与肝功能分级有良好的相关性。

赖力英, 杨旭, 龚国忠, 蒋永芳, 邹文. 乙型肝炎肝硬化并腹水患者肝功能评估时的部分相关因素分析. 世界华人消化杂志 2005;13(6):799-803
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/799.asp

0 引言

肝硬化严重影响着人们的身体健康。我国的肝硬化原因主要为肝炎病毒感染，尤其是乙型肝炎病毒感染，所以探讨乙型肝炎病毒感染导致的肝硬化的临床特点有着重要的实用价值。因为尽管判断肝硬化病情的金标准仍然是肝活检组织病理学检查^[1]，但是由于这种检查有创伤性，费用高，加上肝活检穿刺范围狭小，导致病理结果不可避免的具有局限性，所以在面向广大患者的临床实际工作中，寻找能良好的能够反映病情严重程度的血液生化指标具有更加重要的实际意义。

部分作者对混合性病因的肝硬化的影响因素作了研究^[2-3]，也有作者对慢性丙肝病毒相关的慢性肝炎的影响因素的研究作了报道^[4-6]，我们则对乙型肝炎病毒感染导致的肝硬化合并腹水的患者进行了 Child-Pugh 评分

及分级，并且分析了这类患者的血清生化指标与不同肝功能级别的关系，力求为乙型肝炎肝硬化合并腹水患者的病情评估寻找到创伤小、而且对临床工作有指导意义的指标，结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 患者来源 乙型肝炎肝硬化患者共 126 例，均为 2001-01/2004-01 我院的住院患者，符合乙型肝炎肝硬化诊断标准^[7]，经腹腔穿刺或者腹部 B 超、CT 证实有腹水存在，排除合并其他病毒感染以及其他综合征，其中男性 100 例，女性 26 例，年龄 19 岁-75 岁。按照 Child-Pugh 肝功能评分系统评分并分级。

1.2 标本及检测 空腹静脉采血，送我院检验科以全自动生化分析仪（日本日立 7060）检测血清 ALT、AST、ALB、GLB、TBIL、TBA，指标判定正常值依次为： <40 nkat/L， <35 nkat/L， >35 g/L， <29 g/L， <17.1 μ mol/L， <10 μ mol/L。各个指标的敏感性为该指标中异常例数占肝病总数的百分比。

统计学处理 各组的异常率用百分率表示，用 χ^2 检验。各组数据以 mean \pm SD 表示，用 SPSS10.0 统计软件行 t 检验或者单因素方差分析， $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各生化指标在不同性别的乙型肝炎肝硬化并腹水患者中的比较 ALT、AST、ALB、GLB、TBA 各自的均值在男性和女性患者之间差异无显著性。TBIL 在男性和女性患者之间差异有极显著性（表 1）。

2.2 各生化指标在乙型肝炎肝硬化并腹水患者不同肝功能级别中的异常率及分析 我们收集到的乙型肝炎肝硬化并腹水病例共 126 例，按照 Child-Pugh 肝功能评分系统评分并分级，其中 A 级 15 例，B 级 73 例，C 级 38 例，

表 1 ALT 等指标在不同性别的乙型肝炎肝硬化并腹水患者中的比较

项目	性别	n	mean \pm SD	方差齐性检验			t 检验
				F	P	t	P
ALT(nkat/L)	男	100	75.00 \pm 97.54	1.75	0.19	0.66	0.51
	女	26	61.68 \pm 59.93				
AST(nkat/L)	男	74	162.60 \pm 174.47	3.35	0.70	1.22	0.21
	女	21	113.28 \pm 80.22				
ALB(g/L)	男	100	28.61 \pm 4.71	0.36	0.55	-0.33	0.74
	女	26	29.96 \pm 5.20				
GLB(g/L)	男	98	33.46 \pm 8.75	2.68	0.10	-0.56	0.57
	女	26	34.59 \pm 10.37				
TBIL(μ mol/L)	男	100	166.15 \pm 158.58 ^b	13.31	0.00	3.53	0.00
	女	26	79.13 \pm 96.07				
TBA(μ mol/L)	男	82	106.32 \pm 73.61	1.05	0.31	0.38	0.70
	女	25	99.76 \pm 81.14				

^b $P<0.01$ vs 女患者组。

表2 各生化指标在乙型肝炎肝硬化并腹水患者不同的肝功能级别中的异常率及统计分析

项目	分级	n	异常例数	异常率(%)	敏感性(%)	χ^2	P
ALT	A	15	4	26.67	39.68	2.04	0.25-0.5
	B	73	28	38.35			
	C	18	18	47.37			
AST	A	9	2	22.20 ^b	84.21	32.05	<0.005
	B	54	46	85.10 ^b			
	C	32	32	100.00 ^b			
ALB	A	15	9	60.00 ^d	89.68	18.69	<0.005
	B	73	66	89.68 ^d			
	C	38	38	100.00 ^d			
GLB	A	15	11	73.33	70.16	3.09	0.1-0.25
	B	73	47	64.38			
	C	36	29	80.55			
TBA	A	13	9	69.23 ^f	95.32	34.41	<0.005
	B	65	64	98.46 ^f			
	C	29	29	100.00 ^f			
TBIL	A	15	10	66.66 ^h	91.26	63.75	<0.005
	B	73	67	91.78 ^h			
	C	38	38	100.00 ^h			

^bP<0.01, ^dP<0.01, ^fP<0.01.

表3 各生化指标在乙型肝炎肝硬化并腹水患者不同肝功能级别中的值及统计分析

项目	分级	mean ± SD	t	P
ALT(nkat/L)	A	36.43 ± 35.23 ^b	-1.45	0.15
	B	66.47 ± 78.39	1.44	0.15
	C	97.49 ± 119.65	2.85	0.01
AST(nkat/L)	A	48.32 ± 17.19 ^d	-4.23	0.00
	B	135.81 ± 145.84 ^{bc}	1.99	0.04
	C	207.60 ± 184.16 ^c	4.82	0.00
ALB(g/L)	A	33.55 ± 3.33 ^f	4.55	0.00
	B	28.80 ± 5.06 ^f	2.90	0.00
	C	26.55 ± 3.07	7.04	0.00
GLB(g/L)	A	33.86 ± 8.39	0.54	0.59
	B	32.48 ± 8.90	-1.97	0.05
	C	36.10 ± 9.46	-0.81	0.42
TBA(μmol/L)	A	42.02 ± 35.09 ^h	-4.40	0.00
	B	102.41 ± 78.04 ^{gh}	2.18	0.03
	C	138.25 ± 62.50	6.35	0.00
TBIL(μmol/L)	A	53.21 ± 123.49 ^j	-2.39	0.02
	B	142.67 ± 166.28 ^{ij}	-2.03	0.04
	C	196.29 ± 109.90	-3.92	0.00

^bP<0.01 vs ALT C组; ^cP<0.05 vs AST C组; ^dP<0.01 vs 组AST B组和C组;
^fP<0.01 vs ALB B组, C组; ^gP<0.05 vs TBA C组; ^hP<0.01 vs 组TBA B
 组和C组; ⁱP<0.05 vs TBIL C组; ^jP<0.01 vs TBIL B组和C组.

计算出各级中ALT、AST、ALB、GLB、TBA、TBIL的异常率,并予以 χ^2 检验. ALT及GLB在各级间P值差异无显著性;AST、ALB、TBA及TBIL异常率在各级间差异均有极显著性. 敏感性从高到低依次为TBA(95.32%)、TBIL(91.26%)、ALB(89.68%)、AST(84.21%)、GLB(70.16%)、ALT(39.68%)(表2).

2.3 各生化指标在乙型肝炎肝硬化并腹水患者不同肝功能级别中的值及统计分析 在我们的患者中, ALT均值在C级与A级之间的差异有显著性;AST、TBA、TBIL均值在A与B级、B与C级、C与A级之间的差异均有显著性(P<0.05),其中A与B级、C与A级之间的差异有极显著性(P=0.000);ALB均值在各级之间的差异均有极显著性(P<0.01);GLB在各级之间的差异均无显著性(P>0.05)(表3).

3 讨论

肝硬化是肝病的严重阶段,其肝功能储备状态对肝硬化患者的治疗以及预后判断有重要的指导意义.判断肝功能储备状态的方法一般沿用Child-Pugh评分系统^[8],但是这种方法仍然不够完善,因此人们一直在寻找新的变量以求更准确的预测和评估患者的肝功能储备^[4,9-11].

肝硬化出现腹水通常是病情严重的表现,我们对HBV感染后的肝炎肝硬化并腹水患者的肝功能储备状态作了Child-Pugh评分及分级,发现这类患者中仍然有部分患者为肝功能A级(11.9%),说明即使在这类患者中仍然有部分患者处于肝功能代偿较好的阶段,对这种现象我们解释为在肝硬化早期由于肝脏对醛固酮的灭活减少

导致钠潴留而产生腹水,这时候低蛋白血症不明显而导致Child-Pugh积分不高.由此我们想到,不同病因所致的肝硬化应该有不同的临床特点,而且在生化检查结果方面也会有其特殊性.于是我们对乙型肝炎肝硬化并腹水患者进行了Child-Pugh分级后,对部分相关因素作了分析,以期发现对病情判断有指导意义的指标.

我们对不同性别的乙肝肝硬化并腹水患者的多项指标作了比较,发现ALT、AST、ALB、GLB、TBA在男性和女性患者之间差异无显著性;TBIL在男性和女性患者之间的差异有极显著性,这种现象与临床上所见的现象相吻合,即乙肝病毒感染致肝硬化患者中黄疸深的男性比女性多,这种差异的原因尚不清楚,有待进一步研究.

AST、ALT是肝细胞损害的敏感指标,对于鉴别肝细胞疾病是很有帮助的.当慢性肝病向肝硬化发展时AST明显增高.事实上,对于AST与各种肝病的关系的研究一直都很活跃^[2-3,5],Li *et al*^[2]在86例不同病因的肝硬化患者中研究与肝纤维化相关的因素,发现升高的AST、TBIL与肝硬化患者蜘蛛痣的出现有关,而蜘蛛痣的多少与肝硬化病情的严重性是平行的.Giannini *et al*^[6]发现在HCV感染的252个慢性肝病患者中,AST与ALT的比值与组织炎症分级和临床评估有相关性,还对99例肝炎肝硬化(含HBV和HCV感染)患者的AST和ALT比值与终末期肝病模型的关系做了分析,发现在病毒相关性肝硬化中,AST与ALT的比值对病情的预兆能力与已经建立的预兆记分系统相比(比如终末期肝病模型)差别没有显著性^[3].Khokhar^[5]对266个慢性丙型肝炎患者的全血相和肝功能实验作了回顾性调查,并且比较了肝脏切片的纤维化和硬化的程度,发现在慢性丙型肝炎病毒感染的患者中AST/ALT比值大于1和血小板计数小于 1.5×10^5 可以预测纤维化和硬化的进展阶段.

我们的研究发现在肝炎肝硬化并腹水患者中,ALT、AST的异常率依次为39.6%,84.2%, χ^2 检验结果是ALT在Child-Pugh A、B、C三个级别的各级别间差异无显著性,AST的异常率在各级间的差别有极显著性,说明AST与病情相关的敏感性比ALT大.另外,AST的均值在Child-Pugh三级间的差异也有显著性,并且在A级与B级之间、A级与C级之间均值的差异有极显著性,而ALT没有这种现象,此外还可以看到各个级别的肝炎后肝硬化并腹水患者的AST均值高于ALT均值,说明AST与ALB、TBIL一样,在肝功能评分时可以作为参考指标使用.导致这种现象的原因是ALT主要存在于肝细胞的胞质中,当肝细胞膜有炎症时ALT便明显升高,而AST存在于线粒体中,病变严重并累及到线粒体时明显升高,而且升高的数值超过ALT升高的数值,因此在肝炎肝硬化并腹水患者中在判断病情严重性方面AST是优于ALT的.

GLB升高常常提示肝病进入慢性期,我们对乙肝肝硬化并腹水患者的研究结果显示GLB的异常率为70.16%,在各级间的差异无显著性.从理论上而言,发生肝硬化时GLB应该明显升高,为什么这时的异常率不是100%呢?

我们认为在肝硬化严重阶段,肝脏的网状内皮系统也受到了损害,Kupffer细胞的功能也受到了严重影响,导致球蛋白不能升高,因此,GLB升高通常代表肝病慢性化,但是GLB不升高时不能因此否定肝硬化的存在.

TBA、ALB、TBIL异常率在各级间差异均有极显著性,说明TBA与ALB、TBIL一样,在评分时可以作为参考指标使用.胆汁酸测定可以敏感地反映肝功能异常,他在肝细胞内由微粒体、线粒体、溶酶体合成,然后分泌到肠道,在肠道内有80-90%被重吸收至门静脉入肝脏,与肝脏生成的胆汁酸再次随胆汁排入肠道,形成肠肝循环,当肝脏出现病变时清除胆汁酸的能力降低,血中胆汁酸浓度升高,另一方面,肝硬化时由于门-体分流,门静脉中的胆汁酸直接进入体循环,导致血液中胆汁酸增加.TBA能较为特异的反应肝排泄功能^[12],近些年对TBA与肝病关系的认识也有了长足的进步.De Almeida *et al*^[13]报道,在酒精性肝硬化患者中TBA血清水平与Child-Pugh肝功能分级程度相一致;Testa *et al*^[14]在对混合病因的肝硬化患者作研究时发现血清TBA水平在评估肝移植方案时是Child-Pugh记分系统的良好补充.

我们发现,在Child-Pugh A、B、C三个级别的肝炎肝硬化并腹水患者中,TBA的异常率为93.3%,大于ALT及AST的阳性率, χ^2 检验结果是TBA在各级间的差别有显著性,说明在乙肝肝硬化并腹水患者中TBA的敏感性高,而且高于ALT及AST,也高于其他作者的报道^[15],产生这种情况的原因可能是因为我们所选用的患者群体是已经有腹水的乙型肝炎后的肝硬化,这类患者的肝实质损伤比由其他病因引起的肝硬化的肝实质损伤要严重.我们的结果还显示TBA均值在Child-Pugh A级、B级及C级间逐级升高,而且各级间的差异都有显著性.

总之,在乙型肝炎肝硬化并腹水的患者中,血清生化指标AST和TBA的异常与Child-Pugh肝功能分级密切相关,其数值越高,肝功能贮备越差,因此,在临床工作中可以用来协助Child-Pugh肝功能分级系统进行无创性肝功能评估,有良好的实用价值.

4 参考文献

- 1 姚光弼.临床肝脏病学.上海:上海科学技术出版社,2004:463
- 2 Li CP, Lee FY, Hwang SJ, Lu RH, Lee WP, Chao Y, Wang SS, Chang FY, Whang-Peng J, Lee SD. Spider angiomas in patients with liver cirrhosis: role of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *World J Gastroenterol* 2003;9:2832-2835
- 3 Giannini E, Botta F, Testa E, Romagnoli P, Polegato S, Malfatti F, Fumagalli A, Chiarbonello B, Risso D, Testa R. The 1-year and 3-month prognostic utility of the AST/ALT ratio and model for end-stage liver disease score in patients with viral liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2855-2860
- 4 Pohl A, Behling C, Oliver D, Kilani M, Monson P, Hassanein T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3142-3146
- 5 Khokhar N. Serum aminotransferase levels and platelet count as predictive factor of fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C infection. *J Pak Med Assoc* 2003;53:101-410
- 6 Giannini E, Risso D, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malfatti