

血清 γ -球蛋白联合吲哚菁绿清除试验评估肝脏储备功能的实验研究

康杜甫¹⁾, 孙志为²⁾, 唐建中²⁾, 陈业盛¹⁾, 费振浩²⁾

(1) 昆明医科大学, 云南昆明 650031; 2) 云南省第一人民医院肝胆一科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨血清 γ -球蛋白与吲哚菁绿清除试验结合应用在肝脏储备功能评估中的意义. **方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组和实验组, 建立 SD 大鼠肝硬化动物模型, 检测对照组和实验组的吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 15 min 滞留率 (indocyanine green retention rate of 15 minutes, ICG R15) 及血清 γ -球蛋白水平, 分析二者相关性, 并取肝脏行病理检查判断肝纤维化程度. **结果** 随造模时间的延长, SD 大鼠肝脏纤维化程度逐渐加重, ICG R15 及血清 γ -球蛋白均明显升高 ($P < 0.05$), 相关性分析显示二者具有明显相关性 ($r = 0.841$), 单因素线性回归分析得出回归方程: $Y = 0.715X + 3.783$ (Y 为 ICG R15, X 为血清 γ -球蛋白). **结论** 血清 γ -球蛋白与 ICG R15 的升高在肝硬化形成过程中具有明显相关性, 因此血清 γ -球蛋白检测在肝脏储备功能评估中可有效地补充吲哚菁绿清除试验.

[关键词] ICG 清除试验; γ -球蛋白; 肝脏储备功能; 肝硬化

[中图分类号] R657.3+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 07-0023-04

The Experimental Study on Combining Serum Levels of Gamma Globulin and Indocyanine Green Clearance Test for Evaluation of Hepatic Functional Reserve

KANG Du-fu¹⁾, SUN Zhi-wei²⁾, TANG Jian-zhong²⁾, CHEN Ye-sheng¹⁾, FEI Zhen-hao²⁾

(1) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 2) Dept. of Hepatobiliary Surgery, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the significance of the combining serum levels of gamma globulin and Indocyanine green clearance test in evaluating hepatic functional reserve. **Methods** 60 male SD rats were randomly divided into experimental group and control group. The model of liver cirrhosis in rats was established and the serum levels of gamma globulin and Indocyanine green retention rate in 15 minutes (ICG R15) were tested and their correlation was analyzed. Furthermore, the liver pathological examination was performed to estimate degree of liver fibrosis. **Results** As time went on, the liver fibrosis degree of SD rats aggravated gradually, both serum levels of gamma globulin and ICG R15 increased significantly ($P < 0.05$), and the correlation analysis showed that they had obvious correlation ($r = 0.841$). The single factor linear regression analysis obtained a equation of regression: $Y = 0.715X + 3.783$ (Y is ICG R15, X is serum levels of gamma globulin). **Conclusion** During the forming process of liver cirrhosis, the increase of serum levels of gamma globulin and ICG R15 have obvious correlation, so testing serum levels of gamma globulin would be a good approach to complement Indocyanine green clearance test in evaluating hepatic functional reserve.

[Key words] Indocyanine green clearance test; Gamma globulin; Hepatic functional reserve; Liver cirrhosis

肝脏储备功能系指生理负荷增加时肝脏能动员的额外代偿潜能^①. 肝脏受到病理损害时, 除了需提供机体代谢、解毒和免疫等功能的需求, 肝脏储备功能还需满足肝脏自身修复和再生的需求. 肝

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD188)

[作者简介] 康杜甫 (1988~), 男, 云南普洱市人, 在读硕士研究生, 住院医师, 主要从事肝胆外科基础研究工作.

[通讯作者] 孙志为. E-mail: zwsun6345@aliyun.com

切除术是当前肝细胞癌的主要治疗手段,但由于肝细胞癌多存在肝硬化背景,肝脏储备功能不同程度受损,肝切除术后肝脏功能衰竭成为围手术期死亡的重要原因^[2]。因此术前对肝脏储备功能进行精确评估,对把握安全切肝范围、降低术后肝脏功能衰竭发生率具有重要意义。目前评估肝脏储备功能的方法主要包括 Child-Pugh 分级等评分系统及多种肝脏代谢、排泄功能定量试验等。在众多定量试验中,ICG 清除试验因其较高的敏感性及实用性已被广泛应用,而其他试验评估方法尚未被常规用于临床评估^[3]。ICG 清除试验简便、安全、准确性较高,但 ICG 排泄速率受肝脏血流量影响较大,任何影响肝脏血流量的因素如门静脉癌栓、门静脉栓塞术后、肝脏局部血流变异等都将对试验结果产生影响;血管扩张剂和高胆红素血症等亦有明显影响;任何原因引起的胆汁排泄障碍可导致 ICG 排泄速率延缓。当存在上述情况时 ICG 清除试验将不能准确反映肝脏储备功能^[4]。肝脏本身不能合成免疫球蛋白,肝病时淋巴系统产生大量 γ -球蛋白,该变化与肝细胞损伤严重程度成正比^[5];除反映肝功能损害外,血清 γ -球蛋白还能反映肝组织纤维化程度^[6],故动态观察血清 γ -球蛋白变化对肝病病情评价有重要意义。本研究旨在比较分析肝硬化形成不同阶段血清 γ -球蛋白和 ICG R15 变化情况二者关系,从而推断血清 γ -球蛋白联合 ICG 清除试验在肝脏储备功能评估中的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级雄性 SD 大鼠 60 只(购自昆明医科大学动物中心),体重 310.8 ± 40.5 g,随机分为对照组 ($n=10$) 和实验组 50 只(其中分为 2 周、4 周、6 周、8 周、10 周组,每组各 10 只),分笼饲养。对照组喂普通饲料、饮自来水,实验组喂高脂高胆固醇饲料,饮 5%酒精,并每隔 3 d 于动物颈、背部皮下注射 40%油剂 CCl₄ 油剂(99.9%分析纯 CCl₄ 与大豆油按体积 3:2 混合配制而成),首剂 5 mL/kg,此后 3 mL/kg。

1.2 ICG R15 及血清 γ -球蛋白的测定

实验前 12 h 大鼠禁食、禁水。以 0.3%戊巴比妥按 0.2 mL/kg 剂量进行腹腔注射麻醉,麻醉成功后依次分离出大鼠双侧股静脉,以 50 mL 注射用水溶解 25 mg ICG 粉末,按 0.5 mg/kg 剂量由大鼠右侧股静脉 30 s 内注入。准确计时,给药 15 min 后由左侧股静脉采血 3 mL 置于经肝素处理的离心管中,混

匀,以 3 000 r/min 离心 10 min,该血浆为 ICG R15 测定样品。同前续采血 3 mL 置入普通 10 mL 离心管中留作血清 γ -球蛋白测定。打开大鼠腹腔切取部分肝脏以 10%甲醛固定留作病理检查,实验完毕后大鼠断颈处死(2 周、4 周、6 周、8 周、10 周组分别于造模开始后第 2 周、4 周、6 周、8 周、10 周采血检测)。

按 ICG 药物说明书绘制 ICG 标准曲线。取上述样品血浆 1 mL 加生理盐水 2 mL 稀释混匀,752 型紫外分光光度计 805 nm 处测定吸光度,查标准曲线计算出 ICG 浓度 (C_{15}),并通过以下公式计算出 ICG R15 = $(C_{15}/1.00) \times 100$ (%)。血清 γ -球蛋白测定样品以法国 Sebia HYDRASYS LC 电泳仪进行血清蛋白电泳检测。

1.3 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 进行数据分析处理。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多个样本均数比较采用完全随机设计计量资料的方差分析,多个样本均数的两两比较采用 LSD- t 检验,检测水准 $\alpha=0.05$ 。两变量间采用 Pearson 相关分析,并进行假设检验,检测水准 $\alpha=0.05$ 。行线性回归分析建立回归方程,并进行假设检验,检测水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SD 大鼠肝硬化模型的建立

实验组大鼠第 1、2 周出现饮食、饮水减少,体重下降,第 2 周后饮食、饮水量基本恢复正常,体重增加;第 4 左右开始出现精神萎靡、脱毛、注射部位皮下坏死等;第 8 周实验组大鼠出现腹部膨隆,开腹见腹水形成。造模过程中 2 周组、4 周组大鼠均无死亡,6 周组死亡 1 只、8 周组死亡 2 只、10 周组死亡 2 只。8 周和 10 周时实验组动物肝脏呈黄褐色,体积缩小,表面可见多数细小硬化结节,呈典型肝硬化外观;光镜下,肝细胞变性明显,门管区结缔组织增生明显,后期见有原小叶结构紊乱,有假小叶形成,具有肝硬化特征性表现,见图 1~3。

2.2 ICG R15 变化

单因素方差分析示 $F=39.078$, $P<0.01$,差异有统计学意义,说明 6 组大鼠的 ICG R15 有差别;LSD- t 检验示 6 周组、8 周组、10 周组与对照组、2 周组、4 周组间两两比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),6 周组、8 周组、10 周组间两两比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),说明大鼠 ICG R15 随造模时间延长而升高,变化情况见表 1。

2.3 血清 γ -球蛋白

方差分析示 $F=27.391$, $P<0.01$, 差异有统计学意义, 说明 6 组大鼠的血清 γ -球蛋白水平有差别; LSD- t 检验示 4、6、8、10 周组与对照组比较差异有统计学意义, 6、8、10 周组分别与 2、4 周组比较差异有统计学意义, 10 周组分别与 6、8 周组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 说明大鼠

血清 γ -球蛋白随造模时间延长而升高.

2.4 ICG R15 与血清 γ -球蛋白相关性分析

Pearson 相关分析得出相关系数 $r=0.841$, 说明二者存在明显相关关系; 单因素线性回归分析得出回归方程: $Y=0.715X+3.783$ (其中 Y 为 ICG R15, X 为血清 γ -球蛋白).



图 1 8 周组大鼠肝脏表明呈大量结节状改变

Fig. 1 The multiple nodular changes on rat liver's surface in 8th week group

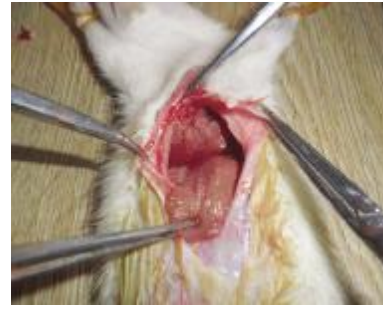
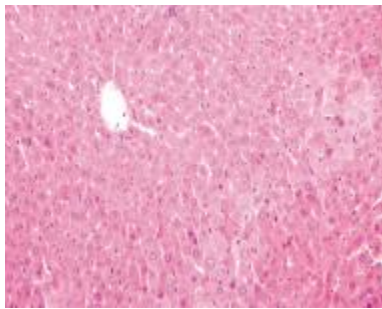
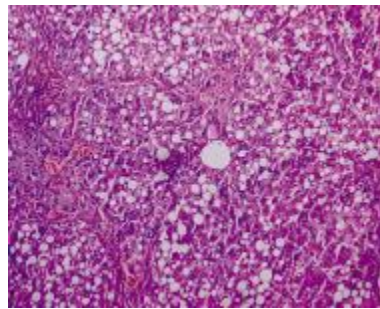


图 2 8 周组大鼠腹腔内有腹水形成

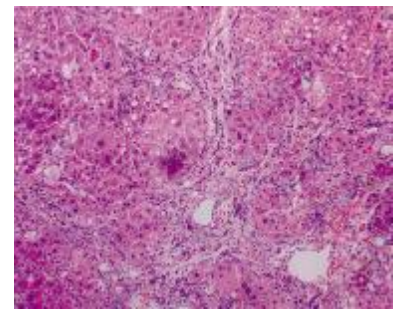
Fig. 2 Rats in 8th group weeks have ascites formation inside the abdomen



A



B



C

图 3 光镜下对照组、4 周组、8 周组大鼠肝脏组织病理改变 (HE $\times 100$)

Fig. 3 The pathological changes under light microscopy of rat liver tissues in control group and 4th weeks, 8th weeks group (HE $\times 100$)

A: 对照组肝小叶结构正常; B: 4 周组肝细胞脂肪变性, 肝小叶结构紊乱, 肝组织胶原纤维沉积, 炎症细胞浸润; C: 8 周组大量纤维条索分割、包绕肝小叶, 假小叶形成 (HE $\times 100$).

表 1 对照组及实验组 ICG R15 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of ICG R15 between experimental group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	R15 (%)
对照组	10	6.55 \pm 1.82
实验组		
2 周	10	7.18 \pm 2.32*
4 周	10	8.31 \pm 2.77*
6 周	10	12.96 \pm 3.97*
8 周	10	16.46 \pm 3.07*
10 周	10	22.83 \pm 3.86*

与对照组比较, * $P<0.05$.

表 2 对照组及实验组血清 γ -球蛋白变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of serum levels of gamma globulin between experimental group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	γ -球蛋白 (%)
对照组	10	5.26 \pm 1.44
实验组		
2 周	10	6.15 \pm 2.87*
4 周	10	8.77 \pm 4.38*
6 周	10	13.29 \pm 3.82*
8 周	10	15.57 \pm 3.34*
10 周	10	21.78 \pm 4.89*

与对照组比较, * $P<0.05$.

3 讨论

原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 在我国高发, 其在肿瘤相关死亡中位居第二, 仅次于肺癌^[6]。目前对于 PLC 的治疗根据不同病情有多种方法, 但早期手术切除仍是 PLC 最有效的治疗方法。肝功能衰竭是肝切除术后死亡主要原因之一^[7], 因此肝切除术前对肝脏储备功能进行准确评估必不可少。在我国超过 90%^[8] 的 PLC 患者具有不同程度的乙型肝炎, 肝脏储备功能受损, 肝切除术后易发生肝功能衰竭, 故术前对肝脏储备功能的评估显得更加重要。

ICG 是一种无毒的染料, 经外周静脉注射 20 min 后约 97% 从体内排出, 其完全由肝脏代谢并从胆道排出, 不参与体内化学反应, 无肠肝循环, 因此 ICG 清除试验被广泛用于评估肝脏储备功能和肝脏血流量, 是目前国内外广泛使用的一种准确性较高的肝脏储备功能评估方法, 其常用参数为 ICG R15, 正常值为 3.5% ~ 10.6%^[9]。然而 ICG 清除试验的准确性受诸多因素的影响, 如肝脏有效血流量异常 (门脉癌栓、肝内动-静脉瘘等)、应用血管扩张剂、胆红素水平升高、乙型肝炎等。有研究^[10]表明, ICG R15 与肝脏有效血流量呈负相关, 与是否患乙型肝炎以及血总胆红素水平呈正相关, 其机制可能是乙型肝炎导致肝硬化及肝血流量变化, 胆红素可能与吲哚菁绿竞争结合载体而影响试验结果。当存在以上情况时, 则需要其他评估方法对 ICG 清除试验进行补充, 以提高肝脏储备功能评估的准确性。

血浆蛋白的变化可以反映肝脏功能情况。通过血清蛋白电泳可分析各种蛋白的百分比, 正常血清蛋白电泳后可分为 Alb、 α_1 、 α_2 、 β 及 γ 5 条区带, 其中前 4 种蛋白质由肝脏合成。 γ -球蛋白主要是由单核-吞噬系统合成的免疫球蛋白, 肝脏本身无合成免疫球蛋白的能力。肝脏疾病往往引起血清白蛋白降低, 而肝外合成的球蛋白尤其是 γ -球蛋白增高。 γ -球蛋白增高是肝脏间质细胞受累的表现, 其增高伴有白蛋白减少时对评估肝功能损害有较大的价值^[11]。

肝脏疾病时, 血清 γ -球蛋白增高程度与疾病的严重程度相关, 它既能反映肝功能损害程度, 又能反映肝组织纤维化程度, 因此动态观察血清 γ -球蛋白的变化, 对肝病病情的评价有重要参考价值。有研究显示^[9], 肝纤维化面积百分比与血清

γ -球蛋白水平呈正相关关系 (相关系数 r 为 0.806), 即血清 γ -球蛋白越高, 肝纤维化面积百分比越高, 肝硬化程度越重。

从本实验中笔者可以得知肝硬化形成过程中, 血清 γ -球蛋白与 ICG R15 变化具有明显的相关性, 因此在肝脏储备功能评估中, 当存在影响 ICG 清除试验准确性的因素时, 检测血清 γ -球蛋白可作为 ICG 清除试验的一种较好的补充手段, 二者联合应用对提高肝脏储备功能评估的准确性具有较高的价值。

[参考文献]

- [1] SCHNEIDER P D. Preoperative assessment of liver function [J]. *Surgical Clinics of North America*, 2004, 84(2): 355 - 373.
- [2] 董家鸿, 郑树森, 陈孝平, 等. 肝切除术前肝脏储备功能评估的专家共识 (2011版) [J]. *中华消化外科杂志*, 2011, 10(1): 20 - 25.
- [3] MIZUGUCHI T, KAWAMOTO M, MEGURO M, et al. Preoperative liver function assessments to estimate the prognosis and safety of liver resections [J]. *Surgery today*, 2014, 44(1): 1 - 10.
- [4] O'CONNELL T X, HORITA T J, KASRAVI B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis [J]. *American family physician*, 2005, 71(1): 105 - 112.
- [5] 秦凯, 聂双发, 曾勇, 等. 血清 γ -球蛋白与 Child-Pugh 肝功能分级在肝脏储备功能评估中的价值 [J]. *西部医学*, 2011, 23(2): 342 - 344.
- [6] 杨秉辉, 丛文铭, 周晓军, 陈孝平, 等. 原发性肝癌规范化诊治专家共识 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(3): 259.
- [7] STOCKMANN M, LOCK J F, MALINOWSKI M, et al. The LiMAx test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery [J]. *HPB*, 2010, 12(2): 139 - 146.
- [8] 周伟, 蔡响, 李悦国, 等. 肝癌术后肝功能储备的实验室评价 [J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 29(24): 2098 - 2100.
- [9] FAN S T. Liver functional reserve estimation: state of the art and relevance for local treatments: the Eastern perspective [J]. *Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 2010, 17(4): 380 - 384.
- [10] 庄波, 金如燕, 厉学民, 等. 测定肝功能时吲哚菁绿清除试验的影响因素分析 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2013, 25(4): 336 - 338.
- [11] 梁鹏, 尹杰, 王璇, 等. 血清 γ -球蛋白评价肝脏储备功能的临床研究 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2008, 15(4): 274 - 277.

(2014-03-23 收稿)