

肝肺综合征患者HIF-1 α 和MPO水平与门脉高压血流动力学研究

戚秋藤¹, 王燕颖¹, 禹晶², 张秉全², 赵欣¹ (1. 黑龙江省医院 消化内科, 哈尔滨 150036;
2. 齐齐哈尔医学院第二附属医院 消化内科, 齐齐哈尔 161005)

摘要: **目的** 探讨彩色多普勒超声并对比增强超声心动图(CEE)评价肝肺综合征(HPS)肺内分流发生与血浆缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和髓过氧化物酶(MPO)以及门脉血流动力学变化的相互关系。**方法** 利用彩色多普勒超声检测各组门静脉内径及血流速度,用CEE检测各组肺内分流,应用ELISA法分别检测健康者及伴与不伴HPS肝硬化患者的血浆HIF-1 α 和MPO浓度,对比各组血浆HIF-1 α 和MPO水平以及门脉血流动力学的变化与肺内分流程度的关系。**结果** HPS组患者血浆HIF-1 α 和MPO浓度高于非HPS组,且门静脉内径增宽、血流速度减慢,两组结果比较差异有统计学意义($P < 0.05$),并与肺内分流程度呈正相关。**结论** 彩色多普勒超声及CEE可以简便、敏感的反映血浆HIF-1 α 和MPO水平以及门静脉血流动力学异常在HPS发生中起一定作用,并可提示亚临床早期肺内血管异常。

关键词: 超声检查, 多普勒, 彩色; 缺氧诱导因子-1; 过氧化物酶; 肝肺综合征

Relationship between HIF-1 α , MPO and hemodynamic in patients with hepatopulmonary syndrome and portal hypertension

QI Qiu-teng¹, WANG Yan-ying¹, YU Jing², ZHANG Bing-quan², ZHAO Xin¹ (1. Department of Gastroenterology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150036, China; 2. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical School, Qiqihar 161005, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the color doppler sonography and contrast-enhanced echocardiography (CEE) in assessment of intrapulmonary shunting in patients with hepatopulmonary syndrome and HIF-1 α , MPO and portal hemodynamic. **Method** The portal vein diameter and blood flow velocity were examined by color doppler, and intrapulmonary shunting by contrast-enhanced echocardiography (CEE). Expressions of HIF-1 α and MPO in serum were determined by ELISA in normal, hepatocirrhosis amalgamating HPS and unam amalgamating HPS patients, separately. HIF-1 α and MPO levels were compared among the groups, also the portal hemodynamic and the intrapulmonary shunting were examined. **Results** The levels of HIF-1 α and MPO in hepatocirrhosis amalgamating HPS levels patients were higher than those in unamalgamating HPS levels patients, the diameter of portal vein dilated and the velocity of portal vein dropped, which were statistically different between the two groups ($P < 0.05$) and positively correlated with intrapulmonary shunting. **Conclusions** The color doppler sonography and contrast-enhanced echocardiography (CEE) which reflected HIF-1 α , MPO levels patients and the hemodynamic played an role in the development of HPS, and was available to early examine the change of intrapulmonary vessel.

Key words: Ultrasonography, doppler, color; Hypoxia inducible factor-1; Peroxidase; Hepatopulmonary syndrome

肝硬化门静脉高压(cirrhotic portal hypertension, CPH)时,全身高动力循环,引起肺脏异常改变,肺血管扩张、动静脉交通支开放,临床产生低氧血

症称之为肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)。5%~29%的肝硬化患者会伴发HPS。伴HPS肝硬化患者的病死率高达41%^[1],因此早期诊断和及时治疗HPS至关重要。本研究通过对比增强超声心动图(CEE)证实低氧血症时的肺内分流,

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GB07C32506)

通讯作者: 王燕颖 Email: liuyuzhe1972@163.net

彩色多普勒超声检测健康者及肝硬化伴与不伴HPS患者的门静脉宽度、门脉血流速度等参数,检测肝硬化伴与不伴HPS患者血浆缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和髓过氧化物酶(MPO)水平,对比分析其门脉血流动力学改变以及血浆HIF-1 α 、MPO水平的变化,探讨肺内分流与HIF-1 α 和MPO变化的内在联系,为临床早期诊断和治疗HPS提供实践和理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择2006年3月~2009年9月黑龙江省医院消化内科住院肝硬化患者245例,疾病诊断均依据《内科学》(第6版)肝硬化临床分期标准^[2],排除其他器官原发疾病史。平均病程(6.8 \pm 4.7)年,诊断肝硬化后至本次就诊的平均时间为3.2年。其中有肝硬化家族史者29例,占11.8%;脾切除史者35例,占14.3%。根据有无发生HPS将其分为2组,其中HPS组63例,包括男性48例,女性15例,平均(46.2 \pm 13.2)岁;非HPS组182例,包括男性139例,女性43例,平均(47.8 \pm 15.1)岁。对照组为35例健康者,均无亲缘关系,包括男性28例,女性7例,平均(42.7 \pm 9.4)岁,肝酶谱正常,病毒标志物阴性且无原发性心肺肾疾病及高血压病。

1.2 HPS诊断标准^[3] ①无原发性心、肺及血液系统疾病;②血气分析动脉血氧分压(PaCO₂)<10.7 kpa,直立性低氧血症,PaCO₂下降10 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)以上;③振动盐水微泡静脉注射经胸超声心动图阳性。

1.3 实验方法

1.3.1 实验材料及试剂 无菌取空腹肘静脉血用EDTA抗凝,分离血清,分装后置于-70℃冻存待测,另取空腹肘静脉血3 ml,取其血清置于-70℃冻存。腹水留取采用常规无菌腹腔穿刺,腹水标本离心去细胞成分后置于-20℃冰箱保存待测。HIF-1 ELISA试剂盒购自德国欧蒙公司,MPO ELISA试剂盒购自美国RD公司。

1.3.2 血清/腹水HIF-1、MPO的测定 将样品稀释,按加样方案向相应微孔中分别加稀释血清、阴性、阳性对照和空白对照各100 μ l,室温温育30分钟,洗板3次,加酶标抗体100 μ l,再室温温育

30分钟,再洗板3次(同前),加底物显色,5分钟后加终止液。Clini Bio 128酶标仪读取450 nm波长的吸光度A值。HIF-1 α 以A值为纵坐标(Y),相应的HIF-1标准品浓度为横坐标(X)做线性曲线,根据其A值由标准曲线换算出样品的HIF-1浓度。MPO以吸光度A值为Y,相应的MPO标准品浓度为X做对数曲线,根据其A值由标准曲线换算出样品的MPO浓度。

1.3.3 CEE的测定 使用HP Sonos 5500彩色多普勒超声诊断仪,探头频率2.0~4.0 MHz。用维生素B₆ 300 mg(50 mg/ml)及5%碳酸氢钠5 ml,分别同时注入患者外周静脉。CEE阳性标准:右心室显示云雾状影后6~7个心动周期,左心房、左心室出现微泡。根据左心室微泡的显示程度,定性分析为1⁺~3⁺。1⁺:左心室出现极少量微泡,见图1;2⁺:约1/2左心室腔显示微泡;3⁺:左心室腔充满微泡。根据CEE检查结果将患者分为有(CEE⁺)或无(CEE⁻)肺内分流两组。

1.3.4 门脉系统血流动力学的检查 仪器选用Diasonics VMS彩色多普勒超声诊断仪,探头频率3.5 MHz,检查前禁食12小时。分别测量门静脉主干(PV)的内径、血流速度,测量点在肠系膜上动脉左侧2 cm以内,声束与血管夹角<60°。计算血管直径(D)、时间平均流速(TAV)及血流量(Q)。血流量公式为:Q(ml/min)= $\pi \times r^2 \times 60$ 。所有计算均为仪器自动测算。

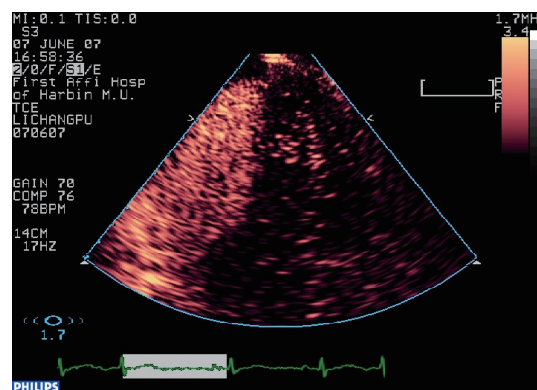


图1 右心室显影后6~7个心动周期,左心室显示1⁺光点回声,表示肺内右向左分流。

1.4 统计学处理 所有数据均使用SPSS 10.0统计学软件进行分析,均数比较使用t检验,率的比较使

用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPS组与非HPS组血气分析 HPS组pH值为(7.51 ± 0.02), 非HPS组为(7.42 ± 0.03)。血气分析显示, HPS组中PaO₂为(8.95 ± 1.58) kPa, PaCO₂为(4.62 ± 0.20) kPa; 非HPS组PaO₂为(12.48 ± 1.12) kPa, PaO₂为(4.53 ± 0.26) kPa, 两组比较差异有统计学意义($t=11.55$, $t=3.53$, P 均 <0.01)。

2.2 HPS组及非HPS组与对照组PV内径、血流速度和HIF-1 α 、MPO水平的比较 HPS组及非HPS组PV内径、血浆HIF-1 α 、MPO水平均高于对照组, 血流速度较正常对照速度减慢; HPS组与较HPS组PV内径明显增宽, 血浆HIF-1 α 、MPO水平亦明显增高, 血流速度明显减慢, P 均 <0.05 , 见表1。

2.3 HPS组及非HPS组PV、HIF-1 α 、MPO水平与肺内分流情况比较 HPS组肺内分流程度: 1⁺为12例(19.0%)、2⁺为27例(42.9%)、3⁺为24例(38.1%), 而非HPS组CEE阳性57例(31.3%), 其分流程度: 1⁺为38例(20.9%)、2⁺为13例(7.1%)、3⁺为6例(3.3%)。CEE分流程度与PV内径呈正相关。HPS组血浆HIF-1 α 、MPO水平随CEE分流升高程度而升高($P < 0.05$), 而非HPS组血浆HIF-1 α 、MPO水平与分流升高程度无关, 见表2。

3 讨论

肺脏是肝脏的“下游”器官, 肝静脉和门静脉的血流通过心脏后流入肺动脉和肺毛细血管。

CPH时血流动力学改变初期为门静脉阻力增加, 涉及的因素包括肝内血管间隙缩小、肝窦毛细血管瘤化、肝内血液分流、肝内流出道梗阻等即所谓的“后向血流”, 晚期随着门静脉血流显著增加, NO等扩血管细胞因子增加内脏血流量, 维持高动力循环形成所谓的“前向血流”^[4]。肝硬化时通过彩色多普勒判断门静脉血流动力学改变, 表现为门静脉回流受阻, 门静脉系统血流速度减慢, 门静脉内径增宽^[5]。本研究结果表明, HPS组与非HPS组比较, 门静脉宽度增宽, 且两组均高于对照组, 而HPS组血流速度则比非HPS组明显减慢。CEE为晚期肝硬化并发肺内血流异常提供了简单、敏感、无创和有效的诊断方法。本研究结果显示, 晚期肝硬化HPS组肺内分流程度1⁺为12例、2⁺为27例、3⁺为24例, 而无低氧血症的亚临床肺内分流肝硬化未并发HPS患者57例, 其分流程度1⁺为38例、2⁺为13例、3⁺为6例, 与PV内径、血浆HIF-1 α 、MPO升高程度呈正相关, 与血流速度呈负相关。提示肺内分流是PHT血流动力学的重要组成部分, HIF-1 α 、MPO升高程度可以反映肺内分流程度并可作为提示亚临床肺内分流的指标。

大鼠HPS模型证实肠源性内毒素血症(IETM)是HPS形成的基础^[6-8]。持续CPH致肠道菌群易位、肝脏对内毒素清除功能减退、门体分流等原因大量内毒素入血, 可产生IETM。内毒素的化学本质为脂多糖(lipopolysaccharides, LPS), LPS可诱导、激活体内包括肝脏Kupffer细

表 1 HPS组及非HPS组与对照组门静脉内径、血流速度和HIF-1 α 、MPO水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

	PV (cm)	血流速度 (cm/s)	HIF-1 α (ng/ml)	MPO (ng/ml)
对照组 (n = 35)	0.97 ± 0.12	18.25 ± 6.41	2.05 ± 0.66	2.18 ± 0.45
非HPS组 (n = 182)	1.32 ± 0.25	10.28 ± 3.23	2.67 ± 0.94	5.91 ± 2.12
HPS组 (n = 63)	1.61 ± 0.27	7.56 ± 2.64	5.53 ± 2.32	16.36 ± 5.74

注: P 均 <0.05

表 2 HPS组及非HPS组PV、HIF-1 α 、MPO水平与肺内分流情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

	例数		PV (cm)		HIF-1 α (ng/ml)		MPO (ng/ml)	
	HPS组	非HPS组	HPS组	非HPS组	HPS组	非HPS组	HPS组	非HPS组
CEE -	0	125		1.41 ± 0.37		2.72 ± 0.86		5.28 ± 1.75
CEE 1 ⁺	12	38	1.34 ± 0.26	1.47 ± 0.35	2.69 ± 2.43	2.43 ± 1.74	10.31 ± 1.52	5.91 ± 2.13
CEE 2 ⁺	27	13	1.42 ± 0.19	1.43 ± 0.28	4.74 ± 2.82	2.56 ± 1.21	14.62 ± 4.74	5.39 ± 1.47
CEE 3 ⁺	24	6	1.67 ± 0.08		6.36 ± 0.54		17.57 ± 1.94	

胞的单核/巨噬系统^[9]。由于肝脏解毒功能减退, 肝脏代偿性地成为清理细菌和毒素主要场所。血液单核细胞黏附、聚积于肺血管内皮, 分化成肺血管内巨噬细胞(PIM)^[10]。PIM吞噬功能增强, 以清除血液中的肠道菌群和内毒素^[11]。正常大鼠体内无PIM, 而HPS时大鼠体内诱导产生了PIM^[6]。激活的PIM吞噬功能增强, 并释放大细胞因子形成级联瀑布反应进一步激活单核-巨噬细胞系统。

MPO是由巨噬细胞分泌的含血红素辅基的一种酶, 它催化底物过氧化氢和氯离子生成次氯酸(HOCI), 参与炎症反应的氧化吸收过程^[12]。巨噬细胞通过诱导MPO基因表达增加, 激活MPO的活性。MPO还具有消耗NO而诱导血管内皮细胞功能不全的作用^[13]。炎症因子MPO升高引起的免疫损伤可能参与HPS的形成。HIF-1 α 是机体生存必需的维持氧稳态的主要调节因子^[14]。HIF-1 α 是唯一的O₂调节亚单位, 氧浓度的改变直接调控HIF-1 α 的活性。在正常情况下, HIF-1 α 通过泛素、蛋白酶体途径降解, 而在缺氧条件下降解通路被阻断, HIF-1 α 的表达增加, 以适应低氧环境^[15-17]。对哺乳动物的研究发现, 肺动脉内皮细胞5%的基因受HIF-1 α 调控^[18]。本研究结果提示HIF-1 α 和MPO可能协同参与了缺氧对门脉血流的调节。笔者推测, MPO通过“肠-肝轴(gut-liver axis)”经门静脉到达肝脏直接刺激Kupffer细胞产生细胞因子的级联释放反应, 高水平的MPO生成大量NO引起的血管扩张导致有效血容量增多, 使流入门脉血流量增多, 加重了门脉血流动力学异常^[19]。HIF-1 α 高表达加重肺动脉高压和肺内动-静脉分流, 形成低氧血症-肺动脉高压-高动力循环-低氧血症恶性循环, 进一步加速CPH的病理生理进程。

综上所述, 笔者认为MPO和HIF-1 α 作为氧化应激相关酶, 对肝硬化HPS早期诊断具有潜在价值, 作为监测指标有助于筛选和保护易感人群, 对HPS发生、发展的研究以及采取切实有效的干预措施具有一定的意义。

参考文献

- [1] Paramesh AS, Husain SZ, Shneider B, et al. Improvement of hepatopulmonary syndrome after transjugular intrahepatic

- portasystemic shunting: case report and review of literature[J]. *Pediatr Transplant*, 2003, 7: 157-162.
- [2] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 440-449.
- [3] Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri[J]. *Int J Cancer*, 2001, 92: 276-284.
- [4] 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 1525-1525.
- [5] 吴扬, 张向红, 迟宝荣, 等. 肝硬化门脉高压症早期的双功彩色多普勒研究[J]. *临床肝胆病杂志*, 1998, 14: 158-160.
- [6] Chang SW, Ohara N. Chronic biliary obstruction induces pulmonary intravascular phagocytosis and endotoxin sensitivity in rats[J]. *J Clin Invest*, 1994, 94: 2009-2019.
- [7] Bailey MT, Engler H, Sheridan JF. Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 171: 29-37.
- [8] RAriguez-Roisin R, Krowka MJ. Hepatopulmonary Syndrome -a Liver-Induced Lung Vascular Disorder[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358: 2378-2387.
- [9] Zhang HY, Han DW, Wang XG, et al. Experimental study on the role of endotoxin in the development of hepa-topulmonary syndrome[J]. *World J Gastroentero*, 2005, 11: 567-572.
- [10] Brain JD, Molina RM, DeCamp MM, et al. Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species[J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: L146-154.
- [11] 李胜亮, 陈正堂, 金敬顺. 脂多糖致肺血管内巨噬细胞形态和功能的改变[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1998, 21: 167-169.
- [12] Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, et al. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 3520-3526.
- [13] Auchere F, Capeillere-Blandin C. NADPH as a co-substrate for studies of The Chlorinating activity of myeloPeroxidase[J]. *Biochem J*, 1999, 343(pt3): 603-613.
- [14] Semenza GL. HIF-1 α , and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus[J]. *Cell*, 2001, 107: 1-3.
- [15] Ren XQ, Meng JM, Fu KD. Study on relationship between expression of p53, HIF-1 α and angiogenesis of colorectal carcinoma[J]. *Zhongguo Yixue Gongcheng*, 2004, 12: 31-35.
- [16] Semenza GL. Expression of hypoxia inducible factor-1 α mechanisms and consequences[J]. *Biochem Pharmacology*, 2000, 59: 47-53.
- [17] 宋虎平, 惠延年, 王丽丽, 等. 缺氧诱导因子-1 α 在早期糖尿病大鼠角膜上皮细胞中的表达[J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6: 352-356.
- [18] Lai YL, Law TC. Chronic hypoxia-and monocrotaline-induced elevation of hypoxia inducible factor-1 α levels and pulmonary hypertension[J]. *Journal of Bio medical Science*, 2004, 11: 315-321.
- [19] Wu Y, Burns RC, Sitzmann JV. Effects of nitric oxide and cyclooxygenase inhibition on splanchnic hemodynamics in portal hypertension[J]. *Hepatology*, 1993, 18: 1416-1421.

收稿日期: 2010-11-17