

胆汁淤积的生物标志物研究进展

蔡晓波, 王建香, 陆伦根

(上海交通大学附属第一人民医院消化科, 上海 200080)

关键词: 胆汁淤积; 生物标志物; 分子标志物

中图分类号: R575 文献标志码: A 文章编号: 1673-6087(2022)01-0011-04

DOI: 10.16138/j.1673-6087.2022.01.003

胆汁淤积概述

胆汁的主要成分为胆汁酸, 其由肝细胞合成并依次排入胆管、肠道。约 95% 的胆汁酸可在肠道被重吸收, 形成胆汁酸的肠肝循环, 维系胆汁酸的稳态^[1]。胆汁酸循环的各个环节受不同致病因素的影响, 致使流入十二指肠的胆汁减少, 从而引起胆汁淤积。胆汁淤积按发生部位可分为肝内胆汁淤积和肝外胆汁淤积。肝内胆汁淤积主要原因有药物、酒精、病毒、细菌和自身免疫等, 而肝外胆汁淤积多由于肝门部或肝外胆管良恶性狭窄、结石等原因引起的梗阻所致。除外原发疾病引起的相关临床症状, 肝脏胆汁淤积本身可引起相关症状及继发性改变。胆汁淤积相关的临床表现主要有黄疸、皮肤瘙痒、疲劳、脂肪泻、黄色瘤和肝性骨营养不良等^[2]。

生物标志物简介

生物标志物是指可标志系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生改变的生化学指标, 是生物过程客观、可量化的特征, 代表从患者外部观察到的医疗状况的客观指示, 在临床医学领域的识别和应用中具有巨大的影响力, 是生物医学研究和临床实践中不可缺的一部分。一个最佳的生物标志物需对生物和病理过程有高度的敏感性和特异性, 这意味着生物标志物和临床终点间需有明确的关系。此外, 用于临床评估和分析的生物标志物应是低成本和非侵入性的。理想的生物标志物还应具有对临床结果、疾病进展和病情预后的预测能力^[3]。

胆汁淤积生物标志物

一、传统血清学标志物

1. 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP): ALP 是一组磷酸单酯酶, 在体外 pH 为 10 时具有最高的磷酸酯水解活性。血清 ALP 活性是胆汁淤积的传统间接指标, ALP 主要有肝脏、骨骼、肠道 3 个来源^[4]。ALP 表达于肝细胞血窦侧和毛细胆管侧及胆管细胞微绒毛上, 随胆汁排入胆道系统。当胆汁排泄不畅, 毛细胆管内压增高, 可诱发 ALP 产生增多; 加之胆汁酸凭借表面活性作用将其从脂质膜上溶析下来, 使血清 ALP 进一步增高^[5]。肝内胆汁淤积和肝外胆汁淤积的升高程度没有明显区别。ALP 的半衰期为 7 d, 这导致其在胆管梗阻解除后可能继续升高一段时间。ALP 还可存在于骨、胎盘、肾、脾、脑、心脏、肺、白细胞和肠道中, 也可以在某些恶性肿瘤中被合成。类风湿性关节炎、胰岛素依赖型糖尿病、多发性硬化症、骨软化症和妊娠可能会出现较长时间的 ALP 升高。此外, 吸烟和锻炼也可能导致 ALP 轻微升高。而缺锌、肝豆状核变性、心脏手术、甲状腺功能减退和妊娠可能会降低 ALP 水平。因此, ALP 本身并不被认为是胆汁淤积的特异性生物标志物。

2. γ 谷氨酰转移酶 (gamma glutamyl transferase, GGT): GGT 是催化氨基酸从一种肽转移到另一种多肽或氨基酸的一类酶, 对于氨基酸和蛋白质的吸收、分泌和合成都是必需的。与 ALP 一样, GGT 广泛分布在肾、肝、胰腺和肠道等组织中。尽管 GGT 对胆汁淤积极为敏感, 任何原因导致的肝内外梗阻时, 均可明显增加, 并与疾病的严重程度和病情经过呈一定的平行关系。然而, 其同样特异性欠佳。血清 GGT 水平在胃肠道疾病、胰腺炎、心肌梗死、糖尿病、肥胖症、甲状腺功能亢进等其他疾病情况下也可升高。此外, 抗惊厥药物和口服避孕药也可能导致血清 GGT 水平显著升高。

ALP 和 GGT 均表达于肝细胞膜和毛细胆管绒毛上, ALP 主要分布于毛细胆管, 而 GGT 分布于整

个胆管系统。胆汁淤积早期可表现为 ALP 和 GGT 升高,治疗后 ALP 的下降与疾病的临床结局相关^[6]。目前,国内外指南均仅纳入 ALP 和 GGT 作为诊断胆汁淤积的标准,对于早期无症状的胆汁淤积患者,GGT 大于参考范围上限 3 倍且 ALP 大于参考范围上限 1.5 倍时,可考虑诊断胆汁淤积,但此临界值仍存在一定的争议^[6-7]。ALP 或 GGT 单独升高并不等同于胆汁淤积。

3. 胆汁酸:胆汁酸是一类含有亲水(羟基和羧基)和疏水(烷基)基团的两性分子,具有表面活性功能,在十二指肠内乳化脂肪,促进脂质和脂溶性维生素的消化吸收,还可通过激活特异性受体和信号通路调节胆固醇、三酰甘油和葡萄糖等的代谢平衡^[2]。胆汁酸在肝脏中合成,是胆汁中的主要成分^[8]。某些胆汁酸在高浓度时具有细胞毒性,损伤肝细胞和胆管细胞。胆汁淤积性肝病与胆汁流动障碍或胆汁产生缺陷导致的胆汁减少有关。临床研究表明,在各种肝病期间,血液和尿液中的胆汁酸浓度增加可达 100 倍。在胆汁淤积症大鼠、兔和人类中,胆汁酸浓度的升高被证明与肝脏和胆管损伤的进展相关。但胆汁酸如何引发肝损伤的分子机制目前尚不清楚^[8]。正常胆汁酸在空腹时为 1.0~6.0 $\mu\text{mol/L}$,餐后 2 h 为 6.0~9.0 $\mu\text{mol/L}$,胆汁淤积时超过 10 $\mu\text{mol/L}$ 。胆汁酸 10~20 $\mu\text{mol/L}$ 为轻度升高,20~40 $\mu\text{mol/L}$ 为中度升高,40 $\mu\text{mol/L}$ 以上为重度升高^[2,9]。发生胆汁淤积时,胆汁分泌减少,并迅速改变胆汁酸贮存量的分布,使得血清和尿液中的胆汁酸浓度显著升高。血清胆汁酸对于诊断胆汁分泌受损较血清胆红素敏感,但是对于大多数胆汁淤积不如 ALP 敏感^[2]。

4. 胆红素:正常人生成胆红素 250~350 mg/d,其中 80%以上来自循环中衰老红细胞。胆红素大部分以胆红素-白蛋白复合物形式在血中运行,此种胆红素尚未与肝细胞中的葡萄糖醛酸结合,故称非结合胆红素。非结合胆红素在肝血窦与白蛋白分离,经葡萄糖醛酸酶催化与葡萄糖醛酸作用形成结合胆红素,结合胆红素随胆汁排到肠道,经肠内细菌作用成为尿胆原,大部分随粪便排出^[10]。胆汁淤积和肝细胞病变可引起血清胆红素升高,伴随着相关酶水平升高。胆汁淤积引起的黄疸以直接胆红素升高为主,肝细胞损害引起的黄疸因为同时有胆红素摄取、结合、排泄的障碍,因此直接和间接胆红素均可升高,但一般直接胆红素升高比间接胆红素升高的幅度大^[2]。在临床环境中,总胆红素浓度和结合、非结合胆红素浓度均可测得,从而可以区分高胆红

素血症的肝外原因。

二、其他血清学标志物

1. 天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT):AST 和 ALT 都被称为转氨酶,是肝细胞损伤的标志。AST 催化 L-天冬氨酸与 α 酮戊二酸间的氨基转移反应,存在于肝脏和其他器官中,包括心肌、骨骼肌、肾脏和大脑。ALT 是催化丙氨酸与 α 酮戊二酸间氨基转移反应的酶,是重要的氨基转移酶之一,主要存在于肝脏,因此 ALT 是肝细胞损伤更特异的标志物。与 ALP 和 GGT 相比,AST 和 ALT 更能提示肝细胞损伤,而提示胆汁淤积的特异性较低。

2. 5'-核糖核苷酸磷酸水解酶(5'-nucleotidase, 5'-NT):5'-NT 广泛存在于人体组织中,如肝、胆、肠、脑、心脏、胰腺等,但主要来源于肝脏。5'-NT 在肝内主要分布在毛细胆管和肝窦细胞膜,各种肝胆疾病时血清 5'-NT 均可升高,其中以肝内外胆汁淤积时升高最为明显。其在骨病和妊娠时酶活力无明显改变,因此灵敏度和特异度高于 ALP。血清 5'-NT 活力大于参考范围 2~3 倍以上,对于鉴别肝细胞性黄疸或胆汁淤积性黄疸(肝内或肝外性)有一定参考价值。然而,目前临床中应用较少。

3. 石胆酸(lithocholic acid, LCA)和溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidyl choline, LPC):LCA 是一种内源性化合物,与胆汁淤积时的肝脏毒性有关,在肝病患者中增加^[11]。LPC 是磷脂的一种,具有多种生理功能,与糖尿病、动脉粥样硬化、血脂异常等代谢性疾病和心血管疾病密切相关。LPC 主要在肝脏代谢,在肝脏疾病和肝毒性中可发生明显变化^[12]。LCA 引起磷脂/鞘磷脂稳态的改变,提示血清 LPC 作为胆汁淤积生物标志物的可能性。胆汁淤积的动物模型显示多个 LPC 的稳态被打乱,但在不同的模型中,其变化趋势不完全相同。因此临床实践中无论 LPC 升高还是降低,都应当警惕胆汁淤积的发生。LCA 和 LPC 作为胆汁淤积的生物标志物尚需进一步研究。

三、分子生物标志物

1. 基因标志物:随着基因测序技术在临床上的应用,遗传相关的胆汁淤积性肝病如进行性家族性肝内胆汁淤积(progressive familial intrahepatic cholestasis, PFIC)和良性复发性肝内胆汁淤积(benign recurrent intrahepatic cholestasis, BRIC)更容易诊断。然而,单基因肝病仅占肝脏疾病的一小部分,由于肝脏具有多方面功能,绝大多数胆汁淤积性疾

病包含多个受影响的基因^[13],更多的胆汁淤积性肝病可能是多基因疾病或基因和环境因素共同作用导致,如人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)多态性可能与原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)有关,但与其他免疫性疾病也同样相关。只有 10% 的 PBC、PSC 患者携带易感基因,说明环境因素或者其他未知的基因变异与其发病有关。在单基因疾病中,变异的基因可以作为有价值的生物标志物,而在多基因复杂疾病中,仅基于基因生物标志物的诊断较困难^[14]。即便如此,在探索胆汁淤积性疾病发生的原因和途径方面,使用特定改变的基因作为遗传学生物标志物仍然非常有意义。

2. 表观遗传标志物:表观遗传学是指研究基因组中不改变原始 DNA 序列的可遗传改变,表观遗传对细胞的最终表型贡献很大。在胆汁淤积性疾病中,以表观遗传模式及其改变作为疾病生物标志物的研究受到越来越多的关注^[15]。如组蛋白 H3 第 4 赖氨酸三甲基化(H3K4)与胆汁酸转运子基因活化相关,并在胆汁淤积时减少,因此被研究用于胆汁淤积的标志物。微 RNA(microRNA, miR)是一种由 19~24 个核苷酸组成的单链非编码 RNA,可以与靶 mRNA 结合,在生长、增殖、细胞信号转导以及细胞凋亡过程中发挥关键的基因表达调控作用。miR 性质稳定,易提取、纯化并可进行定量测定,对胆汁淤积性疾病的诊断和监测具有重要的临床意义^[16]。在胆汁淤积症小鼠中,miR-210 水平升高,并与其靶目标结合,导致胆盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)水平降低,从而导致胆汁酸代谢紊乱^[17]。在 PBC 患者中也发现肝脏 miR-210 水平升高,这为小的非编码 RNA 作为胆汁淤积性疾病的生物标志物和潜在的治疗靶点提供了可能性^[17]。

3. 蛋白标志物:蛋白质组学分析的是细胞或组织的所有翻译蛋白质,克服了在 mRNA 水平检测不到的生物过程影响,如乙酰化、糖基化和磷酸化,以及由于蛋白质多态性或选择性剪接造成的误差。虽然蛋白质组学前景良好,但目前以其作为生物标志物来评估肝病的研究还很少。由于胆汁在胆汁淤积中的重要作用,少数利用蛋白质组学技术探索胆汁淤积相关疾病的研究主要集中在胆汁蛋白质组学。使用胆汁蛋白的好处在于,病变周围病理相关蛋白质浓度高于血浆或血清中的浓度,在血浆或血清中,胆汁被高度稀释,甚至可能无法检测到。然而

收集胆汁样本是一侵入性过程,样本中存在的胆汁蛋白可能会在分析的过程中受胆汁酸或其他物质干扰。尽管如此,基于人体胆汁样本的蛋白质组学研究仍有应用前景。如胆管癌可以根据胆汁蛋白模式与 PSC 区分,与 PSC 患者相比,胆管癌患者中的胆汁蛋白显著升高^[18]。

总结及展望

传统生物标志物 ALP、GGT、胆汁酸、胆红素在胆汁淤积性肝病的诊断中具有重要作用,虽然这些指标在评估是否存在胆汁淤积时被作为推荐指标,但是敏感性和组织特异性均存在一定的不足。其他血清学生物标志物如 LCA 和 LPC 的组织特异度、敏感度可能更高,更能特异地反映胆汁淤积,可能发展为胆汁淤积生物标志物,用于早期评价。随着高通量基因测序技术的发展及对代谢组学的研究深入,分子生物标志物在胆汁淤积中的诊断及研究价值日趋重要。在胆汁淤积的监测中,应联合检测多种相关生物标志物,综合判断及预测肝损伤及胆汁淤积的发生、发展,以期在胆汁淤积的早期阶段进行诊治,改善该类疾病的预后。

[参考文献]

- [1] Trauner M, Fuchs CD. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease[J]. Gut, 2022, 71(1): 194-209.
- [2] 中华医学会肝病学分会,中华医学会消化病学分会,中华医学会感染病学分会. 胆汁淤积性肝病诊断和治疗共识(2015)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1989-1999.
- [3] Hardy T, Mann DA. Epigenetics in liver disease: from biology to therapeutics[J]. Gut, 2016, 65(11): 1895-1905.
- [4] Kalas MA, Chavez L, Leon M, et al. Abnormal liver enzymes: a review for clinicians[J]. World J Hepatol, 2021, 13(11): 1688-1698.
- [5] 曹甸甸,高月求,张文宏,等. 基于上海市住院慢性肝病患者胆汁淤积患病率的调查研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(8): 569-573.
- [6] Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, et al. Primary sclerosing cholangitis-a comprehensive review[J]. J Hepatol, 2017, 67(6): 1298-1323.
- [7] Appanna G, Kallis Y. An update on the management of cholestatic liver diseases[J]. Clin Med (Lond), 2020, 20(5): 513-516.

- [8] Li M, Cai SY, Boyer JL. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver[J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 56: 45-53.
- [9] Wu H, Chen C, Ziani S, et al. Fibrotic events in the progression of cholestatic liver disease[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1107.
- [10] 李飞, 陆伦根. 胆汁淤积和黄疸的诊断与鉴别诊断[J]. *内科理论与实践*, 2018, 13(6): 385-387.
- [11] Šarenac TM, Mikov M. Bile acid synthesis: from nature to the chemical modification and synthesis and their applications as drugs and nutrients[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 939.
- [12] 宋丹军, 潘家琪, 李鹏旭, 等. 溶血磷脂酰胆碱在肝脏疾病中的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2014, 12: 1642-1646.
- [13] Reichert MC, Hall RA, Krawczyk M, et al. Genetic determinants of cholangiopathies: molecular and systems genetics[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(4): 1484-1490.
- [14] Karlsen TH, Lammert F, Thompson RJ. Genetics of liver disease: from pathophysiology to clinical practice[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S6-S14.
- [15] García-Giménez JL, Seco-Cervera M, Tollefsbol TO, et al. Epigenetic biomarkers: current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2017, 54(7-8): 529-550.
- [16] van der Kolk JH, Pacholewska A, Gerber V. The role of microRNAs in equine medicine: a review[J]. *Vet Q*, 2015, 35(2): 88-96.
- [17] Kim YC, Jung H, Seok S, et al. MicroRNA-210 promotes bile acid-induced cholestatic liver injury by targeting mixed-lineage leukemia-4 methyltransferase in mice [J]. *Hepatology*, 2020, 71(6): 2118-2134.
- [18] Navaneethan U, Lourdasamy V, Gk Venkatesh P, et al. Bile proteomics for differentiation of malignant from benign biliary strictures[J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2015, 3(2): 136-143.

(收稿日期:2021-11-25)

(本文编辑:王朝晖)