

胆道闭锁早期诊断方法的研究进展

刘洪江 张明满

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是一种以肝外胆管炎症及肝纤维化导致胆汁淤积,进行性胆汁性肝硬化为特征的疾病,约 50% 的患儿需行肝移植手术。本病的发病率在台湾地区和日本约为 1:5 000~10 000^[1],在欧美地区发病率约为 1:15 000~20 000^[2]。如不能及时进行有效的治疗,胆道闭锁患儿将最终死于肝硬化和肝衰竭,其病程约 2 年^[3]。Chardot C 等研究表明,在患儿生后 1 个月、2 个月、3 个月及以后行 Kasai 手术,术后 20 年自体肝存活率分别为 39%、32%、28% 和 19%,而分别在 60 日龄前后行 Kasai 手术,术后须行肝移植的比例分别为 25.6% 和 32.3%^[2]。说明无论患儿行 Kasai 手术后自肝生存或接受肝移植,确诊 BA 的年龄及行 Kasai 手术的时机都是预后重要的因素,早期诊断,早期手术能提高患儿自肝生存率,降低死亡率^[4]。目前该疾病的病因及发病机制仍不明确,术中胆道造影及肝组织病理活检被认为是诊断 BA 的金标准,但创伤较大。因此,一种灵敏度高,特异性好,无创,可定量的早期诊断方法十分重要。近年来 microRNA 等生物标记物被用于胆道闭锁的病因和发病机制研究,而分子诊断也为该疾病的早期筛查和诊断提供了新的方向。

一、产前诊断

产前筛查是发现先天性胆道闭锁的重要手段,超声检查为产前最常用方法,四维超声检查可以发现发育不良的胆囊和胆道扩张症。当在孕中期未检测到胆囊结构时,须怀疑胆道闭锁。Hinds R 等^[5]回顾性研究发现约 4.6% BA 患儿产前常规检查曾诊断为胆道囊性畸形,该囊肿后期还可能消失,当发现患儿存在不规则的囊肿与肝外胆道相通时应注意

与胆总管囊肿相鉴别;当胆管囊肿畸形的新生儿出现黄疸时,应当及早排除 BA 诊断^[6,7]。产前诊断可以早期诊断典型的胆道闭锁,让患儿得到早期治疗,但囊肿型胆道闭锁易与胆总管囊肿混淆,临床上需注意鉴别。

二、早期筛查

(一) 大便比色卡筛查

大便颜色变浅,白陶土样大便是 BA 患儿的典型临床症状,大便比色卡(stool color card, SCC)能简便有效的针对这一症状进行筛查,可早期发现黄疸不明显的患儿,同时还可筛查出其他引起胆汁淤积症的疾病。日本是最早开始此筛查项目的国家,目前其使用的 SCC 已更新至第 3 版,他们将此卡片复印在儿童保健手册中,要求父母当婴儿在 1 月龄左右回访时,到指定的保健所填写该卡片,并由指定机构统一回收,进一步筛查及随访。据统计 SCC 筛查的灵敏度为 76.5%,特异度可达 99.9%^[8]。在智能手机普及的今天,设计特异的 App 自动分析婴儿的大便颜色可以弥补 SCC 筛查主观判断差异性较大的缺点^[9]。

SCC 筛查在日本、美国、加拿大、台湾等国家及地区都取得了良好的效果,改善了 BA 患儿预后,台湾自 2004 年实施该计划以来,该病的死亡率由 26.2% 降到了 15.9%。从经济学角度来讲,与不进行筛查相比,SCC 筛查能节约社会医疗资源,是一项重要且经济实惠的可行方案^[10-13]。我国目前 SCC 筛查仍未得到规范实施,需继续推广。

(二) 胆红素检测

胆红素因其检测方便快捷、价廉,是目前用于筛查 BA 最广泛的血液生化学指标。早在 1999 年, Mushtaq I 等^[14]研究发现,胆道梗阻患儿生后 7~10 d 血液中胆汁酸浓度会增高,而胆道闭锁患儿增高更为明显。美国儿科学会建议:如果新生儿黄疸持续 3 周及以上,应持续监测患儿胆红素变化,评估病因,及早排除 BA 诊断^[15]。Zhou K 等^[16]发现胆道闭锁患儿血清中初级结合胆汁酸增高明显,并且牛磺胆酸浓度及总胆红素浓度较正常对照组患儿明显

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2017.02.003

基金项目:重庆市卫生局资助项目(2012-2-104);国家临床重点专科建设项目(国卫办医函[2013]544);重庆市科技计划项目(cstc2014yykfA110014)

作者单位:重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿童发育大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室(重庆 400014)

通信作者:张明满, E-mail: zhangmingman-a@163.com

偏高,提出患儿生后牛磺胆酸增高需排除胆道闭锁。当血液中胆汁酸成分发生变化,如牛磺胆酸或牛磺鹅去氧胆酸/鹅去氧胆酸比值显著增高时,也提示有胆道闭锁可能^[17]。在发生肝硬化的患儿血清中初级胆汁酸比例显著增高,血液及尿液中的胆汁酸谱均会显著改变^[18]。测定血清各种胆汁酸浓度能更好早期筛查 BA,并可监测 BA 的进展及预后。

胆汁酸代谢中磺酸化反应使胆汁酸的溶解度增高,减轻毒性,减少其在肠道的吸收,增加排泄。当胆汁淤塞相关疾病发生时胆汁酸磺酸化反应会相应增加。正常情况下尿液中约 70% 的胆汁酸是被磺酸化的,肝胆疾病发生时尿中磺酸化胆汁酸(urinary sulfated bile acid, USBA)的含量会明显改变,USBA 具有受饮食影响小及检测成本低等特点,且灵敏度高。Suzuki M 等^[19] 对大样本尿液标本通过酶学分析法进行测定,发现当 USBA 检测结果高于 55.0 $\mu\text{mol/g}$ 时,需进一步检查排除 BA。同时,研究还发现 USBA 检测对于肝病导致的胆汁淤积诊断敏感性、特异性、阴性预测值分别达 100%、96%、100%,但阳性预测值只有 4%。USBA 用于胆道闭锁的敏感度高,但阳性预测值太低,用于 BA 的排除诊断作用较大。

张金山^[20] 发现 BA 患儿胆汁流量及胆汁酸含量明显低于胆总管囊肿患儿,并认为这可能是 BA 患儿肝功能差所致。因此,检测胆汁流量及胆汁酸含量也可用于两种疾病的鉴别诊断。Shneider BL 等^[21] 报道当婴儿行 Kasai 术后 3 个月内总胆红素水平没有下降到 2.0 mg/dL ,提示短期预后不好,需考虑及时行肝移植。而 Chusilp S 等^[22] 报道 Kasai 术后 7 d 内总胆红素降低 20% 是患儿预后好的重要指标,5 年生存率明显高于对照组。总之,目前胆红素用于胆道闭锁的早期筛查具有较大优势,可用于该疾病治疗的疗效及预后判断,还可作为门诊随访指标,但其对 BA 的诊断特异性较差,需注意与其他引起胆汁淤积性黄疸的疾病相鉴别。

(三) 血清学标志物

近年来,不断有新的检测技术发现与胆道闭锁发病相关的基因、RNA、蛋白质等生物标记物。大样本的基因筛查提示 ADD3 基因在 BA 患儿中较正常对照组表达异常^[23]。李金朋等发现 PDCD5 基因可能参与胆道闭锁胆管上皮细胞凋亡,从而参与胆道闭锁炎症反应,在胆道闭锁的发病机制中发挥重要作用^[24]。胆道闭锁患儿与母亲的混合淋巴细胞即母系微嵌合体作用可能为胆道闭锁的发病机理之

一,也为该病的早期筛查指明新方向^[25]。部分 BA 患儿血清中有抗 α -enolase 的 IgG 或 IgM 抗体出现,针对 α -enolase 的体液免疫反应可能参与了胆道闭锁的发生过程,而抗体水平的升高有利于短期预后的恢复^[26]。串联质谱检测血中氨基酸和肉碱等可以鉴别 Citrine 蛋白缺乏等导致的肝内胆汁淤积症。近年来有学者对 BA 相关发病机制、早期筛查的研究众多,至今仍未发现能在临床实践中可广泛用于 BA 早期筛查的生物标志物,但可为临床决策提供参考。

在所有生物标志物中 microRNA 因其具有在组织、疾病中的特异性及在血液循环中的稳定性,可以很好用于早期筛查胆道闭锁。Zahm AM 等研究发现 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 在 BA 中较其他胆汁淤积患儿高表达,诊断准确率可达 85%^[27]。Dong R 等发现在 BA 患儿中 miR-4429 较其他类型胆汁淤积症表达下调,miR-92a-3p、miR-4689 和 miR-150-3p 则高表达^[28]。Peng X 等发现 BA 患儿较正常对照组患儿 miR-194-5p、miR-432-5p、miR-12 等高表达,miR-10b-5p、miR-140-3p、miR-26a-5p 等表达下调,并发现 miR-140-3p 诊断 BA 的灵敏度和特异度分别为 66.7% 和 79.1%,因此认为其可以作为诊断 BA 患儿的生物标志物,但缺乏临床验证^[29]。因为 miR-122 是反应肝细胞损伤的标志物,在 BA 患儿,肝外胆道闭锁导致胆汁淤积,肝细胞和胆管细胞均被严重损伤,因此血清中的 miR-122 应该增加,但目前尚没有学者进行研究^[30]。miR-200a 来自正常肝细胞及胆管细胞,当这些细胞被破坏时 miR-200a 会减少,并在动物实验得到了证实。microRNA 为近年来研究的热点,但其能否用于 BA 的早期筛查还有待临床大样本研究的验证。

三、早期诊断

在我国当患儿因黄疸待查收收治入院时,患儿年龄多已较大,这就要求我们尽早排除胆道闭锁,而最常用的辅助检查就是超声检查,肝门三角形条索征(Triangular Cord Sign, TCS)及胆囊畸形是超声诊断 BA 最重要的两个征象^[31]。其中胆囊畸形包括胆囊缺如,体积小,形态不规则,胆囊壁异常,胆囊空虚等。Takamizawa S^[32] 等报道结合肝门三角形条索征,胆囊长径,胆囊收缩率三者综合分析可以较准确诊断胆道闭锁,当 TCS ≥ 3 mm,胆囊长径 < 15 mm,胆囊收缩率 $< 68\%$ (< 12 周) 或 $< 25\%$ (≥ 12 周) 为阳性。当 TCS 及胆囊长径结果均为阳性时诊断 BA 的阳性预测值为 98%,当三者均为阴性时可以

完全排除 BA。而肝包膜下血流(hepatic subcapsular flow, HSF)、肝动脉、门静脉内径及胆管缺如等对胆道闭锁的诊断也有价值^[33,34]。超声弹性成像(fibroscan)技术可用于评估胆道闭锁肝纤维化程度,决定治疗方案及评价手术效果,评估判断胆道闭锁预后等^[35]。超声检查诊断 BA 的敏感度及特异度都可达 90% 以上,但准确认识这些征象对诊断医生要求非常高^[36]。故超声检查对 BA 的早期诊断有重要意义,但超声结果因操作医师不同而诊断准确率差异较大。

其他影像学检查方法如肝胆闪烁扫描法检测,如苯巴比妥钠联合 ⁹⁹Tc-EHIDA 肝胆显像及 MRI 等相关影像学检查也是常用的无创、安全、诊断效能高的检查方法,有助于预测治疗效果,对于 BA 的诊断有较高的临床价值。有文献对这几种常见检查的准确性进行了相关评价,肝胆闪烁扫描法、超声分析、肝组织病理活检诊断 BA 的灵敏度、特异度分别为 90% 和 80%, 42.7% 和 80.9%, 92.5% 和 88.9%^[37]。这说明超声检查对检查者要求较高,易漏诊,而肝胆闪烁扫描法和肝组织病理活检对 BA 的诊断较准确。磁共振检查特别是 MRCP 对 BA 的诊断也有较大帮助。临床较常用的其他检查方法有 ERCP(内镜逆行胰胆管造影)和十二指肠引流液检查总胆红素有助于患儿黄疸病因的鉴别诊断,术中胆道造影及肝组织病理活检是目前诊断 BA 的金标准。

综上所述,胆道闭锁的早期诊断,早期手术对该病预后至关重要。目前我国缺乏对该疾病规范、系统的早期筛查项目。大便比色卡筛查应加大推广力度,建立规范的筛查体系。结合我国国情,增强孕妇对胆道闭锁的认识,广泛宣传,提高基层医生对该病的警惕性,树立起黄疸患儿须及早排除胆道闭锁的理念,均有利于该病的早期诊断。近年来胆道闭锁的研究众多,不断有新的检测技术发现与胆道闭锁发病相关的蛋白质、RNA、基因等生物标记物。这些研究部分阐明了该病的发病机制,同时为临床准确、敏感、无创地早期诊断胆道闭锁提供了可能。

参考文献

- 1 Chiu CY, Chen PH, Chan CF, et al. Biliary atresia in pre-term infants in Taiwan: a nationwide survey[J]. J Pediatr, 2013, 163(1):100-103. DOI: 10.1016/j.jpeds.2012.12.085.
- 2 Chardot C, Buet C, Serinet MO, et al. Improving outcomes of biliary atresia: French national series 1986-2009[J]. J

- Hepatol, 2013, 58(6):1209-1217. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.01.040.
- 3 Lakshminarayanan B, Davenport M. Biliary atresia: a comprehensive review[J]. J Autoimmun. 2016,73:1-9. DOI: 10.1016/j.jaut.2016.06.005.
- 4 Lin JS, Chen SC, Lu CL, et al. Reduction of the ages at diagnosis and operation of biliary atresia in Taiwan: a 15-year population-based cohort study[J]. World J Gastroenterol. 2015, 21(46):13080-13086. DOI: 10.3748/wjg.v21.i46.13080.
- 5 Hinds R, Davenport M, Mieli-Vergani G, et al. Antenatal presentation of biliary atresia [J]. J Pediatr, 2004, 144(1):123-125. DOI:10.1016/j.jpeds.2003.09.027.
- 6 Mashima M, Tanaka H, Numoto A, et al. Antenatal three-dimensional sonographic features of fetal biliary atresia [J]. J Med Ultrason, 2013, 40(3):279-281. DOI: 10.1007/s10396-012-0425-0.
- 7 龚振华. 日本第 40 届胆道闭锁研究会纪要[R]. 临床小儿外科杂志, 2015, 14(2):158-160. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.02.025.
- Gong ZH. The 40th Japanese seminar of biliary atresia[J]. J Clin Ped Sur, 2015, 14(2):158-160. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.02.025.
- 8 Gu YH, Yokoyama K, Mizuta K, et al. Stool color card screening for early detection of biliary atresia and long-term native liver survival: a 19-year cohort study in Japan[J]. J Pediatr, 2015, 166(4):897-902. DOI: 10.1016/j.jpeds.2014.12.063.
- 9 Franciscovich A, Vaidya D, Doyle J, et al. PoopMD, a mobile health application, accurately identifies infant acholic stools[J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0132270. DOI: 10.1371/journal.pone.0132270.
- 10 Lien TH, Chang MH, Wu JF, et al. Effects of the infant stool color card screening program on 5-year outcome of biliary atresia in Taiwan [J]. Hepatology, 2011, 53(1):202-208. DOI: 10.1002/hep.24023.
- 11 Mogul D, Zhou M, Intihar P, et al. Cost-effective analysis of screening for biliary atresia with the stool color card[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2015, 60(1):91-98. DOI: 10.1097/MPG.0000000000000569.
- 12 Schreiber RA, Masucci L, Kaczorowski J, et al. Home-based screening for biliary atresia using infant stool colour cards: a large-scale prospective cohort study and cost effectiveness analysis[J]. J Med Screen, 2014, 21(3):126-32. DOI: 10.1177/0969141314542115.
- 13 Min Lee, Solomon Chih-Cheng Chen, Hsin-Yi Yang, et al. Infant stool color card screening helps reduce the hospitalization rate and mortality of biliary atresia[J]. Medicine Volume, 2016, 95(12):e3166. DOI: 10.1097/MD.

- 0000000000003166.
- 14 Mushtaq I, Logan S, Morris M, et al. Screening of newborn infants for cholestatic hepatobiliary disense with tandem mass spectrometry[J]. *BMJ*, 1999, 319(7208) :471-477.
 - 15 American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia; Management of hyperhilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation[J]. *J Pediatrics*, 2004, 114(1) :297-316.
 - 16 Zhou K, Lin N, Xiao Y, et al. Elevated bile acids in newborns with biliary atresia[J]. *PLOS One*, 2012, 7(11) : e49270. DOI:10.1371/journal.pone.0049270.
 - 17 Zhou K, Wang J, Xie G, et al. Distinct plasma bile acid profiles of biliary atresia and neonatal hepatitis syndrome [J]. *Proteome Res*, 2015, 14(11) :4844-4850. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00676.
 - 18 Kakiyama G, Pandak WM, Gillevet PM, et al. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(5) :944-955. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00676.
 - 19 Suzuki M, Muraji T, Obatake M, et al. Urinary sulfated bile acid analysis for the early detection of biliary atresia in infants[J]. *Pediatrics International*, 2011, 53(4) :497-500. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.01.003.
 - 20 张金山,王文晓,李龙,等.胆道闭锁术中胆汁流量及胆汁成分的观察分析[J]. *中华小儿外科杂志*, 2010, 31(6) :421-425. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2010.06.005.
 - Zhang JS, Wang WX, Li L, et al. Analysis of bile flow in biliary atresia[J]. *Chin J Pediatr Surg*. 2010,31(6) :421-425. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2010.06.005.
 - 21 Shneider BL, Magee JC, Karpen SJ, et al. Total serum bilirubin within 3 months of hepatopuertoenterostomy predicts short-term outcomes in biliary atresia[J]. *J Pediatr*, 2016, 170:211-217. DOI: 10.1016/j.jpeds.2015.11.058.
 - 22 Chusilp S, Sookpotarom P, Tepmalai K, et al. Prognostic values of serum bilirubin at 7th day post-Kasai for survival with native livers in patients with biliary atresia[J]. *Pediatr Surg Int*, 2016, 1032(10) :927-931. DOI: 10.1007/s00383-016-3951-9.
 - 23 Zeng, P Sun, Z Chen, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the ADD3 gene and susceptibility to biliary atresia[J]. *PLOS One*, 2014, 9(10) : e107977. DOI: 10.1371/journal.pone.0107977.
 - 24 李金朋,王勇,汤绍涛. PDCD5 在胆道闭锁患儿胆管组织中的表达及意义[J]. *临床小儿外科杂志*, 2014, 13(5) :408-411. doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2014.05.012.
 - Li JP, Wang Y, Tang ST, et al. Expression and significance of PDCD5 gene in bile duct tissues of biliary atresia [J]. *J Clin Ped Sur*, 2014, 13(5) :408-411. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2014.05.012.
 - 25 Muraji T. Maternal microchimerism in biliary atresia: are maternal cells effector cells, targets, or just bystanders? [J]. *Chimerism*, 2014, 5(1) :1-5. DOI: 10.4161/chim.28576.
 - 26 明安晓,王海斌,林海伟,等.胆道闭锁血清抗 α -enolase 自身抗体检测及临床意义[J]. *中华小儿外科杂志*, 2012, 33(4) :263-267. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2012.04.006.
 - Ming AZ, Wang HB, Ling HW, et al. Examination of α -enolase autoantibodies in patients with biliary atresia[J]. *Chin J Pediatr Surg*, 2012, 33(4) :263-267. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2012.04.006.
 - 27 Zahm AM, Hand NJ, Boateng LA, et al. Circulating microRNA is a biomarker of biliary atresia[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012, 55(4) :366-369. DOI:10.1097/MPG.0b013e318264e648.
 - 28 Dong R, Shen Z, Zheng C, et al. Serum microRNA microarray analysis identifies miR-4429 and miR-4689 are potential diagnostic biomarkers for biliary atresia[J]. *Sci Rep*, 2016, 16(6) :21084. DOI: 10.1038/srep21084.
 - 29 Peng X, Yang L, Liu H, et al. Identification of circulating microRNAs in biliary atresia by next-generation sequencing [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016, 63(5) :518-523. DOI:10.1097/MPG.0000000000001194.
 - 30 Bihrer V, Friedrich-Rust M, Kronenberger, et al. Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(9) :1663-1669. DOI: 10.1038/ajg.2011.161.
 - 31 Zhou L, Shan Q, Tian W, et al. Ultrasound for the diagnosis of biliary atresia: A Meta analysis[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2016, 206(5) :W73-82. DOI: 10.2214/AJR.15.15336.
 - 32 Takamizawa S, Zaima A, Muraji T, et al. Can biliary atresia be diagnosed by ultrasonography alone? [J]. *J Pediatr Surg*, 2007, 42(12) :2093-2096. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2007.08.032.
 - 33 Lee MS, Kim MJ, Lee MJ, et al. Biliary atresia: color Doppler US findings in neonates and infants[J]. *Radiology* 2009, 252(1) :282-289. DOI: 10.1148/radiol.2522080923.
 - 34 Kim WS, Cheon JE, Youn BJ, et al. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia [J]. *Radiology*, 2007, 245(2) :549-555. DOI: 10.1148/radiol.2522080923. (下转第 158 页)