

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.10.013

胆囊结石患者血清胆汁酸谱的检测与分析*

金素丽¹,秘玉静¹,赵 帅¹,马利锋²,沈 莉¹,闫国超¹,武 艳^{1△}

1. 河北医科大学第一医院检验中心,河北石家庄 050030;2. 河北医科大学第二医院
普外八科,河北石家庄 050004

摘 要:目的 探讨血清胆汁酸谱的测定在胆囊结石临床诊断及早期预防中的应用价值。方法 选取 2019 年 9 月至 2020 年 6 月在河北医科大学第一医院住院的 48 例胆囊结石患者作为胆囊结石组,将其中 32 例总胆汁酸正常者作为总胆汁酸正常组,另选取 26 例体检健康者作为对照组。采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测各组胆汁酸谱,并比较各组血清 15 种胆汁酸亚组分水平。结果 15 种胆汁酸亚组分中,胆囊结石组 6 种胆汁酸亚组分[甘氨酸胆酸(GCA)、甘氨酸鹅脱氧胆酸(GCDCA)、甘氨酸熊脱氧胆酸(GUDCA)、牛磺胆酸(TCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)及牛磺熊脱氧胆酸(TUDCA)]水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。总胆汁酸正常组脱氧胆酸(DCA)、熊脱氧胆酸(UDCA)低于对照组,GUDCA、TCA 高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 GUDCA、TCA 可能为胆囊结石临床诊断及早期预防的重要标志物。

关键词:胆囊结石; 胆汁酸谱; 超高效液相色谱-串联质谱

中图法分类号:R575.6+2;R446.1 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2022)10-1344-04

Detection and analysis of serum bile acid spectrum in patients with gallstone*

JIN Suli¹, MI Yujing¹, ZHAO Shuai¹, MA Lifeng², SHEN Li¹, YAN Guochao¹, WU Yan^{1△}

1. Medical Laboratory Center, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050030, China; 2. The Eight Departments of General Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050004, China

Abstract:Objective To evaluate the application value of serum bile acid spectrum in clinical diagnosis and early prevention of gallstone. **Methods** A total of 48 patients with gallstone hospitalized in the First Hospital of Hebei Medical University from September 2019 to June 2020 were selected as the gallstone group, among which 32 patients with normal total bile acid were selected as the normal total bile acid group. At the same time, 26 healthy subjects were selected as the control group. Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect the bile acid spectra of each group, and the levels of 15 bile acid subcomponents in serum of each group were compared. **Results** Among the 15 bile acid subcomponents, the contents of 6 bile acid subcomponents [glycocholic acid (GCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), glyoursodeoxycholic acid (GUDCA), taurocholate (TCA), taoursodeoxycholic acid (TCDCA), and taurochondoxycholic acid (TUDCA)] in gallstone group were significantly higher than those in control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Deoxycholic acid (DCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA) in normal total bile acid group were lower than those in control group, while GUDCA and TCA were statistically higher than those in control group ($P<0.05$). **Conclusion** GUDCA and TCA may be important markers for clinical diagnosis and early prevention of gallstone.

Key words: gallstone; bile acid spectrum; ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

胆囊结石是临床上常见的一种疾病。目前,尚缺乏全国性胆囊结石的流行病学资料。有研究报道,我国胆囊结石的患病率为 2.3%~6.5%^[1],个别地区的发病率甚至可达 24.0%^[2],且随着人口年龄的增长和

* 基金项目:河北省卫健委医学科学研究课题(20190453)。
作者简介:金素丽,女,主管技师,主要从事临床质谱检测方面研究。△ 通信作者, E-mail: wycyhyw@163.com。

人们生活水平的提高,其发病率呈上升趋势。有研究表明,很多因素可以促进胆囊结石产生,如遗传因素、环境、性别、脂质代谢异常、胆囊功能、生活习惯、其他疾病影响等^[3-4],这些危险因素可以通过影响胆汁代谢导致胆汁成分改变或影响胆囊功能而诱发胆囊结石^[5-6]。虽然目前对胆囊结石形成的危险因素已有所认识,但仍缺乏预防胆囊结石形成的有效策略^[7]。胆汁酸是胆囊结石发病的重要因子,人体血清中胆汁酸各亚组分的水平变化与胆囊结石的发病及转归关系密切,临床上常用熊脱氧胆酸作为胆囊结石的治疗药物^[1]。因此,胆汁酸的检测对胆囊结石的诊断及预防价值较大。以往由于技术的限制,临床上主要测定总胆汁酸水平,不能定量检测血清中不同胆汁酸代谢组分的变化。随着超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术的应用,胆汁酸代谢谱的检测在临床上的应用日渐成熟,利用其高通量的特点检测血清中胆汁酸的亚组分水平及比例,实现疾病的预防与诊断成为筛选疾病转化标志物的一种新思路。本研究通过对胆囊结石患者血清胆汁酸谱的检测,探索胆囊结石的成石原因,以期为临床诊断及早期预防胆囊结石的发生提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 9 月至 2020 年 6 月在河北医科大学第一医院(下称本院)确诊为胆囊结石的患者 48 例作为胆囊结石组。其中男 16 例,女 32 例;年龄 27~75 岁,平均(54.08±12.68)岁。纳入标准:(1)经超声、CT 或磁共振胰胆管成像(MRCP)诊断确诊为胆囊结石;(2)同意进行血清胆汁酸谱检测。排除标准:(1)有病毒性肝炎、酒精性肝病等肝脏损伤的病史;(2)有梗阻性胆管疾病,如结石、肿瘤等引起的胆管梗阻。48 例胆囊结石患者中,总胆汁酸处于参考范围内患者 32 例(总胆汁酸正常组),总胆汁酸高于参考范围 16 例。对照组来自同期本院体检中心经彩超确认无胆囊结石的健康人群 26 例。其中男 10 例,女 16 例;年龄 32~76 岁,平均(48.35±11.33)岁。胆囊结石组与对照组性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经本院伦理委员会审批同意,所有受试者知晓并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 仪器:Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);H1650R 台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);G560E 涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司);CV100-DNA-H 真空离心浓缩仪(北京乾明基因技术有限公司);UPLCBEH

C18 色谱柱(美国 Waters 公司,100.0 mm×2.1 mm,1.7 μm)。试剂:超高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)级甲醇、甲酸、乙腈购自美国 Fisher Scientific 公司;释放剂及内标液购自杭州佰辰公司;所有实验用水均为屈臣氏蒸馏水。

1.3 方法

1.3.1 样本的采集及预处理 (1)样本采集:胆囊结石组(术前)及对照组人员于清晨空腹采集静脉血 5 mL 并 3 000 r/min 离心 10 min,提取上清液保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。(2)预处理:取 100 μL 血清样本,加入 300 μL 胆汁酸内标工作液,旋涡混合 5 min,12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心 5 min,吸取上清液 300 μL ,低温浓缩 2 h 至近干;用 100 μL 的样本释放剂 B 液复溶,旋涡混合 5 min,12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心 5 min,取上清液 80 μL 于 96 孔板中,采用 UPLC-MS/MS 对胆汁酸进行分析。

1.3.2 UPLC-MS/MS 分析 (1)采用线性梯度洗脱模式对胆汁酸进行色谱分离,流速为 0.4 mL/min,柱温为 45 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相 A 为 10% (体积比)的甲酸水溶液,动相 B 为乙腈:甲醇(3:1)的混合溶剂。梯度分离条件为:起始 38% 的流动相 B 维持 0.5 min,至 1.9 min 升到 48% B,第 6.7 min 升到 64% B,8.7 min 升到 83% B,10.7 min 升到 95% B,11.3 min 降至起始梯度并平衡至 12 min。进样量为 5 μL 。(2)质谱仪采用电喷雾离子源(ESI)负离子模式进行离子化。采用多反应监测(MRM)模式对胆汁酸谱进行定量检测。

1.4 统计学处理 应用 SPSS21.0 统计学软件对数据进行分析,两组胆汁酸谱各亚组分数据均为非正态分布,且方差不齐,用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用独立样本的 Mann-Whitey 检验;其他计量资料经正态、方差齐性检验后为正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验;计数资料以率或构成比表示,采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

15 种胆汁酸亚组分[胆酸(CA)、鹅脱氧胆酸(CDCA)、脱氧胆酸(DCA)、石胆酸(LCA)、甘氨胆酸(GCA)、甘氨熊脱氧胆酸(GUDCA)、甘氨鹅脱氧胆酸(GCDCA)、甘氨脱氧胆酸(GDCA)、牛磺胆酸(TCA)、牛磺脱氧胆酸(TDCA)、牛磺熊脱氧胆酸(GUDCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)、牛磺石胆酸(TLCA)、甘氨石胆酸(GLCA)、熊脱氧胆酸(UDCA)]中,胆囊结石组的 GCA、GCDCA、GUDCA、TCA、TUDCA、TCDCA 水平高于对照组($P<0.05$);两组其余胆汁酸亚组分差异无统计学意义($P>0.05$)。总胆汁酸正常组与对照组比较,总胆汁酸正

常组 DCA、UDCA 比对照组低($P<0.05$),GUDCA、TCA 比对照组高($P<0.05$),其余胆汁酸亚组分差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 两组胆汁酸谱的比较[$M(P_{25},P_{75})$,nmol/L]

胆汁酸亚组分	胆囊结石组($n=48$)	对照组($n=26$)	总胆汁酸正常组($n=32$)	P_1	P_2
CA	89.46(29.26,364.90)	76.95(47.97,182.67)	53.31(24.44,176.43)	0.901	0.222
CDCA	390.60(52.45,772.37)	418.87(128.16,845.78)	182.40(28.91,596.44)	0.441	0.053
DCA	84.50(18.00,347.13)	206.43(86.44,606.40)	70.06(19.59,187.88)	0.093	0.014
LCA	4.47(2.39,10.95)	5.16(2.25,14.38)	4.69(2.32,10.95)	0.910	0.950
GCA	282.35(135.96,1 345.32)	118.71(56.63,213.04)	177.80(79.57,397.31)	0.001	0.072
GUDCA	437.55(153.91,1 330.49)	88.58(49.62,236.08)	287.87(119.86,472.55)	<0.001	0.001
GCDCA	1 696.34(641.73,4 324.33)	760.94(462.90,1 517.77)	809.42(452.68,2 002.64)	0.007	0.364
GDCA	122.77(15.40,642.88)	131.02(68.89,266.22)	72.35(8.21,387.68)	0.427	0.421
TCA	33.41(15.11,205.36)	9.97(8.00,25.19)	25.71(13.78,39.34)	<0.001	0.002
TDCA	19.84(8.00,74.55)	9.84(8.47,23.86)	9.32(8.32,31.46)	0.120	0.702
TUDCA	8.00(8.00,27.75)	9.24(8.21,9.45)	9.33(8.81,10.35)	0.007	0.058
TCDCA	117.08(59.25,567.97)	55.25(28.00,101.92)	78.70(45.15,172.35)	0.001	0.102
TLCA	—	—	—	—	—
GLCA	—	—	—	—	—
UDCA	42.90(13.51,158.57)	95.21(59.07,145.39)	32.37(8.41,78.77)	0.123	0.010

注:—表示 TLCA、GLCA 大部分数据小于检测限,未进行统计; P_1 为胆囊结石组与对照组比较, P_2 为总胆汁酸正常组与对照组比较。

3 讨 论

胆囊结石是临床上的一种多见病、常发病。多数患者并无明显症状,常于健康体检或其他疾病检查时发现。但是结石的存在会对胆囊的正常结构和功能产生影响,如占位性影响胆囊排空功能、结石嵌顿引起胆绞痛、结石反复摩擦胆囊壁诱发胆囊炎等^[1]。目前胆囊结石的诊断和治疗已相对成熟,但术后发生其他疾病的风险也增大。有研究表明,胆囊结石、胆囊切除术可以增加大肠癌发生的危险性^[8-9]。此外,胆囊结石术后结石复发率较高,约为 20%^[10-11]。因此,对胆囊结石形成的原因及预防的研究显得尤为重要。

胆汁酸是胆固醇的代谢产物,占人体总胆汁的 50%~70%。胆汁酸成分的改变是胆囊结石形成的主要原因之一。在非疾病状态下,血清中胆汁酸各亚组分水平及比例基本稳定,其中 CA 约占总胆汁酸的 40%,CDCA 占 40%,DCA 占 18%,LCA 不足 2%。在疾病状态下,受肝细胞功能和胆汁酸肝肠循环的影响,血清中胆汁酸各亚型的种类及含量可能发生改变,以致胆固醇不能维持微胶粒状态而析出,最终导致结石的形成。

本研究结果发现,胆囊结石组 GCA、GCDCA、GUDCA、TCA、TUDCA 及 TCDCA 6 种胆汁酸亚组分水平比对照组高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

原因可能是由于胆囊结石患者体内结石大小、数量或部位不同导致部分患者胆汁淤滞,而使血清中的总胆汁酸升高。为排除胆囊结石组部分病例由于总胆汁酸升高而导致统计结果的偏差,作者对胆囊结石组中总胆汁酸处于正常参考范围内的病例与对照组进行比较,结果发现总胆汁酸正常组 DCA、UDCA 水平比对照组低,而 GUDCA、TCA 比对照组高($P<0.05$)。由此推断,可能由于某种机制的作用,胆囊结石患者体内转化为 DCA、UDCA 的胆汁酸减少,而增加了 GUDCA、TCA 的转化生成,最终导致体内胆汁酸亚组分比例发生变化。

本研究与陈则旭^[12]的相关报道存在异同。其相同之处在于,均发现胆囊结石组的 GUDCA、TCA 比对照组升高,UDCA 比对照组下降;不同之处在于,陈则旭等^[12]研究认为,胆囊结石组 GCA 和 TCDCA 比对照组升高。这可能因为本研究中未排除总胆汁酸升高因素。本研究结果提示,不论总胆汁酸升高与否,胆囊结石患者体内 GUDCA 和 TCA 水平比健康人高。另有研究认为,胆汁酸各亚组分在胆石症发生前,即超声、CT 等结果正常时已有明显的改变^[11]。

综上所述,GUDCA 和 TCA 可能为胆囊结石诊断和预防的重要标志物,但限于本研究的样本量较少,后续还需要进行大样本的研究。(下转第 1350 页)

基于肾损伤不可逆性、持续性和早期隐匿性的特点,早期发现蛋白尿成为临床评估、诊断和干预的重要手段,24 h 尿蛋白定量存在标本留取烦琐、患者依从性差的缺点,容易引起误诊、误治,干化学法检测尿蛋白标本留取方便、操作简单、结果回报快,却易出现漏诊,ACR 和 PCR 可操作性强,可以作为早期蛋白尿的替代评价方法,但应综合考虑受检者的血糖、血压和血脂等代谢状态,以及近期饮食和口服药物情况,再对结果进行准确判断。

参考文献

[1] 中华医学会健康管理学分会,中华健康管理学杂志编委会.健康体检基本项目专家共识[J].中华健康管理学杂志,2014,8(2):81-90.

[2] 刘然,朱红,杨菊红,等.尿白蛋白/肌酐比值可以完全替代 24 小时尿微量白蛋白吗[J].中华内科杂志,2019,58(5):377-381.

[3] CROKE L. Gestational hypertension and preeclampsia: a practice bulletin from ACOG[J]. Am Fam Physician, 2019,100(10):649-650.

[4] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组.妊娠期高血压疾病诊治指南(2020)[J].中华妇产科杂志,2020,55(4):227-228.

[5] MITCHELL S C, SHELTON T A, SHAW A B. Quantification of proteinuria: a re-evaluation of the protein/creatinine ratio for elderly subjects[J]. Age Ageing, 1993, 22(6):443-449.

[6] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney

disease[J]. Kidney Int, 2013, 3(Suppl):S1-S150.

[7] INKER L A, GRAMS M E, LEVEY A S, et al. Relationship of estimated GFR and albuminuria to concurrent laboratory abnormalities: an individual participant data meta-analysis in a global consortium[J]. Am J Kidney Dis, 2019, 73(2):206-217.

[8] LEVEY A S, GANSEVOORT R T, CORESH J, et al. Change in albuminuria and GFR as end points for clinical trials in early stages of CKD: a scientific workshop sponsored by the National Kidney Foundation in Collaboration with the US Food and Drug Administration and European Medicines Agency[J]. Am J Kidney Dis, 2020, 75(1):84-104.

[9] 蔺海旗,陈亮,唐璐,等.尿液蛋白质组学评估机体病理性变化的意义[J].中国组织工程研究,2021,25(20):3259-3266.

[10] 孙治平,武晓春,戴瑛,等.尿微量白蛋白/肌酐在老年健康体检人群慢性肾脏病筛查中的应用[J].实用老年医学,2021,35(3):278-281.

[11] LI B, CHEN K, WANG J, et al. Low-grade albuminuria is associated with high cardiovascular risk in CVD-free and normoal buminuric Chinese adults: Results from the REACTION study[J]. J Diabetes, 2021, 13(8):648-660.

[12] FLOEGE J, BARBOUR S J, CATTRAN D C, et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 1): conclusions from a Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference[J]. Kidney Int, 2019, 95(2):268-280.

(收稿日期:2022-01-25 修回日期:2022-02-25)

(上接第 1346 页)

参考文献

[1] 中华消化杂志编辑委员会,中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组.中国慢性胆囊炎,胆囊结石内科诊疗共识意见(2018 年)[J].中华消化杂志,2019,39(2):73-79.

[2] 吕复君,丁丹丹,刘江伟,等.新疆维吾尔自治区维吾尔族和哈萨克族及汉族女性胆囊结石的流行病学调查[J].中国全科医学,2019,22(20):2436-2440.

[3] 葛宏升.胆囊结石形成机理及影响因素的最新研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(59):144-145.

[4] 陈武,张曙光,刘建通.腹腔镜胆囊切除胆道探查术与传统开腹手术治疗胆囊结石合并胆总管结石的临床效果[J].检验医学与临床,2018,15(11):1654-1658.

[5] 刘昌,孟凡迪,王瑞涛.胆石症基础研究现状与展望[J].中国实用外科杂志,2021,41(1):48-51.

[6] 宋睿,杜国平.胆石症的研究进展与新认识[J].医学理论与实践,2018,31(10):1427-1428.

[7] SHABANZADEH D M. Incidence of gallstone disease and complications[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2018, 34(2):

81-89.

[8] LEE J, CHOE S, PARK J W, et al. The risk of colorectal cancer after cholecystectomy or appendectomy: a population-based cohort study in Korea[J]. J Preventive Med Public Health, 2018, 51(6):281-288.

[9] ZHANG Y, LIU H, LI L, et al. Correction: cholecystectomy can increase the risk of colorectal cancer; a meta-analysis of 10 cohort studies[J]. PLoS One, 2018, 13(1):e0191587.

[10] 周亚柏,张开光,王成,等.ERCP 治疗胆管末端良性病变并胆管炎的疗效及复发因素分析[J].安徽医科大学学报,2020,55(9):1412-1415.

[11] 王雷鸣,陈晨,丁辉,等.经内镜逆行胰胆管造影联合腹腔镜胆囊切除术后胆囊结石合并胆总管结石复发的危险因素分析[J/CD].中华普通外科学文献(电子版),2019,13(3):224-228.

[12] 陈则旭.血清胆汁酸谱变化对胆结石发病预测及证候研究[D].广州:广州中医药大学,2018.

(收稿日期:2021-08-07 修回日期:2022-02-18)