

# 应用去唾液酸糖蛋白受体及临床指标建立肝储备功能定量评估系统

李勤涛, 穆毅, 蒋力, 张珂, 黄容海, 李宝亮, 贾哲, 鲁岩, 赫嵘, 丁振昊, 郭立民 (首都医科大学附属北京地坛医院 肝胆外科, 北京 100015)

**摘要:** 目的 探讨应用肝细胞表面ASGPR流式细胞分析及临床指标建立肝储备功能定量评估系统, 并与Child-Pugh评分进行比较, 了解其在患者术前肝储备功能评估中的临床应用价值。方法 选择32例肝占位病变行肝部分切除术患者, 术前检测ICGR15与EHBF、R值与K值以及临床生化指标、Child-Pugh评分, 以此作为自变量(Xn), 以肝组织标本PHC<sup>ASGPR+</sup>为因变量(Y), 通过多元线性回归分析, 建立肝储备功能定量评估系统, 并与Child-Pugh评分进行比较, 了解两种方法预测术后肝功能代偿情况的准确率。按照回归方程计算46例肝占位病变接受肝部分切除术及肝硬化并门脉高压症接受断流术患者肝储备功能定量值, 评估肝储备功能情况, 预测术后肝功能恢复情况, 比较术前不同Child-Pugh分级与Y值患者术后肝功能恢复情况。结果 在预测术后肝功能代偿良好准确率方面, Y值优于Child-Pugh分级( $P = 0.030$ ); 而在预测术后肝功能代偿不良准确率方面, Y值与Child-Pugh分级无统计学差异( $P = 1.000$ )。结论 新肝储备功能定量评估系统能一定程度提高肝切除或肝硬化患者术前肝储备功能评价准确度, 具有临床应用价值。

**关键词:** 肝脏储备功能; 去唾液酸糖蛋白受体; Child-Pugh评分

## Quantitative evaluation of liver functional reserve by asialoglycoprotein receptor and clinical test indexes

LI Qin-tao, MU Yi, JIANG Li, ZHANG Ke, HUANG Rong-hai, LI Bao-liang, JIA Zhe, LU Yan, HE Rong, DING Zhen-hao, GUO Li-min (Department of Hepatobiliary Surgery, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To investigate a quantitative assessment of hepatic functional reserve using flow cytometric analysis of asialoglycoprotein receptors (ASGPR) on the liver cell surface and regular clinical indexes. This assessment method was compared with the Child-Pugh score to evaluate its predictive value for hepatic functional reserve in patients undergoing liver resection or devascularization. **Methods** Total of 32 patients with liver tumors had partial hepatectomy. The percentage of the ASGPR<sup>+</sup> hepatocyte (PHC<sup>ASGPR+</sup>), ICGR15, effective hepatic blood flow (EHBF), the R value, the K value and regular clinical parameters were examined to evaluate a quantitative assessment method for liver functional reserve. The PHC<sup>ASGPR+</sup> was defined as a dependent variable (Y) while the other indexes were defined as independent variables (Xn). The accuracy of predicted postoperative liver compensation was obtained from follow-up information and was compared to that predicted by the Child-Pugh score. Total of 46 patients had partial hepatectomy or devascularization. The hepatic functional reserve was calculated with the new scoring system. The accuracy of predicted postoperative liver compensation was obtained from follow-up information and was compared to that predicted by the Child-Pugh score. **Results** The new scoring system (the Y value) had better accuracy in predicting postoperative hepatic functional reserve than Child-Pugh score ( $P = 0.030$ ), but there were no statistical difference in predicting postoperative hepatic decompensation ( $P = 1.000$ ). **Conclusions** The quantitative assessment method for hepatic functional reserve, established in the current study, could provide

a comprehensive evaluation of perioperative hepatic functional reserve in some degrees in patients undergoing hepatectomy or devascularization.

**Key words:** Hepatic functional reserve; Asialoglycoprotein receptor; Child-Pugh classification

Child-Pugh评分是目前使用最广泛的肝功能评价方法,因其只在一定程度上反映了肝实质损害严重程度与肝细胞代偿功能现状,故不能准确反映机体在受到外来打击时肝脏所能释放出的潜在能力<sup>[1-3]</sup>。去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是肝细胞表达的膜表面蛋白,其数量、功能与肝细胞的功能呈正相关,是评价肝储备功能的敏感方法<sup>[4,5]</sup>。本研究通过分析肝切除患者肝细胞表面ASGPR与临床检测指标间的关系,为预测肝切除手术或肝功能异常的患者手术风险与术后提供更为准确的肝储备功能定量评价新方法。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 第一组:选择2012年1月1日至6月30日间肝占位病变患者在本科室接受肝部分切除术,第二组:2012年7月1日至12月31日间肝占位病变患者在本科室接受肝部分切除术,肝硬化合并门脉高压症患者在我科接受脾切除、贲门周围血管离断术。筛选标准:年龄 $\geq 18$ 岁且 $\leq 60$ 岁,无心、肺、脑、肾等重要脏器功能障碍,无难以控制的高血压、糖尿病等基础内科疾病,除肝脏外无其他脏器良恶性肿瘤。选择78例患者同意参加本研究,并签订书面知情同意书。第一组:共32例,男性16例,女性16例,平均年龄( $48.13 \pm 6.89$ )岁,无基础肝病的肝海绵状血管瘤10例,乙型肝炎后肝硬化合并原发性肝癌18例,丙型肝炎后肝硬化合并原发性肝癌4例。第二组:共46例,男性24例,女性22例,平均年龄( $47.72 \pm 7.38$ )岁,无基础肝病的肝海绵状血管瘤10例,乙型肝炎后肝硬化合并原发性肝癌16例,乙型肝炎后肝硬化合并门脉高压症20例。本研究经首都医科大学附属北京地坛医院医学伦理委员会审核通过。

## 1.2 方法

**1.2.1 建立肝储备功能定量评估系统** 对第一组患者应用肝细胞表面ASGPR流式细胞分析及临床指标建立肝储备功能定量评估系统,并与Child-Pugh评

分进行比较,了解其在患者术前肝储备功能评估中的临床应用价值。以术后14天为观察期,以Child-Pugh分级为术后肝功能恢复标准,其中Child-Pugh A级为代偿良好,Child-Pugh B级为代偿轻度不良,Child-Pugh C级为代偿重度不良。比较术前不同Child-Pugh分级与新评价系统测定值患者术后肝功能恢复情况。

(1)流式细胞仪测定ASGPR阳性肝细胞比例(the percentages of ASGPR<sup>+</sup> hepatocyte, PHC<sup>ASGPR+</sup>):术中切除肝肿瘤标本后,立刻无菌留取瘤旁5 mm外1 cm<sup>3</sup>大小正常肝组织,HBSS液去除肝组织中红细胞。将肝组织剪呈1~2 mm<sup>3</sup>碎块,0.05% II型胶原酶37℃消化10分钟,过200目细胞筛网,2% FBS/DMEM终止消化。1200 r/min离心5分钟,弃上清,加入3~5 ml HBSS液重悬细胞。相差显微镜观察肝细胞形态并计数,保持细胞至 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6/\text{ml}$ ,0~4℃备用。取肝细胞悬液50~100  $\mu\text{l}$ ,加入5  $\mu\text{l}$  FITC-anti-ASGR1 (HyCult Biotechnology, 荷兰) 4℃孵育30分钟。1000 r/min离心5分钟,弃上清,加入1 ml HBSS液重悬细胞。1000 r/min离心5分钟,HBSS液洗涤细胞2次,用HBSS液稀释至细胞数 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6/\text{ml}$ 。取样上机检测肝细胞ASGPR,计算机软件自动计算PHC<sup>ASGPR+</sup>。以标记FITC的小鼠同型IgG1为阴性对照。

(2)吲哚氰绿试验:术前3天以DDG-3300K分析仪(Nihon Kohden Corporation, Japan),采用脉动色素浓度测定法行无创吲哚氰绿试验。将ICG试剂溶解稀释成5 mg/ml,患者安静卧床,以0.5 mg/kg的剂量于肘静脉注入。使用专用鼻夹探头持续测定血中ICG浓度,计算机软件自动计算吲哚氰绿15分钟滞留率(Indocyanine green retention at 15 minutes, ICGR15)及有效肝血流量(Effective hepatic blood flow, EHBf)。

(3)血栓弹力图(Thrombelastogram, TEG)

描记方法: 用Haemoscope 500 series血栓弹力图仪(Haemonetics Corporation, USA), 在预置温度37℃条件下, 将1.2 ml全血注入管瓶中激活, 吸取0.36 ml注入测定杯中, 测定杯以4° 45' 的角度旋转, 每周期持续10秒, 经电脑收集和分析软件处理, 描记出TEG图像和参考值。记录R值与K值。

(4) 检测术前临床指标: 检测术前1周内患者ALT、AST、TBIL、ALB、总胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、胆碱酯酶(CHE)、前白蛋白(prealbumin, PA)、BUN、Cr, 凝血指标PT、INR, 以及腹水量、有无肝性脑病, 并进行Child-Pugh评分。

(5) 建立肝储备功能定量评估回归方程: 以 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 为因变量(Y), 以ICGR15、EHBf、R值、K值、ALT、AST、CHOL、HDL-C、LDL-C、CHE、PA、BUN、Cr以及Child-Pugh评分为自变量(Xn), 通过多元线性回归分析, 建立回归方程。

1.2.2 应用建立的回归方程预测肝功能恢复情况 术前按照回归方程计算第二组患者肝储备功能定量值, 评估肝储备功能情况, 预测术后肝功能恢复情况。以术后14天为观察期, 以Child-Pugh分级为术后肝功能恢复标准, 其中Child-Pugh A级为代偿良好, Child-Pugh B级为代偿轻度不良, Child-Pugh C级为代偿重度不良。比较术前不同Child-Pugh分级与Y值患者术后肝功能恢复情况。

1.3 统计学处理 应用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 多元线性回归分析建立回归方程, 计数资料行 $\chi^2$ 检验, 计量资料行独立样本t检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 术后恢复情况 两组患者手术过程顺利, 无手术死亡病例, 均于术后1个月内出院。两组患者均按术后肝功能恢复情况代偿良好与代偿不良分组, 手术情况无差异, 见表1、2。

2.2 肝储备功能定量评估系统的建立 以 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 为因变量(Y), 以ICGR15、EHBf、R值、K值、CHOL、HDL-C、LDL-C、CHE、PA、BUN、Cr以及Child-Pugh评分为自变量(Xn), 通过多元线性回归分析, 排除与因变量(Y)无显著相关的EHBf、R值、K值、CHOL、HDL-C、LDL-C、BUN、Cr, 建立回归方程为 $Y(\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}\%) = 93.122 - 0.409 \times \text{ICGR15}(\%) - 0.742 \times \text{R值}(\text{min}) - 0.125 \times \text{ALT}(\text{U/L}) + 0.044 \times \text{PA}(\text{mg/L}) + 0.002 \times \text{CHE}(\text{U/L}) - 2.862 \times \text{Child-Pugh}(\text{评分值})$ 。模型方差分析 $F = 76.844$ , 显著性概率为0.000, 说明方程有意义。 $R^2 = 0.949$ , Adjusted  $R^2 = 0.936$ , 该模型能够解释 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$  90%以上的变差。Y值ROC曲线分析见图1, 最佳临界值为78.205%, 其敏感度为88.9%, 特异性为100%。全部病例中 $Y > 78.205\%$ 者16例,  $Y \leq 78.205\%$ 者16例。术前Child-Pugh A级22例, Child-Pugh B级10例。Child-

表1 第一组患者手术情况

|               | 年龄<br>(岁, $\bar{x} \pm s$ ) | 手术时间<br>(分, $\bar{x} \pm s$ ) | 术中出血量<br>(ml, $\bar{x} \pm s$ ) | 第一肝门阻断时间<br>(分, $\bar{x} \pm s$ ) | 手术方式(例) <sup>a</sup> |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 肝功能代偿良好(n=18) | 46.22 ± 6.35                | 143.06 ± 17.42                | 372.22 ± 101.78                 | 17.72 ± 3.51                      | 2/3/10               |
| 肝功能代偿不良(n=14) | 50.57 ± 7.00                | 139.29 ± 13.14                | 364.29 ± 100.82                 | 17.21 ± 2.39                      | 1/2/9                |
| 统计值           | $t = -1.838$                | $t = 0.674$                   | $t = 0.220$                     | $t = 0.463$                       | $\chi^2 = 0.249$     |
| P             | 0.076                       | 0.506                         | 0.828                           | 0.646                             | 0.618                |

注: <sup>a</sup>右前叶切除/右后叶切除/左外叶切除/局部肝切除

表2 第二组患者手术情况

|               | 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ ) | 手术时间(分, $\bar{x} \pm s$ ) | 术中出血量(ml, $\bar{x} \pm s$ ) | 肝切除/断流术(例)       |
|---------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------|
| 肝功能代偿良好(n=29) | 46.45 ± 7.30            | 145.34 ± 15.00            | 336.21 ± 128.80             | 19/10            |
| 肝功能代偿不良(n=17) | 49.88 ± 7.22            | 143.24 ± 13.69            | 285.29 ± 102.72             | 7/10             |
| 统计值           | $t = -1.547$            | $t = 0.475$               | $t = 1.389$                 | $\chi^2 = 2.584$ |
| P             | 0.129                   | 0.637                     | 0.172                       | 0.108            |

Pugh A级的22例患者中,  $Y > 78.205\%$ 者15例,  $Y \leq 78.205\%$ 者7例; Child-Pugh B级的10例患者中,  $Y > 78.205\%$ 者1例,  $Y \leq 78.205\%$ 者9例。

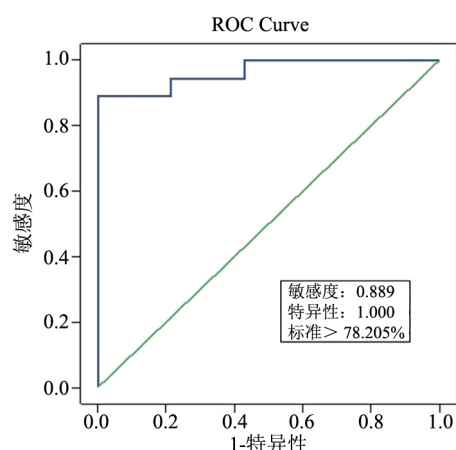


图1 Y值与术后肝功能代偿的ROC相关性曲线

**2.3 术后肝功能恢复情况** 第一组: 22例术前Child-Pugh A级患者, 术后14天16例为Child-Pugh A级, 6例为Child-Pugh B级, 无Child-Pugh C级病例, 其预测术后肝功能代偿良好准确率为72.7%; 10例术前Child-Pugh B级患者, 术后14天2例为Child-Pugh A级, 5例为Child-Pugh B级, 3例为Child-Pugh C级, 其预测术后肝功能代偿不良准确率为80.0%。16例  $Y > 78.205\%$ 者, 术后14天均为Child-Pugh A级, 其预测术后肝功能代偿良好准确率为100%, 与Child-Pugh分级预测术后肝功能代偿良好准确率比较, 差异有统计学意义 ( $P = 0.030$ ); 16例  $Y \leq 78.205\%$ 者, 术后14天有2例为Child-Pugh A级, 11例为Child-Pugh B级, 3例为Child-Pugh C级, 其预测术后肝功能代偿不良准确率为87.5%, 与Child-Pugh分级预测术后肝功能代偿不良准确率比较无统计学差异 ( $P = 0.625$ )。

**2.4 预测肝功能恢复情况** 第二组: 35例术前Child-Pugh A级患者, 术后14天27例为Child-Pugh A级, 7例为Child-Pugh B级, 无Child-Pugh C级病例, 其预测术后肝功能代偿良好准确率为77.1%; 11例术前Child-Pugh B级患者, 术后14天2例为Child-Pugh A级, 8例为Child-Pugh B级, 1例为Child-Pugh C级, 其预测术后肝功能代偿不良准确率为81.8%。25例  $Y > 78.205\%$ 患者, 术后14天有23例为Child-Pugh

A级, 2例为Child-Pugh B级, 无Child-Pugh C级病例, 其预测术后肝功能代偿良好准确率为92.0%, 与Child-Pugh分级预测术后肝功能代偿良好准确率比较差异有统计学意义 ( $P = 0.030$ ); 21例  $Y \leq 78.205\%$ 患者, 术后14天有3例为Child-Pugh A级, 17例为Child-Pugh B级, 1例为Child-Pugh C级, 其预测术后肝功能代偿不良准确率为85.7%, 和Child-Pugh分级预测术后肝功能代偿不良准确率比较无统计学差异 ( $P = 1.000$ )。

### 3 讨论

肝硬化患者肝脏储备功能差, 手术打击有可能导致肝功能失代偿, 甚至是肝功能衰竭。因此, 术前对肝脏储备功能的评估是必要的。定量评估肝脏储备功能可以为决定手术时机、制定手术方案、评估预后提供重要依据。目前, Child-Pugh评分仍是临床上评价肝储备功能的主要手段。由于其指标易受治疗因素影响, Child-Pugh评分仅反映当时肝功能的情况, 不能精确反映肝脏受到手术打击时所能体现出的实际情况<sup>[6,7]</sup>, 因此可以加入其他临床指标完善Child-Pugh评分系统。吲哚氰绿是测定肝脏功能的理想物质之一, 单位时间内进入肝细胞的ICG量可反映肝血流量的多少及肝细胞的功能, 测定血ICGR15能够反映肝细胞代谢功能<sup>[8,9]</sup>。ICGR15对肝硬化患者肝切除的预后判断价值已经得到证实, 有学者提出了基于ICGR15的肝切除安全限量评估系统<sup>[10,11]</sup>。但由于ICGR15受肝血流量、门脉分流、胆汁分泌及胆道畅通程度等因素影响, 单独运用比较局限。TEG是反映血液凝固动态变化的指标, 其主要参数R值、K值反映机体凝血因子及纤维蛋白原的合成水平, 而这两种蛋白均由肝脏合成, 因此能反映肝细胞合成功能<sup>[12,13]</sup>。故将ICGR15、EHBF、TEG参数中R值、K值、肝肾血清生化指标与Child-Pugh评分结合, 来反映功能性肝细胞数量, 建立一种更为准确的肝储备功能定量评估方法, 可以更容易应用于临床, 作为肝脏手术或肝病患者手术前更准确地评估肝脏储备功能的方法, 评估手术风险及预后。

ASGPR是肝细胞表面的特异性内吞受体, 主要功能是去除唾液酸的糖蛋白和凋亡细胞<sup>[14]</sup>。其



表达数量与功能状态直接反映肝细胞功能的正常与否,是精确反映肝储备功能的指标<sup>[15,16]</sup>。但操作较繁琐,未在临床上常规应用。

本研究中第一组32例肝切除术患者,术后18例肝功能代偿良好,14例肝功能代偿不良。代偿良好组与代偿不良组在年龄、手术时间、术中出血量、第一肝门阻断时间和手术方式组成等方面无差异( $P > 0.05$ )。建立的回归方程能够解释 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 90%以上的变差。Y值ROC曲线确定的最佳临界值为78.205%,其敏感度为88.9%,特异性为100%。提示对于 $Y \leq 78.205\%$ 的患者,发生术后肝功能代偿不良的风险显著增加。方程中,ICGR15能够反映肝细胞代谢功能;TEG参数中R值主要反映肝脏合成凝血因子的水平,凝血因子半衰期短,较半衰期长的血清白蛋白能更准确更即时地反映肝细胞合成功能<sup>[12,13]</sup>。PA、CHE活性也是肝功能分级的补充指标,并用于判定肝硬变患者的肝储备功能和预后<sup>[17]</sup>。ALT是肝细胞损伤的敏感指标,其水平升高反映了肝实质受到损害的程度,因此也是反映肝脏储备功能的一个因素。

以Child-Pugh分级和Y值进行肝储备功能评估比较,结果显示:在预测术后肝功能代偿良好准确率方面,Y值与Child-Pugh分级比较,差异有显著统计学意义( $P = 0.030$ );而在预测术后肝功能代偿不良准确率方面,Y值与Child-Pugh分级比较,差异无统计学意义( $P = 1.000$ )。因此,对于 $Y \leq 78.205\%$ 的患者,即使Child-Pugh分级为A级,也只能反映肝脏在不承受外来打击时的功能状态,一旦遭受麻醉、手术、出血、感染等外来打击极易造成肝功能衰竭,因此应该慎重制定这类患者的治疗方案。综合ICGR15、R值、ALT、PA、CHE、Child-Pugh评分的回归方程,能够解释 $\text{PHC}^{\text{ASGPR}+}$ 90%以上变差的肝储备功能定量评估系统,能够更准确反映患者承受麻醉及手术创伤的实际肝储备状况。

综上所述,通过新建立的肝储备功能定量评估系统能够更准确地评估肝硬化患者或肝部分切除术患者肝脏储备功能,了解患者手术的耐受性,为设计和实施安全手术提供依据,具有临床应用价值,

值得进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Schneider PD. Preoperative assessment of liver function[J]. Surg Clin North Am,2004,84:355-373.
- [2] Mahmoud M, Abdel-Kader R, Hassanein M, et al. Antipyrine clearance in comparison to conventional liver function tests in hepatitis C virus patients[J]. Eur J Pharmacol,2007,569:222-227.
- [3] Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, et al. Preoperative liver function assessments to estimate the prognosis and safety of liver resections[J]. Surg Today,2014,44:1-10.
- [4] Kaibori M, Ha-Kawa SK, Maehara M, et al. Usefulness of Tc-99m-GSA scintigraphy for liver surgery[J]. Ann Nucl Med,2011,25:593-602.
- [5] Kokudo N, Vera DR, Makuuchi M. Clinical application of TcGSA[J]. Nucl Med Biol,2003,30:845-849.
- [6] Concha PM, Mertz KV. Perioperative risk among patients with cirrhosis[J]. Rev Med Chil,2010,138:1165-1171.
- [7] Paes-Barbosa FC, Ferreira FG, Szutan LA. Hepatectomy preoperative planning[J]. Rev Col Bras Cir,2010,37:370-375.
- [8] Fazakas J, Mándli T, Ther G, et al. Evaluation of liver function for hepatic resection[J]. Transplant Proc,2006,38:798-800.
- [9] Scheingraber S, Richter S, Igna D, et al. Indocyanine green disappearance rate is the most useful marker for liver resection[J]. Hepatogastroenterology,2008,55:1394-1399.
- [10] Imamura H, Sano K, Sugawara Y, et al. Assessment of hepatic reserve for indication of hepatic resection:decision tree incorporating indocyanine green test[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg,2005,12:16-22.
- [11] Poon RT, Fan ST. Assessment of hepatic reserve for indication of hepatic resection: how I do it[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg,2005,12:31-37.
- [12] Stravitz RT. Potential applications of thromboelastography in patients with acute and chronic liver disease[J]. Gastroenterol Hepatol,2012,8:513-520.
- [13] Weitzel NS, Weitzel LB, Epperson LE, et al. Platelet mapping as part of modified thromboelastography (TEG®) in patients undergoing cardiac surgery and cardiopulmonary bypass[J]. Anaesthesia,2012,67:1158-1165.
- [14] Marshall JS, Williams S, Jones P, et al. Serum desialylated glycoproteins in patients with hepatobiliary dysfunction[J]. J Lab Clin Med,1978,92:30-37.
- [15] Yang W, Zhang X, Liu Y. Asialoglycoprotein receptor-targeted radiopharmaceuticals for measurement of liver function[J]. Curr Med Chem,2013 Aug 23,[Epub ahead of print].
- [16] Tatsumi H, Masuda Y, Imaizumi H, et al. Asialoglycoprotein receptor scintigraphy with 99mTc-galactosyl human serum albumin (99mTc-GSA) as an early predictor of survival in acute liver failure[J]. Anaesth Intensive Care,2013,41:523-528.
- [17] 李琴, 张福奎, 马红, 等. 血清前白蛋白、胆碱酯酶及胆汁酸在评价肝硬化患者肝脏储备功能及其变化中的临床价值[J]. 临床和实验医学杂志,2004,3:195-197.

收稿日期: 2013-08-26