

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001897

血清胆汁酸代谢轮廓分析 用于妊娠期肝内胆汁淤积症的早期诊断

何一帆¹, 邵 勇², 胥 彪³, 邓 丹⁴, 张晓清¹, 陈 霄¹, 丁 敏¹

(1. 重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016;

4. 重庆医科大学公共卫生与管理学院卫生统计学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨血清胆汁酸代谢轮廓分析在妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)的早期诊断中的应用价值。**方法:**应用超高效液相色谱-三重四级杆-飞行时间质谱法对 50 例健康孕妇、51 例 ICP 孕妇、14 例早期 ICP 孕妇和 21 例妊娠肝功能紊乱孕妇血清中的 27 种已知胆汁酸和 29 种鉴定胆汁酸进行检测。采用偏最小二乘判别分析建立 ICP 的诊断模型,应用受试者工作特征曲线和 Logistic 回归筛选成分胆汁酸作为 ICP 早期诊断标志物。**结果:**与正常孕妇比,早期 ICP 孕妇的牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)、甘氨酸胆酸(glycolcholic acid, GCA)、甘氨酸结合型三羟基胆汁酸-3(Gtri-3)、甘氨酸结合型三羟基胆汁酸-5(Gtri-5)等多种血清成分胆汁酸明显升高($P < 0.05$),而妊娠肝功能紊乱孕妇未见明显改变($P > 0.05$)。ICP 诊断模型对早期 ICP 的预测灵敏度为 85.7%,特异性为 95.2%。鉴定的胆汁酸 Gtri-3 和牛磺结合型三羟基胆汁酸-2 作为联合标志物,对 ICP 的早期诊断具有较高效能,灵敏度为 92.9%,特异性为 90.5%。**结论:**血清胆汁酸代谢轮廓分析是一种较特异、灵敏的 ICP 早期诊断方法。

【关键词】妊娠期肝内胆汁淤积症;胆汁酸;代谢轮廓分析;早期诊断

【中图分类号】R714.25

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-11-12

Early diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy based on metabolic profiling analysis of serum bile acids

He Yifan¹, Shao Yong², Xu Biao³, Deng Dan⁴, Zhang Xiaoqing¹, Chen Xiao¹, Ding Min¹

(1. Key laboratory of Laboratory Medical Diagnosis, Ministry of Education, School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Department of clinical laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 4. Teaching and Research Section of Health Statistics, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the value of metabolic profiling analysis of serum bile acids in the early diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods:** Ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry was used to measure the serum levels of 27 known bile acids and 29 identified bile acids in 50 healthy pregnant women, 51 patients with ICP, 14 patients with early-stage ICP, and 21 pregnant women with liver dysfunction. A partial least squares-discriminant analysis was used to establish a diagnostic model of ICP, and the receiver operating characteristic (ROC) curve and logistic regression analysis were used to screen out the bile acids as the markers for the early diagnosis of ICP. **Results:** Compared with the normal pregnant women, the pregnant women with early-stage ICP had significant increases in the serum levels of taurocholic acid, glycocholic acid, glycine-conjugated bile acid with three hydroxyl-3 (Gtri-3), and glycine-conjugated bile acid with three hydroxyl-5 (Gtri-5, $P < 0.05$), while no significant changes were observed in the pregnant women with liver dysfunction. The ICP diagnostic model had a sensitivity of 85.7% and a specificity of 95.2% in the diagnosis of early-stage ICP. Gtri-3 and taurine-conjugated bile acid with three hydroxyl-2 (Ttri-2) were selected as the markers for the early diagnosis of ICP, with a sensitivity of 92.9% and a specificity of 90.5%. **Conclusion:** The metabolic profiling analysis of serum bile acids is a highly specific and sensitive method for the early diagnosis of ICP.

作者简介:何一帆, Email: mors_hyf@hotmail.com,

研究方向:生物活性物质的分析方法研究。

通信作者:丁 敏, Email: dingmin@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81401228);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(博导类)资助项目(编号:20115503110013)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181103.1452.012.html>
(2018-11-06)

【Key words】intrahepatic cholestasis of pregnancy; serum bile acid; metabolic profiling analysis; early diagnosis

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是一种常见且严重的妊娠期特发疾病,患者常表现为妊娠中晚期出现不明原因的皮肤瘙痒、血清总胆汁酸(total bile acids, TBA)升高和肝功能紊乱,产后迅速恢复正常^[1]。该病的主要危害是影响围产儿预后,导致早产、羊水粪染、胎儿宫内窘迫,甚至不明原因的胎儿宫内死亡^[2]。ICP 在我国重庆、成都和上海地区发病率较高,为 3.2%~6.3%^[3]。

血清 TBA 是目前诊断 ICP 最重要的实验室指标^[4]。然而在临床实践中发现,在 ICP 发病早期,部分患者的血清 TBA 水平并未升高,仅出现转氨酶、胆红素或 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyltranspeptidase, γ -GT)等肝功能指标异常,且临床表现不典型。这些早期表现与妊娠期一些不明原因的肝功能紊乱相似,以致临床常无法准确鉴别两者。在肝功能异常的孕妇中,早期准确地识别 ICP 患者有利于尽早选择合适的治疗干预措施,对改善妊娠不良结局有重要意义^[5]。

前期研究发现,ICP 患者具有独特的血清胆汁酸代谢轮廓^[6]。然而,尚不明确 ICP 早期胆汁酸代谢是否发生特征性改变,及代谢轮廓分析是否适用于早期 ICP 识别。因此,本研究采用超高效液相色谱-三重四级杆-飞行时间质谱(ultrahigh performance liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-TripleTOF-MS/MS)方法对 ICP 患者和妊娠中晚期肝功能紊乱孕妇的血清胆汁酸代谢轮廓进行全面分析,应用建立的 ICP 诊断模型和筛选的成分胆汁酸标志物,在肝功能异常孕妇中对早期 ICP 病例进行诊断,并考察其诊断效能。

1 材料与方法

1.1 研究对象

136 名研究对象均为 2016 年 3 月至 2017 年 1 月重庆医科大学附属第一医院产科门诊、住院孕产妇,包括:健康孕妇(对照组)50 例;妊娠期肝内胆汁淤积患者(ICP 组)51 例;妊娠中晚期出现肝功能异常,但首诊时总胆汁酸未升高,且无其他异常临床表现的孕妇 35 例,其中 14 位孕妇在首诊 2~4 周后出现明显的瘙痒或黄疸症状,总胆汁酸水平升高超出正常范围($>10 \mu\text{mol/L}$),临床综合其表现诊断为 ICP,设为早期 ICP 组;另 21 位孕妇的总胆汁酸水平持续保持正常且无特殊临床症状,为不明原因的肝功能紊乱,设为肝功紊乱组。ICP 的诊断标准遵循中华医学会妇产科学分会发布的“妊娠期肝内胆汁淤积症诊疗指南(2015)”^[7]。研究对象均排除病毒性肝

炎、妊娠期急性脂肪肝、妊娠期高血压、妊娠期糖尿病、孕妇药物性黄疸及其他内科合并症或并发症。调查研究对象的临床信息包括基本资料、常规实验室检查结果、妊娠结局和产后恢复情况等。收集 ICP 组、早期 ICP 组和肝功能紊乱组患者首诊未经治疗时的空腹静脉血,及对照组孕妇的同期空腹静脉血。静脉血经离心后取上清,置于 -80°C 冰箱保存备用。本研究已获得所有研究对象的知情同意,重庆医科大学伦理委员会批准通过。

1.2 实验器材

1.2.1 实验仪器 Shimadzu CBM20A Lite 超高效液相色谱系统(日本 Shimadzu 公司), Kinetex UPLC XB-C18 色谱柱($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$, 美国 Phenomenex 公司), TripleTOF 5600 高分辨质谱仪(美国 AB Sciex 公司)配有 ESI 源与 Analyst 1.5 分析软件, Agilent 固相萃取装置(美国 Agilent 公司), Bond Elut-C18 固相萃取小柱($200 \text{ mg}/3 \text{ mL}$, 美国 Agilent 公司), SB-3200 超声波清洗器(宁波新芝科器研究所), Millipore 超纯水制备装置(美国 Millipore 公司), ISS110P1 真空离心浓缩仪器(美国 Thermo 公司)。

1.2.2 实验试剂 27 种胆汁酸标准品包括游离的胆酸(cholic acid, CA)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)、脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)、石胆酸(lithocholic acid, LCA)、熊脱氧胆酸(urusodeoxycholic acid, UDCA)、猪胆酸(Hyocholic acid, HCA)、脱氢胆酸(hyodesoxycholic acid, HDCA)与其牛磺结合型(tauro-, T-)胆汁酸、甘氨酸结合型(glyco-, G-)胆汁酸,及 α -鼠胆酸(α -muricholic acid, α -MCA)、 β -鼠胆酸(β -muricholic acid, β -MCA)、 ω -鼠胆酸(ω -muricholic acid, ω -MCA)、牛磺结合型 α -鼠胆酸(α -taumuricholic acid, T- α -MCA)、牛磺结合型 ω -鼠胆酸(ω -taumuricholic acid, T- ω -MCA)、3-硫酸化牛磺结合型石胆酸(tauroolithocholic acid 3-sulfate, TLCA-3S)购自美国 Sigma 公司和美国 Steraloids 公司。甲醇为色谱纯,购自美国 Fisher 公司。甲酸为质谱纯,乙酸铵为色谱纯,均购自美国 Sigma 公司。实验用水为经 Millipore 系统纯化的超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 成分胆汁酸的检测 采用本课题组前期研究已建立的 UPLC-TripleTOF-MS/MS 方法对血清中的 27 种已知胆汁酸进行定量检测,对 29 种可能的胆汁酸通过二级质谱进行鉴定和半定量分析^[7]。

1.3.2 方法学评价与质控 所采用的血清胆汁酸的质谱检测方法的日内变异系数为 2.2%~16.7%, 日间变异系数为 4.3%~16.1%, 平均回收率为 83.2%~118.0%。取 25 位健康孕妇与 25 位 ICP 患者的血清各 $100 \mu\text{L}$ 混合后制备质控血清,经同样的预处理,每进行 10 例孕妇样本的质谱检测即进样 1 例质控样本,以监测和评估质谱检测方法的稳定性。质控样本中定量胆汁酸的变异系数为 1.2%~12.7%, 半定量胆汁酸的变异系数为 1.3%~12.9%。

1.4 统计学处理

成分胆汁酸的质谱数据采用 PeakView 2.1 与 MultiQuant

3.0 软件(美国 AB Sciex 公司)进行定性和定量分析。采用 SIMCA-P 12.0 软件(瑞典 Umetrics 公司)进行有监督的偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA),分析结果以二维得分图(score plot)表示。其他统计学分析采用 SPSS 21.0 软件(美国 IBM 公司)。数据的正态性检验采用 Kolmogorov-Smirnov 检验。本研究计量资料大多数为非正态分布,均采用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。计量资料采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验,组间两两比较采用 Kruskal-Wallis H 检验平均秩多重比较。计数资料的检验及组间两两比较根据数据特点选择采用 Pearson 卡方检验、经连续校正的卡方检验或 Fisher 精确概率法。检验水准 $\alpha=0.05$;多组间两两比较采用经 Bonferroni 校正的检验水准。对于筛选的差异胆汁酸,采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析并评价其诊断的灵敏度与特异性。联合诊断标志物采用二元 logistic 回归分析。

2 结果

2.1 临床信息

孕妇的临床信息和妊娠结局见表 1。4 组孕妇的年龄无统计学差异。首诊肝功能检查结果显示,早期 ICP 患者与肝功紊乱孕妇的主要肝功能检查指标如丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、 γ -GT 均明显高于对照组,但 TBA 水平与对照组无统计学差异。ICP 患者和早期 ICP 患

者的生产孕周早于对照组,不良妊娠结局的发生率高于对照组,差异有统计学意义。而肝功紊乱组与对照组的产信息无统计学差异。ICP 患者和肝功紊乱孕妇的肝功能均在产后 2.5(1.3, 4.6)周内恢复正常。

2.2 血清胆汁酸代谢轮廓分析

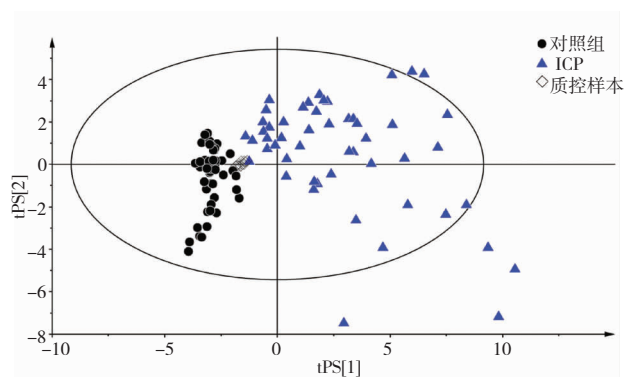
2.2.1 建立 ICP 的 PLS-DA 诊断模型 基于质谱检测的 27 种已知胆汁酸与鉴定的 29 种可能的胆汁酸的定量与半定量信息,采用 PLS-DA 分析 ICP 组与对照组的血清胆汁酸代谢轮廓差异。经过 100 次交叉验证后,构建的 PLS-DA 模型变量的参数 $R^2Y=0.757$, $Q^2(\text{cum})=0.646$,提示该模型具有较好的解释能力和预测能力。其二维得分图(图 1A)显示 ICP 组与对照组可较好地地区分,表明血清胆汁酸代谢轮廓在 2 组间具有明显差异。该模型对 ICP 的诊断正确率为 96.1%,对对照组的诊断正确率为 100%,总体诊断正确率为 98.0%。该模型经过 100 次置换验证(图 1B),结果表明未产生数据的过度拟合。另一方面,图 1A 可见质控样本紧密聚合,变异极小,证实质谱检测方法稳定可靠。

2.2.2 对早期 ICP 进行预测 将建立诊断 ICP 的 PLS-DA 模型应用于预测早期 ICP。二维得分图(图 2)显示,早期 ICP 孕妇与 ICP 孕妇重叠,提示早期 ICP 的血清胆汁酸代谢轮廓与 ICP 相似;而肝功紊乱孕妇与对照组基本重叠,提示这些孕妇的血清胆汁酸代谢轮廓基本正常。早期 ICP 组与肝功紊乱组的区分较为明显。将模型对这些孕妇的预测结果与临床诊断结果进行对比(表 2),结果显示一致性良好($\kappa=0.819$, $P<0.001$),该模型用于 ICP 的早期诊断具有较好的灵敏度(85.7%)和特异性(95.2%)。

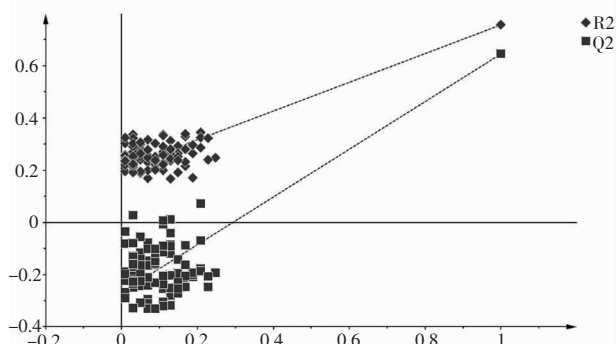
表 1 136 名受试孕妇的肝功能检查与妊娠信息

妊娠期信息	对照组 ($n=50$)	ICP ($n=51$)	早期 ICP ($n=14$)	肝功紊乱 ($n=21$)	$H\chi^2$ 值	P 值
年龄(岁)	28.0 (27.0, 32.0)	28.0 (26.0, 31.0)	28.5 (25.8, 33.3)	28.0 (27.0, 31.5)	0.387	0.943
生产孕周	39.7 (39.0, 40)	37.0 (36.0, 37.4) ^a	37.1 (36.7, 38.5) ^a	39.0 (38.0, 39.4)	68.207	0.000
肝功检查孕周	31.5 (30.0, 32.0)	32.0 (30.0, 34.0)	32.0 (30.0, 36.0)	32.0 (30.0, 32.0)	4.465	0.215
肝功检查结果						
TBA ($\mu\text{mol/L}$)	3.2 (2.2, 4.0)	15.8 (13.2, 23.9) ^a	5.4 (4.0, 7.0)	4.6 (2.1, 6.8)	94.956	0.000
ALT (U/L)	13.0 (10.0, 19.5)	136.0 (104.8, 242.0) ^a	132.5 (76.3, 193.5) ^a	122.0 (80.5, 195) ^a	88.569	0.000
AST (U/L)	17.0 (15.0, 21.0)	93.0 (60.8, 158.0) ^a	107.0 (43.3, 120.0) ^a	77.0 (57.0, 119.0) ^a	85.465	0.000
TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	6.8 (5.7, 9.7)	11.2 (8.5, 14.5) ^a	8.1 (7.0, 12.1)	9.7 (8.5, 13.2) ^a	33.020	0.000
DBIL ($\mu\text{mol/L}$)	1.7 (1.4, 2.4)	5.0 (2.7, 8.0) ^a	4.1 (2.1, 9.5) ^a	3.1 (2.4, 3.4) ^a	49.658	0.000
γ -GT (U/L)	13.0 (10.0, 20.5)	37.0 (25, 87.3) ^a	31.0 (16.5, 47) ^a	36.0 (16.5, 45.5) ^a	44.796	0.000
妊娠结局($n, \%$)						
剖宫产	13 (26.0)	32 (62.7) ^a	10 (71.4) ^a	8 (38.1)	17.957	0.000
自发性早产	0 (0.0)	7 (13.7)	2 (14.3)	1 (4.8)	9.052	0.015
医源性早产	0 (0.0)	14 (27.5) ^a	2 (0.0)	2 (9.5)	18.584	0.000
胎儿窘迫	0 (0.0)	5 (9.8)	2 (14.3)	1 (4.8)	7.077	0.037
Apgar<7	2 (4.0)	5 (9.8)	0 (0.0)	1 (4.8)	1.877	0.577
羊水粪染	4 (8.0)	21 (41.2) ^a	3 (21.4)	3 (14.3)	16.465	0.001
产后出血>500 mL	0 (0.0)	6 (11.8)	1 (7.1)	1 (4.8)	6.747	0.055
不良妊娠结局	5 (10.0)	33 (64.7) ^a	9 (64.3) ^a	7 (33.3)	35.634	0.000

注:表中定量数据用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示;对照组与其余 3 组的比较采用经 Bonferroni 校正的检验水准 $\alpha=0.05/3=0.017$;a, 与对照组比较 $P<0.017$



A. ICP 患者与正常孕妇血清胆汁酸的 PLS-DA 得分图



B. ICP 患者与正常孕妇血清胆汁酸的 PLS-DA 置换验证结果

图 1 51 位 ICP 患者与 50 位健康孕妇血清胆汁酸代谢轮廓的 PLS-DA 得分图与置换验证结果

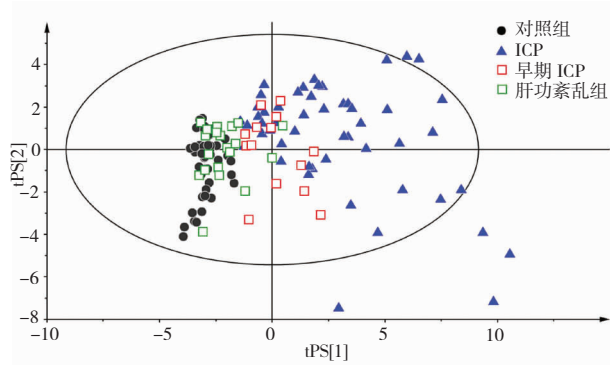


图 2 应用构建的 PLS-DA 模型对早期 ICP 孕妇和肝功能紊乱孕妇进行预测的得分图

表 2 PLS-DA 模型对早期 ICP 孕妇和肝功能紊乱孕妇的预测结果与临床诊断结果的比较 (n)

模型预测	临床诊断		合计
	早期 ICP	肝功能紊乱	
ICP	12	1	13
正常	2	20	22
合计	14	21	35

2.3 差异胆汁酸分析

2.3.1 差异胆汁酸的血清含量 主要差异胆汁酸在 4 组中的血清含量及组间对比见表 3。其中,ICP 患者血清中的已知胆汁酸如 GCA、TCA 和 THCA,及鉴定胆汁酸如甘氨酸结合型三羟基胆汁酸-3(Gtri-3)、甘氨酸结合型三羟基胆汁酸-5(Gtri-5)和甘氨酸结合型三羟基胆汁酸-7(Gtri-7)升高幅度较大,与对照组的差异有统计学意义。且这些胆汁酸含量在早期 ICP 即升高,与对照组有统计学差异。而与对照组比,肝功能紊乱孕妇的这些胆汁酸均无统计学差异。图 3 可见其明显的变化趋势。以上结果提示,这些成分胆汁酸可能有助于早期 ICP 的诊断。

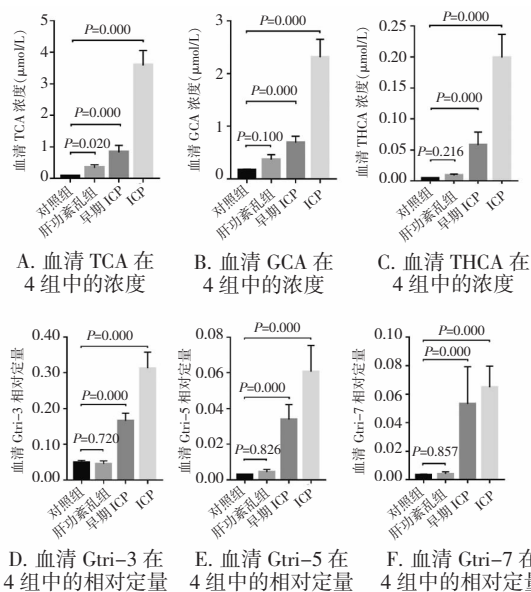
柱状图采用平均值 ± 标准误表示;采用经 Bonferroni 校正的检验水准 $\alpha=0.05/3=0.017$

图 3 主要差异胆汁酸在对照组、不明原因肝功能紊乱孕妇、早期 ICP 患者与 ICP 患者中的改变趋势

表 3 主要差异胆汁酸在对照组、ICP 患者、早期 ICP 患者与不明原因肝功能紊乱孕妇中的血清含量

胆汁酸	对照组 (n=50)	ICP (n=51)	早期 ICP (n=14)	肝功能紊乱 (n=21)	H 值	P 值
TCA (μmol/L)	0.019(0.000,0.062)	3.074(0.815,4.996) ^a	0.621(0.168,1.232) ^a	0.121(0.031~0.452)	93.773	0.000
GCA (μmol/L)	0.115(0.069,0.217)	1.607(0.762,3.217) ^a	0.670(0.221,1.051) ^a	0.175(0.102~0.594)	84.955	0.000
THCA (μmol/L)	0.002(0.001,0.005)	0.113(0.030,0.253) ^a	0.038(0.007,0.081) ^a	0.005(0.001~0.013)	84.773	0.000
Gtri-3 (A/A _S)	0.039(0.014,0.075)	0.181(0.104,0.424) ^a	0.141(0.101,0.257) ^a	0.039(0.011~0.061)	67.573	0.000
Gtri-5 (A/A _S)	0.002(0.001,0.004)	0.013(0.002,0.077) ^a	0.030(0.006,0.057) ^a	0.002(0.000~0.005)	35.081	0.000
Gtri-7 (A/A _S)	0.002(0.000,0.005)	0.014(0.003,0.105) ^a	0.021(0.003,0.048) ^a	0.002(0.000~0.005)	41.728	0.000

注:表中定量数据用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示;A/A_S 为胆汁酸峰面积/内标峰面积;对照组与其余 3 组的比较采用经 Bonferroni 校正的检验水准 $\alpha=0.05/3=0.017$;a,与对照组比较, $P<0.017$

2.3.2 ICP 诊断与早期识别的 ROC 分析 结合 PLS-DA 模型的 VIP(variable importance in projection)值与成分胆汁酸的组间对比结果,筛选出具有明显组间差异($VIP>1, P<0.01$)的胆汁酸进行 ROC 分析。分别绘制诊断 ICP 与早期 ICP 的 ROC 曲线(图 4),并探讨成分胆汁酸的曲线下面积(area under the curve, AUC)及在 cut-off 值的灵敏度与特异性(表 4)。其中, TCA 诊断 ICP 效能最高($AUC=0.991$, 图 4A), 当 cut-off 值为 $0.329 \mu\text{mol/L}$ 时, 其诊断 ICP 的灵敏度和特异性均 $>95\%$ 。但 TCA 应用于早期识别 ICP 时效果不理想($AUC=0.762$, 图 4B), 灵敏度和特异性均 $<70\%$ 。Gtri-3 诊断 ICP 和早期 ICP 的效能均较好(AUC 分别为 0.897 和 0.942), cut-off 值取 0.092 时, 灵敏度和特异性均 $>80\%$ 。为进一步探讨成分胆汁酸联合诊断早期 ICP 的价值, 采用 logistic 回归分析筛选出 Gtri-3 和牛磺结合型三羟基胆汁酸-2 (Ttri-2) 组成联合指标, 对早期 ICP 的诊断效能较高($AUC=0.966$), 灵敏度和特异性均 $>90\%$, 提示该联合指标可作为 ICP 早期诊断潜在的标志物。

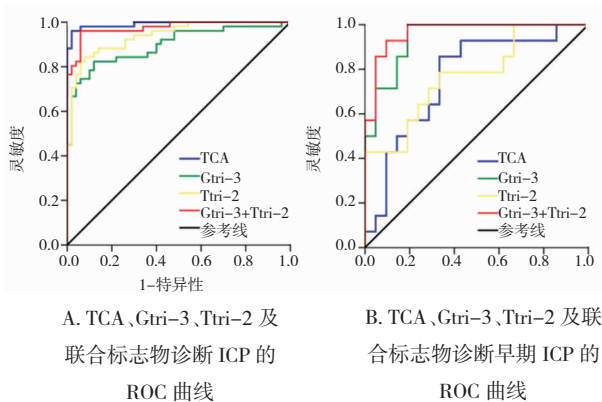


图 4 胆汁酸标志物诊断 ICP 和识别早期 ICP 的 ROC 曲线

3 讨论

ICP 是临床引起胎儿不良结局最严重的疾病之一^[1-2]。因此, ICP 患者的早期发现是临床十分重视的问题^[4]。在妊娠 28~32 周常规测定包括 TBA 在内的肝功能指标, 有利于 ICP 的早期筛查。然而, TBA 作为诊断 ICP 最重要的实验室依据, 也存在一定局限性。2015 年的 ICP 诊疗指南提出, 即使 TBA 水平正常, 发生不明原因的肝功能异常时, ICP 的诊断亦不能排除^[4]。研究者在临床实践中发现, 部分 ICP 患者在早期发病的一段时间内, TBA 水平均在正常范围。这部分患者要长期观察和密切随访才能确定合适的临床诊疗措施。因此, 本课题组关注早期 ICP 患者的胆汁酸代谢轮廓改变, 以期找到更好的识别方法。

生理条件下, 人体体液中成分胆汁酸的合成、摄取、排泄和重吸收等代谢过程受到机体多重负反馈机制的精细调节, 使其在肠肝循环中保持动态平衡^[10]。ICP 的病因和发病机制目前尚未有定论, 可能与遗传、激素及环境因素有关^[4, 11-14]。多种编码胆汁酸转运蛋白的相关基因如 ABCB4、ABCB11、ABCC2、FIC1 的突变导致胆汁酸吸收或排泄过程受阻, 引发肝内胆汁淤积^[11-13]。妊娠期间异常升高的硫酸孕酮代谢物可作为法尼醇受体的部分激动剂, 竞争性抑制胆汁酸摄取和排泄, 导致肝内和外周血的胆汁酸水平升高和肝损伤^[14]。这些因素引起的胆汁酸代谢

表 4 主要差异胆汁酸在 ICP 患者与健康孕妇的 ROC 分析及应用其 Cut-off 值早期诊断 ICP 的效能

胆汁酸	诊断 ICP ($n=101$)							预测早期 ICP ($n=35$)	
	倍数	VIP	AUC	cut-off 值	灵敏度 (%)	特异性 (%)	P 值	灵敏度 (%)	特异性 (%)
TCA	60.0	1.446	0.991 (0.978~1.000)	0.329	96.1	98.0	0.000	64.3	66.7
GCA	13.8	1.292	0.979 (0.955~1.000)	0.392	98.0	90.0	0.000	71.4	66.7
Ttri-3	24.9	1.471	0.978 (0.955~1.000)	0.004	90.2	98.0	0.000	64.3	71.4
THCA	49.0	1.157	0.973 (0.935~1.000)	0.015	94.1	98.0	0.000	64.3	85.7
GHCA	12.4	1.332	0.970 (0.940~1.000)	0.043	92.2	94.0	0.000	57.1	76.2
Ttri-4	28.5	1.285	0.951 (0.902~0.999)	0.003	86.3	96.0	0.000	64.3	61.9
Ttri-2	10.1	1.325	0.939 (0.895~0.982)	0.020	82.4	94.0	0.000	57.1	81.0
Ttri-5	14.0	1.332	0.898 (0.833~0.964)	0.006	78.4	94.0	0.000	57.1	81.0
Gtri-3	6.3	1.225	0.897 (0.834~0.960)	0.092	82.4	88.0	0.000	85.7	85.7
TUDCA	29.1	0.977	0.875 (0.810~0.940)	0.011	80.4	82.0	0.000	78.6	66.7
Gtri-7	19.7	1.015	0.822 (0.738~0.906)	0.009	64.7	92.0	0.000	64.3	90.5
Gtri-5	21.1	0.928	0.783 (0.691~0.875)	0.008	56.9	96.0	0.000	78.6	81.0
Gtri-3+Ttri-2	-	-	0.966 (0.914~1.000)	0.286	96.1	92.0	0.000	92.9	90.5

紊乱可使 ICP 呈现出独特的胆汁酸代谢轮廓。Tribe 等^[9]报道 ICP 患者从妊娠 24 周起出现明显的血清成分胆汁酸的改变。田刚等^[15]发现 ICP 患者与乙肝患者的血清胆汁酸代谢轮廓具有明显差异,且轮廓分析具有较高的鉴别诊断效能。本研究表明,在 ICP 发病早期,TBA 尚在正常范围时,孕妇血清胆汁酸代谢已开始产生紊乱,其代谢轮廓的改变趋势与典型 ICP 相近。这提示胆汁酸代谢轮廓分析诊断 ICP 不仅灵敏度高,且能将其与妊娠期其他肝病进行鉴别,有潜力补充 TBA 无法诊断早期 ICP 并鉴别诊断妊娠期肝功紊乱的不足。

文献报道,ICP 患者的肠肝循环平衡被打破,胆汁酸在肝脏内病理性淤积并溢出至外周血中,使血清胆汁酸水平升高,以 CA 的甘氨酸结合型(GCA)和牛磺结合型(TCA)为主。同时,升高的胆汁酸水平刺激机体负反馈调节,抑制胆汁酸合成关键酶胆固醇 7 α -羟化酶的活性,使游离的 CA、CDCA 的合成减弱^[9,16]。另一方面,与游离型胆汁酸相比,结合型胆汁酸尤其是甘氨酸、牛磺结合型三羟基胆汁酸具有较大的亲水性与较弱的毒性,可刺激肝胆管对胆汁酸的转运,这些胆汁酸的水平升高是胆汁淤积的标志,也是机体的自我保护体现^[17]。本研究表明,结合型三羟基胆汁酸 GCA、TCA、THCA 及鉴定的 Gtri-3、5、7 在 ICP 发生时升高得更早、幅度更大,这符合并拓展了前期研究^[7,9,15]。与早期 ICP 形成对比的是,本研究中肝功能紊乱孕妇的这些成分胆汁酸的血清水平并未改变,代谢轮廓与健康孕妇也无明显差异,提示这类孕妇的肝功能紊乱可能与胆汁酸代谢无关,可排除 ICP,需要进行其他病因学检测。

本研究基于 56 种血清胆汁酸建立的轮廓模型和筛选出的联合标志物 Gtri-3、Ttri-2 对 ICP 的诊断具有较好的灵敏度和特异性,有助于识别早期 ICP,使 ICP 的诊断更精准完善,治疗更及时有效。后续将扩大样本量和病种,对本研究的结论进一步验证。

参 考 文 献

[1] Geenes V, Chappell LC, Seed PT, et al. Association of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy with adverse pregnancy outcomes: a prospective population-based case-control study[J]. *Hepatology*, 2014, 59(4): 1482-1491.

[2] Brouwers L, Koster MP, Page-Christiaens GC, et al. Intrahepatic

cholestasis of pregnancy: maternal and fetal outcomes associated with elevated bile acid levels[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(1): 100.e1-7.

[3] Feng D, He W. Asymptomatic elevated total serum bile acids representing an unusual form of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2016, 134(3): 343-344.

[4] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠期肝内胆汁淤积症诊疗指南(2015)[J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(7): 481-485.

[5] 何灿丽. 妊娠期肝内胆汁淤积症早期诊断与治疗[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2014, 54(7): 54-57.

[6] 崔悦, 王文娟, 田刚, 等. 基于母胎胆汁酸代谢轮廓的妊娠肝内胆汁淤积症分度研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(3): 228-233.

[7] Gao J, Xu B, Zhang X, et al. Association between serum bile acid profiles and gestational diabetes mellitus: A targeted metabolomics study[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 459: 63-72.

[8] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153-161.

[9] Tribe RM, Dann AT, Kenyon AP, et al. Longitudinal profiles of 15 serum bile acids in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(3): 585-595.

[10] de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism[J]. *Cell Metab*, 2013, 17(5): 657-669.

[11] Wasmuth HE, Glantz A, Keppeler H, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: the severe form is associated with common variants of the hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4 gene[J]. *Gut*, 2007, 56(2): 265-270.

[12] Paulusma CC, de Waart DR, Kunne C, et al. Activity of the bile salt export pump(ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(15): 9947-9954.

[13] Meng Q, Liu Q, Wang C, et al. Molecular mechanisms of biliary excretion of cefditoren and the effects of cefditoren on the expression levels of hepatic transporters[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2010, 25(4): 320-327.

[14] Abu-Hayeh S, Ovadia C, Lieu T, et al. Prognostic and mechanistic potential of progesterone sulfates in intrahepatic cholestasis of pregnancy and pruritus gravidarum[J]. *Hepatology*, 2016, 63(4): 1287-1298.

[15] 田刚, 甄乾娜, 班艳娜, 等. 血清胆汁酸代谢轮廓分析在妊娠肝内胆汁淤积症诊断中的应用[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(5): 586-588.

[16] Crosignani A, Del Puppo M, Longo M, et al. Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 382(1-2): 82-88.

[17] Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, et al. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(7): 804-816.

(责任编辑:冉明会)