技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）05-0586-03

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

田 刚，甄乾娜，班艳娜，唐秀芳，丁 敏
（重庆医科大学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨血清胆汁酸代谢轮廓分析在妊娠肝内胆汁淤积症（Intrahepatic cholestasis of pregnancy，ICP）诊断中的作用。方法：应用柱前衍生 HPLC-荧光检测法测定 ICP 患者，乙肝孕妇和正常孕妇（各 11 例）血清胆汁酸谱（5 种游离型和 4 种甘氨结合型），结合主成分分析法（Principal component analysis，PCA）和偏最小二乘判别分析法（Partial least-squares discriminant analysis，PLS-DA）对血清胆汁酸谱进行分析。结果：血清胆汁酸代谢轮廓分析可区分 ICP 患者，乙肝孕妇和正常孕妇，其模型的正确诊断率和预测能力分别为 97.0%和 75.3%。结论：血清胆汁酸代谢轮廓分析有助于 ICP 的诊断和鉴别诊断。

【关键词】胆汁酸；代谢轮廓分析；血清；妊娠肝内胆汁淤积症；乙型肝炎
【中国图书分类法分类号】R714.255 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-26

Intrahepatic cholestasis of pregnancy diagnosis based on metabolic profiling of serum bile acid

TIAN Gang, ZHEN Qian-na, BAN Yan-na, TANG Xiu-fang, DING Min
(*Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the feasibility of metabolic profiling of serum bile acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) diagnoses. *Methods*: High performance liquid chromatography (HPLC) with post column derivatisation and fluorescence detection were used to determinate 5 free and 4 glycine-conjugated serum bile acids in 11 healthy pregnant women, 11 patients with ICP and 11 patients with hepatitis B. Data sets were analyzed by principal component analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA). *Results*: PCA and PLS-DA models showed a clear separation among ICP group, hepatitis B group and healthy controls, and PLS-DA model provided an accuracy of 97.0% for the diagnosis of diseases and a prediction power of 75.3%. *Conclusion*: Metabolic profiling analysis of serum bile acid is useful for diagnosis of ICP.

【Key words】bile acid; metabolic profiling analysis; serum; intrahepatic cholestasis of pregnancy; hepatitis B

妊娠肝内胆汁淤积症（Intrahepatic cholestasis of pregnancy，ICP）是妊娠期特有的疾病，其危害主要是导致早产，胎儿宫内窘迫和胎死宫内[1]。ICP 的诊断主要基于妊娠期皮肤瘙痒和显著升高的血清总胆汁酸水平[2]。由于胆汁酸主要反映肝胆系统疾病，如妊娠期急性脂肪肝、重度妊高症肝损害，妊娠期合并病毒性肝炎和胆石症时血清总胆汁酸均增高，因此，血清总胆汁酸对于 ICP 的诊断特异性较差。

研究表明，不同疾病时血清总胆汁酸可能相同但其谱却各不相同[3]，血清胆汁酸谱可能有助于 ICP 的诊断和鉴别诊断。本研究采用柱前衍生 HPLC-荧光检测法测定 ICP 患者，乙肝孕妇和正常孕妇的血清胆汁酸代谢谱，结合主成分分析（Principal component analysis，PCA）和偏最小二乘法判别分析（Partial least-squares discriminant analysis，PLS-DA）区分 ICP 患者，乙肝孕妇和正常孕妇，并初步探讨血清胆汁酸代谢轮廓分析对 ICP 的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 材料

LC-6A 高效液相色谱仪，附 RF-535 荧光检测器（日本岛津公司）；Waters Nova C18 色谱柱（美国 Waters 公司）；Varian Elut Bond 3CC C18 固相萃取小柱（美国 Varian 公司）；Millipore 纯水装置（美国 Millipore 公司）。胆酸（Cholic acid，CA）、脱氧胆酸（Deoxycholic acid，DCA）、鹅脱氧胆酸（Chenodeoxycholic acid，CDCA）、熊脱氧胆酸（Ursodeoxycholic acid，UDCA）、石胆酸（Lithocholic acid，LCA）、甘氨胆酸（Glycocholic acid，GCA）、甘氨脱氧胆酸（Glycodeoxycholic acid，GDCA）、甘氨鹅脱氧胆酸（Glycochenodeoxycholic acid，GCDCA），甘氨石胆酸（Glycolithocholic acid，GLCA）标准品均购自美国 Sigma 公司。衍生剂 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素（4-bromomethyl-7-

作者介绍：田 刚（1982-），男，硕士，研究方向：胆汁酸的分离检测。
通信作者：丁 敏，女，教授，Email: dingmin@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：20475069）。

methoxycoumarin,BMC）和催化剂 18-冠醚-6（Dicuclohexano-18-crown-6,DCC）。甲醇、乙腈（色谱纯，美国天地公司）、氢氧化钾，磷酸二氢钾和月桂酸均为国产分析纯。

1.2 样品来源和分组

1.2.1 样本来源 ICP 患者，乙肝孕妇和正常孕妇各 11 例，均来自于重庆医科大学附属第一医院。

1.2.2 ICP 组 年龄 21~31 岁，平均（26±2）岁，孕龄 31~39 周，平均（36±2）周。纳入标准：①妊娠中晚期出现瘙痒，无原发引起瘙痒的皮肤病。②血清胆红素轻中度增高或正常。③转氨酶正常或轻中度增高（2~5 倍）。④总胆汁酸浓度增高。⑤病毒性肝炎指标均为阴性。⑥无内科合并症或并发症。排除标准：①病毒性肝炎；②妊娠期急性脂肪肝；③孕妇药物性黄疸、孕高症；④有继发性肝损伤的疾病。

1.2.3 乙型肝炎患者组（乙肝组） 年龄 22~31 岁，平均（25±2）岁，孕龄 31~39 周，平均（36±2）周。纳入标准：乙肝表面抗原（HBsAg）为阳性（ELISA 方法），转氨酶轻中度增高（2~5 倍），无其它型肝炎，无内科合并症或并发症，无其它疾病原因引起的肝损伤。

1.2.4 正常孕妇组（正常组） 年龄 22~31 岁，平均（25±2）岁，孕龄 35~39 周，平均（37±2）周。纳入标准：孕龄大于 35 周。排除标准：病毒性肝炎、妊娠期急性脂肪肝、孕妇药物性黄疸、孕高症、ICP，无内科合并症或并发症。

1.3 方法

血清游离和甘氨结合型胆汁酸的测定采用已建立的柱前衍生 HPLC-荧光检测法[4]。

1.4 统计分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析，血清胆汁酸含量以中位数±四分位数间距表示（M±Q），3 组比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验，任意两组比较采用 Nemenyi 秩和检验，$P<0.05$ 具有统计学意义。采用 SIMCA P12.0 软件对血清胆汁酸定量结果进行 PCA 和 PLS-DA 分析。

2 结 果

2.1 血清胆汁酸代谢谱

9 种胆汁酸定量分析结果如表 1 所示。GCA、GDCA、CA，CDCA 和 GCDCA 在 3 组间比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。ICP 组 GCA 和 GCDCA 与正常组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。ICP 组 GCA、CA，CDCA 和 GCDCA 与乙肝组比较，差异也有统计学意义（$P<0.05$），GCA 较正常组和乙肝组分别有 15 倍和 4 倍的升高，而 CA 和 CDCA 则明显低于乙肝组。乙肝组与正常组比较 GCA、CA，GDCA 和 GCDCA 显著升高（$P<0.05$）。

2.2 PCA 和 PLS-DA 分析结果

PCA 是一种降维思想，从指标之间的相互关系入手将多个测定指标转化为少数几个互不相关的综合指标（即主成分）以反映原始指标所提供的信息。在 PCA 中，通过数据变换和坐标轴旋转等方式，使得高维空间的数据信息最大程度地投影在二维或三维空间，从而直观地显示个体的分布特点。利用 SIMCA 软件对 9 种胆汁酸定量结果进行 PCA 分析，以贡献率最大的前 2 个主成分（PC1、PC2）作图，可见 ICP 组主要聚集在左上角，而乙肝组则聚集在右下角，ICP 组和乙肝组组内个体较正常组分散，但均能较好地聚类并与正常对照组完全区分（图 1）。利用 PLS-DA 模型对个体属性进行判断，3 组均能较好地区分（图 2），该模型的准确率为 97.0%，预测能力为 75.3%。利用内代法对模型的正确性进行验证，其误判率为 3%。

在 PLS-DA 模型中，利用变量的重要性（Variable importance in the projection，VIP）和载荷图（Loadings plot，PLS weights w×c）筛选潜在的标志物。依据 VIP 值≥1 和—w×c[1]—>0.25[5,6]，GCA、CA，CDCA 和 GDCA 被初步选定为潜在的标志物，四种胆汁酸组分在秩和检验中的 P 值均小于 0.05。结合胆汁酸变量和疾病组在载荷图中的位置，寻找与疾病最相关的标志物。GCA 离 ICP 组最近，可能是诊断 ICP 最有价值的胆汁酸。CA，CDCA 和 GDCA 离乙肝孕妇组最近，有助于鉴别诊断 ICP 和乙肝孕妇（图 3）。

3 讨 论

ICP 是妊娠期特有的肝功能紊乱性疾病，发病机制与雌激素水平，环境因素和基因突变等密切相关[7]。体内胆固醇 7α-羟化酶是胆汁酸合成的限速酶，该酶受雌激素和胆汁酸等的负反馈调节[8]。ICP 时，过高的雌激素和胆汁酸抑制胆固醇 7α-羟化酶的活性，游离胆汁酸的合成减少，血清中 CA 和 CDCA 降低。甾醇 12α-羟化酶的作用是促进 CDCA 转化成 CA，CA 在细胞色素酶（P450）的作用下转化成 GCA[9]。因此，ICP 时血清中显著升高的 GCA 水平可能与甾醇 12α-羟化酶和 P450 的活性增加有关。另外，胆盐输出泵基因（Bile salt

表 1 ICP 组，乙肝组和正常组血清胆汁酸浓度比较（μmol/L，M±Q）

	GCA	GDCA	CA	CDCA	GCDCA	UDCA	GLCA	DCA	LCA
正常组	1.39±1.77	0.37±0.28	1.14±1.03	0.46±0.37	0.77±0.63	0.014±0.60	0.29±0.42	0.28±0.21	0.99±0.46
乙肝组	4.93±1.80	2.16±1.53	3.24±1.76	1.39±2.37	5.10±1.85	0.38±0.31	0.16±0.47	0.29±0.33	0.75±0.91
P值	0.036▲	0.005▲	<0.001▲	0.053	0.022▲				
ICP组	20.46±20.92	0.34±1.40	0.31±0.28	0.27±0.67	6.39±3.33	0.22±0.55	0.32±0.54	0.37±0.42	1.37±1.65
P值	<0.001■	0.940	0.053	0.677	<0.001■				
P值	0.025★	0.359	0.001★	<0.001★	0.001★				
P值	<0.001◆	<0.001◆	<0.001◆	0.001◆	<0.001◆	0.056	0.275	0.776	0.429

注：▲，乙肝组与正常组比较；■，ICP 组与正常组比较；★，ICP 组与乙肝组比较；◆，3 组间差异有统计学意义