技术方法 文章编号:0253-3626(2009)06-0732-03

高效液相色谱－串联质谱法测定妊娠肝内胆汁淤积患者血清牛磺结合型胆汁酸

邓文平[1],王文娟[1],邵 勇[2],邓 丹[3],丁 敏[1]

(1. 重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室;
2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科;3. 重庆医科大学公共卫生学院卫生统计教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究妊娠肝内胆汁淤积症(Intrahepatic cholestasis of pregnancy,ICP)患者血清中牛磺结合型胆汁酸的变化。方法:收集 ICP 及 ICP 伴糖尿病、ICP 伴病毒性肝炎患者和正常孕妇血清,经固相萃取,采用高效液相色谱－串联质谱(High performance liquid chromatography-tendem mass spectrometry,HPLC—MS/MS)法测定牛磺结合型胆汁酸的含量。结果:ICP 及 ICP 伴糖尿病、ICP 伴病毒性肝炎患者血清中牛磺胆酸(Taurocholic acid,TCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(Taurochenodeoxycholic acid,TCDCA)、牛磺脱氧胆酸(Taurodeoxycholic acid,TDCA)分别比正常孕妇有 10 倍、5 倍和 3 倍以上的显著性增高($P<0.01$)。ICP 及 ICP 伴糖尿病、ICP 伴病毒性肝炎三组间 TCA 和 TCDCA 的差异均有显著性 ($P<0.05$)。结论:ICP 患者有特征的血清牛磺结合型胆汁酸变化。

【关键词】胆汁酸;血清;妊娠肝内胆汁淤积症;高效液相色谱;串联质谱
【中国图书分类法分类号】R714.255 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-11

Simultaneous determination of serum tauro-conjugated bile acids in intrahepatic cholestasis of pregnancy patients by high performance liquid chromatography -tendem mass spectrometry

DENG Wen-ping, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the individual serum tauro-conjugated bile acid concentration in patients with Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy (ICP) by high performance liquid chromatography-tendem mass spectro- metry (HPLC-MS/MS). *Methods*: Bile acids were extracted from serum samples of ICP, ICP with Diabetes Mellitus, ICP with Virus Hepatitis patients and normal pregnant women. Serum tauro-conjugated bile acids were measured by HPLC-MS/MS. *Results*: The serum levels of taurocholic acid(TCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA) and taurodeoxycholic acid (TDCA) in the three groups of ICP, ICP with Diabetes Mellitus, and ICP with Virus Hepatitis were significantly higher than those of the control group ($P<0.01$), and the differences and were 15-fold, 5-fold, 3-fold, respectively. The serum levels of TCA and TCDCA were statistically different among each two of patients of ICP, ICP with Diabetes Mellitus, ICP with Virus Hepatitis respectively ($P<0.05$). *Conclusion*: The concentrations of individual tauro-conjugated bile acids have specific features in ICP patients.

【Key words】 Bile acids; Serum; ICP; HPLC; MS/MS

妊娠肝内胆汁淤积症(Intrahepatic cholestasis of pregnancy,ICP)已被列为高危妊娠范畴内,以妊娠中晚期出现的皮肤瘙痒、胆汁淤积、伴或不伴肝功能异常为主要表现,对母体危害较小,但可造成胎儿宫内窘迫,羊水胎粪粪染,胎死宫内等,围生儿发病率和死亡率增高。研究认为[1],ICP 围生儿发病率和死亡率与血清胆汁酸水平呈显著正相关。

人体内代谢的胆汁酸主要为 5 类游离型胆汁酸,即胆酸(Cholic acid,CA)、鹅脱氧胆酸(Chenodeoxycholic acid,CDCA)、脱氧胆酸(Deoxycholic acid,DCA)、石胆酸(lLithocholic acid,LCA)和熊脱氧胆酸(Ursodeoxycholic acid,UDCA)以及它们的甘氨(Glyco-,G)和牛磺(Tauro-,T)结合型胆汁酸。目前对胆汁酸代谢的研究主要集中在总胆汁酸和甘氨型胆汁酸上,而对牛磺型胆汁酸少有涉及。总胆汁

作者介绍:邓文平(1976-),女,主管检验师,硕士,研究方向:临床检验诊断学。
通讯作者:丁 敏,女,教授,E-mail:dingmin@cqmu.edu.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(20475069)。

酸中牛磺结合型胆汁酸占近 30%，其中 80%的结合型牛磺胆酸通过依赖牛磺胆酸钠共转运体途径摄取，若依赖牛磺胆酸钠共转运体存在功能缺陷均可能使牛磺胆酸摄取障碍而在外周血中显著升高[2]，导致胆汁淤积。

本研究拟采用高效液相色谱－串联质谱（High performance liquid chromatography-tendem mass spectrometry，HPLC-MS/MS）测定血清牛磺结合型胆汁酸，探讨各牛磺结合型胆汁酸在 ICP、ICP 伴糖尿病、ICP 伴病毒性肝炎疾病中的变化。

1 对象和方法

1.1 对象

收集重庆医科大学附属第一医院 2006 年 5 月至 2007 年 4 月间收治的 48 例 ICP、ICP 伴糖尿病、ICP 伴病毒性肝炎（简称为 ICP 伴肝炎）患者血清，其中(1)ICP：34 例，年龄 24～36 岁，平均年龄(29.1±3.7)岁，孕期 31～41 周；ICP 伴糖尿病：5 例，年龄 24～35 岁，平均年龄(30.2±4.1)岁，孕期 32～40 周；ICP 伴肝炎：9 例，年龄 25～34 岁，平均年龄(29.4±2.1)岁，孕期 34～40 周。

ICP 组的诊断标准[3]：(1)妊娠中晚期出现皮肤瘙痒、黄疸等不适，无明显消化道症状，并排除妊娠期其他皮肤病；(2)血清胆汁酸水平升高伴有或不伴有血清总胆红素及转氨酶升高；(3)妊娠终止后瘙痒、黄疸迅速消失，胆汁酸、转氨酶、血清总胆红素逐渐下降到正常。

糖尿病诊断标准参照 WHO(1999)糖尿病及空腹血糖受损标准。病毒性肝炎诊断标准参照病毒性肝炎防治方案(2000，西安)。

对照组为同期收治的正常孕妇：20 例，年龄 21～35 岁，平均年龄(28.6±2.9)岁，孕期 35～41 周。排除可疑瘙痒、黄疸以及伴肝病、内分泌疾病者。

1.2 仪器与试剂

API 2000 质谱仪（加拿大 Applied Biosystems 公司）配备 Perkin Elmer 200 泵和 tubro 离子源；Atlantisd C18（150 mm×3.9 mm，5 μm，美国 Waters 公司）色谱柱，保护柱及 C18 柱芯（美国 Phenomenex 公司），Chromabond C18（3 ml/200 mg，德国 Macherey-Nagel 公司），Millpore 纯水装置（美国 Millpore 公司）。5 种牛磺胆汁酸标准品和醋酸铵均为色谱纯（Sigma 公司），甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯（美国 Tedia 公司）。

1.3 样品收集、处理与测定

取空腹静脉血，自然收缩后离心取血清冻藏于 -20℃，实验前解冻并平衡于室温，依次用 1 ml 甲醇、1 ml 0.05%甲酸溶液活化 SPE 小柱。1 ml 0.05%甲酸溶液中加入 300 μl 血清，混匀 1 min 后上小柱。依次用 1 ml 0.05%甲酸溶液、1 ml 甲醇水溶液（45:55，v:v）冲洗。在重力作用下滴干后，真空抽干。再用 1.5 ml 甲醇洗脱，洗脱液在 60℃氮气吹干，残余物溶于 100 μl 流动相（A:B=20:80，v:v）中，漩涡混匀 1 min，超声 2 min。取 20 μl 进行 HPLC-MS/MS 分析，检测时间 12 min。

1.4 质谱条件

离子化模式：ESI-，聚焦电压：-300V，射入电压：-10V，停顿时间：5.00 ms；离子源气帘气：20.0 ml/min、喷雾电压：-4 200 V、温度：200℃、碰撞气 20.0 ml/min。多反应监测，监测离子对见表 1。

1.5 色谱条件

柱温：25 ℃；流速：1 ml/min，分流比为 1:4；流动相 A：含 5 mmol/L 醋酸铵和 0.01%甲酸水溶液，B：含 5 mmol/L 醋酸铵和 0.01%甲酸甲醇溶液。梯度洗脱程序为：0 min(80.0%B)→7 min(93.0%B)→8 min(80.0%B)→12 min (80.0%B)。

1.6 统计方法

数据以四分位数（Q_1，Q_3，μmol/L）表示，SPSS10.0 统计软件分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 方法学评价

2.1.1 精密度和回收率 在血清中加入适量胆汁酸标准品混合液，日内重复测定 5 次，连续测定 5 d，变异系数日内在 0.70~2.50%之间，日间在 1.33~6.10%之间。对血清样品进行高、低 2 种浓度的回收率试验，重复测定 5 次，胆汁酸的平均回收率高浓度（10.0 μmol/L）为 86.0%～102.0%，低浓度（0.50 μmol/L）为 91.0%～98.0%。

2.1.2 标准曲线和检出限 用正常人血清配制不同浓度的胆汁酸标准混合液，重复测定 3 次。用胆汁酸标准混合液中各胆汁酸的峰面积减去血清中相应的内源性胆汁酸的峰面积对胆汁酸浓度绘制标准曲线，各胆汁酸在 0.10～100.0 μmol/L 浓度范围内线性良好。以 S/N=3 时胆汁酸的浓度为检测限，结果见表 1 所示。

ICP 组、ICP 伴糖尿病组和 ICP 伴肝炎组 TCA、TCDCA 和 TDCA 与对照组差异均有显著性（$P<0.05$）。ICP 组 TCA 和 TCDCA 与 ICP 伴糖尿病组、ICP 伴肝炎组差异有显著性（$P<0.05$）。ICP 组 TDCA 与 ICP 伴糖尿病组和 ICP 伴肝炎组无差异显著性（$P>0.05$）。ICP 组、ICP 伴糖尿病组和 ICP 伴肝炎组 TCA、TCDCA 和 TDCA 与对照组比较，分别有 10 倍、5 倍和 3 倍的增长。

3 讨 论

本研究所建立的 HPLC-MS/MS 测定血清中牛磺型胆汁酸，不需水解和衍生，分析时间短，分离效果好，且具有较好的精密度和回收率。

ICP 诊断中除瘙痒外最主要的生化指标就是反映胆汁淤积的胆汁酸水平的增高。正常情况下，血清中牛磺型胆汁酸占总胆汁酸 30%。肝细胞膜转运蛋白调节与表达缺陷，或肝细胞障碍导致信号传导途径、紧密连接蛋白、细胞内运输囊泡受损[4]时可导

表 1　胆汁酸的多反应监测离子对，标准曲线、相关系数和检测限

胆汁酸	监测离子对(Q_1/Q_3,m/z)	标准曲线		相关系数 γ	检出限（μmol/L）
		a	*b*		
牛磺胆酸 TCA	514.4/80.0	2.29×10^3	86.9	0.999 6	0.006
牛磺鹅脱氧胆酸 TCDCA	498.4/79.9	2.40×10^3	84.1	0.999 3	0.005
牛磺脱氧胆酸 TDCA	498.4/79.9	2.24×10^3	1.19×10^2	0.999 8	0.006
牛磺石胆酸 TLCA	482.4/80.0	2.04×10^3	1.17×10^2	0.999 7	0.003
牛磺熊脱氧胆酸 TUDCA	498.4/79.9	2.92×10^3	2.78×10^2	0.999 6	0.003

表 2　牛磺结合型胆汁酸在 4 组中浓度比较(Q_1, Q_3)（μmol/L）

	TCA	TCDCA	TDCA	TLCA#	TUDCA#
对照组	(0.32,0.91)	(0.51,1.35)	(0.13,0.43)	(0.09,0.13)	(0.11,0.12)
ICP 伴糖尿病组	(1.95,25.4)	(2.02,9.94)	(0.60,2.42)	(0.08,0.12)	(0.12,0.14)
P 值	$P<0.001^*$	$P=0.008^*$	$P=0.042^*$		
	$P<0.001^\blacklozenge$	$P=0.038^\blacklozenge$	$P=0.251^\blacklozenge$		
ICP 伴肝炎组	(2.03,34.2)	(3.24,12.05)	(0.19,1.87)	(0.08,0.14)	(0.12,0.15)
P 值	$P<0.001^*$	$P<0.001^*$	$P=0.024^*$		
	$P=0.045^\blacklozenge$	$P=0.026^\blacklozenge$	$P=0.196^\blacklozenge$		
ICP 组	(0.95,22.88)	(0.72,7.16)	(0.22,1.59)	(0.07,0.12)	(0.13,0.21)
P 值	$P<0.001^*$	$P<0.001^*$	$P=0.010^*$		

注 $^*P$：与对照组比较；$^\blacklozenge P$：与 ICP 组比较；#：4 组间差异无统计学意义

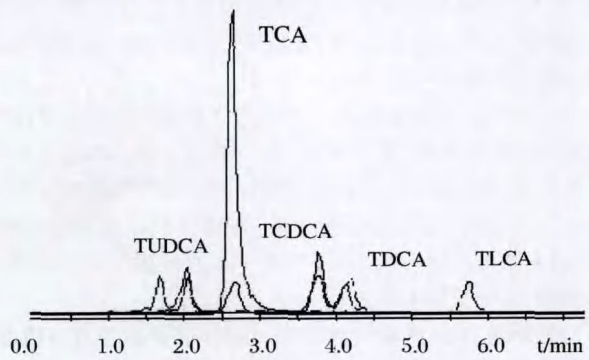


图 1　5 种胆汁酸混合标准品（黑色）和 ICP 患者血清胆汁酸（蓝色）的 MRM 色谱图

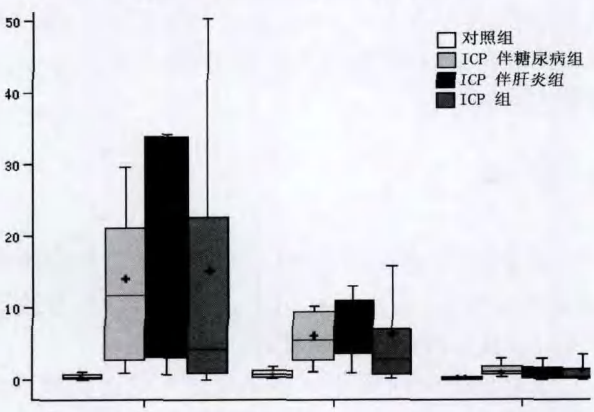


图 2　4 组 3 种胆汁酸的浓度(Q_1, Q_3)（μmol/L）（图中下线为最小值，上线是最大值；盒子的下线是第一四分位数 Q_1，中线是第二四分位数 Q_2，上线是第三四分位数 Q_3，"+"为均数）

致胆汁淤积，由于牛磺型胆汁酸的输入—输出平衡被打破，导致其大量出现在血液中，最高可占总胆汁酸 60%。

本文研究发现 ICP 时血清牛磺型胆汁酸尤其是牛磺胆酸和牛磺鹅脱氧胆酸显著增高，与国外文献一致[5,6]。ICP 伴糖尿病组和 ICP 伴肝炎组 TCA 和 TCDCA 与 ICP 组比较，也有显著性差异（$P<0.05$），且各牛磺型胆汁酸所占比例不同，提示单一 ICP 与 ICP 伴糖尿病或伴肝炎时，存在特征的牛磺结合型胆汁酸变化，有助于 ICP 诊断和鉴别诊断。

参 考 文 献

[1] Glantz A, Marschall H U, Mattsson L A. Intrahcpatic cholestasis of pregnancy: relationships between bile acid levels and fetal complication rates[J]. Hepatology, 2004, 40(2):467-474.

[2] Anwer M S. Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis[J]. Hepatology, 2004, 39(3):581-590.

[3] 乐　杰. 妇产科学[M]. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，2004. 107-109.

[4] Mendez S N, Chavez T N C, Uribe M. New molecular features of cholestatic diseases of the liver[J]. Rev Invest Clin, 2003, 55(5):546-556.

[5] Jansen P L M, Muller M. The molecular genetics of familial intrahepatic cholestasis[J]. Gut, 2000, 47(1):1-5.

[6] Zollner G, Trauner M. Molecular pathogenesis of cholestasis[J]. Wien Med Wochemschr, 2006, 156(13-14):380-385.

（责任编辑：冉明会）