基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000646

# 尿液硫酸化胆汁酸代谢轮廓分析在无症状高胆汁酸血症识别中的应用

杨 婷[1],陈建波[2],冯成亚[1],崔 悦[1],李育超[1],邵 勇[3],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.昆明金域医学检验所有限公司昆明市医学实验诊断技术中心,昆明 650214;3.重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

[摘 要]目的:探讨尿液硫酸化胆汁酸代谢轮廓分析在识别无症状高胆汁酸血症(asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy,AHP)中的应用价值。方法:应用高效液相色谱_串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定正常孕妇(13 例),妊娠肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy,ICP)(17 例)尿液硫酸化胆汁酸谱,采用不同扫描模式鉴别和分析尿液各种硫酸化胆汁酸,并用主成分分析法(principle component analysis,PCA)对尿液硫酸化胆汁酸代谢轮廓进行分析。结果:采用不同的扫描模式对尿液中 15 种可能的硫酸化胆汁酸进行鉴定并分析,经 PCA 对尿液硫酸化胆汁酸代谢轮廓分析,发现在 ICP 组中存在一类特殊的人群,其表现为无任何症状的胆汁酸水平升高而肝功能正常,但其尿液硫酸化胆汁酸代谢轮廓与正常孕妇类似。结论:尿液硫酸化胆汁酸代谢轮廓分析有助于 AHP 的识别。

[关键词]无症状高胆汁酸血症;妊娠肝内胆汁淤积症;代谢轮廓分析;硫酸化胆汁酸
[中图法分类号]R714.55 [文献标志码]A [收稿日期]2014-09-18

# Asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy identification based on metabolic profiling of urinary sulfated bile acid

*Yang Ting[1], Chen Jianbo[2], Feng Chengya[1], Cui Yue[1], Li Yuchao[1], Shao Yong[3], Ding Min[1]*
*(1. Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Laboratory center, Kunmin Kingmed Center for Clinical Laboratory; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)*

[Abstract]***Objective*** To investigate the feasibility of metabolic profiling of urinary sulfated bile acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) identification. ***Methods***: High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was employed to determinate urinary sulfated bile acids in 13 healthy pregnant women and 17 patients with ICP. Multiple scanning modes were used to identify and analyze possible sulfated bile acids in urine. Datas were analyzed by principle component analysis (PCA). ***Results*** Fifteen possible urinary sulfated bile acids were identified and analyzed by multiple scanning modes. The PCA results showed that the existence of a special crowd in ICP group whose symptoms were elevated bile acids with normal liver function. While the changes in matabolic profiling of urinary sulfated bile acids in asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy were resembled those described in healthy pregnant women. ***Conclusion*** Metabolic profiling analysis of urinary sulfated bile acid is helpful for identification of asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy.

[Key words]asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy; intrahepatic cholestasis of pregnancy; metabolic profiling analysis; urinary sulfated bile acids

---

作者介绍:杨 婷,Email:786393306@qq.com,
研究方向:生物活性的胆汁酸成分研究。
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:81401228,81471473);
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://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150519.2141.015.html(2015-05-19)

妊娠肝内胆汁淤积症（intrahepatic cholestasis of pregnancy，ICP）是一种以妊娠中晚期母体出现不同程度的瘙痒、肝功能紊乱及胆汁酸升高为特征的妊娠期并发症，可造成胎儿宫内窘迫、早产等严重危害。目前临床 ICP 的诊断主要依靠孕妇的病史，临床表现以及实验室相关检查，而胆汁酸对 ICP 的诊断优于其他生化指标，是目前诊断 ICP 最有价值的实验室证据[1-3]。2006 年阿根廷学者 Castaño 等[2]首次提出了无症状高胆汁酸血症（asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy，AHP）的概念，指出无任何症状的胆汁酸水平升高而肝功能正常的孕妇不能诊断为 ICP。AHP 在国内很少有人报道，2009 年尉伟东等[4]在研究高胆汁酸水平与不良妊娠结局关系时提出妊娠合并高胆汁酸血症的想法，但缺乏相关的深入研究。

尿液作为胆盐排泄的主要途径，胆汁酸的硫酸化是胆汁酸的主要清除形式。硫酸化胆汁酸在胆汁和血清中含量较少，而在尿液中的含量高达 40%~70%，且不受饮食影响[5]。在肝胆系统疾病状态下，蓄积体内的胆汁酸硫酸化后水溶性增加，其在肠道吸收、肝脏摄取及肾小管的重吸收显著减少，从粪便和尿液排泄增加，减少高浓度非硫酸化胆汁酸对肝脏造成的损伤。研究显示，ICP 患者尿液中硫酸化的胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸以及石胆酸升高[6-7]。在 ICP 的诊断中，尿液总硫酸化胆汁酸较非硫酸化胆汁酸更为特异[8]。

代谢轮廓是通过分析鉴别某一类结构、性质相关的化合物或某一代谢途径中的所有中间产物或多条代谢途径的标志性组分的代谢组学研究策略，反映机体不同状态的代谢轮廓，用以描述及区别生物体系的不同状态[9]。本研究采用高效液相色谱_串联质谱（high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry，HPLC-MS/MS）测定 ICP 孕妇和正常孕妇尿液硫酸化胆汁酸谱，结合主成分分析法（principle component analysis，PCA）对尿液硫酸化胆汁酸代谢轮廓进行分析并识别出 5 例 AHP，为初步了解妊娠状态下尿液硫酸化胆汁酸的变化情况以及 ICP 的诊断与鉴别诊断提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

API 4000、4000 QTRAP 质谱仪（美国应用生物系统公司），配电喷雾离子源，负离子模式。Shimadzu 20 液相色谱仪（日本岛津公司）。标准品包括硫酸化石胆酸（3-sulfated lithocholic acid，3S-LCA）、硫酸化牛磺石胆酸（3-sulfated taurolithocholic acid，3S-TLCA）、硫酸化甘氨石胆酸（3-sulfated glycolithocholic acid，3S-GLCA）、内标物质 5β-cholanic acid-3α，6β，7α-Triol（美国 Sigma-Aldrich）；甲醇、乙腈（色谱纯，德国 Merk KGaA 公司）；甲酸（色谱纯，CNW 公司）；乙酸铵（分析纯，广州华大化学试剂有限公司）。

### 1.2 对象分组

（1）ICP 组：17 例，平均年龄（28±4）岁，平均孕周（32±6）周。ICP 诊断标准[10]：血清总胆汁酸升高（≥10 μmol/L）或血清甘氨胆酸（CG）水平升高（≥10.75 μmol/L），伴转氨酶轻、中度升高或伴血清胆红素升高；妊娠中晚期出现皮肤瘙痒或伴黄疸；妊娠是引起皮肤瘙痒及生化异常的唯一原因。排除其他原因引起的肝功异常。（2）正常妊娠组：随机选择同期在我院产科住院的正常健康妊娠中晚期妇女 13 例，平均年龄（30±4）岁，平均孕周（35±4）周。纳入标准：孕周大于 28 周。排除标准：病毒性肝炎、妊娠期急性脂肪肝、药物性黄疸、妊高症、无内科合并症或并发症等。

### 1.3 标本采集与处理

所有研究对象取尿液 10 ml，置-80 ℃保存备用。采用固相萃取对样品进行处理，具体步骤：SPE 柱（Oasis HLB，30 mg/L cc，Waters）预先用 1 ml 甲醇活化，2 ml 纯水平衡。取 200 μl 尿液加入到 800 μl 磷酸二氢钾（pH 7.0）溶液中（含 190 ppb 内标），混匀上样。用 2 ml 纯水淋洗，1.5 ml 50%甲醇水溶液洗脱，收集洗脱液，在 40 ℃下氮吹浓缩。加入 1.0 ml 0.1%甲酸：甲醇（9∶1，V/V）溶液振荡溶解残渣后，过 0.22 μm 滤膜后取 5 μl 进样分析。

### 1.4 分析方法

采用 HPLC-MS/MS 测定尿硫酸化胆汁酸谱。样品经 Luna C18（150 mm×2 mm，3 μm）（美国 Phenomenex）色谱柱分离。流动相 A 为含 0.1%甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵水溶液，B 为含 0.1%甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵乙腈溶液，梯度洗脱，流速 0.2 ml/min。检测时间 18 min。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行相关矩阵分析。采用多变量统计软件 SIMCA-P software 12.0 对尿液硫酸化胆汁酸结果进行 PCA。

## 2 结 果

### 2.1 硫酸化胆汁酸的鉴定

本研究中商品化的硫酸化胆汁酸标准品只有 3S-LCA、3S-TLCA、3S-GLCA 3 种，其他硫酸化胆汁酸的鉴定根据其结构特征、母离子、子离子及碎片离子信息来判断。采用多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）和 QTRAP 的增强子离子扫描（enhance product ion，EPI）模式鉴定尿液中各种

硫酸化胆汁酸。所需鉴定的硫酸化胆汁酸可能的碎片见表 1。以 3S-TCA 为例说明胆汁酸色谱峰的鉴定情况，理论上推断 3S-TCA 可能的碎片离子为 594.1、514.1、96.7、79.9、106.9，保留时间 13.04 min 时的峰符合 3S-TCA 的特征，所以将此峰定性为 3S-TCA，见图 1。

表 1 硫酸化胆汁酸的特征离子对

Tab.1 Characteristic parent ions and product ions of sulfated bile acids

| 分析物 | 母离子 (m/z) | 子离子 1 (m/z) | 子离子 2 (m/z) | 子离子 3 (m/z) |
|---|---|---|---|---|
| 3S-CA | 487 | 97 | | 407 |
| 3S-GCA | 544 | 97 | 74 | 464 |
| 3S-TCA | 594 | 97 | 80 | 514 |
| 3S-UDCA/3S-CDCA/3S-DCA | 471 | 97 | | 391 |
| 3S-GUDCA/3S-GCDCA/3S-GDCA | 528 | 97 | 74 | 448 |
| 3S-TUDCA/3S-TCDCA/3S-TDCA | 578 | 97 | 80 | 498 |

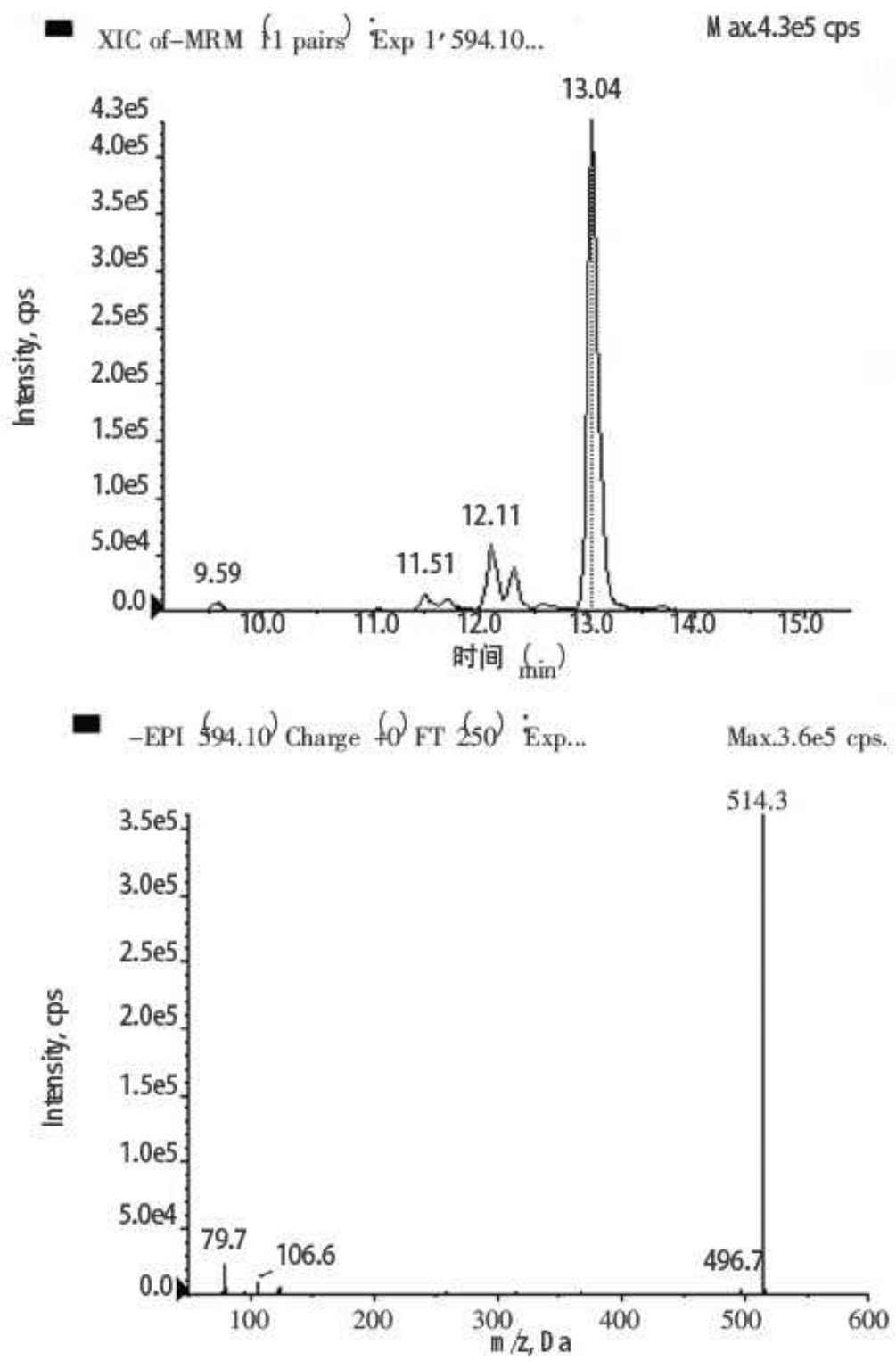



图 1 尿中 MRM 为 594.1→514.1 的离子流图和 m/z 为 594.1 的 EPI 谱图

Fig.1 MRM chromatogram of the transition m/z 594.1→514.1 and EPI spectrum of m/z 594.1 in urine

2.2 硫酸化胆汁酸的 PCA 结果

根据简单相关矩阵对原始数据进行直观检验，相关矩阵的大部分相关系数大于 0.3，表明原始数据之间具有较好的相关性，适合进行 PCA。利用 SIMCA 软件对 15 种可能的胆汁酸定量结果进行 PCA 分析，2 个主成分时解释能力 ($R^2X$) 为 0.703，预测能力 ($Q^2$) 为 0.35，特征值为 3.12。以贡献率最大的 2 个主成分 (PC1、PC2) 作图，从图 1 可见正常妊娠组主要聚集在左上角，而 ICP 组主要分布在右下角，其组内个体较正常妊娠组分散，可能是由于个体差异所造成。在 ICP 组中存在一类人群其数据落在正常妊娠组区域，表明其硫酸化胆汁酸代谢轮廓与正常妊娠组类似。

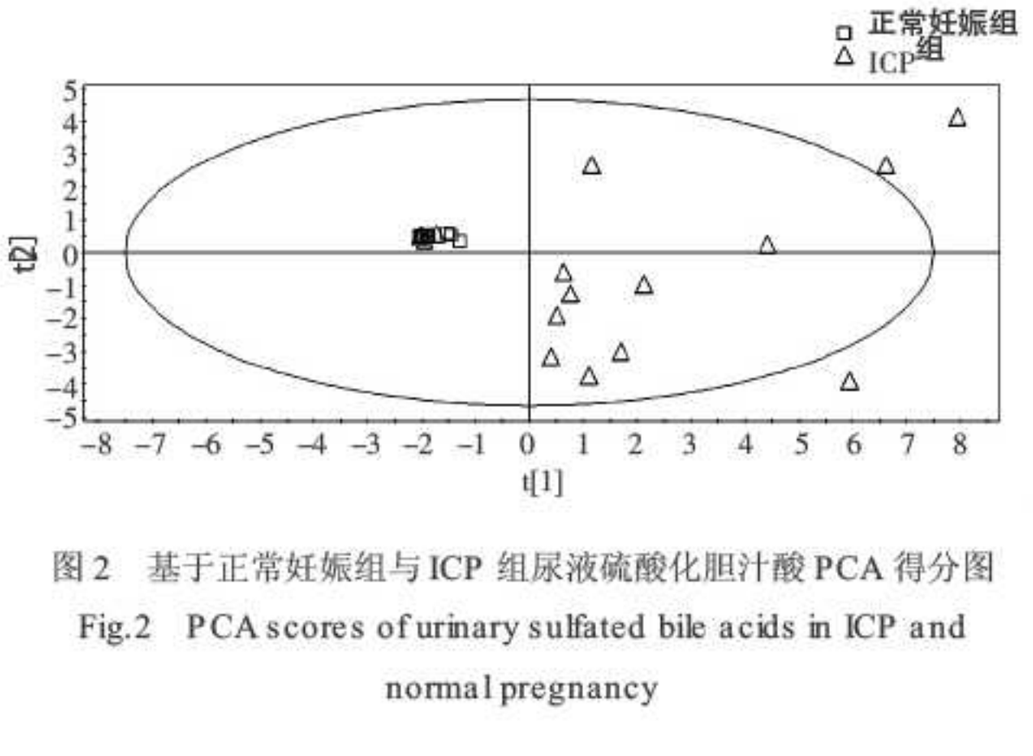



图 2 基于正常妊娠组与 ICP 组尿液硫酸化胆汁酸 PCA 得分图

Fig.2 PCA scores of urinary sulfated bile acids in ICP and normal pregnancy

## 3 讨 论

2011 年中华医学会制订了 ICP 诊疗指南[10]，提出 ICP 的诊断标准为胆汁酸系列和肝酶系列。胆汁酸系列包括总胆汁酸和甘胆酸。英国皇家妇产学会[11] (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists' RCOG) 在 2011 年提出 ICP 诊断指南为排除其他原因引起的妊娠期间瘙痒（主要部位为手掌和足底）及肝功能异常或胆汁酸水平升高，所有情况在分娩后消失。目前胆汁酸改变被认为是 ICP 最有价值的实验室证据。

胆汁酸的硫酸化是机体的一种代偿性保护措施，文献报道，尿中硫酸化胆汁酸在丙肝相关慢性肝脏疾病[12]、原发性胆汁性肝硬化[13]、新生儿胆道闭锁[14]和胆汁淤积[15]等肝脏疾病中明显升高，且这种变化比血清总胆汁酸更加显著。早期研究显示，ICP 患者尿液中硫酸化的胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸以及石胆酸升高[6-7]。表明尿硫酸化胆汁酸代谢轮廓分析对 ICP 的诊断有重要价值。

本研究采用 HPLC-MS/MS 对尿液硫酸化胆汁

酸代谢轮廓进行分析，通过 PCA 发现在 ICP 组中存在部分特殊孕妇，其血清总胆汁酸及甘胆酸检测结果高于参考范围，但 PCA 数据落在正常妊娠组区域，表明其硫酸化胆汁酸代谢轮廓与正常孕妇类似。这 5 例病人初诊为 ICP，回访发现其血清总胆汁酸、甘胆酸水平高于参考范围，但并无瘙痒等临床表现，且肝功能正常，结合其分娩方式及母婴预后情况等最终排除了 ICP 的诊断。Castaño 等研究发现无任何症状的胆汁酸水平升高而肝功能正常的孕妇为 AHP，是正常孕妇在妊娠期间表现出来的特发性的胆汁酸增高。

AHP 的病例先后在一些国家有报道[16]，也引起了一些临床工作者的注意，有研究者认为 AHP 不是一种疾病，而是正常孕妇在妊娠期间表现出来的特发性高胆汁酸血症，是孕妇的一种亚健康状态。文献还指出[16]，AHP 孕妇的胆汁酸水平变化与 ICP 类似，其中 2%~3% AHP 孕妇在孕中晚期发展为 ICP 患者，表明 AHP 可能是生理与疾病状态间的过渡。胆汁酸具有细胞毒作用，其升高是不良妊娠结局的重要因素。研究发现，ICP 母体血清总胆汁酸 >40 μmol/L 时，胎儿不良预后的风险增加[17]，但 AHP 孕妇的胆汁酸水平变化是否会影响妊娠结局尚未见较深入的研究报道。目前国内临床对 AHP 的认识不足，或者直接根据总胆汁酸，甘胆酸以及肝功能检查的结果诊断为 ICP。临床对 ICP 的处理措施对胎儿的影响较大，如果处理不当，将 AHP 误诊为 ICP 会导致剖宫产率的增高和治疗性早产的增多，造成不必要的医疗费用以及医疗资源的浪费；反之，如将 ICP 漏诊为 AHP，采取期待疗法则可能延误治疗的最佳时机，易产生新生儿窒息或围生儿死亡，甚至可能发生胎儿宫内死亡，由此带来产妇精神创伤和医疗纠纷。因而，正确认识 AHP 有助于临床 ICP 的鉴别诊断以便尽早采取适当的处理措施，对母婴预后有积极的意义。

## 参 考 文 献


[1] Howard PJ，Murphy GM.Bile acid stress in the mother and baby unit[J].Eur J Gastroenterol Hepatology，2003，15(3)：317-321.

[2] Castaño G，Lucangioli S，Sookoian S，et al.Bile acid profiles by capillary electrophoresis in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J].Clin Sci，2006，110(4)：459-465.

[3] Bacq Y.Liver disease unique to pregnancy：A 2010 update[J].Clin Res Hepatol Gas，2011，35(3)：182-193.

[4] 尉伟东，周夫群，马英英，等.高胆汁酸血症与不良围产结局的关系[J].中国优生与遗传杂志，2009，17(9)：66-67.

[5] Alnouti Y.Bile acid sulfation：a pathway of bile acid elimination and detoxification[J].Toxicol Sci，2009，108(2)：225-246.

[6] Thomassen PA.Urinary bile acids during development of recurrent cholestasis of pregnancy[J].Eur J Clin Invest，1979，9(6)：417-423.

[7] Meng LJ，Reyes H，Palma J，et al.Profiles of bile acids and progesterone metabolites in the urine and serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy[J].J Hepatol，1997，27(2)：346-357.

[8] Huang WM，Seubert DE，Donnelly JG，et al.Intrahepatic cholestasis of pregnancy：detection with urinary bile acid assays[J].J Perinat Med，2007，35(6)：486-491.

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

[10] 中华医学会妇产科学分会产科学.妊娠期肝内胆汁淤积症诊疗指南（第1版）[J].中华妇产科杂志，2011，46(5)：391-395.

[11] Royal College of Obstericians and Gynaecologists (UK).Obstetric Cholestasis.RCOG Green-top Guideline，No.43[DB/OL]April 2011 (Revision).http://www.rcog.org.ur/fifes/rcogcorp/GTG43obstetriccholestasis.pdf.

[12] Tetsutani T，Adachi K，Suzuki T，et al.Clinical study of urinary sulfated bile acids in patients with hepatitis C virus[J].Hepatogastroenterology，2010，57(104)：1483-1488.

[13] Miura R，Tanka A，Takikawa H.Urinary bile acid sulfate levels in patients with primary biliary cirrhosis[J].Hepatol Res，2011，41(4)：358-363.

[14] Suzuki M，Muraji T，Obatake M，et al.Urinary bile acids analysis for the early detection of biliary atresia in infants[J].Pediatr Int，2011，53(4)：497-500.

[15] Nanashima A，Obatake M，Sumida Y，et al.Clinical significance of measuring urinary sulfates bile acids in adult patients with hepatobiliary diseases[J].Hepatogastroenterology，2009，56(90)：299-302.

[16] Pasual MJ，Serrano MA，El-Mir MY，et al.Relationship between asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy and progesterone metabolism[J].Clin Sci，2002，102(5)：587-593.

[17] Glantz A，Marschall HU，Mattsson LA.Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy：Relationships Between Bile Acid Levels and Fetal Complication Rates[J].Hepotology，2004，40(2)：467-474.


责任编辑：冉明会）