

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.17.031

ICP 患者血清疏水性胆汁酸与 miR-18a 水平的相关性研究

利荣乔¹, 陈 晖¹, 蓝欲裕¹, 姚人业²

1. 广西壮族自治区江滨医院检验科, 广西南宁 530000; 2. 广西壮族自治区妇幼保健院检验科, 广西南宁 530000

摘 要:目的 探讨妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)患者血清 miR-18a 水平与血清疏水性胆汁酸的相关性。
方法 选取健康对照组、轻度 ICP 组、中度 ICP 组、重度 ICP 组孕妇各 40 例, 分别采用实时定量 RT-PCR 法检测血清 miR-18a 水平, 高效液相色谱串联质谱法检测疏水性胆汁酸脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、石胆酸、甘氨鹅脱氧胆酸水平; 并与血清 miR-18a 水平进行相关性分析。
结果 相较于健康对照组, 轻度、中度和重度 ICP 组患者血清 miR-18a 水平均明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 相较于轻度 ICP 组, 中度和重度 ICP 组患者血清 miR-18a 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 相较于中度 ICP 组, 重度 ICP 组患者血清 miR-18a 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组孕妇血清 miR-18a 水平与疏水性胆汁酸水平无相关性($P > 0.05$); 轻度、中度和重度 ICP 组患者血清 miR-18a 水平与疏水性胆汁酸水平呈负相关($r = -0.847 \sim -0.531, P < 0.05$)。
结论 ICP 患者血清 miR-18a 明显降低, 随病情加重, miR-18a 水平越低, miR-18a 水平与血清疏水性胆汁酸水平呈负相关, 可能在 ICP 的发生、发展中发挥重要作用。

关键词:妊娠期肝内胆汁淤积症; miR-18a; 疏水性胆汁酸

中图法分类号: R714.259; R446.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)17-2535-04

Study on the correlation between serum hydrophobic bile acid and the level of miR-18a in patients with ICP

LI Rongqiao¹, CHEN Hui¹, LAN Yuyu¹, YAO Renye²

1. Jiangbin Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530000, China;

2. Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530000, China

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between serum level of miR-18a in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) and serum hydrophobic bile acid. **Methods** 160 pregnant women were divided into health control group, mild ICP group, moderate ICP group and severe ICP group, 40 cases in each group. The serum level of miR-18a was detected by real-time quantitative RT-PCR. The levels of deoxycholic acid, goose deoxycholic acid, cholic acid, glycine-bound goose deoxycholic acid were detected by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and the correlation with miR-18a were analyzed. **Results** Compared with the health control group, the serum levels of miR-18a in mild ICP, moderate ICP and severe ICP groups were decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the mild ICP group, the serum levels of miR-18a in moderate ICP and severe ICP groups were decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the moderate ICP group, the serum level of miR-18a in severe ICP group was decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was no correlation between the serum level of miR-18a and hydrophobic bile acid in the control group ($P > 0.05$), there was a negative correlation between the serum level of miR-18a and hydrophobic bile acid in mild, moderate and severe ICP group ($r = -0.847 \sim -0.531, P < 0.05$). **Conclusion** The serum level of miR-18a in ICP patients is significantly decreased. With the aggravation of the disease, the level of miR-18a decreased. There is a negative correlation between the level of miR-18a and the level of hydrophobic bile acid in serum. miR-18a may play an important role in the occurrence and development of ICP.

Key words: intrahepatic cholestasis of pregnancy; miR-18a; hydrophobic bile acid

妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)是妊娠期一种重要的并发症,其可致孕妇皮肤瘙痒、黄疸、早产、死胎、死

产,致胎儿宫内窘迫、中枢神经系统缺氧损伤,该疾病导致围生儿发病率和病死率增加。研究表明,疏水性胆汁酸在 ICP 发生、发展中发挥重要作用^[1-2]。此外,雌激素受体 α (ER α)在转录和翻译水平均受 miR-18a 的负性调控^[3],提示 miR-18a 可能通过调控 ER α 的表达,进而调控胆汁酸,特别是疏水性胆汁酸的体内淤积,在 ICP 的发生、发展中发挥重要作用。本研究旨在探讨 ICP 患者血清 miR-18a 水平与血清疏水性胆汁酸的相关性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据随机数字表法随机选取 2017 年 12 月至 2019 年 3 月广西壮族自治区江滨医院确诊的 120 例轻度、中度、重度 ICP 患者各 40 例及同期健康孕妇 40 例,孕妇年龄为 22~34 岁,平均(28±4)岁;孕周为 28~37 周,平均(32.0±4.3)周。4 组孕妇一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入标准:临床资料完整;单胎妊娠;妊娠前检查未见瘙痒,妊娠期出现瘙痒,且瘙痒只与妊娠有关。排除标准:肝炎患者、严重妊娠期合并症或并发症者及其他不适合参加本次研究者。

1.2 ICP 患者分度诊断标准 轻度 ICP:总胆汁酸(TBA)≥10~<40 $\mu\text{mol/L}$,总胆红素(TBIL)<20 $\mu\text{mol/L}$;中度 ICP:TBA≥40~<80 $\mu\text{mol/L}$,TBIL≥20~<40 $\mu\text{mol/L}$;重度 ICP:TBA≥80 $\mu\text{mol/L}$,TBIL≥40 $\mu\text{mol/L}$ ^[4-5]。

1.3 仪器与试剂 RNAiso Blood(货号:9112),逆转录试剂盒(货号:RR037)及 TB Green Premix Taq(货号:RR820)扩增试剂均购自 Takara 公司,has-miR18a 及 U6 逆转录和扩增引物由上海生工合成。荧光定量 PCR 仪为 Agilent AriaMx。has-miR18a 引物:上游:5'-GGG GTG TTC TAA GGT GCA TCT A-3';下游:5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3';U6 引物:上游:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3';下游:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

1.4 方法 孕妇入院接受腹部超声检查,明确孕期;清晨安静空腹状态下抽取外周血标本 5 mL,妥善保存后送检实验室进行处理及检测。标品标准化前处理后采用高效液相色谱串联质谱法检测脱氧胆酸(DCA)、鹅脱氧胆酸(CDCA),甘氨鹅脱氧胆酸(GC-

DCA)和石胆酸(LCA)水平,色谱条件:pH 1~12 柱 100 $\mu\text{m} \times 23 \mu\text{m}$,预柱为 Luna C18(2) 3 μm (10 mm×2 mm)柱,流速:0.20 mL/min,柱温:35℃,流动相:甲酸氨水溶液体积比为 1:200,乙酸水溶液(用氨水调节 pH=4.5):甲醇为 30:70;质谱条件:ESI 选择性正离子检测,SIM 方式检测。工作参数:干燥氮气温 200℃,雾化器流量 1.5 L/min,检测电压 1.40 kV。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 线性相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组孕妇血清中 miR-18a 水平比较 与健康对照组比较,轻度、中度和重度 ICP 组血清中 miR-18a 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与轻度 ICP 组比较,中度和重度 ICP 组血清中 miR-18a 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与中度 ICP 组比较,重度 ICP 组血清中 miR-18a 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组孕妇血清中 miR-18a 水平($\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	miR-18a
健康对照组	40	1.01±0.15 ^c
轻度 ICP 组	40	0.73±0.16 ^a
中度 ICP 组	40	0.58±0.08 ^{ab}
重度 ICP 组	40	0.41±0.06 ^{abc}

注:与健康对照组比较,^a $P<0.05$;与轻度 ICP 组比较,^b $P<0.05$;与中度 ICP 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.2 各组孕妇血清中 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平比较 与健康对照组比较,轻度、中度和重度 ICP 组血清中 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与轻度 ICP 组比较,中度和重度 ICP 组血清中 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与中度 ICP 组比较,重度 ICP 组血清中 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组孕妇血清中 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DCA($\mu\text{mol/L}$)	CDCA($\mu\text{mol/L}$)	GCDCA ($\mu\text{mol/L}$)	LCA($\mu\text{mol/L}$)
健康对照组	40	0.58±0.07	0.36±0.05	1.03±0.16	0.06±0.01
轻度 ICP 组	40	1.24±0.19 ^a	0.59±0.09 ^a	2.14±0.42 ^a	0.26±0.03 ^a
中度 ICP 组	40	3.84±0.45 ^{ab}	1.38±0.17 ^{ab}	4.28±0.62 ^{ab}	0.44±0.08 ^{ab}
重度 ICP 组	40	5.41±0.97 ^{abc}	2.67±0.31 ^{abc}	6.19±0.79 ^{abc}	1.29±0.15 ^{abc}

注:与健康对照组比较,^a $P<0.05$;与轻度 ICP 组比较,^b $P<0.05$;与中度 ICP 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.3 各组孕妇血清 miR-18a 与 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平的相关性分析 健康对照组孕妇血清 miR-18a 水平与 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平均不相关($P>0.05$);轻度、中度及重度 ICP 组孕妇血清 miR-18a 水平与 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平均呈负相关($r=-0.847\sim-0.531, P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组孕妇血清 miR-18a 与 DCA、CDCA、GCDCA、LCA 水平的相关性分析		
组别	<i>r</i>	<i>P</i>
健康对照组		
DCA	0.077	>0.05
CDCA	-0.115	>0.05
GCDCA	0.084	>0.05
LCA	0.110	>0.05
轻度 ICP 组		
DCA	-0.637	<0.05
CDCA	-0.531	<0.05
GCDCA	-0.612	<0.05
LCA	-0.549	<0.05
中度 ICP 组		
DCA	-0.736	<0.05
CDCA	-0.743	<0.05
GCDCA	-0.847	<0.05
LCA	-0.716	<0.05
重度 ICP 组		
DCA	-0.815	<0.05
CDCA	-0.827	<0.05
GCDCA	-0.846	<0.05
LCA	-0.759	<0.05

3 讨 论

ICP 多发生于妊娠中晚期,属可逆性胆汁淤积症,ICP 的病因是多因素的,遗传易感性、激素和环境因素在其发病机制中相互作用。其临床特点是妊娠 30 周后开始出现轻微或者严重瘙痒症状,通常在分娩后 48 h 症状缓解。除了难治性瘙痒和产后出血,孕产妇的预后通常是良好的。但 ICP 与胎儿发病率和病死率密切相关,特别是早产、胎儿窘迫和突然的不可预测的胎儿宫内死亡。

ICP 与 TBA 水平升高有关。本研究表明,疏水性胆汁酸与 ICP 的发生、发展密切相关。胆汁酸分子内既含有亲水性的羟基及羧基,又含有疏水性烃核和甲基。亲水基团均为 α 型,而甲基为 β 型,两类不同性质的基团位于环戊烷多氢菲核的两侧,这种构型使得胆汁酸有疏水性和亲水性两种性质。疏水性胆汁酸包括胆酸(CA)、DCA、CDCA、GCDCA 和 LCA,其

疏水性的大小顺序依次为 $LCA>GCDCA>DCA>CDCA>CA$ 。疏水性胆汁酸能破坏细胞基底外膜、细胞器膜并特异性破坏微管膜的外层,对机体危害较大^[6-7]。疏水性胆汁酸损伤细胞的机制与以下机制有关:(1)作为炎症刺激剂活化细胞内信号转导途径,直接刺激促炎介质的产生;(2)引起线粒体机能障碍,导致过量活性氧的产生和内膜通透性的改变;(3)通过内质网应激介导细胞损伤^[8-10]。

ICP 多发生于妊娠晚期、多胎妊娠、既往有口服高雌激素水平避孕药的女性,此类人群雌激素均处于高水平状态,提示 ICP 发生与雌激素有关^[11]。ICP 在多胎孕妇中的患病率是单胎孕妇的 5 倍,这与更高水平的雌激素是相关的。ICP 与其他类型胆汁淤积相似,在使用过含雌激素剂量大的避孕药的女性中发生率较高。有研究证明,雌激素能够抑制血糖利用,促进脂肪分解,释放游离脂肪酸,而高水平游离脂肪酸诱发肝脏损伤,进而加重胆汁淤积。当机体内部雌激素代谢产物增加时可导致胆汁排泄受阻,从而影响肝脏对硫酸盐的代谢及排泄,表明高水平的雌激素可能通过受损硫酸盐化作用和胆汁酸运输诱导肝内胆汁淤积。ER α 在人体内广泛分布,与其他亚型受体互补共存,共同介导雌激素在靶器官中发挥效应。而在胚胎着床、胎盘发育等妊娠生理过程中,ER α 更是起到重要生理介导作用。研究表明,ER α 的异常表达可能与病理妊娠相关^[12-13]。miRNA 是一类非编码小分子 RNA,通过与靶 mRNA 的 3' 非编码区结合后调控相关基因转录翻译,进而影响细胞生理过程,既往研究表明,ER α 在转录和翻译水平均受 miR-18a 的负性调控^[3]。

本研究发现,各 ICP 组血清疏水性 LCA、GCDCA、DCA 和 CDCA 水平明显高于健康对照组,且随病情加重,LCA、GCDCA、DCA 和 CDCA 水平越高;各 ICP 组血清 miR-18a 明显下调,且随病情加重,miR-18a 水平越低。ICP 组血清 miR-18a 水平与疏水性胆汁酸水平呈负相关($r=-0.847\sim-0.531; P<0.05$)。因 miR-18a 可负性调控 ER α ,笔者推测,血清 miR-18a 水平下调的孕妇,其组织 ER α 水平上调,致其对雌激素的敏感性升高,进而导致疏水性胆汁酸在体内积聚,对胎儿造成危害,同时亦损伤孕妇肝细胞,形成恶性循环。ICP 的诊断需要排除其他胆汁淤积和肝脏疾病,miR-18a 有望成为 ICP 诊断的新血清学标志物,也有望成为鉴别诊断 ICP 的新依据,值得进一步深入研究。

参考文献

[1] MARTINEFSKI M, CONTIN M, LUCANGIOLI S, et al. In search of an accurate evaluation of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Scientifica (Cairo), 2012, 2012:

496489.

- [2] WANG H Z, CAI D C, LIAO D D, et al. Role of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of trophoblasts in intrahepatic cholestasis during pregnancy[J]. J Southern Med Uni, 2018, 38(5): 572-577.
- [3] YUAN L, TANG C D, LI D F, et al. MicroRNA-18a expression in female coronary heart disease and regulatory mechanism on endothelial cell by targeting estrogen receptor[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2018, 72(6): 277-284.
- [4] GÜNAYDIN B, BAYRAM M, ALTUG M, et al. Retrospective analysis of maternal, fetal, and neonatal outcomes of intrahepatic cholestasis of pregnancy at Gazi University[J]. Turk J Med Sci, 2017, 47(2): 583-586.
- [5] 王晓璐, 邵勇. 高效液相色谱串联质谱法对妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇血清胆酸的检测及临床意义[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(3): 214-217.
- [6] LI C Y, LI J, WENG X, et al. Farnesoid X receptor agonist CDCA reduces blood pressure and regulates vascular tone in spontaneously hypertensive rats[J]. J Am Soc Hypertens, 2015, 9(7): 507-516.
- [7] GUMPRICHT E, DAHL R, YERUSHALMI B, et al. Nitric oxide ameliorates hydrophobic bile acid-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes by non-mitochondrial pathways[J]. J Biol Chem, 2002, 277(28): 25823-25830.
- [8] GONZÁLEZ-RUBIO S, LÓPEZ-SÁNCHEZ L, MUÑOZ-CASTANEDA J, et al. GCDCA down-regulates gene expression by increasing Sp1 binding to the NOS-3 promoter in an oxidative stress dependent manner[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 96(1): 39-51.
- [9] WU W B, MENON R, XU Y Y, et al. Downregulation of peroxiredoxin-3 by hydrophobic bile acid induces mitochondrial dysfunction and cellular senescence in human trophoblasts[J]. Sci Rep, 2016, 6(2): 38946.
- [10] LI X J Y, YUAN Z H, LIU R P, et al. UDCA and CDCA alleviate 17 α -ethinylestradiol-induced cholestasis through PKA-AMPK pathways in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 311(12): 12-25.
- [11] ZHOU F, GAO B X, DENG C Y, et al. Dynamic expression of corticotropin-releasing hormone and urocortin in estrogen induced-cholestasis pregnant rat [J]. Reprod Toxicol, 2016, 65(8): 179-186.
- [12] ZHANG L, LIU S Y, SHI Q Y, et al. Study on the association between estrogen receptor alpha gene polymorphism and intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2006, 41(5): 307-310.
- [13] SONG Z Y, SHI Q Y. The interaction of PPAR α and CYP7B1 with ER α , β impacted the occurrence and development of intrahepatic cholestasis in pregnant rats[J]. Reprod Sci, 2017, 24(4): 627-634.

(收稿日期: 2019-12-26 修回日期: 2020-03-11)

(上接第 2534 页)

- [4] MARX A, CHAN J K, COINDRE J, et al. The 2015 World Health Organization classification of tumors of the thymus continuity and changes[J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(10): 1383-1395.
- [5] LI X, MENG X, YE Z. Iodine quantification to characterize primary lesions, metastatic and non-metastatic lymph nodes in lung cancers by dual energy computed tomography: an initial experience[J]. Eur J Radiol, 2016, 85(6): 1219-1223.
- [6] LIU Y, KIM J, QU F, et al. CT features associated with epidermal growth factor receptor mutation status in patients with lung adenocarcinoma[J]. Radiology, 2016, 280(1): 271-280.
- [7] WANG H, SCHABATH M B, LIU Y, et al. Semiquantitative computed tomography characteristics for lung adenocarcinoma and their association with lung cancer survival[J]. Clin Lung Cancer, 2015, 16(6): e141-e163.
- [8] SIMONS D, KACHELRIESS M, SCHLEMMER H P. Recent developments of dual-energy CT in oncology[J]. Eur Radiol, 2014, 24(4): 930-939.
- [9] ZIELINSKI K W, KULIG A. Morphology of the microvascular bed in primary human carcinomas of lung. Part I: three-dimensional pattern of microvascular network[J]. Pathol Res Pract, 1984, 178(3): 243-250.
- [10] ZIELINSKI K W, KULIG A, ZIELINSKI J. Morphology of the microvascular bed in primary human carcinomas of lung. Part II. Morphometric investigations of microvascular bed of lung tumors[J]. Pathol Res Pract, 1984, 178(4): 369-377.
- [11] GORDIC S, PUIPPE G D, KRAUSS B, et al. Correlation between dual-energy and perfusion CT in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Radiology, 2016, 280(1): 78-87.
- [12] 徐晓莉, 隋昕, 钟巍, 等. 双能量 CT 碘图定量参数联合 CT 征象建模在诊断肺癌病理亚型中的价值[J]. 中华放射学杂志, 2018, 52(11): 823-828.

(收稿日期: 2019-12-10 修回日期: 2020-04-12)