

血清 miR-3614-5p 在妊娠期肝内胆汁淤积症诊断中的价值

赵军, 孟西娜, 侍佳, 董蕊锐, 李娜, 王瑶, 邹萍, 张婷, 许耀辉

作者单位: 南京医科大学附属无锡妇幼保健院检验科, 江苏 无锡 214002

通信作者: 许耀辉, 男, 副主任技师, 研究方向为妇产科疾病, E-mail: sunshing982503@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(81671489); 江苏省科技发展重点研发计划(BE2017628)

摘要:目的 探讨血清 miR-3614-5p 在妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)诊断中的应用。方法 采用临床对照回顾性研究方法。选取南京医科大学附属无锡妇幼保健院 2017 年 11 至 2018 年 10 月就诊的 79 例 ICP 病人, 同时按随机数字表法选取同期 79 例正常孕妇作为健康对照。采用实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测血清 miR-3614-5p 水平, 并分析 miR-3614-5p 与临床资料的关系, 进行相关性分析及受试者工作特征曲线(ROC)分析, 评价 miR-3614-5p 在 ICP 诊断中的临床应用价值。结果 ICP 病人血清 miR-3614-5p 相对表达量 [ΔCT : 9.893(8.635, 10.166)] 明显高于对照组 [ΔCT : 10.841(10.256, 11.987)], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ICP 组中 miR-3614-5p 和 TBA 水平呈显著正相关 ($r = 0.311, P < 0.001$), 血清 miR-3614-5p 在 ICP 组中的 ROC 曲线下面积(AUC)、灵敏度和特异度分别为 0.864、79.0% 和 83.0%。结论 血清 miR-3614-5p 可能成为 ICP 诊断的新型分子靶标。

关键词: 妊娠并发症; 胆汁淤积, 肝内; 微 RNAs; 荧光免疫测定; 诊断; miR-3614-5p

The value of serum miR-3614-5p in the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy

ZHAO Jun, MENG Xina, SHI Jia, DONG Ruirui, LI Na, WANG Yao, ZOU Ping, ZHANG Ting, XU Yaohui

Author Affiliation: The Laboratory of The Affiliated Wuxi Maternity and Child Health Care Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214002, China

Abstract: Objective To investigate the application of serum miR-3614-5p in the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods** A clinical controlled retrospective study was used. 79 patients with ICP, admitted in The Affiliated Wuxi Maternity and Child Health Care Hospital of Nanjing Medical University from November 2017 to October 2018 as 79 healthy pregnant women, were selected by random number table. Serum miR-3614-5p levels were measured by qPCR, and the relationship between miR-3614-5p and clinical data were analyzed. Correlation and receiver operating characteristic curve (ROC) analysis were performed to evaluate clinical application value of miR-3614-5p in diagnosis of ICP. **Results** The relative expression of serum miR-3614-5p in ICP patients [ΔCT : 9.893(8.635, 10.166)] was significantly higher than that in the control group [ΔCT : 10.841(10.256, 11.987)], the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was a significant positive correlation between miR-3614-5p and TBA levels in the ICP group ($r = 0.311, P < 0.001$). The area under the ROC curve (AUC), sensitivity, and specificity of serum miR-3614-5p in the ICP group were 0.864, 79.0% and 83.0%, respectively. **Conclusion** Serum miR-3614-5p may be a novel molecular target for ICP diagnosis.

Key words: Pregnancy complications; Cholestasis, intrahepatic; Micro RNAs; Fluoroimmunoassay; Diagnosis; MiR-3614-5p

妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)是一种妊娠期特有的以皮肤瘙痒和黄疸为主要临床症状的疾病, 其在中国的发生率约为 4%~10%^[1]。ICP 会引起较高的早产率以及胎儿窘迫、新生儿死亡等情况^[2-3]。目前为止, ICP 的发病原因尚不十分清楚。总胆汁酸(TBA)是现阶段诊断 ICP 的主要指标, 但其仍有不足^[4]。寻找一个能够及时准确诊断 ICP 的靶标是当前 ICP 治疗与监测的方向。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是长度为 18~23 nt 的非编码 RNA 序列, 可参与多种生物学过程。血

清 miRNA 已被报道为妊娠并发症的诊断和预后生物标志物, 如妊娠糖尿病和先兆子痫^[5-6]。本课题组前期分析了 ICP 的血清 miRNA 谱并验证了部分差异表达 miRNA^[7]。本研究拟通过检测 ICP 病人血清 miR-3614-5p 的表达并与临床和生化参数进行相关分析, 来探讨血清 miR-3614-5p 作为诊断 ICP 的候选生物标志物的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 2017 年 11 月至 2018 年 10 月于南京医科大学附属无锡妇幼保健院妇产科就诊

的ICP孕妇79例,均符合中华医学会制订的ICP诊疗指南的标准(2015版)^[8]。同时按随机数字表法选取就诊的健康孕妇79例。要求各型肝炎病毒标志物均为阴性,无心、肝、肾功能异常,无临床急性或慢性疾病症状,未接受任何药物治疗。收集新鲜血液标本,且标本收集前均未做过任何治疗。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》的相关要求。

1.2 主要试剂与设备 RNA提取试剂盒(北京百泰克);Prime Script™ RT II 逆转录试剂盒(TaKaRa,大连宝生物);SYBR Premix Ex Taq II 扩增试剂盒(TaKaRa,大连宝生物);PCR引物(上海生工生物工程有限公司);ABI 7500 Fast 荧光定量PCR仪器(ABI,美国);UV-1900紫外分光光度计(日本岛津);Gel Doc XR+凝胶成像仪(Bio-Rad,美国);XH600电泳仪(上海昕慧)。

1.3 RNA提取及miRNA表达检测 血清miR-3614-5p检测采用实时荧光定量PCR(qPCR)法。分别留存两组病人静脉血样本5 mL,1 000 r/min离心10 min,将上层血清转移至无酶管再以10 000 r/min离心10 min吸取上层血清于无酶管-80℃冻存备用,按照试剂说明书,提取总RNA逆转录生成cDNA。以miR-16作为内参,采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算两组标本miR-3614-5p水平^[8],以 ΔCT 值表示其相对表达量水平, ΔCT 值越低,其相对表达量越高。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列:miR-16 正向:5'-GTCTGATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACcgccaa-3',反向:5'-GCTTGTAGCAGCAGCTAAATATTG-3';miR-3614-5p 正向:5'-GTCTGATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACctgaag-3',反向:5'-TACTAAATCGGGCAGCCTTCAG-3'。采用SYBR Premix ExTaqII 试剂盒检测每个扩增循环后SYBR Green 荧光信号水平,总反应体系20 μ L,反应条件:95℃、10 min 预变性;95℃、15 s,60℃、1 min,40个循环。实验重复3次。

1.4 统计学方法 使用SPSS 22.0统计软件对数据进行处理分析。数据不满足正态分布,以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间差异分析采用Mann-Whiney U 非参数检验法。对ICP组与对照组结果绘制受试者工作曲线(ROC),ROC曲线下面积(AUC)的比较采用Hanley-McNeil非参数检验法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICP组与对照组生化指标以及临床参数的比较 ICP组在年龄、孕周上与对照组差异无统计学

意义($P > 0.05$),在生化指标TBA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平上均差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 两组孕妇生化指标以及临床参数的比较/ $M(P_{25}, P_{75})$

临床参数	ICP组	对照组	Z值	P值
年龄/岁	29.4(24.3,32.4)	24.8(22.6,27.6)	-1.389	0.17
孕周/周	38.9(38.3,39.4)	39.2(38.7,39.7)	-1.793	0.07
TBA/ μ mol/L	82.2(45.9,108.8)	4.6(3.1,6.1)	-8.716	0.01
ALT/(U/L)	132.9(52.9,199.5)	13.9(8.1,21.1)	-6.734	0.02
AST/(U/L)	107.5(48.2,160.8)	17.2(12.1,21.5)	-4.374	0.03

注:ICP为妊娠期肝内胆淤积症,TBA为总胆汁酸,ALT为丙氨酸氨基转移酶,AST为天冬氨酸氨基转移酶

2.2 ICP病人血清miR-3614-5p的表达水平及与TBA相关性 qPCR检测结果显示,79例ICP病人血清miR-3614-5p的相对表达量 $[\Delta CT: 9.893(8.635, 10.166)]$ 较对照组 $[\Delta CT: 10.841(10.256, 11.987)]$ 增加,差异有统计学意义($Z = 6.00, P = 0.001$)。且血清miR-3614-5p表达水平与TBA呈正相关($r = 0.311, P < 0.001$),见图1。

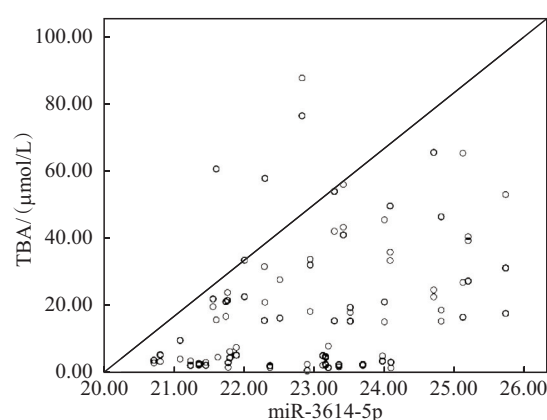
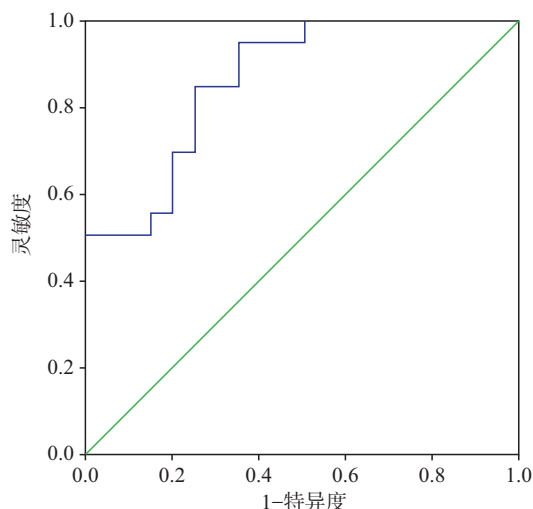


图1 妊娠期肝内胆淤积症(ICP)病人中miR-3614-5p与总胆汁酸(TBA)的相关性

2.3 ICP病人血清miR-3614-5p ROC曲线分析 血清miRNA-1182在ICP组中AUC、灵敏度、特异度分别为0.864、79.0%和83.0%,见图2。

3 讨论

ICP是一种特发于妊娠中晚期,以出现瘙痒及黄疸为主要临床症状的疾病,它对母体的影响主要表现在顽固性瘙痒和易于产后出血而导致产妇死亡率增加,对胎儿的影响更甚,可导致早产、胎粪污染、新生儿窒息、新生儿死亡、新生儿神经系统后遗症等^[9]。目前,ICP的发病原因及发病机制尚不明确,大量的流行病学研究以及临床观察实验室研究认为可能与遗传、激素、基因突变、营养和环境因素



注:ROC曲线下面积(AUC)为0.864;95%CI:0.810~0.918

图2 妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)病人血清miR-3614-5p受试者工作特征曲线(ROC)

有关。ICP的诊断也没有统一标准,中华医学会制订的ICP诊疗指南(2015版)指出TBA是目前诊断和检测ICP的主要指标,但皇家妇产科医师学会(RCOG)指南并不十分认同^[8]。ICP既难以预料又无法准确监测,带给广大产科工作者巨大困惑的同时,也给孕产妇及家属带来极大的精神创伤,因此极易引起医疗纠纷。选取更灵敏和特异的指标对ICP病人尽早进行诊断以及改善预后具有显著的意义。

microRNAs是一类内源性的短序列非编码小分子,大量研究表明其在细胞分化、增殖和生长,细胞凋亡,血管生成,炎症等生理和病理过程中起着重要作用^[10]。血清miRNA表达稳定并易于检测,是一种非常具有前景的诊断标志物^[11]。自2008年Chim研究组首次提出循环miRNA可作为妊娠相关并发症的生物标志物起,大量的miRNAs被鉴定并成为妊娠疾病的生物标志物^[5-6]。本研究在前期ICP血清miRNA谱的基础上,挑选miR-3614-5p进行临床验证,发现其在ICP病人中较对照组高表达,且差异有统计学意义,在ICP孕妇组ROC曲线下AUC、灵敏度、特异度分别为0.864、79%和83%,提示miR-3614-5p是诊断和评估ICP病人的理想标志物之一。

众所周知,血清TBA是胆固醇被肝脏分解后进入肝肠循环出现的物质,其代谢情况与肝脏功能障碍、实质损伤关系密切。孕中晚期雌激素波动幅度大,胆盐代谢障碍,影响肝细胞功能,进而血清TBA

异常升高、肝功能指标异常,这也是血清TBA用于检测ICP的原理^[12]。但miR-3614-5p与ICP的相关研究还是空白。但在生物信息学分析中,我们发现miR-3614-5p主要调控的功能有脂质磷酸化、细胞黏附、细胞凋亡、蛋白激酶结合等,可能参与MAPK信号通路,代谢途径,Wnt信号通路等生物过程^[7]。尤其是MAPK信号通路与脂类代谢密切相关,而脂类代谢是已明确的ICP发病机制之一。据此我们推测miR-3614-5p在ICP发病过程中也发挥了一定的功能作用,这还需要进一步的实验研究。

综上所述,本研究验证了ICP病人血清中高表达的miR-3614-5p,可作为检测ICP的一种新型靶标,具有一定的临床应用价值。

参考文献

- [1] 王晓敏,贺晶.早发型妊娠期肝内胆汁淤积症诊治的研究进展[J].中华妇产科杂志,2017,52(1):64-67.
- [2] 葛星,徐叶清,黄三唤,等.妊娠期肝内胆汁淤积症对分娩结局影响的出生队列研究[J].中华流行病学杂志,2016,37(2):187-191.
- [3] 蔡文杞,刘路遥,张应凤,等.妊娠期肝内胆汁淤积症的研究进展[J].现代妇产科进展,2016,25(11):871-873.
- [4] FRIBERG AK, ZINGMARK V, LYNDURUP J. Early induction of labor in high-risk intrahepatic cholestasis of pregnancy: what are the costs? [J]. Archives of Gynecology & Obstetrics, 2016, 294(4):709-714.
- [5] MULLER-DEILE J, SCHRODER P, BEVERLY-STAGGS L, et al. Overexpression of preeclampsia induced microRNA-26a-5p leads to proteinuria in zebrafish [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):3621.
- [6] DIAS S, PHEIFFER C, ABRAHAMS Y, et al. Molecular biomarkers for gestational diabetes mellitus [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10):2926.
- [7] ZOU P, LUO L, ZHAO C, et al. The serum microRNA profile of intrahepatic cholestasis of pregnancy: identification of novel noninvasive biomarkers [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(3):1480-1488.
- [8] 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,2015,31(7):481-485.
- [9] 欧泞依.妊娠期肝内胆汁淤积症临床特点与妊娠结局[J].系统医学,2018,3(15):118-120.
- [10] 梁时雨,汤依群.微小RNA在心脏疾病中的研究进展[J].安徽医药,2016,20(6):1040-1044.
- [11] 刘洪璐,王熙才.外周血miRNA应用于肿瘤早期诊断的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(2):109-117.
- [12] 肖凤莲,郑英如.妊娠期肝内胆汁淤积症总胆汁酸水平及终止妊娠时间与围产儿结局的关系[J].第三军医大学学报,2018,40(11):1028-1032.

(收稿日期:2019-02-25,修回日期:2019-03-29)