

胎盘 *ABCB4* 表达与妊娠期肝内胆汁淤积症血液指标 及妊娠结局相关性分析*

熊艳敏, 周琳娜

(河南科技大学第二附属医院 产科, 河南 洛阳 471000)

摘要: **目的** 分析胎盘组织中 *ABCB4* 基因表达情况与妊娠期肝内胆汁淤积症 (ICP) 患者血液指标及妊娠结局的相关性。**方法** 该回顾性研究病例纳入时间为2021年1月至2022年12月, 研究对象为河南科技大学第二附属医院112例ICP患者, 根据临床妊娠结局不同, 将60例伴不良妊娠结局的ICP患者列为预后不良组, 将52例正常分娩的ICP患者列为预后良好组。比较两组患者的胎盘 *ABCB4* 阳性表达率、*ABCB4* mRNA 相对表达量及血清胆汁酸、肝功能指标, 经 Spearman 相关性系数验证胎盘 *ABCB4* 表达情况与 ICP 患者血液指标的相关性; 通过绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线验证胎盘 *ABCB4* 表达情况对不良妊娠结局的预测效能。**结果** 经检测, 预后不良组患者的 *ABCB4* 阳性表达率为 85.00% (51/60), 高于预后良好组 73.08% (38/52), *ABCB4* mRNA 相对表达量为 (7.75 ± 2.31) , 低于预后良好组 (9.03 ± 2.49) ($P < 0.05$)。预后不良组患者的胆汁酸水平为 (55.25 ± 10.31) mmol/L, 谷草转氨酶 (AST) 水平为 (88.39 ± 10.47) U/L, 谷丙转氨酶 (ALT) 水平为 (85.11 ± 10.61) U/L, 均高于预后良好组 [(48.24 ± 10.47) mmol/L、 (80.24 ± 10.31) U/L、 (78.45 ± 10.17) U/L] ($P < 0.05$)。经 Spearman 相关性系数检验, 胎盘 *ABCB4* 阳性表达率会随胆汁酸、AST、ALT 水平上升而不断升高, *ABCB4* mRNA 相对表达量会下降; 经 ROC 曲线验证, *ABCB4* 阳性表达率越高、*ABCB4* mRNA 相对表达量越低, ICP 患者发生不良妊娠结局的风险越高。**结论** ICP 患者的胎盘 *ABCB4* 阳性表达率会明显升高, *ABCB4* mRNA 相对表达量会明显下降, *ABCB4* 阳性表达率与患者血液指标、不良妊娠结局发生率正相关, *ABCB4* mRNA 相对表达量与患者血液指标、不良妊娠结局发生率负相关。

关键词: 胎盘 *ABCB4* 表达; 妊娠期肝内胆汁淤积症; 血液指标; 妊娠结局; 相关性分析

中图分类号: R714.255

Correlation analysis of placental *ABCB4* expression with blood indicators and pregnancy outcomes in intrahepatic cholestasis of pregnancy*

XIONG Yanmin, ZHOU Linna

(Obstetrics Department, the Second Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China)

Abstract: **[Objective]** To analyze the correlation between the expression of *ABCB4* gene in placental tissue and blood indicators and pregnancy outcomes in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) patients. **[Methods]** This article is a retrospective study, with cases included from January 2021 to December 2022. The study subjects were 112 ICP patients. According to different clinical pregnancy outcomes, 60 ICP patients with adverse pregnancy outcomes were classified as the poor prognosis group, and 52 ICP patients with normal delivery were classified as the good prognosis group. The placental *ABCB4* positive expression rate, *ABCB4* mRNA relative expression level, serum bile acid, and liver function indicators of the two groups of patients were compared. The correlation between placental *ABCB4* expression and blood indicators in ICP patients was verified by Spearman correlation coefficient. The predictive efficacy of *ABCB4* expression in placenta for adverse pregnancy outcomes was verified by plotting ROC. **[Results]** After testing, the positive expression rate of *ABCB4* in patients with poor prognosis was

收稿日期: 2023-06-08

* 基金项目: 河南省医学科技攻关项目 (2021002156); 河南省医学教育研究项目 (201900217)

85.00% (51/60), which was higher than 73.08% (38/52) in the group with good prognosis. The relative expression level of ABCB4 mRNA was 7.75 ± 2.31 , and lower than that in the group with good prognosis 9.03 ± 2.49 ($P < 0.05$). The bile acid levels of patients with poor prognosis were 55.25 ± 10.31 mmol/L, AST levels were 88.39 ± 10.47 U/L, and ALT levels were 85.11 ± 10.61 U/L, which were higher than those of patients with good prognosis (48.24 ± 10.47 mmol/L, 80.24 ± 10.31 U/L, 78.45 ± 10.17 U/L) ($P < 0.05$). According to Spearman correlation coefficient test, the positive expression rate of ABCB4 in the placenta continuously increases with the increase of bile acid, AST, and ALT levels, while the relative expression level of ABCB4 mRNA decreases. According to the ROC curve validation, the higher the positive expression rate of ABCB4 and the lower the relative expression level of ABCB4 mRNA, the higher the risk of adverse pregnancy outcomes in ICP patients. **【Conclusion】** The positive expression rate of ABCB4 in the placenta of ICP patients will significantly increase, and the relative expression level of ABCB4 mRNA will significantly decrease. The positive expression rate of ABCB4 is positively correlated with the patient's blood indicators and the incidence of adverse pregnancy outcomes, while the relative expression level of ABCB4 mRNA is negatively correlated with the patient's blood indicators and the incidence of adverse pregnancy outcomes.

Keywords: ABCB4 expression in placenta; intrahepatic cholestasis of pregnancy; blood indicators; pregnancy outcome; correlation analysis

妊娠期肝内胆汁淤积症 (ICP) 为一种妊娠期常见并发症, 此类患者临床多伴有皮肤瘙痒、黄疸等典型症状, 经实验室检查可见其血清胆汁酸水平异常升高^[1]。目前临床尚未明确 ICP 的具体发病原因, 但考虑与家族遗传、既往病史、孕期体内激素水平紊乱等因素密切相关, 同时, 若孕妇自身年龄 ≥ 35 岁或伴人工受精等辅助生殖技术治疗史、慢性肝胆性疾病时, 发病 ICP 的风险也相对较高^[2]。ICP 患者的临床症状及体征一般可在分娩结束后自行恢复, 但也有部分患者可因血清胆汁酸水平控制不佳而出现羊水污染、早产、围产儿窒息等多种不良妊娠结局, 可对母体本身及新生儿生命安全造成严重威胁^[3-4]。目前针对此病临床尚未提出绝对理想的治疗方法, 一般以对症治疗、缓解临床症状为主要治疗原则^[5]。近年国外有研究指出^[6], 转运编码基因 *ABCB4* 突变可参与 ICP 疾病的发生, 且 *ABCB4* 蛋白高表达可增加新生儿不良预后发生风险。为进一步明确 ICP 发病机制并指导临床治疗, 本研究旨在分析胎盘组织中 *ABCB4* 基因表达情况与 ICP 患者血液指标及妊娠结局的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本文为回顾性研究, 病例纳入时间为 2021 年 1 月至 2022 年 12 月, 研究对象为河南科技大学第二附属医院 112 例 ICP 患者, 根据临床妊娠结局不同, 将入组患者分为预后不良组 (60 例) 和预后良好组 (52 例)。预后不良组中患者年龄 23~

35 岁, 平均 (28.44 ± 5.17) 岁; 孕周 36~40 周, 平均 (38.25 ± 5.18) 周; 孕期体重指数 (BMI) $23.00 \sim 28.00$ kg/m², 平均 (25.58 ± 5.13) kg/m²; 产次: 40 例为初产妇, 20 例为经产妇。预后良好组中患者年龄 24~34 岁, 平均 (29.22 ± 5.33) 岁; 孕周 37~39 周, 平均 (38.23 ± 5.21) 周; 孕期 BMI $23.50 \sim 27.00$ kg/m², 平均 (25.62 ± 5.25) kg/m²; 产次: 35 例为初产妇, 17 例为经产妇。两组患者一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本次研究已获得河南科技大学第二附属医院伦理委员批准 (33929)。

纳入标准: ①入组患者均符合 ICP 诊断要点^[7]; ②均为单胎、足月妊娠; ③年龄均 ≤ 35 岁; ④均知悉此次亚努就试验目的及内容, 同意获取并公开既往临床资料。

排除标准: ①伴妊娠期高血压、妊娠期糖尿病等^[8-9]合并症者; ②伴有其他心肺、肝肾功能异常者; ③恶性肿瘤者; ④伴免疫功能障碍或其他感染性疾病者; ⑤临床资料缺失者。

1.2 方法

胎盘 *ABCB4* 检测方法: ①检测样本: 于剖宫产术胎盘娩出后 15 min 内, 在母体面中央区域剪取 1 cm³ 大小胎盘组织, 加入浓度为 10% 的甲醛溶液 (上海溶剂厂, H31020858, 规格: 500 g) 进行固定后备用。② *ABCB4* 阳性表达率检测: 经免疫组化法观察 *ABCB4* 的阳性表达率, 对胎盘组织进行常规石蜡切片进行脱蜡处理, 后加入 0.01 mmol/L 的柠檬酸钠缓冲溶液修复切片组织中抗原; 加入浓度为 3% 的过氧化氢溶液 (海德润制

药，H11021382，规格：3%）后于室温下孵育 10 min，并将内源性过氧化氢酶进行封闭；应用磷酸盐缓冲液对样本进行反复冲洗，后加入 1：10 的 ABCB4 单抗稀释后孵育 120 min；再次应用磷酸盐缓冲液（北京生物制品研究所，S10850002）反复冲洗并加入 ABCB4 单抗后再孵育 30 min；经磷酸盐缓冲液进行第三次反复冲洗后加入二氨基联苯胺〔北京沃凯生物科技有限公司，沪食药监械（准）字 2013 第 1401615 号〕进行原位杂交显色反应并依次采用苏木素复染，经脱水、透明并应用中性树胶予以封片后，于显微镜下随机观察 3 个 400 倍视野，评估阳性细胞比例及染色强度。③ABCB4 mRNA 相对表达量检测：经逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）法检测 ABCB4 mRNA 的相对表达量，于冷冻的胎盘组织样本中加入生理盐水洗涤至无血色后，将其剪碎并置于匀浆器中；通过 Trizol 法提取 ABCB4 蛋白的 RNA，于 260 nm 条件下测定并记录吸光度，以此计算 ABCB4 蛋白的 RNA 纯度及含量；取 2 μg 总 RNA 实施逆转录扩增，获取 PCR 产物后在 95℃下予以 5 min 预变性，后予以 3 s 变性并在 58℃下进行 40 s 退火，在 72℃下进行 30 s 延伸，以此重复 40 次；测定 ABCB4 蛋白灰度，并参考 β-actin 灰度记录 ABCB4 mRNA 的相对表达量。

1.3 观察指标

①记录并对比两组患者的胎盘 ABCB4 阳性表达率、ABCB4 mRNA 相对表达量；②检测并对比两组患者的血液指标，统一采集外周静脉血作抗凝处理，后按转速 3 000 r/min，半径 10 cm 离心 5 min 后将血清样本送入 AU5800 全自动生化分析仪〔美国，贝克曼库尔特公司，国食药监械（进）字 2010 第 2402510 号〕中分别检测两组患者的胆汁酸水平、谷草转氨酶（AST）水平及谷丙转氨酶（ALT）水平，其中胆汁酸检测方法为酶联免疫吸附试验法，AST、ALT 检测方法为放射免疫法。③经 Spearman 相关性系数检验 ABCB4 阳性表达率及 mRNA 相对表达量的相关性^{〔10〕}。④通过绘制受试者工作特征（ROC）曲线分析外泌体 ABCB4 阳性表达率及 mRNA 相对表达量与不良妊娠结局的相关性，当曲线下面积（AUC）>0.85 时认为二者显著相关^{〔11〕}。

1.4 统计学方法

数据均采用软件 SPSS 22.0 处理，计数资料以

百分率（%）表示，用 χ^2 检验，计量资料以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，用 t 检验；经 Spearman 相关性系数检验 ABCB4 阳性表达率及 mRNA 相对表达量的相关性；通过绘制受试者工作特征曲线（ROC）分析外泌体 ABCB4 阳性表达率及 mRNA 相对表达量与不良妊娠结局的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的 ABCB4 表达情况比较

经检测，预后不良组的 ABCB4 阳性表达率高于预后良好组，ABCB4 mRNA 相对表达量低于预后良好组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见表 1。

表 1 两组患者的 ABCB4 表达情况比较

组别	<i>n</i>	阳性表达率[<i>n</i> (%)]	mRNA 相对表达量/ $(\bar{x} \pm s)$
预后不良组	60	51(85.00)	7.75±2.31
预后良好组	52	38(73.08)	9.03±2.49
t/χ^2		4.288	2.821
<i>P</i>		0.038	0.006

2.2 两组患者的血液指标比较

经检测，预后不良组患者的胆汁酸水平、AST、ALT 均高于预后良好组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见表 2。

表 2 两组患者的血液指标比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	胆汁酸/(mmol/L)	AST/(U/L)	ALT/(U/L)
预后不良组	60	55.25±10.31	88.39±10.47	85.11±10.61
预后良好组	52	48.24±10.47	80.24±10.31	78.45±10.17
<i>t</i>		3.563	4.138	3.377
<i>P</i>		0.001	<0.001	0.001

2.3 ABCB4 表达与血液指标的相关性

经 Spearman 相关性系数检验，胎盘 ABCB4 阳性表达率与 ICP 患者的胆汁酸、AST、ALT 水平正相关，ABCB4 mRNA 相对表达量与 ICP 患者的胆汁酸、AST、ALT 水平负相关（ $P<0.05$ ），见表 3。

表 3 ABCB4 表达与血液指标的相关性

指标	ABCB4 阳性表达率		ABCB4 mRNA 相对表达量	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
胆汁酸	0.255	0.006	-0.133	0.015
AST	0.249	0.009	-0.142	0.017
ALT	0.251	0.011	-0.139	0.020

2.4 ABCB4 表达对不良妊娠结局的预测效能

经 ROC 曲线验证，ICP 患者不良妊娠结局发生风险会随 ABCB4 阳性表达率升高、ABCB4

mRNA 相对表达量降低而不断上升（AUC 均>0.85），见表 4、图 1。

表 4 ABCB4 表达对不良妊娠结局的预测效能

指标	灵敏度/%	95%CI	特异度/%	95%CI	AUC	95%CI
(+)expn	78.25	85.50~70.32	79.44	86.20~71.43	0.854	0.785~0.887
mRNA	81.25	87.78~75.52	60.24	75.44~80.23	0.857	0.791~0.879

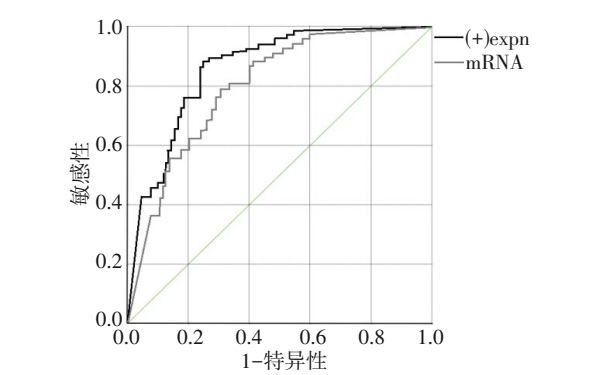


图 1 ABCB4 表达对不良妊娠结局预测 ROC 图

3 讨论

ICP 为一种好发于妊娠中晚期的常见疾病，为一种可导致多种不良妊娠结局并严重威胁母婴生命安全的妊娠期并发症，目前认为，此病多见于自身合并非酒精性肝硬化、胰腺炎、胆囊炎、胆结石等多种慢性肝胆系统疾病患者，其发病考虑与孕期体内激素水平紊乱或个人遗传、环境因素等密切相关^[12]。因其发病机制复杂，现阶段临床仍缺乏治疗 ICP 的特殊方法，将胆汁酸水平下调至 40 mmol/L 及以下并缓解临床症状为 ICP 患者的主要治疗原则^[13]。近年随遗传基因和分子生物学研究的不断深入，人们逐步认识到可参与胆汁酸转运及分泌的多种基因载体在 ICP 发病机制中产生的重要作用，也有研究证实^[14]，ABCB4 基因突变可导致 DME3 蛋白缺乏并抑制胆汁磷脂分泌或促使胆碱游离，随胆管细胞凋亡或坏死，孕妇胆道系统内可有大量胆汁预计并聚集为高浓度胆汁酸。

若胎盘组织中胆汁酸水平过高则会导致胎盘内血流因绒毛膜血管收缩不足而减少，进而影响胎盘的合成及转运^[15]。高水平胆汁酸不仅会增加羊水污染风险，还可直接损伤胎儿细胞及组织，导致胎儿宫内窘迫或新生儿窒息^[16]。研究表明^[17]，ABCB4 为染色 7q21.1 的重要载体，为肝脏

毛细胆管膜磷脂的主要输出泵，可有效保护胆管细胞免于胆汁盐损伤。本研究中，伴不良妊娠结局的预后不良组内患者的 ABCB4 阳性表达率高于预后良好组，ABCB4 mRNA 相对表达量低于预后良好组，提示 ABCB4 表达情况与 ICP 患者预后情况有紧密联系。赵临潇等^[18]研究表明，ICP 孕妇的 ABCB4 基因表达水平下降可增加不良妊娠结局发生风险，该研究中，ICP 组内患者的阳性表达率明显高于对照组，ABCB4 mRNA 相对表达量明显低于对照组，与本研究结果一致。国外相关研究指出^[19]，ABCB4 与胆汁淤积有密切关联。ABCB4 基因突变可导致 DMR3 蛋白匮乏、磷脂分泌减少，胆石症、AST 活性增强所致肝胆疾病均可导致胆汁淤积，上述患者的 ABCB4 基因突变率为 26.8%~44.4% 不等。而本研究中，预后不良组患者的胆汁酸水平、AST、ALT 均高于预后良好组，提示胆汁淤积程度越严重，ICP 患者的胆汁酸水平及肝功能损伤程度更高。经 Spearman 相关性系数验证得知，胎盘 ABCB4 阳性表达率与 ICP 患者的胆汁酸、AST、ALT 水平正相关，ABCB4 mRNA 相对表达量与 ICP 患者的胆汁酸、AST、ALT 水平负相关。且经 ROC 曲线验证后得知，ICP 患者不良妊娠结局发生风险会随 ABCB4 阳性表达率升高、ABCB4 mRNA 相对表达量降低而不断上升，提示通过检测 ABCB4 阳性表达率及 mRNA 相对表达量或可实现对 ICP 患者不良妊娠结局的有效预测。宇海燕等^[20]也表示，ABCB4 表达水平越低，ICP 患者不良妊娠结局的发生率越高，ABCB4 表达或可成为预测患者妊娠结局的重要指标。与本研究结论具有一致性。

综上所述，ABCB4 阳性表达率会随 ICP 胆汁酸水平、AST、ALT 水平升高而上升，但 ICP 不良妊娠结局发生风险与 ABCB4 mRNA 相对表达量负相关。

参 考 文 献

[1] 钱静, 闻明. 妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇血清总胆汁酸水平与胎儿宫内窘迫关系及预测缺氧程度价值[J]. 中国计划生育学杂志, 2022, 30(10): 2386-2388, 2393.

[2] 张静, 孟璐, 刘辰, 等. 妊娠期肝内胆汁淤积症发生的危险因素及对妊娠结局的影响[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(8): 1868-1874.

[3] 范晶晶, 王小红. 妊娠期肝内胆汁淤积症与胎儿生长受限及不良妊娠结局的关系[J]. 肝脏, 2022, 27(2): 238-241.

[4] SMITH DD, ROOD KM. Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Clin Obstet Gynecol, 2020, 63(1): 134-151.

[5] 龚燕, 龚杰. 妊娠期肝内胆汁淤积症的致病因素和药物治疗进展[J]. 肝脏, 2022, 27(2): 247-249, 254.

[6] PERRAULT F, ECHELARD P, VIENS D, et al. Contraceptive vaginal ring-induced cholestasis in a patient with a history of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2021, 45(4): 101475.

[7] 曾帅, 刘倚君, 刘兴会. 英国皇家妇产科医师学会《妊娠期肝内胆汁淤积症(2022)》指南要点解读[J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(12): 909-913.

[8] 唐瑶, 顾蔚蓉, 李笑天. 2021 年 ISSHP 妊娠期高血压疾病临床指南解读[J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(11): 832-838.

[9] 杨志芬, 王春洋. 2021 年妊娠期糖尿病相关诊疗指南解读[J]. 河北医科大学学报, 2021, 42(9): 993-997, 1021.

[10] ROVETTA A. Raiders of the lost correlation: a guide on using Pearson and spearman coefficients to detect hidden correlations in medical sciences[J]. Cureus, 2020, 12(11): e11794.

[11] WU YG. Nonparametric inference of the area under ROC curve under two-phase cluster sampling[J]. J Biopharm Stat, 2022, 32(2): 346-355.

[12] 夏士珊, 卢寨娥. 妊娠期肝内胆汁淤积症发生的危险因素及对母婴结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(11): 2600-2603.

[13] 朱丽花, 毛萍萍, 林亚娟. 熊去氧胆酸联合多烯磷脂酰胆碱治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的疗效及对血清胆碱酯酶、APOA1 和炎症因子的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(19): 2040-2044.

[14] 易波, 李雪, 汤善宏. 基因突变致胆汁酸代谢异常相关发生机制的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(9): 2136-2140.

[15] 叶云飞, 陈柏秀, 潘珏蓉. 妊娠期肝内胆汁淤积症胎盘组织中 STAT3/TNF- α 表达的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2021, 29(1): 77-79.

[16] 孙晋萍, 樊庆泊, 翟建军. 妊娠期肝内胆汁淤积症患者的围产儿结局分析[J]. 中国医药, 2021, 16(11): 1705-1707.

[17] SALEEM K, CUI QB, ZAIB T, et al. Evaluation of a novel missense mutation in *ABCB4* gene causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3[J]. Dis Markers, 2020, 2020: 6292818.

[18] 赵临潇, 左博云, 李静亚, 等. 妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇胎盘 *ABCB4* 基因表达与妊娠结局的关系[J]. 海南医学, 2022, 33(11): 1424-1427.

[19] CARBONE M, CARDINALE V. *ABCB4*-alteration screening in adult-onset cholestasis[J]. Dig Liver Dis, 2021, 53(3): 261-262.

[20] 宇海燕, 高静. 胎盘 *ABCB4* 表达在预测妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇妊娠结局中的意义[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2023, 39(2): 22-24.

(张咏 编辑)

• 40 •