

孕妇血清淀粉样蛋白 A 水平检测与早期原发性不明原因复发性流产的临床相关性研究*

曹 英, 刘春华, 杨亚莉 (宝鸡市妇幼保健院产科, 陕西宝鸡 721000)

摘要:目的 检测原发性不明原因早期复发性流产(recurrent early pregnancy loss, REPL)孕妇血清淀粉样蛋白 A(serum amyloid A, SAA)水平,并探讨其对不明原因 REPL 的预测价值。方法 将 2014 年 1~12 月间宝鸡市妇幼保健院妇产科收治的 96 例原发性不明原因 REPL 孕妇作为 REPL 组,并以 96 例无 REPL 史的正常孕妇作为对照组。采用酶联免疫法检测两组患者血清 SAA 水平,多因素 Logistic 回归分析 REPL 发病的危险因素,并采用 ROC 曲线评估 SAA 对 REPL 的诊断价值。结果 REPL 组孕妇血清 SAA 中位浓度(50.0 $\mu\text{g/ml}$)显著高于正常孕妇(11.6 $\mu\text{g/ml}$)($Z=2.153$, $P=0.000<0.01$)。SAA 对 REPL 的诊断价值较高($\text{AUC}=0.91$),最佳筛查阳性界值为 18 $\mu\text{g/ml}$ 。校正孕妇年龄和孕周因素, SAA 水平是原发性不明原因 REPL 发生的危险因素(OR 值:1.12, $P=0.000$)。结论 原发性不明原因 REPL 孕妇血清 SAA 水平升高可作为 REPL 发病的新的生物标志。

关键词:原发性不明原因早期复发性流产;血清淀粉样蛋白 A;合体化;滋养细胞侵入

中图分类号:R714.21;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)05-043-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.012

Clinical Research on Detecting the Serum Amyloid A Level of Pregnant Woman in Early Primary Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion

CAO Ying, LIU Chun-hua, YANG Ya-li (Department of Obstetrics, Baoji Maternal and Child Care Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China)

Abstract: Objective To research the serum amyloid A (SAA) levels of primary unexplained recurrent early pregnancy loss (REPL), and discuss the viability of regarding the SAA as a independent indicator of REPL. Methods A prospective study was conducted among 96 women with missed spontaneous abortion at Baoji Maternal and Child Care Hospital from January to December 2014. A control group was formed of pregnant women with no history of REPL. Serum samples of both groups were collected to measure SAA levels by enzyme linked immunosorbent assay. The association between SAA and primary unexplained REPL were analyzed according to the multiple factors Logistic models, and the diagnostic value of SAA to REPL were detected through receiver operating characteristic. Results Median SAA level was significantly higher among women with REPL (50 $\mu\text{g/ml}$, interquartile range 26.0~69.0 $\mu\text{g/ml}$), than that in the control group (11.6 $\mu\text{g/ml}$, interquartile range 6.2~15.5 $\mu\text{g/ml}$, $P=0.000<0.01$). The diagnose value of SAA to REPL was perfect good ($\text{AUC}=0.91$), and the most accurate value was 18 $\mu\text{g/ml}$. The SAA level was an independent indicator of primary unexplained REPL, after adjusting for maternal age and gestational age (OR:1.12, $P=0.000$). Conclusion Elevated SAA levels found among women with primary unexplained REPL could represent a novel biomarker for this complication of pregnancy.

Keywords: primary unexplained REPL; SAA; syncytialization; trophoblastic invasion

早期复发性流产(recurrent early pregnancy loss, REPL)约占妊娠妇女的 1%~2%^[1],其病因主要与染色体异常、解剖学异常、免疫因素、内膜因素及血栓形成等相关,但仍有近 50% 的 REPL 病因不详^[2]。血清淀粉样蛋白 A(serum amyloid A, SAA)是与急性时相反应相关的一种免疫调节蛋白^[3],其主要功能包括参与免疫调节、细胞增殖、细胞分化、细胞迁徙及侵入等重要的生理过程^[4,5]。SAA 主要由肝脏合成,但在早期胚胎滋养层细胞中也有表达,发挥免疫调节作用,并参与滋养层细胞的迁徙、侵入及分化过程^[6]。低浓度的 SAA 可

调节滋养层细胞的迁徙及金属蛋白酶活性,对胎盘形成及胎盘内稳态的维持具有重要的意义;SAA 水平升高则可显著干扰其生理功能,包括滋养层细胞侵入子宫蜕膜的过程异常,从而可能导致不育或自然流产^[7]。因此,本研究探讨了孕妇血清 SAA 水平与原发性不明原因 REPL 发生的相关性,并分析 SAA 水平作为 REPL 的新型早期血清标志物的诊断价值。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 一般资料:选择 2014 年 1~12 月间宝鸡市

* 基金项目:宝鸡市 2013 年科学技术研究发展计划项目(13SF4_2)。

作者简介:曹 英(1977—),女,本科,主治医师,研究方向:产科门诊孕妇膳食营养指导及妇科肿瘤临床治疗, E-mail:caoying197711@126.com。

通讯作者:杨亚莉(1978—),女,本科,主治医师,研究方向:产后康复, E-mail:longxianrenda@163.com。

妇幼保健院妇产科收治的96例原发性不明原因REPL孕妇作为REPL组。同期选择96例1次以上正常妊娠史且无REPL史的孕妇作为对照组。本研究经医院伦理委员会审查后批准实施,所有患者均签署知情同意书。患者一般资料见表1:REPL组过往分娩次数、自然流产次数,与对照组比较差异均有统计学意义($Z=1.471, 2.029$, 均 $P=0.000$)。而REPL组孕周、结婚年限、年龄、身高体重指数($t=0.890, 1.255, 2.141, 2.163$; $P=0.322, 0.146, 0.095, 0.185$),区域、被动吸烟、社会经济状况等人口统计学资料($\chi^2=0.192, 1.097, 2.961$; $P=0.117, 0.383, 0.770$),与对照组比较差异均无统计学意义,具有可比性。

表1 一般资料比较

| 变量 | REPL组(n=96) | 对照组(n=96) | P值 |
|----------------------|-------------|-----------|-------|
| 年龄(岁) ^a | 29.3±3.9 | 27.9±5.0 | 0.095 |
| 结婚年限(年) ^a | 4.4±1.2 | 4.2±1.0 | 0.146 |
| 身高体重指数 ^a | 26.7±3.8 | 25.6±3.3 | 0.185 |
| 分娩次数 ^b | 0(0~0) | 1(1~2) | 0.000 |
| 自然流产次数 ^b | 3(2~4) | 1(1~1) | 0.000 |
| 孕周(周) ^a | 8.7±1.4 | 8.5±1.7 | 0.322 |
| 终止妊娠方式 ^c | — | — | 0.015 |
| 药物 | 18(18.75) | 6(6.25) | — |
| 手术 | 78(81.25) | 90(93.75) | — |
| 社会经济地位 ^c | — | — | 0.770 |
| 低 | 57(59.38) | 54(56.25) | — |
| 高 | 39(40.63) | 42(43.75) | — |
| 区域 ^c | — | — | 0.117 |
| 城市 | 61(63.54) | 72(75.00) | — |
| 农村 | 35(36.46) | 24(25.00) | — |
| 被动吸烟情况 ^c | 18(18.75) | 24(25.00) | 0.383 |

注:^a以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;^b以中位数(四分位范围)表示,采用非参数Mann-Whitney U检验;^c以数(率)表示,采用 χ^2 或Fisher校准检验。

1.1.2 纳入及排除标准:REPL组纳入标准:无正常生育史;经历连续两次以上的原发性不明原因的REPL;且在妊娠早期发生流产。对照组纳入标准:先前至少有1次正常妊娠史;无REPL史。排除标准:排除处于慢性炎症期、肿瘤、多囊卵巢综合征、吸烟、多胎妊娠、糖尿病、高血压、先兆子痫、胎儿宫内生长受限的孕妇。

1.1.3 诊断标准:孕周从末次月经首日开始计算,通过阴道B超确认。妊娠流产特征包括:妊娠6周有完整宫内孕囊但心脏搏动阴性,有宫内孕囊但未见卵黄囊(直径>30 mm),或者孕6周见空心的宫内孕囊。胎停后均行手术或药物流产。

1.2 试剂与仪器 试剂:血清SAA ELISA试剂盒(ab10065,英国 abcam)。仪器:Multiskan GO 酶标仪(Thermo mk³),高速离心机(eppendorf 5430),洗板机(BioTek 405TS),恒温水浴锅(Thermo Precision?),-80℃超低温冰箱(Thermo 991)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及处理:所有研究对象均空腹抽取5 ml肘静脉血。血液标本经4℃ 2 500 g离心5 min,分离血清并储存于-80℃备用。

1.3.2 SAA检测:采用人血清SAA ELISA试剂盒(英国 abcam, ab10065)进行检测。室温解冻血清样本及试剂,参照试剂盒说明书操作。经准备试剂、配制标准品、加样、洗涤温育、加抗体、洗涤温育、加酶、洗涤温育、显色、测定等步骤测量各孔吸光度(A值),根据标准曲线及软件分析计算各样本中SAA浓度。

1.4 统计学分析 数据采用SPSS17.0和MedCalc 12.5进行统计分析。数据资料正态性分布采用Shapiro-Wilk正态检验。正态分布的数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示;组间比较采用独立样本 t 检验。偏态分布数据以中位数和四分位范围(IQR)表示;组间比较采用非参数Mann-Whitney U检验。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 或Fisher校准检验。ROC曲线评价原发性早期不明原因REPL的血清SAA水平阈值。多参数logistic回归分析用于检验原发性早期不明原因REPL的独立预测因素。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清SAA水平比较 REPL组血清SAA中位浓度为50.0(26.0~69.0)μg/ml,显著高于对照组的11.6(6.2~15.5)μg/ml,差异有统计学意义($Z=2.153, P=0.000$)。

2.2 ROC曲线评价血清SAA对原发性不明原因REPL的诊断价值 见表2。ROC曲线下面积(AUC)为0.91(95%CI, 0.83~0.96),提示SAA对REPL的诊断价值较高($AUC>0.9$)。SAA作为原发性不明原因REPL标志物的最佳筛查阳性界值(cut-off值)为18 μg/ml。诊断的敏感度、特异度、阳性似然比、阴性似然比、阳性预测值和阴性预测值较好。

表2 血清SAA水平诊断原发性不明原因REPL的价值

| 测量 | 估值 | (95%CI) |
|------------------------|-------|-----------|
| ROC曲线下面积(AUC) | 0.91 | 0.83~0.96 |
| 约登指数(J) | 0.7 | — |
| 血清SAA最佳cut-off值(μg/ml) | >18.0 | — |
| 敏感度(%) | 82.5 | 67.2~92.7 |
| 特异度(%) | 87.5 | 73.2~95.8 |
| 阳性似然比 | 6.6 | 2.9~15.2 |
| 阴性似然比 | 0.2 | 0.1~0.4 |
| 阳性预测值(%) | 86.8 | 71.9~95.6 |
| 阴性预测值(%) | 83.3 | 68.6~93.0 |

2.3 多因素logistic回归模型分析原发性不明原因REPL的危险因素 见表3。在调整孕妇年龄和孕周因素后,发现SAA水平可作为原发性不明

原因 REPL 的独立预测因子($\beta=0.12$, $OR=1.12$, $95\% CI:1.06\sim1.19$, $P=0.000$)。

表3 多因素 logistic 回归模型分析
原发性不明原因 REPL 的危险因素

| 变 量 | 回归系数(标准误差) | 相对风险(95%CI) | P 值 |
|-------------------------------|-------------|-----------------|--------|
| 血清 SAA 水平($\mu\text{g/ml}$) | 0.12(0.03) | 1.12(1.06~1.19) | <0.001 |
| 年龄(岁) | -0.12(0.08) | 0.88(0.75~1.04) | 0.146 |
| 流产时胎龄(周) | -0.51(0.25) | 0.60(0.37~0.97) | 0.146 |
| 常量 | 4.49 | - | - |

3 讨论

3.1 SAA 水平为 REPL 发生的危险因素 研究报道早期妊娠(10~12周)胚胎滋养层 SAA 表达水平升高,提示 SAA 在早期胚胎发育过程中发挥重要作用^[6]。Canisso 等^[7]研究显示正常生理浓度 SAA 通过激活 Toll 样受体及维持母胎耐受相关的抗炎、促炎性因子的功能性平衡来调节滋养层细胞侵入子宫蜕膜的过程;相反, SAA 水平升高与滋养层细胞侵入和滋养层细胞合体化过程异常相关^[8]。Ibrahim 等^[9]研究显示 $1\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$ 外源性 SAA 可刺激人滋养层细胞株的侵入,并减少金属蛋白酶的基因表达和活性,而 $20\mu\text{g/ml}$ 的 SAA 则抑制绒毛外滋养层细胞的侵入及 $\beta\text{-HCG}$ 的分泌。本研究结果显示原发性不明原因 REPL 女性血清 SAA 水平较正常妊娠女性大幅度升高,且血清 SAA 水平为 REPL 发生的危险因素,提示 REPL 的发生与血清 SAA 水平异常升高密切相关,其机制应为高浓度 SAA 干扰滋养层细胞侵入及滋养层细胞合体化过程。

3.2 SAA 通过 TNF, IL-6 类炎症因子介导 REPL 的发生 SAA 引起的滋养层细胞合体化异常可能由其他的炎症介质介导,尤其是肿瘤坏死因子(TNF)^[10]。研究发现在一些胎盘失调性疾病中促炎因子 TNF 表达异常和滋养层细胞侵入失败间存在联系,尤其是子痫前期和胎儿宫内生长受限^[11~14]。Park 等^[15]研究发现子痫前期女性血清 SAA 水平明显升高,且与促炎因子水平具有相关性,这可能为其发病机制之一。以上报道均提示高浓度 SAA 可通过干扰滋养层细胞合体化和滋养层细胞侵入子宫蜕膜诱发流产, TNF 类促炎因子可能为其作用介质。IL-6 具有重要的抗炎和促炎作用,且常为疾病发生机制的关键^[16]。已有报道原发性不明原因 REPL 女性血清 IL-6 水平显著升高,但胚胎停育及非自然流产女性则未见明显变化^[17]。

IL-6 在多种细胞中表达以应对免疫反应,包括合体滋养层细胞^[18],滋养层细胞释放的 IL-6 可促进肝脏分泌 SAA,这可能是 REPL 发生的机

制之一。因此,封闭 IL-6 相关受体可作为原发性不明原因 REPL 治疗的新靶点。

3.3 血清 SAA 作为不明原因 REPL 的新标志物

对比之前的报道,本研究有以下几个优势。首先,第一次探讨了原发性不明原因 REPL 和血清 SAA 水平的关系。此外,对照组的设置非常合理,患者先前均有一次无并发症的妊娠史,且入组时为第一次流产。这样设计有利于阐明 SAA 水平升高是与单次妊娠流产相关,或者仅与原发性不明原因 REPL 相关。不足之处包括样本量的大小缺乏依据,原因为缺乏原发性不明原因 REPL 女性 SAA 水平相关数据的报道。此外,不能可靠地评估风险相关性,且未讨论与病因学的联系。本研究仅提出了 SAA 水平和原发性不明原因 REPL 可能的相关性,但联系的作用方式及机制仍需更多研究证明。综上所述, SAA 是原发性不明原因 REPL 的一个潜在的新的标志物,且需要进一步的研究。未来可比较 REPL 病史女性妊娠期和非妊娠期 SAA 水平,以及流产前后 SAA 水平的变化。这些研究可能促进新的治疗手段的产生,例如基因治疗或免疫受体拮抗剂的使用。

参考文献:

- [1] 李莉,乔杰,王海燕.不明原因复发性流产免疫学发病机制的研究进展[J].中华生殖与避孕杂志,2017,37(2):160-165.
Li L, Qiao J, Wang HY. Research advances in the immunological pathogenesis of unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Reprod Contracept, 2017, 37(2):160-165.
- [2] Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, et al. Terminology for pregnancy loss prior to viability: A consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group[J]. Hum Reprod, 2015, 30(3):495-498.
- [3] 陈长强,顾志冬,樊绮诗.血清淀粉样蛋白 A 在疾病应用中的研究进展[J].检验医学,2012,27(9):776-779.
Chen CQ, Gu ZD, Fan QS. The progress of serum amyloid A in the application of disease[J]. Lab Med, 2012, 27(9):776-779.
- [4] 费凤英,衣萍,林见敏.血清淀粉样蛋白 A 与 C 反应蛋白联合检测的临床应用价值[J].检验医学,2014,29(10):1031-1033.
Fei FY, Yi P, Lin JM. Clinical application significance of serum amyloid A and C-reactive protein combined determination[J]. Lab Med, 2014, 29(10):1031-1033.
- [5] O'Neill L, Rooney P, Molloy D, et al. Regulation of inflammation and angiogenesis in giant cell arteritis by acute-phase serum amyloid A[J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(9):2447-2456.
- [6] Tramontana A, Dieplinger B, Stangl G, et al. First trimester serum concentrations of afamin are associated with the development of preeclampsia and gestational diabetes mellitus in pregnant women[J]. Atherosclerosis, 2016(252):e69-e70.
- [7] Canisso IF, Ball BA, Cray C, et al. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis (下转 49 页)

(上接 45 页)

- in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2014, 72(4): 376-385.
- [8] Borbely AU, Sandri S, Fernandes IR, et al. The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells[J]. *Reprod Biol Endocrin*, 2014, 12(1): 7-12.
- [9] Ibrahim MI, Harb HM, Ellaity MI, et al. First trimester assessment of pentraxin-3 levels in women with primary unexplained recurrent pregnancy loss[J]. *Eur J Obstet Gynr B*, 2012, 165(1): 37-41.
- [10] 李新菊. 子痫前期发病及其严重程度与 NF- κ B, TNF- α 及 PLGF 相关性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(12): 1849-1851.
- Li XJ. Study on the correlation between onset, degree of severity of preeclampsia and NF- κ B, TNF- α , PLGF[J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2014, 29(12): 1849-1851.
- [11] Keane KN, Mustafa KB, Hinchliffe P, et al. Higher β -HCG concentrations and higher birthweights ensue from single vitrified embryo transfers[J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 33(2): 149-160.
- [12] 罗振宇, 柴冬宁, 李 萍, 等. 复发性流产病因分析及免疫治疗[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(4): 782-784.
- Luo ZY, Chai DN, Li P, et al. Etiological analysis and immunotherapy of recurrent spontaneous abortion[J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2016, 31(4): 782-784.
- [13] Timur H, Yimaz N, Kahyaoglu I, et al. The effect of serum and follicular fluid amyloid-associated protein levels on in vitro fertilization outcome in patients with polycystic ovary syndrome[J]. *J Assist Reprod Gen*, 2015, 32(11): 1637-1640.
- [14] 李 屹, 贾 杰, 孙艺娟, 等. 子痫前期产妇血浆中白细胞介素-6 与肿瘤坏死因子- α 含量变化的相关性[J]. *广东医学*, 2016, 37(24): 3701-3703.
- Li Y, Jia J, Sun YJ, et al. Correlation of the change of interleukin-6 with tumor necrosis factor- α in plasma of pre-eclampsia woman [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2016, 37(24): 3701-3703.
- [15] Park HJ, Shim SS, Cha DH. Combined screening for early detection of pre-eclampsia[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 17952-17974.
- [16] Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(5): 448-457.
- [17] Nair RR, Khanna A, Singh K. Association of interleukin 1 beta(IL-1B) gene polymorphism with early pregnancy loss risk in the North Indian population [J]. *Int J Immunogenet*, 2014, 41(1): 41-43.
- [18] Almasry SM, Eldomiaty MA, Elfayomy AK, et al. Expression pattern of tumor necrosis factor alpha in placenta of idiopathic fetal growth restriction[J]. *J Mol Histo*, 2012, 43(3): 253-254.

收稿日期: 2017-07-11 修回日期: 2017-09-04