

## 论著·临床研究

## LC-MS/MS 法检测不明原因复发性流产患者蜕膜组织中多种氨基酸水平

许红, 韩彦洁, 张瑶, 刘力

(石家庄市第四医院/石家庄市妇产医院检验科, 石家庄 050000)

**摘要:**目的 分析不明原因复发性流产(URSA)患者与正常人工流产妇女蜕膜组织中 7 种氨基酸水平的差异,探讨 URSA 患者蜕膜组织中氨基酸的变化及临床意义。方法 采用高效液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)检测 15 例 URSA 患者和 20 例人工流产妇女蜕膜组织中 7 种氨基酸水平的差异。组织样本充分研磨后加入含有同位素内标的甲醇溶液,添加比例为 1:9(M:V),混匀并离心,提取 100  $\mu$ L 上清液进行检测。选用 API3200 型液相色谱串联质谱的多重反应监测(MRM)扫描方式。结果 本方法简单、快速、高通量,且具有良好的重复性和稳定性。URSA 患者蜕膜组织中鸟氨酸、甘氨酸水平均高于人工流产妇女( $P < 0.05$ );而两组间丙氨酸、缬氨酸、精氨酸、酪氨酸、瓜氨酸水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 URSA 患者与人工流产妇女蜕膜组织中氨基酸水平存在差异。深入研究可能为不明原因复发性流产的病因学提供基础。

**关键词:** 高效液相色谱串联质谱法; 不明原因复发性流产; 蜕膜组织; 氨基酸分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.21.022

中图分类号:R714.21

文章编号:1673-4130(2018)21-2682-04

文献标识码:A

### Determination of multiple amino acids levels in decidua tissues of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion by LC-MS/MS

XU Hong, HAN Yanjie, ZHANG Yao, LIU Li

(Department of Clinical Laboratory, Shijiazhuang Fourth Hospital/Shijiazhuang Obstetrics and Gynecology Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

**Abstract: Objective** To analyze the difference of seven amino acids in decidua between unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) patients and normal induced abortion women, and to explore the changes and clinical significance of amino acids in decidua of URSA patients. **Methods** High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to detect the levels of seven amino acids in decidua of 15 URSA patients and 20 normal induced abortion women. The tissue samples were ground thoroughly and then added with methanol solution containing the internal standard of isotope. The ratio was 1:9 (M:V), mixed and centrifuged. The supernatant of 100  $\mu$ L was extracted for detection. API3200 tandem mass spectrometry (MRM) scanning mode was used. **Results** This method was simple, rapid, high-throughput, and had good repeatability and stability. The levels of ornithine and glycine in decidua of URSA patients were higher than those of normal induced abortion women ( $P < 0.05$ ), but the levels of other amino acids (Ala, Val, Arg, Tyr, Cit) were not significantly different ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** There were differences of amino acid levels in decidua tissues between normal induced abortion women and URSA patients. Further studies may provide the basis for the etiology of recurrent spontaneous abortion.

**Key words:** LC-MS/MS; unexplained recurrent spontaneous abortion; decidua tissue; amino acid analysis

复发性自然流产(RSA)病因复杂,给患者带来了巨大的身心痛苦,也是导致继发性不孕的重要原因<sup>[1-2]</sup>。目前仍有约 50% 的 RSA 患者尚未发现明确致病因素,被称为不明原因复发性流产(URSA),这使 URSA 成为目前临床研究的热点和难点之一<sup>[3-4]</sup>。近

年来,有文献报道 URSA 与孕妇及胎儿氨基酸代谢相关<sup>[5]</sup>,蜕膜组织是连系孕妇与胎儿的重要组织,其氨基酸水平能准确反映孕妇及胎儿的代谢状况<sup>[6-7]</sup>。然而,笔者通过查阅相关文献发现,对蜕膜组织中相关氨基酸检测的研究较少,因此,本研究采用高效液相

作者简介:许红,女,主任技师,主要从事临床检验诊断学研究。

本文引用格式:许红,韩彦洁,张瑶,等. LC-MS/MS 法检测不明原因复发性流产患者蜕膜组织中多种氨基酸水平[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(21): 2682-2684.

色谱串联质谱(LC-MS/MS)法分析 URSA 患者蜕膜组织中 7 种氨基酸水平,旨在初步探讨 URSA 患者蜕膜组织中氨基酸水平的变化及其临床意义,以期发现一些特异性氨基酸,为临床对 URSA 的诊断提供理论依据,也为 URSA 的病因学研究提供理论基础。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究共收集研究对象 35 例,其中 URSA 组 15 例,正常人工流产组妇女 20 例,且均为 2015 年 3 月至 2016 年 12 月在石家庄市妇产医院就诊的患者。URSA 患者年龄 20~35 岁,流产次数>2 次,流产时孕周<20 周,通过询问病史及各种血液学检查和神经系统检查等手段未查明流产原因;在收集标本前未接受任何药物治疗;排除生殖器官解剖异常,有内分泌、免疫、遗传疾病的患者。对照者为随机选取的门诊正常人工流产妇女 20 例,怀孕孕周<20 周,年龄 20~35 岁,排除肝、肾疾患及免疫性疾病史,且无宫内感染及其他临床发热征象,无自然流产、死胎、死产史。两组孕妇一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究经石家庄市妇产医院医学伦理委员会通过,并所有研究对象或家属知情同意并签证。

**1.2 仪器与试剂** API3200 型液相色谱串联质谱仪以及 Analyst 4.2 数据处理软件购自美国 AB SCIEX 公司;离心机购自德国 Eppendorf 公司;氨基酸同位素对照品试剂盒( $^2\text{H}_4$ -丙氨酸 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , $^2\text{H}_4$ , $^{13}\text{C}$ -精氨酸 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , $^2\text{H}_2$ -瓜氨酸 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , $^{15}\text{N}$ , 2- $^{13}\text{C}$ -甘氨酸 12.5  $\mu\text{mol/L}$ , $^2\text{H}_2$ -鸟氨酸 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , $^{13}\text{C}_6$ -酪氨酸 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , $^2\text{H}_8$ -缬氨酸 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ,纯度 $\geq 98\%$ )购自济南英盛公司;甲醇、乙腈均为色谱纯。

### 1.3 方法

**1.3.1 样本处理** 留取 URSA 组和人工流产组妇女蜕膜组织,立即保存于液氮中。配制含有同位素内标的甲醇溶液,取同位素标准品 50  $\mu\text{L}$ ,加入甲醇 9.95 mL,于 4  $^\circ\text{C}$  密封保存,使用时恢复至室温。检测时将组织样本充分研磨,加入含有同位素内标的甲醇溶液,添加比例为 1:9(M:V),混匀并离心,提取 100  $\mu\text{L}$  上清液至 V 型底耐热微孔板中,覆上铝箔封膜减少挥发。将微孔板放入 LC-MS/MS 自动进样器中,启用软件开始检测。

**1.3.2 色谱质谱条件** 本研究采用多重反应监测

(MRM)模式进行正离子扫描。流动相为 100% 甲醇;进样量为 20  $\mu\text{L}$ ;离子喷射电压为 5 000 V;温度为 550  $^\circ\text{C}$ ;源内气体 1(GS1,N<sub>2</sub>)压力为 350 kPa;气体 2(GS2,N<sub>2</sub>)压力为 400 kPa;气帘气体(N<sub>2</sub>)压力为 135 kPa;碰撞气(N<sub>2</sub>)压力为中等;解簇电压(DP)为 35 V;碰撞能量(CE)为 30 eV。

**1.3.3 精密度考察** 随机选取蜕膜组织样本 5 例,按本研究提出的预处理及检测方法进行处理后检测,每日平行测定 5 次,计算其日内相对标准偏差,连续测定 5 d,计算其日间相对标准偏差。其检测结果见表 1。

**1.3.4 稳定性考察** 由于采集到的样本通常不能及时检测,为了验证蜕膜组织中各氨基酸水平是否会随时间延长而发生变化,本研究做了稳定性实验。将样本放置于-20  $^\circ\text{C}$  冰箱中,同一样本分别放置 1~7 d,每天检测 3 次,求其平均值,以第 1 天检测为基准,计算该样本第 2-7 天检测的平均回收率。其检测结果见表 2。

**1.4 数据处理及分析** 本实验的定量方法参考文献[8],定量公式为  $C_1 = A_1 \times \text{CIS} \times K / \text{AIS}$ ,其中, $C_1$  为测试样本氨基酸水平; $A_1$  为测试样本氨基酸峰面积; $\text{CIS}$  为内标氨基酸水平; $\text{AIS}$  为内标氨基酸峰面积; $K$  为特定校准系数。统计学分析采用 SPSS13.0 软件。两组计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用两独立样本  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 检测条件优化** 为了提升检测效果,本实验对离子喷射电压和离子化温度这两个重要的检测条件进行了优化。由于被检氨基酸相对分子质量较小,理论上应选用较低的离子喷射电压,经不断优化调试发现离子喷射电压在 5 000 V 时信号较高且稳定,因而本实验选用 5 000 V 的离子喷射电压。当离子化温度低于 500  $^\circ\text{C}$  时,离子化程度不充分,影响氨基酸检测响应值,当温度高于 650  $^\circ\text{C}$ ,又容易造成离子化过程中部分中性基质碳化或焦化,进而污染离子源,降至 550  $^\circ\text{C}$  后离子化效果较好且不易焦化,因而本实验选用了 550  $^\circ\text{C}$  离子化温度。

**2.2 精密度考察结果** 根据 1.2.4 提出的考察方法,计算该方法日内及日间相对标准偏差。根据其检测结果可知,该方法的日内和日间标准偏差均不超过 5.2%,充分说明该方法具有良好的精密度。见表 1。

表 1 蜕膜组织中各氨基酸日内及日间标准偏差测定结果(%)

项目	丙氨酸(Ala)	缬氨酸(Val)	鸟氨酸(Orn)	精氨酸(Arg)	酪氨酸(Tyr)	瓜氨酸(Cit)	甘氨酸(Gly)
日内标准偏差	3.3	3.8	4.5	3.9	4.2	2.4	2.8
日间标准偏差	5.2	4.1	5.0	4.2	4.5	2.6	3.5

**2.3 稳定性考察结果** 根据 1.2.5 提出的考察方法,该方法第 2—7 天检测的平均回收率在 98.9%~84.1%,充分表明该样本在-20℃冰箱中放置 7 d 对检测结果无明显影响。见表 2。

**2.4 两组氨基酸水平比较** 本研究共分析了 URSA 患者及人工流产妇女蜕膜组织中 7 种氨基酸水平,相比人工流产组,URSA 组患者的鸟氨酸、甘氨酸水平显著升高( $P < 0.05$ );而丙氨酸、缬氨酸、精氨酸、酪氨酸、瓜氨酸两组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。两组串联质谱氨基酸检测结果见表 3。

表 2 蜕膜组织中各氨基酸回收率测定结果(%)

氨基酸名称	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
丙氨酸(Ala)	96.8	95.1	93.5	91.5	91.1	87.7
缬氨酸(Val)	96.3	96.2	91.6	92.3	90.1	86.3
鸟氨酸(Orn)	95.5	92.4	90.5	91.7	86.2	87.2
精氨酸(Arg)	97.5	92.4	91.6	90.9	91.1	86.2
酪氨酸(Tyr)	93.4	91.9	92.3	93.1	85.7	86.1
瓜氨酸(Cit)	94.3	90.3	90.1	85.4	85.3	84.1
甘氨酸(Gly)	98.9	92.1	93.4	92.2	91.0	86.5

表 3 URSA 患者组与人工流产组氨基酸检测结果分析( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

组别	n	丙氨酸(Ala)	缬氨酸(Val)	鸟氨酸(Orn)	精氨酸(Arg)	酪氨酸(Tyr)	瓜氨酸(Cit)	甘氨酸(Gly)
URSA 组	15	345.6±10.2	216.2±13.1	127.3±9.5	77.1±8.2	54.0±5.1	31.6±4.3	310.2±29.3
人工流产组	20	348.1±12.7	225.5±11.4	104.3±9.1	73.6±5.1	52.5±3.8	30.3±3.4	262.3±21.9
P		0.12	0.64	0.00	0.18	0.11	0.08	0.00

### 3 讨 论

URSA 发病机制复杂,发病原因不明,无法采取针对性治疗措施,因而成为困扰生殖医学和妇产科学的一大难题<sup>[8-9]</sup>。有研究报道显示,URSA 与孕妇及胎儿代谢相关,而氨基酸代谢是人体内最为重要的代谢途径之一,孕妇或胎儿氨基酸代谢异常直接影响胎儿宫内生长<sup>[10]</sup>。蜕膜组织是连接孕妇与胎儿的重要枢纽,蜕膜组织中氨基酸水平能够直接反映孕妇及胎儿的氨基酸代谢状态。本研究采用 LC-MS/MS 法分析了 URSA 患者与人工流产妇女蜕膜组织中 7 种氨基酸水平,并进行了比较,旨在探讨 URSA 患者蜕膜组织中这些氨基酸水平变化的临床意义,为其病因学研究提供理论基础。

常见的氨基酸检测方法包括离子交换色谱法<sup>[11]</sup>、气相色谱串联质谱法<sup>[12]</sup>、高效液相色谱法<sup>[13]</sup>、液相色谱串联质谱法<sup>[14]</sup>等。与其他方法相比,LC-MS/MS 具有较高的灵敏度和选择性,且无需对样本进行衍生化处理,分析效率大大提高,成为最热门的氨基酸分析手段<sup>[15]</sup>。在本研究中,进一步简化了方法的预处理过程,且 LC-MS/MS 与自动进样系统相连接,能够简单、快速、高通量地对大量 URSA 患者蜕膜组织中多种氨基酸进行分析,且具有良好的精密度和稳定性,适合临床上大样本检测。

本研究检测结果显示,相比正常人工流产妇女,URSA 组患者的鸟氨酸、甘氨酸水平显著升高( $P < 0.05$ );而丙氨酸、缬氨酸、精氨酸、酪氨酸、瓜氨酸则无明显差异。鸟氨酸是尿素生成的中间产物,是精氨酸、瓜氨酸等多种氨基酸代谢的前提物质,主要参与产尿素的鸟氨酸循环中,对人体内集聚的氨具有解毒作用,因而鸟氨酸对人体肝脏细胞具有重大意义<sup>[16]</sup>。而甘氨酸是最重要的抑制性神经递质,在神经信号的

传递,以及参与各种生理和病理反应中起着重要基础作用<sup>[17]</sup>。

### 4 结 论

结合本研究,URSA 组患者蜕膜组织中鸟氨酸和瓜氨酸水平之所以较高,可能是因为母体或胎盘方面氨基酸转运障碍,使得自体水平增高,而输送至胎儿生长微环境的氨基酸量不足,导致胎儿发育不良而流产;也可能是由于母体蛋白质分解代谢亢进,母体-胎盘-胎儿循环链代谢失衡等原因。丙氨酸、缬氨酸、精氨酸、酪氨酸、瓜氨酸在两个组织中的水平无明显差异,说明 URSA 的发病原因与这几种氨基酸代谢无明显联系。人体中氨基酸种类繁多,本研究仅涉及其中 7 种相关氨基酸,后续笔者将继续对其他相关氨基酸的检测和分析进行进一步研究。

### 参考文献

- [1] 张阳佳,朱宝生. 复发性自然流产的病因学研究进展[J]. 中国妇幼保健,2015,30(10):1637-1640.
- [2] 韩慧,张滢,李蓉,等. 继发性不孕症危险因素的病例对照研究[J]. 中国生育健康杂志,2017,28(4):333-336.
- [3] 郭允娟,韩海霞,巩爱玲. 原因不明复发性流产的治疗进展[J]. 中国当代医药,2017,24(13):17-19.
- [4] 王贤军,罗丽,王莉,等. 不明原因复发性流产与 MTH-FRC677T 突变的关系[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(4):243-246.
- [5] 马春艺,路阳,苏赛,等. 高同型半胱氨酸与复发性流产的相关性研究[J]. 中国妇幼卫生杂志,2014,5:20-22.
- [6] 孙莉,陈琳,马继红. 妊娠早期复发性流产患者妊娠组织增殖与凋亡的研究[J]. 临床误诊误治,2017,30(1):94-97.
- [7] ZHANG Y Y, YANG C F, FU S, et al. Different expression of NOD2 in decidual stromal cells between normal and unexplained recurrent spontaneous abortion(下转第 2688 页)

## 参考文献

- [1] MOSCHINI M, SPAHN M, MATTEI A, et al. Incorporation of tissue-based genomic biomarkers into localized prostate cancer clinics[J]. *BMC Med*, 2016, 14: 67.
- [2] FERRO M, BUONERBA C, TERRACCIANO D, et al. Biomarkers in localized prostate cancer[J]. *Future Oncol*, 2016, 12(3): 399-411.
- [3] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(4): 330-334.
- [4] 毕新刚, 韩仁强, 周金意, 等. 2009 年中国前列腺癌发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(6): 417-422.
- [5] ZHAO S, GEYBELS M S, LEONARDSON A, et al. Epigenome-wide tumor DNA methylation profiling identifies novel prognostic biomarkers of metastatic-lethal progression in men diagnosed with clinically localized prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(1): 311-319.
- [6] SMITS M, MEHRA N, SEDELAAR M, et al. Molecular biomarkers to guide precision medicine in localized prostate cancer[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17(8): 791-804.
- [7] 韩仁强, 武鸣, 陈万青, 等. 2003—2007 年中国前列腺癌发病与死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(11): 805-811.
- [8] 唐志柳, 白洁, 顾丽娜, 等. 2000—2010 年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性综述[J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(4): 260-265.
- [9] LEAPMAN M S, NGUYEN H G, COOPERBERG M R. Clinical utility of biomarkers in localized prostate cancer[J]. *Curr Oncol Rep*, 2016, 18(5): 30.
- [10] HALL W A, LAWTON C A, JANI A B, et al. Biomarkers of outcome in patients with localized prostate cancer treated with radiotherapy[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2017, 27(1): 11-20.
- [11] MORRISSEY C, VESSELLA R L, LANGE P H, et al. The biology and clinical implications of prostate cancer dormancy and metastasis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(3): 259-265.
- [12] ZHAO L, WANG D, SHI G, et al. Dual-labeled chemiluminescence enzyme immunoassay for simultaneous measurement of total prostate specific antigen (tPSA) and free prostate specific antigen (fPSA)[J]. *Luminescence*, 2017, 32(8): 1547-1553.
- [13] YANG J, TANG A, ZHANG S, et al. The age-specific reference intervals for tPSA, fPSA, and % fPSA in healthy Han ethnic male[J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 31(4): 1-4.
- [14] DU J, YANG Q, CHEN X S, et al. Changes in fPSA level could discriminate tPSA flare-up from tPSA progression in patients with castration-refractory prostate cancer during the initial phase of docetaxel-based chemotherapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(5): 1055-1061.
- [15] CHEN Z D, WEI S M, CAI S L. Significance and limitations of f/tPSA in differential diagnosis of prostate cancer with tPSA levels between 4 and 10 ng/ml [J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2004, 42(10): 593-595.
- [16] CLAYTON S A, JONES S W, KUROWSKA-STOLARSKA M, et al. The role of microRNAs in glucocorticoid action-literature review [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(6): 1865-1874.
- [17] CAO M, ZHENG L, LIU J, et al. MicroRNAs as effective surrogate biomarkers for early diagnosis of oral cancer [J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(2): 1-11.
- [18] FLETCHER C E, DART D A, SITA-LUMSDEN A, et al. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets prohibitin in prostate cancer[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(14): 3112-3127.
- (收稿日期: 2018-01-16 修回日期: 2018-04-22)
- (上接第 2684 页)
- women during first trimester gestation[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8784-8790.
- [8] 李鹏飞, 陶蓓蓓, 张绪得, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定人体内 30 种氨基酸[J]. *分析化学*, 2013, 41(9): 1347-1352.
- [9] LIU Z L, XU H J, KANG X M, et al. Allogenic lymphocyte immunotherapy for unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 76(6): 443-453.
- [10] ZHANG B Y, WEI Y S, NIU J M, et al. Risk factors for unexplained recurrent spontaneous abortion in a population from southern China[J]. *Int J Gynecol Obstet*, 2010, 108(2): 135-138.
- [11] 赫欣睿, 武中庸, 叶永丽, 等. 高效液相色谱法测定氨基酸的研究进展[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(7): 922-928.
- [12] 石书婷, 章晓娟, 易伦朝. 气相色谱-质谱法结合偏小二乘-判别分析用于血清和血浆中代谢物的比较分析[J]. *分析科学学报*, 2015, 31(2): 237-240.
- [13] 王维皓, 杨滨. UPLC 柱前衍生测定白茯苓中游离氨基酸的水平[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(5): 372-376.
- [14] 田晔, 江骥, 胡蓓. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中精氨酸及衍生物水平[J]. *质谱学报*, 2016, 37(5): 446-452.
- [15] 暴海霞, 戴新华. 氨基酸检测方法的进展和现状[J]. *化学试剂*, 2013, 35(7): 577-584.
- [16] 成军. 门冬氨酸鸟氨酸的肝病临床应用与研究进展[J/CD]. *中国肝脏病杂志电子版*, 2015(3): 49-51.
- [17] 周鸿铭, 雷娜, 鲁亚平. 甘氨酸神经递质研究进展[J]. *生物化学杂志*, 2011, 28(1): 79-81.
- (收稿日期: 2018-01-10 修回日期: 2018-04-16)