

· 中青年学者论坛 ·



高路 教授，博士生导师，现任海军军医大学（第二军医大学）生理学教研室主任。2012—2015年美国德州大学西南医学中心博士后、高级访问学者。国家自然科学基金优秀青年基金获得者，上海市科学技术委员会优秀学术带头人、上海市卫生系统优秀学科带头人、上海市教育委员会东方学者特聘教授，入选曙光计划、浦江人才计划、总后优秀青年科技人才、海军高新科技人才培养对象等。担任中国生理学会理事、中国生理学会生殖科学专业委员会副主任委员、中国妇幼保健协会生育力保存专业委员会委员、上海市生理学会常务理事。主要从事生殖生理学和生殖医学研究，围绕母胎因素对胚胎发育和妊娠结局的调控机制这一重大临床科学问题，致力于研究胎源性因子在协调胎儿发育和分娩启动中的作用。在 *J Clin Invest*、*J Clin Endocrinol Metab*、*Endocrinology* 等 SCI 收录杂志发表论文 30 余篇，单篇最高影响因子 13.215；4 篇论文被国际权威生殖生理学教材收录。参编著作 5 部。主持国家级科研项目 5 项，省部级科研项目 10 余项。2017 年获比尔·盖茨基金会“全球健康学术旅行奖”，2018 年获上海市医学科技奖一等奖和上海市“青年五四奖章”。荣立三等功 1 次。

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.06.0589

早产无创性检测生物标志物研究进展及其应用前景

王恺铖¹，李 励²，刘媛媛¹，高 路^{1*}

1. 海军军医大学（第二军医大学）基础医学院生理学教研室，上海 200433

2. 海军军医大学（第二军医大学）长海医院妇产科，上海 200433

[摘要] 早产是最常见的产科并发症之一。近几十年来，全世界范围内早产的发生率居高不下，且呈不断上升的趋势。阐明人类分娩发动的机制并对早产进行有效防治是保障母婴健康、提升人口素质的迫切需求。受到伦理学和检测手段的限制，早产的预测和早期诊断一直是困扰医务工作者的首要难题。近年来，关于无创性检测生物标志物的研究方兴未艾，羊水、宫颈阴道液、尿液、唾液和血液都提供了丰富的生物标志物，从中寻找能够预测早产的生物标志物成为研究热点。本文旨在讨论早产预测中无创性检测标志物的研究进展，展望该领域未来的发展和应用前景。

[关键词] 早产；生物学标志物；产前诊断；高迁移率族蛋白质类；微 RNAs

[中图分类号] R 714.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)06-0589-06

Noninvasive biomarkers of premature delivery: research progress and application prospect

WANG Kai-cheng¹, LI Li², LIU Yuan-yuan¹, GAO Lu^{1*}

1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] Preterm birth is one of the most common obstetric complications. In recent decades, the incidence of premature birth remains high throughout the world, and even shows a rising trend in some countries and areas. Therefore,

[收稿日期] 2018-12-21

[接受日期] 2019-03-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81622020, 81771608), 上海市优秀学术带头人计划(18XD1405100), 上海市卫生和计划生育委员会市级医疗卫生优秀学科带头人培养计划(2017BR017), 上海市教育委员会曙光计划(17SG36)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81622020, 81771608), Project of Outstanding Academic Leaders of Shanghai (18XD1405100), Training Plan of Outstanding Medical Talents of Shanghai Municipal Health Commission (2017BR017), and Shuguang Program of Shanghai Municipal Education Commission (17SG36)。

[作者简介] 王恺铖，海军军医大学（第二军医大学）临床医学专业 2013 级八年制本科学员。E-mail: 15021563303@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870980, E-mail: roadgao@163.com

understanding the mechanisms of human parturition and developing the effective prevention and treatment strategies of premature delivery are urgent to improve maternal and fetal health and overall quality of population. Due to the limitation of ethics and testing methods, the prediction and early diagnosis of premature birth have been the primary problem that perplexes obstetricians. Various body fluids, including amniotic fluid, cervicovaginal fluid, urine, saliva and blood, provide rich sources of putative biomarkers that may be causative or reflective of preterm labor. In recent years, the exploration of novel biomarkers for noninvasive detection is in the ascendant, which sheds new lights for the prediction and early diagnosis of preterm labor. This review compares the biomarkers for the detection of preterm birth, and discusses the future prospect.

[Key words] premature birth; biological markers; prenatal diagnosis; high-mobility group proteins; microRNAs

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(6): 589-594]

早产是最常见的不良妊娠结局之一,也是围生期新生儿死亡的首要原因,全世界每年大约有1 500万早产儿出生,其中近110万新生儿因早产而死亡^[1]。据世界卫生组织2015年发布的年度儿童健康流行病学调查报告报道,早产在新生儿(0~27 d)和5岁以内幼儿所有死因中高居榜首,占比达15.4%;在我国,早产在5岁以下幼儿死因中的占比也高达14.18%,且近60%的幼儿死亡发生在新生儿期^[2]。早产儿即使存活,其在新生儿期的感染性疾病、出血性疾病甚至成年后疾病的发生率都显著高于足月分娩胎儿^[3],给家庭和社会医疗、教育、服务等诸多方面带来沉重的负担。近几十年来,早产的发病率居高不下,且呈不断上升的趋势,原因主要在于分娩启动机制尚未得到解析^[4],病因和诱因复杂^[5-6],缺乏行之有效的防治手段^[5]。

如果能够预测早产并提前进行预防和干预,新生儿的预后将会大大改观。目前常用的预测早产的方法有2种,其一是超声测量宫颈长度,其二是定性或定量检测宫颈阴道液(cervical vaginal fluid, CVF)中的胎儿纤连蛋白(fetal fibronectin, fFN),但宫颈长度和fFN预测早产的能力均有限^[7-8]。因此,寻找无创性检测生物标志物对早产进行预测和早期诊断、提前进行预防和干预成为降低早产发生率、提高早产临床干预水平的迫切需求。

生物标志物是随着免疫学和分子生物学技术的发展而被提出的一类与细胞生长增殖有关的标志物。生物标志物不仅可从分子水平探讨发病机制,而且在准确、灵敏地评价早期、低水平的损害方面有着独特的优势,可为早期预警及临床医师辅助诊断提供依据。近年来,在预测早产方面,利用母体相关的生物标志物对宫内环境和胎儿的状况进行实时监测、寻找早产发生的相关规律和有效预测指标

成为研究的主流方向。

1 母体孕育胚胎相关组织分泌物中的生物标志物

迄今为止,研究人员对于早产的生物标志物已经进行了相当多的筛选和研究,母体孕育胚胎相关组织(如阴道上皮、宫颈、子宫内膜等)分泌物中的分子成分往往可以提供较为准确的宫内信息,为产前诊断提供帮助,成为热门研究方向。

1.1 羊水 羊水是最为接近胎儿和母体子宫环境的液体,理论上,如果能充分检测羊水的变化就可以实时了解孕妇及胎儿的状况,预测各种突发事件,包括早产。感染是引发早产最常见的病因,炎症往往会导致子宫受到强烈刺激,产生剧烈收缩,从而诱发早产^[5]。因此,母体羊水内的细胞因子,如白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-8、MMP-9等,往往可以反映子宫内是否存在炎症及炎症的严重程度,这些因子水平异常增高常提示存在早产的风险^[5-6]。然而,在不同种族和不同病原体感染的人群中,羊水中细胞因子的变化水平差异较大,难以使用统一的标准预测早产的发生^[6]。此外,目前临床上获得羊水的主要方法是羊膜穿刺术,属于有创性检测手段,有引发感染和对胎儿造成创伤的风险,限制了以羊水中生物标志物作为早产预测指标的发展。

1.2 CVF 相对于羊水, CVF是比较容易获得的母体体液,且采集标本时不会对母体和胎儿产生明显的负面影响。CVF中存在大量的细胞因子、生物学分子,可以作为生物标志物的备选,其中fFN和胰岛素样生长因子结合蛋白1(insulin-like growth factor binding protein 1, IGFBP-1)是最有

代表性的2个分子。

fFN 是滋养层分泌的一种大分子糖蛋白, 正常情况下在孕 16~20 周出现, 孕 20 周后会消失, 孕 20 周后 fFN 阳性预示着早产的风险增加, 但以 fFN 预测早产易出现假阳性结果, 因此目前临床上 fFN 主要应用于早产的阴性预测^[7-8]。磷酸化胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (phosphorylated insulin-like growth factor binding protein 1, pHIGFBP-1) 由蜕膜细胞分泌并混合到阴道液中, 对早产的预测准确度较低^[9], 其作用与 fFN 类似, 主要也是用于早产的阴性判定。IGFBP-1 可用于预测早产^[10], 但其缺陷在于一旦样本被孕妇的羊水或血液污染就极易出现假阳性结果。另外, Leylek 等^[11]发现宫颈阴道分泌物中催乳素的含量若超过 50 pg/L 且孕周超过 29 周, 孕妇往往会在 12 d 内发生早产, 其阳性预测准确度较高。

2 母体尿液和唾液中的生物标志物

尿液和唾液标本有收集方便、无损伤等优点, 适合作为妊娠期检测标本。目前临床上检测孕妇尿液中生物标志物的实验数据十分匮乏。有研究者对比分析了孕妇尿液、血液、唾液、阴道液和宫颈分泌物中的成分, 发现阴道液成分和宫颈分泌物成分有较高相似性, 可以通过检测阴道液中的成分获取子宫内的信息; 而尿液中往往会混有阴道液残留物, 且尿液更易获得、标本量也更大, 更便于临床检查^[8]。这提示尿液中生物标志物在早产预测中具有一定潜力。

孕酮为维持妊娠所必需的激素, 在妊娠早期主要由卵巢黄体分泌, 在妊娠中晚期主要由胎盘分泌。已有学者探讨了唾液中孕酮含量作为早产生物标志物的可行性, 认为孕 24~34 周时母体唾液内孕酮浓度过低有发生早产的风险^[7]。

3 母体外周血中的生物标志物

血液中能够获得生物标志物的成分主要是血浆和血清。既往认为母体外周血和子宫内环境相去甚远, 并且外周血经过血液循环后其内容物的含量会与子宫内环境有较大差距, 尽管如此, 研究人员仍试图从母体血液中寻找可能用于预测早产的生物标志物^[7]。随着分子生物学技术的发展, 母体外周血成为科学家们关注的焦点, 寻找血液中的分子生物

标志物成为早产无创性诊断研究的重要方向。

3.1 蛋白质 既往研究中探讨的与早产相关的血浆和血清生物标志物大多与炎症相关。血浆中的高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 具有警报素功能, 其血浆浓度升高常常提示感染, 对早产有预警作用, 而它的功能与 2 种受体——Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 密切相关^[12]。TLR4 本身可以中和抗体减少炎症损伤, 但是其过度活化会引发子宫内炎症, 使外周循环系统中相关活性因子处于激活状态, 从而可能刺激子宫收缩导致早产, 因而可以作为早产相关标志物^[13]。可溶性 TLR4 (soluble TLR4, sTLR4) 作为 TLR4 的负性调控因子可以在外周血中被检测到, 并且羊水中 sTLR4 浓度与孕妇羊膜腔内感染和早产之间关系密切^[14], 因此 sTLR4 有望成为早产相关的外周血生物标志物。

HMGB1 的另一个受体 RAGE 在早产发生中可能具有更重要的意义。RAGE 是与慢性炎症相关的警报素受体, 当 HMGB1 与 RAGE 的细胞外区结合后, 可以持续活化核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路并募集炎症细胞 (如 CD68 和 CD11c 双阳性的单核吞噬细胞等), 介导炎症反应^[15]。研究发现 RAGE 介导的慢性炎症对早产有明确的影响^[12]。RAGE 也存在可溶性形式, 可溶性 RAGE (soluble RAGE, sRAGE) 和内源分泌性 RAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE) 均为存在于细胞外的 RAGE 的截断形式, 有研究发现妊娠中期存在羊膜腔感染和 (或) 炎症的孕妇, 羊水中 sRAGE 和 esRAGE 浓度增高, 提示其可能与妊娠期炎症反应和免疫调节有关^[16]。Rzepka 等^[17]通过检测 211 名孕妇血浆 sRAGE 水平分析 sRAGE 对早产的预测价值, 早产孕妇血浆 sRAGE 水平低于足月产孕妇, 血浆 sRAGE 水平预测早产的灵敏度和特异度分别为 51.3% 和 93.5%, 与超声测量宫颈长度的预测价值相当。Bastek 等^[18]研究发现 sRAGE 可预测围产期不良结局, sRAGE 水平较高的孕妇可能具有较强的免疫调节能力, 不容易发生早产。上述证据表明 HMGB1 及其受体 RAGE、sRAGE 是炎症所致早产的重要介质, 这类炎症相关的因子和受体在早产预测研究中备受关注。

3.2 DNA 与 RNA 1997年,香港中文大学的研究人员从“血浆中存在肿瘤DNA”这一事实得到启发,加之当时分子分析技术的逐渐普及,提出了“是否可以从孕妇血浆和血清中提取到胎儿DNA”这一假说并付诸实施,最终成功从10 mL血浆中提取到足以用于检测的胎儿DNA^[19-21]。在母体血浆中发现了胎儿DNA这一事实彻底颠覆了传统观念,使得母体血浆和血清中胎源性标志物的检测分析成为产前诊断的一大热门。利用从母体外周血中提取的胎儿RNA和DNA,可以很容易地检测胎儿的性别及遗传病、基因病等,从而及早进行干预,为无数家庭带来了福音^[22]。得益于此,胎儿DNA分析、转录组学分析也能在无创的条件下开展,使得相关研究可以避免社会和伦理方面的问题^[23-25]。在应用胎儿DNA检测遗传病的同时,有研究者发现母体外周血中胎儿DNA的水平随妊娠进程不断升高,而早产孕妇外周血胎儿DNA含量可达足月产孕妇的2倍以上^[26],提示母体外周血的胎儿DNA或RNA有可能成为诊断和预测早产的生物标志物,然而其具体的检测靶点和策略却鲜见相关研究。

2018年,斯坦福大学的研究人员通过对25名足月产孕妇和13名早产孕妇的外周血游离RNA (cell-free RNA, cfRNA) 进行RNA测序,发现7个与早产发生最为相关的cfRNA——电压门控氯离子通道3 (chloride voltage-gated channel 3, CLCN3)、酪氨酸3-磷酸肌醇双衔接因子1 (dual adaptor of phosphotyrosine 3-phosphoinositide 1, DAPPI)、前血小板碱性蛋白 (pro-platelet basic protein, PPBP)、丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶7 C末端样蛋白 (mitogen-activated protein kinase kinase 7 C-terminal-like protein, MAP3K7CL)、MOB激酶致活因子1B (MOB kinase activator 1B, MOB1B)、RAS癌基因家族成员RAB27B、G蛋白信号调节子18 (regulator of G protein signaling 18, RGS18), 通过这7个RNA构成的预测模型可以在分娩前2个月成功预测早产,其准确度可达75%,而假阳性率仅为4%^[27]。尽管这项研究的样本量有限,且相关机制尚不明确,但无疑进一步拓宽了早产无创性诊断的研究领域和应用前景。

3.3 微RNA (microRNA, miRNA) 除了胎儿游离DNA和cfRNA外,另一种游离核酸分子miRNA作为新的循环标志物被广泛研究。母体血中的胎儿RNA可能来源于发生凋亡或坏死的胎盘

滋养细胞^[28]。Hromadnikova等^[29]检测了15种胎盘特异性miRNA在自发性早产、早产性胎膜早破和足月产孕妇胎盘组织中的表达,发现19号染色体微RNA簇 (chromosome 19 microRNA cluster, C19MC) 的上调是自发性早产的一个特征性现象。miRNA可由组织释放入血,且其在外周血中的稳定性高,定量检测的灵敏性和特异性均优于传统的蛋白质类生物标志物,因此近年来作为新兴的非侵入性检测手段日益受到关注。

Gray等^[30]使用miRNA阵列分析了妊娠20周时血浆中miRNA与早产的关系,发现与足月分娩对照组相比,自发性早产孕妇的miRNA-302B、miRNA-1253和miRNA-548表达降低,而miRNA-223表达升高。Winger等^[31]评估了妊娠(7.9±3.0)周外周血单个核细胞中miRNA对孕妇自发性早产风险的预测能力,该研究纳入25名足月分娩孕妇(妊娠38~42周)和14名自发性早产孕妇(妊娠<37周),对30个选定的miRNA进行定量PCR检测,并计算miRNA风险评分,通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析发现miRNA风险评分对于早产有较好的预测价值(ROC曲线下面积为0.95)。Cook等^[32]在一项由96名足月分娩孕妇、14名早产孕妇和21名妊娠<20周的早期宫颈缩短孕妇组成的队列研究中,分析了孕早期血浆中miRNA表达与早产和宫颈缩短的关系,结果发现9个miRNA (hsa-let-7a-5p、hsa-miRNA-374a-5p、hsa-miRNA-15b-5p、hsa-miRNA-19b-3p、hsa-miRNA-23a-3p、hsa-miRNA-93-5p、hsa-miRNA-150-5p、hsa-miRNA-185-5p、hsa-miRNA-191-5p) 在早产或宫颈缩短孕妇中存在差异表达,ROC曲线分析表明hsa-miRNA-150-5p预测早产(ROC曲线下面积为0.8725)和宫颈缩短(ROC曲线下面积为0.8514)的能力较强。

本课题组前期对足月分娩、足月未分娩和早产3组孕妇的血浆标本进行miRNA测序,通过对3组差异表达的miRNA进行统计分析发现,早产组中特异性降低的miRNA有2个 (hsa-miRNA-150-5p和hsa-miRNA-512-3p),在足月分娩组和足月未分娩组发生特异性改变的miRNA分别有4个和3个;从中选取基础表达量较高的5个miRNA进行扩大样本量的实时荧光定量PCR验证,发

现 hsa-miRNA-150-5p 和 hsa-miRNA-6802-5p 的变化趋势与测序结果一致, 建立 ROC 曲线发现 miRNA-150-5p 对早产预测能力为 78.4% (待发表结果)。

由上述研究可见, 母体外周血 miRNA 在早产预测中具有重要意义, 可能成为妊娠早期预测早产的非侵入性生物标志物。但 miRNA 种类繁多, 仍需要进一步筛选, 并开展大样本量的研究以验证其潜在临床效用。

4 小结和展望

尽管目前早产依然是困扰医师、孕妇及其家属的一大世界性难题, 其发生的具体机制、行之有效的预测手段、治疗方式等都还没有得到根本性解决, 但是随着产前无创性诊断技术特别是高通量测序手段的不断成熟和进步, 从各种体液尤其是血液中筛选预测早产的生物标志物成为研究热点, 为早产的早期预测带来新的前景。从目前研究来看, 采用单一生物标志物预测早产可能不够灵敏, 科学家们更倾向于联合应用多种标志物进行检测, 并且需要更加便捷、灵敏地检测生物标志物的方法。为此, Woolley 团队研发了 3D 打印微芯片装置, 研究人员采用此装置检测了 3 种早产生物标志物 (包括肽和蛋白质), 其灵敏度可达到 10^{-9} mol 左右, 有望进一步提高^[33]。未来仍亟待基础研究人员和临床医师密切合作, 通过多中心、大样本的临床试验构建早产早期诊断和预测的新范式, 并为早产防治药物的开发提供新的靶点; 此外, 开发自动化和智能化的便捷检测装置也将进一步推动早产生物标志物的临床应用。

[参考文献]

- [1] CHANG H H, LARSON J, BLENCOWE H, SPONG C Y, HOWSON C P, CAIRNS-SMITH S, et al. Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index[J]. *Lancet*, 2013, 381: 223-234.
- [2] LIU L, OZA S, HOGAN D, PERIN J, RUDAN I, LAWN J E, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis[J]. *Lancet*, 2015, 385: 430-440.
- [3] SAIGAL S, DOYLE L W. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood[J]. *Lancet*, 2008, 371: 261-269.
- [4] NORMAN J E, SHENNAN A H. Prevention of preterm birth—why can't we do any better?[J]. *Lancet*, 2013, 381: 184-185.
- [5] ROMERO R, DEY S K, FISHER S J. Preterm labor: one syndrome, many causes[J]. *Science*, 2014, 345: 760-765.
- [6] PELTIER M R, DROBEK C O, BHAT G, SAADE G, FORTUNATO S J, MENON R. Amniotic fluid and maternal race influence responsiveness of fetal membranes to bacteria[J]. *J Reprod Immunol*, 2012, 96(1/2): 68-78.
- [7] GEORGIU H M, DI QUINZIO M K, PERMEZEL M, BRENNECKE S P. Predicting preterm labour: current status and future prospects[J/OL]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 435014. doi: 10.1155/2015/435014.
- [8] HANNA N, KIEFER D. A translational view of biomarkers in preterm labor[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 67: 268-272.
- [9] FUCHS F, HOULLIER M, LEPARCO S, GUYOT A, SENAT M V, FERNANDEZ H, et al. Performance of cervical p18GFBP-1 test alone or combined with short cervical length to predict spontaneous preterm birth in symptomatic women[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 10856. doi: 10.1038/s41598-017-11447-y.
- [10] MEŠIĆ ĐOĐIĆ L, MIČIĆ D, OMERAGIĆ F, KOVAČ R, FAZLAGIĆ S. IGFBP-1 marker of cervical ripening and predictor of preterm birth[J]. *Med Glas (Zenica)*, 2016, 13: 118-124.
- [11] LEYLEK O A, SONGUR S, ERSELCAN T, CETIN A, IZGIC E. Cervicovaginal washing prolactin assay in prediction of preterm delivery[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 1997, 59: 7-12.
- [12] NOGUCHI T, SADO T, NARUSE K, SHIGETOMI H, ONOGI A, HARUTA S, et al. Evidence for activation of Toll-like receptor and receptor for advanced glycation end products in preterm birth[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 490406. doi: 10.1155/2010/490406.
- [13] PAWELCZYK E, NOWICKI B J, IZBAN M G, PRATAP S, SASHTI N A, SANDERSON M, et al. Spontaneous preterm labor is associated with an increase in the proinflammatory signal transducer TLR4 receptor on maternal blood monocytes[J/OL]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2010, 10: 66. doi: 10.1186/1471-2393-10-66.
- [14] KACEROVSKY M, ANDRYS C, HORNÝCHOVA H, PLISKOVA L, LAN CZ K, MUSILOVA I, et al. Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 4 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of the membranes[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2012, 25: 1148-1155.
- [15] ALEXIOU P, CHATZOPOULOU M, PEGKLIDOU K, DEMOPOULOS V J. RAGE: a multi-ligand receptor

- unveiling novel insights in health and disease[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 2232-2252.
- [16] ROMERO R, ESPINOZA J, HASSAN S, GOTSCH F, KUSANOVIC J P, AVILA C, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation[J]. *J Perinat Med*, 2008, 36: 388-398.
- [17] RZEPKA R, DOŁĘGOWSKA B, RAJEWSKA A, SALATA D, BUDKOWSKA M, KWIATKOWSKI S, et al. Diagnostic potential of evaluation of SDF-1 α and sRAGE levels in threatened premature labor[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 2719460. doi: 10.1155/2016/2719460.
- [18] BASTEK J A, BROWN A G, FOREMAN M N, MCSHEA M A, ANGLIM L M, ADAMCZAK J E, et al. The soluble receptor for advanced glycation end products can prospectively identify patients at greatest risk for preterm birth[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2012, 25: 1762-1768.
- [19] SUN K, JIANG P, CHAN K C, WONG J, CHENG Y K, LIANG R H, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E5503-E5512. doi: 10.1073/pnas.1508736112.
- [20] Roadmap Epigenomics Consortium; KUNDAJE A, MEULEMAN W, ERNST J, BILENKY M, YEN A, HERAVI-MOUSSAVI A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes[J]. *Nature*, 2015, 518: 317-330.
- [21] LO Y M. Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing[J]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 27: 593-598.
- [22] LO Y M. Noninvasive prenatal diagnosis: from dream to reality[J]. *Clin Chem*, 2015, 61: 32-37.
- [23] CHIU R W, CHAN K C, GAO Y, LAU V Y, ZHENG W, LEUNG T Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20458-20463.
- [24] MUGLIA L J, KATZ M. The enigma of spontaneous preterm birth[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362: 529-535.
- [25] CHIM S S, TONG Y K, CHIU R W, LAU T K, LEUNG T N, CHAN L Y, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14753-14758.
- [26] PHILLIPPE M. Cell-free fetal DNA—a trigger for parturition[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370: 2534-2536.
- [27] NGO T T M, MOUFARREJ M N, RASMUSSEN M H, CAMUNAS-SOLER J, PAN W, OKAMOTO J, et al. Noninvasive blood tests for fetal development predict gestational age and preterm delivery[J]. *Science*, 2018, 360: 1133-1136.
- [28] MENDELSON C R, MONTALBANO A P, GAO L. Fetal-to-maternal signaling in the timing of birth[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 170: 19-27.
- [29] HROMADNIKOVA I, KOTLABOVA K, IVANKOVA K, KROFTA L. Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue of patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm birth[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16: 3849-3862.
- [30] GRAY C, MCCOWAN L M, PATEL R, TAYLOR R S, VICKERS M H. Maternal plasma miRNAs as biomarkers during mid-pregnancy to predict later spontaneous preterm birth: a pilot study[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 815. doi: 10.1038/s41598-017-00713-8.
- [31] WINGER E E, REED J L, JI X. Early first trimester peripheral blood cell microRNA predicts risk of preterm delivery in pregnant women: proof of concept[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12: e0180124. doi: 10.1371/journal.pone.0180124.
- [32] COOK J, BENNETT P R, KIM S H, TEOH T G, SYKES L, KINDINGER L M, et al. First trimester circulating microRNA biomarkers predictive of subsequent preterm delivery and cervical shortening[J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9: 5861. doi: 10.1038/s41598-019-42166-1.
- [33] BEAUCHAMP M J, NIELSEN A V, GONG H, NORDIN G P, WOOLLEY A T. 3D printed microfluidic devices for microchip electrophoresis of preterm birth biomarkers[J]. *Anal Chem*, 2019, 91: 7418-7425.