论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0994-03

孕兔妊娠肝内胆汁淤积症模型的构建

冯丽霞,李 力,胡 珊,郑英如 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

提 要:目的 构建孕兔妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)模型,为ICP围产儿并发症发生机制的研究提供适宜的动物模型。**方法** 选择32只孕兔,随机分为4组。高、中、低剂量组自妊娠第22天,分别颈后皮下注射苯甲酸雌二醇0.2、0.1、0.05 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,对照组颈后皮下注射生理盐水,直至分娩。妊娠第26天耳静脉采血检测血清生化指标,孕兔分娩时取部分肝脏组织观察病理变化。**结果** ①与对照组相比,高、中剂量组孕兔血总胆汁酸(TBA)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、甘胆酸(CG)均显著升高($P<0.01$),总胆固醇(TCH)显著下降($P<0.01$),而低剂量组仅TBA、CG较对照组有升高($P<0.05$),其余生化指标统计学差异无显著性;②高、中、低剂量组均出现早产、胎死宫内,二者发生率明显高于对照组($P<0.05$);③病理观察显示,高、中剂量组孕兔肝脏呈胆汁淤积改变。**结论** 皮下注射苯甲酸雌二醇可诱导妊娠晚期孕兔出现肝内胆汁淤积病理改变。

关键词:妊娠肝内胆汁淤积;疾病模型;雌二醇;兔

中图法分类号:R-332;R575;R714.25 **文献标识码**:A

Establishment of a disease model for intrahepatic cholestasis in pregnant rabbits

FENG Li-xia, LI Li, HU Shan, ZHENG Ying-ru (Department of Gynecology and Obstetrics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish a disease model for intrahepatic cholestasis in pregnant rabbits and provide a suitable animal model for the study on the mechanism of fetal complications of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods** Thirty-two pregnant rabbits were randomly divided into four groups. The high, moderate and low dosage groups were subcutaneously injected with benzestrofol at a dose of 0.2, 0.1 and 0.05 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ respectively and control group with 0.9% saline solution from day 22 of gestation to delivery. Blood tests for biochemical parameters were conducted on day 26. Specimens of livers were taken after cesarean for light microscopy. **Results** In high and moderate dosage groups, the serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bile acid (TBA) and glycocholic acid (CG) were significantly increased ($P<0.01$) and total cholesterol (TCH) were significantly reduced ($P<0.01$), as compared with control group. In low dosage group only TBA and CG were significantly increased ($P<0.05$), while other parameters remained unvaried. The rates of premature labor and fetal death in high, moderate and low dosage groups were significantly higher than those in control group ($P<0.01$). Obvious pathological changes of intrahepatic cholestasis were observed in the high and moderate dosage groups. **Conclusion** Benzestrofol can induce intrahepatic cholestasis in trimester pregnant rabbits.

Key words: intrahepatic cholestasis of pregnancy; disease model; estradiol; rabbit

妊娠肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是一种以皮肤瘙痒、黄疸及肝功能异常为特征的妊娠期特有并发症。ICP围产儿预后不良,胎儿窘迫发生率高达32%~65%,胎儿死亡率也比正常妊娠高4倍,其发生机制至今未阐明,因此备受产科工作者的重视。本研究给妊娠晚期孕兔注射苯甲酸雌二醇,通过监测血生化指标,观察孕兔肝脏组织病理改变,验证和构建了孕兔妊娠肝内胆汁淤积症模型,为ICP围产儿并发症发生机制的研究提供了适宜的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验对象

成年新西兰雌兔,由第三军医大学大坪医院实验动物中心

作者简介:冯丽霞(1977-),女,江西省上饶市人,硕士研究生,医师,主要从事围产医学方面的研究。电话:(023)68757249

收稿日期:2005-03-01;修回日期:2005-04-12

提供，体质量 2 500～3 500 g。发情期与雄兔 1∶1 合笼，次日早晨分笼饲养。交配后第 10 天通过摸胎法确定其是否受孕。受孕者纳入实验，记为妊娠第 10 天。

1.2　实验分组

将 32 只孕兔随机分为 4 组：高、中、低剂量组和对照组，每组 8 只。

1.3　动物模型

每组孕兔自妊娠第 22 天起，夜间禁食水，每日上午 8 时称重，高、中、低剂量组分别于颈后皮下注射苯甲酸雌二醇 0.2、0.1、0.05 mg/kg，对照组按 0.1 ml/kg 皮下注射生理盐水，直至分娩。

1.4　观察指标

1.4.1　孕兔血清生化指标的检测　　妊娠第 26 天上午 8 时，孕兔禁食水，耳静脉采血 4 ml，离心，取血清检测生化指标。

1.4.2　妊娠及分娩情况　　自注射药物后，每天密切观察孕兔体质量变化及有无烦躁、扯毛、阴道流淡血性分泌物等分娩前征兆。发现孕兔阴道流淡血性分泌物或出现体质量不增甚至减轻时，即予 846 合剂（速眠新，长春军需大学生产）0.2 ml/kg 肌肉注射麻醉，行剖宫产术。记录胎崽及活胎数，称量胎崽、胎盘质量。

1.4.3　孕兔肝脏组织病理检查　　娩出胎兔后，观察母兔肝脏外观，取部分组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定，常规石蜡包埋、切片及 HE 染色，光镜下观察组织病理变化。

1.5　试剂及药品来源

苯甲酸雌二醇（1 mg/ml）由上海通用药业股份有限公司生产。总胆红素（TBiL）、丙氨酸转氨酸（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）、碱性磷酸酶（ALKP）、总胆固醇（TCH）、总胆汁酸（TBA）试剂盒由 BECKMAN 公司提供。甘胆酸（CG）采用放射免疫分析法检测，试剂盒由北京北方生物技术研究所提供。

1.6　统计学处理

使用 SPSS 10.0 软件处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多个样本均数比较用方差分析；样本率的比较用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　妊娠及分娩情况

高、中剂量组孕兔注射苯甲酸雌二醇后精神、饮食逐渐变差，低剂量组及正常组无明显改变。高、中、低剂量组均出现早产或胎死宫内，随注射剂量的增加死胎数明显增多；对照组无早产和死胎发生，胎兔存活率为 100%。高、中、低剂量组胎兔体质量、胎盘质量、妊娠天数、胎兔存活率与对照组比均有显著性差异（$P<0.01$），见表 1。

表 1　各组孕兔妊娠结局的比较（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Comparison of pregnant outcomes in different groups（$\bar{x} \pm s$）

Group	n	Weight of fetus (g)	Weight of placenta (g)	Gestational age (d)	Number of live fetus	Number of preterm laboring or fetal death	Survival rate
High dosage	59	$30.29 \pm 3.64^{**\Delta\Delta}$	$4.91 \pm 0.56^{**\Delta\Delta}$	$26.25 \pm 1.48^{**\Delta\Delta}$	7	52	11.9% **
Moderate dosage	57	$32.31 \pm 5.13^{**\Delta\Delta}$	$5.05 \pm 0.69^{**\Delta}$	$27.63 \pm 1.30^{**\Delta}$	31	26	54.4% **
Low dosage	54	$37.36 \pm 5.29^{**}$	$5.39 \pm 0.60^{**}$	$28.87 \pm 1.55^{*}$	43	11	79.6% **
Control	56	40.60 ± 5.86	5.78 ± 0.59	30.50 ± 0.53	56	0	100%

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control group；Δ：$P<0.05$，ΔΔ：$P<0.01$，*vs* low dosage group

2.2　孕兔血清生化指标改变

与对照组相比，高、中剂量组孕兔注射苯甲酸雌二醇后血清 AST、ALT、TBA、CG 均有显著性升高（$P<0.01$），TCH 显著降低（$P<0.01$）。低剂量组仅血清甘胆酸及总胆汁酸较对照组有显著变化（$P<0.05$），其它生化指标无显著改变，见表 2。

表 2　各组孕兔血清生化指标的比较（$n=8$，$\bar{x} \pm s$）

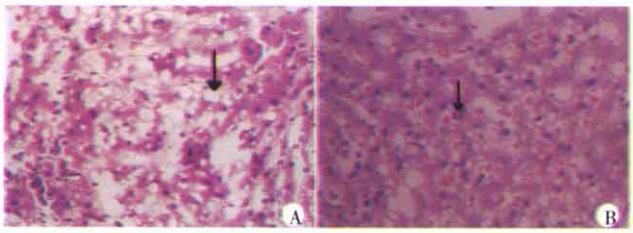
Tab 2　Comparison of serum biochemical parameters in different groups（$n=8$，$\bar{x} \pm s$）

Group	TBiL (μmol/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	TBA (μmol/L)	TCH (mmol/L)	CG (μg/ml)
High dosage	4.51 ± 0.99	$159.55 \pm 21.66^{**\Delta\Delta}$	$64.25 \pm 11.82^{**\Delta\Delta}$	$87.55 \pm 6.18^{**\Delta\Delta}$	$0.32 \pm 0.04^{**\Delta\Delta}$	$1.06 \pm 0.14^{**\Delta\Delta}$
Moderate dosage	4.67 ± 1.15	$109.10 \pm 20.30^{**\Delta\Delta}$	$60.28 \pm 11.00^{*\Delta}$	$61.43 \pm 6.25^{**\Delta\Delta}$	$0.91 \pm 0.12^{**\Delta\Delta}$	$0.94 \pm 0.10^{**\Delta\Delta}$
Low dosage	4.58 ± 0.89	37.06 ± 17.70	49.45 ± 8.61	$43.42 \pm 5.45^{*}$	1.81 ± 0.22	$0.67 \pm 0.09^{*}$
Control	4.65 ± 0.98	34.36 ± 18.86	49.17 ± 8.17	32.99 ± 5.27	1.94 ± 0.24	0.56 ± 0.07

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control group；Δ：$P<0.05$，ΔΔ：$P<0.01$，*vs* low dosage group

2.3　肝脏形态学改变

对照组肝脏外观红润、表面光滑，边缘锐利，光镜下见肝小叶结构正常，肝细胞呈放射状排列，肝窦扩张良好，未见细胞变性、坏死及胆汁样物质沉积；高、中剂量组肝脏略肿胀，色泽较暗，呈棕红色，边缘较钝，光镜下见肝细胞肿胀、排列紊乱，肝窦狭窄，胞浆疏松呈网状或透明，细胞水肿，部分细胞脂肪变性（图 1A），部分肝细胞浆内可见胆汁样物质沉积（图 1B）；低剂量组肝脏色泽稍暗，表面光滑，光镜下见肝小叶结构完整，肝窦附近见少许肝细胞水肿，未见胆汁样物质沉积。



A: Fatty degeneration of hepatocyte (↑); B: Cholic acid formation in hepatocyte (↑)

图1 高、中剂量组孕兔肝脏光镜观察 (HE×400)

Fig 1 Morphology of liver in high and moderate groups (HE×400)

3 讨论

流行病学研究显示ICP的发生与雌激素有密切的关系。如ICP多发生在分泌雌激素高峰的孕晚期,妊娠终止后胆汁淤积症状迅速好转或消失;双胎妊娠合并ICP的几率是单胎妊娠的5倍。目前的研究认为雌激素诱导ICP的发生机制可能与以下3个因素有关:①雌激素可以降低肝细胞膜的流动性及Na^+-K^+-ATP酶的活性并破坏肝细胞紧密连接结构,使胆管通透性增加,导致胆汁淤积[1];②雌激素通过下调肝细胞Na^+-牛磺胆酸共转运体(Ntcp)和有机阴离子转运体(Oatpl、2、4)及其反式作用因子,使Na^+依赖性胆酸的摄取减少,导致肝内胆汁淤积[2];③雌激素代谢紊乱。研究表明ICP患者尿中雌三醇代谢产物A-环葡萄糖醛酸雌激素排除量明显下降,而D-环葡萄糖醛激素排泄增加。目前已知D-环葡萄糖醛酸雌激素能引起肝内胆汁淤积。

ICP对围产儿危害大。现有的研究主要集中在胎盘-胎儿灌注方面,多数学者认为ICP时胆盐沉积于胎盘,使胎盘-胎儿灌注减少,导致胎儿急性缺氧甚至死亡;也有学者通过研究[3]对上述观点提出质疑,他们认为ICP时胎盘绒毛间腔狭窄仅仅引起胎盘氧储备力下降,不足以导致胎儿于临产前突然死于宫内。最新的研究表明胆酸可使未成熟心肌细胞收缩强度、幅度、同步性和节律性发生改变,致使心动过缓甚至停搏,提示ICP时胎儿自身重要脏器功能损伤可能在围产儿并发症发生中扮演重要角色[4,5],这为进一步的深入研究提供了新的思路。目前有学者通过对妊娠大鼠注射外源性雌激素,成功诱导孕鼠出现与人类ICP相似的血液生化指标及肝内胆汁淤积的病理改变[6]。大鼠ICP动物模型具有配种简便、受孕率高、繁殖周期短的优点,具有较广泛的应用前景。现已有研究者[7]运用该模型进行了ICP临床药物疗效及相关研究。但由于该模型胎鼠体积较小,取材及操作困难,不能较好的满足对ICP围产儿重要脏器功能损伤的观察和研究,因此有待构建大小适宜的ICP动物模型。

家兔疾病病理改变与人类接近,易繁殖,一胎多产,且胎兔体积大小适宜,因此本实验选用新西兰家兔为实验对象。通过给妊娠晚期孕兔注射苯甲酸雌二醇发现,0.1 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$及0.2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$的剂量可使孕兔血CG、TBA、ACT、AST显著升高,肝脏组织病理显示肝细胞出现明显的变性、胞质内胆汁样物质沉积。说明雌激素确可抑制肝细胞对胆汁酸的摄取,同时胆汁酸的细胞毒性作用破坏肝细胞,导致肝酶释放。另外,本实验观察发现各剂量组均有胎死宫内、早产的发生,高剂量组胎兔死亡率高,存活率仅11.9%,中剂量组胎兔存活率则大于50%。因此,0.1 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$的苯甲酸雌二醇构建的疾病模型适用于ICP胎儿并发症发生机制的观察和研究。

以上结果说明孕兔皮下注射苯甲酸雌二醇可出现妊娠肝内胆汁淤积的病理改变,以0.1 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$为理想注射剂量。该模型的建立为ICP对围产儿重要脏器损伤的发生机制研究提供了适宜的动物模型,同时也进一步证实雌激素有致胆汁淤积的作用,是导致妊娠肝内胆汁淤积的原因之一。

参考文献:

[1] Leslie K K, Reznikov L, Simon F R, *et al*. Estrogens in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Obstet Gynecol, 2000, 95(3): 372-376.

[2] Geier A, Dietrich C G, Gerloff T, *et al*. Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1609(1): 87-94.

[3] Zimmermann P, Koskinen J, Vaalamo P, *et al*. Doppler umbilical artery velocimetry in pregnancies complicated by intrahepatic cholestasis[J]. J Parinat Med, 1991, 19(5): 351-355.

[4] Williamson C, Gorelik J, Eaton B M, *et al*. The bile acid taurocholate impairs rat cardiomyocyte function: a proposed mechanism for intra-uterine fetal death in obstetric cholestasis[J]. Clin Sci (Lond), 2001, 100(4): 363-369.

[5] Gorelik J, Shevchuk A, de Swiet M, *et al*. Comparison of the arrhythmogenic effects of tauro- and glycoconjugates of cholic acid in an *in vitro* study of rat cardiomyocytes[J]. BJOG, 2004, 111(8): 867-870.

[6] 徐先明, 庄依亮, 杨幼明, 等. 乙炔雌二醇诱发孕鼠肝内胆汁淤积[J]. 中华围产医学杂志, 2000, 3(2): 112-115.

[7] 常 青, 王静波, 陈 勇, 等. 熊脱氧胆酸、地塞米松、思美泰对抗孕大鼠肝内胆汁淤积症的比较研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(12): 1091-1093.

(编辑 王 红)