论著

文章编号:1000-5404(2009)04-0334-04

妊娠肝内胆汁淤积症胎兔心肌细胞损伤的研究

冯丽霞,李 力,俞丽丽,郑英如,郭建新,易 萍,颜耀华 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

摘 要:目的 观察妊娠肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy,ICP)胎兔心肌细胞超微结构及细胞凋亡率,检测心肌腺苷三磷酸(ATP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。**方法** 16只孕兔,分为ICP组和对照组。ICP组自妊娠第22天,颈后皮下注射苯甲酸雌二醇0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1},对照组颈后皮下注射0.9%生理盐水,直至分娩。观察ICP组和对照组胎兔心肌细胞超微结构,检测心肌细胞ATP、SOD、MDA含量及细胞凋亡指数。**结果** 电镜观察见ICP胎兔心肌细胞线粒体轻度肿胀、髓鞘样结构形成,细胞质内糖原颗粒分布减少,对照组超微结构无明显改变。ICP组胎心组织ATP、SOD含量减少,MDA含量和细胞凋亡数明显增多,与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** ICP胎兔存在心肌细胞损伤。

关键词: 肝内胆汁淤积;妊娠;胎儿;心肌细胞

中图法分类号: R-332;R542.2;R714.255 **文献标识码:** A

Cardiac myocyte damage in fetus of rabbits with intrahepatic cholestasis pregnant

FENG Li-xia, LI Li, YU Li-li, ZHENG Ying-ru, GUO Jian-xin, YI Ping, YAN Yao-hua (Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate ultrastructure and apoptotic rate of fetal cardiac myocytes of rabbits with intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) and the levels of adenosine triphosphate (ATP), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the myocardial tissues. **Methods** Sixteen pregnant rabbits were randomly divided into control group and ICP group. Rabbits in ICP group were subcutaneously injected with benzestrofol at a dose of 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1} and control group with 0.9% saline solution from the 22nd gestation day to delivery day. The levels of ATP, SOD and MDA in myocardial tissues of ICP rabbit fetuses and control fetuses were determined. Ultrastructure and number of apoptosis cells were observed. **Results** Compared with controls, the levels of ATP and SOD in ICP rabbit fetuses' cardiac myocytes significantly decreased ($P<0.05$), while the levels of MDA and the number of apoptosis cells in ICP rabbit fetuses' cardiac myocytes significantly increased. Slight swelling, vacuolation and myelinoclasis in mitochondria, and decreased glycogen granules in cytoplasm were observed in ICP rabbit fetuses' cardiac myocytes under electron microscope. However, these ultrastructural alteration was not observed in controls. **Conclusion** The damage of cardiac myocytes does exist in fetuses of rabbits with ICP.

Key words: intrahepatic cholestasis; pregnancy; fetus; cardiac myocyte

妊娠肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠期特有的并发症。ICP对围产儿危害大,胎儿窘迫发生率高达22%~33%[1],胎儿死亡率也比正常妊娠高4倍,其发生机制至今未阐明。本实验在孕兔皮下注射苯甲酸雌二醇构建兔ICP模型的基础上,观察ICP胎兔心肌细胞超微结构及细胞凋亡率,检测心肌腺苷三磷酸(ATP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量,初步探讨在ICP疾病基础下胎兔心肌细胞产生的病理改变。

作者简介:冯丽霞,女,江西省上饶市人,硕士研究生,主要从事产科病理方面的研究,现在江西省鹰潭市184医院妇产科。E-mail:fenglixia2000@21cn.com

通信作者:李 力,E-mail: xglili@mail.dph-fsi.com

收稿日期:2008-06-04;修回日期:2008-07-11

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　成年新西兰雌兔,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,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。

1.1.2　主要试剂　　苯甲酸雌二醇(1 mg/ml,上海通用药业股份有限公司),ATP、SOD、MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),TUNEL 检测试剂盒(Roche 公司)、甘胆酸(CG)试剂盒(北京北方生物技术研究所)。

1.2　方法

1.2.1　模型制作　　孕兔 16 只,分为 ICP 组和对照组,每组 8 只。自妊娠第 22 天起,ICP 组于颈后皮下注射苯甲酸雌二醇 0.1 mg·kg^{-1}·d^{-1},对照组按 0.1 ml·kg^{-1}·d^{-1}皮下注射生理盐水,直至分娩。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[2]。

1.2.2　胎兔获取　　发现孕兔阴道流淡血性分泌物即有分娩征兆时,予速眠新(长春军需大学生产)0.2 ml/kg 肌肉注射麻醉,行剖宫产术娩出胎兔。记录胎崽及存活胎数,称量胎崽、胎盘质量。

1.2.3　孕兔肝脏组织 HE 染色病理观察　　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改变。

1.2.4　胎兔心肌超微结构观察　　每组选取 10 只胎兔,活杀摘取心脏,取少许心脏组织置于滴有 3% 戊二醛的蜡板上,切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小,置入 3% 戊二醛中固定,1% 四氧化锇后固定,乙醇丙酮递增浓度脱水,环氧树脂 618 浸透包埋,LKB 超薄切片机切片,醋酸铀和枸橼酸铅双染色,电镜观察心脏超微结构。

1.2.5　胎心组织 ATP 含量的测定

1.2.5.1　标本采集　　活体摘取心脏,取左心适量心肌组织置液氮中保存,待集中检测。

1.2.5.2　胎心组织匀浆的制备　　自液氮中取出胎心组织,在冷却的生理盐水中漂洗,滤纸拭干,称质量,放入手动玻璃匀浆管中,加入预冷的 1 ml 0.01 mol/L 高氯酸中,在冰浴下反复转动研磨,使心肌组织匀浆后,用高速低温离心机,15 000 r/min,离心 20 min,取上清液检测。

1.2.5.3　测定　　流动相为 50 mmol/L 磷酸钠缓缓冲液,美国 Waters 公司 Bondepak C_{18}色谱柱(15 cm×3.90 mm),检测波长 2 nm,流动相流速 0.5 ml/min,进样量 10 μl。

1.2.6　胎心组织 MDA、SOD 含量的测定　　自液氮中取出胎心组织,在冷却的生理盐水中漂洗,滤纸拭干,称体质量,放入手动玻璃匀浆管中,加入冷的 0.86% 生理盐水,在冰浴中反复研磨,使心肌组织匀浆后,3 500 r/min,离心 15 min,取上清液检测。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法,SOD 含量测定采用黄嘌呤氧化酶法。

1.2.7　胎心细胞凋亡情况检测　　采用 TUNEL 技术检测凋亡细胞。计算方法:选择 5 个以上具有代表性的高倍视野,计数 500 个细胞中 TUNEL 染色阳性细胞数。

凋亡细胞指数 = 凋亡细胞数/细胞总数×100%

1.3　统计学处理

使用 SPSS 10.0 软件处理,计量资料各指标结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数的两两比较用方差分析,样本率的比较用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　孕兔血清生化指标

与对照组相比,ICP 组孕兔注射苯甲酸雌二醇后血清 AST、ALT、TBA、CG 有所升高($P<0.01$),TCH 降低($P<0.01$),2 组差异具有统计学意义($P<0.01$,表 1)。

2.2　孕兔妊娠结局

ICP 组孕兔在注射苯甲酸雌二醇后 5 例提前出现阴道流血性分泌物的分娩征象,行剖宫取胎时发现部分胎兔胎死宫内,3 例于妊娠 33 d 亦无产兆,腹部备皮后经 B 超探测未见胎心搏动,遂剖宫探查见胎兔全部宫内死亡。而对照组无提前分娩和胎死宫内发生,胎兔存活率为 100%。2 组胎兔体质量、胎盘质量、妊娠天数、胎兔存活率与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.01$,表 2)。

表 1　孕兔血清生化指标的比较($\bar{x} \pm s$、$n=10$)

组别	TBIL(μmol/L)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	TBA(μmol/L)	TCH (mmol/L)	CG(μg/ml)
ICP 组	4.67 ± 1.15	109.10 ± 20.30[a]	60.28 ± 11.00[a]	61.43 ± 6.25[a]	0.91 ± 0.12[a]	0.94 ± 0.10[a]
对照组	4.65 ± 0.98	34.36 ± 18.86	49.17 ± 8.17	32.99 ± 5.27	1.94 ± 0.24	0.56 ± 0.07

a:$P<0.01$,与对照组比较

表 2　孕兔妊娠结局的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胎兔质量(g)	胎盘质量(g)	妊娠天数(d)	活胎数	宫内死胎数	胎兔存活率(%)
ICP 组	57	32.31 ± 5.13[a]	5.05 ± 0.69[a]	27.63 ± 1.30[a]	31	26	54.4
对照组	56	40.60 ± 5.86	5.78 ± 0.59	30.50 ± 0.53	56	0	100

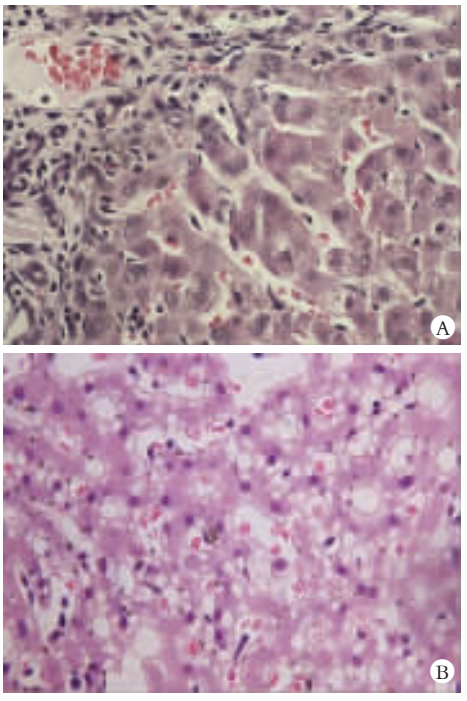
a:$P<0.01$,与对照组比较

2.3 孕兔肝脏形态学改变

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，肝细胞索排列规则，肝窦扩张良好，未见细胞变性、坏死及胆汁淤积（图1A）。ICP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，细胞质疏松呈网状或透明，细胞水肿，部分细胞脂肪变性，部分肝细细胞质内可见胆汁淤积（图1B）。

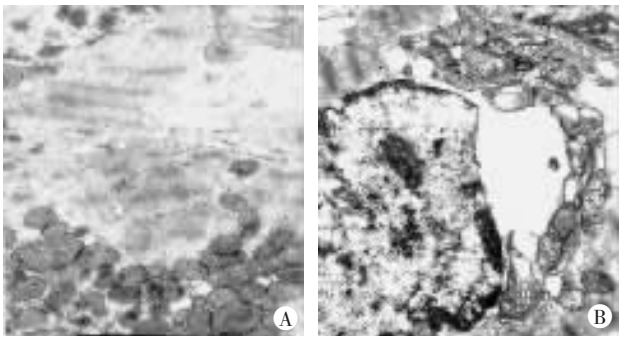
2.4 胎兔心脏超微结构的改变

ICP组胎兔心肌细胞润盘连接正常，肌丝走向稍紊乱，部分线粒体轻度肿胀，灶性空化，髓鞘样结构形成，核周间隙增宽，胞质内糖原颗粒分布减少。对照组线粒体显微结构无明显改变（图2）。



A：对照组；B：ICP组

图1 2组孕兔肝细胞病理学观察 （HE×400）



A：对照组；B：ICP组

图2 2组胎兔心肌超微结构观察 （TEM×10 000）

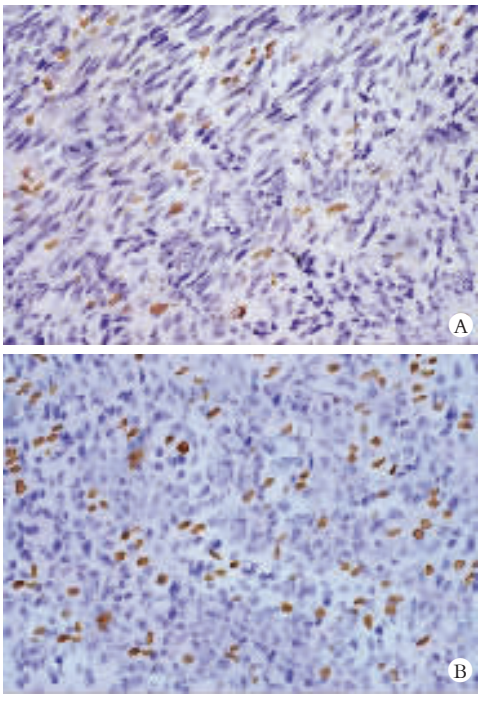
2.5 胎兔心肌细胞ATP、SOD、MDA的含量及心肌细胞凋亡检测

ICP胎兔心肌细胞ATP、SOD含量低于对照组胎兔，而MDA含量与心肌细胞凋亡指数高于对照组（图3），差异具有统计学意义（$P<0.01$，表3）。

表3 胎兔心肌细胞ATP、SOD、MDA含量及细胞凋亡情况（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	ATP（μmol/g）	SOD（U/100 mg）	MDA（nmol/mg）	细胞凋亡指数（%）
ICP组	10	78.5±10.8[a]	68.48±6.97[a]	7.89±1.23[a]	16.5±4.0[a]
对照组	10	100.9±21.4	80.31±6.71	6.02±1.13	9.6±3.3

a：$P<0.01$，与对照组比较



A：对照组；B：ICP组

图3 2组胎兔心肌细胞凋亡情况 （HE×400）

2.6 孕兔血甘胆酸与胎心组织ATP的相关性分析

孕兔血中甘胆酸与胎心组织ATP含量呈显著负相关（$r=-0.928$，$P=0.037$）。

3 讨论

本实验通过皮下注射苯甲酸雌二醇诱发妊娠家兔的ICP模型。结果显示，ICP组孕兔血清甘胆酸、总胆汁酸、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶水平显著升高，这与ICP患者的血清生化改变一致。肝脏组织病理观察显示ICP组孕兔肝细胞出现明显的水肿和脂肪变性，胞质内胆汁淤积。本实验从血清学、肝脏组织形态学改变证明，苯甲酸雌二醇可诱导孕兔发生肝内胆汁淤积和肝细胞损伤，同时胎兔体质量下降、胎死宫内发生率显著增加，妊娠天数明显减少，与ICP患者的病理生理变化一致，证明苯甲酸雌二醇可建立稳定的孕兔ICP动物模型。

ICP 时胎儿窘迫、早产、死胎和死产的发生率显著高于正常妊娠。本实验在构建兔妊娠肝内胆汁淤积症模型中也观察到胎兔早产和宫内死亡的发生。目前认为 ICP 胎儿并发症的发生与母体胆汁酸水平密切相关。ICP 时由于肝细胞对胆汁酸的摄入、转运和排泄障碍,孕妇外周血中胆汁酸浓度显著升高,达正常的 10 ~ 100 倍[3]。Glantz 等[3]对 45 000 例孕妇进行 ICP 筛查发现,ICP 胎儿并发症的发生与母体胆汁酸水平呈正相关。Lee 等[4]进行回顾行研究发现,当 ICP 母亲血液 TBA 浓度≥20 mmol/L,分娩时胎儿出现胎粪排出,而胎粪排出的发生率与母亲血液 TBA 浓度呈线性相关。

胆汁酸对体外培养的肝细胞、肠黏膜上皮细胞、红细胞等均有浓度和时间依赖性细胞毒作用[5]。研究表明胆汁酸具有氧自由基作用,极易与脂类多不饱和脂肪酸中的双链发生反应,造成膜脂质破坏,发生氧化损伤,导致线粒体功能障碍[6]。而线粒体损伤在胆汁酸致细胞毒性作用中扮演着重要的角色[7]。众所周知,线粒体是细胞产生 ATP 的主要场所,细胞内 95% 以上的能源物质是靠线粒体氧化磷酸化产生 ATP 来提供的。完整的线粒体结构、正常的功能,关系到细胞内能源物质的供应,线粒体结构功能的损害势必导致 ATP 生成减少。相关研究证实胆汁酸通过促进乳酸脱氢酶释放、IL-2、IL-8 合成和溶解细胞膜磷脂微团,破坏细胞膜脂质双层结构,导致细胞膜流动性和对 Ca^{2+} 的通透性增加,使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高来抑制线粒体氧化磷酸化功能,引起细胞能量衰竭[5]。同时 Perez 等[8]发现 ICP 孕鼠和胎鼠肝脏组织中参与抗氧化的过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶含量均下降,氧化型谷胱甘肽/还原型谷胱甘肽值上升。Perez 等[9]还发现 ICP 鼠胎盘组织存在脂质过氧化和蛋白羧基化作用,孕鼠血清中显著升高的胆汁酸与胎盘组织氧化应激的发生密切相关。线粒体功能障碍和氧化应激是导致细胞凋亡的主要途径。

邵勇等[10]通过胎鼠宫内心电图观察发现 ICP 胎鼠死亡前出现胎鼠心率功率谱变化和短暂的心律失常。本实验结果显示 ICP 胎兔心肌细胞 ATP 含量显著低于对照组,通过相关性分析显示 ICP 孕兔外周血中甘胆酸浓度与胎兔心肌组织中 ATP 含量呈负相关。电镜观察胎兔心肌组织超微结构变化,发现 ICP 胎兔心肌细胞部分线粒体出现轻度肿胀、髓鞘样结构形成,胞质内糖原颗粒分布减少。利用 TUNEL 方法检测凋亡细胞,发现 ICP 胎兔心脏组织中细胞凋亡指数显著高于对照组。通过对胎兔心肌组织 SOD 和 MDA 的检测显示,ICP 胎兔心肌组织 MDA 含量增加,SOD 含量减少。生理状态下,SOD 能清除细胞代谢过程中产生的自由基,是衡量自由基清除酶系统活力的一个重要指标。在损伤、缺氧等情况下,氧自由基生成增加使 SOD 活性下降,导致脂质发生氧化损伤,生成大量的 MDA。因此组织中 SOD 活性下降和 MDA 含量增高可作为评定氧自由基生成及对膜脂质双层结构破坏的指标。以上结果提示 ICP 胎兔心肌细胞存在能量生成障碍、氧化损伤和细胞凋亡,而心脏作为机体最重要脏器之一,其结构功能的异常可能是 ICP 胎兔宫内死亡率高的原因之一。

参考文献:

[1] Lammert F, Marschall H U, Glantz A, *et al*. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management[J]. J Hepatol, 2000, 33(6): 1012 - 1021.

[2] 冯丽霞, 李　力, 胡　珊, 等. 孕兔妊娠肝内胆汁淤积症模型的构建[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 994 - 996.

[3] Glantz A, Marschall H U, Mattsson L A. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: relationships between bile acid levels and fetal complication rates[J]. Hepatology, 2004, 40(2): 467 - 474.

[4] Lee R H, Kwok K M, Ingles S, *et al*. Pregnancy outcomes during an era of aggressive management for intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. Am J Perinatol, 2008, 25(6): 341 - 345.

[5] Fickert P, Trauner M, Fuchsbichler A, *et al*. Cytokeratins as targets for bile acid-induced toxicity[J]. Am J Pathol, 2002, 106(2): 491 - 499.

[6] Gumpricht E, Dahl R, Devereaux M W, *et al*. Beta-carotene prevents bile acid-induced cytotoxicity in the rat hepatocyte: Evidence for an antioxidant and anti-apoptotic role of beta-carotene in vitro[J]. Pediatr Res, 2004, 55(5): 814 - 821.

[7] Palmeira C M, Rolo A P. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids[J]. Toxicology, 2004, 203(1-3): 1 - 15.

[8] Perez M J, Macias R I, Duran C, *et al*. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid[J]. J Hepatol, 2005, 43(2): 324 - 332.

[9] Perez M J, Macias R I, Marin J J. Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid[J]. Placenta, 2006, 27(1): 34 - 41.

[10] 邵　勇, 姚珍薇, 陆　杰, 等. 肝内胆汁淤积症孕鼠的胎鼠心率功率谱变化与猝死的关系[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(6): 1215 - 1219.

(编辑　王小寒)