DOI: 10.16016/j.1000-5404.201502098

论著

胎盘合体滋养细胞微粒注射对孕鼠肾功能和病理形态损伤的研究

张 欣[1],李红梅[1],李怡琳[2],周丽娟[1],李银峰[1],顾 焱[1],韩 健[1],韩 磊[1],郑英如[1],郭建新[1],李 力[1]
(400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科中心[1];610000 成都,四川省人民医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 观察经孕鼠尾静脉注射合体滋养细胞微粒(syncytiotrophoblast microparticles STBM)后,小鼠肾功能及肾脏病理改变。**方法** 收集孕18 d C57小鼠的胎盘,制备小鼠合体滋养细胞微粒,利用电镜观察C57小鼠STBM的形态结构,BCA法测定C57小鼠STBM的蛋白水平;将C57孕鼠分为STBM组、对照组和PBS组,STBM组:自C57小鼠孕8 d起,每天以蛋白浓度为0.15 mg/mL的STBM(0.2 mL)经鼠尾静脉回输至小鼠体内,至孕18 d时收集小鼠24 h尿液测定尿微量蛋白(M-TP)、尿肌酐(U-Crea)、尿蛋白肌酐比(M-TP/Cr)、尿酸(U-Uric)、24 h尿蛋白(24 h U-TP),采集全血测定血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、胱抑素C(Cys-C),取肾脏标本切片后行HE染色观察肾组织结构变化;对照组:正常孕18 d小鼠收集尿液、采集全血、取肾脏进行检测;PBS组:自孕8 d起每天经鼠尾静脉注射PBS 0.2 mL,余处理同STBM组。**结果** STBM组孕鼠尿液M-TP、M-TP/Cr、24 h U-TP明显高于对照组和PBS组($P<0.01$),与对照组比较,PBS组U-Uric未见明显变化($P>0.05$),而STBM组U-Uric显著降低($P<0.01$);STBM组血清BUN、Scr、Cys-C含量显著升高($P<0.01$);STBM组肾脏HE染色可见肾小球内皮细胞增生、肿胀、变形,肾小管云雾状变性。**结论** 类子痫前期模型鼠有肾损伤,STBM可能在子痫前期肾损害中起重要作用。

[关键词] 合体滋养细胞微粒;肾损害;子痫前期
[中图法分类号] R-332;R692;R714.245 [文献标志码] A

Renal function and pathological damages after injection of syncytiotrophoblast microparticles in pregnant mice

Zhang Xin[1], Li Hongmei[1], Li Yilin[2], Zhou Lijuan[1], Li Yinfeng[1], Gu Yan[1], Han Jian[1], Han Lei[1], Zheng Yingru[1], Guo Jianxin[1], Li Li[1]([1]Obstetrics and Gynecology Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan Province, China)

[**Abstract**] Objective To determine the renal function and pathological changes after intravenous injection of syncytiotrophoblast microparticles (STBMs) in pregnant mice. Methods When the mice were pregnant for 18 d, the placentas were taken to prepare STBMs. The morphology of STBMs was observed by transmission electron microscopy, and the protein level of STBMs was detected with BCA Protein Assay Kit. Fluorescence-labeled STBMs were injected into the pregnant mice *via* the tail veins, and the *in vivo* distribution of STBMs were traced. The pregnant mice were divided into STBM group, control group and PBS group. The STBM group was treated by tail vein injection of STBMs (0.2 mL) with protein concentration of 0.15 mg/mL from the 8th day of the pregnancy. When the pregnancy lasted for 18 d, 24-h urine of the mice was collected to detect microalbuminuria (M-TP), urine creatinine (U-Crea), urinary protein creatinine ratio (M-TP/Cr), 24-h urine protein (24 h U-TP) and uric acid (U-Uric). Meanwhile, the blood was sampled to detect urea nitrogen (BUN), creatinine (Scr) and cystatin C (Cys-C), and the kidney specimens were treated by hematoxylin-eosin (HE) staining to observe renal pathological changes. Results The urine

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31470886,81270008);重庆市科委应用开发课题(CS+C20ByykfA0213)
[通信作者] 李 力,E-mail:cqlili2011@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150910.1131.021.html(2015-09-10)

M-TP, M-TP/Cr, and 24 h U-TP of the STBM group were significantly higher than those of the control group and the PBS group ($P<0.01$). There was no significant difference in U-Uric between the control group and the PBS group ($P>0.05$), but the U-Uric level was significantly decreased in the STBM group ($P<0.01$). The serum BUN, Scr, and Cys-C were significantly increased in the STBM group ($P<0.01$). The HE staining results showed glomerular endothelial cell proliferation, swelling, deformity, and renal tubular cloudy degeneration in the STBM group. **Conclusion** STBM raising can cause renal damage in the pregnant mice, so STBM may play an important role in the renal damage of preeclampsia.

[**Key words**] syncytiotrophoblast microparticles; kidney damage; preeclampsia

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31470886, 81270008) and the Application and Development Project of Chongqing Science and Technology Commission (CS + C20ByykfA0213). Corresponding author: Li Li, E-mail: cqlili2011@163.com

合体滋养细胞微粒(syncytiotrophoblast microvillous membrane, STBM)是从胎盘合体滋养细胞脱落下来的纳米级的膜性囊泡[1],其释放行为是正常妊娠过程中的一种生理现象,但在子痫前期(preeclampsia, PE)时其脱落增加,从而产生致病作用[2]。越来越多的证据表明,STBM作为重要的胎盘源性不良因子之一,释放入母体外周循环导致产妇全身炎症反应和内皮功能障碍,被认为是PE发病的重要因素[3]。本课题前期研究发现,小鼠STBM与人STBM高度相似,并成功建立了小鼠STBM的提取方法[4],但STBM对孕鼠肾功能与病理形态的影响尚不得而知。为此,本研究通过制备小鼠STBM,观察尾静脉注射STBM对孕鼠肾功能的损害,旨在发现STBM介导的肾损害及与PE发生的相互联系,为探寻PE的发病机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

8周龄C57BL/6小鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),青-链霉素溶液(GIBCO Invitrogen Life Technologies),BCA蛋白浓度测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit)。

1.2 主要仪器

超高速冷冻离心机(Beckman公司),透射电子显微镜(Hitachi-7500)等。

1.3 方法

1.3.1 小鼠STBM的制备和观察 孕18 d C57BL/6小鼠(8周龄)以2.5%戊巴比妥(20 mL/kg)腹腔注射麻醉,无菌条件下迅速去除胎盘置于冰磷酸盐缓冲液(PBS)中,分离完整胎盘洗去残留血液后剪碎(约1 mm^3),称量克数,将剪碎的胎盘组织放入0.9%的NaCl溶液(1%青-链霉素)中(40 mL/g),4 ℃振荡过夜,反复离心,得到STBM沉淀。每管以5%蔗糖的PBS 400 μL重悬,保存于-20 ℃备用。将制备好的STBM稀释45倍备用,用滴液法制片,用细吸管吸取稀释后的STBM混悬液滴于400目铜网膜上,待样品干燥后用透射电子显微镜上机观察。

1.3.2 BCA法测定STBM蛋白水平 使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定STBM蛋白水平,严格按照说明书操作。

1.3.3 分组处理孕鼠 8周龄C57BL/6小鼠雌雄1:1合笼,次日清晨发现阴栓者选出标记为妊娠1 d的小鼠。STBM组孕鼠:妊娠第8天起每天经鼠尾静脉注射STBM(0.15 mg/mL)0.2 mL;对照组:正常妊娠的C57小鼠;PBS组孕鼠:妊娠第8天起每天经鼠尾静脉注射PBS 0.2 mL。至妊娠第18天检测各项指标。

1.3.4 收集尿液、采集全血并检测 妊娠第17天代谢笼收集各组小鼠24 h尿液,上机测定尿微量蛋白(M-TP)、尿肌酐(U-Crea)、尿蛋白肌酐比(M-TP/Cr)、24 h尿蛋白(24hU-TP)。妊娠第18天挖眼取血,3 000 r/min,15 min,取上清上机测定尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、胱抑素C(Cys-C)。

1.3.5 制备肾脏冰冻切片HE染色 取孕18 d小鼠,麻醉后经左心室PBS溶液缓慢灌注5 min,2%多聚甲醛灌注3 min,取左肾迅速置于液氮中,包埋剂(OCT Compound)包埋肾脏组织,将其置于恒冷箱切片,HE染色,置于高倍镜下观察肾脏病理改变。

1.4 统计学方法

采用SPSS 13.0进行数据统计分析,结果用$\bar{x}\pm s$表示,采用F检验比较多组间数据,采用LSD-t检验进行组间差异的两两比较。

2 结果

2.1 STBM的验证

在透射电镜下(Hitachi-7500)可见STBM为带膜囊泡状结构,此法制备的STBM与人来源的STBM有相似的结构特征[5]。应用Image-Pro Plus 6.0软件测得STBM囊泡的直径为254.22~928.47(453.28±87.35)nm,见图1。与文献报道的人STBM(200~800 nm)的体视学参数相近。BCA法测定的STBM蛋白浓度为0.67~1.28(0.87±0.24)mg/mL($n=16$)。

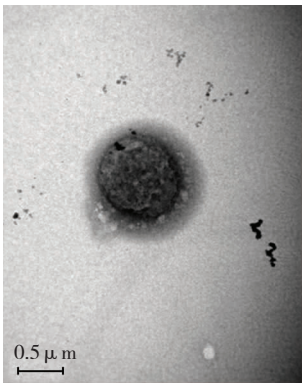


图 1 透射电镜下 STBM 的囊泡状结构

2.2 各组孕鼠尿液指标定量检测

STBM 组 M-TP、U-Crea、M-TP/Cr、24 h U-TP 水平明显高于对照组和 PBS 组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与对照组比较，PBS 组 U-Uric 未见明显变化（$P>0.05$），而 STBM 组 U-Uric 显著降低（$P<0.01$，表 1）。

表 1 各组孕鼠尿液指标定量检测结果（$n=6, \bar{x}\pm s$）

组别	M-TP (g/L)	U-Crea (μmol/L)	M-TP/Cr	U-Uric (μmol/L)	24 h U-TP (g/L)
对照组	0.19±0.04	1.24±0.19	0.16±0.03	529.19±51.82	0.53±0.08
PBS 组	0.17±0.03	1.18±0.29	0.15±0.04	556.62±54.64	0.49±0.08
STBM 组	0.53±0.19^{ab}	2.01±0.50^{ab}	0.26±0.04^{ab}	372.50±37.82^{ab}	1.54±0.23^{ab}
F 值	29.101	15.585	25.040	37.514	143.286
P 值	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 PBS 组比较

2.3 各组孕鼠肾功能指标变化

与对照组和 PBS 组相比，STBM 组 BUN、Crea、Cys-C显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$，表 2）。

表 2 各组孕鼠肾功能指标变化（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

组别	BUN (mmol/L)	Crea (μmol/L)	U/C	Cys-C (mg/L)
对照组	9.12±1.36	14.97±0.75	144.75±14.68	0.45±0.09
PBS 组	9.22±1.20	14.58±1.30	145.94±18.06	0.42±0.10
STBM 组	13.60±2.23^{ab}	16.91±1.96^{ab}	198.15±22.88^{ab}	1.07±0.15^{ab}
F 值	14.333	4.601	15.718	59.206
P 值	0.000	0.028	0.000	0.000

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 PBS 组比较

2.4 孕鼠肾脏组织病理表现

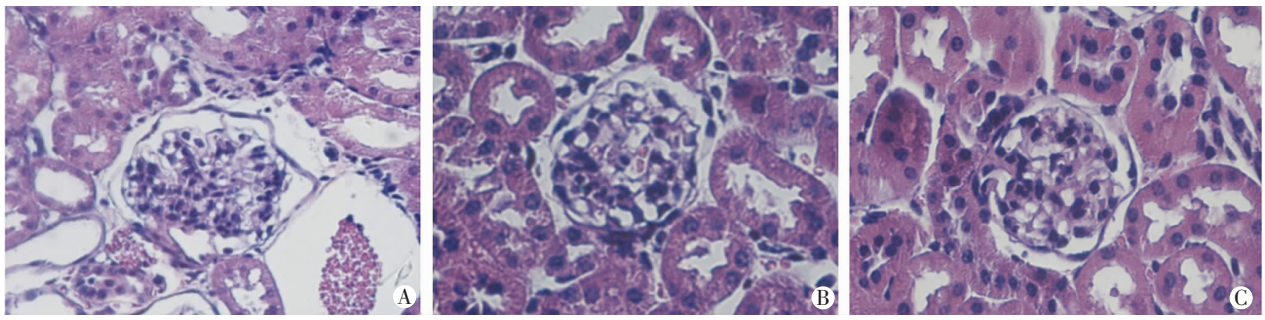
STBM 组肾脏组织病理 HE 染色示：肾小球体积增大，内皮细胞增生、肿胀，系膜区增宽，肾小球囊与球内细胞间隙变窄，肾小管轻度云雾状变性，呈毛玻璃样（图 2A）。对照组和 PBS 组肾脏组织病理无上述病理改变（图 2B、C）。

3 讨论

子痫前期（PE）是妊娠期特有的疾病，在我国发病率是 9.4% ~10.4%[6]。临床特点为妊娠中后期（>20 周）出现的高血压、蛋白尿，严重时出现水肿、肾功能不全及凝血机能异常，可累及多个脏器，终末期可能发生子痫前期肾病、急性肾功能衰竭、心力衰竭、DIC 等。其中肾脏损害主要表现为蛋白尿、肾功能损伤及肾脏组织病理学改变等。尽管 PE 发生的根本原因仍没有明确，但胎盘源性不良因子的释放导致的血管内皮受损等一系列病理生理变化在疾病发生中的作用已受到关注，胎儿及其附属物胎盘是 PE 发病的聚焦点。终止妊娠是目前唯一有效的治疗方法。

STBM 作为 PE 发病的重要的胎盘源性不良因子，从胎盘脱落入母血时向母体输送了许多致病因子，在 PE 的发病中发挥重要作用[7]。研究证实，正常妊娠时，有少量 STBM 从合体滋养细胞上脱落入母血循环中，但在子痫前期时可能由于子宫胎盘循环障碍、增强氧化应激、细胞功能紊乱和/或凋亡等原因使 STBM 释放入母血增加[8-9]。这些合体滋养细胞微粒可以作用于血管内皮细胞，致血管高反应性，损伤血管内皮细胞，在子痫前期发病中起重要作用。此外，还可影响母体免疫系统、致机体炎症状态、造成机体高凝状态等[3]。

正常妊娠妇女的肾小球滤过率（glomerular filtration rate，GFR）在孕早期开始上升，至孕中期达峰值，表现为孕期血肌酐、血尿素氮、尿酸等的降低[10-11]。重度子痫前期/子痫的妇女，由于外周血中 STBM 等胎盘不良因子脱落增加，肾小球血管内皮细胞持续性痉挛，致不同程度的肾血流灌注不足，肾血流量和 GFR 均较正常妊娠相同孕期减少，引起血液中 BUN、Crea、



A：STBM 组；B：对照组；C：PBS 组

图 2 各组孕鼠肾脏组织病理变化（HE×400）

Cys-C 等人体的代谢产物无法正常排出,蓄积在体内致肾功能指标异常。肾小球滤过屏障是由肾小球内皮细胞、足细胞裂孔和基底膜等组成的兼具电荷屏障和物理屏障的双重屏障作用,其中任何一部分的损伤均可造成滤过膜的损坏,产生蛋白尿。STBM 致肾小球内的血管内皮损伤后,血管内皮的完整性受损和通透性增加,肾小球滤过膜孔径增加,所带电荷受到破坏,使血浆微量白蛋白等漏出形成蛋白尿[12]。长期以来,24 h U-TP 一直被作为诊断 PE 肾脏损害的金标准,但近来有学者提出质疑,一方面,尿蛋白测定也有很大的不稳定性,其假阳性率高,假阴性有时也有发生;假阳性的结果可能会使医师对患者错误地立即终止妊娠,相反,若仅因假阴性结果而轻视 PE 患者的病情也会导致不当的临床处置;另一方面,24 h U-TP 并不能直接反映妊娠的结局,无蛋白尿的 PE 患者也可以有不良的妊娠结局。与之相比,M-TP/Cr 用于诊断的准确性、可重复性和舒适性更高[13-14]。本实验在构建类子痫前期样小鼠模型的基础上,收集小鼠尿液、血液及肾脏组织标本检测,比较其与正常孕鼠的尿液指标、肾功能与肾组织病理的变化。发现类子痫前期组孕 18 d 鼠的 24 h U-TP、M-TP/Cr 均显著高于对照组和 PBS 组;类子痫前期组小鼠血液中尿素氮、肌酐、血清胱抑素 C 也有不同程度的升高,说明模型鼠增高的 STBM 有肾损害存在,此为临床检测的结果提供了佐证。

此外,对 PE 患者的活检研究表明其肾小球、肾小管和小动脉均可发生改变。以肾小球损伤为主,包括肾小球体积和毛细血管腔直径的减小,这会导致蛋白通透性的增加和蛋白尿的产生,且肾小球体积的增加与疾病的严重程度相关[15-16];透射电子显微镜下可见 PE 患者的肾脏较正常妊娠妇女发生了多项超微结构的改变:内皮细胞肿胀、内皮下纤维蛋白样沉积物的出现和系膜细胞插入。肿胀肥大的内皮细胞体积增大,导致毛细血管腔闭塞,呈现缺血表现,又被称为内皮增生[17]。本实验中小鼠肾脏组织病理切片 HE 染色结果提示:STBM 组肾小球体积增大,内皮细胞肿胀、增生,系膜区增宽,肾小球囊与球内细胞间隙变窄,肾小管轻度云雾状变性,呈毛玻璃样改变。出现了子痫前期肾病典型的病理改变。

目前对 STBM 致子痫前期及肾脏损害的研究报道甚少,本实验研究从多方面的检测证实了外周血STBM 升高对肾脏的结构和功能可以构成损害,分析可能与肾小球血管痉挛,局部缺血缺氧,导致内皮细胞损伤有关。本身肾脏的特殊解剖结构,对缺氧的敏感性,也为损害奠定基础。但其环节通路是否可逆尚不明确,仍需要进一步探讨研究。

参考文献:

[1] Aharon A, Brenner B. Placenta-derived microparticles[J]. Thromb Res, 2013, 131(Suppl 1): S22-S24.

[2] Lok C A, Van-Der-Post J A, Sargent I L, *et al*. Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia[J]. Hypertens Pregnancy, 2008, 27(4): 344-360.

[3] van-der-Post J A, Lok C A, Boer K, *et al*. The functions of microparticles in pre-eclampsia[J]. Semin Thromb Hemost, 2011, 37(2): 146-152.

[4] 李怡琳, 韩健, 刘晓洁, 等. 小鼠合体滋养细胞微绒毛膜制备方法的研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(12): 1330-1331,1335.

[5] Gupta A K, Rusterholz C, Huppertz B, *et al*. A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast microparticles preparations on endothelial cells[J]. Placenta, 2005, 26(1): 59-66.

[6] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 399-421.

[7] Rajakumar A, Cerdeira A S, Rana S, *et al*. Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia[J]. Hypertension, 2012, 59(2): 256-264.

[8] Searle J, Mockel M, Gwosc S, *et al*. Heparin strongly induces soluble fms-like tyrosine kinase 1 release *in vivo* and *in vitro*--brief report[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(12): 2972-2974.

[9] Gyorgy B, Szabo T G, Pasztoi M, *et al*. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(16): 2667-2688.

[10] Maynard S E, Thadhani R. Pregnancy and the kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(1): 14-22.

[11] Conrad K P, Davison J M. The renal circulation in normal pregnancy and preeclampsia: is there a place for relaxin?[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(10): F1121-F1135.

[12] Han L, Yang Z, Li K, *et al*. Antepartum or immediate postpartum renal biopsies in preeclampsia/eclampsia of pregnancy: new morphologic and clinical findings[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(8): 5129-5143.

[13] Karumanchi S A, Maynard S E, Stillman I E, *et al*. Preeclampsia: a renal perspective[J]. Kidney Int, 2005, 67(6): 2101-2113.

[14] D'Anna R, Baviera G, Scilipoti A, *et al*. The clinical utility of serum uric acid measurements in pre-eclampsia and transient hypertension in pregnancy[J]. Panminerva Med, 2000, 42(2): 101-103.

[15] Brown M A. Pre-eclampsia: proteinuria in pre-eclampsia-does it matter any more?[J]. Nat Rev Nephrol, 2012, 8(10): 563-565.

[16] Mirza F G, Cleary K L. Pre-eclampsia and the kidney[J]. Semin Perinatol, 2009, 33(3): 173-178.

[17] Strevens H, Wide-Swensson D, Hansen A, *et al*. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre-eclampsia[J]. BJOG, 2003, 110(9): 831-836.

(收稿:2015-02-17;修回:2015-04-10)

(编辑 吴培红)