临床研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0071-03

宫内给药对晚孕大鼠细菌性宫内感染胎盘炎症与滋养细胞凋亡的影响

程 浩,刘 建,兰 易,邹姝丽,甘晓玲
(重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨头孢曲松钠羊膜腔内给药对大肠埃希菌所致宫内感染的晚孕 SD 大鼠胎盘组织炎症反应和滋养细胞凋亡的影响。方法:妊娠 15 d 的 SD 孕鼠 36 只,随机分成 4 组,分别为羊膜腔内给药(IUA)组、对照(IUC)组和母鼠静脉给药(IVA)组、对照(IVC)组,每组 9 只。(1)妊娠第 15 d,所有孕鼠一侧宫角行 10^{10} 个 /L 大肠埃希菌菌液 0.2 ml 接种。(2)妊娠第 16 d,IUA 组和 IUC 组,分别于接种侧各羊膜腔内注射头孢曲松钠和等体积的生理盐水,IVA 组和 IVC 组,母鼠尾静脉分别注射头孢曲松钠和等体积的生理盐水。(3)自妊娠第 17 d 起,每组每天随机处死 3 只,其接种侧宫角顶端 3 个胎囊胎盘行 HE 染色组织切片,光学显微镜下比较 Naeye 分期分级,随机抽取其一 TUNEL 法 FITC 标记胎盘凋亡细胞后作半定量分析。结果:羊膜腔内穿刺总体和各天的给药组轻度炎症率高于对照组,母鼠静脉途径总体和第 2、3 d,给药组轻度炎症率高于对照组($P<0.05$)。轻度炎症率在两个给药组和其给药后 1 d 时,羊膜腔内组较母鼠静脉组为高($P<0.05$)。给药组滋养细胞凋亡强度明显低于其对照组($P<0.05$)。IUA 组给药后第 1、3 d,凋亡强度较 IVA 组低($P<0.05$)。结论:单次头孢曲松钠给药治疗晚孕 SD 大鼠大肠埃希菌宫内感染,羊膜腔内较母鼠静脉途径能更迅速地减轻胎盘的炎症反应和抑制滋养细胞凋亡,以改善妊娠结局。

【关键词】绒毛膜羊膜炎;大肠杆菌性;细胞凋亡;妊娠末期;羊膜腔内
【中国图书分类法分类号】R714.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-02-25

Effect of administration by amniocentesis on chorioamnionitis and rophoblasts apoptosis in late pregnant rats with intrauterine infection by E coli

CHENG Hao, et al
(*Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstracts】*Objective*: To explore the effect of ceftiaxone sodium administered by amniocentesis on chorioamnionitis and trophoblast apoptopsis in treatment of intrauterine infection with Escherichia coli(E coli)in late pregnant SD rats. *Methods*: 36 SD pregnant rats for 15 days were randomly divided into four groups(9 in each), intrauterine admistration(IUA)group and control(IUC)group, maternal intravenous injection(IVA)group and control(IVC)group. 0.2 ml E coli suspension at a dose of 10^{10}/L was inoculated into one horn of uterus of each rat on 15-day of pregnancy. On the 16-day of pregnancy, each gestational sac in inoculation side of rats in IUA group and IUC group was given ceftriaxone sodium or appropriate volume of isotonic Na chloride(NS)by amniocentesis, and each rat in IVA group and IVC group was given ceftiaxone sodium or appropriate volume of isotonic NS intravenously. From the 17th day,3 rats in each group were sacrificed randomly and respectively everyday. The top 3 sacs in inoculation side of each rat were detected,placenta and membrane was get for histological analysis with light microscope by HE staining to compare Naeye's stage and grade of chorioamnionitis. One of the top 3 sacs in inoculation side of each rat was randomly selected. The apoptosis of trophoblasts was semiquantitatively analyzed by TUNEL staining. *Results*: The mild chorioamnionitis rates were higher in total and each day administration group of amniocentesis route, in total and late 2 days administration group of intravenous route, and in total and 1st day amniocentesis route group of two administration groups($P<0.05$). The apoptosis level of trophoblasts in administration groups was lower than in control groups($P<0.05$). The level was lower in IUA group than in IVA group on the 1st and 3rd after administration($P<0.05$). *Conclusion*: Ceftriaxone sodium administered with a single dose by amniocentesis compared with maternal intravenous injection is the more effective treatment for intrauterine infection with E coli in late pregnant SD rats, which releases chorioamnionitis more quickly,suppresses and postpones the inflammation induced apoptosis of trophoblasts,thus improves the pregnancy outcome.

【Key words】 Chorioamnionitis;*Escherichia coli*;Cell apoptosis;Pregnancy trimester;Administration by amniocentesis

作者介绍:程 浩(1981-),男,硕士,研究方向:围生医学(现工作于重庆市涪陵中心医院妇产科)。
通讯作者:刘 建,男,教授,E-mail:liu6898@sina.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2005BB5256)。

妊娠晚期由于各种原因使得病原微生物进入羊膜腔引起羊水、胎膜及胎盘的感染称为羊膜腔感染综合征（Infection syndrome of amniotic cavity，I-AIS），它是导致胎膜早破、早产等不良妊娠结局的重要原因。引起 IAIS 的病原微生物很复杂，大肠杆菌（Escherichia coli）是最常见的需氧菌之一。本实验建立了晚孕 SD 大鼠 E coli 宫内感染模型，通过母体静脉和羊膜腔内给予头孢曲松钠，比较两者绒毛膜羊膜炎病理分期分级及胎盘滋养细胞凋亡强度，观察羊膜腔内给药对 IAIS 的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

所有动物由本校实验动物中心提供。选择 SPF 级孕 15 d SD 雌鼠 36 只，质量（300 ± 10）g，清洁喂养。取 E coli 标准菌株（ATCC25922 菌株）接种于 LB 平板上，37℃培养 16 ~ 18h，挑取单个菌落接种于 LB 培养液中，37℃，60 r/min 细菌摇床过夜稀释至 10^{10} 个 /L 后使用。实验使用注射用头孢曲松钠（山东鲁抗医药股份有限公司，1.0 g/ 支）。 FITC 标记 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒于凯基生物公司购进。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 36 只孕鼠随机分为 4 组，分别为羊膜腔内给药（IUA）组、对照（IUC）组和母鼠静脉给药（IVA）组、对照（IVC）组，每组 9 只，根据国内外的报道[1,2]并结合实验需要，所有孕鼠于妊娠第 15 d 一侧宫角两胎囊间隙接种 10^{10} 个 /L 大肠埃希菌菌液 0.2 ml 建立接种后 1 d 的 SD 大鼠宫内感染模型，妊娠第 16 d 给药。IUA 组、IUC 组：开腹行接种侧胎囊穿刺，各胎囊注射 20 mg/ml 头孢曲松钠生理盐水溶液 2 mg/ 胎、生理盐水 0.1 ml 后关腹；IVA 组、IVC 组：各孕鼠尾静脉注射 100 mg/ml 头孢曲松钠生理盐水溶液（60 mg/ 只）、生理盐水 0.6 ml。所有孕鼠接种、穿刺、给药、采集标本均采用无菌术，术前术后清洁喂养，无饮食控制。分别于给药后 1、2、3 d，每天每组随机处死 3 只取材。

1.2.2 标本采集 拉断颈髓处死孕鼠，取接种侧宫角顶端三个胎囊的胎盘胎膜组织分别置于 4% 多聚甲醛液固定后，经脱水、透明、浸蜡、包埋后切片。

1.2.3 指标观察

1.2.3.1 绒毛膜羊膜炎分期分级 石蜡切片 HE 染色后光镜观察，参照 Naeye 标准[3]，按白细胞侵润的深度、数量对胎盘胎膜组织炎症程度进行分期、分级：Ⅰ期：中性粒细胞侵润较少、散在，几乎全部局限于绒毛膜板下纤维蛋白沉积物内，或胎膜的蜕膜层；Ⅱ期：中性粒细胞侵润增多，并延伸至绒毛膜组织内或绒毛膜板组织及其胎儿血管，但未进入羊膜；Ⅲ期：中性粒细胞已广泛侵润蜕膜、绒毛膜，并达羊膜。在十分严重的病例，中性粒细胞覆盖羊膜表面，提示羊膜腔已有脓毒症。Ⅰ级：中性白细胞 <10/HPF；Ⅱ级：中性白细胞数在 11 ~ 30/HPF；Ⅲ级：中性白细胞 >30/HPF。Naeye 分期和分级越低，绒毛膜羊膜炎的严重程度越轻，故本实验将Ⅰ期和（或）Ⅰ级视为轻度炎症。

1.2.3.2 胎盘滋养细胞凋亡强度 随机抽取各鼠 3 个胎囊之一的胎盘组织切片 TUNEL 法原位检测凋亡的滋养细胞，FITC 标记，荧光显微镜高倍镜（10 × 40）490 nm 波长下，随机选择 5 个染色适中的视野进行拍照，所有图片应用 Image-Pro Plus5.0 型病理影像多媒体图文操作系统测其阳性反应部位的平均荧光强度值，进行定量分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行 χ^2 检验、Fisher 确切概率法、方差分析和 q 检验。

2 结 果

2.1 给药途径对绒毛膜羊膜炎分期分级的影响

IUA 组和 IUC 组，IVA 组和 IVC 组相比，其轻度炎症率均为前者高于后者（$P<0.05$），羊膜腔内穿刺后各天的给药组轻度炎症率高于对照组，母鼠静脉途径给药后第 2、3 d，给药组轻度炎症率高于对照组（$P<0.05$）。轻度炎症率在两个给药组和其给药后 1 d 时，羊膜腔内组较母鼠静脉组为高（$P<0.05$）（表 1）。

2.2 给药途径对胎盘滋养细胞凋亡的影响

各组滋养细胞 TUNEL 法检测凋亡均呈阳性反应结果（如图 1、表 2 所示）。给药组凋亡强度明显低于其对照组（$P<0.05$）。IUA 组给药后第 1、3 d，凋亡水平较 IVA 组低（$P<0.05$），而两个给药组给药后第 2 d（$P>0.05$）以及两个对照组给药后第 2、3 d（$P>0.05$），凋亡强度无明显差异。各组给药后第 1、2、3 d，凋亡水平呈增高态势（图 2），但 IUA 组给药后第

表 2 各组胎盘凋亡细胞平均荧光强度值（$\bar{x}\pm s$）

组别	平均荧光强度值		
	1 d	2 d	3 d
IUA 组	0.079 2 ± 0.028 6	0.127 9 ± 0.032 4[b]	0.133 1 ± 0.032 6[a]
IUC 组	0.258 0 ± 0.027 5[b]	0.281 2 ± 0.029 2	0.339 7 ± 0.033 8
IVA 组	0.125 8 ± 0.031 7	0.131 8 ± 0.026 3[c]	0.207 1 ± 0.017 4[d]
IVC 组	0.215 2 ± 0.038 1	0.265 2 ± 0.026 4	0.323 2 ± 0.045 0

注 a. 与 IUA 组 2 d 比较，$P>0.05$；b. 与 IVA 组 2 d 比较，$P>0.05$；
c. 与 IVC 组 2 d 比较，$P>0.05$；d. 与 IVC 组 3 d 比较，$P>0.05$



图 1 荧光显微镜观察胎盘凋亡细胞阳性表达
（FITC-TUNEL×400）

表 1 各组接种侧宫角顶端 3 个胎囊绒毛膜羊膜炎轻度炎症分布情况

组别	轻度炎症数 / 非轻度炎症数(胎)				轻度炎症率(%)			
	1 d	2 d	3 d	总体	1d	2 d	3 d	总体
IUA 组	6/3	7/2	8/1	21/6	66.67[ab]	77.78[a]	88.89[a]	77.78[ab]
IUC 组	1/8	1/8	0/9	2/25	11.11	11.11	0.00	7.41
IVA 组	1/8	4/5	8/1	13/14	11.11	44.44a	88.89[a]	48.15[a]
IVC 组	1/8	0/9	2/7	3/24	11.11	0.00	22.22	11.11

[a]：与相同给药途径对照组比较 $P<0.05$；[b]：不同给药途径给药组比较 $P<0.05$

3 d 较第 2 d（$P>0.05$）、IVA 组给药后第 2 d 较第 1 d 增幅不明显（$P>0.05$）。

3 讨 论

长期以来，临床上采用母体口服、肌肉和静脉途径使用抗生素对细菌性绒毛膜羊膜炎进行治疗[4]，以期预防早产和改善妊娠结局。我们的实验采用单次头孢曲松钠羊膜腔内与母鼠静脉给药进行比较，发现上述两种途径均能有效的抑制细菌生长和减轻胎盘炎症反应。不同的是，羊膜腔内途径抑制细菌生长和减轻胎盘炎症反应的速度较母体静脉途径要快，在给药后 1 d，其作用明显强于后者。我们推测，这与两种途径羊水中药物即时和峰值浓度有关。羊膜腔内给药可以避开胎盘屏障，羊水中的药物浓度瞬时增高至峰值，并可通过扩散、转运以及羊膜的析出等方式达胎盘，抑制宫内大肠埃希菌的生长和繁殖，从而减轻感染带来的炎症反应。母鼠静脉给药后，药物须通过胎盘屏障才能进入羊水，加之头孢曲松钠与母鼠血浆蛋白结合和肾脏、胆道的排泄，使其进入胎囊相对缓慢，羊水药物浓度即时值和峰值均低于羊膜腔内给药，对细菌生长的抑制和炎症的控制能力也有所减弱。

已有大量研究表明，细菌性绒毛膜羊膜炎可影响滋养细胞一氧化氮[5]代谢，刺激 TNF-α、IL-6、8 等细胞因子合成分泌[6]、基质金属蛋白酶表达增加[7]，并可诱导细胞膜 Fas 表达[8]，同时羊水中的核小体[9]和 Fas 等[10]水平也有所增高，因此可诱导和促进滋养细胞的凋亡的发生。头孢曲松钠的抗菌作用使得给药组滋养细胞凋亡较对照组呈抑制状态，而局部药物浓度的差异是导致两给药组凋亡差异的根本原因，较高的瞬时药物浓度为导致给药后第 1 d，IUA 组较 IVA 组滋养细胞凋亡强度低的原因。由于羊膜腔穿刺的操作，IUC 组较 IVC 组给药后 1 d 凋亡水平高，但第 2、3 d 无明显差异，提示羊膜腔内穿刺对胎盘滋养细胞凋亡无明显影响。此外，滋养细胞的成熟和老化还随着妊娠进展，故抗菌治疗不能完全逆转其凋亡，而是延缓和抑制细菌性感染诱导的炎性凋亡，整个凋亡水平呈现逐步升高的态势。

羊膜腔途径给药作为侵入性操作尚未被临床常规采用，近年来仅用于胎儿宫内换血治疗和引产，宫内操作的风险使其研究和应用滞后，但羊膜腔内给药有绕过胎盘屏障直接进入羊水之优势，国内也已有羊膜腔内注射氨基酸治疗胎儿宫内生长受限的报道[11]。本研究提示，单次头孢曲松钠给药治疗晚孕 SD 大鼠大肠埃希菌宫内感染，羊膜腔内较母鼠静脉途径更为有效，其能更迅速地减轻胎盘的炎症反应且抑制和延缓炎症诱导的胎盘滋养细胞凋亡，以改善妊娠结局。同时，与母体给药比较，羊膜腔内给药剂量更小，用药更为经济。我们相信，随着研究的不断深入和穿刺操作的规范熟练，羊膜腔途径不仅可以作为宫内感染的给药方式，也将为胎儿其他疾病的药物治疗提供新的路径。

参 考 文 献

[1] Brown M B, Peltier M, Hillier M, et al. Genital mycoplasmosis in rats: a model for intrauterine infection[J]. Am J Reprod Immunol, 2001, 46(3): 232-241.

[2] 袁天明，俞惠民，李建平. 细菌性宫内感染致早产大鼠模型的建立[J]. 浙江医学，2004，26(4)：275-276.

[3] 陈忠年，杜心谷，刘伯宁. 妇产科病理学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1996，343-344.

[4] ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician gynecologists[J]. Obstet Gynecol, 2007, 109(4): 1007-1019.

[5] Kazuo A, Mikiya N, Hideki K, et al. Involve ment of peroxynitrite in LPS-induced apoptosis of trophoblast[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2003, 29(1): 49-55.

[6] Menon R, Fortunato S J. Fetal membrane inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of the membranes and preterm labor pathways[J]. J perinatal Med, 2004, 32(5): 391-399.

[7] Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183(4): 887-894.

[8] Balkundi D R, Ziegler J A, Watchko J F, et al. Regulation of FasL/Fas in human trophoblasts: possible implications for chorioamnionitis[J]. Biol Reprod, 2003, 69(2): 718-724.

[9] Lu L C, Hsu C D. Elevated amniotic fluid nucleosome levels in women with intra-amniotic infection[J]. Obstet Gynecol, 1999, 94(1): 7-10.

[10] Hsu C D, Hong S F, Harirah H, et al. Amniotic fluid soluble fas levels in intra-amniotic infection[J]. Obstet Gynecol, 2000, 95(5): 667-670.

[11] 卢海英，郭晓玲. 羊膜腔内注射氨基酸治疗胎儿生长受限的研究[J]. 中国优生与遗传杂志，2005，13(4)：62-63.

（责任编辑：冉明会）