维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0236-04

孕鼠肝内胆汁淤积症致胎鼠心律失常的实验研究

邵 勇[1],姚珍薇[1],陆 杰[2],罗红霞[1],吴味辛[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;2. 重庆医科大学生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨孕鼠肝内胆汁淤积症致胎鼠心电图的异常。方法:应用雌、孕激素建立妊娠肝内胆汁淤积症大鼠模型,通过 Powerlab 生物信号处理系统 Chart 5 软件引导妊娠第 20 天和第 21 天胎鼠宫内心电图。结果:(1)妊娠第 20 天,胆淤模型组 1 孕鼠血清总胆汁酸(TBA)水平为(64.3 ± 5.2)μmol/L;妊娠第 21 天,胆淤模型组 2 孕鼠血清总胆汁酸(TBA)水平为(78.5 ± 4.5)μmol/L。两组比较差异有极显著性,$P < 0.01$。(2)妊娠第 20 天,胆淤模型组 1 持续观察 90min,胎鼠心电图均显示正常;妊娠第 21 天,胆淤模型组 2 实验开始时胎鼠心电图正常,持续观察 29.3 ± 6.4min 后出现胎鼠心律不齐,继续观察 23.5 ± 4.6min 后胎鼠死亡,而正常对照组 2 持续观察 90min,胎鼠心电图均正常。结论:孕鼠肝内胆汁淤积症时胎鼠死亡前出现短暂的心律失常阶段。

【关键词】肝内胆汁淤积症,妊娠;心律失常;猝死

【中国图书分类法分类号】R714 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-05-30

Fetal rats arrhythmias in intrahepatic cholestasis of pregnancy

SHAO Yong, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate fetal rats abnormal electrocardiograms in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). *Methods*: The animal model of intrahepatic cholestasis of pregnancy was induced by 17-α-Ethinylestradiol and Progesterone. The electrocardiograms of fetal rats by conceptual day 20th (Group1), day 21st (Group2) were evaluated with Powerlab biologic signal extracting and analyzing system Chart 5 Software. *Results*: ①The serum total bile acids (TBA) levels of pregnant rats of ICP were 64.3 ± 5.2(μmol/L) in group 1, 78.5 ± 4.5(μmol/L) in group 2, respectively, which showed significant differences ($P<0.01$). ②It showed all normal electrocardiograms of fetal rats in Group1 over 90 minutes continuous observation. In Group2, fetal rats arrhythmias appeared after 29.3 ± 6.4 minutes normal electrocardiograms observed initially; About 23.5 ± 4.6 (range 15-30) minutes fetal rats arrhythmias later, fatal ventricular arrhythmias came out and the fetal rats died suddenly. *Conclusion*: It demonstrated that fetal arrhythmias contribute to fetal sudden death in ICP.

【Key words】Intrabepatic cholestasis of pregnancy; Arrhythmias; Sudden death

妊娠肝内胆汁淤积症(Intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠期特有的并发症,迄今仍然是一种谜一般的疾病。ICP 时往往容易发生胎儿窘迫,甚至死胎、死产等。ICP 时胎儿窘迫的发生非常突然,尤其在妊娠晚期可能突然发生“难以预料的胎死宫内”或称“猝死”,即使在密切的胎儿监护之下也难以避免突然发生的胎儿窘迫和宫内死亡[1],其发生机制至今仍然不清楚,常规的电子胎心监护技术似乎难以预测胎儿预后。本研究拟进一步从动物实验水平探讨妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)胎儿死亡前心律失常及其意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选择清洁级 SD 雌性大鼠 40 只(第三军医大学大坪医院实验动物中心提供),体重 200~250g,鼠龄 150~180 天,在室温 18℃~25℃、相对湿度 60%~70%的屏障系统内饲养,不控制饲料和饮水。在发情期与雄性大鼠按 4∶1 同笼饲养,每天观察阴栓脱落情况,阴栓脱落日定为妊娠第 1 天,一直饲养到妊娠第 15 天待用。

1.2 实验方法

作者介绍:邵 勇(1970-),男,副教授,博士,主要研究方向:围生医学。

基金项目:重庆医科大学优秀博士论文基金资助(重医大研 2004-17)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 建立妊娠肝内胆汁淤积症（ICP）动物模型 正常对照组（20 只）；随机分为正常对照组 1（10 只）和正常对照组 2（10 只），分别于妊娠第 20 天和第 21 天采集胎鼠心电信号。自孕 15 天起至孕 19 天，每天后肢内侧皮下注射精制植物油 2.5ml/（kg·d）。

胆淤模型组（20 只）：随机分为胆淤模型组 1（10 只）和胆淤模型组 2（10 只），分别于妊娠第 20 天和第 21 天采集胎鼠心电信号。均自妊娠第 15 天起至妊娠第 19 天，每天后肢内侧皮下注射孕酮（Sigma 公司，溶解于精制植物油）75mg/（kg·d）和 17-α-乙炔雌二醇（Sigma 公司，溶解于精制植物油）1.25mg/（kg·d）。

实验结束时眶静脉采血 1ml，采用日本 Olympus Au400 全自动生化分析仪测定孕鼠血清总胆汁酸，同时取孕鼠肝脏和胎盘进行 HE 染色组织学检查，Olympus 光学显微镜观察。

1.2.2 孕鼠和胎鼠心电信号采集与处理

1.2.2.1 实验均安排在上午进行 20%乌拉坦钠（0.6ml/kg）腹腔注射麻醉。实验中用酒精温度计监测大鼠肛温，保持大鼠正常体温 37℃~38℃。在记录心电时尽量保持孕鼠及实验室安静，避免噪音干扰。本实验在重庆医科大学生理教研室专用恒温屏蔽实验室内进行。

1.2.2.2 孕鼠心电信号采集 将不锈钢注射针作为电极分别刺入孕鼠右前肢及左、右后肢肌肉作为引导心电信号的电极。右后肢作为参考电极。记录类似人的Ⅱ导联心电图。实验过程中孕鼠心电图始终保持正常。

1.2.2.3 胎鼠心电信号采集 按照王智彪等[9]的方法采集胎鼠心电信号。8%硫化钠液涂于孕鼠下腹部正中脱毛后，1%碘伏消毒局部皮肤，以下腹正中纵切口长约 2~2.5cm 进腹腔，暴露妊娠子宫，外置子宫于消毒的母鼠腹壁上，取左子宫角上近输卵管端第 1 个胚胎记录心电图并实时显示在计算机屏幕上。将制备好的两根直径约 100μm 仅裸露尖端的的不锈钢丝细电极平行地插入，一根从子宫妊娠部位的对系膜侧中点进针，入羊膜囊内，为正极；另一根在该部位的边缘进针，插入子宫肌层中或入羊膜囊均可，为负极。

1.3 统计学处理

所得数据输入 SPSS for Windows 10.0 统计软件包进行统计。

2 结 果

2.1 孕鼠血清总胆汁酸水平比较

妊娠第 20 天，胆淤模型组 1 孕鼠血清总胆汁酸（TBA）水平为 64.3±5.2（μmol/L），妊娠第 21 天，胆淤模型组 2 孕鼠血清总胆汁酸（TBA）水平为 78.5±4.5（μmol/L），两组比较差异有极显著性，$P<0.01$。两组孕鼠血清总胆汁酸（TBA）水平均高于正常对照组，差异均有极显著性，$P<0.01$。

2.2 孕鼠肝脏的组织学检查

表 1 孕鼠血清总胆汁酸水平比较（μmol/L）

分组	例	妊娠第 20 天	妊娠第 21 天
胆淤模型组 1	10	64.3±5.2*△	
正常对照组 1	10	25.3±3.4	
胆淤模型组 2	10		78.5±4.5*
正常对照组 2	10		24.6±3.6

* 胆淤模型组 vs 正常对照组，$P<0.01$。

△ 胆淤模型组 1 vs 胆淤模型组 2，$P<0.01$。

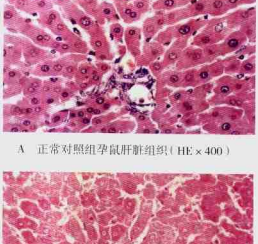
光镜下胆淤模型组部分肝细胞有颗粒变性和空泡变性，肝小叶结构正常；正常对照组孕鼠肝细胞形态正常，肝小叶结构正常（图 1）。

2.3 孕鼠胎盘的组织学检查

光镜下胆淤模型组部分滋养细胞颗粒变性和空泡变性，合体滋养细胞变性更为明显，绒毛间隙内胆汁淤积；正常对照组滋养细胞形态正常，胎盘结构正常（图 2）。

2.4 胎鼠心电图分析

妊娠第 20 天，胆淤模型组 1 持续观察 90min，胎鼠心电图均显示正常，与正常对照组 1 比较，频率和电压分别为 203.50±18.6312（次/min）vs



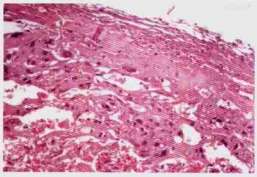
A 正常对照组孕鼠肝脏组织（HE×400）



B 胆淤模型组孕鼠肝细胞颗粒变性和空泡变性(HE×400)

图 1 正常对照组和胆淤模型组孕鼠肝组织光镜下改变

维普资讯 http://www.cqvip.com

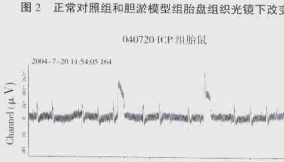


A 正常对照组孕鼠胎盘组织(HE×400)



B 胆淤模型组孕鼠胎盘滋养细胞颗粒变性和空泡变性(HE×400)

图 2 正常对照组和胆淤模型组胎盘组织光镜下改变



A 胆淤模型组 2 于妊娠第 21 天引导胎鼠心电图出现明显心律失常



B 正常对照组妊娠第 21 天胎鼠心电图

图 3 胎鼠心电图分析

205.16 ± 16.3281 (次 /min),0.29 ± 0.0851(mv)vs 0.28 ± 0.0912(mv),差异均无显著性,$P > 0.05$。

妊娠第 21 天,胆淤模型组 2 实验开始时胎鼠心电图显示正常,持续观察 29.3 ± 6.4min 后出现胎鼠心律不齐、心率增快,随后减慢。继续观察 23.5 ± 4.6min 后出现心室颤动,胎鼠死亡;正常对照组 2 持续观察 90min,胎鼠心电图均显示正常(图 3)。

3 讨 论

妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)是特发于妊娠的疾病,我国长江流域的重庆、四川和长江三角洲是发病率(4% ~ 10%)较高的地区。特别令人忧虑和困惑的问题是,虽然 ICP 对孕妇的影响甚微,但却往往引起围生儿不良结局,早产(60%)、胎儿窘迫(33%)发生率及胎儿宫内死亡率(20%)高。Alonso 等[1]报道 4 例死产中有 3 例分别于胎儿死亡前 2.5、6 天行无应激试验(NST)均为有反应,而且在入院前的几小时内母体感觉胎动仍正常;Londero 等[2]报道胎儿死亡前 7h NST 正常。ICP 胎儿突然死亡的具体机制至今仍然不清楚,仍然是全世界产科医生和孕产妇所面临的共同难题。

大量临床研究发现,在所有引起猝死的事件中,心脏性猝死占首位。心脏性猝死是世界范围内的研究热点,美国每年有 35 万人发生心脏性猝死,最常见的原因为不稳定性心律失常,其中 90%以上猝死病例为多形性室性心动过速或心室颤动,少数为缓慢心律失常所致。ICP 时胎儿猝死是否与心脏事件有关,这是值得探讨的问题。

本研究联合应用雌、孕激素成功建立 ICP 大鼠模型。本研究结果发现,妊娠第 21 天胆淤模型组孕鼠血清胆汁酸水平显著高于妊娠第 20 天胆淤模型组;妊娠第 21 天,胆淤模型组 2 实验开始时胎鼠心电图显示正常,持续观察 29.3 ± 6.4min 后出现胎鼠心律不齐、继续观察 23.5 ± 4.6min 后出现心室颤动,胎鼠死亡。本研究结果表明,ICP 孕鼠病程愈长、孕鼠血清胆汁酸水平愈高,愈容易发生胎鼠预后不良;胎鼠死亡前出现短暂的心律失常阶段。

Williamson 和 Gorelik 等[3-5]细胞水平的实验表明,牛磺胆酸对体外培养的新生鼠心肌细胞收缩能力有一定抑制作用、细胞网络的完整性受到破坏,细胞停止同步跳动,诱导心肌细胞心律失常。本研究进一步从动物实验水平证实妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)胎儿死亡前表现心律失常。这可能与母体和胎儿体内高水平胆汁酸有关。体外实验发现,胆汁酸对自主神经系统传导功能有抑制或刺激作用,

维普资讯 http://www.cqvip.com

低浓度胆汁酸刺激交感和副交感神经的传导性，高浓度胆汁酸则抑制自主神经的传导性，其中石胆酸抑制作用最强，胆酸和脱氧胆酸抑制作用较弱[9]。Yun 等[10]的研究发现，慢性交感神经活动异常可能增加突发性的致死性心律失常的危险性。许多研究发现，心脏自主神经系统功能失衡，尤其交感神经活动增加和迷走神经活动减弱，与心律失常和猝死的发生有着密切关系[11,12]。

妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)胎儿突然死亡的原因至今仍然是一个谜。我们的研究结果目前国内外文献上还未见报道。根据本项研究结果，作者推测，ICP 时胎儿猝死可能与高水平胆汁酸诱导胎儿心律失常有关。这一假说尚需要更多的研究尤其临床研究工作证实。我们的后续研究将对胎儿心律失常的发生机制进行更深入的探讨。

参 考 文 献

[1] Fagan EA.Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J].Clin Liver Dis, 1999;3(3): 603–632.

[2] Brites D, Rodrigues CMP, Oliveira N, et al. Correction of maternal serum bile acid profile during ursodeoxycholic acid therapy in cholestasis of pregnancy[J]. J Hepatology, 1998;28: 91–98.

[3] Williamson C, Gorelik J, Eaton BM, et al. The bile acid taurochlate impairs rat cardiomyocyte function: a proposed mechanism for intra–uterine fetal death in obstetric cholestasis [J]. Clin Sci, 2001;100(4): 363–369.

[4] Gorelik J,Harding SE, Shevchuk AI, et al. Taurocholate induces changes in rat cardiomyocyte contraction and calcium dynamics[J]. Clin Sci, 2002;103(2): 191–200.

[5] Gorelik J, Shevchuk AI, Diakonov I, et al. Dexamethasone and ursodeoxycholic acid protect against the arrhythmogenic effect of taurocholate in an in vitro study of rat cardiomyocytes[J]. Br J Obs Gyn, 2003;110 (5): 467–474.

[6] 王智彪，陆 杰，顾美礼，等. 超声波抗早孕的动物实验研究Ⅰ.宫内胚胎心电图：一种能反映胚胎急性损伤效应的动物模型[J]. 中国超声医学杂志，1995;11(2):107–110.

[7] Alonso J, Rioseco, Milenko B, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: A retrospective case–control study of perinatal outcome[J]. Am J Obstet Gynecol, 1994;170:890–895.

[8] Londero F, San Marco L. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Are we really able to predict fetal outcome [J]? Am J Obstet Gynecol, 1997;1274.

[9] Radymska–Wawrzyniak K, Szember–Nyrka B, Rybka A. Effect of the bile and bile acids on the motility of the innervated rabbit colon [J]. Pol Arch Weter, 1987;27(4):85–98.

[10] Yun AJ, Lee PY. Sudden death among infants and adults: companion disorders of maladaptive sympathetic bias [J]. Med Hypotheses,2004;62(6):857–860.

[11] Sztajzel J. Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system [J].Swiss Med Wkly, 2004;134(35–36): 514–522.

[12] Lehnart SE, Wehrens XH, Laitinen PJ, et al. Sud– den death in familial polymorphic ventricular tachycardia associated with calcium release channel (ryanodine receptor) leak[J]. Circulation, 2004;109(25):3208–3214.

（上接第 182 页）

hibitory signal produced by unattached kinetochores [J]. J. Cell Biol, 1995;130: 941–948.

[2] Deantoni A, Sala V, Musacchio A, et al. Explaining the oligomerization properties of the spindle assembly checkpoint protein Mad2 [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005; 360 (1455):637–648.

[3] Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, et al . Differential expression of the MAD2, BUB1 and HSP27 genes in Barrett′ s oesophagus–their association with aneuploidy and neoplastic progression [J]. Mutat Res, 2004;547(1–2):133–144.

[4] Vigneron S, Prieto S, Bernis C, et al. (2004) Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom [J] ? Mol Biol Cell, 2004;15(10):4584–4596.

[5] Johnson VL, Scott MI, Holt SV, et al. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp–E, Cenp–F and Mad2, and chromosome congression [J]. J Cell Sci, 2004;117(8):1577–1589.

[6] Takanori Y, Naoya S, Nobuyuki E, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector–derived small interfering RNAs [J]. EMBO J, 2003;4(6): 602–608.

[7] Sharookh BK, Amy BA, Francis VC. Interference of hepatitis C virus replication by short interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 18(4): 2014–2018.

[8] Seo MY, Abrignani S, Houghton M, et al. Small interfering RNA–mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell [J]. J Virol, 2003; 77: 810–812.

[9] Clearance of replicating hepatitis C virus replicon *RNAs in* cell culture by small interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 100:235–240.