维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0831-05

神经肽 Y 在孕鼠肝内胆汁淤积症胎盘中的表达及意义

李红霞[1],刘伯锋[2],姚珍薇[1],邵 勇[1]

(1 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;2 延安大学医学院解剖教研室,延安 716000)

【摘 要】目的:观察妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)孕鼠肝脏、胎盘结构变化;分析神经肽 Y(NPY)在妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)孕鼠胎盘中的表达,探讨 ICP 的发病机制。方法:选择孕 15 天 SD 大鼠,用孕酮及乙炔雌二醇建立孕鼠 ICP 模型,观察孕鼠肝脏和胎盘的病理变化;应用免疫组织化学染色方法及图像分析检测 ICP 孕鼠(15 例,实验组)及正常孕鼠(15 例,对照组)胎盘中 NPY 的表达及定量。结果:①孕鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆酸(TBA)明显升高;肝细胞水肿,胞质内出现空泡,毛细胆管扩张、胆汁淤积;胎盘绒毛肿胀、增粗,绒毛间隙变窄,滋养细胞增生②ICP 孕鼠组绒毛的 NPY 免疫反应呈强阳性,对照组部分滋养细胞的 NPY 免疫反应阳性绒毛的毛细血管内皮细胞呈弱阳性或阴性。对两组胎盘免疫组化染色进行定量分析结果显示,ICP 组 NPY 的染色强度高于对照组,两组比较有统计学意义($P<0.05$)。结论:NPY 在 ICP 胎盘中的表达升高,提示胎盘合成和分泌血管活性物质的功能失调可能参与了 ICP 的发生与发展,并与 ICP 围生儿等不良预后有密切的关系。

【关键词】肝内胆汁淤积;神经肽 Y;雌孕激素;胎盘;大鼠
【中国图书分类法分类号】R714.24 【文献标示码】A 【收稿日期】2006-03-22

The expressinon and significance of neuropeptideY(NPY) in placenta of pregnant rats with intrahepatic cholestasis

LI Hongxia, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the structure change of liver and placenta and expression of NPY in the pregnant rats with intrahepatic cholestasis, and explore the reasons for intrauterine growth retardation and intrauterine fetal death in ICP. *Methods*: Rats pregnant for fifteen days were administered Estrogen and Progestrone to induce ICP. The structural changes of liver and placenta of the delivered rats were observed. And blood tests for biochemical criterion were conducted. The placentas of normal pregnancy (n=15) and ICP(n=15) were used for studying expression and quantification of NPY by immunohistochemistry staining and image analysis. *Results*: ①in the experimental group, the levels of serum total bile salt (TBA), serum aminotransferases (ALT), aspartate transaminase(AST) significantly increased, ($P<0.05$) and structural changes of hepatocytes of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) in rats included swelling, finding bubble, capillary expanding, and dilation of the bile canaliculi. The placentas of ICP showed that the villi were swelling, the size of intervilli space was smaller, and the trophocytes were hyperplastic. ②Almost all placenta villis in vivo of ICP group showed NPY strong positive immunoreaction, but in control group, some trophocytes appeared NPY positive immunoreaction, and capillary endothelium in placental villi showed NPY weak positive or negative immunoreaction, The results of image analysis showed that the staining intensity of NPYin ICP group was significantly higher than that in the control group($P<0.05$). *Conclusion*: the placenta with ICP expressed more NPY than those of normal, which suggests that constructive vasoactive substance (NPY) might be important to cause fetal anoxia and death.

【Key words】Intrahepatic Cholestasis; HeuropeptideY; Estrogen, Progesterone; Placenta; Rats

妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)是妊娠期特有的疾病,可导致早产,胎儿窘迫及突然胎死宫内,使围生儿病死率及围产儿死亡率增高。但 ICP 发病机制至今仍未完全明了。神经肽(NPY)是含 36 个氨基酸残基的神经活性肽,起着神经递质、神经调节及神经内分泌的作用。研究发现 NPY 与妊娠高血压疾病及胎儿宫内生长受限有关[1,2]。妊娠高血压疾病与 ICP 在遗传、免疫、血流动力学、血管内皮受损等方面有许多相似之处[3]。因此推测 NPY 可能是 ICP 的发病之一。本研究建立 ICP 动物模型,检测孕鼠胎盘中 NPY 的表达,分析 NPY 与 ICP 的关系,进一步探索 ICP 的发病机制。

作者介绍:李红霞(1973-),女,硕士研究生,
主要研究方向:妇产科内分泌。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 所有动物由第一军医大学实验动物中心提供。选择洁洁级 SD 雌性大鼠 30 只，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。

1.1.2 药物 植物油购于重庆市化学试剂公司，孕酮及 17-α-乙炔雌二醇(ethinyl estradiol ,EE)均购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 主要试剂和仪器 全自动生化分析仪(日本产)、兔抗人神经肽 Y 多克隆抗体、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自(武汉博士德生物工程有限公司)、捷达 801 形态图像分析系统(南京大学捷达公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 ICP 动物模型的建立 按照参考文献[4-5]建立动物模型 30 只 SD 孕鼠随机分为 2 组(实验组和对照组)，每组 15 只。实验组：自孕 15 天起，每天后肢内侧皮下注射孕酮 75mg/kg 和 17-α-乙炔雌二醇 1.25mg/kg。对照组：自孕 15 天起，每天后肢内侧皮下注射植物油 2.5ml/kg。孕鼠均于妊娠第 21 天眶静脉采血 1ml，测定血生化指标。孕鼠均于妊娠第 21 天，采血后断头处死母鼠，查血生化，并取母鼠肝脏及胎盘进行病理组织学检查，HE 染色。肝脏组织学检查见小叶间胆管内有胆汁淤积，部分肝细胞有空泡样变性，但无肝细胞坏死；血清总胆酸、转氨酶升高为模型成功。

1.2.2 检测指标 常规生化方法检测丙氨酸转氨酶(ALT)天冬氨酸转氨酶(AST)总胆酸(TBA)

1.2.3 病理组织学观察 处死大鼠后，取出肝脏，胎盘组织，立即用 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，HE 染色，光镜下观察。

1.2.4 免疫组织化学染色 石蜡切片常规脱水、脱蜡，H_2O_2 氧化，正常羊血清中室温孵育 30min(1∶50)，在兔抗神经肽 Y 血清(1∶100)中孵育 60 min，生物素化的羊抗兔血清(1∶100)60 min，SABC (1∶50 Vector)90 min，每次孵育后均用 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min，最后 DAB 显色 3~15 min。常规脱水、透明、封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.5 图像分析 用图像分析仪对免疫组化染色进行半定量分析，随机抽取染色切片每组各 2 张，每个部位每张切片各测 5 个相同单位面积，以平均光密度(AOD)表示着色强度，结果以($\bar{x}\pm s$)表示。

1.2.6 统计学处理 计量资料用 t 检验做统计分析。

2 结 果

2.1 孕鼠肝内胆汁淤积模型的建立

2.1.1 两组孕鼠生化改变 胆淤组 ALT、AST、TBA 均较对照组明显升高 $P<0.01$ 见表 1。

表 1 建立胆淤模型后各组间孕鼠血清血生化的比较($\bar{x}\pm s$)

分组	例	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBA[IU/(umol.L)]
对照组	15	44.2±9.8	51.1±12.5	25.3±3.4
实验组	15	227.0±9.3*	424.5±21.2*	78.5±6.5*

注：* 实验组与对照组比较，均 $P<0.01$

2.1.2 病理组织学的观察结果

肝脏 大体观：对照组孕鼠肝脏外观表现为边缘锐利，色泽红润；实验组肝脏边缘钝厚，光泽暗，呈棕红色。光镜：对照组肝脏组无明显形态改变，肝细胞结构清晰(见图 1)，实验组肝细胞内有空泡样变性，部分毛细胆管内有胆栓形成(见图 2)。

胎盘 大体观：对照组胎盘中央厚，边缘薄，母面呈暗红色，胎盘小叶排列紧凑，接近胎盘边缘偶有少数散在白色的钙化点。胎儿面被半透明的羊膜所

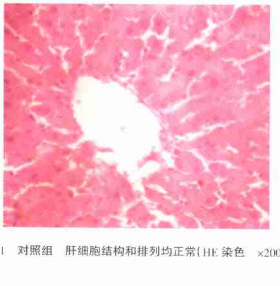


图 1 对照组 肝细胞结构和排列均正常(HE 染色 ×200)

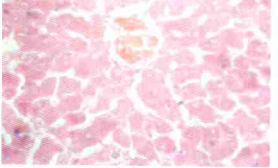


图 2 实验组 肝细胞空泡变性，胆汁酸沉积，小叶结构正常(HE 染色 ×200)

维普资讯 http://www.cqvip.com

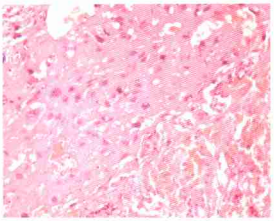


图 3 对照组 正常孕鼠胎盘(HE 染色 ×400)

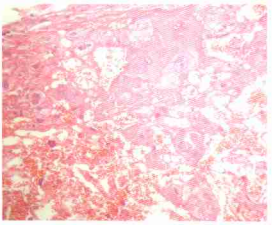


图 4 实验组孕鼠胎盘,滋养细胞变性、水肿(HE 染色 ×400)



图 5 对照组 NPY 在胎盘中的免疫组化,仅部分滋养细胞着色,着色明显减弱(SABC 法 ×400)



图 6 实验组 NPY 在胎盘的免疫组化,整个绒毛实质几乎都有阳性(SABC 法 ×400)

覆盖、表面光滑;实验组胎盘中央部分较对照组薄,胎盘小叶排列较松散,接近胎盘边缘白色钙化点呈灶性分布,胎儿面羊膜混浊,光泽较暗。光镜:对照组胎盘绒毛无肿胀、滋养层细胞无明显增生(见图 3);实验组胎盘绒毛肿胀、增粗,绒毛间隙变窄、滋养层细胞增生,以合体滋养层细胞增生较为显著,近胎盘母体面绒毛缺血性坏死增多,合体滋养细胞表面绒毛短少、空泡状结构增多(见图 4)。

2.2 免疫组化染色结果

胎盘组织内 NPY 免疫组化染色显示,实验组整个绒毛实质几乎都有着色,且为明显有棕黄色(见图 5),而正常组仅部分滋养细胞着色,绒毛基质内的毛细血管内皮细胞着色明显减少或无(见图 6)。

2.3 图像分析

对胎盘 NPY 的免疫组化结果用图像分析仪测定,结果显示:实验组 NPY 平均光密度值(1.6407 ± 0.0865)明显高于对照组的(0.7892 ± 0.04642),两者比较统计学有显著性差异($P < 0.01$, $t = 12.8$)。

3 讨 论

3.1 动物模型建立成功

妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)是妊娠期特异性并发症。ICP 患者孕中、晚期 ALT、AST 升高,胆汁酸水平较正常孕妇升高达 5~10 倍,肝细胞内有空泡样变性,肝内毛细胆管内有胆栓形成。Lesle 等[5]报道用雌激素处理孕鼠后肝脏生化指标及病理学改变与人 ICP 相似,可作为研究人类 ICP 的动物模型。但有人发现用此法建立的 ICP 模型,光镜下见肝脏有少量坏死,与人类 ICP 肝脏无点状坏死改变不相

维普资讯 http://www.cqvip.com

符[6]。提示单用雌激素来建立模型不很完善。Bacq 等[7]发现预防早产的孕妇口服孕酮,可出现 ICP 皮肤瘙痒症状。因此有学者[8]联合应用雌、孕激素建立 ICP 动物模型,结果肝脏生化特征和病理改变与人 ICP 非常相似。本实验以雌孕激素联合方法建立模型,实验组肝脏生化指标(ALT、AST、TBA)显著升高;光镜下肝细胞内有空泡样变性,毛细胆管内有胆栓形成,未见肝细胞坏死。这一结果非常类似人 ICP,也与文献报道[7,8]一致。

3.2 NPY 结构与功能

NPY 是一种广泛分布于神经系统及其它组织器官的富含 36 个氨基酸残基的神经多肽。由 Tatemoto 1982 年自猪脑中发现,在交感神经支配丰富的组织内含量高。在人体内 NPY 的主要来源有二:1. 交感神经释放。NPY 主要在交感神经纤维末梢中,以囊泡的形式储存。在交感神经兴奋时其末梢同时释放 NPY 及 NE。2.储存于血小板中的 NPY 释放。有实验证明:血小板中存在与 NPY 合成有关的 mRNA,表明血小板是合成 NPY 的主要细胞,当血小板激活后,其释放的 NPY 可引起持久的血管平滑肌收缩,导致组织缺血,血栓形成,进一步改变血流动力学;血管痉挛;还可以明显加强 NE 和 5- 羟色胺的缩血管效应。NPY 有六种受体,分别为 Y_1、Y_2、Y_3、Y_4、Y_5、Y_6。研究表明外源性 NPY 可通过兴奋 Y_1- 受体,直接升高血压;加强血管对缩血管物质如 NE,酪胺,血管紧张素Ⅱ的收缩效应,抑制血管对舒血管物质如腺苷、乙酰胆碱、PGI_2、NO、激肽的舒张反应;刺激血管平滑肌细胞增生,使血管壁变厚,管径变小,外周阻力升高;促神经生长因子分泌,使交感神经的支配增强;促使 Ca^{2+} 内流及细胞内 Ca^{2+} 释放增加从而起到缩血管的作用。在中枢神经系统 NPY 可通过兴奋 Y_2- 受体,降低孤束核中 α 受体与其激动剂(NE)的亲合力,使其反馈性抑制外周 NE 释放的能力减弱,从而提高外周血管张力。在缺氧、缺血、炎症宫缩等应激状态,反射性兴奋交感儿茶酚胺系统及激发下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴系统,释放 NPY 增加。

3.3 NPY 在正常妊娠中表达及意义

妊娠时胎盘作为内分泌器官产生大量重要多肽类物质,这些多肽进入母体及胎儿血循环对代谢、免疫、血管等系统发挥多种作用。在整个妊娠期,这些肽类物质进行着复杂的平衡调节,维持了正常妊娠的过程。有人研究发现人脐血管内皮细胞在胚胎发育过程中就可能合成和分泌多种血管活性物质,NPY 出现于胚胎第 16 周[9],随着孕龄增长,孕妇血及羊水中 NPY 浓度逐渐升高,但在分娩前与正常未孕时相比虽然有上升,但没有显著性差异[1,9]。但在妊娠疾病时,这种平衡往往被破坏。

3.4 NPY 在 ICP 的中表达及意义

本实验结果发现 NPY 在 ICP 孕鼠胎盘中的表达较正常组明显增强,经图像分析平均光密度值统计学分析有显著性差异。NPY 在 ICP 胎盘中表达上调,说明 ICP 胎盘合成和分泌功能失调,平衡调节功能被破坏,可能是 ICP 的发病原因之一。是何种原因导致 ICP 胎盘中表达升高尚不清楚,可能的原因有两大方面,其一是 ICP 胎盘血管内皮细胞受损或功能异常:内皮受损后可导致内皮下胶原暴露,促进血小板粘附、聚集,使储存在血小板中的 NPY 释放出来,从而 NPY 升高。以下三点均说明 ICP 内皮细胞受损和功能异常:1.胆汁酸沉积:血中高浓度的胆汁酸沉积于胎盘,对生物膜的破坏和损伤,使内皮细胞功能异常。2.脂质过氧化:王竹晨[10]等发现 ICP 病人的血硒水平及谷胱甘肽过氧化物酶的活性均较正常孕妇低,谷胱甘肽过氧化物酶活性降低、氧自由基增加,脂质过氧化物对细胞膜的损伤。3.自身免疫:董旻岳[11]等发现 ICP 病人抗心磷脂抗体(A-CA)升高。ACA 的靶抗原是位于血管内皮细胞和血小板等细胞膜上的心磷脂,ACA 对胎盘血管内皮细胞的损伤。另一方面,ICP 脂质代谢改变和血液流变性减退,血液粘度增加,血小板聚集,释放 NPY 增加。戴华康[12]等的研究发现 ICP 时 TG 水平可较对照组增加 3 倍以上,ICP 组 LDL-C 及LDL-C/HDL-C 比值均明显大于正常妊娠组,HDL-C 却明显低于正常妊娠组,并且有血液流变性减退现象存在。ICP 胎盘血管内皮细胞损伤或功能异常;血小板聚集,血流动力学改变,使 NPY 分泌增加。NPY 增加血管收缩,胆汁淤积、胎盘受损更严重,从而有助于 ICP 的发生。

3.5 NPY 对 ICP 围生儿的影响

妊娠肝内胆汁淤积症(ICP)是产科并发症,严重危害母、婴健康,围产儿死亡率高达 100‰,但病因不明。正常妊娠时随着妊娠的进行 NPY 及其他的缩血管物质与舒血管物质共同调节平衡,以使血管紧张性降低,维持血压稳定,保证全身各脏器及胎盘的血液供应。ICP 时,由于胆酸的作用而使胎儿、胎盘循环系统合成分泌 NPY 增加,升高的 NPY

维普资讯 http://www.cqvip.com

可使胎盘血管收缩，胎儿—胎盘循环阻力增大，缺氧、缺血及应激均可导致脑、胎盘等组织 NPY 的合成及释放再增加[13]。过度升高的 NPY 可导致胎儿重要器官缺血、缺氧损伤，加重循环不良，使胎儿各系统功能产生抑制，从而导致胎儿缺氧更加严重，NPY 含量也更加上升，这种恶性循环，最后导致胎儿死亡。这一作用途径可能是 ICP 胎儿窘迫或死亡发生发展的重要原因之一。

本研究认为 NPY 与 ICP 及其并发症密切相关，监测 NPY 的变化可作为诊断 ICP 和预测 ICP 胎儿宫内情况指标之一；推测 NPY 受体拮抗剂的应用可能是改善胎儿不良结局的一条新途径。

参 考 文 献

[1] 陈建国，钱德英，刘建中，等. 妊娠高血压综合征患者血浆降钙素基因相关肽和神经肽 Y 含量的变化及其意义[J].中国现代医学杂志，2003；13(8)：56-58.

[2] Huizinga，-C-T；Oudejans，-C-B；Delemarre-van-de-Waal，-H-A Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation[J]. J-Endocrinol，2001；168(2)：273-281.

[3] 王利权，董旻岳，周坚红. 妊高症增加妊娠期肝内胆汁淤积症的发病危险性[J].浙江预防医学，2003；15(6)：8-9.

[4] Hajime Takikawa，Ryo Yamazaki，Naoyo Sano，et al.Biliary excretion of estradiol-17 β -glucunonide in the rat[J].Hepatology，1996；23：607-613.

[5] Lesle KK，Reznikov L，Simon FR.Estrogen in intrahepatic cholestasis of pregnancy [J].Obstetrics Gynecology，2000；95：372-375.

[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症[J].中华围产医学杂志，2000；3(2)：112-115.

[7] Bacq Y，Sapey T，Brechot MC，et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy：a French prospective study[J]. Hepatology，1997；26：358-364.

[8] Shi QY，Kong BH，Ma KD，et al. Effects of ursodeoxycholic acid on the liver plasma membrane fluidity，hepatic glutathione concentration，hepatic estrogen receptors and progesterone receptors in pregnant rats with ethinylestradiol and progesterone induced intrahepatic cholestasis [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi，2003；38(11)：680-682.

[9] 李泽桂、蔡文琴. 血管活性肽在人胚胎脐血管内皮细胞中的发育 [J].解剖学报，1997；28(1)：81-84.

[10] 王竹晨，刘淑芸，王靖华 .妊娠肝内胆汁淤积症患者血硒及胎盘硒水平变化与胎盘组织学改变的关系 [J].中华妇产科杂志，2000；35(8)：476-478.

[11] 董旻岳，王亚平，贺 晶 .抗心磷脂抗体与妊娠期肝内胆汁淤积症的关系[J].中华妇产科杂志，1999；34(8)：491.

[12] 戴华康，金杭美，贺 晶.妊娠期胆汁淤积症患者脂质代谢及血液流变学变化 [J].中华妇产科杂志，1997；32(12)：728-731.

[13] Fletchert AJ，Edwards CM，Gardner DS，et al.Neuropeptide Y in the sheep fetus effects of acute hypoxemia and dexamethasone during late gestation[J].Endocrinology，2000；141：3976-3982.

(上接第 786 页)

及 23s rRNA 保守区设计的通用引物扩增获得的片段序列。因此，这两个片段的测序及 Genbank 的收录发表丰富了细菌通用 PCR 扩增及基因芯片检测的靶样本范围，对于扩大一次 PCR 扩增及基因芯片对临床标本的检测范围做出了贡献。并且可以大大促进临床细菌通用 PCR 扩增检测试剂盒及检测基因芯片的开发和临床应用。

(通讯作者：周元国，第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心，ygzhou@cta.cq.cn)

参 考 文 献

[1] Li L, Ma W, Zheng W, et al.Progress in DNA chip technology [J]. Chin Med Sci J，2001；16(1)：59-62.

[2] Bier FF, Kleinjung F.Feature-size limitations of microarray technology--a critical review[J]. Fresenius J Anal Chem，2001；371(2)：151-156.

[3] Bertilsson S，Cavanaugh CM，Polz MF.Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers [J].Appl Environ Microbiol，2002；68(12)：6077-6086.

[4] Chandler DP，Newton GJ，Small JA，et al.Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar oligonucleotide microarrays[J]. Appl Environ Microbiol，2003；69(5)：2950-2958.

[5] Gonzalez N, Romero J, Espejo RT. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region [J]. J Microbiol Methods，2003；55(1)：91-97.

[6] 傅君芬，徐美春，尚世强，等.应用 16S-23S rRNA 基因区间对败血症常见菌的鉴定[J].中华传染病杂志，2002；20(5)：261-264.

[7] 分子克隆实验指南(上、下册)/(美)萨姆布鲁克(Sambrook,J.)等著；黄培堂等译[M]. 第 3 版，北京：科学出版社，2002. 8.