DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.023
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)12-1091-03

论著

熊脱氧胆酸、地塞米松、思美泰对抗孕大鼠肝内胆汁淤积症的比较研究

常 青,王静波,陈 勇,史常旭 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 比较熊脱氧胆酸(UDCA)、思美泰(SAMe)和地塞米松(DEX)对乙炔雌二醇(EE)诱发妊娠大鼠肝内胆汁淤积综合征的治疗作用。方法 孕15 d Wistar大鼠50只,随机分成对照组、EE组、UDCA组、SAMe组和DEX组,分别给予丙二醇(PG)、EE 2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1}皮下注射;UDCA组、SAMe组和DEX组在注射EE同时分别给予UDCA 100 mg·kg^{-1}·d^{-1};SAMe 100 mg·kg^{-1}·d^{-1};DEX 1 mg·kg^{-1}·d^{-1}连续5 d后测定孕鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、和甘胆酸(GC),并观察肝脏形态学变化及胎鼠生长发育情况。结果 UDCA组血清GC、ALP、ALT较DEX组显著降低($P<0.001$);与SAMe组相比也有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$);各组间光镜观察和硝酸银染色均无明显差异;UDCA组胆小管管腔扩张较DEX组和SAMe组减轻;胎鼠体重和存活数较DEX组和SAMe组显著升高($P<0.01$)。结论 UDCA、DEX和SAMe可不同程度治疗EE诱发的孕鼠肝内胆汁淤积,UDCA作用优于DEX和SAMe。

关键词:熊脱氧胆酸;地塞米松;思美泰;妊娠肝内胆汁淤积;大鼠
中图法分类号:R657.430.53;R975.5;R977.11 文献标识码:A

Comparison of the effects of ursodeoxycholic acid, dexamethasone, and S-adenomethionine on intrahepatic cholestasis induced by ethinylestradiol in pregnant rats

CHANG Qing, WANG Jing-bo, CHEN Yong, SHI Chang-xu (Department of Obstetrics and Genecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of ursodeoxycholic acid (UDCA), dexamethasone (DEX), and S-adenomethionine (SAMe) on the pregnant rats with intrahepatic cholestasis induced by ethinylestradiol (EE). **Methods** A total of 50 15-day pregnant Wistar rats were randomly divided into five groups: control group, EE group, UDCA group, DEX group, and SAMe group. In EE group, rats were subcutaneously injected with EE (2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1}) for 5 d. In the control group, rats received subcutaneous injection of appropriate volume of propylene glycol (PG) for 5 d. In UDCA, SAMe, and DEX groups, rats were administered with the same dose of EE plus UDCA (100 mg·kg^{-1}·d^{-1}), SAMe (100 mg·kg^{-1}·d^{-1}), and DEX (1 mg·kg^{-1}·d^{-1}) for 5 d, respectively. The serum levels of aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatases (ALP), glycocholic acid (GC), and total bilirubin were measured after cesarean. Morphologic changes of the liver of pregnant rats and the growth and development of the fetal rats were observed. **Results** The serum levels of ALT, ALP, GC in rats of UDCA group were decreased significantly as compared with those in DEX group ($P<0.001$), and were significantly different from those in SAMe group. Dilated bile canaliculi were significantly improved in the UDCA group as compared with those in other groups. Body weight and fetal survival rate of UDCA group were better improved than those in SAMe and DEX groups. **Conclusion** UDCA, SAMe, and DEX are effective in the prevention of cholestasis induced by EE in pregnant rats. UDCA is more effective than SAMe and DEX.

Key words: ursodeoxycholic acid; dexamethasone; S-adenomethionine; intrahepatic cholestasis of pregnancy; rat

妊娠肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是一种妊娠特发性肝脏疾病,可造成多种不良围生儿结局,目前尚缺乏治疗ICP的有效药物。本实验在乙炔雌二醇(ethinylestradiol, EE)皮下注射建立妊娠大鼠ICP模型的基础上,分别采用熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)、地塞米松(dexamethasone, DEX)和思美泰(S-adenomethionine, SAMe)治疗ICP大鼠,观察3种药物对孕大鼠血液生化指标、肝脏病理结构以及胎鼠生长发育的影响,并对其抑制EE诱发的

作者简介:常 青(1963-),女,湖南省长沙市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事妇科内分泌方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68765399

收稿日期:2003-08-22;修回日期:2004-03-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

妊娠大鼠肝内胆汁淤积效果进行比较，为临床 ICP 患者的药物治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 雌性大鼠 50 只，购自本校实验动物中心。体质量 260～300 g，鼠龄 180～210 d。发情期与雄鼠合笼，阴栓脱落日为妊娠第 1 天，至妊娠第 15 天结合摸胎法确定妊娠。

1.1.2 主要试剂 乙炔雌二醇（EE，Sigma 公司，纯度＞98%）100 mg 溶于丙二醇溶液（propylene glycol，PG，上海生工）50 ml 中，制成 2% EE-丙二醇溶液，即每毫升 PG 中含 EE 2mg。UDCA（Sigma 公司，纯度为 99%）溶于生理盐水中制成每毫升含 UDCA 100 mg 的溶液。思美泰针剂为德国 AMG 公司产品，1 000 mg/支。

1.2 实验方法

采用随机数字表法将 Wistar 大鼠分成 5 组：UDCA 组、DEX 组、SAMe 组、EE 组和正常对照组（N 组），每组 10 只。自妊娠 15 d起，EE 组皮下注射 EE-PG 溶液，2.5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，连续 5 d。UDCA 组同时口服 UDCA（灌胃法）100 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，SAMe 组皮下注射 SAMe 100 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，DEX 组皮下注射 DEX 1 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，N 组注射等量 PG 溶液，共 5 d，5 组孕鼠均于见到阴道血性分泌物后立即以剖宫产中止妊娠，记录胎鼠数量、胎鼠体质量、妊娠天数。取大鼠下腔静脉血 5 ml，全自动生化分析仪测定肝功能，放射免疫法测定血清胆酸水平，测定步骤严格按照说明书操作。于活体 1 min 内取孕鼠和胎鼠肝左叶置 4%多聚甲醛溶液固定、修块约 1 mm×1 mm×1 mm 大小，常规电镜制样，透射电镜（GEOL-2 000EX，日本电子公司）观察肝细胞超微结构。另取部分肝组织分别固定于 4% 甲醛溶液和 3.5%重铬酸钾-甲醛溶液中，作石蜡切片、HE 染色观察肝细胞组织学改变、硝酸银浸染观察胆小管情况。石蜡切片和电镜超薄切片制作按常规进行，硝酸银染色在 Kopsch 的 Golgi 镀银法基础上加以改进。

1.3 统计学处理

所得数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 3 种药物对大鼠血清生化指标的影响

UDCA 组孕鼠血清胆酸（GC）、碱性磷酸酶（ALP）、谷丙转氨酶（ALT）水平较 DEX 组降低，有极显著性差异；与 SAMe 组相比，也有显著性差异。SAMe 组血清 ALP 较 DEX 组显著降低。5 组间总胆红素（TBiL）无明显区别（表 1）。

表 1 不同治疗组血清生化指标的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 1 Comparison of serum biochemical parameters in different groups ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ALP(IU/L)	TBiL(umol/L)	GC (μg/dl)
UDCA	41.1±5.41 #*	144.2±41.5	235.6±23.0 ** ##	6.92±1.58	500.9±159.9 ** ##
DEX	58.1±6.59	150.8±32.7	372.9±31.4	7.21±2.13	1 563.9±421.8
SAMe	51.1±4.93	147.8±58.6	311.3±50.3 #	7.43±2.12	1 742.2±582.9
EE	61.3±15.1	155.1±39.9	395.3±97.6	7.29±1.59	2 923.3±886.9
Control	37.9±4.53	138.4±38.3	220.4±41.4	7.91±1.10	472.0±132.2

#：$P<0.05$，##：$P<0.001$，*vs* DEX group；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* SAMe group

2.2 孕鼠肝脏变化

肉眼见对照组和 UDCA 组肝脏外观红润，边缘锐利，EE 组、DEX 组和 SAMe 组肝脏边缘稍钝。HE 染色后光镜观察，见 EE 组大鼠肝细胞破坏不明显，仅见肝细胞排列稍紊乱，少量肝细胞点状坏死；镀银染色后可见部分胆小管轻度扩张，各组间差异不显著。电镜下发现，对照组孕鼠胆小管无扩张，见丰富的微绒毛（图 1），EE 组胆小管扩张最显著，重者可呈囊状（图 2），微绒毛数量减少或消失，管腔内见退变的膜性结构。以 UDCA 组孕鼠肝胆小管扩张程度最轻（图 3），SAMe 组较 EE 组有改善，DEX 组与 EE 组相比无明显变化。EE 组胎鼠肝脏也相应存在不同程度的胆小管扩张和微绒毛改变，胞浆内糖原分泌颗粒明显减少，次级溶酶体增多；线粒体肿胀，空泡变性，可见灶性溶解。对照组胎肝见丰富的糖原颗粒，线粒体形态正常，UDCA 组胎肝胆小管管腔接近对照组，SAMe 组较 EE 组稍小，DEX 组与 EE 组相比无明显变化。

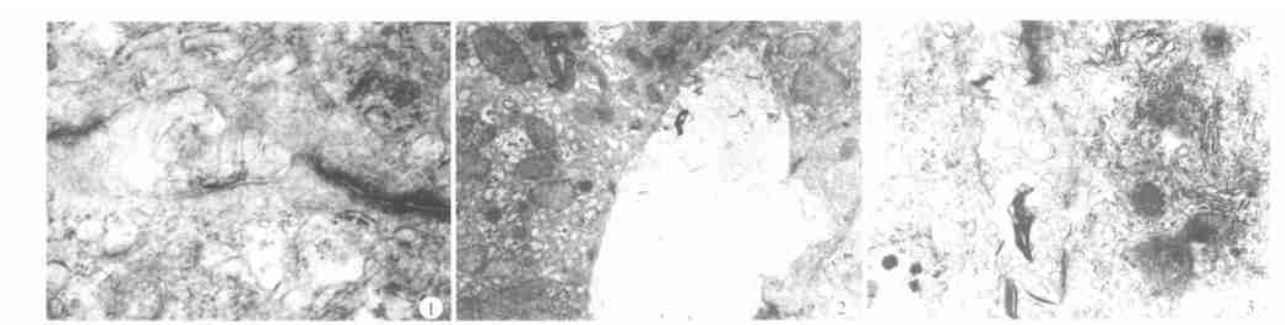


图 1 对照组孕鼠胆小管见丰富的微绒毛 （×6 000）

Fig 1 Abundant microvilli in bile canaliculi in the control group （×6 000）

图 2 EE 组孕鼠胆小管扩张最显著，微绒毛消失 （×4 000）

Fig 2 Bile canaliculi dilated significantly and microvilli disappeared in EE group （×4 000）

图 3 UDCA 组孕鼠胆小管扩张程度最轻，有微绒毛 （×8 000）

Fig 3 Bile canaliculi dilated slightly and with many microvilli in UDCA group （×8 000）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　胎鼠的生长发育情况

UDCA 组胎鼠体质量较 DEX 组和 SAMe 组显著增加, 同时死产数减少, 活产数增加。其中, DEX 组胎鼠体质量降低、死产数增加最为明显(表 2)。

表 2　不同治疗组胎鼠生长参数

Tab 2　Growth parameters of fetal rats in different groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Weight (g)	Fetal death	Fetal alive	Gestational age(d)
UDCA	94	3.84±0.21▲▲*	22▲▲##	72▲▲##	18.5±0.47
DEX	102	2.25±0.32##	86##	16##	18.7±0.39
SAMe	98	3.21±0.69	37	61	18.3±0.24
EE	100	3.20±0.69	48	52##	18.1±0.56##
Control	97	4.10±0.18	0	97	19.9±0.32

▲▲: $P<0.001$, *vs* DEX group; *: $P<0.01$, *vs* SAMe group; ##: $P<0.001$, *vs* SAMe group

3　讨论

本实验通过皮下注射 EE 诱发妊娠大鼠的 ICP 模型[1,2], 结果显示, EE 组孕鼠血清生化改变以甘胆酸、ALP 升高较为明显, ALT 水平也较对照组升高, 这与 ICP 患者的血清生化改变一致。本实验从血清学、肝脏组织形态学以及肝细胞超微结构改变证明, EE 可诱导妊娠大鼠发生肝内胆汁淤积和肝细胞损伤, 同时胎鼠体质量下降、死产率显著增加、妊娠天数明显下降, 与 ICP 患者的病理生理变化一致, 证明 EE 可建立稳定的大鼠 ICP 动物模型。

结果表明, 在皮下注射 EE 诱发妊娠大鼠 ICP 的同时, 给予 UDCA、SAMe、DEX 可使血清胆酸和肝脏 ALP、ALT 水平不同程度降低, 减少 EE 对肝细胞的损害, 不同程度地改善了 EE 诱发的孕鼠肝内胆汁淤积。目前研究认为, UDCA 具有改变胆汁酸池成分、拮抗疏水性胆汁酸的细胞毒作用, 促进硫酸化孕酮代谢物等肝细胞毒性物质的排泄、保护肝细胞, 发挥免疫调节等多种作用[3~6]。其机制可能是通过以下 3 种途径实现的: 调节富含磷脂的微粒团成分降低疏水性胆汁酸浓度、降低其细胞毒作用; 经由 Ca 依赖的蛋白激酶 C 途径和/或 MAPK 和细胞外信号调节激酶(Erk)刺激肝细胞的分泌、胆汁酸的排出增加; 改善胆汁酸诱发的细胞凋亡[7]。

在本实验中, UDCA 降低血清胆酸和 ALP、ALT 作用明显优于 SAMe 和 DEX, 而且, UDCA 组孕鼠肝细胞超微结构胆小管的扩张程度也较 SAMe 和 DEX 组减轻, 同时, 胎鼠体质量、活产数相应显著增加, 较接近对照组, 且并未发现畸形胎鼠, 说明 UDCA 可有力对抗 EE 引起妊娠大鼠肝内胆汁淤积, 并使其子代胎鼠并发症降低, 出生体质量和活产率增加。值得注意的是, UDCA 组胎鼠的胆小管管腔明显缩小, 形态已接近正常, 线粒体丰富, 说明 UDCA 不仅可改善孕鼠的肝内胆汁淤积, 还能减轻其子代肝脏的胆汁淤积, 这对提高子代的生存率、降低死产率至关重要。

由于 ICP 的发生与雌激素的增高有关, 而 DEX 能通过胎盘降低减少子代肾上腺硫酸脱氢表雄酮(DHEAS)的分泌, 降低雌激素的分泌而减轻胆淤[8]。此外, DEX 具有显著的促胎肺成熟作用, 可用于防治 ICP 引起的早产。DEX 还有非特异性的降胆红素作用, 阻止肝损伤[8]。

本实验中, DEX 可使孕鼠的胆酸浓度降低, 但并未对血清转氨酶水平产生显著影响, 提示 DEX 对 ICP 孕鼠的肝细胞功能无明显保护作用。在应用本实验剂量下, DEX 可使 ICP 孕鼠子代体质量显著降低, 死产率较 UDCA 和 SAMe 组显著增加, 表明 DEX 持续应用($1\ mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)可能对孕鼠子代产生不良影响。本实验并未设立不同 DEX 剂量的对照组, 因此, 其对子代的影响是否与剂量有关尚需进一步实验证明。在形态学方面, DEX 组孕鼠和胎鼠的胆小管管腔显著扩张, 子代肝细胞内糖原颗粒减少, 线粒体肿胀, 提示其子代存在能量代谢障碍, 并可能是其死亡的原因之一。

SAMe 作为一种肝细胞保护剂, 可降低胆汁酸池中的胆酸浓度, 因而可起一定的肝细胞保护作用。在本实验中, SAMe 可降低 ICP 孕鼠血清的胆酸和转氨酶水平, 部分改善肝细胞功能, 其疗效优于 DEX, 子代死亡率也较 DEX 显著降低, 表明 SAMe 对 EE 引起的大鼠 ICP 模型具有拮抗作用, 但与 UDCA 相比, 仍存在显著差异。本实验中, 3 组药物组子代均未发生畸形, 提示在本实验剂量下, UDCA、SAMe、DEX 均无明显的肢体致畸作用。

参考文献:

[1] 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[J]. 中华围产医学杂志, 2000, 3(2): 112－115.

[2] Koopen N R, Post S M, Wolters H, *et al*. Differential effects of 17alpha-ethinylestradiol on the neutral and acidic pathways of bile salt synthesis in the rat[J]. J Lipid Res, 1999, 40(1): 100－108.

[3] Davidson K. Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Semin Perinatol, 1998, 22(2): 104－111.

[4] Banq Y, Myara A, Brechot M C, *et al*. Serum conjugated bile acid profile during intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. J Hepatol, 1995, 22(1): 66－70.

[5] McDonald J. Cholestasis of pregnancy[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1999, 14(6): 515－518.

[6] Brites D, Rodrigues C M. Elevated levels of bile acids in colostrum of patients with cholestasis of pregnancy are decreased following ursodeoxycholic acid therapy[J]. J Hepatol, 1998, 29(5): 743－751.

[7] Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited[J]. Hepatology, 2002, 36(3): 525－531.

[8] Hirvioja M L, Tuimala R, Vuori J. The treatment of intrahepatic cholestasis of pregnancy by dexamathasone[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1992, 99(2): 109－111.

[9] Fox E S, Kim J C, Tracy T F, *et al*. NF-Kappa B activation and modulation in hepatic macrophages during cholestatic injury[J]. J Surg Res, 1997, 72(2): 129－134.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net