

【基础研究】

通信作者:李玉洁(1972-),女,河南周口人,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:围生医学;E-mail:645482554@qq.com。

pathological change. The pathological changes of hepatic tissues of rats in the estrogen group included the hepatocellular edema, loose cytoplasm, much cellular steatosis, more spotty necrosis, hepatic sinusoid narrowing, bile duct dilatation and cholestasis. The pathological changes of hepatic tissues of rats in the progesterone group included some hepatocellular edema in hepatic portal area, a few cellular steatosis, cholangiectasis and inflammatory cell infiltrate. There were a lot of fatty degeneration, spotty necrosis, inflammatory cell infiltration and some bile thrombus in hepatic cells of rats in the estrogen + progesterone group. There was no significant difference in serum ALT, AST, ALP and TBA levels among the four groups before medication ($P > 0.05$). The levels of serum ALT, AST, ALP and TBA after medication were significantly higher than those before medication in the estrogen group, progesterone group, estrogen + progesterone group ($P < 0.05$). The levels of serum ALT, AST, ALP and TBA in the estrogen group, progesterone group, estrogen + progesterone group were significantly higher than those in the control group after medication ($P < 0.05$). Compared with the estrogen group, the levels of serum ALT, AST, ALP and TBA significantly decreased in the progesterone group ($P < 0.05$); and they increased significantly in the estrogen + progesterone group ($P < 0.05$). The levels of serum ALT, AST, ALP and TBA in the estrogen + progesterone group were significantly higher than those in the progesterone group ($P < 0.05$). There was no significant difference in fetal death rate among the control group, estrogen group and progesterone group ($P > 0.05$). The fetal death rate of rats in the estrogen + progesterone group was significantly higher than that in the control group, estrogen group and progesterone group ($P < 0.05$). There was no significant difference in body weight of the fetal rats among the control group, estrogen group and progesterone group ($P > 0.05$). The body weight of the fetal rats in the estrogen + progesterone group was significantly lower than that in the control group, estrogen group and progesterone group ($P < 0.05$). **Conclusions** Estrogen, progesterone, estrogen + progesterone can induce cholestasis in rats. The model of cholestasis in middle pregnancy rats could be established by progesterone, which is more suitable for ICP study.

Key words: estrogen; progesterone; intrahepatic cholestasis of pregnancy

妊娠期肝内胆汁淤积症 (intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP) 是妊娠期出现的一种特殊类型的肝脏疾病, 孕妇多出现皮肤瘙痒、皮肤抓痕、黄疸及血生物化学指标异常, 其主要危害为导致胎儿宫内窘迫、早产和围生儿死亡率增加^[1]。ICP 的发病机制不明, 多数学者认为其可能与女性激素、遗传易感性、硒缺乏环境及免疫等有关^[2-3]。然而, 依靠现有临床技术对突发的胎死宫内仍不可预测; 因此, 其成为产科研究的热门课题之一, 而选择合适的动物模型将有利于对该类疾病的进一步研究。以往研究采用胆总管结扎术改变胆管解剖结构, 可成功制备肝内胆汁淤积症动物模型^[4], 但存在手术应激反应及建模周期较长等缺点, 影响观察结果。给予 α -萘异硫氰酸酯、氯丙嗪灌胃^[5-6] 或腹腔注射脂多糖^[7] 也可建立胆汁淤积动物模型, 但药物灌胃增加肝脏代谢量, 存在首关消除效应; 而腹腔注射给药可减少这种现象, 提高药物的生物利用度, 但摄入外源性肝损伤药物不符合妊娠期激素分泌的变化特征。动物选取方面, 选择兔、犬等大型动物建立模型价格较高; 选择小鼠建立动物模型, 又因小鼠体积小、标本不易获取而影响对子代的进一步研究。针对以上情况, 本研究选取动情周期规律、繁殖率高、价格低廉的大鼠为实验对象, 并根据妊娠期激素分泌特点, 分别选用雌激素、孕激素及雌激素 + 孕激素对孕中期大鼠进行干预, 制备 ICP 大鼠模型, 并对 3 种模型进行比

较, 探讨建立 ICP 的最佳动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只, 体质量 220 ~ 270 g, 由河南省实验动物中心提供, 在室温 18 ~ 28 °C、相对湿度 40% ~ 70% 的环境内饲养, 自由饮水、饮食。在发情期按 1 : 1 与雄性大鼠合笼饲养, 每日观察阴栓脱落情况, 将阴栓脱落日定为妊娠第 1 天, 饲养至妊娠第 10 天待用。

1.2 主要试剂与仪器 苯甲酸雌二醇 (estradiol benzoate, EB) 注射液 (天津金耀氨基酸有限公司, 国药准字 H12020530), 黄体酮注射液 (浙江仙琚制药股份有限公司, 国药准字 H33020828); 日立 7600 全自动生物化学分析仪 (日本日立公司), DME × 30 系列生物显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司)。

1.3 ICP 大鼠模型制备 将妊娠第 10 天的 SD 大鼠 40 只随机分为对照组、雌激素组、孕激素组、雌激素 + 孕激素组, 每组 10 只。妊娠第 10 ~ 14 天, 对照组大鼠腹腔注射生理盐水 2.5 mL · kg⁻¹; 雌激素组大鼠腹腔注射 EB 2.5 mg · kg⁻¹, 孕激素组大鼠腹腔注射黄体酮注射液 225 mg · kg⁻¹, 雌激素 + 孕激素组大鼠腹腔注射 EB 2.5 mg · kg⁻¹ + 黄体酮注射液 75 mg · kg⁻¹; 均每日 1 次。

1.4 标本采集及检测 各组大鼠于用药前 (妊娠第 10 天) 及用药后 (妊娠第 15 天) 分别取心脏静

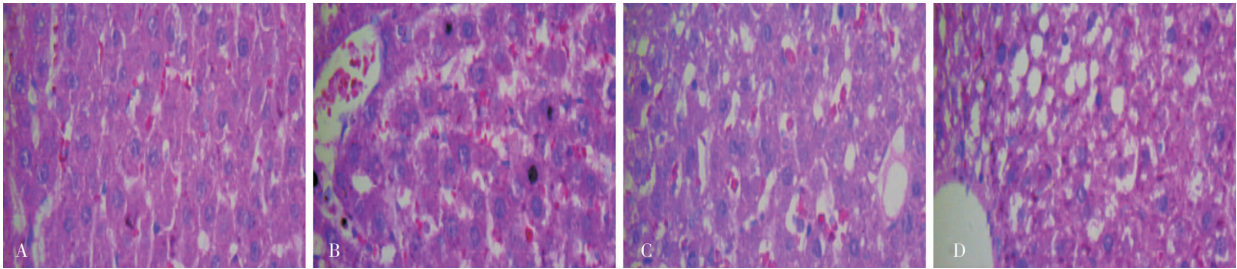
脉血 2 mL,1 500 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上层血清,应用全自动生物化学分析仪测定血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆酸(total bile acid, TBA) 水平。血清 TBA 及肝酶水平升高即视为 ICP 大鼠模型制备成功。大鼠临产后测体质量,腹腔注射水合氯醛 250 mg · kg⁻¹,麻醉后剖腹取胎,记录胎鼠数、死胎数及胎鼠体质量,留取大鼠左叶肝脏 1.0 cm × 1.0 cm × 0.5 cm,置于体积分数 10% 甲醛溶液中固定 48 h,经脱水、透明、浸蜡制作石蜡组织切片,行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE) 染色,显微镜下观察肝脏病理学变化。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组大鼠用药前及用药后血生物化学指标比较采用单因素方差分

析,各组大鼠死胎率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏组织病理学比较 对照组大鼠肝脏色泽红润,表面光滑,边缘锐利;雌激素组、孕激素组、雌激素 + 孕激素组大鼠肝脏肿胀,色暗红,边缘圆钝,可见棕黄色脂肪颗粒沉积。光学显微镜下见:对照组大鼠肝细胞及肝小叶形态结构正常,无明显病理改变(图 1A);雌激素组大鼠肝细胞水肿明显,细胞质疏松,细胞大量脂肪变性,点状坏死较多,肝血窦变窄,胆管扩张有胆汁淤积(图 1B);孕激素组大鼠肝汇管区部分肝细胞水肿,少量脂肪变性细胞出现,毛细胆管扩张及部分炎性细胞浸润(图 1C);雌激素 + 孕激素组大鼠肝细胞出现大量脂肪变性及点状坏死,炎性细胞浸润较多,部分可见胆栓形成(图 1D)。



A:对照组;B:雌激素组;C:孕激素组;D:雌激素 + 孕激素组。

图 1 各组大鼠肝脏组织形态学观察(HE, ×400)

Fig.1 Morphological observation of liver tissues of the rats in each group(HE, ×400)

2.2 各组大鼠用药前后血生物化学指标比较 结果见表 1。用药前各组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与用药前比较,用药后雌激素组、孕激素组、雌激素 + 孕激素组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。用药后,与对照组比较,雌激素组、孕激素组、雌激素 + 孕激素组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平升高,差异均有

统计学意义($P < 0.05$);与雌激素组比较,孕激素组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),雌激素 + 孕激素组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与孕激素组比较,雌激素 + 孕激素组大鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平升高显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清生物化学指标水平比较

Tab.1 Comparison of the serum biochemical indexes in each group

组别	n	用药前				用药后			
		ALT	AST	ALP	TBA	ALT	AST	ALP	TBA
对照组	10	42.60 ± 6.24	54.70 ± 7.60	107.70 ± 7.72	14.43 ± 2.03	47.80 ± 4.80	58.00 ± 6.54	109.70 ± 5.83	17.05 ± 2.76
雌激素组	10	44.50 ± 5.36	57.20 ± 7.89	110.50 ± 9.98	15.31 ± 1.94	69.40 ± 10.10 ^{ab}	89.90 ± 18.81 ^{ab}	175.00 ± 20.96 ^{ab}	33.34 ± 3.81 ^{ab}
孕激素组	10	42.80 ± 4.98	55.40 ± 7.30	109.00 ± 8.64	14.48 ± 1.72	60.80 ± 10.07 ^{abc}	75.60 ± 17.12 ^{abc}	158.40 ± 19.82 ^{abc}	25.25 ± 4.04 ^{abc}
雌激素 + 孕激素组	10	43.10 ± 7.20	54.60 ± 7.89	110.30 ± 9.14	15.31 ± 1.88	97.90 ± 6.74 ^{abcd}	106.50 ± 10.29 ^{abcd}	200.10 ± 11.35 ^{abcd}	39.04 ± 3.89 ^{abcd}
F		0.20	0.24	0.21	0.69	66.26	21.41	58.45	68.57
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与用药前比较^a $P < 0.05$;与对照组比较^b $P < 0.05$;与雌激素组比较^c $P < 0.05$;与孕激素组比较^d $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠死胎率比较 对照组、雌激素组、孕激素组、雌激素 + 孕激素组大鼠的死胎率分别为 8.6%、17.0%、15.7%、23.3%，雌激素组、孕激素组大鼠的死胎率与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，而雌激素 + 孕激素组大鼠的死胎率与对照组比较显著升高 ($P < 0.05$)，雌激素组与孕激素组大鼠的死胎率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，雌激素 + 孕激素组大鼠的死胎率较雌激素组、孕激素组显著升高 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠体质量比较 对照组、雌激素组、孕激素组、雌激素 + 孕激素组大鼠的体质量分别为 (5.44 ± 0.47)、(4.68 ± 0.39)、(4.87 ± 0.27) 及 (4.55 ± 0.33) g。雌激素组、孕激素组、雌激素 + 孕激素组大鼠的体质量与对照组比较均有下降，但雌激素组、孕激素组大鼠的体质量与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，雌激素 + 孕激素组胎鼠的体质量较对照组显著下降 ($P < 0.05$)。雌激素组大鼠的体质量与孕激素组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，雌激素 + 孕激素组大鼠的体质量较雌激素组、孕激素组显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

ICP 是妊娠期特有的疾病，多出现在妊娠中晚期^[8]，造成围产儿发病率及病死率增加。而此时是雌激素合成的高峰期^[9]，REYES 等^[10]研究发现，ICP 患者血和尿中的雌激素总量并未发生改变，而孕激素和胆汁酸的代谢产物显著高于正常妊娠者。ICP 的发病机制目前尚不十分明确，以往关于 ICP 发病机制的探讨多倾向于对雌激素的研究，而近年更倾向于对孕激素的研究^[11]。

雌激素诱导 ICP 发病原因可能是通过改变胆汁流循环，诱使胆汁淤积，其机制可能包括：(1) 改变肝细胞膜中胆固醇/磷脂比值，降低膜流动性，影响胆汁流；(2) 雌激素水平过高，诱导 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性减低，阻遏胆酸摄入肝细胞；(3) 雌激素与肝细胞上的雌激素受体结合，可能是通过上调低密度脂蛋白和丙氨酸载体的表达，下调有机阴离子转运多肽等胆酸载体的表达，影响胆酸排出；(4) 雌激素下调胆管膜上的牛磺胆盐同向转运多肽的表达，还可通过改变胆管系统的通透性，影响胆汁酸代谢，致使胆汁淤积发生^[9,12]。孕激素诱导的 ICP 发病机制可能为：(1) 孕激素代谢异常增加胆管树的通透性；(2) 细胞膜脂质成分发生异常，改变膜流动性及载体的数量和活性；(3) 降低 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性；

(4) 孕激素代谢产物异常阻碍胆红素与葡萄糖醛酸结合，使血中非结合胆红素浓度升高，肝功能受损，硫酸盐等代谢生成增加，排泄减少；(5) 松弛胆囊平滑肌，胆汁排泄障碍，破坏胆汁酸的肝肠循环，诱导人类 ICP 的发生^[13]。本研究发现，采用雌激素或孕激素建立胆汁淤积动物模型，雌激素造模后肝脏生物化学指标升高及肝脏病理改变均明显，以二者合用时变化更明显，考虑雌激素引起肝细胞水肿，胆管树通透性改变明显，细胞器损伤重， $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性下降，诱使胆汁淤积、肝损伤发生；孕激素造模，肝细胞少量水肿，细胞膜脂质成分异常变化，膜流动性下降，线粒体损伤， $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶产生减少，使胆汁酸浓度升高，出现肝内胆汁淤积；雌激素、孕激素联合建立动物模型，出现肝脏生物化学指标明显升高，肝脏病理学变化更明显，可能是孕激素具有强化雌激素的作用机制，产生胆汁淤积^[11]，但具体作用机制有待进一步研究探讨。

本研究从大鼠妊娠第 10 天开始进行造模，孕激素组大鼠肝脏病理形态学结果显示，汇管区出现部分肝细胞水肿，少量脂肪变性，毛细胆管扩张及部分炎性细胞浸润，与人类 ICP 肝脏病理改变相似，且血清 ALT、AST、ALP、TBA 水平均升高，表明采用孕激素可成功诱导出与人类相似的 ICP 动物模型。雌激素组诱导的大鼠模型中，血清生物化学指标均高于对照组，且与孕激素组比较明显升高，但病理形态学观察显示出比孕激素组更为严重的病理变化；雌激素 + 孕激素组大鼠在病理形态学观察中显示出比孕激素组和雌激素组大鼠更为严重的变化，生物化学指标明显高于孕激素组和雌激素组。以上结果显示，雌激素和雌激素 + 孕激素的干预方法同样能制备出肝内胆汁淤积大鼠模型。根据研究结果，考虑雌激素组可能是因为雌激素水平过高，胆管树通透性异常，细胞器损伤重， $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性下降，诱使胆汁淤积；孕激素组可能是孕激素水平过高或是大鼠对孕激素过于敏感，诱导肝细胞膜脂质成分及膜流动性发生改变，线粒体损伤， $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶产生减少，胆汁酸代谢异常，浓度升高，诱导肝内胆汁淤积发生；雌激素 + 孕激素组可能是孕激素强化了雌激素的某些作用，诱导胆汁淤积发生。但是孕激素方法诱导出的肝内胆汁淤积模型与人类 ICP 最为相似，而雌激素组的胆汁酸水平与孕激素组相比过高，雌激素 + 孕激素组的生物化学指标与孕激素组和雌激素组比较升高更严重，而且造成的病理损害更严重，与人类 ICP 肝脏的病理变化不相符；并

且雌激素 + 孕激素组的死胎率明显高于对照组,大鼠体质量明显低于对照组,对大鼠的预后影响较大,不利于后续实验研究的开展。综上所述,雌激素、孕激素、雌激素 + 孕激素均有诱导大鼠胆汁淤积的作用,采用孕激素给药方式能够建立更符合 ICP 研究的中孕期大鼠胆汁淤积症模型。

参考文献:

[1] 廖志,张勇,罗红权,等. 妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇所产新生儿脐动脉血清诱导 A549 细胞凋亡的机制研究[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(2):98-100.

[2] 杜巧玲,段涛. 胆汁酸与妊娠期肝内胆汁淤积症发病机制关系的研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2013,48(2):141-143.

[3] GRONE A K,SMITH J F. Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Neo Rev*,2012,13(3):e145-e150.

[4] 张慧,卞兆连,王琦夏,等. 胆汁淤积小鼠模型的探讨[J]. 肝脏,2015,20(3):218-222.

[5] 朱平生,龙爱华,王兵. ANIT 诱发大鼠肝内胆汁淤积的动态病理变化观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):190-191.

[6] 杨红莲. 氯丙嗪致大鼠胆汁淤积效应及其作用机制研究[D].

北京:中国人民解放军军事医学科学院,2007.

[7] 戴进,王晓东. LPS 诱导动物胆汁淤积模型的制备及微胆管蛋白对 BSEP 功能影响的研究[J]. 中国血液流变学杂志,2009,19(4):525-526.

[8] WEI W,HU Y Y. Expression of hypoxia-regulated genes and glyco-metabolic genes in placenta from patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Placenta*,2014,35(9):732-736.

[9] 何春容,杨芳,刘小乐,等. 雌激素受体与妊娠期肝内胆汁淤积症的相关研究[J]. 实用临床医药杂志,2013,17(13):40-42.

[10] REYES H,SJOVALL J. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Ann Med*,2000,32(2):94-106.

[11] 张利平. 雌孕激素对孕鼠肝脏、胎盘组织中 FXR/BSEP 受体系统表达的影响研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2007.

[12] 王玥,赵晓杰. 妊娠期肝内胆汁淤积症及其不良结局的发病机制研究进展[J]. 现代妇产科进展,2015,24(2):155-157.

[13] 张利平,刘建,黄楠. 雌激素对肝脏、胎盘组织 FXR/BSEP 受体系统表达的影响研究[J]. 中国医药指南,2013,11(27):9-12.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

(上接第 368 页)

参考文献:

[1] 杨生汝,张伟,赵云鹤,等. c-Jun 在胆红素脑病幼鼠海马神经细胞凋亡中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(21):1654-1657.

[2] 王劲,陈燕,王琳,等. 高体积分数氧对骨髓间充质干细胞含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 和增殖细胞核抗原表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(3):217-220.

[3] 厉新新,刘丽娟,陈宝石,等. 银杏内酯 B 对 H₂O₂ 诱导人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2016,36(9):822-825.

[4] 李云,刘菲. Cyt C 和 caspase-3 在 STZ 诱导糖尿病大鼠晶状体上皮细胞中的表达[J]. 眼科新进展,2014,34(3):228-231.

[5] 李宏伟,周斌,张海鸿. TRPM8 通过 cAMP-PKA/UCP4 信号调控氧糖剥夺/复糖复氧诱导的神经元凋亡[J]. 南方医科大学学报,2016,36(9):1265-1270.

[6] 邓松筠,艾宇航,张丽娜,等. 脑红蛋白在氧糖剥夺-复氧复糖诱导人神经母细胞瘤细胞线粒体膜电位去极化及活性氧生成中的作用[J]. 中华内科学杂志,2017,56(1):44-48.

[7] YANG X,ASAKAWA T,HAN S,*et al.* Neuroserpin protects rat neurons and microglia-mediated inflammatory response against oxygen-glucose deprivation and reoxygenation treatments in an *in vitro* study[J]. *Cell Physiol Biochem*,2016,38(4):1472-1482.

[8] MA Y,ZHAO P,ZHU J,*et al.* Naointong protects primary neurons

from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced injury through PI3K-AKT signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2016,2016:5815946.

[9] 董高翔,冯亦璞. 丁基苯酚对局部脑缺血再灌注大鼠脑线粒体 ATPase、抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响[J]. 中国医学科学院学报,2002,24(1):93-97.

[10] 荣国铃,吴世政,张淑坤,等. 丁苯酚抑制原代大鼠海马神经元氧糖剥夺/复氧诱导的凋亡[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):1015-1019.

[11] 种兆忠,冯亦璞. 丁基苯酚对缺血脑组织中及低糖低氧刺激后培养的神经细胞中胆碱乙酰化酶活性的影响[J]. 中国药理学杂志,1999,34(8):519-522.

[12] 马岚,张奕霞,练海东,等. 右美沙芬对糖尿病视网膜神经病变中 caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展,2015,35(5):432-434.

[13] 刘猛. 急性力竭运动大鼠脑皮质运动区组织中 caspase-3 的表达[J]. 新乡医学院学报,2017,34(1):22-25.

[14] 马艳,吴志鸿,司南,等. αB 晶状体蛋白对急性高血压大鼠视网膜神经节细胞保护作用机制的研究[J]. 眼科新进展,2015,35(4):318-322.

[15] 玄承敏,薛天阳,许伟,等. 苦参碱对人横纹肌肉瘤 RD 细胞增殖及凋亡的影响及其作用机制[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(3):233-235.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)