

段的一定比例的病毒基因与宿主基因整合,整合的序列不是完整的基因复制模板,而病毒S基因仍完整的存在于整合基因中,HBsAg可以正常合成。而在HBeAg阳性阶段上述这两种情况不存在或者存在程度较轻。血清定量HBsAg与肝功能主要指标ALT、AST、ALP、 γ -GT相关分析中显示HBeAg阳性或阴性状态下均不存在相关性,只在HBeAg阴性患者转氨酶升高时AST与HBsAg存在较弱的正相关($r = 0.48$)。这些都说明了肝细胞中HBV复制程度的高低与肝细胞的严重状况并不存在直接关系,HBV的复制并不直接造成肝细胞的损伤,而是在肝细胞免疫系统抑制病毒的过程中间接损伤了自身细胞,导致肝脏炎性反应的发生,这在陈继梅等^[8]相关研究中得到证实。

本研究结果揭示了定量HBsAg在慢性乙型肝炎患者不同HBeAg状态下与HBV-DNA及主要肝功能指标间的相关性,表明在HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者血清定量HBsAg与HBV-DNA间存在较好的相关性,可反映DNA复制的程度,尤其是在HBV-DNA高水平复制时HBsAg含量可作为HBV-DNA的替代指标应用于临床,而在HBeAg阴性的慢性乙型肝炎患者中定量HBsAg与HBV-DNA间不存在的相关性。

参考文献

- 1 李文兴,李山,秦雪,等.乙型肝炎患者HBV-DNA载量与肝功能及乙型肝炎病毒表面抗原定量的关系[J].内科,2008,3(2):164-166
- 2 方红龙,吴金明,江宏峰,等.慢性乙型肝炎患者外周血HBsAg与HBV DNA相关性分析[J].实用肝脏病杂志,2011,14(2):108-109
- 3 Su TH, Hsu CS, Chen CL, et al. Serum hepatitis B surface antigen concentration correlates with HBV DNA level in patients with chronic hepatitis B[J]. Antiviral Ther, 2010, 15:1133-1139
- 4 Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers[J]. Hepatology, 2010, 51:1933-1944
- 5 Wiegand J, Wedemeyer H, Finger A, et al. A decline in hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) predicts clearance, but does not correlate with quantitative HBeAg or HBV DNA levels[J]. Antiviral Ther, 2008, 13:547-554
- 6 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中国预防医学杂志,2011,12(1):1-15
- 7 郑专,杨俊杰.e抗原阴性慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA载量与HBsAg以及AST含量关系的研究[J].中国卫生检验杂志,2011,21(10):2474-2475
- 8 陈继梅,吕亮,丁雪芳.慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA载量与肝功能指标关系的研究[J].中华全科医学,2012,10(4):457-460
(收稿日期:2014-03-11)
(修回日期:2014-04-16)

人合体滋养细胞微粒对孕鼠血管内皮的影响

顾航超 陈 宇 黄亚娟

摘要 目的 研究人合体滋养细胞微粒(syncytiotrophoblast microparticles, STBM)对SD孕鼠血管内皮的影响,从而探讨子痫前期可能的发病机制。方法 选取2013年8~10月在上海交通大学附属第六人民医院住院行选择性剖宫产的10例子痫前期患者的胎盘,采用机械打碎法体外制备合体滋养细胞微粒。将孕鼠随机分为两组,于孕7.5、10.5及13.5天分别经尾静脉注入合体滋养细胞微粒及生理盐水,自孕10.5天起隔日大鼠无创血压测量分析系统测量血压,并于17.5天取血检测血中一氧化氮(nitric oxide, NO)及内皮素(endotelin, ET)含量。结果 实验组孕鼠于10.5天起血压逐渐增高,而对照组血压无明显改变。同时实验组孕鼠血一氧化氮水平($47.256 \pm 6.708 \mu\text{mol/L}$)明显低于对照组($61.287 \pm 9.725 \mu\text{mol/L}$) ($P < 0.01$),而内皮素水平($91.209 \pm 16.918 \text{ng/L}$)明显高于对照组($56.624 \pm 9.337 \text{ng/L}$) ($P < 0.01$)。结论 STBM可以损伤孕鼠血管内皮,使其调节血管舒缩功能受损,从而导致孕鼠血压升高,提示其可能是子痫前期内皮细胞功能紊乱的原因。

关键词 人合体滋养细胞微粒 子痫前期 孕鼠 血管内皮

[中图分类号] R714 [文献标识码] A

Human Syncytiotrophoblast Microparticles Induce the Dysfunction of Endothelial Cells in Pregnant Rat. Gu Hangchao, Chen Yu, Huang

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院

通讯作者:黄亚娟,硕士生导师,主任医师,电子信箱:huangyajuan2006@163.com

Yajuan. Department of Gynecology and Obstetrics, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract Objective To provide a basis for the pathogenesis of preeclampsia by investigating whether syncytiotrophoblast microparticles (STBM) could cause the vascular endothelial dysfunction in pregnant rat. **Methods** Placentas were obtained after cesarean section from ten preeclampsia women from Aug 2013 to Oct 2013 in the Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital. 0.3ml saline which contain 0.45mg syncytiotrophoblast microparticles and 0.3ml saline with nothing as control were injected in tail veins of SD rat on the day 7.5, day 10.5, day 13.5 of pregnancy. Blood pressure was measured by means of the tail - cuff method and on day 17.5, the rat were anesthetized by diethyl ether and blood were collected for detecting the plasma concentration of nitric oxide (NO) and endothelin (ET). **Results** Rat with syncytiotrophoblast microparticles showed a significant elevation in BP, a significant increase in ET level and a significant decrease in NO level. **Conclusion** Syncytiotrophoblast microparticles can injury the endothelia cells of pregnant rat which may contribute to the elevation in BP. This research indicates the syncytiotrophoblast microparticles are important among the pathogenesis of preeclampsia.

Key words Syncytiotrophoblast microparticles; Preeclampsia; Pregnant rat; Endothelial cell

子痫前期是多基因的系统性疾病,多发生于妊娠中晚期,发生率2%~5%,以高血压、蛋白尿、水肿为特征,是孕产妇和围生儿病死率的主要原因之一。目前研究提示胎盘浅着床、血管内皮功能紊乱及全身性炎症反应在子痫前期的发病机制中占有重要地位,多种学说试图解释子痫前期的发病机制,如胎盘缺血缺氧学说、免疫学说、氧化应激学说、遗传学说等。目前子痫前期的唯一有效治疗方法仍然是终止妊娠,提示胎盘在子痫前期的发病中处于中心环节,故有研究者提出以下假说:首先多种有害因素,如高脂血症、高血压等,作用于早期滋养细胞,使其浸润不足,导致胎盘浅着床和螺旋动脉重铸不良,造成胎盘低灌注;其次胎盘缺血再灌注损伤,引发氧化应激、脂质过氧化和氧自由基释放,STBM等胎盘毒性物质进入母体循环导致全身性炎症反应和血管内皮细胞损伤,从而出现血液高凝,血管内微血栓形成,使全身各系统各脏器血液灌流量减少,最终导致器官病理改变,出现子痫前期的高血压、蛋白尿、水肿等临床表现。陈宇等人的研究发现在子痫前期患者循环血液中STBM的含量远高于正常孕妇,且其在体外实验中发现STBM对人脐静脉内皮具有抑制作用,进一步提示了STBM在子痫前期发病中的重要作用^[1-3]。本文首次采用胎盘机械打碎法体外制备STBM,注入孕鼠体内观察其对孕鼠心血管系统的影响。

材料与方 法

1. 材料:胎盘取自于2013年8~10月上海交通大学附属第六人民医院住院行剖宫产的重度子痫前期患者。本试验经笔者医院伦理委员会批准,获取标本前均告知研究对象试验的性质、目的,所有患者均签署知情同意书。

2. 实验动物:清洁级成年SD大鼠(由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供),雌性体重为200~250g,雄性体重为210~260g,在室温18~28℃、相对湿度40%~70%的环

境中饲养,不控制饲料和饮水。在发情期,将雌性大鼠和雄性大鼠按2:1比例同笼饲养,每天早晨阴道分泌物镜检,发现精子为妊娠第0.5天。试验中意外死亡的孕鼠均予及时补充。

3. 主要试剂与仪器:BCA蛋白检测试剂盒(江苏碧云天公司),大鼠一氧化氮(NO)酶联免疫试剂盒(上海泽迈公司),大鼠内皮素(ET)酶联免疫试剂盒(上海泽迈公司),鼠尾动脉无创血压分析系统(上海奥尔科特公司)。

4. 方法:本实验借鉴Smith体外机械打碎法制备微粒,取胎盘母体面2/3绒毛组织,去除蜕膜,剪成1cm×1cm×1cm大小,分别用0.1mol/L的CaCl₂和PBS各洗涤3次去除血液,再将组织剪成5mm的碎片,放入100ml的生理盐水中,4℃过夜^[4]。过滤组织,收集上清液。在4℃低温下,采用3步离心法,即先1000g离心10min,去除细胞,收集到的上清液,10000g离心15min,去除小的残存的细胞碎片及细胞器,再收集上清液100000g离心60min,最后得到的乳白色沉淀即为合体滋养细胞微粒,沉淀重复洗涤离心2次,悬浮于1ml的无菌生理盐水中,以BCA法对STBM悬浮液进行蛋白浓度测定,调整STBM浓度至1.5mg/ml,-80℃保存备用。

5. 动物分组与给药:将孕鼠随机分为两组,对照组和实验组,每组10只。于孕7.5、10.5及13.5天分别经尾静脉注入含合体滋养细胞微粒液体0.3ml及生理盐水0.3ml。

6. 血压的测量及血液的采集:两组孕鼠于妊娠第9.5天开始测量尾动脉收缩压,隔日清晨1次,直至处死。测量方法:先把孕鼠置于预热箱内预热至36~38℃,待其安静后以鼠尾动脉无创血压测试仪(上海奥尔科特有限公司,原理与测人体肱动脉血压相似)测量,测5次,取平均值。两组孕鼠于孕前经尾静脉采血0.5ml,并于17.5天血压测量后,乙醚吸入麻醉状态下开腹,抽取下腔静脉血2ml,两次采集的血液均在室温下凝结20min后以4000r/min离心5min,取血清,利用酶联免疫法测量血清中NO及ET含量。

7. 统计学方法:用SPSS 11.0软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行t检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 血压:各组大鼠血压情况见表 1。从表 1 数据可以看出孕前及孕 5.5 天两组大鼠血压无差异。自孕 9.5 天起,即注射 STBM 后两天,实验组动物血压逐渐升高,且与对照组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血压变化 (mmHg)

时间	实验组	对照组
孕前	108.2 ± 4.3	107.8 ± 3.6
孕 5.5 天	111.3 ± 4.5	113.2 ± 2.7
孕 9.5 天	124.5 ± 3.1 *	116.4 ± 2.8
孕 11.5 天	134.6 ± 3.1 **	116.4 ± 3.2
孕 13.5 天	145.7 ± 5.3 **	113.2 ± 3.9
孕 15.5 天	161.2 ± 6.0 **	119.4 ± 4.5
孕 17.5 天	191.7 ± 8.3 **	116.7 ± 4.8

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. 血液中 NO 和 ET 的测定:各组大鼠血清中 NO 和 ET 的含量见表 2。从表 2 中可以看出,孕前两组大鼠血清 NO 及 ET 水平比较无统计学差异。孕 17.5 天实验组大鼠血清 NO 含量明显低于对照组 ($P < 0.05$),而实验组大鼠血清 ET 含量明显高于对照组 ($P < 0.01$)。

表 2 各组孕鼠血清 NO 及 ET 含量

时间	实验组	对照组
孕前血清 NO(μmol/L)	59.854 ± 9.115	58.762 ± 9.501
孕 17.5 天血清 NO(μmol/L)	47.256 ± 6.708 *	61.287 ± 9.725
孕前血清 ET(ng/L)	54.225 ± 9.354 **	55.064 ± 9.298
孕 17.5 天血清 ET(ng/L)	91.209 ± 16.918 **	56.624 ± 9.337

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

目前子痫前期的发病机制仍然不清,但基于现有的研究提示在子痫前期的发病机制中,血管内皮细胞损伤和功能紊乱是中心环节,但损伤原因尚不明确。微粒 (microparticle) 是由于细胞受到刺激或发生凋亡后产生的直径为 0.1 ~ 1.0 μm 的囊泡,其内包裹多种蛋白质、RNA、DNA 等,参与细胞间的相互作用,能够调节和反映子痫前期的关键部分,包括炎症、凝血功能的增强、血小板激活和内皮功能紊乱。Ling 等^[5]发现子痫前期患者循环血液中内皮细胞微粒数目较正常孕妇明显增高,提示血管内皮功能紊乱,同时内皮微粒可以损伤乙酰胆碱依赖的血管舒张反应,同时降低内皮 NO 产生,并加强氧化应激反应,结果导致

内皮细胞损伤进一步加重。而合体滋养层细胞微粒是妊娠期特有的循环微粒。由于母胎界面的合体滋养细胞正常新陈代谢或者多因素影响,凋亡或者受应激的合体滋养细胞受调控地释放各种成分不同的微粒,并脱落到母体血液循环中。近年多项实验证实子痫前患者体内胎盘源性的可溶性血管生长因子受体 -1 (soluble fms-like tyrosine kinase, sFlt-1) 明显升高,其可以通过拮抗血管内皮生长因子和胎盘源性生长因子,造成全身血管内皮紊乱^[6]。而该作用已在动物实验中得到证实。但是单体的 sFlt-1 因具有肝素结合域,较难在循环中存在,其如何在循环血液中运输成为困扰研究者们的问题^[7]。

Maynard 等用表达 sFlt-1 的腺病毒诱导孕鼠产生子痫前期表现,但是游离的 sFlt-1 却未能诱导出明显的子痫前期表现,表明 sFlt 需要一定的载体才能发挥其生物学效应。而微粒具有的膜结构正好为 sFlt-1 提供了这样的保护,防止其被肝素凝集。并且 Rajakumar 等^[8]发现子痫前期患者循环微粒含有大量 sFlt-1,并且子痫前期胎盘体外培养产生的微粒同样含有大量的 sFlt-1,故在子痫前期患者体内胎盘源性 sFlt-1 极有可能通过 STBM 在循环中运输。同时近年来发现微小 RNA (microRNA, miRNA) 对血管具有重要作用的调节作用,其中 miR-126 对血管形成有重要促进作用,有研究提示 miR-126 对子痫前期大鼠具有保护作用^[9]。但是人体循环血液中有丰富 miRNA 降解酶,miRNA 无法在游离状态下完成细胞间调节,而 Diehl 等^[10]研究发现微粒可以保护 miRNA 避免降解,从而帮助 miRNA 的完成调节功能。故 STBM 的形成一定程度上影响 miRNA 的调节能力。Chen 等^[11]研究显示子痫前期患者循环血中的 STBM 浓度与疾病严重程度呈正相关,同时体外实验发现,人工制备的 STBM 对内皮细胞有抑制增殖作用,并可诱导内皮细胞凋亡,但不导致内皮细胞坏死,在血管内皮细胞功能紊乱中起一定作用。但是 Chen 等^[11]的研究只在体外实验中证明了微粒对内皮作用的影响,却并未进行动物体内实验证实。而 Omatsu 等利用磷脂酰丝氨酸及磷脂酰胆碱在体外人工合成的微粒注入小鼠体内,可以造成子痫前期样表现,更进一步说明微粒在子痫前期中的作用。但是该实验的微粒只是模仿了微粒的膜结构,其主要参与促凝作用,而微粒要发挥其损伤内皮作用不仅与其膜结构有关,更多的是应是其微粒内容物的作用,Omatsu 等的实验组大鼠血压升高不明显也印证了这一点。

故为了更好在动物实验上证明 STBM 在子痫前期中的作用,本实验选取子痫前期患者胎盘采用机械打碎法制备 STBM。目前体外制备 STBM 的方法主要有机械打碎法,绒毛组织培养和胎盘小叶灌注,但三者制备的微粒特性并不一致,如通过绒毛组织培养和机械打碎制备的 STBM 接近于人类病理状态下产生的微粒,而胎盘小叶灌注制备的 STBM 则更接近于生理状态下产生的微粒。因动物实验所需微粒计量较大,同时机械打碎法对设备要求更低,故采用机械打碎法制备 STBM,其特性应更接近于子痫前期患者循环血液中的 STBM。本实验结果显示实验组动物随着注药次数的增多及妊娠的进展,血压明显增高,与对照组相比有统计学差异。而 NO 和 ET 分别是内皮细胞最强的舒血管因子和缩血管因子,当内皮细胞分泌的 NO 和 ET 失调可导致明显的血压升高,故其很好的反映内皮细胞调节血管舒缩功能的紊乱。本实验结果显示实验组动物血清 NO 含量较对照组明显降低,而 ET 较对照组明显升高,提示实验组大鼠的血压升高与内皮分泌 NO 和 ET 紊乱有关。

本研究证实了 STBM 在动物体内可引起内皮功能的紊乱,进一步证明 STBM 可能参与子痫前期的发生、发展,为将来子痫前期的诊治研究提供依据。但是 STBM 对内皮细胞的具体损伤机制还有待进一步研究,从而为子痫前期的临床诊治提供帮助。

参考文献

1 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版,北京:人民卫生出版社,2008:94
 2 Marques FK, Campos FMF, Sousa LP, et al. Association of microparticles and preeclampsia[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(7): 4553 - 4559

3 陈宇,黄亚娟. 重度子痫前期患者胎盘合体滋养细胞凋亡的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(10): 750 - 753
 4 Smith NC, Brush MG. Preparation and characterization of human syncytiotrophoblast plasma membrane[J]. Medical Biology, 1978, 56(5): 272 - 276
 5 Ling L, Huang H, Zhu L, et al. Evaluation of plasma endothelial microparticles in pre-eclampsia[J]. Journal of International Medical Research, 2014, 42(1): 42 - 51
 6 Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor - 1 inhibits angiogenesis in preeclampsia[J]. Circulation Research, 2004, 95(9): 884 - 891
 7 Sela S, Itin A, Natanson - Yaron S, et al. A novel human - specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 cell type - specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and preeclampsia[J]. Circulation Research, 2008, 102(12): 1566 - 1574
 8 Rajakumar A, Cerdeira AS, Rana S, et al. Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms - like tyrosine kinase 1 in preeclampsia[J]. Hypertension, 2012, 59(2): 256 - 264
 9 Yan T, Cui K, Huang X, et al. Assessment of therapeutic efficacy of miR - 126 with contrast - enhanced ultrasound in preeclampsia rats[J]. Placenta, 2014, 35(1): 23 - 29
 10 Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. Microparticles; major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation[J]. Cardiovascular Research, 2012, 93(4): 633 - 644
 11 Chen Y, Huang Y, Jiang R, et al. Syncytiotrophoblast - derived microparticle shedding in early - onset and late - onset severe pre - eclampsia[J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2012, 119(3): 234 - 238

(收稿日期:2014 - 04 - 16)

(修回日期:2014 - 05 - 04)

中西医结合对急性肝衰竭大鼠肠道屏障功能保护作用的研究

王江娅 刘寿荣 武 瑞

摘 要 目的 观察大黄煎液联合谷氨酰胺能否减少急性肝衰竭大鼠肠道细菌易位的发生并探讨其防治作用的机制。
方法 SD 大鼠随机分成 5 组,模型组(A 组),大黄防治组(B 组),谷氨酰胺(Gln)防治组(C 组),大黄联合谷氨酰胺防治组(D 组),对照组(E 组)。A、B、C、D 组腹腔注射 D - 氨基半乳糖(GalN)建立急性肝衰竭(AHF)大鼠模型。造模前两天,B 组予大黄煎液灌胃,C 组予 Gln 溶液灌胃,D 组予大黄煎液和 Gln 溶液灌胃,A 组和 E 组予生理盐水灌胃作为对照。造模 4 天后处死动物,

作者单位:310000 杭州市西溪医院(杭州市第六人民医院)肝病科
 通讯作者:武瑞,电子信箱:wurui19821205zj@163.com;王江娅,电子信箱:wangjiangya4328@163.com