

妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇胎盘组织 HDAC3 的表达及意义研究

郑 蛟¹, 刘彩茹², 邵 勇¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院产科, 重庆 400016; 2. 河北省邯郸市中心医院妇产科, 河北 056000)

【摘要】目的:探讨组蛋白去乙酰化酶 3(histone deacetylase 3, HDAC3)在妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)孕妇胎盘组织中的表达及意义。**方法:**2012 年 3 月至 2013 年 5 月在重庆医科大学附属第一医院选择 ICP 孕妇 41 例为研究对象, 包括 ICP 轻度组(19 例)、ICP 重度组(22 例), 以同期行择期剖宫产术的 20 例正常孕妇为对照组。免疫组化法检测胎盘组织中 HDAC3 的定位及表达, 蛋白印迹(Western blot)技术检测胎盘组织中 HDAC3 蛋白的表达水平, 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术检测胎盘组织中 HDAC3 mRNA 的表达水平。**结果:**(1)ICP 重度组孕妇血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)及谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase, AST)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)水平明显高于轻度组和正常对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。(2)ICP 重度组和轻度组胎盘组织中 HDAC3 蛋白和 mRNA 的表达水平均低于对照组, 分别比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。(3)胎盘组织中 HDAC3 蛋白表达水平与血清中 TNF- α 、TBA 及 ALT、AST 水平呈负相关。**结论:**HDAC3 表达下调可能与 ICP 发病及肝功能损害有关。

【关键词】妊娠期肝内胆汁淤积症; 合体滋养细胞; 组蛋白去乙酰化酶 3; 肿瘤坏死因子- α

【中图分类号】R714.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-08-10

Expression of histone deacetylase 3 in placenta with intrahepatic cholestasis of pregnancy and its significance

Zheng Jiao¹, Liu Cairu², Shao Yong¹

(1. Department of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Handan Central Hospital in Hebei Province)

【Abstract】Objective: To evaluate the expression and location of the histone deacetylase3(HDAC3) in human placenta with intrahepatic cholestasis of pregnancy(ICP) and its significance. **Methods:** Forty-one women with ICP who delivered from March 2012 to May 2013 in the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University were chosen as the study objects. They were classified into mild group($n=19$), severe group($n=22$). Twenty healthy pregnant women who delivered in the same period were chosen as the control group($n=20$). Immunohistochemical was employed to detect the expression and localization of HDAC3 protein in placenta tissue. Western blot analysis was used to quantify HDAC3 protein expression level. Real-time PCR was used to quantify HDAC3 mRNA expression level. **Results:** (1)The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), total bile acid(TBA), glutamic-oxaloacetic transaminase(ALT) and glutamic-pyruvic transaminase(AST) were significantly higher in severe groups than in mild ICP group and control group($P<0.05$). (2)The HDAC3 protein and mRNA levels in placenta were significantly lower in severe and mild groups than in control group($P<0.05$). (3)The quantitative expression of HDAC3 protein in placenta was negatively correlated with serum TNF- α , TBA, ALT and AST levels. **Conclusion:** The low expression of HDAC3 may be associated with the pathogenesis of ICP and liver function damage.

【Key words】intrahepatic cholestasis of pregnancy; syncytiotrophoblastic cell; histone deacetylase3; tumor necrosis factor- α

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis

of pregnancy, ICP)是妊娠中、晚期特有的疾病,临床上以皮肤瘙痒和黄疸为主要特征。ICP 主要危害胎儿,使围生儿病率和死亡率增高。目前其发病机制不清,可能与免疫功能失常、雌激素代谢异常、遗传和基因等因素有关,但很多 ICP 孕妇都表现出不同程度的肝功能受损。Cabrerizo 等^[1]发现 ICP 孕妇某

作者介绍:郑 蛟, Email: zhengjiao422@163.com,

研究方向:围产医学。

通信作者:邵 勇, Email: cqshaoyong@163.com。

项目基金:国家自然科学基金资助项目(编号:81471473)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2155.012.html>

(2015-03-10)

些基因启动子区甲基化水平降低,并且与血胆汁酸水平成正相关。这表明,表观遗传学的机制参与了 ICP 孕妇肝损伤的发生。

甲基化和乙酰化都是表观遗传学的一种调控机制,Li 等^[2]研究发现组蛋白去乙酰化酶 3(histone deacetylase 3,HDAC3)可以引起血胆汁酸水平下降。Chen 等^[3]研究发现,HDAC3 表达增高可使核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B,NF- κ B)表达下调,而 NF- κ B 参与调节肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-12(interleukin-12,IL-12)、白细胞介素-18(interleukin-18,IL-18)等免疫因子的表达,进而引起 ICP 孕妇肝功能受损。本研究通过检测 ICP 孕妇胎盘组织中 HDAC3 的表达,探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2012 年 3 月至 2013 年 5 月在重庆医科大学附属第一医院住院分娩的 41 例 ICP 孕妇为研究对象,包括 ICP 轻度组(19 例)、ICP 重度组(22 例)。本研究得到了重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的批准,取得了所有受试对象的知情同意。ICP 诊断标准参照中华妇产科杂志妊娠期肝内胆汁淤积症诊疗指南^[4]的 ICP 临床分度标准,均排除其他导致肝功能异常的疾病(如肝脏和胆道的急慢性疾病等)。以同期行择期剖宫产术的 20 例正常孕妇为对照组。所有研究对象均为单胎、剖宫产分娩;既往均无高血压、心脏病、肾脏病、糖尿病及甲状腺功能亢进等病史;无复发性自然流产、畸胎、死胎等不良孕产史;无吸烟、长期服用药物史。孕期无急、慢性感染性疾病;胎儿无畸形。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 清晨空腹、无菌条件下采集孕妇肘静脉血,静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液移至 EP 管中,于-80℃冰箱保存待测。同时待相应孕妇分娩时,胎盘娩出后 30 min 内,避开钙化区及坏死区,远离脐带取胎盘母体面组织 2 块,每块大小约 1 cm×1 cm×1 cm,用磷酸盐缓冲液(PBS)反复漂洗后把标本分为 2 份,一份置入 4%多聚甲醛中固定;另一份装入 EP 管中,转入-80℃冰箱保存待测。

1.2.2 采用 ELISA 法测血清中 TNF- α 水平 采用采用日立 7171A 全自动生化仪检测相应血清中 TBA、ALT 及 AST 水平。

1.2.3 免疫组化方法检测胎盘组织中 HDAC3 的定位及表达 胎盘组织标本用 4%多聚甲醛固定 24 h 后行石蜡包埋,切成 3 μ m 厚的薄片备用。操作按链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶连接(SP)法试剂盒步骤进行。兔抗人 HDAC3 多克隆抗体(GeneTex 公司)用 PBS 稀释至 1:400,PBS 代替一抗作为阴性对照,二氨基联苯胺(DAB)染色。以胎盘合体滋养细胞中各种细胞胞质和(或)胞核出现棕黄色着色视为阳性染色。

1.2.4 Western blot 检测胎盘组织中 HDAC3 蛋白的表达 按

照蛋白提取试剂盒说明书操作提取总蛋白并检测浓度,进行 SDS-PAGE 电泳,转至聚偏氟乙烯膜(PVDF),用 5%的脱脂奶粉(PBS 配制)封闭,过夜。加抗体孵育 HDAC3 一抗(兔抗人多克隆抗体)1:1 000,二抗羊抗兔 IgG 1:4 000,内参 β -actin(兔抗人单克隆抗体)1:1 000,显影。用 Gel pro4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析,测其 IOD(integrated optical density)累积光密度参考值,进行半定量比较分析,目的基因的条带灰度与内参照 β -actin 的灰度比值表示蛋白的表达水平。

1.2.5 Real-time PCR 检测胎盘组织中 HDAC3 mRNA 的表达 用 Trizol 法提取的总 RNA 逆转录合成 cDNA。HDAC3 引物:上游 5'-ACGTGGGCAACTTCCACTAC-3',下游 5'-GACTCTTGCTGAAGCCTTGC-3'; β -actin 引物:上游 5'-CATTAAGGAGAAGCTGTGCT-3',下游 5'-GTTGAAGGTAG-TTTCGTGGA-3'。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,94℃变性 20 s,58.5℃退火 20 s,72℃延伸 20 s,共 40 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 Tukey HSD 检验,计数资料用卡方检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3 组孕妇一般资料比较

各组孕妇年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。孕周比较,轻度组与重度组之间差异无统计学意义($P>0.05$),但与正常组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组孕妇瘙痒症状、早产儿发生率及羊水污染率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 3 组孕妇一般资料比较

组别	年龄 (岁)	孕周 (周±天)	瘙痒症状 (%)	早产率 (%)	羊水污染 率(%)
轻度组	28.8±4.5	37 ^{±5} ±2	52.6	26.3	26.3
重度组	28.6±5.1	37 ^{±3} ±1	72.7	45.5	54.5
正常组	29.6±3.5	39 ^{±4} ±1	0.0	0.0	0.0
F_{χ^2} 值	0.270	19.250	23.788	11.717	15.538
P 值	0.765	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 3 组孕妇血清中 TNF- α 、总胆汁酸(total bile acid,TBA)及谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase,ALT)、谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase,AST)水平比较

ICP 重度组孕妇血清中 TNF- α 、TBA 及 AST、ALT 水平明显高于轻度组和正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);ICP 轻度组孕妇血清中 TBA 及 AST、ALT 水平明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。ICP 轻度组孕妇血清中 TNF- α 水平与正常对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

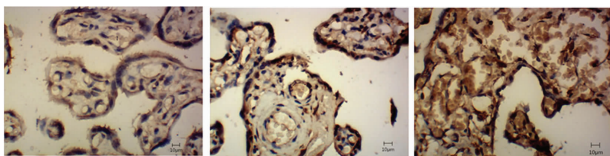
表 2 3 组血清中 TBA 及 ALT、AST 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison of expression of ALT and AST in serum ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TBA (ng/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TNF- α (ng/L)
ICP轻度组	19	22.33 $\pm$ 10.61	116.9 $\pm$ 31.2	105.1 $\pm$ 28.2	37.14 $\pm$ 3.84
ICP重度组	22	51.80 $\pm$ 21.16	351.3 $\pm$ 105.3	308.7 $\pm$ 146.1	51.75 $\pm$ 3.86
正常对照组	20	2.76 $\pm$ 1.00	17.3 $\pm$ 4.5	21.3 $\pm$ 4.1	34.19 $\pm$ 4.34
F 值		50.597	142.405	57.856	115.675
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:TNF- α 正常组与轻度组 $P=0.065$,正常组与重度组 $P=0.000$,轻度组与重度组 $P=0.000$

2.3 ICP 及正常孕妇胎盘组织中 HDAC3 的定位表达(免疫组化)

HDAC3 定位在 ICP 重度组及轻度组胎盘合体滋养细胞胞核,着色较淡,呈淡棕黄色染色;在对照组,HDAC3 也定位在胎盘合体滋养细胞中,着色部位也主要在胞核,但呈棕黄色浓染。见图 1。



A. ICP 重度组 B. ICP 轻度组 C. 正常对照组

A:ICP 重度组 HDAC3 主要定位在胎盘合体滋养细胞胞核,呈淡棕黄色染色;B:ICP 轻度组 HDAC3 主要定位在胎盘合体滋养细胞胞核,呈淡棕黄色染色;C:正常对照组 HDAC3 主要定位在胎盘合体滋养细胞胞核,但呈棕黄色浓染

图 1 HDAC3 在 3 组胎盘组织中的定位表达 (400 $\times$)

Fig.1 Expression and localization of HDAC3 protein in placenta tissue (400 $\times$)

2.4 ICP 及正常孕妇胎盘组织中 HDAC3 蛋白的定量表达 (Western blot)

Western blot 结果显示,HDAC3 在分子质量 43 kD 处有明显的蛋白条带显示。ICP 轻度组及重度组胎盘组织中 HDAC3 表达水平分别为 0.079 ± 0.021 及 0.072 ± 0.024 ,2 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),2 组明显低于对照组的 0.224 ± 0.061 ,分别比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 2、表 3。

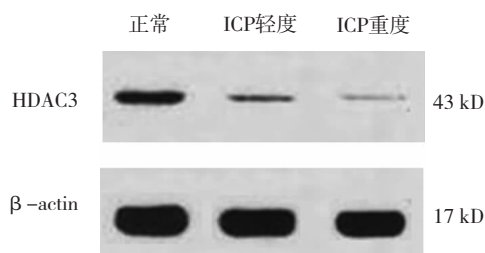


图 2 各组孕妇胎盘组织中 HDAC3 蛋白表达

Fig.2 Expression of HDAC3 protein level in placenta

表 3 3 组孕妇胎盘组织中 HDAC3 蛋白及 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)Tab.3 Expression of HDAC3 protein and mRNA level in placenta ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HDAC3蛋白	平均 CT 值	相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
ICP轻度组	19	0.079 ± 0.021	29.461 ± 0.337	1.985 ± 0.507
ICP重度组	22	0.072 ± 0.024	29.526 ± 0.462	1.899 ± 0.566
正常组	20	0.224 ± 0.061	28.729 ± 0.312	3.298 ± 0.882
F 值		93.880		27.668
P 值		0.000		0.000

注:HDAC3 蛋白及 mRNA 表达水平比较采用单因素方差分析。ICP 重度组与正常对照组比较 P 值均为 0.000,ICP 轻度组与正常对照组比较 P 值均为 0.000,ICP 重度组与轻度组比较 P 值分别为 0.827、0.91

2.5 ICP 及正常孕妇胎盘组织中 HDAC3 mRNA 的表达(real-time PCR)

ICP 轻度组及重度组胎盘组织中 HDAC3 mRNA 的表达水平均明显低于对照组,分别比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。ICP 轻度组与重度组胎盘组织中 HDAC3 mRNA 的表达水平比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

2.6 胎盘组织中 HDAC3 的定量表达与血清中 TNF- α 、TBA 及 ALT、AST 水平相关性分析

3 组孕妇胎盘合体滋养细胞中 HDAC3 的定量表达与血清中 TNF- α 、TBA 及 ALT、AST 水平呈负相关,Spearman 相关系数分别为 $r_s=-0.526, P=0.000; r_s=-0.751, P=0.000; r_s=-0.680, P=0.000; r_s=-0.729, P=0.000$ 。

3 讨论

ICP 是妊娠中晚期特有的疾病,临床上表现为皮肤瘙痒、黄疸和肝功能异常,主要危害胎儿,目前其发病机制尚不清楚,但研究显示 ICP 的发病可能与免疫失衡有一定关系。T 细胞可以分化为 Th1 和 Th2 两种类型,Th1 型细胞因子参与细胞免疫,包括:TNF- α 、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)等,Th2 型细胞因子参与体液免疫,包括:白细胞介素-4(interleukin-4, IL-

4)、白细胞介素-5(interleukin-5, IL-5)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)等。正常妊娠时,母体免疫系统从 Th1 向 Th2 方向转换;而 ICP 孕妇体内 Th1/Th2 型细胞因子平衡则由 Th2 向 Th1 方向偏移。NF- κ B 是由 p50 蛋白和 RelA 蛋白形成的异二聚体,参与调节炎症反应、免疫应答、细胞凋亡等,在调节 Th1/Th2 型细胞因子平衡中发挥着重要作用^[5-6]。有研究表明,当细胞受到刺激时,可以激活 NF- κ B,增强 TNF- α 、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等细胞因子转录,使其产生和释放增多,同时, TNF- α 、IL-1 β 又能正反馈激活 NF- κ B。在正常胎盘组织中, NF- κ B 的激活与 TNF- α 、IL-6、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)等细胞因子的增加相关, NF- κ B 转录途径是 TNF- α 、IL-6、IL-8 分泌的关键。

艾瑛和刘淑芸^[7]研究发现, ICP 孕妇胎盘组织 TNF- α 水平高于正常孕妇,本课题前期研究中也发现, IL-18、IL-12、TNF- α 在 ICP 孕妇血清中的表达高于正常孕妇^[8]。这些炎症因子通过多种途径(如:促进氧自由基生成、激活肝细胞毒性通路、增强 NK 细胞毒性等)诱导肝细胞凋亡,导致肝功能受损,血清中 AST、ALT 升高。TNF- α 还可使肝细胞对胆汁的摄取、合成、分泌发生障碍,从而导致胆汁淤积。

2001 年, Chen 等^[3]在 Science 上发表的一篇文章中指出, HDAC3 表达升高可引起 NF- κ B 的表达下降。HDAC3 蛋白是由 HDAC3 基因编码形成的蛋白质,广泛存在与多种生物中,参与调节糖脂代谢、胆汁酸代谢、胚胎发育、肿瘤的形成和转移等。它可以使 RelA 蛋白去乙酰化,从胞核转运到胞浆并且与 NF- κ B 的抑制蛋白 I κ B α 结合,从而减少 NF- κ B 的表达,继而引起 TNF- α 、IL-18 等细胞因子表达下降。Li 等^[2]用高脂饮食建立代谢紊乱综合征大鼠模型后,发现其肝脏 X 受体- α (liver X receptor- α , LXR- α)、胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)、类法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR- γ) 表达升高,血胆汁酸水平升高。CYP7A1 是胆汁酸合成的限速酶, LXR- α 的激活可以引起 CYP7A1 表达增加,从而增加胆汁酸合成。而大鼠肝细胞 HDAC3 基因的过表达则可引起 LXR- α 和 CYP7A1 mRNA 和蛋白的表达下降。这就表明, HDAC3 可能通过降

低 LXR- α 和 CYP7A1 的表达来减少胆汁酸的合成,从而降低血胆汁酸水平,而血胆汁酸水平升高是 ICP 孕妇一个重要的特征。

本研究初步探讨了 HDAC3 在 ICP 孕妇胎盘上的定位和表达,以及血清中 TNF- α 、TBA、ALT、AST 的表达水平。结果显示: HDAC3 定位于胎盘合体滋养细胞的细胞核上,其蛋白及 mRNA 的表达 ICP 组明显低于正常对照组;而血清中 TNF- α 、TBA 及 AST、ALT 的表达, ICP 组则明显高于正常对照组;并且胎盘组织上 HDAC3 的表达量与血清中 TNF- α 、TBA 及 ALT、AST 水平呈负相关。本研究提示: HDAC3 可能参与了 ICP 孕妇的免疫失衡。ICP 孕妇胎盘组织上 HDAC3 表达下调,可能通过激活 NF- κ B 介导的炎症通路,引起 ICP 孕妇 TNF- α 等炎症因子表达上调,而 TNF- α 参与了 ICP 孕妇肝细胞损伤,进而导致其肝功能受损,胆汁淤积,血清 AST、ALT 和 TBA 水平升高。

参 考 文 献

- [1] Cabrerizo R, Castaño GO, Burgueño AL, et al. Promoter DNA methylation of farnesoid x receptor and pregnane x receptor modulates the intrahepatic cholestasis of pregnancy phenotype[J]. PLoS One, 2014, 31, 9(1): e87697.
- [2] Li D, Wang X, Ren W, et al. High expression of liver histone deacetylase 3 contributes to high-fat-diet-induced metabolic syndrome by suppressing the PPAR- γ and LXR- α pathways in E3 rats[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 344(1-2): 69-80.
- [3] Chen L, Fischle W, Verdin E, et al. Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation[J]. Science, 2001, 293(5535): 1653-1657.
- [4] 妊娠期肝内胆汁淤积症诊疗指南(第1版)[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(5): 391-395.
- [5] 彭冰, 刘淑芸. 辅助性 T 淋巴细胞亚型与妊娠期肝内胆汁淤积症发病的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(9): 516-518.
- [6] Hadfield KA, McCracken SA, Ashton AW, et al. Regulated suppression of NF- κ B throughout pregnancy maintains a favourable cytokine environment necessary for pregnancy success[J]. J Reprod Immunol, 2011, 89(1): 1-9.
- [7] 艾瑛, 刘淑芸. 转化生长因子 β 2 对妊娠肝内胆汁淤积症患者胎盘组织分泌肿瘤坏死因子 α 及 γ 干扰素的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(5): 322-325.
- [8] 金萍, 邵勇. 妊娠期肝内胆汁淤积症患者血清中 IL-18、IL-12 及 TNF- α 的水平变化及临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(5): 329-332.

(责任编辑: 冉明会)