

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003358

不同性激素诱导的 SD 大鼠妊娠期肝内胆汁淤积症模型的肝脏病理生理研究

张丹,邵勇,陈昶,张华

(重庆医科大学附属第一医院妇产科、重庆医学生命科学研究所,重庆 400016)

【摘要】目的:通过分析雌二醇、孕酮诱导的大鼠妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)模型的肝脏损伤水平、胆汁酸谱以及炎症因子、氧化应激水平,探索妊娠期肝内胆汁淤积的发病机制。**方法:**妊娠期 Sprague-Dawley(SD)大鼠颈部皮下注射雌二醇或孕酮构建大鼠ICP模型。通过检测血清总胆汁酸(total bile acid, TBA)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平评价模型是否成功;通过肝脏病理切片评价肝脏损伤情况;采用液相色谱-质谱联用仪分析肝脏胆汁酸谱;使用RT-qPCR检测肝脏中炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的转录水平;使用试剂盒检测肝脏氧化和抗氧化标志物丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的水平;采用RT-qPCR 和 Western blotting 检测肝脏抗氧化应激标志物核因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶修饰亚基(glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)、NAD(P)H 酰氧化还原酶-1[NAD(P)H quinone oxidoreductase-1, NQO1]、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的 mRNA 和蛋白质水平。**结果:**雌激素组、孕激素组大鼠血清 TBA、ALT、AST、ALP 水平均较对照组显著升高。HE 染色显示雌激素组大鼠肝血窦变窄,胆汁淤积;孕激素组部分肝细胞水肿,少量脂肪变性细胞出现。胆汁酸谱在各组间有较大差异。雌激素组肝脏中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MDA 水平上升,而 GSH、SOD 和 NRF2、GCLM、GCLC、NQO1 的 mRNA 和蛋白质水平下降,而孕激素组均无明显变化。**结论:**雌激素、孕激素均能诱导大鼠发生 ICP,其中雌激素可抑制 NRF2-GCLM、NRF2-GCLC 通路并导致肝脏损伤加重,而孕激素则无以上作用。

【关键词】妊娠期肝内胆汁淤积症;雌激素;孕酮;胆汁酸谱;氧化应激

【中图分类号】R714

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-09-01

Liver pathophysiology of Sprague-Dawley rat models of intrahepatic cholestasis of pregnancy induced by different sex hormones

Zhang Dan, Shao Yong, Chen Chang, Zhang Hua

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Institute of Life Science,
Chongqing Medical University)

【Abstract】**Objective:** To explore the pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) in rats induced by either estradiol or progesterone, through determining the levels of liver damage, bile acid profiles, inflammatory factors, and oxidative stress. **Methods:** ICP models were established by subcutaneous injection of either estradiol or progesterone in the neck of Sprague-Dawley (SD) rats during pregnancy. The models were evaluated by measuring the levels of TBA (serum total bile acid), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), and ALP (alkaline phosphatase). Liver injury was evaluated through pathological section observation. The bile acid profiles of the liver were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry. The transcription levels of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α [TNF- α], interleukin[IL]-1 β , and IL-6) in the liver were measured using RT-qPCR. The levels of oxidative and antioxidative markers (malondialdehyde[MDA], glutathione[GSH], and superoxide dismutase[SOD]) were determined using commercial kits. The mRNA and protein levels of antioxidative stress markers (nuclear factor erythroid 2-related factor 2[NRF2], glutamate-cysteine ligase modifier subunit[GCLM], glutamate-cysteine ligase catalytic subunit[GCLC], NAD(P)H quinone oxidoreduc-

tase-1[NQO1], and heme oxygenase-1[HO-1]) in the liver were determined using RT-qPCR and Western blotting, respectively.

Results: The levels of serum total bile acid, ALT, AST, and ALP in the estradiol group and progesterone group were significantly higher than those in the control group. HE staining showed narrower hepatic sinusoids and cholestasis in the estradiol group and hepatocyte

作者介绍:张丹,Email:2020110259@stu.cqmu.edu.cn,

研究方向:妊娠期肝内胆汁淤积症,妊娠期糖尿病。

通信作者:张华,Email:zhanghua@hospital.cqmu.edu.cn。

优先出版:<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20231101.1351.008>

(2023-11-02)

swelling and mild hepatic steatosis in the progesterone group. The bile acid profiles were significantly different between the groups. In the estradiol group, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MDA in the liver were significantly increased, while the levels of GSH and SOD as well as the mRNA and protein levels of NRF2, GCLM, GCLC and NQO1 were significantly decreased, with no significant changes in the progesterone group. **Conclusion:** Both estrogen and progesterone induce ICP in rats. Estrogen can inhibit the NRF2-GCLM and NRF2-GCLC pathways to aggravate liver injury, while progesterone has no such effect.

[Key words] intrahepatic cholestasis of pregnancy; estrogen; progesterone; bile acid profile; oxidative stress

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠期特发的一种肝内胆汁淤积症,以母体瘙痒、血清总胆汁酸浓度升高、转氨酶升高为特征^[1-3],影响0.3%~5.6%的孕妇^[4]。ICP可能导致包括早产、胎儿窘迫和死胎在内的严重后果^[5-6]。已有研究表明,ICP与环境、免疫失衡和遗传变异等因素密切相关^[7],但确切的发病机制尚不清楚。

目前认为ICP的发生可能与性激素有关,雌、孕激素都可用于建立ICP动物模型^[8]。然而,两种激素在ICP的发生过程中分别扮演什么角色?采用2种激素建立的ICP动物模型有何差异?这些关键问题尚不明确,不利于ICP动物模型的标准化和不同研究之间的数据比较,更不利于阐明ICP的发病机制。

临床以血清总胆汁酸浓度作为ICP的诊断标准之一。然而,本课题组的前期研究发现,血清胆汁酸谱比血清总胆汁酸更有助于ICP的分级^[9]。血清胆汁酸源于肝脏,可间接反映胆汁酸的肝-肠循环状态。然而,能更直观显示ICP过程中胆汁酸生成和循环状态的肝组织胆汁酸谱,尚未得到充分研究。

此外,有研究表明,氧化应激在肝内胆汁淤积症的病理过程中起主要作用^[10]。转录因子核因子红系2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)是细胞异生和氧化应激反应的主要协调因子之一,具有抗炎作用^[11]。NRF2在正常条件下调节细胞对氧化损伤的反应和大多数抗氧化酶的表达。它作为抗氧化反应元件与启动子序列结合并激活基因,启动新的抗氧化酶的转录^[11]。有证据表明,胆汁淤积的患者肝脏过氧化反应增加,抗氧化反应减少^[2,12]。另一方面,ICP患者的血清中也存在氧化应激标志物^[13],但ICP患者是否存在肝内氧化应激尚不明确。

综上,本研究拟分别使用雌激素和孕激素建立大鼠ICP模型,然后观察其肝脏中ICP相关指标,包括肝脏损伤程度、胆汁酸谱、炎症因子,以及氧化与抗氧化标志物的表达,旨在探索雌、孕激素在ICP发生发展中的作用及机制,为ICP的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 药物

丙二醇,购自北京索莱宝科技有限公司,货号:P7071。雌二醇,购自美国Sigma-Aldrich公司,货号:E8875。孕酮,购自美国Sigma-Aldrich公司,货号:P0130。

1.2 实验动物及处理

本研究通过重庆医科大学伦理委员会批准,批准号为2021073。由重庆医科大学实验动物中心提供SPF级成熟未交配的6~8周Sprague-Dawley雌性大鼠21只,体质量(200±20)g,使用许可证号为YXK(渝)2012-0001。重庆医科大学IVC动物房常年保持相对恒定的室内温度21~25℃,每日光照时间12 h(08:00~20:00),室内相对湿度30%~70%,使用标准动物饲料喂养,所有大鼠均可自由饮水和进食。

大鼠按照2:1比例合笼饲养,每天清晨于显微镜下观察雌鼠阴道分泌物涂片,从发现精子之日起定为妊娠第1天,分笼饲养至妊娠14 d。

对照组(Con)于孕14 d起每天颈部皮下注射雌、孕激素溶剂丙二醇。雌激素组(Est)于孕14 d起每天颈部皮下注射5 mg/kg雌二醇,孕激素组(Pro)于孕14 d起每天颈部皮下注射孕酮225 mg/kg,连续注射5 d。于妊娠第21天内眦取血后颈椎脱臼处死,取肝脏。

1.3 实验方法

1.3.1 血清生化标志物 血清总胆汁酸(total bile acid, TBA)含量采用酶循环法测定。血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平使用商用试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国)测定。

1.3.2 苏木精-伊红(HE)染色 取大鼠肝脏组织,按照要求制备石蜡切片,用二甲苯脱蜡,酒精水化,用苏木精染料进行染色,冲洗,再用0.1%酸乙醇进行分化,伊红液染色,冲洗,然后用酒精进行醇洗以及脱水,用二甲苯进行透明,使用树脂封片,在光学显微镜下观察并采集图像。

1.3.3 肝脏胆汁酸谱分析 取50 mg肝组织,加入20 μL浓度为1 μg/mL的胆酸-d4内标,然后加入1 mL甲醇匀浆。离心后取上清液,真空干燥后复溶于100 μL 50%甲醇,采用已建立的液相色谱-质谱联用方法检测胆汁酸水平^[14]。

1.3.4 肝脏氧化和抗氧化应激指标 取100 mg肝脏加入900 mL生理盐水,4℃匀浆,以3 500 r/min 4℃离心10 min。上清液用于丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化

酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的试剂盒检测(南京建成生物工程研究所,中国)。

1.3.5 RT-qPCR 按照试剂盒说明书(湖南艾科瑞生物技术有限公司,中国)提取肝脏中总 mRNA, 使用 NanoDrop one/One C 测定各组样本中 mRNA 浓度。按照反转录酶试剂盒说明书(湖南艾科瑞生物技术有限公司,中国), 将总 mRNA 反转录成 cDNA。根据 SYBR Green Master Mix 说明书(艾科瑞生物技术有限公司), 利用 BioRad CFX-96 PCR 仪进行扩增。基因表达量通过公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行换算。所有实验均重复 3 遍。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')
NRF2-F	CAGCATAGAGCAGGACATGGAG
NRF2-R	GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG
GCLM-F	TCTCTGCTGTGATGCCACAG
GCLM-R	GCTTCCTGGAAACTTGCCCTAG
GCLC-F	ACACCTGGATGATGCCAACGAG
GCLC-R	CCTCCATTGGTCGGAACCTCTAC
NQO1-F	GCCGAACACAAGAAGCTGGAAG
NQO1-R	GGCAAATCCTGCTACGAGCACT
HO1-F	CACTCTGGAGATGACACCTGAG
HO1-R	GTGTTCCCTGTCAGCATCAC
TNF- α -F	CGTCAGCCGATTGCCCCATT
TNF- α -R	TCCCTCAGGGTGCCTTAG
IL-1 β -F	GCACAGTTCCCCAACTGGTA
IL-1 β -R	TGTCCCGACCATTGCTGTTT
IL-6-F	TGCACTGTCAGAAAACAATCTG
IL-6-R	CCAGAGCAGATTTCAATAGGC
β -actin-F	GTACTAGTCGTCAGCTAGTAGT
β -actin-R	GCTAGTCAGTCAGCTAGCTAT

1.3.6 Western blot 称取肝脏组织 50 mg, 加入适量含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA(上海碧云天生物技术有限公司)充分裂解蛋白。用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度, 然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结束后将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, 按照 1:1 000 稀释一抗, 4 °C 孵育过夜。第二天用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 按照 1:5 000 稀释二抗, 常温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 用 Fusion(Vilber Lourmat, 法国)和 ECL 化学

发光剂检测条带。所有实验重复 3 遍。

1.4 统计学方法

正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 GraphPad 8 Prism(版本 8.4.0)经单因素方差分析比较组间差异, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 血清生化指标

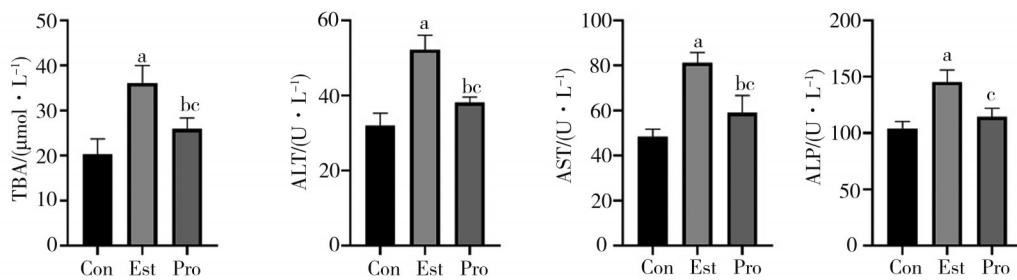
与对照组比较, Est 组的 TBA、ALT、AST、ALP 水平, Pro 组的 TBA、ALT、AST 水平显著升高($P=0.000$, 图 1)。以上结果表明 2 种激素均可建立大鼠 ICP 模型。

2.2 肝脏病理变化

肉眼观, 对照组大鼠的肝脏光滑柔软, 边缘锐利。Est 组肝脏可见棕色颗粒沉积, 部分肝脏出现局部组织坏死。Pro 组与对照组类似, 柔软光滑, 未见明显异常。与对照组相比, Est 组大鼠肝脏/体重比增加($P=0.000$, 图 2A), Pro 组肝脏/体重比无明显变化。HE 染色结果显示, 对照组肝细胞以中心静脉为中心向四周放射, 肝细胞排列整齐, 肝板结构以及肝血窦正常无紊乱。Est 组肝细胞排列紊乱, 出现点状坏死, 肝血窦变窄, 部分炎性细胞浸润, 胆栓形成。Pro 组肝细胞水肿, 少量脂肪变性细胞出现(图 2B~D)。

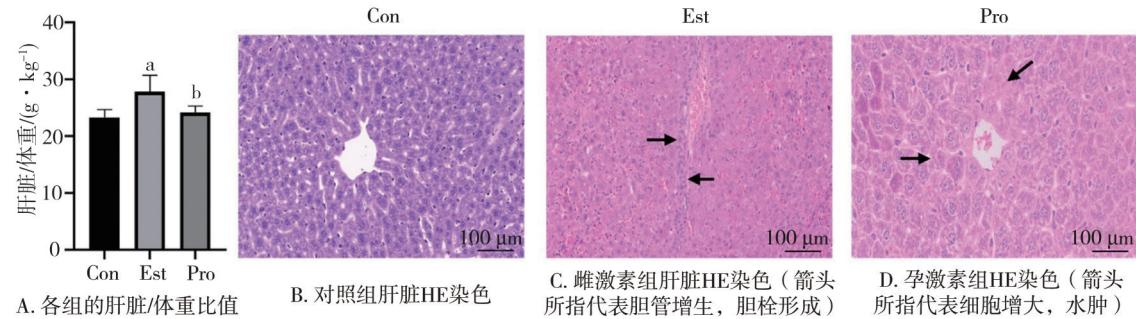
2.3 肝脏胆汁酸谱

对照组、Est 组与 Pro 组表现出不同的肝脏胆汁酸谱。Est 组牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)、猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid, HDCA)、甘氨熊去氧胆酸(Glycyrtodeoxycholic acid, GUDCA)、12-氧代脱氧胆酸(12-oxydeoxycholic acid, 12-OXO-CDCA)、7-氧代石胆酸(7-oxylithocholic acid, 7-OXO-LCA)的水平显著高于对照组, 去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)、甘氨鹅去氧甘胆酸(Glycinodeoxycholic acid, GCDCA)的水平显著低于对照组。相反, Pro 组主要表现为较高浓度的猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid, HDCA)、鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)、熊去氧胆酸(ursodesoxycholic acid, UDCA)和较低浓度的去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)、甘氨胆酸(glycocholic acid, GCA)、去甲胆酸(Norcholesterol acid, NCA)($P=0.000$, 图 3)。



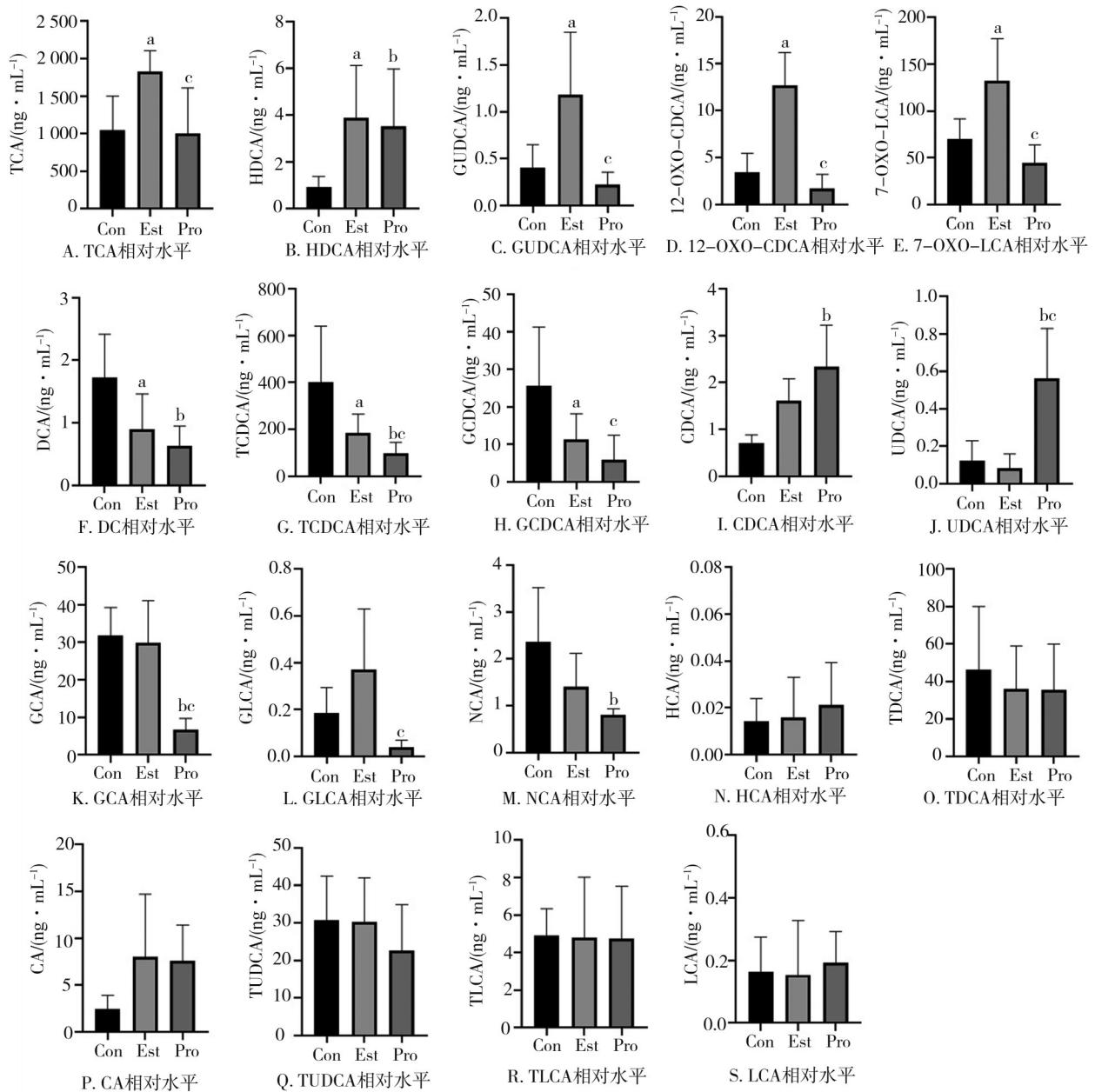
注:a, 与 Con 组比较, $P=0.000$; b, 与 Con 组比较, $P=0.000$; c, 与 Est 组比较, $P=0.000$

图 1 SD 大鼠血清中的 TBA、ALT、AST、ALP 水平($\bar{x} \pm s$, n=7)



注:a,与Con组比较,P=0.000;b:与Est组比较,P=0.000

图2 SD大鼠肝脏/体重比和肝脏HE染色($\bar{x} \pm s, n=7$)



注:a,与Con组比较,P=0.000;b:与Con组比较,P=0.000;c:与Est组比较,P=0.000

图3 各组SD大鼠肝脏中胆汁酸的相对浓度($\bar{x} \pm s, n=7$)

2.4 肝脏炎症因子

与对照组相比,Est 组肝脏炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的 mRNA 水平均显著上升,但孕激素组肝脏的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平无显著变化(图4)。

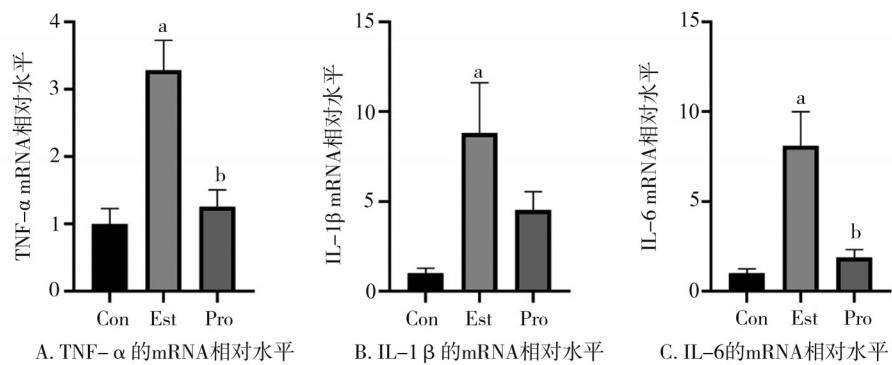
2.5 肝脏氧化和抗氧化应激指标

与对照组比较,Est 组 MDA 水平显著上升,GSH、SOD 水平显著下降,孕激素组的 MDA、GSH、SOD 的水平无明显变

化(图5)。

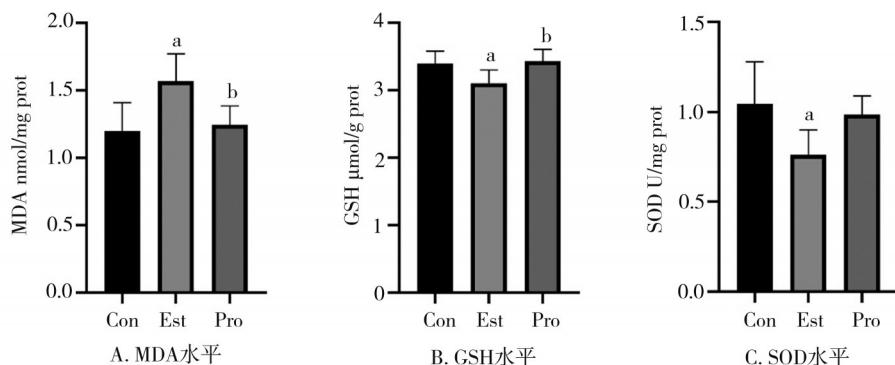
2.6 雌激素抑制 NRF2 通路

为了验证雌孕激素是否通过调节 NRF2 调节氧化应激与抗氧化应激通路,我们运用 RT-qPCR 以及 Western blotting 检测 NRF2、GCLC、GCLM、NQO-1、HO-1 mRNA 水平与蛋白表达水平的变化。结果显示,与对照组相比,Est 组 NRF2、GCLC、GCLM、NQO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降。而 Pro 组 NRF2、GCLC、GCLM、NQO-1、HO-1 的 mRNA 和蛋白水平无明显差异(图6、7)。



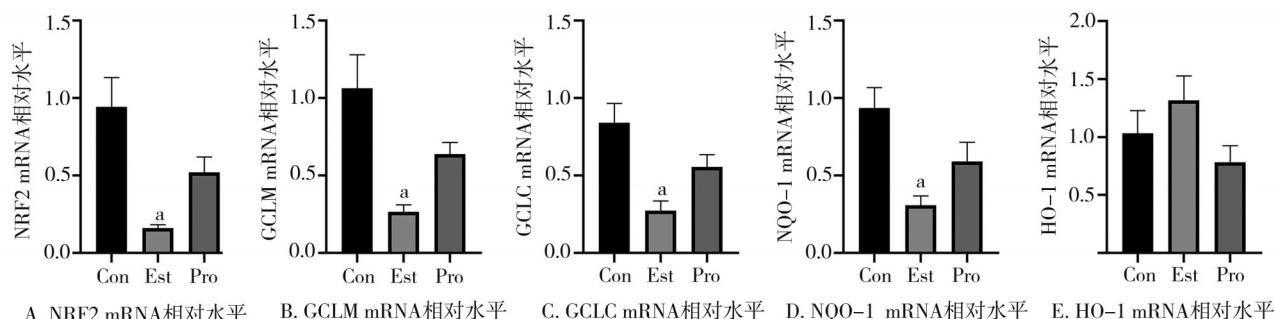
注:a,与 Con 组比较, $P=0.000$; b:与 Est 组比较, $P=0.000$

图4 各组 SD 大鼠肝脏 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对水平 ($\bar{x} \pm s, n=7$)



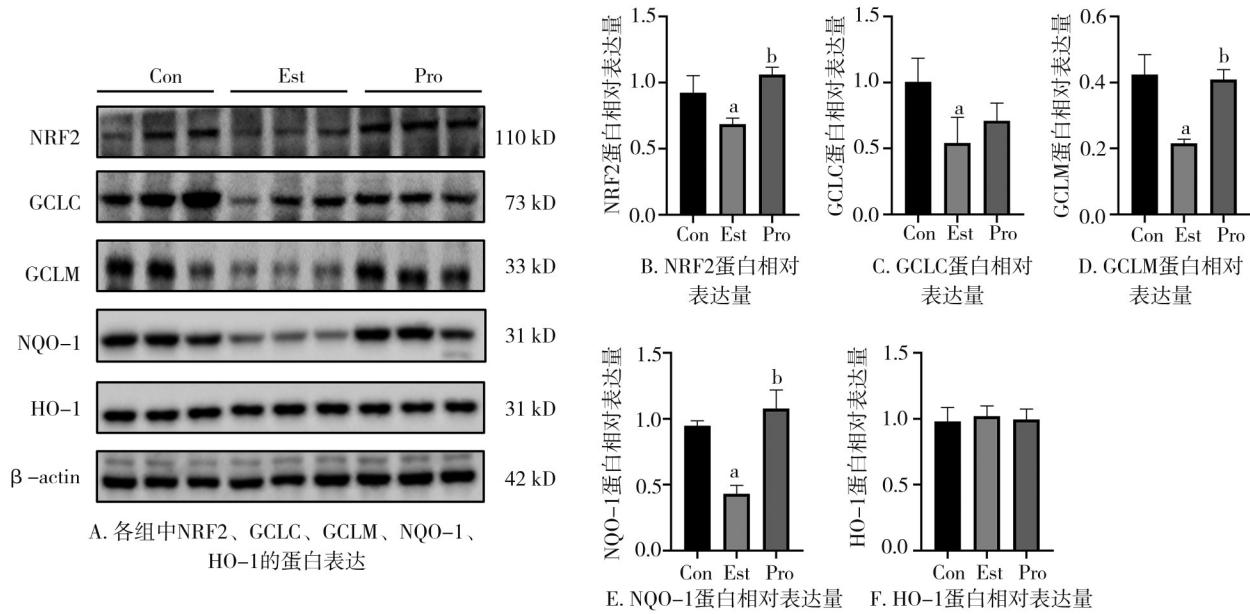
注:a,与 Con 组比较, $P=0.000$; b:与 Est 组比较, $P=0.000$

图5 各组 SD 大鼠肝脏 MDA、GSH、SOD 水平 ($\bar{x} \pm s, n=7$)



注:a,与 Con 组比较, $P=0.000$

图6 各组 SD 大鼠肝脏 NRF2、GCLC、GCLM、NQO-1、HO-1 mRNA 相对水平 ($\bar{x} \pm s, n=7$)



注:a,与Con组比较, $P=0.000$;b:与Est组比较, $P=0.000$

图7 各组SD大鼠NRF2、GCLC、GCLM、NQO-1、HO-1蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨 论

本研究采用雌激素和孕激素分别建立了大鼠ICP模型，并观察到了一些典型的ICP特征，但是雌激素和孕激素诱导的大鼠ICP模型的肝脏的病理生理指标有所差异，可能涉及不同的机制。

本研究中发现雌、孕激素组血清TBA、ALT、AST的水平明显上升，与临幊上妊娠期肝内胆汁淤积的总胆汁酸和血清转氨酶水平变化一致^[13,15]，说明雌、孕激素都可用于建立大鼠妊娠期肝内胆汁淤积症模型。

在雌孕激素诱导的ICP模型中，肝细胞排列紊乱，出现点状坏死，肝血窦变窄，部分炎性细胞浸润。孕激素诱导的ICP模型中，出现肝细胞水肿，少量脂肪变性细胞。目前尚未有ICP病人的肝脏病理组织报道，但胆汁淤积的患者的肝脏病理结果显示大量炎性细胞浸润和肝板结构紊乱，胆栓形成^[16]，这与雌激素诱导的ICP模型相似。

对雌、孕激素诱导的大鼠ICP模型的肝脏胆汁酸谱分析发现，雌激素组和孕激素组出现了不同的胆汁酸代谢模式，包括GUDCA、UDCA、12-OXO-CDCA、7-OXO-LCA、GCA、GLCA在内的胆汁酸水平在雌激素和孕激素组之间出现较大差异。由于不同的胆汁酸具有不同的药理作用和毒性，因此可能造成不同的病理后果。在以往的研究中，发现血清胆汁酸谱能反映ICP的亚型^[19]，本研究肝脏胆汁酸谱的分析进一步揭示，不同的ICP动物模型表现为不同的肝脏胆汁酸代谢特征。

有研究指出，肝脏中有毒胆汁酸的积累会引起包括肝细胞、胆管细胞等多种细胞的炎症反应^[17]，加重肝脏内部的胆汁淤积，进一步导致肝脏细胞毒性，诱发细胞凋亡和氧化应激^[18]。以往研究中发现ICP血清促炎细胞因子水平显著升高^[11]，表明炎症会导致肝脏损伤。通过RT-qPCR结果发现雌激素诱导的ICP大鼠中肝脏炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6水平显著升高，说明雌激素诱导的ICP大鼠肝脏存在炎症，这与临床报道的ICP患者血清炎症因子TNF-α、IL-6水平增高的结果相似^[19]。但孕激素组的炎症因子水平没有明显变化，这可能与孕激素的抗炎作用有关^[20]。

氧化应激在胆汁淤积类疾病中发挥关键作用，临床研究表明阻塞性胆汁淤积和ICP患者血清氧化应激标志物水平较高^[12]，但抗氧化应激指标降低^[21]。最近的一些研究表明，梗阻性黄疸患者表现出明显的氧化应激和低谷胱甘肽水平^[2]。还有研究显示，ICP患者的血清抗氧化应激指标8-isoPGF2α和GSH-Px低于正常孕妇，表明ICP患者体内氧化应激与抗氧化应激的失衡^[21]，这与我们在雌激素诱导大鼠ICP模型中观察到的抗氧化应激指标的下降一致，如MDA水平升高以及SOD和GSH水平降低。然而，孕激素组的抗氧化应激指标并没有明显变化，这可能与孕激素在肝脏和神经中的抗氧化作用有关^[22-23]。

有证据表明，NRF2在胆汁酸代谢和胆汁酸相关肝病中起关键作用^[24-25]。天然的NRF2激活剂可

以缓解胆汁淤积,对于肝脏具有保护作用^[26]。研究表明,石胆酸可以激活NRF2并触发胆汁淤积中对胆汁酸毒性的适应性抗氧化反应^[27]。但我们发现雌激素组的NRF2-GCLM/NRF2-GCLC通路受到抑制,说明雌激素组的肝脏中抗氧化反应减少,可能进一步导致了有毒性胆汁酸在肝脏中的沉积,加重了肝脏中的炎症负荷,增加了炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的水平。

综上所述,从肝脏转氨酶、病理变化、胆汁酸谱以及氧化-抗氧化应激的角度出发,雌激素和孕激素诱导ICP发生的机制并不相同。其中雌激素所致的大鼠ICP模型与ICP的临床表现更接近,这也进一步提示ICP的发生可能与雌激素的关系更大,可以考虑将雌激素作为未来ICP诊断和治疗研究的优选方向。

参 考 文 献

- [1] Ovadia C, Sajous J, Seed PT, et al. Ursodeoxycholic acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy: a systematic review and individual participant data meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2021, 6(7):547-558.
- [2] Assimakopoulos SF, Thomopoulos KC, Patsoukis N, et al. Evidence for intestinal oxidative stress in patients with obstructive jaundice [J]. Eur J Clin Invest, 2006, 36(3):181-187.
- [3] Palmer KR, Liu XH, Mol BW. Management of intrahepatic cholestasis in pregnancy[J]. Lancet, 2019, 393(10174):853-854.
- [4] Bicocca MJ, Sperling JD, Chauhan SP. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: review of six national and regional guidelines[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2018, 231:180-187.
- [5] Germain AM, Carvajal JA, Glasinovic JC, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an intriguing pregnancy-specific disorder[J]. J Soc Gynecol Investig, 2002, 9(1):10-14.
- [6] Reid R, Ivey KJ, Rencoret RH, et al. Fetal complications of obstetric cholestasis[J]. Br Med J, 1976, 1(6014):870-872.
- [7] Han F, Xu LH, Huang YQ, et al. Magnesium sulphate can alleviate oxidative stress and reduce inflammatory cytokines in rat placenta of intrahepatic cholestasis of pregnancy model[J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 298(3):631-638.
- [8] 张利平, 刘建. 雌孕激素诱导妊娠期肝内胆汁淤积症的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3):320-321.
- Zhang LP, Liu J. Estrogen and progesterone induced intrahepatic cholestasis of pregnancy study[J]. Int J Lab Med, 2011, 32(3):320-321.
- [9] Shao Y, Chen SY, Li H, et al. Maternal bile acid profile and subtype analysis of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Orphanet J Rare Dis, 2021, 16(1):259.
- [10] Xiang D, Yang JY, Xu YJ, et al. Estrogen cholestasis induces gut and liver injury in rats involving in activating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways[J]. Life Sci, 2021, 276:119367.
- [11] Biberoglu E, Kirbas A, Daglar K, et al. Role of inflammation in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2016, 42(3):252-257.
- [12] Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD. Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis[J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(2):195-204.
- [13] Wu KQ, Yin BN, Li S, et al. Prevalence, risk factors and adverse perinatal outcomes for Chinese women with intrahepatic cholestasis of pregnancy: a large cross-sectional retrospective study[J]. Ann Med, 2022, 54(1):2966-2974.
- [14] Li Y, Zhang D, Mo Y, et al. Simultaneous determination of sex hormones and bile acids in rat plasma using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method[J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 223:115139.
- [15] Manzotti C, Casazza G, Stimac T, et al. Total serum bile acids or serum bile acid profile, or both, for the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 7(7):CD012546.
- [16] Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis[J]. Semin Liver Dis, 2004, 24(1):21-42.
- [17] Chen ML, Takeda K, Sundrud MS. Emerging roles of bile acids in mucosal immunity and inflammation[J]. Mucosal Immunol, 2019, 12(4):851-861.
- [18] Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(36):4985-4993.
- [19] Zhang Y, Hu LQ, Cui Y, et al. Roles of PPAR γ /NF- κ B signaling pathway in the pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e87343.
- [20] Fedotcheva TA, Fedotcheva NI, Shimanovsky NL. Progesterone as an anti-inflammatory drug and immunomodulator: new aspects in hormonal regulation of the inflammation[J]. Biomolecules, 2022, 12(9):1299.
- [21] Hu YY, Liu JC, Xing AY. Oxidative stress markers in intrahepatic cholestasis of pregnancy: a prospective controlled study[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(17):3181-3186.
- [22] Nouri A, Hashemzadeh F, Soltani A, et al. Progesterone exerts antidepressant-like effect in a mouse model of maternal separation stress through mitigation of neuroinflammatory response and oxidative stress[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1):64-71.
- [23] Alese MO, Bamisi OD, Alese OO. Progesterone modulates cadmium-induced oxidative stress and inflammation in hepatic tissues of Wistar rats[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2021, 14(10):1048-1055.
- [24] Khambu B, Li TG, Yan SM, et al. Hepatic autophagy deficiency compromises farnesoid X receptor functionality and causes cholestatic injury[J]. Hepatology, 2019, 69(5):2196-2213.
- [25] Yan Y, Wang K, Tang X, et al. Phytochemicals protect L02 cells against hepatotoxicity induced by emodin via the Nrf2 signaling pathway [J]. Toxicol Res, 2019, 8(6):1028-1034.
- [26] He LF, Guo CC, Peng C, et al. Advances of natural activators for Nrf2 signaling pathway on cholestatic liver injury protection: a review[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 910:174447.
- [27] Tan KP, Wood GA, Yang M, et al. Participation of nuclear factor (erythroid 2-related), factor 2 in ameliorating lithocholic acid-induced cholestatic liver injury in mice[J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(5):1111-1121.

(责任编辑:李青颖)