

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170287

妊娠期胆汁淤积症孕妇胎盘组织 TP63 的表达及其与血高胆酸的相关性

丁 晨¹, 吴维宾¹, 蔡 眉², 张慧娟^{1*}

1. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院病理科 & 生物样本库, 上海 200030

2. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院检验科, 上海 200030

[摘要] **目的:**检测妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)及正常妊娠孕妇胎盘组织 TP63 的表达,并探讨其与血胆酸水平的相关性。**方法:**选择 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院分娩的 ICP 患者 70 例(ICP 组)及正常妊娠孕妇 44 例(对照组)作为研究对象。采用免疫组化法评估两组孕妇胎盘组织 TP63 的表达水平。采用 RT-qPCR 检测不同浓度胆汁酸作用对滋养细胞株 JAR 细胞 TP63 mRNA 表达水平的影响。**结果:**ICP 组患者胎盘滋养细胞(绝大部分为细胞滋养细胞)中 TP63 表达低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。胎盘组织中 TP63 的表达与孕妇血清胆酸水平负相关($r=-0.679, P<0.001$)。高浓度胆汁酸可引起 JAR 细胞中 TP63 mRNA 的表达量下降($P<0.05$)。**结论:**高胆酸引起的胎盘滋养细胞中 TP63 低表达可通过减弱细胞增殖能力参与 ICP 发生发展。

[关键词] 妊娠期肝内胆汁淤积症;胎盘;TP63;免疫组织化学;胆酸**[中图分类号]** R 714.255 **[文献标志码]** A

Expression of placental tissue TP63 in pregnant women with ICP and its correlation with excessive bile acid

DING Chen¹, WU Wei-bin¹, CAI Mei², ZHANG Hui-juan^{1*}

1. Departments of Pathology & Bio-bank, the International Peace Maternity & Child Health Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine, Shanghai 200030, China

2. Departments of Laboratory, the International Peace Maternity & Child Health Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective:** To compare the expression of TP63 in placentas from intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) patients and normal pregnant women, and to discuss the relationship between bile acid and TP63. **Methods:** Retrospective study was conducted on 70 placentas from ICP patients (ICP group) and 44 placentas from normal term pregnancy (control group). The samples were collected from January 2012 to December 2014 in the International Peace Maternity & Child Health Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. Immunohistochemistry assay was applied to evaluate the protein expression of TP63 in placentas of the two groups. In addition, the mRNA level of TP63 was tested by RT-qPCR assay in trophoblastic cell line JAR after pretreating with different concentrations of bile acids. **Results:** TP63 was majorly localized in cytotrophoblasts. The expression level of TP63 in placentas from ICP group were significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). Moreover, the expression of TP63 was negatively correlated with total bile acid level in maternal serum at delivery ($r=-0.679, P<0.001$). Treatment with high concentration of bile acids reduced the mRNA level of TP63 in JAR cells. **Conclusions:** Down regulation of TP63 by excessive bile acids in placental trophoblasts would contribute to the progression of ICP possibly by attenuating the proliferation of trophoblasts.

[Key Words] intrahepatic cholestasis of pregnancy; placenta; TP63; immunohistochemistry; bile acid

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠期特有的并发症,以孕中晚期可能出现皮肤瘙痒、黄疸等不适

为主要临床表现。实验室检查可发现孕妇空腹血清胆汁酸水平升高或伴随肝脏转氨酶异常。目前多数学者认为,ICP对母体无严重危害,但明显增加

[收稿日期] 2017-04-07 **[接受日期]** 2017-05-20**[基金项目]** 上海市卫生和计划生育委员会面上项目(201640033). Supported by General Fund of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201640033).**[作者简介]** 丁 晨,硕士生,住院医师. E-mail: reddyspnea_13@hotmail.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64070434-29905, E-mail: zhanghj815@126.com

早产、胎儿宫内窘迫及围产儿死亡的发生率^[1-4]。ICP的病因目前尚未明确。ICP患者母血、脐血、羊水及胎粪中胆汁酸水平明显增高,因此胆汁酸增高被认为是导致ICP不良妊娠结局的主要原因之一^[5-6]。Glantz等^[7]的研究发现,当母血中胆汁酸大于等于40 $\mu\text{mol/L}$ 时,胆汁酸每升高1 $\mu\text{mol/L}$,胎儿并发症的发生率就增加1%~2%,提示母-胎循环系统内胆汁淤积是胎儿不良结局的关键^[7]。

TP63是p53的同源基因,人类TP63基因位于染色体3q27-3q29区。TP63参与调控转录和凋亡,在表皮发育与衰老中起重要作用并与肿瘤发生有关。TP63主要表达于多种上皮组织的基底层干细胞及某些肿瘤中^[8]。我们前期研究^[6,9]发现,滋养细胞中TP63高表达与妊娠滋养细胞疾病的发生发展有关,且提示TP63下调可能与ICP胎盘滋养细胞老化有关。因此,本研究通过比较ICP与正常妊娠胎盘组织中滋养细胞TP63的表达差异,并通过体外实验观察胆汁酸处理后JAR细胞TP63的表达水平变化,探讨胆汁酸能否通过TP63影响滋养细胞功能,并参与ICP发生发展。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012年1月至2014年12月在上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院分娩的产妇共114例,其中ICP组70例,正常对照组44例。纳入标准:对照组为足月妊娠,无妊娠并发症及合并症。ICP诊断标准按中华医学会儿科学分会产科学组颁布的ICP诊疗指南(2015版)^[10],即:妊娠中晚期出现空腹血清总胆酸(TBA)水平升高($\geq 10 \mu\text{mol/L}$),或伴有转氨酶升高;皮肤瘙痒,或伴不同程度黄疸;妊娠终止后症状和生化指标恢复正常。排除标准:多胎妊娠、其他妊娠期皮肤病、其他引起肝功能异常的疾病。收集研究对象的基本资料,包括产妇年龄、孕周、是否初产及ICP相关实验室检查结果等。本研究经医院伦理委员会审核,所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 免疫组化染色测定胎盘组织TP63表达

1.2.1 染色步骤 取所有研究对象胎盘组织1块,取自脐带附着点附近较厚胎盘组织的下1/2(母面侧)以观察终末绒毛。石蜡包埋组织切片(厚5 μm)经二甲苯脱蜡,高至低浓度梯度乙醇水化;加3%过氧化氢溶液,37℃、30 min,以阻断内源性过氧化物

酶;切片经水洗及蒸馏水洗后浸泡于98℃ 1 mmol/L EDTA溶液(pH 8.0)内,中档微波处理20 min进行抗原修复;室温静置冷却后,切片蒸馏水洗后,TBS冲洗3次(每次5 min);擦去组织周围的TBS,滴加一抗(美国Cell Signaling公司兔抗人TP63抗体,1:100);4℃过夜后,37℃复温孵育30 min,切片用TBS冲洗3×5 min;滴加二抗(美国Invitrogen公司的通用型HRP标记二抗聚合物),37℃、30 min,切片用TBS洗3次(每次5 min)。滴加DAB显色液,显色时间为5~10 min(显微镜下控制显色程度)。自来水冲洗5 min,苏木精染液复染30 s,0.1%盐酸处理,自来水冲洗10 min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.2 染色结果的分级及评分 免疫组化染色切片由同一名医师采用奥林巴斯CX41显微镜进行阅片。每张切片随机选取10个高倍视野进行观察,并进行免疫组织化学染色评分(IHS)。IHS通过对着色细胞的百分数及染色强度的评分来计算。计数视野内所有完整终末绒毛结构中TP63阳性滋养细胞占总滋养细胞的百分数。染色评分参照相关文献^[11-12],着色细胞百分比的评分为0~3分(0分:0~1%;1分:1%~10%;2分:10%~20%;3分:大于20%)。染色强度评分也为0~3分(0分:无染色,1分:淡黄色,2分:棕黄色,3分:棕褐色)。将着色细胞百分比(extent, E)和强度(intensity, I)两组评分相乘得出数值(EI值);用该数值来评估TP63的表达水平。

1.3 反转录荧光定量PCR(RT-qPCR)测定滋养细胞TP63基因表达

1.3.1 JAR细胞培养及加药处理 滋养细胞株JAR细胞购自中国科学院细胞库,采用含10%胎牛血清的DMEM培养于5%CO₂、37℃恒温培养箱中。分别采用含二甲基亚砜(DMSO)或200 $\mu\text{mol/L}$ 的CA、脱氧胆酸(DCA)、鹅脱氧胆酸(CDCA)处理JAR细胞24 h后收集细胞。

1.3.2 RT-qPCR检测 采用TRIzol试剂提取各组JAR细胞总RNA后,采用加拿大ABM公司反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。并采用美国Qiagen公司的荧光定量PCR试剂盒在美国ABI公司StepOnePlus实时荧光定量PCR仪器上检测TP63基因的表达。所用引物采用Primer Premier 5软件设计,TP63正向引物序列:5'-GGA CCA GCA GAT TCA GAA CGG-3',反向序列:5'-AGG ACA CGT

CGA AAC TGT GC-3'; β -actin 正向引物序列:5'-TTG CGT TAC ACC CTT TCT TG-3',反向序列:5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT C-3'。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件处理,计数资料组间比较采用卡方检验;计量资料组间比较采用 t 检验及独立样本 Kruskal-Wallis 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 两组孕妇一般情况比较 结果(表 1)表明:ICP 组与对照组孕妇的平均年龄及孕产次差异无统计学意义;ICP 组孕妇孕周数少于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$);ICP 组孕妇妊娠时 TBA 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$)。

2.2 胎盘组织 TP63 的表达及与孕妇血清 TBA 水平的相关性 免疫组化染色结果(图 1)表明:ICP

组及对照组晚孕胎盘组织 TP63 定位于细胞核,绝大部分表达于细胞滋养细胞中,偶见合体滋养细胞表达;半定量评分(EI)结果表明:ICP 组胎盘组织中滋养细胞 TP63 表达明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$)。Spearman 相关性分析结果(图 2)表明:EI 评分与孕妇血清 TBA 水平间明显负相关($r=-0.679,P<0.001$)。

表 1 两组孕妇一般情况及产前 TBA 水平的比较

指 标	ICP 组($n=70$)	对照组($n=44$)	P 值
年龄/岁	30.20 $\pm$ 4.01	30.57 $\pm$ 3.25	0.607
孕周 t /周	37.62 $\pm$ 1.62	39.00 $\pm$ 0.98	<0.001
孕次 f /次	1.74 $\pm$ 1.12	1.73 $\pm$ 0.82	0.937
产次 f /次	1.19 $\pm$ 0.43	1.34 $\pm$ 0.48	0.083
TBA $c_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	36.93 $\pm$ 25.43	5.39 $\pm$ 1.94	<0.001

TBA:血清总胆酸

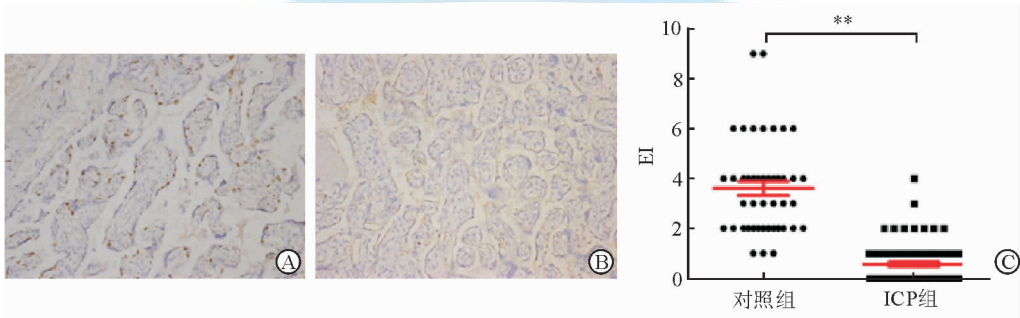


图 1 胎盘组织 TP63 免疫组化染色结果

A:对照组胎盘;B:ICP 组胎盘;C:半定量评分结果。* $P<0.001$ 。Original magnification: $\times 200$ (A,B)

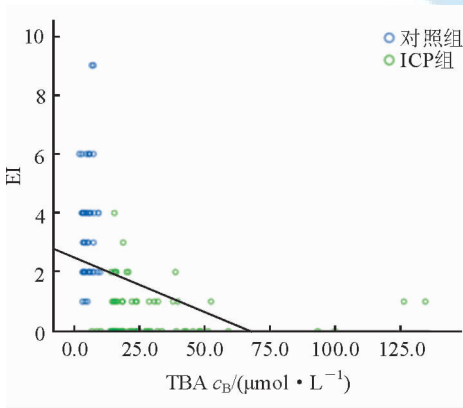


图 2 TP63 免疫组化染色 EI 评分与孕妇血清 TBA 水平的相关性分析

$r=-0.679,P<0.001$

2.3 CA 处理降低滋养细胞株 TP63 mRNA 表达水平 分别采用 DMSO 或 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA、DCA、CDCA 处理 JAR 细胞 24 h 后,采用 RT-qPCR 法检测 TP63 mRNA 表达水平。结果(图 3)表明:CDCA 及 DCA 处理后,TP63 mRNA 水平明显下降;进一步用 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCA 分别处理 JAR 细胞 24 h 后,与 DMSO 处理对照细胞相比,50 $\mu\text{mol/L}$ 及 100 $\mu\text{mol/L}$ DCA 处理后的 JAR 细胞中 TP63 mRNA 的表达水平未见明显下降,而 200 $\mu\text{mol/L}$ DCA 处理细胞中 TP63 mRNA 明显下降($P<0.01$)。

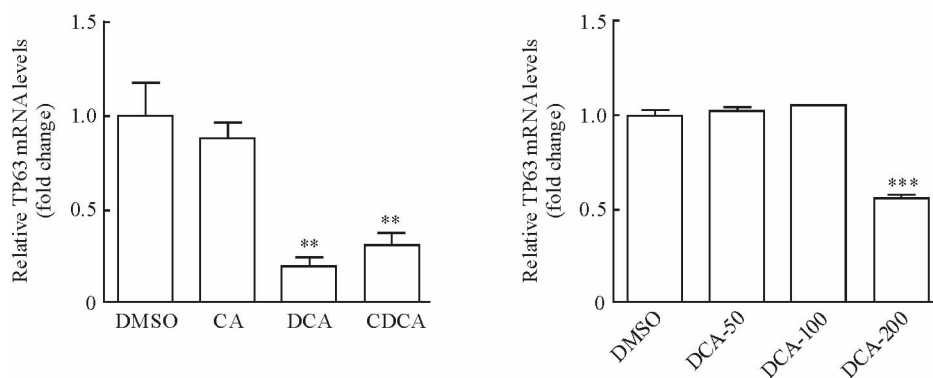


图 3 CA 对滋养细胞 TP63 mRNA 表达的影响

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 与 DMSO 组相比; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

ICP 是妊娠期特有的并发症。1883 年, Ahlfeld 首次报道了一种复发性妊娠期黄疸, 其在妊娠终止后消失。随着越来越多的产科医师认识到该疾病对母儿特别是胎儿的危害性, ICP 近年来已成为产科的热点之一。大量的流行病学调查及实验研究显示, 遗传、激素、免疫及环境因素与 ICP 的发生有着密切的关系。但是其病因及造成围产儿不良妊娠结局的病理机制均不明确。ICP 孕妇为高危妊娠, 其最大的危害是发生难以预测的胎死宫内^[13]。尤其是当血清 CA $\geq 40 \mu\text{mol/L}$ 时, 围产儿发病率和死亡率显著增高^[6-7]。这可能与高浓度 CA 淤积的毒性效应有关^[14]。Kurtuluş 等^[15]认为, 高水平的 CA 对心肌的毒性在胎儿的猝死过程中可能起着重要的作用。

TP63 是 p53 家族成员的核转录因子, 与 p53 在序列结构上有很高的同源性。由于 TP63 具有两个不同启动子和多种内含子剪切方式, 其基因编码产生不同亚型的蛋白。这些蛋白分为两大类亚型 TATP63 (TATP63 α 、TATP63 β 、TATP63 γ) 及 Δ NTP63 (Δ NTP63 α 、 Δ NTP63 β 、 Δ NTP63 γ), 前者是由上游启动子引发 TP63 mRNA 不同剪接产生的具有转录激活区的全长 TP63 同源异构体, 后者则是由下游启动子开始产生缺失转录激活区的 N 端被截短的异构体。这些亚型的 TP63 蛋白, 具有不同的生物学功能, 在不同的组织和不同的发育阶段参与生物学事件。TP63 异构体在人体组织中呈广泛而有选择性的表达, 在正常组织中主要表达于鳞状上皮和某些腺上皮的基底层细胞, 对上皮和间叶组织正常发生、分化以及形态学的发生具有重要作用。

本研究检测全长 TP63, 通过免疫组化的方法发现, ICP 组病人胎盘组织中 TP63 蛋白的表达水平明显低于对照组, 且和孕妇血清 TBA 水平呈负相关。本次体外实验表明, 只有当 CA 浓度升高到一定程度, 才会引起 TP63 表达的显著下降。ICP 孕妇胎盘中, 引起 TP63 低表达的原因可能多种多样, TP63 的低表达并不是 ICP 特有的指标。本研究发现, ICP 胎盘中 TP63 的低表达与高 CA 环境有较高的相关性, 因此高 CA 与滋养细胞中 TP63 的低表达有重要联系。高浓度的 CA 可通过 TGR5 受体^[16]或者钠氢交换体 (Na^+/H^+ exchanger)^[17]诱导细胞内 DNA 损伤, CA 亦可诱导细胞内活性氧聚集产生过氧化应激进而引起 DNA 损伤^[18], 细胞内 DNA 损伤可诱发 TP63 表达降低, 进而引起细胞生长阻滞和凋亡信号通路的激活^[19]。

Li 等^[20]发现, TP63 能够将细胞滋养细胞维持于干细胞样状态, 在滋养细胞株 JEG3 中过表达 TP63 会促进细胞增殖, 反之, 下调 TP63 则抑制细胞增殖。结合此次实验结果和本研究小组以往的研究^[5], 我们认为高浓度 CA 显著降低了 TP63 的表达, 由此明显削弱绒毛滋养细胞作为干细胞不断增殖分化的能力, 且使滋养细胞处于老化状态, 进而导致 ICP 胎盘功能下降。发生 ICP 时, 胎盘处在高浓度 CA 环境下, 进而可引起胎盘滋养细胞的凋亡^[21]。我们的前期研究^[22]也发现, 在 ICP 小鼠模型中, 胎盘滋养细胞发生水肿萎缩, 细胞凋亡增加, 过氧化应激程度增大。ICP 患者胎盘存在明显的绒毛间质和滋养细胞内水肿、滋养细胞凋亡增多等病理改变, 可能引起胎盘功能下降, 并可能引发胎儿宫内缺氧^[15]。本结果提示, 高浓度 CA 作用下 TP63 低表达可能为 ICP 滋养细胞增殖抑制以及细胞凋亡的一种潜在机制, 并在 ICP 胎盘功能障

碍发生的过程中起着重要的作用。

本研究明确了高浓度的CA会引起ICP孕妇胎盘滋养细胞TP63表达的降低,但是未探讨CA引起ICP发展的病理机制及ICP胎儿不良结局的原因。由于TP63基因结构和生物学功能的复杂性,需要进一步研究来明确其在ICP疾病发展中所起的作用。

参考文献

- [1] GEENES V, WILLIAMSON C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(17): 2049-2066.
- [2] ROOK M, VARGAS J, CAUGHEY A, et al. Fetal outcomes in pregnancies complicated by intrahepatic cholestasis of pregnancy in a Northern California cohort[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e28343.
- [3] GEENES V, CHAPPELL L C, SEED P T, et al. Association of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy with adverse pregnancy outcomes: a prospective population-based case-control study[J]. *Hepatology*, 2014, 59(4): 1482-1491.
- [4] 刘 淮, 张晓玲, 黄金阳. 妊娠期肝内胆汁淤积症患者血脂水平与新生儿血气分析值的相关性分析[J]. *中国临床医学*, 2008, 15(1): 101-102.
- [5] BROUWERS L, KOSTER M P, PAGE-CHRISTIAENS G C, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: maternal and fetal outcomes associated with elevated bile acid levels[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(1): 100. e1-e7.
- [6] WU W B, MENON R, XU Y Y, et al. Downregulation of peroxiredoxin-3 by hydrophobic bile acid induces mitochondrial dysfunction and cellular senescence in human trophoblasts[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38946.
- [7] GLANTZ A, MARSCHALL H U, MATSSON L A. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates[J]. *Hepatology*, 2004, 40(2): 467-474.
- [8] KAWAKITA T, PARIKH L I, RAMSEY P S, et al. Predictors of adverse neonatal outcomes in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(4): 570.
- [9] ZHANG H J, XUE W C, SIU M K, et al. P63 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with proliferation and apoptotic dynamics[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2009, 28(2): 172-178.
- [10] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠期肝内胆汁淤积症诊疗指南(2015)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(10): 1575-1578.
- [11] MARÉCHAL R, DEMETTER P, NAGY N, et al. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(9): 1444-1451.
- [12] SOSLOW R A, DANNENBERG A J, RUSH D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [13] SILVER R M, PARKER C B, GOLDENBERG R, et al. Bile acids in a multicenter, population-based case-control study of stillbirth[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2014, 210(5): 460. e1-e9.
- [14] WILLIAMSON C, MIRAGOLI M, SHEIKH ABDUL KADIR S, et al. Bile acid signaling in fetal tissues: implications for intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Dig Dis*, 2011, 29(1): 58-61.
- [15] KURTULMUŞ S, GÜR E B, ÖZTEKİN D, et al. The impact of intrahepatic cholestasis of pregnancy on fetal cardiac and peripheral circulation[J]. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2015, 16(2): 74-79.
- [16] LI D, CAO W. Bile acid receptor TGR5, NADPH Oxidase NOX5-S and CREB Mediate Bile Acid-Induced DNA Damage In Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31538.
- [17] GOLDMAN A, SHAHIDULLAH M, GOLDMAN D, et al. A novel mechanism of acid and bile acid-induced DNA damage involving Na^+/H^+ exchanger: implication for Barrett's oesophagus[J]. *Gut*, 2010, 59(12): 1606-1616.
- [18] TAN M, TANG C, ZHANG Y, et al. SIRT1/PGC-1 α signaling protects hepatocytes against mitochondrial oxidative stress induced by bile acids[J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(8): 935-945.
- [19] LI X, CHEN J, YI Y, et al. DNA damage down-regulates $\Delta\text{Np}63\alpha$ and induces apoptosis independent of wild type p53[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(2): 338-343.
- [20] LI Y, MORETTO-ZITA M, LEON-GARCIA S, et al. p63 inhibits extravillous trophoblast migration and maintains cells in a cytotrophoblast stem cell-like state[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(12): 3332-3343.
- [21] GEENES V L, LIM Y H, BOWMAN N, et al. A placental phenotype for intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Placenta*, 2011, 32(12): 1026-1032.
- [22] WU W B, XU Y Y, CHENG W W, et al. Agonist of farnesoid X receptor protects against bile acid induced damage and oxidative stress in mouse placenta—a study on maternal cholestasis model[J]. *Placenta*, 2015, 36(5): 545-551.
- [23] WIKSTRÖM SHEMER E, THORSELL M, ÖSTLUND E, et al. Stereological assessment of placental morphology in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Placenta*, 2012, 33(11): 914-918.

[本文编辑] 廖晓瑜, 贾泽军