

妊娠期肝内胆汁淤积症大鼠肝损伤及其肠道菌群结构的研究

何刘媛¹, 张彬¹, 张和平¹, 沈继龙², 徐元宏², 沈续航³

摘要 目的 探讨妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)大鼠模型肝胆代谢特点及对肠道菌群的影响。方法 取孕10 d的SD大鼠40只,随机分为对照组(15只)和ICP组(25只)。妊娠第10~14天给予ICP组大鼠腹腔注射苯甲酸雌二醇(2.5 mg/kg)联合黄体酮(75 mg/kg),构建动物模型,同期对照组给予生理盐水(2.5 ml/kg)腹腔注射。用药后第6天分别检测两组大鼠血清总胆红素(TBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰氨基转移酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)和总胆汁酸(TBA)水平,比较两组实验大鼠生化指标。取两组大鼠肝脏,病理切片及HE染色,观察ICP大鼠肝脏病理变化。同时收集ICP大鼠新鲜粪便进行16S rDNA测序。结果 ICP组大鼠血清TBIL、ALT、AST、GGT、ALP和TBA水平均显著高于对照组($P < 0.05$)。与对照组比较,ICP组大鼠肝细胞出现显著的脂肪变性,并伴有灶状坏死和炎性细胞浸润,部分可见胆栓形成。ICP大鼠肠道菌群出现紊乱,表现为真杆菌、狄氏副拟杆菌、单形拟杆菌等丰度显著下降($P < 0.05$),而普氏菌和梭杆菌等显著升高($P < 0.05$)。结论 ICP大鼠出现肝组织和肝功能损伤,伴有胆汁酸代谢障碍,并导致母体肠道菌群紊乱。

关键词 妊娠期肝内胆汁淤积症;大鼠模型;肠道菌群;16S rDNA

中图分类号 R 372;R 575

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0824-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.020

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)常见于孕中晚期。我国孕妇的患病率低于国外报道,但仍达0.95%~6.00%^[1]。本病主要表现为皮肤瘙痒、肝功能异常、进行性黄疸和血清总胆汁酸(total bile acid, TBA)水平升高等,严

重者可导致早产、死胎及新生儿抑郁和呼吸窘迫综合征等^[2-3]。母体孕期肠道和生殖道菌群均有明显改变,以适应胎儿宫内发育和分娩,并为出生婴儿体内菌群的定植做准备^[4]。母体肠道共生菌产生的短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)参与了孕妇脂质代谢和糖代谢,对于维持妊娠发挥了至关重要的作用^[5]。已知肠道菌群的丰度和多样性与宿主的年龄、孕期、居住地、饮食习惯和健康状态密切相关。既往的临床病例研究尚未揭示ICP与肠道菌群变化的因果关系,ICP实验动物模型对肠道菌群及其对代谢的影响鲜见报道。该研究建立了ICP大鼠模型,探讨ICP对肝脏损伤、胆汁酸代谢以及肠道菌群的影响,旨在为ICP发病机制研究和临床诊治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级SD大鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,雌性大鼠40只,6周龄,体重220~270 g,有生育能力的雄性大鼠13只。在室温18~28℃、相对湿度40%~70%的环境内饲养,自由饮水和饮食,适应环境1周。发情期按雌雄比例3:1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。所有动物试验操作符合《中华人民共和国实验动物管理条例(2021)》要求。

1.2 主要试剂与仪器 苯甲酸雌二醇注射液、黄体酮注射液(上海全宇生物科技有限公司);全自动生化仪au5800(美国贝克曼公司);奥林巴斯BX50系列生物显微镜(日本奥林巴斯公司);组织病理切片机RM2016(德国徕卡公司);其余器材由病原生物学安徽省重点实验室提供。

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15只和ICP组25只。妊娠第10~14天分别给予对照组大鼠腹腔注射生理盐水2.5 ml/kg,ICP组大鼠腹腔注射苯甲酸雌二醇2.5 mg/kg联合黄体酮75 mg/kg。以上药物每天注射1次,连续注射5 d。

2022-11-17 接收

基金项目:病原生物学安徽省重点实验室开放课题(编号:2022013)

作者单位:¹安徽省妇幼保健院(安徽医科大学妇幼医学中心)检验科,合肥 230001

²安徽医科大学第一附属医院检验科,安徽省病原生物学重点实验室,合肥 230022

³安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介:何刘媛,女,主管技师;

徐元宏,男,教授,主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail:xyhong1964@163.com

1.4 标本采集与检测 妊娠第 15 天采用无菌滤纸收集各组大鼠粪便, -80°C 临时保存, 用于肠道菌群 16S rDNA 测序。各组大鼠腹腔注射 6% 水合氯醛溶液 250 mg/kg 麻醉, 分别取静脉抗凝血 2 ml, 1 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 应用全自动生化分析仪测定血清中总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST)、谷氨酰氨基转移酶 (glutamyl transferase, GGT)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和 TBA 水平。血清 TBA 及肝酶水平异常升高即视为 ICP 大鼠模型制备成功。大鼠腹腔注射水合氯醛 250 mg/kg, 麻醉后留取左叶肝脏 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小, 置于 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, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 显微镜下观察肝脏病理变化。

1.5 粪便 16S rDNA 测序 将上述收集的大鼠新鲜粪便置于无菌收集管中, 标记, 送上海欧易生物科技有限公司测序分析。采用 DNA 抽提试剂盒对样本的基因组 DNA 进行提取, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 取适量的样品于离心管中, 如果有必要则使用无菌水稀释样品至 $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 根据测序区域的选择, 使用带 Barcode 的特异引物, Takara 公司的 Takara Ex Taq 高保真酶进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。测序区域 16S 的引物区域 V3 ~ V4 前端通用引物为 343F 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'; 后端引物为 798R 5'-AGGGTATCTAATCCT-3'。PCR 产物电泳检测, 磁珠纯化后作为模板, 进行二轮 PCR 扩增, 并再次电泳检测和磁珠纯化, 对 PCR 产物进行 Qubit 定量。根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 并上机测序。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组大鼠血清生物化学指标比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠血清生化指标比较 与对照组比较, ICP 组大鼠血清反映肝细胞损伤和胆汁酸代谢的 TBIL、ALT、AST、GGT、ALP 和 TBA 等指标, 于造模给药后第 6 天显著升高 ($P < 0.05$)。两组大鼠血清生化指标水平比较见表 1。

2.2 肝脏肉眼观察和组织病理检查 对照组大鼠肝脏外观呈红褐色, 质软光滑, 边缘锐利; ICP 组大鼠肝脏轻度肿胀, 呈暗红色, 边缘圆钝, 可见棕黄色脂肪颗粒沉积。镜下组织观察见到, 对照组大鼠肝细胞排列方式呈现以中央静脉为中轴, 向边沿部放射状分布, 所形成的肝板和肝血窦的排列及结构未见明显异常 (图 1A); 而 ICP 组汇管区可见肝细胞水肿和脂肪变性, 伴有显著的炎性细胞浸润, 部分可见胆栓形成 (图 1B)。

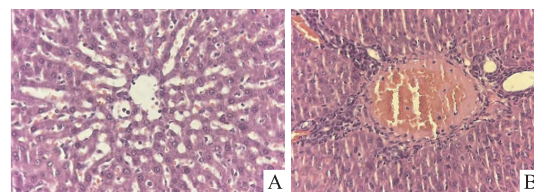


图 1 大鼠肝脏 HE 染色 $\times 400$

A: 正常组; B: ICP 组

2.3 肠道菌群 16S rDNA 测序分析 Alpha 多样性分析为基于统一深度下计算不同样本的多样性指数。结果显示, 两组大鼠肠道菌群丰度和多样性无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 2A、B); Beta 多样性的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 显示, 对照组和 ICP 组菌群组成出现显著性差异 ($P < 0.05$, 图 2C、D)。

采用非参数 Wilcoxon t 检验分析两组大鼠肠道细菌在门、属和种水平上的差异。结果显示, 有 8 个门的细菌出现了显著变化。ICP 组的梭杆菌门 (*Fusobacteriota*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*) 细菌显著升高; 而丝状杆菌门 (*Fibrobacterota*)、螺旋菌门 (*Spirochaetota*) 显著下降 ($P < 0.05$, 图 3A); 在属水平, 组

表 1 两组大鼠肝脏生化指标检测比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	TBIL($\mu\text{mol/L}$)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	GGT(IU/L)	ALP(IU/L)	TBA(IU/L)
对照	15	2.56 ± 0.30	45.51 ± 1.67	195.71 ± 5.01	1.59 ± 0.08	80.91 ± 1.86	8.40 ± 0.08
ICP	25	6.50 ± 1.09	72.24 ± 3.46	317.15 ± 10.80	2.18 ± 0.63	147.43 ± 3.50	29.14 ± 0.27
t 值		-1.22	-3.35	-3.07	-1.79	-3.29	-3.41
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

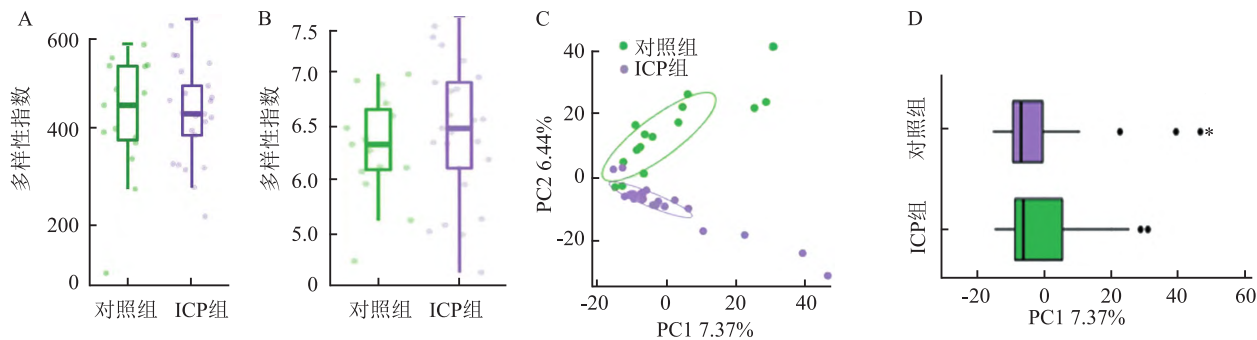


图2 Alpha多样性和Beta多样性分析

A: Chao 1 指数值; B: Shannon 指数值; C、D: 主成分分析, 每个点代表每一份样本; 与对照组比较: * $P < 0.05$

间差异的前 10 中 Clade-III、副拟杆菌 (*Parabacteroides*)、真杆菌 (*Eubacterium*)、瘤胃球菌 (*Ruminococcus*) 在 ICP 组显著降低; 而普雷沃菌 (*Prevotella*)、罗氏菌 (*Roseburia*)、嗜木聚糖真杆菌群 (*E. xylanophilum* group)、梭杆菌 (*Fusobacterium*) 在 ICP 组显著升高 ($P < 0.05$, 图 3B)。进一步在种水平的分析发现, 在 ICP 组中, 单形拟杆菌 (*Bacteroides uniformis*)、罗尔斯通菌 (*Ralstonia insidiosa*)、狄氏副拟杆菌 (*Parabacteroides distasonis*)、*Clostridiales bacterium* 等显著降低; 而猪肠支原体 (*Metamycoplasmata suis*)、螺杆菌 (*Helicobacter apodemus*)、柯林斯菌 (*Collinsella stercoris*) 等显著升高 ($P < 0.05$, 图 3C)。

2.4 肠道标志性菌种、随机森林分析和功能预测

指示性菌种分析主要是指筛选大鼠肠道中能对环境产生较大影响的生物种属或群落。ICP 组指示性菌种中, 变形菌、普氏菌和罗氏菌占优势; 而益生菌狄氏副拟杆菌、单形拟杆菌 (*Bacteroides uniformis*) 显著减少 (图 4)。随机森林分析发现, 副拟杆菌、梭杆菌、普拉梭杆菌和志贺氏大肠埃希菌是区分 ICP 组和对照组大鼠最重要的前 5 个重要肠道菌属 (图 5)。此外, 基于 16S rDNA 测序的 KEGG 功能预测发现, ICP 组大鼠氨基酸和次级代谢产物的生物合成、碳水化合物代谢、微生物代谢通路显著降低 (图 6)。

3 讨论

ICP 是孕期较常见的肝脏疾病, 对母体和胎儿危害严重。胎粪污染羊水可致新生儿抑郁症和呼吸窘迫综合征等。研究^[6]报道, ICP 孕妇的早产、死胎和新生儿住院的比例显著上升。近年发现 ICP 患者肠道菌群在宿主代谢和免疫中发挥重要作用, 且可影响妊娠结局^[7]。肠道菌群失调与胆汁淤积、胆管炎和肝硬化密切相关; 患病母体出生的患儿肠道菌

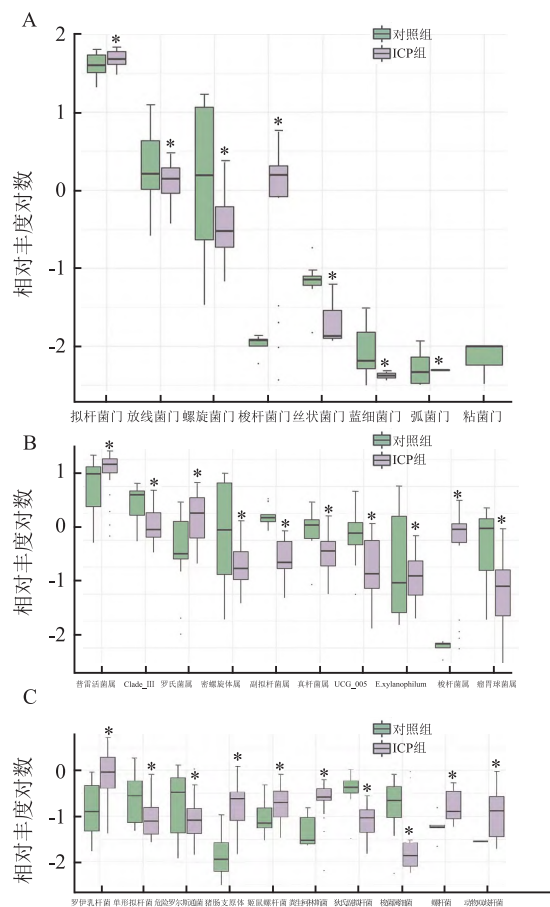


图3 两组大鼠肠道菌群在门、属和种水平的差异

挑选差异物种丰度前 10 做相对丰度 boxplot 分析, 获得优势差异物种在组内丰度及组间比较; A: 前 10 个门水平的差异; B: 前 10 个属水平的差异; C: 前 10 个种水平的差异; 与对照组比较: * $P < 0.05$

群多样性显著降低, 且与肝脏生化指标之间有高度相关性。临床也发现 ICP 母体初级胆汁酸合成、胆汁分泌、牛磺酸和亚牛磺酸水平升高, 肠道菌群出现显著差异^[8]; 拟杆菌 (*Bacteroides*) 升高, 梭菌 (*Faecalibacterium*)、布劳特菌 (*Blautia*) 和真杆菌 (*Eubacte-*

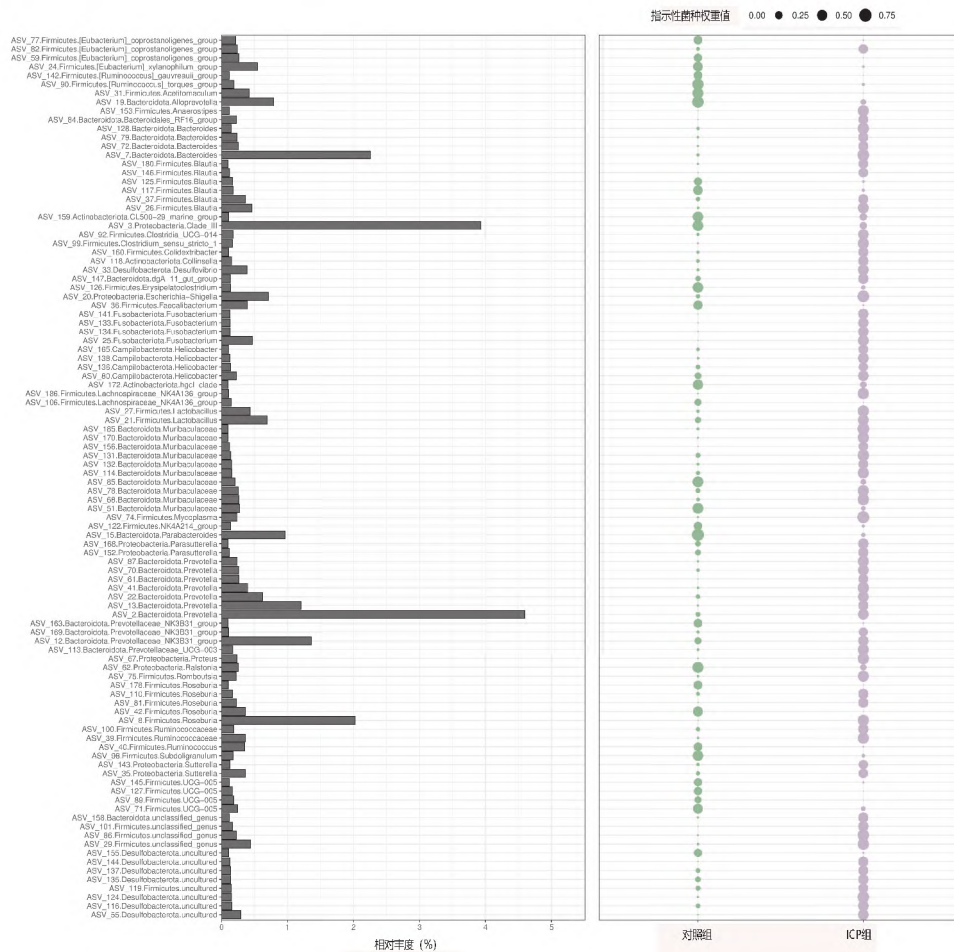


图4 对照组和 ICP 组大鼠肠道菌群指示性物种差异分析

rium) 等产 SCFAs 的细菌明显减少。Zhan et al^[9] 最近对 45 例 ICP 患者研究发现, 大肠志贺氏菌 (*Escherichia shigella*), 欧陆森菌 (*Olsenella*) 和苏黎世杆菌 (*Turicibacter*) 丰度升高; 血清 TBA、ALT、AST、DBIL 和 TBIL 异常升高。已知母体肠道菌群在维持正常妊娠, 子代菌群的定植、营养、免疫系统的构建以及抵抗病原体感染等均发挥了重要作用。但有关母体 ICP 对其自身肠道菌群构成的影响尚未见报道。

本研究采用苯甲酸雌二醇 + 黄体酮构建了 SD 大鼠的 ICP 模型。大鼠血清肝脏生化指标水平异常升高 ($P < 0.05$), 肝细胞出现大量脂肪变性、点状坏死、显著的炎症细胞浸润和部分胆栓形成, 表明模型构建成功。本研究基于 ICP 大鼠肠道菌群的 16S rDNA 测序分析发现, 几种肠道益生菌丰度明显下降, 如副拟杆菌、单形拟杆菌、真杆菌、*Clostridiales bacterium* 和瘤胃球菌。已知狄氏副拟杆菌 (*Parabacteroides distasonis*) 是正常胃肠道拟杆菌属的代表性菌种, 体内活菌移植能显著升高石胆酸和熊去氧

胆酸水平, 提升肠道琥珀酸的浓度, 减轻高脂饮食小鼠的体质量、降低血糖并减轻肝脏脂肪变性, 并修复肠黏膜屏障。因此狄氏副拟杆菌在维持机体正常代谢中发挥重要作用^[10], 还可降低 γ -谷氨酸水平, 升高下丘脑 GABA/谷氨酸比值。有报道用单形拟杆菌治疗肥胖小鼠可改善糖代谢, 提升丁酸水平, 抑制 IL-22 介导的肝组织炎症, 治疗糖尿病小鼠疗效显著, 可抑制小鼠的肥胖^[11]。此外, 本研究提示真杆菌在 ICP 组显著减少。真杆菌是肠道益生菌的核心成员之一, 有些菌种可产生丁酸等 SCFAs, 调节代谢、促进肠道蠕动, 抑制肠黏膜炎症、抑制结肠癌和动脉硬化, 降低 IL-2 和 C 反应蛋白等炎症标志物。此外, 真杆菌还参与肠-肝胆汁酸代谢和胆固醇转化, 维持肠道内稳态^[12]。除了拟杆菌外, 真杆菌、罗氏菌、普拉梭菌均可分泌胆盐水解酶。胆盐水解酶不仅维持菌群代谢, 还可调节脂质吸收和糖代谢, 维持能量平衡。

本研究显示, ICP 模型大鼠肠道普雷沃菌

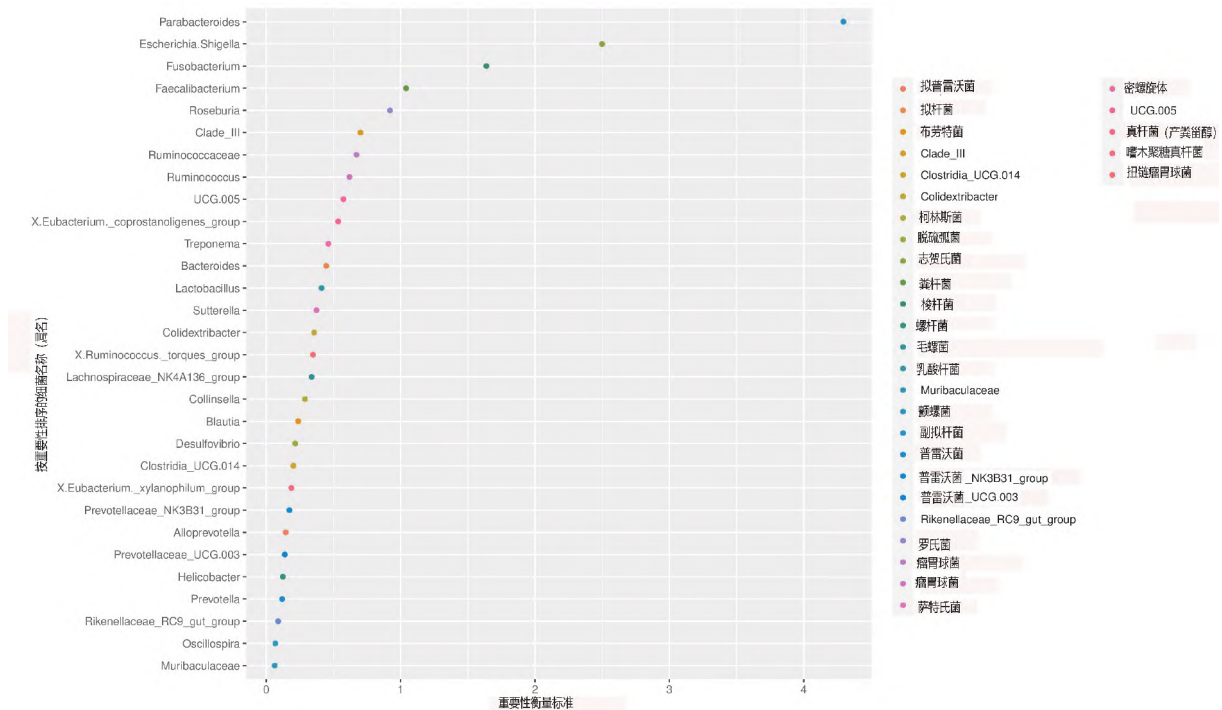


图5 Random Forest 随机森林分析

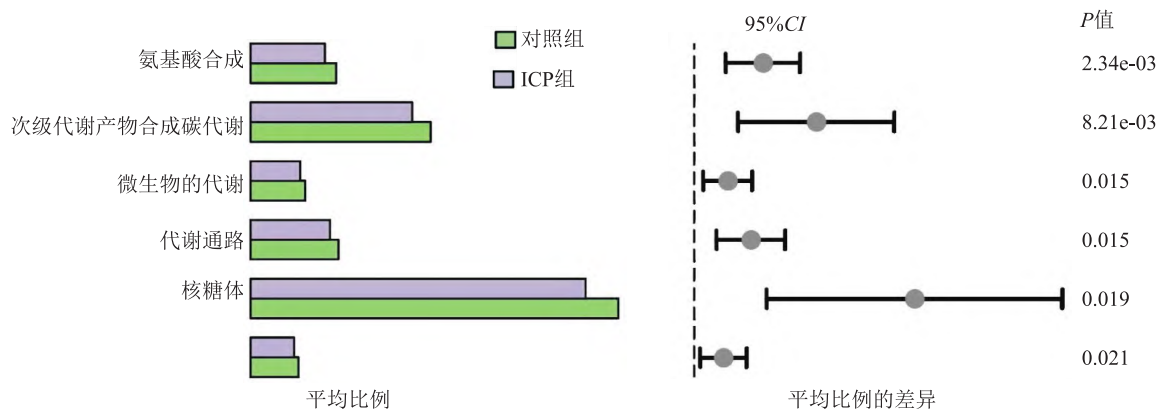


图6 KEGG 功能预测分析

(*Prevotella*) 丰度增加。该属细菌在人体可引起牙周炎和阴道炎,与类风湿性关节炎、代谢性疾病和全身感染有关,也可通过 TLR2 激活 Th17 应答,分泌 IL-1、IL-6、IL-23 等介导黏膜炎症^[13]。此外梭杆菌 (*Fusobacterium*) 也成为 ICP 组大鼠肠道的指示性菌种。梭杆菌的有些种类为侵袭性厌氧菌,多存在于肠黏膜炎性组织。Castellarin et al^[14] 研究发现具核梭杆菌 (*F. nucleatum*) 与结肠癌及其淋巴结的转移密切相关。ICP 母体的肠道菌群失调不仅有可能加重自身肝脏的损伤,同时也可能成为影响子代肠道微生态的重建的重要因素^[15]。此外,KEGG 分析显示,两组大鼠中丰度变化最大的菌群均集中在代谢

相关的通路和遗传信息处理等。本研究中见到,ICP 组大鼠肠道菌群中富集到个别对人体有益生作用的肠道菌,如双歧杆菌和乳酸杆菌丰度升高,其原因有待进一步观察。

(致谢:本文承蒙安徽医科大学微生物学教研室何茂章博士协助数据分析和指导,在此深表感谢。)

参考文献

- [1] Ren S J, Zhou Y P, Xuan R R. Research progress in the role of gut microbiota and its metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Exp Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(12): 1361 – 6.
- [2] Geenes V, Chappell L C, Seed P T, et al. Association of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy with adverse pregnancy out-

- comes; a prospective population based case control study[J]. *Hepatology*, 2014, 59(4):1482–91.
- [3] 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, doi: 10.1016/j.ajog.2014.07.026.
- [4] Koren O, Goodrich J K, Cullender T C, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy[J]. *Cell*, 2012, 150:470–80.
- [5] Ziętek M, Celewicz Z, Szczuko M. Short-chain fatty acids, maternal microbiota and metabolism in pregnancy[J]. *Nutrients*, 2021, 13(4):1244.
- [6] 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):1482–91.
- [7] Ren S J, Zhou Y P, Xuan R R. Research progress in the role of gut microbiota and its metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 15(12):1361–6.
- [8] 郭 城. 胆汁淤积症肠道微生物生态学的临床与基础研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [9] Zhan Q T, Qi X C, Weng R P, et al. Alterations of the human gut microbiota in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:635680.
- [10] Wang K, Liao M F, Zhou N, et al. *Parabacteroides distasonis* alleviates obesity and metabolic dysfunctions *via* production of succinate and secondary bile acids[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(1):222–35.
- [11] Fabersani E, Portune K, Campillo I, et al. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 alleviates inflammation within the gut adipose tissue axis involving TLR5 signaling in obese mice[J]. *Sci Rep*, 2021, 11:11788.
- [12] Mukherjee A, Cathy L R, Ross P, et al. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1):e1802866.
- [13] Larsen J M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease[J]. *Immunology*, 2017, 151:363–74.
- [14] Castellari M, Warren R L, Freeman J D, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma[J]. *Genome Res*, 2012, 22(2):299–306.
- [15] Moya-Alvarez V, Sansonetti P J. Understanding the pathways leading to gut dysbiosis and enteric environmental dysfunction in infants; the influence of maternal dysbiosis and other microbiota determinants during early life[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, 46(3):fuac004.

Liver injuries and alterations of gut microbiota in intrahepatic cholestasis in pregnancy of rats

He Liuyuan¹, Zhang Bin¹, Zhang Heping¹, Shen Jilong², Xu Yuanhong², Shen Xuhan³

[¹Dept of Laboratory Diagnostics, Maternal and Child Medical Center of Anhui (Anhui Medical University), Hefei 230001; ²Dept of Laboratory Diagnostics, The First Hospital of Anhui Medical University,

Key Laboratory of Pathogenic Biology of Anhui Province, Hefei 230022;

³Dept of Gastroenterology, The First Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022]

Abstract Objective To investigate the effects of hepatobiliary metabolic dysfunction on gut microbiota in rats with intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats at 10 days of gestation were randomly divided into two groups, 25 for ICP induction and 15 as control. Estradiol benzoate, combined with progesterone, was given to the rats by intraperitoneal injection from 10 to 14 days after gestation. Hepatic impairment indicators of total bilirubin (TBIL), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), and total bile acids (TBA) in sera of the animals were detected in each group to verify the model construction. Simultaneously, the liver tissues were subjected to pathology examination and fresh faeces samples were collected for 16S rDNA sequencing to explore the gut microbiota profiles. **Results**

The serum levels of TBIL, ALT, AST, GGT, ALP and TBA in ICP group were significantly elevated compared with the control ($P < 0.05$); the ICP rats presented obvious characteristics of hepatobiliary disorders, showing prominent steatosis, necrosis of hepatocytes and infiltration of inflammatory cells, with formation of bile thrombus in some animals. The abundance of *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides uniformis* remarkably decreased whereas *Prevotella* and *Fusobacterium* significantly increased in ICP rats when compared with the control ($P < 0.05$). **Conclusion** The hepatic injuries and bile acid metabolic disorders occurred in ICP rats, which resulted in dysbiosis of gut microbiota.

Key words intrahepatic cholestasis in pregnancy; rat model; gut microbiota; 16S rDNA