

# HIF-2 $\alpha$ 在妊娠期肝内胆汁淤积症患者胎盘中的表达及意义

章易琳,倪观太,周毅惠

(皖南医学院附属弋矶山医院 妇产科 安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 检测妊娠期肝内胆汁淤积症( ICP) 患者胎盘组织缺氧诱导因子 HIF-2 $\alpha$  蛋白的含量, 探讨其在 ICP 胎儿宫内缺氧中的作用。方法: 选取 2010 年 2 ~ 8 月在弋矶山医院剖宫产分娩的 40 例孕妇为研究对象, 其中正常足月孕妇 10 例, ICP 轻度组 15 例, 重度组 15 例。采用蛋白免疫印迹法检测各组孕妇胎盘组织中 HIF-2 $\alpha$  蛋白的表达水平。结果: 3 组孕妇 HIF-2 $\alpha$  蛋白表达差异有统计学意义(  $P < 0.05$ ), 轻、重度 ICP 组 HIF-2 $\alpha$  蛋白表达较正常对照组有统计学意义(  $P < 0.05$ ); 轻、重度 ICP 组间 HIF-2 $\alpha$  蛋白表达差异无统计学意义(  $P > 0.05$ )。结论: ICP 患者 HIF-2 $\alpha$  蛋白在胎盘组织中的高表达, 可能在胎盘-胎儿系统对缺氧的自稳和代偿反应中起重要的调节作用。

**【关键词】**肝内胆汁淤积; 缺氧诱导因子; 胎盘

**【中图分类号】**R 714.2 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2015.03.007

## Expression and significance of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ in placenta in intrahepatic cholestasis of pregnancy

ZHANG Yilin, NI Guantai, ZHOU Yihui

Department of Obstetrics and Gynecology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the role of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) protein in placenta in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods:** Forty women undergone cesarean section delivery were included between February and August of 2010 in our hospital. Of them, 10 were normal full-term pregnancy women, 15 were complicated with mild ICP and another 15 with severe ICP. Western blot was performed to determine the protein level of placental HIF-2 $\alpha$ . **Results:** HIF-2 $\alpha$  level was different among the three groups (  $P < 0.05$  ) and higher in mild and severe ICP group as compared with normal controls (  $P < 0.05$  ), yet difference was not significant between mild and severe ICP group (  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** HIF-2 $\alpha$  protein is highly expressed in placenta in ICP pregnancy, suggesting that it play an important role in regulating the compensatory homeostatic response to hypoxemia of placenta-fetus system.

**【Key words】** intrahepatic cholestasis; hypoxia inducible factor; placenta

妊娠期肝内胆汁淤积症( intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP) 是妊娠中晚期的常见疾病, 孕妇预后尚好, 但围产儿结局不良, 可导致不可预测的胎儿宫内猝死。目前, ICP 导致胎儿宫内窘迫的发病机制仍未完全阐明。缺氧诱导因子 HIF-2 $\alpha$  ( hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ ) 是新近发现的 PAS 结构域蛋白 1 ( EPAS-1) 家族成员, 其蛋白质表达水平受氧分压的严密调控, 对低氧环境中组织细胞的生存和适应有着重要意义<sup>[1]</sup>。国外研究显示: HIF-2 $\alpha$  的异常与缺氧相关性病理妊娠如妊娠期高血压疾病、胎儿生长受限有关<sup>[2]</sup>。本研究采用 western blot 印迹技术检测正常晚孕妇女和 ICP 患者的 HIF-2 $\alpha$  蛋白表达, 旨在从分子水平初步探讨 ICP 胎儿缺氧

机制。

### 1 资料和方法

1.1 研究对象 2010 年 2 ~ 8 月在弋矶山医院剖宫产分娩的正常孕妇 10 例及 ICP 孕妇 30 例。ICP 诊断标准参照乐杰主编的《妇产科学》第 7 版<sup>[3]</sup>, 分度依据相关报道<sup>[4]</sup>的 ICP 临床分度标准。正常晚孕妇女无妊娠合并症和并发症。剖宫产术前无宫缩, ICP 孕妇排除其他肝胆疾病史和自身免疫病史。各组孕妇孕龄 35 ~ 42 周, 平均年龄、孕产次无统计学差异。

### 1.2 方法

1.2.1 各组孕妇均在胎盘娩出后 5 min 内切取胎

收稿日期: 2014-11-25

作者简介: 章易琳( 1979-), 女, 住院医师, 硕士, ( 电话) 13956158828, ( 电子信箱) zyllxh@sohu.com;

倪观太, 男, 主任医师, 硕士生导师, ( 电子信箱) niguantai@yahoo.com.cn, 通讯作者。

盘中央全层绒毛组织 100 mg × 3 块, 注意避开梗死及钙化区, 剔除大血管, 以冷生理盐水漂洗后后置消毒 EP 管中 - 80℃ 冰箱保存。

1.2.2 western blot 蛋白免疫印迹法检测 HIF-2α 蛋白的表达 取胎盘组织 100 mg, 加入预冷的细胞裂解液 300 μL, 充分匀浆后 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 以 BCA 法进行蛋白定量。取 20 μL 总蛋白, 加入上样缓冲液, 以 5% ~ 8% 不连续十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 进行分离电泳, 然后在半干转膜仪中, 100 V 恒压电转 1 h, HIF-2α 一抗为鼠抗人单克隆抗体(1: 1 000), 购自 Millipore 公司, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体, 购自美国 Chemicon 公司, ECL 显色, 曝光。像片经扫描后, 用 Labwork. 3.0 UVP 软件分析条带灰度。

1.2.3 统计学方法 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

3 组孕妇 HIF-2α 蛋白表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ICP 轻度组与重度组 HIF-2α 蛋白表达较正常妊娠组均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ICP 轻度组与重度组之间 HIF-2α 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组孕妇胎盘组织 HIF-2α 蛋白灰度扫描比值比较

组别	例数	HIF-2α 蛋白 灰度扫描比值	F 值	P 值
正常妊娠组	10	0.325 6 ± 0.089 1 <sup>a</sup>		
轻度 ICP 组	15	0.737 8 ± 0.122 7 <sup>b</sup>	31.556	< 0.05
重度 ICP 组	15	0.684 1 ± 0.168 3 <sup>b</sup>		

注: 各组两两比较采用 SNK-*q* 检验, 两组间字母相同表示  $P > 0.05$ , 两组间字母不同表示  $P < 0.05$

## 3 讨论

HIF-2 是 1997 年首次在内皮细胞发现的一类缺氧诱导因子, 又称内皮 PAS 结构域蛋白 1 (EPAS-1), 是由 HIF-2α 和 HIF-1β 两种亚基组成的异源二聚体, HIF-2α 是调节 HIF-2 活性的功能亚基, 氧分压下降时, HIF-2α 降解受阻, 和 HIF-1β 形成二聚体后构成完整稳定的 HIF-2 分子, 作为细胞缺氧应激的上游调节因子发挥对细胞的转录调节作用, 直接影响细胞在缺氧状态的生存能力<sup>[5]</sup>。

Rajakumar 等<sup>[5]</sup> 发现人类胎盘 HIF-2α 蛋白表

达在合体滋养细胞、细胞滋养细胞的胞核和胞浆中, 认为 HIF-2α 可能参与低氧子宫环境下滋养细胞的形成。该学者在另一研究中还发现: HIF-2α 蛋白在妊娠期高血压疾病患者胎盘组织中呈高表达, 认为缺氧诱导的 HIF-2α 蛋白合成增加参与胎盘血管构建障碍及氧运减少<sup>[7]</sup>。Meade 等<sup>[8]</sup> 研究表明低氧培养的绒毛滋养细胞 HIF-1α、HIF-2α DNA 活性及蛋白表达增加。DunnWB<sup>[9]</sup> 通过急性缺氧/复氧体外培养胎盘绒毛组织, 发现常氧状态下 ICP 患者胎盘组织 HIF-2α 的表达明显上调, 推测急性缺氧时 ICP 胎盘上 HIF-2α 的功能障碍可能导致胎儿不良妊娠结局。

本研究采用 western blot 蛋白印迹法检测 ICP 患者胎盘组织 HIF-2α 蛋白的表达水平, 结果显示: 正常妊娠组 HIF-2α 呈微量表达, 而 ICP 组 HIF-2α 的表达明显上调, 可能与 ICP 患者血循环中胆汁酸增加, 绒毛膜板和羊膜上皮处胆盐沉积, 内皮细胞受损, 造成胎盘组织血氧储备功能下降, 胎盘缺氧, 从而启动 HIF-2α 介导的一系列低氧适应性反应, 维持母胎界面滋养细胞的功能有关。HIF-2α 表达在胎盘早期缺氧的自稳和代偿反应中起重要的调节作用, 但当出现临产或刺激后频发宫缩时, 其失代偿后可能通过调节其下游相关基因诱发多种缺氧相关的病理效应加重胎儿缺氧, 甚至导致胎儿宫内死亡。

ICP 不同临床分度对正确分析胎儿缺氧程度和预测不良妊娠结局至关重要<sup>[10]</sup>。本组研究中将 ICP 组分为轻、重度组观察 HIF-2α 表达趋势, 结果显示两组间差异无显著性, 这与胡雅毅等<sup>[11]</sup> 报道的 HIF 蛋白表达与 ICP 病情分级存在等级相关结论不甚一致, 推测与实验标本采集于临产宫缩发动前, 此时尚无急性缺氧等应激因素的作用, 不能充分反映 HIF-2α 在缺氧条件下的变化趋势有关。Walmsley 等<sup>[12]</sup> 则认为体内不同组织细胞面对氧供应变化时需要不同的适应性变化, HIF-2α 激活所引起的下游反应在不同的细胞类型间明显不同<sup>[13]</sup>。因此本研究结论在改变缺氧时间、缺氧程度、组织细胞类型等条件下有待于进一步探讨。

ICP 胎儿不良结局与胎盘缺氧、胆汁酸、胆红素的毒性作用等综合因素有关<sup>[14]</sup>, 本研究提示 HIF-2α 在 ICP 胎盘缺氧的病理生理改变中起着一定作用, 进一步深入研究, 可为阐明 ICP 胎儿缺氧机制研究提供新的思路。

(下转第 239 页)

是一种方便、有效的办法。但是本研究中也存在一定的不足,我们选取的病例均为渗出型患者,比较单一,而且采用微波照射治疗的疗程定为4周,仅仅是依据临床经验,没有参考标准,我们会在以后进行深入研究,以便针对不同病情的患者制定不同的疗程。

【参考文献】

[1] 李淑德,许国铭. 结核性腹膜炎的诊断和治疗[J]. 胃肠病学, 2005, 10( 3): 191 - 192.  
 [2] 邓国防,孙丽珍,雷建平. 腹腔置管注药并引流治疗干酪型结核性腹膜炎的疗效观察[J]. 临床内科杂志, 2010, 27( 8): 528 - 530.  
 [3] 江贵源,邓兴,郭似惠,等. 结核性腹膜炎并粘连性不全肠梗阻30例诊治体会[J]. 中国实用医药, 2008, 3( 33): 109 - 110.  
 [4] 杨书华,王洁,朱文玉,等. 难治性结核性胸腔积液中心烟肺浓度的检测和对比[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18( 3): 433 - 434.  
 [5] 李鸿昌. 利福平粉针剂治疗淋巴结核局部的效果观察[J]. 中国实用医药, 2013, 8( 15): 154 - 155.

(上接第231页)

【参考文献】

[1] Rajakumar A, Conrad KP. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta[J]. Biol Reprod, 2004, 63( 2): 559 - 569.  
 [2] Rajakumar A1, Michael HM, Daftary A, et al. Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins [J]. Placenta, 2008, 29( 3): 290 - 299.  
 [3] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 107 - 109.  
 [4] Glantz A, Marschall HU, Mattsson LA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates[J]. Hepatology, 2004, 40( 2): 467 - 474.  
 [5] Rajakumar A1, Jeyabalan A, Markovic N, et al. Placental HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, membrane and soluble VEGF receptor-1 proteins are not increased in normotensive pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293( 2): R766 - 774.  
 [6] Rajakumar A1, Doty K, Daftary A, et al. Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 alpha and -2 alpha proteins in pre-eclamptic placentae [J]. Placenta, 2003, 24( 2-3): 199 - 208.  
 [7] Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, et al. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2 alpha, in placentas from women with preeclampsia [J]. Biol Reprod,

[6] Dong BW, Liand P, Yu XL, et al. Sonographically guided microwave coagulation of liver cancer: an experimental and clinical study [J]. Am J Roentgenol, 1998, 171( 2): 449 - 454.  
 [7] 陈丽萍,迟宝荣. 超声引导下微波凝固治疗肝癌的应用进展[J]. 中国全科医学, 2005, 8( 2): 153.  
 [8] 卢平宣,黄永志,黎海舰. 结核性胸膜炎发生胸膜肥厚因素的探讨[J]. 南华大学学报: 医学版, 2002, 30( 2): 170 - 171.  
 [9] 齐海亮,苏宏伟,杜秀然,等. 微波辅助治疗结节型浸润型淋巴结核的疗效观察[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19( 9): 1635 - 1637.  
 [10] 齐海亮,张晓光,王鹏,等. 微波联合利福平治疗溃疡型淋巴结核的临床观察[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19( 11): 2018 - 2021.  
 [11] 齐海亮,章志华,郑立恒,等. 微波辅助治疗结核性胸膜炎的疗效观察[J]. 医学临床研究, 2014, 31( 10): 1876 - 1879.  
 [12] 李强. 微波辅助治疗结核性胸膜炎的疗效观察[J]. 实用临床医学, 2010, 11( 1): 27 - 28.  
 [13] 肖宽,赵自洁,张言斌,等. 支气管结核的微波介入治疗[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26( 2): 116.

2004, 64( 2): 499 - 506.

[8] Meade ES, Ma YY, Guller S. Role of hypoxia-inducible transcription factors 1 alpha and 2 alpha in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in a human trophoblast cell line [J]. Placenta, 2007, 28( 10): 1012 - 1019.  
 [9] Dunn WB, Brown M, Worton SA, et al. Changes in the metabolic footprint of placental explant-conditioned culture medium identifies metabolic disturbances related to hypoxia and pre-eclampsia [J]. Placenta, 2009, 10( 11): 974 - 980.  
 [10] Sun SG, Shen N, Zheng YH, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha, vascular endothelial growth factor and sFlt-1 in pre-eclampsia placenta [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2006, 41( 7): 440 - 444.  
 [11] 胡雅毅,刘淑芸. 妊娠期肝内胆汁淤积症患者胎盘中缺氧诱导因子的初步研究[J]. 现代妇产科进展, 2006, 37( 6): 901 - 903, 942.  
 [12] Walmsley SR, Chilvers ER, Whyte MK. Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11( 2): 217 - 219.  
 [13] Rajakumar A1, Doty K, Daftary A, et al. Expression of von Hippel Lindau ( pVHL) protein in placentae from normal pregnant women and women with preeclampsia [J]. Placenta, 2006, 27( 4-5): 411 - 421.  
 [14] 胡玉芹,潘石蕾. 妊娠期肝内胆汁淤积症研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2009, 31( 5): 205 - 206.