

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.017

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190424.1032.003.html(2019-04-24)

STAT3 在妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇胎盘中的表达及意义*

叶云飞,蒙文霞,陈滢,周一萍,李文怡,陈柏秀
(广西科技大学附属柳州市人民医院产科 545006)

[摘要] **目的** 探讨信号转导和转录活化因子 3(STAT3)在妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)孕妇胎盘中的表达及意义。**方法** 选择 2016 年 1 月至 2017 年 12 月于柳州市人民医院产科门诊产检并住院分娩、资料完整的重度 ICP 孕妇 25 例为试验组,选择同期健康顺产孕妇 30 例为对照组。采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP 法)测定 STAT3、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在孕妇胎盘组织中的定位与表达水平。蛋白印迹法检测 STAT3 蛋白的表达水平。**结果** (1)试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 STAT3、IL-6 和 TNF- α 阳性细胞率及平均光密度值明显高于对照组($P < 0.05$)。(2)试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 STAT3 表达阳性细胞率与 IL-6、TNF- α 水平呈正相关($r = 0.687, P < 0.05$)。(3)试验组 STAT3 蛋白的表达量明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** STAT3 可能参与了 ICP 的发病且与 IL-6、TNF- α 在 ICP 发生发展中具有共同促进作用。

[关键词] 胆汁淤积;肝内;胎盘;信号转导和转录活化因子 3;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子- α **[中图分类号]** R714.255**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)11-1866-04

**Expression and significance of signal transducer and activator of transcription 3 in
placentas of pregnant women with intrahepatic cholestasis of pregnancy***

YE Yunfei, MENG Wenxia, CHEN Ying, ZHOU Yiping, LI Wenyi, CHEN Baixiu

(Department of Obstetrics, Affiliated Liuzhou Municipal People's Hospital, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi Zhuang Autonomous Region 545006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in the placentas of pregnant women with intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP). **Methods** Twenty-five cases of placental tissues (severe degree) from ICP pregnant women with out-patients department antenatal examination, hospitalization delivery and intact data in the obstetric department of Liuzhou Municipal People's Hospital from January 2016 to December 2017 were selected as the experimental group, and 30 cases of normal placental tissues were selected as the control group. The location and expression levels of STAT3, IL-6 and TNF- α in the placental tissues was determined by adopting the immunohistochemistry streptomycin antibiotin protein-peroxidase chain reaction (SP method). The STAT3 protein expression level was determined by Western blot. **Results** (1) The positive cells rate and the average optical density values of STAT3, IL-6 and TNF- α in the placental trophoblast cells of the experience group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). (2) The STAT3 expression positive cells rate in the placental trophoblast cells of ICP pregnant women was positively correlated with IL-6 and TNF- α ($r = 0.687, P < 0.05$). (3) The STAT3 protein expression level in the experimental group was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** STAT3 may be involved in the pathogenesis of ICP and play a co-promoting role with IL-6 and TNF- α in the occurrence and development of ICP.

[Key words] pregnancy complications; cholestasis; intrahepatic; placenta; STAT3; IL-6; TNF- α

妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)是妊娠中晚期最常见的特发性肝脏功能紊乱性疾病。临床上以皮肤瘙痒及血清总胆汁酸水平升高为特点,发病率为 0.2%~2.0%^[1-2]。ICP 是严重威胁母婴健康的妊娠期并发症,可导致早

产、胎儿宫内窘迫、新生儿窒息、羊水胎粪污染等,使围生儿病死率明显增高^[3]。ICP 的发病机制非常复杂,其病因学仍不清楚。多数研究认为是遗传变异、内分泌、免疫功能失常及环境因素等多因素共同作用的结果^[4]。曹丽琼等^[5]研究报道细胞因子信号传导

负调控因子 3(SOCS3)参与了 ICP 的发病。而对信号转导和转录活化因子 3(STAT3)在 ICP 患者胎盘中的表达尚无文献报道。本研究通过检测重度 ICP 孕妇和健康孕妇胎盘组织中 STAT3、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达水平,初步探讨 STAT3 在 ICP 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2017 年 12 月在柳州市人民医院产科住院治疗、资料完整的剖宫产分娩的重度 ICP 孕妇 25 例为试验组。根据中华医学会儿科学分会 2015 年公布的 ICP 诊疗指南^[6],重度 ICP 的纳入标准:(1)血清总胆汁酸水平大于或等于 40 $\mu\text{mol/L}$;(2)瘙痒严重或不伴有黄疸、皮肤抓痕;(3)复发性 ICP。排除标准:排除肝炎病毒、EB 病毒、巨细胞病毒感染。试验组年龄 29.3 岁(27~37 岁),孕周 37⁺³周(36~40 周)。选择同期健康顺产孕妇 30 例为对照组,年龄 28.5 岁(24~36 岁),孕周 39⁺³周(37~41 周)。两组孕妇年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),孕周比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组孕妇既往均无高血压、心脏病、肾脏疾病、糖尿病及甲状腺功能异常等基础病史,无输血及免疫治疗史。本研究经柳州市人民医院伦理委员会讨论并批准,并经所有孕妇知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本收集及处理 胎盘娩出后 10 min 内,于脐根正对面,避开淤血、坏死及钙化区迅速剪取绒毛组织(无蜕膜组织及羊膜)2 块约 1 cm \times 1 cm \times 1 cm,其中 1 块用生理盐水冲洗并擦干,放入 10%甲醛中固定 24~48 h 后用乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋进行免疫组织化学检测。另 1 块迅速置于 10%甲醛中,用于蛋白印迹法检测。

1.2.2 免疫组织化学法检测胎盘组织中 STAT3、IL-6 和 TNF- α 的表达 采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP 法)测定胎盘组织中 STAT3、IL-6 和 TNF- α 的表达水平,免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。STAT3、IL-6 和 TNF- α 抗体试剂盒均购自上海生工生物工程股份有限公司。操作按说明书上步骤进行。结果判定:染色结果分别由 2 位病理学专业医师独立评估。STAT3、IL-6、TNF- α 阳性信号为细胞内呈现棕黄色颗粒。按阳性细胞百分率评分:0%~<5%为 0 分,5%~<25%为 1 分,25%~<75%为 2 分, \geq 75%为 3 分。按细胞质或细胞核着色程度评分:未着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分,将两项得分相乘,<2 分判为阴性(-), \geq 2 分为阳性(+).

1.2.3 平均光密度值测定 采用美国 Media cybernetics 公司生产的 Imagepro-plus 6.0 专业图像分析软件对免疫组织化学照片进行光密度分析。每张切片选取 3 张 400 倍照片做光密度分析,

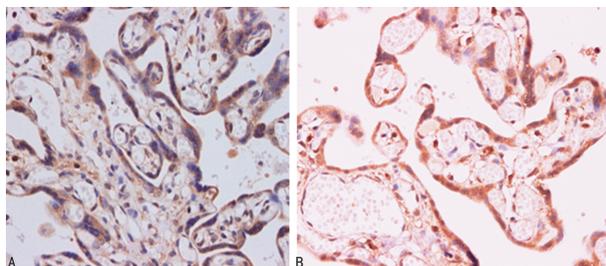
1.2.4 蛋白印迹法检测 STAT3 蛋白表达水平 组织裂解、离心后得到蛋白样本,测定总蛋白浓度,上样

电泳。电泳后转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),加入小牛血清蛋白封闭液封闭。加入 STAT3 一抗(兔抗人单克隆抗体 1:10 000 稀释), β -actin 抗体(1:800 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,分别加入二抗(1:10 000 稀释),室温孵育。ECL 显影、曝光。扫描曝光片后,应用 Quantity 图像分析系统分析目的条带,记录条带灰度值。蛋白印迹条带的灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值作为 STAT3 蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

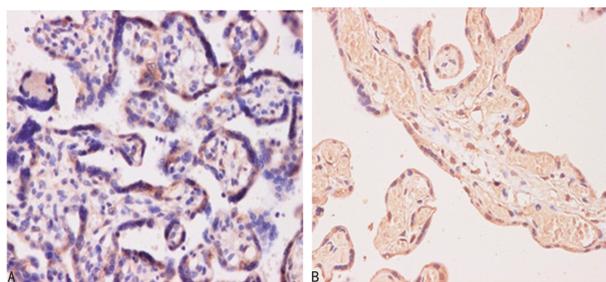
2 结果

2.1 STAT3、IL-6、TNF- α 在胎盘组织中的定位及表达 STAT3 在两组孕妇胎盘组织中均有表达,STAT3 定位在滋养层细胞的胞质和胞核;呈现浅黄色、棕黄色或褐色染色颗粒,STAT3 在试验组孕妇胎盘滋养层细胞中呈强阳性表达;在对照组孕妇胎盘滋养层细胞中呈弱阳性表达。IL-6 定位在滋养层细胞的胞质;TNF- α 定位在合体滋养层细胞胞核。STAT3、IL-6 和 TNF- α 在试验组中的表达明显高于对照组。试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 STAT3、IL-6、TNF- α 平均光密度值明显高于对照组($P<0.05$),见图 1~3。



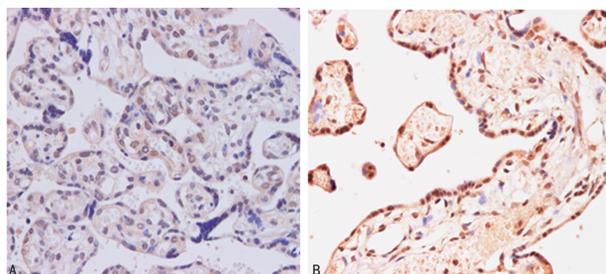
A: 对照组; B: 试验组

图 1 两组 STAT3 的表达(SP \times 400)



A: 对照组; B: 试验组

图 2 两组 IL-6 的表达(SP \times 400)



A: 对照组; B: 试验组

图 3 两组 TNF- α 的表达(SP \times 400)

表 1 两组中 STAT3、IL-6、TNF- α 细胞阳性率及平均光密度值($\bar{x}\pm s$)

组别	n	STAT3		IL-6		TNF- α	
		细胞阳性率(%)	平均光密度	细胞阳性率(%)	平均光密度	细胞阳性率(%)	平均光密度
试验组	25	0.750 \pm 0.061	0.070 \pm 0.012	0.690 \pm 0.019	0.080 \pm 0.001	0.580 \pm 0.011	0.040 \pm 0.003
对照组	30	0.210 \pm 0.023	0.030 \pm 0.009	0.190 \pm 0.003	0.011 \pm 0.002	0.180 \pm 0.001	0.010 \pm 0.004

2.2 孕妇胎盘滋养层细胞中 STAT3 阳性细胞率及平均光密度值 试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 STAT3 阳性细胞率明显高于对照组($P<0.05$);试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 STAT3 平均光密度值明显高于对照组($P<0.05$);试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 IL-6、TNF- α 阳性细胞率明显高于对照组($P<0.05$);试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 IL-6、TNF- α 平均光密度值明显高于对照组,两组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.3 STAT3 在胎盘组织中的表达定量 免疫印迹检测显示,对照组、试验组孕妇胎盘组织中均可检测到 STAT3 蛋白的表达,试验组 STAT3 表达水平(1.05 \pm 0.10)明显高于对照组(0.38 \pm 0.07)。两组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

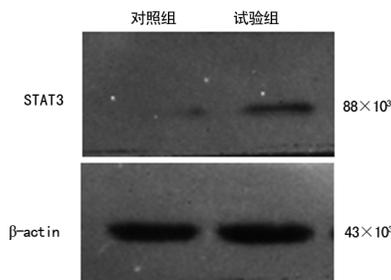


图 4 各组胎盘组织 STAT3 蛋白表达免疫印迹图

2.4 试验组孕妇胎盘滋养层细胞中 STAT3 与 IL-6、TNF- α 的相关性分析 试验组中 STAT3 表达强度与 IL-6、TNF- α 的表达强度呈显著正相关($r=0.687$, $r=0.891$, $P<0.05$),见表 2。

表 2 试验组 STAT3 与 IL-6、TNF- α 的相关性

项目	IL-6		TNF- α		IL-6/TNF- α	
	r	P	r	P	r	P
细胞阳性率	0.575	0.009	0.477	0.022	0.687	0.000
平均光密度	0.431	0.018	0.560	0.005	0.891	0.000

3 讨论

3.1 STAT3 在 ICP 母胎界面的变化 JAK/STAT 信号通路目前已成为研究细胞膜到细胞核信号传递中的经典信号途径。而信号转导及转录激活因子(STAT)通路是 JAK/STAT 信号通路研究的热点之一。STAT3 能被许多细胞因子、生长因子和其他刺激因素所激活发挥作用,激活的 STAT3(P-STAT3)可以调节其他细胞因子表达,并可介导细胞的增殖、凋亡、分化等重要生理活性。FITZGERALD 等^[7-8] 研究显示 STAT3 转录因子的活性与绒毛外滋养细胞的

凋亡、迁移和侵袭相关。曹丽琼等^[5] 研究报道 SOCS3 参与了 ICP 的发病。本研究对 ICP 孕妇和健康孕妇胎盘组织中 STAT3 的表达进行分析,免疫组织化学结果显示:STAT3 定位在胎盘组织滋养层细胞的胞质和胞核;ICP 时胎盘中 STAT3 表达水平显著高于健康孕妇。免疫印迹实验显示:两组孕妇胎盘组织中均可检测到 STAT3 蛋白的表达,试验组(1.05 \pm 0.10)明显高于对照组(0.38 \pm 0.07),差异有统计学意义($P<0.05$)。故无论是定性实验还是定量实验均提示:ICP 时胎盘中 STAT3 表达水平显著高于健康孕妇。ICP 患者的母胎界面 STAT3 表达增高,提示 STAT3 可能参与了 ICP 的发病。

3.2 IL-6、TNF- α 在胎盘中的定位及表达 近年研究发现,对一些细胞因子如 IL-6、TNF- α 、血管内皮生长因子(VEGF)等进行早期监测对 ICP 具有重要意义。IL-6 是由淋巴细胞及单核巨噬细胞分泌的炎性细胞因子,有广泛的生物学作用,可诱导 B 细胞分化并产生免疫球蛋白,促进 T 细胞增殖、生长等。IL-6 在妊娠、分娩及胎儿生长发育过程中均发挥重要作用。研究^[7] 发现 ICP 患者血清中 IL-6 的表达明显高于正常妊娠,且随着病情的加重该指标值不断升高,IL-6 还可诱导内皮细胞合成和分泌黏附分子进而发挥损伤作用,据此通过监测血清中 IL-6 的水平可以了解 ICP 患者病情的严重程度。研究^[9-10] 显示,人类子宫内层和胎盘组织中存在大量的巨噬细胞,这些巨噬细胞在接受同种异型胎儿抗原刺激后可分泌 TNF- α ,适量的 TNF- α 可调节胎儿与胎盘组织的生长,促进滋养层细胞的合成,刺激孕酮和绒毛膜促性腺激素(HCG)的分泌,防止母体对胎儿产生排斥反应。BULL 等^[11] 研究发现 ICP 患者胎盘中细胞因子 TNF- α 的表达明显增加,诱发 ICP 发病。TNF- α 诱导 ICP 胎盘绒毛滋养细胞凋亡,使黏附分子的表达上调,ICP 患者发生体内免疫损伤和免疫排斥,TNF- α 可以促进雌激素在胎盘的合成和分泌,加重 ICP。TNF- α 具有双重生物学效应,生理状态下参与机体免疫防护,病理状态下大量 TNF- α 造成机体免疫损伤。从免疫学观点来看,TNF- α 属于 Th1 型细胞因子^[11-12]。已有研究^[13-14] 表明免疫功能失衡可能会破坏孕妇免疫微环境,导致孕妇出现各种病理性妊娠反应。ICP 孕妇的 Th1/Th2 型细胞因子的平衡发生变化,Th1 的表达更明显。本研究结果显示,ICP 患者的 IL-6、TNF- α 表达水平比健康孕妇异常增高。这一结果与文献^[9-10] 的研究结果相符合。本研究提示,IL-6、TNF- α 表达的异常增高与 ICP 患者病理性妊娠

反应有着极为密切的关系,并且可能导致胎儿不良妊娠结局的发生。

3.3 STAT3 与 IL-6、TNF- α 相关性 王斯南等^[15]

通过免疫组织化学法评价胆酸对 IL-6/STAT3 通路的激活情况。结果显示:胆酸可通过诱导肠道低度炎症反应激活 IL-6/STAT3 通路。NGUYEN 等^[16]研究发现:STAT3 是 IL-6 的核心效应分子。细胞因子 TNF- α 是体内重要的早期促炎因子,TNF- α 的 mRNA 上有 STAT3 的结合位点,活化后的 STAT3 可以入核与 TNF- α 的 mRNA 上 S1X13 的结合位点结合,增强 TNF- α 的转录,导致 TNF- α 的大量释放;而细胞因子受体与相应的细胞因子结合后又可进一步促进 JAK/STAT 通路的活化,从而对 JAK/STAT 通路进行“正反馈”调节,使炎症级联反应不断放大。

LUO 等^[17]在构建妊娠高血压大鼠模型实验中发现,STAT3 可以改善妊娠高血压大鼠血管内皮细胞功能,STAT3 与 TNF- α 、IL-6 的表达具有正相关性。本研究结果发现:无论是定量还是定性实验均发现 STAT3 的表达与胎盘组织中 IL-6、TNF- α 水平呈正相关。说明 IL-6 对 TNF- α 的调控,可能是通过 STAT3 信号通路完成。IL-6 高表达激活了 STAT3 表达,活化后的 STAT3 进入细胞核与 TNF- α 结合,导致 TNF- α 的大量释放,从而使 TNF- α 表达异常增高,打破了 Th1/Th2 平衡,Th1 表达明显,从而导致 ICP 的发病最终导致 ICP 发病。是否可以通过阻断该通路达到一定的治疗作用,减少患者及新生儿的不良结局的发生,进而对准确及详细分析 ICP 患者提供一定的参考,值得进一步研究。

综上所述,本研究表明,通过对 STAT3 的检测并结合 TNF- α 、IL-6 的表达情况能从信号通路这一方面更深入地了解 ICP 疾病的发病情况,开拓了 ICP 发病机制的新思路。而孕期通过检测 IL-6、STAT3 和 TNF- α 水平可了解胎儿宫内环境,对临床终止妊娠时机的选择提供了理论依据。目前,对 ICP 病理生理过程认识较局限,STAT3 信号通路的研究为 ICP 的发病提供了新的思路,而对其药物治疗提供了重要的研究方向,可针对该通路选择对胎儿影响小,更有效的药物进行治疗,或能成为治疗 ICP 的一条新的路径。

参考文献

[1] PARIZEK A, HILL M, DUSKOVA M, et al. A comprehensive evaluation of steroid metabolism in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8):e159203.

[2] MELLA M T, KOHARI K, JONES R, et al. Mitochondrial gene expression profiles are associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. *Placenta*, 2016(45):16-23.

[3] OVADIA C, WILLIAMSON C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Recent advances [J]. *Clin Dermatol*, 2016, 34

(3):327-334.

[4] 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):100-101.

[5] 曹丽琼, 蒋惠玲, 阿米娜, 等. IL-10、TNF- α 及 SOCS3 在妊娠期肝内胆汁淤积症母胎界面的变化 [J]. *中国妇幼健康研究*, 2017, 28(3):259-261.

[6] 贺晶, 杨慧霞, 段涛, 等. 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.

[7] FITZGERALD J S, GERMEYER A, HUPPERTZ B, et al. Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra- and extracellular regulation [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 63(6):492-505.

[8] KNOFLER M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(2/3):269-280.

[9] 黄鹰. TNF- α 在妊娠期肝内胆汁淤积症中表达的研究 [J]. *重庆医学*, 2015, 45(14):1913-1915.

[10] EL-FARAMAWY A A, EL-SHAZLY L B, ABBASS A A, et al. Serum IL-6 and IL-8 in infants with biliary atresia in comparison to intrahepatic cholestasis [J]. *Trop Gastroenterol*, 2011, 32(1):50-55.

[11] BULL L N, HU D, SHAH S, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy (icp) in u. s. latinas and chileans; clinical features, ancestry analysis, and admixture mapping [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e131211.

[12] 莫劲童, 董小萍, 苏宝兰. 妊娠期肝内胆汁淤积症患者的早产预测指标 [J]. *中国妇幼健康研究*, 2014, 25(3):440-442.

[13] ATAALLA W M, ZIADA D H, GABER R, et al. The impact of total bile acid levels on fetal cardiac function in intrahepatic cholestasis of pregnancy using fetal echocardiography: a tissue Doppler imaging study [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2016, 29(9):1445-1450.

[14] 浦雯琦, 蔡奚梅, 陆丽丹. 妊娠期肝内胆汁淤积症患者人类白细胞抗原 G 与 Th1/Th2 细胞因子的相关性 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(32):90-93.

[15] 王斯南, 曹海龙, 许梦雀, 等. 白细胞介素 6/信号转导和转录激活因子 3 通路在胆酸诱导 Apc min/+ 小鼠肠腺瘤癌变中的作用 [J]. *中华消化杂志*, 2017, 37(2):101-105.

[16] NGUYEN D P, LI J, TEWARI A K. Inflammation and prostate cancer; the role of interleukin 6 (IL-6) [J]. *BJU Int*, 2014, 113(6):986-992.

[17] LUO J Y, FU D, WU Y Q, et al. Inhibition of the JAK2/STAT3/SOS1 signaling pathway improves secretion function of vascular endothelial cells in a rat model of pregnancy-induced hypertension [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3/4):527-537.

(收稿日期:2018-12-14 修回日期:2019-02-25)