

子痫前期 HELLP 和 APS 血清游离脂肪酸水平对滋养细胞脂质沉积影响的研究

于欢 杨孜 丁晓燕 王伽略 王雁玲 韩怡炜

【摘要】 目的 探讨子痫前期, HELLP 综合征和抗磷脂综合征血清中游离脂肪酸水平对滋养细胞内脂质沉积的不同影响。方法 采用早发型重度子痫前期 (E-PE 组)、重度子痫前期并发 HELLP (PE-HELLP 组) 及抗磷脂综合征 (APS 组) 的不同病理妊娠血清和正常妊娠孕妇 (NC 组) 血清孵育体外原代培养人绒毛滋养细胞和细胞系 HTR8/SVneo。ELISA 法检测血清中 CHO、TG 和 FFA 含量; 脂肪特殊染色检测细胞内脂滴沉积。结果 E-PE 组和 APS 组中血清 FFA 水平和滋养细胞内脂滴沉积均明显高于 PE-HELLP 组及 NC 组 ($P < 0.05$); PE-HELLP 组中血清 FFA 水平和滋养细胞内脂滴沉积高于 NC 组 ($P < 0.05$)。血清游离脂肪酸水平与滋养细胞内脂质沉积量呈正相关 ($R = 0.8669, 0.8435, 0.7734, P < 0.05$)。结论 早发型重度子痫前期、HELLP 和 APS 间存在不同程度的脂肪酸氧化代谢异常。

【关键词】 子痫前期; HELLP; APS; 脂肪酸氧化

Study on the correlation of serum free fatty acid level of preeclampsia, HELLP and APS and lipid droplets deposition in trophoblast

YU Huan, YANG Zi, DING Xiaoyan, WANG Jialue, WANG Yanling, HAN Yiwei.

(Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Objective To explore the correlation between serum free fatty acids of preeclampsia, HELLP syndrome, APS and lipid droplet deposition in trophoblast cells. **Methods** Primary human trophoblast cells and HTR8/SVneo cells were treated with serum from patients with early-onset severe PE (E-PE), E-PE with HELLP (PE-HELLP), APS, and normal pregnant women as controls (NC). Serum FFA concentration and lipid deposition were detected. **Results** FFA concentration and lipid deposition in E-PE and APS groups were significantly higher than that in the PE-HELLP and NC groups ($P < 0.05$). FFA concentration and lipid deposition of the PE-HELLP group were significantly higher than that in NC group ($P < 0.05$). FFA concentration was correlated with intracellular lipid droplets deposition ($R = 0.8669, 0.8435, 0.7734, P < 0.05$). **Conclusion** Disorders of fatty acid oxidation of various degrees exist in patients with E-PE, HELLP and APS.

【Key words】 preeclampsia; HELLP; APS; fatty acid oxidation

Chin J Clin Obstet Gynecol, 2014, 15: 422-425

近年来的研究发现在子痫前期患者中存在脂代谢异常^[1]。同时长链脂肪酸氧化相关酶 LCHAD 水平下降, 脂肪酸氧化功能障碍^[2]。我们还发现早发型重度子痫前期和 HELLP 综合征中 LCHAD 基因和蛋白表达降低均比晚发型明显, 提示不同子痫前期类型可能存在不同的脂肪酸氧化代谢的变化和

影响^[3]。抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome, APS) 患者中也存在血脂代谢异常^[4], 是子痫前期和 HELLP 发病的风险因素之一^[5-6]。本实验拟通过分析早发型重度子痫前期、HELLP 及 APS 综合征血清中游离脂肪酸水平与滋养细胞内脂质沉积的相关性, 探讨在子痫前期、HELLP 及 APS 三者中是否存在不同程度的脂肪酸氧化代谢障碍。

doi: 10.13390/j.issn.1672-1861.2014.05.011

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (81241021); 北京市自然科学基金资助项目 (7132215)

作者单位: 100191 北京大学第三医院妇产科 (于欢、杨孜、丁晓燕、王伽略、韩怡炜); 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室 (王雁玲)

通信作者: 杨孜 Email: zi_yang2005@126.com

材料与amp;方法

一、血清标本的采集

血清标本采集于 2012 年 6 月至 12 月就诊于北京大学第三医院妇产科孕妇。本研究获得北京大学第三医院伦理委员会批准，采集时所有患者均签署知情同意书。分为早发型重度子痫前期组（E-PE）、HELLP 综合征组（PE-HELLP）和抗磷脂综合征组（APS）和正常孕妇组（NC）四组，每组各 10 名。早发型重度子痫前期诊断标准为发生在妊娠 20~32 周的重度子痫前期，BP≥160/110 mm Hg（1 mm Hg=0.133 kPa），尿蛋白≥2.0 g/24 h 或≥2+，持续头痛或视觉障碍、持续性上腹痛。HELLP 综合征诊断标准为在早发型重度子痫前期基础上出现溶血，LDH>300 IU/L，丙氨酸转氨酶>70 IU/L，血小板<100 000/mm³。APS 诊断标准为间隔 6 周两次以上抗心磷脂抗体（aCL）IgG 和/或 IgM 型抗体阳性。各组孕妇均无原发性高血压、肝肾疾病及其他内外科并发症，无宫内胎儿死亡，无胎儿染色体异常，未应用辅助生殖技术。孕妇于入院 24 h 内抽取肘静脉血。

二、细胞培养

体外原代培养人绒毛滋养细胞：选择在北京大学第三医院妇产科门诊自愿要求人工流产者，妊娠（7.2±0.3）周的健康妇女的绒毛组织 20 例，胚胎发育正常，孕妇年龄（28.4±0.2）岁，经负压吸宫术获得绒毛组织，采用中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室原代 CTB 的分离培养方法建立人滋养细胞系^[7]。本研究得到北京大学第三医院伦理委员会批准，患者签署书面知情

同意书。

永生性人滋养细胞系 HTR8/SVneo：HTR8/SVneo 细胞系自液氮中取出复苏后，培养于含 10%FBS 的 1640 培养液中，于 37℃在 5%CO₂ 的细胞培养箱中孵育^[8]。

三、ELISA 分析

根据 ELISA 试剂盒说明书（上海酶联）方法检测四组妊娠血清中胆固醇（CHO），甘油三酯（TG）和游离脂肪酸（FFA）的浓度。

四、油红 O 染色

胰蛋白酶消化培养成功的滋养细胞，置于放有载玻片的 24 孔板中。分别加入相同浓度（10%）的 E-PE、PE-HELLP、APS 和正常妊娠孕妇血清在细胞培养箱中孵育 24 h。吸出细胞培养液，经固定洗板后，油红 O 染色，封片，显微镜下观察细胞内脂质沉积、拍照，应用 Image-pro Plus 软件（USA）计数细胞内脂滴沉积。

五、统计学分析

采用 GraphPad Prism 统计软件分析、处理数据。计量资料以 mean±SD 表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）。各组样本总体均值差异采用 *t* 检验进行两两组间比较分析。采用 Spearman 相关系数分析细胞内脂质沉积和血清游离脂肪酸水平的相关性。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组孕妇一般临床资料

各组孕妇一般临床资料如表 1 所示。

表 1 各组孕妇一般临床资料

项目	NP 组	E-PE 组	PE-HELLP 组	APS 组	<i>P</i> 值	<i>F</i> 值
平均年龄(岁)	30.8 ± 1.0 ^①	30.5 ± 1.3 ^②	28.8 ± 2.6 ^②	29 ± 2.2 ^②	0.8988	0.1935
采血孕周	28.9 ± 3.9 ^①	30.4 ± 2.4 ^②	29.2 ± 2.7 ^②	29.4 ± 2.3 ^②	0.3672	1.190
PE 发病孕周	— ^③	30.4 ± 2.4	29.2 ± 2.7	— ^③	<0.05	60.59
分娩孕周	38.7 ± 0.8	31.8 ± 1.1 ^①	30.8 ± 0.9 ^①	38.2 ± 0.5 ^②	<0.05	107.0
BMI	30.82 ± 1.39	30.63 ± 1.64 ^②	30.17 ± 1.90 ^②	31.09 ± 1.89 ^②	0.8936	0.2011
收缩压 mm Hg	116.6 ± 7.9	172.5 ± 8.8 ^①	175.1 ± 11.2 ^①	120.6 ± 8.3 ^②	<0.05	1.918
舒张压 mm Hg	67.8 ± 4.4	118.1 ± 7.9 ^①	115.4 ± 8.8 ^①	68.9 ± 6.2 ^②	<0.05	0.6559
蛋白尿 g/24 h	0.09 ± 0.08	6.37 ± 1.36 ^①	6.58 ± 1.09 ^①	0.11 ± 0.09 ^②	<0.05	0.5154

注：与正常对照组比较，*P*<0.05 为差异有统计学意义；①：*P*<0.0001 为差异有高度统计学意义；②：*P*>0.05 为差异无统计学意义。③：在正常对照组及 APS 组中无 PE 发病。

二、血清中 CHO、TG、FFA 水平比较

三组病理血清与正常对照组血清中 CHO 水平

差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但 TG 和 FFA 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2、图 1。

表 2 血清中胆固醇 (CHO)、甘油三酯 (TG)、游离脂肪酸 (FFA) 浓度

项目	NP 组	E-PE 组	PE-HELLP 组	APS 组	P 值	F 值
CHO(mmol/L)	3.892±0.296	4.540±0.342 ^②	4.324±0.624 ^②	4.126±0.274 ^②	0.168	1.999
TG(mmol/L)	4.048±0.774	6.612±0.574 ^①	5.362±0.449 ^②	7.254±0.606 ^①	<0.05	25.39
FFA(μ mol/L)	398.2±28.9	688.1±65.24 ^③	588.7±29.31 ^①	727.1±35.82 ^③	<0.05	119.398

注:与正常对照组比较,① $P<0.05$ 为差异有统计学意义;② $P>0.05$ 为差异无统计学意义;③ $P<0.05$ 。

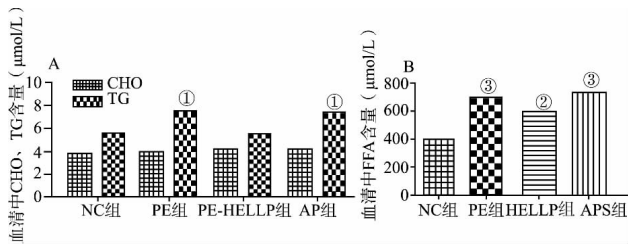


图 1 血清中 CHO、TG、FFA 水平与对照组比较

(① $P<0.05$, ② $P<0.005$, ③ $P<0.0001$)。

三、油红 O 染色

E-PE 组和 APS 组细胞明显肿大、变圆, 细胞浆中弥漫性分布橙红色脂滴, 排列较密集, 脂滴颗粒不均一, 局部灶状聚积, 细胞内脂滴沉积数量明显多于 NC 组 ($P<0.005$) 和 PE-HELLP 组 ($P<0.05$); PE-HELLP 组细胞失去正常形态, 胞浆中散在分布橙红色小脂滴, 排列局部较稀疏; NC 组细胞形态规则, 触角突出, 胞浆通透、丰富, 胞浆内橙红色小脂滴分布稀疏, 脂滴颗粒小而散在。E-PE 组和 APS 组间脂滴沉积数量差异无统计学意义 ($P>0.05$), PE-HELLP 组细胞内脂滴沉积数量多于 NC 组 ($P<0.05$), 如图 2、图 3 所示。

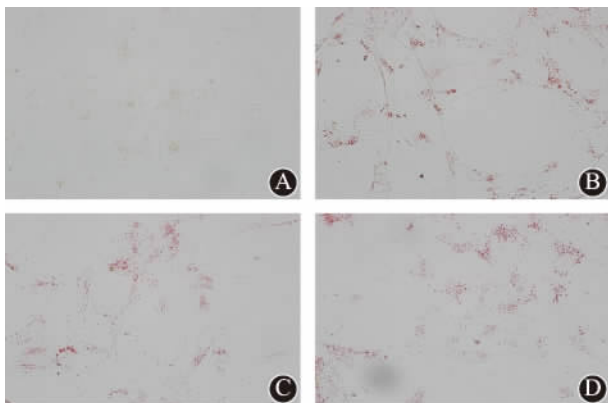


图 2 A: 正常对照组脂质沉积明显减少, 细胞质中散在分布橙红色小脂滴, 排列局部较稀疏; B: E-PE 组; C: PE-HELLP 组; D: APS 组细胞脂质沉积相似, 细胞明显肿大, 变圆, 细胞质中弥漫性分布橙红色脂滴, 排列较密集, 脂滴颗粒不均一, 局部灶状聚积 (油红 O 染色 $\times 60$)。

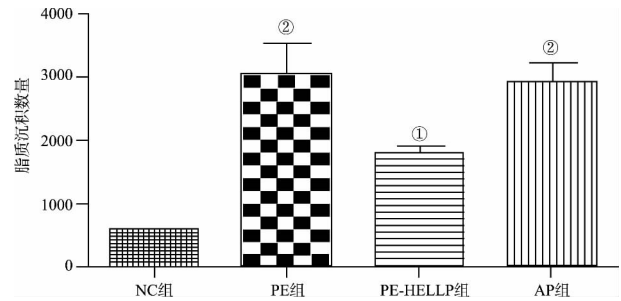


图 3 滋养细胞内脂质沉积数量比较 (① $P<0.05$,

② $P<0.005$)。

四、血清 FFA 水平与滋养细胞内脂质沉积相关性

在 E-PE 组、PE-HELLP 组和 APS 组中, 血清 FFA 水平与滋养细胞内脂质沉积数量均存在线性正相关, R 值分别为 0.866 9、0.843 5、0.773 4, $P<0.05$ 。

讨论

目前关于重度子痫前期、HELLP 及 APS 患者中脂代谢和脂肪酸氧化功能异常对滋养细胞内脂滴沉积的影响鲜有报道, 脂肪酸氧化代谢障碍是否影响此类疾病的发生发展尚不得而知。有研究显示, 子痫前期患者胎盘滋养细胞中脂质沉积增多^[9]。在子痫前期胎盘线粒体内长链脂肪酸 β -氧化的关键酶 LCHAD 表达降低^[10-11]。本课题组以往研究中发现, 早发型重度子痫前期和 HELLP 综合征中 LCHAD 基因和蛋白表达的降低比晚发型更明显, 提示在子痫前期不同临床发病类型中可能存在不同的脂代谢和脂肪酸氧化功能的变化和影响^[3]。在妊娠合并 APS 患者中亦存在类似的脂质代谢异常及动脉粥样硬化改变^[12]。APS 患者合并子痫前期和 HELLP 综合征的风险增加, 与子痫前期并发率能达到 50%, 且病情重、发病早^[13]。本课题组发现, 经注射 $\beta 2$ GPI 建立的孕鼠模型中表现出与子痫前期相类似的高血压、蛋白尿、胎盘和肝细胞内脂滴大量沉积及不良妊娠结局^[14]。

在本研究中我们发现,早发型子痫前期和 APS 患者中均存在脂肪酸氧化代谢障碍,以及血清中甘油三酯水平的升高。而 HELLP 患者出现游离脂肪酸升高而甘油三酯并不升高的现象。肝细胞受损时羟甲基戊二酸单酰 COA 还原酶合成减少,也可导致甘油三酯水平下降。由此可见,在早发型重度子痫前期、HELLP 及 APS 患者中均存在脂肪酸氧化代谢异常,但由于肝的合成代谢功能不同,从而对脂代谢产生不同的影响。

与正常对照组进行比较后我们发现,血清游离脂肪酸水平与细胞内脂质沉积数量呈正相关。早发型重度子痫前期和 APS 血清中游离脂肪酸水平明显升高,滋养细胞内脂质聚集明显增多,提示在早发型重度子痫前期和 APS 患者中存在脂肪酸氧化代谢障碍。当细胞内脂质沉积增多时,其代谢障碍的中间产物累积会产生毒性作用,诱导胎盘脂质过氧化物的产生和抗氧化物的减少,自由基进入母体循环,引发一系列的炎症介质改变和加重内皮功能损伤,从而使机体进入恶性循环状态。脂肪酸还可以通过脂质过氧化加重氧化应激、刺激产生炎症细胞因子及促进细胞凋亡,进而损伤血管内皮细胞功能,从而导致子痫前期疾病的发生^[15]。而 HELLP 血清游离脂肪酸水平低于 E-PE 组和 APS 组,滋养细胞内脂质沉积数量亦少于 E-PE 和 APS 组。细胞内沉积的脂质主要包括甘油三酯、胆固醇、胆固醇酯、视黄酯、磷脂及游离脂肪酸。由于 HELLP 患者血清以游离脂肪酸升高为主,甘油三酯无明显升高,因此 HELLP 刺激后的滋养细胞内脂质沉积量少于早发型重度子痫前期。这提示在 HELLP 患者中也存在长链脂肪酸氧化功能障碍,但由于血脂含量无明显升高,滋养细胞内脂质沉积较少,因此表现出与早发型重度子痫前期不同的临床症状。

综上所述,在早发型重度子痫前期、HELLP 综合征及 APS 患者中血清游离脂肪酸升高水平不同,对滋养细胞脂质沉积影响程度不同,两者之间具有相关性。提示在早发型重度子痫前期、HELLP 综合征及 APS 患者之间可能存在不同程度和不同类型的脂肪酸氧化代谢异常,同时脂肪酸氧化代谢异常也在三者之间发挥着不同的作用及影响,这可能是此类型疾病发生发展的机制之一。

参 考 文 献

[1] Gohil JT, Patel PK, Gupta P. Estimation of Lipid Profile in

subjects of Preeclampsia. The Journal of Obstetrics and Gynecology of India, 2011, 61: 399-403.

- [2] Bartha JL, Visiedo F, Fernandez-Deudero A, et al. Decreased mitochondrial fatty acid oxidation in placentas from women with preeclampsia. *Placenta*, 2012, 33: 132-134.
- [3] 孙晓乐, 杨孜, 王伽略, 等. 重度子痫前期与长链脂肪酸氧化酶基因蛋白表达异常的相关性. *中华医学杂志*, 2011, 91: 2026-2029.
- [4] de Souza AW, Silva NP, de Carvalho JF, et al. Impact of hypertension and hyperhomocysteinemia on arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 2007, 16: 782-787.
- [5] Panagiotis T, George M, Vassiliki P, et al. Antiphospholipid syndrome: a predisposing factor for early onset HELLP syndrome. *Rheumatol Int*, 2007, 28: 171-174.
- [6] do Prado AD, Piovesan DM, Staub HL, et al. Association of Anticardiolipin Antibodies With Preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*, 2010, 116: 1433-1443.
- [7] Liu J, Cao B, Li YX, et al. GnRH I and II up-regulate MMP-26 expression through the JNK pathway in human cytotrophoblasts. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8: 5.
- [8] Bai Y, Yang W, Yang HX, et al. Downregulated miR-195 Detected in Preeclamptic Placenta Affects Trophoblast Cell Invasion via Modulating ActRIIA Expression. *PLoS One*, 2012, 7: e38875.
- [9] Shekhawat P, Bennett MJ, Sadovsky Y, et al. Human placenta metabolizes fatty acid; implications for fetal fatty acid oxidation disorders and maternal liver diseases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284: E1098-1105.
- [10] Bartha JL, Visiedo F, Fernandez-Deudero A, et al. Decreased mitochondrial fatty acid oxidation in placentas from women with preeclampsia. *Placenta*, 2012, 33: 132-134.
- [11] Robinson NJ, Minchell LJ, Myers JE, et al. A potential role for free fatty acids in the pathogenesis of preeclampsia. *J Hypertensions*, 2009, 27: 1293-302.
- [12] Ames PR, Matsuura E, Batuca JR, et al. High-density lipoprotein inversely relates to its specific autoantibody favoring oxidation in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 2010, 19: 711-716.
- [13] Clark EA, Silver RM, Branch DW. Do Antiphospholipid Antibodies Cause Preeclampsia and HELLP Syndrome? *Curr Rheumatol Rep*, 2007, 9: 219-225.
- [14] Ding X, Yang Z, Han Y, et al. Long-chain fatty acid oxidation changes in a b2 glycoprotein I-induced preeclampsia-like mouse model. *Placenta*, 2014, pii: S0143-4004 (14) 00122-2.
- [15] Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia. The placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review. *Placenta*, 2003, 24 (Suppl a): S21-27.

(收稿日期: 2014-06-05)