

## 双酚 A 对人早孕绒毛组织结构及 $\beta$ -HCG 分泌功能的影响

林强<sup>1</sup>, 朱洪<sup>2</sup>, 吴丹梅<sup>1</sup>, 谈顺<sup>3</sup>, 张毅<sup>1\*</sup>

**摘要:** [目的] 研究双酚 A (BPA) 水平与人早孕绒毛膜促性腺激素 ( $\beta$ -HCG) 分泌功能的关系, 探讨 BPA 对绒毛组织可能带来的影响。[方法] 以 40 例早期妊娠 (6~8 周) 的新鲜绒毛组织进行体外培养, 培养基中加入不同浓度的 BPA: A 组为  $1000 \times 10^{-6}$  g/L, B 组为  $500 \times 10^{-6}$  g/L, C 组为  $1 \times 10^{-6}$  g/L, D 组为对照组。取第 2、4 天的培养液测定  $\beta$ -HCG; 第 4 天将培养的绒毛组织作病理检查。[结果] 随培养时间增加, D 组的  $\beta$ -HCG 浓度呈递减变化, 而其他组呈递增变化, 且差异有统计学意义 ( $P = 0.001$ ); 随 BPA 浓度的增加,  $\beta$ -HCG 的浓度也逐渐增加, 各组间第 4 天与第 2 天  $\beta$ -HCG 的差异有统计学意义 ( $P = 0.002$ )。D 组绒毛结构正常, 其他组绒毛合体滋养细胞明显增生, 结节数量有不同程度增多, 且出现绒毛间质水肿、纤维素样坏死、退行性变化, 部分绒毛出现萎缩。[结论] BPA 对绒毛组织具有细胞毒性作用, 并可影响滋养细胞的分泌功能。

**关键词:** 双酚 A; 人绒毛膜促性腺激素 ( $\beta$ -HCG); 体外培养; 绒毛组织

**Study on the Effects of Bisphenol A on the Morphology and  $\beta$ -HCG Secretion of Human Early Villus** LIN Qiang<sup>1</sup>, ZHU Hong<sup>2</sup>, WU Dan-mei<sup>1</sup>, TAN Shun<sup>3</sup>, ZHANG Yi<sup>1\*</sup> (1. Reproduction Center of Hainan Province, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China; 2. Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China; 3. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China). \* Address correspondence to ZHANG Yi; E-mail: zhangyi0307@yahoo.com.cn

**Abstract:** [Objective] To study the effects of bisphenol A (BPA) on the morphology and  $\beta$ -HCG secretion of human early villus and the possible toxicity of BPA to human early villus. [Methods] The human early villus from forty pregnancy cases (6-8 weeks) were collected, cultured and treated with BPA at different concentrations. The cultures were divided into 4 groups based on the concentration of BPA. The concentration of BPA was  $1000 \times 10^{-6}$  g/L in group A,  $500 \times 10^{-6}$  g/L in group B,  $1 \times 10^{-6}$  g/L in group C respectively, and without BPA in group D as control. The concentration of  $\beta$ -HCG in the supernatant of culture was measured by chemiluminescence immunoassay at day 2 and day 4 of culture, and the cultured villus was stained by HE at day 4. [Results] The concentration of  $\beta$ -HCG in the culture was elevated in A, B and C group with increasing culture time, while its concentration in D group was decreased. The concentration of  $\beta$ -HCG was statistically higher in group A, B and C than in group D. The concentration of  $\beta$ -HCG was increased with the increasing BPA. The differences of  $\beta$ -HCG values between day 4 and day 2 among the groups were statistically different ( $P = 0.002$ ). The histologic abnormalities of villus were characterized by increasing syncytiotrophoblast knotting, prominent cytotrophoblast proliferating, basement membrane thickening, fibrinoid necrosis and anaplasia. In addition, atrophy was also observed in some villus. [Conclusion] In culture, BPA is cytotoxic to villus and has effects on the secretion of trophocyte.

**Key Words:** bisphenol A;  $\beta$ -HCG; culture in vitro; human early villus

双酚基丙烷即双酚 A (bisphenol A, BPA) 是聚碳酸酯、环氧树脂等产品的重要化工原料, 广泛用于生产食品包装材料、食物和饮料容器、牙科填料以及杀虫剂等, 可通过消化道、呼

吸道、皮肤等途径进入人体。人群中血清、尿样、母体胎盘组织及胎儿血浆等样品中均可检测出不同浓度的 BPA。BPA 是一种环境内分泌干扰物, 具有类雌激素样作用。国内外研究发现, 在胚胎发育早期, 低剂量 BPA 可影响人类的生长发育、性成熟、血液的激素水平、生殖器官的功能、免疫功能、脑细胞某些酶的活性和信号转导等<sup>[1-9]</sup>。动物实验结果表明, BPA 可以引起小鼠绒毛间质水肿、纤维素样坏死、退行性变化、胎盘功能障碍及胚胎的发育异常等<sup>[10-11]</sup>。但 BPA 对人早孕绒毛的影响尚无深入的研究。因此, 本实验拟通过分析 BPA 对人早孕绒毛的毒性作用及其对滋养细胞分泌功能的影响, 探索 BPA 对人类妊娠可能存在的危害。

[基金项目] 海南省重点科技项目 (编号: 061005)

[作者简介] 林强 (1962-), 女, 主治医师; 研究方向: 生殖医学; E-mail: linqiang705@163.com

[\*通信作者] 张毅副主任医师; E-mail: zhangyi0307@yahoo.com.cn

[作者单位] 1. 海南医学院附属医院海南省生殖医学中心, 海口 570102; 2. 海南医学院附属医院检验科, 海口 570102; 3. 海南医学院附属医院病理科, 海口 570102

1 材料和方法

1.1 仪器设备与试剂

二氧化碳培养箱, 无菌操作台, 倒置显微镜, 全自动免疫发光分析仪 ASxYM( 美国 ), 2135 型组织切片机( 莱卡, 德国 ), 组织脱水机( 樱花, 日本 ), BPA( 天津市大茂化学试剂厂产品 ), 1640 培养基( sigma 公司生产 ), 人绒毛膜促性腺激素(  $\beta$ -HCG )化学发光免疫分析试剂盒( 美国贝克曼公司生产 )。

1.2 取材

取孕 6~8 周的人工流产新鲜绒毛组织 40 份, 分为 4 组, 经洗涤剪去蜕膜后, 每份取绒毛 0.5 g 用于实验。孕妇的年龄为 20~35 岁, 无心、肝、肾等严重疾病和生殖道感染性疾病。孕妇的基本情况见表 1。

1.3 分组与绒毛培养

将新鲜绒毛 0.5 g 置于 6 mL 的 1640 培养液中 37℃、5% 二氧化碳、95% 湿度的培养箱中培养。培养液中加入不同浓度溶于乙醇的 BPA: 准确称取 10 mg BPA 溶于无水乙醇 10 mL 中, 制成浓度为 1 g/L 的母液, 再将母液加到 1640 培养液中, 使 BPA 的终浓度分别为  $1000 \times 10^{-6}$  g/L ( A 组 )、 $500 \times 10^{-6}$  g/L ( B 组 ) 和  $1 \times 10^{-6}$  g/L ( C 组 ), D 组为培养液对照组( 加等量无水乙醇 )。取第 2 天、第 4 天的培养液, 置于 -20℃ 冰箱中冻存待测  $\beta$ -HCG。取培养第 4 天的绒毛, 10% 甲醛固定, 供 HE 染色。

1.4  $\beta$ -HCG 检测

采用化学发光免疫分析法进行测定。

1.5 病理检查

绒毛组织标本常规 HE 染色, 普通光镜观察绒毛组织病理改变。

1.6 统计方法

SPSS for windows 12.0 建立数据库, 用  $t$  检验分析各组第 4 天和第 2 天  $\beta$ -HCG 的差异, 用秩和检验( Kruskal-Wallis 及 Wilcoxon Signed Ranks )分析各组第 4 天和第 2 天  $\beta$ -HCG 差值之间的差异。

2 结果

2.1 各组标本孕妇的基本情况比较

各组间年龄及妊娠天数差异无统计学意义(  $P > 0.05$  ), 结果见表 1。

表 1 各组标本孕妇基本情况比较(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	例数	年龄 <sup>*</sup>	妊娠天数 <sup>**</sup>
A 组	10	24.1 $\pm$ 3.26	50 $\pm$ 5.02
B 组	10	23.0 $\pm$ 4.29	49 $\pm$ 6.33
C 组	10	22.6 $\pm$ 4.93	51 $\pm$ 4.95
D 组	10	24.8 $\pm$ 2.98	52 $\pm$ 6.39
合计	40	22.9 $\pm$ 4.57	50.5 $\pm$ 5.30

[ 注 ]<sup>\*</sup>: 各组年龄比较,  $P > 0.05$ ; <sup>\*\*</sup>: 各组妊娠天数比较,  $P > 0.05$ 。

2.2 BPA 对绒毛培养液中  $\beta$ -HCG 浓度的影响

含 BPA 的 A、B、C 组  $\beta$ -HCG 浓度呈递增, 而对照组( D 组 )呈递减变化; 各组第 4 天与第 2 天  $\beta$ -HCG 浓度的比较存在统计学差异(  $P = 0.001$  ), 结果见表 2。

对各组第 4 天与第 2 天  $\beta$ -HCG 浓度之间的差值进行秩和分析, 结果显示组间差异存在统计学意义(  $P = 0.002$  ), 提示培养液中  $\beta$ -HCG 的增加与 BPA 呈正相关, BPA 对绒毛培养液  $\beta$ -HCG 浓度影响呈量效关系, 结果见表 2。

表 2 各组  $\beta$ -HCG 浓度测定值中位数的比较( mIU/mL·g )

组别	第 2 天	第 4 天	第 4 天与第 2 天差值
A	150.58	329.51 <sup>*</sup>	178.93 <sup>**</sup>
B	131.01	270.04 <sup>*</sup>	139.03 <sup>**</sup>
C	92.94	213.57 <sup>*</sup>	120.63 <sup>**</sup>
D	87.86	76.03	-11.83

[ 注 ]<sup>\*</sup>: 与第 2 天的  $\beta$ -HCG 浓度比较, 差异有统计学意义(  $P = 0.001$  );

<sup>\*\*</sup>: 秩和检验分析显示第 4 天和第 2 天  $\beta$ -HCG 的差值在组间差异有统计学意义(  $P = 0.002$  )。

2.3 各组绒毛病理结构的变化

对照组绒毛结构正常; 含 BPA 各组绒毛合体滋养细胞明显增生, 结节数量有不同程度的增多, 且出现绒毛间质水肿、纤维素样坏死及退行性变化。尤其 A 组滋养细胞明显增生, 滋养细胞下基底膜增厚, 合体结节增多, 合体细胞出芽, 发生纤维素样坏死的绒毛增多( 见图 1 )。

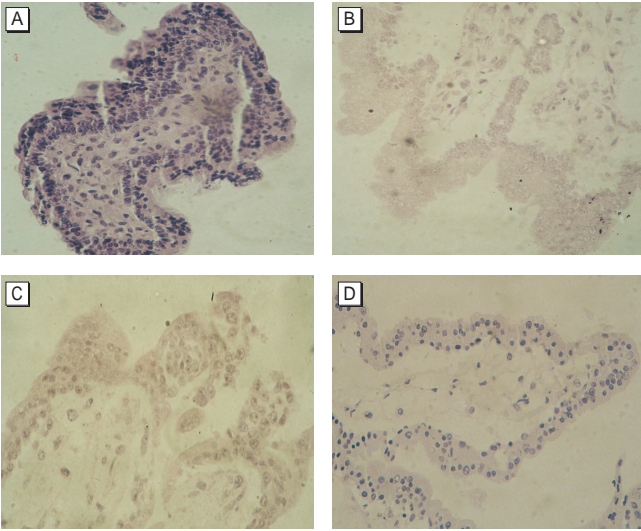


图 1 各组绒毛 HE 染色结果( HE 染色  $\times 200$  )

[ 注 ] A. A 组, 绒毛合体滋养细胞结节数量增多, 滋养细胞增生, 滋养细胞下基底膜增厚; B. B 组, 绒毛合体滋养细胞结节数量增多, 细胞滋养细胞增生; C. C 组, 合体细胞出芽; D. D 组, 正常绒毛结构。

3 讨论

由于胎盘滋养层直接与母体血循环相接触, 血清中  $\beta$ -HCG 浓度可直接反应胎盘功能,  $\beta$ -HCG 水平异常改变可能是胎盘功能障碍的较早信号。国内外已有大量文献报道  $\beta$ -HCG 水平升高与妊娠并发症和不良妊娠结局有关, 如妊娠高血压综合征( PIH )、胎儿生长受限( FGR )、早产等。此外, 高水平的  $\beta$ -HCG 还可能与胎儿异常、新生儿呼吸窘迫综合征、新生儿黄疸及死胎的发生有关<sup>[12-16]</sup>。

动物实验结果发现, 1 pmol/L~1 nmol/L 的 BPA 可以影响小鼠的某些细胞功能, 而人体内的 BPA 的浓度远高于此浓度<sup>[17]</sup>。石峻岭等<sup>[18]</sup>对人群的调查发现, 普通人群的血清 BPA 水平中,

95% 正常值范围是 0~6.8 ng/mL (0~6.8  $\mu$ g/L), 汪莉等<sup>[19]</sup>对深圳市人群血清中的 BPA 进行检测, 结果显示, BPA 的职业密切接触者 100% 检出, BPA 含量均大于 27.16  $\mu$ g/L, 最高值为 41.61  $\mu$ g/L; 非职业接触者 51% 检出, 最高值为 13.54  $\mu$ g/L, 最低值为 0.58  $\mu$ g/L。在本研究中, C 组 BPA 的浓度 1  $\mu$ g/L (1 ng/mL 或 4.3 nmol/L) 明显低于石峻岭等所报道的普通人群 95% 正常值的上限, 约相当于汪莉等报道的非职业接触人群中检出者 BPA 血清浓度的最低检出值, 这个浓度可以导致绒毛组织发生合体滋养细胞出芽, 并且随着 BPA 浓度的增加, 病理变化越明显, 合体滋养细胞明显增生、细胞结节数量增多、绒毛间质水肿, 纤维素样坏死和退化性变化, 甚至出现绒毛萎缩等病理改变, 表明 BPA 对绒毛的损伤与 BPA 的浓度呈正相关。同时, BPA 可以使绒毛组织  $\beta$ -HCG 的分泌增加, 且存在明显的量效关系。结果提示 BPA 可导致绒毛发生病理学改变, 并刺激早期绒毛细胞分泌  $\beta$ -HCG。这一现象是否给妊娠带来高风险, 值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] HUNT PA, KOEHLER KE, SUSIARJO M, et al. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(7): 546-553.
- [2] TAKEUCHI T, TSUTSUMI O, IKEZUKI Y, et al. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction[J]. *Endocr J*, 2004, 51(2): 165-169.
- [3] 崔金山, 张玉敏, 段志文, 等. 双酚 A 与壬基酚混合染毒对小鼠生殖功能的影响[J]. *工业卫生与职业病*, 2004, 30(5): 289-292.
- [4] 张玉敏, 崔金山, 段志文, 等. 环境雌激素双酚 A 对小鼠生殖功能的影响[J]. *工业卫生与职业病*, 2004, 30(5): 296-299.
- [5] TAN BL, KASSIM NM, MOHD MA. Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol[J]. *Toxicol Lett*, 2003, 143(3): 261-270.
- [6] 邓茂先, 吴德生, 陈祥贵, 等. BPA 雄性生殖毒性的体内外实验研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2004, 38(6): 383-387.
- [7] ASHBY J, ODUM J. Gene expression changes in the immature rat uterus: effects of uterotrophic and sub-uterotrophic doses of bisphenol A[J]. *Toxicol Sci*, 2004, 82(2): 458-467.
- [8] 龙冬梅, 程微波, 张浩, 等. 围生期双酚 A 暴露对断乳期雄性子代脑芳香化酶表达的影响[J]. *西南国防医药*, 2005, 15(2): 123-125.
- [9] 王亚民, 徐晓虹, 张婧围, 等. 围产期母鼠染毒双酚 A 对雄性子代脑内谷氨酸 N-甲基-D-天冬氨酸受体发育的影响[J]. *生物物理学报*, 2009, 25(2): 99-105.
- [10] TACHIBANA T, WAKIMOTO Y, NAKAMUTA N, et al. Effects of bisphenol A (BPA) on placental and survival of the neonates in mice[J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53(3): 509-514.
- [11] RICHTER CA, BIRNBAUM LS, FARABOLLINI F, et al. In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies[J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 24(2): 199-224.
- [12] 王秀琴, 王艳虹. 妊娠中晚期母血  $\beta$ -hCG 升高与胎盘病理变化的关系[J]. *山东医药*, 2005, 45(19): 61-62.
- [13] LEPAGE N, CHITAYAT D, KINGDOM J, et al. Association between second-trimester isolated high maternal serum human chorionic gonadotropin levels and obstetric complications in singleton and twin pregnancies[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(5): 1354-1359.
- [14] CHANDRA S, SCOTT H, DODDS L, et al. Unexplained elevated maternal serum alpha-fetoprotein and/or human chorionic gonadotropin and the risk of adverse outcomes[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 189(3): 775-781.
- [15] SHENHAV S, GEMER O, VOLODARSKY M, et al. Midtrimester triple test levels in women with severe preeclampsia and HELLP syndrome[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003, 82(10): 912-915.
- [16] 蒙晓玲, 刘文荣, 赵炳红, 等. 妊娠期高血压疾病患者血中  $\beta$ -HCG 与 AFP 关系的探讨[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(15): 2029-2030.
- [17] WELSHONS WV, NAGEL SC, VOM SAALLARGE FS. Large effects from small exposures. III. endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(6): S56-S69.
- [18] 石峻岭, 杨水莲, 肖国兵, 等. 普通人群血清双酚 A 水平的测定[J]. *环境与职业医学*, 2004, 21(3): 190-193.
- [19] 汪莉, 何继宝, 李风华, 等. 深圳市人群中双酚 A 含量的血清学调查[J]. *实用预防医学*, 2005, 12(2): 241-242.

(收稿日期: 2009-02-09)

(编辑: 王晓宇; 校对: 吴德才)