DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0595
文章编号 1671-8852(2025)09-1097-09

孕期阿奇霉素暴露对胎鼠肝脏发育和功能的影响及其特征

卢正杰[1,2,3] 毛彤芸[2] 刘可欣[1,4] 汪 晖[2,4]
[1]武汉大学中南医院药学部 湖北 武汉 430071；
[2]武汉大学基础医学院药理系 湖北 武汉 430071；
[3]武汉大学中南医院关节与运动医学科 湖北 武汉 430071；
[4]发育源性疾病湖北省重点实验室 湖北 武汉 430071

摘要 目的：探究不同时期、疗程和剂量的孕期阿奇霉素暴露(PAzE)对胎肝发育和功能的影响。方法：孕鼠灌胃给予不同时期(孕中、晚期)、疗程(单疗程或多疗程)和剂量(50或200 mg•kg^{-1}•d^{-1}) PAzE，检测胎肝质量以及增殖、分化、凋亡和糖脂代谢功能基因表达。结果：在雌性，PAzE抑制胎鼠肝脏增殖和分化相关基因表达，并促进凋亡相关基因表达。在雄性，PAzE主要促进胎鼠肝脏增殖和分化相关基因的表达，对凋亡无显著影响。进一步，PAzE抑制雌、雄胎鼠肝脏的糖异生功能，增强其甘油三酯、胆固醇和胆汁酸合成功能。此外，PAzE促进雌性胎鼠肝脏雌激素受体表达，并抑制雄性胎鼠雄激素受体表达。上述改变在孕晚期、多疗程和高剂量下更显著。结论：PAzE可以性别差异性地影响胎肝发育，抑制雌、雄胎鼠肝脏的糖异生功能，增强其脂质合成功能，上述改变具有时期、疗程和剂量差异。

关键词 孕期用药；阿奇霉素；肝脏发育；糖异生；脂质合成；发育毒性
中图分类号 R3
文献标识码 A
开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

Effects of prenatal azithromycin exposure on fetal mouse liver development and function and the characteristics

LU Zhengjie[1,2,3], MAO Tongyun[2], LIU Kexin[1,4], WANG Hui[2,4]
[1]Dept. of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;
[2]Dept. of Pharmacology, Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430071, Hubei, China;
[3]Dept. of Orthopedic Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;
[4]Hubei Provincial Key Laboratory of Developmentally Originated Diseases, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effects of prenatal azithromycin exposure (PAzE) on fetal mouse liver development and function at different stages, courses, and doses. **Methods:** Pregnant mice were exposed to azithromycin during pregnancy at different stages (middle/late pregnancy), courses (single course/multiple courses), and doses (50 or 200 mg•kg^{-1}•d^{-1}) by intragastric administration. Fetal liver

课题来源：国家重点研发计划重点专项(编号：2020YFA0803900)；国家自然科学基金资助项目(编号：32300973)；中央高校基本科研业务费专项资金(编号：2042023kf0066)；武汉大学中南医院科技创新培育基金(编号：CXPY2024014)
作者简介：卢正杰，男，1998—，医学博士生，主要从事药物发育毒理研究，E-mail: zhengjielu1998@163.com
通信作者：刘可欣，女，1996—，医学博士，副研究员，主要从事药物发育毒理研究，E-mail: Kathiehubu@163.com；汪晖，女，1963—，医学博士，二级教授，博士生导师，主要从事药物发育毒理研究，E-mail: wanghui19@whu.edu.cn

weight and mRNA expression of genes related to proliferation, differentiation, apoptosis, and glucose and lipid metabolism were detected. **Results:** In female mice, PAzE inhibited the expression of genes related to liver proliferation and differentiation, and promoted the expression of genes related to apoptosis. In male mice, PAzE mainly promoted the expression of genes related to liver proliferation and differentiation, but exerted no significant effect on apoptosis. Furthermore, PAzE inhibited gluconeogenesis and enhanced the synthesis of triglyceride, cholesterol, and bile acid in the liver of female and male fetal mice. In addition, PAzE promoted the expression of estrogen receptor in the liver of female fetal mice and inhibited the expression of androgen receptor in male fetal mice. These changes were more significant in late pregnancy, with multiple courses and high doses. **Conclusion:** PAzE could exert sex-specific effects on fetal liver development, inhibit gluconeogenesis in the liver of female and male fetal mice, and enhance their lipid synthesis function. These effects differ based on stages, courses, and doses.

Key Words Medication During Pregnancy; Azithromycin; Liver Development; Gluconeogenesis; Lipid Synthesis; Developmental Toxicity

阿奇霉素属于新一代大环内酯类抗生素,具有抗支原体、衣原体和多种细菌感染的功效[1]。近些年,研究[2]还发现阿奇霉素具有抗病毒、抗炎和免疫调节作用,且其特性已被证明对广泛的呼吸系统疾病有临床疗效。在孕期,阿奇霉素广泛用于预防和治疗宫内感染、性传播感染、妊娠期疟疾等[3]。流行病学调查[4]表明,20%~25%的妇女在怀孕期间接受了抗生素治疗,而阿奇霉素常被用作氟喹诺酮和四环素等具有胎儿发育毒性药物的替代药品[5]。妇产科抗生素使用指南将阿奇霉素列为妊娠期B级药物[6]。近年来,陆续有研究提示孕期服用阿奇霉素对胎儿发育的不良影响。例如,妊娠早期使用大环内酯类药物(红霉素除外)可能增加自然流产风险[7]。孕期暴露于大环内酯类药物可能与胎儿器官特异性畸形有关[8]。因此,孕期阿奇霉素暴露(prenatal azithromycin exposure,PAzE)具有潜在的发育毒性。

已知在不同的妊娠时期,胎儿对药物的敏感性以及对发育毒性的反应也存在差异。如孕期大环内酯类药物暴露与子代先天畸形的相关性仅在孕早期存在[9];孕中期使用地塞米松对子代小鼠关节软骨发育的损害比孕晚期更为显著[10]。相反,孕晚期使用阿司匹林可引发子代肾损伤,而其在孕中期的使用是相对安全的[11]。此外,本实验室前期研究[10,12]发现,孕期地塞米松暴露对胎鼠长骨和关节软骨的发育还具有剂量和疗程依赖性的毒性效应。因此,推测PAzE诱发的胎肝发育毒性也可能有时期、剂量和疗程的影响。

在本研究中,作者构建了不同时期(孕中/晚期)、疗程(单疗程/多疗程)和剂量(50或200 mg·kg^{-1}·d^{-1})的PAzE小鼠模型,通过观察PAzE对胎鼠肝脏发育和功能的影响及其特征,系统评估阿奇霉素的胎肝发育毒性。本研究将有助于全面了解PAzE对子代早期发育带来的不利影响,从而加深对孕期药物治疗和环境药物暴露安全性的认识。

1 材料与方法

1.1 实验动物 昆明小鼠[编号:2019-0010,认证号:110324210105266683,许可证号:SCXK(湖北)],体质量约(35±5) g,购自湖北省疾病预防控制中心(中国武汉)。动物实验在武汉大学动物实验中心(中国武汉)进行,该中心由国际实验动物护理评估与认可协会(AAALAC International)认可。本议定书经武汉大学动物保护与利用专业委员会(IACUC)批准通过(ZN2022228)。所有动物实验程序均经中国动物福利委员会批准。

1.2 试剂 阿奇霉素(CAS编号:83905-01-5;A59370)购自华润三九中怡药业有限公司(中国浙江)。总RNA TRIzol试剂盒购自Omega Bio-Tek(美国)。反转录和实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒(Q223)购自TaKaRa公司(中国大连)。所使用的引物序列见前期研究所示[13],所有引物均由武汉天艺汇源生物科技有限公司合成。其他实验用试剂均为分析级试剂。

1.3 实验动物的处理 在标准条件下,适应性喂养1周后,将两只雌鼠和1只雄鼠过夜交配。检出阴栓视为交配,记为妊娠日(gestation day,GD) 0。

在本研究中，不同组别的给药方法如下。①对照组1（C1）：GD10-12，10 mL•kg^{-1}•d^{-1} 0.5% 羧甲基纤维素钠（Carboxy Methyl Cellulose-Na，CMC-Na），灌胃；②对照组2（C2）：GD15-17，10 mL•kg^{-1}•d^{-1} 0.5%CMC-Na，灌胃；③对照组3（C3）：GD17，10 mL•kg^{-1} 0.5%CMC-Na，灌胃；④孕晚期小剂量阿奇霉素暴露组：GD15-17，50 mg•kg^{-1}•d^{-1}阿奇霉素溶于0.5% CMC-Na，灌胃；⑤孕晚期大剂量阿奇霉素暴露组：GD15-17，200 mg•kg^{-1}•d^{-1}阿奇霉素溶于0.5%CMC-Na，灌胃；⑥孕中期大剂量阿奇霉素暴露组：GD10-12，200 mg•kg^{-1}•d^{-1}阿奇霉素溶于0.5%CMC-Na，灌胃；⑦孕晚期大剂量单疗程阿奇霉素暴露组：GD17，200 mg•kg^{-1}•d^{-1}阿奇霉素溶于0.5%CMC-Na，灌胃。其中，大剂量（200 mg•kg^{-1}•d^{-1}）由临床孕期用药剂量根据人和小鼠所对应的体表面积转换而来[14]。

1.4　总RNA的提取与RT-qPCR　用TRIzol试剂从肝脏组织中分离总RNA并逆转录为cRNA。随后，使用SYBR Green qPCR Master Mix Kit和ABI StepOnePlus（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA）进行RT-qPCR。检测循环阈值（*Ct*），以甘油醛磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，Gapdh）表达归一化的$2^{-\triangle\triangle Ct}$法测定基因的相对表达量，并作为定量对照。

1.5　苏木素伊红染色与免疫组化　肝脏样本固定在4%多聚甲醛溶液中，使用石蜡切片技术进行处理。切片厚度约5 μm，苏木精和伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色，光镜下观察；去除石蜡并进行抗原修复，使用脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，Fasn）和3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶（3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase，Hmgcr）的特异性一抗孵育，随后用二抗标记。通过DAB显色反应进行染色，并用苏木精对核进行对比染色。光镜下观察结果，记录蛋白表达情况。

1.6　统计学处理　使用GraphPad Prsim进行统计和数据分析。所有数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，单因素方差分析用于比较组间差异。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝细胞增殖的影响　首先，作者观察了不同时期（GD10-12和GD15-17）、疗程（GD17和GD15-17）和剂量（50和200 mg•kg^{-1}•d^{-1}）PAzE对胎肝增殖的影响，包括肝重指数（肝/体质量比）与增殖标志物——肝脏增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，*Pcna*）和*Ki67*的表达。与各自的对照组相比，在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下，对于雌性胎鼠，孕晚期PAzE组胎肝形态学无显著改变（图1A），但肝/体质量比较低（$P<0.01$，图1B）。对于雄性胎鼠，孕中、晚期PAzE组胎肝形态学无显著改变（图1C），但肝/体质量比较高（$P<0.01$，图1D）。进一步发现，不同时期的结果表明：在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下，对于雌性胎鼠，孕中、晚期PAzE均可抑制胎肝*Pcna* mRNA表达，而孕晚期PAzE也可抑制胎肝*Ki67* mRNA表达（$P<0.01$，图1E和1F）。对于雄性胎鼠，孕中期PAzE可促进胎肝*Pcna* mRNA表达，而孕中、晚期PAzE可促进胎肝*Ki67* mRNA表达（$P<0.05$或0.01，图1G和1H）。不同疗程的结果表明：在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下，单疗程PAzE均可抑制雌、雄胎鼠肝脏*Pcna*和*Ki67* mRNA表达（$P<0.01$或0.05，图1E～1H）。多疗程PAzE引起雌雄胎鼠肝脏增殖指标的改变如前所述。不同剂量的结果表明：在孕晚期时，对于雌性胎鼠，高剂量PAzE可抑制胎肝*Pcna*和*Ki67* mRNA表达（$P<0.01$，图1E和1F），但低剂量PAzE组无显著改变（图1E和1F）。对于雄性胎鼠，高剂量PAzE可促进胎肝*Ki67* mRNA表达（$P<0.05$或0.01，图1H），但低剂量PAzE组同样无显著改变（图1H）。虽然没有典型的剂量-反应关系，但高剂量组的胎肝细胞增殖指标变化较为明显。

根据以上结果，可以清楚地观察到PAzE可不同程度地影响雌、雄性胎鼠的肝脏增殖，整体上表现为：①孕晚期PAzE对雌、雄胎鼠肝脏增殖的影响程度均强于孕中期；②单疗程和多疗程PAzE均可抑制雌性胎鼠肝脏的增殖，且单疗程影响程度较多疗程轻；而对于雄性胎鼠，单疗程可抑制肝脏增殖，而多疗程则促进肝脏增殖；③高剂量PAzE对雌、雄胎鼠肝脏增殖的影响程度均强于低剂量。

2.2　孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝细胞分化的影响　为了评估PAzE对胎肝细胞分化的影响，作者检测了胎肝中5个肝胆细胞系的关键标志物的表达。其中，白蛋白（albumin，Alb）和甲胎蛋白（alpha fetoprotein，Afp）分别是成熟和不成熟肝细胞的标志物；肝细胞核因子4α（hepatocyte nuclear factor 4 alpha，Hnf4α）可反映肝细胞结构形成和功能成熟水平；细胞角蛋白19（cytokeratin 19，

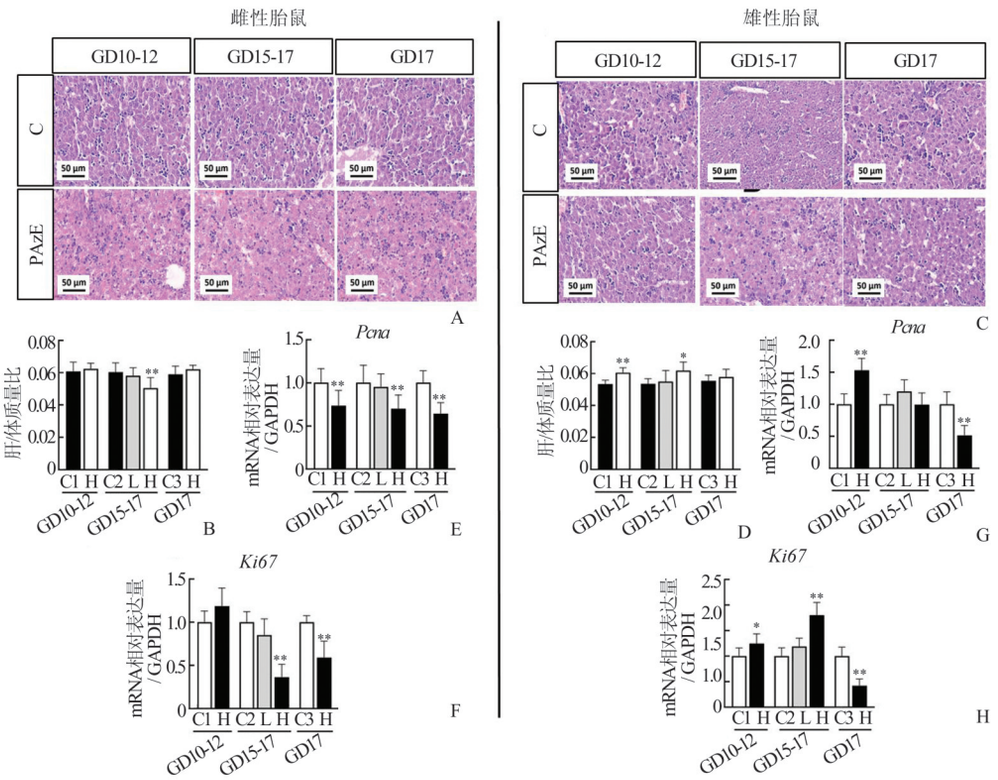


图1 孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝细胞增殖的影响

A～D.胎鼠肝脏形态学与肝/体质量比；E～H.胎鼠肝脏Pcna和Ki67 mRNA表达水平。C1：对照组1；C2：对照组2；C3：对照组3；L：50 mg•kg^{-1}•d^{-1}；H：200 mg•kg^{-1}•d^{-1}；GD：妊娠日。$\bar{x}\pm s$，n=3(HE)，n=8(RT-qPCR)。与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

Ck19)和SRY-box转录因子9(SRY-box transcription factor 9，Sox9)是胆道功能的标志物。

不同时期的结果表明：与各自对照组相比，在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下，对于雌性胎鼠，孕中期PAzE胎肝分化指标无显著变化(图2A～2F)，而孕晚期PAzE可抑制胎肝*Alb*、*Hnf4α*、*Ck19*和*Sox9* mRNA表达，促进*Afp* mRNA表达，并降低*Alb*与*Afp* mRNA表达比($P<0.01$，图2A～2F)；对于雄性胎鼠，孕中期PAzE可促进胎肝*Alb*和*Ck19* mRNA表达，而孕晚期PAzE可促进*Hnf4α*、*Ck19*和*Sox9* mRNA表达($P<0.01$，图2G和2J～2L)。不同疗程的结果表明：在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下，对于雌性胎鼠，单疗程PAzE可促进胎肝*Afp* mRNA表达，抑制雌性胎鼠肝脏*Ck19*和*Sox9* mRNA表达($P<0.01$，图2B、2E、2F)；对于雄性胎鼠，单疗程PAzE可抑制胎肝*Sox9* mRNA表达($P<0.01$，图2L)。多疗程PAzE引起雌雄胎鼠肝脏分化指标的改变如前所述。不同剂量的结果表明：在孕晚期时，对于雌性胎鼠，低剂量PAzE的胎肝*Alb*和*Ck19* mRNA表达减少，且*Alb*与*Afp* mRNA表达比降低，而高剂量PAzE的胎肝除了上述指标变化外，*Afp* mRNA表达也同时增加，并伴随*Hnf4α*和*Sox9* mRNA表达减少($P<0.01$，图2A～2F)；对于雄性胎鼠，低剂量PAzE组雄性胎鼠的肝脏*Hnf4α* mRNA表达上升，而高剂量PAzE组胎肝除了上述指标变化外，*Ck19*和*Sox9* mRNA表达也同时增加($P<0.01$，图2J～2L)。综上可知，孕中、晚期PAzE可抑制雌性胎鼠肝脏分化，但促进雄性胎鼠肝脏分化，而单疗程的高剂量PAzE可抑制雌、雄胎鼠肝脏分化。

综上可知，PAzE可不同程度地影响雌、雄性胎鼠的肝脏分化，整体上表现为：①孕中期PAzE对雌性胎鼠肝脏分化无显著影响，但孕晚期PAzE显著抑制胎肝分化；孕中、晚期PAzE均可部分促进雄性胎鼠肝脏分化；②单疗程PAzE可抑制雌、雄胎鼠肝脏分化，而多疗程PAzE可抑制雌性胎鼠肝脏分化，但促进雄性胎鼠肝脏分化；③高剂量PAzE对雌、雄胎鼠肝脏分化的影响程度均强于低剂量。

2.3 孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝细胞凋亡的影响 为了评估PAzE对胎肝细胞凋亡的影响，作者检测了胎肝中Bax和Bcl2表达。不同时期的结果表明：与各自对照组相比，在

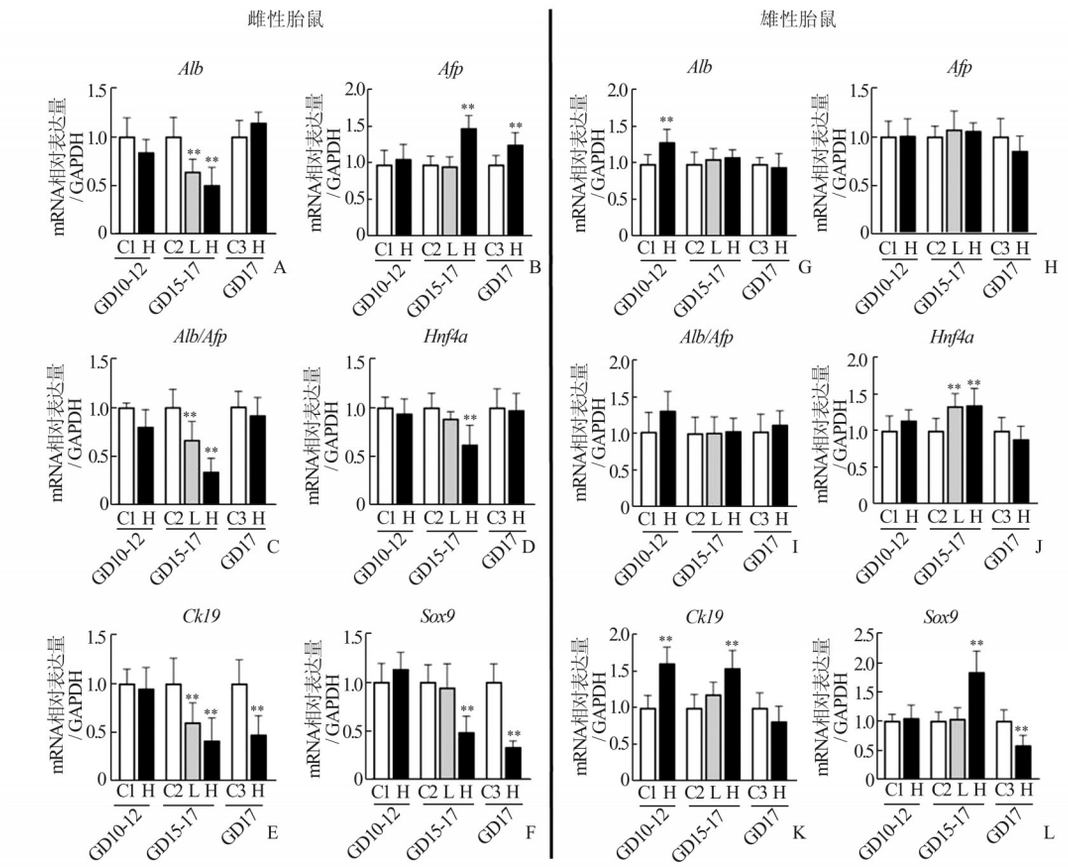


图 2　孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝细胞分化的影响

A～C 和 G～I 分别为雌雄胎鼠肝脏 Alb、Afp mRNA 表达水平以及其表达比；D～F 和 J～L 分别为雌雄胎鼠肝脏 Hnf4α、Ck19 和 Sox9 mRNA 表达水平。C1：对照组 1；C2：对照组 2；C3：对照组 3；L：50 mg•kg^{-1}•d^{-1}；H：200 mg•kg^{-1}•d^{-1}；GD：妊娠日。$\bar{x}\pm s$，$n=8$。与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下，对于雌性胎鼠，孕中期和孕晚期 PAzE 均可增强胎肝 *Bax* mRNA 表达，降低 *Bcl2* mRNA 表达，并升高 *Bax* 与 *Bcl2* mRNA 表达比（$P<0.05$，图 3A～3C）。对于雄性胎鼠，孕中、晚期 PAzE 组肝脏凋亡指标均无显著改变（图 3D～3F）。不同疗程的结果表明：在 200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下，单疗程 PAzE 可增强胎肝 *Bax* mRNA 表达，降低 *Bcl2* mRNA 表达，并升高 *Bax* 与 *Bcl2* mRNA 表达比（$P<0.05$，图 3A～3C），但对雄性胎鼠肝脏凋亡指标无显著影响（图 3D～3F）。不同剂量的结果表明：在孕晚期时，对于雌性胎鼠，低剂量 PAzE 组肝脏凋亡指标无显著改变，而高剂量 PAzE 可增强胎肝 *Bax* mRNA 表达，降低 *Bcl2* mRNA 表达，并升高 *Bax* 与 *Bcl2* mRNA 表达比（$P<0.05$，图 3A～3C）。对于雄性胎鼠，低、高剂量 PAzE 组肝脏凋亡指标均无显著改变（图 3D～3F）。

综上可知，PAzE 可影响胎鼠的肝细胞凋亡，并具有性别差异。整体上表现为：①孕中、晚期 PAzE 可促进雌性胎鼠肝细胞凋亡，对雄性胎鼠无显著影响；②单疗程 PAzE 对雌雄胎鼠肝细胞凋亡无显著影响，而多疗程 PAzE 可促进雌性胎鼠肝细胞凋亡。对雄性胎鼠无显著影响；③高剂量下雌性胎鼠肝细胞凋亡增强，而低剂量 PAzE 对雌、雄胎鼠肝细胞凋亡无显著影响。

2.4　孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝糖、脂代谢功能的影响　进一步，检测了胎肝中一系列参与糖、脂代谢的关键基因表达情况。这些基因包括糖异生相关功能基因磷酸烯醇丙酮酸羧激酶（phosphoenolpyruvate carboxykinase，Pepck）和葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基 1（glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1，G6pc）、脂肪酸合成相关基因甾醇调节元件结合转录因子 1（sterol regulatory element binding transcription factor 1，Srebp1）和脂肪酸合成酶 Fasn、胆固醇合成相关基因 Srebp2 和 Hmgcr 以及胆汁酸生成相关基因胆固醇 7-羟化酶（cholesterol 7 alpha-hydroxylase，

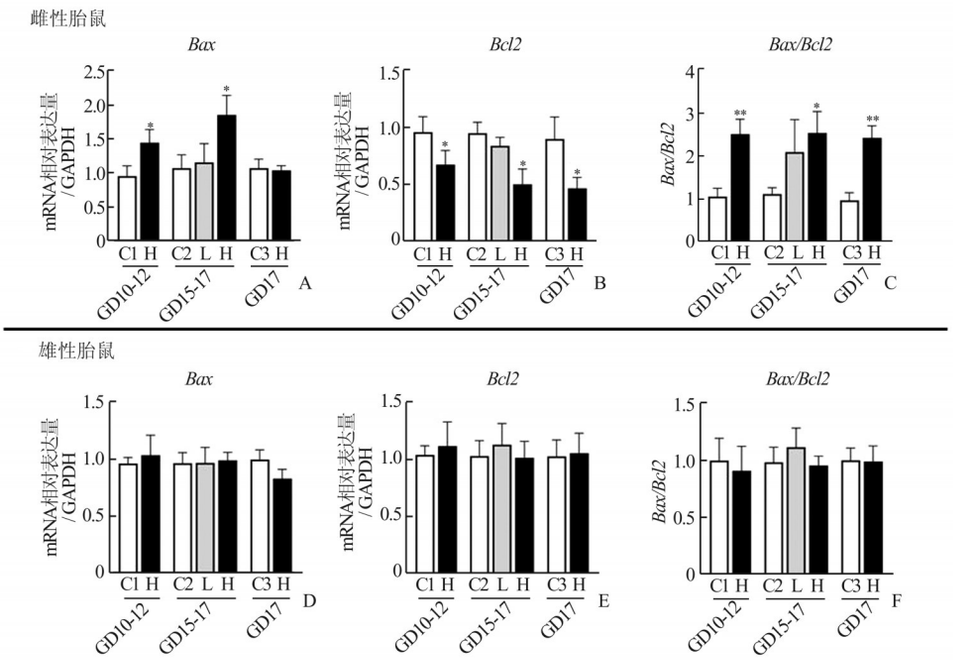


图3 孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝细胞凋亡的影响

A～F.胎鼠肝脏Bax和Bcl2 mRNA表达水平以及其表达比值。C1:对照组1;C2:对照组2;C3:对照组3;L:50 mg•kg^{-1}•d^{-1};H:200 mg•kg^{-1}•d^{-1}; GD:妊娠日。$\bar{x}\pm s$, $n=8$。与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

Cyp7a1)和固醇27-羟化酶(sterol 27 alpha-hydroxylase,Cyp27a1)。

不同时期的结果表明:与各自对照组相比,在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下,对于雌性胎鼠,孕中期PAzE组胎肝*Pepck* mRNA表达下调($P<0.01$,图4A),*Srebp1*、*Fasn*、*Srebp2*、*Hmgcr* mRNA表达和FASN、HMGCR的蛋白表达上调($P<0.05$或0.01,图4C～4F,4I～4L),而孕晚期PAzE组胎肝中仅*Srebp2*和*Cyp27a1* mRNA表达和HMGCR的蛋白上调($P<0.05$或0.01,图4A～4H,4K,4L);对于雄性胎鼠,孕中期PAzE组胎肝*Srebp1*、*Fasn*、*Srebp2*和*Hmgcr* mRNA表达和FASN、HMGCR的蛋白表达上调($P<0.01$或0.05,图4I～4P,4U～4X),而孕晚期PAzE组*G6pc*、*Srebp1*、*Fasn*、*Srebp2*、*Cyp7a1*和*Cyp27a1* mRNA表达和FASN的蛋白表达上调($P<0.01$或0.05,图4I～4P)。不同疗程的结果表明,在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下,单疗程PAzE可抑制雌性胎鼠肝脏*Pepck* mRNA表达($P<0.01$,图4A)和雄性胎鼠肝脏*Cyp27a1* mRNA表达($P<0.01$,图4P)。不同剂量的结果表明,在孕晚期,低剂量PAzE可抑制雌、雄胎鼠肝脏*Pepck* mRNA表达($P<0.01$,图4A和4B),而高剂量PAzE对雌、雄胎鼠肝脏中脂质代谢关键基因mRNA表达的影响如前所述。

综上可知,PAzE可不同程度地影响雌、雄性胎鼠的肝脏糖、脂代谢功能,具体表现为:①孕中期PAzE可致雌性胎鼠肝脏糖异生功能减弱,脂肪酸与胆固醇的合成功能增强,对胆汁酸的合成没有影响。而孕晚期PAzE可致雌性胎鼠肝脏胆固醇与胆汁酸合成功能部分增强;孕中期PAzE对雄性胎鼠肝脏糖异生和胆汁酸合成功能没有影响,但可增强其脂肪酸与胆固醇的合成功能,而孕晚期PAzE可致雄性胎鼠肝脏糖异生功能减弱以及脂肪酸、胆固醇与胆汁酸合成功能增强;②单疗程PAzE对仅影响雌性胎肝糖异生功能和雄性胎肝胆汁酸合成功能,而多疗程PAzE可广泛影响雌雄胎肝的糖脂代谢功能;③低剂量PAzE抑制了胎鼠肝脏的糖异生功能,而高剂量PAzE则增强了胎鼠肝脏脂质及胆汁酸的合成功能,且雄性较雌性改变更显著。

2.4 孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝性激素受体表达的影响 最后,我们观察了PAzE对胎肝细胞性激素受体表达的影响。不同时期的结果显示,与各自对照组相比,在200 mg•kg^{-1}•d^{-1}剂量下,对于雌性胎鼠,孕中期和孕晚期PAzE组胎肝雌激素受体ERβ mRNA表达显著升高($P<0.05$,$P<0.01$,图5A);而对于雄性胎鼠,仅在孕晚期胎肝雄激素受体AR mRNA表达显著降低($P<$

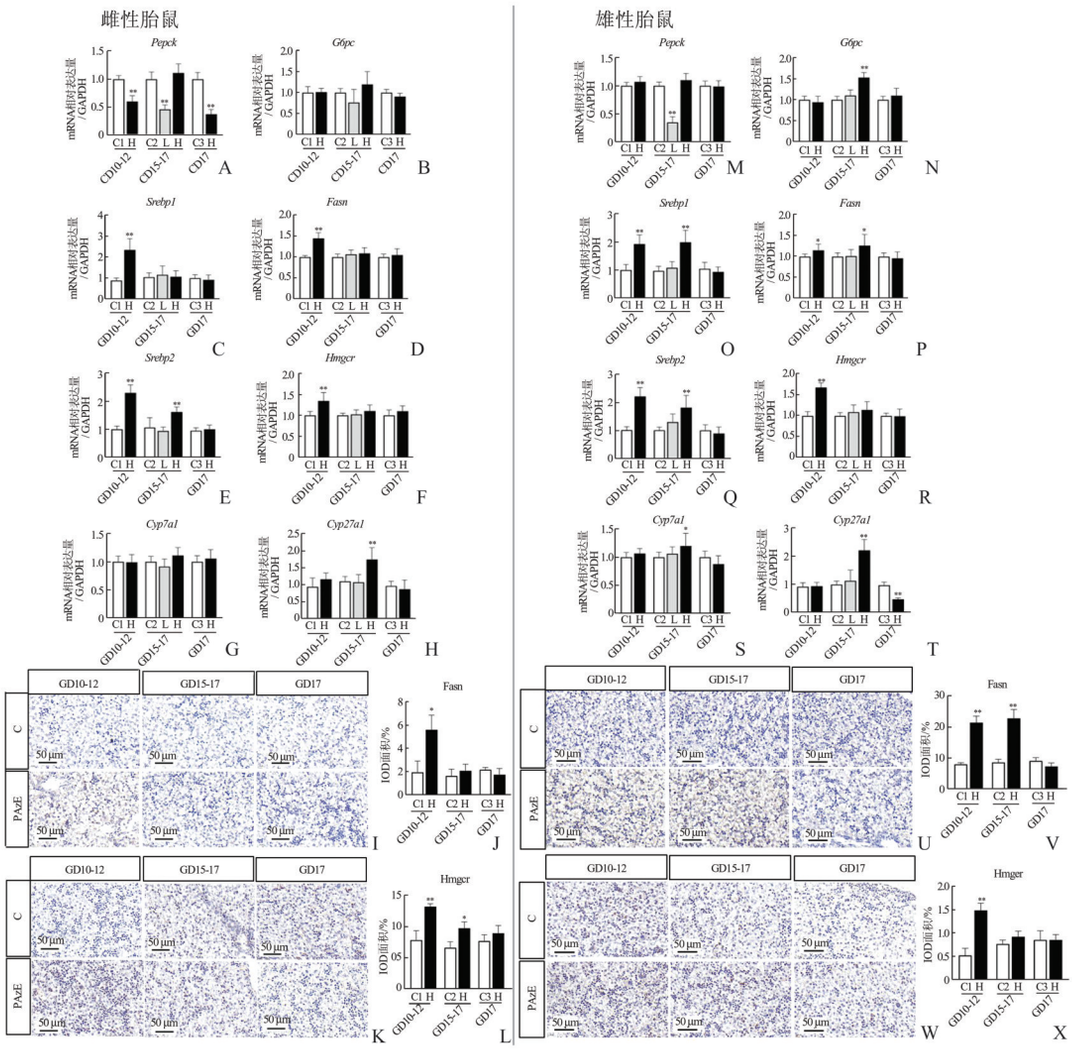


图 4　孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝糖、脂代谢功能的影响

A～H 和 M～T 分别为雌、雄胎鼠肝脏 Pepck、G6pc、Srebp1、Fasn、Srebp2、Hmgcr、Cyp7a1 和 Cyp27a1 的 mRNA 表达水平；I～L 和 U～X 分别为雌、雄胎鼠肝脏 Fasn 和 Hmgcr 的免疫组化及分析。C1：对照组 1；C2：对照组 2；C3：对照组 3；L：50 mg•kg^{-1}•d^{-1}；H：200 mg•kg^{-1}•d^{-1}；GD：妊娠日。$\bar{x}\pm s$，n=3(IHC)，n=8(RT-qPCR)。与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

0.05，$P<0.01$，图 5B）。不同疗程的结果表明，在 200 mg•kg^{-1}•d^{-1} 剂量下，单疗程 PAzE 可降低雄性胎鼠肝脏 AR mRNA 的表达（$P<0.01$，图 5B）。不同剂量的结果表明，在孕晚期，低剂量 PAzE 对雌、雄性胎鼠肝脏性激素受体的表达无显著影响，而高剂量 PAzE 对雌、雄胎鼠肝脏中脂质代谢关键基因 mRNA 表达的影响如前所述。

综上可知，PAzE 可不同程度地影响雌、雄性胎鼠的肝脏性激素受体的表达，具体表现为：①孕中期 PAzE 可致雌性胎肝雌激素受体表达升高，对雄性胎肝雄激素受体的表达没有影响。而孕晚期 PAzE 可同时导致雄性胎肝雄激素受体表达显著降低；②单疗程 PAzE 仅影响雄性胎肝雄激素受体的表达，而多疗程 PAzE 可同时影响雌雄胎肝的性激素受体表达；③低剂量 PAzE 未显著影响雌雄性胎鼠肝脏性激素受体的表达，而高剂量 PAzE 可同时影响雌雄胎肝的性激素受体表达。

3　讨论

阿奇霉素属于大环内酯类抗生素，用于治疗感染性炎症，包括治疗孕期母体感染，尤其自 2019 年 COVID-19 疫情暴发以来，阿奇霉素等抗生素的预防和控制性用药急剧增加，这带来了一系列问题，如因人和动物使用增多而引起机体毒性反应增加和环境污染加剧[15]。作为一类“新型污染物”，阿奇霉素的广泛使用和持续排出不仅严重危害生态环境，对接触环境的个体健康也有影响，尤其是对环境极为敏感的高风险孕妇群体。且阿奇霉素易通

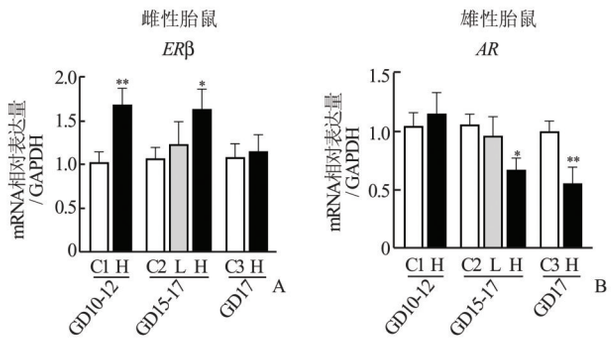


图5 孕期不同时期、疗程和剂量的阿奇霉素暴露对胎肝性激素受体表达的影响

A.雌性胎鼠肝脏ERβ mRNA表达水平;B.雄性胎鼠肝脏AR mRNA表达水平。C1:对照组1;C2:对照组2;C3:对照组3;L:50 mg·kg^{-1}·d^{-1};H:200 mg·kg^{-1}·d^{-1}; GD:妊娠日。$\bar{x}\pm s$, $n=8$。*vs* 对照组,$^{*}P<0.05$;*vs* 对照组,$^{**}P<0.01$

过胎盘进入胎儿体内[16],在胎盘组织中具有较长的半衰期,这使得阿奇霉素在孕期的多途径暴露对胎儿健康存在安全隐患。然而,目前缺乏有关PAzE对胎肝发育的系统评价。已知受精卵在妊娠早期发育成卵黄囊和胚胎,此时胎儿器官尚未开始发育,孕鼠接触外源性化学物质容易发生死产或流产[17]。妊娠中后期是胎儿多器官功能发育的关键时期,其中肝脏约在GD9开始发育[18]。因此在研究中,我们选择在妊娠中后期给药,主要观察孕期阿奇霉素暴露对胎鼠肝脏发育和功能的影响。

前期研究[19]发现,PAzE可增加雌、雄性胎鼠血清TG和TCH水平。在本研究中,作者评估了不同时期、疗程和剂量PAzE对胎鼠肝脏发育和功能的影响及特征,主要表现为:①PAzE对胎肝发育的影响具有性别差异,表现为雌性胎鼠肝细胞增殖、分化减弱及凋亡增强,而雄性胎鼠肝细胞增殖和分化增强,凋亡不变;②PAzE可抑制雌、雄胎鼠肝脏的糖异生功能,增强其甘油三酯、胆固醇和胆汁酸合成功能;③PAzE对胎肝发育和功能的影响具有时期、疗程和剂量差异,表现孕晚期、多疗程和高剂量阿奇霉素暴露的影响分别强于孕中期、单疗程和低剂量。此外,PAzE对胎肝发育和功能影响的时期效应(孕中期的影响小于孕晚期)可能部分归因于停药后较长时间的代偿性发育。

孕期用药对胎儿器官发育和功能影响的性别差异广泛存在,并与性激素受体调控的宫内编程机制有关[20]。本实验室前期在小鼠模型上发现,PAzE可增加雌性胎鼠血清雌二醇水平,降低雄性胎鼠血清睾酮水平[19]。本研究进一步发现,PAzE可不同程度地影响雌、雄性胎鼠的肝脏性激素受体的表达,其趋势与肝脏功能改变一致,均为孕晚期、多疗程和高剂量改变显著。因此,推测性激素受体调控的肝脏宫内编程可能参与了PAzE对胎肝发育的性别差异性影响。其确切的宫内编程机制需要后续深入研究。

综上,本研究全面、系统研究了不同时期、疗程和剂量PAzE所致的胎肝发育毒性。作者发现,PAzE不同程度地抑制雌性胎鼠肝细胞增殖及分化、增强其凋亡,主要促进雄性胎鼠肝细胞增殖及分化。同时,PAzE可抑制雌、雄胎鼠肝脏的糖异生功能,增强其脂质合成功能。这些改变存在剂量、时间及疗程差异。该研究有助于加深人们对PAzE的健康风险认识,同时也为研究者们后续探索其诱导肝脏发育毒性的长期危害和宫内编程机制,提供了重要的理论和实验依据。未来,无论临床用药还是生态环境管理,PAzE的潜在健康风险都需要更加重视。

参考文献

[1] FIRTH A, PRATHAPAN P. Azithromycin: The first broad‐spectrum therapeutic [J]. Eur J Med Chem, 2020, 207: 112739.

[2] OLIVER M E, HINKS T S C. Azithromycin in viral infections [J]. Rev Med Virol, 2021, 31(2): e2163.

[3] MOORE B R, BENJAMIN J M, TOBE R, et al. A randomized open-label evaluation of the antimalarial prophylactic efficacy of azithromycin-piperaquine versus sulfadoxine-pyrimethamine in pregnant papua new guinean women [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(10):e00302-19.

[4] DE JONGE L, BOS H J, VAN LANGEN I M, et al. Antibiotics prescribed before, during and after pregnancy in the Netherlands: A drug utilization study [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2014, 23(1): 60-68.

[5] AMANN U, EGEN-LAPPE V, STRUNZ-LEHNER C, et al. Antibiotics in pregnancy: Analysis of potential

risks and determinants in a large German statutory sickness fund population [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2006, 15(5): 327-337.

[6] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组 . 妇产科抗生素使用指南 [J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(3): 230-233.
Infectious Diseases Collaboration Group of Chinese Society of Obstetrics and Gynecology. Guideline of the use of antibiotics in obstetrics and gynecology [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2011,46(3):230-233.

[7] MUANDA F T, SHEEHY O, BÉRARD A. Use of antibiotics during pregnancy and risk of spontaneous abortion [J]. CMAJ, 2017, 189(17): E625-E633.

[8] MUANDA F T, SHEEHY O, BÉRARD A. Use of antibiotics during pregnancy and the risk of major congenital malformations: A population based cohort study [J]. Br J Clin Pharmacol, 2017, 83(11): 2557-2571.

[9] MALLAH N, TOHIDINIK H R, ETMINAN M, et al. Prenatal exposure to macrolides and risk of congenital malformations: A meta‐analysis [J]. Drug Saf, 2020, 43(3): 211-221.

[10] CHEN Z, ZHAO Z, LI Y, et al. Course-, dose-, and stage-dependent toxic effects of prenatal dexamethasone exposure on fetal articular cartilage development [J]. Toxicol Lett, 2018, 286: 1-9.

[11] BLOOR M, PAECH M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the initiation of lactation [J]. Anesth Analg, 2013, 116(5): 1063-1075.

[12] CHEN Z, ZHAO X, LI Y, et al. Course-, dose-, and stage-dependent toxic effects of prenatal dexamethasone exposure on long bone development in fetal mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 351: 12-20.

[13] DAI Y, PENG Y, LU Z, et al. Prenatal prednisone exposure impacts liver development and function in fetal mice and its characteristics [J]. Toxicol Sci, 2024, 199(1): 63-80.

[14] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. FASEB J, 2008, 22(3): 659-661.

[15] DOMINGO‐ECHABURU S, IRAZOLA M, PRIETO A, et al. Drugs used during the COVID‐19 first wave in Vitoria-Gasteiz (Spain) and their presence in the environment [J]. Sci Total Environ, 2022, 820: 153122.

[16] NEWNHAM J P, MOSS T J, NITSOS I, et al. Antenatal corticosteroids: The good, the bad and the unknown [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2002, 14(6): 607-612.

[17] MEYER N, SANTAMARIA C G, MÜLLER J E, et al. Exposure to 17α-ethinyl estradiol during early pregnancy affects fetal growth and survival in mice [J]. Environ Pollut, 2019, 251: 493-501.

[18] LEMAIGRE F P. Mechanisms of liver development: Concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies [J]. Gastroenterology, 2009, 137(1): 62-79.

[19] LU X, MAO T, DAI Y, et al. Azithromycin exposure during pregnancy disturbs the fetal development and its characteristic of multi‐organ toxicity [J]. Life Sci, 2023, 329: 121985.

[20] CHEN Y, XU D, XIA X, et al. Sex difference in adrenal developmental toxicity induced by dexamethasone and its intrauterine programming mechanism [J]. Pharmacol Res, 2021, 174: 105942.

（2024-08-08 收稿）
编辑　孙孝云