

·论著·

丙戊酸诱导胎鼠发生隐性
脊椎裂畸形的模型建立

李勇, 王维林, 袁正伟, 白玉作, 杨屹, 蔡炜嵩

(中国医科大学第二临床医学院小儿外科, 沈阳 辽宁 110004)

[摘要] 目的 研究丙戊酸对 Wistar 大鼠的致畸作用。方法 24 只雌性受孕 Wistar 大鼠随机分成五组, 不同剂量丙戊酸(400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg)三组、生理盐水对照组和空白对照组, 丙戊酸的三组在妊娠第 9 天 9 am 和 4 am 皮下注射丙戊酸钠溶液两次, 妊娠第 20 天剖宫产取出胚胎, 脊柱标本进行骨和软骨双重染色后进行显微图象分析, 测量椎体椎弓两个软骨端的距离并与正常范围值比较, 判定隐性脊椎裂。结果 Wistar 大鼠正常 20 天胚胎, 胸 9 到骶 3 椎体椎弓两个软骨端的距离正常值范围小于 166.4 μm (112.0 \pm 1.96 \times 27.7 μm 上限), 骶 4 椎体正常值小于 185.5 μm (127.7 \pm 1.96 \times 29.5 μm 上限), 骶 5 椎体正常值小于 198.7 μm (142.1 \pm 1.96 \times 28.9 μm 上限)。盐水对照组胚胎无畸形发生; 丙戊酸钠 400 mg/kg 组, 隐性脊椎裂发生率 80%; 丙戊酸钠 450 mg/kg 组发生率达 93%; 丙戊酸钠 500 mg/kg 组发生率达到 100%。其中一个胚胎出现头面部、颅骨、脊柱、尾多个部位畸形。结论 丙戊酸能诱导胎鼠发生隐性脊椎裂畸形。 [中国当代儿科杂志, 2004, 6(1): 38-41]

[关键词] 神经管畸形; 隐性脊椎裂; 丙戊酸; 胎鼠

[中图分类号] R682.1⁺3; R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2004)01-0038-04

Model of spina bifida occulta induced by valproic acid in foetal rats

Yong LI, Wei-Lin WANG, Zheng-Wei YUAN, Yu-Zuo BAI, Yi YANG, Wei-Song CAI. Department of Pediatric Surgery, Second Clinical Hospital, China Medical University, Shengyang 110004, China (Email: liyong622980@sohu.com)

Abstract: **Objective** To study the teratogenicity of valproic acid (vpa) in Wistar rats. **Methods** Twenty-four pregnant Wistar rats were randomly assigned into 5 groups: 3 VPA of different dosages groups (400 mg/kg, 450 mg/kg and 500 mg/kg groups), the normal saline (NS) control group and the Blank control group. On the 9th day of gestation, 3 VPA groups were subcutaneously injected different dosages of vpa at 9am and 4pm. The NS control group was administrated 1 ml of NS instead and the Blank control group had no intervention. On the 20th day of gestation, the embryos were taken out and the specimens from spines were double-stained with Alcian blue GX and Alizarin red S. The distance of the two cartilaginous ends of the vertebra arch was measured with a stereomicroscope and compared with the normal limit. **Results** In the Blank control group, the distance of the two vertebral cartilaginous ends was less than 166.4 μm (the superior limit of 112.0 \pm 1.96 \times 27.7 μm) from the 9th thoracic to the 3rd sacral vertebra; less than 185.5 μm (the superior limit of 127.7 \pm 1.96 \times 29.5 μm) in the 4th sacral vertebra; and less than 198.7 μm (the superior limit of 142.1 \pm 1.96 \times 28.9 μm) in the 5th sacral vertebra. There was no malformation in the NS control group. The incidence of spina bifida occulta was 80%, 93% and 100% in the VPA 400 mg/kg, 450 mg/kg and 500 mg/kg groups respectively. The craniofacial, skull, spine and tail malformations occurred in a fetus in the vpa 500 mg/kg group. **Conclusions** Vpa could induce spina bifida occulta in foetal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(1): 40-43]

Key words: Neural tube defect; Spina bifida occulta; Valproic acid; Fetal rat

神经管缺陷是人类常见的先天性畸形之一, 包括无脑、脑裂脑膜膨出、显性脊椎裂和隐性脊椎裂多

种表现型^[1,2]。世界范围内其发病率占总出生新生儿数的 1~9/1 000^[3], 是世界卫生组织常规监测的

[收稿日期] 2003-06-09; [修回日期] 2003-08-26
[作者简介] 李勇(1971-), 男, 博士生, 主治医师。主攻方向: 小儿外科。
[通讯作者] 李勇, 沈阳市中国医科大学第二临床医学院小儿外科, 邮编: 110004。

先天畸形之一。导致神经管畸形的发生是多因素作用的结果。神经管畸形具有明显的遗传倾向,但不是简单的受一个显性或隐性基因控制的,单独无脑或脊椎裂畸形在人群中的发病率为1/1 000,在家族中的发生率达到2%~5%^[4]。

丙戊酸是临床上常用的一种抗癫痫药物。随着丙戊酸的普遍使用,有研究发现丙戊酸对人和动物胚胎具有致畸作用^[5,6]。孕妇妊娠早期使用丙戊酸其胎儿出现神经管畸形的发生率比正常人群的发生率高10~20倍^[6]。在动物实验研究中发现,妊娠早期使用丙戊酸可以使胚胎出现各种神经管畸形:脑膜膨出、脊髓裂、脊膜膨出、脊椎裂,而且丙戊酸诱导小鼠和恒河猴出现的神经管畸形病理改变与人的神经管畸形极其相似^[5,6]。丙戊酸致神经管畸形的确切机理还不十分清楚。国内至今无丙戊酸导致神经管畸形的研究报道。本文首次在国内建立了丙戊酸诱导胎鼠发生隐性脊椎裂畸形的模型,为以后的研究提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

Wistar大鼠由中国医科大学第二临床学院医学实验动物中心提供;骨和软骨双重染色试剂 Alcian blue GX、Alizarin red S 和丙戊酸钠由北京丰特斯化工材料有限公司提供。

1.2 实验方法

体重240~300 g健康成熟未孕的Wistar大鼠,常规条件下饲养:颗粒食料,自来水饮水,明暗周期各12 h,室温为20~22℃,相对湿度为50%~60%。雌雄大鼠以4:1比例午夜后合笼,上午8 am~9 am雌鼠阴道涂片,显微镜下见到精子即确认已交配,此日记为妊娠第0天。确认已妊娠的大鼠随机分成5组装入笼中饲养。给药1组:孕鼠4只,丙戊酸钠溶液400 mg/kg;给药2组:孕鼠6只,丙戊酸钠溶液450 mg/kg;给药3组:孕鼠8只,丙戊酸钠溶液500 mg/kg;盐水对照组:孕鼠3只,生理盐水1 ml;空白对照组:孕鼠3只,不予任何处置。给药组大鼠妊娠第9天9 am和16 am,后肢皮下注射20%丙戊酸钠溶液。妊娠第20天剖宫,取出所有胚胎,记录总胚胎数、活胎数、死胎数、吸收胎数,检查外观,判定是否有外观畸形并记录数量。然后取胎鼠脊柱按染色要求染色,测量每个椎体椎弓两个软骨端距离。

1.3 骨和软骨双重染色

1.3.1 方法和步骤 将胎鼠放入4% NaCl液中室温2 h;去除皮肤及内脏,轻轻剔除颈背部脊柱表面的肌肉,保留完整的颅骨及脊柱骨架,放入酸性液(pH=2.8)中进行软骨染色,至少12 h;然后移入96%酒精中脱水;6 h后放入碱性液中进行骨染色,至少12 h,期间更换染液三次;然后放入透明液中透明处理8 h。染色后标本放入保存液中,4℃冰箱内可保存22个月,每种染液20升可以使1 000只胎鼠大批量同时染色^[7]。染色结果:阿尔新蓝将软骨染成兰色,茜素红将骨染成红色,立体显微镜下可清楚观察胎鼠骨骼的形态。

1.3.2 染色液的配制 酸性液:阿尔新蓝(Phentex Corp. USA)溶于70%酒精中配成0.14%的阿尔新蓝液,10份;茜素红(Phentex Corp. USA)溶于96%酒精中配成0.12%的茜素红液,2份;冰醋酸,8份;70%酒精,50份。碱性液:0.7% KOH(溶于蒸馏水),250份;茜素红(Phentex Corp. USA)溶于蒸馏水配成0.5%的茜素红液,1份。透明液:70%酒精、甘油、苯甲醇以2:2:1比例配制。保存液:麝香草酚溶于甘油配成100%溶液。

1.4 胎鼠椎体椎弓两个软骨端距离的测定

茜素红和阿尔新蓝双重染色后的脊柱标本在立体显微镜(Olympus)下采集图象(Olympus数码照相机)输入计算机,利用显微图象分析软件测定每只胎鼠从胸9到骶5共16个椎体椎弓两个软骨端距离值(单位:μm)。空白对照组胎鼠胸9到骶5的16个椎体椎弓两个软骨端距离的均数±标准差确定为正常值范围。

1.5 统计学方法

t 检验。

2 结果

2.1 外观畸形

空白对照组和盐水对照组胎鼠无头颅、脊柱、四肢等外观畸形。丙戊酸400 mg/kg组活胎25只,脑裂脑膜膨出2只,面部畸形3只;丙戊酸450 mg/kg组活胎15只,脑裂脑膜膨出1只,面部畸形2只,短尾和卷尾畸形3只;丙戊酸500 mg/kg组活胎12只,短尾和卷尾畸形2只,短尾和卷尾畸形合并脑裂脑膜膨出和面部畸形1只。各组中,外观畸形胚胎经双重染色、显微图象分析证实均伴有隐性脊椎裂畸形。见表1。

表 1 对照组和给药组胎鼠畸形发生率比较

Table 1 The malformation percentages of the Control group and VPA groups							例 (%)
组别	孕鼠	总胚胎数(活胎数)	死胎数 *	吸收胎数 *	隐性脊椎裂 **	显性脊椎裂 **	其它畸形 **
空白对照	3	42(42)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
盐水对照	3	40(40)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
400 mg/ kg	4	35(25)	4(11.4)	6(17.1)	20(80)	0(0)	5(20)
450 mg/ kg	6	57(15)	12(21.1)	30(52.6)	14(93)	0(0)	6(40)
500 mg/ kg	8	76(12)	10(13.2)	54(71.1)	12(100)	0(0)	3(25)

注:表内数字单位为只,*括号为占总胚胎数的百分数,**括号为占活胎数的百分数

2.2 椎体椎弓两个软骨端距离

空白对照组胎鼠 42 只,胸段从胸 9 到胸 13 所有椎体测得的最大数值164.2 μm,腰段从腰 1 到腰 6 所有椎体测得的最大数值164.2 μm,骶段从骶 1 到骶 5 所有椎体测得的最大数值194.0 μm。(图 1,见封)。胸 9 到骶 3 共 14 个椎体椎弓两个软骨端距离无统计学差异($P > 0.05$),而骶 4、骶 5 椎体椎弓两个软骨端距离正常值之间差异有显著性($P < 0.05$),且与其它 14 个椎体椎弓两个软骨端距离差异有显著性($P < 0.01$)。数据经统计学分析,确定胸 9 到骶 3 共 14 个椎体椎弓两个软骨端距离正常值范围小于 166.4 μm (112.0 ±1.96 ×27.7 μm 上限),骶 4 为小于185.5 μm(127.7 ±1.96 ×29.5 μm 上限),骶 5 为小于 198.7 μm (142.1 ±1.96 ×28.9 μm 上限)。则胸 9 到骶 3 节段椎体椎弓两个软骨端距离超过166.4 μm,骶 4 椎体椎弓两个软骨端距离超过185.5 μm,骶 5 椎体椎弓两个软骨端距离超过198.7 μm;诊断为隐性脊椎裂。见图 1。

2.3 各组隐性脊椎裂畸形发生情况

盐水对照组无隐性脊椎裂畸形。丙戊酸 400 mg/ kg 组,隐性脊椎裂 20 只(80 %),均为腰骶段脊椎裂,最大距离是一个骶 5 椎体椎弓两个软骨端距离501.7 μm;丙戊酸 450 mg/ kg 组,隐性脊椎裂 14 只(93 %),其中腰骶段 12 只,胸腰骶段 2 只,最大距离是一个腰 1 椎体椎弓两个软骨端距离611.9 μm;见图 2。丙戊酸 500 mg/ kg 组,隐性脊椎裂 12 只(100 %),其中腰骶段 6 只,胸腰骶段 6 只,最大距离是一个骶 5 椎体椎弓两个软骨端距离837.2 μm,其中的一只胎鼠同时出现了多部位的畸形:头面部、脑裂脑膜膨出、短尾和卷尾、隐性脊椎裂。

3 讨论

脊椎裂包括显性脊椎裂和隐性脊椎裂,多发生

在脊椎的腰骶段,是人类常见的一种神经管畸形,认为是胚胎神经系统发育期致畸因素导致神经管、椎管发育异常。神经管闭合过程分两个阶段:初级神经胚形成和次级神经胚形成。初级神经胚形成包括神经板形成、神经板两边抬起形成神经褶、神经褶边缘融合形成神经管;次级神经胚形成是人 32 ~ 34 体节相当于将来形成的骶 3 ~ 5 椎体,此过程实心的神经管内的间质细胞发育成次级神经管与初级神经胚形成神经管相连接完成神经管闭合的整个过程^[8];人的初级神经胚形成约需要 10 天时间,次级神经胚形成比初级神经胚形成时间要长几天。胚胎学研究发现人胚胎神经板形成开始于妊娠第 16 天,26 ~ 30 天完成,相应大鼠在胚胎第 9 天开始,第 10 天结束,脊椎裂发生最可能是神经板形成时神经管没能闭合造成^[9]。

丙戊酸是一种含有八个碳的支链脂肪酸,在小鼠体内的半寿期是0.7 ~ 1.3 h^[6],在人体内的半寿期是 7 ~ 9 h,主要与葡萄糖醛酸酐结合经尿液排出,丙戊酸可以通过胎盘经母体传输到胎儿体内,脐带血中和胎儿血浆中的丙戊酸浓度都超过母体血浆中的浓度^[5]。目前已公认丙戊酸可致动物和人胚胎畸形,尤其可导致多种神经管畸形。1991 年 Nau 等^[10]报道认为很难用丙戊酸建立动物先天性脊椎裂模型,但后来很多学者相继用丙戊酸使小鼠、恒河猴等胚胎出现了各种神经管畸形^[6]。小鼠妊娠第 8 天腹腔注射丙戊酸钠,胎鼠神经管畸形以脑裂为主,而第 9 天腹腔注射丙戊酸钠,胎鼠神经管畸形以脊椎裂为主,这是因为胎鼠发育过程中神经管前孔闭合(妊娠第 9 天)早于神经管后孔闭合(妊娠第 10 天)^[11]。国内自 1990 年以来,钟惠军等^[12-14]采用环磷酰胺、敌枯双、高温等化学、物理因素建立了大鼠神经管畸形的模型,对畸形发生机制进行了探讨;至今,国内还没有有关丙戊酸、维甲酸导致神经管畸形的研究报道,这是国内首次报道丙戊酸导致大鼠

神经管畸形所观察到的情况。实验中观察到随着丙戊酸剂量的加大,胚胎的死胎率、吸收胎率升高,隐性脊椎裂的发生率升高。丙戊酸 400 mg/kg 组,脊椎裂发生部位均在腰骶段,胸段无畸形,而 450 mg/kg 和 500 mg/kg 组胸段脊椎出现了脊椎裂畸形,认为腰骶段脊椎对丙戊酸比较敏感,胸段脊椎大剂量时才受影响。目前丙戊酸导致神经畸形的机制不十分清楚。有研究认为它对脊柱的影响是使椎弓不能闭合,影响椎体的软骨发生,免疫组化研究显示丙戊酸可以抑制体外培养的肋骨、肋软骨的软骨细胞增生和Ⅰ型胶原蛋白的合成^[15]。

(图 1,2 见封)

[参 考 文 献]

- [1] Diez-Pardo JA, Marino JM, Baoquan QI, Delgado-Baeza E, Fernandez F, Morales MC. Neural tube defects: an experimental model in the foetal rat [J]. *Eur J Pediatr Surg*, 1995, 5(4): 198 - 202.
- [2] Seller MJ. Neural tube defect: are neurulation and canalization forms causally distinct [J]. *Am J Med Genet*, 1990, 35(3): 394 - 396.
- [3] Min Wu, Dong Feng Chen, Sasaoka T, Tonegawa S. Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(5): 2110 - 2115.
- [4] Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube closure defects [J]. *Hum Mol Gen*, 2000, 9(6): 993 - 1000.
- [5] Lammer EJ, Sever LE, Oakley GP. Teratogen update: valproic acid [J]. *Teratology*, 1987, 35(3): 465 - 473.
- [6] Ehlers K, Sturje H, Merker HJ, Nau H. Spina bifida aperta induced by valproic acid and by all-trans-retinoic acid in the mouse: distinct differences in morphology and periods of sensitivity [J]. *Teratology*, 1992, 46(2): 117 - 130.
- [7] Young AD, Phipps DE, Astroff AB. Large-scale double-staining of rat fetal skeletons using Alizarin Red S and Alcian Blue [J]. *Teratology*, 2000, 61(4): 273 - 276.
- [8] William Slikker Jr, Louis Chang. *Handbook of Developmental Neurotoxicology* [M]. Chicago: Academic Press, 1998, 9: 189 - 208.
- [9] Duru S, Ceylan S, Ceylan S. Comparative effects of valproic acid sodium for Chiari-like malformation at 9 and 10 days of gestation in the rat [J]. *Child's Nerv Syst*, 2001, 17(7): 399 - 404.
- [10] Nau H, Hauck RS, Ehlers K. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms [J]. *Pharmacol Toxicol*, 1991, 69(5): 310 - 321.
- [11] Ehlers K, Sturje H, Merker HJ, Nau H. Valproic acid-induced spina bifida: a mouse model [J]. *Teratology*, 1992, 45(2): 145 - 154.
- [12] 钟惠军,高英茂. 环磷酰胺对 SD 大鼠的致畸作用及其致神经管畸形形态发生的观察 [J]. *解剖学报*, 1990, 21(1): 107 - 110.
- [13] 徐向阳,高英茂,张汇泉. 敌枯双致神经管畸形的形态学研究 [J]. *解剖学报*, 1990, 21(2): 215 - 219.
- [14] 马金龙,高英茂,刘凯,武玉玲,高彦慧. 高温致金黄地鼠神经管畸形中细胞凋亡的组织学观察 [J]. *解剖学报*, 1998, 29(3): 299 - 302.
- [15] Base A, Wezeman FH. Developmental toxicity of valproic acid during embryonic chick vertebral chondrogenesis [J]. *Spine*, 2000, 25(17): 2158 - 2164.

(本文编辑:谢岷)

Expression of epidermal growth factor and its receptor in the gastric mucosa of neonatal rats with intrauterine asphyxia

(These figures refer to the paper on page 7)

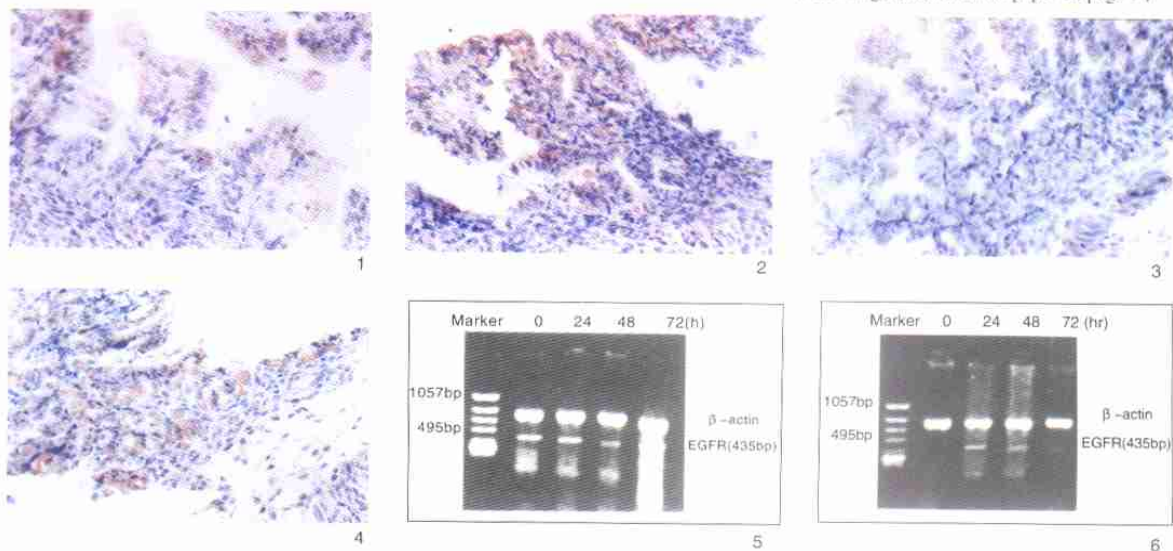


Figure 1 EGF expression of the gastric mucosa in the Control group. Cytoplasm of epithelial cells were light brown after having been stained (400 ×)
Figure 2 EGF expression of the gastric mucosa 20 minutes after asphyxia. Cytoplasm of epithelial cells were dark brown after having been stained (400 ×)
Figure 3 EGFR expression of the gastric mucosa in the Control group. Membrane of epithelial cells were light brown after having been stained (400 ×)
Figure 4 EGFR expression of the gastric mucosa 20 minutes after asphyxia. Membrane of epithelial cells were dark brown having been stained (400 ×)
Figure 5 EGFRmRNA expression of the gastric mucosa at various time points in the Control group. No difference among various time points was found (400 ×)
Figure 6 EGFR mRNA expression of the gastric mucosa at various time points in the Asphyxia group. The lowest expression was at 0 hour and the highest was at 24 hours (400 ×)

丙戊酸诱导胎鼠发生隐性脊椎裂畸形的模型建立

(正文见第 38 页)

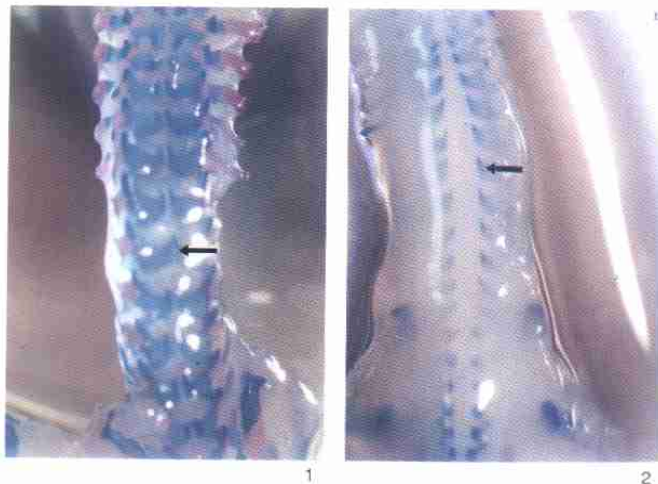


Figure 1 The distances between the ends of the vertebral arches from T9 to L6 were less than the normal limit. The distance of L2 (arrow) was 104.1 μm.(7.5×2.5) (spina double-staining in the normal fetal rats)
Figure 2 After being stained, the distances between the ends of the vertebral arches from T9 to S5 were shown broad in the VPA group. The distance of L1 (arrow) was the most broad (611.9 μm).(7.5 × 2.5)