

[文章编号] 1000-2200(2010)01-0014-03

· 基础医学 ·

过量维 A 酸致昆明小鼠腭裂动物模型的建立及意义

尹海燕¹, 刘 凯², 卓煜娅¹, 刘 桐¹, 孙美群¹, 邹维艳¹

[摘要]目的:建立维 A 酸诱导的发生率较高、易于获得并可用于腭裂发生机制研究的动物模型。方法:采用致畸物全反式维 A 酸(atRA)作用于昆明小鼠(对照组采用等剂量溶剂),观察不同剂量和不同给药时间的胚鼠腭裂畸形发生率及腭部组织的光镜结构特点,确定诱导腭裂发生的最佳作用条件。结果:在孕 10 天给予 80 mg/kg 剂量 atRA 诱导昆明小鼠腭裂发生率最高为 100.0% ($P < 0.01$),为理想的腭裂动物模型,光镜结果显示,atRA 诱导的腭裂为小腭。结论:成功建立了 atRA 致腭裂发生分子机制研究的动物模型,为进一步研究腭裂畸形的分子机制奠定了基础。

[关键词] 维 A 酸;腭裂;动物模型;小鼠

[中国图书资料分类号] R 986;R 782.22 [文献标识码] A

先天性腭裂的发病机制复杂,致病因素多样,一般认为是一种多基因易感性疾病,现被大多数学者认为是基因和环境联合作用引起,其发病机制目前尚未明确。稳定的腭裂动物模型对研究人类腭裂的形成原因、演变机制及预防具有重要意义。通过对一些化学药物产生腭裂的研究,已能初步指出和解释腭裂的发生及其致畸机制^[1]。本实验拟通过在特定妊娠时期给予昆明小鼠全反式维 A 酸(atRA),通过对胚胎发育的渐进性形态学观察,揭示腭发育及腭裂形成过程,为后续化学物致畸分子机制的研究提供基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 成年未经产雌性昆明小鼠,体重 25~35 g,购自山东大学实验动物中心。

1.2 试剂 80 mg/ml atRA,芝麻油悬液(atRA 购自美国 Sigma 公司,芝麻油为市售优质品),临用时配成 0.8% 混悬液。

1.3 动物模型建立方法 健康成熟未经产雌性昆明小鼠 80 只,常规饲养,颗粒食料,自来水饮水,明暗周期各 12 h,室温 20~22 ℃。下午 6 时小鼠按雌雄 2:1 合笼,第 2 天早上阴栓阳性者为孕天数(gestation day, GD)0 天。参照有关文献^[2-4],并考虑腭裂畸形发生率、母鼠流产率等因素,将获取的 26 只孕鼠随机分为实验组和对照组,实验组 20 只,再随机分为 5 组,每组 4 只,其中 3 组分别于 GD8、GD10 和 GD12 天下午 1 时一次性灌服全反式

atRA 芝麻油悬液,剂量均为 80 mg/kg。另外两组则分别与 GD 10 天下午 1 时一次性灌服 atRA 芝麻油悬液,剂量分别为 60 mg/kg 和 100 mg/kg。对照组 6 只,再随机分为 3 个小组,每组 2 只,分别于 GD8、GD10 和 GD12 天下午 1 时一次性灌服与实验组等剂量的芝麻油。

在 GD16 天颈椎脱臼处死实验组和对照组母鼠,从子宫内取出胚胎,解剖显微镜下对胚胎进行观察,确定有无腭裂畸形。计数胚胎总数、腭裂胚胎数,计算腭裂的发生率。部分实验组和对照组 GD16 日龄胎鼠,用 4% 多聚甲醛固定,常规组织处理后仔细切除躯干部,小鼠喙部向下,制备石蜡切片,切片时以麦克尔软骨为基准面,作冠状位连续切片,片厚 5 μm,最后裱片于 APES 处理过的载玻片上,常规 HE 染色,光镜下观察腭部组织结构。上述实验确定 atRA 致昆明小鼠腭裂畸形的最佳用药时间和用药剂量。

1.4 分组与标本制备 按上述方法获取孕鼠 32 只,随机分为实验组和对照组,每组 16 只,按照步骤 1.3 确立的 atRA 最佳给药时间和给药剂量,实验组孕鼠于 GD10 天下午 1 时,按 80 mg/kg 剂量,一次性灌服 atRA 芝麻油悬液,对照组孕鼠则于相同时间,灌服等剂量芝麻油。实验组和对照组再各随机分为 8 个小组,分别于 GD13⁸ (孕 13 天上午 8 时,下同)、GD13¹⁴、GD13²²、GD14⁸、GD14¹⁴、GD14²²、GD15⁸ 和 GD15²² 8 个时间点脱颈处死,剖宫取胚鼠,用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,仔细切除躯干部,小鼠喙部向下,制备石蜡切片,切片时以麦克尔软骨为基准面,作冠状位 5 μm 连续切片,常规 HE 染色,光镜观察腭裂发生的组织结构变化。

1.5 统计学方法 采用秩和检验、 χ^2 检验和四格表确切概率法。

2 结果

2.1 不同剂量 atRA 的腭裂发生率 孕 10 天给予

[收稿日期] 2008-11-23

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Y2005C63);蚌埠医学院科研课题项目资助(BY0904)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 组织与胚胎学教研室,安徽 蚌埠 233030; 2. 山东大学 组织学与胚胎学教研室,山东 济南 250012

[作者简介] 尹海燕(1981-),女,硕士,助教。

100 mg/kg atRA 剂量组,母鼠流产率胚胎吸收或死胎为 100.0%,其它各组未见母鼠流产。60 mg/kg 与 80 mg/kg 剂量组腭裂发生率分别为 34.2% 和 100.0%,故认定剂量为 80 mg/kg 为 atRA 诱导腭裂畸形发生最佳用药剂量 ($P < 0.01$)。以 80 mg/kg 的剂量分别于孕 8、10、12 天给药组的腭裂发生率分别为 30.8%、100.0% 和 37.0%,其中孕 10 天给药腭裂的发生率最高 ($H_c = 38.47, P < 0.01$),故认定 GD10 天为 atRA 诱导昆明小鼠腭裂畸形发生的最佳用药时间(见表 1)。

表 1 不同孕鼠不同剂量 atRA 在腭部不同发育时间致腭裂畸形作用比较

剂量 (mg/kg)	母孕 鼠数	胎鼠 总数	腭裂胎 鼠数	畸形发 生率(%)	H_c	P
GD10 天						
0	2	13	0	0.0**	42.56	<0.01
60	4	26	9	34.2**		
80	4	28	28	100.0		
100	4	0	0	0.0		
GD8 天						
0	2	11	0	0.0	—	0.098 Δ
80	4	13	4	30.8 $\#\#$		
GD12 天						
0	2	10	0	0.0	3.37 $\Delta\Delta$	>0.05
80	4	27	10	37 $\#\#$		

两两比较秩和检验:与 80 mg/kg 组比较 ** $P < 0.01$;与 GD10 天组比较, $\#\#P < 0.01$; Δ 示四格表确切概率法 P 值; $\Delta\Delta$ 示 χ^2 值

16 日龄的正常组胚鼠外侧腭板在舌体上方完全融合,腭中缝(midline epithelial seam, MES)已完全消失,即已形成完整的腭器官。16 日龄实验组胚鼠绝大多数两侧腭板发育不全,体积较小,不能在中线处相互接触融合,极少部分发现只有单侧腭板上抬,预示腭裂已发生。

2.2 解剖显微镜观察结果 16 日龄正常组胚鼠两侧腭板上抬至舌体完全接触融合,腭中上皮缝完全去除,腭间质细胞相互连接贯通形成完整的腭器官;16 天龄腭裂胚鼠绝大多数两侧腭突不能上抬至正常水平并向水平方向生长,极少部分发现有单侧腭突上抬,腭突发育不全,体积较小,不能在中线处相互接触融合形成腭板,腭裂发生是本实验确定的最佳致畸动物模型(见图 1)。

2.3 光镜组织学观察结果 正常对照组胚鼠,随着腭器官的不断发育,鼠胚于 GD13⁸ ~ GD13²² 时双侧腭板位于舌的两侧(见图 2A ~ C),斜向下方生长。于 GD14⁸ ~ GD14²² 时,舌体下降,双侧腭板上抬呈水平位,位于舌的上方,逐渐向中线方向延伸并接触,

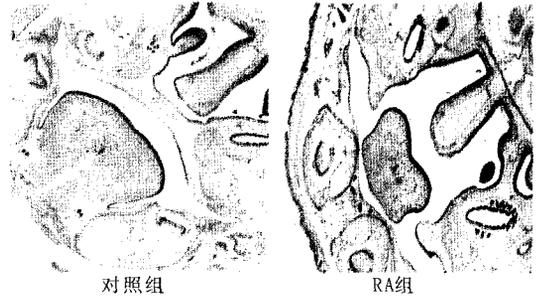


图 1 昆明小鼠腭板 16 天龄 HE 染色结果 ($\times 40$)

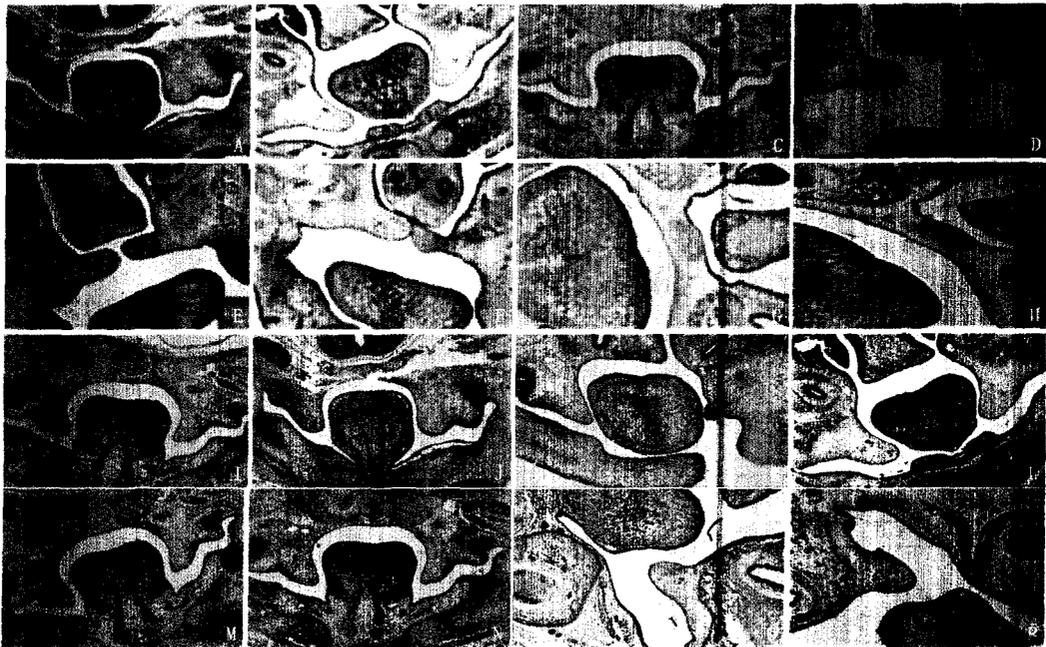
双侧腭板的内侧缘上皮融合形成正中上皮缝(见图 2D ~ F)。于 GD15⁸ ~ GD15²² 时正中上皮缝消失,内侧缘上皮层完全消失,双侧腭板间充质贯通完成融合形成完整的腭器官(见图 2G ~ H)。

实验组鼠胚双侧腭板也经历垂直生长期等发育过程,但与正常对照组相比,在腭发育早期 GD13⁸ ~ GD13¹⁴ 时,舌体位置、形态与对照组无明显差异(见图 2I ~ K),在多数样本,于 GD14⁸ 之后,甚至到 GD15²² 时双侧腭突仍位于舌的两侧,斜向下生长,体积明显小于相应对照组(见图 2L ~ P),说明其上抬和发育过程明显受阻。在少数样本,于 GD15⁸ ~ GD15²² 时,虽双侧腭突或单侧腭突上升至水平位,但距中线仍较远,形态瘦小。所有样本的外侧腭突均未能在中线融合,提示腭裂畸形的发生。

3 讨论

腭的形成和发育在胚胎时期是一个复杂的生物学过程,腭的发育由前腭突和侧腭突两部分组成。侧腭多是由两侧上颌突在原始口腔形成的突起融合形成的,这些突起称侧腭突或继发腭,起初由于舌的发育很快,几乎完全充满了原始口腔,所以侧腭只能沿着舌的两侧向下垂直生长,位于舌两侧(GD13⁸ ~ GD13²²)。随着继续发育,舌的形态逐渐变为扁平,位置开始下降,两个侧腭突上抬,位于舌的上方并水平生长(GD13²² ~ GD14¹⁴),随后两侧腭突相互接触融合(GD14¹⁴ ~ GD15⁸),随着胚胎发育其继续分化成熟(GD15⁸ ~ GD15²²)。

atRA 是维生素 A 衍生物,为一种小分子量脂溶性信号分子,通过结合维 A 酸受体调节下游靶基因表达来实现其生物学效应^[5-6]。生理剂量 atRA 在细胞增殖、分化、凋亡及生殖、视觉、各种动物的胚胎模式形成等生物学事件中发挥重要作用,是胚胎发育过程中不可缺少的形态发生素,在许多器官的胚胎发生中发挥重要作用。然而 RA 也是一种致畸因子,胚胎发育过程中,过多摄入 atRA 或 atRA 缺乏时可导致哺乳动物神经管、心脏和颜面部等多种畸形发生^[7]。根据已有报道,atRA 诱导腭裂可因小鼠种



A、B、C、D、E、F、G、H: 对照组GD13⁸、GD13¹⁴、GD13²²、GD14⁸、GD14¹⁴、GD14²²、GD15⁸和GD15²²HE染色结果;
I、J、K、L、M、N、O、P: 实验组GD13⁸、GD13¹⁴、GD13²²、GD14⁸、GD14¹⁴、GD14²²、GD15⁸和GD15²²HE染色结果

图 2 昆明小鼠腭板发育过程HE染色结果(×100)

系、给药时间、给药剂量以及 atRA 溶媒剂的不同而有所差异,并且在胚胎同一发育阶段诱导腭裂的发生率和致畸程度随给药剂量的增加而增高,当剂量大到一定程度时则引起流产、死胎和胚胎吸收^[8]。造成这种差异性的原因可能是在腭发育的不同时间给予 atRA 所影响的腭突发育阶段、细胞类型和作用环节有所不同。已有研究证明^[9-11],在小鼠孕不同时间给予一定剂量的 atRA 均能引起腭裂的发生,但是发生率却有所不同。有学者^[8]认为在小鼠孕 8 天给予一定剂量的 atRA,可以影响面突的前体——神经嵴细胞的发育形成小腭突引起腭裂。还有文献^[10]报道在小鼠孕 10 天给予 atRA,可以抑制腭突间充质细胞的增殖,形成小腭突,造成腭突两侧不能接触融合而形成腭裂并且腭中嵴上皮细胞未出现凋亡,在孕 12 天应用 atRA;并不抑制腭间充质细胞的增殖,而是干扰了腭的上抬、腭中嵴上皮细胞的分化和腭的粘连融合等过程。

而在本实验中,在孕 10 天给予 80 mg/kg 的 atRA 可致昆明小鼠腭裂发生率为 100.0%。本实验中,atRA 诱导昆明小鼠腭裂双侧或者单侧腭突发育不全,形成的小腭突不能在中线处进行正常的接触、融合,而导致腭裂的发生,提示在孕 10 天给予 atRA 可影响腭突的上抬和生长、接触融合过程而导致腭裂的发生。本实验证实,于孕 GD10 天,一次性灌服 atRA 80 mg/kg,可使昆明小鼠产生腭裂形成理想的腭裂模型。此对进一步揭示其畸形特征,为后续相关化学物致畸分子机制的研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 陈亦阳,黄洪章. 化学药物诱导小鼠腭裂模型的致畸机理[J]. 国外医学:口腔医学分册,1997,24(5):277-280.
- [2] 陈蓉芳,张天宝,印木泉,等. 化学物质诱发的小鼠肢体畸形动物模型的建立[J]. 第二军医大学学报,2003,24(6):658-660.
- [3] Mark WJF. Palate development [J]. Development, 1998, 103 (Suppl):41-60.
- [4] Kochhar DM, Jihson EM. Morphological and autoradiographic studies of cleft palate induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A [J]. J Embryol Exp Morphol, 1965, 14(3):223-238.
- [5] Kitamura M, Ishikawa Y, Moreno-Manzano V, et al. Intervention by retinoic acid in oxidative stress-induced apoptosis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(Suppl 9):84-87.
- [6] Xu Q, Konta T, Kitamura M. Retinoic acid regulation of mesangial cell apoptosis [J]. Exp Nephrol, 2002, 10(3):171-175.
- [7] Miller L, Smith AN, Taketo M, et al. Optic cup and facial patterning defects in ocular ectoderm β -catenin gain-of-function mice [J]. BMC Dev Biol, 2006, 15(1):6-14.
- [8] 朱江波,印木泉,陈蓉芳,等. 甲基 N-硝基亚硝基胍和视黄酸至 ICR 小鼠腭裂发育模型的建立 [J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(1):58-60.
- [9] Concepcion MA, Rosa B, Consuelo T, et al. Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion [J]. Int J Dev Biol, 2000, 44(3):331-335.
- [10] Goulding EH, Pratt RM. Isotretinoin teratogenicity in mouse whole embryo culture [J]. J Craniofac Genet Dev Biol, 1986, 6(2):99-112.
- [11] Abbott BD, Harris MW, Bimbaum LS, et al. Etiology of retinoic acid induced cleft palate varies with the embryonic stage [J]. Teratology, 1989, 40(6):533-553.