

· 论 著 ·

甲基 N-硝基亚硝基胍和视黄酸致 ICR 小鼠腭裂发育模型的建立

朱江波, 印木泉, 陈蓉芳, 郭苗莉, 张天宝*

(第二军医大学基础医学部卫生毒理学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**建立发生率较高、畸形类型明确、易于获得并可用于不同类型化学物致腭裂发生机制研究的动物模型。**方法:**采用致突变性化合物甲基 N-硝基亚硝基胍(MNNG)和非致突变性致畸物视黄酸(RA)作用于 ICR 小鼠(对照组采用溶剂),观察不同剂量和不同给药时间的胚鼠腭裂畸形发生率,确定诱导腭裂发生的最佳作用条件,并通过光镜、电镜等手段对其畸形特征作进一步分析。**结果:**孕 10 d 一次给予 40 mg/kg MNNG 所致腭裂的发生率为 55.2%,一次给予 80 mg/kg RA 腭裂发生率几乎达 100%;光镜结果显示这 2 种化学物诱导的腭裂均为小腭;电镜结果表明孕 16 d 对照组腭中嵴上皮细胞表面有大量的丝状伪足而实验组中则无。**结论:**成功建立了可供两类不同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] 腭裂;动物模型;甲基 N-硝基亚硝基胍;视黄酸;发育

[中图分类号] R 782.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0058-03

Establishment of mouse model of cleft palate induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and retinoic acid

ZHU Jiang-bo, YIN Mu-quan, CHEN Rong-fang, GUO Miao-li, ZHANG Tian-bao* (Department of Health Toxicology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:**To develop a convenient, stable animal model of cleft palate with chemicals. **Methods:** N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) and retinoic acid(RA) were used as teratogen to induce cleft palate in ICR mice. Morphological study was applied to analyze the cleft palate induced by MNNG and RA. **Results:** RA/MNNG-induced cleft palate of ICR mice were successfully established. It was showed that the palate shelves were reduced in size and lack of contact and fusion under microscope. The filopodia on surface of MEE cell was found in control group but not in treated group at TEM level. **Conclusion:** Animal models of 2 types of cleft palate induced by different chemical teratogens have been successfully established for studying the related molecular mechanism.

[KEY WORDS] cleft palate; animal model; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; retinoic acid; development

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1):58-60]

在先天性腭裂的研究中,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,但目前尚无公认的可用于不同类型化学物致腭裂发生机制研究的动物模型。环境因素通过引起基因表达异常而导致各种疾病的机制主要有两类,即诱导关键基因的突变和改变基因表达的调控。因此,动物腭裂模型也应能满足这两类不同机制的需求。本研究通过在特定妊娠时期给予 ICR 小鼠致突变性致畸物甲基 N-硝基亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)和非致突变性致畸物视黄酸(RA),建立可供两类不同腭裂发生分子机制研究的动物模型,为后续相关基因的筛选、鉴定以及化学物致畸分子机制的研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 受试物 受试物 MNNG(Sigma 公司)采用

30%乙醇为溶剂配制成混悬液,RA(上海第六制药厂)采用植物油为溶剂配制成混悬液。

1.2 实验动物 8~10 周龄、25 g 以上的 ICR 小鼠,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物合格证号 02-49-1。按雌雄比 2:1 于前一天 18:00 合笼,次日晨 8:00 取出,查见阴栓者为孕 0 d。

1.3 分组及给药途径 将孕鼠随机分为实验组和对照组。MNNG 实验中,实验组腹腔注射 MNNG 混悬液,对照组相同途径给予溶剂,给药体积均为 0.1 ml/10 g。RA 实验中,实验组经口给予 RA 混悬液,对照组相同途径给予溶剂,给药体积均为 0.2 ml/10 g。参照有关文献^[1,2]并考虑腭裂畸形发生

[基金项目] 国家重点基础研究规划("973"计划)课题(2002C13512901);国家自然科学基金(30070662,30400360)。

[作者简介] 朱江波(1974-),男(汉族),讲师,博士。

* Corresponding author. E-mail: tbzhang2001@yahoo.com.cn

率、母鼠流产率等因素,分别于孕 10 d 给予 20、40、60 mg/kg MNNG 或 60、80、100 mg/kg RA,以确定给药剂量;参考有关文献^[3],分别在孕 9、10、11 d 给予 40 mg/kg MNNG,以确定给药时间,RA 的给药时间参照 MNNG。

1.4 动物解剖 在孕 15、16 d 麻醉状态下颈椎脱臼处死母鼠,从子宫内取出胚鼠,在解剖显微镜下观察外观畸形。

1.5 光镜观察 将实验组及对照组 16 d 龄胎鼠,用 10% 甲醛固定。常规组织处理后仔细切除躯干部,小鼠喙部向下,常规石蜡包埋,5 μ m 切片, H-E 染色,光镜下观察。

1.6 电镜观察 取 15 d 龄实验组腭裂胚鼠和对照组正常胚鼠头部标本除去下颌,等渗生理盐水冲洗表面。3% 戊二醛适度固定后,乙醇逐级脱水、经临界点干燥、真空蒸镀金属膜,SEM 观察。

2 结果

2.1 MNNG 给药方案的确定 孕 10 d 给予不同剂量的 MNNG 之后,所致母鼠流产率和腭裂发生率不同,对照组中 10 只孕鼠无流产和腭裂发生;20、40 和 60 mg/kg 剂量组的孕鼠流产率分别为 0(0/12)、7.69(1/13)和 53.3%(8/15),腭裂发生率分别为 12/112 (10.7%)、76/142 (53.5%)、40/71 (56.3%)。其中 60 mg/kg 组流产率与对照组比较差别有显著性($\chi^2=6.21, P<0.05$),而 20 mg/kg 剂量组畸形的发生率较低,与对照组无显著差异($\chi^2=1.89, P>0.05$)。因此认为建立动物模型的受试剂量以 40 mg/kg 为宜。孕 9、10、11 d 给药腭裂畸形占总畸形的发生率分别为 40.7%(11/27)、55.2%(21/38)和 16.1%(5/31),其中孕 10 d 给药腭裂的发生率最高。故认为 MNNG 诱导腭裂畸形发生的最佳条件为:在孕 10 d 给予 40 mg/kg 的 MNNG。

2.2 RA 给药方案的确定 100 mg/kg 剂量组母鼠流产率为 100%,其他各组未见孕鼠流产。60 mg/kg 与 80 mg/kg 剂量组腭裂发生率分别为 22.2%(20/90)和 99.9%(132/133),认为剂量为 80 mg/kg 为宜。给药时间参照 MNNG 结果,定为孕 10 d。由此确定 RA 致小鼠腭裂的最佳条件为孕 10 d 给予 80 mg/kg RA。

2.3 光镜检查结果 16 d 龄正常组胚鼠两侧腭突上抬至舌体完全接触融合,腭中缝(midline epithelial seam, MES)完全去除,腭间质细胞相互连接贯通形成完整的腭器官;16 d 龄腭裂胚鼠虽然两侧腭突

上抬至正常水平并向水平方向生长,但发育不全,体积较小,不能在中线处相互接触融合形成腭板,腭裂发生(图 1)。

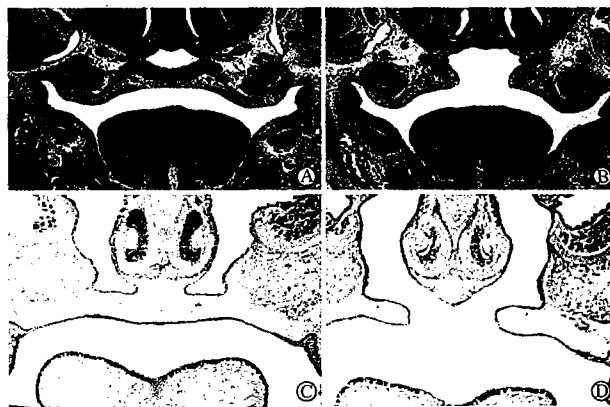


图 1 RA(A,B)和 MNNG(C,D)诱导的 16 d 龄胚鼠腭突
Fig 1 Palatine process of 16 d-mouse embryo induced by RA(A,B) or MNNG(C,D) (H-E, $\times 40$)
A,C: Control group; B,D: Treatment group

2.5 电镜检查结果 15 d 龄对照组胚鼠腭中嵴上皮细胞(medial edge epithelial, MEE)表面有大量的丝状伪足出现,而实验组 MEE 表面光滑,未见任何丝状伪足(图 2)。

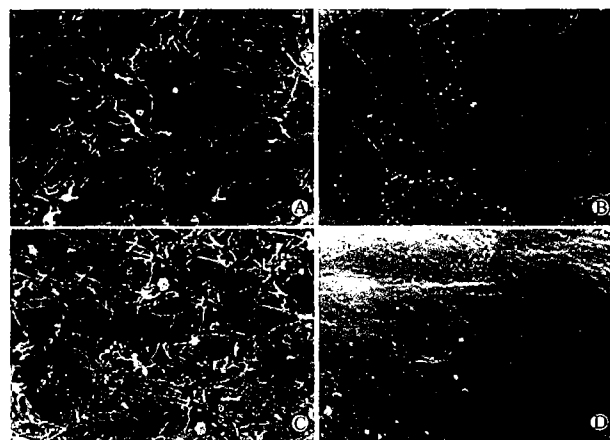


图 2 RA(A,B)和 MNNG(C,D)诱导的 15 d 龄腭裂胚鼠 MEE 形态
Fig 2 MEE morphology of cleft palate mouse induced by RA(A,B) or MNNG(C,D)
A,C: Control group; B,D: Treatment group

3 讨论

MNNG 是一种烷化剂,同时具有致突变性、致癌性和致畸性,是代表性致突变性致畸物,研究 MNNG 致畸作用的关键基因将有助于烷化剂等致突变性致畸物致畸机制的研究。MNNG 的致畸谱较广,包括脑、腭、脊柱、肋骨和肢体的畸形,但不同

时间给药所致主要畸形类型不同。有关 MNNG 诱导腭裂发生的研究较少,尚未见用其诱导的腭裂发生动物模型。本研究发现,孕 10 d 给予 MNNG 所诱发的畸形以腭裂为主(55.2%)。

RA 是一种常见的致畸原,早在 1965 年, Kochhar 等^[3]已经应用 RA 诱导鼠腭裂的发生。RA 诱导腭裂可因动物种系、给药时间、给药剂量以及 RA 溶媒剂的不同而有差异,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。研究表明^[3~5]在 小鼠孕 8、10、12 d 给予 RA 均能引起鼠腭裂的发生,但是发生率却有所不同。更重要的是,RA 是一种非致突变性致畸物,通过对 RA 所致腭裂相关基因的研究,有助于阐明致畸物通过引起基因表达调控异常而导致畸形的分子机制。

有学者^[3]认为在 小鼠孕 8 d 给予一定剂量的 RA,可以影响面突的前体——神经嵴细胞的发育,形成小腭突而引起腭裂。还有文献报道^[5]在 小鼠孕 10 d 给予 RA,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,而是分化为口腔样的复层鳞状上皮;在孕 12 d 应用 RA,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。以上结果表明在腭发育的不同时间给予 RA 所影响的腭突发育阶段、细胞类型和作用环节可能有所不同^[6]。

本研究发现在孕 10 d 给予 80 mg/kg 的 RA 腭裂的发生率几为 100%,大体畸形除腭裂外,主要畸形为短前肢,其发生率与腭裂几乎完全一致,偶见有短尾发生。此结果与在孕 10 d 给予 40 mg/kg 的 MNNG 所致的畸形类型相似,但发生率有明显区别。小鼠腭突(继发腭)的发育集中于孕 11.5~15.5 d,而肢发育的高峰时间为孕 9.5~18 d^[7],由于小鼠肢和腭在发育时间上具有重叠性,所以在孕 10 d 给予受试物多以这两种畸形为主。无论是 RA 还是 MNNG 皆可以诱致继发腭裂的发生,而且在外观上无显著性的差别;光镜结果显示,两种化学物质诱发继发性腭裂均是由于双侧腭突发育不全而形成的小腭突不能在中线处进行正常的接触、融合而导致腭裂发生。但显示双侧腭突的上抬似乎是正常的,这种小腭突的发生是由神经嵴细胞迁移至第一腮弓过程异常还是由于腭间充质细胞增殖抑制抑或其他发育过程受干扰而致尚不清楚。由于神经嵴细胞的迁移发生较早(孕 8 d 左右),多数研究倾向于

孕 10 d 给药影响腭突上抬和腭突的生长、接触和融合等过程而诱致腭裂。

对孕 15 d 胚鼠腭突用扫描电镜观察,发现正常组腭突 MEE 的表面有大量的丝状伪足,而实验组却未见有丝状伪足的发生,此结果与国外文献报道^[8]一致。丝状伪足在腭突融合中的作用可能如下:(1)丝状伪足可以大大增加 MEE 的表面积,而 MEE 是双侧腭突融合的关键部位;(2)丝状伪足可对细胞黏附分子或者桥粒进行浓缩,这可以加快腭突的融合过程;(3)丝状伪足可降低 MEE 表面的能量自由释放;(4)丝状伪足可作为分裂和迁移活性增加的指示物。分裂和迁移活性对于双侧腭突接触后快速整合以及中间上皮缝消失而形成一完整、坚固的继发腭至关重要。

本研究通过在 ICR 小鼠特定妊娠时期对其给予致突变性致畸物 MNNG 和非致突变性致畸物 RA,建立了可供两类不同腭裂发生分子机制研究的动物模型,在大体、光镜、电镜水平上进行比较结果发现两者诱致的腭裂无明显差异。此对进一步揭示其畸形特征,为后续相关基因的筛选和鉴定以及化学物致畸分子机制的研究奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Mark WJF. Palate development[J]. *Development*, 1998, 103 (Suppl):41-60.
- [3] 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.
- [4] Goulding EH, Pratt RM. Isotretinoin teratogenicity in mouse whole embryo culture[J]. *J Cranial Genet Dev Biol*, 1986, 6 (2):99-122.
- [5] 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.
- [6] Birnbaum LS, Harris MW, Stocking LM, et al. Retinoic acid and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin selectively enhance teratogenesis in C57BL/6N mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1989, 98(3):487-500.
- [7] Cohn MJ, Bright PE. Molecular control of vertebrate limb development, evolution and congenital malformations[J]. *Cell Tissue Res*, 1999, 296(1):3-17.
- [8] 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.

[收稿日期] 2004-05-26

[修回日期] 2004-09-20

[本文编辑] 李丹阳