

## • 基础研究 •

## 类先天性马蹄足动物模型胚胎病理初步研究及病因学意义

贾艳丽<sup>1a</sup>, 杜世新<sup>1b</sup>, 刘戈飞<sup>2</sup>

[摘要] 目的 分析在肢体发育不同时段综合多基因相互作用条件下最终导致先天性马蹄内翻足(CCF)发生的原因。方法 77 只大白鼠从怀孕第 10 天起,将维甲酸石蜡油混悬液经胃管单次注入,建立 CCF 动物模型;应用光镜、电镜及分子生物学方法检测胎鼠后肢芽(后肢)、胸腰段脊髓。结果 动物模型的 CCF 发病率为 61.8%,距骨发育停滞,距骨、跟骨间重叠不良和跟骨内翻,后肢芽及脊髓前角细胞均有凋亡现象。结论 CCF 在胚胎发育期即有畸形,且程度随生长发育而逐步加重,后肢芽及脊髓前角细胞在胚胎早期即出现凋亡现象。

[关键词] 足畸形;先天性;维甲酸;凋亡

**Primary Research and Etiological Implication of Congenital Clubfoot like Model at Pathological and Molecule Level** JIA Yan-li, DU Shi-xin, LIU Ge-fei. The Department of Orthopaedics, the First Clinical College of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong, China

**Abstract: Objective** To explore the possible correlations under the interaction of multi-genes action at different stages and analyze the primary histophotomacrographic changes of hind buds tissue in congenital clubfoot and the pathodynamic developmental procedure. **Methods** Seventy-seven female Wistar rats were administered with retinoic acid on the 10th day after pregnancy. And the hindlimb, buds and spinal cord were detected through transmission electron microscopic and molecular biological experiments. **Results** There was clubfoot-like deformity in 61.8% of the experimental animals. Persistence of the embryonic position of the talus and tibia in fetuses was observed. Poor overlapping between talus and calcaneus was seen. Cell apoptosis at the anterior corner of spinal cord and hind buds were seen. **Conclusion** Congenital clubfoot deformities appear at early stage and exaggerate along with developmental procedure.

**Key words:** foot deformities; congenital; retinoic acid; apoptosis

[中图分类号] R682.1 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)08-0733-03

[本文著录格式] 贾艳丽,杜世新,刘戈飞.类先天性马蹄足动物模型胚胎病理初步研究及病因学意义[J].中国康复理论与实践,2007,13(8):733-735.

先天性马蹄内翻足(congenital clubfoot, CCF)的病因不清,多数学者认为是由遗传和环境中的致畸因素共同作用导致<sup>[1]</sup>。CCF 晚期距骨滑车往往变低平类似矩形,出现骨关节炎,最终导致患肢残疾<sup>[2]</sup>。利用全反式维甲酸(at RA)制作的 CCF 动物模型与人类新生儿 CCF 有较好的一致性。本研究从维甲酸投入第 2 日(dpc 11)起,对胎鼠的后肢芽进行初步组织病理学及分子生物学分析,从形态、核酸和蛋白质水平研究上述受维甲酸信号系统调控基因(及尚未报道的基因)的表达及其与未使用维甲酸的对照组胎鼠的区别,以期寻找在肢体发育不同时段综合多基因相互作用条件下最终导致 CCF 发生的原因。

## 1 材料与方法

**1.1 动物模型建立及分组** 雌性 Wistar 大白鼠 70 只,体重 220~230 g,平均(230±11)g。随机将动物分为对照组和实验

组各 7 组,共 14 组,每组 5 只。大鼠在层流柜中饲养,自由进食、进水,垫料保持干燥,12 h 交替照明;所有器具及食物均消毒,无菌操作。与雄鼠合笼后每天早上 6 点阴道涂片判断母鼠是否怀孕,发现精子为受孕 0 d(dpc 0)。实验组用维甲酸标准品(购于 SIGMA 公司)120 mg/kg 溶于石蜡油,在大鼠受孕第 10 天灌胃;对照组仅经胃管一次灌注等体积的石蜡油。

**1.2 标本取材及观察方法** 分别在大白鼠 dpc 11、dpc 12、dpc 13、dpc 15、dpc 17、dpc 19、dpc 21 时用戊巴比妥(1 ml/kg)麻醉孕鼠并剖宫取出胎鼠,剥离羊膜,固定取材。对 dpc 11~12 的大鼠,须在显微镜下取材,固定。切取对照组和实验组胎鼠后肢芽(dpc 12 以后的胎鼠)及腰骶段脊髓(dpc 15 以后的胎鼠),经过冷冻、组织切片。后肢芽(后肢)分别在三维平面连续切片,HE 染色。脊髓尼氏染色先用 4%多聚甲醛固定 3 d,再将固定好的组织置于平面矫正器上切好平面后浸入 20%蔗糖;组织下沉后转入 30%蔗糖;再次下沉后置于冰冻切片 30 min,贴于预先处理过的载玻片上。空气中放置 1~2 d,自然晾干后切片浸于 100%氯仿中 30 min,再浸于 100%丙酮约 15 min,经乙醇脱水、1%焦油紫染色、水清洗 3 次,再经氯仿、分化剂、二甲苯、中性树胶固封。将切片在光学显微镜下观察并照相,与正常对照组比较,总结脊髓尼氏小体的演变。另将胎鼠后肢及腰骶段脊髓(dpc 15 以后的胎鼠)经戊二醛固定、包埋、切片定位脊髓前角;经双重染色后,在透射电镜下观察。

基金项目:1. 广东省卫生厅医学科研基金资助项目(No. A2005445);2. 广东省自然科学基金资助(No. 5300584);3. 广东省科技计划项目(No. 2006B35901008)

作者单位:1. 汕头大学医学院第一附属医院 a. 矫形外科;b. 骨科,广东汕头市 515041;2. 汕头大学医学院细胞生物实验室,广东汕头市 515031。作者简介:贾艳丽(1967-),女,辽宁海城市人,副教授,主要研究方向:关节损伤。通讯作者:杜世新(1966-),男,辽宁鞍山市人,教授,博士,主要研究方向:脊柱、关节疾病诊治。

1.3 凋亡测定 应用末端 DNA 介导的 DIG-dUTP 缺口末端 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP, TUNEL) 标记法测定后肢芽、后肢、脊髓神经细胞凋亡(凋亡试剂盒由武汉博士德公司提供)。将标本用 10% 中性缓冲 Formalin 液固定,石蜡包埋。石蜡切片脱腊入水,新鲜配制 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 10 min,蒸馏水洗涤 2 min,共 3 次;标本片加 TBS 1:200 新鲜稀释蛋白酶 K,37℃ 消化 15 min,TBS 洗涤 2 min,共 3 次;标本片滴加标记缓冲液,混匀,37℃ 标记 2 h;TBS 洗涤 2 min,共 3 次;加封闭液,室温处理 30 min,不洗;加入生物素化 dUTP 及末端脱氧核糖苷转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT)37℃ 反应 30 min,TBS 洗涤 2 min,共 3 次;TBS 1:100 稀释链酶亲和素-过氧化物酶(streptavidin-biotin peroxidase complex, SABC),混匀加片,37℃ 反应 60 min;TBS 液浸洗 5 min,共 4 次;二氨基联苯胺(double amidogen benzidine, DAB)显色,苏木素复染,TBS、蒸馏水洗,梯度乙醇脱水,中性树胶封片。先镜下计数 TUNEL 标记阳性细胞,标准为细胞核被标记呈棕蓝色,再结合光镜下细胞形态鉴别阳性细胞中的凋亡细胞(根据凋亡细胞的形态特征)。

1.4 统计学处理 所得数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验或  $\chi^2$  检验。

2 结果

2.1 大体形态学观察 实验组共取出胎鼠 241 只,其中 dpc 17 以后(dpc 17 以前的胎鼠较小)的共 15 只;共剖出胎鼠 110 只,出现 CCF 的 68 只(61.8%),其中 dpc 17 为 35.4%,dpc 19 为 54.2%,dpc 21 为 86.3%,马蹄内翻角度(踝角)明显增大;胎鼠单足发病占 67.6%,双足为 32.3%(见表 1)。对照组共取出胎鼠 455 只,其中 dpc 17 以后的共 15 只;共剖出胎鼠 178 只,无 1 只出现畸形。实验组和对照组的胎鼠外观见图 3.1~图 3.4。对照组胎鼠的踝角随生长发育逐渐变小,dpc 17 为(155±6.9)°(34/59),dpc 19 为(121±7.9)°(33/61),dpc 21 为(97±9.8)°(30/58);而实验组则分别为 dpc 17(162±8.3)°(32/36),dpc 19(144±13.3)°(30/34),dpc 21(133±7.1)°(29/31),两组间的差异有显著性意义(*P* < 0.05)。

表 1 不同时间实验组出现畸形胎鼠百分比

[A/F( % ), n=241]				
畸形分类	dpc 17	dpc 19	dpc 21	总计
马蹄内翻足	11/31(35.4)	19/35(54.2)	38/44(86.3)	68/110(61.8)
单足	7/11(63.6)	12/19(63.1)	27/38(71.0)	46/68(67.6)
双足	4/11(36.3)	7/19(36.8)	11/38(28.9)	22/68(32.3)
颌面畸形	2/31(6.4)	4/35(11.4)	10/44(22.7)	16/110(14.5)
前肢畸形	5/31(16.1)	4/35(11.4)	6/44(13.6)	15/110(13.6)
脊柱裂	4/31(12.9)	6/35(17.1)	12/44(27.2)	22/110(20.0)
肛门直肠畸形	0/31(0.0)	2/35(5.7)	5/44(11.3)	7/110(6.3)

注:A/F:畸形胎鼠/胎鼠。

2.2 光镜观察 对照组:①dpc 17 组:距骨内倾程度较轻,矢状位显示距骨、跟骨开始出现部分重叠,脊髓前角神经元形态及分布正常,胶质细胞增加;②dpc 19 组:距骨内倾程度加大,矢状位显示距骨、跟骨部分重叠,脊髓前角神经元形态及分布正常,神经元与胶质细胞比例正常;③dpc 21 组:解剖结构同人类相似,跟腱位于跟骨后侧,矢状位显示距骨、跟骨明显重叠,脊髓前角神经元较前明显增大,分布正常,神经元与胶质细胞比例正常。实验组:①dpc 17 组:距骨较对照组小,滑车未出现应

有的类圆弧形结构,矢状位显示距骨、跟骨重叠不足;跟骨内翻较对照组严重,跗骨发育得较小且失正常形态,脊髓前角神经元减少,胶质细胞增加;②dpc 19 组:见距骨变小,滑车较平,矢状位显示距骨、跟骨重叠严重不足;跟骨内翻较前严重,跗骨小且失正常形态,脊髓前角神经元显著减少,胶质细胞增加;③dpc 21 组:见踝关节呈马蹄内翻状,距骨变小,滑车变平,前足切片见胫骨和跗骨在同一解剖面,跟骨内翻严重且距、跟骨间重叠不良,跗骨小且失正常形态,脊髓前角神经元明显减少,胶质细胞增加。

2.3 实验组透射电镜观察 dpc 13 组:可见实验组肢芽明显小于对照组,病理切片可见后肢芽组织细胞中有变性、凋亡现象。dpc 17 组:小腿和足软骨及肌肉细胞中有变性、凋亡现象,距骨表面软骨细胞出现变性;腰骶段脊髓前角部分神经细胞凋亡,线粒体及内质网肿胀,染色质边集并浓聚成块等。dpc 19 组:小腿和足软骨及肌肉细胞中有变性、凋亡现象,距骨表面软骨细胞变性;腰骶段脊髓前角有较多的神经元细胞凋亡,线粒体肿胀,部分嵴缺失;内质网肿胀,染色质边集并浓聚成块等。dpc 21 组:上述病理现象持续存在并加重。脊髓前角有较多凋亡神经元细胞,染色质聚集、凝缩,胞核固缩呈一致密物进而碎裂,严重时丧失正常细胞结构。

2.4 TUNEL 标记法检测凋亡细胞 dpc 13 组:可见后肢芽组织细胞中有一定数量的凋亡细胞出现。dpc 17 组:见小腿和足软骨及肌肉细胞中有变性、凋亡现象,腰骶段脊髓可见前角神经细胞凋亡;dpc 19 组:见小腿和足软骨及肌肉细胞中有较多的变性、凋亡现象,腰骶段脊髓较多前角神经细胞凋亡。dpc 21 组:脊髓前角有大量凋亡细胞,散落在正常细胞间;凋亡细胞变小,胞浆凝缩;染色质聚集、凝缩,胞核固缩呈均一致密物,形成凋亡小体。

3 讨论

CCF 病因不清,被认为是遗传因素和环境因素共同作用而引起的先天性疾病。大量报道显示,维甲酸是胚胎发育过程中的内源性形态原(morphogen),通过调控 Hox 基因及其他诸多相关基因决定肢芽、颅面部骨骼、中枢神经系统等器官、系统的形成。同时,维甲酸缺乏和过量都可导致胚胎畸形。尽管国内外用高浓度维甲酸成功制作大鼠 CCF 模型,并进行各种机制研究的报道较多<sup>[3]</sup>,但在胚胎早期从病理和基因水平研究其发病机制尚未见报道。Delgado 给孕鼠维甲酸 120 mg/kg 体重,CCF 发生率为 86.5%,神经管畸形率 75.7%,并发现胚胎期后肢的旋转异常<sup>[4]</sup>。Santos-Alvarez 采用同样的方法和剂量,CCF 发生率为 90%,并对 dpc 15 胚胎后肢进行了抗索蛋白(desmin)的免疫组化检测、有丝分裂活性与核仁硝酸银染色测定<sup>[5]</sup>。Yu 等以 125 mg/kg 剂量维甲酸引发的 CCF 与神经管畸形发生率分别为 90%和 55%,同时,还观察到许多其他系统的畸形<sup>[6]</sup>。在本实验中,实验组胎鼠 CCF 发生率为 61.8%,可能与认定标准差异有关。胚胎早期的后肢芽发育过程显示,后肢芽明显发育不良,早期即出现组织细胞凋亡。在 CCF 胎鼠脊髓中发现,前角神经元减少,胶质细胞增多,有较多前角细胞凋亡。换言之,在胚胎发育早期,通过维甲酸干预后,胚胎的脊髓及胚芽均已出现病变。

肢体发育是一个极其复杂的多基因调控过程,涉及不同时间和不同空间的若干基因先后表达,因而研究肢芽发育的意义

在于,肢芽的正常发育应是许多相关基因受到维甲酸精密调控的结果。哺乳动物孕期维甲酸缺失或摄入过多都可引发畸形,在不同发育阶段投入过量的维甲酸可引发不同的畸形。给怀孕 10 d 的正常大鼠经胃灌注 100 ~ 140 mg/kg 维甲酸能建立较为典型的 CCF 模型<sup>[7]</sup>。考虑到外源性维甲酸在大鼠胚胎体内的半衰期(12 h)和完全清除期(72 h)<sup>[8]</sup>,胚胎 10.5 ~ 13.5 d 期间是维甲酸主要作用时期,而且此期间正是后肢芽细胞分化刚刚定型并有后肢芽出现。因此,对这一发育阶段的分析研究至关重要。维甲酸在胚胎发育中具有重要作用,是肢芽、颅面部骨骼、中枢神经系统等器官、系统正常发育的内源性形态原<sup>[9]</sup>。在肢芽尖外胚层嵴(apical ectodermal ridge, AER)的整个形成过程,极化活性区(zone of polarizing activity, ZPA)形成早期都有维甲酸信号传导系统发挥作用。维甲酸作为内源性形态原,其主要作用是通过调控 Hox 基因家族的表达来实现的<sup>[10]</sup>。对肢芽中 Hox D 和 Hox A 的时空顺序表达,维甲酸起直接或间接主导作用<sup>[11]</sup>。而 Hox 基因调控区域(retinoic acid response elements, RARE)的细微不同,可能是导致不同 Hox 基因对维甲酸反应不同的根本所在<sup>[12]</sup>。在出现 CCF 的胎鼠脊髓中,发现了一系列病理改变<sup>[13]</sup>,CCF 及其伴发的神经管发育异常均位于胚胎期尾芽发育的部位。而在临床上,CCF 患儿大多存在不同程度的神经电生理异常,且多数病变位点源于腰骶部脊髓,部分来源于腰骶部以上脊髓节段<sup>[14]</sup>。最近,孙开来研究小组用蛋白质组学的方法检测大鼠 CCF 模型中已发育成型的踝关节骨与组织和脊索的变化,发现了 3 种蛋白:X 连锁凋亡蛋白抑制因子(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)、骨骼肌肌钙蛋白 T(troponin T isoforms, sTnT)、Col2 alpha 1 的差异表达<sup>[15]</sup>,这可能是一个后期的结果。由于腰骶段脊髓与肢芽的发育时间接近,又有共同的 Hox 基因家族参与,因此发生脊髓病变也属正常现象。单从动物模型腰骶椎脊柱裂畸形与 CCF 的发生率来看,不能说腰骶椎脊柱裂畸形与 CCF 有因果关系。

CCF 是由遗传因素和环境中的致畸因素共同导致的。用正常大鼠建立的 CCF 模型,利用了过量维甲酸的致畸作用。那么,维甲酸致畸的机制是什么?尽管大量实验证明,维甲酸调控上述许多与发育成形有关的基因,但在复杂的胚胎发育内环境中,过量(而且异位,因维甲酸在体内的合成有时空特性,有浓度梯度)的维甲酸对相关基因的综合调控的细节尚不得而知。由于与人类新生儿 CCF 有较好的一致性,若能够利用模型发现某(些)相关靶基因上下调是 CCF 表现型的成因,则对遗传因素的阐明大有裨益。

#### [参考文献]

- [1] 杜世新,吉士俊,孙开来. 实验性先天性马蹄内翻足的病因病理研究[J]. 中华骨科杂志, 2003, 22(7): 440—442.
- [2] DeLaurier A, Schweitzer R, Logan M. Pitx 1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb[J]. Dev Biol, 2006, 299(1): 22—34.
- [3] Reijntjes S, Blentic A, Gale E, et al. The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo[J]. Dev Biol, 2005, 285(1): 224—237.
- [4] Delgado-Baeza E, Santos-Alvarez I, Martos-Rodriguez A. Retinoic acid-induced clubfoot-like deformity: pathoanatomy in rat fetuses[J]. J Pediatr Orthop B, 1999, 8(1): 12—18.
- [5] Santos-Alvarez I, Martos-Rodriguez A, Delgado-Baeza E. Embryonic blastemic changes in retinoic acid-induced hindlimb deformity[J]. Cells Tissues Organs, 2003, 173: 217—226.
- [6] Yu J, Gonzalez S, Martinez L, et al. Effects of retinoic acid on the neural crest-controlled organs of fetal rats[J]. Pediatr Surg Int, 2003, 19(5): 355—358.
- [7] Yashiro K, Zhao X, Uehara M, et al. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb[J]. Dev Cell, 2004, 6(3): 411—422.
- [8] Hernandez RE, Putzke AP, Myers JP, et al. Moens Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development[J]. Development, 2007, 134(3): 177—187.
- [9] Schubert M, Yu JK, Holland ND, et al. Retinoic acid signaling acts via Hox1 to establish the posterior limit of the pharynx in the chordate amphioxus[J]. Development, 2005, 132(1): 61—73.
- [10] Cohen AJ, Lassova L, Golden EB, et al. Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element[J]. J Cell Biochem, 2006, 99(1): 269—278.
- [11] Ribes V, Wang Z, Niederreither K. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling[J]. Development, 2006, 133(2): 351—361.
- [12] Zhang L, Zhong T, Wang Y, et al. TBX1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is inhibited by retinoic acid[J]. Int J Dev Biol, 2006, 50(1): 55—61.
- [13] Yu Z, Xing Y. All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF-beta/Smad signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(3): 929—934.
- [14] 杜世新,吉士俊,孙开来,等. 先天性马蹄内翻足的病因初步探讨[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(8): 19—22.
- [15] Li Z, Ji H, Fu W, et al. Proteomic analysis of the ankle joint bone-ankle joint tissue and spinal cord of clubfoot-like deformity in rat fetuses[J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2007, 24(1): 52—58.

(收稿日期: 2007-05-15)



图 2.3 西药组 (250 ×)



图 2.4 电针组 (250 ×)



图 3.1 对照组 dpc11 胎鼠外观, 可见前肢已经发育, 但后肢芽还没有出现。



图 3.2 对照组 dpc12 胎鼠外观, 可见后肢芽已经开始出现。



图 3.3 实验组 dpc13 胎鼠外观, 可见后肢芽发育明显滞后 (2.5 ×)



图 3.4 对照组 dpc13 胎鼠外观, 可见后肢芽已经开始出现 (1.0 ×)

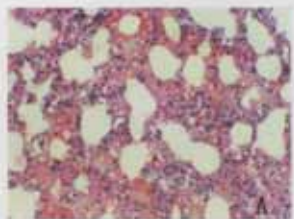


图 4.1 致伤组第 7 天

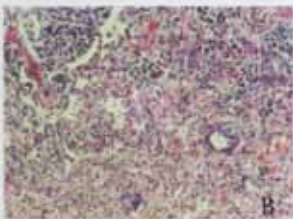


图 4.2 致伤组第 27 天