

达能营养中心
DANONE INSTITUTE CHINA
青年科学工作者论坛
Young Scientists' Forum

维生素 A 与维生素 E 增强叶酸防畸效果的研究

马爱国 徐宏伟 杜卫 刘颖
青岛大学医学院营养研究所, 青岛 266021

摘要:为观察维生素 A 与维生素 E 能否增强叶酸的防畸效果, 采用环磷酰胺致大鼠胎鼠发育畸形作为动物模型, 孕鼠在孕期分别补充叶酸和叶酸+维生素 A+维生素 E, 观察其防畸效果。结果显示孕鼠不补充叶酸和维生素、单独补充叶酸和联合补充叶酸、维生素 A 和维生素 E 使胎鼠脑膨出率分别为 87.27%、42.03% 和 30.08% ($P < 0.01$)。联合补充组与单独补充叶酸组相比, 脑膨出率降低更为明显 ($P < 0.05$), 上枕骨骨化程度明显提高 ($P < 0.01$), 胎鼠平均体重增加 ($P < 0.05$)。结果提示叶酸、维生素 A、维生素 E 有明显促进胚胎发育及拮抗环磷酰胺的致畸作用, 且叶酸与维生素 A、维生素 E 联合应用的作用明显优于单独补充叶酸。

关键词: 维生素 A 维生素 E 叶酸 环磷酰胺 致畸
中图分类号: Q56 Q132.7 Q593.2 **文献标识码:** A

Effect of folic acid and supplemented with vitamin A and vitamin E on depressing teratogenesis induced by cyclophosphamide

Ma Aiguo, Xu Hongwei, Du Wei, Liu Ying

Institute of Human Nutrition, Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, China

Abstract: The effect of folic acid and the combined effect of folic acid (FA) + vitamin A + vitamin E on the prevention of teratogenesis induced by cyclophosphamide during pregnancy were observed. The results showed that cyclophosphamide resulted a decreased weight and length of the fetuses, an increased rate of neural tube defects and a retardation of ossification centers. The neural tube defects rates in the groups with no any supplementation, supplemented with folic acid alone and supplemented with FA + vitamin A + vitamin E were 87.27%, 42.93% and 30.08% respectively ($P < 0.01$). The supplementation of FA or the combined supplementation resulted also in greater fetal weight and length, increased ossification of supraoccipital bone ($P < 0.01$). The study suggested that the combined effect of FA, vitamin A and vitamin E was superior to FA alone.

Key words: vitamin A, vitamin E, folic acid, cyclophosphamide, teratogenesis

我国出生缺陷总发生率是 1.31%, 其中神经管畸形 (neural tube defects, NTDs) 约占 1/4^[1], 是影响人口素质的一个重要因素, 大量实验证明孕早期补充叶酸可显著降低神经管畸形的发生率, 各种营养素的作用是彼此相互联系的, 本实验在观察叶酸防畸的基础上, 又系统地观察了维生素 A、维生素 E 的防畸作用, 并对其防畸机理作了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

注射用环磷酰胺系上海华联制药有限公司生产; 维生素 A 系上海东海制药厂生产 (25000IU/丸); 维生素 E 系天津市中央制药二厂生产 (100mg/丸); 叶酸由济南民康制药厂生产 (5mg/片); 其它试剂均为分析纯。

1.2 动物及饲养

采用 Wistar 雌性未生育大鼠, 体重 180~230g, 由青岛市实验动物中心提供, 雌鼠: 雄鼠为 2:1 每晚合笼交配, 次日晨作阴道涂片, 查到精子者定为妊娠第 0 天并称重。

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP) 是一种强致畸物, 对大鼠具有明显的致神经管畸形 (NTDs) 和骨骼发育异常的作用, 其畸形发生率为 97.46%^[2]。较早给予环磷酰胺可致大鼠着床后胚胎死亡或流产显著增加, 难以观察到明显的神经管畸形, 而环磷酰胺所致的神经管畸形的最佳染毒时间为妊娠第 12~14 天^[3]。本研究孕鼠随机分为 N、P、A、B 4 组, 于妊娠 0~20 天喂饲不同饲料及饮水。各组均在妊娠第 13 天上午称重, CP(P)、CP+ 叶酸(A)、CP+ 叶酸+VA+VE(B) 三组腹腔注射以生理盐水新鲜配制的 0.2g/100ml CP (13mg/kg 体重), 正常对照组(N) 仅注射等量生理盐水。在给予致畸物前后, 即妊娠第 12、13、14 三天各组灌胃给予相应的营养素, 以保证营养素在体内到达足够浓度, 实验动物的分组及喂养情况见表 1。

基础饲料配方为 (g/kg): 面粉 300、豆面 100、玉米面 300、麸皮 200、鱼粉 50、骨粉 10、盐 10、酵母 20、花生油 10。

基金项目: 山东省教委科研基金资助项目 (No. Z98K54)

作者简介: 马爱国, 男, 医学硕士, 教授

表 1 实验动物分组及喂养

分 组	饲料	饮水	灌胃 (孕第 12~14 天, 每天 1 次)
正常对照组(N)	基础饲料	正常饮用水	生理盐水
CP 组(P)	基础饲料	正常饮用水	生理盐水
CP+ 叶酸组(A)	基础饲料	0.02mg/100ml 叶酸	叶酸 15mg/(kg·d)
CP+ 叶酸+ VA+ VE 组 (B)	基础饲料+ VE 500mg/kg+ VA 10000IU/kg	0.02mg/100ml 叶酸	叶酸 15mg/(kg·d) + VE 5mg/(kg·d) + VA 600IU/(kg·d)

1.3 实验方法

均于妊娠第 20 天上午称重后处死各组孕鼠, 立即剖开腹腔暴露子宫, 检查受孕情况, 分别记录胚胎着床数、活胎数、死胎数、吸收胎数, 将胎鼠逐一取出, 剥离胎盘并称重。

1.4 活胎鼠的外形检查

逐一检查每只胎鼠有无外形结构的畸形, 主要看有无脑膨出等, 并测定每只活胎鼠的体重、身长、尾长。

1.5 胎鼠内脏检查

外形检查完毕后, 按同窝同瓶的原则随机取出 1/2 胎鼠放入盛有鲍音氏溶液的标本瓶中, 固定 2 周以上, 取出用自来水冲去固定液, 按毒理学胎鼠内脏检查法检查头部、鼻部、眼部、脑部及胸、腰、盆腔脏器的结构并记录。

1.6 胎鼠骨骼检查

外形检查完毕后, 按同窝同瓶的原则将另 1/2 胎鼠放入盛有乙醇固定液的标本瓶中固定, 48~72h, 即转入 1g/100ml KOH 溶液中 3~5 天, 直至肌肉透明可见骨骼为止, 此时将 1g/100ml KOH 溶液弃去, 加入茜素红应用液(以 2g/100ml KOH 溶液将茜素红贮备液配成 0.1%~0.2% 的溶液)进行染色, 直到骨骼染成桃红色为止, 染色后将胎鼠置于透明液 1、2、3 中各 1~2 天。经上述处理的胎鼠, 放于玻璃平皿中用解剖镜进行观察, 按头、胸、腰、四肢、尾的顺序观察、记录, 按吴德生方法进行骨骼畸形鉴定。

1.7 统计处理

所有实验结果, 按资料的不同性质, 分别给予相应的统计处理: 计量资料用方差分析, 计数资料用卡方检验。

2 结果

2.1 实验孕鼠情况

实验期间各组动物的活动和饮食均正常, 无死亡。孕 1~13 天和孕 13~20 天各组孕鼠体重增加均无显著性差异($P > 0.05$), 见表 2。可见, 妊娠第 13 天给予孕鼠 CP(13mg/kg·BW) 1 次, 虽有致畸作用, 但对母体无明显的毒性作用。

表 2 孕鼠体重的增长($\bar{x} \pm s$) g

分组	n	体重变化	
		第 1~13 天	第 13~20 天
正常对照组(N)	10	38.4 ± 7.44	50.3 ± 5.68
CP 组(P)	10	33.0 ± 7.86	44.5 ± 9.69
CP+ 叶酸组(A)	11	32.5 ± 8.72	47.5 ± 6.49
CP+ 叶酸+ VA+ VE 组(B)	11	30.2 ± 4.31	48.5 ± 8.26

2.2 胚胎毒性及 NTDs 发生率比较

各组间着床数、活胎数、死胎数、吸收胎数差异无显著性

($P > 0.05$)。提示给予致畸物的时间较好, 未影响胚泡形成和着床。本实验发现环磷酰胺所致的神经管畸形主要为脑膨出。结果显示 A、B 组脑膨出率明显低于 P 组($P < 0.01$)。A、B 组间脑膨出率差异有显著性($P < 0.05$)。可见, 维生素有明顯的拮抗 CP 所致脑膨出的作用, B 组效果比 A 组好, 见表 3。

表 3 胚胎毒性和神经管畸形发生情况

分组	孕鼠数	胎鼠数	活胎数	死胎数	吸收胎	脑膨出畸形	
						发生数	发生率(%)
N	10	122	117	1	4	0	0
P	10	126	120	4	2	96	87.27
A	11	138	137	0	1	58	42.03 ⁽¹⁾
B	11	135	132	2	1	40	30.08 ^(1,2)

注: (1) 与 P 组比较 $P < 0.01$ (2) 与 A 组比较 $P < 0.05$

2.3 各组胎鼠生长发育比较

表 4 结果显示, 胎鼠体重差异有显著性。各组间两两比较, N、B、A 组胎鼠体重明显高于 P 组, A、B 组胎鼠体重仍明显低于 N 组($P < 0.01$), 而 A、B 组间胎鼠体重差异无显著性。胎鼠身长各组间两两比较, N 组胎鼠身长明显高于 P 组, 其余各组胎鼠身长间差异无显著性。各组间胎鼠尾长及胎盘重无显著差异($P > 0.05$)。

表 4 胚胎生长发育指标分析($\bar{x} \pm s$)

分组	孕鼠数	胎鼠体重 (g)	胎鼠身长 (cm)	胎鼠尾长 (cm)	胎盘重 (g)
N	9	3.18 ± 0.29 ⁽²⁾	3.34 ± 0.17 ⁽¹⁾	1.24 ± 0.07	0.42 ± 0.07
P	9	2.35 ± 0.23	3.07 ± 0.14	1.15 ± 0.08	0.39 ± 0.07
A	11	2.68 ± 0.28 ^(1,3)	3.17 ± 0.24	1.19 ± 0.05	0.40 ± 0.06
B	11	2.79 ± 0.40 ^(2,3)	3.21 ± 0.16	1.21 ± 0.05	0.40 ± 0.05

注: 与 P 组比较 (1) $P < 0.05$ (2) $P < 0.01$, 与 N 组比较 (3) $P < 0.01$

2.4 胎鼠上枕骨骨化程度分析(表 5、附图)

0 级: 上枕骨呈片状或哑铃状, 两侧骨化点完全融合, 融合处宽度大于两侧 1/3。

I 级: 上枕骨两侧骨化点相连, 相连处宽度小于两侧 1/3。

II 级: 上枕骨两侧骨化点不相连, 但可清楚地见 2 个较大的骨化点。

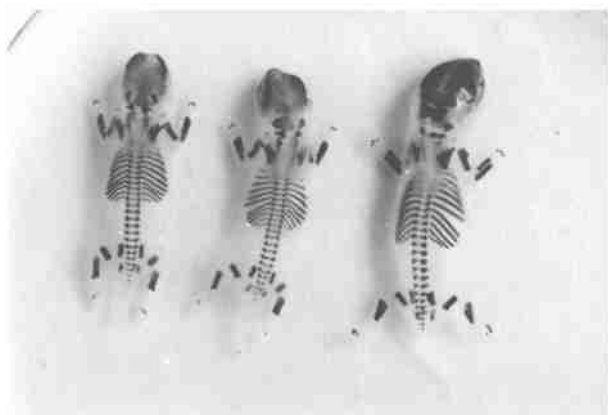
III 级: 上枕骨两侧骨化点不相连, 仅见小骨化点(或仅见一侧骨化点);

IV 级: 未见上枕骨两侧骨化点。

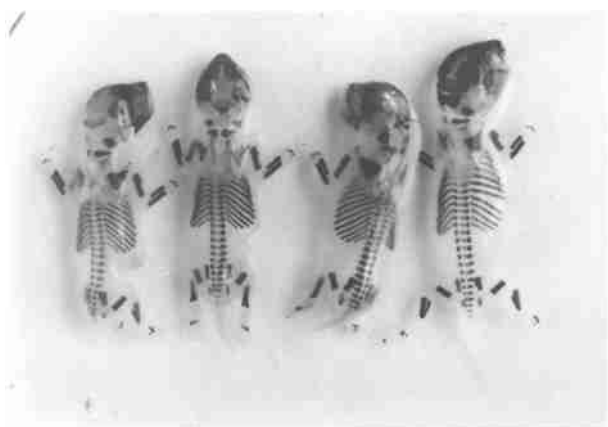
表 5 显示, A、B 组与 P 组间差异有显著性($\chi^2 = 112.15$ 和 $91.2, P < 0.01$), A、B 组间差异有显著性($\chi^2 = 6.40, P < 0.05$)。

表5 上枕骨骨化程度分析

分组	N	0级		I级		II级		III级		IV级	
		n	百分比 (%)	n	百分比 (%)	n	百分比 (%)	n	百分比 (%)	n	百分比 (%)
N	61	48	78.7	13	21.3						
P	70							14	20.0	56	80.0
A	68			16	23.5	40	58.8	12	17.6		
B	70			29	41.5	27	38.6	14	20.0		



A 左二胎鼠为CP组,上枕骨骨化程度IV级,右为正常组胎鼠,上枕骨骨化程度为0级



B 左三胎鼠为CP+维生素组,左1~3上枕骨骨化程度分别为III、II、I级,右为正常组胎鼠,上枕骨骨化程度为0级

附图 胎鼠上枕骨骨化程度

3 讨论

人群调查发现有2次及2次以上NTDs生育史的妇女的红细胞叶酸水平显著低于未生育过NTDs的对照组妇女,而且红细胞叶酸水平与NTDs发生次数间呈线性关系^[4]。1995年Czeizel的维生素与疾病关系的研究表明,在受孕前即给予含叶酸的补充剂进行干预,能有效地和明显地降低婴儿神经管畸形的发生^[5]。

叶酸和维生素A、维生素E的实验干预剂量在不同研究中差异较大。英国MRC对有NTDs分娩史妇女的妊娠前后每天服用4000μg叶酸,使NTDs再发危险性降低了72%。美国公共卫生署于1992年建议准备怀孕的妇女每天服用400μg叶酸以预防胎儿发生NTDs。我国科学工作者在中国北方的NTDs高发区和南方的NTDs低发区进行了人群干预研究,对

130142名妇女每天补充400μg叶酸,同时有117689名对照妇女,干预试验为期3个月,结果证实400μg叶酸能有效地降低NTDs的发生率,使出生的婴儿中NTDs的发生率由0.48%下降到0.1%,取得了明显的预防效果^[6]。本研究所选用对大鼠补充叶酸、维生素A和维生素E的剂量是参考人群相应推荐供给量加2个标准差或接近可耐受最高摄入量(UL),而低于产生毒作用的剂量作为本研究的有效干预剂量^[7]。

神经管畸形的主要形式有:无脑畸形、脊柱裂、脑膨出和枕骨裂露脑畸形等。本实验采用环磷酰胺所致的神经管畸形主要表现为脑膨出和枕骨骨化不全,为进一步了解脑膨出和枕骨骨化不全的程度,本文将这两种畸形分开进行了分析。研究结果显示孕鼠单独补充叶酸可使胎鼠脑膨出率降低($P < 0.01$),胎鼠体重增加($P < 0.05$),上枕骨骨化程度提高($P < 0.01$)。与上述实验结果一致。

本实验选用的致畸物为环磷酰胺,其引起的DNA损伤被认为是其致畸的首要原因。环磷酰胺还能引起核糖体RNA合成的改变,从而影响细胞内蛋白质的合成^[8]。而叶酸对DNA和RNA的合成,细胞增殖和组织生长有重要意义。

本实验结果显示:孕鼠补充叶酸、VA和VE的防畸作用优于单独补充叶酸,可见VA+VE能增强防畸效果。其原因可能是:(1)VA、VE对胚胎生长发育有重要作用;(2)CP代谢产物主要与S期的DNA发生烷化作用,从而干扰细胞周期,导致细胞死亡和组织异常。近年来对VA、VE抗肿瘤作用的研究中发现VA、VE可调节细胞周期相关基因的表达。研究VE对与肿瘤细胞分化和增生密切相关的DNA、RNA、蛋白质合成和基因表达的作用时发现,VE能够影响化学诱变作用和细胞形态,控制细胞的复制等^[9]。Hox基因是对胚胎发育从时间和空间上进行调控的基因之一,也称发育基因,Hox基因的异常表达与胚胎畸形的发生直接相关,Heather在研究脊椎动物胚胎形成过程中,发现视黄酸影响细胞和胚胎组织中Hox基因的表达^[10]。Packer则发现Hox基因的调控区存在视黄酸受体反应元件,这更证实了在胚胎发育形成过程中必须有视黄酸的存在^[11]。

有些体外实验说明,维生素A、β-胡萝卜素、α-生育酚可以抑制环磷酰胺导致的姊妹染色体交换等致突变作用^[12]。通过补充较高剂量VE、VC和β-胡萝卜素,观察3种维生素对淋巴细胞损伤的影响。结果显示补充VE、VC和β-胡萝卜素可以有效地降低H₂O₂所致的DNA损伤^[13]。

胚胎组织损伤的严重程度和组织的修复能力对畸形的发生有着同等重要意义,当致畸因素作用于组织并引起损害时,如组织修复能力强,能及时修复就会形成较轻的畸形甚至不形成畸形。

4 参考文献

- 肖坤则. 中国神经管缺陷的流行病学. 中华医学杂志, 1989, 4: 189-191
- 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. 解剖学报, 1990, 21(1): 107-110
- 管孝菊. 环磷酰胺致畸机理研究进展. 癌变、畸变、突变, 1998, 10: 256-264
- Yates. Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition

文章编号: 1000-8020(2001) 06-0346-04

· 论著 ·

达能营养中心
DANONE INSTITUTE CHINA
青年科学工作者论坛
Young Scientists' Forum

大豆异黄酮对低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用

闫祥华 顾景范¹ 孙存普¹ 刘大星 何传民

济南军区军事医学研究所, 济南 250014

摘要:为探讨大豆异黄酮(SI)在体外及体内对低密度脂蛋白(LDL)氧化修饰的作用特点及其与 α -生育酚的异同,采用密度梯度超速离心法分离制备血清LDL后,建立了 Cu^{2+} 诱导LDL氧化修饰反应模型,体外向模型中直接加入SI和 α -生育酚后,通过监测反应体系中硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)和共轭双烯生成量的变化观察它们的作用。体内实验通过先补加SI于高脂饲料喂饲大鼠,再测定血中LDL对 Cu^{2+} 诱导氧化的敏感性以反映SI的效果。结果表明,体外无论在启动LDL氧化反应前还是反应后加入SI,均显著降低体系中TBARS和共轭双烯的生成,并呈现剂量相关关系;仅在启动LDL氧化反应前加入 α -生育酚显示良好的抑制效果,当启动LDL氧化反应后加入 α -生育酚则未表现任何防护作用。在大鼠喂饲实验中,高脂饲料导致动物LDL对氧化修饰的敏感性增加,补加SI对此有明显的拮抗作用。可见,在体外SI是与 α -生育酚作用有所区别的一类天然抗氧化剂,它在体外和体内均能显著抑制LDL的氧化修饰。

关键词:大豆异黄酮 低密度脂蛋白 氧化修饰

中图分类号:R151.2 R543.5 Q566 S816.42

文献标识码:A

Inhibition effect of soybean isoflavones on the oxidative modification of low-density lipoprotein

Yan Xianghua, Gu Jingfan, Sun Cunku, Liu Daxing, et al.

Institute of Military Medicine of Jinan, Jinan 250014, China

Abstract: In order to investigate the effect of soybean isoflavones(SI) on the oxidative modification to low-density lipoprotein(LDL) and to differentiate the effect of SI and α -tocopherol, *in vitro* and *in vivo* test were conducted. An *in vitro* model of LDL oxidative modification induced by copper ion was established by monitoring the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and conjugated dienes after SI or α -tocopherol was added. The *in vivo* test was conducted by feeding rats with a high fat diet supplemented with SI and measured the sensitivity of LDL oxidative modification mediated by Cu^{2+} *in vitro*. The results revealed that when SI was added into the *in vitro* LDL oxidation system, the content of TBARS or conjugated dienes in the system was much reduced with a dose-effect relationship, whether lipid oxidation being initiated or not by copper ion at 37°C. In comparison with SI, only a significant inhibiting effect on lipid oxidation while α -tocopherol was added before the initiation of oxidation. High fat diet induced a rising of LDL sensitivity of oxidative stress, and adding SI to the high fat diet could counteract the sensitivity of LDL oxidative modification significantly. It is concluded

tion neural tube defects? Clinical Genetics, 1987, 31: 281-287

5 Czeizel AE. Folic acid in the prevention of neural tube defects. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1995, 2:4-16

6 Robert JB, Zhu L, Erickson JD, et al. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. New Engl J Med 1999, 341: 1485-1490

7 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, (10): 259-356

8 Little SA, Mirkes PE. Effects of 4-hydroperoxy-cyclophosphamide(4-OHH-CP) and 4-hydroperoxydechlorocyclophosphamide(4-OHH-deClCP) on the cell cycle of post implantation rat embryos. Teratology, 1992, 45(2): 163

9 Lupulescu A. Vitamin E inhibition of human papillomavirus type 16-mediated

transformation of human keratinocytes. Inter J Vit Nur Res, 1993, 63: 3-14

10 Heather M, Morrison A, Studer M, et al. Retinoids and Hox genes. FASEB J, 1996, 10: 969-978

11 Packer AI, Crotty DA, Wolgemuth DJ. Expression of the murine Hoxa-4 gene require both autoregulation and conserved retinoic acid response element. Devel, 1998, 125(11): 1991-1998

12 Edenharter R. Effects of beta-carotene, retinal, riboflavin, alpha-tocopherol and vitamins C and K1 on sister-chromatid exchanges induced by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) and cyclophosphamide in human lymphocyte cultures. Food Chem Toxicol, 1998, 36(11): 897-906

13 马爱国, Susan JD, Marion AR. 维生素 E、C 和 β -胡萝卜素对 DNA 损伤的影响. 中华预防医学杂志, 1999, 33(1): 16-17

(2001-01-07 收稿)

作者简介: 闫祥华, 男, 博士, 助理研究员

¹ 军事医学科学院