DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.07.016

丙戊酸钠妊娠中期暴露对子代神经行为影响及其与肝脏功能相关性

唐 瑾[1],徐元宏[1,2]

摘要 **目的** 探讨丙戊酸钠(VPA)妊娠中期宫内暴露对子代肝脏损伤的影响与神经行为的相关性。**方法** 取孕12.5 d SD大鼠30只,随机分为低剂量组10只(腹腔注射VPA 300 mg/kg),高剂量组10只(腹腔注射VPA 600 mg/kg);对照组10只(腹腔注射等量生理盐水)。分别对3组子代大鼠(低剂量组母鼠所产仔鼠编为VPA低剂量组,高剂量组母鼠所产仔鼠编为VPA高剂量组,对照组母鼠所产仔鼠编为对照组)。对各组进行神经行为学和肝脏功能等检查,同时进行相关性分析。**结果** VPA高剂量组和VPA低剂量组的总蛋白和白蛋白的水平显著低于对照组,VPA高剂量组也显著低于VPA低剂量组($P<0.01$),表明VPA妊娠中期宫内暴露可影响子代肝脏白蛋白的合成;VPA高剂量组和VPA低剂量组的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和血氨水平均显著高于对照组,VPA高剂量组又显著高于VPA低剂量组($P<0.01$),表明VPA妊娠中期宫内暴露可导致子代的肝功能损害;VPA高剂量组和VPA低剂量组的血氨水平均明显高于对照组,VPA高剂量组也显著高于VPA低剂量组($P<0.01$),表明VPA妊娠中期宫内暴露可导致子代的血氨显著增高;对子代大鼠的神经行为检测结果显示,VPA高剂量组和VPA低剂量组宫内暴露均导致子代的刻板动作发生的时间和次数较对照组显著增多($P<0.01$)、Morris水迷宫中逃避潜伏期、游泳距离时间和目标象限游泳时间,VPA高剂量组和VPA低剂量组较对照组明显延长($P<0.05$,$P<0.01$),而穿越平台次数较对照组显著减少($P<0.01$),表明VPA妊娠中期宫内暴露可导致子代的神经行为异常;对血氨、肝功能与神经行为的相关性分析结果显示,VPA处理组的总蛋白和白蛋白的水平显著降低,与神经行为异常呈负相关;血氨、ALT、AST水平与刻板动作次数、时间、学习记忆的总路程、潜伏期、穿越平台次数均密切相关($P<0.01$)。**结论** VPA妊娠中期宫内暴露可导致子代肝脏白蛋白减少,ALT、AST、血氨增高和神经行为异常;子代肝脏白蛋白合成减少而影响子代神经系统的发育,血氨增高为其神经毒性直接导致子代的神经行为异常。两者均可能是VPA妊娠中期宫内暴露可导致子代神经行为的主要因素之一。

关键词 丙戊酸钠;妊娠暴露;子代大鼠;肝功能;血氨;神经行为

中图分类号 R 338.6;R 714.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)07-0930-05

丙戊酸钠(sodium valproate,VPA)是临床最常用的抗癫痫药物,VPA妊娠期间暴露被认为与胎儿的多种畸形[1]和神经行为异常如孤独症等有关。因此,有研究者利用VPA孕中期暴露,成功的构建了孤独症的动物模型,其导致孤独症的机制被认为与VPA的神经毒理有关[2-3]。另一方面,VPA存在肝脏损伤的副作用。该研究拟建立不同剂量VPA妊娠中期宫内暴露致子代神经行为异常和肝脏损伤的大鼠模型,探讨肝脏损伤与神经行为异常之间是否存在相关性。

1 材料与方法

1.1 材料与分组 健康成年SD大鼠,雄性280~290 g,10只,雌性240~250 g,20只,清洁级,均购于安徽医科大学实验动物中心。在周期性光照(07:00~19:00)、恒温24 ℃和恒湿55%条件下饲养4周,环境适应2周后,参照Schneider et al[4]的方法,于当日17:00以雌雄比2∶1合笼,次日08∶00查阴道涂片,以查得精子为妊娠第1天,孕鼠另笼饲养。将孕鼠随机分为低剂量组、高剂量组和对照组,每组各10只,VPA组共30只。未孕鼠不纳入试验。在妊娠第12.5天(孕中期)时,低剂量组孕鼠腹腔注射VPA(杭州赛诺菲安万特制药有限公

2014-04-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171606);安徽省自然科学基金(编号:PT20081011)

作者单位:[1] 安徽医科大学公共卫生学院检验医学系,合肥 230032

[2] 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介:唐 瑾,女,硕士研究生;

徐元宏,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:xyhong1964@163.com

receiving physical examination in northern Guangxi. ② The adiponectin gene SNP-11377C/G may be not associated with overweight and obesity in Han population receiving physical examination in northern Guangxi.

Key words obesity; overweight; epidemiological investigation; adiponectin gene; single nueleotide polymorphism

司,400 mg 粉针剂) 300 mg/kg 粉用生理盐水配成 250 mg/ml 溶液,高剂量组孕鼠腹腔注射 VPA 600 mg/kg;对照组孕鼠腹腔注射等量生理盐水。低剂量组母鼠产下的仔鼠记为 VPA 低剂量组($n=42$),高剂量组母鼠产下的仔鼠记为 VPA 高剂量组($n=36$),对照组母鼠产下的仔鼠记为对照组($n=49$);出生当日记为生后第 1 天。

1.2 研究方法

1.2.1 *体重发育* 将 3 组仔鼠编号,随机抽取 VPA 低剂量组、VPA 高剂量组和对照组各 16 只,分别于第 7、14、21 天进行称重 。

1.2.2 *倾斜板实验* 将 3 组实验鼠(28 d)各随机抽取 16 只放在倾斜 75°的平板上,记录各组平均停留时间(s)。

1.2.3 *旷场红外线检测系统* 参照 Schneider et al[4] 所建立的方法并对实验幼鼠的类似行为进行检测,方法简述如下:旷场红外线检测系统为一长×宽×高为 48 cm×24 cm×20 cm 的顶部开口的长方形实验盒,盒顶盖上玻璃,侧壁安装有束状红外线发生器和探测器系统,旷场红外线检测系统利用大鼠是否阻断红外线而自动全时程记录其活动情况。通过预实验后确定本实验选取 15 日龄幼鼠作测试,使用旷场红外线检测系统记录一定时程(30 min 内)内各只幼鼠每 5 min 的第 1 分钟内呆板和非自主刻板性动作的出现次数和累积时间,然后对各组刻板动作出现次数和时间的均值进行比较。

1.2.4 *Morris 水迷宫* 选择 6 周龄仔鼠,3 组(VPA 低剂量组、VPA 高剂量组和对照组)各随机抽取 16 只。池直径 12 cm,高 60 cm,水温为(25±2)℃。实验包括 2 个阶段:① 定位航行试验:实验历时 4 d,每只仔鼠每天训练 4 次。训练时将仔鼠从规定的位置面朝池壁靠近水面放入水中,记录其在 90 s 内找到平台的时间(逃避潜伏期)。如果仔鼠在 90 s 内未能找到平台,由测试者将其引导上平台,使其在平台上停留 15 s 后移开,潜伏期记为 90 s;② 空间探索试验:在第 5 天撤除平台,然后将仔鼠从点 N+E(东北)面朝池壁放入水中,由摄像系统和计算机软件记录 60 s 内仔鼠在目标象限(原平台所在象限)运动时间和穿越目标(原平台位置)次数。

1.2.5 *肝功能检测* 应用罗氏 7600D 全自动生化仪,对血清中的转氨酶采用转氨酶系速率法、总蛋白检测采用双缩尿法、白蛋白检测采用溴甲酚绿法。

1.2.6 *血氨检测* 强生公司 Vitros 5.1FS 自动生化分析仪,干化学法。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验、方差分析,参数间相关性应用 Pearson 相关。

2 结果

2.1 一般发育情况

2.1.1 *死亡率与畸形率比较* VPA 低剂量组 1 个月内死亡 2 只,死亡率 4.6%;畸形 1 只,畸形率 2.3%,VPA 高剂量组 1 个月内死亡 5 只,死亡率 9%;畸形 3 只,畸形率 4.6%;对照组无死亡和畸形。

2.1.2 *体重发育情况* 对照组在 3 周时体重显著高于 VPA 组(低剂量组,$t=23.583$,$P<0.01$;高剂量组,$t=20.838$,$P<0.01$),第 1、2 周 3 组体重差异无统计学意义。表明 VPA 对仔鼠体重的影响以 2 周后明显。见图 1。

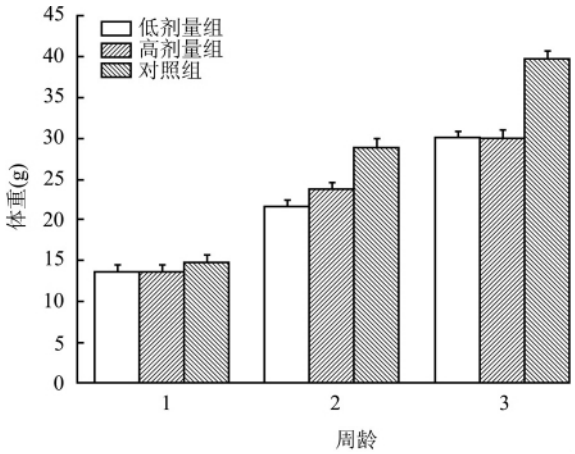

图 1 VPA 妊娠中期宫内暴露对仔鼠体重的影响

2.2 仔鼠肝功能、血氨

2.2.1 *仔鼠肝功能情况* 总蛋白和白蛋白的水平,VPA 高剂量组和低剂量组显著低于对照组,高剂量组也显著低于低剂量组($P<0.01$);ALT、AST 的比较结果,VPA 高剂量组和 VPA 低剂量组显著高于对照组,高剂量组也显著高于低剂量组($P<0.01$)。胆红素 3 组之间比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 不同剂量 VPA 妊娠暴露对仔鼠肝功能的影响($\bar{x}\pm s$)

肝功能	高剂量组	低剂量组	对照组	F 值	P 值
总蛋白(g/L)	42.87±6.13	47.24±3.76	54.66±3.24	17.433	<0.01
白蛋白(g/L)	18.35±3.35	21.07±2.28	24.65±1.85	11.025	<0.05
胆红素(μmol/L)	7.50±2.22	6.35±1.59	5.52±1.12	1.025	0.087 6
ALT(U/L)	89.70±20.48	56.70±6.31	37.00±3.20	9.179	<0.01
AST(U/L)	98.50±38.12	87.20±8.74	33.40±4.20	40.671	<0.01

2.2.2 *仔鼠血氨水平* VPA 高剂量组显著高于

VPA 低剂量组，差异有统计学意义（$F=76.454$，$P<0.01$）；VPA 低剂量组的血氨水平又显著高于对照组，差异有统计学意义（$F=84.273$，$P<0.01$）。见图 2。

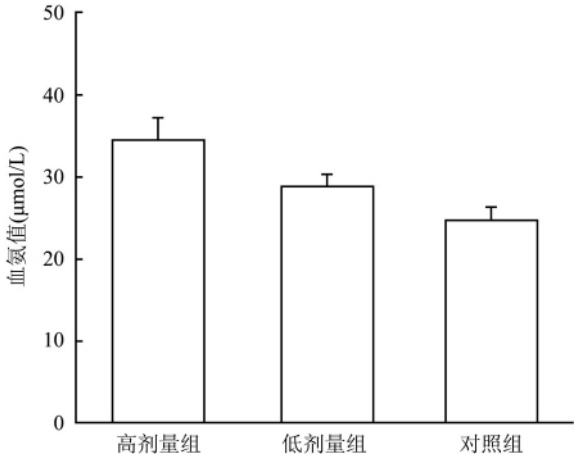

图 2　妊娠中期宫内暴露对子代血氨水平的影响

2.3　神经行为学检测

2.3.1　*重复一刻板动作检测*　3 组之间比较，刻板动作发生的时间（图 3A）和次数（图 3B）较对照组差异有统计学意义，VPA 可以导致子鼠刻板动作显著增加。

2.3.2　Morris 水迷宫

2.3.2.1　逃避潜伏期　采用重复测量数据方差分析，3 组间差异有统计学意义（$F=18.54$，$P<0.05$）。见表 2。

2.3.2.2　游泳距离　采用重复测量数据方差分析，3 组间差异有统计学意义（$F=47.502$，$P<0.01$）。见表 2。

表 2　不同剂量 VPA 妊娠暴露对仔鼠 Morris 水迷宫的结果（$\bar{x}\pm s$）

项目	VPA 高剂量组	VPA 低剂量组	对照组
逃避潜伏期（s）			
第 1 天	99.00±12.24	96.67±17.05	55.79±12.05
第 2 天	88.00±12.21	76.27±16.16	32.91±10.75
第 3 天	72.00±15.34	57.82±19.08	21.96±9.43
第 4 天	56.00±11.24	43.02±15.54	13.91±8.30
游泳距离（cm）			
第 1 天	19.14±3.75	16.25±2.24	9.79±2.05
第 2 天	15.22±3.16	14.23±2.21	6.91±1.75
第 3 天	15.22±3.16	11.80±2.34	5.96±1.43
第 4 天	11.02±3.54	9.60±2.24	5.71±1.30

2.4　血氨、肝功能与神经行为的相关性分析　将血氨、ALT、AST 水平与神经行为的分项值分别进行双变量相关分析，结果表明，血氨ALT、AST水平与刻板动作次数、时间显著相关（$P<0.01$）；血氨、ALT、AST 水平与学习记忆的总路程、潜伏期、穿越平台次数均显著相关（$P<0.01$）。

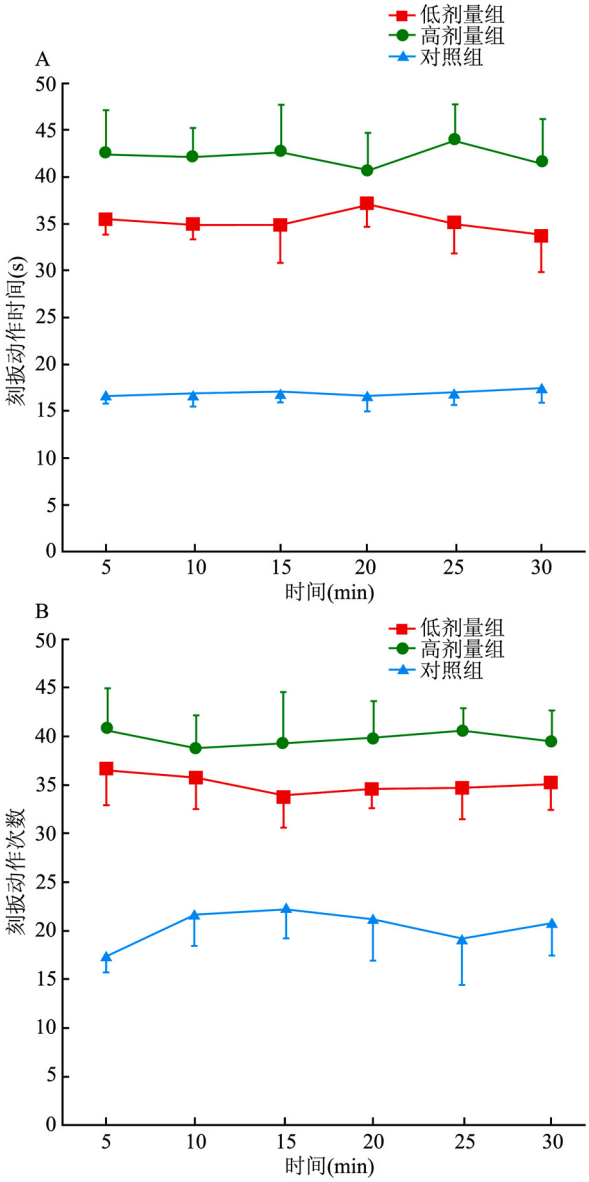

图 3　刻板动作时间和次数

3　讨论

3.1　不同剂量 VPA 妊娠中期宫内暴露的大鼠模型的建立和评价　VPA 能增加抑制性神经递质 γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）的合成并减少其降解，从而降低神经元的兴奋性而抑制癫痫发作。孕期服用 VPA 的妇女，子代神经行为异常的发病率高出普通人群近 20 倍[5]。研究[6-7]表明妊娠期宫内的 VPA 暴露可导致子代出现自闭症。2000 年 Ingram et al[8] 建立了 VPA 致自闭症的大鼠模型，并认

为是大脑皮层的发育异常导致自闭症症状。但没有对仔鼠的肝脏功能进行检测。

大鼠胚胎发育的第 11 ~ 13 天是神经管闭合的阶段,在此阶段接触 VPA 可能影响神经系统正常发育分化,使后代出现神经发育的异常。Schneider et al[4] 在大鼠妊娠的第 12.5 天时通过腹腔注射 VPA 建立孤独症动物模型,大鼠出现刻板动作、社交活动减少等行为特征的改变。本研究建立了不同剂量的 VPA 妊娠中期宫内暴露的大鼠模型,结果显示,VPA 高剂量组和低剂量组妊娠中期宫内暴露均导致子代的刻板动作发生的时间和次数较对照组显著增多; VPA 高剂量组和 VPA 低剂量组的仔鼠在 Morris 水迷宫中逃避潜伏期、游泳距离时间、目标象限游泳时间均较对照组明显延长; 而穿越平台次数较对照组显著减少。进一步表明 VPA 妊娠中期宫内暴露可导致子代的神经行为学异常。

3.2 妊娠中期 VPA 暴露对子代大鼠肝功能的影响 VPA 致肝毒性的主要临床表现为血清肝酶和血氨等的升高。损害机制是大剂量 VPA 使肝细胞线粒体 β-脂酸氧化代谢受到干扰,肝细胞内产生自由基特征的 VPA 代谢产物,当体内清除自由基的物质如谷胱甘肽消耗太多时,就会产生过氧化反应,造成肝细胞破坏与肝脏功能的损伤。另外, CYP450 还原酶的表达明显增强也是 VPA 肝毒性增强的机制之一[9]。本研究显示 VPA 高剂量组和 VPA 低剂量组的总蛋白和白蛋白的水平显著低于对照组,VPA 高剂量组也显著低于 VPA 低剂量组,表明 VPA 妊娠中期宫内暴露可影响子代大鼠肝脏中白蛋白的合成; VPA 高剂量组和 VPA 低剂量组的 ALT、AST、血氨水平均显著高于对照组,VPA 高剂量组又显著高于 VPA 低剂量组,表明 VPA 妊娠中期宫内暴露可导致仔鼠肝酶升高和肝脏氨代谢障碍。证明 VPA 妊娠中期宫内暴露可致仔鼠肝功能损伤。

3.3 肝功能损伤与神经行为的相关性 血氨升高可以引起一系列的神经系统症状。血氨易通过血脑屏障刺激谷氨酰胺酶活性增加导致谷氨酰胺的合成增加,导致细胞内渗透压增高,细胞外水分进入细胞内引起胶质细胞肿胀和脑水肿[10-11]。另外,GABA 主要来源于肠道菌群,肝损伤后不能有效清除肠源性 GABA,使脑内 GABA 升高,大量的 GABA 激发氯离子通道的开放,促使氯离子内流,导致突出后膜超极化,兴奋性降低,是导致神经行为学异常的原因之一。本研究中 VPA 组的血清白蛋白的水平与神经行为异常呈负相关,即白蛋白的水平越低子代神经行为越重、发生率也越高,由此推论 VPA 妊娠中期宫内暴露导致子代蛋白合成能力的下降可能是影响子代大鼠神经发育的一个因素。高氨血症被证明可以导致认知损害和影响神经行为学异常[12],其机制可能与高血氨抑制海马锥体神经元长时程增强作用(long-term potentiation, LTP)的可塑性有关[13]。本研究中血氨、ALT、AST 水平与刻板动作次数、时间的相关性有统计学意义,血氨、ALT、AST 水平与学习记忆的总路程、潜伏期、穿越平台次数均密切相关。这些神经系统症状是否和血氨升高、酶学异常有直接的关系有待进一步研究。

综上所述,VPA 妊娠中期宫内暴露可导致 SD 仔鼠神经行为异常和肝功能损伤。其所致神经行为异常不仅与药物的神经毒性直接损伤有关,还可能是因为肝损伤致蛋白合成减少而影响仔鼠神经系统的发育,同时肝损伤致高血氨可能影响子代神经行为的一个重要因素。相应的生理学机制有待于进一步研究。

参考文献

[1] Jentink J, Loane M A, Dolk H, et al. Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations [J]. N Engl J Med, 2010, 362(23): 2185 - 93.

[2] Narita M, Oyabu A, Imura Y, et al. Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat [J]. Neurosci Res, 2010, 66(1): 2 - 6.

[3] Kim K C, Lee D K, Go H S, et al. Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(1): 512 - 28.

[4] Schneider T, Przewfocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism [J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80 - 9.

[5] 李 音,衣明纪,马 遥. 高压氧对 VPA 孤独症模型鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中国儿童保健杂志, 2012, 20(10): 903 - 6.

[6] Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid [J]. Psychoneuroendocrinology, 2008, 33(6): 728 - 40.

[7] Moore S J, Turnpenny P, Quinn A, et al. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes [J]. Med Genet, 2000, 37(7): 489 - 97.

[8] Ingram J L, Peckham M, Tisdale B, et al. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism [J]. Neurotoxicol, 2000, 22(3): 319 - 24.

[9] 李晓宇,刘皋林. CYP450 酶特性及其应用研究进展 [J]. 中国

临床药理学与治疗学,2008,13(8):942 - 6.

[10] Chopra A, Kolla B P, Mansukhani M P, et al. Valproate-induced hyperammonemic encephalopathy: an update on risk factors, clinical correlates and management [J]. Gen Hosp Psychiatry, 2012, 34(3):290 - 8.

[11] 孙振晓,于相芬. 丙戊酸钠导致高氨血症及脑病的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2012,6(8):2163 - 4.

[12] Lockwood A H. Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy [J]. Metab Brain Dis, 2004, 19(3-4):345 - 9.

[13] Izumi Y, Svrakic N, O'Dell K, et al. Ammonia inhibits long-term potentiation via neurosteroid synthesis in hippocampal pyramidal neurons [J]. Neuroscience, 2013, 233:166 - 73.

Research on liver damage and the neurobehavioral abnormality of offspring rats exposed to Sodium Valproate in the second trimester and on the relevance between the liver damage and the neurobehavioral abnomrality

Tang Jin[1], Xu Yuanhong[1,2]

([1]*Dept of Clinical Laboratory, School of Public Heal, Anhui Medical University, Hefei* 230032;
[2]*Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To investigate the relevance of liver function and neurobehavior of offspring of SD rats exposed to sodium valproate in the second trimester. ***Methods*** 30 SD rats at 12.5 d of pregnance were randomly divided into three groups: low-dose group (300 mg/kg VPA was injected into abdominal cavity), high-dose group (600 mg/kg VPA); control group (normal saline). The offspring of low-dose groupe were grouped as VPA-low-dose; the offspring of high-dose groupe were grouped as VPA-high-dose; and the offspring of control group were grouped as control group. Then, we tested the liver and neurological function of each group of offspring, respectively, and analyzed their relevance. ***Results*** The levels of serum total protein and albumin of the high-dose group were considerably lower than these of the low-dose group which were significantly lower than these of control group ($P<0.01$ for both total protein and albumin); the levels of ALT, AST and blood ammonia of the high dose group were drastically higher than these of the low dose group, which were dramatically higher than these of control group ($P<0.01$). The duration and of stereotyped movement disorder in experimental group was markedly longer than this of the control group, while this of the high-dose group was notably longer than this of the low-dose group ($P<0.01$); the frequency of the stereotyped movement disorder of experimental group was significantly more than this of the control group, while this of high-dose group was obviously more than this of the control group ($P<0.01$). In the Morris water maze, the escape latency of the high-dose group was remarkably longer than this of low-dose group, which was observably longer than this of control group ($P<0.01$); the swimming distance of the high-dose group was tremendously shorter than this of low-dose group, which was considerably shorter than this of control group ($P<0.05$, $P<0.01$). Correlation analysis of liver function and neural behavior showed that the neurobehavioral abnormalities were negatively correlated with level of total protein and albumin, and were positively related with the level of blood ammonia, ALT and AST ($P<0.01$). ***Conclusion*** The VPA exposure in the second trimester leads to the decrement of serum albumin and total protein and to the increment of AIL, AST and blood ammonia; and it also causes the neurobehavioral abnormalities of offspring. The reduction of synthesis of liver albumin and the rise of ALT, AST and blood ammonia can influence the neurobehavioral abnormalities. And there were both of the factors which result in the neurobehavioral abnormalities of offspring exposured to VPA in the second trimester.

Key words sodium valproate; exposure during pregnancy; rats`offspring; liver damage; blood ammonia; neurobehavior