文章编号:1000-5404(2006)24-2437-03

论著

孕期和生后维生素A缺乏及干预对幼鼠胫骨生长的影响

刘 星[1],李廷玉[2],张德文[1],毛春婷[2] (重庆医科大学儿童医院:[1]骨科,[2]儿童营养研究所,重庆 400014)

提 要:目的 探讨孕期和生后维生素A缺乏(vitamin A deficiency, VAD)及其补充对幼鼠长骨发育的影响。**方法** 健康成年雌性Wistar大鼠18只,分为5组。实验组母鼠及其仔鼠饲含维生素A 400 IU/kg、对照组及干预组于不同干预时间点改饲6 500 IU/kg饲料,实验持续至生后7周龄。各组子代鼠分别于生后0 d、4、7周分3批处死后称体质量、测胫骨长度,取血及骨样本待测,采用HPLC测血清维生素A水平、HE染色观测软骨组织形态学。**结果** ①VAD组幼鼠的血清维生素A与正常组比较在生后0 d、4周和7周显著降低($P<0.01$)。②VAD组幼鼠胫骨长度与正常组比较在生后0 d、4周和7周均明显变短($P<0.01$),至7周时,正常组与0 d补充组和胚补组比较无明显差别,而4周幼鼠干预组较正常组下降($P<0.05$),但仍长于VAD组($P<0.05$)。③VAD组骺板软骨细胞增殖和钙化受到抑制,结构层次紊乱,同源细胞明显减少,软骨细胞陷窝小,核分裂象少且多幼稚。**结论** 维生素A缺乏对大鼠的软骨细胞发育有明显的影响,给予维生素A干预时间越早其纠正骨发育障碍的作用越有效。

关键词:维生素A缺乏;补充;骨骼发育
中图法分类号:R153.2;R322.71;R591.41 **文献标识码**:A

Effects of vitamin A deficiency and its supplementation on tibial growth in rats

LIU Xing[1], LI Ting-yu[2], ZHANG De-wen[1], MAO Chun-ting[2] ([1]Department of Orthopaedics, [2]Institute of Children Nutrition Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the effects of vitamin A deficiency (VAD) and its supplementation on the skeletal growth in rats. **Methods** Eighteen female Wistar rats were randomly divided into VAD (Vit A 400 IU/kg diet, $n=3$), supplement ($n=9$) and control groups (normal diet Vit A 6 500 IU/kg, $n=6$). The supplement groups were randomly divided into 3 sub-groups, and their diet was changed to Vit A 6 500 IU/kg diet from 14 d after pregnancy, 0 d and 4 weeks after birth respectively until they were 7 weeks age old. When they were 0 day, 4 and 7 weeks old, their body weight, the length of the tibia, serum Vit A level were measured, and the histology of growth plate was also observed. **Results** At every measuring times, the serum Vit A level was significantly lower, and the tibial length was shorter in VAD group than in the control ($P<0.01$). For the tibial length, the pregnant and 0 d subgroups had kept up with the control until 7 weeks old, but that of the 4 weeks subgroup was still shorter than the control ($P<0.05$), while longer than that of the VAD groups ($P<0.05$). The histology of epiphyseal plate of the rats in VAD group showed disordered structure, and inhibited cartilage cell proliferation and calcification, with obviously reduced cell number, lesser and immature karyokinesis. **Conclusion** VAD has profound effect on the development of cartilage cells, and the earlier the supplement begins the more effective it will be.

Key words: vitamin A deficiency; supplement; skeletal development

维生素A缺乏(vitamin A deficiency, VAD)是世界范围内、尤其是发展中国家最常见的三大微量营养素缺乏病之一,孕妇、乳母和儿童是最容易发生VAD的人群。重庆郊县调查发现孕妇VAD患病率达17.0%,亚临床VAD患病率达33.3%。2000年全国普查6岁以下儿童,维生素A缺乏患病率为11.7%,亚临床VAD患病率39.2%[1],严重地危害儿童身心健康。动物实验表明VAD对大鼠长骨生长板软骨细胞发育有重要影响[2],不同年龄补充维生素A(vitamin A, VA)对长骨生长恢复的影响尚少见报道。为此,本研究观察从怀孕到生后7周龄VA干预对VAD幼鼠胫骨生长发育的影响,为早期干预VAD伴身材矮小提

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471462)
Supported by National Natural Science Foundation of China(30471462)
作者简介:刘 星(1971-),男,四川省渠县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事小儿创伤与矫形方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)63632756-3615,E-mail:liuxingda@21cn.com
收稿日期:2005-11-16;**修回日期**:2006-04-08

供理论依据。

1 材料与方法

1.1 VAD 母鼠及幼鼠模型的建立

1.1.1 动物分组 健康成年雌性 Wistar 大鼠 18 只,体质量 260～300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,分为 5 组:缺乏组(VAD)3 只、补充组 9 只(按 VA 干预开始时间不同分为胚补组 3 只:胚胎 14 d 开始干预;0 d 补充组 3 只:刚出生就开始干预;4 周补充组 3 只:生后 4 周开始干预)和正常对照组 6 只。以健康成年雄性 Wistar 大鼠作为交配雄鼠。

1.1.2 动物饲料 配方同常用方法[3],其中缺乏组饲料含 VA 400 IU/kg,正常组饲料含 VA 6 500 IU/kg。

1.1.3 实验动物的饲养 雌鼠于受孕前 3 周开始分别饲以正常组和缺乏组实验饲料,正常组和缺乏组仔鼠生后 3 周断乳后饲料同其母鼠至 7 周;干预组中胚补组从孕 14 d 的孕鼠、0 d 组刚生产的母鼠开始喂正常组饲料,其仔断乳后喂正常组饲料;而 4 周组则一直缺乏 VA 到生后 4 周的幼鼠才喂正常组饲料,交配用雄鼠饲以动物实验中心提供的普通饲料。正常组每只母鼠产仔 11～19 只,缺乏组为 3～13 只,为了减少实验误差,淘汰了产仔太多(大于 15 只)和太少(少于 10 只)的实验鼠。食量控制为对照组前 1 d 平均进食量,5 组大鼠均自由饮用蒸馏水。动物房温度控制在 19～25 ℃,湿度 55%～65%,光照 10～12 h/d。

1.2 实验方法

1.2.1 观察指标 模型建立过程中观察雌鼠和幼鼠有无维生素 A 缺乏体征及出现时间,进食量及行为有无改变,雌鼠产仔数量,幼鼠生长发育情况。

1.2.2 新生鼠及幼鼠的处死时间和体重测定 各组鼠分别在出生后 0 d、4 周和 7 周分 3 批处死,其中 0 d 时每组处死 12 只幼鼠,4 周和 7 周时每组有 15 只幼鼠。用 TN 型托盘式扭力天平称体质量,精确到 0.1 g。

1.2.3 新生鼠及幼鼠血清 VA 含量测定 新生鼠于出生后 24 h 内采用心内取血或幼鼠断头取颈动脉血采用高效液相色谱法(高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;全反式视黄醇标准品,美国 Sigma 公司);条件:流动相组份甲醇:水 = 90:10(体积分数),检测波长 313 nm,流速 1.4 ml/min,保留时间 3.8 min。计算公式:(峰面积 × 4.425 440 093 × 0.001 + 6.519)/286.4 × 2 = VA 含量(μmol/L)。

1.2.4 胫骨长度测定 解剖出包括干骺端的完整胫骨后,用小分规卡住胫骨远、近端,再用游标卡尺测量小分规两尖端之间的距离,即为胫骨的长度,精确到 0.1 mm。

1.2.5 组织形态学 每组大鼠右侧胫骨近端干骺端在出生后 0 d、4 周和 7 周时常规 HE 染色,光镜下观察生长板细胞的增殖、分化情况。

1.3 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行两组间比较 t 检验,多组间两两比较 q 检验。

2 结果

2.1 VAD 母鼠及幼鼠模型建立情况

VAD 母鼠出现食欲下降,产仔数减少(正常组每只母鼠产仔 11～19 只,缺乏组为 3～13 只),还有吃子等异常行为。幼鼠出生后各时间点血清 VA 均明显低于对照组(表 1),且体格发育明显落后于对照组,尤其是断乳后 VAD 组幼鼠还出现了眼结膜、角膜干燥、感染和黏稠分泌物等维生素 A 缺乏的体征并出现先兴奋、易激惹,后淡漠、活动减少等行为改变。

2.2 不同时期幼鼠血清 VA 水平

在生后 0 d 时,胚补组和缺乏组均较正常组显著降低($P < 0.01$);在生后 4 周时,正常组、胚补组、0 d 组和缺乏组中除胚补组与 0 d 组间无显著差异($P > 0.05$),其余各组间均有显著差异($P < 0.01$);在生后 7 周时,仅正常组和胚补组间无显著差异($P > 0.05$),其余各组间(正常组、胚补组分别与 0 d 补充组、4 周组和缺乏组;0 d 组与 4 周组和缺乏组;4 周组与缺乏组)均有显著差异($P < 0.01$)。如 VAD 幼鼠的血清 VA 与正常组比较在生后 0 d(0.472/0.865)、4 周(0.446/1.074)和 7 周(0.233/1.111)显著降低($P < 0.01$)。

2.3 不同时期幼鼠体质量

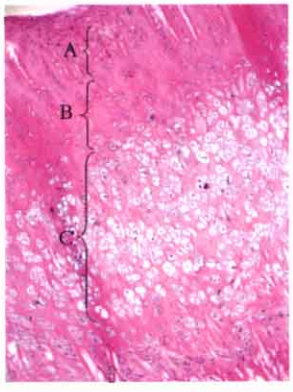
生后 0 d 时,正常组幼鼠体质量与胚补组(6.06/5.80)和缺乏组(6.06/5.81)差异不明显($P > 0.05$);生后 4 周时,正常组与胚补组(72.86/71.42)无显著性差异($P > 0.05$),与缺乏组(72.86/64.27)和 0 d 组(72.86/67.23)均显著差异($P < 0.01$);生后 7 周时,正常组与胚补组(128.21/126.44)和 0 d 组(128.21/126.02)间无显著差异($P > 0.05$),与缺乏组(128.21/103.37)和 4 周组(128.21/110.23)均显著差异($P < 0.01$)。

2.4 不同时期幼鼠胫骨长度

VAD 组幼鼠胫骨长度与正常组比较在生后 0 d(8.21/11.50)、4 周(20.29/25.25)和 7 周(28.02/34.32)均明显变短($P < 0.01$);生后 0 d 时,胚补组和缺乏组均小于正常组($P < 0.01$);生后 4 周时,胚补组、0 d 补充组和缺乏组各组均明显小于正常组($P < 0.01$);至 7 周时,正常组与 0 d 补充组(34.32/32.85)和胚补组(34.32/33.24)比较无明显差别($P > 0.05$),而 4 周幼鼠干预组较正常组(30.47/34.32)下降($P < 0.01$),但仍长于 VAD 组(30.47/28.02)($P < 0.05$)。

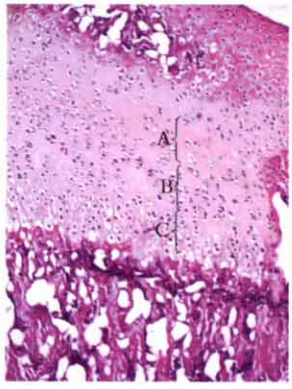
2.5 胫骨近端生长板细胞的增殖、分化情况

正常组与缺乏组、补充组间光镜下差异较大,见图 1、2。缺乏组增殖区变小,钙化不明显,静止区相对扩大;同源细胞数减少,结构紊乱,软骨陷窝小,软骨囊显示不清,软骨细胞发育不良,多幼稚,核分裂象少,可见骨髓纤维化,而补充组则有所改善。



A:肥大层; B:增殖层; C:静止层

图 1 缺乏组大鼠生后 4 周的生长板形态学观察 (HE × 100)



A：肥大层；B：增殖层；C：静止层

图 2　0 d 补充组大鼠生后 4 周的生长板形态学观察　（HE × 100）

3　讨论

亚临床维生素 A 缺乏的发病率较重度 VAD 高，且临床表现不典型，故易漏诊，危害性更大。本实验模拟人轻度缺乏情况，建立孕鼠轻度 VAD 模型，母鼠有食欲下降，产仔数减少，吃子等异常行为，但无角膜溃疡等典型 VAD 症状，与以前建立的亚临床 VAD 母鼠模型一致[3]，说明孕鼠亚临床 VAD 模型建立成功。其幼鼠出生后各时间点血清 VA 均明显低于正常，体格发育明显落后，甚至出现眼结膜、角膜干燥、感染和黏稠分泌物等维生素 A 缺乏的体征，一并出现先兴奋、易激惹、后淡漠，活动减少等行为改变，与以前建立的 VAD 模型符合[2]，提示 VAD 幼鼠模型建立成功。

VAD 幼鼠随着缺乏时间延长其 VA 水平进一步下降，不同时期开始 VA 干预幼鼠使 VA 血清水平上升的幅度亦不同。生后 7 周时仅胚补组能追赶上正常水平，而 0 d 组和 4 周组与正常组仍有差异，说明越早补充 VA，VA 水平越可能达到正常。以上结果提示每日膳食摄入标准量补充 VAD 恢复慢，与临床观察 VA 强化饼干干预 VAD 人群试验的结果一致[4]。本研究表明亚临床 VAD 母鼠所生后代于初生时体质量可在正常范围，我们认为这可能与 VAD 组母鼠产子数减少，使仔鼠体质量相应增加有关。但生后 4 周时即显落后，与徐宏伟等[5]研究幼鼠从生后 3 周开始完全缺乏 VA 90 d 的结果一致，但他们未进行补充实验。

维生素 A 在细胞分化和成熟中起着重要的作用，从而可调节生长，人们已对此做了大量研究。维生素 A 缺乏对骨发育的影响研究较早，而人群干预实验结果却很不一致。如 Tarwotjo 等[6]人群短期干预试验观察到上臂围和体质量的增加，而身高增加不明显；Hadi 等[7]用 VA 强化食品人群干预试验 1 年显示身高明显增加。本实验结果显示 VAD 幼鼠在初生期胫骨长度即明显落后，提示 VAD 对胫骨长度的影响比体质量更敏感。刘恭平等[8]研究发现交配后第 7 天开始补充 VA，新生鼠的身长和尾长仍低于正常值，与本结果吻合。本实验结果还显示 VA 补充干预的时间越早，越能使胫骨长度接近正常。给予孕鼠或生后即补充 VA 者，至 7 周时已达正常范围，而生后 4 周才开始补充 VA 者，则不能达到正常水平。因此我们认为早期发现婴幼儿 VAD 并及时补充 VA 甚为重要。

骨的生长包括增长和增粗，前者主要为软骨化骨形成，后者为骨膜化骨。长骨的生长主要是在骨干两端的干骺端和骨骺间的软骨骺板中进行。骺板由生长带（包括静止细胞层和增殖细胞层）、软骨成熟带和软骨变形带组成。随着软骨细胞的钙化，干骺端血管长入，凋亡的软骨细胞被吞噬。同时成骨细胞进入，分泌碱性磷酸酶，使矿盐沉着于基质出现骨化。本研究观察到生长板组织形态学的显著差异，而有研究表明 VA 缺乏与生长板有关[9]，我们推测 VA 缺乏可能是通过抑制生长板软骨细胞的增殖、分化而使其处于静止期，从而影响长骨的增长或身高的增高。

综上所述，VAD 对胚胎及幼年期大鼠骨骼的发育有明显影响。母代缺乏维生素 A，其子代只要及早（相当于婴幼儿期）有效补充维生素 A，则其骨增长可能最终不受影响；若补充不足或补充时间太晚则其长骨增长将会受到影响，但仍较不补充者为好。

参考文献：

[1] 谈藏文，马官福，林良明，等. 中国儿童亚临床维生素 A 缺乏患病率及其影响因素[J]. 中华预学医学杂志，2002，36(3)：161－163.

[2] 李廷玉，刘　渝，姜　蓉，等. 维生素缺乏与生长障碍[J]. 中华儿童保健杂志，1996，4：49－53.

[3] 陈丽娜，李廷玉，瞿　平，等. 维生素 A 缺乏对初生大鼠脑发育的影响[J]. 营养学报，2002，24(4)：363－367.

[4] 练雪梅，李廷玉，瞿　平，等. 每周补充维生素 A 及每周补铁对学龄前儿童贫血的干预试验[J]. 中国儿童保健杂志，2002，10(6)：368－370.

[5] 徐宏伟，刘　颖，马爱国. 维生素 A 缺乏对大鼠体格生长及生殖器官发育的影响[J]. 青岛大学医学院学报，2001，37(4)：306－308.

[6] TARWOTJO I，KATZ J，WEST K P Jr.，*et al*. Xerophthalmia and growth in preschool Indonesian children[J]. Am J Clin Nutr，1992，55(6)：1142－1146.

[7] HADI H，STOLTZFUS R J，DIBLEY M J，*et al*. Vitamin A supplementation selectively improves the linear growth of indonesian preschool children：results from a randomized controlled trial[J]. Am J Clin Nutr，2000，71(2)：507－513.

[8] 刘恭平，朱清华. 维生素 A 缺乏及补充对小鼠子代发育的影响[J]. 卫生毒理学杂志，2001，15(1)：17－19.

[9] DE-LUCA F，UYEDA J A，MERICQ V，*et al*. Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis[J]. Endocrinology，2000，141(1)：346－353.

（编辑　栾　嘉）