

# 大鼠在胚胎着床前用阿司匹林诱导的胚泡异常对胚泡着床后发育的影响\*

应 赢 蔡悦西 楼宜嘉

(浙江医科大学药学系药理教研室, 杭州 310006)

**摘要** 用胚胎移植技术, 研究大鼠着床前用阿司匹林(Asp)诱导的胚泡异常对胚泡着床能力和着床后胚胎发育的影响。妊娠大鼠 d 3 ig Asp 0.5 或 1.0 g·kg<sup>-1</sup> 使形态异常的胚泡率明显提高, 胚泡细胞数显著减少。形态正常的胚泡在假孕鼠中的着床率和活胎率随 Asp 剂量增加而减少, 而形态异常的胚泡着床后全部吸收。存活胎鼠经骨骼和内脏检查均未发现畸胎。以上结果提示, 大鼠胚胎着床前应用 Asp 诱导的胚泡异常对后期胚胎发育的影响主要表现为致死性损伤, 而不导致畸胎的产生。

**关键词** 阿司匹林; 胚泡; 发育毒性; 胚胎移植

文献报道<sup>[1,2]</sup>, 孕大鼠在胚泡着床前用阿司匹林(Asp)对胚泡有显著的毒性, 并对着床后胎仔有胚胎毒性和致畸作用, 两者间呈相关性。本实验拟通过胚胎移植生物技术, 研究 Asp 诱导的着床前胚泡异常对胚泡着床能力及着床后胚胎发育的影响。

## 材 料 和 方 法

**药品与动物** Asp 为山东新华制药厂产品。Sprague-Dawley 大鼠, ♀ 180~220 g; ♂ 220~250 g, 均由浙江医科大学实验动物中心提供。

**交配与给药方法** 大鼠经 10 d 适应饲养后, 按雄鼠:雌鼠 1:4 于下午 18 时合笼, 次晨 8 时作阴道涂片, 查到精子当天为妊娠 d 0。孕鼠于妊娠 d 3 上午 9 时 ig Asp 0.5 或 1.0 g·kg<sup>-1</sup>, 药物皆以 0.5% 羧甲基纤维素(CMC)胶浆配制。另设 ig 0.5% CMC 胶浆 5 ml·kg<sup>-1</sup> 作溶剂对照(相当于 Asp 组给药容量)。

**受胚鼠假孕模型的制备**<sup>[3]</sup> ♂ 鼠 ig 氯丙二醇 5 g·kg<sup>-1</sup>, 连续给药 8 d 后, 与♀鼠合笼, 于次日查到精子者为假孕 d 0, 作为受胚鼠供用。

**胚胎移植** 假孕鼠于 d 4 ip 戊巴比妥钠 30 mg·kg<sup>-1</sup> 麻醉, 卧位固定于手术板上, 背位腰椎正中处剪开 2 cm 的切口, 将皮拉向一侧腰窝凹陷处, 并在此处剪开 1 cm 小口, 暴露子宫角待用。同时将 d 4 妊娠供胚鼠颈椎脱臼处死, 以加 HEPES 缓冲液的胚胎培养液(M2)冲洗子宫两侧, 收集胚泡置于微型平皿上, 在低倍镜下分别收集形态正常与异常的胚泡。以直径 5~10 μm 的硬质玻璃管将胚泡植入两侧子宫角内, 缝合后每只受胚鼠单独分笼饲养。

本文于 1995 年 7 月 30 日收到。

\* 国家自然科学基金资助项目 No. 39470836

**胚泡检查**<sup>[1]</sup> 孕鼠于妊娠 d 4 处死, 收集胚泡于微型平皿中, 观察并记录胚泡形态后, 转入 0.7% 柠檬酸钠溶液中低渗处理 10 min, 最后将胚泡转移到玻片上, 滴加乙醇—冰醋酸 (3:1) 混合液固定, 干燥后 Giemsa (pH 7.4) 染色, 油镜下计数。

**移植胚胎在受胚鼠子宫内的发育观察** 受胚鼠于假孕 d 20 颈椎脱臼处死, 剖腹取出子宫检查, 记录移植胚胎着床数、吸收胚胎数和活胎数。活胎仔经称重和外观检查后分成两部分, 一半固定于 Bouin 氏液中作内脏检查, 另一半固定于 95% 乙醇中, 经 1% KOH 处理和茜素红染色后作骨骼检查。

## 结 果

### Asp 对着床前胚泡的作用

结果表明, Asp 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组中, 形态异常的胚泡率较对照组明显提高 ( $P < 0.01$ ), 胚泡细胞数显著减少 ( $P < 0.01$ )。但形态正常的胚泡细胞数与对照组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ )。Asp 1.0 g·kg<sup>-1</sup> 组胚泡形态异常率、形态正常和异常的胚泡细胞数与对照组比较均有显著差异 ( $P < 0.001$ ), 该剂量组胚泡微核率也显著升高 ( $P < 0.05$ )。另外, 用药组形态正常的胚泡细胞数与形态异常的胚泡细胞数比较也有显著差异 ( $P < 0.001$ )。见表 1。

Tab 1 Effects of aspirin given orally on day 3 of gestation on blastocysts in rats

Aspirin (g·kg <sup>-1</sup> )	No. of blastocysts		CNPB ( $\bar{x} \pm s$ )		FBAM (%)	FM (%)	
	BNM	BAM	BNM	BAM		BNM	BAM
0	82	6	41.5 ± 6.0	37.4 ± 5.4	6.8	7.3	8.6
0.5	61	19	40.3 ± 7.9	27.6 ± 6.8**	23.8**	8.6	12.1
1.0	29	20	35.8 ± 6.6***	28.1 ± 5.2***	40.8***	21.6*	19.0*

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs vehicle control; CNPB: Cell number per blastocyst; FBAM: Blastocysts with abnormal morphology/total blastocysts × 100; FM: Micronuclei/total nuclei × 1000; BNM: Blastocysts with normal morphology; BAM: Blastocysts with abnormal morphology.

### Asp 对胚泡着床能力的影响

Asp 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 组胚泡的着床率较对照组低, 但无显著差别 ( $P > 0.05$ ), 1.0 g·kg<sup>-1</sup> 组的着床率较对照组显著降低 ( $P < 0.001$ )。同一剂量组内, 形态异常胚泡的着床率比形态正常胚泡的着床率低, 且有显著差别 ( $P < 0.001$ ), 见表 2。

Tab 2 The rate of implantation in pseudopregnant recipients of day 4 embryos transferred from the rats treated with ig aspirin on day 3 of gestation

Aspirin (g·kg <sup>-1</sup> )	No. of embryos transferred			Rate of implantation (%)		
	BNM	BAM	total	BNM	BAM	total
0	82		82	80.5		80.5
0.5	83	17	100	85.5	29.4#	76.0
1.0	83	32	115	38.6*	21.9#	33.9*

\*  $P < 0.001$  vs vehicle control; #  $P < 0.001$  vs BNM.

### Asp 对着床后胚胎发育的影响

Asp 给药组形态正常的胚泡着床后吸收率随剂量增加而增加,但仅高剂量组与对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ ),形态异常的胚泡着床后胚胎全部被吸收。用药组中活胎率随 Asp 剂量增加而减少,但与对照组比较均无显著差异( $P > 0.05$ ),见表3。

**Tab 3 The rate of embryo resorptions and live fetuses in pseudopregnant recipients of day 4 embryos transferred from the rats treated with ig aspirin on day 3 of gestation**

Aspirin (g·kg <sup>-1</sup> )	No. of embryos transferred			Rate of embryo resorption(%)			Rate of live fetuses(%)
	BNM	BAM	Total	BNM	BAM	Total	
0	82		82	54.5		54.5	43.9
0.5	83	17	100	57.7	100	59.2	38.2
1.0	83	32	115	68.8	100	74.4*	25.6

\* $P < 0.05$  vs vehicle control.

胎仔经外观、骨骼和内脏检查除 Asp 0.5 g·kg<sup>-1</sup>组两只胎仔皮下有出血点外,其余胎仔均无异常发现。

## 讨 论

哺乳动物发育的器官形成前期历来被认为是诱发实验性先天畸形的不敏感期<sup>[4]</sup>。Austin 认为,致畸因子对着床前胚胎的作用取决于胚胎细胞被杀伤的程度,高于某水平时,胚胎死亡,否则胚胎细胞可继续增殖,取代被杀伤的细胞,对以后的发育几乎无影响,即“全或无”模式<sup>[5]</sup>。但近年来许多研究表明,哺乳动物着床前胚胎接触某些化学物质或环境因子后可导致着床后胚胎发育异常<sup>[6]</sup>。本实验室曾报道<sup>[1,2]</sup>,孕大鼠在胚泡着床前用 Asp 可导致胚泡细胞数呈剂量依赖性减少,胚泡形态异常率和胚泡微核率呈剂量相关性增加;另外还发现,孕鼠在胚泡着床前用 Asp 可导致胚胎着床后发育毒性,并出现畸胎。提示药源性着床前胚泡异常与着床后胚胎发育毒性可能有内在联系。但以上结果不能排除药物通过母体间接影响后期胚胎发育的可能性。

本研究用胚胎移植生物技术,进一步探讨大鼠着床前用 Asp 所致胚胎着床后发育异常的机制,并观察了 Asp 诱导的形态正常和异常胚泡的细胞数及两者着床后的发育差异。结果表明,Asp 不仅使大鼠着床前胚胎胚泡化延缓,且明显抑制胚胎细胞分裂,尤其形态异常的胚泡细胞数较对照组显著减少。形态异常和正常的胚泡着床后的命运也不同,前者着床率较后者明显减少,且着床后全部吸收。另外,用药组中,形态正常的胚泡其着床率随 Asp 剂量的增加而减少,而吸收胎随 Asp 的剂量增加而增加。该结果提示胚泡在亲代体内与不同剂量的 Asp 接触后,在受胚鼠子宫内发育的能力与着床前药源性损伤的程度有关,还提示同为形态正常的胚泡,其内部损伤的程度也有差异。着床前胚泡遗传物质受损可能影响胚胎着床后基因的表达,从而导致胚胎发育异常,但较严重的染色体损伤往往导致胚胎着床后吸收<sup>[6]</sup>。本研究发现,阿司匹林引起大鼠胚泡微核率升高可能与着床后胚胎吸收增加有关。

本实验还发现,用药组中形态正常的胚泡在受胚鼠中着床后,尽管活胎率较对照组有所减少,但存活胎鼠均未出现畸胎。该结果提示,大鼠在着床前用 Asp 引起的胎鼠畸形,可能并非 Asp 对胚泡的直接损伤所致。Asp 在大鼠胚胎器官形成期用药有致畸作用。尽管本研究中 Asp

在大鼠孕 d 3 用药,但大剂量时其按零级动力学代谢,  $T_{1/2}$  可长达 30 h 以上。因此, Asp 仍有可能滞留体内而影响着床后胚胎的发育,但也不能排除 Asp 造成母体损伤对后期胚胎发育影响的可能性。

### 参 考 文 献

- 1 应赢,楼宜嘉. 大鼠在胚泡着床前应用阿司匹林与醋氨酚对胚泡及胎仔发育的影响. 中国药理学报, 1993, 14:369
- 2 楼宜嘉,应赢,吴飞文等. 阿司匹林—对乙酰氨基酚和布洛芬对整体大鼠着床前胚泡的微核诱导作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1993,7:297
- 3 应赢,楼宜嘉,王立明. 胚胎移植生物技术中假孕模型制备的优化. 浙江省药理学学会年会论文汇编. 1995: 15~16
- 4 Wilson JG. Current status of teratology. In: Wilson JG *et al*, eds. *Handbook of Teratology*. Vol 1. *General Principles and Technology*. New York and London: Plenum Press, 1977:47~74
- 5 Austin CR. Embryo transfer and sensitivity to teratogenesis. *Nature*, 1973,244:333
- 6 应赢,楼宜嘉. 哺乳动物胚胎着床前染毒对胚胎发育影响的研究概况. 癌变·畸变·突变, 1994,6:49

## EFFECTS OF BLASTOCYST DEFICIENCIES INDUCED BY ASPIRIN TREATMENT DURING PREIMPLANTATION PERIOD IN RATS ON DEVELOPMENT OF EMBRYOS AFTER IMPLANTATION

Y Ying, YX Cai and YJ Lou

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006)

**ABSTRACT** Pregnant rats were treated orally with aspirin 0.5 or 1.0 g·kg<sup>-1</sup> on d 3 (positive vaginal smear was considered as d 0) and were sacrificed on d 4. Some blastocysts collected on d 4 were evaluated for gross morphology and cell number, and the remainings were transferred into pseudopregnant rats. Results showed that the rate of blastocysts with abnormal morphology were 23.8% and 40.8%, respectively, in 0.5 and 1.0 g·kg<sup>-1</sup> of aspirin. These were significantly higher than 6.8% of the control group. The cell number of blastocysts also decreased in the aspirin groups. The rate of implantation and live fetuses in the case of blastocysts with normal morphology were related negatively with the aspirin doses, especially in the group of 1.0 g·kg<sup>-1</sup> of aspirin, the implantation rate was significantly lower (38.6%). However, the implantation rate of blastocysts with abnormal morphology in both groups of aspirin were much less than that of the control group, and all embryos after implantation were resorped. No significant malformations were observed in the live fetuses. These results suggest that the effects of blastocyst deficiencies induced by aspirin on development of embryos transferred into pseudopregnant rats mainly caused death of embryos, but not malformation of fetuses.

**Key words** Aspirin; Blastocyst; Developmental toxicity; Embryo transfer