

## RTX 诱导神经管畸形动物模型的建立及机制研究

王 莉<sup>1</sup>,董艳婷<sup>1</sup>,丁晓琛<sup>1</sup>,牛玉虎<sup>1</sup>,牛 勃<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>山西医科大学基础医学院,山西 太原 030001;<sup>2</sup>首都儿科研究所儿童发育营养组学北京市重点实验室,北京 100020)

**[摘要]** 目的:通过胸苷酸合成酶(thymidylate synthase,TS)特异性抑制剂——雷替曲塞(RTX)干预孕鼠,建立小鼠神经管畸形(neural tube defects,NTDs)模型,探讨细胞凋亡和增殖、DNA损伤在RTX诱导的NTDs发生中的作用。方法:将孕7.5 d C57BL/6J小鼠随机分为6组;1组为对照组,5组为RTX干预组。对照组腹腔注射0.9%NaCl,RTX干预组分别腹腔注射不同剂量的RTX(5.0、10.0、11.5、13.5、15.0 mg/kg),孕11.5 d取胚胎并观察其发育情况。苏木精-伊红(HE)染色观察神经管闭合情况,放射性法测定TS活性,高效液相色谱检测胸苷酸(dTMP)及尿苷酸(dUMP)含量,Western blot分析复制蛋白A2(RPA2)、 $\gamma$ -H2AX和caspase-3表达,免疫组化检测细胞增殖。结果:RTX注射剂量为11.5 mg/kg时,NTDs发生率最高(30.56%);RTX干预后,TS活性较对照组显著降低,dUMP含量显著升高,dTMP含量显著下降;RTX建立的NTDs模型中,RPA2和 $\gamma$ -H2AX磷酸化水平显著升高;caspase-3表达量显著增加,细胞增殖显著减少。结论:通过RTX干预孕鼠可建立小鼠NTDs模型,dTMP合成障碍导致DNA损伤、细胞凋亡与增殖失调可能是NTDs发生的重要机制。

**[关键词]** 神经管畸形;胸苷酸合成酶;雷替曲塞;DNA损伤;细胞凋亡与增殖

**[中图分类号]** Q132.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)04-420-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160408

## Establishment of animal model of neural tube defects induced by RTX and the mechanisms study

Wang Li<sup>1</sup>, Dong Yanting<sup>1</sup>, Ding Xiaochen<sup>1</sup>, Niu Yuhu<sup>1</sup>, Niu Bo<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001;<sup>2</sup>Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a murine model of neural tube defects (NTDs) by inhibition of thymidylate synthase (TS) via a specific inhibitor, raltitrexed(RTX). Based on the model, The role of DNA damage, cell apoptosis and proliferation in RTX-induced NTDs were investigated. **Methods:** The adult C57BL/6J pregnant of 7.5 d mice were randomly divided into six groups: one was for control and the other five were RTX-treated groups. NTDs were induced by intraperitoneally injection of various doses of RTX(5.0, 10.0, 11.5, 13.5, 15.0 mg/kg body weight) on gestational day 7.5. Control mice were injected with 0.9% NaCl at equal volume. Neural tube closure was examined by hematoxylin-eosin (H&E) staining on gestational day 11.5 and TS activity was measured by radioactive method following RTX treatment. Levels of thymidylate (dTMP) and uridylate (dUMP) were detected by high performance liquid chromatography(HPLC). Western-blotting was performed to analyze the expressions of replication protein A2 (RPA2),  $\gamma$ -H2AX and caspase-3 in NTDs embryos induced by RTX. Cell proliferation was analyzed by immunohistochemical method. **Results:** At 11.5 mg/kg bw, RTX induced the highest incidence of NTDs(30.56%). TS activity was significantly reduced by RTX treatment. Besides, levels of dUMP were increased associated with decreased dTMP levels after RTX treatment. Furthermore, phosphorylation of RPA2 and  $\gamma$ -H2AX were significantly increased in RTX-induced NTDs. The expression of caspase-3 was significantly increased and cell proliferation was significantly decreased. **Conclusion:** Murine model of NTDs was successfully established by inhibition of TS via RTX. DNA damage and imbalance between apoptosis and proliferation were important events caused by impairment of dTMP biosynthesis, which may be one of the key mechanisms underlying the development of NTDs.

**[Key words]** neural tube defects; thymidylate synthase; raltitrexed; DNA damage; cell apoptosis and proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04):420-425]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81370312)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:niub2004@126.com

研究表明,叶酸缺乏与神经管畸形(neural tube defects,NTDs)密切相关<sup>[1-2]</sup>。怀孕期间补充叶酸,可使 NTDs 发生率降低 50%~70%<sup>[3]</sup>。然而,叶酸缺乏引起 NTDs 的具体机制尚未完全阐明,主要原因之一是通过饮食控制叶酸引起 NTDs 的动物模型尚未成功建立。叶酸在体内作为一碳单位代谢(one-carbon metabolism,OCM)的载体,参与胸腺嘧啶和嘌呤核苷酸的从头合成。因此,叶酸缺乏可能通过造成 OCM 代谢障碍,引起单核苷酸合成受损,导致 DNA 的合成、修复、基因表达及调控异常,引起 NTDs<sup>[4-6]</sup>。胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)合成是叶酸相关代谢途径中合成 DNA 的关键环节,该途径障碍可能是叶酸缺乏引起 NTDs 的重要机制之一<sup>[7-9]</sup>。胸苷酸合成酶(thymidylate synthase,TS)是催化尿苷酸(dUMP)生成胸苷酸(dTMP)的关键酶。本研究通过 TS 特异性抑制剂——雷替曲塞(RTX)作用于孕 7.5 d 小鼠,建立小鼠 NTDs 模型;在此模型基础上,探讨了 DNA 损伤、细胞凋亡和增殖在 NTDs 发生中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康的 7~8 周 SPF 级成年 C57BL/6J 小鼠,体重为 19~20 g (北京维通利华实验动物中心)。RTX (Sigma-Aldrich 公司,美国),CellLytic MT™ 细胞裂解液 (Sigma 公司,美国),磷酸化的复制蛋白 A2 (RPA2)抗体、兔抗小鼠  $\gamma$ -H2AX 抗体、兔抗 PH3 抗体 (Ser10,细胞有丝分裂的标记物)、山羊抗兔二抗 (Cell Signaling Technology 公司,美国),抗原修复液 (pH6.0,格洛卓卓普 Dako 公司,丹麦);液体闪烁光谱仪 LS 6500(贝克曼公司,美国)

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的建立

成年 C57BL/6J 小鼠饲养条件为 22℃,12 h 光照/d。雌雄小鼠合笼过夜,并在第 2 天早 8:00 检查雌鼠阴栓,有阴栓者确定为孕 0.5 d。将孕鼠随机分成 6 组,每组 10 只。RTX 溶解在 0.9%NaCl 中。妊娠 7.5 d 时,5 组 RTX 干预组小鼠腹腔注射不同剂量的 RTX(5.0、10.0、11.5、13.5、15.0 mg/kg)。同时,对照组腹腔注射同等体积的 0.9%NaCl。孕 11.5 d 时,脱颈处死孕鼠,进行解剖。在解剖显微镜下观察胚胎发育情况并记录。部分 NTDs 胚胎用 10%中性福尔马林缓冲液固定,进行脑部连续切片,HE 染色,观察神经管闭合情况。

#### 1.2.2 TS 活性测定

通过检测 TS 将 dUMP 催化为 dTMP 生成氚标记水的量来确定 TS 活性。孕 7.5 d 小鼠注射 RTX 后不同时间点 (0、3、9、24、48、96 h) 收集对照组和 RTX 干预组的胚胎组织,在匀浆缓冲液中进行超声破碎,将匀浆超速离心(105 000×g,4℃,60 min)。上清液收集分装到 EP 管中。将 5-[<sup>3</sup>H]-dUMP(10  $\mu$ mol/L)、Tris-HCl 缓冲液、5,10-CH<sub>2</sub>-FH<sub>4</sub> 分别加入到各 EP 管中,30℃孵育 1 h。随后,加入冰 25%三氯乙酸(TCA)和 10%的中性活性炭,使反应停止。将样品离心,收集上清液,通过液体闪烁光谱仪测定其放射性。实验重复 3 次。

#### 1.2.3 高效液相色谱(HPLC)检测

孕 7.5 d 小鼠注射 RTX 后不同时间点(0、3、9、24、48、96 h)HPLC 检测胚胎组织中 dTMP 和 dUMP 含量。CO<sub>2</sub> 窒息法处死小鼠,原位冰冻固定胚胎。在冰上迅速分离胚胎组织。将冷冻的组织粉碎成匀浆,冰三氯醋酸孵育 20~30 min。将样品离心(3 000 g,10 min,4℃)并用氟利昂在三辛胺中中和。将上层液体收集到试管中进行 HPLC 检测。色谱柱为 Polaris C<sub>18</sub>-A 柱 (4.6×150 mm,5  $\mu$ mol/L;Agilent 公司,美国)。用梯度洗脱法对 dTMP 和 dUMP 进行洗脱以及量化分析。流动相包括缓冲液 A 和缓冲液 B[缓冲液 A 成分为水、10 mmol/L 四丁基氢氧化铵(TBAH)和 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;缓冲液 B 成分为甲醇(CH<sub>3</sub>OH)和 10 mmol/L 的 TBAH]。程序运行时间:0~27 min 为 95%~50%A,27.1~32.0 min 为 5%~95%A,流速 1.5 mL/min。检测在室温下进行,对洗脱的化合物进行吸光度测定,波长为 254 nm。

#### 1.2.4 Western blot 分析

将 CellLytic MT™ 细胞裂解液分别按比例加入对照组胚胎和 RTX 干预组 NTDs 胚胎脑组织(11.5 mg/kg)中研磨,离心 (20 000×g,10 min,4℃)。取上清,用 Bradford 法测定蛋白浓度。经过 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白质转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂奶粉在室温下孵育 1 h。分别加入磷酸化的 RPA2(1:500), $\gamma$ -H2AX(1:1 000)抗体(兔抗小鼠)孵育过夜,二抗(1:1 000)孵育 2 h。ECL 显色,并用软件分析蛋白表达情况, $\beta$ -actin 作为内参。

#### 1.2.5 免疫组化检测细胞增殖

免疫组化法检测孕 11.5 d 的对照组和 RTX (11.5 mg/kg) 干预组的胚胎神经上皮细胞 PH3 表达。用福尔马林固定和石蜡包埋的上述组织,按上述操作准备 5  $\mu$ m 切片。抗原修复液用于热激活抗原修复。一抗为兔抗 PH3 抗体(1:400),二抗为山

羊抗微生物素标记的抗体,光学显微镜观察结果。

### 1.3 统计学方法

所有数据用 SPSS16.0 统计学软件进行分析。TS 活性和 dTMP、dUMP 含量变化通过单因素方差分析 (ANOVA) 进行分析。两组之间均值比较采用 *t* 检验。所有数据表示为均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), *P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RTX 诱导神经管畸形动物模型的建立

本实验通过不同剂量 RTX (5.0、10.0、11.5、13.5、15.0 mg/kg 体重) 干预孕 7.5 d 小鼠, 建立 NTDs 模型。孕 7.5 d 是神经管形成的关键时期, 正常情况下孕 11.5 d 时神经管已完全闭合, 因此, 我们选择 11.5 d 观察胚胎发育情况。结果发现对照组

胚胎发育正常(图 1A)。RTX 干预后, 随 RTX 剂量增加, 吸收胎的比率增加。RTX 剂量为 15.0 mg/kg 时, 吸收胎的比率为 84.61%。但是, RTX 剂量从 10.0 mg/kg 增加到 13.5 mg/kg 时, NTDs 的发生率随 RTX 量的增加而增加。在 11.5 mg/kg, NTDs(图 1B)发生率最高(30.56%), 且吸收胎比率最低(表 1)。因此, 我们选择 11.5 mg/kg 作为建立小鼠 NTDs 模型的最佳剂量。本研究观察到 NTDs 小鼠主要表现为露脑畸形(后脑神经管闭合障碍), 偶见颅面部畸形(图 1C)和部分发育迟缓(图 1D)。

HE 染色结果显示, 对照组胚胎在后脑完全闭合, 并形成第四脑室(图 2A)。但是, NTDs 胚胎后脑未完全融合(图 2B), 与对照组相比 NTDs 胚胎的后脑神经上皮细胞排列不规整, 结构紊乱。

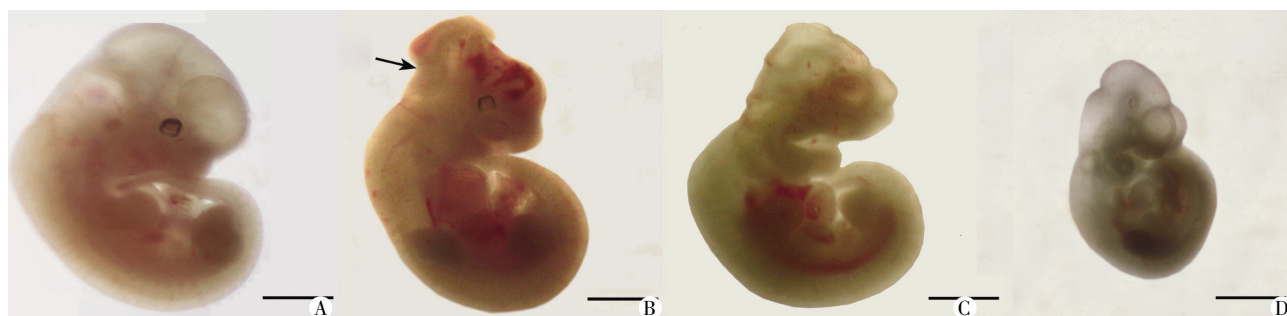
### 2.2 RTX 致 TS 活性降低

表 1 不同剂量 RTX 干预对小鼠胚胎发育影响

Table 1 Murine embryonic development following RTX treatment at various doses

RTX 剂量(mg/kg)	孕鼠个数(n)	胚胎数(n)	胚胎重吸收[n(%)]	发育迟缓[n(%)]*	NTDs[n(%)]	其他畸形[n(%)]	正常胚胎[n(%)]
0	8	59	1(1.70)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	58(98.30)
5.0	7	47	2(4.26)	2(4.26)	0(0.00)	0(0.00)	43(91.48)
10.0	6	40	12(30.00)	4(10.00)	3(7.50)	1(2.50)	20(50.00)
11.5	6	36	4(11.11)	17(47.22)	11(30.56)	2(5.56)	2(5.56)
13.5	5	31	19(61.29)	7(22.58)	5(16.13)	0(0.00)	0(0.00)
15.0	4	26	22(84.61)	3(11.54)	0(0.00)	1(3.85)	0(0.00)

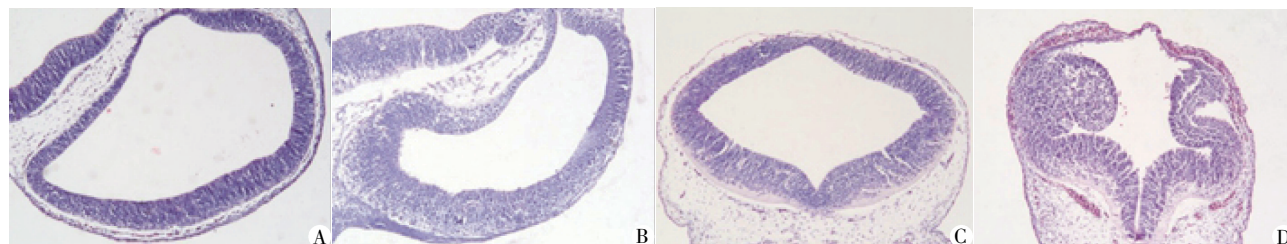
\*: 胚胎长度小于(4.21 ± 0.76)mm, 体重低于(9.49 ± 3.48)mg。



A: 正常胚胎; B: NTDs 胚胎, 箭头所指为露脑畸形部位; C: NTDs 伴随无眼畸形胚胎; D: 发育迟缓胚胎。比例尺为 1 mm。

图 1 正常胚胎和 RTX 引起的发育异常胚胎

Figure 1 Normal embryo and RTX-induced malformed embryos

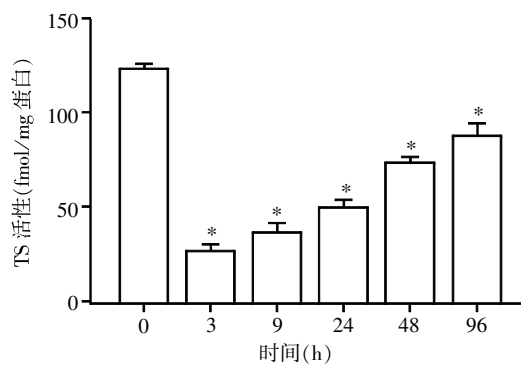


A: 正常小鼠胚胎前脑 HE 染色结果; B: NTDs 小鼠胚胎前脑 HE 染色结果; C: 正常小鼠胚胎后脑 HE 染色结果; D: NTDs 小鼠胚胎后脑 HE 染色结果(n=6)。

图 2 正常和 NTDs 胚胎神经管 HE 染色结果(×50)

Figure 2 HE staining results of neural tube in normal and NTDs embryos(×50)

腹腔注射 RTX(11.5 mg/kg)后,分别在 0、3、9、24、48、96 h 测定 TS 活性。结果表明,在 RTX 干预 3 h 后 TS 活性最低。随时间延长 TS 活性逐渐升高,96 h(孕 11.5 d)TS 活性仍显著低于对照组(图 3)。



与对照组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=6$ )。

图 3 RTX 对不同时间点胚胎组织 TS 活性的影响

Figure 3 Changes of TS activity in embryos at various time points following RTX treatment

### 2.3 RTX 对 dTMP 和 dUMP 的影响

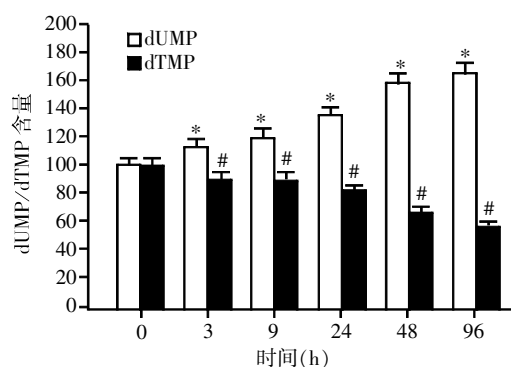
TS 是催化 dUMP 生成 dTMP 的关键酶。抑制 TS 活性会影响细胞内 dTMP 和 dUMP 的含量。在观察到 TS 活性降低的基础上,我们在注射 RTX 后不同时间点(3、9、24、48、96 h)对 dTMP 和 dUMP 的含量进行检测。结果显示,与对照组相比,RTX 干预组的胚胎随着给药时间的延长,dUMP 含量显著上升,同时 dTMP 含量显著下降( $P < 0.05$ )。在 96 h(孕 11.5 d),此变化最为明显,与对照组相比 RTX 干预组 dTMP 含量减少了将近 50%(图 4)。这些结果表明,RTX 显著抑制 TS 活性进而影响体内 dTMP 的含量。

### 2.4 RTX 导致神经管畸形胚胎中 DNA 损伤情况

复制蛋白 A(RPA)在 DNA 复制和修复中起重要的作用。RPA2 是 RPA 的一个亚基,当 DNA 损伤时,RPA2 发生磷酸化<sup>[10]</sup>。H2AX 是 H2A 的一个亚型,在 DNA 复制过程中发挥重要作用。当 DNA 损伤,尤其 DNA 双链断裂时,H2AX 发生高度的磷酸化而转化为  $\gamma$ -H2AX<sup>[11-12]</sup>。研究结果显示,经过 RTX 干预后孕 11.5 d 的 NTDs 胚胎组织中 RPA2 和  $\gamma$ -H2AX 磷酸化水平显著升高(图 5)。这表明 RTX 可能通过影响 dTMP 合成干扰 DNA 复制,造成 DNA 损伤。

### 2.5 NTDs 胚胎中细胞凋亡与增殖失衡检测

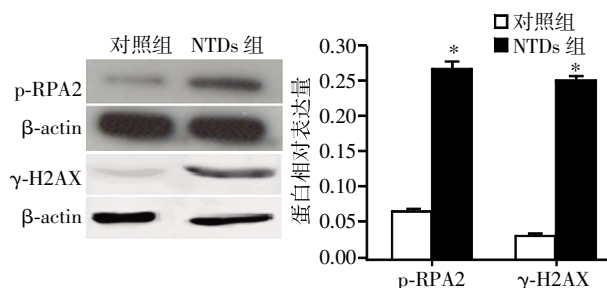
Caspase-3 是细胞凋亡的典型标记<sup>[13]</sup>。为了确定细胞凋亡在 RTX 诱导的神经管畸形中的作用,本研究进一步检测了 caspase-3 的表达情况,结果显示,在孕 11.5 d 的 NTDs 胚胎中,裂解的 caspase-3 表达量显著高于对照组(图 6)。此外,通过对 NTDs 胚胎



与对照组 dUMP 相比, \* $P < 0.05$ ; 与对照组 dTMP 相比, # $P < 0.05$  ( $n=6$ )。

图 4 RTX 对不同时间点胚胎组织 dTMP 和 dUMP 含量的影响

Figure 4 Levels of dTMP and dUMP in embryos treated by RTX at various time points



与对照组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=6$ )。

图 5 对照组胚胎和 RTX 干预组 NTDs 胚胎脑组织中 RPA2 和  $\gamma$ -H2AX 磷酸化水平变化

Figure 5 Expressions of phosphorylated RPA2 and  $\gamma$ -H2AX in embryonic brain tissues of control and RTX-induced NTDs



图 6 对照组胚胎和 RTX 干预组 NTDs 胚胎脑组织中 caspase-3 含量变化

Figure 6 Expression of cleaved caspase-3 in embryonic brain tissues of control and RTX-induced NTDs

磷酸化组蛋白 PH3 情况进行分析,结果显示,与对照组相比,NTDs 胚胎后脑神经上皮组织磷酸化组蛋白 PH3 的表达量显著下降,表明细胞增殖减少(图 7)。这些结果表明,RTX 诱导的 NTDs 中存在细胞凋亡和增殖的失衡。

## 3 讨论

在叶酸缺乏引起 NTDs 的研究中,如何建立一个合适的叶酸缺乏模型是一个巨大的挑战。叶酸作



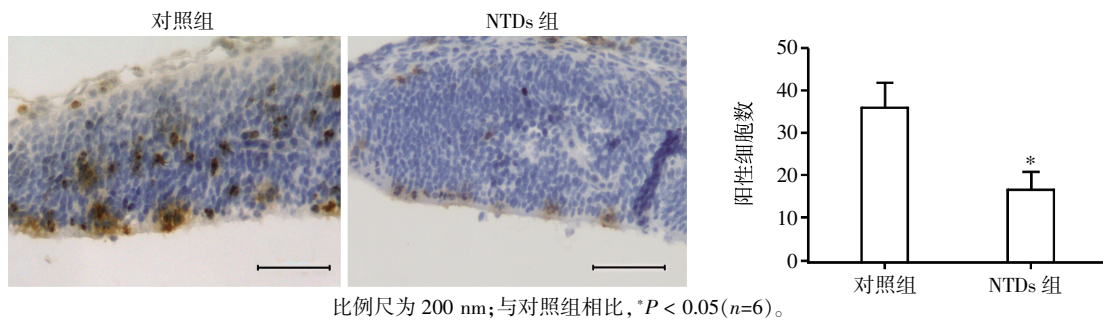


图 7 对照组胚胎和 RTX 干预组 NTDs 胚胎后脑神经上皮组织细胞 PH3 表达情况

Figure 7 Expression of PH3 in hindbrain of control and RTX-induced NTDs embryos

为一碳单位的载体参与一碳单位代谢,因此,叶酸缺乏实质为叶酸相关代谢障碍。本课题组前期研究中通过干扰叶酸代谢的关键酶二氢叶酸还原酶(DHFR)成功建立小鼠 NTDs<sup>[14]</sup>。然而,究竟叶酸缺乏通过哪条代谢途径障碍引起神经管发育异常,目前仍未完全阐明。dTMP 是叶酸相关代谢中与 DNA 合成相关的关键物质,TS 是催化 dTMP 生成的关键酶,本研究通过 TS 特异性抑制剂——RTX 抑制 TS 活性,成功建立 NTDs。结果表明,dTMP 代谢异常可能为叶酸缺乏引起 NTDs 的重要机制之一。孕 7.5 d 是神经管(尤其是后脑)闭合的关键时期,因此本研究选择孕 7.5 d 作为孕鼠干预的时间点<sup>[15]</sup>。

RTX 干预后引起 TS 活性降低,dTMP 水平下降以及 dUMP 含量增加,表明 RTX 通过抑制 TS 活性,影响 dTMP 的生物合成。以往研究表明,NTDs 与 dTMP 的合成受损密切相关<sup>[16-17]</sup>。dTMP 含量下降干扰 DNA 复制或诱导 DNA 损伤,从而导致 NTDs<sup>[18]</sup>。dTMP 合成障碍通过错掺入 DNA 的尿嘧啶影响 DNA 稳定性及 DNA 复制,从而影响神经管闭合<sup>[19]</sup>。此外,RPA2 的磷酸化是 DNA 复制叉停滞或 DNA 损伤时最早出现的反应之一。 $\gamma$ -H2AX 是 DNA 双链断裂的标记物<sup>[20]</sup>。RPA2 以及  $\gamma$ -H2AX 磷酸化水平的升高表明 dTMP 合成受损引起广泛的 DNA 损伤,进一步影响细胞增殖、凋亡,影响神经管的发育。在神经管形成过程中,需要细胞凋亡和细胞增殖维持动态平衡,如果这种平衡被打破,会导致神经管异常闭合,引发 NTDs<sup>[21]</sup>。本研究发现 NTDs 胚胎脑组织中,复制蛋白 RPA2 和  $\gamma$ -H2AX 磷酸化显著升高,细胞凋亡标记物 caspase-3 过表达,而细胞增殖标记物 PH3 表达下调,表明,RTX 诱导的 NTDs 中,存在 DNA 损伤及细胞增殖凋亡异常。

本研究通过 RTX 干预成功建立小鼠 NTDs 模型。表明 dTMP 合成障碍通过引起 DNA 损伤、细胞凋亡与增殖失衡,从而引起 NTDs。

#### [参考文献]

- [1] Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, et al. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects [J]. *Science*, 2013, 339 (6123): 1222-1224
- [2] Zhang HY, Luo GA, Liang QL, et al. Neural tube defects and disturbed maternal folate- and homocysteine-mediated one-carbon metabolism [J]. *Exp Neurol*, 2008, 212 (2): 515-521
- [3] 周卫卫, 奚旭阳. 叶酸预防神经管畸形的临床效果观察 [J]. *海峡药学*, 2012, 24(11): 151-152
- [4] Ulrich CM, Robien K, Sparks R. Pharmacogenetics and folate metabolism; a promising direction [J]. *Pharmacogenomics*, 2002, 3(3): 299-313
- [5] Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 11-20
- [6] Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism [J]. *Vitam Horm*, 2008, 79: 1-44
- [7] Beaudin AE, Abarinov EV, Noden DM, et al. Shmt1 and de novo thymidylate biosynthesis underlie folate-responsive neural tube defects in mice [J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93 (4): 789-798
- [8] Panetta JC, Paugh SW, Evans WE. Mathematical modeling of folate metabolism [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2013, 5(5): 603-613
- [9] Leung KY, De Castro SC, Savery D, et al. Nucleotide precursors prevent folic acid-resistant neural tube defects in the mouse [J]. *Brain*, 2013, 136(Pt 9): 2836-2841
- [10] Avallone A, Di Gennaro E, Silvestro L, et al. Targeting thymidylate synthase in colorectal cancer: critical re-evaluation and emerging therapeutic role of raltitrexed [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2014, 13(1): 113-129
- [11] Yang Z, Waldman AS, Wyatt MD. DNA damage and homologous recombination signaling induced by thymidylate deprivation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76 (8): 987-996

- [12] Liu Y, Parry JA, Chin A, et al. Soluble histone H2AX is induced by DNA replication stress and sensitizes cells to undergo apoptosis[J]. *Mol Cancer*, 2008, 7: 61
- [13] 董小欢, 吴建新. 神经管畸形的分子机制研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(7): 138-140
- [14] Zhao J, Guan T, Wang J, et al. Influence of the antifolate drug Methotrexate on the development of murine neural tube defects and genomic instability[J]. *J Appl Toxicol*, 2013, 33(9): 915-923
- [15] Grogan BC, Parker JB, Guminski AF, et al. Effect of the thymidylate synthase inhibitors on dUTP and TTP pool levels and the activities of DNA repair glycosylases on uracil and 5-fluorouracil in DNA[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(5): 618-627
- [16] Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. Dishevelled; linking convergent extension with neural tube closure[J]. *Trends Neurosci*, 2003, 26(9): 453-455
- [17] Fleming A, Copp AJ. Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects[J]. *Science*, 1998, 280(5372): 2107-2109
- [18] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage; implications for cancer and neuronal damage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(7): 3290-3295
- [19] Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1991, 14: 453-501
- [20] Weil M, Jacobson MD, Raff MC. Is programmed cell death required for neural tube closure? [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(4): 281-284
- [21] Copp AJ, Brook FA, Roberts HJ. A cell-type-specific abnormality of cell proliferation in mutant (curly tail) mouse embryos developing spinal neural tube defects[J]. *Development*, 1988, 104(2): 285-295

[收稿日期] 2015-08-28

## 连续性数据分组

连续性量值如速率、高度、时间、年龄等分组表示不科学的情形是很常见的。例如“年龄(岁)”数据分组为: 10 以下, 10~20, 20~30, …, 60~70, 70 以上。这是不准确、不科学的。这里其实涉及了极限数值的表示方法。GB/T 8170-2008 给出的下列允许用语和表示方式:

从 A 到 B       $A \sim B$ ,       $A \leq X \leq B$ ;

超过 A 到 B     $>A \sim B$ ,       $A < X \leq B$ ;

至少 A 不足 B     $A \sim < B$ ,       $A \leq X < B$ ;

超过 A 不足 B     $>A \sim < B$ ,       $A < X < B$ 。

上述关于年龄不科学的分组可作如下修改:

1. 如果 10 在第 2 组, 则表示为:

年龄(岁)  $<10, 10 \sim <20, 20 \sim <30, \dots, 60 \sim <70, \geq 70$ 。

2. 如果 10 在第 1 组, 则表示为:

年龄(岁)  $\leq 10, >10 \sim 20, >20 \sim 30, \dots, >60 \sim 70, >70$ 。