

维甲酸导致胎鼠肾积水的实验研究

张丽瑜¹ 夏慧敏¹ 余家康¹ 宿宝贵² 刘国昌¹

【摘要】 目的 诱导建立肾积水动物模型,探讨其病理学改变。 方法 用维甲酸建立胎鼠肾积水模型,观察肾盂输尿管连接部的形态和神经纤维的分布。 结果 模型组胎鼠肾积水的发生率为 63.63%,模型胎鼠肾盂输尿管连接部平滑肌排列紊乱,胶原纤维明显增多;S-100 在正常的胎鼠肾盂输尿管连接部组织中呈阳性反应,在肾积水模型组中表达明显减少或呈阴性反应。 结论 维甲酸制作的先天性肾积水动物模型的病理改变与人类先天性肾积水的病理改变相似,可以作为研究先天性肾积水的动物模型使用。

【关键词】 维甲酸/动物模型/肾积水

Experiment study for tretinoin leads to hydronephrosis of embryorats. ZHANG Li-yu, XIA Hui-min, YU Jia-kang, et al. Department of Surgery, Guangzhou City Children Hospital, Guangzhou, 510000, China.

【Abstract】 **Objective** To establish an hydronephrosis animal model induced with tretinoin in order to explore its pathological change. **Methods** We used tretinoin (vitamin A acid) induced hydronephrosis of embryorats to establish a animal model to observe the morphology of pyeloureter junctive zone and its distribution of nerve fibers. **Results** The hydronephrosis morbidity in model group was 63.63%. Arrangement of smooth muscles of embryorats showed more disorder collagen fibers obviously increased, S-100 protein of embryorats in the pyeloureter junctive zone was significantly decreased, even negative reaction in model group as compared with normal embryorats. **Conclusions** Animal model of hydronephrosis induced with tretinoin in embryorats have similar pathological changes with human congenital hydronephrosis, it could apply to study the congenital hydronephrosis in animal model.

【Key Words】 Biliary atresia; Hepatic fibrosis; Matrix metalloproteinase(MMP); Transforming growth factor beta 1(TGF- β_1)

先天性肾积水是小儿泌尿外科常见的先天性畸形,胎儿超声检查的发现率为 1/100 ~ 1/500。先天性肾积水的病因有多种,其中肾盂输尿管连接部梗阻(uretero pelvic junction obstruction, UPJO)是最常见的原因,占 85% ~ 90%以上^[1]。研究表明,肾积水的发生与肾盂输尿管的细胞形态及结构异常有关,但发生的具体原因尚不清楚。有专家认为可能与血管紧张素系统、转化生长因子、表皮生长因子、内皮素、神经钙蛋白、神经分布等有关^[2]。因此,建立与人类先天性肾积水病理改变相似的动物模型将有助于揭示 UPJO 的病因及其病理改变,进而预防本病的发生。研究显示,维甲酸类药物有较强的致畸性,对人及所有实验动物都可产生强的致畸作用^[3],可用作诱导建立动物学模型。本研究采用全

反式维甲酸诱导建立先天性肾积水动物模型,探讨肾盂输尿管连接部的形态和神经分布及与肾盂积水的关系。

材料与方法

一、模型的建立

选用体重 200 ~ 250 g 的健康雌性青春期大鼠,与雄鼠按 3:1 合笼,合笼后每天清晨固定时间做阴道涂片,于显微镜下查涂片上有无精子,以确定是否受孕,查到精子的当天确定为怀孕第 1 日。将孕鼠(n=5)随机分为 2 组,模型组(n=3)和对照组(n=2)。自孕期第 10 天起,模型组大鼠吸入乙醚麻醉,经胃管注入 125 mg/kg 全反式维甲酸;对照组给予相应剂量的橄榄油。于孕 21 d 剖宫取出胎鼠,处死,用 4% 福尔马林液浸泡固定 10 d。实验材料取自对照组和模型组胎鼠的肾盂输尿管连接部。

二、方法

肉眼及显微镜下观察模型组和对照组胎鼠的

作者单位:1,广州市儿童医院外科(510000);2,暨南大学医学院人体解剖教研室(510120)。E-mail:zhangliy222@126.com。本研究为 2006 年广州市卫生局科研立项项目,项目号:2006-YB-065。

性别、体重、肾、输尿管、膀胱。各器官畸形的诊断标准参照 Leck 等人的标准^[4,5]。用 HE 染色显示肾盂与输尿管连接部的组织学结构,用免疫组织化学方法显示 S-100(兔抗 S-100 抗体,北京中杉金桥生物公司产品)免疫阳性神经纤维的分布和计数数量,采用图像分析技术对图像进行分析。采用双盲法,以阳性对照和阴性对照片为标准,对比棕黄色神经纤维的分布和数量,棕黄色神经纤维数量一样多或接近者为(++),阳性神经纤维数量介于阳性对照与阴性对照之间者为(+),与阴性对照一样者为(-)。阳性对照采用正常大鼠的肾盂与输尿管接合部的标本,每个标本选取 3 个横切面(连接部及其上下各 1 个、输尿管末端及其上方各 1 个)进行观察计量。

三、统计学处理

采用秩和检验 Kruskal-Wallis Test 两两比较统计方法,并利用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

对照组孕鼠 2 只,获胎鼠 20 只,其中 5 只(25%)有肾积水(1 例右肾增大、右肾盂扩张,4 例肾盂扩张积水、肾盂输尿管连接部细小)。模型组孕鼠 3 只,获胎鼠 22 只,其中 16 只(72.73%)发现各类泌尿系畸形,包括 14 例肾积水,1 例马蹄肾,1 例肾发育不良。

一、HE 染色观察结果

对照组胎鼠肾盂输尿管连接部各层组织清晰,平滑肌层排列整齐、有序,管腔完整,移行上皮被覆;对照组胎鼠有肾积水者肾盂输尿管连接部肌层明显变薄,平滑肌排列紊乱,胶原纤维增多,管腔变窄;模型组胎鼠肾盂输尿管连接部肌层明显变薄,平滑肌排列紊乱,胶原纤维增多,管腔变窄。

二、免疫组织化学染色观察结果

对照组正常胎鼠肾盂输尿管连接部 10 个标本中,8 个为(++),2 个为(+),神经纤维数量基本正常;对照组肾积水胎鼠的肾盂输尿管连接部 5 个标本中,1 个为(+),4 个为(-),神经纤维的数量明显减少;模型组中,肾积水胎鼠的肾盂输尿管连接部 10 个标本中,3 个为(+),7 个为(-),神经纤维数量明显减少。

S-100 免疫反应阳性的神经纤维中,对照组胎鼠 10 例,模型组胎鼠 3 例。两组相比较, $P < 0.01$,

差异有显著统计学意义。

讨 论

目前有两种常用的动物可用来诱导建立肾积水动物模型,即兔模和鼠模。兔模是采用结扎输尿管造成梗阻,形成肾积水。这一方法成本较高,且与先天性输尿管梗阻有异,与人类先天性肾积水更不同。鼠模是采用大鼠建立动物模型的一种方法,一般是给孕鼠胃内注入除草酚,使胎鼠发生肾积水,其肾积水的畸形率为 76.6%^[5]。但是除草酚制造的胎鼠肾积水模型,其产生肾积水的机制是除草酚的利尿作用所致,与人类肾积水的发病原因是不相同的。而用维甲酸建立肾积水模型,方法简单,容易操作,具有较高的致畸率,本组为 63.63%。虽然成模率略低于除草酚组,但维甲酸诱导建立的模型似乎更符合人类先天性肾积水的改变。

神经嵴是一个松散的结构,由少量的细胞组成,只在胚胎早期短暂存在,神经嵴结构沿躯体纵轴从头到尾呈阶梯状分布,在特定的时刻释放游离的类间质细胞,沿着特定的途径到达靶器官,然后分化成各种不同的组织器官^[6]。如果在某一时刻其释放和迁移受到干扰,则会出现相应的各种畸形。在肾及输尿管形成的过程中,维甲酸干扰了这一过程,因而就产生了肾积水。因此,利用维甲酸的胎毒性制作先天性肾积水的大鼠模型是可行的。

目前,人类先天性肾盂输尿管连接部狭窄的病因尚不清楚。有人认为是肾盂输尿管平滑肌细胞发育不良,肌细胞之间有大量的胶原纤维和基质,将平滑肌细胞分离,失去正常的排列,阻断了肌细胞间的电活动传递,影响了蠕动,造成梗阻,导致肾积水。也有研究者认为是由于输尿管平滑肌层神经纤维缺失,导致肌细胞萎缩和功能失调,并通过其他机制使胶原纤维组成和结构发生改变,产生肾盂输尿管连接部的蠕动异常,形成机械性及功能性肾积水。而 Knerr 等^[7,8]等研究发现,先天性肾积水患者中,狭窄部的神经元及上皮细胞内的一氧化氮合酶(NOS)表达明显降低,免疫组化结果也显示,一氧化氮能及神经肽 Y 能的神经分布显著减少。本研究显示,两组胎鼠肾积水的标本中均可见肾盂输尿管连接部胶原纤维增多、肌层紊乱,提示两组肾积水的形成可能与肾盂输尿管连接部平滑肌细胞异常、胶原纤维增多有关。(下转第 24 页)

质性病变引起。我们在做充盈性膀胱内压测定时,当患儿出现尿意而要求排尿或出现 DI 时嘱患儿收缩盆底肌,尽量延长储尿时间,发现第 1 次测 CBCmax(19220 ± 6673 ml)比功能性膀胱容量(118.01 ± 75.50 ml)有明显增加, $P < 0.05$; 第 2 次测 CBCmax 百分数 (0.901 ± 0.106 ml) 比第 1 次测 CBCmax 百分数 (0.670 ± 0.195) 亦有明显增加, $P < 0.05$, 膀胱顺应性明显增高,说明膀胱病理改变是功能性紊乱,而非膀胱壁组织结构器质性改变引起。在充盈性膀胱内压测定过程中,当出现 DI、逼尿肌压力升高时,嘱患儿收缩盆底肌,发现逼尿肌压力下降,说明收缩盆底肌或尿道外括约肌可以反射性抑制逼尿肌收缩。二次充盈性膀胱内压测定相比较,第二次 CBCmax 百分数较第一次明显升高, $P < 0.05$, 第二次不稳定指数较第一次明显降低, $P < 0.05$, 说明收缩盆底肌的膀胱储尿功能训练可有效抑制逼尿肌不稳定收缩、增加 CBCmax, 为行为疗法提供了有力的理论依据,40 例患儿中尿流曲线 18 例呈柱丘型、14 例呈高斜坡型,5 例呈钟型,均为非梗阻型,仅 3 例呈间断排尿,对应的排尿期盆底肌电活动间断增强,可能是紧张等原因引起,说明排尿期膀胱尿道功能无明显异常。

对确诊为儿童白天尿频症患者,我们建议的治

疗方法为:①详细询问病史,对有确切诱因者予以心理疏导、转移注意力,去除诱因,注重引导,切忌训斥。②以行为疗法为主,主要是膀胱储尿功能训练,即当患儿产生尿意,要求排尿时嘱患儿收缩盆底肌,尽量延长储尿时间,当强烈要求排尿时再同意其排尿。有条件者可到医院行生物反馈治疗。指导其养成定时排尿的习惯,并逐渐延长排尿的时间间隔,治疗期间可适当减少饮水量。③对以上措施仅能使症状缓解或疗效不明显者辅助应用对膀胱有较高选择性的抗胆碱能药物,如奥昔布宁,可阻断 M 胆碱能受体,抑制 DI,改善膀胱的顺应性,增加 CBCmax。

参 考 文 献

- 1 金锡御,宋波 主编,临床尿动力[M].北京:人民卫生出版社,2002,45.
- 2 Cohen HA, Nussinovitch M, Kauschansky A. Extraordinary daytime urinary frequency in children [J]. J Fam Pract, 1993,37(1):28-29.
- 3 黄澄如,主编,小儿泌尿外科学[M].济南:山东科学技术出版社,1996,11-13.
- 4 宋波,金锡御,张煦炜.尿动力学在几种功能性尿频中的应用[J].中华泌尿外科杂志,1998,19(5):319-320.

(上接第 9 页) 该病理改变与人类肾盂输尿管连接部梗阻的肾积水病理改变是一致的。另外,两组胎鼠肾积水的标本中,S-100 神经纤维减少或消失,两者间无显著差异,说明两组胎鼠肾积水可能与肾盂输尿管连接部神经纤维减少有关。提示肾盂输尿管连接部的神经纤维的减少,在肾积水的发病中可能起作用。

因此,维甲酸诱导建立胎鼠肾积水动物模型的发病机制和病理改变与人类先天性肾积水的发病机制与病理改变有着很大的相似性,采用此模型用于人类先天性肾积水的研究是可行的。

参考文献

- 1 李正,王慧贞,吉士俊.实用小儿外科学[M].第二版,北京:人民卫生出版社,1984,1191-1200.
- 2 周鸿敏,袁继炎.先天性肾积水发病机制分子学研究进展[J].中华小儿科杂志.2003,24(1):76-78.
- 3 郑家润,徐文严.皮肤外用维甲酸制剂致胚胎毒性和致畸


性的可能性估计[J].国外医学皮肤性病学分册,1995,21(1):65-69.

- 4 David Tj. Pathogenesis of congenital malformations. In: Boyd R and Battaglia. Perinatal Medicine London [J]. London: Butterworths publisher, 1983, 264-285.
- 5 Leck I. The geographical distribution of neural tube defects and oral clefts [J]. Br. Med Bull, 1984, 40(4): 390-395.
- 6 Qi bao quan, Juan A, Diez -Pardo. Experimental Ureterhydronephrosis in Fetal Rats [J]. J Pediatr Surg, 2002, 26(9): 1247-1251.
- 7 何泽涌.组织学与胚胎学[M].北京:人民卫生出版社,2004,284-289.
- 8 Knerr I, Dittrich K, Miller J, et al. Alteration of neuronal and endothelial nitric oxide synthase and neuropeptide Y in congenital ureteropelvic junction obstruction [J]. Urol Res, 2001, 29(1): 134-140.
- 9 Murakumo M, Nonomura K, Yamashita T, et al. Structural changes of collagen components and diminution of nerves in congenital ureteropelvic junction obstruction [J]. J Urol, 1997, 157(5): 1963-1968.

维甲酸导致胎鼠肾积水的实验研究

作者：[张丽瑜](#)，[夏慧敏](#)，[余家康](#)，[宿宝贵](#)，[刘国昌](#)

作者单位：[张丽瑜,夏慧敏,余家康,刘国昌\(广州市儿童医院外科, 510000\)](#)，[宿宝贵\(暨南大学医学院人体解剖教研室, 510120\)](#)

刊名：[临床小儿外科杂志](#)

英文刊名：[JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY](#)

年，卷(期)：2007，6(2)

被引用次数：0次

参考文献(9条)

1. [Qi bao quan;Juan A;Diez-Pardo](#) [Experimental Ureterhydronephrosis in Fetal Rats](#) 2002(09)
2. [Leck I](#) [The geographical distribution of neural tube defects and oral clefts](#) 1984(04)
3. [David Tj](#) [Pathogenesis of congenital malformations](#) 1983
4. [郑家润;徐文严](#) [皮肤外用维甲酸制剂致胚胎毒性和致畸性的可能性估计](#) 1995(01)
5. [周鸿敏;袁继炎](#) [先天性肾积水发病机制分子学研究进展\[期刊论文\]-中华小儿外科杂志](#) 2003(01)
6. [李正;王慧贞;吉士俊](#) [实用小儿外科学](#) 1984
7. [Murakumo M;Nonomura K;Yamashita T](#) [Structural changes of collagan components and diminution of nerves in congenital ureteopelvic juntion obstruction](#) 1997(05)
8. [Knerr I;Dittrich K;Miller J](#) [Alteration of neuronal and endothekial nityic oxide synthase and neuropeptide Y in congenital ureteropelvic junction obstruction](#) 2001(01)
9. [何泽涌](#) [组织学与胚胎学](#) 2004

相似文献(10条)

1. 学位论文 [魏天佑](#) [维甲酸致大鼠骨质疏松动物模型研究及药物对其预防作用](#) 2007

目的：

研究维甲酸所诱导的大鼠骨质疏松动物模型，观察该模型的骨组织形态计量学、骨生物力学、骨密度，骨生化指标等各种改变，并以此分析该模型的特点和导致骨质疏松的原理。研究本实验室开发的药物丹参骨宝以及其他几种防治骨质疏松的药物——雌激素、司坦唑醇等对该骨质疏松动物模型的预防作用。

方法：

3月龄未交配的SPF级雌性SD大鼠68只，随机分成8组，第一组和第二组每组10只，第三组至第八组每组8只。正常对照组每日给予羧甲基纤维素钠溶液，模型组每日分别给予维甲酸混悬液和羧甲基纤维素钠溶液，低剂量丹参骨宝组每日分别给予维甲酸混悬液和低剂量丹参骨宝，中剂量丹参骨宝组每日分别给予维甲酸和中剂量丹参骨宝，高剂量丹参骨宝组每日分别给予维甲酸和高剂量丹参骨宝，复方丹参片组每日分别给予维甲酸和复方丹参片悬浊液，雌激素组每日分别给予维甲酸和雌激素溶液，司坦唑醇组每日分别给予维甲酸和司坦唑醇混悬液。以上药物均灌胃给药，每日分为上下午两次给予不同的药物，共计给药28天。所有大鼠在处死前的第13、14天和第3、4天分别皮下注射盐酸四环素和钙黄绿素进行荧光标记。动物于实验第29天处死取材，心脏取血分离血清测其生化指标；取左侧胫骨，包埋后制作不脱钙切片和磨片，并通过半自动图像分析系统测量其骨组织形态计量学参数；取右侧股骨进行骨密度、骨生物力学、骨物理指标的测量，测量完生物力学的股骨用盐酸消化后，检测其羟脯氨酸等生化指标和钙镁等微量元素的含量。

结果：

1. 维甲酸对大鼠的影响：

(1) 维甲酸可以降低大鼠股骨的干湿重和中点附近横断面的内外径：与正常组相比，维甲酸组的大鼠股骨的物理指标明显降低，其中大鼠股骨中点横断面的外径下降了约16%，股骨湿重降低了约24%，干重降低了约22%，且都具有十分显著的统计学意义(p<0. 01)，但是由于维甲酸组大鼠的体重比正常组略低，所以维甲酸组大鼠的股骨湿体重比和干体重比虽然也分别降低了20%和18%，但并不具有统计学意义。

(2) 维甲酸可以降低大鼠股骨的骨密度：与正常组大鼠相比，维甲酸组大鼠的股骨中点的骨密度下降了约8. 2%，股骨远心端的骨密度下降了约10. 2%，且都具有统计学意义(p<0. 01)。

(3) 维甲酸对于骨生化指标的影响不明显：以羟脯氨酸为代表的骨有机质和钙磷为代表的无机质，在维甲酸组大鼠和正常组大鼠的比较中，改变不明显，总体来说是维甲酸组大鼠骨骼有机质比正常组略有上升，无机质略有下降，但是上升和下降幅度都很小，不具有统计学上的意义。

(4) 维甲酸可以降低大鼠股骨骨生物力学部分指标：与正常组相比，维甲酸组的大鼠最大载荷下降了56%，弹性载荷下降了40%，断裂载荷下降了32%，断裂应变下降了41%，弯曲能量下降了38%，具有统计学意义(p<0. 01)，但是弹性模量和断裂能量吸收的改变不明显。

(5) 维甲酸可以降低大鼠胫骨上段松质骨骨总面积和骨小梁总面积，但对单位面积的骨小梁数量和骨小梁厚度影响不明显：维甲酸导致大鼠骨骼的几何形状缩小，导致骨总面积的减少(约32%，p<0. 01)和绝对骨小梁面积的减少(约41%，p<0. 01)，但是，维甲酸对大鼠胫骨上段松质骨的单位面积骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度的影响不明显。所以，本次实验维甲酸所造成的骨的损害与传统定义上的骨质疏松症有一定的区别。

(6) 维甲酸降低大鼠胫骨上段松质骨的骨形成率：代表骨形成的几个动态参数均有比较明显的下降，其中荧光周长标记百分数下降了57%，三组骨形成率指标的下降幅度也都超过了50%，且这几个指标的下降都具有统计学意义(p<0. 01)，只有骨矿化沉积率的下降没有统计学的意义，但是，该指标也下降了约22%。

(7) 维甲酸的胫骨中段皮质骨面积和百分比没有明显的变化，但是外膜的骨建造受到了抑制而骨内膜的骨重建得到了增强：大鼠胫骨中段皮质骨的静态参数方面，与正常组相比，维甲酸组的皮质骨面积有小幅度的下降而皮质骨面积百分比有小幅度的上升，但均不具有统计上的意义。在大鼠胫骨中段皮质骨动态参数方面，正常组大鼠胫骨外膜具有非常明显的荧光，而维甲酸组大鼠胫骨外膜看不到明显的荧光，正常组大鼠胫骨内膜看不到荧光，而维甲酸组大鼠胫骨内膜可以看到非常明显的荧光。这说明，维甲酸可以使生长期的大鼠的骨建造变缓甚至停止，而内膜的骨重建活动变得剧烈。

(8) 维甲酸可以升高大鼠血清的碱性磷酸酶含量：与正常组相比，维甲酸组的血清碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶都有不同程度的上升，其中碱性磷酸酶上升幅度为271%，具有统计学上的意义(p<0. 01)，抗酒石酸酸性磷酸酶上升幅度为108%，不具有统计学意义。

2. 药物对大鼠的影响：

(1) 丹参骨宝对维甲酸致大鼠骨质疏松的影响：中剂量丹参骨宝十分有效的升高维甲酸所导致的大鼠股骨湿体重比值的降低，其数值超过了正常组；中剂量丹参骨宝和高剂量丹参骨宝可以明显的升高维甲酸所导致的大鼠骨密度的降低，具有十分显著的统计学意义(p<0. 01)，其数值也达到或超过了正常组。丹参骨宝对大鼠骨组织形态计量学、骨生物力学、等其他各项指标的影响并没有显著性差别。

(2) 复方丹参片、己烯雌酚、司坦唑醇对大鼠骨骼的影响：三种药物并不能改善由维甲酸所带来的股骨物理指标、股骨密度、胫骨骨组织形态计量学、股骨生物力学等改变。

结论：

按照本次实验的方法，每天给予大鼠维甲酸70mg/kg，连续给药28天，对大鼠骨质影响的特点是：维甲酸所致大鼠骨骼的改变是以骨的几何形状缩小、骨密度降低、骨的生物力学性能降低，但骨小梁面积百分比不减少为特点的骨损害。生长期的大鼠骨骼，在维甲酸的药物作用下，减弱或停止了骨骼的向外生长，皮质骨骨外膜的骨建造变得十分缓慢，同时骨内膜的重建作用增强，导致的结果是骨骼变细、变窄、变轻，进而导致骨密度的下降和骨生物力学性能的减弱，在外力的作用下使用维甲酸的骨骼的抵抗力变弱，容易导致骨折的发生。

在本次实验中，丹参骨宝中剂量组和高剂量组对于维甲酸所致股骨远心端的骨密度起到了很好的预防作用，但复方丹参片、雌激素和司坦唑醇没有产生统计学上的预防效果。

2. 期刊论文 [丁涛,叶豆丹,温富春,徐惠波](#) [维甲酸给药时间对大鼠骨质疏松动物模型的影响](#) -吉林中医药2009, 29(6)

目的:探讨维甲酸的给药时间对大鼠骨质疏松动物模型的影响.方法:通过给动物分别灌服2周和4周的维甲酸,制备骨质疏松动物模型.结果:随着给维甲酸时间的延长,动物体重明显下降,前列腺萎缩,肾上腺肥大;尿液中轻脂氨酸的排出量增加;血液中碱性磷酸酶活性升高,但对抗酒石酸酸性磷酸酶的活性、血液中Ca、P含量仍无明显的影.结论:维甲酸导致动物骨质疏松生化指标和性激素的变化与维甲酸的给药时间呈正相关性,故维甲酸的给药时间可视为受试药物的作用效果而定.

3. 学位论文 [廖慧娟](#) [去卵巢和维甲酸致骨质疏松动物模型的长程比较研究及2型神经纤维瘤病NF2基因的突变分析](#) 2004

第一部分去卵巢和维甲酸致骨质疏松两种动物模型的长程观察附:复方尼尔雌醇和小剂量17β-雌二醇预防去卵巢大鼠骨质疏松疗效比较 目的:通过对去卵巢和维甲酸致骨质疏松两种动物模型的长程观察,为骨质疏松模型的建立和选择提供依据,并且比较复方尼尔雌醇和小剂量17β-雌二醇对去卵巢致骨质疏松大鼠模型的预防疗效.结论:体重校正后的骨密度是评价抗骨质疏松药物在体重差异较大实验组间疗效的敏感指标.以DXA检测骨丢失,大鼠去卵巢后第3周及灌服维甲酸后第3周均可成功复制骨质疏松动物模型.去卵巢致骨质疏松大鼠模型可靠稳定,持续时间长,可广泛用于研究骨质疏松的病理、发病机制和药物防治的临床前研究.维甲酸致骨质疏松大鼠模型造模简单,近期效果好,可作为去卵巢致骨质疏松大鼠模型的一种补充.复方尼尔雌醇和小剂量17β-雌二醇预防去卵巢大鼠骨质疏松疗效相当,复方尼尔雌醇预防大鼠骨丢失的起效时间早于17β-雌二醇.因复方尼尔雌醇有类似SERM的作用,为国人自行研制,经济实惠、服用方便、治疗性价比高.第二部分MT1-MMP、MMP-2和TIMP-2基因在去卵巢大鼠成骨细胞中的表达目的:观察去卵巢骨质疏松模型大鼠成骨细胞MT1-MMP基因的表达,探讨绝经后骨质疏松的发病机制.结论:雌激素不足可促成骨细胞MT1-MMP基因表达减少,可能为绝经后骨质疏松的发病机制之一.第三部分 2型神经纤维瘤病家系NF2基因的突变分析 目的:探讨中国人常染色体显性遗传2型神经纤维瘤病的基因突变和分子病诊断.结论:该突变为国内外新发现的NF2基因内含子13剪接供体位点突变,突变导致的剪接异常影响了NF2基因所表达Merlin蛋白的生物学功能,使其失去对正常神经细胞生长的调控,导致2型神经纤维瘤病的发生.

4. 学位论文 [黄海涛](#) [维甲酸下调Bcl-2的表达水平与腭裂形成的关系](#) 2005

腭裂是人类常见的先天性发育畸形,给患者及其家庭带来了极大的痛苦.人们长期以来一直在探询着腭裂的发病机制,但因其影响因素十分复杂,涉及多个方面,因此腭裂的确切病因至今仍未明确.在研究腭裂病因学的过程中,如何建立一种稳定、有效的腭裂动物模型,已成为研究进一步深入的关键.由于腭突发育的复杂性,导致其对多种致畸物质的毒性作用具有极强的敏感性.

在已知的能诱发生腭裂的致畸物质中,维甲酸(RA)是致畸作用比较显著的一种.本文通过建立由维甲酸诱导的C57BL/6J小鼠腭裂动物模型,并在此基础上用免疫组化的方法检测了凋亡抑制因子Bcl-2在中腭上皮细胞中的表达情况,以探讨维甲酸对于Bcl-2表达水平的影响,并分析其可能的致畸机制.

5. 期刊论文 [郭俊斌,王练英,张志波,白玉作](#) [维甲酸诱导大鼠产生肛门直肠畸形及其伴发畸形](#) -中国优生与遗传杂志2005, 13(1)

目的利用维甲酸诱导大鼠肛门直肠畸形并探讨维生素A类物与肛门直肠畸形发生之间的关系.方法利用成熟未孕的Wistar大鼠,在妊娠10d时经胃管注入维甲酸,诱导产生肛门直肠畸形动物模型,分别在妊娠16、18、20d时剖宫取出胎鼠,进行实体观察、畸形率统计,同时进行病理形态学研究.对照组仅给予橄榄油,剖宫时间及观察项目同致畸组.结果维甲酸致畸组共获得胎鼠96只,其中肛门直肠畸形发生率81.3%(78/96),显性脊柱裂46.9%(45/96),无尾畸形70.8%(68/96),足畸形37.5%(36/96).对照组剖出74只胎鼠,均未见上述畸形.致畸组与对照组在妊娠16d、18d、20d时身长及体重相应各组数据经t检验统计差异显著(P<0.01),致畸组均较对照组为差.结论维甲酸是一种良好的诱导肛门直肠畸形动物模型的致畸剂,其发生机制可能是过量维甲酸通过干扰维生素A酸信号系统影响正常胚胎发生所致.

6. 学位论文 [王焯明](#) [比较三种骨质疏松动物模型的特点和机理分析](#) 2003

目的:了解用不同的方法建立的骨质疏松动物模型的效果,骨代谢与骨结构变化特点,分析其机理.方法:(1).3月龄清洁级健康雌性SD大鼠20只,随机均分为2组,假手术组,去卵巢组,试验时间4月;(2).6.5月龄清洁级健康雌性SD大鼠20只,随机均分为2组.试验组大鼠连续性维甲酸75mg/kg·d灌胃,对照组为生理盐水,试验时间15天;(3).3周龄清洁级健康雌性SD大鼠20只,随机均分为2组.实验组大鼠摄食为灭菌的高蛋白低钙饲料(Ca0.025%,protein27%),对照组为灭菌的标准饲料.试验时间6月.各实验组结束时,在处死前24小时代谢笼分别收集24小时尿液,次日麻醉后,摘眼球采血法留取血液标本,离心取血清.处死大鼠后留取L3、L4,检测血清中骨源性碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(BGP)和尿样中尿吡啶酚/肌酐(PYD/Cr)和尿脱氧吡啶酚/肌酐(DPD/Cr),并用骨计量学进行定量分析,普通光学显微镜和扫描电镜观察骨静态结构变化.结论:(1)去卵巢、维甲酸灌胃和低钙高蛋白饮食摄入的方法都可以成功复制出大鼠骨质疏松模型.(2)大鼠切除卵巢去势是研究绝经后骨质疏松的较好的模型,但应注意区分该模型模拟绝经后骨量丢失的不同时期.在大鼠去卵巢功能后约4月左右后进入骨量丢失相对平缓时相.(3)维甲酸诱导骨质疏松,适于模拟绝经后骨量的快速丢失期,属于高转化型骨质疏松动物模型.但远期建立骨质疏松模型的效果有待证实.(4)低钙高蛋白饮食摄入的方法造模适于营养学角度对骨质疏松的预防和治疗的研究.属于高转化型骨质疏松模型.(5)膳食中过多的蛋白质并且钙质不足会造成骨质疏松症的危险因素.

7. 学位论文 [陈嘉波](#) [三氧化二砷及维甲酸对神经母细胞瘤SK-N-SH细胞及裸鼠移植瘤模型作用的实验研究](#) 2002

目的:①从细胞实验和动物实验两个角度初步探讨三氧化二砷(arsenic trioxide,As₂O₃)与维甲酸(retinoic acid,ATRA)对神经母细胞瘤(Neuroblastoma,NB)的诱导分化作用;②建立NB裸鼠移植瘤动物模型,并了解其生物学特性.结论:①As₂O₃与ATRA在细胞实验及动物实验中均能有效抑制NB细胞生长,抑制作用是通过诱导肿瘤细胞凋亡实现的.这一结果显示出As₂O₃与ATRA诱导分化治疗NB的良好前景;②细胞移植和瘤块移植均能成功建立裸鼠移植瘤模型,但后者成瘤率更高,潜伏期更短,移植瘤的生物学特性在传代过程中也比较稳定,在NB的动物实验研究中是值得推荐的方法.

8. 学位论文 [张艳萍](#) [Wnt信号通路与过量维甲酸致昆明小鼠神经管畸形的相关性研究](#) 2007

无脑畸形、脊髓裂是最为常见的神经管畸形,两者统称为开放性神经管缺陷.脊柱裂指脊椎骨发育不全,使本应有脊椎骨保护的脊髓突出或暴露于体表.脊髓裂常伴有脊柱裂.无脑畸形是一种最为严重的NTD,常伴有头盖骨和头部皮肤发育不全.这种胎儿一般在出生前就死于子宫,形成“死胎”或“死产”,即使活产,也会在短时间内死亡,几乎无一例存活.由于无脑畸形胎儿一般在出生前就死于子宫内,故关于无脑畸形发生机制的研究大多在相应动物模型上实施.

RA是维生素A在体内的自然活性代谢物,也是胚胎发育过程中不可缺少的形态发生素.它不仅决定胚胎头尾轴的建立,而且参与中枢神经系统发育过程中对前、中、后脑和脊髓的调节分化.一般认为,RAY巴过与维甲酸受体(retinoic acidreceptor, RARs)结合,调节下游靶基因表达,来实现其生物学效应.哺乳动物RARs一般包括α、β和γ三种亚型.RA先与RARs结合,然后RARs以二聚体的形式结合到靶基因启动子上一段称为维甲酸反应元件(retinoid acid responseelements, RARE)的特定DNA序列上,以调控靶基因转录.研究证实,过量维生素A及RA等维生素A衍生物可在小鼠、金地鼠、鸡等动物胚胎上诱导一系列发育缺陷,而中枢神经系统是RA致畸形发生的最常见部位.

细胞凋亡在神经管的正常形成过程中发挥重要作用,凋亡过度或减少均可致NTDs发生.研究表明,细胞凋亡参与RA致发育缺陷的发生.Caspase-3是细胞凋亡下游的关键执行者,细胞凋亡的某些特征性标志,如染色体凝聚和DNA片段化等,均与Caspase-3直接相关.

Wnt蛋白是一类由Wnt基因编码的分泌型糖蛋白,通过与细胞膜上Frizzled受体家族和低密度脂蛋白受体相关蛋白家族(low-density lipoprotein receptorassociating protein, LRP)相互作用而启动Wnt信号传导,与胚胎发育及细胞增殖、分化和凋亡等密切相关.

β-catenin是经典Wnt信号途径中不可缺少的关键性效应分子,一般通过激活T细胞因子/淋巴样增强因子(T cell factor/lymphoid enhancer factor, LEF/TCF)家族中转录因子而发挥其发育调控效应.在中枢神经系统发育过程中,β-catenin参与细胞的增殖、分化、凋亡及神经管形态发生等一系列生物学过程,其表达失调可致神经管畸形、颅面部发育缺陷以及视杯和面部模式形成障碍.

Dishevelled是胞质内多条wnt信号传导途径的衔接子,在哺乳动物中至少包括3个亚型,即Dishevelled1/2/3.Wnt一旦与受体Frizzled结合,Dishevelled即与Frizzled受体胞内区结合,继而被激活.激活的Dishevelled蛋白使B-catenin在胞质内积累,并进入细胞核调控下游靶基因转录.Dishevelled还可激活平面细胞极性(planar cell polarity, PCP)信号通路,以调控细胞极性排列.

PCP是一条非经典Wnt信号通路,它与经典Wnt信号通路一样需要细胞膜上Frizzled受体及胞浆内Dishevelled蛋白的参与,但其信号传递不依赖β-catenin分子.近年来相关研究表明,PCP信号通路在胚胎形成过程中,通过参与原肠胚/神经胚期会聚延伸(convergent extension, CE)运动参与调控神经管闭合过程.Vangl1是PCP信号途径主要分子成员之一,在哺乳动物中主要包括两个亚型,即Vangl1/2,其突变可导致NTD发生.

本实验拟用RA建立小鼠露脑畸形动物模型,并利用免疫组化、原位杂交、Western-blot及RT-PCR技术初步探讨Dishevelled1/2/3亚型基因及经典Wnt信号通路分子β-catenin和PCP信号通路分子Vangl2在RA处理后小鼠胚胎畸形发生中的表达分布变化,以及PARα、PARβ及Caspase-3蛋白表达量的变化,以期阐明过量RA致NTD的发生机制,为NTD的预防与治疗提供实验依据.

实验结果

1.露脑畸形动物模型:(1)RA诱导昆明小鼠露脑畸形发生率随药物剂量.加大而升高,随胚龄增加而降低.E7.75灌服30mg/kgRA可诱导94%(E10.5)/76.9%(E16.5)露脑畸形胚胎发生率,是本实验确定的最佳致畸动物模型。

2. RARα、RARβ及Caspase-3蛋白检测: Western-blot检测结果显示:(1)在正常对照组, RARα及RARβ蛋白在花生油灌服后18h表达升高,42h表达最强,之后表达又逐渐降低。在实验组, RARα及RARβ蛋白表达水平在RA灌服后18、42h,均明显低于正常对照组(P<0.05);66h、90h时, RARα蛋白表达水平与对照组相比无明显差异, RARβ蛋白表达水平则显著高于正常对照组(P<0.05)。(2)Caspase-3在正常胚胎神经管组织中的表达存在时间依赖性。在对照组, Caspase-3蛋白在花生油灌服后18h表达升高,42h和66h时表达最强,之后表达逐渐降低。在实验组, Caspase-3蛋白在RA处理后42h表达水平显著低于正常对照组(P<0.05),66h和90h时,其表达水平显著高于正常对照组(P<0.05)。

3. Dishevelled1/2/3、β-catenin及Vangl2表达状况检测: (1)Dishevelled1/2/3在正常胚胎神经管组织中的表达存在时间依赖性。在对照组, Dishevelled1/2/3mRNA在花生油灌服后18h表达最强,之后表达逐渐降低到原来表达水平。在实验组, Dishevelled1/2/3 mRNA在RA处理后4h和18h的表达水平显著低于正常对照组(P<0.05),42h时其表达水平升高并显著高于正常对照组(P<0.05),66h时Dishevelled1/2在对照组与实验组中的表达无显著差异, Dishevelled3表达水平显著高于对照组水平(P<0.05)。在对照组, Dishevelled2蛋白表达水平在花生油灌服后随着胚胎发育逐渐降低;在实验组, Dishevelled2蛋白在RA处理后18h表达水平显著低于对照组(P<0.05),42h时其表达水平升高,且显著高于正常对照组(P<0.05),66h和90h时实验组与对照组相比无显著差异。免疫组化检测显示: Dishevelled2蛋白在各对照组及实验组鼠胚头部神经管上皮组织中均呈不同程度阳性着色。在正常胚胎神经管组织中,其表达水平随胚胎发育逐渐降低;在实验组, Dishevelled2蛋白在神经管组织的表达呈现先下降,之后上升的趋势。(2)在对照组, β-catenin mRNA及蛋白表达随胚胎发育逐渐降低;实验组在RA灌服后4h和18h, β-catenin mRNA表达水平明显低于正常对照组(P<0.05);42h时实验组与对照组相比无明显差异;66h时其表达水平明显高于对照组(P<0.05);β-catenin蛋白在RA处理后18h和42h,表达水平显著低于正常对照组(P<0.05),66h时实验组与对照组相比无显著差异,90h时其表达水平升高,且显著高于正常对照组(P<0.05)。原位杂交及免疫组化检测显示: B-catenin在各对照组及实验组鼠胚头部神经管上皮组织中,均呈不同程度阳性着色。在正常胚胎神经管组织中,β-catenin mRNA及蛋白表达水平随胚胎发育逐渐降低;在实验组, β-catenin mRNA及蛋白表达水平均呈现先下降,而后又逐渐上升的趋势。(3)在对照组, Vangl2mRNA表达在花生油灌服后18h明显升高并于

42h时达最高峰，之后逐渐降低到原来水平；Vangl2蛋白表达在花生油灌注后18h表达升高，42h时最强，66h和90h时明显降低。实验组在灌服RA后4h和118h，Vangl2mRNA表达水平明显低于正常对照组(P<0.05)；42h时两组相比无明显变化，66h时其表达水平显著高于对照组(P<0.05)；Vangl2蛋白在RA处理后18、42h表达水平显著低于正常对照组(P<0.05)，66、90h时其表达水平升高，且显著高于正常对照组(P<0.05)。原位杂交及免疫组化检测显示：Vangl2在各对照组及实验组鼠胚胎头部神经管上皮组织中，均呈不同程度阳性着色。在正常组，Vangl2mRNA及蛋白表达水平随胚胎发育呈现先上升后下降的趋势；在实验组，其mRNA及蛋白表达则呈现先上升，而后逐渐下降的趋势。

- 结论
1. 成功建立过量RA致昆明小鼠NTD动物模型：E7.75灌服小鼠30mg/kgRA，露脑畸形发生率为94% (E10.5)/76.9% (E16.5)。
 2. RA参与小鼠胚胎神经系统正常发育。
 3. 过量RA可能通过调节PAR α和RAR β的表达，影响下游相关发育基因的正常调控，从而干扰神经管闭合过程，导致NTD发生。
 4. 细胞凋亡参与胚胎神经系统正常发育，过量RA可能通过Caspase-3干扰正常细胞凋亡，导致NTD的发生。
 5. Wnt信号通路参与小鼠胚胎神经系统正常发育，过量RA可干扰Wnt信号通路分子Dishevelled1/2/3、β-catenin及Vangl2基因在神经管组织中的正常表达，导致NTD的发生。

9. 学位论文 [马勇 骨质疏松模型中铁调素（Hepcidin）变化的相关研究 2007](#)

目的：观察维甲酸灌胃建立制作的大鼠骨质疏松模型；在模型建立过程中选定不同时间点，观察大鼠肝脏的铁调素(Hepcidin)基因表达变化以及相应时刻血清中铁调素含量的观察；在骨质疏松研究领域，观察、研究“铁代谢调节因素(铁调素)”在“骨代谢异常(骨质疏松)”过程中的作用，为进一步研究骨质疏松症的机理、治疗、转归提供新的思路、新的策略。

方法：选择3月龄清洁级雄性SD大鼠，分成模型组 and 对照组；模型组用维甲酸(70mg/kg/d)每天灌胃，对照组用等量的灭菌蒸馏水灌胃，连续14天。灌胃第5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、14天分别处死大鼠取材：血清、肝脏组织、骨组织(胫骨、股骨、腰椎)。获取骨质疏松模型建立指标：灌胃前后大鼠活体骨密度测定、脱钙骨切片分析、血清钙、磷、碱性磷酸酶(ALP)；获取肝脏相关研究结果：肝组织切片观察、血清肝功能酶(ALT、AST、γ-GT)测定；采用RT-PCR方法分别观察灌胃5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、14天大鼠肝组织铁调素基因表达水平；采用ELISA试剂盒测定相应时间的血清中铁调素的含量。

结果：实验第14天，模型组与对照组相比，模型组大鼠骨质疏松模型建立成功：骨密度(胫骨、股骨、腰椎)不同程度的降低、骨HE切片中骨小梁稀疏、皮质骨变薄、软骨细胞层减少等病理变化。模型建立过程中，与对照组比较，模型组所运用的维甲酸累积剂量、累计时间未在肝组织HE切片发现明显病理改变、血清肝功能酶含量没有肝脏功能的损伤表现。在实验周期内，模型组与对照组比较，肝脏铁调素基因表达在维甲酸灌胃的不同时间，存在明显差异：早期5、6、7天铁调素基因相对表达量逐渐下降，在第8、9、10天达到较低值，随后有回升，呈现凹陷的抛物线变化趋势；而对照组基本处于水平的轻微波动变化。血清铁调素ELISA检测含量趋势与对照组比较，呈现凹陷的抛物线变化，低值出现在第8、9、10天，整体变化趋势与肝脏基因水平相符合；对照组变化亦与肝hepcidin基因水平相符合。

- 结论：根据本次实验结果，对骨质疏松的病因病理的认识及铁代谢与铁调素、骨代谢与铁代谢关系、铁离子与钙离子的关系系列研究的回顾，经分析得出如下结论：
- 1、本研究骨质疏松模型采用单一人工干预方法，没有其他影响因素；实验结束时大鼠骨密度、骨组织学检查表明骨质疏松形成，同时肝功能酶和HE切片显示肝功能未受药物源性产生明显损伤性影响；因此，同期不同时间组大鼠肝脏铁调素基因表达、血清铁调素含量可以代表体内铁代谢不同时间的变化。
 - 2、在本研究中，模型组与对照组研究结果的差异表明：铁调素基因RT-PCR变化、血清铁调素ELISA测定含量变化与维甲酸制作的大鼠骨质疏松模型形成有实验相关性。
 - 3、在本研究平台下，形成了一个互相影响的假设图：铁调素(Hepcidin) ↔ 铁代谢 ↔ 铁离子 ↔ 钙离子 ↔ 骨质疏松。

10. 期刊论文 [刘和娣,李星海,佟晓旭,李恩 地塞米松与维甲酸致大鼠骨质疏松动物模型的比较 -中国病理生理杂志2004, 20\(4\)](#)

目的：了解地塞米松和维甲酸对骨代谢的影响。方法：选用3月龄健康雌性纯系SD大鼠分别喂食低钙饲料，每周两次肌肉注射地塞米松0.1 mg/100g体重，连续5周和常规喂养，每天用花生油溶解维甲酸70 mg/kg体重灌胃，连续3周，诱发两种不同类型的大鼠骨质疏松，比较不同组大鼠间血钙、磷、碱性磷酸酶、雌二醇、骨密度、骨灰重、肠钙吸收、骨组织形态多指标的变化。结果：地塞米松组大鼠的骨组织形态学呈现典型的骨质疏松状态，骨密度、骨灰重、肠钙吸收均显著低于对照组，大鼠体内雌二醇水平亦低于对照组，而血钙、磷、ALP则维持在正常范围，符合骨质疏松的病变特点。维甲酸组大鼠虽然骨骼病变明显，骨灰重、骨密度均显著低于正常大鼠，但血钙、磷、ALP变化明显，与骨质疏松状态下这些指标基本在正常水平或稍低的数据不符。结论：地塞米松能诱发大鼠的骨质疏松动物模型，维甲酸造成的大鼠骨骼病变非骨质疏松状态而更似骨软化。

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200702003.aspx
授权使用：黔南民族师范学院(gnnzsfxxy)，授权号：ad03c76e-8eaf-4f1e-9c5c-9ed40110723c

下载时间：2011年4月29日