

严晓,覃彩芳,李青先,等. 盆腔脏器脱垂动物模型的建立与适用性评价[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 668-674.

Yan X, Qin CF, Li QX, et al. Establishment and evaluation of the applicability of an animal model of pelvic organ prolapse [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 668-674.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.012

盆腔脏器脱垂动物模型的建立与适用性评价

严晓,覃彩芳,李青先,秦玲,许文娟,樊伯珍*

(上海中医药大学附属普陀医院妇产科,上海 200062)

【摘要】 目的 建立能反映盆腔脏器脱垂患者骶韧带相似病理变化的大鼠动物模型,探讨增加产伤的强度和模拟绝经对大鼠骶韧带组织病理的影响,为进一步研究提供实验基础。**方法** 选取成年SPF级体重约300 g SD雌性大鼠60只,其中45只为无生育史的,采取随机数字表法分为空白对照组(A),模拟绝经组(B),模拟产伤+模拟绝经组(C),另15只连续分娩过3次的为产伤+模拟产伤+模拟绝经组(D)。A组正常饮水进食,B组行双卵巢切除术,C组予以模拟产伤操作及行双侧卵巢切除手术模拟绝经,D组在连续分娩3次的基础上模拟产伤2次后行双侧卵巢切除模拟绝经,术后均常规饲养8~10周。各组随机取8只,观察各组大鼠生殖器外观、生殖道裂孔变化;采用免疫组化法观察评价阴道前壁I型和III型胶原蛋白(COL1A1、COL3A1)、转化生长因子 β -3(TGF β -3)积分光密度变化。采用RT-PCR法测定骶韧带组织COL1A1、COL3A1、TGF β -3 mRNA表达水平。**结果** 造模后,D组大鼠阴道裂孔的直径超过对照组大于2 mm,各组大鼠没有明显的脱垂表型,D组表现出轻度的会阴体异常;D组大鼠阴道前壁COL1A1的表达显著低于A组($P < 0.05$),TGF β -3相对表达量与A组相比C、D组均显著高于A组($P < 0.05$);D组大鼠骶韧带COL1A1、COL3A1的表达显著低于A组($P < 0.05$),TGF β -3相对表达量与A组相比C、D组均显著高于A组($P < 0.05$)。**结论** 造模后的大鼠模型其生殖器脱垂表型不显著,如以表型变化为研究内容的研究本模型的制作并不合适;本模型能作为研究POP骶韧带病理生理变化的动物模型,但不能确定人类和大鼠骶韧带的机械性能是否具有相似性,需结合各类动物各自的优缺点和需解决的实际研究问题选择最合适的动物模型。

【关键词】 盆腔脏器脱垂;骶韧带;阴道前壁;胶原蛋白;大鼠动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0668-07

Establishment and evaluation of the applicability of an animal model of pelvic organ prolapse

YAN Xiao, QIN Caifang, LI Qingxian, QIN Ling, XU Wenjuan, FAN Bozhen*

(Department of Gynaecology and Obstetrics, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

Corresponding author: FAN Bozhen. E-mail: fbz628@163.com

【Abstract】 Objective To establish a rat model that can exhibit pathological changes of the sacral ligament similar to that in patients with pelvic organ prolapse, and to explore the effects of increasing the intensity of labor injury and simulating menopause on the histopathology of the sacral ligament in rats, so as to provide an experimental basis for further research. **Methods** Sixty adult SPF female rats with a body weight of about 300 g were selected, 45 of which had no birth history. They were divided into a blank control (a) group, simulated menopause (b) group, and simulated birth injury +

【基金项目】上海市医学引导类(中、西医)科技支撑项目(18411970500),上海中医药大学预算内科研项目(18LK062),上海市普陀区科学技术委员会卫生系统重点项目(ptkwws201906)。

Funded by Shanghai Medical Guidance Class (Chinese and Western Medicine) Science and Technology Support Project(18411970500), Research Projects in Budget of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine(18LK062), Key Projects on Health System of Putuo District Science and Technology Committee of Shanghai (ptkwws201906).

【作者简介】严晓(1983—),女,主治医师,硕士,研究方向:女性盆底功能障碍性疾病、生殖医学。Email: dx_yan@sina.cn

【通信作者】樊伯珍(1967—),男,主任医师,研究方向:女性盆底功能障碍性疾病。Email: fbz628@163.com

simulated menopause (c) group by a random digital table method. The other 15 rats who had delivered three times in succession were used as alabor injury + simulated birth injury + simulated menopause (d) group. Group A received normal drinking water and food, group B received bilateral ovariectomy, group C received simulated labor injury operation and bilateral ovariectomy to simulate menopause, and group D received bilateral ovariectomy to simulate menopause on the basis of simulated labor injury twice after three consecutive deliveries, which were fed for 8–10 weeks. Eight rats were randomly selected from each group to observe the appearance of the genitalia and the changes of the genital cleft. The changes of integral optical density of type I and type III collagen (COL1A1, COL3A1) and transforming growth factor β -3 (TGF β -3) in the anterior wall of the vagina were observed and evaluated by immunohistochemistry. The expression levels of COL1A1, COL3A1, and TGF β -3 mRNA in the sacral ligament were measured by RT-PCR. **Results** After modeling, the diameter of the vaginal hiatus in group D was more than 2 mm greater than that in the control group, and there was no obvious prolapse in each group, while group D showed a slightly abnormal perineum. The expression of COL1A1 in the anterior wall of the vagina in group D was significantly lower than that in group A ($P < 0.05$), and the relative expression of TGF β -3 in group C and group D was significantly higher than that in group A ($P < 0.05$). The expression of COL1A1 and COL3A1 in the sacral ligament in group D was significantly higher than that in group A ($P < 0.05$). The relative expression of TGF β -3 in group C and group D was significantly higher than that in group A ($P < 0.05$). **Conclusions** After the establishment of the model, the phenotypic outcomes of pelvic organ prolapse was not notable. This model is not suitable for the study of phenotypic changes. This model can be used as an animal model to study the pathophysiological changes of the sacral ligament of pelvic organ prolapse, but it cannot be determined whether the mechanical properties of the sacral ligament of human and rat are similar. It is necessary to combine the advantages and disadvantages of various animals and the actual issue to be resolved to select the most suitable animal model for research.

[Keywords] pelvic organ prolapsed; sacrum ligament; anterior vaginal wall; collagen; rat model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

盆腔脏器脱垂(pelvic organ prolapse, POP)在中老年女性中常见,除排尿等障碍及局部溃疡感染严重外很少会导致患者死亡,但显著影响女性的生活质量。它是一个病程长、治疗及研究等方面具有复杂性的疾病。文献认为阴道分娩、绝经、年老、肥胖等均是 POP 发生的高危因素^[1-2],但相关发病机理的基础研究及各种临床治疗效果的病理生理机制仍不清,这些基础研究及探讨离不开稳定的动物模型的建立。因此,如何制作合适的 POP 动物模型对于加深对其病因学和进展的认识以及研究有效的预防和治疗策略有重要意义。本研究通过模拟妊娠难产产生的脏器支撑组织损伤和模拟绝经制备 POP 大鼠模型,并结合文献试图通过对模型大鼠生殖器表型、阴道前壁及子宫骶韧带组织中胶原蛋白含量变化的观察,来初步探讨 POP 疾病动物模型制作的动物选择、制作的动物模型的适用性以及研究中存在的问题,为不断完善 POP 疾病动物模型制作提供研究积累。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 月龄 SPF 级雌性成年 SD 大鼠 60 只,体重约

300 g,均已连续分娩过 3 次,另取同级别同龄无生育 SD 大鼠为对照,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供【SCXK(沪)2017-0005】,饲养于沪北实验动物中心【SYXK(沪)2018-0034】。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度 50% ~ 60%,温度控制在 21 ~ 24℃。所有操作均符合实验伦理学要求(批号:TJHBLAC-2019-026)。

1.1.2 试剂与仪器

RNA 抽提试剂盒,美国 zym 公司生产。裂解液、逆转录试剂盒、荧光定量聚合酶链反应试剂盒,日本 TaKaRa 株式会社生产。离心机(Thermo,美国),PCR 基因扩增仪(Bio-Rad,美国),实时 PCR 扩增仪(Applied Biosystems,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备

根据参考文献进行造模^[3-5]。取无生育史的 45 只成年 SD 雌性大鼠采用随机数字表法分为 3 组,每组各 15 只。A 组为正常空白对照组,自由进食饮水饲养 12 周;B 组为模拟绝经组,入组后常规饲养 2 周后单纯双侧卵巢切除,术后饲养 10 周;C 组为模拟产伤及绝经组,入组时即将大鼠腹腔注射麻醉,取俯卧位固定,将 6F 弗莱氏导尿管插入阴道中约 3 cm,并往气囊中注入生理盐水 3 mL 撑开阴道,用

1-0号丝线将导尿管八字缝合于阴道口,将大鼠固定,取耻骨联合位于桌缘使导尿管下垂,给 300 g 拉力维持 4 h 后取出,常规饲养 2 周后行双侧卵巢切除,术后常规饲养 10 周;D 组为增加模拟产伤强度组,取与上述各组入组研究时同龄的 15 只已连续分娩过 3 次的 SD 大鼠,同 C 组模拟产伤操作 1 次后间隔 2 周再行上述操作 1 次,常规饲养 2 周后行双侧卵巢切除术,常规饲养 8 周。

1.2.2 标本采集及处理

各组随机取 8 只,测量观察各组大鼠实验前后外阴表现和生殖道裂孔直径的差异,并采用颈椎脱臼法将大鼠处死后,仰卧固定,打开盆腹腔,取出阴道前壁组织置于 4% 多聚甲醛溶液内固定 48 h,脱水,石蜡包埋,待切片;取出大鼠骶韧带组织,置于液氮内备用。

1.2.3 阴道前壁组织 COL1A1, COL3A1, TGF β -3 表达水平的检测

免疫组化方法检测:常规固定,脱水,脱蜡后,以免疫组化法检测阴道前壁组织中 COL1A1, COL3A1, TGF β -3 的表达。大鼠阴道前壁组织切片脱蜡,水化后,枸橼酸盐缓冲液热修复抗原,加入抗 COL1A1, COL3A1, TGF β -3 一抗(1:100),4℃ 湿盒内孵育过夜。PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min 后,加入二抗孵育,显色,复染后,以显微镜观察染色情况,拍摄图片,His 模式下,选取棕色或棕褐色阳性表达区域,以 Image pro plus 6.0 图像分析系统计算积分光密度,每张切片取 5 个视野的光密度的平均值作为该切片的积分光密度值。

1.2.4 骶韧带组织 COL1A1, COL3A1, TGF β -3 表达水平的检测

RT-PCR 方法检测:取各组样本,用 TRIzol 裂解液和美国 zymo 公司生产的 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,测总 RNA 浓度和纯度,-80℃ 保存备用。将 1 μ g 的总 RNA 根据 TaKaRa 的逆转录试剂盒行 cDNA 逆转录,按照 TaKaRa 荧光定量聚合酶链反应试剂盒操作步骤进行 PCR 反应;PCR 反应在 Real time PCR 扩增仪上进行,反应条件:95℃, 30 s, 95℃, 5 s, 60℃, 34 s, 共 45 个循环。COL1A1(上游 5'-GGTGAGACAGGCCAACAAGGTG-3', 下游 5'-GCCAGGAGAGCCAGGAGGAC-3'), COL3A1(上游 5'-ACTTCTGGTCCTCCTGGTCTGC-3', 下游 5'-CGCCTGGCTCACCTTTTCAC-3'), TGF β CTG(上游 5'-CTGGCTCACCTCATACCT-3', 下游 5'-

CTGGCTCACCTCATACCT-3')的引物,由上海生工生物工程有限公司设计合成。各个基因的表达采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行定量分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行正态性和方差齐性检验,计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用团体 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠外阴脱垂表型变化

与对照组 A 相比,C、D 组大鼠阴道裂孔的直径均超过 A 组大于 2 mm;C、D 组与 A 组之间阴道裂孔直径差异具有显著性[(1.403 $\pm$ 0.343) 相对 (0.419 $\pm$ 0.100)]($P < 0.05$)、[(1.609 $\pm$ 0.160) 相对 (0.419 $\pm$ 0.100)]($P < 0.05$)。各组大鼠没有明显的脱垂表型,D 组表现出轻度的会阴体异常。

2.2 各组大鼠阴道前壁组织 COL1A1、COL3A1 和 TGF β -3 免疫组化积分光密度比较

2.2.1 与 A 组比较

阴道前壁组织 COL1A1 的相对表达量 B 组和 A 组差异无显著性,C 组有下降趋势,但差异无显著性,D 组显著低于 A 组($P < 0.05$);COL3A1 的相对表达量各组大鼠均表现为下降趋势,C、D 组均显著低于 A 组($P < 0.05$)。TGF β -3 相对表达量与 A 组相比均呈上升趋势,B 组与 A 组间差异无显著性,C、D 组均显著高于 A 组($P < 0.05$)(表 1)。

2.2.2 组间比较

COL1A1 的相对表达量随着损伤强度的增加各组间有依次下降趋势,但差异无显著性。COL3A1 的相对表达量 C 组较 B 组、D 组较 C 组均显著下降($P < 0.05$)。TGF β -3 相对表达量随着损伤强度的增加 C 组较 B 组、D 组较 C 组均显著上升($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 各组大鼠骶韧带组织 COL1A1、COL3A1 和 TGF β -3 表达水平比较

2.3.1 与 A 组比较

骶韧带组织 COL1A1、COL3A1 相对表达量均呈下降趋势,其中 B、C 组与 A 组相比差异均无显著性,D 组显著低于 A 组($P < 0.05$)。TGF β -3 相对表达量与 A 组相比均呈上升趋势,B 组与 A 组间差异无显著性,C、D 组均显著高于 A 组($P < 0.05$)(表 2)。

2.3.2 组间比较

COL1A1、COL3A1 的相对表达量随着损伤强度的增加 C 组较 B 组呈现下降趋势,但差异无显著性,

D 组较 C 组呈显著下降($P < 0.05$);TGFβ-3 相对表达量随着损伤强度的增加 C 组较 B 组虽差异无显著性,但有上升趋势,D 组较 C 组显著上升($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠阴道前壁组织 COL1A1、COL3A1、TGFβ-3 免疫组化积分光密度($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Integral optical density of immunohistochemical staining of COL1A1, COL3A1 and TGFβ-3 in anterior vaginal wall of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	COL1A1	COL3A1	TGFβ-3
A 组 Group A	51200 ± 14459	172005 ± 2079	84733 ± 6054
B 组 Group B	53336 ± 12744	168539 ± 1957	84991 ± 6161
C 组 Group C	50065 ± 14125	135623 ± 5407 [△]	90932 ± 1146 [△]
D 组 Group D	44146 ± 9568 [*]	103268 ± 4387 ^{△□}	107597 ± 4406 ^{△□}
F	0.748	586.165	38.743
P	0.533	< 0.05	< 0.05

注:与 A 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 B 组比较,[△] $P < 0.05$;与 C 组比较,[□] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with Group A, ^{*} $P < 0.05$. Compared with Group B, [△] $P < 0.05$. Compared with Group C, [□] $P < 0.05$.

表 2 各组大鼠骶韧带组织 COL1A1、COL3A1、TGFβ-3 表达水平($\bar{x} \pm s$)
Table 2 mRNA expressions of COL1A1, COL3A1 and TGFβ-3 in sacral ligament tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	COL1A1	COL3A1	TGFβ-3
A 组 Group A	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06
B 组 Group B	0.99 ± 0.02	0.99 ± 0.04	0.99 ± 0.07
C 组 Group C	0.96 ± 0.04	0.97 ± 0.02	1.22 ± 0.13 [*]
D 组 Group D	0.50 ± 0.08 ^{△□}	0.54 ± 0.03 ^{△□}	1.65 ± 0.06 ^{△□}
F	297.257	327.9	122.33
P	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与 A 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 C 组比较,[□] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with Group A, ^{*} $P < 0.05$. Compared with Group C, [□] $P < 0.05$.

3 讨论

女性盆腔脏器维持正常位置依赖于子宫骶韧带等盆底支撑组织良好的解剖完整性、组织构成及其正常功能^[6]。各种原因损伤的不能自愈的盆底局部解剖上的完整性常常可借助现代不断完善的外科手术而加以解决。而在组织学上,胶原蛋白 I 型和 III 型(COL1A1、COL3A1)在阴道壁及子宫骶韧带的支持功能中扮演了重要的角色,近年来的研究提示,胶原蛋白含量减少引起这类支撑组织生物力学特征的改变是导致 POP 发生的重要原因^[7-11]。POP 疾病的形成过程缓慢,但多有前期引起盆底组织的急性损伤,这种急性损伤常常伴有一个自我修复的过程,TGFβ-3 是参与创伤愈合修复反应的生长因子,能在转录、转录后及翻译水平等多环节增加胶原蛋白的合成^[12-14]。在探讨 POP 疾病的形成过程及各种治疗措施疗效的基础研究中,离不开选择合适的 POP 动物模型的制作以及评价指标。目前尚没有一种固定的 POP 动物模型能为这类研究使用。现有的模型多集中在对压力性尿失禁大鼠动物模型的制作,而这种模型是否适用于因骶韧带为

主引起的 POP 疾病的基础研究中尚缺少文献支持。本研究采用大鼠造模前后生殖器表型及阴道壁和骶韧带中胶原蛋白及 TGFβ-3 的变化来评估其可靠性,以供该类研究制模参考。

现有制作 POP 模型的动物选择主要有小鼠、大鼠、羊、兔子、灵长类动物和猪等。虽然大型动物如羊和灵长类动物(恒河猴等)等因为其与人类最接近的解剖和组织结构、病理生理、激素水平而被认为是 POP 最理想的制模动物,但存在生命周期长、研究费用高、研究场地限制等方面的困难^[15]。啮齿类动物如大鼠虽可能因为存在与人类解剖上的差异,但具有容易获得、生命周期较短、数量多、经济等优点。有研究提示大鼠的阴道壁结构特征及支持组织与人类相似^[16];妊娠及刚阴道分娩后的大鼠阴道壁线性刚度明显下降,且是可逆的,4 周后可恢复至正常^[17];大鼠手术绝经模型因绝经大鼠阴道壁胶原蛋白呈下降趋势^[18]可作为研究 POP 的模型。但骶韧带中这些结构成分的变化如何文献报告尚少。近年来,有两个在其他物种中有关骶韧带的组织学方面的研究为 POP 骶韧带研究的动物模型打下基础,Gruber 等^[19]发现猪具有与人类相似的骶韧

带组织成分,适量而丰富的胶原蛋白和平滑肌,可以作为 POP 研究的动物模型。Iwanaga 等^[20]做了一个人类、大鼠、小鼠骶韧带组织学方面的比较研究,提示比起小鼠,人类和大鼠的骶韧带更为相似的胶原和平滑肌含量,且大鼠骶韧带样本较小鼠大,虽然小鼠有基因敲除后其表型与人类临床相似的优点,但仍认为大鼠是一个 POP 骶韧带相关研究更适合且经济的动物模型来源。考虑到猪作为大型动物在饲养场地、操作等方面的困难,我们选取大鼠作为研究 POP 骶韧带组织变化的模型无论从哪个角度判断均较为合适。

目前压力性尿失禁大鼠模型是在模拟产伤的基础上联合双侧卵巢切除法,因为这些方法模拟了妊娠难产和绝经,这符合压力性尿失禁的重要发病因素。也同样被认为是 POP 患者的主要发病原因,这种经典的方法为大家所应用。但研究表明由于大鼠特殊的盆底解剖特点,目前尚无自发性的 POP 方面的数据。同时妊娠和阴道分娩对于大鼠盆底支持组织生物力特征的影响存在自我修复,而雌激素减退对于盆底组织的影响也是个漫长的过程,选择适时的研究指标检测时机是判断造模成功与否的关键。研究表明大鼠在分娩后 4 周^[17],盆底支持组织可恢复至正常水平,而手术导致的绝经状态始于双侧卵巢切除后 15 d,之后雌激素水平会显著下降^[21]。所以本实验中我们增加密产因素,每次分娩结束即开始下一次妊娠,且在前一次产伤的短期内即二周时再行产伤模拟操作,第 2 次模拟产伤 2 周后即行双卵巢切除术,以增加产伤强度,术后再常规饲养动物 8 ~ 10 周,以增加模型的稳定性及可重复性。

动物模型中盆腔脏器脱垂的客观表型,有一个准确且可重复的量化系统是非常重要的。这样的分级系统在大型动物模型如松鼠猴和狒狒的研究中已被使用^[22-23]。在基因敲除的小鼠脱垂模型中也有一套盆腔器官脱垂量化 (MOPQ) 分级系统^[24-25],这套分级系统中,0 级和 1 级被定义为无脱垂表现;2 级或 3 级是中到重度脱垂;4 级就是严重脱垂了。小鼠的脱垂牵涉到了一个会阴体的向外膨隆,而人类的脱垂是通过 POP-Q 分级系统客观评估其外化表型。本研究结果提示采用本方法制作的大鼠模型没有明显的脱垂表型,D 组表现出了一个轻度的会阴体异常,其生殖道裂孔较 A 组相比增加超过 2 mm。但其表型特征表现为 1 级,如以表型

变化为研究内容的研究本模型的制作并不合适。

另一方面,模型制作后其重要支撑组织中的组织成分变化为相关研究提供客观的观察指标,本研究中我们用免疫组化的方法测定 I 型和 III 型胶原蛋白在各组大鼠阴道前壁中的表达来协同判断 POP 模型造模成功与否,提示大鼠阴道壁以 III 型胶原蛋白为主,这与既往研究一致^[26]。随着损伤强度的增加,与 A 组相比,各组 III 型胶原蛋白的表达均表现出了下降趋势,其中 D 组的 III 型胶原蛋白的表达与 A 组相比存在着显著性下降,这与人类中 POP 患者与非 POP 患者阴道壁中胶原含量有相似的变化^[10,27-28],进一步说明了 D 组可以作为研究 POP 疾病病理生理机制的模型。另外,大鼠阴道前壁 TGF β -3 的表达较 A 组的变化也都能进一步验证。同样,我们使用 RT-PCR 方法分析了骶韧带中 I 型和 III 型胶原蛋白的含量,随着损伤强度的增加,与 A 组相比,各组骶韧带 I 型和 III 型胶原蛋白的表达有依次下降趋势,其中 D 组骶韧带 I 型和 III 型胶原蛋白的表达较 A 组均表现为显著性下降 ($P < 0.05$)。TGF β -3 在骶韧带中的表达随着损伤强度的增加也呈上升趋势,这可能是机体在损伤时的一种应急修复代偿机制,这也与 POP 患者骶韧带组织中 I 型和 III 型胶原蛋白以及 TGF β -3 与非 POP 正常对照组相比时有着相似的变化^[14,29-32],说明 D 组可以作为研究 POP 骶韧带病理生理变化的动物模型。本组模型没有脱垂表型可能与大鼠特殊的不同于人类的解剖有关,就像敲除了 Hoxa11 基因的小鼠与人类 POP 患者一样表现出一个下降的胶原蛋白的表达,但是同样没有脱垂的表现^[33-35]。

不难看出,随着损伤强度的增加能得到我们预期的能作为研究 POP 骶韧带病理生理变化的大鼠模型,且大鼠作为动物模型具有数量多、费用较低、生命周期短等优点,但制作经过是一个耗时耗力的过程,麻醉次数多,且需要开腹手术,有麻醉意外、出血、感染等风险,大鼠死亡率高,造模成功率在 70% 左右,我们在制模入组时大鼠的量大于最后检测标本的数量,就是基于以上风险考虑的。另外疾病的研究不局限于组织学方面的探索,还包括功能方面的研究,骶韧带因其机械性能在盆底脏器正常位置的支持方面起着非常重要的作用,仅仅骶韧带的组织成分的研究不能确定人类和其他物种的骶韧带的机械性能具有相似性,而这恰恰是对 POP 机制研究是必须的,啮齿类因其骶韧带组织样本的大

小而限制了其机械性研究,这就决定了使用这类动物模型研究的相对局限性。

综上所述,我们认识到没有研究 POP 的动物模型是完美的,很多模型可以模拟人类的某个特征,比如组织、解剖或是激素,但没有哪个动物模型能同时代表所有的特征。所以对各类动物行一个彻底的解剖、组织学和盆底韧带等的组成及功能方面的研究,结合他们各自的优缺点和需解决的实际研究问题,从而选择最合适的动物模型开展相关研究。而本研究采用增加模拟产伤强度的基础上联合双侧卵巢切除法制作的大鼠模型,至少可以作为探索与 POP 骶韧带组织胶原变化相关的病理生理变化的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Jelovsek JE, Aher C, Barber MD. Pelvic organ prolapse[J]. Lancet, 2007, 369(9566): 1027-1038.
- [2] Gyhagen M, Bullarbo M, Nielsen TF, et al. Prevalence and risk factors for pelvic organ prolapse 20 years after childbirth: a national cohort study in singleton primiparae after vaginal or caesarean delivery[J]. BJOG, 2013, 120(2): 152-160.
- [3] 王天行, 陈跃来, 尹平, 等. 压力性尿失禁动物模型: 正确选择与研究目的相关实验动物模型的构建方法[J]. 中国组织工程研究, 2018, 2(28): 4557-4561.
Wang TX, Chen YL, Yin P, et al. Animal models of stress urinary incontinence: selection of appropriate construction methods of research objective-related animal models[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2018, 2(28): 4557-4561.
- [4] 陆洋, 沈媛, 罗新. 压力性尿失禁动物模型研究现状[J]. 国外医学妇产科学分册, 2007, 34(2): 118-124.
Lu Y, Shen Y, Luo X. Research status of animal model of stress urinary incontinence[J]. Foreign Med Sci, 2007, 34(2): 118-124.
- [5] 黄健, 程明军, 陈义松, 等. IGF-1 基因及电刺激治疗对产后压力性尿失禁大鼠模型的影响[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 617-621.
Huang J, Cheng MJ, Chen YS, et al. Effect of IGF-1 gene and electric stimulation therapy on the rat model of postpartum stress urinary incontinence[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(6): 617-621.
- [6] DeLancey JO. Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166(6 Pt 1): 1717-1724.
- [7] Gong RQ, Xia ZJ. Collagen changes in pelvic support tissues in women with pelvic organ prolapse[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2019, 234: 185-189.
- [8] Epstein LB, Graham CA, Heit MH. Systemic and vaginal biomechanical properties of women with normal vaginal support and pelvic organ prolapse[J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 197(2): 165.e1-165.e6.
- [9] Rahn DD, Ruff MD, Brown SA, et al. Biomechanical properties of the vaginal wall: effect of pregnancy, elastic fiber deficiency, and pelvic organ prolapse[J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 198(5): 590.e1-590.e6.
- [10] Zhou L, Lee JH, Wen Y, et al. Biomechanical properties and associated collagen composition in vaginal tissue of women with pelvic organ prolapse[J]. J Urol, 2012, 188(3): 875-880.
- [11] Emmerson S, Young N, Rosamilia A, et al. Ovine multiparity is associated with diminished vaginal muscularis, increased elastic fibres and vaginal wall weakness: implication for pelvic organ prolapse[J]. Sci Rep, 2017, 7: 45709.
- [12] 邱铁伟, 朱理, 张玮鑫. 不同浓度胰岛素样生长因子-1 和转化生长因子 β -3 对人肌腱细胞存活和胶原合成的影响[J]. 中华外科杂志, 2012, 50(8): 744-747.
Qiu YW, Zhu L, Zhang WX. The effects of insulin like growth factor 1 and transforming growth factor β -3 at various concentration on tenocyte survival and collagen formation[J]. Chin J Surgery, 2012, 50(8): 744-747.
- [13] Joseph DS, Malik M, Nurudeen S, et al. Myometrial cells undergo fibrotic transformation under the influence of transforming growth factor beta-3[J]. Fertil Steril, 2010, 93(5): 1500-1508.
- [14] 常涛, 王莉娜, 任艺婷. 绝经后女性盆底脏器脱垂患者阴道前壁及主骶韧带中转化生长因子 β -3 及层粘连蛋白 mRNA 的表达[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(6): 699-702.
Chang T, Wang LN, Ren YT. Expressions of TGF β -3 and laminin mRNA in the uterosacral ligament and anterior vaginal wall in woman with pelvic floor dysfunction[J]. Chin Med Clin, 2013, 13(6): 699-702.
- [15] Couri BM, Lenis AT, Borazjani A, et al. Animal models of female pelvic organ prolapse: lessons learned[J]. Expert Rev Obstet Gynecol, 2012, 7(3): 249-260.
- [16] Moalli PA, Howden NS, Lowder JL, et al. A rat model to study the structural properties of the vagina and its supportive tissues[J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 192(1): 80-88.
- [17] Lowder JL, Debes KM, Moon DK, et al. Biomechanical adaptations of the rat vagina and supportive tissues in pregnancy to accommodate delivery[J]. Obstet Gynecol, 2007, 109(1): 136-143.
- [18] Mao M, Li Y, Zhang Y, et al. Tissue composition and biomechanical property changes in the vaginal wall of ovariectomized young rats [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 8921284.
- [19] Gruber DD, Warner WB, Lombardini ED, et al. Anatomical and histological examination of the porcine vagina and supportive structures: In search of an ideal model for pelvic floor disorder evaluation and management[J]. Female Pelvic Med Reconstr, 2011, 17(3): 110-114.
- [20] Iwanaga R, Orlicky DJ, Arnett J, et al. Comparative histology of mouse, rat, and human pelvic ligaments[J]. Int Urogynecol J, 2016, 27(11): 1697-1704.
- [21] Mocan-Hognogi RF, Costin N, Malutan A, et al. Histological

- changes in the vulva and vagina from ovariectomized rats undergoing oestrogen treatment [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2016, 75(4): 467–473.
- [22] Coates KW, Galan HL, Shull BL, et al. The squirrel monkey: an animal model of pelvic relaxation[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 172(2pt 1): 588–593.
- [23] Mattson JA, Kuehl TJ, Yandell PM, et al. Evaluation of the aged female baboon as a model of pelvic organ prolapse and pelvic reconstructive surgery [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(5): 1395–1398.
- [24] Lee UJ, Gustilo-Ashby AM, Daneshgari F, et al. Lower urogenital tract anatomical and functional phenotype in lysyl oxidase like-1 knockout mice resembles female pelvic floor dysfunction in humans[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(2): F545–F555.
- [25] Wieslander CK, Rahn DD, McIntire DD, et al. Quantification of pelvic organ prolapse in mice; vaginal protease activity precedes increased MOPQ scores in fibulin 5 knockout mice[J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(3): 407–414.
- [26] Moalli PA, Howden NS, Lowder JL, et al. A rat model to study the structural properties of the vagina and its supportive tissues [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(1): 80–88.
- [27] Lin SY, Tee YT, Ng SC, et al. Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse [J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2007, 18(1): 43–48.
- [28] Lei L, Song Y, Chen R. Biomechanical properties of prolapsed vaginal tissue in pre- and postmenopausal women [J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2007, 18(6): 603–607.
- [29] Han L, Wang L, Wang Q, et al. Association between pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence with collagen[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(5): 1337–1341.
- [30] Liu C, Wang Y, Li BS, et al. Role of transforming growth factor β -1 in the pathogenesis of pelvic organ prolapse: a potential therapeutic target[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2): 347–356.
- [31] Zeng CY, Liu J, Wang HL, et al. Correlation between autophagy and collagen deposition in patients with pelvic organ prolapse[J]. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*, 2018, 24(3): 213–221.
- [32] 艾阳, 薛丽霞, 陈滢, 等. 补中益气汤对转化生长因子 β 3 及 I Ⅲ型胶原蛋白的影响及其治疗盆腔脏器脱垂的机制研究 [J]. *中国药物与临床*, 2017, 17(1): 41–43.
- Ai Y, Xue LX, Chen Y, et al. Effect of Buzhong Yiqi decoction on transforming growth factor β -3 and type I and type III collagen and its mechanism in the treatment of pelvic organ prolapse[J]. *Chin Med Clin*, 2017, 17(1): 41–43.
- [33] Gabriel B, Watermann D, Hancke K, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in uterosacral ligaments is associated with pelvic organ prolapse[J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2006, 17(5): 478–482.
- [34] Ma Y, Guess M, Datar A, et al. Knockdown of Hoxa11 *in vivo* in the uterosacral ligament and uterus of mice results in altered collagen and matrix metalloproteinase activity[J]. *Biol Reprod*, 2011, 86(4): 100.
- [35] Strinic T, Vulic M, Tomic S, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-1 in uterosacral ligament tissue from women with pelvic organ prolapse [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2010, 89(6): 832–834.

[收稿日期] 2020-05-21