

## · 综述 ·

## 尿道下裂动物模型的建立和应用研究进展

陈嘉波 杨体泉

尽管尿道下裂是小儿泌尿生殖系统的常见病和多发病,但是仍然有很多基础和临床的问题有待解决<sup>[1]</sup>。近二十年来,国内、外的报道均发现尿道下裂发病率大幅上升,其原因何在?尿道下裂的病因和发病机制的研究有何进展?不同尿道成形术的解剖学和病理组织学基础有何区别?不同尿道成形术的近远期疗效有何区别?组织工程尿道的应用和前景如何?由于社会伦理学的限制和前瞻性随机临床试验的难以开展,尿道下裂的病因学和手术学研究通常应用动物模型来模拟。建立尿道下裂动物模型,并应用于相关问题研究,能够提供尽可能接近人体实验的理论数据<sup>[2]</sup>。本文拟就近年来尿道下裂动物模型的建立和应用研究进展加以综述。

## 一、尿道下裂动物模型的建立

尿道下裂动物模型的建立最早见于20世纪中叶,如今已成功建立的动物模型有药物诱发性 and 手术实验性两种。尿道下裂动物模型的建立以药物诱发性多见,诱发药物有抗雄激素类、雌激素类以及其他内分泌干扰因子,实验动物有SD大鼠、CD-1小鼠、ICR小鼠和新西兰兔等。尽管目前药物诱发性尿道下裂动物模型的建立不乏成功的经验,但是仍然缺乏标准化的药物剂量、剂型、给药途径以及实验动物的胎龄等。通过切除部分尿道建立手术实验性的尿道下裂动物模型相对较少,实验动物有犬和新西兰兔等。手术实验性的尿道下裂动物模型建立相对简单,但是更接近于尿道外伤,而不同于真正意义上尿道下裂的尿道缺损。

1. 抗雄激素类药物诱发的尿道下裂动物模型:男性泌尿生殖系统的分化和发育依赖足量的睾酮和完整的雄激素受体( androgen receptor, AR), $5\alpha$ -还原酶将睾酮转化成活性更高的双氢睾酮( androstenedione, DHT),DHT或睾酮与AR结合,调节雄激素依赖的基因表达,从而影响中肾管和生殖结节的分化和发育。抗雄激素类药物通过影响睾酮生成或睾酮转化DHT以及阻断AR等机制导致尿道下裂发生<sup>[3]</sup>。氟他胺为非甾体类抗雄激素药物,代谢产物小羟基氟他胺是主要活性形式,与DHT竞争性结合AR,抑制靶组织摄取DHT,从而导致尿道下裂发生。Foster等<sup>[4]</sup>证实对SD大鼠给予氟他胺单剂量 $50\text{ mg/kg}$ 可导致仔鼠出现尿道下裂,其中以孕17d母鼠诱发成功率最高。Kim等<sup>[5]</sup>进一步发现诱发成功率与氟他胺剂量和时间呈正相关,对孕12~17d SD大鼠管饲 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,维持30d,此阶段的仔鼠尿道下裂诱发成功率最高。非那雄胺是另一种常用的抗雄激素类药物,为4-氮杂甾体化合物,是 $5\alpha$ -还原酶特异性抑制剂,它可以通过阻断睾酮转化为DHT,从而导致尿道下裂发生。杨晓峰等<sup>[6]</sup>证实对孕19d新西兰兔,只需要给予非那雄胺 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连续给药4~7d,幼崽尿道下裂发生率为22.2%~100%。

2. 雌激素类药物诱发的尿道下裂动物模型:流行病学研究发现,雌激素作为一种环境内分泌干扰物质,可能是近年来尿道下裂发病率大幅增加的原因之一。高浓度雌激素通过下丘脑-垂体-性腺轴的影响间接抑制睾酮的分泌,导致体内雄激素水平下降,从而发挥抗雄激素作用。雌二醇是最常用的雌激素类药物,通过与DHT竞争性结合AR的配体结合区,阻止睾酮或DHT与AR结合,从而抑制AR调节的雄激素依赖基因的表达<sup>[7]</sup>。Lju等<sup>[8]</sup>证实对孕12~17d的CD-1仔鼠,给予17- $\alpha$ -乙炔雌二醇 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,仔鼠尿道下裂发生率为48.6%。贺厚光等<sup>[9]</sup>亦证实对孕12~16d ICR小鼠连续5d皮下注射苯甲酸雌二醇可以成功诱发仔鼠尿道下裂,并且发现 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 可能是最适合的剂量。

3. 其他内分泌干扰因子诱发的尿道下裂动物模型:拟雌激素作用的化合物被称为环境雌激素( environmentalestrogens, EES)或环境内分泌干扰物( environmental endocrine disruptors, EEDS)。EES干扰人类雄性胚胎的泌尿生殖结节分化,从而导致尿道下裂。植物雌激素是拟雌激素类物质之一。其分子结构与哺乳动物雌激素相似,能够与哺乳动物甾体雌激素受体( estrogen receptor, ER)结合,表现出弱的雌激素活性,如大豆异黄酮、金雀异黄酮、木酚素类和黄豆素类等。某些工业化学物质,如邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、利谷隆、敌敌畏(DDVP)、滴滴涕(DDT)等,该类物质能够抑制睾酮形成和阻碍靶组织利用睾酮,从而影响雄性泌尿生殖系统发育。Jiang等<sup>[10]</sup>证实对孕14~18d的SD大鼠给予DBP $700\sim 1000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,仔鼠尿道下裂发生率为6.8%~41.3%。黄鲁刚等<sup>[11]</sup>对孕12~17d的SD大鼠管饲DDVP $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,仔鼠尿道下裂发生率为25%。

4. 手术实验性尿道下裂动物模型的建立:药物诱发的尿道下裂动物模型大多为小鼠或大鼠,通常应用于病因学研究,但由于小鼠尿道下裂阴茎的短小,通常长度小于1cm,故难以实行尿道成形术和开展手术学研究。因此学者们选择较大动物,通过直接切除部分尿道来建立尿道下裂动物模型,再施行尿道成形术并进行手术学研究。比如Leslie等<sup>[12]</sup>利用新西兰兔建立手术实验性尿道下裂模型,设计三种尿道切除方式和尿道成形手术,分别是尿道前壁部分切除尿道成形术、尿道前壁部分切除加尿道后壁纵向切开尿道成形术、尿道前壁部分切除加尿道后壁切开嵌插包皮皮瓣尿道成形术,并比较不同手术的优劣。相似的研究在犬类动物也容易施行。

## 二、尿道下裂动物模型的应用研究进展

1. 尿道下裂病因学研究:人类性别分化和生殖器官发育涉及基因表达与调控,性激素合成,性激素与靶器官结合,细胞信号通道等一系列环节。通过药物诱导建立尿道下裂动物模型,模拟内分泌因素、遗传因素以及环境因素在尿道下裂形成中的作用,从而研究尿道下裂的病因和发病机制。

决定人类性别分化的基因有SRY、WT1、HOX、FGF、Shh、 $5\alpha$ -还原酶II基因、AR基因以及LH受体基因等,其中SRY和WT1

与睾丸发育相关,HOX、FGF、Shh与阴茎发育相关<sup>[13]</sup>。上述基因发生突变或表达异常均可导致尿道下裂发生。Kim等<sup>[5]</sup>发现孕期暴露于DBP和氟他胺的SD大鼠,子代尿道下裂发生率与药物剂量呈正相关,其近端尿道上皮中的5 $\alpha$ -还原酶II基因、AR基因表达明显下降,而雌激素受体表达增加。Bhoj等<sup>[14]</sup>发现BNC2/Bnc2基因在人和鼠的尿道周围组织中大量表达,如果该基因在9号染色体与13号染色体出现平衡易位,则可能导致远端尿道发育障碍。Kurokawa等<sup>[15]</sup>发现氟他胺诱导的SD大鼠尿道下裂模型,其生殖结节和包皮中催乳素诱导蛋白(Pip/PIP)较正常水平低,提示Pip/PIP与尿道下裂发生有关。

DHT或睾酮必须与AR结合才能发挥雄性化作用。Rider等<sup>[16]</sup>发现AR拮抗物如DBP、BBP、DEHP等,能抑制由雄激素调节的基因表达,抑制睾酮诱导的性别分化,导致尿道下裂发生。Zhang等<sup>[17]</sup>利用DBP诱导建立鼠尿道下裂模型,发现DBP通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路影响生殖结节发育,其关键蛋白是 $\beta$ -catenin, $\beta$ -catenin在尿道下裂鼠的尿道板中表达下降。Miyagawa等<sup>[18]</sup>利用基因敲除建立鼠尿道下裂模型,发现hedgehog信号通路对男性外生殖器成形至关重要,在胚胎时期其关键蛋白为Gli2,Gli2基因表达水平下降会影响雄性激素对靶组织的作用,从而影响男性外生殖器发育。

EES或EEDS等环境因素在尿道下裂中的发病机制是近年来的研究热点。Ross等<sup>[19]</sup>认为妊娠期暴露于金雀异黄素可以导致组织形态、细胞增殖和细胞凋亡的路径发生变异,特别是MAPK基因和TGF- $\beta$  MAPK信号通路等发生改变,从而导致尿道下裂发生。黄鲁刚等<sup>[11]</sup>利用DDVP诱导建立大鼠尿道下裂模型,发现其睾丸组织中Leydig细胞数量和Calretinin蛋白明显少于对照组,从而推测DDVP导致胎鼠睾丸中Leydig细胞受损,进而胎鼠雄激素水平降低,可能是尿道下裂的发病机制之一。

2. 尿道下裂尿道成形术后尿道瘢痕组织学研究:尿道狭窄是尿道下裂尿道成形术后的严重并发症,往往需要多次手术才能矫正,甚至最终造成阴茎橡皮样肿、阴茎残废也不在少见。尿道狭窄的原因是新尿道组织瘢痕的形成与增生。而尿道瘢痕的增生又与成纤维细胞、胶原生长因子及胶原酶等密切相关。组织微环境的改变和局部内分泌因子的影响都会造成瘢痕的增生。Hafez等<sup>[20]</sup>利用兔建立手术实验性尿道下裂模型,并实行尿道板卷管尿道成形手术修复尿道。结论是尿道修复取决于尿道上皮再生和周围纤维组织形成,尿道支架的安放与留置时间与尿道愈合的结果没有直接关系。TGF- $\beta$ 1是目前已知与创伤修复、组织瘢痕形成关系最密切、最有代表性的生长因子,TGF- $\beta$ 1的生理作用是刺激微血管生成和创伤组织的上皮化愈合,刺激成纤维细胞增殖、分化,促进肉芽组织形成。曹国锋<sup>[21]</sup>利用兔建立手术实验性尿道下裂模型,分别实行尿道板纵切卷管尿道成形手术、尿道口基底皮瓣翻转尿道成形手术、加盖包皮带蒂岛状皮瓣尿道成形手术修复尿道。发现尿道板卷管尿道成形手术组与尿道口基底皮瓣翻转尿道成形手术组和加盖包皮带蒂岛状皮瓣尿道成形手术组比较,尿道瘢痕TGF- $\beta$ 1与 $\alpha$ -SMA表达最弱,并认为成纤维细胞和肌成纤维细胞可能是尿道下裂术后尿道狭窄形成及加重的病理基础。

3. 手术方式的研究:虽然尿道下裂手术有300余种,但是没有一种手术可以完全避免尿道瘘、尿道憩室、尿道狭窄等并发症的发生,因此不同手术的解剖学和病理组织学原理值得探索。兔阴茎和尿道的胚胎发育过程与人类相近,包括相似的尿道板卷曲形成尿道腔的发育过程,拥有相似的阴茎海绵体、包皮及

背、外侧血管神经分布等,是理想的研究尿道下裂的动物模型<sup>[22]</sup>。杨晓峰等<sup>[23]</sup>利用非那雄胺建立兔尿道下裂模型,采用计算机三维成像技术研究包皮血管分布规律,结论是正常包皮血管呈单支主干型,前端型尿道下裂包皮血管呈双支主干型,近端型尿道下裂包皮血管呈网状型。Leslie等<sup>[24]</sup>利用兔尿道下裂模型施行改良加盖包皮带蒂岛状皮瓣尿道成形手术,尿道板切断后新尿道后壁嵌插睾丸鞘膜,前壁加盖包皮带蒂岛状皮瓣。术后4个月组织病理学检查,发现嵌插的鞘膜逐渐被复层上皮取代,形成类似于尿道移行细胞的结构。Leslie认为运用睾丸鞘膜的改良inlay-onlay手术(耦合式后壁镶嵌游离组织-前壁加盖带蒂岛状皮瓣手术)适合修复需要切断尿道板的重度尿道下裂。Eassa等<sup>[25]</sup>利用兔尿道下裂模型施行尿道板纵切卷管尿道成形手术,观察尿道后壁纵切后组织愈合规律。发现尿道纵切后组织延展宽度有限,难以超过2mm。当纵切处上皮化愈合完成后,局部组织延展也随之停止。合适的尿道支架安放可能有利于组织延展。

4. 组织工程尿道研究:通过组织工程尿道按照组织来源的不同分为两种,即单纯人工支架材料形成组织工程尿道,以及人工支架材料与机体自体细胞组合形成组织工程尿道。前者是将单纯支架材料植入人体,支架逐渐被周围宿主细胞降解、吸收,并最终被宿主细胞替代,从而使尿道缺损得以修复。由于单纯支架材料被证实远期易出现尿道挛缩,因此逐渐被后者即人工-细胞支架复合物替代。人工-细胞支架复合物是指将种子细胞与支架材料共同构建组织工程尿道后再移植人体,通过种子细胞与宿主细胞共同参与修复尿道缺损<sup>[26]</sup>。所谓种子细胞即能够形成类似于尿道上皮细胞的人体自身的细胞,目前已经证实自体尿路上皮细胞和口腔黏膜细胞是比较理想的种子细胞。目前已经被证实的人工支架材料常用的是聚羟基乙酸(PGA)和透明质酸复合物。当然去细胞基质移植体(ACMG)如小肠黏膜下层(SIS)、膀胱黏膜下层(BAMG)、尿道细胞外基质(UECM)可能是理想的生物类支架材料<sup>[27]</sup>。在临床应用方面,对于重度尿道下裂,将组织工程尿道作为新尿道后壁,再结合加盖包皮带蒂岛状皮瓣尿道成形手术完成尿道重建已经被证实是行之有效的方法,Fossum等<sup>[28]</sup>利用自体膀胱上皮细胞体外培养形成种子细胞,铺设并镶嵌于新尿道后壁纵切处,同时结合加盖包皮带蒂岛状皮瓣尿道成形手术完成全部尿道重建。所有6例患者随访6~8年,结论是近远期疗效满意。完全的组织工程尿道代替新尿道完成尿道下裂修复在现阶段尚没有成功报道,由于组织工程尿道的预血管化问题难以解决,在可预见的将来,组织工程尿道仍然只能是实验室的热点,临床实践可能仅仅局限在部分尿道缺损的组织工程化。

### 三、结语

药物诱导或手术切除均可以有效建立尿道下裂动物模型,并成为尿道下裂病因、发病机制、手术原理、组织工程尿道等研究的有效平台。下一步有待解决的问题有以下几点,比如药物诱导尿道下裂动物模型建立的标准化和固态化;基因工程动物模型的建立和病因学应用;药物诱导更大型动物模型的建立和手术学应用;组织工程尿道预血管化的解决和临床应用等。

### 参 考 文 献

- [1] Li YH, Mao M, Dai L, et al. Time trends and geographic variations in the prevalence of hypospadias in China. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2012, 94: 36-41.
- [2] Lalla M, Gregersen H, Olsen LH, et al. *In vivo* biomechanical assess-



- ment of anterior rabbit urethra after repair of surgically created hypospadias. *J Urol*, 2010, 184:675-680.
- [3] 姜华, 达骏, 王忠. 尿道下裂动物模型的研究进展. *中华男科学杂志*, 2008, 22:66-70.
- [4] Foster PM, Harris MW. Changes in androgen-mediated reproductive development in male rat offspring following exposure to a single oral dose of flutamide at different gestational ages. *Toxicol Sci*, 2005, 85:1024-1032.
- [5] Kim TS, Jung KK, Kim SS, et al. Effects of in utero exposure to DI (n-Butyl) phthalate on development of male reproductive tracts in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A*, 2010, 73:1544-1559.
- [6] 杨晓峰, 李德彪, 韩雪冰, 等. 人绒毛膜促性腺激素调控尿道下裂兔阴茎组织血管内皮生长因子的研究. *中华泌尿外科杂志*, 2008, 29:643-647.
- [7] Kalfa N, Paris F, Sover-Gobillard MO. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil Steril*, 2011, 95:2574-2577.
- [8] Lju B, Agras K, Wimnham E, Vilela ML, et al. Activating transcription factor 3 is estrogen-responsive in utero and upregulated during sexual differentiation. *Horm Res*, 2006, 65:217-222.
- [9] 贺厚光, 张炜, 吴天麟, 等. 苯甲酸雌二醇导致小鼠尿道下裂动物模型的建立. *中华男科学杂志*, 2007, 13:3-8.
- [10] Jiang J, Ma L, Yuan L, et al. Study on developmental abnormalities in Hypospadias male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicology*, 2007, 232:286-293.
- [11] 黄鲁刚, 林萃, 龚春雨, 等. 有机磷农药-敌敌畏诱导大鼠尿道下裂动物模型睾丸组织的病理学初步观察. *中华男科学杂志*, 2006, 12:693-695.
- [12] Leslie B, Jesus LE, El-Hout Y, et al. Comparative histological and functional controlled analysis of tubularized incised plate urethroplasty with and without dorsal inlay graft: a preliminary experimental study in rabbits. *J Urol*, 2011, 186:1631-1637.
- [13] Kalfa N, Philibert P, Sultan C. Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation. *Int J Androl*, 2009, 32:187-197.
- [14] Bhoj EJ, Ramos P, Baker LA, et al. Human balanced translocation and mouse gene inactivation implicate Basonuclin 2 in distal urethral development. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19:540-546.
- [15] Kurokawa S, Kojima Y, Mizuno K, et al. Association of prolactin-induced protein with preputial development of hypospadias. *BJU Int*, 2012, 109:926-932.
- [16] Rider CV, Furr JR, Wilson VS, et al. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl*, 2010, 33:443-462.
- [17] Zhang LF, Qin C, Wei YF, et al. Differential expression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the genital tubercle (GT) of fetal male rat following maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Syst Biol Reprod Med*, 2011, 57:244-250.
- [18] Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, et al. The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology*, 2011, 152:2894-2903.
- [19] Ross AE, Marchionni L, Phillips TM, et al. Molecular effects of genistein on male urethral development. *J Urol*, 2011, 185:1894-1898.
- [20] Hafez AT, Herz D, Bägli D, et al. Healing of unstented tubularized incised plate urethroplasty: an experimental study in a rabbit model. *BJU Int*, 2003, 91:84-88.
- [21] 曹国锋. 尿道下裂术后尿道狭窄细胞生物学基础研究. *南通大学学报:医学版*, 2011, 31:184-189.
- [22] Lalla M, Riis C, Jørgensen CS, et al. A biomechanical, histological and biochemical study in an experimental rabbit hypospadias repair model using scanning acoustic microscopy. *J Pediatr Urol*, 2011, 7:404-411.
- [23] 杨晓峰, 戎冬文, 韩雪冰. 计算机三维重现兔先天性尿道下裂包皮血管. *现代泌尿外科杂志*, 2008, 13:48-51.
- [24] Leslie B, Barboza LL, Souza PO, et al. Dorsal tunica vaginalis graft plus onlay preputial island flap urethroplasty: experimental study in rabbits. *J Pediatr Urol*, 2009, 5:93-99.
- [25] Eassa W, He X, El-Sherbiny M. How much does the midline incision add to urethral diameter after tubularized incised plate urethroplasty? An experimental animal study. *J Urol*, 2011, 186:1625-1629.
- [26] 李虹, 罗德毅. 尿道修复重建进展. *现代泌尿外科杂志*, 2012, 17:6-9.
- [27] Atala A. Bioengineered tissues for urogenital repair in children. *Pediatr Res*, 2008, 63:569-575.
- [28] Fossum M, Skikuniene J, Orrego A, et al. Prepubertal follow-up after hypospadias repair with autologous in vitro cultured urothelial cells. *Acta Paediatr*, 2012, 101:755-760.

(收稿日期:2013-04-19)

(本文编辑:郝锐)

陈嘉波, 杨体泉. 尿道下裂动物模型的建立和应用研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(10):4504-4506.