

· 基础研究 ·

# 维生素 A 缺乏导致新生大鼠枕颈部畸形的机制研究

刘楚吟<sup>1</sup>, 麻昊宁<sup>2</sup>, 朱宝<sup>1</sup>, 董春科<sup>1</sup>, 颜勤华<sup>1</sup>, 谭明生<sup>3</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京协和医学院, 北京 100730;

3. 中日友好医院, 北京 100029)

**摘要 目的:**探讨维生素 A 缺乏导致新生大鼠枕颈部畸形的作用机制。**方法:**将 40 只 5 周龄雌性健康 SPF 级 SD 大鼠随机分为 2 组, 正常对照组 20 只, 维生素 A 缺乏组 20 只; 20 只适龄雄性健康 SPF 级 SD 大鼠分笼饲养。正常对照组饲以 AIN-93M 饲料, 维生素 A 缺乏组饲以缺乏维生素 A 的 AIN-93M 饲料, 雄性大鼠饲以 AIN-93M 饲料。饲养至第 10 周从雌性大鼠的目外眦取血, 采用酶联免疫吸附法检测 2 组雌鼠血清维生素 A 含量, 鉴定大鼠模型。造模成功后, 将大鼠按雌 2 雄 1 的比例合笼交配, 第 2 天清晨检查阴栓, 有阴栓者记为 E0 d。于妊娠 E11.5 d 取 2 组半数的孕鼠, 麻醉处死后剖腹, 每只孕鼠取出 2 只胚胎, 剥离被膜, 置于液氮中, 然后转移至 -80 °C 的冰箱里保存待测。于妊娠 E21 d 取新生鼠, 麻醉处死后剥离皮肤筋膜以及内脏, 置于 95% 的酒精中固定待测。采用 RT-qPCR 方法检测胚胎 Hoxd3 基因 mRNA 表达情况; 采用双色染色法制作大鼠骨骼标本, 观察新生鼠枕颈部骨骼发育情况。**结果:**①雌鼠血清维生素 A 含量。维生素 A 缺乏组大鼠血清维生素 A 含量明显低于正常对照组 [(214 ± 39) ng · mL<sup>-1</sup>, (432 ± 54) ng · mL<sup>-1</sup>,  $t = 14.636, P = 0.000$ ]。②胚胎 Hoxd3 基因 mRNA 的表达量。维生素 A 缺乏组胚胎 Hoxd3 基因表达量低于正常对照组 (0.58 ± 0.11, 1.03 ± 0.14,  $t = 10.407, P = 0.000$ )。③新生鼠枕颈部骨骼形态。正常对照组可见枕骨与寰枢椎发育正常, 对位关系良好; 维生素 A 缺乏组可见寰椎后弓与枕骨大孔后缘角度增大, 寰枢椎对位关系异常, 寰枢椎后弓角度增大, C<sub>2</sub> ~ C<sub>7</sub> 椎弓及棘突高度降低、宽度变窄, 且相邻椎体间隙增大。**结论:**维生素 A 缺乏可以导致新生大鼠枕颈部结构发育异常, 这可能与其胚胎发育期 Hoxd3 基因 mRNA 表达水平下降有关, 但其具体的分子生物学机制还有待进一步研究。

**关键词** 维生素 A 缺乏; 枕骨; 颈椎; 先天畸形; Hoxd3 基因; 动物实验

## Research on the mechanism of occipito - cervical deformity induced by vitamin A deficiency in neonatal rats

LIU Chuyin<sup>1</sup>, MA Haoning<sup>2</sup>, ZHU Bao<sup>1</sup>, DONG Chunke<sup>1</sup>, YAN Qinhua<sup>1</sup>, TAN Mingsheng<sup>3</sup>

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

3. China - Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the mechanism of occipito - cervical deformity induced by vitamin A deficiency in neonatal rats.

**Methods:** Forty healthy 5 - week - old female SPF - grade SD rats were randomly divided into 2 groups, 20 rats in each group. The female rats were respectively fed with normal AIN - 93M stoyer (normal control group) and AIN - 93M stoyer lacking in vitamin A (vitamin A deficiency group, VAD group). Meanwhile, 20 healthy male SPF - grade SD rats were recruited and fed with AIN - 93M stoyer in separate cages. Ten weeks later, serum content of vitamin A were detected in female rats by enzyme - linked immunosorbent assay to identify the rat models. After successful modeling, the rats were mated according to the female - male ratio of 2 : 1. In the next morning, the female rats were examined in vaginal plug and rats which had vaginal plug were recorded as E0 d. At 11.5 days after gestation, half of the pregnant rats were anesthetized and sacrificed. The belly of each pregnant rat were cut open and two embryos were fetched out and their capsules were stripped. The embryos were placed in liquid nitrogen and then were transferred to refrigerator and reserved at -80 °C. On 21st gestational day, neonatal rats were anesthetized and sacrificed. Their skins and fascias were stripped and their internal organs were removed. Then the neonatal rats were reserved in 95% alcohol. The qRT - PCR assays was used for detecting the Hoxd3 mRNA expression in embryos and the bicolor staining method was used for observing the development of occipito - cervical bone of neonatal rats. **Results:** The serum contents of vitamin A were obviously lower in the VAD group compared to the control group (214 +/- 39 vs 432 +/- 54 ng/mL,  $t = 14.636, P = 0.000$ ). The Hoxd3 mRNA expression in embryos was obviously lower in the VAD group compared to the control group (0.58 +/- 0.11 vs

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81173423)

通讯作者: 谭明生 E-mail: zrtanms@sina.com

1.03 ± 0.14,  $t = 10.407$ ,  $P = 0.000$ ). Normally developed occipital bone, atlas and axis and right contraposition of atlanto-axial joint were found in the control group. However, in the VAD group the angle between posterior arch of atlas and posterior margin of great occipital foramen increased, and contraposition of atlanto-axial joint was abnormal. Atlantoaxial angle and intervertebral space increased, while the height and width of vertebral arch and spinous process of C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub> decreased. **Conclusion:** Vitamin A deficiency can lead to occipito-cervical dysplasia in neonatal rats, which may be related to decrease in Hoxd3 mRNA expression in embryonic development period. However, the specific molecular mechanism needs to be further studied.

**Key words** vitamin A deficiency; occipital bone; cervical vertebrae; congenital abnormalities; Hoxd3 gene; animal experimentation

维生素 A 在体内生成的代谢物—视黄酸 (retinoic acid, RA), 在动物胚胎发育过程中发挥着重要的调控作用。包括枕颈部在内的中轴骨的发育受 Hox 基因的调控, 而 RA 位于 Hox 基因上游, 抑制或增强 Hox 基因的表达<sup>[1]</sup>。外源性的 RA 干预或内源性的 RA 缺乏均可以导致 Hox 基因表达的异常。研究表明, 维生素 A 缺乏的孕鼠其子代出现先天性枕颈部畸形, 与 Hox 基因家族成员—Hoxd3 基因有着密切的联系<sup>[2]</sup>。本文旨在探讨维生素 A 缺乏导致新生大鼠枕颈部畸形的作用机制。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 5 周龄雌性健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 体质量 (131.4 ± 8.7) g; 适龄雄性健康 SPF 级 SD 大鼠 20 只, 体质量 (149.2 ± 10.2) g, 均购自北京华阜康生物科技有限公司 [许可证号: SCXK(京)2014-0004], 由中日友好医院实验动物中心饲养 [许可证号: SYXK(京)2015-0017]。实验通过医学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 实验试剂** RT-qPCR 试剂盒、RNA 提取 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); M-MLV 逆转录酶、dNTP 溶液 (10 mM)、Premix Ex Taq (日本 TAKARA 公司)、DL2000DNA 分子量标准 (宝生物工程有限公); 脱氧核糖核酸酶 I (Deoxyribonuclease I, DNase I)、6 × Loading Buffer (美国 MBI 公司); 琼脂糖 (西班牙 Biowest 公司); RNase-free H<sub>2</sub>O (韩国 Walgene 公司); Eva\_green (美国 Biotium 公司)。

**1.3 仪器和设备** 2720 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Mupid 2plus 水平电泳槽 (日本 TAKARA 公司); image system (EUV-LDUV) 凝胶成像系统 (韩国 KoreaBiotech 公司); centrifuge (MICRO, 17TR) 离心机 (韩国 Hanil 公司); 2.5 μL/10 μL/100 μL/200 μL/1000 μL 移液器 (德国 Eppendorf 公司); LS-B50L 型灭菌器 (中国江阴滨江医疗设备有限公司); DW-40L262 型冰箱 (青岛海尔公司); Vortex-Genie2 漩涡

混合器 (美国 SI 公司); DHG-9240A 型鼓风干燥箱 (上海一恒公司)。

## 2 方法

**2.1 分组方法** 采用抽签法将 5 周龄雌性健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只随机分为 2 组, 正常对照组 20 只, 维生素 A 缺乏组 20 只。20 只 SD 雄性大鼠分笼饲养。

**2.2 造模方法** 正常对照组饲以 AIN-93M 饲料 (表 1), 维生素 A 缺乏组饲以缺乏维生素 A 的 AIN-93M 饲料。雄性大鼠饲以 AIN-93M 饲料。实验期间所有大鼠自由饮水、进食, 自然光照, 室温 20 ~ 25 °C, 湿度 55% ~ 60%。每周注意观察动物是否出现维生素 A 缺乏症状, 如食欲减少、胡须掉落、尾根部脱毛、角膜溃疡、反应淡漠等。

表 1 AIN-93M 饲料配方

| 饲料配方  |                               | 混合无机盐 |                               | 混合维生素   |                               |
|-------|-------------------------------|-------|-------------------------------|---------|-------------------------------|
| 成分    | 单位<br>(g · kg <sup>-1</sup> ) | 成分    | 单位<br>(g · kg <sup>-1</sup> ) | 成分      | 单位<br>(g · kg <sup>-1</sup> ) |
| 玉米淀粉  | 466                           | 碳酸钙   | 357                           | 尼克酸     | 3.000                         |
| 干酪素   | 140                           | 磷酸钾   | 250                           | 泛酸钙     | 1.600                         |
| 糊精    | 155                           | 氯化钠   | 74                            | 维生素 B6  | 0.700                         |
| 蔗糖    | 100                           | 硫酸钾   | 46.6                          | 维生素 B1  | 0.600                         |
| 纤维素   | 40                            | 柠檬酸钾  | 28                            | 核黄素     | 0.600                         |
| 大豆油   | 40                            | 氧化镁   | 24                            | 叶酸      | 0.200                         |
| 混合无机盐 | 35                            | 柠檬酸铁  | 6.06                          | 生物素     | 0.020                         |
| 混合维生素 | 10                            | 碳酸锌   | 1.65                          | 维生素 B12 | 22.500                        |
| L-胱氨酸 | 1.8                           | 铬酸锰   | 0.63                          | 维生素 E   | 15.000                        |
| 酒石酸盐  | 2.5                           | 碳酸铜   | 0.3                           | 维生素 D3  | 0.250                         |
|       |                               | 碘酸钾   | 0.01                          | 维生素 K   | 0.075                         |
|       |                               | 硅酸钠   | 0.01025                       | 维生素 A   | 0.800                         |
|       |                               | 氧化铬   | 0.275                         |         |                               |
|       |                               | 硼酸    | 0.0815                        |         |                               |
|       |                               | 氟化钠   | 0.0635                        |         |                               |

**2.3 模型鉴定方法** 饲养至第 10 周维生素 A 缺乏组出现维生素 A 缺乏症状时, 从雌性大鼠的目外眦取血, 采用酶联免疫吸附法<sup>[3]</sup>检测 2 组雌鼠血清维生素 A 水平, 鉴定大鼠模型。

**2.4 取材方法** 造模成功后, 将大鼠按雌 2 雄 1 的

比例合笼交配,第 2 天清晨检查阴栓,有阴栓者记为 E0 d。于妊娠 E11.5 d 取 2 组半数的孕鼠,麻醉处死后剖腹,每只孕鼠取出 2 只胚胎,剥离被膜,迅速置于液氮中,然后转移至 -80 ℃ 的冰箱里保存待测。于妊娠 E21 d 取新生鼠,麻醉后处死,剥离皮肤筋膜以及内脏,置于 95% 的酒精中固定待测。

### 2.5 实验指标测定方法

**2.5.1 Hoxd3 基因 mRNA 检测** 按 RT-qPCR 试剂盒的说明检测妊娠 E11.5 d 胎鼠 Hoxd3 基因 mRNA 表达水平。Hoxd3 基因上游引物序列 5' - GACTCTAATCTGGTAATGGTGTCCCTA - 3', 下游引物序列 5' - TCTTTACAGGAGGGGACGGA - 3', 产物长度 159 bp。用 Trizol 通用型 RNA 快速提取试剂盒,提取样品 RNA,最后加入 30 μL 无 RNase 的水,溶解 RNA。RNA 反转录为 cDNA 后,以此为模板,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参,用引物进行 PCR 扩增。扩增条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 15 s, 65 ℃ 退火 30 s, 扩增 40 个循环, 72 ℃ 延伸 5 min, 于 4 ℃ 终止反应。120 V 电压下电泳 20 min, 电泳结束后在凝胶紫外分析仪照相, 记录保存数据。Real Time PCR 反应完成后, 系统软件将自动给出每个样本扩增的 Ct 值, 又根据目的基因和管家基因的 Ct 值, 计算出目的基因的相对表达量, 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示, 并用此方法计算。

**2.5.2 新生鼠骨骼标本制备及观察** 采用赵荧等<sup>[4]</sup>所使用的复合染色法将新生鼠的骨骼和软骨分别染色, 保存于甘油中, 在体视显微镜下观察新生鼠枕颈部骨骼发育情况。

**2.6 数据统计学方法** 采用 SPSS20.0 统计软件对所得数据进行统计学处理, 2 组雌鼠血清维生素 A 含量以及大鼠胚胎 Hoxd3 基因表达量的组间比较采用 *t* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

**3.1 雌鼠血清维生素 A 含量** 维生素 A 缺乏组大鼠血清维生素 A 含量明显低于正常对照组(表 2)。

表 2 2 组雌鼠血清维生素 A 含量的比较 ng · mL<sup>-1</sup>

| 组别         | 例数 | 血清维生素 A 含量 |
|------------|----|------------|
| 维生素 A 缺乏组  | 20 | 214 ± 39   |
| 正常对照组      | 20 | 432 ± 54   |
| <i>t</i> 值 |    | 14.636     |
| <i>P</i> 值 |    | 0.000      |

**3.2 胚胎 Hoxd3 基因 mRNA 的表达量** 维生素 A 缺乏组胚胎 Hoxd3 基因表达量低于正常对照组(表 3), 见图 1、图 2。

表 3 2 组大鼠胚胎 Hoxd3 基因 mRNA 表达量的比较

| 组别         | 例数 | Hoxd3 基因 mRNA 表达量 |
|------------|----|-------------------|
| 维生素 A 缺乏组  | 20 | 0.58 ± 0.11       |
| 正常对照组      | 20 | 1.03 ± 0.14       |
| <i>t</i> 值 |    | 10.407            |
| <i>P</i> 值 |    | 0.000             |

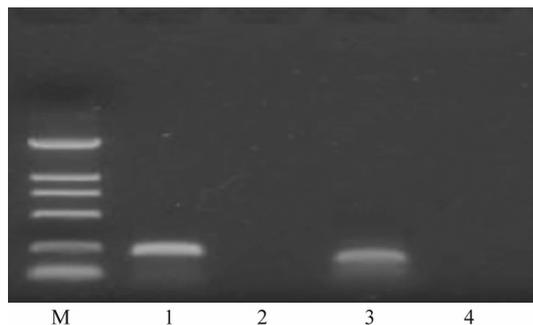


图 1 胚胎 Hoxd3 基因 mRNA 扩增产物

M(Marker)为 DL2000;1 为 GAPDH;2 为 GAPDH 阴性对照;3 为 Hoxd3 基因;4 为 Hoxd3 对照

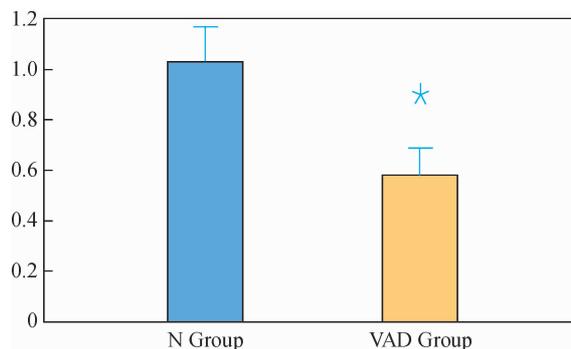


图 2 胚胎 Hoxd3 基因 mRNA 的表达

N 为正常对照组, VAD 为维生素 A 缺乏组

**3.3 新生鼠枕颈部骨骼形态** 正常对照组可见枕骨与寰枢椎发育正常, 对位关系良好[图 3(1)]; 维生素 A 缺乏组可见寰椎后弓与枕骨大孔后缘角度增大, 寰枢椎对位关系异常, 寰枢椎后弓角度增大, C<sub>2</sub> ~ C<sub>7</sub> 椎弓及棘突高度降低、宽度变窄, 且相邻椎体间隙增大[图 3(2)]。

## 4 讨论

中轴骨的发育是一个非常复杂的过程, 需要各种调控基因按照一个严密有序的方式相互协调作用才能完成脊柱完整的发育。在胚胎期, 三胚层形成后, 中胚层分化为轴旁中胚层、间介中胚层和侧中胚层。其中轴旁中胚层断裂成团块状, 称为体节。体节的发生是中轴骨形成的基础<sup>[5]</sup>。体节出现后 10 d 内, 共

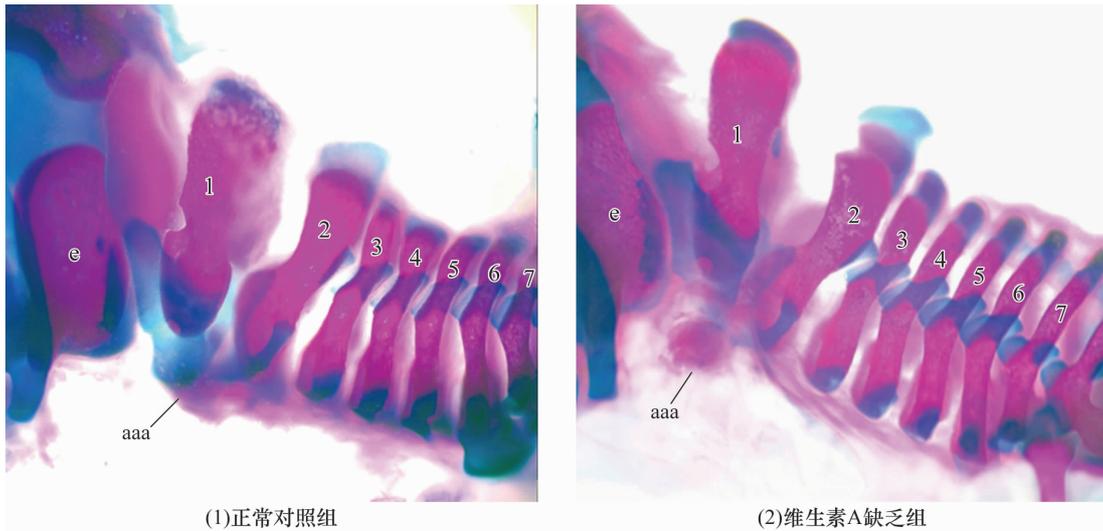


图 3 新生鼠枕颈部骨骼染色结果(×25)

e 指枕骨髁;aaa 指寰椎前弓

形成 42 ~ 44 对体节,逐步分化成颈椎、肋骨、肌腱、肋间和骨骼的肌肉<sup>[6]</sup>。枕颈部结构包括围绕枕骨大孔的枕骨、寰椎、枢椎及其周围韧带共同构成,由体节中的 2、3、4 枕节和第 1 颈节及寰椎的 3 个原发骨化中心分化形成<sup>[7]</sup>。枕颈部畸形是指寰枢椎及其附属结构和与之相连的枕骨及其包含其中的神经组织等,由于先天发育因素造成的解剖结构异常,有时伴发远部畸形。寰枕融合、颅底凹陷、齿状突发育不良是最常见的枕颈部畸形。枕颈部位于全身活动较大的颅颈交界区,其解剖结构复杂,其中穿行生命中枢—延髓,正常完整的结构和精细的韧带可以维持此处的稳定和正常运动,以及保护神经组织。此处畸形多导致骨性结构的不稳定,容易诱发上颈椎不稳或寰枢椎脱位等,从而使延髓—颈髓等神经组织受压损伤,导致患者残疾,甚则危及生命。枕颈部的主要畸形包括颅底凹陷和颅底扁平、枕髁发育不良、寰椎枕骨化(寰枕融合)、枕骨大孔狭窄、寰椎发育不全或不良、齿状突发育畸形、颈椎先天性融合<sup>[8]</sup>。

Hox 基因在时间和空间上沿前后轴精确的表达。Hox 基因在原肠胚阶段按时间顺序依次被激活,所以 Hox 基因在体节发育中沿前后轴正常的表达,从而使中轴骨按正常的形态发育<sup>[9]</sup>。Juan 等<sup>[10]</sup>认为,基因突变导致了其启动时间的改变,从而引起了表型的改变。在 Hox10 基因“失去功能”的基因突变实验中,Hox10 基因的表达降低,大鼠腰椎发生向前的同源异型转换,出现类似胸椎的形态改变,椎体有肋骨结构出现<sup>[11]</sup>。而在 Hox10“获得功能”的基因突变实验

中,Hox10 异位超表达,大鼠胸椎发生向后的同源异型转换,从而导致全部肋骨的缺失<sup>[12]</sup>。而枕颈部畸形的发生可能是由于 Hoxd3 基因突变导致其启动时间推迟,以及在相应的体节表达降低,发生向前或向后的同源异性转换,导致新生个体出现寰椎枕骨化、颈椎先天性融合等枕颈部畸形。枕颈部的畸形可能不仅仅是由于单一的 Hoxd3 基因突变,其家族成员 Hoxa3、Hoxb3 可能也参与了此过程<sup>[13]</sup>,通过基因打靶技术敲除该基因则会引起枕颈部的畸形<sup>[14-15]</sup>。Condie 等<sup>[15-16]</sup>在研究中发现 Hoxa3/Hoxd3 或 Hoxb3/Hoxd3 的双基因突变导致更严重的寰椎畸形—寰椎的完全消失,且 2 种突变造成的枕颈部畸形很难区分,而单一的 Hoxa3 突变则不会造成寰椎的畸形。这提示 Hoxd3 基因对于枕颈部复杂结构的发生起着主导作用,其家族成员对其有功能上的补偿性。

RA 对中轴骨的发育有显著的影响,主要是通过其对 Hox 基因表达的调控来实现的。在此过程中,RA 可以直接激活某些 Hox 基因,而这些 Hox 基因的上游调控区存在着视黄酸受体反应元件(retinoic acid receptors, RARE),RA 与核内的 RA 受体(RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ )结合形成二联体,再与 RARE 结合,从而调控 Hox 基因的表达<sup>[17]</sup>,如果没有 RA 与受体结合,则没有二联体复合物与 RARE 结合,使其下游的靶基因 Hox 基因表达下调,从而出现中轴骨在时空上的发育障碍和畸形。Kaiser 等<sup>[18]</sup>通过原位杂交检测技术,发现维生素 A 缺乏孕鼠胚胎中 Hoxd4、Hoxa9 在相应体节内表达降低,其骨骼形态发生异常改变,

如出现 T<sub>1</sub> 形态颈椎化改变并且无肋骨与之形成关节, L<sub>1</sub> 有部分或完整的浮肋的形态, S<sub>1</sub> 形态腰椎化等。在随后的研究中又发现 Hoxd3 和 Hoxb4 基因的表达也出现降低, 出现颅骨发育不全、甲状软骨和环状软骨畸形<sup>[19]</sup>。

本研究结果显示, 维生素 A 缺乏组 Hoxd3 基因 mRNA 表达水平明显低于正常对照组, 说明 RA 是在 mRNA 水平对 Hoxd3 基因进行调控, 使 Hoxd3 基因表达下调, 从而影响枕颈部的发育, 有可能出现先天性畸形。通过对新生鼠骨骼染色的观察, 我们发现维生素 A 缺乏组的新生鼠枕颈部区域骨性结构及软组织发生不同程度的改变, 如寰椎后弓与枕骨大孔后缘角度增大, 寰枢椎对位关系异常, 寰枢椎后弓角度增大, C<sub>2-7</sub> 椎弓及棘突高度降低、宽度变窄, 且相邻椎体间隙增大等不同的发育异常表现。这说明维生素 A 缺乏导致的枕颈部发育异常, 与 Hoxd3 基因表达的降低有关。然而在枕颈部发育过程中, 维生素 A 调控 Hoxd3 基因表达的机制还未完全阐明, 在 Hoxa1、Hoxb1、Hoxd4 基因中都发现了 RA 受体的反应原件, 但尚无在 Hoxd3 基因中发现该反应原件的报道。同时, RA 在体内主要是通过激活其受体—RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$  来调控 Hox 基因的表达, 有研究表明维生素 A 缺乏不同程度地抑制了 RARs 的表达, 说明维生素 A 缺乏导致枕颈部发育障碍的机制不仅是由于动物体内 RA 合成减少, 同时也由于其受体表达下降, 使处于其下游的 Hoxd3 基因未得到充分激活, 导致 mRNA 表达水平降低<sup>[20]</sup>。而维生素 A 缺乏导致胚胎先天性畸形的机制十分复杂, 其通过 RA 信号通路, 皆可以改变 Hox 基因在胚胎中时空上的表达, 导致组织器官形态的改变从而导致发育异常<sup>[21-22]</sup>, 然而其何时开始影响 Hoxd3 基因的表达尚不明确<sup>[23]</sup>。同时, RA 除通过与 RARs 结合之外, 可能还存在其他通路调控 Hoxd3 的表达。

## 5 参考文献

- [1] Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin a in reproduction and development[J]. *Nutrients*, 2011, 3(4):385-428.
- [2] Li N, Sun S, Wang D, et al. Suppression of retinoic acid receptors May contribute to embryonic skeleton hypoplasia in maternal rats with chronic vitamin A deficiency[J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(8):710-716.
- [3] 郑怀竞, 韩松. 临床检验 ELISA 指南[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994:39-52.
- [4] 赵茨, 张翔胤. 整体显示大鼠骨骼和软骨的复合染色体法[J]. *解剖学报*, 2006, 37(1):117-119.
- [5] Niwa Y, Shimojo H, Isomura A, et al. Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(11):1115-1120.
- [6] Pourquié O. Segmentation of the paraxial mesoderm and vertebrate somitogenesis[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2000, 47(5):81-105.
- [7] 贾连顺, 李家顺. 枕颈部外科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003:3.
- [8] 谭明生, 张光铂. 上颈椎外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010:334.
- [9] Jimura T, Denans N, Pourquié O. Establishment of Hox vertebral identities in the embryonic spine precursors[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2009, 88:201-234.
- [10] Juan AH, Ruddle FH. Enhancer timing of Hox gene expression: deletion of the endogenous Hoxc8 early enhancer[J]. *Development*, 2003, 130(20):4823-4834.
- [11] Wellik DM, Capecchi MR. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton[J]. *Science*, 2003, 301(5631):363-367.
- [12] Carapuço M, Nóvoa A, Bobola N, et al. Hox genes specify vertebral types in the presomitic mesoderm[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(18):2116-2121.
- [13] Pang D, Thompson DN. Embryology and bony malformations of the craniovertebral junction[J]. *Childs Nerv Syst*, 2011, 27(4):523-564.
- [14] Condie BG, Capecchi MR. Rats homozygous for a targeted disruption of Hoxd-3 (Hox-4.1) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the Atlas and the axis[J]. *Development*, 1993, 119(3):579-595.
- [15] Condie BG, Capecchi MR. Rats with targeted disruptions in the paralogous genes hoxa-3 and hoxd-3 reveal synergistic interactions[J]. *Nature*, 1994, 370(6487):304-307.
- [16] Manley NR, Capecchi MR. Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures[J]. *Dev Biol*, 1997, 192(2):274-288.
- [17] 金淑清, 浦予飞, 裘莹. HOX 基因的研究进展[J]. *癌症进展*, 2011, 9(2):154-158.
- [18] Kaiser ME, Merrill RA, Stein AC, et al. Vitamin a deficiency in the late gastrula stage rat embryo results in a one to two vertebral anteriorization that extends throughout the axial

skeleton[J]. Dev Biol, 2003, 257(1): 14-29.

[19] See AW, Kaiser ME, White JC, et al. A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development[J]. Dev Biol, 2008, 316(2): 171-190.

[20] 刘楚吟, 谭明生, 陈鹏明, 等. 维生素 A 缺乏对小鼠胚胎 Hoxd3 基因表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(7): 1-3.

[21] Kessel M, Gruss P. Homeotic transformations of murine ver-

tebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid[J]. Cell, 1991, 67(1): 89-104.

[22] Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants[J]. Development, 1994, 120(10): 2723-2748.

[23] Aulehla A, Pourquié O. Signaling gradients during paraxial mesoderm development[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(2): 869.

(2015-06-08 收稿 2015-07-08 修回)

## · 作者须知 ·

### 论文中对数据进行统计学处理时需要注意的问题

**1 对基线资料进行统计学分析** 搜集资料应严格遵守随机抽样设计, 保证样本从同质的总体中随机抽取, 除了对比因素外, 其他可能影响结果的因素应尽可能齐同或基本接近, 以保证组间的齐同可比性。因此, 应对样本的基线资料进行统计学分析, 以证明组间的齐同可比性。

**2 选择正确的统计检验方法** 研究目的不同、设计方法不同、资料类型不同, 选用的统计检验方法则不同。例如: 2 组计量资料的比较应采用  $t$  检验; 而多组 ( $\geq 3$  组) 计量资料的比较应采用方差分析 (即  $F$  检验), 如果组间差异有统计学意义, 想了解差异存在于哪两组之间, 再进一步做  $q$  检验或 LSD- $t$  检验。许多作者对多组计量资料进行比较时采用两两组间  $t$  检验的方法是错误的。又如: 等级资料的比较应采用 Ridit 分析或秩和检验或行平均得分差检验。许多作者对等级资料进行比较时采用卡方检验的方法是错误的。

**3 假设检验的推断结论不能绝对化** 假设检验的结论是一种概率性的推断, 无论是拒绝  $H_0$  还是不拒绝  $H_0$ , 都有可能发生错误 (I 型错误和 II 型错误)。因此, 假设检验的推断结论不能绝对化。

**4  $P$  值的大小并不表示实际差别的大小** 研究结论包括统计结论和专业结论两部分。统计结论只说明有无统计学意义, 而不能说明专业上的差异大小。 $P$  值的大小不能说明实际效果的“显著”或“不显著”。统计结果的解释和表达, 应说对比组之间的差异有 (或无) 统计学意义, 而不能说对比组之间有 (或无) 显著的差异。 $P \leq 0.01$  比  $P \leq 0.05$  更有理由拒绝  $H_0$ , 并不表示  $P \leq 0.01$  时比  $P \leq 0.05$  时实际差异更大。只有将统计结论和专业知识有机地结合起来, 才能得出恰如其分的研究结论。若统计结论与专业结论一致, 则最终结论也一致; 若统计结论与专业结论不一致, 则最终结论需根据专业知识而定。判断被试因素的有效性时, 要求在统计学上和专业知识上都有意义。

**5 假设检验的结果表达**  $P$  值传统采用 0.05 和 0.01 这 2 个界值, 现在提倡给出  $P$  的具体数值和检验统计量的具体数值 (小数点后保留 3 位有效数字), 主要理由是: ①以前未推广统计软件之前, 需要通过查表估计  $P$  值, 现在使用统计软件会自动给出具体的  $P$  值和检验统计量的具体值 ( $t$  值、 $F$  值、 $\chi^2$  值等)。②方便根据具体情况判断问题。例如  $P = 0.051$  与  $P = 0.049$  都是小概率, 不能简单地断定  $P = 0.051$  无统计学意义而  $P = 0.049$  有统计学意义。③便于对同类研究结果进行综合分析。

**6 统计学符号的使用** 统计学符号的使用应按照 GB3358—82《统计名词及符号》的规定, 具体可参阅本刊投稿须知中的有关要求。

### 提交论文著作权转让书的提示

凡经本刊通知采用的稿件, 请通讯作者于接到通知后 1 周内, 将由全体作者签名并加盖第一作者单位公章的论文著作权转让书邮寄至本刊编辑部, 并注明稿件编号及第一作者姓名。

论文著作权转让书请寄: 河南省洛阳市启明南路 82 号《中医正骨》编辑部, 邮政编码: 471002。