

两种造模方法致大鼠慢性肾病模型的肾功能及病理变化比较

李天祎 杨 扬 杨素萍 李嘉琦 马逸群 王家平

摘 要 **目的** 探究两种造模方法对大鼠慢性肾病模型的肾功能影响及病理改变。**方法** 采用单侧肾切除 + 尾静脉重复注射阿霉素(ADR)法(A组)和二次尾静脉注射 ADR 法(B组)测定各组大鼠肾功能(血尿素氮、血肌酐)、血清白蛋白。光镜下观察各组大鼠肾脏的病理变化,并分别与正常对照组(N组)进行比较。**结果** 在 4、8、12 周末,A、B 组血尿素氮(BUN)、血肌酐(Cr)值均有显著上升($P < 0.05$),白蛋白降低($P < 0.05$),表现为低蛋白血症,部分大鼠合并腹腔积液。光镜下,A、B 两组肾小球均有不同程度萎缩、硬化,肾小管受损不均,肾间质均出现炎性改变。单侧肾切除 + 重复尾静脉注射 ADR 诱导的肾脏损伤更为严重。**结论** 单侧肾切除 + 重复尾静脉注射 ADR 诱导的慢性肾病模型与二次尾静脉注射 ADR 法,均可使大鼠成模,两种方法比较,单侧肾切除 + 重复尾静脉注射 ADR 诱导的病理改变相对较为典型。

关键词 慢性肾病 阿霉素 肾功能

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.12.014

Comparison of Renal Function and Pathological Changes in Rats with Chronic Nephropathy Induced by Two Methods. Li Tianyi, Yang Yang, Yang Suping, et al. The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan 650101, China

Abstract Objective To explore the renal function and pathological changes of chronic kidney disease model in rats by two methods. **Methods** The methods of unilateral nephrectomy and repeated injection of adriamycin (ADR) into caudal vein (Group A) and second injection of ADR into caudal vein (Group B) were used. Under the light microscope, the renal pathological changes of rats in each group were observed and compared with the normal control group (Group N). **Results** At the end of 4, 8, 12 weeks, the blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (CR) of group A and group B were significantly higher than those of group n ($P < 0.05$), and the albumin of group A and group B was lower ($P < 0.05$), showing hypoproteinemia. Some rats were complicated with ascites. Under the light microscope, the glomeruli of group A and group B were atrophic and sclerotic in varying degrees, the renal tubules were damaged unevenly, and the renal interstitium showed inflammatory changes. The renal injury induced by unilateral nephrectomy and repeated tail vein injection of ADR is more serious and typical. **Conclusion** The chronic nephropathy model induced by unilateral nephrectomy and repeated tail vein injection of adriamycin can change the renal function of rats. Compared with the two methods, the pathological changes induced by unilateral nephrectomy and repeated tail vein injection of adriamycin are more typical.

Key words Chronic kidney disease; Adriamycin; Renal function

慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)是影响全球公共健康的主要疾病之一,全球发生率约为 8% ~ 16%^[1]。临床多表现为蛋白尿、低蛋白血症、水肿以及高脂血症等。因 CKD 发生率逐渐增高,病程迁延,很难治愈,末期多发展为慢性肾衰竭,只能依靠透析、换肾等仅有的治疗方式缓解,已经逐渐成为威胁人类健康的一类慢性疾病。随着人们对慢性肾病

发病机制和病理变化等研究的深入,建立慢性肾病动物模型对研究 CKD 的肾组织病理形态学变化以及探究治疗 CKD 的新方法有着重要的意义。

目前,国内外公认的模拟慢性肾病效果较好的为阿霉素(adriamycin, ADR)大鼠模型。ADR 在大鼠体内代谢较为缓慢,对心脏、肝脏、骨髓、胃肠等具有较强的不良反应,但经尾静脉注射后,其毒性可主要积累于肾脏^[2]。因此,应用 ADR 造模时,应注意注射的方式、剂量等。近年来,应用较为广泛的方法主要有尾静脉注射法(单次或多次)、单侧肾切除 + 重复尾静脉注射 ADR 和肾动脉注射法等。本研究比较单侧肾切除 + 重复尾静脉注射 ADR 及二次尾静脉注射

基金项目:云南省卫生和计划生育委员会医学学科带头人培养计划项目(D-201647)

作者单位:650101 昆明医科大学第二附属医院放射科

通讯作者:王家平,电子邮箱:1603642110@qq.com

ADR 这两种方法,旨在为更好地复制慢性肾病模型提供更加丰富的参考依据。

材料与方法

1. 实验材料:(1)实验动物:雄性 SD 大鼠,18 只,体质量 150 ~ 200g,购自昆明医科大学实验动物中心,保证动物在室温下正常饲养。(2)主要试剂:阿霉素(ADR)购自美国 Sigma 公司,医用缝线、一次性无菌巾、75% 乙醇、医用纱布等购自杭州华威医疗用品。

2. 实验方法:(1)大鼠造模:将 18 只 SD 大鼠随机分为 3 组,即 N 组、A 组和 B 组。N 组为正常对照组($n=6$)。A 组为单侧肾脏切除 + 重复尾静脉注射 ADR($n=6$),将大鼠 10% 水合氯醛麻醉后,取俯卧位固定于超净台,选取左侧肋脊角为手术切口,逐层剥离皮肤、皮下脂肪及肌肉组织后,将左侧肾蒂剥离,用手术缝线进行结扎,切除肾脏,缝合手术切口后消毒,术后以 3mg/kg 阿霉素经大鼠尾静脉注射,将大鼠归笼正常饲养,并于 14 天后再次尾静脉注射 ADR (3mg/kg) 1 次。B 组以 3mg/kg ADR 分两次经尾静脉注射($n=6$),两次间隔 14 天注射。

3. 观察指标:(1)一般情况:观察各组大鼠的精神状态、毛色、体质量变化等一般情况,有无水肿,腹腔积液或瘫痪等。(2)大鼠肾功能检测:注射后第 4、8、12 周,将大鼠用乙醚麻醉后采用内眦采血法,3000r/min 离心 20min,分离血清。日本日立 7170A 型全自动生化分析仪检测血尿素氮、血肌酐、血清白蛋白,各组标本均在笔者医院检验科完成。(3)肾组织病理形态学观察:于第 12 周末处死各组大鼠,取出右肾,快速剥离肾包膜,放置在 10% 甲醛溶液中固定,脱水、透明、石蜡包埋后,切片(厚约 3 μ m),作苏木精 - 伊红(HE)染色,在光镜下观察并摄影。

4. 统计学方法:采用 IBM SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料多组间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 $LSD - t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:N 组大鼠活动灵便,状态良好,毛色顺滑。A、B 组两组大鼠状态较差,部分大鼠伴有毛发脱落,活跃欠佳,饮食量有不同程度减少,均出现不同程度水肿,毛色黯淡、微黄,精神不振,部分大鼠伴有腹腔积液,其中 A 组比 B 组变化更为明显。

2. 各组肾功能变化:与 N 组比较,A、B 两组大鼠血肌酐、血尿素氮升高,并表现为低蛋白血症。血尿素氮(BUN)值:8、12 周末,A 组尿素氮即出现上升($P < 0.05$),B 组在 12 周末尿素氮上升较为明显($P < 0.05$);血肌酐(Cr)值:A、B 组血肌酐在 8 周末及 12 周末较 4 周时均有明显上升($P < 0.05$);白蛋白值:A、B 组较 N 组均有降低,在 8 周时 A 组下降较为明显($P < 0.05$,表 1,图 1)。

表 1 各组大鼠肾功能及白蛋白比较

项目	时间(周)	N 组	A 组	B 组
血尿素氮 (mmol/L)	4	2.07 $\pm$ 0.11	9.76 $\pm$ 0.70 *	7.80 $\pm$ 0.51 **
	8	2.16 $\pm$ 0.23	10.21 $\pm$ 0.69 *	7.61 $\pm$ 0.50 **
	12	2.19 $\pm$ 0.12	10.62 $\pm$ 0.89 *	8.92 $\pm$ 0.56 **
血肌酐 (μ mol/L)	4	34.79 $\pm$ 2.97	71.63 $\pm$ 6.96 *	70.92 $\pm$ 3.78 *
	8	33.43 $\pm$ 2.53	96.61 $\pm$ 3.55 *	93.34 $\pm$ 3.83 *
	12	35.70 $\pm$ 1.55	98.11 $\pm$ 7.32 *	96.30 $\pm$ 3.33 *
白蛋白 (g/L)	4	31.35 $\pm$ 2.26	25.12 $\pm$ 3.16 *	25.27 $\pm$ 2.98 *
	8	33.83 $\pm$ 2.69	22.55 $\pm$ 2.77 *	23.22 $\pm$ 2.05 *
	12	33.32 $\pm$ 3.30	22.07 $\pm$ 2.40 *	20.04 $\pm$ 4.09 *

与 N 组比较, * $P < 0.05$; 与 A 组比较, # $P < 0.05$

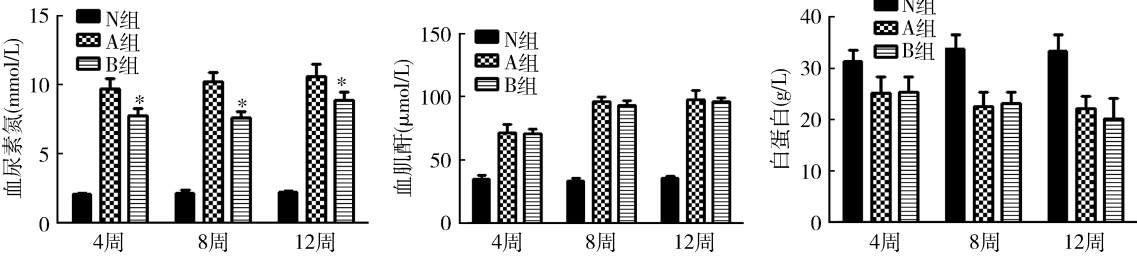


图 1 各组大鼠肾功能及白蛋白比较

与 A 组比较, * $P < 0.05$

3. 肾组织病理学改变:肉眼观察:12 周末 A 组肾脏体积明显增大,表面凹凸不平,呈弥漫性颗粒状改变,色泽呈黄褐色改变;B 组肾脏包膜紧张,表面尚光

滑,色偏黄褐。光镜下观察:N 组大鼠的肾小球、肾小管和肾间质未见明显异常改变;A 组肾脏的肾小球出现萎缩,硬化,局部肾小球毛细血管袢扩张淤

血,肾小管结构紊乱,上皮细胞可见空泡样变性,腔内可见蛋白管型,并且肾间质内大量炎性细胞浸润,受损程度和灶性病变范围较 B 组加重;B 组大鼠的肾组织切片显示,肾脏近曲、远曲小管、髓袢和

集合管上皮可见不同程度水肿变性,部分管腔扩张,腔内可见少量透明管型,部分肾小球有轻微的萎缩,肾间质内可见少量轻-中度淋巴细胞和浆细胞浸润的炎性反应(图 2)。

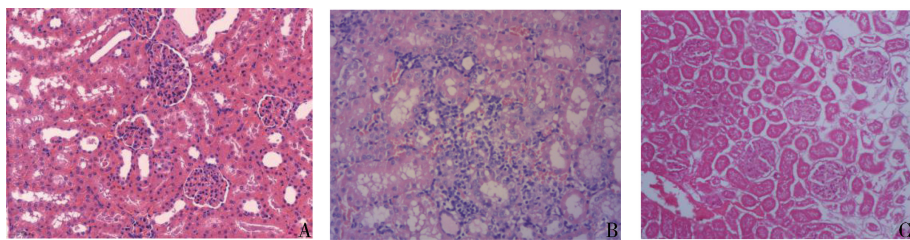


图 2 各组大鼠肾组织 HE 染色结果(×20)

A. N 组;B. A 组;C. B 组

讨 论

阿霉素(ADR),又名多柔比星,作为一种蒽环类抗生素,在临床中广泛应用于多种癌症的治疗^[3]。其导致肾脏损伤的发病机制主要有 3 个方面:①ADR 抑制大鼠肾脏的自噬过程,造成肌动蛋白细胞骨架损伤,足细胞足突消失^[4];②ADR 可以诱导肾小球上皮细胞过氧化反应,造成肾小球滤过膜完整性被破坏,导致滤过屏障受损而形成持续蛋白尿;③ADR 能激活多种炎性介质,促进系膜细胞增殖,随着病程迁延逐渐发展导致肾小球硬化^[5]。全球首次报道阿霉素肾病在 20 世纪 80 年代初,近年来,在使用阿霉素造模过程中,对于用法与用量仍存在分歧和争议。因较大剂量会使大鼠出现心力衰竭、免疫力下降甚至死亡,而减少剂量则使造模时间延长,大鼠肾脏损伤达不到造模标准,所以对于阿霉素的应用剂量和造模方法目前仍然无法统一^[6]。

目前,较为常用的慢性肾病模型制作方法主要有以下 5 种:①5/6 肾切除^[7];②尾静脉注射阿霉素;③单侧肾切除+尾静脉注射阿霉素^[8,9];④尾静脉注射环孢素;⑤结扎单侧输尿管等方法^[10]。研究报道,尾静脉注射 ADR 法,首次剂量过大易出现大鼠极度烦躁、死亡等情况,尾静脉注射次数过多可能出现阿霉素外渗,造成剂量不足或大鼠尾部溃烂等情况发生^[11]。单侧结扎大鼠输尿管的方法在制作模型时,因需要把肾盂输尿管结合部和输尿管膀胱入口处一并结扎,所以手术切口较大,并且找寻输尿管所需时间较长,故造成的手术不良反应较大,且具有易感染等缺陷;5/6 肾切除法对于术者要求较高,手术切面过大,出血量也随之增大,病死率较高^[12]。根据本实验研究并对比上述造模方法,单侧肾脏切除+二次尾

静脉注射 ADR 法具有以下优势:①手术切口较小,可直接结扎单侧肾蒂,出血量较小,手术时间缩短,可降低大鼠的感染概率,病死率较小;②单侧肾脏切除后阿霉素给药剂量较单次尾静脉注射 ADR 法小,可降低阿霉素外渗可能,减轻大鼠尾部溃烂;③大鼠造模后,成模所需时间较二次尾静脉注射 ADR 法更短,且成模效果较好。

本研究比较的两种方法均可制作阿霉素肾病模型。单侧肾脏切除+重复尾静脉注射 ADR 和两次尾静脉注射 ADR 法均可使大鼠肾功能发生改变。在各个观察点 A、B 两组的血肌酐、血尿素氮值比较,差异均有统计学意义,与此同时,两组的肾组织也具有显著的形态学变化。其中 A 组血肌酐、血尿素氮在第 8 周时即出现上升,白蛋白也在 8 周末出现明显下降,且 A 组大鼠肾脏病理切片显示肾小球出现萎缩,硬化,球囊粘连,局部肾小球毛细血管袢扩张淤血,肾小管上皮细胞可见空泡样变性,腔内可见蛋白管型,并且肾间质内可见大量淋巴细胞和浆细胞浸润。这一结果提示单侧肾切除+重复尾静脉注射阿霉素法发展为慢性肾衰竭的趋势更加明显。产生这一结果的原因可能与单侧肾脏的负荷加重导致代偿功能不足,呈现出肾功能进行性加重,故而更加符合慢性肾衰竭的表现,其肾脏的病理学改变也证明了这一点^[13]。

近年来,阿霉素大鼠模型因其能更好地复制人类慢性肾病表现而得到了广泛的研究与应用,ADR 可诱导肾小球内皮变薄和足细胞消失,这与血浆蛋白过滤的大小和电荷特异性屏障的丧失有关^[14]。其动物模型的组织学变化与人类局灶性肾小球硬化相似,伴有足细胞融合、局灶节段性和肾小球硬化以及肾小管

间质炎症和纤维化,并且大鼠表现出来的血清肌酐升高、肌酐清除率降低、血清白蛋白降低、血脂异常和尿蛋白排泄增加,与肾病综合征和CKD一致^[15]。本研究的不足之处在于观察时间仅到12周,无法观察12周之后的肾功能变化趋势,除此之外在应用阿霉素过程中,由于实验大鼠的批次、药物敏感度和遗传变异等方面会对大鼠的肾功能产生一定的影响,因此如何使大鼠肾脏损伤趋于稳定还需进一步研究。

参考文献

- 1 Jha V, Garcia G, Iseki K, *et al.* Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. *Lancet*, 2013, 382(9888): 260 – 272
- 2 贺升升, 李爱平, 张王宁, 等. 阿霉素肾病模型及其病理机制研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5426 – 5434
- 3 Hajra S, Patra AR, Basu A, *et al.* Prevention of doxorubicin (DOX) – induced genotoxicity and cardiotoxicity: effect of plant derived small molecule indole – 3 – carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 228 – 243
- 4 Yi M, Zhang L, Liu Y, *et al.* Autophagy is activated to protect against podocyte injury in adriamycin – induced nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(1): F74 – F84
- 5 唐桂毅, 温和, 王晶晶, 等. 阿霉素肾病大鼠模型的评价研究[J]. *药物评价研究*, 2020, 43(1): 66 – 71
- 6 支勇, 吕艳, 曹式丽. 局灶节段性肾小球硬化型阿霉素肾病大鼠

模型的建立[J]. *江苏医药*, 2018, 44(9): 977 – 980, 972

- 7 Lee HW, Lee SM, Lee MH, *et al.* Effect of omega – 3 fatty acid on stamp2 expression in the heart and kidney of 5/6 nephrectomy rat model[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(11): 398
- 8 白彝华, 王家平, 蒋红樱. 两种造模方法致大鼠慢性肾衰竭模型的效果比较[J]. *广东医学*, 2014, 35(5): 653 – 656
- 9 吴清风, 孙世仁, 段梦露, 等. CCR2 抑制剂延缓输尿管结扎小鼠肾纤维化[J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(4): 461 – 466
- 10 Chen J, Li D. Telbivudine attenuates UUO – induced renal fibrosis via TGF – β /Smad and NF – κ B signaling[J]. *Inter Immunopharmacol*, 2018, 55: 1 – 8
- 11 李爱平, 张王宁, 秦雪梅. 阿霉素肾病大鼠模型的优化[J]. *中草药*, 2018, 49(1): 151 – 159
- 12 袁媛. 大鼠单侧输尿管结扎模型和饥饿模型尿液蛋白质组研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015
- 13 Xie L, Koukos G, Barck K, *et al.* Micro – CT imaging and structural analysis of glomeruli in a model of adriamycin – induced nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316(1): F76 – F89
- 14 Hussein AM, Eldosoky M, Handhle A, *et al.* Effects of long – acting erythropoietin analog darbepoetin – α on adriamycin – induced chronic nephropathy[J]. *Nephrol – Original Paper*, 2016, 48(2): 287 – 297
- 15 Diwan V, Brown L. Adenine – induced chronic kidney disease in rats[J]. *Nephrology*, 2018, 23(1): 5 – 11

(收稿日期: 2020 – 05 – 26)

(修回日期: 2020 – 06 – 18)

(上接第52页)

- 6 陈伟光, 王柏春, 官莹, 等. G1254023X 对白细胞介素6受体、趋化因子CX3CL1的抑制作用及其对冠心病的影响[J]. *国际免疫学杂志*, 2017, 40(4): 396 – 400
- 7 Musumeci G, Coleman R, Imbesi R, *et al.* ADAM – 10 could mediate cleavage of N – cadherin promoting apoptosis in human atherosclerotic lesions leading to vulnerable plaque: a morphological and immunohistochemical study[J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(7): 1148 – 1158
- 8 Hikita A, Tanaka N, Yamane S, *et al.* Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor – α [J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87(4): 581 – 593
- 9 Tang X, Yin R, Shi H, *et al.* LncRNA ZFAS1 confers inflammatory responses and reduces cholesterol efflux in atherosclerosis through regulating miR – 654 – 3p – ADAM10/RAB22A axis[J]. *Int J Cardiol*, 2020, S0167 – 5273(19): 34807
- 10 Cardellini M, Menghini R, Martelli E, *et al.* TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by sirTI[J]. *Diabetes*, 2009, 58(10): 2396 – 2401
- 11 Yang K, Lu L, Liu Y, *et al.* Increase of ADAM10 level in coronary artery in – stent restenosis segments in diabetic minipigs: high ADAM10 expression promoting growth and migration in human vascular smooth muscle cells via Notch 1 and 3[J]. *PLoS One*, 2013, 8

(12): e83853

- 12 Su SC, Hung YJ, Huang CL, *et al.* Cilostazol inhibits hyperglucose – induced vascular smooth muscle cell dysfunction by modulating the RAGE/ERK/NF – κ B signaling pathways[J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 68
- 13 Yang H, Qiu B, Chen S, *et al.* Soluble CXCL16 promotes TNF – α – induced apoptosis in DLBCL via the AMAD10 – NF – κ B regulatory feedback loop[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(8): 863 – 874
- 14 Li X, Dardik A, Guo R, *et al.* Atorvastatin regulates pericardial patch healing via the microRNA140 – ADAM10 – ephrinB2 pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12): 4054 – 4064
- 15 Lee AC, Lam JK, Shiu SW, *et al.* Serum level of soluble receptor for advanced glycation end products is associated with a disintegrin and metalloproteinase 10 in type 1 diabetes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137330
- 16 Reiss K, Cornelsen I, Husmann M, *et al.* Unsaturated fatty acids drive disintegrin and metalloproteinase (ADAM) – dependent cell adhesion, proliferation, and migration by modulating membrane fluidity[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(30): 26931 – 26942
- 17 王夏蕾, 杨景达, 魏伟, 等. 二甲双胍介导胆固醇逆转抑制动脉粥样硬化[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(4): 496 – 501

(收稿日期: 2020 – 06 – 11)

(修回日期: 2020 – 07 – 17)