

· 临床研究 ·

## 一种新型实用的大鼠肾缺血再灌注损伤模型的建立

余晓东, 廖波, 邓显忠<sup>△</sup>, 姜果, 朱平宇, 鲁栋梁, 唐铁龙, 杨雪松, 陈双全, 程树林

(川北医学院附属医院泌尿外科, 四川南充 637000)

**摘要:**目的 建立一种简单实用的大鼠肾缺血再灌注损伤模型。方法 48 只雄性 SD 大鼠随机分成 2 组: 对照组(C 组)、缺血再灌注组(Ir 组), 每组各 4 个时相(6、12、24、72 h)。采用切除右肾, 夹闭左肾动脉 45 min 后恢复灌注建立缺血再灌注损伤模型。检测血清肌酐(Scr)水平, 观察肾组织病理学改变及超微结构变化。结果 缺血再灌注后, Scr 水平显著升高, 肾组织形态学和超微结构出现明显的损伤和破坏, 表明动物模型建立成功。结论 该方法建立大鼠肾缺血再灌注损伤模型简单实用。

**关键词:**大鼠; 再灌注损伤; 模型; 肾脏

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.014

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)13-1283-02

**Model construction of renal ischemia-reperfusion injury in rats**Yu Xiaodong, Liao Bo, Deng Xianzhong<sup>△</sup>, Jiang Guo, Zhu Pingyu, Lu Dongliang,

Tang Tielong, Yang Xuesong, Chen Shuangquan, Cheng Shulin

(Department of Urology, Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**Abstract: Objective** To construct a simple and practical model of renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** 48 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: control group(C group) and ischemia-reperfusion group(IK group), the four phases (6, 12, 24, 72 h) in each group. At 45 min after the left renal artery occlusion on the basis of the right renal resection, we restored perfusion in modeling of ischemia-reperfusion injury. To determine serum creatinine (Scr) and to observe renal histological and ultrastructural changes. **Results** After ischemia-reperfusion, the level of serum creatinine (Scr) was increased significantly, the morphology and ultrastructure of renal tissue were damaged significantly, which indicating that the construction of animal model was successful. **Conclusion** Using the technique to construct renal ischemia-reperfusion rat model is simple and practical.

**Key words:** rats; reperfusion injury; models; kidney

肾缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是一种常见的临床病理生理过程, 多见于低血容量性休克、急性肾动脉阻断以及肾脏移植等情况, 可以造成急性肾衰竭(acute renal failure, ARF)或使移植肾功能延迟恢复<sup>[1]</sup>。因此, 建立一种简单实用的肾缺血再灌注损伤动物模型对于研究其发生机制、预防其发生及治疗具有重要的意义。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 实验动物为健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 体质量为 220~260 g。实验过程中动物饲养及取材均按照实验动物管理和保护的有关规定进行。

**1.2 方法**

**1.2.1 实验动物分组和动物模型建立** 48 只雄性 SD 大鼠随机分成对照组(C 组)和缺血再灌注组(Ir 组), 每组 24 只动物, 每组按取材时间不同分为 4 个时相组(6、12、24、72 h), 每个时相组 6 只 SD 大鼠。C 组: 开腹后切除右肾, 分离左肾动脉, 但不夹闭左肾动脉。Ir 组: 用 3% 的水合氯醛(10 mL/kg)腹腔注射麻醉, 麻醉成功后, 仰卧位固定, 聚维酮碘消毒手术野, 做腹部正中切口, 从耻骨联合上方 1 cm 至剑突下方。将腹腔肠管翻至腹腔外, 用湿纱布包裹保护。暴露双侧肾脏, 切除右肾, 钝性分离左肾动脉, 保护好输尿管, 靠近肾门处用无创动脉夹夹闭肾动脉, 观察肾脏由鲜红色逐渐变为暗红色。将肠管还纳至腹腔, 用 3 把血管钳夹腹壁, 夹闭腹腔, 以防止体温下降和水分散失。45 min 后去除血管钳, 打开腹腔, 将腹腔肠管翻至腹腔外, 暴露肾脏。松开动脉夹, 恢复灌注, 肉眼可见肾动脉充盈, 肾脏由暗红色变为鲜红色, 表明再灌注成功。用 1 号细丝

线连续缝合腹壁切口。麻醉苏醒后, 分笼饲养, 自由摄取水和食物。动物模型的建立参照文献[2-3]。

**1.2.2 取材** 于再灌注后 6、12、24、72 h 处死大鼠, 处死前从下腔静脉采血 2 mL 及切除左肾, 取约 2 mm 厚肾组织于 4% 多聚甲醛中保存, 约 1 mm<sup>3</sup> 肾组织于 2.5% 戊二醛中保存。

**1.2.3 观察指标** (1) 动物处死前下腔静脉采血 2 mL, 检测血清肌酐(Scr)水平; (2) 肾组织在 4% 多聚甲醛中固定, 常规乙醇脱水, 石蜡包埋后, 切取约 4 μm 厚的组织切片, 行 HE 染色, 观察肾脏组织病理学改变; (3) 取约 1 mm<sup>3</sup> 肾组织置于 2.5% 的戊二醛中固定 24 h, 再以 1% 的锇酸固定 1.5 h, 常规脱水, 包埋成块, 修块定位后, 超薄切片, 电子染色, 置于透射电镜下观察。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 肾缺血再灌注后两组各时相 Scr 水平的变化** 与 C 组比较, Ir 组 Scr 水平于再灌注后 6 h 开始升高, 24 h 达到峰值, 72 h 后下降( $P < 0.01$ ), 结果见表 1。

表 1 大鼠肾缺血再灌注后两组各时相 Scr 水平变化比较( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

组别	6 h	12 h	24 h	72 h
C 组	40.33±8.76	42.50±7.42	40.67±6.35	38.83±3.54
Ir 组	106.33±12.74 <sup>#</sup>	165.33±19.19 <sup>#</sup>	201.33±21.52 <sup>#</sup>	90.17±15.87 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>:  $P < 0.01$ , 与 C 组比较。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: (0817)2262409; E-mail: dengxz63@sina.com。

**2.2 肾组织病理学改变** 光镜下,C组肾组织形态学观察未见明显异常,肾小管基底膜呈线性、连续、完整、均匀结构,肾小管管腔完整,腔面隐约见刷状缘,腔内无管型,上皮细胞胞质内见清晰纵行条纹,间质无充血、水肿及炎细胞浸润,见封3图1;Ir组肾小球结构变化不明显,肾小管上皮细胞可见不同程度的浑浊、肿胀、凝固性坏死、脱落、刷状缘消失,管腔内可见管型,肾间质充血、水肿、炎细胞浸润,组织损伤以24h最重,见封3图2。

**2.3 肾组织超微结构变化** 透射电镜下,C组肾组织超微结构观察未见明显异常,近曲小管上皮细胞及细胞器结构正常,见封4图3。Ir组滤过膜厚薄不均,局部内皮细胞缺损,近曲小管上皮细胞水肿,细胞间隙增宽,细胞连接破坏,线粒体肿胀,粗面内质网扩张,微绒毛破坏,部分近曲小管微绒毛倒伏断裂,上皮细胞坏死或凋亡脱落于管腔内,管壁断裂,核肿胀、染色质边集、不规则变形甚至溶解,间质中血管淤血,红细胞成缟钱状聚集,在血管腔外可见有红细胞,见封4图4。

### 3 讨 论

临床手术过程中,IRI引起的ARF是临床上常见且严重的并发症,因为其治疗措施有限,病死率为30%~50%<sup>[4]</sup>。针对这一问题,国内外学者作了大量的研究,并通过建立肾缺血再灌注损伤动物模型探索其发生机制及防治措施。目前,动物模型的建立方法包括:切除一侧肾脏,夹闭另一侧肾蒂或肾动脉;夹闭双侧肾蒂或肾动脉。缺血时间为30~60min不等<sup>[5-9]</sup>。实验动物包括猪、犬、兔、大鼠、小鼠等,其中大鼠最为常用<sup>[10-11]</sup>。

作者认为夹闭肾蒂同时阻断了肾动静脉,造成了肾脏淤血缺血,其病理生理变化不能等同于临床上常见的由于单纯缺血而引起的再灌注损伤。而切除一侧肾脏,夹闭另一侧肾动脉建立肾缺血再灌注损伤模型与双肾模型相比更接近肾移植的状态。有研究表明,缺血再灌注损伤是否出现及其严重程度,取决于缺血时间的长短、侧支循环形成与否、对血氧的需求程度以及电解质水平等多种因素。一般情况下,如缺血时间短于30min,再灌注后组织损伤可以逆转,能够恢复脏器功能;如缺血时间大于60min,再灌注则很难逆转组织损伤;但如果在缺血30~60min后恢复血液供应,特别是那些不易形成侧支循环、对氧需求量高的组织器官,在血液中钠、钙浓度较高的情况下,容易诱发缺血再灌注损伤<sup>[12-13]</sup>。肾脏是血液供应充分的器官,对缺血反应极其敏感,肾脏缺血60min后可发生急性肾小管坏死和肾功能衰竭,短期缺血后再灌注,肾脏可通过小管上皮细胞的迅速增生而修复受损的肾小管,肾功能也随之恢复<sup>[14]</sup>。基于上述理由,本实验采取切除右肾,夹闭左肾动脉45min后恢复灌流建立大鼠肾缺血再灌注损伤模型。结果发现,缺血再灌注后,Scr水平显著升高,肾组织形态学和超微结构出现明显的损伤和破坏,表明动物模型建立成功。大鼠肾脏缺血再灌注后,细胞正常结构受到破坏,细胞内线粒体、内质网及溶酶体等细胞器肿胀、变性及破坏,细胞骨架失去正常排列,细胞管腔侧的微绒毛结构消失,最终细胞凋亡或坏死,从肾小管基底膜脱落而进入肾小管管腔,造成肾小管堵塞,从而引起急性肾功能衰竭<sup>[15]</sup>。实验中还发现,再灌注后24hScr水平最高,肾组织损伤最明显,表明该时间点可能是肾缺血再灌注损伤的高峰期。本方法建立大鼠肾缺血再灌注损伤模型简单实用,易于掌握。

### 参考文献:

[1] 陈光磊,王汉民,刘广厚,等.大鼠急性肾脏缺血再灌注后

处理动物模型的建立[J].第四军医大学学报,2007,28(9):812-814.

- [2] Nitescu N, Grimberg E, Ricksten SE, et al. Effects of N-acetyl-L-cysteine on renal haemodynamics and function in early ischaemia-reperfusion injury in rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(1-2): 53-57.
- [3] Sabbatini M, Santillo M, Pisani A, et al. Inhibition of Ras/ERK1/2 signaling protects against postischemic renal injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290(6): 1408-1415.
- [4] 方志强,叶钢,刘永亮,等.肢体缺血预处理对兔肾急性缺血再灌注损伤的保护作用[J].重庆医学,2008,37(7):743-745.
- [5] Shah KG, Rajan D, Jacob A, et al. Attenuation of renal ischemia and reperfusion injury by human adrenomedullin and its binding protein[J]. J Surg Res, 2010, 163(1): 110-117.
- [6] Salman IM, Ameer OZ, Sattar MA, et al. Role of the renal sympathetic nervous system in mediating renal ischaemic injury-induced reductions in renal haemodynamic and excretory functions[J]. Pathology, 2010, 42(3): 259-266.
- [7] Zhou W, Guan Q, Kwan CC, et al. Loss of clusterin expression worsens renal ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(3): F568-578.
- [8] Patschan D, Patschan S, Wessels JT, et al. Epac-1 activator 8-O-cAMP augments renoprotective effects of syngeneic corrected murine EPCs in acute ischemic kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(1): F78-85.
- [9] Versteilen AM, Korstjens IJ, Musters RJ, et al. Role of cyclooxygenase and derived reactive oxygen species in rho-kinase-mediated impairment of endothelium-dependent vasodilation and blood flow after ischemia-reperfusion of the rat kidney[J]. Nephron Exp Nephrol, 2010, 114(1): e1-6.
- [10] 李春燕,成小松,郑敏.急性肾功能衰竭动物模型的研究进展[J].中国急救医学,2002,22(8):494-495.
- [11] 吴建国,张丹,吴新胜,等.小鼠急性缺血-再灌注肾损伤模型的建立及体会[J].医学信息手术学分册,2007,20(12):1103-1105.
- [12] Starzl TE, Todo S, Fung J, et al. FK506 for liver, kidney, and pancreas transplantation[J]. Lancet, 1989, 2(8670): 1000-1004.
- [13] Margreter R; European tacrolimus vs cyclosporin microemulsion renal transplantation study group. EF. cacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporine microemulsion in renal transplantation; A randomized multicentre study[J]. Lancet, 2002, 359(9308): 741-746.
- [14] 姜锡男,陈方敏,石家齐,等. Wistar大鼠急性肾脏缺血再灌注损伤动物模型的建立及意义[J].南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(8):1108-1111.
- [15] 唐铁龙,卢一平,周棱,等.大鼠肾脏热缺血再灌注损伤的缺血后处理模型的建立[J].华西医学,2006,21(3):540-542.

(收稿日期:2010-10-28 修回日期:2010-11-02)