

· 基础研究 ·

## 肾动脉狭窄合并动脉粥样硬化大鼠模型的建立

郝炎<sup>1#</sup>, 杨乔岚<sup>1</sup>, 余翼<sup>1</sup>, 韩玉贞<sup>1</sup>, 陈明<sup>2△</sup>

(1. 泸州医学院附属医院肾内科, 四川泸州 646000; 2. 成都中医药大学附属医院肾内科 610072)

**摘要:**目的 探讨手术联合维生素 D<sub>3</sub> 及高脂饮食建立大鼠肾动脉狭窄合并动脉粥样硬化(AS)模型的方法。方法 将健康雄性 SD 大鼠 104 只分为对照组、两肾一夹(K2C1)组及两肾均夹(K1C1)组,检测试验前及造模处理 10 周后血压(BP);血清中胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)及尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)。行主动脉 HE 染色及肾脏 PAS 染色观察。结果 造模完成后手术组(K1C1 组和 K2C1 组)BP 及 TC、BUN、Scr 与造模前及对照组比较均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );但 K1C1 组和 K2C1 组比较,上述指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。通过染色及镜下观察发现,手术组可见满意斑块形成,主动脉弓钙化明显,内膜显著增厚、平滑肌细胞增生及炎症细胞浸润,术侧肾脏发生缺血性改变;对照组则内膜增生凸向管腔,平滑肌细胞有增生,细胞排列紊乱,有少量泡沫细胞形成,但其变化较手术组为小。结论 通过手术及腹腔注射维生素 D<sub>3</sub> 50 万 IU/Kg 并联合高脂饲养,可有效建立肾动脉狭窄合并动脉粥样硬化动物模型。

**关键词:**动脉粥样硬化;肾动脉梗阻;胆骨化醇;模型;动物

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0581-03

## Establishment of a rat model of atherosclerosis combined with renal artery stenosis

Hao Yan<sup>1#</sup>, Yang Qiaolan<sup>1</sup>, Yu Yi<sup>1</sup>, Han Yuzhen<sup>1</sup>, Chen Ming<sup>2△</sup>

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610072, China)

**Abstract:** Objective To explore an efficient method to establish a rat model of atherosclerosis combined with renal artery stenosis using surgery and vitamin D<sub>3</sub> and high-fat diet. **Methods** One hundred and four healthy SD rats were randomly divided into 3 groups: control group, two-kidneys and one-clip(K2C1) group, one-kidneys and one-clip(K1C1) group. ten weeks after surgery and raise, BP, TC, TG, BUN, Scr in rat were detected, the sections of the aorta for HE and renal tissue were prepared for PAS dyeing observation. **Results** The level of BP, TC and BUN, Cr in surgery groups(K1C1 and K2C1) were obviously higher than that before model-constructing and in the control group( $P < 0.05$ ), but TG was normal( $P > 0.05$ ). Obvious calcification, endometriosis thickening, smooth muscle cell proliferation and inflammatory cells infiltration were obvious in the surgery groups. The kidney had ischemia change in the surgery groups. Compared with the surgery groups, the control group had endometriosis thickening, smooth muscle cell proliferation and foam cells formation, but smaller. **Conclusion** The rat model of atherosclerosis combined with renal artery stenosis can be effectively established using surgery and vitamin D<sub>3</sub> combined with high-fat diet.

**Key words:** atherosclerosis; renal artery obstruction; cholecalciferol; models, animal

动脉粥样硬化(AS)是一种慢性、进展性的动脉内膜疾病,是众多疾病如冠心病、肾动脉狭窄的病理基础。据文献报道,(AS)所致的肾动脉狭窄占有肾动脉狭窄的 90%<sup>[1]</sup>,因此,合理选择药物治疗该类疾病就显得尤为重要。目前,肾动脉狭窄联合 AS 动物模型尚无相关报道,作者参考国内外相关文献<sup>[2-4]</sup>,通过建立两肾一夹(K2C1)、两肾均夹(K1C1)并注射维生素 D<sub>3</sub> 联合高脂饲料饲养 10 周,成功地复制了肾动脉狭窄合并 AS 模型,为该类疾病的研究打下了模型基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 8 周龄雄性 SD 大鼠,体质量为 190~210 g,购自泸州医学院实验动物中心。

**1.1.2 仪器与试剂** BP98A 无创血压仪(日本软隆公司生产,由重庆中药研究院提供);维生素 D<sub>3</sub>(上海第九制药厂);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司)以及戊巴比妥、无菌针灸针(0.2 mm×5 cm)、3-0 和 4-0 医用缝合线若干。

**1.1.3 高脂饲料的配制** 2%胆固醇,0.5%胆酸钠,5%白糖,10%猪油,82.5%基础饲料。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物的选择及分组** 选择健康雄性 SD 大鼠 104 只,随机分为 3 组:(1)对照组 24 只;(2)K1C1 组 40 只;(3)K2C1 组 40 只,实验开始前饲以基础饲料喂养 3 d,在实验过程中均分笼喂养,室内温度 21~26 °C,饮水不限,总周期为 10 周。

**1.2.2 测量血压及体质量** 实验前及造模后均隔周 1 次测量体质量,使用 BP98A 无创血压仪采用尾套法测量大鼠收缩压及舒张压,每次重复 3 次,取其平均值。对 K1C1 及 K2C1 组进行造模处理,凡造模手术后血压比手术前高 20 mm Hg(大于正常血压值 3 个标准差)以上且高于 130 mm Hg,并且留取标本时狭窄侧肾脏无梗死瘢痕者视为造模成功<sup>[5]</sup>。

**1.2.3 手术模型的建立** 用戊巴比妥 45 mg/kg 腹腔内注射麻醉,将 SD 大鼠俯卧于手术台上,四肢及头部固定,剪去左侧肾脏位置周围皮肤(范围 4~6 cm)的毛,用聚维酮碘消毒皮肤,盖上高温消毒后的孔巾,继之用手术刀纵行切开皮肤约 3~4 cm,从背纵肌与腹斜肌交界处钝性分离肌肉,暴露肾脏后,将左侧肾动脉钝性分离,然后穿入 3-0 无菌丝线,将直径为 0.2 mm 的针灸针与肾动脉血管长轴紧贴平行放置<sup>[6]</sup>,继之将丝线

扎紧肾动脉和针灸针后抽出针灸针,这样就造成了单侧肾动脉狭窄(即 K2C1 模型)。同样,在该手术基础上将右侧肾脏切除就完成 K1C1 动物模型的建立,见图 1。

**1.2.4 术后的管理** 术后 3 d 内每天腹腔内注射青霉素 2 万~4 万 u,以防止感染,于术后第 3 天予高脂饲养,量不限,同时予维生素 D<sub>3</sub> 50 万 IU/kg,分 3 d 腹腔内注射。

**1.2.5 生化指标检测及主动脉、肾脏标本的采集** 于实验前 1 周各组大鼠鼠尾采血,并于实验结束时禁食 8 h 后及戊巴比妥腹腔注射麻醉后心脏采血,血液标本均以 4 000 r/min 离心 15 min 分离出血清,采用全自动生化分析仪检测实验前后 TC、TG 及 BUN、Scr,将主动脉弓及左侧肾脏均一分为二,一部分行石蜡包埋后切片染色,另一部分于液氮冷冻保存备用。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件包处理数据。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组内术前、术后比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 SD 大鼠存活率、造模手术成功率及体质量变化** 对照组 SD 大鼠在整个实验过程中均存活,存活率达 100%,而 K1C1

术后 3 d 内死亡 7 只,其后在喂养过程中死亡 3 只,存活率 75%。但 K2C1 组术后 3 d 内无死亡,在喂养过程中死亡 4 只,存活率为 90%。造模后血压在第 2 周开始上升,第 4 周趋于稳定高值,按上述血压标准判断为造模成功,实验结束时 K1C1 组余 24 只大鼠(造模总成功率 60%),K2C1 组余 30 只大鼠(造模总成功率 75%),组内血压前后比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对照组大鼠体质量随喂养时间而逐渐增加,实验结束时略有轻度下降,但组内前、后比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );手术组第 1、2、3 周增加,第 4 周开始减少,且组内前、后比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

**2.2 血脂及肾功能的变化** 各组大鼠喂养 10 周后,TC 均较实验前明显升高,组内前、后比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且 K1C1 组升高与对照组升高比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),而手术组肾功能造模前后比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),K1C1 组 Scr 由术前 ( $24.15 \pm 0.43$ )  $\mu\text{mol/L}$  升高至术后 ( $49.54 \pm 11.61$ )  $\mu\text{mol/L}$ ,不仅如此,K1C1 组 BUN、Scr 升高与对照组比较差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 1 SD 大鼠手术前后血压及体质量的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 术前          |            |             | 术后             |                |               |
|--------|-------------|------------|-------------|----------------|----------------|---------------|
|        | 收缩压(mm Hg)  | 舒张压(mm Hg) | 体质量(g)      | 收缩压(mm Hg)     | 舒张压(mm Hg)     | 体质量(g)        |
| 对照组    | 124.11±6.50 | 82.50±7.08 | 200.50±7.43 | 128.10±3.79    | 82.00±8.96     | 193.42±3.17   |
| K1C1 组 | 123.01±5.08 | 77.00±5.52 | 200.32±5.03 | 162.00±29.86*# | 109.71±15.65*# | 163.72±4.44*# |
| K2C2 组 | 124.10±5.05 | 74.50±3.91 | 202.08±4.19 | 152.00±24.91*# | 108.91±16.82*# | 174.30±3.02*# |

\*:  $P < 0.05$ ,与对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,与组内术前比较。

表 2 SD 大鼠手术前后血脂及肾功能的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 术前         |            |             |                          | 术后          |            |              |                          |
|--------|------------|------------|-------------|--------------------------|-------------|------------|--------------|--------------------------|
|        | TC(mmol/L) | TG(mmol/L) | BUN(mmol/L) | Scr( $\mu\text{mol/L}$ ) | TC(mmol/L)  | TG(mmol/L) | BUN(mmol/L)  | Scr( $\mu\text{mol/L}$ ) |
| 对照组    | 1.4±0.10   | 0.89±0.22  | 5.96±0.49   | 24.13±0.68               | 3.03±1.18#  | 0.84±0.38  | 5.68±1.89    | 31.50±5.17               |
| K1C1 组 | 1.49±0.08  | 0.88±0.07  | 5.95±0.39   | 24.15±0.43               | 4.35±1.94*# | 0.91±0.41  | 10.58±2.38*# | 49.54±11.61*#            |
| K2C1 组 | 1.50±0.09  | 0.91±0.09  | 5.83±0.40   | 25.49±0.93               | 3.61±1.56#  | 0.87±0.27  | 8.30±3.46*#  | 38.40±8.09#              |

\*:  $P < 0.05$ ,与对照组比较; #:  $P < 0.05$ ,与组内术前比较。



图 1 大鼠肾动脉狭窄手术示意图

**2.3 主动脉组织学变化** 对胸主动脉进行 HE 染色后观察发现,对照组血管内皮细胞脱落,内膜增厚并向管腔突出,平滑肌细胞增生,细胞排列紊乱,于突出的内膜及增生的平滑肌间见少量脂质沉积及泡沫细胞形成(封 4 图 2A)。手术组则内膜显著增厚,可见典型斑块形成,斑块内见坏死核心、泡沫细胞及巨噬细胞和显著增生的平滑肌细胞,内膜下弹性纤维变性、断裂,见明显的钙化和严重的血管壁破坏及炎症细胞浸润,中膜平滑

肌萎缩(封 4 图 2B、C)。但 K1C1 组与 K2C1 组血管壁改变无明显差异。

**2.4 肾脏形态学的改变** 对照组仅可见轻微肾小管萎缩,肾基底膜轻度增厚(封 4 图 3A)。手术组与对照组相比,肾脏外观形态尚规则,色泽呈暗红色,体积较对照组同侧缩小,而 K2C1 组右侧肾脏则代偿性体积有增大。PAS 染色观察发现,手术组肾小球及肾小管均有萎缩,尤以肾小管最为突出,并伴肾间质纤维化及广泛的炎症细胞浸润,有明显的蛋白管型、颗粒样变性、血管样玻璃样变性,见封 4 图 3B、C。

## 3 讨 论

AS 的发病率和致残率逐年增加,已成为威胁人类健康最重要的疾病之一,它亦是肾动脉狭窄最主要的病因,对该类疾病的发生、发展及治疗策略的研究具有重要的临床意义,但对于 AS 的发病机制目前尚不完全清楚。当前,国内外选作 AS 模型的动物颇多,但大鼠作为 AS 模型具有其他动物不可替代的优点,如 SD 大鼠繁殖能力强、易获得、饲养方便且成本低,其本身抵抗力强,死亡率低,且它的饮食、生活习性及解剖结构

均与人类相近<sup>[7]</sup>。单独的肾动脉狭窄或 AS 模型制作方法已趋成熟,但既有肾动脉狭窄又有 AS 的模型尚未见相关报道。为此,作者进行了一些探索,通过手术造成大鼠肾动脉狭窄及高脂饲养联合维生素 D<sub>3</sub> 建立了肾动脉狭窄合并 AS 大鼠模型。

肾性高血压大鼠动物模型制作方法颇多,如银夹法、针灸针缩窄法等<sup>[8]</sup>。作者通过针灸针与肾动脉平行扎紧的方法发现,术后 2 周大鼠血压开始升高,于第 4 周达到一稳定高值,且组内术前、后血压比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而两肾均夹组较两肾一夹组血压更高,但二组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),血压升高程度及手术成功率等均与文献报道基本一致<sup>[9]</sup>。银夹法是传统的狭窄方法,但它有银夹难以制备、术中操作要求高、且狭窄程度可能因操作手法而变化大以及术后大鼠体内残留异物金属等缺点。相较于银夹法,作者据大鼠的血管粗细灵活选择合适的针灸针,缝线扎紧后抽出针灸针造成狭窄的方法,具有操作简单、容易掌握、所需术中物品易于获得、狭窄程度可据血管直径调整及术后无异物残留等优点,且其成功率与银夹法相当。但实验结束时存活率却低于文献报道,可能与饲养时间更长有关。行两肾一夹及两肾均夹方法造成的血压升高幅度差异无统计学意义,但它们形成高血压的机制却不相同<sup>[10]</sup>,这是作者针对不同的肾动脉狭窄病因选择不同的治疗策略理论基础<sup>[11]</sup>。

手术组肾功能普遍有升高,特别是两肾均夹组 BUN、Scr 升高较对照组差异有统计学意义,且通过肾脏 PAS 染色发现,造模成功的大鼠术侧肾脏均有不同程度的肾血管玻璃样变,肾小管萎缩,间质纤维化及蛋白管型形成等慢性肾功能不全的改变,为造模成功提供了有力证据。此外,作者通过染色观察发现,手术模型组 AS 形成较对照组满意,表明了高血压在 AS 进展中有促进作用,这可能与高血压对血管壁损伤的作用有关,有助于指导使用高血压药物治疗这类疾病。不仅如此,形成 AS 还需高脂血症的参与,由于大鼠缺乏胆囊,对脂质吸收不完全,很难达到 AS 所需的血脂浓度,作者通过在饲料中加入胆酸钠及白糖可有效克服这一缺点,使血脂水平较术前显著升高( $P < 0.05$ ),其中又以两肾均夹组升高最明显,这可能与血压水平更高、肾脏滤过率下降以及机体代谢改变有关。同样,单纯的高脂血症亦很难快速形成 AS,通过注射维生素 D<sub>3</sub> 使动脉壁形成钙超载,破坏了内皮完整性,为脂质沉积奠定了基础。通过维生素 D<sub>3</sub> 与高脂饲养联合使用保证了 AS 形成的条件。然而,对于维生素 D<sub>3</sub> 的使用量现有文献并无统一标准,使用量多在 60 万~70 万 IU/kg<sup>[12]</sup>,维生素 D<sub>3</sub> 过量可致血管壁破坏过于严重,亦会加重肾脏的负担,对肾小管产生损害<sup>[13]</sup>。作者的模型由于采用肾动脉狭窄使肾脏部分缺血,滤过功能下降,对维生素 D<sub>3</sub> 代谢能力下降,因此作者减量了维生素 D<sub>3</sub> 使用量,将其统一为 50 万 IU/kg,仍然取得了满意的效果,与既往方法相比能进一步减轻维生素 D<sub>3</sub> 对肾脏的损害。

肾动脉狭窄由于其病因主要是 AS,因此,实验中建立肾动脉狭窄合并 AS 模型就显得尤为迫切。作者通过针灸针缩窄法联合注射维生素 D<sub>3</sub> 及高脂饲养成功建立了该模型,具有耗时短、费用低廉、所需设备简单、操作易掌握等优点,同时也更接近肾动脉狭窄正常的病理过程,并且维生素 D<sub>3</sub> 使用量较

以往方法有减少而达到了相同的效果。但该方法亦有术后存活率不高,特别是在饲养过程中发生较高死亡率及体质量显著下降等缺点。但到目前为止,大鼠仍不失为这类模型的理想动物。

#### 参考文献:

- [1] Trude CL, Elma JG, Johanna LB, et al. Stent placement for renal arterial stenosis: where do we stand? A meta-analysis[J]. *Radiology*, 2000, 216(1): 78-85.
- [2] 戴勇, 彭武建, 徐卓佳. “两肾一夹”肾性高血压大鼠模型改进[J]. *实验动物科学与管理*, 2006, 23(2): 60-62.
- [3] 杨鹏远, 芮耀诚, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24(7): 802-804
- [4] Williams H, Johnson JL, Carson KG, et al. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(5): 788-792.
- [5] Huang WC, Wu JN. Blunted renal responses to atrial natriuretic peptide and its reversal by unclipping in one-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 1997, 15(2): 181-189.
- [6] 尹时华, 金延安, 化长林. 建立肾性高血压大鼠实验模型的一种新方法[J]. *咸宁医学院学报*, 1999, 13(1): 15-17.
- [7] Groener JE, Bax W, Stuan C, et al. Difference in substrate specificity between human and mouse lysosomal acid lipase: low affinity for cholesteryl ester in mouse lysosomal acid lipase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1487(223): 155-162.
- [8] Smith SH, Bishop SP. Selection criteria for drug treated animal in two-kidney one clip renal hypertension[J]. *Hypertension*, 1986, 8(8): 700-709.
- [9] Wesel P, Mazzolai L, Nussberger J, et al. Two-kidney, one clip and one kidney, one clip hypertension in mice[J]. *Hypertension*, 1997, 29(4): 1025-1030.
- [10] Melaragno MG, Fink GD. Enhanced slow pressor Effect of Angiotensin II in Two-kidney, one clip rats[J]. *Hypertension*, 1995, 25(2): 288-293.
- [11] Textor SC. Stable patients with atherosclerotic renal artery stenosis should be treated first with medical management[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 42(5): 858-863.
- [12] 赵娟, 李相军, 孙波. 维生素 D<sub>3</sub> 联合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(21): 3569-3571.
- [13] Jisu OH, Weng S, Shaili K, et al. 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Circulation*, 2009, 120(8): 687-698.

(收稿日期: 2011-03-10 修回日期: 2011-08-26)