

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.08.001

新型组合型肝肾支持系统治疗西藏小型猪急性肾衰模型的实验研究*

冯磊¹,何国林¹,熊龙辉¹,傅超毅¹,霍小林²,高毅^{1△}

(1. 南方医科大学珠江医院肝胆二科/广东省人工器官与组织工程研究中心/

“器官衰竭”防治协同创新中心,广州 510282;2. 中国科学院电工研究所,北京 100190)

[摘要] **目的** 评估新型组合型肝肾支持系统治疗西藏小型猪肾衰模型的安全性及有效性。**方法** 将 5 头西藏小型猪采用结扎双侧肾动脉的方法构建肾衰模型,造模后治疗组用新型组合型肝肾支持系统进行治疗(CRRT 模式),对照组造模后不进行治疗,在治疗 0、4、8 h 抽取静脉血进行内毒素、生化检测及需氧菌培养厌氧菌培养,观察造模前后、治疗前后西藏小型猪的各项生化指标的变化;实验过程中每 2 小时记录仪器的各项压力监测指标。**结果** 两组实验动物肾衰模型均构建成功,治疗组经过新型组合型肝肾支持系统治疗后,一般情况改善;对照组动物一般情况持续恶化。实验动物在实验过程中,心电图未出现明显异常,两组动物在 0 h 时生命体征差异无统计学意义($P>0.05$),其余时段治疗组心率和呼吸频率明显低于对照组($P<0.05$),而血氧饱和度和平均动脉压明显高于对照组($P<0.05$);造模前两组实验动物的生化指标差异无统计学意义($P>0.05$);造模后两组动物与造模前相比差异有统计学意义($P<0.05$);治疗组经肝肾支持系统治疗后,各项生化指标明显下降,与治疗前相比,差异有统计学意义($P<0.05$);而对照组未出现明显变化。内毒素水平平均低于 0.5 EU/mL,动静脉端需氧、厌氧菌培养结果显示未见细菌生长。病理检查见明显的肾小管上皮肿胀、肾小管坏死。**结论** 新型组合型肝肾支持系统用于治疗西藏小型猪肾衰模型是安全、有效的,可进一步尝试用于临床试验。

[关键词] 肾功能衰竭;组合型肝肾支持系统;西藏小型猪**[中图分类号]** R692.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)08-1009-03

Experimental study of Tibet miniature pig model of acute renal failure treated by a novel hybrid liver and renal support system*

Feng Lei¹, He Guolin¹, Xiong Longhui¹, Fu Chaoyi¹, Huo Xiaolin², Gao Yi^{1△}

(1. Second Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University/

Guangdong Provincial Research Center of Artificialorgan and Tissue Engineering/Co-Innovation

Center of Organ Failure Research Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Institute of

Electrical Engineering Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the novel hybrid liver and renal support system the safety and efficacy of the treatment of Tibet mini pig model of renal failure. **Methods** Five Tibet miniature pig bilateral renal artery ligation approached to construct the models of renal failure, treatment group was treated with therapy (CRRT mode) of the novel hybrid liver and renal support system after modeling, while the control group received no treatment. Drawing venous blood endotoxin, biochemical tests and aerobic anaerobic culture when in the treatment of 0, 4, 8 h; then we observed the changes of biochemical indicators in Tibet mini pigs before and after treatment; we recorded machine pressure monitoring indicators every 2 hour during treatment. **Results** The model of renal failure of two experimental animals were successfully constructed. The general condition of treatment group was improved after treated by the novel hybrid liver and renal support system, while the control groups continued to deteriorate. The experimental animals did not appear abnormal ECG during the experiment. Two groups of animals showed no statistics significant difference ($P>0.05$) in the period of 0 h. In the remaining period, heart rate and respiratory rate in treatment group was significantly reduced ($P<0.05$), while oxygen saturation and mean arterial pressure were significantly increased compared to control group ($P<0.05$). There was no differences of biochemical indicators between two groups before modeling ($P>0.05$); after modeling both groups biochemical indicators was significantly increased compared with baseline ($P<0.05$); after treatment of the hybrid liver and renal support systems in the treatment group, the biochemical parameters were significantly decreased compared with baseline, the difference was statistically significant different ($P<0.05$), while the control group did not change significantly. Blood endotoxin measured results were less than 0.5 EU/mL, arteriovenous end aerobic anaerobic culture showed no bacterial growth. Pathological examination showed significant swelling of the renal tubular epithelium and tubular necrosis. **Conclusion** The novel hybrid liver and renal support system for the treatment of Tibet mini-pig model of renal failure is safe and effective, and it can be further attempts for clinical trials.

[Key words] kidney failure; hybrid liver and renal support system; Tibet miniature pig

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2012AA020505); 国家自然科学基金资助项目(81470875); 广东省自然科学基金项目(2014A030312013); 广东省级科技计划项目(2014B020227002); 南方医科大学交叉学科创新团队培养计划项目; 广东省医学科研基金资助项目(C1036114)。 作者简介: 冯磊(1989-), 硕士, 住院医师, 主要从事生物人工肝的研发与动物实验。 △ 通讯作者: E-mail: gaoyi6146@163.com。

急性肾衰竭(简称肾衰)是全世界发病率和死亡率均较高的一种疾病,其影响人数超过 13 亿人,特别是在经济不发达的地区,这些地区由于缺少肾脏替代治疗的资源,死亡人数逐年上升^[1]。因此,发展支持和替代肾功能的新方法具有重要意义^[2]。临床上主要通过药物、血液透析及肾移植等方法治疗,由于肾源缺乏,目前主要是通过血液透析维持患者生命状态。本研究通过西藏小型猪来构建肾衰模型,并用新型组合型肝肾支持系统(又称新型生物人工肝系统,自主研发)进行治疗,以评估新型组合型肝肾支持系统治疗西藏小型猪肾衰模型的安全性及有效性。

1 材料与与方法

1.1 材料 选择 5 头雄性西藏小型猪[来自南方医科大学实验动物中心,合格证号为:SCXK(粤)2011-0015],8~9 个月龄,体质量 40~50 kg;所需材料包括新型组合型肝肾支持系统(由南方医科大学珠江医院联合中国科学院电工研究所共同研发)、血液透析管路(自行设计)、血液透析器(费森尤斯 AV600S)、一次性血液透析双腔导管(广东百合医疗)、一次性 7F 双腔中心静脉导管(广东百合医疗)、有创血压心电监护仪、盐酸赛拉嗪注射液(陆眠宁 II)、丙泊酚注射剂、注射泵等。

1.2 方法

1.2.1 西藏小型猪肾衰模型的构建 实验前适应性喂养 1 周,术前禁食水 12 h,自由饮水。速眠新 II 肌肉注射诱导麻醉,于股动静脉处备皮、消毒、铺单,切开皮肤,暴露股动静脉,行股动静脉插管,抽血进行血生化、血常规和凝血功能检测,经股静脉持续泵入丙泊酚维持麻醉,待麻醉满意后,进行心电监护,观察实验过程中心电图、心率、呼吸频率、血氧饱和度。于颈静脉搏动处备皮、消毒、铺单,切开皮肤,逐层分离,暴露颈静脉,行颈内静脉置管用于血液透析;腹正中区域备皮消毒,用利多卡因局部浸润麻醉,切开皮肤,逐层打开腹腔,暴露膀胱,行膀胱造瘘以便于计算尿量;暴露双侧肾脏,解剖分离双侧肾动脉,结扎双侧肾动脉,消毒关腹,将模型猪放入饲养室,给予补液,静待其苏醒,并取血检测肾功能。当肌酐大于 706 $\mu\text{mol/L}$ 或血钾大于 6.5 mmol/L 时开始上机进行透析治疗。

1.2.2 置换液的配制 将置换液配制成分白袋和紫袋两袋,白袋:生理盐水 3 000 mL、10% KCl 24 mL、25% MgSO_4 6 mL、5% NaHCO_3 500 mL 和注射用水 750 mL;紫袋:生理盐水 3 000 mL、5% 葡萄糖溶液 460 mL、5% CaCl_2 50 mL 和注射用水 750 mL;所有液体均在超净台内配制,严格无菌操作,置换液配置好后,治疗过程中经不同通路同时输入血液管路。

1.2.3 肾衰模型猪的上机治疗 肾衰模型猪制备好后,随机将其分为治疗组($n=3$)和对照组($n=2$),按 CRRT 模式进行管路连接,模型猪上机前所有管路以及滤器用加入 12 500 U 肝素钠的 706 代血浆进行预充,给予静脉注射地塞米松 5 mg,

盐酸异丙嗪注射液 25 mg 肌肉注射,经双腔管按 0.5 mg/kg 给予肝素,同时启动肝素泵,按 0.05 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 追加肝素,实时监测活化部分凝血酶时间(APTT),根据 APTT 值调整肝素泵的速率,治疗结束前 1 h 停止追加肝素^[3]。血泵流量调节为 50 mL/min,弃浆泵流量调节为 10 mL/min,返浆泵流量调节为 5 mL/min,补液泵流量调节为 5 mL/min,超滤率 20%。治疗组进行 CRRT 模式治疗,对照组按实验组方式连接,但不加透析器和置换液,仅补充生理盐水及葡萄糖。连接压力监测器,检查各个报警装置。每头模型猪治疗 8 h,每隔 2 小时记录 1 次静脉压、跨膜压,动态监测猪的动脉血压、血氧饱和度、心率、呼吸、心电图。治疗过程中,每隔 2 小时输入 0.9% 生理盐水 200 mL 进行冲管,以防止滤器和管路堵塞,密切注意西藏小型猪的胸廓起伏、生命体征的变化。同时从实验开始第 0、4、8 h 股静脉采血进行血培养、内毒素、血生化、血常规和凝血功能检测(南方医科大学珠江医院检验科)。治疗结束后,继续观察实验猪饮食、饮水、生命体征等变化^[3]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数间比较采用单向方差分析,数据两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 所有实验猪肾衰模型均构建成功,造模过程中未出现麻醉过量、失血过多等状况,造模后西藏小型猪尿量明显减少,精神萎靡,进食减少。治疗组经过新型组合型肝肾支持系统治疗后,一般情况改善,进食增加。对照组动物一般情况持续恶化。治疗过程中机器各项监测系统正常,未出现异常状况。

2.2 两组实验动物生命体征的变化 实验动物在实验过程中,心电图未出现明显异常,两组实验动物在 0 h 时生命体征差异无统计学意义($P > 0.05$),其余时段治疗组心率和呼吸频率明显低于对照组($P < 0.05$),而血氧饱和度和平均动脉压明显高于对照组($P < 0.05$),见表 1。

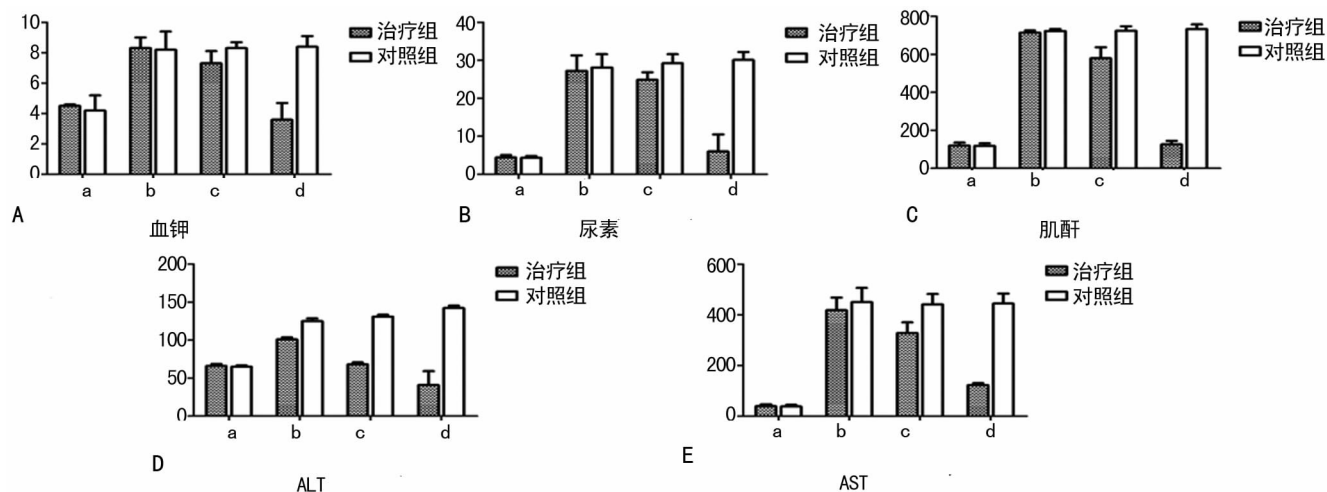
2.3 造模前后及治疗 4、8 h 后的生化指标变化 造模前两组实验动物的生化指标差异无统计学意义($P > 0.05$);造模后两组动物与造模前相比差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组经肝肾支持系统治疗后,各项生化指标明显下降,与治疗前相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);而对照组未出现明显变化(图 1)。

2.4 污染情况 实验第 0、4、8 小时采血所测得的内毒素结果均小于 0.5 EU/mL,动静脉端需氧、厌氧菌培养结果显示未见细菌生长。

2.5 病理检测结果 造模前肾组织中肾小球、肾小管结构清楚、正常;造模后能看见明显的肾小管上皮肿胀、肾小管坏死(图 2)。

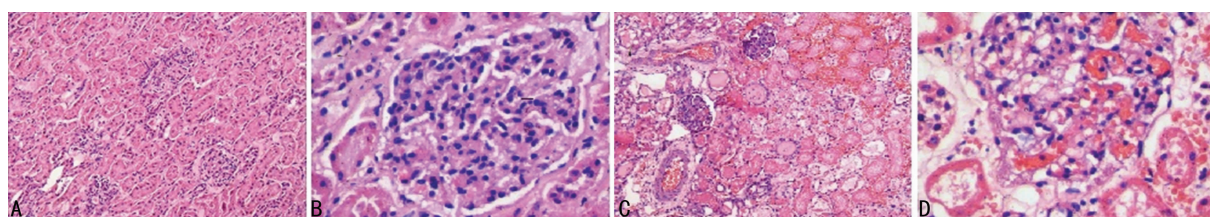
表 1 实验动物生命体征的变化($\bar{x} \pm s$)

时刻	心率(次/分)		呼吸频率(次/分)		血氧饱和度(%)		平均动脉压(mm Hg)	
	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组	治疗组	对照组
0 h	79.5 \pm 0.7	79.1 \pm 1.1	23.0 \pm 1.4	22.5 \pm 1.2	97.0 \pm 1.4	98.1 \pm 1.1	101.0 \pm 1.4	100.2 \pm 1.3
2 h	83.3 \pm 2.1	89.2 \pm 2.3	27.0 \pm 4.2	29.1 \pm 2.3	98.5 \pm 0.7	91.2 \pm 2.3	97.0 \pm 2.8	94.1 \pm 2.1
4 h	83.0 \pm 4.2	91.3 \pm 1.4	27.0 \pm 1.3	31.0 \pm 4.2	96.5 \pm 2.1	87.4 \pm 3.1	96.0 \pm 2.8	87.4 \pm 1.2
6 h	85.5 \pm 2.1	94.5 \pm 3.1	30.0 \pm 1.2	38.3 \pm 2.1	97.0 \pm 1.4	84.3 \pm 2.4	104.5 \pm 2.1	85.2 \pm 2.4
8 h	87.4 \pm 0.7	102.1 \pm 2.6	28.0 \pm 2.8	44.5 \pm 3.2	98.0 \pm 2.8	75.9 \pm 1.6	98.5 \pm 0.7	76.8 \pm 3.2



a:造模前;b:造模后;c:上机 4 h;d:上机 8 h.

图 1 实验动物生化指标的变化



A:造模前肾组织(HE×10);B:造模前肾组织(HE×40);C:造模后肾组织(HE×10);D:造模后肾组织(HE×40).

图 2 实验动物造模前后病理变化

3 讨论

急性肾衰竭是由各种原因引起的肾功能在短时间内突然下降而出现的氮质废物滞留和尿量减少综合征,其主要表现为氮质废物肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)升高,水、电解质和酸碱平衡紊乱及全身各系统并发症^[4]。目前,临床上主要利用血液透析来维持患者的生命,透析机品种多种多样,各有其优缺点^[5-6]。本研究首次使用自主研发的新型组合型肝肾支持系统来进行肾衰竭动物模型的治疗,该支持系统具有独特的特点:(1)能够同时进行肝肾功能支持(人工肝以及 CRRT 持续性肾脏替代治疗);(2)能够选择多种治疗模式进行血液净化治疗;(3)高度智能化以及程序机化,操作简单、方便,能提供数据的安全操作。

本课题组前期实验^[3]已经证明该新型组合型肝肾支持系统是安全的。实验中抽取动静脉端血液进行内毒素及需氧、厌氧菌培养,结果显示内毒素水平低于 0.5 EU/mL,需氧厌氧菌培养显示未见细菌生长;治疗组动物生命体征平稳,未出现明显波动,两组实验动物在 0 h 时生命体征差异无统计学意义 ($P > 0.05$),治疗组其余时段与对照组相比,心率和呼吸频率明显低于对照组 ($P < 0.05$),而血氧饱和度和平均动脉压明显高于对照组 ($P < 0.05$),实验动物的生命安全得以保证,再次证实了该机器的安全性。

临床工作中常遇见多器官衰竭的患者,医学工作者不断致力于提高多器官衰竭患者抢救成功率的研究,收到了一定的成效,但是多器官衰竭患者的死亡率依然很高^[7]。血液透析患者经输血或接触血液污染的医疗器械发生乙型肝炎的机会明显增加,慢性肾衰维持血液透析患者多伴有免疫功能低下,感染乙型肝炎后病原体不易在体内消失,常成为长期抗原携带者,加上起病隐匿症状轻,易被漏诊和转化为慢性迁延性肝炎,从

而导致肝衰竭^[8]。在肾衰并发肝衰竭的情况下,应用具有多功能的治疗机器将具有重要的意义;本研究中使用新型组合型肝肾支持系统能满足这种患者的需求,因此将其应用于临床将具有重大意义。

本实验成功与否的关键在于西藏小型猪肾衰竭模型的构建,目前构建肾衰竭动物模型的方法主要包括缺血再灌注损伤模型^[9-10]、结扎双侧肾动脉模型^[11]及药物诱导模型^[12]。肾组织缺血是导致肾损伤的常见病理机制,本实验运用结扎双侧肾动脉来构建西藏小型猪急性肾衰竭模型,该方法具有造模时间短,可重复性好等优点。因西藏小型猪各项生化指标与人类较相近^[13-14],所以用其造模并进行治疗,对于临床治疗可提供相应的经验。造模前实验动物的各项生化指标均处于正常水平,造模 24 h 后均明显升高,治疗组经新型组合型肝肾支持系统治疗后,各项生化指标明显下降,与治疗前相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而对照组未出现明显变化。实验中,结扎双侧肾动脉 24 h 后,发现丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)有所升高,说明肾衰后,对肝功能有一定的影响;经过机器治疗后,AST、ALT 明显下降并趋于正常水平。

综上所述,新型组合型肝肾支持系统在治疗过程中,机器运行平稳正常,实验动物生命体征平稳,未出现异常状况,其用于治疗西藏小型猪肾衰模型是安全、有效的,可尝试进一步用于非人灵长类动物试验,并过渡到临床试验。

参考文献

[1] Schieppati A, Perico N, Remuzzi G. Eliminating treatable deaths due to acute kidney injury in resource-poor settings [J]. Semin Dial, 2015, 28(2): 193-197. (下转第 1015 页)

- motes pancreatic cancer via Polycomb-dependent and-independent transcriptional programs [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2):727-739.
- [5] Kottakis F, Foltopoulou P, Sanidas I, et al. NDY1/KDM2B functions as a master regulator of polycomb complexes and controls self-renewal of breast cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(14):3935-3946.
- [6] He J, Nguyen AT, Zhang Y. KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2011, 117(14):3869-3880.
- [7] Zhang F, Xu L, Xu L, et al. JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice[J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(1):23-34.
- [8] Haag T, Herkt CE, Walesch SK, et al. The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanisms[J]. *Genes Cancer*, 2014, 5(9/10):365-374.
- [9] Hasemann MS, Lauridsen FB, Waage J, et al. C/EBPis required for Long-Term Self-Renewal and lineage priming of hematopoietic stem cells and for the maintenance of epigenetic configurations in multipotent progenitors [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(1):e1004079.
- [10] Zhang YW, Zheng Y, Wang JZ, et al. Integrated analysis of DNA methylation and mRNA expression profiling reveals candidate genes associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Epigenetics*, 2014, 9(6):896-909.
- [11] Rebbani K, Marchio A, Ezzikouri S, et al. TP53 R72P polymorphism modulates DNA methylation in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(14):74.
- [12] Li N, Yang L, Wang H, et al. MiR-130a and MiR-374a function as novel regulators of cisplatin resistance in human ovarian cancer a2780 cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0128886.
- [13] He J, Kallin EM, Tsukada Y, et al. The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15 (Ink4b) [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(11):1169-1175.
- [14] Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, et al. Fbxl 10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2[J]. *Blood*, 2015, 125(22):3437-3446.
- [15] Tzatsos A, Paskaleva P, Lymperi S, et al. Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(38):33061-33069.

(收稿日期:2015-10-19 修回日期:2015-12-10)

(上接第 1011 页)

- [2] Imberti B, Tomasoni S, Ciampi O, et al. Renal progenitors derived from human iPSCs engraft and restore function in a mouse model of acute kidney injury[J]. *Sci Rep*, 2015(5):8826.
- [3] 熊龙辉,何国林,张志,等. 西藏猪模型对新型生物人工肝治疗安全性的评估[J]. *重庆医学*, 2014, 43(9):1038-1040.
- [4] Gueler F, Shushakova N, Mengel M, et al. A novel therapy to attenuate acute kidney injury and ischemic allograft damage after allogenic kidney transplantation in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1):e0115709.
- [5] 方桂珍,郑传权. 贝朗 Dialog 血液透析机的定标与校准[J]. *中国医疗设备*, 2012, 27(4):121-122.
- [6] 孟伶俊. 费森尤斯 4008S 血液透析机的报警问题与维修措施[J]. *医疗装备*, 2014, 29(8):72-73.
- [7] 杨敬华,孙咏梅,许辉,等. 连续性肾脏替代治疗在多器官功能衰竭救治中的临床应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 12(11):68-70.
- [8] 陈桂珍. 慢性肾衰患者血液透析并发症及其预防[J]. *辽宁医学杂志*, 2003, 17(3):138.
- [9] Awad AS, El-Sharif AA. Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanisms protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(8):992-996.
- [10] Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(6):1549-1558.
- [11] 陶琦,姚源璋. 急性肾衰竭动物模型研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14(7):654-655.
- [12] Chiu PY, Leung HY, Ko KM. Schisandrin B enhances renal mitochondrial antioxidant status, functional and structural integrity, and protects against Gentamicin-Induced nephrotoxicity in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4):602-605.
- [13] 顾为望,刘运忠,唐小江,等. 西藏小型猪血液生理生化指标的初步研究[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(1):60-63.
- [14] 袁进,吴清洪,陈丽,等. 西藏小型猪与人血液流变学指标的比较分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 17(10):82.

(收稿日期:2015-10-14 修回日期:2015-12-15)