

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.14.004

建立一种伴有肾小球和肾小管间质损伤的大鼠慢性肾衰竭动物模型*

林佳如¹, 苟芳芳², 李雪英², 朱婷婷², 樊均明^{1,2,3△}

(1. 成都中医药大学中西医结合临床医学院, 成都 610075; 2. 西南医科大学附属中医院肾病内科, 四川泸州 646000; 3. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

[摘要] **目的** 建立一种伴有肾小球和肾小管间质损伤的慢性肾衰竭动物模型。**方法** SD 大鼠分为 6 组: 正常组, 阿霉素 15 mg/kg 组(A 组), 腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组(B 组), 阿霉素 15 mg/kg+腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组(C 组), 阿霉素 10 mg/kg+腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组(D 组), 阿霉素 5 mg/kg+腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组(E 组)。进行尾静脉注射阿霉素和灌胃腺嘌呤, 分别于 14、28 d 处死大鼠, 并收集尿液、血液及肾脏。**结果** 正常组和 B、E 组大鼠存活过 14、28 d; E 组 24 h 尿蛋白较 B 组和正常组明显增加; E 组大鼠血清中血尿素氮(BUN), 血肌酐(Scr)等水平明显升高; 病理切片示 B、E 组大鼠有不同程度的肾小管间质纤维化和肾小球减少, 其病变较余组典型。**结论** 该方法能够成功建立伴有肾小球和肾小管间质损伤的慢性肾衰竭动物模型, 但药物剂量需要进一步的研究。

[关键词] 肾功能衰竭, 慢性; 肾小球; 动物模型; 腺嘌呤; 阿霉素

[中图分类号] R332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)14-1882-04

Investigation of a novel rat chronic renal failure model with glomerular and tubulointerstitial injury*

Lin Jiaru¹, Gou Fangfang², Li Xueying², Zhu Tingting², Fan Junming^{1,2,3△}

(1. Department of Internal Medicine, Chengdu University of T. C. M, Chengdu, Sichuan 610075, China;

2. Urology Department, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

3. Laboratory of Psychiatry, State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the parameters of the chronic renal failure model with interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. **Methods** The rats were divided into six groups, which were normal group, adriamycin group (15 mg/kg adriamycin, Group A), adenine group (200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ adenine, Group B), high-level adriamycin plus adenine group (15 mg/kg adriamycin+200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ adenine, Group C), medium-level adriamycin plus adenine group (10 mg/kg adriamycin+200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ adenine, Group D), and low-level adriamycin plus adenine group (5 mg/kg adriamycin+200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ adenine, Group E). All the rats were underwent the injection of adriamycin via caudal vein and given adenine by gavage. The animals were harvested at 14th, 28th, the urine, serum and tissue samples were collected. **Results** Only the rats of normal group, group B, group E survived at 14th, 28th day; the 24 h protein urine of group E were statistically higher than those in normal group and group B; the BUN, Scr in group E rats were statistically increased; the pathological changes such as interstitial fibrosis, glomerulosclerosis in group E and group B were more obvious compared to other groups. **Conclusion** This method could establish a successful chronic renal failure with glomerular and tubulointerstitial injury, however, the optimal dosage still need to be investigated.

[Key words] kidney failure, chronic; kidney glomerulus; animal model; adenine; adriamycin

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是各种病因引起的肾脏损害和进行性恶化的结果, 是多种慢性肾病的后期阶段, 表现为毒素蓄留、代谢紊乱的症状。《柳叶刀》新近研究表明, 从 1990 年到 2013 年, 我国慢性肾脏疾病(CKD)的病死率大幅增加, 上升了 147%^[1-2]。流行病学调查研究表明, 大于 18 岁的成年人中, 我国 CKD 的患病率为 10.8%^[3-4]。其中, 约 2.0% 的 CKD 患者会进展至终末期肾病阶段, 主要通过维持性透析或肾移植来维持生命^[5-7]。而 CKD 的动物模型是生物医学研究中所建立模拟人类 CKD 表现的动物模型, 广泛用于人类 CKD 的病因、发病机制、防治技术和防治药物的探索。目前 CKD 尚无理想的西医理论下充分模拟自然病程的人类肾小球

和肾小管损伤兼备的动物模型。建立一种理想的 CRF 动物模型, 对于研究 CRF 发生机制及探寻各种延缓和阻断 CRF 进展的新方法, 具有重要意义。本研究采用阿霉素加腺嘌呤给药的方法寻找建立接近临床实际、使用广泛、简便稳定的 CRF 模型, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 33 只清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 300~350 kg, 由重庆腾鑫生物技术有限公司提供[批号: SCXK(渝)2012-0005]。将大鼠分为 6 组: 正常组 3 只, 阿霉素 15 mg/kg 组(A 组)6 只, 腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组(B 组)6 只, 阿霉

* 基金项目: 四川省科技厅中西医结合肾脏病防治四川省青年科技创新研究团队(2011JTD0014); 泸州市科技基金资助项目(泸市科 2010-128 号)。 作者简介: 林佳如(1988-), 住院医师, 在读博士, 主要从事肾内科相关研究。 △ 通讯作者, E-mail: junmingfan@163.com。

素 15 mg/kg+腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹组(C组)6只,阿霉素 10 mg/kg+腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹组(D组)6只,阿霉素 5 mg/kg+腺嘌呤 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹组(E组)6只。动物饲喂全价颗粒料,自由采食和饮水。

1.1.2 试剂 腺嘌呤购自 sigma 公司(产品编号:A8626);阿霉素购自浙江海正药业股份有限公司(批号:H33021980)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 将大鼠适应性喂养 1 周,给予 A、C、D、E 组共 4 组分别一次性尾静脉注射不同剂量的阿霉素;给予 B、C、D、E 组共 4 组大鼠腺嘌呤灌胃;正常组大鼠给予同等体积的生理盐水尾静脉注射及灌胃。在连续灌胃 5 d 后除 B 组外的造模组进行隔天灌胃。

1.2.2 标本的收集 选取每组中的 3 只大鼠,分别于灌胃后第 14、28 天处死,处死前 1 d 将大鼠置于代谢笼中,收集 24 h 尿液测尿量。水合氯醛麻醉后,右股动脉采血。

1.2.3 检测方法

1.2.3.1 生化指标的测定 全自动生化分析仪检测尿蛋白、血清肌酐(Scr)及尿素氮(BUN)、血钾(K⁺)、血钙(Ca²⁺)、血磷(P⁺)。

1.2.3.2 肾常规病理检查 肾组织经固定,包埋,切成 3 μm 厚石蜡切片,经苏木素-伊红(HE),光镜下观察肾小球、肾小管间质病理形态学改变。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般存活状态、死亡时间及病死率比较 第 1 周内 A、C、D 组的老鼠全部死亡。E 组大鼠死亡 1 只。在这 1

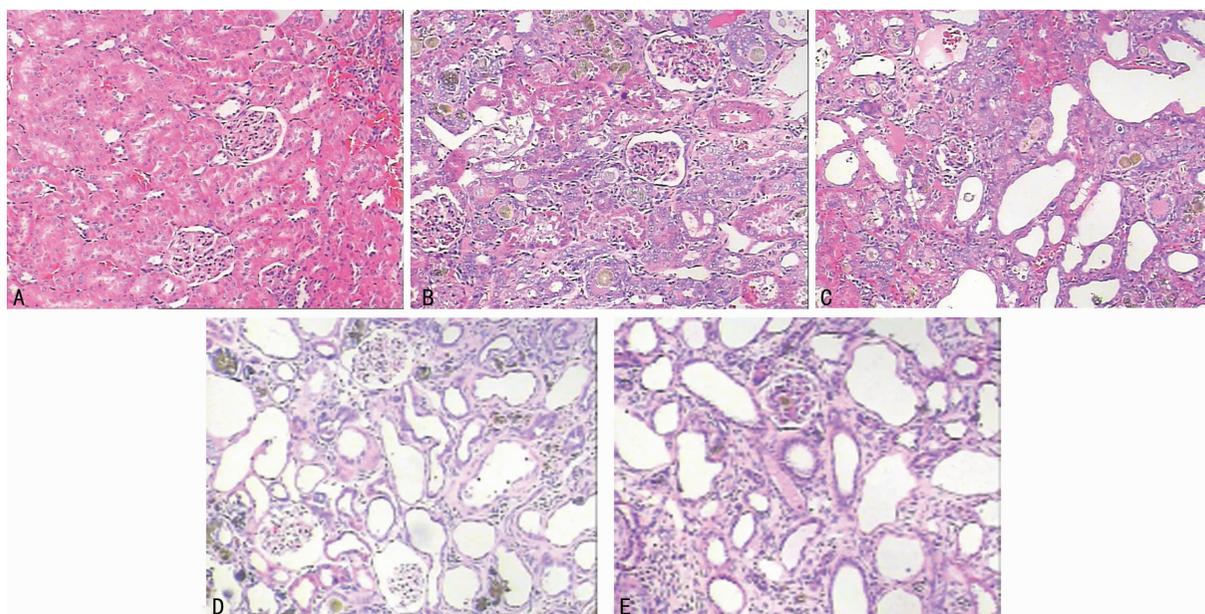
周期间,A、C、D 组大鼠出现不同程度的腹泻,食量下降且活动减少,喜蜷缩,足、腹、睾丸出现不同程度的水肿,以睾丸水肿最为明显,毛发凌乱,无光泽,且这 3 组大鼠均有不同程度的便血,尾巴、四肢及耳朵苍白,尿量减少。其他组大鼠也出现了不同程度的不良反应,但均无上述 3 组明显。正常组被毛光亮,活泼好动,双目有神,饮食正常,二便正常,无消瘦及腹胀大等症。第 2 周内 E 组死亡 2 只,并处死正常组大鼠 2 只,B 组 2 只,E 组 1 只。B 组及 E 组大鼠出现食量下降且活动减少,喜蜷缩,足、腹、睾丸出现轻度的水肿,毛发凌乱,无光泽,尾巴、四肢及耳朵苍白,体质量下降。第 3~4 周期间 B 组 2 只大鼠死亡。存活的大鼠的症状较前 2 周严重,其中 E 组怕冷,喜蜷缩更严重。B 组和 E 组大鼠的病死率均为 90%,其余造模组由于剂量过大均全部死亡。

2.2 大鼠体质量的变化情况及肾脏形态改变 各造模组均有不同程度的体质量下降,因造模过程中大鼠死亡,仅对最终存活大鼠做统计分析。2 周后各造模组大鼠体质量均明显下降,见表 1。正常组肾脏呈蚕豆样,大小正常,形态规整,颜色为红褐色,质地坚实,体积正常无肿大,有光泽;切面皮质呈正常红褐色,髓质颜色浅红,皮髓质分界清楚;组织学未见明显病理改变。E 组及 B 组肉眼观大鼠肾体积明显增大,整个肾脏呈灰白色;切面皮质变薄,皮髓质分界不清楚。

表 1 大鼠灌胃前后体质量的变化($\bar{x} \pm s$,kg)

组别	n	灌胃前	灌胃后 2 周
正常组	6	303.34±15.27	333.34±28.86
B 组	6	296.67±25.17	216.67±37.89 ^a
E 组	6	293.34±5.76	196.67±5.76 ^a

^a: $P < 0.05$,与灌胃前比较。



A:正常组肾脏病理;C、E:B组肾脏病理;B、D:E组肾脏病理。A~C:造模后 2 周肾脏病理;D~E:造模后 4 周肾脏病理。

图 1 肾脏组织病理变化(×10)

2.3 大鼠 24 h 尿蛋白 正常组在造模后 2、3、4 周 24 h 尿蛋白分别为(11.16±1.47)mg/24 h、(13.5±0.71)mg/24 h、(19.67±

4.04)mg/24 h。B 组在造模后 2 周 24 h 尿蛋白(17.16±3.34)mg/24 h,造模 3、4 周后大鼠死亡较多,但 24 h 蛋白尿在造模后

3 周达到 31 mg/24 h, 4 周后达到 69 mg/24 h。E 组在造模后 2 周 24 h 尿蛋白 (12.5±1.7) mg/24 h, 造模 3、4 周后大鼠死亡较多, 但 24 h 蛋白尿在造模后 3 周达到 104 mg/24 h, 4 周后达到 241 mg/24 h。与正常组及 B 组的大鼠比较, E 组大鼠在 3 周、4 周末其 24 h 尿蛋白水平明显增加, 且随时间延长 24 h 尿蛋白定量逐渐增加。

2.4 大鼠血液生化指标 与正常组及 B 组大鼠比较, E 组 CRF 大鼠模型已经基本制备成功, 测定 CRF 比较有代表性的指标, 如 BUN、Scr 等明显升高, K^+ 、 Ca^{2+} 、 P^+ 代谢紊乱, 见表 2。

表 2 大鼠 2 周、4 周时血液生化指标变化

指标	正常组 (n=6)		B 组 (n=6)		E 组 (n=6)	
	2 周	4 周	2 周	4 周	2 周	4 周
BUN(mmol/L)	5.10	5.50	23.29	52.08	64.98	77.34
Scr(mmol/L)	34.20	43.20	125.50	197.20	290.90	210.10
TC(mmol/L)	1.52	1.64	2.35	1.64	2.66	3.97
TG(mmol/L)	1.16	0.45	0.66	1.86	1.03	1.42
K^+ (mmol/L)	7.24	7.87	7.22	6.50	9.06	11.04
Ca^{2+} (mmol/L)	2.39	2.45	2.94	2.17	2.99	1.86
P^+ (mmol/L)	2.32	3.77	6.50	4.11	9.29	14.17

2.5 大鼠肾脏病理改变 镜下各组肾组织 HE 染色, 可以看出造模后 2 周, 与正常组 (图 1A) 相比, E 组 (图 1B) 可见局部肾小管扩张, 肾间质轻度纤维化, 肾小球轻度缩小; B 组 (图 1C) 可见肾小管扩张明显, 间质轻度纤维化, 肾小球病变不明显。造模后 4 周与正常组相比, E 组 (图 1D) 大鼠肾小管扩张, 颗粒管型、蛋白管型, 肾间质纤维化, 肾小球明显缩小, 相对减少, 上皮细胞脱落、损伤; B 组 (图 1E) 可见肾小管扩张, 肾小管间质轻度纤维化。

3 讨论

3.1 CRF 大鼠模型的建立 现在 CRF 大鼠的造模方法主要有以下 3 种: (1) 腺嘌呤型动物模型。腺嘌呤是广泛应用于临床的抗肿瘤类药物。研究表明, 腺嘌呤引起肾小管间质纤维化的机制为经消化道吸收收入血, 在肝内形成极难溶于水的 2, 8-二羟基腺嘌呤, 并在肾内大量沉积形成结晶, 阻塞、压迫肾小管引起肾小管上皮损伤和肾间质肉芽肿性炎症, 晚期出现肾小管间质纤维化。文献中模型的制备有 50~300 mg/kg 不同剂量给予大鼠每天连续灌胃, 一般至少 4 周后 Scr、BUN 水平明显升高, 此法方法简便, 肾衰现象明显, 成功率相对偏高。但主要是偏向于肾小管间质纤维化的研究。(2) 阿霉素型动物模型。阿霉素是含醌的萘环抗生素, 可在肾脏内代谢还原为半醌型自由基。后者与氧反应产生活性氧, 诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应, 影响糖蛋白代谢, 破坏滤过膜的结构和功能, 最终导致膜滤过屏障的选择性变化而引起蛋白尿^[8]。阿霉素的注射方式尾静脉注射 1 次、2 次、多次等, 但大多以 2 次注射为主, 剂量 4~15 mg/kg。Arioka 等^[9] 用 15 mg/kg 诱导出大鼠 CRF 的动物模型。王晨丹等^[10] 给大鼠尾静脉分 2 次注射阿霉素, 第 1 次注射按 6 mg/kg 给药, 第 2 次注射于 1 周后按 4 mg/kg 给药; 大鼠在第 11 周末可见部分肾小球出现局灶节段

性硬化。该实验阿霉素建立的 CRF 动物模型病理改变主要以肾小球的硬化为其特点, 且时间较长。(3) 手术诱导 CRF 模型。运用单侧肾切除等物理方法造成大量肾组织破坏, 残余肾单位的功能代偿性增强, 引起残余肾单位的高滤过蛋白尿, 导致肾小球硬化为主要特点的 CRF。薛痕等^[11] 观察了单侧输尿管结扎大鼠模型中的肾脏病理改变, 发现可以快速建立肾脏细胞转分化和间质纤维化动物模型。尚小梅等^[12] 和 Xiao 等^[13] 制造大鼠 5/6 肾切除 CRF 模型, 12 周后肾脏病理检查发现局灶性肾小球硬化、肾小囊扩张、局灶性肾间质纤维化。但是手术建立的模型病死率相对偏高, 大鼠感染的危险增加, 且制备模型的周期更长。(4) 其他类型造模方式。例如手术加药物注射同时进行, 徐海山等^[14] 过单侧肾切除+阿霉素 (4.0 mg/kg) 股静脉注射 8 周后可制备慢性进展性肾病大鼠模型。但此种类型的大鼠模型病死率相对较高。

3.2 创新性建立 CRF 大鼠模型 纵观国内建立 CRF 大鼠的模型, 以阿霉素和腺嘌呤为肾脏病研究的经典模型, 而本实验创新性地尾静脉注射阿霉素与腺嘌呤灌胃结合起来, 拟建立一种更加理想的 CRF 动物模型, 即是肾小管间质纤维化, 肾小球硬化的动物模型。而在本实验中由于阿霉素对心脏、肝脏、骨髓等系统具有较强的毒性, 而阿霉素是使用的一次性注射, 且最大剂量为 15 mg/kg, 故单次大剂量注射是使本次造模病死率高的原因之一。

本研究发现大鼠的临床表现较单独注射阿霉素或灌胃腺嘌呤更加典型。24 h 尿蛋白定量显示混合药物组较单独使用腺嘌呤或阿霉素肾小球的损害更加严重, E 组给药后第 3 周尿蛋白大于 100 mg/24 h; 混合药物组生化指标对肾脏的损害更加严重, 并有明显的高胆固醇血症及电解质代谢紊乱; 病理切片方面随着时间的增长混合使用药物的大鼠病变较单独注射阿霉素或灌胃腺嘌呤更加典型, 并符合 CRF 的病理改变, 且模型大鼠普遍有不同程度的水肿, 更接近临床实际。

以上研究结果证实本实验能够有效地建立肾小管间质纤维化伴有微小病变病理类型及大量蛋白尿的大鼠动物模型。本实验中因为 A、C、D 组 SD 大鼠死亡较多, 存活例数较少故按照统计学原则只能列出数据反映实验结果, 不能进一步做统计学分析。而大剂量的阿霉素不能制备此种动物模型, 应该将阿霉素的剂量控制在 5 mg/kg 左右, 在小剂量范围内探索两种药物建立 CRF 大鼠动物模型, 也可考虑 2 次尾静脉注射来改良此方法。此外, 阿霉素作用于大鼠的时间偏短, 因此早期肾小球的病理改变主要以微小病变型病理改变为主, 需要进一步做电镜观察其病理改变。

综上所述, 本研究采用阿霉素尾静脉注射加上腺嘌呤灌胃建立 CRF 的大鼠动物模型基本成功, 模型中出现了典型的病理改变、大量蛋白尿, 以及各项生化指标的异常。但是大鼠死亡较多, 且病理切片中肾小球硬化不明显, 可能是阿霉素的剂量及注射方式有待调整, 相应的数据还有待完善。但是可以初步得出结论: 采用阿霉素尾静脉注射加上腺嘌呤灌胃建立 CRF 的大鼠动物模型, 进行多层次地分组注射不同剂量阿霉素, 大剂量阿霉素大鼠病死率较高, 还需进行小范围剂量的探索研究, 探究更准确的适用于 CRF 的大鼠动物模型。

参考文献

- [1] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2015, 385(9963):117-171.
- [2] Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. *Lancet*, 2013, 382(9888):260-272.
- [3] Lane BR, Demirjian S, Derweesh IH, et al. Is all chronic kidney disease created equal? [J]. *Curr Opin Urol*, 2014, 24(2):127-134.
- [4] Chen Y, Tang L, Feng Z, et al. Pathological predictors of renal outcomes in nephrotic idiopathic membranous nephropathy with decreased renal function[J]. *J Nephrol*, 2014, 27(3):307-316.
- [5] 张路霞, 王海燕. 中国慢性肾脏病的现状及挑战——来自中国慢性肾脏病流行病学调查的启示[J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(7):497-498.
- [6] 郑法雷, 李雪梅. 早中期慢性肾脏病防治对策: 如何逆转或延缓[J]. *北京医学*, 2009, 31(3):170-172.
- [7] Remuzzi G, Benigni A, Finkelstein FO, et al. Kidney failure: aims for the next 10 years and barriers to success[J].

Lancet, 2013, 382(9889):353-362.

- [8] Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, et al. "Cancer antigen WT1 protein-derived peptide"-based treatment of cancer-toward the further development[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(29):3052-3061.
- [9] Arioka Y, Yamamoto Y, Hoshi M, et al. Pre-administration of L-tryptophan improved ADR-induced early renal failure in mice[J]. *Life Sci*, 2012, 91(3/4):100-106.
- [10] 王晨丹, 李荣山, 乔晞, 等. 阿霉素诱发局灶节段性肾小球硬化肾病大鼠模型的建立[J]. *中国医药*, 2011, 6(12):1447-1451.
- [11] 薛痕, 樊均明, 陈亮, 等. 大鼠肾间质纤维化动物模型的实验研究[J]. *四川动物*, 2004, 23(1):16-20.
- [12] 尚小梅, 孙秀丽. 大鼠 5/6 肾切除慢性肾衰竭模型的制作[J]. *包头医学院学报*, 2015, 31(4):20, 22.
- [13] Xiao XY, Mo LQ, Song SL, et al. Compound huang gan delays chronic renal failure after 5/6 nephrectomy in rats[J]. *J South Med Univ*, 2014, 34(11):1661-1667.
- [14] 徐海山, 庄永泽, 曾俊婷. 单侧肾切除+股静脉注射阿霉素制作进展性肾病模型[J]. *当代医学*, 2009, 15(34):41-42.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2015-12-27)

(上接第 1881 页)

- [6] Zhao W, Zhang B, Guo X, et al. Expression of Ki-67, Bax and p73 in patients with hilar cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2014, 14(4):197-202.
- [7] 杨闯, 魏振彤, 郑宇, 等. 肝癌中 Bcl-2、Bax 和 C-myc 基因的表达及其临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(4):450-451.
- [8] 李海艳, 徐燕丰, 辛海量, 等. 科罗索酸对 SMMC-7721 细胞生长抑制作用的初步研究[J]. *山东医药*, 2011, 51(52):44-46.
- [9] 陈昊, 陈乃玲, 张春芳, 等. 细胞色素 C 及相关细胞凋亡蛋白、基因在原发性肝癌组织表达的临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(7):1083-1086.
- [10] Han HJ, Kwon HY, Sohn EJ, et al. Suppression of E-cadherin mediates gallotannin induced apoptosis in Hep G2 hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(5):490-499.
- [11] 郭晓东, 杨美, 郭超楠, 等. 肝癌组织中凋亡调控因子 Fas, FasL 及 Caspase-3 的表达及意义[J]. *肝脏*, 2014, 15(4):250-253.

- [12] 郭晓东, 李志伟, 杨美, 等. Caspase-9 和 Survivin 在肝癌组织中的表达及意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(3):253-256.
- [13] Qu C, Chen T, Fan C, et al. Efficacy of neonatal HBV vaccination on liver cancer and other liver diseases over 30-year follow-up of the Qidong hepatitis B intervention study: a cluster randomized controlled trial [J]. *PLoS Med*, 2014, 11(12):e1001774.
- [14] Cheng M, He B, Wan T, et al. 5-Fluorouracil nanoparticles inhibit hepatocellular carcinoma via activation of the p53 pathway in the orthotopic transplant mouse model [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47115.
- [15] 王为东, 李玉军. 肝细胞肝癌中端粒酶、p53 和 CK19 的表达及意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(8):862-866.
- [16] 邹夏慧, 张焜和, 陈江, 等. 仙鹤草水提液对 SMMC-7721 肝癌细胞的抗癌作用及其机制[J]. *重庆医学*, 2013, 42(32):3929-3931, 3934.

(收稿日期:2015-11-12 修回日期:2015-12-28)

欢迎投稿

欢迎订阅