

肾动脉缺血再灌注诱导急性肾损伤模型的建立和评价*

吴玲^① 吴丽华^① 刘昱^① 赵良斌^① 李明权^{①△}

【摘要】目的:观察缺血再灌注诱导急性肾损伤大鼠模型的特点。方法:采用双侧肾动脉夹闭的方法建立急性肾损伤大鼠模型,采用全自动生化分析、Elisa 检测、HE 染色等方法,检测血肌酐、尿素、胱抑素 C 及肾脏病理损伤情况。结果:缺血再灌注处理可诱导 SD 大鼠的肾脏指数升高,血清肌酐、尿素、胱抑素 C 的水平显著升高,肾脏损伤评分明显升高,且肾脏病理主要表现为肾小管损伤。结论:双侧肾动脉夹闭的方法,可引起大鼠肾功能急性损伤,病理损伤主要表现为急性肾小管的损伤,可成功建立 IR-AKI 大鼠模型,且模型较稳定,AKI 特征明显。

【关键词】急性肾损伤 缺血再灌注 动物模型 肾小管损伤

Establishment and Evaluation of Renal Artery Ischemia – reperfusion – induced Acute Kidney Injury Model

WU Ling, WU Lihua, LIU Yu, et al

Clinical School of Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Hospital of
Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610072)

ABSTRACT Objective: To observe the model characteristics of ischemia – reperfusion – induced acute kidney injury in rats. **Methods:** We established a rat model of acute kidney injury by bilateral renal artery clipping, and used the methods of biochemical analysis, Elisa detection and HE staining to detect the levels of serum creatinine, urea, cystatin C and the pathological damage of the kidneys. **Results:** Ischemia – reperfusion treatment can significantly increase the renal index, the levels of serum creatinine, urea, cystatin C and renal injury score in SD rats. And the renal pathology is mainly manifested as renal tubular damage. **Conclusion:** The method of bilateral renal artery clipping can cause acute decline of renal function in rats, and the pathological damage is mainly manifested as acute renal tubular damage. Through this method, the IR – AKI rat model can be successfully established, and the model is relatively stable and has obvious characteristics of AKI.

KEY WORDS Acute kidney injury Ischemia – reperfusion Animal model Renal tubular injury

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是指突发 (<7 d) 和持续 (>24 h) 的肾功能急剧下降的一组临床综合征, 表现为氮质血症、水电解质和酸碱平衡紊乱以及全身各系统症状, 可伴有少尿或无尿^[1]。AKI 是一个常见临床综合征, 具有发病率高、死亡高、预后差及医疗负担大等特点。在病理条件下, 肾脏缺血、肾毒性药物、脓毒血症及泌尿系梗阻等多种因素均可引起 AKI, 其中缺血性肾损伤占 75% 左右^[2-4]。正常 GFR 的维持取决于充分的肾脏灌注, 肾脏占有高达 25% 的心输出量, 因此任何系统循环血容量的衰竭或肾脏自身的循环受损, 都会对肾脏灌注产生深远影响。研究表明, 肾组织缺血再灌注 (ischemic – reperfusion, IR) 是缺血性 AKI 的重要发病机制, 也是 AKI 的最常见原因^[5,6]。动物模型的成功建立, 旨在模拟人体的病理状态, 是研究疾病病理机制的有效工具, 同时也是各种治疗药物及手段有效性及安全性的重

要研究对象。因此, 开展对各种动物模型的探索和研究也是目前的研究热点之一。本研究通过双侧肾动脉夹闭的方法, 建立 IR – AKI 大鼠实验模型, 评估模型的特点及稳定性。

材料与方

1 实验动物与分组 SPF 级雄性 SD 大鼠, 共 16 只, 6~8 周龄, 体重 180~220 g。所有大鼠饲养在温度 (22±3)℃、相对湿度 (55±10)%、12 h 明暗循环的标准 SPF 级别实验动物房内, 给予自由饮水和标准鼠食喂养, 适应性饲养 7 d, 以适应实验室环境。所有动物购自成都达硕生物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(川)2020-030。将 SD 大鼠随机分为两组: 假手术组: 打开腹腔, 游离双侧肾动脉, 但不进行夹闭; 模型组: 采用双侧肾动脉夹闭的方法建立 IR – AKI 大鼠模型。该研究已通过成都中医药大学附属

* 本课题为国家自然科学基金面上项目 (No. 81973831); 四川省科技厅苗子工程项目 (No. 2021050); 四川省重大疾病 (慢性肾脏病) 中医药防治中心

① 成都中医药大学临床医学院, 成都中医药大学附属医院 (成都 610072)

△ 通讯作者

医院实验动物伦理审查委员会的审查批准,伦理审查编号:2021DL-015。

2 试剂与仪器 大鼠 Cys - C ELISA 试剂盒,购自上海茁彩生物科技有限公司;苏木素染液和伊红染液,购自武汉塞维尔生物科技有限公司。全自动兽用生化分析仪,购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;酶标仪,购自美谷分子仪器有限公司;转轮式切片机,购自德国徕卡公司;JT-12S 自动组织脱水机,购自武汉俊杰电子有限公司;BMJ-A 型包埋机,购自常州郊区中威电子仪器厂;RS36 型全自动染色机,购自常州市中威电子仪器有限公司;数字切片扫描仪,购自 3DHISTECH(Hungary)公司;等。

3 研究方法

3.1 IR - AKI 动物模型建立方法 采用双侧肾动脉夹闭的方法建立 IR - AKI 动物模型。SPF 级别 SD 大鼠在动物房适应性喂养 7 d,术前禁食 8 h;3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30 mg/kg),麻醉后备皮、消毒,暴露手术部位,沿腹中线纵行切口 1.5 ~ 2 cm;暴露双侧肾蒂,游离肾动脉,并用医用动脉夹分别夹闭双侧肾动脉。夹闭过程中,肾脏颜色由鲜红色逐渐变为紫黑色,即夹闭有效。夹闭 45 min 后取下动脉夹,如果松开动脉夹后 5 ~ 10 min 内,肾脏转变为正常的红色,则认为再灌注成功。夹闭双侧肾动脉期间,使用生理盐水纱布盖住大鼠腹部,减少水分蒸发,并保持 37 °C 恒温,密切关注大鼠生命体征。再灌注成功后,逐层关闭腹腔,术后密切观察大鼠的生命体征 2 h,待实验大鼠恢复正常活动后置于 SPF 动物房内饲养,正常饮食。

模型成功判定标准:松开动脉夹 5 ~ 10 min 内,肾脏颜色从紫黑色转变为正常红色或基本正常,说明再灌注成功。若松开后 5 ~ 10 min,肾脏未转变为正常的红色,则认为再灌注未成功。

3.2 标本采集 (1) 血液标本采集:于术后 48 h,将大鼠称重,3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30 mg/kg),沿腹中线行纵行切口,采用腹主动脉采血法收集血液标本。血液标本置于离心机中以 3 000 r/min 离心 10 min,留取血清,-20 °C 保存。(2) 肾脏标本采集:分离左侧肾脏,生理盐水清洗后,滤纸析干,观察肾脏形态、大小、色泽并称重,置于 4% 的多聚甲醛中固定。

3.3 指标检测

3.3.1 肾脏指数 称取大鼠体重及左肾重量,计算肾脏指数 = 肾重/体重(mg/g)。

3.3.2 肾功能指标检测 (1) 采用兽用生化分析仪检测实验大鼠血清尿素、血清肌酐(serum creatinine, Scr)。(2) 采用 Elisa 试剂盒检测血清胱抑素 C(cystatin C, Cys - C)。按照说明书要求,进行复温、加

样、配液、洗涤、显色后,终止反应。450 nm 波长测量各孔的吸光度(OD 值)。计算浓度:标准品及样本 OD 值扣除空白孔 OD 值,用标准物的浓度与绝对 OD 值计算出标准曲线的线性回归方程式,将样品的绝对 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

3.3.3 肾脏病理组织 HE 染色 固定肾脏组织经全自动脱水机进行脱水后,包埋,切片,进行 HE 染色。(1)切片脱蜡;(2)苏木精染色 10 ~ 20 min,清水冲洗 1 ~ 3 min;(3)盐酸酒精分化 5 ~ 10 s,清水冲洗 1 ~ 3 min;(4)放入 50 °C 弱碱性水溶液返蓝,直到出现蓝色后,清水冲洗 1 ~ 3 min;(5)放入 85% 的酒精 3 ~ 5 min;(6)伊红染色 3 ~ 5 min,清水冲洗 3 ~ 5 s;(7)梯度酒精脱水;(8)二甲苯透明,中性树胶封固。

以上步骤均按病理检验 SOP 程序进行。采用 Panoramic 250 数字切片扫描仪对切片进行图像采集,观察具体病变。HE 染色下,细胞核呈蓝色,胞浆及纤维化组织呈红色或淡红色。

参照 Paller's 标准对肾脏组织病理损伤情况进行评价。400 倍光镜下随机选取 10 个区域,观察肾小管扩张、刷状缘丢失、间质水肿、细胞膜或胞浆空泡化、细胞管型等情况,对肾组织损伤情况进行评分。评分标准见表 1。

表 1 肾脏组织损伤 Paller's 评分标准

特征	分级/分数	诊断标准
肾小管扩张	0	无
	1	肾小管明显扩张,细胞扁平
刷状缘	0	无
	1	刷状缘损伤
	2	脱落
细胞膜和细胞浆	0	无
	1	细胞膜大泡或细胞浆空泡
间质	0	无
	1	水肿
肾小管管腔	0	无
	1	肾小管管腔内有脱落的坏死细胞未形成管型或碎片
	2	肾小管管腔内有脱落的坏死细胞形成管型或碎片

注:由两名技术人员盲法进行评估,计算平均值

3.4 动物处死方法 实验结束后,在麻醉下,采用脊椎脱臼法处死实验动物:左手拇指与食指用力向下按住鼠头,右手抓住鼠尾用力向后拉,使颈椎脱臼,断开脊髓以处死实验动物。

4 统计学方法 运用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行处理和分析,服从正态分布的定量资料,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布的定量资料用 P50(P25, P75)表示。两组组间比较,数据符合正态性分布者,若方差齐则采用独立样本 *t* 检验,若方差不齐则

采用 *t*' 检验;若数据不符合正态分布则采用秩和检验。*P* < 0.05 表示组间差异具有统计学意义。

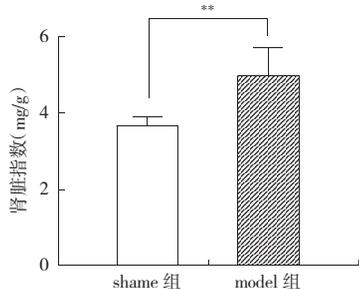
结 果

1 肾脏指数变化 如图 1 所示,可以观察到缺血-再灌注过程中模型组大鼠肾脏颜色发生了明显变化。术后 48 h,采集肾脏标本,称重,计算肾脏指数(肾脏指数 = 肾脏重量/动物体重,单位:mg/g),结果显示,模型组大鼠的肾脏指数较假手术组大鼠显著升高(*P* < 0.01)。提示 IR - AKI 损伤可引起肾脏体积的增大。见表 2,图 2。

表 2 两组 IR 大鼠肾脏指数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肾脏指数(mg/g)
假手术组	8	3.69 ± 0.22
模型组	8	4.98 ± 0.73
<i>t</i>		-4.810
<i>P</i> 值		0.001 **

注:与假手术组比较, ** *P* < 0.01



注:与假手术组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01

图 2 IR 对肾脏指数的影响

2 肾功能变化情况 术后 48 h,收集血清标本,检测大鼠血清的 Urea、Scr、Cys - C 水平。结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠血清 Urea、Scr、Cys - C 的水平明显升高(*P* < 0.05)。说明 IR 处理可引起大鼠肾功能损伤,提示 IR - AKI 大鼠模型成功建立。见表 3,图 3。

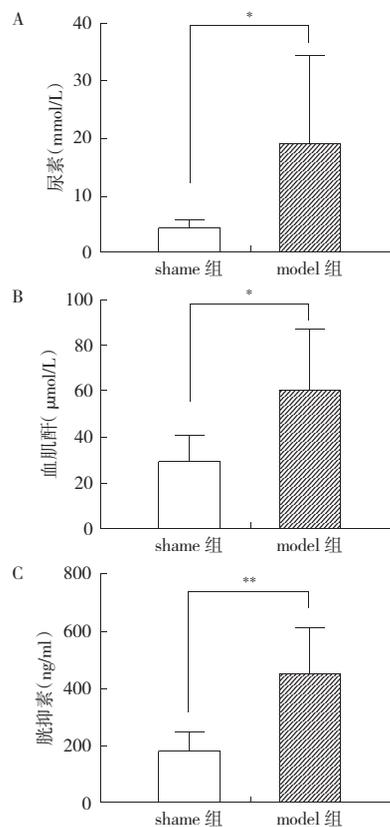
表 3 两组 SD 大鼠血清尿素、肌酐、胱抑素 C 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	尿素(mmol/L)	血肌酐(μmol/L)	胱抑素 C(ng/ml)
假手术组	8	4.18 ± 1.63	29.09 ± 11.60	182.59 ± 63.39
模型组	8	19.31 ± 15.20	60.46 ± 26.21	452.17 ± 162.24
<i>t</i>		-2.798	-3.096	9.089
<i>P</i> 值		0.026 *	0.012 *	0.002 **

注:与假手术比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01

3 肾脏组织病理损伤情况 HE 染色结果显示,假手术组肾脏结构基本正常。模型组肾小球结构未见明显病变,可见不同程度肾小管扩张,上皮细胞扁平化改变,肾小管刷状缘损伤,部分脱落于管腔,肾小管上皮细胞胞膜或胞浆内空泡化变性,不同程度的肾小管上皮细胞变性坏死,坏死细胞脱落于管腔,见管

腔内坏死细胞胞核固缩、崩解或消失,胞质凝固,且部分形成细胞管型;间质内未见明显炎性细胞浸润或纤维组织增生。可见,IR - AKI 的肾脏病理损伤以肾小管损伤为主。见图 4。



注:与假手术组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01

图 3 IR 对 SD 大鼠血清尿素、肌酐、胱抑素 C 的影响

参照肾脏组织损伤 Palters 标准对肾脏组织损伤进行评分,如表 4 所示,模型组大鼠肾脏组织损伤评分明显高于假手术组的大鼠(*P* < 0.05),提示双侧肾动脉夹闭的方法可诱导大鼠肾脏组织的病理损伤,主要表现为肾小管损伤。见表 4。

表 4 两组 SD 大鼠肾组织损伤评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肾损伤评分
假手术组	8	0.00 ± 0.00
模型组	8	3.25 ± 2.87
<i>t</i>		-3.207
<i>P</i> 值		0.015 *

注:与假手术组比较, **P* < 0.05

讨 论

正常 GFR 的维持取决于充分的肾脏灌注,肾脏占有高达 25% 的心输出量,因此任何系统循环血容量的衰竭或肾脏自身的循环受损,都会对肾脏灌注产生深远影响,常见病因包括低血容量、心功能受损、全身血管扩张、血管阻力增加等。

缺血性肾损伤是 AKI 的主要类型, RIRI 是最常见的原因, 涉及多种病理机制。实验用 IR - AKI 动物造模方法主要有三种^[7]: 双侧肾动脉夹闭法、单侧肾脏 IR 法、一侧肾脏 IR 联合对侧肾脏切除术。其中双侧肾动脉夹闭法是目前国内最常用的 AKI 动物造模方法。该模型能否成功建立与肾动脉夹闭时间(即肾脏组织缺血时间)具有密切的关系。研究表明^[8], 肾脏缺血时间与肾损伤程度成正比, 通过控制肾动脉夹闭时间可建立不同程度肾损伤的 AKI 模型, 缺血时间 ≤ 30 min 时肾损伤较轻, 缺血时间 > 30 min 时肾损伤较重。若双侧肾脏缺血时间过长 (> 60 min), 肾脏受损严重, 动物存活时间将会缩短, 不利于实验的开展。因此, 合理控制肾脏缺血时间对成功制备 IR - AKI 模型至关重要。根据既往研究经验, 结合文献报道, 本实验选择 45 min 为肾动脉夹闭时间。

肾脏是 IR 最易损伤的重要器官之一, 由于肾小管上皮细胞具有高耗氧、高耗能的特点, 对缺血缺氧刺激非常敏感, 因此, 肾小管上皮细胞是 RIRI 的主要靶细胞, 在 AKI 发生中最容易受到缺血缺氧损伤因素的攻击。肾小管上皮细胞的损伤和死亡被认为是 AKI 的特征性病理改变^[9,10]。

IR - AKI 典型的病理损伤表现为肾小管损伤, 典型的组织学变化包括肾小管扩张, 刷状缘消失或丢失, 肾小管上皮细胞脱落或坏死, 以及脱落的细胞在管腔内形成细胞管型等^[11]。远期则会引起肾脏组织纤维化。有研究显示, 在 IR 术后 12 周, 大鼠肾组织可见明显肾小球硬化、肾间质纤维化等病理改变, 伴有肾组织 TGF - β、α - SMA 等分子表达水平升高^[12]。

IR - AKI 动物造模方法主要有三种: 双侧肾动脉夹闭法、单侧肾脏 IR 法、一侧肾脏 IR 联合对侧肾脏切除术。与单侧肾脏 IR 法相比, 双侧肾动脉夹闭法的造模成功率更高, 且模型特点更加典型。由于健侧肾脏的代偿作用, 单侧肾脏 IR 法会导致肾功能指标不能有效反映患侧肾损伤程度, 同时肾损伤具有可逆性, 不利于实验观察。一侧肾脏 IR 联合对侧肾脏切除术造成的肾脏病理损伤较双侧肾动脉夹闭法更加显著, 且据偶明显的渐进性变化, 但是由于需要进行一侧肾脏的手术切除, 对实验人员的操作技术要求更高, 技术难度更大, 此外, 实验动物的死亡率更高^[7]。双侧肾动脉夹闭法, 由于操作简便、快速, 手术剪成功率高, 且模型稳定, 具有典型的 AKI 损伤特征, 是目前最常用的 AKI 制模方法。

本研究结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠血清 Scr、尿素、Cys - C 水平均显著升高, 且肾脏组织病理损伤更加严重, 以肾小管损伤为主, 呈现典型的 AKI 肾损伤特征, 提示 IR - AKI 模型成功建立; 且实验过程中, 无实验动物因手术操作或者因术后感染等

原因发生死亡, 模型稳定。实验结果说明双侧肾动脉夹闭 45 min 的方法可成功建立 IR - AKI 大鼠模型, 可用于后续实验研究。

双侧肾动脉夹闭 45 min 的方法, 可引起实验大鼠肾脏形态学改变, 引起肾功能生化指标的升高, 导致大鼠肾功能急性损伤, 病理损伤主要表现为肾小管的损伤, 如肾小管扩张、刷状损伤或脱落、上皮细胞空泡化或变性坏死、管腔内见坏死细胞、细胞管型等; 该方法可成功建立 IR - AKI 大鼠模型, 且模型较稳定, AKI 特征明显。但本研究存在很多局限性, 未与其他造模方法进行同时期的对比, 同时未对缺血时间、再灌注时间与肾功能损伤之间的关系进行观察研究等, 有待后续研究进行进一步完善。

(本文图 1、图 4 见插页 1 - 2)

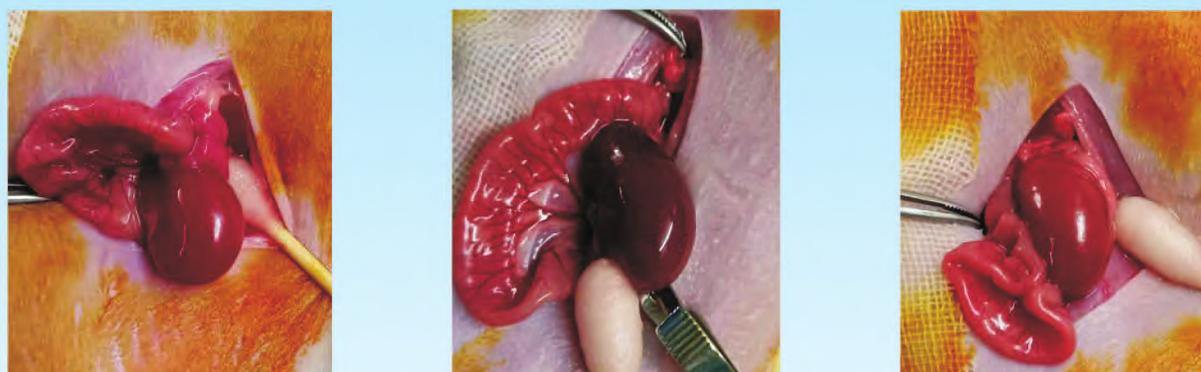
参 考 文 献

1. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(10):607 - 625.
2. Gameiro J, Fonseca JA, Outerelo C, et al. Acute kidney injury: from diagnosis to prevention and treatment strategies[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(6):1704.
3. Tsohadra B, Ryu H, Ju KD, et al. AICAR, an AMPK activator, protects against cisplatin - induced acute kidney injury through the JAK/STAT/SOCS pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(3):680 - 686.
4. Szeto HH. Pharmacologic approaches to improve mitochondrial function in AKI and CKD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(10):2856 - 2865.
5. Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67:293 - 309.
6. Wu C, Chang C, Chang S, et al. 17β - estradiol accelerated renal tubule regeneration in male rats after ischemia/reperfusion - induced acute kidney injury[J]. *Shock*, 2016, 46(2):158 - 163.
7. 吴玲, 蒋廷, 唐安琪, 等. 缺血性急性肾损伤动物模型制备的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(9):1149 - 1152.
8. Fu Y, Tang C, Cai J, et al. Rodent models of AKI - CKD transition[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(4):F1098 - F1106.
9. Liu S, Chen Y, Wang S, et al. Protective effect of dabrafenib on renal ischemia - reperfusion injury in vivo and in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(2):395 - 401.
10. Zhang Y, Wang Q, Liu A, et al. Erythropoietin derived peptide improved endoplasmic reticulum stress and ischemia - reperfusion related cellular and renal injury[J]. *Front Med (Lansanne)*, 2020, 7:5.
11. Xu Y, Guo M, Jiang W, et al. Endoplasmic reticulum stress and its effects on renal tubular cells apoptosis in ischemic acute kidney injury[J]. *Ren Fail*, 2016, 38(5):831 - 837.
12. 谢光亮, 李德富, 张小鹿, 等. 大黄灵脾颗粒对缺血再灌注急性肾损伤大鼠肾纤维化的干预作用[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(3):195 - 198, 283.

(收稿:2022 - 08 - 19 修回:2022 - 11 - 10)

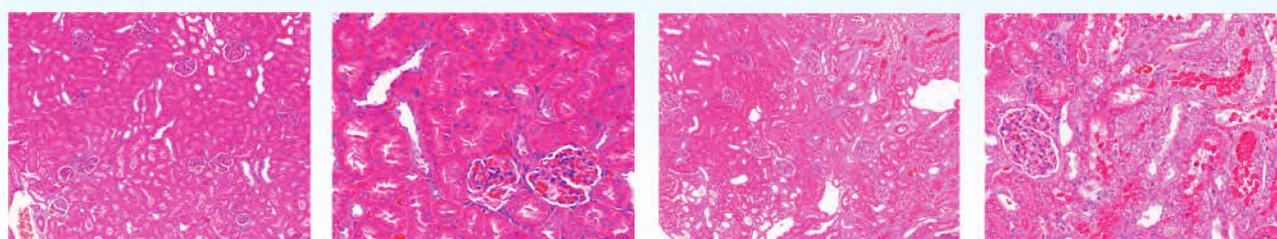
肾动脉缺血再灌注诱导急性肾损伤模型的建立和评价

(见正文961页)



a.肾动脉夹闭前,即缺血前 b.肾动脉夹闭45min后,即缺血45min后 c.松开动脉夹5min后,即再灌注5min后

图1 缺血-再灌注过程中SD大鼠肾脏颜色变化

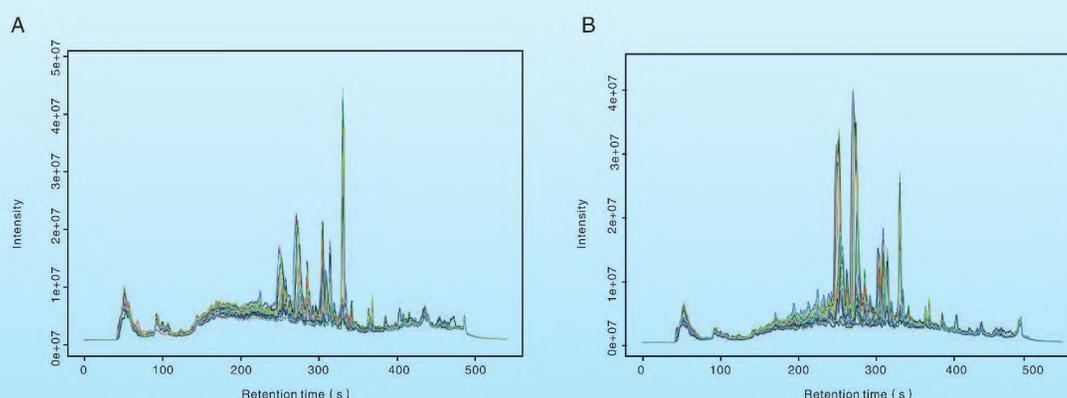


假手术组 (X100) 假手术组 (X400) 模型组 (X100) 模型组 (X400)

图4 IR对SD大鼠肾脏组织病理的影响 (HE染色)

三七注射液改善慢性肾衰竭大鼠肠道代谢组学的研究

(见正文965页)



各组大鼠正离子TIC图

各组大鼠负离子TIC图

图1 各组大鼠正负离子模式下的总离子流图