

# 新型肾脏冷缺血再灌注损伤动物模型的稳定性研究

韦星 蔡明 石炳毅 李州利 王爽 洪欣 柯华婧

**【摘要】 目的** 建立一种新型肾脏冷缺血再灌注损伤动物模型,以简化既往模型的复杂性,适用于更多机构及人员进行肾脏冷缺血再灌注损伤相关研究。**方法** 实验于2010年1~10月在解放军第309医院实验动物中心完成。SD大鼠45只随机分成对照组( $n=5$ )、手术组( $n=20$ )和假手术组( $n=20$ ),对照组采用经典的Takada肾脏冷缺血再灌注损伤模型,手术组采用新型肾脏冷缺血再灌注损伤模型,利用术后需被切除右肾动脉插管进行灌注,省略动脉显微缝合步骤。观察手术组和假手术组大鼠术后6 h、1 d、3 d、5 d肾功能、NF- $\kappa$ B及肾脏的病理变化并与对照组比较。**结果** 手术组和对照组相比,本模型大鼠术后各时间段肌酐、尿素氮和NF- $\kappa$ B差异有统计学意义。两组术后第6 h、1 d、3 d肌酐值比较, $P<0.05$ ;术后1 d尿素氮比较, $P<0.05$ ;术后1 d、3 d NF- $\kappa$ B比较, $P<0.05$ 。可能与省略血管缝合步骤,从而减少大鼠热缺血再灌注损伤时间有关,手术组和对照组病理学检查符合急性肾衰竭改变。**结论** 新型肾脏冷缺血再灌注损伤模型操作更为简单,稳定性强,利于被普通研究人员所掌握,成功率高,是一种研究肾脏冷缺血再灌注损伤的较好模型。

**【关键词】** 再灌注损伤; 模型,动物

**Stability of a new model of kidney cold ischemia reperfusion injury** WEI Xing, CAI Ming, SHI Bing-yi, LI Zhou-li, WANG Shuang, HONG Xin, KE Hua-jing. Organ Transplantation Center for Army, The 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: CAI Ming, Email: caiming2002@163.com

**【Abstract】 Objective** To prepare a stable animal model of rat renal ischemia reperfusion injury and simplify the complexity of model, apply more institution and people to research. **Methods** The experiment was completed in the center for experimental animal, the 309th hospital of Chinese PLA from January to December in 2010. Forty-five SD rats were randomly divided into control group ( $n=5$ ), operation group ( $n=20$ ) and sham group ( $n=20$ ). The control group apply the model of Takada's renal cold ischemia reperfusion injury, The operation group apply the new model of renal cold ischemia reperfusion injury, utilize the right renal artery to perfusion which need to cut after operation, omit the procedure of vascular suture. The renal function, NF- $\kappa$ B and pathological changes from 6 h, 1 d, 3 d, 5 d after operation of operation group and sham operation group were observed and compared with that of the control group. **Results** Compare with control group, creatinine, blood ureanitrogen and NF- $\kappa$ B in the model of operation group were lower in some times after transplantation (creatinine in 6 h, 1 d, 3 d respectively,  $P<0.05$ ; blood ureanitrogen in 1 d respectively,  $P<0.05$ ; NF- $\kappa$ B in 1 d, 3 d respectively,  $P<0.05$ ), which relate to omitting the procedure of vascular suture, and reducing the time of rat renal ischemia reperfusion injury. The pathological changes of the operation group and control group accorded with acute renal failure. **Conclusions** The preparation for the new model of renal cold ischemia reperfusion injury is simple, stable and good for common researcher and with a high successful rate, so such a model can be used to study renal cold ischemia reperfusion injury.

**【Key words】** Reperfusion injury; Models, animal

以往,人们对缺血再灌注损伤的研究多局限于热缺血再灌注损伤,随着研究的深入,冷缺血再灌注损伤逐渐引起人们的重视,肾脏的冷缺血再灌注损伤研究符合临床肾脏移植的实际情况,有较高的一致性,针对

冷缺血再灌注损伤后的导致肾移植术后肾功能延迟恢复(DGF)及ARE发生的研究,对于延长供肾的保存时间,提高移植肾的半寿期具有重要的临床意义<sup>[1-7]</sup>。本文对Takada等<sup>[8]</sup>和张世林等<sup>[9]</sup>报道方法加以改进,建立了一种操作简单、稳定可靠的原位灌注大鼠肾冷缺血再灌注损伤模型。

## 资料与方法

1. 一般资料:(1)设计:以两种大鼠肾脏冷缺血再灌注损伤动物模型为研究对象的随机对照研究。(2)实验地点:解放军第309医院动物实验中心。(3)实验时间:2010年1~10月。(4)实验分组:健康清洁级 Sprague-Dawley (SD)大鼠45只,由中国医科大学肿瘤医院动物实验中心提供,均为雄性,自由正常饮食。饲养环境温度:18~26℃。单纯随机分为对照组( $n=20$ )、手术组( $n=20$ )和假手术组( $n=5$ )。

2. 材料:手术器械:显微手术器械(上海医疗器械集团有限公司),无损伤缝合线(9-0,上海医用缝合线厂生产)。

主要仪器:切片机,电子天平,倒置显微镜,恒温箱,水浴锅,电炉,荧光定量PCR仪(ABI-7500)。

主要试剂:超纯RNA提取试剂盒,HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒,戊巴比妥钠,肝素,肾保存液(上海长征医院),青霉素,70%酒精,80%酒精,95%酒精,无水酒精,蒸馏水,苦味酸,苏木素,硫酸铝钾,红色氧化汞,冰醋酸,甘油,碘酸钠,钾明矾,浓盐酸,碳酸氢钠,硫酸镁,二甲苯(固定液),伊红Y,1%稀氨水,浓度为10%的甲醛固定液,石蜡。

3. 模型的制作:手术组:术前12h禁食,自由饮水,5%戊巴比妥钠麻醉大鼠(45 mg/kg,腹腔注射)。固定,常规消毒,铺巾。取腹部正中切口,剪开肠道与肝脏各叶之间的韧带,将肠道推向左侧,湿纱布包裹肠道,显露右肾蒂,切除右肾。游离左肾蒂及其上下方腔静脉和腹主动脉,经阴茎背静脉给予肝素100 U/100 g。1 min后沿阻断左肾蒂及其上下方腔静脉和腹主动脉,从腹主动脉插管接冷灌注液向左肾灌注,0~4℃肾保存液(约1~3 ml)恒压灌注(60 cm高重力连续灌注),在左肾静脉上切一小口引流,见肾脏颜色变苍白,肾静脉引出液体清亮停止灌注;显微镜(8倍)下分别以9-0无损伤缝合线缝合腹主动脉和肾静脉切口。肾蒂阻断状态下低温保存,45 min后复灌。观察左肾灌注良好,色泽红润,腹腔给予青霉素关闭切口。

对照组:术前12h禁食,自由饮水,5%戊巴比妥钠麻醉大鼠(45 mg/kg,腹腔注射)。固定,常规消毒,铺巾。取腹部正中切口,充分游离双侧肾脏及肾动静脉,于左肾蒂局部滴两滴罂粟碱,分别结扎并剪断左肾上腺动静脉以及左侧生殖血管后游离左肾蒂至肾动脉与腹主动脉连接处。经阴茎背静脉给予肝素100 U/100 g,1 min后应用动脉夹分别阻断右肾静脉上方及左肾静脉下方腔静脉和腹主动脉,再阻断前肠系膜动脉。于左肾动脉插入26 G套管针,左肾静脉切断,0~4℃肾

保存液(约1~3 ml)恒压灌注(60 cm高重力连续灌注),见右肾脏颜色变苍白,肾静脉引出液体清亮停止灌注,结扎左肾动静脉并切除左肾,阻断右肾动静脉后解除腔静脉及腹主动脉的阻断。肾蒂阻断状态下低温保存,45 min后复灌。观察左肾灌注良好,色泽红润,腹腔给予青霉素关闭切口。

4. 检测指标:取术后手术组及对照组6 h、1 d、3 d、5 d各5只,取术后假手术组6 h、1 d、3 d、5 d各1只,5%戊巴比妥钠麻醉大鼠(45 mg/kg,腹腔注射),打开腹腔,取出肾脏用100 ml/L甲醛溶液固定,脱水,石蜡包埋,切片作苏木素-伊红染色,并取下静脉血。肌酐、尿素氮、NF- $\kappa$ B、肾组织病理学观察。

5. 统计学分析:数据分析采用SPSS 18.0版本软件,由本文第一作者进行统计学处理,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析作统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结果

本实验三组大鼠共45只,术后均存活,无数据丢失。

1. 血生化检验(表1,2):术后6 h、1 d、3 d,手术组肌酐水平较对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ );术后1 d,手术组尿素氮水平较对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 肌酐变化情况( $\mu\text{mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	术后6 h	术后1 d	术后3 d	术后5 d
假手术组	1	49.0 $\pm$ 3.3	46.0 $\pm$ 2.8	45.0 $\pm$ 4.5	38.0 $\pm$ 2.8
手术组	5	155.8 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>	165.0 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>	145.0 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>	131.2 $\pm$ 6.6
对照组	5	143.6 $\pm$ 8.0	152.0 $\pm$ 8.0	133.4 $\pm$ 2.4	125.0 $\pm$ 4.3

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

表2 尿素氮变化情况( $\text{mmol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	术后6 h	术后1 d	术后3 d	术后5 d
假手术组	1	6.5 $\pm$ 0.8	6.8 $\pm$ 1.1	6.3 $\pm$ 1.3	5.2 $\pm$ 0.9
手术组	5	16.4 $\pm$ 1.5	18.6 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	14.4 $\pm$ 1.7	10.0 $\pm$ 1.3
对照组	5	13.7 $\pm$ 1.7	16.6 $\pm$ 1.7	12.5 $\pm$ 1.1	8.4 $\pm$ 0.9

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

表3 NF- $\kappa$ B变化情况( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	术后6 h	术后1 d	术后3 d	术后5 d
假手术组	1	2.5 $\pm$ 1.3	3.4 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 0.7	4.4 $\pm$ 1.4
手术组	5	7.3 $\pm$ 1.1	12.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	15.5 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	19.0 $\pm$ 1.7
对照组	5	6.5 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 0.9	13.3 $\pm$ 0.7	17.9 $\pm$ 1.0

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

2. 炎症因子(表3):术后1 d、3 d,手术组NF- $\kappa$ B水平较对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

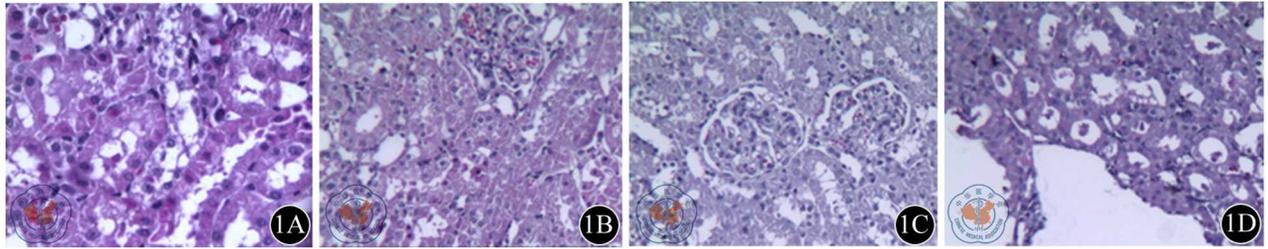


图1 手术组大鼠肾脏组织学改变(HE)。1A: 术后6 h( $\times 400$ ); 1B: 术后1 d( $\times 200$ ); 1C: 术后3 d( $\times 400$ ); 1D: 术后5 d( $\times 200$ )

3. 肾脏形态学检查(图1):各组大鼠肾脏外观及颜色基本正常,假手术组大鼠 HE 切片未见明显的形态学改变。手术组和对照组肾脏微肿胀、颜色暗,切开见皮髓分界欠清,镜下主要表现为肾小管间质病变,可见明显的肾小管上皮细胞水肿、空泡变性、基底膜皱缩、刷状缘消失、核碎裂等,肾小管间毛细血管充血。

## 讨 论

大鼠原位冷缺血灌注损伤模型最早由 Takada 等<sup>[10-11]</sup>报道,方法为首先切除右肾,游离左肾蒂及其上下方腔静脉和腹主动脉并阻断之,从腹主动脉插管接冷灌注液向左肾灌注,在左肾静脉上切一小口引流;灌注完毕后夹闭左肾蒂至所需时间开放,缝合腹主动脉和肾静脉切口。此后,国内张世林及李俊龙等对其作了改进,操作起来更为方便,但仍存在诸多不足。本实验参照以往成型的大鼠原位冷缺血灌注损伤模型进行改进,并保留其优点。本实验的优点是:因冷缺血再灌注损伤模型中,一个肾脏模拟冷缺血再灌注损伤,而另一个肾脏需要切除,我们充分利用切除肾脏的血管进行操作,省略了缝合动静脉步骤,极大地简化了手术设备要求和手术技巧的需要,适合于难以进行显微手术的实验人员进行操作,手术难度适中,术后成活率高,模型稳定,满足大范围临床开展动物实验的要求。目前,肾脏原位冷缺血再灌注模型均不可避免地存在热缺血再灌注损伤过程,而本模型通过省略血管缝合步骤,最大限度地减少了肾脏热缺血再灌注损伤时间,可以更好地体现肾脏冷缺血再灌注所造成的损伤,具有更好的代表性。

此大鼠原位冷缺血灌注损伤模型的构建需要注意以下几点:(1)分离血管时需小心出血,特别是右肾动脉的分离,因右肾动脉位于右肾静脉及下腔静脉的后方进入腹主动脉,分离时需谨慎,避免误伤肝动脉,大鼠血容量较小,若出现出血后很难苏醒。(2)进行血管阻断时需小心操作,右肾静脉与肝脏间的腔静脉段较短,且肝脏组织较脆,分离时需轻柔,避免出血,腹主动脉上方阻断时需小心肠系膜上动脉,避免误伤。(3)阻

断时间尽量缩短,这需要在阻断腔静脉和腹主动脉前充分游离双肾动静脉,且做好左肾动脉插管及灌注准备,笔者注意到,阻断 5 min 以上会明显提高大鼠的死亡率。(4)分离肾动脉时动作尽量轻柔,避免牵拉,并且局部应用罂粟碱,避免肾动脉痉挛,造成插管困难。

手术组和对照组相比,本模型大鼠术后部分时间段肌酐、尿素氮和 NF- $\kappa$ B 较低,可能与省略血管缝合步骤,从而较少大鼠热缺血再灌注损伤时间有关。本模型综合了原有经典模型的优点,简化了显微血管手术步骤,降低了手术难度,且模型构建稳定性强,利于一般实验室及实验人员进行操作。

## 参 考 文 献

- [1] Kaczorowski DJ, Nakao A, Vallabhaneni R, et al. Mechanisms of Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Mediated Inflammation After Cold Ischemia/Reperfusion in the heart. *Transplantation*, 2009, 87: 1455-1463.
- [2] Krüger B, Krick S, Dhillon N, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 3390-3395.
- [3] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124: 783-801.
- [4] Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol*, 2007, 19: 3-10.
- [5] Kaczorowski DJ, Mollen KP, Edmonds R, et al. Early events in the recognition of danger signals after tissue injury. *J Leukoc Biol*, 2008, 83: 546-552.
- [6] Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, et al. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, 2006, 26: 430-437.
- [7] Tang AH, Brunn GJ, Cascalho M, et al. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J Leukoc Biol*, 2007, 82: 282-285.
- [8] Takada M, Chandraker A, Nadeau KC, et al. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 1997, 100: 1199-1203.
- [9] 张世林, 闵志廉, 朱有华, 等. 原位灌注大鼠肾脏冷缺血-再灌注损伤模型的建立. *第二军医大学学报*, 2000, 21: S3-4.
- [10] Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, et al. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. *Inhibi-*

tion by a soluble P-selectin ligand. J Clin Invest, 1997, 99: 2682-2690.

tern, 1997, 52:1678-1684.

(收稿日期:2011-08-22)

[11] Chandraker A, Takada M, Nadeau KC, et al. CD28-B7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/reperfusion injury. Kid In-

(本文编辑:郝锐)

韦星,蔡明,石炳毅,等.新型肾脏冷缺血再灌注损伤动物模型的稳定性研究[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(5):1207-1210.

