

· 基础研究 ·

嘌呤霉素氨基核苷大鼠肾病模型与阿霉素大鼠肾病模型比较

李小艳 丁洁 王学晶 徐国兵 王素霞 冯泉城 姜丽娜

【摘要】 目的 比较两种经典的大鼠肾病模型的制模方法及评价指标,为肾病模型的研究提供参考数据。方法 30 只雄性 SD 大鼠被随机分为对照组,嘌呤霉素氨基核苷组(PAN 组)和阿霉素组(ADR 组)。比较 3 组大鼠的制模方法,评价指标(包括不同时间点大鼠体质量,蛋白尿水平,血清白蛋白浓度,胆固醇浓度,肌酐和尿素氮水平,电镜下足突融合程度等),制模药品不良反应及实验费用等指标,评价两种模型的优缺点。结果 (1)成模后 PAN 组大鼠体质量,毛色等均无明显变化;ADR 组表现为脱毛、毛色差、大便稀,且体质量显著低于对照组($P < 0.01$)。(2)PAN 组制模第 10 天起 24 h 尿蛋白量显著高于对照组并持续至第 15 天($P < 0.01$);ADR 组制模第 15 天始 24 h 尿蛋白量显著高于对照组并持续至第 21 天($P < 0.01$)。(3)PAN 组制模第 10 天起血清白蛋白水平显著低于对照组($P < 0.01$),制模第 15 天恢复;血清胆固醇水平在制模第 10 天显著高于对照组($P < 0.01$),第 15 天恢复;ADR 组血清白蛋白浓度在制模第 15 天显著低于对照组($P < 0.05$),制模第 21 天恢复;两组大鼠不同时间点肌酐和尿素氮浓度与对照组差异无统计学意义。(4)PAN 组在制模第 10 天足突宽度显著宽于对照组($P < 0.01$);ADR 组在第 21 天时足突宽度显著宽于对照组($P < 0.05$);(5)PAN 组成功诱导 1 只大鼠(100 g)肾病模型费用为 ADR 组的 3.1 倍(578.10 元比 186.94 元)。结论 两种药物均可成功诱导大鼠肾病模型。PAN 有制模方便、不良反应小、组间差异小、急性期发病快、周期短等优点,但价格昂贵;ADR 给药途径较困难,不良反应及组间差异大,价格相对便宜。

【关键词】 嘌呤霉素,氨基核苷; 表柔比星; 疾病模型,动物; 微小病变肾病

Comparison of two nephrotic syndrome rat models LI Xiao-yan, DING Jie, WANG Xue-jing, XU Guo-bing, WANG Su-xia, FENG Quan-cheng, JIANG Li-na. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 10034, China

Corresponding author: DING Jie, Email: djnc_5855@126.com

【Abstract】 **Objective** To compare two classical rat models of nephrotic syndrome and to provide some reference data to researchers. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into control group, puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome (PAN) group and adriamycin-induced nephrotic syndrome (ADR) group. The body weight, twenty four hour proteinuria level, serum albumin concentration, cholesterol concentration, creatinine and urea concentration were measured. The renal pathology change was evaluated. The drug toxic effects, administration methods and the costs were also compared. **Results** There was no significant difference in body weight and hair color between control group and PAN group. Compared to control group, the body weight of the rats significantly decreased at day 15 and day 21 in ADR group ($P < 0.01$), accompanied by epilation and diarrhea. Compared to control group, the 24-hour urinary protein levels increased significantly at day

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.02.012

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30830105);国家自然科学基金面上项目(81170657);北京市自然科学基金(7072080);高等学校博士学科点专项科研基金(200800010088)

作者单位:100034 北京大学第一医院儿科(李小艳、丁洁、冯泉城、姜丽娜),检验科(王学晶、徐国兵),电镜室(王素霞)

通信作者:丁洁,Email: djnc_5855@126.com

10 ($P < 0.01$), day 15 ($P < 0.01$), and reached the peak level at day 15 ($P < 0.01$), day 21 ($P < 0.01$) in PAN group and ADR group respectively. Compared to control group, the serum albumin concentration decreased significantly at day 10 ($P < 0.01$), and return to normal level at day 15. The serum cholesterol concentration was increased significantly at day 10 ($P < 0.01$) and return to normal at day 15 in PAN group. Compared to control group, the serum albumin concentration was decreased significantly at day 15 ($P < 0.05$) and return to normal at day 21 in ADR group. No significant difference of serum creatinine and serum urea nitrogen levels were found among three groups. Compared to control group, the width of foot process increased significantly at day 10 ($P < 0.01$) and day 15 ($P < 0.05$) in PAN group and ADR group respectively. To successfully induce a nephrotic rat model (per 100 g), the cost of PAN group was 3.1 times of ADR group (578.10 yuan vs 186.94 yuan).

Conclusions Nephrotic syndrome can be induced by both PAN and ADR. The administration of PAN via intraperitoneal injection is more convenient as compared to ADR via tail intravenous injection. Compared to ADR, PAN can induce nephrotic syndrome model more rapidly, with more consistent detection index, and less toxic effects, but its cost is more expensive.

【Key words】 Puromycin aminonucleoside; Epirubicin; Disease model, animal; Minimal change disease

微小病变肾病(MCD)是儿童原发性肾病综合征最常见的病理类型,其病理组织学特点是光镜下肾小球形态基本正常,电镜下肾小球上皮细胞足突广泛融合。临床上表现为大量蛋白尿,低蛋白血症,高脂血症和明显水肿。其发病机制目前仍不明确。为阐明其发病机制,探寻治疗靶点,研究者常需借助实验动物模型。嘌呤霉素氨基核苷(PAN)大鼠肾病模型和阿霉素(ADR)大鼠肾病模型是目前被大家公认的模拟人类MCD的两种动物模型。我们从实验费用,制模方法,模型评价,制模药品不良反应等指标方面进行比较分析,旨在为肾病模型的研究提供一些数据参考。

材料与方法

一、模型制作与分组

雄性SD大鼠30只(北京维通利华公司),体质量120~140 g,被随机分成4组: PAN对照组($n=5$)、PAN组($n=10$)、ADR对照组($n=5$)及ADR组($n=10$)。PAN组按照15 mg/100 g体质量给予一次性腹腔注射PAN(美国Sigma); PAN对照组予以一次性腹腔注射等量生理盐水。ADR组按照0.65 mg/100 g体质量一次性尾静脉注射阿霉素(美国Sigma); ADR对照组给予一次性尾经脉注射等量生理盐水。所有大鼠均饲养于隔离环境的代谢笼中,自由摄取标准饲料与水,动态监测24 h尿蛋白水平。分别于制模第10天、第15天处死PAN组大鼠,制模第15天、第21天处死

ADR组大鼠。

二、标本采集

1. 尿液: 所有大鼠均置于清洁代谢笼中,动态收集24 h尿液,记录总尿量。

2. 血液: 分别于上述不同时间点处死大鼠,心脏取血留取血液标本。

3. 肾组织: 各组大鼠于不同时间点随机选取1只大鼠留取1 mm×1 mm×1 mm大小的肾脏皮质,3%戊二醛固定,用于电镜检查。

三、检测方法

1. 尿蛋白: 尿标本离心后取上清,用邻苯三酚红钼络合法(日立7170A型全自动生化分析仪)测定24 h尿蛋白浓度。

2. 血生化指标: 血标本离心后取上清,用Beckman Coulter DXC-800全自动生化分析仪测定血清白蛋白、胆固醇、肌酐、尿素氮浓度。

3. 足突宽度(FPW)测量: 肾组织标本经3%戊二醛固定,1%四氧化锇后固定。丙酮脱水,Epon812包埋制备超薄切片,醋酸铀和醋酸铅染色。超薄切片在本院电镜室完成。用日本JEOL JEM-1230电镜检查。电镜下随机选取1~2个肾小球,在同等倍数下($\times 12\ 000$)逆时针随机选取互不重叠的10个毛细血管袢,用连接在电镜上的Gatan 792 BioScan数码相机进行拍照。利用Image Pro Plus图像分析软件对每张图进行足突FPW测量,具体方法为测量肾小球基底膜(GBM)长度,沿GBM计数足突个数(沿GBM相邻两个裂隙之间的足细胞部分定义为1个足突)^[1]。根据公

式计算足突宽度: $FPW = \pi/4 \times \sum \text{GBM 长度} / \sum \text{足突数}$, 计算每个毛细血管袢上的足突宽度^[2]。

四、统计学处理

数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 两两比较, 方差齐者采用 LSD 法分析, 方差不齐者采用 Dunnett T₃ 检验法。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况: 2 个对照组及 PAN 组大鼠精神好, 毛色光滑、无脱毛及腹泻现象发生。ADR 组大鼠精神萎靡、毛色暗淡、脱毛现象严重, 大便稀。各组大鼠均无死亡。PAN 组与对照组相比体质量无明显差异; 而 ADR 组在制模第 15 天和制模第 21 天时大鼠体质量显著低于对照组。PAN 组在制模第 10 天时出现大量蛋白尿, 持续升高到制模第 15 天; ADR 组在制模第 15 天时出现大量蛋白尿, 持续升高到制模第 21 天, 见表 1。

2. 各组大鼠血生化指标比较: PAN 组制模第 10 天起血清白蛋白水平显著低于对照组, 制模第 15 天恢复; 血清胆固醇水平在制模第 10 天显著高于对照组, 第 15 天恢复。ADR 组血清白蛋白浓度在制模第 15 天显著低于对照组, 制模第 21 天恢复; 两组大鼠不同时间点血肌酐和尿素氮浓度与对照组差异无统计学意义。见表 2。

3. 电镜下足突形态学观察: 正常情况下足细胞足突排列整齐, 呈梳齿状。PAN 组大鼠在制模第 10 天足细胞足突的正常结构消失, 表现为足突弥漫性融合; 制模第 15 天时足突形态恢复。ADR 处理组在制模第 15 天时足细胞足突排列紊乱, 足突肿胀; 第 21 天时足突弥漫融合。PAN 处理组第 10 天足突宽度显著增宽; ADR 处理组在第 21 天时足突显著增宽。见表 3, 见图 1。

4. 费用比较: PAN 组大鼠的给药剂量为 150 mg/kg, ADR 组为 6.5 mg/kg。PAN 组平均每 100 g 大鼠所需费用为 578.10 元, 而 ADR 组为 186.94 元, PAN 组的费用是 ADR 组的 3.1 倍。

表 1 各组大鼠不同时间点体质量、24 h 尿蛋白量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体质量(g)			尿蛋白量(mg/24 h)		
		第 1 天	第 10 天	第 15 天	第 1 天	第 10 天	第 15 天
PAN	10	162.8±6.76	214.8±7.81	270.4±6.02	4.51±2.20	286.7±1.75 ^a	428.58±143.44 ^a
PAN 对照	5	161.66±5.56	207.33±7.65	280.83±7.24	6.70±1.97	11.23±4.69	22.28±7.13
ADR	10	164.0±10.23	213.33±8.46 ^a	254.33±7.27 ^a	5.91±3.92	103.25±89.27 ^a	153.63±75.04 ^a
ADR 对照	5	163.67±2.05	259.33±14.06	335.67±9.39	5.51±2.36	16.08±1.07	11.37±7.30

注: 与各自对照组比较, ^a $P < 0.01$

表 2 两组大鼠不同时间点血生化指标变化($\bar{x} \pm s$)

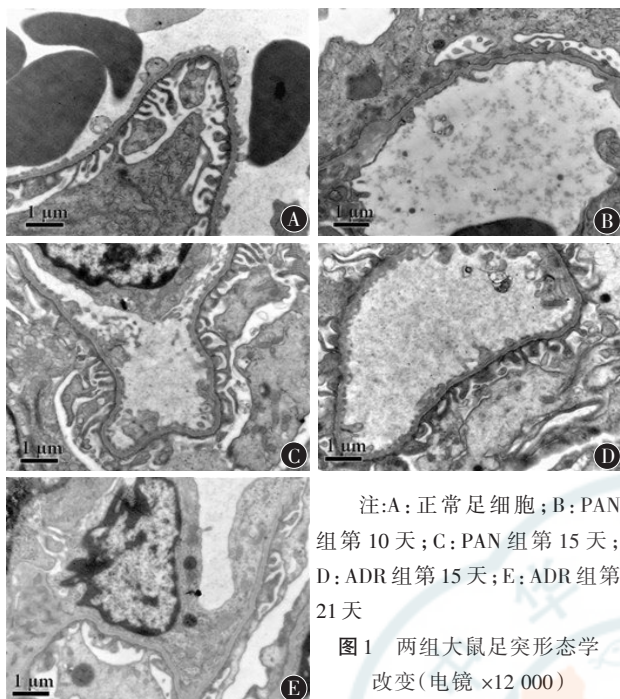
项目	PAN 对照组($n = 5$)	PAN 组($n = 10$)		ADR 对照组($n = 5$)	ADR 组($n = 10$)	
		第 10 天	第 15 天		第 10 天	第 15 天
Alb(g/L)	34.98±1.2	16.64±11.43 ^a	29.0±5.36	36.95±0.45	25.7±1.86 ^b	27.6±3.62
TC(mmol/L)	1.99±0.11	9.46±3.99 ^b	2.37±2.22	1.41±0.09	3.32±0.59	2.53±0.63
Scr($\mu\text{mol/L}$)	27.38±4.78	17.35±8.58	25.0±3.33	23.7±6.5	21.51±4.3	34.58±13.18
BUN(mmol/L)	5.33±1.04	8.95±3.35	12.88±0.24	5.66±0.99	6.04±0.94	7.38±1.62

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

表 3 各组大鼠不同时间点电镜下足突宽度的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	PAN 组(第 10 天)	PAN 组(第 15 天)	ADR 组(第 15 天)	ADR 组(第 21 天)
平均足突宽度(μm)	0.27±0.07	1.51±0.61 ^b	0.61±0.16 ^a	0.54±0.1	1.31±0.42 ^b

注: 两个对照组合并统计鼠数为 10 只; PAN 组、ADR 组鼠数各为 10 只; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$



讨 论

微小病变型肾病(MCD)是儿童原发性肾病综合征中最常见的病理类型,其发病的确切机制仍不明确,治疗手段也无特异。我们通过建立两种大鼠肾病模型,对 2 组间制模成功的重要指标进行对比分析,旨在为肾病模型的研究提供一些参考数据。

PAN 和 ADR 是两种用于诱导大鼠肾病模型的经典药物,最早用于肾病模型分别为 1970 年和 1976 年,两种肾病模型多用于观察临床表型为蛋白尿的肾脏病理研究。模型的成功与否与动物的种属和性别密切相关。体质量介于 90~200 g 之间的雄性 SD 大鼠造模成功率高。不同的给药途径可诱导不同病理改变的肾病模型。诱导 MCD 时,ADR 最常用的给药方式为单次尾静脉注射,PAN 则常用单次腹腔注射的方式。两种模型均有重复性好的优点。本实验中我们发现,ADR 组大鼠在制模第 3 天始出现精神差、脱毛、大便稀、体质量减轻等不良反应;在第 15 天及第 21 天时,大鼠体质量显著低于正常;而 PAN 组大鼠一般情况良好,在蛋白尿最严重的制模第 10 天和制模第 15 天,大鼠体质量与对照组差异无统计学意义。ADR 是一种蒽环类抗生素,具有较强的细胞毒作用,ADR 可破坏双链 DNA、细胞骨架及细胞外基

质的正常结构,通过脂质过氧化作用抑制蛋白酶活性及通过减少线粒体 DNA 而致组织损伤^[3]。由于其损伤广泛,除足细胞受损外,其他组织器官也受累,导致其肾外表现明显。PAN 是嘌呤毒素的衍生物,具有选择性的肾损害作用,其作用机制主要是通过产生活性氧而直接损伤 DNA,文献报道用氧自由基清除剂提前处理后,再注射 PAN,足细胞损伤及蛋白尿水平均减弱^[4]。

本研究中,PAN 组在制模第 10 天 24 h 尿蛋白量显著增高,持续至第 15 天,与 Olson 等^[5]报道一致。而 Shiiki 等^[6]报道,经皮下注射 PAN 后第 5 天则出现大量蛋白尿及不可逆性肾脏损害,可能和给药途径不同、药物体内代谢不同有关。我们发现,PAN 组血清白蛋白水平在制模第 10 天时显著降低,并伴有胆固醇水平显著增高,制模第 15 天时血清白蛋白水平回升,胆固醇水平降至正常范围。ADR 组则在制模第 15 天出现大量蛋白尿,持续升高至制模第 21 天。与 PAN 组相比,ADR 组蛋白尿出现时间较晚,尿蛋白水平较低。有研究报道,一次性给大鼠尾静脉注射 ADR 7.5 mg/kg,5~7 d 即可出现肾病水平蛋白尿,13 d 出现足突融合^[7]。本研究 ADR 组血清白蛋白水平在制模第 15 天时显著下降,制模第 21 天略恢复;而血清胆固醇水平变化不明显。ADR 组及 PAN 组不同时间点肌酐和尿素氮水平均无明显变化。

MCD 最典型的病理改变为电镜下足细胞足突的融合。我们观察到 PAN 组制模第 10 天出现足细胞足突弥漫性融合,平均足突宽度显著宽于对照组;制模第 15 天时虽有恢复,但与对照组差异仍有统计学意义。而 ADR 组在制模第 15 天时足细胞增宽,制模第 21 天时足突才出现弥漫性融合,平均足突宽度显著宽于对照组。

综上所述,PAN 及 ADR 均可成功诱导大鼠 MCD 模型,两种模型均有可重复性高、病变时间可预测等优点。二者比较,PAN 肾病大鼠模型制模操作方便,不良反应小,组间差异小,被广泛用于 MCD 发病机制及损伤恢复的研究,但其肾病急性期持续时间较短,且价格昂贵。ADR 大鼠肾病模型制模时间较长,适用于损伤及抗损伤机制的研究,但其制模操作较困难,不良反应大,在使用中应严格计算药物剂量,因其安全范围较窄,每增加或减少 0.5 mg/kg 剂量,可导致大鼠死亡率增加或模型不成功。

参 考 文 献

- [1] 管娜, 丁洁, 王素霞, 等. 足细胞与 Alport 综合征蛋白尿的关系. 中华肾脏病杂志, 2010, 26: 748-752.
- [2] Gundersen HJ, Seefeldt T, Osterby R. Glomerular epithelial foot processes in normal man and rats. Distribution of true width and its intra- and inter-individual variation. Cell Tissue Res, 1980, 205: 147-155.
- [3] Papeta N, Zheng Z, Schon EA, et al. Prkdc participates in mitochondrial genome maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice. J Clin Invest, 2010, 120: 4055-4064.
- [4] Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. Kidney Int, 1986, 29: 478-483.
- [5] Ootaka T, Suzuki M, Sudo K, et al. Histologic localization of terminal complement complexes in renal diseases. An immunohistochemical study. Am J Clin Pathol, 1989, 91: 144-151.
- [6] Shiiki H, Sasaki Y, Nishino T, et al. Cell proliferation and apoptosis of the glomerular epithelial cells in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. Pathobiology, 1998, 66: 221-229.
- [7] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. Lab Invest, 1982, 46: 16-23.

(收稿日期: 2012-05-24)

(本文编辑: 孙玉玲)

· 经验交流 ·

五酯胶囊联合他克莫司对膜性肾病的疗效

任苗苗 吴琼 杜玄一

他克莫司对膜性肾病疗效确切, 安全性好, 但费用高、生物利用度差异性大。我们用五酯胶囊联合他克莫司治疗膜性肾病, 观察其疗效及费用。

一、对象与方法

选择本院 2011 年 5 月至 2012 年 5 月经肾活检确诊为特发性膜性肾病(IMN)(II~IV 期), 服用他克莫司及激素 3 d 后血药浓度 $< 4.0 \mu\text{g/L}$, 未出现严重并发症的患者 60 例为对象。按随机数字法分为试验组和对照组, 各 30 例。对照组: 年龄 (39.30 ± 11.73) 岁, 体质量 (59.86 ± 10.27) kg, 病程 (11.00 ± 4.50) 月, 病理 II 期 8 例, III 期 13 例, IV 期 9 例。试验组: 年龄 (40.10 ± 10.05) 岁, 体质量 (61.25 ± 8.83) kg, 病程 (12.50 ± 5.00) 月, 病理 II 期 8 例, III 期 14 例, IV 期 8 例。两组各项生化指标水平差异无统计学意义, 具可比性。他克莫司起始剂量 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 分 2 次于餐前 1 h 服用。试验组加用五酯胶囊 1 粒, tid, 并视病情调整五酯胶囊量。对照组加大他克莫司剂量, 维持血药浓度谷值为 $4 \sim 8 \mu\text{g/L}$ 。观察患者的缓解率、生化指标及不良反应, 计算他克莫司剂量及费用。用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料差异用 *t* 检验; 率的比较用卡方检验。

二、结果

1. 临床疗效: 试验组缓解率为 93.3%, 对照组为 90%, $P > 0.05$, 2 组疗效相当。

2. 生化指标: 两组各项生化指标差异均无统计学意义。治疗后, 两组的 Alb 均高于治疗前; 尿蛋白量、胆固醇、三酰甘油均低于治疗前, 差异均有统计学意义。试验组腹泻 1 例, 对照组震颤 1 例, 不良反应差异无统计学意义。

3. 他克莫司用量: 试验组 $(2.93 \pm 0.31) \text{ mg/d}$, 对照组 $(3.90 \pm 0.54) \text{ mg/d}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

4. 费用-效果比及增量费用-效果比: 试验组与对照组的费用分别为 $(13\ 702.62 \pm 1458.62)$ 元和 $(17\ 796.87 \pm 2469.27)$ 元, 费用-效果比分别为 146.86 ± 15.63 和 197.73 ± 27.44 。对照组对于试验组的增量费用-效果比为 1240.68 ± 306.25 , 即在试验组方案的基础上增加 1 个效果方案, 对照组需多花费 (1240.68 ± 306.25) 元, 可见试验组更为经济。

讨论 试验组所需的他克莫司剂量显著低于对照组, 成本亦低于对照组, 且两组临床疗效相当。五酯胶囊的有效成分(五味子甲素)可能通过抑制肝脏或小肠的 CYP3A4, 进一步抑制他克莫司的代谢, 最终增加他克莫司的生物利用度和血药浓度, 还可通过多种方式阻断各种有毒物质如病毒、乙醇及他克莫司对肝细胞膜的损伤。五酯胶囊价格低廉、用量较少、安全性好, 因此临床治疗时可以使用五酯胶囊降低他克莫司剂量, 节省医疗资源, 减轻患者经济压力。