

阿霉素肾病大鼠模型的评价研究

唐桂毅, 温 和, 王晶晶, 张海娇, 刘 妍*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 探索阿霉素不同的给药剂量和注射次数对模型的影响, 确定阿霉素肾病大鼠模型的最佳造模条件。方法 54只成年雄性SD大鼠随机分为对照及模型A、B、C、D、E、F 7组, 对照组于造模第1天尾iv生理盐水; 模型A、B、C组于造模第1天分别尾iv阿霉素5.5、6.0、6.5 mg/kg; 分别于造模第1、8天, 模型D组尾iv阿霉素4.0、2.0 mg/kg, 模型E组尾iv阿霉素4.0、2.5 mg/kg, 模型F组尾iv阿霉素4.0、3.5 mg/kg。观察注射阿霉素后大鼠的一般状态、体质量、摄食量; 于造模第4周末麻醉并处死大鼠, 生化自动分析仪检测尿蛋白/尿肌酐比值(ACR)、血清生化指标; HE染色观察肾脏组织形态学改变。结果 造模后, 模型组大部分出现脱毛、腹泻、摄食量减少、体质量增长缓慢等症状。与对照组比较, 各模型组于给药第1周ACR开始升高, 且模型C、E、F组明显高于对照组($P < 0.01$), 单次造模组于第3周达峰, 并于造模第4周开始出现不同程度的回调, 而分次模型组呈现出持续稳定增长, 于第4周达峰。除F组尿素氮(BUN)高于对照组外, 各模型组BUN、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)均有不同程度降低; 大部分模型组总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)明显高于对照组($P < 0.05$ 、 0.01)。病理切片显示, 各模型组肾小球和肾小管出现不同程度损伤, 且随造模剂量上升病变加重。结论 经改良间隔1周2次重复尾iv阿霉素可以高效、成功地建立阿霉素肾病大鼠模型, 较其他造模组肾功能及病理改变更为典型、稳定, 效果更佳。

关键词: 阿霉素; 肾病模型; 评价; 白蛋白/尿肌酐; 血清生化

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)01-0066-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.011

Evaluation research of adriamycin-induced nephropathy model in rats

TANG Guiyi, WEN He, WANG Jingjing, Zhang Haijiao, LIU Yan

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** To explore the effects of different doses and times of adriamycin on the models, and confirm the optimums of establishing adriamycin-induced nephropathy rat models. **Methods** Totally Fifty-four male healthy SD rats were randomly divided into 7 groups: control group, model A, B, C, D, E and F group. After adriamycin injection, the general status, body weight, food consumption, urinary albumin to creatinine ratio (ACR), serum biochemical indexes, and renal morphological changes were observed. **Results** After modeling, model groups obtained trichomadesis, diarrhea, lower food consumption and slower body weight. Compared with the control group, the urinary ACR in model groups were increased at first week, and ACR in the model C, E and F groups were significantly higher than those in the control groups ($P < 0.01$). The models by one injection reached the peak at the third week, and there were different levels of callback at the fourth week, the models by repeating injection showed the continuous and stable growth and reached the peak at the fourth week. Expect that Urea nitrogen (BUN) in the model F group was higher than control group, BUN, creatinine (CREA), total protein (TP), albumin (ALB) in each model group were decreased in varying degrees, TC and TG level in most model groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$, 0.01), total cholesterol (TC) and triacylglycerol (TG) were lower. Morphological slice displayed the glomerular and tubular were damaged to different degrees, the lesion severity of the model group was aggravated with increasing dose. **Conclusion** Adriamycin-induced nephropathy rat models can be effectively and successfully reproduced through repeating injection adriamycin twice a week at an improved interval, the model was more typical and stable change than other groups.

Key words: adriamycin; nephropathy model; evaluation; albumin/creatinine; serum biochemistry

收稿日期: 2019-06-27

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004)

第一作者: 唐桂毅(1985—), 女, 硕士, 主要从事新药临床前安全性评价研究。E-mail: tanggy@tjpr.com

*通信作者: 刘妍(1973—), 女, 硕士, 研究员, 主要从事新药临床前安全性评价研究。E-mail: liuy8@tjpr.com

阿霉素肾病大鼠模型首次报道于20世纪80年代初^[1],现已广泛应用于肾病研究领域,是公认的能较好模拟人类肾脏疾病的模型^[2-3]。啮齿类动物静脉注射阿霉素后,能迅速分布于肾脏组织^[4],主要表现为大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症、水肿,持续发展为肾衰竭^[5]。近年来应用较为广泛的造模方法也存在着诸多弊端,如给药频率、剂量、方式等不同,会直接影响模型的成功率、稳定性和重复性。因此,本研究结合了文献中报道的多种造模方式,改变尾iv阿霉素的给药剂量和给药次数,最终确定造模的最佳条件,更好地为实验与临床提供科学的参考依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级健康雄性SD大鼠,体质量200~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号SCXK(京)2012-0001;动物饲养温度20~26℃,相对湿度40%~70%,12 h光照循环,标准饮食,自由饮水。

1.2 药品与试剂

阿霉素(Salarbio公司,批号140601);生理盐水(河北天成药业股份有限公司,批号E14030309);

尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)测定试剂盒、质控血清和标准品(中生北控生物科技股份有限公司)。

1.3 仪器

7080型全自动生化分析仪(日本日立公司);VIP5J-F2组织自动脱水机、Glas-J2自动封片机、DRS-2000J-D2自动染色装置(日本樱花检验仪器株式会社);EG-1150H+C组织石蜡包埋机(德国Leica公司);IVS-410自动切片机(日本大和光机工业株式会社);HPX-90502MBE数显电热培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);BX系列普通光学显微镜、DP71图像采集系统(日本奥林巴斯光学株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

实验前大鼠适应性饲养1周,选择54只体质量增长适中的雄鼠,采用体质量随机区组法进行分组,除对照组6只动物外,其他组别均为8只动物。通过参考文献确定阿霉素常用的注射剂量范围,采用尾iv方式造模(表1),对照组注射等容积生理盐水。

表1 动物分组及处理情况表

Table 1 Situations of grouping and dealing in rats

组别	n/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	造模方法
对照	6	0	不造模,于第1天尾iv生理盐水
模型A	8	5.5	于第1天尾iv阿霉素
模型B	8	6.0	于第1天尾iv阿霉素
模型C	8	6.5	于第1天尾iv阿霉素
模型D	8	4.0+2.0	分别于第1、8天尾iv阿霉素4.0、2.0 mg/kg
模型E	8	4.0+2.5	分别于第1、8天尾iv阿霉素4.0、2.5 mg/kg
模型F	8	4.0+3.5	分别于第1、8天尾iv阿霉素4.0、3.5 mg/kg

2.2 观察指标与样本收集

2.2.1 一般观察 观察内容包括精神状态、毛色、大小便、水肿等情况。

2.2.2 体质量及摄食量 检查正常饮食情况下大鼠的体质量及摄食量,每周测定1次。

2.2.3 尿液采集 各组分别于阿霉素注射后1、2、3、4周将大鼠置于代谢笼中禁食并自由饮水,收集过夜尿液,3 000 r/min离心10 min,取上层尿液用于生化分析。使用生化自动分析仪检测尿液中的ALB和CREA,然后计算其比值(ACR)。

2.2.4 血清生化及组织病理学 大鼠于实验第4周

末麻醉后,采用真空促凝采血管经腹主动脉采血3~5 mL,静置后3 000 r/min离心10 min,取上层血清用于生化分析。使用生化自动分析仪,酶二点法检测血清中的BUN、苦味酸二点法检测CREA、双缩脲法检测TP、溴甲酚绿法检测ALB、酶比色法检测TC、酶比色法检测TG。取大鼠肾脏,进行病理切片,HE染色,光镜下观察肾小球、肾小管结构变化。

2.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(多组

之间)或Dunnett-t检验(两组之间)进行统计分析。

3 结果

3.1 一般观察

对照组大鼠无明显异常表现,皮毛顺滑,行动自如,眼、口、鼻无异常分泌物,尿便正常;模型组大鼠造模前状态正常,造模第2天出现不同程度的腹泻、精神不振、皮毛光泽变差;造模第4天出现红色尿、腹部膨大、消瘦等症状;造模第7天模型A组1只大鼠出现尾巴溃烂;同等剂量单次造模组比重复造模组症状更明显,1周后症状开始缓解。试验期间,各组大鼠未发生死亡。

3.2 大鼠体质量变化

大鼠适应1周,至体质量约270 g开始造模,造模前各组体质量无明显差异。造模后,对照组大鼠体质量呈快速增长趋势;各模型组体质量增长缓慢,体质量于造模第1周开始出现显著差异($P < 0.01$),直至造模第4周体质量仍然显著低于对照组;各造模组体质量增长速度显著低于对照组($P < 0.01$);单次造模组比分次造模组大鼠体质量增长缓慢,说明分次造模对体质量出现较强的耐受性,见图1。

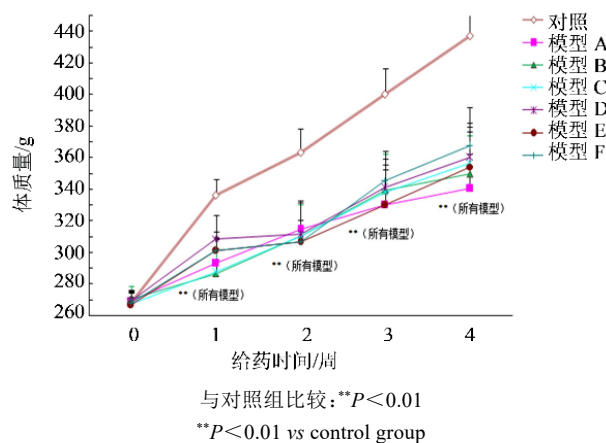


图1 各组大鼠体质量的变化

Fig. 1 Body weight changes of rats in each group

3.3 大鼠摄食量的变化

给药1~2 d,各模型组摄食量便开始显著下降($P < 0.05, 0.01$);各造模组于给药7~8 d摄食量开始逐渐恢复,摄食量于给药13~14 d全部恢复正常,见图2。

3.4 大鼠尿ACR的变化

各模型组于给药第1周ACR开始升高,且模型C、E、F组明显高于对照组($P < 0.01$);单

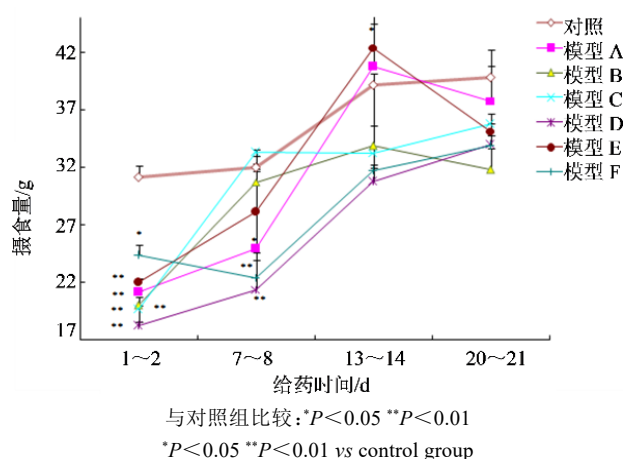


图2 各组大鼠摄食量的变化

Fig. 2 Food consumption changes of rats in each group

次给药3个模型组ACR值于给药前3周持续升高,于第3周达峰值,并于给药第4周开始出现不同程度的回调;而分次模型组ACR值随造模时间呈剂量相关性持续升高趋势,并于第4周达峰值,F组第4周ACR值明显高于同时时间点的其他造模组,说明F组造模效果更好,见图3。

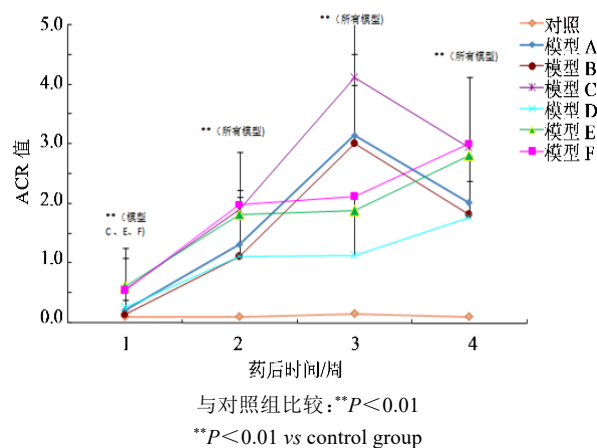


图3 大鼠尿ACR的变化

Fig. 3 Urinary ACR changes of rats in each group

3.5 血清生化指标的变化

除F组BUN高于对照组外,各模型组BUN、CREA、TP和ALB均有不同程度降低;大部分模型组TC、TG明显高于对照组($P < 0.05, 0.01$),虽然D组TC值高于对照组,但差异无统计学意义,表明模型组脂质代谢发生紊乱,见表2。

3.6 大鼠肾脏的病理学改变

光镜下,对照组大鼠肾小球毛细血管袢开放较好,肾小管上皮细胞排列整齐,肾小管和肾小球结构清晰。给药4周后,各模型组绝大多数动物可见

表2 大鼠血清生化指标的变化

Table 2 Serum biochemical parameters changes of rats in each group

组别	n/只	BUN/(mmol·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	6	8.13±0.68	73.10±2.67	62.63±2.30	25.02±1.06	1.50±0.16	0.38±0.17
模型A	8	6.29±1.15*	48.45±5.28**	55.63±2.22	17.40±1.85**	6.01±2.16*	1.71±1.14*
模型B	8	6.87±1.68	58.20±7.32**	55.68±3.47	17.83±1.90**	6.10±2.54*	1.42±0.56*
模型C	8	7.58±1.67	63.80±6.90	59.38±5.19	16.70±1.49**	10.16±5.32**	3.26±2.01**
模型D	8	7.41±1.03	61.36±6.20*	54.13±3.67**	19.00±2.44**	3.83±1.43	0.91±0.45*
模型E	8	7.14±1.25	59.59±7.93**	57.24±6.77	18.13±1.90**	6.76±2.78*	1.66±1.01*
模型F	8	8.67±1.08	68.20±8.82	55.59±4.72*	16.83±2.09**	6.51±2.51*	1.75±1.08*

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 vs control group

轻微至中度肾小球囊壁增厚、肾小球内有渗出液、血管球毛细血管扩张、血管球缩小;轻微至重度肾小管变性坏死、肾小管蛋白管型、肾小管扩张、肾小管再生、间质炎细胞浸润或(和)纤维组织增生,

见图4、5。分次造模和单次造模组随给药剂量上升病变加重;同等剂量重复造模组、单次造模组病变无显著差异,但分次造模肾脏损伤程度较轻。

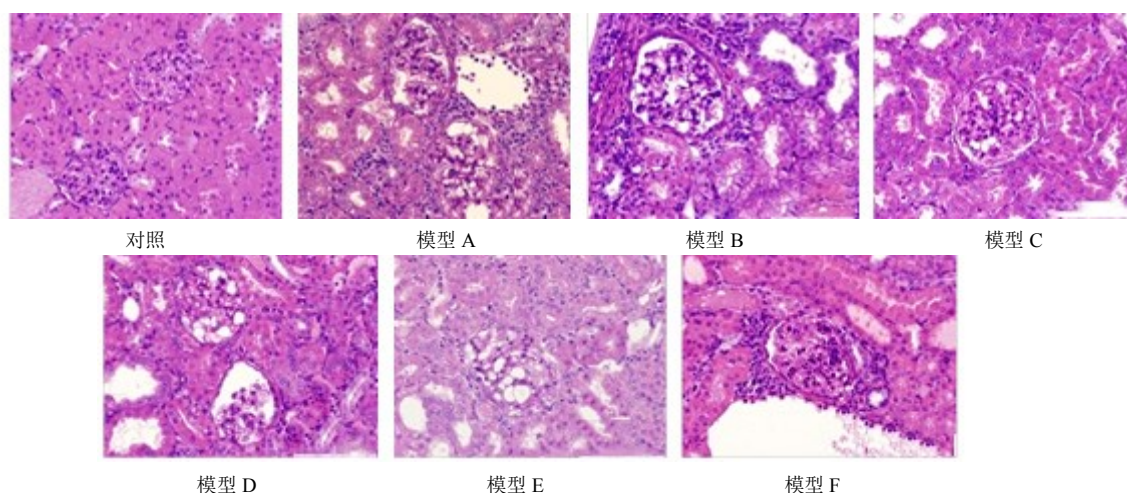


图4 各组大鼠肾小球的病理改变(×40,HE)

Fig. 4 Glomerular histological observation of rats in each group(×40,HE)

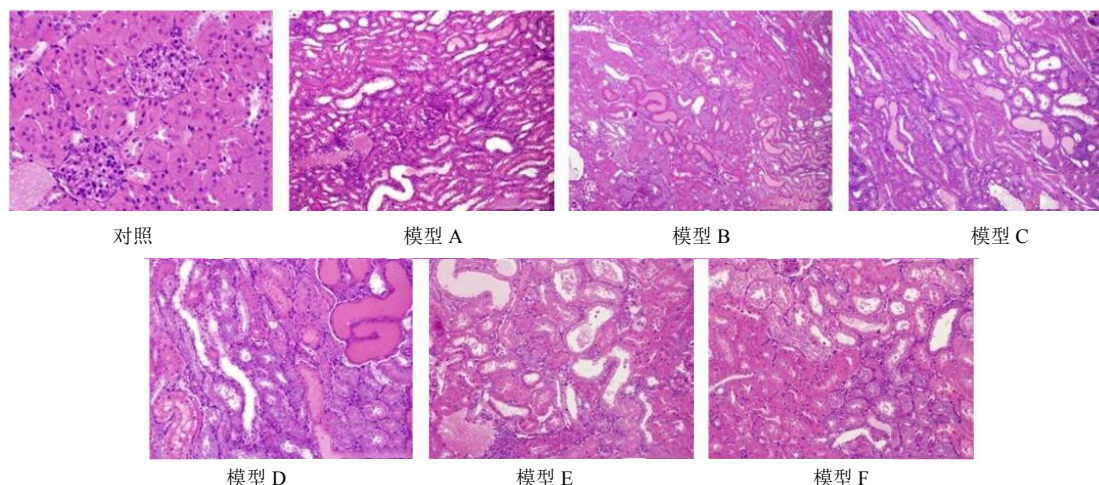


图5 各组大鼠肾小管的病理改变(×40,HE)

Fig. 5 Tubular histological observation of rats in each groups(×40,HE)

4 讨论

阿霉素肾病大鼠模型是现代医学研究人体肾病的极为重要的实验方法和手段,病变发展过程与临床肾病的发展规律相近似,其建立对临床研究有重大意义。本文就阿霉素作用机制、动物选择、剂量选择、给药途径、指标选择、结果分析进行了讨论。

4.1 作用机制

阿霉素又名多柔比星,其致病机制主要包括3个方面:(1)阿霉素具有强烈的细胞毒作用,可直接损害肾细胞,可导致nephron蛋白异常分布和细胞骨架发生紊乱,造成足突细胞的形态学改变^[5];(2)阿霉素含有醌式结构,产生活性氧,诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应,破坏了肾小球滤过膜的完整性,最终导致膜滤过屏障病变而形成持续蛋白尿^[6];(3)阿霉素能激活多种细胞因子及炎性介质,促进系膜细胞增殖和系膜基质增多,缓慢发展形成肾小球硬化^[7]。

4.2 动物选择

研究发现,大鼠品系、性别、年龄、来源和批次都会对ADR肾病模型产生影响^[8]。通过比较不同品系的大鼠制备肾病模型发现SD、Wistar大鼠对阿霉素十分敏感^[9];雄鼠比雌鼠对阿霉素诱导的肾病更加敏感,同时雄性大鼠有更好的耐受性及低死亡率,因此试验设计时,选择了雄性的SD大鼠。

4.3 剂量选择

根据文献报道^[3,10],阿霉素经尾静脉iv的有效剂量范围在1.5~7.5 mg/kg,但由于其消化道、心脏毒副作用较强,一次性尾iv阿霉素7.5 mg/kg 1周后,引起大鼠严重腹泻,心力衰竭,增加大鼠的死亡率,影响造模的成功率。为了降低严重的毒副作用,阿霉素较常用的剂量为6.5 mg/kg,因此本试验选择单次给予最大剂量为6.5 mg/kg,分次给药累加剂量为7.5 mg/kg,而分次后可以减少ADR的剂量,减轻对其他脏器的损伤,而且可使大鼠肾组织受到持续低剂量ADR的肾毒性作用,在降低死亡率的基础上,逐渐形成稳定的模型,有利于长期试验研究^[11]。

4.4 给药途径

阿霉素肾病大鼠模型多采用iv方式,但因阿霉素为高效发泡剂,操作不当而发生血管外渗漏时,可导致局部组织出现化学性损伤,因此尾静脉注射时应尽量避免渗漏,以免造成尾部红肿、溃烂甚至坏死。实验前,先用37℃温水对大鼠尾巴进行浸

泡,使血管膨胀,用布袋固定好大鼠,以免挣扎增加操作难度,用碘伏消毒鼠尾,采用头皮针一次性成功注射阿霉素,能准确控制阿霉素注射剂量,使模型均一,结果更精确。

4.5 阿霉素选择

不同厂家、不同制剂、不同批号的阿霉素对阿霉素肾病动物模型的成模率影响也较大,因此本实验室选择Salarbio厂家提供的进口阿霉素单体进行试验,降低因制剂辅料的添加对造模的影响。阿霉素溶液配制要避光操作,现配现用;配制浓度要适宜,因此本实验室采用等浓度不等体积注射给药,以较少浓度过高或过低造成较大的剂量误差。

4.6 指标及结果分析

血中CREA是机体肌酸的代谢产物,正常情况下CREA只从肾小球滤过并以同样速度清除,当肾小球滤过功能明显下降正常的1/3时,血CREA即可明显上升。血中BUN是机体蛋白质代谢的终产物,当肾小球滤过功能下降到正常的1/2以下时,BUN开始升高。因此,血中CREA和BUN水平在一定程度上可反映肾小球的滤过功能。但本试验除F组BUN略高于对照组,其他各模型组和BUN均不同程度的低于对照组。有研究发现^[12-16],与人类相比,大鼠血清CREA水平差异较大,血清中CREA或BUN未发生明显改变,因此不能完全按照人类慢性肾衰竭的分期诊断方法,而应该综合参考其他指标,如血脂及白蛋白水平、碱平衡、离子紊乱等,可能的原因值得进一步进行研究。脂代谢紊乱参与了肾脏疾病的进行性发展,高血脂时血流量减少,进一步加重肾组织损伤,加速肾小球硬化进程。

近年来,尿蛋白排泄量的测定标准一直以24 h尿蛋白(24-hour urinary protein, 24 h UP)为主,但24 h UP的检查步骤繁琐,同时在留尿过程中也会出现诸多的误差,严重影响检查的便捷及准确性。随着检测技术的发展,ACR的测定更有助于肾损伤的评估,反映尿蛋白的排泄情况,且相对恒定^[17],因此本研究选取了ACR作为检测指标。本试验各模型组ACR值从第1周开始增加,单次给药组大鼠ACR值于造模第4周产生了回调现象,但与对照组相比差异仍有统计学意义,而分次给药组大鼠尿蛋白持续稳定升高,为了更好观察尿蛋白的变化情况,后期测定了(4+3.5)mg/kg组第7周和第10周的ACR值,结果发现,第7周尿ACR平达到高峰,第10周开始回调,但仍然显著高于对照组(但数据在文章中未显示);同时对(4+3.5)mg/kg组第10周血清指标

和组织病理学进行了检查,结果发现,第10周生化指标的TC和TG仍然处于高水平,显著高于对照组;(4+3.5)mg/kg组药后10周病变程度明显重于药后4周,由此可以看出,分次模型F组血生化、尿蛋白变化及病理改变与相同剂量的单次模型要更稳定、可靠。

阿霉素肾病动物模型的应用也是众说纷纭,模型建立成功及其维持的时间同样重要,剂量小建模所需时间延长甚至建模失败,剂量大动物可能短期内死亡,均不利于后续观察与实验。本实验室结合了文献中报道的多种造模方式,通过改变尾静脉注射阿霉素的给药剂量和给药次数,发现间隔1周经鼠尾静脉两次注射ADR,可以成功复制阿霉素肾病模型,蛋白尿持续时间、病理变化、各项生化指标变化均更稳定。本方法具有成本低,容易复制,建模周期短,模型持续时间长,且具有自发进展性等特点,该模型的建立进一步为探索肾脏疾病的发病机制和治疗方法提供有力的工具。

参考文献

- [1] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events [J]. Lab Invest, 1982, 46: 16-23.
- [2] Lee V W, Harris D C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis [J]. Nephrology, 2011, 16(1): 30-38.
- [3] 贺升升, 李爱平, 张王宁, 等. 阿霉素肾病模型及其病理机制研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5426-5434.
- [4] Djabir Y Y, Arsyad M A, Sartini S, et al. Potential roles of *Kleinhovia hospital* L. Leaf extract in reducing doxorubicin acute hepatic, cardiac and renal toxicities in rats [J]. Pharma-cognosy Res, 2017, 9(2): 168-173.
- [5] 刘娜, 王艳秋, 杜丰, 等. 阿霉素诱导小鼠局灶节段性肾小球硬化肾病模型的研究 [J]. 实用药物与临床, 2014, 17(12): 1536-1540.
- [6] D'Agati V D, Kaskel F J, Falk R J. Focal segmental glomerulosclerosis [J]. N Engl J Med, 2011, 365(25): 2398-2411.
- [7] Soyoral Y U, Aslan M, Emre H, et al. Serum paraoxonase activity and oxidative stress in patients with adult nephrotic syndrome [J]. Atherosclerosis, 2011, 218(1): 243-246.
- [8] Zhang C, Boini K M, Xia M, et al. Activation of nod-like receptor protein 3 inflammasomes turns on podocyte injury and glomerular sclerosis in hyperhomocysteinemia [J]. Hypertension, 2012, 60(1): 154-162.
- [9] 蔺建军, 杨勇, 高娜, 等. 阿霉素注射次数及剂量对肾病综合征模型的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(8): 676-678, 755.
- [10] 杜宇, 魏红, 李海峰. 阿霉素大鼠肾病模型的概述 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(9): 78-19.
- [11] Cao Q, Wang Y, Zheng D, et al. IL-10/TGF-beta modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(6): 933-942.
- [12] 支勇, 吕艳, 曹式丽. 局灶节段性肾小球硬化型阿霉素肾病大鼠模型的建立 [J]. 江苏医药, 2018, 44(9): 977-980, 972.
- [13] 李爱平, 张王宁, 秦雪梅. 阿霉素肾病大鼠模型的优化 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 151-159.
- [14] Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, et al. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease [J]. Kidney Int, 1986, 29(2): 502-510.
- [15] Chen A, Wei C, Sheu L, et al. Induction of proteinuria by adriamycin or bovine serum albumin in the mouse [J]. Nephron, 1995, 69(3): 293-300.
- [16] de Fátima Pereira W, Brito-Melo G E A, de Almeida C A S, et al. The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update [J]. Inflamm Res, 2015, 64(5): 287-301.
- [17] Lee V W, Harris D C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis [J]. Nephrology, 2011, 16(1): 30-38.