

阿霉素肾病小鼠的肾脏病理转变过程

刘练, 张高福, 李秋, 王墨

(重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、
儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】 目的 观察不同时间点阿霉素肾病小鼠肾脏病理的转变过程。方法 48只雄性BALB/c小鼠, 随机分成对照组和模型组, 模型组经尾静脉一次性注射阿霉素10.5 mg/kg, 对照组给予等量的生理盐水。动态观察实验12周内小鼠24 h尿蛋白、血清生化指标、肾脏病理改变。结果 模型小鼠蛋白尿于实验第2周出现, 持续至第12周, 第8周出现高峰(均 $P < 0.05$); 低蛋白血症、高脂血症分别于实验第4、8周出现, 肌酐于实验第12周明显高于正常组(均 $P < 0.05$)。模型小鼠肾脏病理改变第4周表现为微小病变型; 第8周病变较第4周加重, 硬化不明显; 第12周出现肾小球局灶节段性硬化、肾小球硬化指数(GSI)为 $(2.81 \pm 0.84)\%$, 明显高于同一观测时间点对照组GSI $(0.33 \pm 0.21)\%$ ($P < 0.01$)。结论 一次性尾静脉注射10.5 mg/kg阿霉素, 能成功复制阿霉素肾病小鼠模型, 该模型在早期表现为微小病变型肾病, 晚期转变为局灶性节段性肾小球硬化。

【关键词】 阿霉素肾病; 小鼠; 肾脏

【中图分类号】 Q95-33, R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0013-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.003

Pathological changes of the kidneys in mouse models of adriamycin-induced-nephrosis

LIU Lian, ZHANG Gao-fu, LI Qiu, WANG Mo

(Department of Nephrology and Immunology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】 Objective Our purpose was to observe the renal pathological changes in the mouse models of adriamycin-induced nephropathy in different periods. **Method** 48 healthy male BALB/c mice were randomly divided into control group and model group. The model group received a disposable tail vein injection of adriamycin 10.5 mg/kg body weight, and the control group received the same amount of saline. 24-hour urinary protein, serum biochemical indexes and kidney pathological changes were dynamically observed for 12 weeks. **Results** Proteinuria of model mice appeared in the 2th week after ADR injection, which lasted to the end of the 12-week experiment, At the 8th week, the amount of urine protein reached a peak ($P < 0.05$); The serum albumin was decreased at the 4th week, cholesterol was increased at 8th week. At the end of experiment, serum creatinine was also increased ($P < 0.05$). Minimal change nephrotic syndrome (MCNS) was observed in model mice at the 4th week; the lesions in renal tissues at 8th weeks were more serious than that at 4th weeks, but glomerular sclerosis was unobvious. Focal segmental glomerulonephritis (FSGS) was seen at the 12th week. The GSI of the model mice was $(2.81 \pm 0.84)\%$, significantly higher than that of the control mice ($(0.33 \pm 0.21)\%$) at 12th

[基金项目] 国家自然科学基金资助青年项目(No. 81100506)和国家自然科学基金资助面上项目(No. 81270802)。

[作者简介] 刘练(1988-), 女, 在读硕士, 研究方向: 小儿肾脏疾病; Email: liulian_8810@163.com

[通讯作者] 张高福, 男, 讲师, 研究方向: 小儿肾脏疾病血脂代谢紊乱的脂质的机制, Email: zhanggaofu19992004@163.com; 李秋, 女, 教授, 研究方向: 小儿肾脏疾病; Email: liqiu809@126.com

week ($P < 0.01$). **Conclusions** A mouse model with adriamycin-induced-nephrosis can be successfully established by a disposable tail vein injection of adriamycin in a dose of 10.5 mg/kg body weight. The early manifestation of this model is MCNS, and at a late stage, it may be changed into FSGS.

【Key words】 Adriamycin nephropathy; Mice; Kidney

阿霉素诱导的肾病模型,被认为能够较好的模拟人类微小病变和局灶性节段性肾小球硬化的肾脏病理改变^[1],长期以来,大部分实验的研究对象以大鼠为主,但对阿霉素肾病小鼠模型报道却较少,并且实验周期较短^[2,3]。本课题组在成功复制幼年大鼠阿霉素肾病模型的实验基础上,拟建立较长实验周期的阿霉素肾病小鼠模型,以期通过对不同时间点模型转变过程的研究获得稳定性好、可重复、与人体疾病契合度高的实验动物模型,为进一步的科学研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 BALB/c 小鼠 48 只,6 周龄,体重 (21.79 ± 1.41) g,由重庆医科大学实验动物中心提供【SCXK(渝)2012-0001】,所有动物均饲养于重庆医科大学儿科研究所动物中心 SPF 环境中【SYXK(渝)2012-0015】,自由饮水进食。

1.2 实验分组及模型建立

将小鼠随机分为对照组与模型组,对照组 24 只,模型组 24 只。固定好小鼠,用 75% 酒精消毒鼠尾皮肤,模型组经尾静脉一次注射阿霉素 (Pharmacia 公司,意大利) 10.5 mg/kg,对照组注射等量的生理盐水。

1.3 标本的收集和检测

1.3.1 24 h 尿液的收集和检测

分别将小鼠置于代谢笼中,禁食不禁水,于实验的第 0、2、4、6、8 和 12 周收集小鼠 24 h 全部尿液,5000 r/min \times 5 min,离心,收集上清、分装, -20°C 保存。

1.3.2 血标本的收集和检测

分别于实验周期的第 4、8、12 周末,处死小鼠。10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 腹腔注射麻醉小鼠后,经眼球静脉采血,全血在室温下自然凝固,待血清析出后,4000 r/min \times 10 min,离心,分离血清,并于 -20°C 保存。全自动生化仪检测血清白蛋白、总胆固醇、低密度脂蛋白、肌酐。

1.3.3 肾组织的收集和检测

获得血标本后,用生理盐水对双侧肾脏进行原位灌洗,直至双肾发白,剥离肾脏包膜,称重。将双肾分别均分为 3 等份,取左肾上下段 1/3,放置于 4% 多聚甲醛中 24 h,经脱水、石蜡包埋后制成肾脏病理标本,用于 HE、PAS 染色;取右肾上段约 1 mm³ 的肾皮质组织,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 2.5% 戊二醛固定 1 h,送重庆医科大学电镜室。

1.3.4 肾小球硬化指数 (glomerulosclerosis index, GSI) 的统计

肾组织石蜡切片,经 HE、PAS 染色,光镜下根据肾小球毛细血管袢塌陷或消失、肾小囊断裂或纤维素样物渗出,半定量评价肾小球硬化程度,GSI 的统计方法^[4]为:肾小球硬化程度根据肾小球硬化灶所占肾小球比例分为 5 个等级,0 级:肾小球基本正常;1 级:肾小球硬化面积 $\leq 25\%$;2 级: $25\% <$ 肾小球硬化面积 $\leq 50\%$;3 级: $50\% <$ 肾小球硬化面积 $\leq 75\%$;4 级:肾小球硬化面积 $> 75\%$ 。根据每张切片肾小球平均硬化面积积分计算出 GSI 表示肾小球硬化程度,公式为 $GSI = [(1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / \text{每张切片肾小球总数}] \times 100\%$ ($N1$ 表示 1 级损害肾小球个数, \dots $N4$ 表示 4 级损害肾小球个数)。每一张切片选取 10 个不重叠高倍视野并拍摄照片,统计分析 10 张照片中肾小球硬化的情况。

1.4 统计学方法

所有数据均用 SPSS 18.0 统计软件包进行统计分析处理。计量资料数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 24 h 尿蛋白检测结果

实验 2 周,模型组 24 h 尿蛋白含量较正常组明显增高,持续至第 12 周,第 8 周时出现高峰 (见表 1)。

2.2 血清生化指标检测结果

与正常组相比,模型组于实验第 4 周出现低蛋白血症,第 8 周出现高脂血症,至 12 周时,血清中肌酐明显高于正常组 (见表 2)。

表 1 不同时期 24 h 尿蛋白水平 ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{mg}/24 \text{ h}$)

Tab. 1 Twenty-four-hour proteinuria levels in different periods

时间(wk.)	0 wk.	2 wk.	4 wk.	6 wk.	8 wk.	12 wk.
对照组 Control	0.50 ± 0.12	0.46 ± 0.22	0.45 ± 0.29	0.67 ± 0.38	0.48 ± 0.24	0.37 ± 0.25
模型组 Model	0.49 ± 0.21 [▲]	1.39 ± 0.89 ^{*▲}	1.52 ± 0.61 ^{*▲}	1.70 ± 0.67 [*]	1.96 ± 0.68 [*]	1.59 ± 0.97 ^{*▲}

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组第 8 周比较, [▲] $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, VS. Control group; [▲] $P < 0.05$, VS. The 8th week of model group.

表 2 不同时期血清生化指标检测 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Serum biochemical indexes in different periods

组别 Group	时间 Week	白蛋白 /g/L Albumin	总胆固醇/mmol/L Total cholesterol	低密度脂蛋白/mmol/L Low-density lipoprotein	肌酐/ $\mu\text{mol/L}$ Creatinine
对照组 Control	4wk	32.87 ± 1.50	2.92 ± 0.38	0.35 ± 0.10	4.33 ± 3.06
	8wk	30.23 ± 0.80	3.22 ± 0.35	0.34 ± 0.05	4.67 ± 0.58
	12wk	29.38 ± 0.72	2.93 ± 0.40	0.34 ± 0.01	5.50 ± 1.29
模型组 Model	4wk	28.01 ± 2.92 [*]	3.01 ± 0.43	0.35 ± 0.09	6.25 ± 3.01
	8wk	26.70 ± 0.81 [*]	4.59 ± 1.14 [*]	0.44 ± 0.05 [*]	5.60 ± 0.89
	12wk	24.81 ± 0.87 [*]	5.17 ± 0.83 [*]	0.49 ± 0.11 [*]	7.71 ± 4.61 [*]

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, vs. control group.

2.3 不同时间点肾脏病理改变

2.3.1 肾脏 HE 染色及 PSA 染色检测结果

对照组小鼠在三个观测时间点 HE 染色及 PAS 染色形态均正常(见图 1. a-c, 图 2. a-c)。模型组小鼠第 4 周时, HE 染色及 PAS 染色可见肾小球血管袢与囊壁有轻度粘连, 肾小球及肾小管形态基本正常; 第 8 周时 HE 染色可见肾小球系膜细胞增生, 系膜区扩大, 肾小管管腔出现大量蛋白管型, 肾间质炎性细胞浸润; 第 12 周时 HE 染色可见部分肾小球萎缩, 部分血管的血管腔缩小或闭塞, 血管袢塌陷, 系膜细胞增生, 系膜区扩大, 肾小管上皮细胞可见空泡样改变, 部分管腔内有蛋白管型, 伴肾间质炎性细胞大量浸润; PAS 染色显示部分肾小球有节段性玻璃样硬化(见图 1. d-f, 图 2. d-f)(图 1、2 见彩插 1)。

2.3.2 肾脏透射电镜检测结果

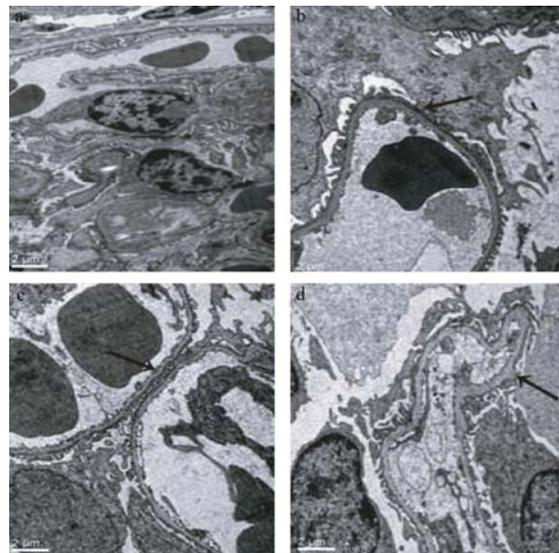
对照组小鼠在三个观测时间点透射结果均无异常。模型组小鼠第 4 周出现足突部分融合, 内皮细胞及基底膜无改变; 第 8 周足突融合较前广泛; 第 12 周时足突广泛融合, 肾小球基底膜局部明显增厚, 系膜细胞增殖(见图 3)。

2.4 肾小球硬化指数(GSI)

模型组第 12 周 GSI 为(2.81 ± 0.84)%, 明显高于同一观测时间点对照组 GSI(0.33 ± 0.21)%, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

阿霉素(adriamycin, ADR)是临床上常用的一种蒽环类广谱抗肿瘤药物, 其建立鼠类肾病模型的主



注: a. 对照组; b. 模型组(4 周); c. 模型组(8 周); d. 模型组(12 周)。

图 3 各期肾脏电镜下改变

Note: a. Control group; b. Model group(4 weeks); c. Model group(8 weeks); d. Model group(12 weeks)

Fig. 3 Morphological change in the renal tissues under transmission electron microscopy

要作用机制包括三个方面: ①通过细胞毒作用, 直接损伤肾细胞, 在 DNA 水平干预足细胞蛋白的合成, 造成足细胞的形态改变^[5]; ②在肾脏内的代谢产物与氧反应产生活性氧, 诱发肾小球上皮细胞的脂质过氧化, 导致滤过膜的结构和功能破坏^[6]; ③嵌入 DNA 而抑制 RNA 的合成, 造成肾脏近曲小管上皮细胞含有 DNA、RNA 的细胞器损伤^[7]。

根据国外阿霉素肾病大鼠模型的实验报道^[1,8],

在预实验中,我们设计给予 BALB/c 小鼠 9.0、10、10.5、11、11.5、12 mg/kg 共 6 个阿霉素注射剂量,每个剂量组 6 只小鼠,实验周期 12 周,重点观察小鼠的死亡情况和肾脏病理改变,以期获得最适合的建立 BALB/c 小鼠肾病模型的剂量。我们发现 11 mg/kg 组、11.5 mg/kg 组、12 mg/kg 组实验至第 12 周均出现部分死亡,死亡率分别为 16.7%、33.3% 和 66.7%。而 9.0 mg/kg 组、10 mg/kg 组、10.5 mg/kg 组实验至第 12 周均未出现死亡,但电镜扫描显示 9.0 mg/kg 组和 10 mg/kg 组实验至第 8 周,肾脏足细胞足突仅有轻微融合;而 10.5 mg/kg 组实验至第 4 周时发现小鼠肾脏在光镜下无明显病理改变,电镜可见足突部分融合,符合人类微小病变型肾病的病理改变,第 8 周时光镜下可见系膜细胞及基质增生,电镜显示足突广泛融合,但肾小球硬化不明显;第 12 周时光镜可见肾小球局灶节段性硬化,伴肾小管空泡样变、炎症细胞浸润、肾间质损害,电镜发现足突广泛融合、肾小球基底膜局部增厚、系膜细胞增殖,这些改变均符合人类局灶性节段性肾小球硬化的病理特点。故本实验发现给予 BALB/c 小鼠注射 10.5 mg/kg 的阿霉素能较好模拟人类微小病变型肾病综合征和局灶性节段性肾小球硬化的病理改变。

儿童肾病综合征以微小病变型最常见^[9],大部分对激素敏感,部分对激素治疗依赖或者抵抗的患儿,5~10 年可转变为局灶性节段性肾小球硬化^[10],转变周期较成人长。在既往的实验中发现肾病大鼠发生硬化时间较早,6~8 周即出现了肾小球硬化^[11],而本实验中模型组小鼠在实验 12 周时才发生局灶性节段性肾小球硬化,说明肾病小鼠发生硬化的时间比大鼠长,这提示小鼠肾病模型可能比大鼠更适合用于模拟儿童肾病综合征的发展过程。

作为一种常用的模拟人类微小病变肾病的经典动物模型,阿霉素肾病既往的动物选择主要是对阿霉素高度敏感的 Wistar 大鼠、SD 大鼠,其模型特征迅速、持久、稳定^[12]。但近年来研究发现,一些原发性肾病综合征的发病与足细胞相关蛋白编码的 NPIS1、NPIS2、WT1 等基因突变有密切关系^[13],所以基因检测将成为研究肾病发病机制、判断预后的主要手段。由于小鼠有 99% 的基因跟人类相同,所有的器官和系统均跟人类相似,所以不论是从遗传学,还是病理生理学来看,小鼠和人类都具有高度同源性,并且小鼠模型在基因敲出、基因转染等技术开展方面已经比较成熟^[14]。综上所述,无论是从作用时间、实验技术,

建立阿霉素小鼠肾病模型,对进一步开展肾病发生发展机制的研究都有十分重要的意义^[15]。

(本文图 1、2 见彩插 1 及封面)。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Watanabe Y, Itoh Y, Yoshida F, et al. Unique glomerular lesion with spontaneous lipid deposition in glomerular capillary lumina in the NON strain of mice [J]. *Nephron.* 1991, 58(2):210-218.
- [3] Chen A, Sheu LF, Ho YS, et al. Experimental focal segmental glomerulosclerosis in mice [J]. *Nephron.* 1998, 78(4):440-452.
- [4] Rodríguez-Iturbe B, Quiroz Y, Shahkarami A. Mycophenolate mofetil ameliorates nephropathy in the obese Zucker rat [J]. *Kidney Int.* 2005, 68(3):1041-1047.
- [5] 杨维娜,于琳华,钱亦华,等. 阿霉素肾病大鼠模型动态变化及其足细胞数量和 nephrin 的表达变化 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*. 2009, 30(5):512-516.
- [6] 张勇,张蓓,宁华英,等. 单次尾静脉注射法阿霉素大鼠肾病模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*. 2013, 21(1):1-4.
- [7] 孙艳萍,陈金,陈贤钧,等. 丹参对大鼠肾脏近曲小管超微结构保护机制的研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*. 2003, 4(3):145-147.
- [8] Simic I, Mansoureh Tabatabaieifar M, Schaefer F. Animal models of nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Nephrol* 2013, 8:2079-2088
- [9] Hu P, Qin YH, Lu L, et al. Genetic variation of apolipoprotein E does not contribute to the lipid abnormalities secondary to childhood minimal change nephrotic syndrome [J]. *Int Urol Nephrol.* 2010, 42(2):453-460.
- [10] L Cagnoli. Instructions and implementations for percutaneous renal biopsy. Guidelines for the therapy of glomerular nephropathies [J]. *Italian Soc Nephrology.* 2003, 20(24):S3-47.
- [11] 张伟,张高福,李秋,等. 幼年大鼠阿霉素肾病模型的复制 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*. 2012, 13(12):1068-1070.
- [12] 支勇,曹式丽. 阿霉素肾病动物模型的国外研究进展 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*. 2008, 9(10):933-935
- [13] 王晶晶,付荣,叶礼燕,等. 汉族慢性肾衰竭儿童 6 例 NPIS2 和 WT1 基因遗传学变异 [J]. *实用儿科临床杂志*. 2009(5):351-354.
- [14] 林兆宇,高翔,等. 小鼠的遗传学研究 [J]. *生命科学*. 2006(5):437-441.
- [15] Lee VWS, Harris DCH. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Nephrology.* 2011, 16(1):30-38.

[收稿日期] 2013-10-14