论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1844-04

ApoE$^{-/-}$小鼠肾动脉狭窄及肾损害特点观察

黄朝晖,吴雄飞,赵洪雯,刘 宏,王汉民 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

提 要:目的 建立动脉粥样硬化性肾动脉狭窄(atherosclerotic renal artery stenosis, ARAS)小鼠动物模型,并观察其肾损害特点。**方法** 取载脂蛋白E基因缺陷(ApoE$^{-/-}$)小鼠(25~51周龄)的肾动脉和肾脏,动态观察肾动脉病变进展各阶段相应的肾脏病变。根据ARAS程度分3组(A组:<50%;B组:50%~70%;C组:>70%)。A组又根据斑块是否破裂分为A_1(未破裂)和A_2(破裂)亚组。**结果** 建立了ARAS小鼠动物模型。肾动脉和肾脏的变化是:①A_1组未发现其下游肾脏病理改变;②A_2组其下游肾内肾小管周围毛细血管减少,肾小管上皮细胞肿胀,电镜下可见细胞内线粒体肿胀;③B组和C组已发生斑块破裂,其肾内肾小管周围毛细血管减少明显,与A_2组比较,差异显著($P<0.01$);肾小管上皮细胞肿胀、脱落、坏死;肾小管间质病变严重。**结论** ApoE$^{-/-}$小鼠建立的ARAS模型易行、稳定、重复性好。

关键词: 动脉粥样硬化;肾动脉狭窄;肾脏病理;ApoE$^{-/-}$小鼠

中图法分类号: R322.61; R543.5; R692.160.2 **文献标识码:** A

Atherosclerotic renal artery stenosis and renal injury in apolipoprotein E knockout mouse

HUANG Zhao-hui, WU Xiong-fei, ZHAO Hong-wen, LIU Hong, WANG Han-min (Department of Kidneys, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a practical, stable and reliable animal model of atherosclerotic renal artery stenosis (ARAS) in apolipoprotein E knockout (ApoE$^{-/-}$) mouse and investigate the development of renal injury. **Methods** After the ApoE$^{-/-}$ mouse models aged 25-51 weeks were respectively sacrificed, the renal arteries and the kidneys were obtained. The stenosis degree was measured by elastic fibers straining and analyzed by a software system. According to the stenosis degree, the renal arteries were divided into 3 groups (A: <50%; B: 50%-70%; C: >70%), and group A was divided into 2 subgroups (A_1: stable, A_2: unstable) depending on whether the atherosclerotic plaque is ruptured or not. **Results** The mouse model of ARAS was established successfully. Renal pathological changes were not found in group A_1. Obvious tubulointerstitial injury was noted in group A_2, such as decreased peritubular capillaries (PTC), the broken and disordered cristae arrangement and swollen mitochondia in renal tubular epithelial cells. The atherosclerotic plaque was ruptured in groups B and C, and greater tubulointerstitial injury was noted with markedly decreased PTC density than group A_2 ($P<0.01$). **Conclusion** The ARAS model we established is steady, credible, and easily repeated.

Key words: atherosclerotic stenosis; renal artery stenosis; renal pathology; apolipoprotein E Knockout mice

1992年美国Jackson实验室载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因缺陷小鼠问世,成为研究动脉粥样硬化(artherosclerosis, AS)较好的动物模型[1]。目前国内鲜见建立肾动脉粥样硬化模型的报道。根据文献[2]报道7.5月龄的ApoE$^{-/-}$小鼠已存在颈动脉、肠系膜上动脉及肾动脉粥样硬化斑块,我们选择了ApoE$^{-/-}$小鼠作为研究对象,动态观察肾动脉粥样硬化病变进程各时段相应肾脏的病理变化,目的是建立简便、可靠、明确的肾动脉狭窄模型,为探讨肾动脉粥样硬化病变和其下游肾损害机制及预防方法提供平台。

1 材料与方法

1.1 实验动物制备及取材

选取:①雄性、8周龄、SPF级、C57BL/6J-ApoE基因缺陷小鼠89只,购于北京大学医学部实验动物科学部;②雄性、8周龄、清洁级、野生型C57BL/6J小鼠42只做对照,购于第三军医大学实验动物中心。饲养于层流房内,自由饮水,喂以普通小鼠饲料。于20~25周龄,每周按体质量完全随机选取C57BL/6J-ApoE基因缺陷小鼠1只处死,行肾动脉病理检查。从25周

作者简介:黄朝晖(1968-),女,贵州省贵阳市人,博士研究生,副主任医师,主要从事肾脏病方面的研究,现在贵阳市第一人民医院肾科。电话:13885122163, E-mail: gzshzh123@yahoo.com.cn

通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188, E-mail: Wuxfei@126.com

收稿日期:2007-07-05;修回日期:2007-09-03

龄出现肾动脉内膜增生开始，每 2 周处死 ApoE 基因缺陷小鼠 6 只和野生型 C57BL/6J 小鼠 6 只至 51 周龄，动态观察肾动脉及肾脏的病理改变。

1.2　肾动脉染色及观察

1.2.1　切片与染色　　肾动脉常规固定、脱水、透明、石蜡包埋及连续切片，从肾动脉于腹主动脉开口处连续切至肾门，每个肾动脉大约可获得 1 200 张切片，每张切片厚 4 μm，弹力纤维行 VG 染色；另取部分肾动脉于 2.5% 戊二醛固定送检，用透射电镜（Philips TECNAI10 荷兰，工作电压 80 kV）观察超微结构。

1.2.2　组织形态测量　　VG 染色切片用于肾动脉的组织形态测量，通过 Image Pro-Plus 图像分析系统（Media Chernetics Inc. USA），分别测量出动脉内外弹性膜周长、内腔面周长、以及粥样斑块周长。根据其测量结果，分别计算出：血管截面积、血管中膜面积、血管内膜面积及内膜粥样斑块面积。正常血管内膜由单层内皮细胞及其下的内弹性膜构成。以内弹性膜周长构成的面积为正常血管内腔面积，计算肾动脉的狭窄程度。

1.2.3　分组　　根据其狭窄程度将其分为 3 组（A 组：< 50%；B 组：50% ~ 70%；C 组：> 70%）。A 组中又根据斑块是否破裂分为 A_1（未破裂）和 A_2（破裂）亚组。

1.3　肾脏病理检查

1.3.1　光镜检查　　肾脏组织经固定、脱水、石蜡包埋，3 μm 切片，常规 HE、Masson 和 PAS 染色并观察。肾小管间质损伤（TI）定义为肾小管扩张和（或）萎缩、炎症细胞浸润、皮质区肾间质纤维化。采用盲法半定量评估肾小管间质损伤程度，每张切片至少观察 40 个皮质区视野（×100），根据上述判断将肾小管间质损伤程度分为 6 级[3]：0 级：正常；1 级：病变范围 < 10%；2 级：病变范围 10% ~ 25%；3 级：病变范围 26% ~ 50%；4 级：病变范围 51% ~ 75%；5 级：病变范围 > 75%。

1.3.2　电镜检查　　取材时，分别取各组肾组织于 2.5% 戊二醛固定送检，用透射电镜观察超微结构。

1.4　肾组织第Ⅷ因子相关抗原［Ⅷ-Ag，vWF（von Willebrand factor）］抗体免疫组化检测

3 μm 石蜡切片脱蜡至水，3% H_2O_2 作用 10 min，胃酶消化 7 min，小牛血清白蛋白封闭 20 min，加入一抗（山羊抗小鼠Ⅷ-Ag，购于 Santa Cruz 公司）4 ℃过夜，抗山羊 IgG 抗体-HRP 多聚体（购于北京中杉金桥生物公司）室温 30 min，DAB 显色，苏木精复染，过梯度酒精，二甲苯透明，中性树脂封片。以 PBS 和正常非免疫兔血清代替一抗作阴性对照。实验结果采用盲法评价：每张切片选 40 个肾皮质高倍视野（×400，0.065 mm^2），计数肾间质内Ⅷ-Ag（vWF）阳性的毛细血管腔个数，计算肾小管周围毛细血管（peritubular capillary，PTC）密度（Ⅷ-Ag 阳性的毛细血管腔个数/mm^2）；每张切片计数 25 ~ 30 个肾小球横切面上Ⅷ-Ag 阳性的毛细血管腔个数，取平均值，计算肾小球毛细血管密度（Ⅷ-Ag 阳性的毛细血管腔个数/肾小球横切面），即 GC 密度。

1.5　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计，组间比较均用单因素方差分析，非参数相关分析用 Spearman 等级相关检验。

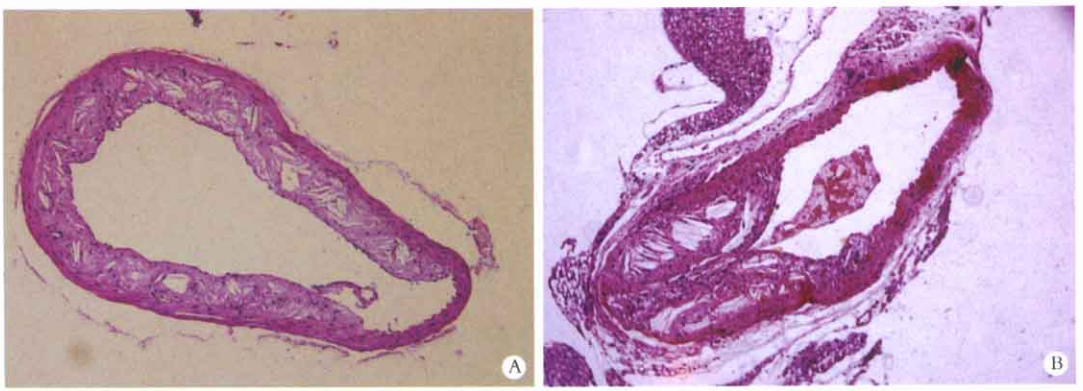
2　结果

2.1　ARAS 狭窄程度与 ARAS 斑块破裂的关系

ApoE$^{-/-}$小鼠：25 周肾动脉内膜增生、血管腔变窄；30 周有肾动脉斑块形成（4/12）；32 周有斑块破裂（2/12）。A 组中：A_1 亚组肾动脉狭窄程度（35.22% ±8.79%），A_2 亚组肾动脉狭窄程度（38.56% ±5.25%），两亚组差异不显著（$P > 0.05$）。B 组（狭窄 50% ~ 70%）和 C 组（狭窄 > 70%）均发生斑块破裂。可见，ApoE$^{-/-}$小鼠发生 ARAS 后，当肾动脉狭窄 < 50% 时，其狭窄程度与斑块是否破裂无明显关系；但肾动脉狭窄 > 50% 时，即斑块长大到一定程度时就有斑块破裂发生。

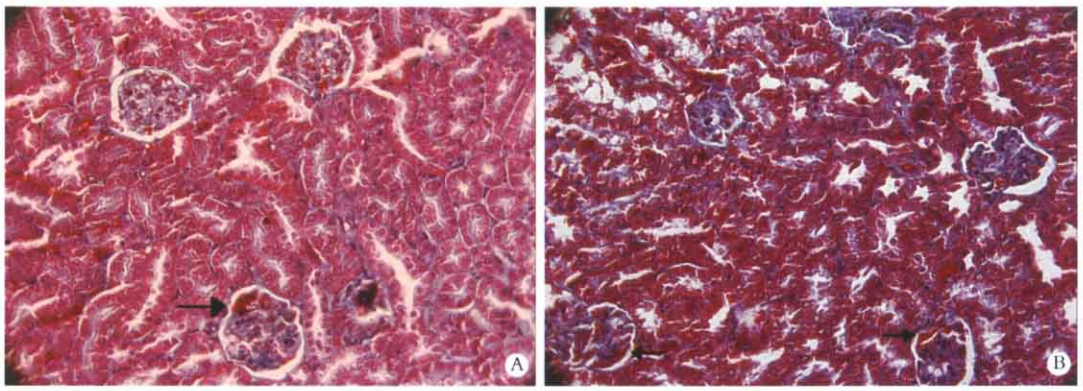
2.2　ARAS 斑块破裂与肾内变化

对照组和 A_1 组肾小球、肾小管及间质无明显改变，肾小管周围毛细血管排列分布及形态均正常。从 A_2 亚组即斑块破裂出现开始，①病变呈进行性，肾小球内基质逐渐增加、系膜区细胞增多，内皮细胞肿胀，上皮细胞变性；肾小管扩张或萎缩，肾间质增宽、呈纤维化。②从 A_2 亚组开始肾小管间质损伤（TI）明显：肾小管周围毛细血管腔缩小、变形、内皮细胞肿胀变形，微血栓堵塞管腔，PTC 密度明显减少（A_1 亚组、A_2 亚组、B 组和 C 组组间两两比较，$P < 0.01$）；而且 PTC 丢失主要集中于肾小管间质损伤、炎症细胞浸润及肾间质纤维化部位（图 1 ~ 4）。③就肾动脉狭窄 < 50% 的 A_1 亚组与 A_2 亚组 PTC 密度比较（$P < 0.01$），即 A_2 亚组间肾小管周围毛细血管密度显著少于 A_1 亚组；同时在 A_1 亚组尚未见明显肾小管间质损伤，而 A_2 亚组已存在肾小管间质损伤，其 TI 为（2.88 ± 1.74）（表 1），提示在肾动脉狭窄 < 50% 时，斑块是否破裂可能是肾损害与否的重要因素之一。



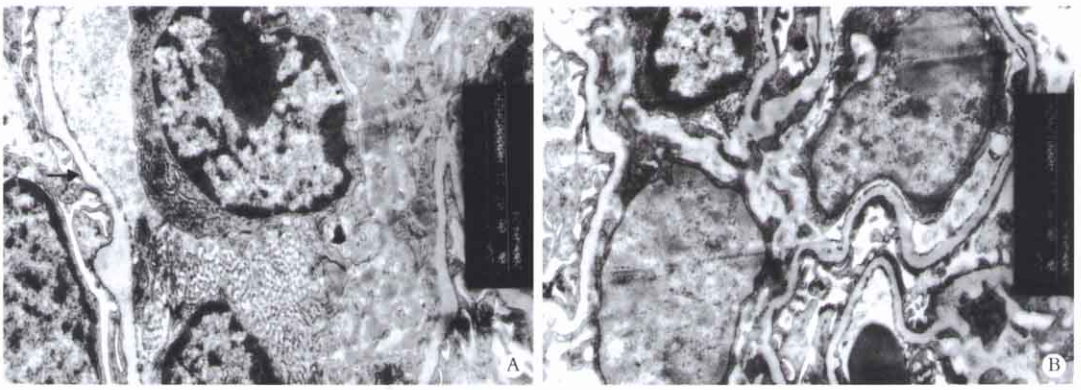
A：A_2 亚组　肾动脉狭窄 < 50%；B：B 组　肾动脉狭窄 50% ~ 70%

图 1　肾动脉狭窄 VG 染色　（×100）



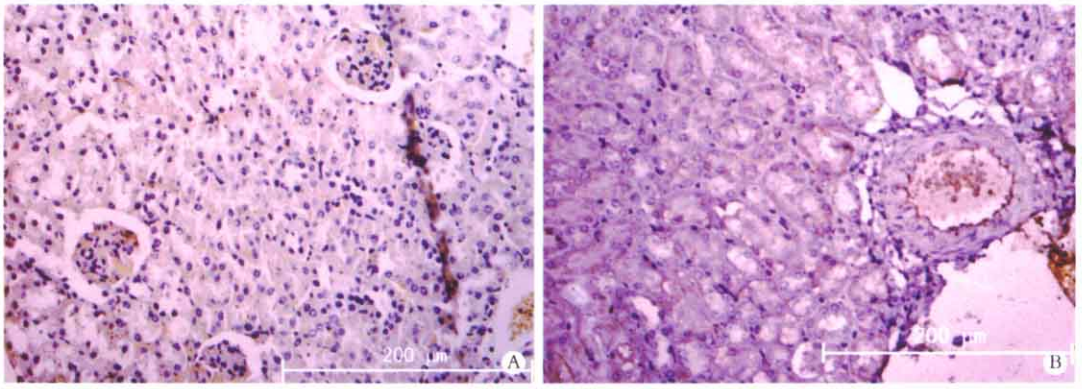
A：A_2 亚组；B：B 组 →：微血栓

图 2 肾脏病理 MASSON 三色观察 （×400）



A：A_2 亚组 肾小管周围毛细血管腔变窄→闭锁，内皮细胞肿胀、细胞质空泡，基底膜有皱缩及增厚；B：B 组 肾小管上皮细胞线粒体肿胀明显、空泡化

图 3 肾小管超微结构观察 （TEM ×7 000）



A：A_2 亚组；B：B 组

图 4 肾脏 vWF 的免疫组化检测 （S-P ×400）

表 1 各组 PTC 密度、GC 密度和 TI 改变（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	PTC 密度	GC 密度	TI
对照组	23	776.24 ± 72.37	51.65 ± 7.07	0
A_1 亚组	21	758.37 ± 60.92	49.44 ± 7.12	0
A_2 亚组	15	612.43 ± 68.35^{abc}	30.86 ± 5.33^{abd}	2.88 ± 1.74^{bc}
B 组	27	565.12 ± 80.43^{ab}	25.48 ± 6.95^{ab}	3.43 ± 1.51^{b}
C 组	21	372.69 ± 50.54^{abc}	23.49 ± 5.01^{ab}	3.84 ± 1.25^{bd}

对照组肾动脉未发生病变，为便于统计资料，按体质量完全随机选择 23 只野生型 C57BL/6J 小鼠入组 a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 A_1 亚组比较；c：$P<0.01$，d：$P<0.05$，与 B 组比较

2.3 斑块破裂后，肾动脉狭窄程度与 PTC 密度、TI 程度的相关性

斑块破裂后，肾动脉狭窄程度与 PTC 密度、TI 程度明显相关（$r=-0.71$，$r=0.75$，$P<0.05$），PTC 密度与 TI 程度明显负相关（$r=-0.92$，$P<0.01$）。

3 讨论

$ApoE^{-/-}$ 小鼠是公认的研究 AS 的动物模型[1]。国内外已有关于使用 $ApoE^{-/-}$ 小鼠建立冠状动脉、颈

动脉、腹主动脉及四肢大动脉粥样硬化模型的报道[2,4,5]。因此用于建立肾动脉粥样硬化模型，理论上是易行、可靠的。在我们的实验中，①建模需时较长，约 1 年，与人类 ARAS 发生是一个慢性进展过程相符合[6]，相对较长的建模时间演示了 ARAS 的演变过程，其肾动脉和肾脏病理改变与人类动脉粥样硬化性肾动脉狭窄病变可损及肾脏是相似的；②将高脂饮食改为普食喂养模型，其目的就是在更接近自然的情况下去研究 ARAS；③在漫长的建模过程中小鼠死亡发生率高。不过总的说来，该模型仍然是较易行、稳定、重复性好的。尤其在研究 ARAS 的病因、病理、发病机制等方面是可行的。

从 ApoE$^{-/-}$小鼠模型观察到：ARAS 是一个进展性疾病，在斑块造成肾动脉狭窄 <50% 前，只要有斑块的破裂，肾脏病理损害就会出现，而且一旦斑块破裂，就进行性长大，所以模型中当狭窄 >50% 时，其最终结果就是导致肾小管、间质不可逆的严重毁损。换言之，随着 ARAS 斑块破裂的发生和加重，其下游肾脏也出现相应的进展性损害。鉴于 ARAS 的发生不仅仅只是肾动脉的损害，而是与其下游肾脏病损密切相关的。因此，我们提出：在探讨 ARAS 的发病机制及治疗上，可考虑通过肾脏病变来推断 ARAS 的进展情况，以指导治疗。正如王海燕[7]指出：当肾脏呈硬化-纤维化病变时，介入治疗的效果也是不容乐观的。我们在治疗 ARAS 时应着眼肾脏和全身情况，而不是仅限于血管。这也是我们的实验所见：在肾动脉狭窄 <50% 时，其狭窄程度与斑块破裂无相关性，也就是说，仅凭狭窄程度不能准确预示 ARAS 的严重性。

参考文献：

[1] Ohashi R, Mu H, Yao Q, *et al*. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models[J]. Trends Cardiovasc Med, 2004, 14(5): 187 - 190.

[2] Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara A K, *et al*. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(11): 2762 - 2768.

[3] Kang D H, Joly A H, Oh S W, *et al*. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: Ⅰ. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(7): 1434 - 1447.

[4] Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis[J]. J Physiol Pharmacol, 2004, 55 (3): 503 - 517.

[5] Chen J, Tung C H, Mahmood U, *et al*. *In vivo* imaging of proteolytic activity in atherosclerosis[J]. Circulation, 2002, 105 (23): 2766 - 2771.

[6] Wilson D B, Mostafavi K, Craven T E, *et al*. Clinical course of mesenteric artery stenosis in elderly Americans[J]. Arch Intern Med, 2006, 166(19): 2095 - 2100.

[7] 王海燕. 动脉粥样硬化性肾动脉狭窄——呼唤跨学科的研讨与合作[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(11): 801 - 802.

（编辑　汪勤俭）

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于 1984-02-27 公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27 国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准，全国必须统一采用计量单位。

我国的法定计量单位包括：①国际单位制的基本单位，如长度（m）、质量（kg）、时间（s）等；②国际单位制的辅助单位；③国际单位制中具有专门名称的导出单位，如频率（Hz）、压力（Pa）、能量（J）；④国家选定的非国际单位制单位，如时间（min、h、d）、转速（r/min）；⑤由以上单位构成的组合形式单位，如速度（m/s）、浓度（mol/L）；⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位，如 μm、kPa、ml 等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和封面读物中可使用中文名称或中文符号外，均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母，无复数形式，符号后不附加圆点（正常语法各字尾标点符号除外）。来源于人名的单位，例如：Pa、Gy、W 等和 10^6 以上的词头，例如：M、G、T 等的首字母大写以外均为小写，容积"升"的符号可用大写（L）也可用小写（l），一般在单独使用于加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与加等的其他符号（例如：化学元素符号）之间应留半个阿拉伯数字空隙，词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用，也不能重叠使用（例如："nμm"应为"nm"）。

本刊编辑部