论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1862-04

尿毒症加速性动脉粥样硬化模型的建立和评价

余 洁[1],赵景宏[2],邓梦扬[1],黄 岚[1] (第三军医大学新桥医院:[1]全军心血管病研究所,[2]全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探索短时间内建立尿毒症加速性动脉粥样硬化动物模型的方法,并评价其相关指标。**方法** 6周龄雄性apoE$^{-/-}$小鼠70只,分为模型组和假手术组,每组35只;另35只6周龄雄性C57小鼠作为对照组,均饲以高脂饲料。模型组、C57组小鼠行肾大部损毁术,建立尿毒症加速性动脉粥样硬化动物模型,假手术组施行假手术。分别于右肾皮质电烙术后0、2、4、6周和8周末,检测血尿素(Urea)、总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)水平。同时取小鼠主动脉弓部进行病理检测;测定粥样硬化斑块面积及斑块面积分数。**结果** 肾大部损毁术后6周,模型组尿素、TC、TG水平较假手术组分别增高188.3%、40.8%、29.8%($P<0.01$),且主动脉粥样斑块面积较对照组增大了1.3倍($P<0.05$),斑块面积分数显著增高($P<0.01$)。**结论** 尿毒症可显著加速动脉粥样硬化进程,利用apoE$^{-/-}$小鼠行肾脏大部损毁术可以建立尿毒症加速性动脉粥样硬化动物模型。

关键词: 尿毒症加速性动脉粥样硬化;apoE$^{-/-}$小鼠;肾大部损毁术
中图法分类号: R-332; R543.506; R692.5 **文献标识码:** A

Establishment and evaluation of uremic atherosclerosis models in ApoE$^{-/-}$ mice

YU Jie[1], ZHAO Jing-hong[2], DENG Meng-yang[1], HUANG Lan[1] ([1]Institute of Cardiovascular Diseases, [2]Renal Diseases Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish uremic atherosclerosis models in apoE$^{-/-}$ mice and evaluate its feasibility. **Methods** Totally 70 6-week-old male apoE$^{-/-}$ mice were randomized into 2 groups, uremic group ($n=35$) and nonuremic control group ($n=35$). All mice were fed with a Western diet. Uremic group mice underwent partial kidney ablation with electrocoagulation of right renal cortex followed by left total nephrectomy in 2 weeks later and control animals underwent sham operation. Serum levels of urea, total cholesterol and triglycerides were assessed at 0, 2, 4, 6 and 8 weeks after the first surgery. The cross-section surface area of the lesion and the lesion area fraction were assessed. **Results** At 6 weeks after nephrectomy, the level of serum urea in chronic renal failure (CRF) mice was 188.3% higher than that of control mice, and total cholesterol and triglyceride concentrations were increased by 40.8% and 29.8% than those of nonuremic controls, respectively ($P<0.01$). Aortic plaque area of CRF groups was increased 1.3-fold compared with nonuremic controls ($P<0.05$). Moreover, the lesion area fraction of uremic apoE$^{-/-}$ mice was markedly increased when compared with controls ($P<0.01$). **Conclusion** These findings demonstrate that CRF aggravates atherosclerosis and the uremic atherosclerosis models can be established with partial kidney ablation on apoE$^{-/-}$ mice. We anticipate that this experimental model will be useful to test treatment strategies aimed at decreasing the disease.

Key words: uremic atherosclerosis; apoE$^{-/-}$ mice; partial kidney ablation

心血管并发症是尿毒症患者最主要的死亡原因,而尿毒症加速性动脉粥样硬化是多种心血管并发症的重要病理基础[1,2]。目前国内尚少建立尿毒症加速性动脉粥样硬化稳定、经典的实验动物模型,限制了此类合并症基础研究的开展。载脂蛋白E(apolipoprotein E,apoE)基因敲除鼠是目前研究动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)最稳定的动物模型,在高脂饮食条件下

基金项目:国家自然科学基金(30700316);重庆市自然科学基金(2007BB5024)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700316) and the Natural Science Foundation of of Chongqing (2007BB5024)
作者简介:余 洁,女,重庆市人,博士研究生,主要从事动脉粥样硬化性心脏病的防治方面的研究。电话:(023)68774601,E-mail:simpls@163.com
通信作者:黄 岚,电话:(023)68774601
收稿日期:2009-04-26;修回日期:2009-05-31

形成动脉粥样硬化斑块的时间可大大缩短[3]。本研究拟在参考文献[4]报道的基础上进行一定改进,利用 apoE$^{-/-}$小鼠制备尿毒症加速性动脉粥样硬化动物模型,并通过一些典型的生化指标及病理指标进行评价,为此类合并症的防治研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物及材料

6 周龄雄性 apoE$^{-/-}$小鼠 70 只,体质量 19 ~ 20 g,由北京大学医学部动物中心提供,合格证号为 SCXK(京)2008 - 0001;6 周龄雄性 C57 小鼠,35 只,由第三军医大学实验动物中心提供。胆固醇干粉(成都市科龙化工试剂厂),胆酸(BBI),猪化油(第三军医大学实验动物中心提供)。高频电离子手术治疗仪,由成都维信电子科大新技术有限公司生产。

1.2　模型制作

所有小鼠造模前基础饲料适应性喂养 1 周,在稳定其代谢状况后,分为 C57 组、apoE$^{-/-}$假手术组和 apoE$^{-/-}$模型组,每组 35 只,均予以高脂饮食喂养:常规小鼠饲料 + 15 % 脂肪(猪化油) + 1 % 胆固醇 + 0.35 % 胆酸。C57 组和 apoE$^{-/-}$模型组作为手术组按以下步骤,依据肾大部损毁术制备尿毒症动物模型[4]:用 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠后,利用高频电离子刀行右肾皮质电烙术(electrocoagulation of right renal cortex,EC):小鼠背侧右下腹肾区,侧切 2 cm 切口暴露整个右肾;术中以高频电刀轻触整个右肾皮质,避免出血,肾皮质呈焦灼状态后将其消毒归位;手术区域严格消毒后逐层缝合。2 周后再次行左肾全切术(left total nephrectomy,Nx),术后青霉素抗感染 3 d。假手术组 2 次手术仅暴露双肾,不做手术切除。

1.3　生化指标检测

分别在右肾皮质电烙(EC)术后 0、2、4、6、8 周,各组术后存活小鼠均摘眼球取血,分离血浆;分别测定血尿素(Urea)和血脂(TC、TG)水平。每个时相点,选取尿素水平接近的 5 只小鼠数据,进行统计学分析。

1.4　标本取材及制备

取血后,3 组小鼠均分离主动脉:将主动脉从根部至髂动脉分叉处离断取出。在所有小鼠自主动脉根部近心端 10 mm 切下,去除外膜后以 4% 多聚甲醛固定,然后中性福尔马林再固定制备石蜡切片。对石蜡切片行 HE 染色,观察各组主动脉横断面粥样斑块形成情况。

1.5　HE 染色及图像的采集分析

横切面的小鼠主动脉标本,常规 HE 染色,观察不同切面的斑块形成情况。取主动脉根部标本 600 μm^2,间隔 4 μm 进行石蜡连续切片 30 张,每间隔 10 张取 1 张行 HE 染色,每张切片 2 个组织面。显微镜下观察 HE 染色切片,100 倍镜下实域分割。

分离剩余主动脉,去除外膜和结缔组织;纵向剖开后内膜面向上固定于操作台,以连接有解剖显微镜的数码相机拍摄内膜照片。Image Pro Plus 6.0 图像分析软件(Cyber Media,美国)测量模块,分析得到主动脉内膜面 AS 斑块损伤面积和内膜总面积,计算其比值(斑块面积分数)并计数,取平均值后进行统计分析。200 倍镜下观察斑块组织学特点。

1.6　统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,方差分析比较总体差异。

2　结果

2.1　肾大部损毁术后观察

apoE$^{-/-}$小鼠 EC 术后 30 min 及 6 h 内分别有 2 只小鼠死亡;至 Nx 术完成,apoE$^{-/-}$小鼠平均存活率达到了 78.8%。死亡小鼠经剖腹探查发现,残余肾组织与周围有粘连及炎症表现。

2.2　血清学指标变化

检测结果表明,术前 3 组间尿素和血脂水平无差异。高脂喂养后,C57 组小鼠血脂水平较术前无显著差异;apoE$^{-/-}$2 组小鼠血清 TC、TG 水平都随时相点延长而逐渐增加。EC 术后 2 周,C57 组及 apoE$^{-/-}$模型组血清尿素水平高于正常,且较术前明显增高($P < 0.01$),假手术组无明显变化(表 1)。Nx 术后 2、4、6 周,模型组血 TC、TG 以及尿素水平较假手术组都显著增高($P < 0.01$)。至术后 6 周达高峰,模型组尿素、TC、TG 水平较假手术组分别增高了 188.3%、40.8%、29.8%($P < 0.01$,表 1)。

2.3　动脉粥样硬化斑块分析

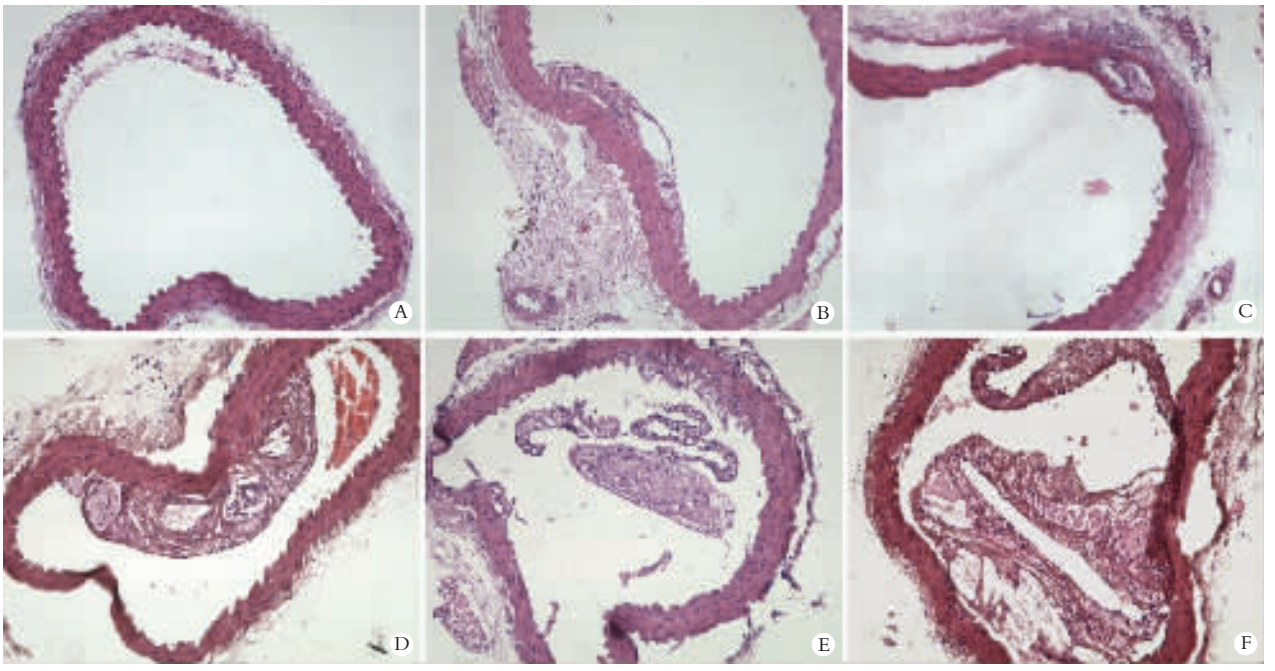
2.3.1　斑块病理学观察　　主动脉 HE 染色显示,C57 组术后 2、4、6 周均未发现明显的动脉粥样斑块形成,故未再行斑块面积测定等后续试验。EC 术后 2 周,apoE$^{-/-}$模型组和假手术组小鼠主动脉窦内均未观察到明显 AS 斑块形成。Nx 术后 2 周,假手术组小鼠主动脉窦内未观察到明显 AS 斑块,而模型组可见血管内膜增厚,和中膜间隙明显增宽;有纤维帽形成。与假手术组相比,Nx 术后 4 周和 6 周,模型组小鼠动脉粥样硬化斑块面积明显增大(图 1)。

2.3.2　斑块形态学分析　　术后 6 周,模型组粥样硬化斑块面积较价手术组增大了 1.3 倍($P < 0.05$);斑块面积分数较假手术组显著增高[(0.27 ± 0.02) *vs* (0.08 ± 0.01),$P < 0.01$],动脉粥样硬化病变更加严重。

表 1　3 组小鼠术后不同时间血清生化指标的比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	尿素	总胆固醇	甘油三酯
C57 组			
EC	5.95 ± 0.17	3.24 ± 0.11	0.74 ± 0.07
Nx	6.32 ± 0.14	2.87 ± 0.09	0.83 ± 0.10
2 周	20.19 ± 1.32	3.41 ± 0.15	0.91 ± 0.08
4 周	21.29 ± 1.61	3.22 ± 0.11	0.89 ± 0.13
6 周	19.47 ± 1.45	2.90 ± 0.23	0.78 ± 0.10
假手术组			
EC	6.31 ± 0.21[a]	9.82 ± 0.59[a]	1.87 ± 0.12[a]
Nx	6.77 ± 0.19[a]	14.64 ± 0.83[a]	2.02 ± 0.35[a]
2 周	8.37 ± 0.33[a]	16.36 ± 2.21[a]	3.04 ± 0.27[a]
4 周	8.29 ± 0.72[a]	20.29 ± 1.66[a]	3.78 ± 0.41[a]
6 周	9.45 ± 0.55[a]	19.93 ± 1.87[a]	3.62 ± 0.48[a]
模型组			
EC	6.74 ± 0.32	8.74 ± 0.26	1.84 ± 0.52
Nx	10.68 ± 0.79[b]	17.11 ± 1.28[b]	2.87 ± 0.46[b]
2 周	25.31 ± 1.24[b]	20.25 ± 1.49[b]	3.74 ± 0.58[b]
4 周	28.11 ± 2.20[b]	30.72 ± 2.03[b]	4.85 ± 0.73[b]
6 周	27.25 ± 1.38[b]	28.06 ± 1.78[b]	4.74 ± 0.39[b]

a:$P < 0.01$,与 C57 组比较;b:$P < 0.01$,与假手术组比较



A:假手术组术后2周;B:模型组术后2周;C:假手术组术后4周;D:模型组术后4周;E:假手术组术后6周;F:模型组术后6周

图1 apoE$^{-/-}$2组小鼠Nx术后主动脉横断面粥样斑块形成情况 (HE×200)

3 讨论

肾功能衰减是心血管疾病的独立危险因素[5],成功建立尿毒症加速性动脉粥样硬化动物模型,是进一步研究慢性肾功能衰竭(chronic renal failure,CRF)过程中动脉粥样硬化发生机制的基础。

应用胚胎干细胞基因敲除技术培育成功的apoE$^{-/-}$小鼠[6],由于在普通饮食条件下即可自发生成AS,是国际上公认的最经典、最稳定的动脉粥样硬化动物模型。前期的相关研究显示[3,7],高脂饲养可以加速此类小鼠血管AS改变,且斑块的分布与人类动脉粥样硬化斑块的分布极为相似;我们的研究中,对照组小鼠高脂饲养后于14周龄即出现AS变化,与以往报道一致。

2005年,Massy等[4]研究发现,以apoE$^{-/-}$小鼠制备尿毒症动物模型,可以加速小鼠动脉粥样硬化的形成,尿毒症组的apoE$^{-/-}$小鼠其动脉粥样斑块的形成较对照组更快、更严重,认为该模型可以作为研究尿毒症加速性动脉粥样硬化的实验动物模型。随后,Phan等[8]利用同样的方法再次证实了该模型的可信度和稳定性,并将其应用于尿毒症加速性动脉粥样硬化的实验研究,从而确立了国际医学界认可的经典动物模型,但国内尚少见成功制备该模型的报道。

本研究参照国外相关文献,利用apoE$^{-/-}$小鼠制备尿毒症模型。以往,CRF动物模型的建立方法较多,大致分为物理方法、化学方法和生物学方法,其中5/6肾切除等物理方法被广泛应用[9]。但此法对手术条件要求较高,术后动物成活率较低,对价格相对昂贵的apoE$^{-/-}$小鼠而言造模成本较高。本研究中,我们对小鼠施行右肾皮质电烙术。为提高电烙对肾的损伤程度以保证尿毒症形成,同时又能快速完成手术操作并降低死亡率,我们改良文献[4]方法,术中采用高频电刀进行右肾皮质电烙毁损。该方法术中出血少,术后感染几率小,保证了小鼠的术后存活率。

预实验中,我们分别尝试于EC术同时或术后1周行左肾切除术,实验动物术中及术后存活率都较低,提示动物不能在短时间内适应2次肾脏手术。因此我们参照文献[4]方案在EC术后2周,再行左肾切除术,达到肾脏大部分毁损的目的。血清生化检测结果显示,模型组小鼠Nx术后2、4、6周血清Urea值逐渐升高,且明显高于对照组。以往的文献报道提示[10],实验小鼠的肌酐水平易受测量方法干扰,血肌酐升高往往不显著,而血尿素水平成为衡量造模成功与否的关键指标。我们的研究结果与国外文献报道一致:利用apoE$^{-/-}$小鼠制备的尿毒症模型主要表现为血清Urea显著升高,而血清肌酐变化不明显,提示apoE$^{-/-}$尿毒症小鼠已制备成功。

目前认为,尿毒症状态下存在的血脂代谢紊乱、氧化应激、高同型半胱氨酸血症、糖代谢异常及部分血管活性物质和细胞因子的作用,均可加速动脉粥样硬化的形成[11]。我们的发现与其他报道一致,在相同高脂饮食和喂养条件下,模型组小鼠血清总胆固醇和甘油三酯较对照组明显升高,说明CRF状态下模型鼠血脂代谢更为异常。病理分析结果表明,模型组在术后早期主动脉即有内皮细胞的脱落,随着CRF病变的加

重,内膜下逐渐出现泡沫细胞,内膜增厚,血管内出现明显的粥样斑块;且模型组小鼠在 Nx 术后 2、4、6 周动脉斑块面积以及斑块面积分数都明显增大。上述生化指标和病理分析结果证实,以 apoE$^{-/-}$ 小鼠为基础制备尿毒症模型可以加速动脉粥样硬化的形成,由此获得了尿毒症加速性动脉粥样硬化的动物模型。我们不但成功制备了该实验动物模型,并在关键环节上进行了改进,保证了实验动物较高的存活率。

本实验利用 apoE$^{-/-}$ 小鼠,分两步手术对肾脏进行大部损毁,成功制备了尿毒症加速性动脉粥样硬化动物模型。手术方法简便易行,成功率较高,为进一步开展尿毒症加速性动脉粥样硬化的相关研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Foley R N, Parfrey P S, Sarnak M J. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9(12 Suppl): S16 - S23.
[2] Weiner D E, Tighiouart H, Amin M G, *et al*. Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(5): 1307 - 1315.
[3] Nakashima Y, Plump A S, Raines E W, *et al*. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14(1): 133 - 140.
[4] Massy Z A, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, *et al*. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knock-out mice[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 109 - 116.
[5] Sarnak M J, Levey A S, Schoolwerth A C, *et al*. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention[J]. Circulation, 2003, 108(17): 2154 - 2169.
[6] Plump A S, Smith J D, Hayek T, *et al*. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES Cells[J]. Cell, 1992, 71(2): 343 - 253.
[7] 刘剑刚,董国菊,史大卓,等. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠不同周龄动脉粥样硬化的病理变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(6): 689 - 692.
[8] Phan O, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, *et al*. Sevelamer prevents uremia-enhanced atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 2005, 112(18): 2875 - 2882.
[9] 肖　炜,马　云,傅江南. 慢性肾衰动物模型方法学研究现状[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(3): 176 - 179.
[10] Bro S, Moeller F, Andersen C B, *et al*. Increased expression of adhesion molecules in uremic atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(6): 1495 - 1503.
[11] 李光文, 黄一新. 对慢性肾衰竭患者动脉粥样硬化的新认识[J]. 国际泌尿系统杂志, 2006, 26(3): 399 - 403.

(编辑　吴培红)

文章编号:1000-5404(2009)19-1865-01

个案与短篇

原发性睫状体黑色素瘤 1 例

徐江宁,李　晶,谢汉平　　(第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

葡萄膜的恶性黑色素瘤是成年人最多见的眼内肿瘤,多见于 50 ~ 60 岁患者[1],85% 的葡萄膜黑色素瘤发生于脉络膜,其次为虹膜,发于睫状体的黑色素瘤较罕见[2]。我科于 2008 年 10 月收治 1 例原发性睫状体黑色素瘤患者,现报告如下。

1　临床资料

患者,女性,43 岁,因"左眼视力下降伴眼红 8 个月余"于 2008 年 10 月入院。全身检查未见异常,专科情况:右眼视力 0.7 - 1.5 DC × 85°→0.9,左眼视力 0.1 - 1.25 DS - 4.00 DC × 110°→0.4,左眼鼻侧角巩膜缘处可见直径约 5 mm 深蓝色隆起,角膜透明,前房轴深 3 CT,房水清,Tyn(-);鼻侧 7:00 ~ 10:00 睫状体隆起(图 1),瞳孔等大等圆,直接和间接对光反射灵敏,晶体透明,玻璃体腔内鼻侧 6:00 ~ 11:30 可见一实质性棕褐色隆起,鼻下方视网膜灰白色隆起。右眼检查未见异常。眼压:右眼 18.9 mmHg,左眼 16.3 mmHg。



图 1　患者睫状体黑色素瘤裂隙灯显微镜观察

辅助检查:左眼超声生物显微镜(UBM)显示:前房深度正常,晶体位正,全房角狭窄,鼻侧睫状体部可见巨大实性回声隆起,内回声强而均匀,边界不能探及。提示:睫状体占位性病变,性质待定。左眼 B 超显示:提示左眼球内占位性病变(睫状体黑色素瘤可能),左眼视网膜脱离,左眼脉络膜占位性病变(黑色素瘤可能性大)。胸部 X 线摄片,腹部肝、胆、脾、胰腺 B 超,妇产科会诊等未见异常。入院诊断:①左眼睫状体黑色素

(下转 1880 页)

作者简介:徐江宁,女,重庆市人,医师,主要从事眼科方面的研究,电话:(023)60990898,E-mail: 247935243@qq.com
通信作者:谢汉平,E-mail:xiehanping@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2009-02-20;**修回日期**:2009-04-28