心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000955

新西兰兔慢性肾功能衰竭合并动静脉内瘘模型的建立

李相杰,李 追,张 矛,赵 渝,任 为,成 军

重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016)

[摘 要]目的:建立慢性肾功能衰竭(chronic renal failure,CRF)合并颈部动静脉内瘘(arteriovenous fistula,AVF)的新西兰兔模型,研究 CRF 对 AVF 静脉内膜增生(venous neointimal hyperplasia,VNH)的影响。方法:32 只健康新西兰兔随机等分为肾衰组和健康组,每组 16 只。肾衰组以腺嘌呤诱导新西兰兔 CRF 后建立 AVF 模型,健康组不做 CRF 诱导建立 AVF 模型。术后第 4 周取瘘口静脉段行 HE 染色评估内膜厚度、面积,免疫组织化学检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的表达评估其增殖活性,取肾组织行 HE 染色观察病理学改变。结果:肾衰组血尿素氮、肌酐水平于第 4 周明显增加,第 6 周时达正常值 3 倍左右,光镜下可见肾小管萎缩消失、结晶物沉着、间质纤维化伴炎症细胞浸润;肾衰组 AVF 静脉平均内膜厚度、面积及 PCNA 表达量均明显高于健康组($P<0.05$)。结论:腺嘌呤可诱导家兔 CRF 形成,CRF 对 VNH 具有促进作用,加快 AVF 的功能障碍,因此在研究 AVF 早期功能障碍时需建立 CRF 的 AVF 模型,以保证研究的科学性。

[关键词]动静脉内瘘;慢性肾功能衰竭;腺嘌呤;动物模型

[中图分类号]Q95-33 [文献标志码]A [收稿日期]2016-01-25

Animal model of arteriovenous fistula combined with chronic renal failure in New Zealand white rabbits

Li Xiangjie, Li Zhui, Zhang Mao, Zhao Yu, Ren Wei, Cheng Jun

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] ***Objective*** To establish a rabbit model of chronic renal failure (CRF) combined with arteriovenous fistula (AVF), and to investigate the effect of CRF on venous neointimal hyperplasia (VNH) of AVF. ***Methods*** Thirty-two healthy rabbits were randomly divided into renal failure group and health group (16 in each group). Rabbits in renal failure group were fed chow containing adenine. After induction of CRF, an AVF model in neck was established in renal failure group. Whereas, the same AVF model with no intervention was established in health group. Four weeks after operation, the pathological changes of fistula tissue, specifically the thickness and area of intimal in venous segment was observed by HE staining; the proliferation activity of the neointimal cells was evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA); the pathological changes of renal tissue was observed by HE staining. ***Results*** Compared with those in health group, the levels of SCr and BUN in the renal failure group were increased significantly in the first four weeks, and were three times higher than baseline at the sixth weeks. HE staining of renal tissue in renal failure group showed amounts of crystals deposition within the tubules with partial atrophy, and the renal interstitium infiltrated with inflammatory cells and fibrosis. Compared with those of health group, the average thickness and area of VNH and PCNA-positive cells in venous segment were increased significantly in the renal failure group ($P<0.05$). ***Conclusion*** The CRF rabbit model is successfully established by feeding adnine, which promotes the VNH and AVF dysfunction. Therefore, AVF combined with CRF model should be established for the early AVF dysfunction studies in the further.

[Key words] arteriovenous fistula; chronic renal failure; adenine; animal model

---

作者介绍:李相杰,Email:664744369@qq.con,
研究方向:动静脉内瘘早期功能障碍发生机制。

通信作者:张 矛,Email:zbysz1118@126.com。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1030.056.html (2016-05-13)

血液透析是维系终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 患者生命的重要手段,良好的血管通路是维持长期血液透析的必要条件,动静脉内瘘 (arteriovenous fistula, AVF) 是目前最常用的永久性血管通路,也是美国国家肾脏基金会_肾脏疾病预后及生存质量 (NKF-K/DOQI) 指南推荐优先选择的通路。但在欧美国家 AVF 早期功能障碍的发生率为 28%~53%[1],给临床带来了严峻的挑战。

AVF 早期功能障碍主要表现为静脉内膜增生 (venous neointimal hyperplasia, VNH) 导致的瘘口静脉段狭窄,最终使透析血流量减少[2-5]。目前对于 AVF 早期功能障碍研究的模型大都是建立在健康动物体内,而非慢性肾功能衰竭衰 (chronic renal failure CRF) 的 AVF 模型,并不能模拟临床 CRF 患者复杂的内环境。本实验通过饲喂腺嘌呤诱导新西兰兔的 CRF 模型,并在此基础上建立 AVF,为进一步研究 AVF 早期功能障碍的发生机制和干预奠定基础。

1 材料及方法

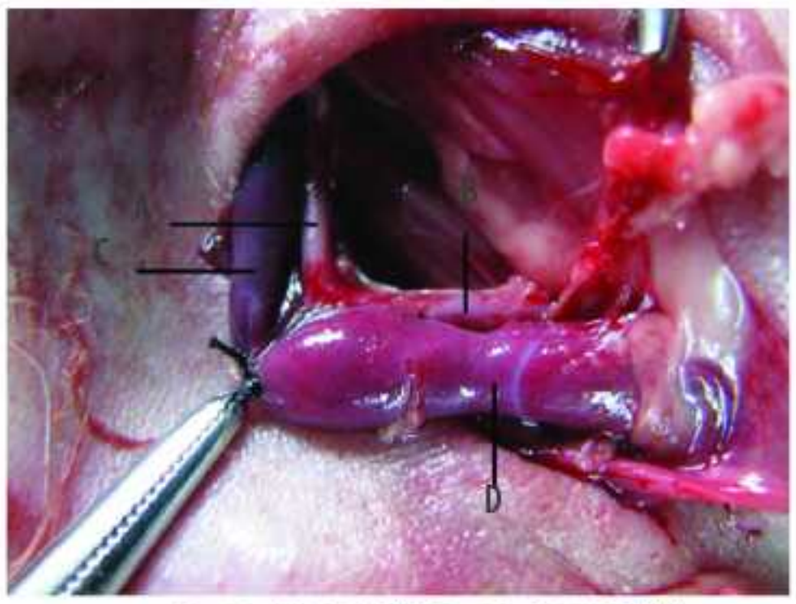
1.1 研究材料

新西兰兔 (由重庆医科大学动物实验中心提供),腺嘌呤;10%水合氯醛;硫化钠;显微器械包;全自动生化分析仪 (贝克曼 AU68 美国);小鼠抗兔 PCNA 抗体 (BMO104 武汉博士德生物);Image Profession Plus 6.0 (媒体控制公司 美国)。

1.2 研究方法

1.2.1 慢性肾衰模型 32 只健康新西兰兔,雌雄不限,体质量 2.0~2.5 kg,取耳缘静脉血检测血肌酐和尿素氮确定肾功能正常后,随机等分为肾衰造瘘组和健康造瘘组。腺嘌呤其代谢产物通过阻塞肾小管,导致肌酐、尿素及电解质代谢紊乱引起肾功能衰竭[6],肾衰造瘘组给予含腺嘌呤的食物饲养,0.6%腺嘌呤饲喂 4 周,接着以 0.3%腺嘌呤饲喂 2 周 (诱导期),最后以 0.15%腺嘌呤 (维持期) 饲养到实验结束,每周抽取耳缘静脉血用全自动生化分析仪检测血肌酐和尿素氮值至实验结束;健康造瘘组除饲喂不含腺嘌呤的饲料外,其他实验条件与肾衰造瘘组相同。

1.2.2 动静脉内瘘模型 腺嘌呤诱导 CRF 成功后,建立左颈动静脉内瘘模型。术前用 6%硫化钠备皮,10%水合氯醛经耳缘静脉麻醉后固定手术台,经消毒、铺巾,沿下颌角与锁骨中点连线切开皮肤,切口长约 3 cm,分离皮下组织,显露颈静脉,于胸骨舌骨肌与胸骨甲状肌间分离出颈总动脉,结扎血管分支,将颈动静脉平行并拢,无创血管阻断钳阻断近远端血流,沿动静脉长轴切开,切口约 0.5 cm,去除外膜后用 8~0 缝线侧侧吻合动静脉。吻合结束后用 5~0 缝线结扎颈静脉远端,开放循环后近端颈静脉立即充盈,可触及明显的搏动和震颤,提示 AVF 吻合成功 (图 1)。



A.颈动脉远侧端;B.颈动脉近侧端
C.颈静脉远侧端;D.颈静脉近侧端

图 1 建立改良的端侧吻合颈部动静脉内瘘

Fig.1 Establishment of improved side to side anastomosis carotid-jugular arteriovenous fistula

1.2.3 组织病理学 AVF 术后 4 周,分别取各组新西兰兔肾脏及 AVF 静脉段 (距 AVF 瘘口约 1 cm 内) 以 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,组织切片,片厚 5 μm,行苏木精_伊红 (HE) 染色。分别于 200 及 400 倍光镜下观察内膜及肾脏的病理变化,采用 Image Pro Plus (IPP) 6.0 软件对 AVF 静脉段进行图像分析,测量新生内膜厚度和面积。

1.2.4 免疫组织化学染色 AVF 静脉组织切片脱蜡至水,微波抗原修复,3%H_2O_2 封闭 30 min,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 冲洗 3 次,血清封闭 10 min,滴加 PCNA 一抗 (1:400;BMO104 武汉博士德生物),4 ℃过夜,PBS 冲洗 3 次,滴加山羊抗鼠二抗 (BA1001 武汉博士德生物) 孵育 10 min,PBS 洗涤 3 次,加辣根过氧化物酶标记的生物素 10 min,PBS 洗涤 3 次,DAB 显色,二甲苯透明,中性树胶封固,采图后用 Image Profession Plus 6.0 分析内膜的阳性细胞数。每一血管组织取不连续 3 张切片,每张切片取 10 个高倍视野下所有细胞核 (分母) 和 PCNA 阳性细胞核 (分子) 计算 PCNA 百分比。

1.3 统计学处理

结果采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,实验数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料采用两独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

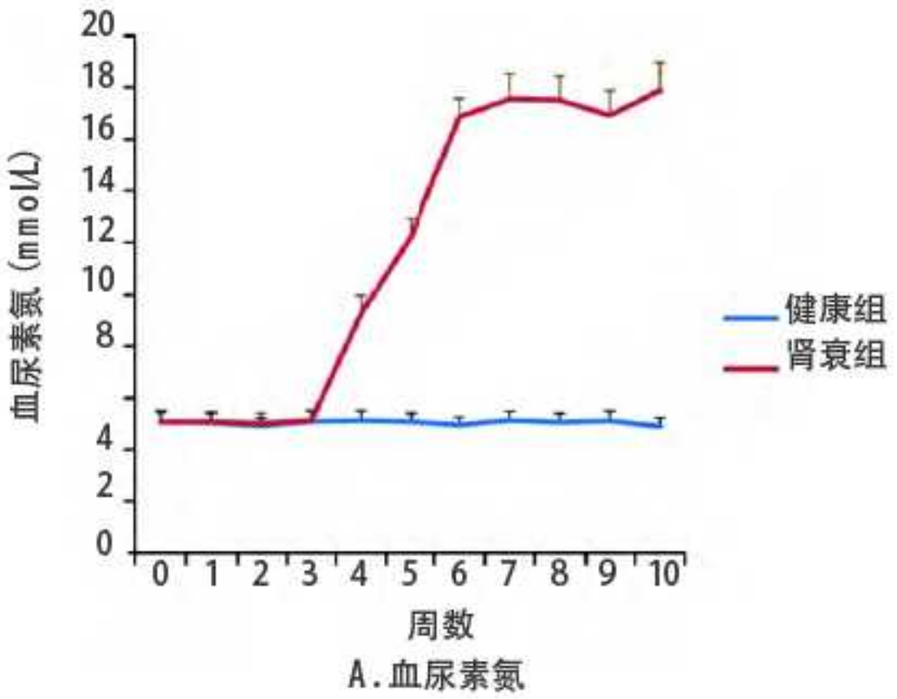
2.1 一般情况

肾衰组喂食含腺嘌呤食物后新西兰兔精神稍差,食量、活动度减少,体质量逐渐降低,但无 1 例新西兰兔因饲喂腺嘌

吟而发生死亡。造瘘术后 2 组新西兰兔逐渐出现口唇发绀；第 4 周，肾衰组和健康组各有 1 只因发生肺部感染而死亡。

2.2　肾功能

为了验证腺嘌呤对新西兰兔肾脏功能的影响，实验检测了新西兰兔血液中肌酐和尿素氮的含量。经统计分析发现，慢性肾功能衰竭的新西兰兔在腺嘌呤诱导期血肌酐和尿素氮明显升高，在维持期血肌酐和尿素氮值维持在正常值的 3 倍以上并趋于稳定。血肌酐和尿素氮在腺嘌呤干预的前 3 周并无变化，第 4 周时开始明显上升，到 6 周继续上升到正常值 3 倍以上，提示 CRF 模型建立成功。健康组血肌酐和尿素氮无明显变化，组间差异有统计学意义（$P<0.05$）（图 2）。



A. 血尿素氮

B. 肌酐

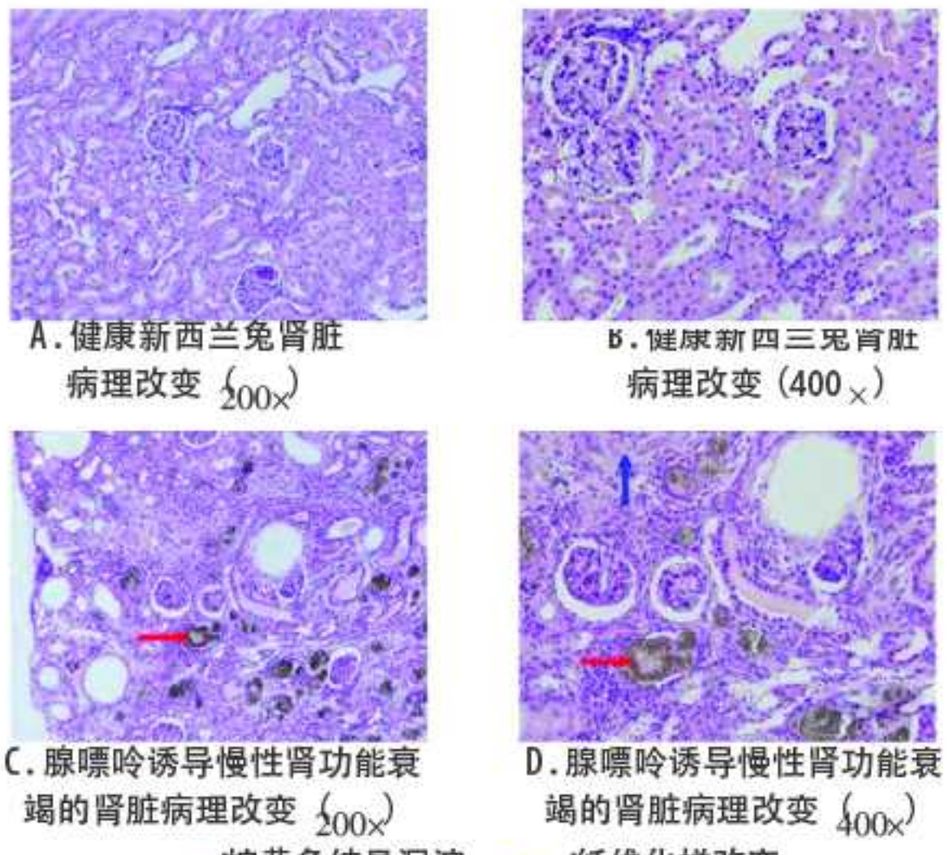
$P<0.05$

图 2　腺嘌呤诱导慢性肾功能衰竭血尿素氮和肌酐水平的改变

Fig.2　Changes in blood urea nitrogen and serum creatinine levels in adenine-induced chronic renal failure

2.3　肾脏病理变化

为进一步明确腺嘌呤干预后，血肌酐和尿素氮增加的机制，实验对新西兰兔的肾组织进行了 HE 染色，在光镜下，慢性肾功能衰竭组肾小球体积及形态各异，在肾小管内可见到大量棕黄色结晶物沉着，未被结晶物沉着的肾小管代偿性扩张，部分萎缩消失，肾间质纤维化样改变，肾单位正常结构消失伴有大量炎症细胞浸润。健康组肾脏结构清晰，皮、髓质结构正常，肾小球及间质均无异常改变（图 3）。



A. 健康新西兰兔肾脏病理改变（200×）

B. 健康新西兰兔肾脏病理改变（400×）

C. 腺嘌呤诱导慢性肾功能衰竭的肾脏病理改变（200×）

D. 腺嘌呤诱导慢性肾功能衰竭的肾脏病理改变（400×）

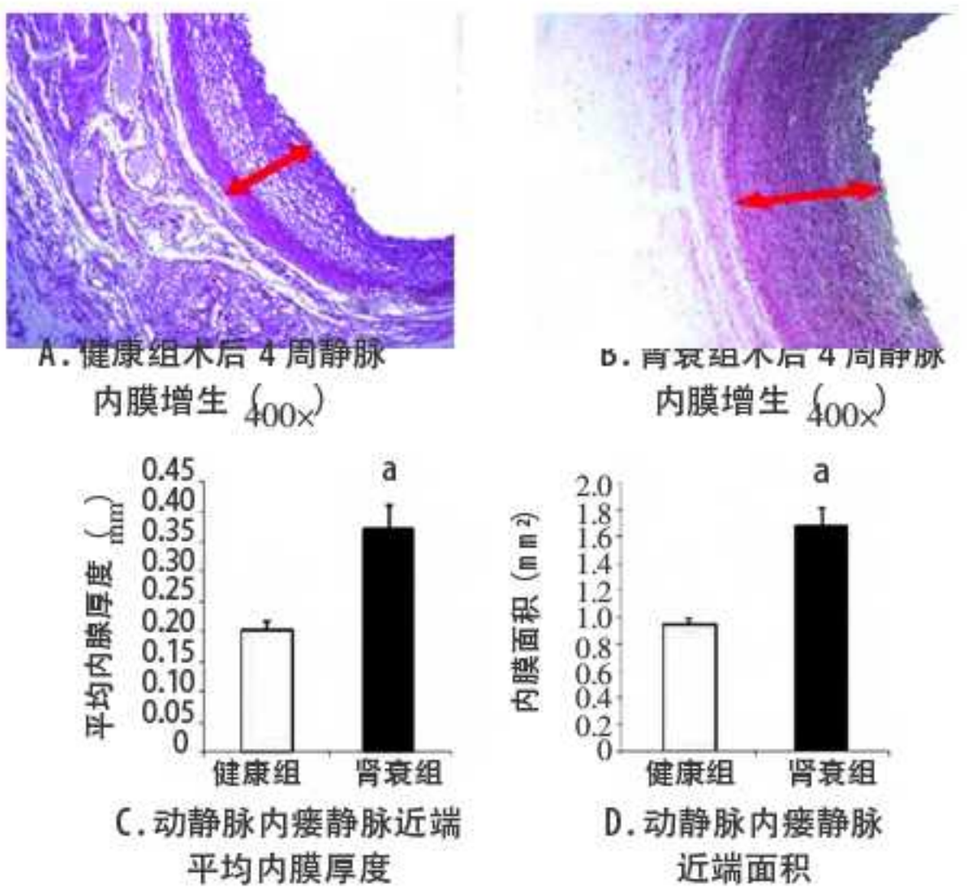
→ 棕黄色结晶沉淀，→ 纤维化样改变

图 3　肾脏病理变化（苏木精－伊红染色）

Fig.3　Changes in renal pathological (HE staining)

2.4　AVF 静脉内膜病理变化

为观察慢性肾功能衰竭对 VNH 的影响，对 AVF 静脉段进行了 HE 染色和免疫组织化学染色。经 HE 染色发现，在造瘘术后第 4 周，2 组的静脉内膜均发生增殖改变，肾衰造瘘组较健康造瘘组内瘘静脉段明显增厚，肾衰造瘘组内瘘静脉段平均内膜厚度为（0.371 3±0.040 7）mm，健康造瘘组平均内膜厚度为（0.201 8±0.013 8）mm，组间差异有统计学意义（$t=15.75$，$P<0.05$）进一步计算内膜增殖的面积发现，肾衰造瘘组内膜面积为（1.68±0.14）mm²，健康造瘘组内膜面积为（0.94±0.05）mm²，组间有统计学意义（$t=19.06$，$P<0.05$）（图 4）。PCNA 是细胞增殖的指标，经免疫组织化学染色发现肾衰组 PCNA 阳性细胞百分比明显高于健康组，肾衰造瘘组为（39.23±3.85）%，健康造瘘组为（20.12±2.57）%，组间差异具有统计学意义（$t=16.49$，$P<0.05$）（图 5）。



A. 健康组术后 4 周静脉内膜增生（400×）

B. 肾衰组术后 4 周静脉内膜增生（400×）

C. 动静脉内瘘静脉近端平均内膜厚度

D. 动静脉内瘘静脉近端面积

↔：内膜厚度，a：$P<0.05$

图 4　动静脉内瘘静脉近端内膜增生

Fig.4　Venous neointimal hyperplasia (VNH) of the proximal vein of the arteriovenous fistula

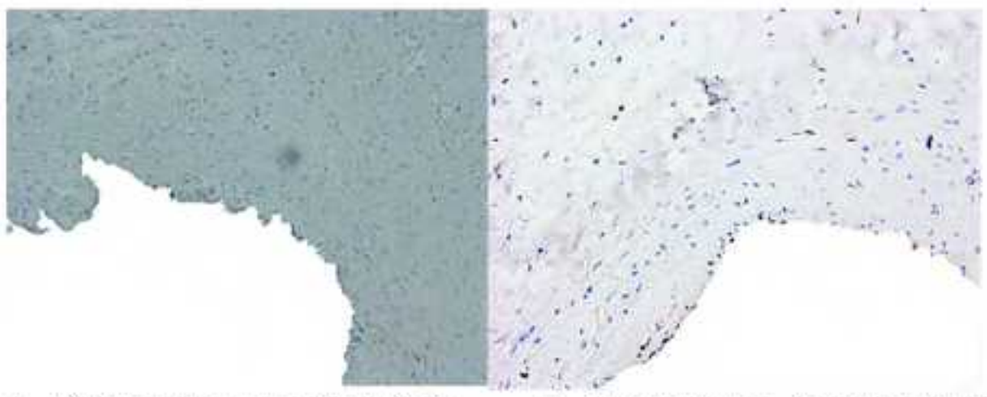


图 5 动静脉内瘘静脉近端免疫组织增殖细胞核抗原染色

Fig.5 Immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen in the proximal vein of the arteriovenous fistula

3 讨 论

AVF被誉为终末期肾病患者“生命线”，据欧美国家统计，28%~53%的 AVF 在成形术后 3 个月内发生功能障碍[1]，国内的这个比例更高。美国每年因 AVF 功能障碍住院人数占 ESRD 总住院人数的 25%，住院费用占总住院费用的 50%，多达 10 亿美元[7-8]。随着我国慢性肾功能衰竭发病率的逐年增加，用于维持血液透析患者的费用也逐年增加，相当比例的费用用于血管通路的建立和维护[9]。AVF 早期功能障碍尚无有效的预防与治疗措施，因此，加强对 AVF 早期功能障碍发生机制及其防治的研究尤为重要，一个能充分模拟临床的动物模型是研究的关键。本实验通过建立慢性肾功能不全的 AVF 模型，探讨该模型对于 VNH 的影响。本研究发现在慢性肾衰组中，AVF 静脉段的平均内膜厚度和内膜面积均高于肾脏功能正常组；此外，新生内膜中细胞增殖标记物 PCNA 的阳性细胞数亦明显高于肾功能正常组，证明慢性肾功能衰竭对 AVF 的 VNH 具有促进作用。因此，在研究 AVF 早期功能障碍发生的机制时，AVF 动物模型需建立在 CRF 模型之上，否则对于 AVF 功能障碍的研究是有失偏颇的。

目前建立 CRF 模型以手术方式为主，运用最为广泛的是单侧输尿管结扎[10-12]及肾大部切除术[13-14]，前者是经结扎输尿管，引起肾间质纤维化和肾小管坏死，肾大部切除术是将一侧肾的上下极各切除 1/3，二期行对侧全肾切除，该方法较复杂，需掌握肾脏切除技术，此方法易引起出血，感染甚至模型死亡，此外，模型个体差异大，影响后期实验研究。本研究采用 0.6%的腺嘌呤饲喂新西兰兔 4 周，接着以 0.3%的浓度继续饲喂 2 周进行 CRF 的诱导，以 0.15%的浓度用于维持，成功的建立了家兔 CRF 模型。与手术干预相比，腺嘌呤诱导为无创的化学方法，此方法简易，循序渐进的饲喂方法使动物易于耐受，存活率高，实验中无 1 例新西兰兔因饲喂腺嘌呤而发生死亡。有研究认为长期进食腺嘌呤的大鼠所产生的异常代谢与人类慢性肾功能衰竭的临床表现及病理改变相似[15]，腺嘌呤通过黄嘌呤氧化酶的作用在肝内形成极难溶于水的 2，8-二羟基腺嘌呤，后者经肾小球滤过，沉积在肾小管，使肾小管发生炎症改变而闭塞，从而影响氮质化合物的排泄，导致肌酐、尿素、氨基酸、电解质等代谢紊乱[6]。刘洪彦等[16]以灌胃方式使大鼠摄入 0.75%浓度腺嘌呤悬液，1 周后模型大鼠即出现血肌酐、尿素氮等肾功能指标的升高，但该方法导致的死亡率高达 42.86%。连续高剂量摄入腺嘌呤使动物快速的出现肌酐、尿素等指标急剧升高，肾脏出现不可逆的损伤而迅速的进入失代偿期，不符合慢性肾功能衰竭的病理特点，且模型死亡率较高。小剂量摄入腺嘌呤对肾脏的损害较轻，健存的肾单位进行快速代偿作用，停止饲喂腺嘌呤后肾脏功能即可恢复，导致慢性肾功能衰竭模型建立失败[17]。本实验先采用较大剂量的腺嘌呤诱导出 CRF，再用小剂量维持至实验结束，避免了大剂量腺嘌呤引起的动物死亡，也避免了停止腺嘌呤摄入后，健存肾单位代偿致使模型建立的失败。与大鼠 CRF 模型比较，新西兰兔有着更强的实验耐受性，在耳缘静脉采血，简单易行可重复，且血容量充足，能获得较满意的样本量。腺嘌呤诱导 CRF 优点众多，但其作用机制是通过其代谢物阻塞肾小管导致 CRF，而临床上 CRF 患者多以肾小球病变为主，因此该肾衰模型仅能用于研究与 CRF 相关的其他组织或器官病变，并不能作为研究肾小球病变的肾衰竭模型。

人体 AVF 以静脉—动脉的端侧吻合方式多见，但此方式在吻合时动、静脉易对位不良，血管外翻吻合不严密，静脉易旋转、扭曲，导致吻合口狭窄。改良的静脉—动脉端侧吻合法是先将动静脉行侧

侧吻合，再结扎静脉的远心端，将侧侧吻合变成端侧吻合。在侧侧吻合时保持了动、静脉连续性，起到牵引固定的作用，避免血管旋转及扭曲，此法吻合口直径主要决定于血管壁切口的大小，而非血管的直径，因此瘘口血液流量的大小具有可控性[18]。此法还保持了动脉的连续性，避免的远端组织的缺血，本研究采用此法在慢性肾功能衰竭的新西兰兔颈部建立了 AVF 模型。新西兰兔颈部血管较表浅且直径大小适宜，无需显微镜即可吻合，该模型既保证了静脉中有充足的血流，又保证了新西兰兔脑组织具有足够的血流。有学者用健康犬的股动静脉建立 AVF 模型，大型动物如犬、猪内瘘模型的优点在于血管直径大，易于吻合，不足之处在于饲养费用高，麻醉过程复杂，且难以建立具有 CRF 的 AVF 模型[19]。大鼠虽易于饲养，成本低，但其血管过细，对实验者外科技巧要求较高，在显微镜下也较难完成吻合[20]。上述模型大多为单一的 AVF 模型，并不能模拟肾功能衰竭患者体内的病理变化。

总之，本研究用腺嘌呤饲喂的方式成功建立了新西兰兔慢性肾衰竭模型，并在此基础上建立了 AVF 模型，为对 VNH 的研究建立了一个能充分模拟临床患者体内病理变化的模型。通过对 AVF 静脉段的组织病理学检测发现，慢性肾功能衰竭组静脉内膜增生的平均厚度及面积均高于肾功能正常组，增殖标志物 PCNA 表达量亦明显升高，表明肾功能衰竭引起的氮质血症、慢性炎症状态、氧化应激等病理变化可促进 VNH 的发生和发展[21-24]，其具体机制将在下一步的实验中研究。

参 考 文 献

[1] Asif A，Roy-Chaudhury P，Beathard GA. Beathard.et，al.Early arteriovenous fistula failure：a logical proposal for when and how to intervene[J]. Clin JAm Soc Nephrol，2006，1（2）：332-339.

[2] Roy-Chaudhury P，Sukhatme VP，Cheung AK，et al. Hemodialysis vascular access dysfunction a cellular and molecular viewpoint[J]. J Am Soc Nephrol，2006，17（4）：1112-1127.

[3] Lee T，Roy-Chaudhury P. Advances and new frontiers in the pathophysiology of venous neointimal hyperplasia and dialysis access stenosis [J]. Adv Chronic Kidney Dis，2009，16（5）：329-338.

[4] Li YS，Haga JH，Chien S，et al. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells[J]. J Biomech，2005，38（10）：1949-1971.

[5] Prabir RC，Yang W，Mahesh K，et al. Cellular phenotypes in human stenotic lesions from haemodialysis vascular access[J]. Nephrology，Dialysis，Transplantation，2009，24（9）：2786-2791.

[6] Philips FS，Thiersch JB，Bendich A. Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 2，8-dioxyadenine in renal tubules[J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics，1952，104（104）：20-30.

[7] NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendation 2006：Updates：VasoularAcuss，AJKD，2006，48：s1-s322.

[8] Helen L，Braden M，Ken T，et al. Cost analysis of ongoing care of patients with end-stage renal disease：the impact of dialysis modality and dialysis access[J]. American Journal of Kidney Diseases，2002，40（3）：611-622.

[9] 中国医院协会血液净化中心管理分会血液透析登记组. 我国面临快速增长的终末期肾病治疗负担[J]. 中国血液净化，2010，9（1）：47-49.

[10] Pimentel JL Jr，Sundell CL，Wang S，et al. Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor-beta in obstructive nephropathy[J]. Kidney Int，1995，48（4）：1233-1246.

[11] Manucha W，Oliveros L，Carrizo L，et al. Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction[J]. Kidney Int，2004，65（6）：2091-2107.

[12] Chevalier RL. Growth factors and apoptosis in neonatal ureteral obstruction[J]. J Am Soc Nephrol，1996，7（8）：1098-1105.

[13] Barata K，Yoshida M，Hokao R，et al. Function in 5/6 nephrectomized rats -basic study for renal toxicity using 5/6 nephrectomized rats[J]. J Toxicol Sci，1998，23（5）：433-442.

[14] Shimamura T，Morrison AB. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats[J]. Am J Pathol，1975，79（1）：95-106.

[15] Yokozawa T，Zheng PD，Oura H，et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats[J]. Nephron，1986，44（）：230-234.

[16] 刘洪彦，杨爱华，刘雪梅，等. 腺嘌呤致大鼠慢性肾功能衰竭模型研究[J]. 中国实验诊断学，2011，12（5）：2014-2017.

[17] 陈俊蓉，陈利国，谢林林. 关于腺嘌呤慢性肾衰实验模型的思考[J]. 实验动物科学，2013，30（2）：65-67.

[18] 刘 杰，戈小虎，任 昊，等. 3 种血液透析动静脉内瘘手术方式的体会[J]. 中国现代医学杂志，2006，16（21）：3317-3319.

[19] 王 博. 犬动静脉内瘘模型的建立及初步试验研究[D]. 天津医科大学，2014.

[20] 华 参，叶朝阳，董哲毅，等. 大鼠自体内瘘模型制备及内瘘狭窄的实验研究[J]. 中国血液净化，2009，8（6）：322-325.

[21] Kokubo T，Ishikawa N，Uchida H，et al. CKD accelerates development of neointimal hyperplasia in arteriovenous fistulas[J]. Journal of the American Society of Nephrology Jasn，2009，20（6）：1236-1245.

[22] Sezer S，Ozdemir F N，Arat Z，et al. Triad of malnutrition，inflammation，and atherosclerosis in hemodialysis patients[J]. Nephron，2002，91（3）：456-462.

[23] Juncos JP，Tracz MJ，Croatt AJ，et al. Genetic deficiency of heme oxygenase-1 impairs functionality and form of an arteriovenous fistula in the mouse[J]. Kidney International，2008，74（1）：47-51.

[24] Lin CC，Yang WC，Lin SJ，et al. Length polymorphism in heme oxygenase-1 is associated with arteriovenous fistula patency in hemodialysis patients[J]. Kidney Int，2006，69（1）：165-172.

（责任编辑 张辉洁）