



# 背入式腹膜后双肾蒂夹闭制作肾缺血再灌注损伤模型的技术方法

谢敏慧<sup>1</sup>, 谷翠芝<sup>2</sup>, 李凤霞<sup>1</sup>, 李清初<sup>1\*</sup>

(1. 桂林医学院附属医院肾内科, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院教务处, 广西 桂林 541004)

**【摘要】** 目的 探索一种损伤小、操作简便且效果稳定的大鼠肾缺血再灌注损伤模型制作方法。方法 SD 雄性大鼠随机分为正常组(C组)、假手术组(S组)、实验组(IR组)。实验组大鼠经背部正中皮肤切口,通过两侧背部肌肉筋膜进入双侧腹膜后间隙,分离双侧肾蒂,用无损伤微型动脉夹夹闭双侧肾蒂 50 min 后再松开,恢复灌注。假手术组大鼠不夹闭肾蒂,其余步骤与实验组一致;正常组大鼠仅做麻醉。观察术后 24 h 大鼠生存状态、血肌酐、尿素氮和肾组织结构变化。**结果** IR 组皮肤切口(2.24 ± 0.27) cm,右腰背部筋膜与肌肉切口(1.36 ± 0.21) cm,左侧腰背部筋膜与肌肉切口(1.36 ± 0.24) cm。从切开皮肤至夹闭双肾蒂用时(3.30 ± 0.37) min。IR 组造模成功率 95%。与正常组、假手术组比较,IR 组血肌酐、尿素氮水平显著性增高( $P < 0.01$ ),肾小管损伤评分明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** 采用背入式腹膜后双肾蒂夹闭法建立肾缺血再灌注损伤模型,效果稳定,成功率高,切口小,出血少,对动物刺激轻,易操作。

**【关键词】** 肾脏;动物模型;背部;腹膜后;缺血再灌注损伤

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0106-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.019

## Establishment method of a rat model of renal ischemia-reperfusion injury by clamping the bilateral renal pedicles through backside and retroperitoneal incision

XIE Minhui<sup>1</sup>, GU Cuizhi<sup>2</sup>, LI Fengxia<sup>1</sup>, LI Qingchu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China;

2. Department of Teaching Affairs, Guilin Medical College, Guilin 541004)

**【Abstract】 Objective** To explore a method to prepare a model of renal ischemia-reperfusion injury, with mild injury to animals, simple and easy to operate and stable effectiveness. **Methods** Healthy SD male rats were randomly divided into normal group (group C), sham-operated group (group S) and experimental group (IR group). Rats in the experimental group received a median incision in the middle of the back skin. Through the muscle fascia of each side on the back into the bilateral retroperitoneal space, the bilateral renal pedicles were separated, and closed for 50 min with a mini artery clamp without injury, and then the blood perfusion of the bilateral renal pedicles was resumed by releasing the mini artery clamp. Except that the rats of sham operation group were not blocked the renal pedicle, the rest of the operating steps were consistent with the experimental group. The normal group rats were not treated except for anesthesia. To observe the

[基金项目] 广西高校科学技术研究项目(LX2014264); 广西自然科学基金面上项目(2016JJA140396)。

[作者简介] 谢敏慧(1988—), 女, 执业助理医师, 研究生, 研究方向: 急性肾损伤基础研究。E-mail: 260809980@qq.com

[通信作者] 李清初(1970—), 男, 主任医师, 在职博士, 硕士生导师, 研究方向: 急性肾损伤基础与临床。E-mail: liqingchu2013@126.com

condition of the rats, serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and pathological changes in the kidney tissues at 24 h after operating. **Results** Skin incision was  $2.24 \pm 0.27$  cm in the group IR, the right incision of lumbar dorsal fascia and muscle was  $1.36 \pm 0.21$  cm, and the left incision was  $1.36 \pm 0.24$  cm. The operation time was  $3.30 \pm 0.37$  min from incising skin to clamping the bilateral kidney pedicles. The successful rate of model preparation reached 95% in the IR group. Compared with the groups C and S, the levels of SCr and BUN were remarkably increased in the IR group ( $P < 0.01$ ), and renal tubular necrosis scores were also significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The rat model of renal ischemia-reperfusion injury is established by clamping bilateral renal pedicles via dorsal retroperitoneal incision. This surgical procedure is stable and simple, with a high success rate and small incision, less bleeding, and minimal animal injury.

**【Key words】** kidneys; animal model; back; retroperitoneum; ischemia-reperfusion injury

肾缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是因肾脏供血中断或者不足引发急性肾损伤,当重新恢复灌注后肾损伤继续加重,甚至导致肾衰竭,是急性肾损伤的主要发病机制之一<sup>[1]</sup>。建立稳定的肾缺血再灌注损伤模型是研究急性肾损伤发病机制和预防治疗的重要保障<sup>[2]</sup>。

目前肾缺血再灌注损伤的动物模型大多经腹部切口<sup>[3-4]</sup>,术中需要打开腹腔,牵拉胃肠道,易引起动物胃肠功能紊乱;使用的动物多为小鼠和大鼠,鼠为爬行体位的动物,腹部靠地,切口容易受刺激和污染,可能加剧动物机体的应激状态和炎症改变,干扰研究结果。从背部切口已有报道<sup>[5]</sup>,系经背部正中偏右近第 12 肋切口,通过游离腹主动脉后分离并夹闭左、右肾动脉,血管易受到牵拉而引起出血;且肾动脉夹闭期间切口未关闭,腹膜后间隙与外界相通有增加脱水或感染的风险。对此笔者改进手术方式,从大鼠背部正中皮肤切口,通过皮肤牵拉,再从两侧筋膜和肌肉切口,进入腹膜后间隙,分离双侧肾蒂,用无损伤微型动脉夹夹闭双侧肾蒂成功建立大鼠肾缺血再灌注损伤模型,此方法皮肤切口与筋膜肌肉切口错开,肾动脉夹闭期间筋膜肌肉切口被皮肤覆盖,且不用牵拉腹主动脉。具体报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,8~10 周龄,体重( $240 \pm 20$ )g,由桂林医学院实验动物饲养中心提供[SCXK(桂)2013-0001],实验室温度  $24^{\circ}\text{C} \sim 26^{\circ}\text{C}$ ,湿度 60%~70%,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀(伦理委员会批准编号:GLMC20180395)。大鼠在该中心实验室适应性喂养 1 周后,状态良好,随机分为正常组(C 组,  $n = 8$ )、假手术组(S 组,  $n = 8$ )和实

验组(IR 组,  $n = 20$ )。

### 1.2 主要试剂与仪器

10% 水合氯醛(成都科龙化学试剂厂,批号 2015090601);尿素氮测试盒(罗氏诊断产品(上海)有限公司,批号 196836-01);肌酐测试盒(罗氏诊断产品(上海)有限公司,批号 20313801);4% 多聚甲醛(西陇化工股份有限公司,批号 1502262);HE 试剂由桂林医学院病理实验室配制。

自动生化分析仪(罗氏诊断产品(上海)有限公司,型号 COBASC 501)。显微镜及成像系统(Olympus,型号 BX53);小组织剪、眼科镊、无创微型动脉夹、小弯钳、线剪、执针器,标尺。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物模型建立

大鼠术前 8~12 h 禁食,用 10% 水合氯醛( $0.3 \text{ g/kg}$ )经腹腔注射麻醉,大鼠麻醉后俯卧位固定于手术板上,背部备皮消毒后于双侧肋弓角水平线与背部正中交接处向下纵行切开皮肤约 2 cm,向右牵拉皮肤,于右 12 肋下偏右约 1 cm 处沿 12 肋方向斜向外侧剪开腰背部筋膜与肌肉约 1 cm,用小弯钳钳夹牵引固定,暴露腹膜后间隙和右肾,钝性分离右肾蒂,用无损伤动脉夹夹闭右肾蒂,松开小弯钳;将皮肤向左牵拉,使切口暴露于左 12 肋下,于肋下偏左约 1 cm 处向下纵向剪开左侧腰背部筋膜与肌肉约 1 cm,用小弯钳钳夹牵引固定,暴露腹膜后间隙和左肾,钝性分离左肾蒂,用无损伤动脉夹夹闭左肾蒂,松开小弯钳,皮肤恢复正常位置,遮盖了两侧内部切口。皮肤切口用无菌纱布覆盖,白炽灯照射保温。50 min 后松开动脉夹,观察双肾灌注良好后,逐层缝合切口。术后单笼饲养,自由饮水与进食。假手术组:不夹闭双侧肾蒂,其余步骤与实验组相同。正常组仅做麻醉处理。

模型成功的判定标准:术中夹闭双侧肾蒂后,

见双肾由鲜红色变为紫黑色;松开动脉夹后,血流恢复灌注,5 min 内见双肾由紫黑色变为鲜红色;且术后 3 h 内大鼠苏醒。

### 1.3.2 观察术中情况与大鼠生存状况

记录手术时间、麻醉清醒时间,测量皮肤、肌肉切口长度等,观察大鼠精神状态、进食、饮水以及活动情况等,计算造模成功率。

### 1.3.3 肾功能检测

于肾缺血再灌注 24 h 后经心脏穿刺取血,静置 2 h,4℃ 4000 r/min 离心 5 min,取血清经全自动生化分析仪检测血肌酐(Cr)和血尿素氮(BUN)。

### 1.3.4 肾组织病理学检查

大鼠肾缺血再灌注 24 h 后进行颈椎脱臼法处死,取双侧肾脏,从肾脏中间横切取 1/2 肾组织置于 4% 多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm 切片,进行 HE 染色,×400 光镜下观察肾组织形态与结构,肾小管病变包括肾小管上皮细胞变性、坏死、刷状缘脱落、管型形成及炎性细胞浸润等。根据肾小管病变程度,用 Hauet 等<sup>[6]</sup>半定量病理评估法评分(最高分是 5 分)。1 分:正常肾脏;2 分:<25% 的肾小管病变;3 分:25%~50% 的肾小管病变;4 分:50%~75% 的肾小管病变;5 分:>75% 的肾小管病变。每个样本随机选取 10 个不互相重复的视野,分别计算每个视野的肾小管损伤分数,取 10 个视野评分的平均值作为每个样本的评分值。

## 1.4 统计学方法

使用 SPSS 21 软件处理实验数据,数据用平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),LSD 法进行两两比较。以  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 术中情况与大鼠生存状况

#### 2.1.1 术中情况

假手术组皮肤切口 ( $2.24 \pm 0.14$ ) cm,右腰部筋膜与肌肉切口 ( $1.27 \pm 0.13$ ) cm,左侧腰背部筋膜与肌肉切口 ( $1.28 \pm 0.14$ ) cm。实验组皮肤切口 ( $2.24 \pm 0.27$ ) cm,右腰部筋膜与肌肉切口 ( $1.36 \pm 0.21$ ) cm,左侧腰背部筋膜与肌肉切口 ( $1.36 \pm 0.24$ ) cm。从切开皮肤至夹闭双肾蒂用时 ( $3.30 \pm 0.37$ ) min。术中出血少,无需止血或擦拭渗血,视野清楚。

#### 2.1.2 大鼠生存状况

除实验组 1 只大鼠于肾蒂结扎后 5 min 死亡外,其余 35 只大鼠术后 24 h 均成活。正常组大鼠麻醉后 ( $58.25 \pm 2.77$ ) min 苏醒,精神好,活动自如,饮食正常。假手术组大鼠麻醉后 ( $70.75 \pm 2.12$ ) min 苏醒,12 h 内精神欠佳,活动减少,饮食较少,12 h 后精神尚可,饮食、活动恢复正常。实验组:大鼠在麻醉后 ( $97.26 \pm 6.86$ ) min 苏醒,12 h 内精神萎靡,活动缓慢,很少进食,12 h 后精神欠佳,进食与活动减少。实验组 20 只大鼠,造模成功 19 例,成功率为 95%。死亡大鼠解剖未发现明显异常,可能为麻醉意外死亡。

## 2.2 大鼠血 Cr、BUN 水平

与正常组或假手术组比较,实验组大鼠血清血肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平明显增高 ( $P < 0.01$ ),假手术组与正常组间这两项指标差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),提示实验组大鼠肾功能受损。(见表 1)

## 2.3 大鼠肾组织病理学变化

### 2.3.1 大体变化

大鼠肾脏的大体形态在正常组、假手术组与实验组双肾蒂夹闭前无明显差别,可见双肾颜色鲜红,表面光滑,无肿胀。实验组双肾蒂夹闭后可见双肾颜色变为紫黑色,被膜紧张,呈淤血状。松开动脉夹后,可见双肾颜色逐渐转鲜红。(见图 1)

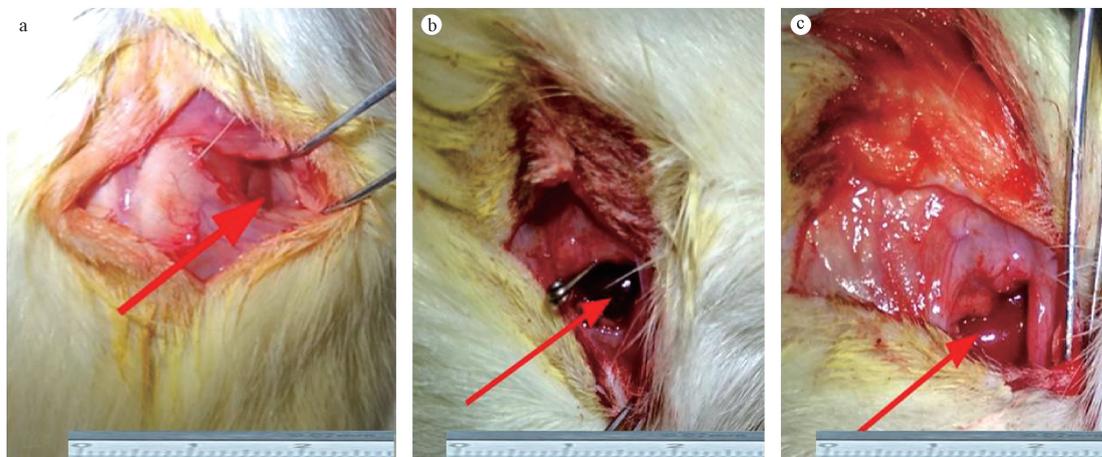
表 1 各组大鼠血肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The levels of serum creatinine (Cr) and urea nitrogen (BUN) in the rats

组别 Groups	n	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
正常组 Normal group	8	4.88 ± 1.40	46.90 ± 11.16
假手术组 Sham-operated group	8	4.93 ± 1.32	41.78 ± 7.37
实验组 Experimental group	19	39.49 ± 10.09 <sup>**</sup>	265.66 ± 65.65 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与假手术组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group,\* $P < 0.05$ . Compared with the sham-operated group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ .



注: (a) 肾蒂夹闭前; (b) 肾蒂夹闭后; (c) 松开动脉夹后。

图 1 大鼠肾脏缺血前、缺血后、再灌注后颜色变化

Note. (a) Before clamping the renal pedicle. (b) After clamping the renal pedicle. (c) After loosening the artery clamp.

Fig. 1 Changes of the color of kidneys (arrows) before and after ischemia, and after reperfusion in the rats

### 2.3.2 光镜下变化

正常组与假手术组肾组织结构清晰,肾小管上皮细胞完整,排列整齐。实验组可见近曲小管结构破坏,出现断裂或塌陷,腔内可见管型;大量肾小管上皮细胞水肿,部分上皮细胞有核固缩、胞浆深染,脱落坏死,部分肾小管管腔扩张、管腔轮廓模糊;间质有炎性细胞浸润。(见图 2)

### 2.3.3 肾小管损伤分数

肾小管损伤分数由病理科专业医师进行盲评。统计分析显示,实验组损伤分数明显高于假手术组与正常组( $P < 0.01$ ),假手术组与正常组间差异无显著性( $P > 0.05$ )。(见图 3)

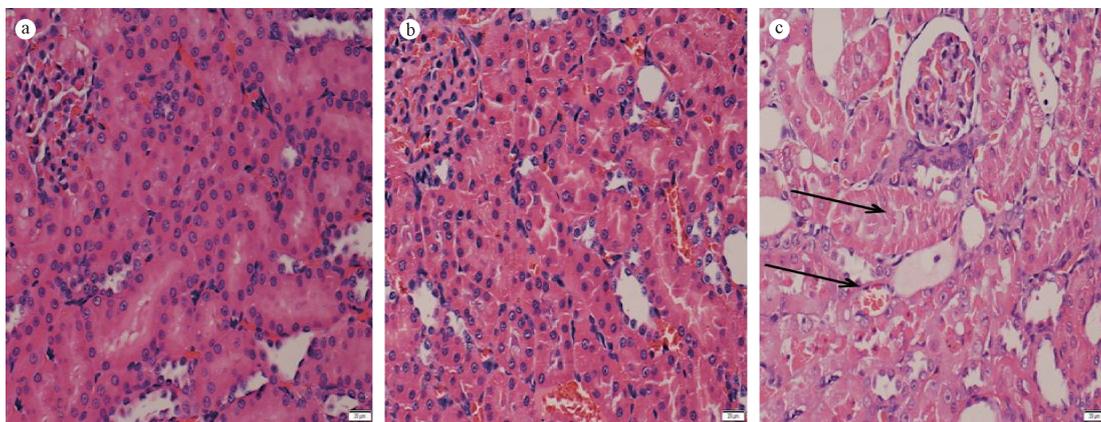
## 3 讨论

急性肾损伤是临床常见的急危重症,虽然治疗措施有了明显改善,但其发病率与死亡率仍然很高<sup>[1]</sup>。肾脏缺血再灌注损伤被认为是急性肾损伤与慢性肾衰竭的主要发病基础,肾 IRI 动物模型是研究这些疾病发病机制和预防治疗的重要手段。文献报道的肾 IRI 动物模型制作方法包括夹闭双侧肾蒂(或双侧肾动脉、肾静脉)或夹闭单侧肾动脉+切除对侧肾<sup>[2]</sup>,模拟双侧或单侧肾缺血再灌注,复制的模型出现以肾小管损伤为主的肾功能和结构损伤,类似于临床多数急性肾损伤。最常使用的动物为大鼠与小鼠,手术方式普遍采用经腹部切口<sup>[3-4,7-10]</sup>。有研究者认为腹部切口易牵拉和暴露胃肠道,对大鼠的生理状态影响较大<sup>[11]</sup>。鼠类活动以爬行为主,活动时将不断刺激腹部切口,也容易

使切口污染,增加感染几率,可能影响动物的应激状态和炎症水平,干扰实验结果。本研究从背部正中切口,因大鼠皮肤比较松弛,通过切口皮肤的牵拉,于左右肋下切开双侧腰背部筋膜与肌肉,从腹膜后夹闭双侧肾蒂,成功建立肾缺血再灌注模型。此方法无需打开腹腔,不接触胃肠道,不影响胃肠功能;皮肤切口与肋下切口位置错开,肾蒂夹闭期间肋下切口被皮肤覆盖,内脏不会暴露,失水和感染几率下降;大鼠背部脏器较少,切开筋膜出血少,视野清楚,腹膜后肾脏暴露充分,不易伤及周围器官;切口在背部,大鼠活动几乎不受影响,切口不易受污染。

本研究中,模型成功率 95%,且随着再灌注时间延长,大鼠活动、饮食恢复良好;再灌注 24 h 肾功能损伤显著,血肌酐和尿素氮比正常值增加 6~10 倍;光镜下肾组织结构明显破坏,肾小管出现断裂或塌陷,腔内可见管型;大量小管上皮细胞水肿、坏死和脱落,部分间质有炎性细胞浸润。这些实验结果表明,动物模型的肾脏功能和组织结构受损明显,提示这种背入式腹膜后夹闭双肾蒂的模型制作方法符合肾缺血再灌注损伤的研究要求。

鉴于文献一般分析的是药物或信号通路等处理因素对实验动物的影响,对模型制作成功率报道较少见,尚不能确定何种方式成功率更高。以往的研究焦点多在动物的种属、体重、年龄、性别及缺血时间、手术方式等因素对肾缺血再灌注模型动物的肾功能、形态、结构与预后的影响,而研究模型制作方法对动物生理状态的影响较少,作者将继续研究

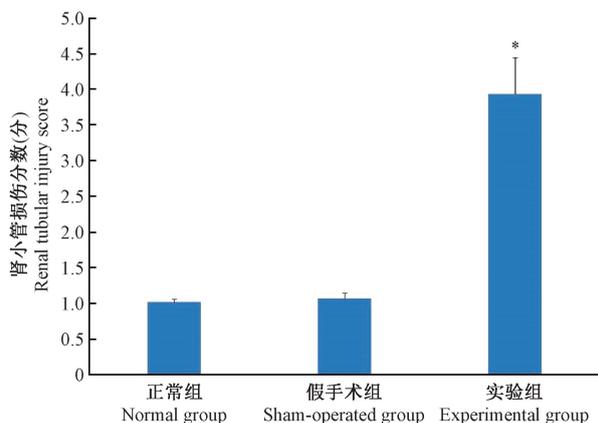


注:(a)正常组;(b)假手术组;(c)实验组。

图2 各组大鼠肾组织病理形态与结构变化(HE × 400)

Note. (a) Normal group. (b) Sham-operated group. (c) Experimental group.

Fig. 2 Histopathological changes of renal tissues in the rats. HE staining



注:与正常组比, \* $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠肾小管损伤分数

Note. Compared with the normal group, \* $P < 0.01$ .

Fig. 3 Renal tubular injury scores of the rats

背入式与腹部切口方式对动物生理状态的影响,如应激相关因子和炎症因子水平的变化,以明确哪种手术方式对动物模型的干扰更小。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury [J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67: 293 - 307.
- [ 2 ] Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, et al. Animal models of acute renal failure [J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(1): 31 - 44.

- [ 3 ] Sun L, Shen YL, Liu HJ, et al. The expression of response gene to complement 32 on renal ischemia reperfusion injury in rat [J]. *Ren Fail*, 2016, 38(2): 276 - 281.
- [ 4 ] Medeiros VF, Azevedo ÍM, Carvalho MD, et al. The renoprotective effect of oral Tadalafil pretreatment on ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Acta Cir Bras*, 2017, 32(2): 90 - 97.
- [ 5 ] 易小敏, 张更, 马帅军, 等. 大鼠急性肾缺血再灌注损伤模型的建立与评估 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(21): 4027 - 4029.
- [ 6 ] Hauet T, Mothes D, Goujon JM, et al. Trimetazidine prevents renal injury in the isolated perfused pig kidney exposed to prolonged cold ischemia [J]. *Transplantation*, 1997, 64(7): 1082 - 1086.
- [ 7 ] Lv J, Feng M, Zhang L, et al. Protective effect of epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, against renal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47(8): 1429 - 1435.
- [ 8 ] 王程, 张炯, 李飞, 等. 百里醌对肾缺血再灌注损伤大鼠的作用及机制 [J]. *广东医学*, 2016, 37(13): 1929 - 1932.
- [ 9 ] 胡红林, 习小庆, 唐伟伟, 等. MicroRNA - 21 和 microRNA - 664 减轻肾缺血再灌注损伤的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(2): 19 - 25.
- [ 10 ] 杨永红, 袁鹏英, 张文博, 等. Apocynin 对缺血再灌注后急性肾损伤的保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(5): 46 - 49.
- [ 11 ] Skrypnik NI, Harris RC, de Caestecker MP, et al. Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice [J]. *J Vis Exp*, 2013, 78: 50495

[ 收稿日期 ] 2018 - 01 - 23