

孟红旭,林力,马彦雷,等.高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型的建立和评价[J].中国比较医学杂志,2023,33(5):15-23.

Meng HX, Lin L, Ma YL, et al. Establishment and evaluation of a rat model of chronic kidney disease with hyperhomocysteinemia [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 15-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.003

高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型的建立和评价

孟红旭,林力,马彦雷,史跃,刘建勋*,李磊*

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,国家中医心血管病研究中心,中药药理北京市重点实验室,北京 100091)

【摘要】 目的 采用高蛋白氨基酸喂养和 5/6 肾摘除建立高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型并对该模型进行评价。**方法** 大鼠随机分为 4 组:假手术组、高蛋白氨基酸组、单纯肾摘组、复合模型组。分别采用高蛋白氨基酸饲料喂养建立高同型半胱氨酸血症模型、5/6 肾摘除建立慢性肾病模型以及复合两种方法建立高同型半胱氨酸血症慢性肾病模型,测定大鼠动脉血压、超声心动图、血清生化指标水平;观察离体胸主动脉血管环的张力变化和 $p\text{-p}85$ 、 $p\text{-Akt}$ 及 $p\text{-eNOS}$ (Ser1177)蛋白表达的差异;HE 染色观察肾组织、心肌组织和主动脉组织的病理改变。**结果** 与假手术组比较,三组模型动脉血压均能够持续性显著升高 ($P<0.01$),复合模型组的血压明显高于高蛋白氨基酸组和单纯肾摘组 ($P<0.05$);与假手术组比较,三组模型心动超声指标 LVEDd、LVEDV、LVESV、SV 差异显著 ($P<0.05$);与假手术组比较,高蛋白氨基酸组和复合模型组动物血清同型半胱氨酸、蛋氨酸明显升高 ($P<0.01$),而单纯肾摘组和复合模型组动物血清肌酐、尿素氮、总胆固醇、高密度脂蛋白明显升高 ($P<0.05$),甘油三酯明显降低 ($P<0.05$);与假手术组比较,三组模型由血管舒张剂诱导的血管环舒张作用曲线均发生右移,而且复合模型组由乙酰胆碱和硝普钠诱导的 $E_{\max}$ 和 EC_{50} 较单纯模型组差异显著 ($P<0.05$);与假手术组比较,复合模型组主动脉组织中 $p\text{-Akt}$ 及 $p\text{-eNOS}$ 的表达有统计学意义 ($P<0.05$);三种模型动物肾组织、心肌组织和主动脉组织皆出现病理改变,复合模型病理改变更严重。**结论** 采用高蛋白氨基酸喂养和 5/6 肾摘除可以建立高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型,与单纯模型比较功能和形态学指标差异显著,可应用于高同型半胱氨酸血症慢性肾病的基础研究。

【关键词】 高同型半胱氨酸血症;慢性肾病;疾病动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0015-09

Establishment and evaluation of a rat model of chronic kidney disease with hyperhomocysteinemia

MENG Hongxu, LIN Li, MA Yanlei, SHI Yue, LIU Jianxun*, LI Lei*

(Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital China Academy of Chinese Medical Sciences, National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Beijing 100091, China)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of chronic kidney disease with hyperhomocysteinemia by high methionine feeding and 5/6 nephrectomy. Then, to evaluate the model by comparing it with the simple high methionine feeding model and simple nephrectomy model. **Methods** Five-week-old rats were randomly divided into four groups: sham, high methionine (feeding on a high methionine diet), nephrectomy (5/6 nephrectomy), and compound model

【基金项目】国家自然科学基金(81603335,82174015)。

【作者简介】孟红旭(1972—),男,副研究员,研究方向:中药心血管药理学。E-mail:amfd003@163.com

【通信作者】刘建勋(1955—),男,研究员,研究方向:中药心血管药理学。E-mail:liujx0324@sina.com

李磊(1982—),男,副研究员,研究方向:中药心血管药理学。E-mail:lilei0502@126.com

* 共同通信作者

(high methionine diet and 5/6 nephrectomy) groups. Arterial blood pressure, echocardiography, and serum biochemical indices were measured. Changes in the tension of isolated thoracic aortic vascular rings were observed and expression of *p*-p85, *p*-Akt, and *p*-eNOS (Ser1177) proteins was detected. HE staining was used to observe pathological changes in renal, myocardial, and aortic tissue. **Results** Compared with the sham group, arterial blood pressure of the three model groups increased continuously ($P < 0.01$). Arterial blood pressure of compound model group was significantly higher than high methionine group and nephrectomy group ($P < 0.05$). Compared with the sham group, echocardiography indexes LVEDd, LVEDV, LVESV, and SV of the three model groups were significantly different ($P < 0.05$). Compared with the sham group, serum homocysteine and methionine in high methionine and compound model groups were increased ($P < 0.01$), while, creatinine, urea nitrogen, total cholesterol, and high-density lipoprotein in serum were increased significantly ($P < 0.05$) and triglyceride was significantly decreased ($P < 0.05$) in nephrectomy and compound model groups. Compared with the sham group, vascular ring relaxation curves of model groups induced by vasodilators shifted to the right, and the $E_{\max}$ and EC_{50} of the relaxation effect induced by acetylcholine and sodium nitroprusside in the compound model group were significantly different from those in the simple model group ($P < 0.05$). Compared with the sham group, expression of *p*-Akt and *p*-eNOS in aortic tissue of the compound model group was statistically significant ($P < 0.05$). Pathological changes were observed in renal, myocardial, and aortic tissues of the model animals, among which the compound model group had more severe pathological changes. **Conclusions** A rat model of chronic kidney disease with hyperhomocysteinemia can be established by combining a high methionine diet and 5/6 nephrectomy. Compared with the simple models, the functional and morphological changes are significantly different in the compound model, which can be applied to fundamental research on chronic kidney disease with hyperhomocysteinemia.

【**Keywords**】 hyperhomocysteinemia; chronic kidney disease; disease animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性肾病常常并发心血管疾病,而且心血管疾病导致的死亡是终末期肾病死亡的主要原因^[1]。慢性肾病患者常出现高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy),近年来发现 HHcy 既是肾损伤又是心血管疾病发生发展的独立危险因素,而且慢性肾病患者心血管事件发生与同型半胱氨酸水平密切相关^[2]。目前,HHcy 如何引起慢性肾病患者的心血管病变的具体机理仍不清楚,因此复制高同型半胱氨酸血症慢性肾病动物模型可以为解决上述问题提供研究对象,对寻求新的干预策略和治疗靶点有着深远的意义。本研究采用联合高蛋白氨基酸喂养和 5/6 肾摘除建立高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型,并与单纯高蛋白氨基酸喂养复制的高同型半胱氨酸血症模型和单纯 5/6 肾摘除复制的慢性肾病模型进行了比较评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体重 200~220 g,5 周龄,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供[SCXK(京)2019-0010]。动物饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心流柜[SYXK(京)2018-0018],温度 20~25℃,相对湿度 40%~

70%,明/暗周期为 12 h/12 h,大鼠自由饮水进食。实验方案符合 3R 原则并究获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准(2018XLC003-2)。

1.2 主要试剂与仪器

磷酸化蛋白激酶 B 抗体(*p*-Akt,批号:HX17797)和磷酸化一氧化氮合成酶 3(内皮型)抗体(*p*-eNOS Ser1177,批号:HX17030)抗体由华兴博创生物技术公司提供;磷酸化磷脂酰肌醇激酶抗体(*p*-p85,批号:Ab191606)由 Abcam 公司提供;大鼠维持饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供;一氧化氮(NO)测试盒(批号:20180823)和一氧化氮合成酶(eNOS)测试盒(批号:20180829)均购自南京建成生物工程研究所。动物血压计(MBP-98A,日本 Softron 公司);小动物超声仪(Vevo 2100,加拿大 VisualSonics 公司);生理记录仪(MP150,美国 BIOPAC 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

大鼠随机分为四组:(1)假手术组(Sham group),正常饲料+假手术;(2)高蛋白氨基酸组(Met group),蛋氨酸饲料+假手术;(3)单纯肾摘组(Nx group),正常饲料+5/6 肾摘除;(4)复合模型组(Nx+Met group),蛋氨酸饲料+5/6 肾摘除。

1.3.2 造模和给药

动物适应性喂养 1 周后单纯肾摘组 (Nx group) 和复合模型组 (Nx+Met group) 分两阶段进行 5/6 肾摘除术: 采用戊巴比妥钠 (生理盐水配制成 0.3% 溶液, 1 mL/100 g 给药) 腹腔麻醉大鼠, 手术大鼠采用右侧卧位, 将左肾区剃毛消毒后, 切开皮肤皮下及腹膜后可从腹腔中牵出左肾, 将周围脂肪及肾包膜剥离后分别剪去左肾上下各 1/3 左右, 仅保留中间部分, 使用明胶海绵将剩余的肾进行压迫止血后逐层缝合。上述手术后 1 周进行第 2 次操作, 这次手术在右肾区进行, 充分暴露右肾后, 夹住肾门血管并结扎, 然后摘除右肾, 逐层缝合。假手术组 (Sham group) 和高蛋氨酸组 (Met group) 动物只分离肾周围脂肪组织及包膜。高蛋氨酸组和复合模型组给予高蛋氨酸饲料 (2% L-蛋氨酸) 喂养。

1.3.3 动脉血压测定

动脉血压测定需要在固定的时间, 一般在早上 8:00~11:00 为宜。测定时将大鼠固定于特定保温桶 (38℃) 中至少 10 min, 将无创动物血压计的压脉套套至大鼠尾部近心端, 血压数据采集需要测定 3 次, 每次间隔 2 min, 数值取 3 次测量的均值。

1.3.4 心脏超声

实验结束前各组大鼠进行超声心动图检查。采用小动物超声仪进行 M 型超声心动图测量, 测量指标包括心率 (heart rate, HR)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end diastolic dimension, LVEDd)、左心室舒张末期容积 (left ventricular end diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end systolic dimension, LVESd)、左心室收缩末期容积 (left ventricular end systolic volume, LVESV)、每搏输出量 (stroke volume, SV)、射血分数 (ejection fraction, EF)、短轴缩短率 (fractional shortening, FS)、每分输出量 (cardiac output, CO)。

1.3.5 血清生化指标测定

实验结束腹主动脉取血, 常规制备血清, -80℃ 冻存。采用 LC-MS/MS 测定血清同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 和蛋氨酸 (methionine, Met) 含量^[3]。全自动生化仪测定总胆固醇 (total cholesterol, TC)、血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 及高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 含

量; 采用试剂盒检测血清 NO 和 eNOS 含量。

1.3.6 主动脉血管舒张功能测定

实验结束时, 麻醉动物迅速分离胸主动脉, 将胸主动脉切成 4~5 mm 的血管环, 置于克-亨氏液中, 保持 37℃ 恒温并通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体。用生理记录仪记录张力换能器传导的血管张力变化。首先在给与 1.5 g 张力负荷保持 90 min, 以稳定血管环的舒缩功能, 然后给与 KCl (40 mmol/L) 进行预收缩, 保留收缩性较好的血管环用于后续实验。采用去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE, 10⁻⁶ mol/L) 使血管环收缩, 待收缩强度到达平台后, 分别给与不同浓度的乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach, 10⁻⁹ ~ 10⁻⁴ mol/L)、硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP, 10⁻¹¹ ~ 10⁻⁶ mol/L) 和异丙肾上腺素 (isoprenaline, ISO, 10⁻⁹ ~ 10⁻⁴ mol/L), 记录血管张力随浓度变换的数值。血管舒张百分率为去甲肾上腺素诱导压力最大值与舒张后的比值。EC₅₀ 值设定为药物产生 50% 舒张效应时的浓度对数值, E_{max} 设定为药物产生最大舒张效应时的血管舒张率。这两个指标均根据量效关系曲线计算得出。

1.3.7 胸主动脉组织 p-p85、p-Akt 及 p-Ser1177 蛋白表达

横向截取主动脉组织, 按照 BCA 试剂盒说明书进行匀浆并高速离心后取上清液在酶标仪上测定蛋白浓度。根据蛋白分子量的大小, 选择 6%~10% 浓度的分离胶, 上样后采用 SDS-PAGE 电泳 (湿转法) 将样品中的蛋白转移至 PVDF 膜上, 采用磷酸化蛋白用封闭液封闭 1~2 h, 分别向封闭液中加入 p-p85、p-Akt 和 p-Ser1177 一抗 (皆为 1:1000 稀释), 置于 4℃ 冷藏箱内的摇台上缓慢摇动过夜, 充分洗涤 PVDF 膜后向封闭液内加入相应的二抗 (皆为 1:10 000 稀释) 孵育 1 h, 将 PVDF 膜放置于凝胶成像系统中上, 均匀滴加 ECL 工作液, 开始曝光检测, 以 GAPDH 为内参, 采用 Image J 软件对获得的灰度值进行统计处理。

1.3.8 病理 HE 染色

实验结束时, 取肾组织、心肌组织以及主动脉血管进行常规病理 HE 染色操作流程, 光镜下进行形态学观察。

1.4 统计学方法

所有数据用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计分析采用 SPSS 18.0 软件, 重复测量数据 (血压、舒张反应) 进行球形检验和方差分析。组间差异采用单因素方差分析, 当组间有差异时使用 Tukey's HSD

进行两两比较。 $P<0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 各组动物血压变化

各组动物在实验开始 0 周时动脉收缩压在同一水平。实验 2 周后三组模型组大鼠收缩压均呈现持续性升高,其中复合模型组和单纯肾摘组明显高于假手术组($P<0.01$),并且维持到实验结束。实验 4 周后,高蛋氨酸组动脉收缩压与假手术组比较差异显著($P<0.01$),并持续到实验结束。实验 8 周时,复合模型组的动脉收缩压明显高于高蛋氨酸组和单纯肾摘组($P<0.05$),见表 1。

各组动物动脉舒张压的变化与收缩压变化基本一致。实验 8 周时,复合模型组的动脉舒张压明显高于高蛋氨酸组($P<0.01$),与单纯肾摘组比较未见明显差异($P>0.05$),见表 2。

2.2 各组动物超声心动图指标的变化

在超声心动图的 8 个指标中,三组模型大鼠心脏 LVEDd、LVEDV、LVESV、SV 与假手术组比较差异显著($P<0.01$ 或 0.05),复合模型组 CO 与假手术组比较也有明显差异($P<0.01$),见图 1 和表 3。

2.3 各组动物血清指标的变化

术后 8 周处死动物时,单纯肾摘组和复合模型

组动物较假手术组 BUN、Scr、TC 和 HDL-C 显著升高($P<0.05$),TG 显著降低($P<0.05$)。高蛋氨酸组和复合模型组动物 Hcy 和 Met 较假手术组差异显著($P<0.05$);与假手术组比较,各组动物血清 NO 含量和 eNOS 活性未见明显差异($P>0.05$)(表 4)。

2.4 各组动物主动脉血管舒缩功能的变化

内皮依赖性血管舒张剂 Ach、非内皮依赖性血管舒张剂 SNP 和 PKA 信号激动剂 ISO 皆可对 NE 诱导的动脉血管环收缩表现出剂量依赖性舒张。三组模型动物由 Ach 产生的血管环舒张曲线皆出现改变,表现为曲线的右移,在高蛋氨酸组和复合模型组曲线上,Ach 多个浓度的舒张强度较假手术组明显减弱($P<0.05$),三组模型动物血管环的 $E_{\max}$ 较假手术组也明显减弱($P<0.05$),其中复合模型组 Ach 多个浓度的舒张强度和 $E_{\max}$ 较高蛋氨酸组或单纯肾摘组差异显著($P<0.05$),见图 2A 和表 5。三个模型组 SNP 引起的血管环舒张曲线也表现为右移,单纯肾摘组和复合模型组 SNP 多个浓度的舒张强度较假手术组明显减弱($P<0.05$),其中复合模型组多个浓度的舒张强度和 $E_{\max}$ 较高蛋氨酸组和单纯肾摘组减弱程度更加明显($P<0.05$)见图 2B 和表 5。三个模型组 ISO 引起的血管环舒张曲线也表现为右移,单纯肾摘组和复合模型组 ISO 多个浓度的

表 1 大鼠动脉收缩压变化($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Changes of systolic blood pressure in rats

分组 Groups	0 周 0 week	2 周 2 weeks	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
假手术组 Sham group	122.3±3.9	118.4±4.1	119.4±5.9	124.2±5.6
高蛋氨酸组 Met group	120.9±4.1	121.2±9.0	134.7±5.7**	134.9±4.3**
单纯肾摘组 Nx group	124.0±6.6	130.9±7.7**	147.8±6.3**	152.5±6.1**
复合模型组 Nx+Met group	128.6±5.0	137.2±5.2**	149.0±5.8**	157.2±6.0**##&

注:与假手术组比较, ** $P<0.01$;与高蛋氨酸组比较, ## $P<0.01$;与单纯肾摘组比较, & $P<0.05$ 。
Note. Compared with the sham group, ** $P<0.01$. Compared with the Met group, ## $P<0.01$. Compared with the Nx group, & $P<0.05$.

表 2 大鼠动脉舒张压变化($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 2 Changes of diastolic blood pressure in rats

分组 Groups	0 周 0 week	2 周 2 weeks	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
假手术组 Sham group	82.1±6.5	75.9±8.3	84.3±7.4	91.8±7.8
高蛋氨酸组 Met group	82.3±4.8	86.9±12.7	107.2±10.4**	106.0±5.4**
单纯肾摘组 Nx group	86.1±8.5	97.7±6.8**	112.0±7.8**	114.9±9.1**
复合模型组 Nx+Met group	88.8±10.8	98.6±8.8**	108.7±7.1**	112.2±8.8**##

注:与假手术组比较, ** $P<0.01$;与高蛋氨酸组比较, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the sham group, ** $P<0.01$. Compared with the Met group, ## $P<0.01$.

舒张强度和 EC_{50} 较假手术组差异显著 ($P<0.05$), 复合模型组多个浓度的舒张强度较高蛋氨酸组和单纯肾摘组减弱程度更加明显 ($P<0.05$), 见图 2C 和表 5。

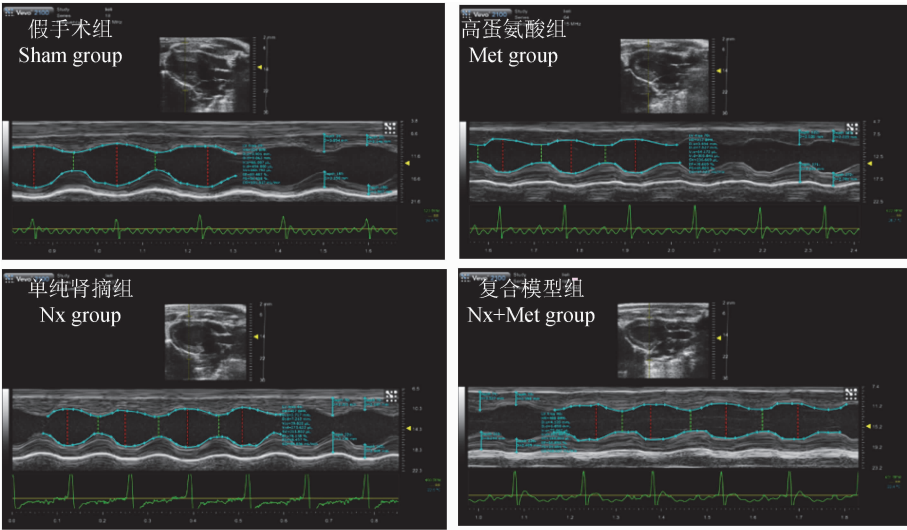


图 1 大鼠超声心动图变化

Figure 1 Changes of echocardiography in rats

表 3 大鼠超声心动指标的变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Changes of echocardiography parameters in rats

心动指标 Echocardiography parameters	假手术组 Sham group	高蛋氨酸组 Met group	单纯肾摘组 Nx group	复合模型组 Nx+Met group
HR (BPM)	380.3±48.6	381.2±46.8	379.1±61.2	374.3±68.2
LVESd (mm)	82.3±4.8	86.9±12.7	107.2±10.4**	106.0±5.4**
LVEDd (mm)	86.1±8.5	97.7±6.8**	112.0±7.8**	114.9±9.1**
LVESV (μL)	88.8±10.8	98.6±8.8**	108.7±7.1**	112.2±8.8***
LVEDV (μL)	282.5±44.3	278.2±47.7**	265.4±67.6**	276.9±47.0**
SV (μL)	240.5±20.1	233.3±30.6*	217.1±58.6**	218.3±42.5**
EF (%)	82.6±7.7	84.6±7.8	81.8±4.2	78.7±5.4
FS (%)	54.0±9.7	56.4±9.6	52.3±4.9	49.0±5.3
CO (mL/min)	91.3±10.4	89.4±17.1	86.9±27.8	80.9±19.4**

注:与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与高蛋氨酸组比较, *** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the Met group, *** $P<0.01$.

表 4 大鼠血清指标含量变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Changes of lipid indexes in rat serum

血清指标 Lipid indexes	假手术组 Sham group	高蛋氨酸组 Met group	单纯肾摘组 Nx group	复合模型组 Nx+Met group
Hcy (μmol/L)	1.66±0.90	7.32±5.22*	1.60±1.24	10.04±5.96**
Met (μmol/L)	13.68±6.26	64.09±49.29*	14.56±6.32	42.77±25.35*
NO (μmol/L)	37.55±4.09	36.40±4.52	34.78±5.17	38.76±2.47
eNOS (U/mL)	44.75±3.82	44.14±3.29	43.07±3.27	44.40±4.00
BUN (mmol/L)	6.1±0.9	7.6±2.4	11.8±1.8**	12.0±1.4**
CREA (μmol/L)	29.0±2.9	32.8±7.6	50.8±7.8**	49.9±4.8**
CHO (mmol/L)	1.36±0.19	1.40±0.19	1.70±0.37**	1.74±0.19**
TG (mmol/L)	0.60±0.25	0.55±0.21	0.44±0.16**	0.41±0.14*
HDL-C (mmol/L)	0.79±0.11	0.87±0.11	1.06±0.21**	0.99±0.15*
LDL-C (mmol/L)	0.28±0.05	0.24±0.05	0.35±0.12	0.30±0.07

注:与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

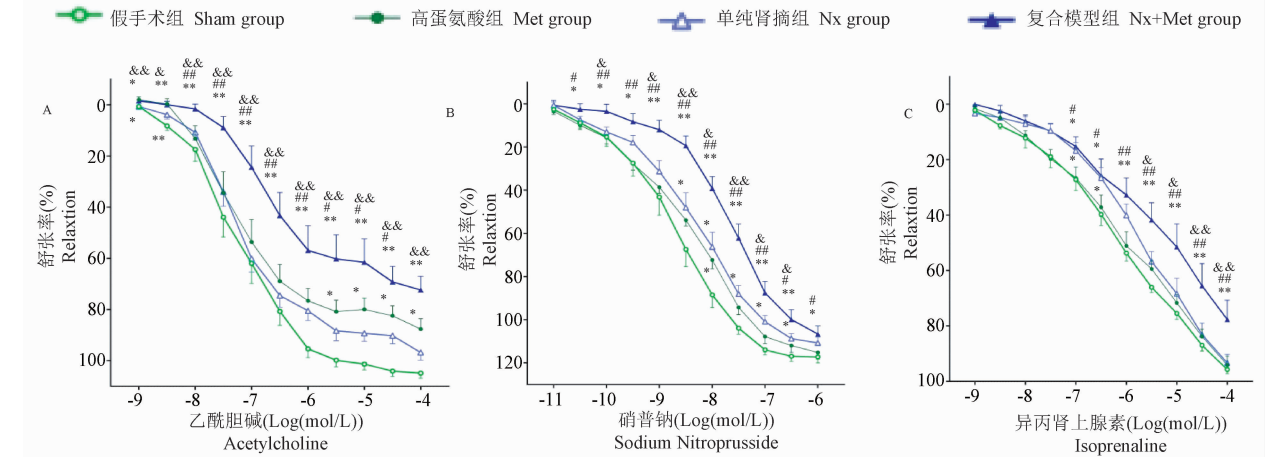
2.5 各组动物主动脉组织 PI3K/Akt/eNOS 信号通路磷酸化水平的变化

大鼠血管组织 Western blot 结果显示,与假手术组比较 3 个模型组反映 PI3K/Akt/eNOS 信号通路磷酸化水平的蛋白 *p*-Akt 和 *p*-Ser177 呈升高趋势,复合模型组这两种蛋白的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3)。

2.6 各组病理形态学变化

假手术组动物肾皮髓质结构清晰,肾小管上皮细胞及肾小球未见明显病理改变。高蛋氨酸组动物肾可见少量肾小管上皮细胞嗜碱性变,萎缩,少量淋巴细胞浸润。单纯肾摘组动物肾可见较多淋巴细胞浸润,肾小管上皮细胞萎缩,嗜碱性变,可见纤维组织增生。复合模型组组动物肾病变较重,见大范围的肾小管上皮细胞萎缩,嗜碱性变;肾间质

可见大量炎细胞浸润伴明显纤维组织增生,结果见图 4A。假手术组心脏示心肌纤维排列整齐,闰盘隐约可见,未见明显病理改变;高蛋氨酸组心脏出现小灶炎细胞浸润。单纯肾摘组心脏均可见局灶心肌纤维溶解和纤维组织增生,闰盘病变部位不明显。复合模型组心肌可见大范围较广的肌纤维断裂、溶解和炎细胞浸润,伴有纤维组织增生,见图 4B。假手术组动物血管管壁厚度较为均匀一致,管壁弹力纤维排列整齐,清晰可见。高蛋氨酸组动物血管管壁局部增厚,弹力纤维消失,排列紊乱。单纯肾摘组动物血管管壁厚度较为一致,弹力纤维排列整齐,清晰可见。复合模型组动物血管管壁中膜增厚,中膜和外膜均可见纤维组织增生伴玻璃样变和硬化,外膜可见少量淋巴细胞浸润,实验结果见图 4C。



注:A:乙酰胆碱的作用;B:硝普钠的作用;C:异丙肾上腺素的作用。与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与高蛋氨酸组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与单纯肾摘组比较, & $P<0.05$, && $P<0.01$ 。

图 2 乙酰胆碱、硝普钠、异丙肾上腺素诱导的主动脉血管环舒张曲线 ($n=10$)

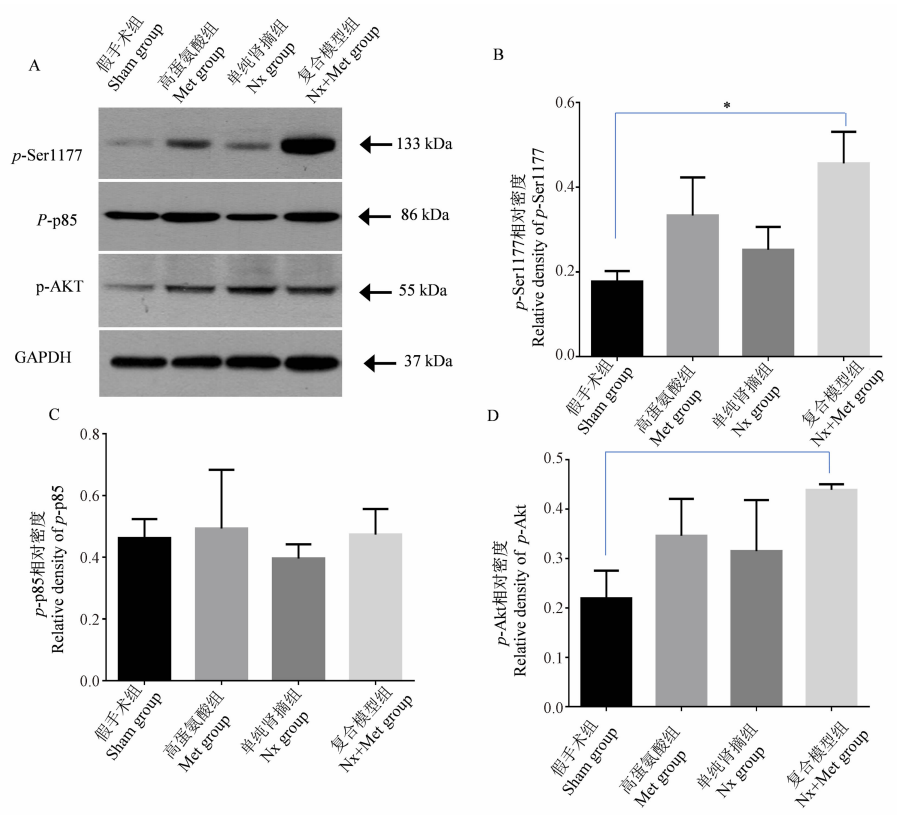
Note. A, Effects of Acetylcholine. B, Effects of Sodium Nitroprusside. C, Effects of Isoprenaline. Compared with the sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the Met group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the Nx group, & $P<0.05$, && $P<0.01$.

Figure 2 The relaxation curves of isolated thoracic aortic vascular ring induced by Ach、SNP、ISO

表 5 Ach、SNP、ISO 诱导的主动脉血管环舒张效应的 EC_{50} 及 E_{max}

分组 Groups	乙酰胆碱 Acetylcholine					
	EC_{50} (Log (mol/L))			E_{max} (%)		
假手术组 Sham group	-7.26±0.45	103.81±7.38	-8.63±0.56	121.04±11.71	-6.18±0.29	100.52±9.75
高蛋氨酸组 Met group	-7.28±0.56	88.47±9.58 **	-8.36±0.33	123.36±11.57	-5.88±0.62	106.29±14.99
单纯肾摘组 Nx group	-7.22±0.42	91.71±11.81 *	-8.17±0.64	119.04±19.88 *	-5.60±0.48 *	108.80±18.43
复合模型组 Nx+Met group	-6.76±0.50 ** &&	73.55±12.62 ** &&	-7.66±0.27 *** &&	114.49±7.58 ** &&	-4.75±1.61 *	106.14±10.06

注:与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与高蛋氨酸组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与单纯肾摘组比较, & $P<0.05$, && $P<0.01$ 。
Note. Compared with the sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the Met group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the Nx group, & $P<0.05$, && $P<0.01$.



注:A:Western blot 检测蛋白表达;B:*p*-Ser117 相对密度;C:*p*-Akt 相对密度;D:*p*-p85 相对密度。与假手术组比较, **P*<0.05。

图 3 各组血管 *p*-Ser117、*p*-Akt 及 *p*-p85 蛋白表达 (*n*=3)

Note. A, Protein expression detected by Western blot. B, *p*-Ser117 relative density. C, *p*-Akt relative density. D, *p*-p85 relative density. Compared with the sham group, **P*<0.05.

Figure 3 Protein expression of *p*-Ser117, *p*-Akt and *p*-p85 in isolated thoracic aortic vascular ring

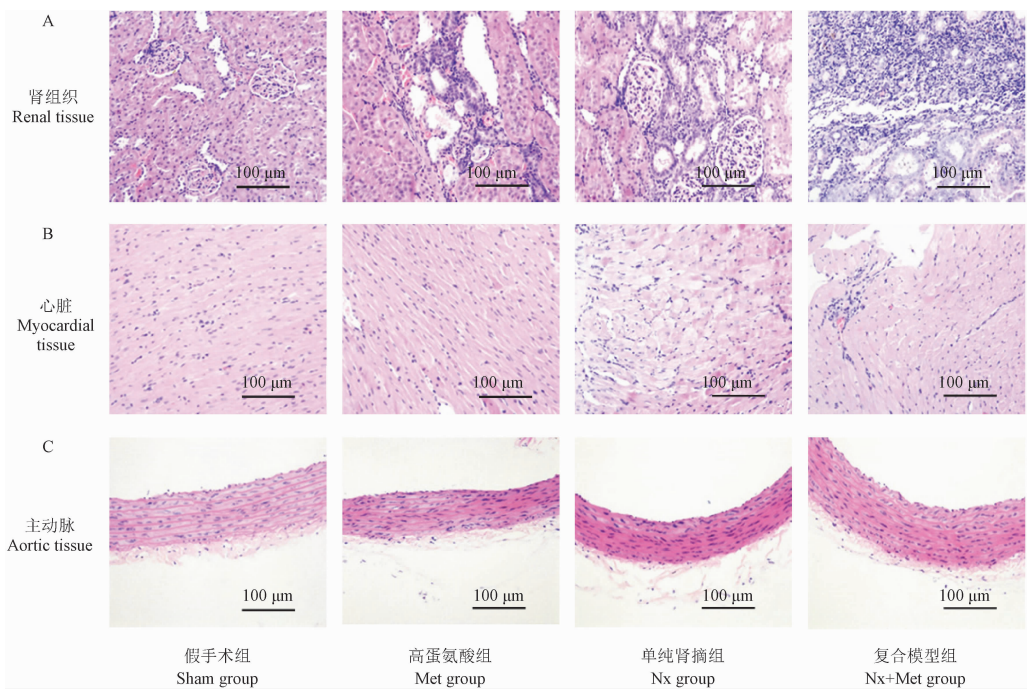


图 4 大鼠肾组织、心脏及主动脉 HE 染色

Figure 4 HE staining in renal tissue, myocardial tissue and aortic tissue

3 讨论

慢性肾病患者易发生心脏损害,而且心脏损害是慢性肾病患者死亡的主要原因,这种表现临床上称为Ⅳ型心肾综合征^[4]。慢性肾病在发展过程中会出现神经内分泌功失衡,电解质及酸碱平衡紊乱、毒素蓄积及炎症反应等情况,通过上述多种机制共同影响心脏功能,导致心血管损伤,但是这些发病因素如何引发心血管病变并不完全清楚^[5]。高同型半胱氨酸血症常并发于慢性肾病,一项一万七千余例的临床数据显示慢性肾病患者血清同型半胱氨酸水平越高其肾小球滤过率越低,提示血清同型半胱氨酸水平与慢性肾病患者病情严重程度密切相关,另一项前瞻性临床研究显示血清同型半胱氨酸升高 5 $\mu\text{mol/L}$ 就会增加终末期肾病患者 7% 的死亡率和 9% 的心血管事件的发生概率^[6-7],而且血同型半胱氨酸水平还可反映慢性心力衰竭和急性心肌梗死患者病情的严重程度^[8],这些证据表明高同型半胱氨酸血症在慢性肾病并发心脏损害的病理过程中可能扮演重要角色。而以高同型半胱氨酸血症慢性肾病动物模型作为研究对象,对慢性肾病过程中同型半胱氨酸血症对机体,特别是心血管系统的病理生理变化的深入研究,有助于理解慢性肾病引发心血管病变的作用机制,对寻求新的干预策略和治疗靶点有着深远的意义。单纯 5/6 肾摘除复制的慢性肾病模型是常用的动物模型,但是这种模型动物血清同型半胱氨酸含量未见明显升高。有报道蛋氨酸灌胃可制备高同型半胱氨酸血症大鼠模型^[9],因此我们采用联合高蛋氨酸喂养和 5/6 肾摘除建立高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型,并与单纯高蛋氨酸喂养复制的高同型半胱氨酸血症模型和单纯 5/6 肾摘除复制的慢性肾病模型进行了比较评价。我们首先观察了各组模型动脉血压的动态变化和反映心脏功能的超声心动图的变化,结果显示无论单纯造模组和复合造模组大鼠动脉血压均呈现持续性升高,复合造模组在实验结束前动脉收缩压已明显高于单纯造模组,并且在实验结束前各模型组心功能指标皆出现明显下降。这些结果表明三种造模方法皆能够对心血管系统造成损伤,其种复合造模的损伤效应更加显著。接着我们比较了三组模型动物的血清生化指标变化,结果显示高蛋氨酸组和复合模型组动物血清同型半胱氨酸、蛋氨酸明显升高,而单纯肾摘组和复合

模型组动物血清肌酐、尿素氮、总胆固醇、高密度脂蛋白明显升高,甘油三酯明显降低,表明复合模型动物兼具其它两种单纯模型的优势,既有明显的高同型半胱氨酸血症表现,也具有慢性肾病代谢紊乱的特点,更适合观察慢性肾病中并发高同型半胱氨酸血症的病理生理变化。在实验中我们发现单纯肾摘组和复合模型组动物甘油三酯明显降低,而高蛋氨酸组未见明显改变,考虑可能是手术造成了大鼠肾上腺组织损伤,引起肾上腺皮质功能低下,诱发甘油三酯代谢异常,具体机制仍需进一步探索。

我们的前期研究结果表明结合喂养蛋氨酸建立的慢性肾病大鼠模型主动脉的舒张功能出现缺陷^[10],本次研究显示三组模型动物主动脉血管环由三种血管舒张剂(乙酰胆碱、硝普钠、异丙肾上腺素)诱发的舒张作用曲线均右移,多个 $E_{\max}$ 和 EC_{50} 明显增加,表明模型组动物大血管的舒张功能下降,而且复合模型组的舒张功能下降效应更加显著,与前期研究结果相一致,也提示模型组大血管舒张功能下降可能是造成血压持续升高和心功能下降的重要原因。这些实验结果也同时显示复合模型组的舒张功能低下不仅兼具内皮依赖性和非内皮依赖性两种表现,还减弱了环核苷酸依赖性血管舒张作用。病理形态学研究结果显示复合模型组动物血管管壁中膜增厚,中膜和外膜均可见纤维组织增生伴玻璃样变和硬化,体现了 Hcy 诱发血管重塑的病理生理特点。Hcy 诱发血管重塑的机制被认为是 Hcy 能够通过直接损伤血管细胞膜和促进膜磷脂代谢失衡促进血管免疫炎症,造成内皮细胞功能障碍并促进血管平滑肌细胞增殖和迁移^[11-12]。近年来研究显示 PI3K/Akt/eNOS 通路在 HHcy 导致内皮功能异常和血管平滑肌细胞增殖迁移中起到重要作用^[13-14]。我们的结果显示复合模型组血管组织中反映 PI3K/Akt 信号通路磷酸化水平的相关蛋白 p-Akt 及 p-Ser177 的表达明显升高,p-Ser177 的磷酸活化上调表明 NOS 活性增强,虽然我们的数据未发现模型动物血清中 NO 和 eNOS 出现明显变化,但是结合模型动物仍存在明显血管舒张低下的特征提示复合模型动物存在 NO 的生物利用度降低,这与一些研究的结论相一致^[15]。我们的病理形态学结果也显示出模型动物在心脏和肾组织的损伤较单纯模型组损伤更严重,这些器质性的改变可能是模型组心脏功能和肾功能指标下降的基本原因。

综上所述我们的研究联合采用高蛋氨酸喂养和 5/6 肾摘除可以建立高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型,与单纯模型比较功能和形态学指标差异显著,可应用于高同型半胱氨酸血症慢性肾病的基础研究。

参考文献:

[1] Bazyluk A, Malyszko J, Zbroch E. Cardiovascular risk in chronic kidney disease: what is new in the pathogenesis and treatment? [J]. Postgrad Med, 2018, 130(5): 461-469.

[2] 李忆, 张艳宁. 同型半胱氨酸在慢性肾脏病心血管疾病发生发展中研究进展 [J]. 中国现代医生, 2020, 58(22): 186-192.

[3] 李磊, 孟红旭, 林力, 等. 双参芎归颗粒对高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠血管舒张及 PI3K/Akt/eNOS 通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 88-97.

[4] 阎保伟. 心肾综合征机制及临床药物治疗研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2020, 33(6): 1272-1274.

[5] 刘茜, 周华, 瞿惠燕, 等. 心肾综合征发病机制和治疗的研究进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26(2): 1-5.

[6] Cohen E, Margalit I, Shochat T, et al. The relationship between the concentration of plasma homocysteine and chronic kidney disease: a cross sectional study of a large cohort [J]. J Nephrol, 2019, 32(5): 783-789.

[7] Wu CC, Zheng CM, Lin YF, et al. Role of homocysteine in end-stage renal disease [J]. Clin Biochem, 2012, 45(16-17): 1286-1294.

[8] 杨永丽, 王小雪, 周荣. 同型半胱氨酸与心肾急危重症疾病关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2022, 28(11): 2179-2182.

[9] 代渊, 魏江平, 潘婷, 等. 蛋氨酸灌胃制备高同型半胱氨酸血症大鼠模型研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(12): 1697-1700.

[10] Li L, Hasegawa H, Inaba N, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia impairs vasodilation in 5/6-nephrectomized rats [J]. Amino Acids, 2018, 50(10): 1485-1494.

[11] 王宪, 冯娟. 免疫代谢与血管重塑-高同型半胱氨酸血症的作用 [J]. 中国科学: 生命科学, 2022, 52(5): 740-747.

[12] Sun W, Pang Y, Liu Z, et al. Macrophage inflammasome mediates hyperhomocysteinemia-aggravated abdominal aortic aneurysm [J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 81: 96-106.

[13] 纪昕, 王鑫, 岳晓乐, 等. eNOS、CAV1、PI3K/Akt 信号通路在同型半胱氨酸促进大鼠血管平滑肌细胞迁移、增殖中的作用研究 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(12): 1469-1473.

[14] Liu S, Sun Z, Chu P, et al. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways [J]. Apoptosis, 2017, 22(5): 672-680.

[15] 陈仁富, 刘广交. 血清同型半胱氨酸与冠心病的相关性及其致病机制探讨 [J]. 北方药学, 2015, 12(7): 115-116.

[收稿日期] 2022-06-30