

· 技术方法 ·

高磷饮食+5/6肾切除制备慢性肾衰竭继发甲状旁腺功能亢进大鼠模型

李 丹, 赵学智* (第二军医大学长征医院肾内科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 构建慢性肾衰竭继发甲状旁腺功能亢进大鼠模型, 为研究肾性甲旁亢的发病机制及治疗奠定基础。 **方法:** 36只8~10周龄健康雄性SD大鼠, 体质量200~250g, 随机分为6组($n=6$): 5/6肾切除高磷饲料组(STNx+HP); 5/6肾切除低磷饲料组(STNx+LP); 5/6肾切除正常磷饲料组(STNx+NP); 假手术高磷饲料组(Sham+HP); 假手术低磷饲料组(Sham+LP); 假手术正常磷饲料组(Sham+NP)。肾切除组大鼠分两步进行肾脏切除, 术前1周及2次手术后7、14、21、28d在大鼠眼内眦静脉取血, 分别检测大鼠血清中血磷(P)、全段甲状旁腺素(iPTH)水平。术后4周取大鼠残余肾脏及甲状腺与甲状旁腺的复合体, 进行病理组织学检查。 **结果:** STNx+NP组、STNx+LP组和STNx+HP组术后存活大鼠数分别为5只、4只和4只; 假手术各组大鼠未见死亡。肾切除组术后各时段血清iPTH水平均高于术前和各自假手术组($P<0.05$); STNx+HP组血清iPTH水平明显高于STNx+NP组和STNx+LP组($P<0.05$)。STNx+HP组术后各时段血清P水平高于术前和Sham+HP组($P<0.05$); 而STNx+NP组、STNx+LP组与各自假手术组无显著差异, 且均低于STNx+HP组($P<0.05$)。STNx+HP组大鼠术后28d组织病理学观察可见肾小球纤维化及硬化; 甲状旁腺组织观察可见腺体增大, 腺体中主要见主细胞及甲状旁腺嗜酸性细胞。 **结论:** 高磷饮食合并5/6肾切除可建立大鼠慢性肾功能衰竭继发甲状旁腺功能亢进模型, 具有动物成本低, 操作方法简便, 实验周期短, 动物死亡率低等优点。

[关键词] 肾功能衰竭, 慢性; 甲状旁腺功能亢进症, 继发性; 高磷; 5/6肾切除; 模型, 动物

[中图分类号] R 692.5; R 582.1

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)07-0784-03

High phosphorus foods combined with 5/6 nephrectomy for establishing rat hyperparathyroidism model secondary to chronic renal failure

LI Dan, ZHAO Xue-zhi* (Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a rat hyperparathyroidism model secondary to chronic renal failure, so as to lay a foundation for studying the mechanism and treatment of secondary hyperparathyroidism. **Methods:** Thirty-six male Sprague-Dawley rats, weighing 200-250 g, were randomly divided into 6 groups: 5/6 nephrectomy plus high phosphorus food group (STNx + HP), 5/6 nephrectomy plus low phosphorus food group (STNx + LP), 5/6 nephrectomy plus normal phosphorus food group (STNx + NP), sham operation plus high phosphorus food group (Sham + HP), sham operation plus low phosphorus food group (Sham + LP), and sham operation plus normal phosphorus food group (Sham + NP). Nephrectomy was performed in 2 steps. Serum phosphorus levels (P) and iPTH levels were detected at day 7 pre-operation and day 7, 14, and 21 after the second operation. The kidneys, thyroid glands and parathyroid glands complex underwent pathological analysis 4 weeks after operation. **Results:** Five patients survived in STNx+NP group, 4 in STNx+LP group and 4 in STNx+HP group postoperatively. No death occurred in sham operated groups. Serum phosphorus levels of nephrectomy groups at different time points after operation were higher than those before operation and those of sham operation groups ($P<0.05$). Serum phosphorus level of STNx+HP group was obviously higher than those before operation and Sham + HP group ($P<0.05$); those of STNx+NP and STNx+LP were similar to those of Sham + NP and Sham + LP group, respectively; but were both lower than that of STNx+HP group ($P<0.05$). Pathological analysis demonstrated renal glomerulus putty denaturalization and sclerosis. Histological examination of parathyroid glands revealed gland hypertrophy, mostly adlemorphous cells and acidophilia cells, in STNx+NP group 28 d after operation. **Conclusion:** Nephrectomy plus high phosphorus foods can be used to establish hyperparathyroidism model secondary to chronic renal failure in rats, with low cost, simple operation, short experiment cycle and low animal mortality.

[KEY WORDS] kidney failure, chronic; hyperparathyroidism, secondary; high phosphorus; 5/6 nephrectomy; models, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7): 784-786]

继发性甲状旁腺功能亢进(SHPT)是慢性肾功能衰竭(CRF)的重要并发症, 是导致患者生活及生存质量降低的重要原因^[1], 为研究肾性甲旁亢的甲状旁腺细胞病理机制的发

[基金项目] 上海市科委重大项目(0452NM035)。Supported by Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(0452NM035)。

[作者简介] 李 丹, 硕士生, E-mail: danli-sh@tom.com

* Corresponding author. E-mail: zh_xz@tom.com

生发展因素以及进一步研究肾性甲旁亢的基因治疗需要建立肾性甲旁亢的动物实验模型。为此,我们根据国内外研究并加以改进,探讨采取高磷饮食与手术相结合的方式建立慢性肾衰竭继发甲旁腺功能亢进的大鼠模型的可行性,为进一步研究慢性肾衰竭继发甲旁腺功能亢进症奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及其分组 选取36只8~10周龄的雄性SD大鼠,体质量在200~250 g(第二军医大学实验动物中心),分笼饲养(第二军医大学动物中心标准动物房),随机分为6组,每组6只。分别为:5/6肾切除高磷饲料组(STNx+HP);5/6肾切除低磷饲料组(STNx+LP);5/6肾切除正常磷饲料组(STNx+NP);假手术高磷饲料组(Sham+HP);假手术低磷饲料组(Sham+LP);假手术正常磷饲料组(Sham+NP)。

1.2 磷饲料的配置 大鼠饲料(海军医学研究所饲料配置中心)中磷、钙含量比例参照美国营养学会1993年AIN-93G标准^[2]及2003年国内王小兵等^[3]研究结果制备大鼠饲料:高磷(含磷1.2%,含钙1.6%),低磷(含磷0.2%,含钙0.5%),正常磷(含磷0.5%,含钙0.9%)。详见表1。

表1 低磷、高磷饲料配方

Tab 1 Low phosphorus and high phosphorus diets recipe

Content	(g/kg)	
	Low phosphorus	High phosphorus
Corn starch	499.486	499.486
Casein	200	200
Sucrose	69.457	69.457
Soybean oil	70	70
Cellulose	89.503	50.378
Mineral mixing oil(AIN-93-MX)	35	35
Vitamin mixture(AIN-93-VX)	10	10
L-cysteine	3.0	3.0
Choline acid tartrate	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinol	0.014	0.014
Calcium phosphate dibasic	2.457	46.336
Calcium carbonate	10.683	5.926
Potassium citrate	7.9	7.9

1.3 动物模型的制备 取随机分好的假手术组大鼠6只,正常饮食适应喂养1周后,STNx+HP与Sham+HP组术前行高磷饮食,STNx+NP与Sham+NP组术前行正常磷饮食,STNx+LP与Sham+LP组术前行低磷饮食,不同比例的饲料持续喂养大鼠,直到大鼠死亡。STNx组喂养配置的不同比例饲料半个月后行5/6肾脏切除^[4]。肾脏切除分两步进行:戊巴比妥30~35 mg/kg腹腔注射麻醉,局部剪毛,常规皮肤消毒,背左侧或腹部切口充分暴露左侧肾脏,剥离肾包膜,在无菌条件下手术切除左肾皮质2/3,首次术后1~2周切除整个右肾,两侧手术总计切除全部肾脏的5/6,术后予抗生素3 d。假手术(Sham)组喂养配置的不同比例饲料半个月后,采取同样步骤,麻醉、背部斜切口暴露肾脏,但不作肾切除。

1.4 标本的收集及血清生化指标检测 术前1周及术后7、14、21、28 d取大鼠眼内眦静脉血,分别用日立全自动生化分析仪检测大鼠血清中血磷(P),化学发光酶免分析仪(购于美国DPC公司)测全段甲状旁腺素(iPTH)。

1.5 组织病理学检查 术后4周后将手术组与假手术组大鼠每组取2只处死,取出残余肾脏及甲状旁腺复合体,甲醛固定,行病理组织学检查。取大鼠残余肾脏及甲状腺与甲状旁腺复合体标本,10%甲醛固定,常规脱水,透明,石蜡浸蜡,包埋,切片,H-E染色,光镜观察。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据之间比较采用组间t检验,三组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 手术情况 STNx+HP组6只大鼠中4只大鼠术后无出血和感染,其余2只大鼠术后第2天死亡,大鼠尸体解剖发现大鼠胃肠道梗阻胀气,考虑大鼠术后肠蠕动差,肠麻痹,过早进食引起肠道梗阻、胀气,继而引起肠坏死而致大鼠死亡。STNx+LP组6只大鼠中4只存活,2只大鼠死于术后出血,解剖大鼠尸体可见腹膜后血肿,考虑残余肾脏结扎线脱落。STNx+NP组6只大鼠中5只存活,1只术后死于出血。假手术各组大鼠未见大鼠死亡。

2.2 生化指标检测结果 肾切除组术后各时段血清iPTH水平均高于各自假手术组($P < 0.05$);STNx+HP组血清iPTH水平明显高于STNx+NP组和STNx+LP组($P < 0.05$)。STNx+HP组术后各时段血清P水平高于术前和Sham+HP组($P < 0.05$);而STNx+NP组、STNx+LP组与各自假手术组无显著差异,且均低于STNx+HP组($P < 0.05$)。详见表2。

2.3 病理组织学检查结果 STNx+HP组大鼠术后28 d组织病理学观察可见残余肾脏代偿性增大,镜检可见肾小球毛细血管扩张,内皮细胞肥大伴有足突水肿融合,系膜基质增生,大量上皮、内皮细胞坏死,毛细血管腔消失的肾小球纤维化及硬化(图1A)。甲状旁腺解剖可见腺体增大,组织病理检查可见甲状旁腺中主要是主细胞,可见甲状旁腺嗜酸性细胞(图2B),未见脂肪细胞。

3 讨论

1989年Sancho等^[5]采取肾结扎左侧肾动脉分支,7 d后切除右侧肾脏的方法成功建立了大鼠肾性甲旁亢动物模型。2003年García-Rodríguez等^[6]用巴龙霉素(neomycine, 60 mg/kg,肌肉注射,48 h/次,32周)成功诱导猎犬致慢性肾衰竭继发甲旁亢的动物模型,2004年白荣杰等^[7]给实验兔高磷饮食建立原发性甲状旁腺功能亢进的动物模型,上述动物模型制作最大缺点是动物个体差异大,实验周期长,死亡率高。我们参考国内外资料并进行改良,予大鼠高磷饮食合并经典的5/6肾切除,建立慢性肾功能衰竭继发甲状旁腺功能亢进的大鼠模型。

表2 各组大鼠术后不同时段血生化指标

Tab 2 P($c_B/mm\text{ol} \cdot L^{-1}$) and iPTH($\rho_B/pg \cdot ml^{-1}$) analyses of 6 groups 28 d after operation

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	7 d post-operation		14 d post-operation		21 d post-operation		28 d post-operation	
		P	iPTH	P	iPTH	P	iPTH	P	iPTH
Sham+LP	6	2.2±0.45	32.88±12.54	2.04±0.55	32.67±12.54	2.09±0.25	31.55±12.54	2.08±0.55	31.67±12.54
STNx+LP	4	2.45±0.55	54.56±11.56*	2.55±0.32	55.49±14.56*	2.44±0.32	55.49±14.56*	2.48±0.32	58.49±12.34*
Sham+HP	6	3.21±0.45	33.43±9.54	3.43±0.22	39.43±8.54	3.39±0.22	42.43±8.54	3.43±0.22	45.43±8.63
STNx+HP	4	4.65±0.63*	78.56±23.65* Δ	4.87±0.58* Δ	84.22±30.65* Δ	4.84±0.48* Δ	88.2±30.65* Δ	4.92±0.58* Δ	92.2±25.65* Δ
Sham+NP	6	2.12±0.35	33.24±7.98	2.54±0.16	35.24±7.68	2.54±0.23	32.52±7.68	2.38±0.16	32.24±8.58
STNx+NP	5	2.26±0.36	59.55±12.64	2.28±0.36	62.55±9.64	2.45±0.36	68.55±9.64	2.48±0.36	62.55±9.64

* $P < 0.05$ vs Sham+LP or Sham+HP or Sham+NP group; $\Delta P < 0.05$ vs STNx+LP or STNx+NP group; P: Serum phosphorus level; iPTH: Intact parathyroid hormone level

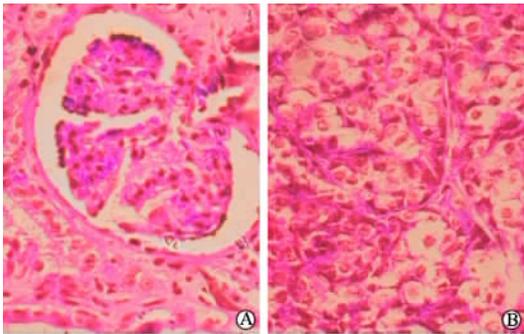


图1 STNx+HP组术后28d模型大鼠肾脏(A)和甲状旁腺组织(B)病理学观察

Fig 1 Kidney and parathyroid gland of modeling rat 28 d after operation (H-E, $\times 400$)

A: Renal glomerulus putty denaturalization and sclerosis; B: Histological examination of parathyroid glands revealed gland hypertrophy, mostly adenomatous cells

总结大鼠模型建立的整个过程,我们体会到高磷饲料的配置以及手术切除大鼠肾脏是关键。根据文献资料我们予大鼠高磷饮食(1.2%磷,1.6%钙),但有报道显示饲料中磷含量过高会影响钙的吸收^[8],故可适当调整钙的含量。总结经验,大鼠术后应禁食1~2d,观察大鼠排便后,逐渐予大鼠饮食,禁食期间大鼠可以少量饮水。术中改用明胶海绵压迫止血用于大鼠肾脏切除后止血效果较好,大鼠未再出现大量出血而致死。该模型对于高磷所致慢性肾衰继发甲旁亢的研究具有重要作用,且有动物成本低,操作方法简便,实验周期短,动物死亡率低等优点。

综上所述,本实验建立慢性肾功能衰竭继发甲状旁腺功能亢进的SD大鼠模型的方法是可行的,为进一步研究慢性肾衰竭继发甲旁亢奠定了基础。

[参考文献]

[1] Torres PU, Prie D, Beck L, et al. New therapies for uremic secondary hyperparathyroidism[J]. J Ren Nutr, 2006, 16:87-99.
 [2] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. J Nutr, 1993, 123:1939-1951.
 [3] 王小兵,王笑云,周富华. 自制含不同磷、钙量的大鼠实验饲料的研究[J]. 中华血液净化杂志, 2003, 2:436-438.
 [4] 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: 176-179.
 [5] Sancho JJ, Duh QY, Oms L, et al. A new experimental model for secondary hyperparathyroidism[J]. Surgery, 1989, 106:1002-1008.
 [6] Garcia-Rodriguez MB, Perez-Garcia CC, Rios-Granja MA, et al. Renal handling of calcium and phosphorus in experimental renal hyperparathyroidism in dogs[J]. Vet Res, 2003, 34:379-387.
 [7] 白荣杰,柳淑云,于天龙,等. 实验性原发性甲状旁腺机能亢进兔血清钙、磷、PTH水平分析[J]. 中国医科大学学报, 2004, 33: 209-211.
 [8] Denda M, Finch J, Slatopolsky E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure[J]. Am J Kidney Dis, 1996, 28:596-602.

[收稿日期] 2005-11-25

[修回日期] 2006-05-25

[本文编辑] 贾泽军