

· 综 述 ·

老年性肾间质纤维化动物模型研究新进展

王艳非,常晶,高云,侯原平,孙倩美*

(首都医科大学附属北京朝阳医院综合科,北京 100020)

【摘 要】 肾间质纤维化是老年慢性肾脏病的最终特征,也是导致肾功能衰竭的常见原因。为了解肾间质纤维化的病理生理学特征,使用动物模型至关重要。肾间质纤维化常见的动物模型包括:单侧输尿管梗阻模型、肾大部切除模型、缺血再灌注模型、环孢素 A 肾病模型、阿霉素肾病模型、马兜铃酸肾病模型等。我们对这些动物模型的研究进展进行汇总综述,以期为更好的开展基础研究奠定试验方法。

【关键词】 老年人;肾间质纤维化;动物模型

【中图分类号】 R692; R592

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.12.221

Recent progress in research with animal models for age-related renal interstitial fibrosis

WANG Yan-Fei, CHANG Jing, GAO Yun, HOU Yuan-Ping, SUN Qian-Mei*

(Department of Internal Medicine, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China)

【Abstract】 Interstitial fibrosis is the end-stage characteristic of chronic renal disease in the elderly and a common cause of renal failure. The use of animal models is essential for the understanding of the pathophysiology of renal interstitial fibrosis. The widely used animal models for this purpose include those with unilateral ureteral obstruction, subtotal nephrectomy, ischemia-reperfusion injury, cyclosporine A nephropathy, adriamycin nephropathy, stolochic acid nephropathy. These models were reviewed in this paper to provide a reference for the selection of a test method for better basic research.

【Key words】 aged; renal interstitial fibrosis; animal model

This work was supported by the Health Research Project of Beijing Municipality (Jing17-05) and Capital Residents Health Training Project of Science & Technology Commission of Beijing Municipality (Z171100000417055).

Corresponding author: SUN Qian-Mei, E-mail: sunqianmei5825@126.com

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是几乎所有进行性肾脏病发展至终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的最终特征^[1], RIF 的主要病理特征包括炎性细胞浸润、细胞外基质过度积聚、肾小管萎缩、成纤维细胞增殖等。然而, RIF 的机制仍不十分清楚,现有的治疗方法有限且疗效欠佳,因此,为了研究这种疾病的病理生理学机制、开发与评估新的治疗方法,需要建立 RIF 动物模型^[2]。目前关于 RIF 的诱导方法主要有手术诱导、化学诱导以及辐射肾病、基因突变肾病等其他动物模型建立方法。本文对目前常用的 RIF 动物模型作一综述,以期为开展基础研究奠定试验方法。

1 手术诱导模型

1.1 单侧输尿管梗阻动物模型

单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)被认为是研究 RIF 机制使用最广泛的模型。在 20 世纪 70 年代,兔的 UUO 被证明会导致肾间质成纤维细胞的增殖并转化为肌纤维母细胞。随后 UUO 动物模型逐渐被扩展和提炼,用以阐明梗阻性肾病以及解释肾纤维化的发病机制^[3]。大多数的肾脏细胞改变发生在术后 2~3 周,如上皮管状细胞损伤等,随后肾纤维化指标显著增加,如由巨噬细胞和肌成纤维细胞介导的炎症。这些细胞产生细胞因

收稿日期: 2018-07-12; 修回日期: 2018-09-07

基金项目: 北京市保健科研项目(京 17-05);北京市科委首都市民健康培育项目(Z171100000417055)

通信作者: 孙倩美, E-mail: sunqianmei5825@126.com

子和生长因子,包括转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 (interleukin-1, IL-1) 等,在 UUO 之后引发肾脏的炎症反应,诱导细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积和细胞凋亡等。其中最引人注目的是 TGF- $\beta 1$, 其表达上调被证明发生在动物和人类的几乎所有类型的纤维性肾脏疾病中^[4]。

目前大多数研究均采用 UUO 模型来评价 RIF 的治疗效果。用于实现 UUO 动物模型的手术技术相对简单,一般来说,这种模型的改变在小鼠中建立需要 7 d,在大鼠中建立需要 2~3 周^[3]。UUO 是目前研究 RIF 的理想模型,文献报道较多,成功率高,对动物损伤小、死亡率低。该方法简便,病变均一,有较好的重复性。然而大鼠 UUO 属于急性机械性损伤,不能适应肾小管和间质损伤及其纤维化的所有情况,但是该方法能够在短期内造成纤维化,就研究 RIF 的发病规律及机制探讨而言,是一种较为快速、可靠的动物模型^[2]。

1.2 肾大部切除动物模型

经常用 5/6 肾切除 (subtotal nephrectomy, STN) 模型来评估慢性肾功能衰竭进展的变化即肾纤维化^[5]。对于肾脏疾病的研究,可以通过两种方式:(1)单侧肾切除术+剩余肾脏的切除手术,从而导致大约 5/6 肾组织减少;(2)单侧肾切除术+对侧肾动脉的 2 个分支的完整结扎,总共产生 5/6 肾组织减少^[6]。在 STN 模型中,残余的肾单位增加其过滤率以保持排泄功能,当残余的肾单位不能完成这种排泄功能时就会发生肾功能不全。随着时间的推移,这些动物会出现系统综合征、蛋白尿及基质扩张等,12 周后在最初健康的残余肾单位中出现了进行性肾小球硬化和间质纤维化^[7]。

此模型是研究慢性肾脏病特异性机制的优秀模型,并为评估潜在的新疗法提供了可能。然而,这种模型是受限的,原因是手术困难和动物死亡率较高,且大量肾组织突然丧失在人类疾病中很少发生^[2]。

1.3 缺血-再灌注动物模型

缺血-再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IR) 是一种急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)。AKI 是一个严重的临床问题,可导致高死亡率、ESRD 的发生^[8]。在 IR 过程中,可发生一系列的事件,如肾小管上皮细胞凋亡和坏死、活性氧代谢产物的积累、钙超载以及炎症介质和能量代谢障碍等,会导致肾功能紊乱,从而导致代谢异常^[9]。Takada 等^[10]证明,在肾缺血后的 20~40 周内发生的形态

学变化主要是肾小球硬化和间质纤维化。

2 化学诱导模型

2.1 阿霉素肾病模型

阿霉素是一种抗肿瘤药物,肾功能的进行性丧失是阿霉素肾病模型的主要特点之一。在动物实验中,多数大鼠肾脏对阿霉素损伤十分敏感,注射后可引起蛋白尿、肾小球和足细胞损伤,然后是肾小管萎缩,最后是肾纤维化。Wang 等^[11]对 BALB/c 小鼠进行的一项研究发现,第 5 天出现蛋白尿,第 7 天蛋白尿水平较高,1~2 周后观察到肾小球出现显著的透明沉积物和肾小管细胞吸收液灶状增加,到第 4 周,这些变化更加明显。第 6 周后,观察到肾脏炎症,以及严重的肾小球硬化和间质纤维化。阿霉素肾病模型对于阐明慢性肾脏病的肾小球、肾间质炎症及纤维化的病理机制很有帮助。

2.2 环孢素 A 肾病模型

环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 是一种主要的钙调磷酸酶抑制剂,其作为免疫抑制剂广泛应用于临床,用以改善器官移植患者的预后。然而,长时间使用 CsA 会导致肾脏纤维化。因此,CsA 的临床应用在一定程度上受到其肾毒性效应的限制。1990 年 Rosen 等^[12]用皮下注射 CsA 的方法建立了一种可重复性大鼠钠耗竭慢性肾毒性动物模型,其病理表现类似于长期接受 CsA 治疗者的肾脏纤维化。我国学者乔保平等^[13]建立的口服剂型 CsA 慢性肾毒性模型,证明了低盐饮食下,给予 CsA 的大鼠可出现明显的间质纤维化,说明钠耗竭是建立 CsA 慢性肾毒性模型的重要条件。然而,这种模型的缺点在于:高成本、肝毒性、广泛的试验期以及在动物研究中常用的 CsA 的浓度要远远高于临床实践^[14]。

2.3 马兜铃酸肾病模型

含马兜铃酸 (aristolochic acid, AA) 的中草药可以引起肾脏损害,早期表现为出现肾小管损害,上皮细胞变性、坏死,以后进展成灶状、多灶状直至融合成大片的寡细胞性 RIF。Jadot 等^[15]通过对 C57Bl/6J 雄性小鼠腹腔内注射 AA (3.5 mg/kg) 建立动物模型,证明了 AA 肾病是一种从早期阶段的 AKI 逐渐进展至慢性肾脏病的小管间质性疾病。我们最近的研究也表明^[16],AA 可以引起肾小管萎缩、肾间质多灶性纤维化等病理变化。文献报道^[17],AA 肾病最显著的特征为广泛的间质纤维化。

3 新方法诱导模型

手术诱导及化学药物诱导模型的研究已经逐渐

成熟,然而,为了进一步研究肾纤维化的病理生理学机制,并开发与评估新的治疗方法,有学者尝试提出新的动物模型。

3.1 基因突变肾病模型

目前发现了一种新型肾纤维化动物模型——尿调节素相关肾病模型,其属于常染色体显性遗传性间质性肾病,以高尿酸血症、痛风、慢性进展性肾间质损害为主要临床表现,最终导致 ESRD,病因是编码尿调节素(Tamm-Horsfall 蛋白)的 *UMOD* 基因突变^[18]。人 *UMOD* 基因定位于 16 号染色体 12.3 区域(16p12.3),由 640 个氨基酸组成,富含半胱氨酸残基,半胱氨酸在维持蛋白正常三维结构及功能上非常重要^[19]。*UMOD* 基因共有 11 个外显子,目前有超过 60 个致病突变已被确定,几乎全部是错义突变,突变位点大多数位于 4、5、8 号外显子,外显子 4 突变最为常见。基因突变后,异常的尿调节素沉积在肾小管髓袢升支粗段细胞的内质网,导致尿调节素正常功能丧失、肾小管细胞凋亡加速及缓慢进展的肾衰竭。Bernascone 等^[20]报道的尿调节素相关的转基因小鼠模型显示出特定的肾小管间质损伤、尿液浓缩障碍及进行性的肾衰竭;该模型是由 *UMOD* 基因的 C147W 突变所致,并且这些变化与人类有非常相似的临床特征。目前研究 *UMOD* 基因致病突变的学者越来越多,Piret 等^[21]在 2017 年也报道了由于基因突变所致的尿调节素相关肾病动物模型,这种新的 RIF 小鼠模型将会成为研究连接尿调节素突变与内质网应激和肾纤维化机制的宝贵资源。

3.2 先天性肾纤维化模型

Yasuda 等^[22]发现了一种由于肾单位数量减少导致的肾纤维化动物模型,这种模型不同于 STNx 模型,是一种由于先天性肾单位数量减少最终进展为终末期肾病的大鼠模型。肾脏发育不全(hypoplastic kidney, HPK)大鼠仅具有正常肾单位数量的 20%并且表现出进行性慢性肾脏病。此研究使用免疫组织学方法评估了雄性 HPK 大鼠肾小球硬化及间质纤维化的发病机制,结果表明,HPK 大鼠在 35 d 时显示出肾小球肥大,TGF- β 、胶原蛋白和纤维连接蛋白表达增加,所有这些改变随着年龄增加逐渐恶化。这项研究清楚地表明,只有 20%肾单位的先天性慢性肾脏病大鼠可导致肾纤维化。然而,目前还没有很好地建立先天性肾单位的数量与肾纤维化发生的关系。

3.3 辐射肾病模型

辐射肾病是以进行性肾小球硬化和管状间质纤

维化为特征的慢性辐射损伤,最终导致肾功能衰竭^[23]。研究表明,在照射后 24 周,肾小球和管状纤维发生了显著的变化^[24]。辐射肾病导致内皮损伤和慢性进行性硬化与不同程度的肾小管间质纤维化。在 SD 大鼠中,放射线(12 Gy)会导致肾小球滤过率下降,在后期,损伤涉及肾小球、肾小管和间质细胞之间的复杂相互作用,最终导致严重的间质纤维化和轻度间质炎症。除了 TGF- β 和纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)可能参与此过程外,血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)无疑是这一过程的主要中介^[25],Ang II 损伤肾小球上皮细胞,导致局部和全身炎症反应,且具有引起细胞纤维化、细胞外基质积聚、激活活性氧等作用^[26]。

3.4 转基因小鼠模型

血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1)缺乏的 c57BL/6(突变)小鼠,选择性替代了 lacZ 基因的 AT1a 位点。这些动物使我们能够阐明 AT1a 介导的信号传导通路在肾脏疾病特别是肾小管间质损伤中的病理生理学机制。因此,c57BL/6(突变)小鼠在研究 AT1a 受体的特定功能方面具有一定作用^[2]。此外,还有学者研究了 ET-1 转基因小鼠肾纤维化动物模型、绿色荧光蛋白转基因小鼠肾纤维化动物模型等。

3.5 新型腺嘌呤肾病模型

自从报道腺嘌呤能够对肾功能造成影响以来,陆续有多名学者已经成功制备出腺嘌呤引起的肾纤维化模型。接受腺嘌呤灌胃的大鼠表现出肾小管部分破坏、萎缩,部分扩张,间质淋巴细胞、单核细胞浸润,其中可见成纤维细胞增生和间质纤维化。然而,传统的腺嘌呤灌胃法大多历时时间长,动物死亡率高,且因动物对腺嘌呤的反应存在个体差异可造成模型制备不均衡等,这些缺点限制了其在研究中的应用。Zhu 等^[27]为了弥补这种缺陷,建立了一种短期腺嘌呤灌胃法,在为期 10 d 的灌胃中,大鼠显示出明显的 RIF 特征,这种方法对动物的损伤小,试验动物对药物的个体差异小,死亡率低。

4 总结与展望

综上所述,RIF 动物模型建立方法包括手术诱导、化学诱导、基因突变肾病、先天性模型等。RIF 动物模型的建立为研究疾病的发病机制及寻找新的治疗措施提供了可能。人类最常见的病理生理变化已经在动物模型中得到了成功复制,这使我们对人类病理学的理解变得更加深刻,我们可以开发新的

动物模型,并评估新的治疗方法。然而,没有一种模型能完全模拟肾脏疾病如 RIF 等疾病的进展,故利用 RIF 动物模型进行科学研究时,应当根据实验目的及需要,分析各种不同模型建立方法的优缺点,选择适当的建模方法。

【参考文献】

- [1] Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(11): 1819–1834. DOI: 10.1681/ASN.2010080793.
- [2] Nogueira A, Pires MJ, Oliveira PA. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: a review of animal models and therapeutic strategies[J]. In Vivo, 2017, 31(1): 1–22. DOI: 10.21873/invivo.11019.
- [3] Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy[J]. Kidney Int, 2009, 75(11): 1145–1152. DOI: 10.1038/ki.2009.86.
- [4] Matsui F, Meldrum KK. The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease[J]. J Surg Res, 2012, 178(1): 339–345. DOI: 10.1016/j.jss.2012.06.050.
- [5] Rodríguez-Peña A, Prieto M, Duwel A, et al. Up-regulation of endoglin, a TGF-beta binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction[J]. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16(1): 34–39. DOI: 10.1093/ndt/16.suppl_1.34.
- [6] Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, et al. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives[J]. Pharmacol Ther, 2010, 128(1): 61–81. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.05.006.
- [7] Yang HC, Zuo Y, Fogo AB, et al. Models of chronic kidney disease[J]. Drug Discov Today Dis Models, 2010, 7(1–2): 13–19. DOI: 10.1016/j.ddmod.2010.08.002.
- [8] Xue JL, Daniels F, Star RA, et al. Incidence and mortality of acute renal failure in medicare beneficiaries, 1992 to 2001[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(4): 1135–1142. DOI: 10.1681/ASN.2005060668.
- [9] Wang J, Wang F, Wang Z, et al. Protective effect of GDNF-engineered amniotic fluid-derived stem cells on the renal ischaemia reperfusion injury in vitro[J]. Cell Prolif, 2018, 51(2): 1–8. DOI: 10.1111/cpr.12400.3
- [10] Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, et al. Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding[J]. Transplantation, 1997, 64(11): 1520–1525. DOI: 10.1097/00007890-199712150-00003.
- [11] Wang Y, Wang YP, Tay YC, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events[J]. Kidney Int, 2000, 58(4): 1797–1804. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00342.x
- [12] Rosen S, Greenfeld Z, Berzis M. Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat. A medullary ray and inner stripe injury[J]. Transplantation, 1990, 49(2): 445–452. DOI: 10.1097/00007890-199002000-00041.
- [13] 乔保平, 张亚伟, 李道明, 等. 大鼠口服环孢素 A 慢性肾毒性模型的建立[J]. 中华器官移植杂志, 2000, 21(3): 158–160. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2000.03.013.
- Qiao BP, Zhang YW, Li DM, et al. Establishment of an experimental chronic cyclosporine nephropathy model in rat[J]. Chin J Organ Transplant, 2000, 21(3): 158–160. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2000.03.013.

- [14] Zhao J, Wang H, Cao AL, et al. Renal tubulointerstitial fibrosis: a review in animal models[J]. J Integr Nephrol Androl, 2015, 2(3): 75–80. DOI: 10.4103/2225-1243.161428.
- [15] Jadot I, Colombaro V, Martin B, et al. Restored nitric oxide bioavailability reduces the severity of acute-to-chronic transition in a mouse model of aristolochic acid nephropathy[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183604. DOI: 10.1371/journal.pone.0183604.
- [16] 郑法雷, 张晓明, 黄庆元, 等. 慢性马兜铃酸肾病动物模型的建立及其意义[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(18): 1095–1110. DOI: 10.3760/j.issn:0376-2491.2001.18.004.
- Zheng FL, Zhang XM, Huang QY, et al. Establishment of model of aristolochin acid-induced chronic renal interstitial fibrosis in rats[J]. Natl Med J China, 2001, 81(18): 1095–1110. DOI: 10.3760/j.issn:0376-2491.2001.18.004.
- [17] Depierreux M, Van Damme B, Vanden Houste K, et al. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs[J]. Am J Kidney Dis, 1994, 24(20): 172–180. DOI: 10.1016/s0272-6386(12)80178-8.
- [18] Scolari F, Caridi G, Rampoldi L, et al. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms[J]. Am J Kidney Dis, 2004, 44(6): 987–999. DOI: 10.1053/j.ajkd.2004.08.021.
- [19] Pennica D, Kohr WJ, Kuang WJ, et al. Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein[J]. Science, 1987, 236(4797): 83–88. DOI: 10.1126/science.3453112.
- [20] Bernascone I, Janas S, Ikehata M, et al. A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulo-interstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(15): 2998–3010. DOI: 10.1093/hmg/ddq205.
- [21] Piret SE, Olinger E, Reed AAC, et al. Mouse model for inherited renal fibrosis associated with endoplasmic reticulum stress[J]. Dis Model Mech, 2017, 10(6): 773–786. DOI: 10.1242/dmm.029488.
- [22] Yasuda H, Tochigi Y, Katayama K, et al. Progression of renal fibrosis in congenital CKD model rats with reduced number of nephrons[J]. Exp Toxicol Pathol, 2017, 69(5): 245–258. DOI: 10.1016/j.etp.2017.01.007.
- [23] Cohen EP, Robbins ME. Radiation nephropathy[J]. Semin Nephrol, 2003, 23(5): 486–499. DOI: 10.1016/s0270-9295(03)00093-7.
- [24] Ki Y, Kim W, Kim YH, et al. Effect of coenzyme Q10 on radiation nephropathy in rats[J]. J Korean Med Sci, 2017, 32(5): 757–763. DOI: 10.3346/jkms.2017.32.5.757.
- [25] Rossini M, Naito T, Yang H, et al. Sulodexide ameliorates early but not late kidney disease in models of radiation nephropathy and diabetic nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(6): 1803–1810. DOI: 10.1093/ndt/gfp724.
- [26] 赵飞, 任野平, 孔凡武. 慢性肾脏病患者交感神经系统及肾素-血管紧张素-醛固酮系统与肾脏疾病进展之间的关系[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(5): 394–397. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.05.092.
- Zhao F, Ren YP, Kong FW. Relationship of sympathetic nervous system and rennin-angiotensin-aldosterone system with progression of renal disease in chronic kidney disease patients[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2017, 16(5): 394–397. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.05.092.
- [27] Zhu CZ, Doyle KJ, Nikkel AL, et al. Short-term oral gavage administration of adenine induces a model of fibrotic kidney disease in rats[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2018, 94(Pt 1): 34–43. DOI: 10.1016/j.vascn.2018.04.003.