

肾动脉狭窄性高血压食蟹猴模型的建立和评价^①

邓学秋¹, 马晓聪¹, 李建椽¹, 朱志华², 武桢², 陶国现³, 周冰³, 杨琪⁴, 岳桂华^{1②}

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001 E-mail: dengxueqiu@foxmail.com;

2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011;

3. 广西南宁灵康赛诺生物科技有限公司, 广西 南宁 530003;

4. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: **目的** 建立肾动脉狭窄性高血压食蟹猴模型, 并制定其评价标准。 **方法** 选取7只正常成年雄性食蟹猴, 使用丝线及针头狭窄肾动脉, 运用两肾一夹(2K1C)法, 制作肾动脉狭窄性高血压食蟹猴模型, 并对模型进行评价, 同时检测血生化相关指标。 **结果** 食蟹猴血压变化: 术后1周血压开始升高, 4周后达到稳定水平, 平均血压为(18.70±1.30)/(10.62±0.91) kPa, 食蟹猴术后血压显著高于术前($P < 0.05$), 并且可维持至本实验持续时间8周。食蟹猴血生化变化: 尿素、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶术后7 d明显升高, 与术前比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 总胆固醇与葡萄糖升高不明显, 与术前比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模成功率约为71.43%。 **结论** 运用2K1C法成功建立肾动脉狭窄性高血压食蟹猴模型, 该模型经济、操作简单易行、成功率高、稳定性好。

关键词: 肾动脉梗阻; 高血压; 食蟹猴; 模型; 动物

中图分类号: R692.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)04-0256-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.04.002

Establishment and evaluation of a cynomolgus monkey model of renal artery stenosis hypertension

Deng Xueqiu¹, Ma Xiaocong¹, Li Jianxiang¹, Zhu Zhihua², Wu Zhen², Tao Guoxian³,
Zhou Bing³, Yang Qi⁴, Yue Guihua¹

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China

E-mail: dengxueqiu@foxmail.com; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University
of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi, China;

3. Guangxi Nanning Lingkang Sainuoke Biotechnology Co., Ltd., Nanning 530003, Guangxi, China;

4. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To develop a cynomolgus monkey (*Macaca mulatta*) model of renal artery stenosis hypertension and to establish its evaluation criteria. **Methods** Seven normal adult male cynomolgus monkeys were selected in this study. The cynomolgus monkey models of renal artery stenosis hypertension were achieved by using two kidney one clip (2K1C) method with silk thread and needle clipping renal artery. The models were evaluated and the measurements of related blood biochemical indexes were also performed at the same time. **Results** The changes of blood pressure in cynomolgus monkeys: one week after operation, blood pressure began to increase, reached to a stable level after 4 weeks, the mean blood pressure was (18.70±1.30)/(10.62±0.91) kPa, the blood pressure of cynomolgus monkey after operation was significantly higher than that before operation ($P < 0.05$), and could maintain the duration of 8-week experiment. Cynomolgus monkey blood biochemical changes: urea, serum creatinine, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate

① 基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 14123006-5)

② 通信作者, E-mail: sdygh1969@163.com

aminotransferase (AST) increased significantly 7 days after operation, compared to those of preoperation, there were statistically significant differences ($P < 0.05$); postoperative total cholesterol and glucose increased slightly, compared to preoperative total cholesterol and glucose, there were no statistically significant differences ($P > 0.05$). The successful rate of model development was about 71.43%. **Conclusion** Using 2K1C method can successfully establish cynomolgus monkey model of renal artery stenosis hypertension, and the model is economical, simple and easy operation, with highly success rate and good stability.

Key words: renal artery obstruction; hypertension; cynomolgus monkey; models, animal

高血压病是临床常见的心血管疾病,已成为重大的公共卫生问题,为了更好地探究其发病机制及治疗方法,人们构建了各种高血压实验动物模型,肾血管性高血压(RVH)是常用的模型之一。RVH实验模型是研究高血压病生理病理及降压药物疗效常用的手段,其造模方法以狭窄肾动脉形成肾血管性高血压为最常用。狭窄肾动脉的方法众多,本研究参考了傅继华等^[1]和孙琪等^[2]的方法并加以改进,采用丝线和针头狭窄肾动脉建立肾性高血压食蟹猴模型,研究汇报如下:

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验所用的动物为7只年龄11~14岁、体重(8.38±2.07) kg的雄性食蟹猴,由广西南宁灵康赛诺生物科技有限公司提供(项目动物使用许可证号:SYXK桂2014-0004),符合国际动物伦理学标准。

1.1.2 仪器及药品 常规手术器械;手术丝线(规格3/0,4/0,苏州医疗用品厂有限公司);针头(规格23G1,21G1,Becton, Dickinson and Company);腕式电子血压计(北京松下电子有限公司);Dash 2500监护仪[通用电气医疗系统(中国)有限公司];GE Discovery CT750 HD 64排螺旋CT机;PHILIPS HD15彩色多普勒超声诊断仪,线阵探头,频率:12.0 MHz;舒眠宁II注射液;硫酸庆大霉素注射液(河南润弘制药有限公司,批号:H41020318);注射用氨苄西林钠(山东鲁抗医药股份有限公司,生产批号:160922)。

1.2 方法

1.2.1 术前检测 术前1个月隔天同一时间用腕式电子血压计按操作规范测量清醒状态下食蟹猴血压(食蟹猴经过训练可在测量血压时安静端坐)。术前1周在广西中医药大学附属瑞康医院行CT血管造影术(CTA)和肾动脉彩超检测食蟹猴肾动脉直径,并在手术前检查血生化指标等。

1.2.2 术中检测 用舒眠宁(0.03 ml/kg)麻醉食蟹猴后,用心电监护仪监控其血压、心率等变化。

1.2.3 实验方法 腹部正中10 cm×15 cm范围去

毛,常规消毒后经腹部正中切口,从剑突下处皮肤到脐部做约10 cm长的切口,依次切开皮肤、皮下组织、腹白线,钝性分离腹直肌,切开腹膜,进入腹腔后,在升结肠外侧纵行切开后腹膜,将结肠推向内侧,显露右肾,沿下腔静脉右侧解剖,分离出右肾静脉,沿静脉走行,用无损伤镊充分剥离肾动脉,用无损伤钳轻轻钳夹肾动脉,观察血压是否有变化。将肾动脉完全剥离后,观察肾动脉有无痉挛,如出现明显痉挛,则用罂粟碱浇注,使肾动脉解除痉挛,以便进行客观测量。在显微镜下用标有刻度的小钢尺直观测量肾动脉的直径 d_1 。根据肾动脉半径预先计算出血管横切面积,通过横切面积计算结扎肾动脉的定量。具体公式为:先算出血管横切面积 $S_1 = \pi \times (d_1 \div 2)^2$,手术狭窄80%,则狭窄后血管横切面积 $S_2 = S_1 \times 80\%$,狭窄后血管直径 $d_2 = 2 \times \sqrt{(S_2 \div \pi)}$,根据狭窄后血管直径 d_2 选用合适大小的针头安放在血管上面进行丝线结扎,结扎后抽出针头(见图1)。检测血压手术前和结扎后血压变化。用加庆大霉素的灭菌用生理盐水冲洗腹腔,观察有无出血点,排列好肠管,清点手术器械及纱布等,无误则依次缝合腹膜、肌肉及皮肤创口。

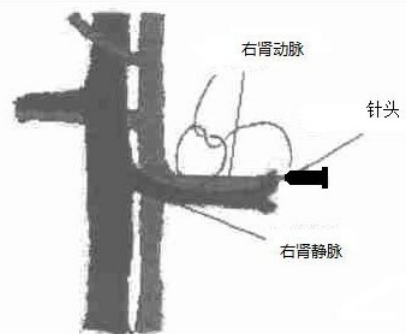


图1 手术关键技术实施操作示意图

1.2.4 术后注意 术后1周内注射氨苄西林100 mg/kg,每日分2次肌肉注射以预防感染。

1.2.5 观察指标

1.2.5.1 一般情况观察 造模后4周内每日观察并记录食蟹猴摄食量、饮水量、尿量、精神状况、心率和体温等一般情况,并监测体重变化。

1.2.5.2 血压测量 手术后 1 周开始隔天监测血压,连续监测 8 周。使用腕式电子血压计测量食蟹猴血压。

1.2.5.3 彩超和 CTA 检测肾血管直径 术前 1 周和术后 4 周分别用彩超和 CTA 检测食蟹猴肾血管直径,由放射科、B 超室各 2 位高年资骨干医师进行检测,对图像数据进行原始记录。数据测量位置统一选择肾动脉从肾门处发出后 1 cm 以内的横断面测量。每个部位数据重复测量 3 次,取平均值。所有数据由各科室 2 位医师测量并达成一致后记录结果。术前及术后 10 d 行彩超和 CTA 以证实肾动脉狭窄形成及程度。

1.2.5.4 血生化等测定 肾动脉狭窄术前、后,均在食蟹猴清醒状态下经股静脉取血 8 ml,经离心后血清、血浆分置于 2 个试管内。广西中医药大学附属瑞康医院检验科查肝肾功能等。

1.2.6 食蟹猴高血压模型标准 参照《中国高血压防治指南》(2010 年修订版)^[3],在未口服降压药物情况下,收缩压和/或舒张压 ≥ 18.62 kPa 和/或 ≥ 11.97 kPa;或参考奇锦峰等^[4]研究猴肾动脉狭窄性高血压模型的建立及其评价标准,2K1C 模型血压稳定后收缩压、舒张压均应比术前升高 50% 以上。满足上述任意一条即可认为病理性高血压诊断成立。

1.2.7 统计学方法 对测量值运用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,配对资料采用 *t* 检验,检验的显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况 食蟹猴肾动脉狭窄术均进行顺利,术后无严重并发症,精神状态良好,食量及大小便正常。

2.2 CTA 和彩超测量食蟹猴肾动脉直径变化 本组 7 例均完成双侧肾动脉 CTA 和彩超检测。两种方法对双侧肾动脉及其主要的动脉分支均可清晰显示和测量。CTA 结果显示:本组 7 例右侧肾动脉均有狭窄,狭窄均位于中段,狭窄段局限、光滑、均匀呈管状,造模前右侧肾动脉直径 (2.74 ± 0.49) mm,造模后为 (1.44 ± 0.20) mm,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。彩超结果显示:本组 7 例右侧肾动脉均有狭窄,造模前右侧肾动脉直径 (2.34 ± 0.37) mm,造模后 (0.91 ± 0.21) mm,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。CTA 测量双侧肾动脉起始部横断面图像,见图 2,彩超测量双侧肾动脉起始部横断面图像,见图 3,但 133489、133468 动脉截面积减少不足 50%。

2.3 2K1C 组造模前后血压变化 肾动脉狭窄术后第 1 周食蟹猴血压开始升高,术后第 2 周继续升高,第 4 周后稍有下降并达到稳定的高水平,4 周血压均值标

表 1 2K1C 组造模前后食蟹猴右侧肾动脉直径

编号	CTA 检测(mm)		彩超检测(mm)		动脉截面积减少比例(%)
	术前直径	术后直径	术前直径	术后直径	
133489	2.40	1.11	1.90	1.41	44.93
021005	3.12	1.52	2.24	1.52	53.95
051177	2.89	1.32	2.93	0.71	94.13
051174	2.01	1.33	2.28	0.62	92.61
051187	2.32	1.54	2.29	1.41	62.09
133468	3.13	1.72	2.48	1.76	49.64
021006	3.31	1.53	1.90	1.11	65.87

注:CTA 检测术前与术后直径均值比较, $P < 0.05$;彩超检测术前与术后直径均值比较, $P < 0.05$



图 2 CTA 测量肾动脉横断面图像

注:测量 3 次数据分别为 2.61 mm、2.56 mm、2.69 mm



图 3 同一食蟹猴彩超测量肾动脉横断面图

注:测量 3 次数据分别为 2.32 mm、2.56 mm、2.43 mm

准差为 $(18.70 \pm 1.30) / (0.62 \pm 0.91)$ kPa,血压显著高于术前的 $(14.41 \pm 0.51) / (7.27 \pm 0.08)$ kPa,术后血压较术前血压差异有统计学意义($P < 0.05$),说明肾动脉狭窄术后形成了病理性高血压,且维持至本实验结束的第 8 周。术后第 2 周、4 周、8 周血压差异无统计学意义($P > 0.05$)。2K1C 组 7 只手术成功食蟹猴血压均有不同幅度的升高,收缩压升高比例 12.82%~59.34%,舒张压升高比例 11.42%~71.98%,以编号 051177、021006 两只食蟹猴血压升高最为明显。编号 133489、133468 两只食蟹猴血压升高不明显,造模不成功,见表 2。

表2 造模前后食蟹猴血压变化情况

编号	术前血压 (kPa)	术后2周 (kPa)	术后4周 (kPa)	术后8周 (kPa)	术后4周血 压升高比例
133489	14.84±1.02/7.33±0.52	16.74±1.36/8.40±1.31	16.49±1.13/8.49±1.49	16.07±0.78/8.24±1.09	12.82%/14.63%
021005	14.32±0.81/7.15±0.41	18.96±1.72/12.03±0.56 ^a	18.20±1.40/9.42±0.55 ^b	16.86±1.48/8.86±0.64 ^c	32.42%/68.23%
051177	13.63±0.69/7.23±0.56	20.55±0.84/12.25±0.80 ^a	18.44±2.27/10.80±1.42 ^b	17.88±2.22/10.43±1.40 ^c	50.78%/69.48%
051174	15.04±1.14/7.32±0.56	19.93±1.33/12.16±0.45 ^a	18.30±2.25/11.94±0.88 ^b	17.75±2.11/10.48±0.86 ^c	32.51%/66.27%
051187	14.60±0.92/7.34±0.52	19.02±1.40/12.36±0.86 ^a	17.61±1.26/10.30±1.11 ^b	16.70±1.86/9.83±1.23 ^c	30.25%/68.46%
133468	15.65±1.01/7.74±0.47	17.74±1.45/8.62±0.69	18.03±1.62/8.32±0.85	18.02±1.54/8.50±0.78	13.37%/11.42%
021006	14.46±0.77/7.30±0.61	23.04±1.29/12.29±2.10 ^a	20.95±1.37/10.62±1.42 ^b	20.19±2.70/10.285±1.76 ^c	59.34%/71.98%

注:a:术后2周与术前血压比较, $P < 0.05$; b:术后4周与术前血压比较, $P < 0.05$; c:术后8周与术前血压比较, $P < 0.05$

2.4 2K1C组造模前后血生化水平变化 术后7d的血生化水平较术前均有升高,术后7d的尿素、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶较术前比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后7d的总胆固醇、葡萄糖也稍有升高,较术前比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 造模前后食蟹猴血生化水平

血生化指标	术前	术后7d
尿素(mmol/L)	8.61±1.09	17.23±2.73 ^a
肌酐(μ mol/L)	97.67±35.21	173.50±47.48 ^a
谷丙转氨酶(U/L)	57.00±38.63	96.67±21.69 ^a
谷草转氨酶(U/L)	26.67±10.05	69.50±20.40 ^a
总胆固醇(mmol/L)	2.91±0.51	3.19±1.17 ^b
葡萄糖(mmol/L)	3.59±0.47	3.91±1.33 ^b

注:术后7d的尿素、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶与术前比较, a: $P < 0.05$; 术后7d的总胆固醇、葡萄糖与术前比较, b: $P > 0.05$

3 讨论

高血压动物模型是研究高血压发病机制、诊断标准和治疗方案的基础。1934年Goldblatt及其同事用银夹缩窄狗的肾动脉导致了高血压的产生,这种方法又在兔、大鼠上获得成功。该模型的创立对高血压病及其受累器官的实验研究起了巨大的推动作用,时至今日仍得到普遍的运用^[5]。并在此基础上采用两肾一夹(2K1C)复合高脂灌胃法复制高血压复合高脂血症大鼠模型,以符合临床实践的需要^[6]。同时完全闭塞双侧肾动脉方法可以引起严重的高血压,并可以伴随肾脏萎缩,对于研究肥胖型高血压发生的潜在机制有一定的应用价值^[7]。现在高血压的模型中肾动脉狭窄高血压模型有应用较广泛。

本研究建立了肾动脉狭窄性高血压食蟹猴模型的方法及流程,经过8周术后观察期,2K1C组肾动脉狭窄性高血压食蟹猴模型已非常稳定,按80%动脉截面积狭窄,7只食蟹猴中有5只形成病理性高血压,成功率约71.43%,能够达到预期的研究结果。本研究采

用非人类灵长类食蟹猴作为实验动物,而灵长类动物是人类的近亲,是极其珍贵和重要的实验动物,其应用价值远超过其他种属的动物。灵长类动物在组织结构、免疫、生理和代谢等方面与人类高度近似,与人类的遗传物质有75%~98.5%的同源性,显示了许多相似的生物学和行为学特征,成为解决人类健康和疾病问题的基础研究和临床前研究的理想动物模型。在检测肾动脉直径时,我们采用CTA和超声测量肾动脉血管内径,提高了测量的准确性,而且进行手术前后对比,准确了解了肾动脉狭窄的程度。手术采用了不同型号的针头狭窄肾动脉的方法,易于操作,造模成功率高。但该实验模型仍有改进的空间。造模过程中2只食蟹猴模型血压水平未达到预期效果,未能达到动脉截面积狭窄,实际狭窄程度与手术过程中拟到达的80%有一定差距。其原因可能用丝线狭窄结扎肾动脉时松脱或松紧失度,或手术操作过程仍需改进,或血管痉挛影响了实际狭窄和测量的程度,也可能是术后测量血压存在误差或食蟹猴的个体差异等原因,在今后的实验中应尽量避免。在本次研究过程中,我们还尝试了两肾两夹(2K2C)法,但于术后1周内死亡。考虑可能是由于双侧结扎方法对食蟹猴机体损伤过大,也可能是引起双侧狭窄血压急剧升高,引起并发症而导致食蟹猴死亡。术后7d的尿素、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶与术前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),说明术后7d食蟹猴肝肾功能出现一定的损害,其原因可能是手术引起肾脏血流变学的改变,肾小球滤过率降低,尿素、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶等代谢产物出现堆积未能及时排出而留滞于血液中^[8]有关。

在今后的实验研究中,应不断改善手术方案,提高肾动脉测量的准确性,注意术后护理,提高造模成功率。

4 结语

目前食蟹猴肾动脉狭窄高血压动物模型的标准尚未建立,相关中医证候模型还是空白。建立稳定、实

(下转第275页)

- [2] 杨露,高建宏,王婧,等. 子宫内位异位症不孕患者术后应用促性腺激素释放激素激动剂对妊娠结局的疗效观察[J]. 华西医学,2015,30(7):1250-1254.
- [3] Zhang L, Ying X. Efficacy of Laparoscopic Surgery Combined with GnRH-a in the Treatment of Endometriosis [J]. Chinese Journal of Minimally Invasive Surgery, 2015,15(4):305-308.
- [4] 崔恒. 子宫内位异位症诊断和治疗指南解读[C]//北京大学人民医院卵巢恶性肿瘤和子宫内位异位症诊治新进展研讨会. 2014.
- [5] 蔡婷,姜锐. 腹腔镜术后辅以散结镇痛汤治疗子宫内位异位症合并不孕临床研究[J]. 中医药信息,2017,34(1):104-106.
- [6] 李杏杏,万贵平. 中药治疗子宫内位异位症作用机制的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2015,24(2):210-213.
- [7] 马平丽,马红艳. 子宫内位异位症的临床诊治分析[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(4):597-598.
- [8] 凌丽,熊正爱. 子宫内位异位症免疫机制研究进展[J]. 国际妇产科学杂志,2015,42(1):33-37.
- [9] 于红岩,李楠,夏宝国,等. 腹腔镜术后联合 GnRH- α 对子宫内位异位症合并不孕患者妊娠结局及婚姻质量的影响[J]. 中国妇幼健康研究,2016,27(12):1466-1468.
- [10] 李惠清,黄华仪,唐霓,等. 腹腔镜保守性手术联合 GnRH-a 反减疗法治疗子宫内位异位症[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(2):227-228.
- [11] 李萌,夏天,王宝娟. 不同治疗方案对子宫内位异位症合并不孕患者生育影响的研究进展[J]. 生殖与避孕,2015,35(7):478-483.
- [12] 艾婷,张莉. 不孕伴子宫内位异位症患者腹腔镜术后联合药物治疗对妊娠结局的影响[J]. 中国慢性病预防与控制,2016,24(4):306-308.
- [13] 徐蕾,孙平平,赵亭亭. 腹腔镜治疗子宫内位异位症合并不孕患者术后药物治疗与妊娠结局的关系分析[J]. 中国医刊,2015,50(12):83-85.
- [14] 李抗旱,王云. 腹腔镜手术分别联合 GnRH-a 与孕三烯酮治疗子宫内位异位症的临床效果分析[J]. 中国计划生育学杂志,2015,23(4):261-263.
- [15] 李焱,张震宇,刘崇东. 子宫内位异位症合并不孕患者腹腔镜术后药物治疗妊娠结局分析[J]. 实用妇产科杂志,2015,31(1):53-56.

收稿日期:2017-06-29;修回日期:2017-08-27

(上接第 259 页)

用、重复性好且与临床接近的非人灵长类肾动脉狭窄高血压病动物模型,对进一步研究高血压病的机制及治疗具有重要的意义。我们通过狭窄食蟹猴肾动脉形成高血压模型,操作简单易行,造模后成功率较高,但仍有改进的空间。今后将不断提高实验技术,以期建立稳定的肾动脉狭窄性高血压食蟹猴模型,为高血压疾病防治发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] 傅继华,陈宇飞,张琪. 肾性高血压大鼠实验模型制作改进[J]. 中国药科大学学报,1995,26(6):383-384.
- [2] 孙琪,黄荣桂,郑兴中,等. 一肾一夹肾血管性高血压动物模型的制作[J]. 临床军医杂志,2007,35(6):812-814.
- [3] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华心血管病杂志,2011,39(7):579-616.
- [4] 奇锦峰,李比海,徐强,等. 猴肾动脉狭窄性高血压模型的建立及其评价[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):475.
- [5] Goldbatt H, Lynch J, Hanzal RF, et al. Studies on experimental hypertension:1. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia[J]. J Exp Med,1934,59(3):347-379.
- [6] 李飞,杨骏,汪克明. 高血压复合高脂血症动物模型的建立[J]. 安徽中医学院学报,2005,24(3):35-37.
- [7] Hall JE, Kuo JJ, da Silva AA, et al. Obesity-associated hypertension and kidney disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens,2003,12(2):195-200.
- [8] 曹科峰,张群,李英. 血清胱抑素 C、肌酐和尿素测定对肾损伤的诊断分析[J]. 中外医学研究,2015,13(2):130-131.

收稿日期:2017-06-02;修回日期:2017-06-26