

## 肾上腺醛固酮腺瘤大鼠模型的建立

闫永吉<sup>1)</sup>, 陆义芹<sup>2)</sup>, 王保军<sup>3)</sup>, 史涛坪<sup>3)</sup>, 王光<sup>1)</sup>, 张海燕<sup>1)</sup>

(1) 昆明医学院第二附属医院微创泌尿外科, 云南昆明 650101; 2) 云南省第一人民医院妇科, 昆明 650032; 3) 中国人民解放军总医院, 北京 100853)

**[摘要]** **目的** 构建肾上腺醛固酮腺瘤大鼠模型. **方法** 16只SD大鼠随机分对照组和醛固酮腺瘤组, 在ALZET 2004微量渗透泵储药仓内分别注入醛固酮溶液或空白溶剂, 然后将其埋于大鼠背部皮下. ALZET 2004微量渗透泵可以持续灌注4周, 为使醛固酮作用时间达到8周, 4周后更换渗透泵1次, 同时尾套法测量大鼠尾动脉收缩压; 8周后, 放免法检测血浆醛固酮浓度和肾素活性. **结果** 3周后, 与对照组大鼠相比, 腺瘤组大鼠收缩压开始升高, 第7周达到顶峰, 之后维持在高水平; 腺瘤组大鼠血浆醛固酮的浓度显著升高 ( $P < 0.01$ ), 肾素活性被抑制 ( $P < 0.01$ ). **结论** 大鼠皮下埋植微量渗透泵灌注醛固酮, 可以成功构建大鼠醛固酮腺瘤模型.

**[关键词]** 醛固酮腺瘤; 微量渗透泵; 动物模型

**[中图分类号]** R69 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 02 - 0014 - 04

## Establishment of a Rat Model of Aldosterone-Producing Adenoma

YAN Yong - ji<sup>1)</sup>, LU Yi - qin<sup>2)</sup>, WANG Bao - jun<sup>3)</sup>, SHI Tao - ping<sup>3)</sup>, WANG Guang<sup>1)</sup>,  
ZHANG Hai - yan<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Mini-invasive Urinary Surgery, The 2th Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Gynecology, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032; 3) Dept. of Urology, The General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a rat model of aldosterone-producing adenoma (APA). **Methods** 16 Sprague-Dawley rats subcutaneously implanted with an osmotic mini-pump, were randomly divided into 2 groups: control group (vehicle) and APA (1  $\mu\text{g/h}$ ) group. Because the mini-pump (ALZET 2004) could continuously infuse test substance for 4 weeks, another minipump was replaced after the fourth week to make the duration of aldosterone infusion for 8 weeks. Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly by the tail-cuff method. At the termination of the study, blood was collected for measurements of plasma renin activity (PRA) and aldosterone concentration (PAC) with radioimmunoassay kits. **Results** After 3 weeks, APA rats showed significantly and progressively increased SBP compared with controls ( $P < 0.05$ ), and the SBP level reached peak on 7th week and remained high levels. PRA was substantially depressed and PAC was significantly raised in APA rats ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** By implanting osmotic minipumps subcutaneously, the rat models of APA can be successfully established, which provide a good platform for investigating the pathogenesis of APA.

**[Key words]** Aldosterone-producing adenoma; Osmotic pump; Animal model

原发性醛固酮增多症 (primary aldosteronism, 腺醛固酮腺瘤 (aldosterone-producing adenoma, PA) 是继发性高血压最常见的原因, 其中, 肾上 APA) 是 PA 的主要类型. 腺瘤切除是 APA 首选治

**[基金项目]** 国家杰出青年科学基金资助项目 (30725040)

**[作者简介]** 闫永吉 (1975~), 男, 山东临沂市人, 医学博士, 讲师, 主要从事泌尿外科临床工作.

疗方法, 然而, 术后高血压控制率仅有 33% ~ 87%<sup>[1,2]</sup>, 原因还未阐明<sup>[3]</sup>. 所以, 有必要建立醛固酮腺瘤动物模型, 为研究醛固酮的作用机理建立平台.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

7 周龄健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 重约 230 ~ 250 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 醛固酮购自美国 Sigma-Aldrich 公司. 血浆醛固酮浓度 (plasma aldosterone concentration, PAC) 和血浆肾素活性 (plasma renin concentration, PRA) 放免试剂盒购自北京北方生物技术研究所. 微量渗透泵 (ALZET 2004) 购自美国 ALZET, DURECT 公司 (见图 1). 无创尾动脉血压测定系统 (NIBP System) 包括 ML845 PowerLab 4/20 记录仪、ML125 鼠尾部无创血压系统、MLT125 大鼠尾部无创血压袖套以及 Chart 及 Scope 软件等购自澳大利亚 Adinstruments 公司. SN-682 型放射免疫  $\gamma$  计数器购自上海核福光仪器有限公司.

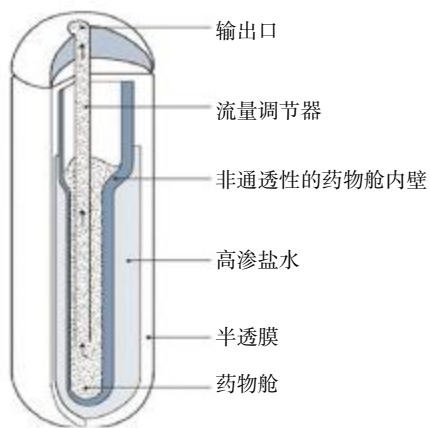


图 1 微量渗透泵

Fig. 1 Trace osmotic pump

### 1.2 方法

16 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 每组 8 只: (1) 空白溶剂设为对照组 (CON 组); (2) 醛固酮腺瘤组 (ALD 组): 醛固酮泵入量 ( $1 \mu\text{g}/\text{h}$ ). 大鼠均为单笼喂养, 自由进食与饮水, 室温保持在  $20^\circ\text{C}$  ~  $25^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 45% ~ 60%, 持续换气, 照明和黑暗每 12 h 轮换. 适应新环境 1 周后, 所有大鼠以 20% 乌拉坦 ( $0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$ ) 腹腔注射麻

醉. 将微量渗透泵内按分组情况注入溶剂或醛固酮溶液. 肩胛区皮肤消毒并作一约 1.5 cm 的皮肤切口, 用血管钳进行钝性分离皮下间隙, 置入微量渗透泵 (见图 2), 缝合关闭切口. 术后青霉素 4 万 U/d 肌肉注射预防感染, 连续 3 d.



图 2 大鼠皮下埋植

Fig. 2 Subcutaneous implanting osmotic minipump in rats

### 1.3 观察指标

每日 2 次观察大鼠精神状况, 大鼠精神、饮食、摄水及活动状态. 检查切口, 观察有无感染、破溃. 在安静清醒状态下, 将大鼠放置在保定器内, 白炽灯照射进行尾部加温, 用 NIBP 测定系统测量尾动脉收缩压, 每周测量 1 次, 重复 3 遍取平均值 (见图 3).

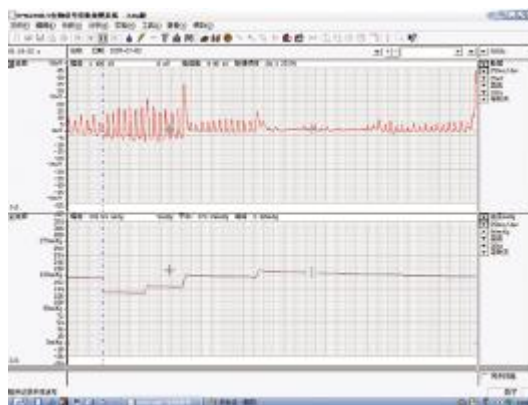


图 3 测量大鼠尾动脉收缩压

Fig. 3 Measuring rat tail artery systolic pressure

### 1.4 血浆醛固酮浓度 (PAC) 和血浆肾素活性 (PRA) 的测定

8 周后, 腹腔麻醉下, 下腔静脉穿刺采血, 血浆醛固酮浓度 (plasma aldosterone concentration, PAC): 取 1.5 mL 静脉血注入 0.1 mL 含有肝素试管内, 置入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱内保存; 血浆肾素活性

(plasma renin activity, PRA): 2 mL 静脉血注入抗凝管内, 管内含有 3 mol/L 乙二胺四乙酸 30  $\mu$ L、0.32 mol/L 二巯基丙醇 15  $\mu$ L、0.34 mol/L 8-羟基喹啉硫酸盐 30  $\mu$ L 的酶抑制剂, 封闭管口, 摇匀后置入冰水中, 以 2 000 r/min 离心 5 min, 分离和收集血浆. 放射免疫分析法检测 PAC 和 PRA.

### 1.5 统计学处理

所有数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 一般情况

所有大鼠均存活, 精神和食欲良好. 切口无破溃、无红肿, 1 周左右愈合. 实验过程中, 大鼠体重逐渐增加, 但各组之间没有显著性差异.

### 2.2 尾动脉收缩压

大鼠收缩压变化. 实验开始时, 各组大鼠的收缩压相似. 3 周后, 与对照组大鼠相比, 腺瘤组大鼠收缩压开始升高, 第 7 周达到最高, 之后一直维持在高水平 (见图 4).

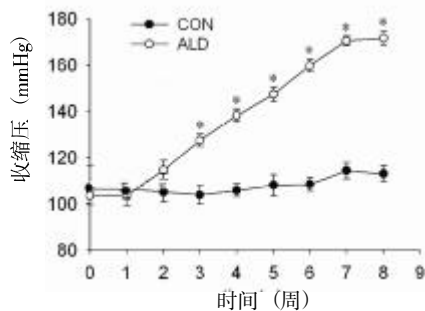


图 4 2 组大鼠尾动脉收缩压变化性况

Fig. 4 Changes of rat tail artery systolic pressure in 2 groups

### 2.3 PAC 和 PRA

与对照组大鼠相比, 腺瘤组大鼠血浆醛固酮的浓度显著升高 ( $P < 0.05$ ), 肾素活性被抑制 ( $P < 0.05$ ), 见表 1.

表 1 大鼠 PAC 和 PRA 的检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The test results of PAC and PRA in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	PAC (pg/mL)	PRA (ng/mL.h)
CON 组	8	82 $\pm$ 3.54	18.27 $\pm$ 0.22
ALD 组	8	305 $\pm$ 8.7*	3.68 $\pm$ 0.20*

与 CON 组比较, \* $P < 0.05$ .

## 3 讨论

醛固酮对心血管系统的损害是近年来研究的热点. 与原发性和高血压相比, PA 患者更易发生心血管损伤和重构<sup>[3,4]</sup>. 以往认为醛固酮在肾上腺皮质球状带合成, 通过肾脏引起水钠潴留导致血压升高是主要的致病原因. 然而, 最近研究发现, 血管也可以合成醛固酮<sup>[5]</sup>, 并表达盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR)<sup>[6]</sup>和 11- $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 (11- $\beta$ -HSD2)<sup>[7]</sup>, 后者是确保醛固酮与 MR 特异性结合的酶, 因此, 醛固酮直接引起血管损伤.

肾上腺醛固酮腺瘤术后血压持续升高与不可逆性的血管重构有关<sup>[8]</sup>. 收缩压升高与心输出量和大血管硬度增加有关. 醛固酮作用于肾脏引起钠水潴留造成心输出量增加. 研究也发现, 醛固酮腺瘤患者大动脉发生重构. 国外在研究醛固酮对血管的损害时共有 3 种大鼠模型, (1) 高盐 + 单侧肾切除 + 醛固酮: 高盐饮食并行单侧肾脏切除的大鼠, 醛固酮作用 (1  $\mu$ g/h) 4 周<sup>[9]</sup>, 主动脉发生明显重构, 表现为中膜厚度和横截面面积增加; (2) 高盐 + 醛固酮: 只给予高盐饮食而不行单侧肾脏切除的大鼠, 醛固酮 (0.75  $\mu$ g/h) 作用 6 周<sup>[9]</sup>, 主动脉也发生重构. 然而, 在这两种模型中, 高盐饮食和切肾对结果的影响不能被排除; (3) 醛固酮: Iglarz 等<sup>[10]</sup>报道, 正常饮食、不行单侧肾脏切除的大鼠, 醛固酮 (0.75  $\mu$ g/h) 作用 6 周, 主动脉横截面面积没有明显增加. 所以, 醛固酮能否诱导主动脉重构还有争议. 为了进一步检测醛固酮对大血管结构的作用, 笔者在模型构建上进行了改进: (1) 选用新型灌注泵: ALZET 2004 微量渗透泵是美国 ALZET 公司的新产品, 能够持续工作 4 周, 较以往常用的渗透泵 (ALZET 2002) 延长 1 倍. 通过在大鼠皮下埋植微量渗透泵, 利用组织液与渗透泵内高渗液之间的渗透压差持续灌注醛固酮, 模拟 APA 激素分泌的方式; (2) 实验 4 周后, 更换 1 个灌注泵, 使醛固酮的作用时间达到 8 周; (3) 选用文献报道中醛固酮的最高剂量. 本研究发现, 醛固酮灌注 3 周后, 大鼠收缩压开始升高, 8 周后, 血浆 PAC 升高, 而 PRA 被抑制, 表明 APA 大鼠模型构建成功.

本研究结果表明, 通过在大鼠皮下埋置 ALZET 2004 微量渗透泵, 持续泵入醛固酮, 能够模拟 APA 激素释放方式, 使大鼠处于高醛固酮状 (下转第 30 页)