



# 贯彻“疾病”与“肾细胞”主线的 综合性实验教学案例初探

范宇,唐昊,李小燕,郑凌

(武汉大学 生命科学学院,湖北 武汉 430072)

**摘要:**急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)指肾功能的急剧下降,表现为血清肌酐水平升高、排尿量减少,是一种常见的、严重危及患者生命的临床综合征。AKI 具有较高死亡率,但缺乏有效治疗药物,是亟待解决的生物医学难题。顺铂(cisplatin)是用于治疗肺癌、宫颈癌、黑色素瘤等实体癌的最常用化疗药物,但常引起如 AKI 的副作用。以顺铂诱导小鼠急性肾损伤为临床常见疾病模型,设计适应于本科生的综合性动物实验教学课程,其内容包括小鼠模型制备、血清生化指标检测、肾脏组织中基因水平检测以及病理切片评估等。该课程极大培养本科生的动物实验动手能力,有助于提高学生多角度分析解决问题的能力,增加对科学研究的兴趣进而发挥学习的主观能动性。

**关键词:**急性肾损伤;顺铂;小鼠模型;综合性实验课

中图分类号:G642.4

文献标识码:A

文章编号:1671-931X (2022) 02-0110-05

DOI: 10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2022.02.020

## 一、背景分析

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)指 7 天内肾功能突然下降,表现为血清肌酐水平升高、排尿量减少,是一种常见的严重危及患者生命的临床综合征<sup>[1]</sup>。临床上肾毒性药物的使用、败血症以及感染性休克等都能引起 AKI。据统计,AKI 发病率在长期住院患者中为 8%~18%<sup>[2]</sup>。在重症监护室中,并发 AKI 患者的死亡率为 25.3%,是未并发 AKI 患者的十倍<sup>[3]</sup>。此外,AKI 也会造成部分患者出现慢性肾脏病或终

末期肾病,长期影响生活质量<sup>[4]</sup>。目前临床上缺乏治疗 AKI 的有效药物。因此,了解 AKI 的发病机理并筛选治疗性药物是重要的生物医学问题。

人类疾病的发生发展错综复杂,以人体作为实验对象来探讨疾病发生机制存在医学伦理相关问题,而借助研究动物模型能够方便、有效地认识人类疾病发生发展的规律,研究防治措施<sup>[5]</sup>。目前,急性肾损伤模型的造模方法主要有三种:缺血再灌注型、药物诱导型和感染型,所用实验动物包括大鼠、小

收稿日期:2021-01-08

基金项目:2020 年中央高校改善基本办学条件专项资金武汉大学生物学教学实验室建设项目;2021 年度基础学科拔尖学生培养计划 2.0 “生物科学拔尖人才系统科学研究训练模式研究与实践”(项目编号:20211043)。

作者简介:范宇(1994—),男,河南周口人,武汉大学生命科学学院 2019 级博士研究生,研究方向:急性肾损伤发病机制;唐昊(2002—),男,四川安岳人,武汉大学生命科学学院 2019 级本科生,研究方向:细胞生物学;李小燕(1968—),女,湖北咸宁人,武汉大学生命科学学院高级实验师,研究方向:细胞生物学实验;郑凌(1974—),女,湖北武汉人,武汉大学生命科学学院教授,研究方向:糖尿病及其并发症。

鼠、家兔和犬等<sup>[6]</sup>。缺血再灌注型包括双侧肾动脉夹闭法、单侧肾缺血再灌注法和部分结扎腹主动脉法等诱导的急性肾损伤,多以外源性手术方式造模。药物诱导型由毒性物质与肾脏反应所致,常见造模法包括氨基糖苷类抗生素诱导法、造影剂诱导法、顺铂诱导法和氯化汞诱导法等,上述肾毒性药物多以腹腔注射方式给予实验动物。感染型主要是通过全身性炎症感染继而损肾脏,常见造模方法包括内毒素诱导法和盲肠结扎穿孔术等。由于顺铂是一种广泛用于治疗多种实体肿瘤的化疗药物<sup>[7]</sup>,而且药物诱导 AKI 的小鼠模型具有操作简单,死亡率低等优点,因此我们采用该模型模型用于设计相关本科生实验课程。

不少综合性大学的生物学相关专业开设动物实验课程,教授对不同动物种类的组织器官的辨识。本实验课程设计一方面能帮助本科生熟悉小鼠实验的部分基础操作,包括小鼠的饲养、抓握、标记、采血以及腹腔注射等具体实验技巧。另一方面,能帮助学生学习和掌握急性肾损伤的几种判定方法,如检测血尿素氮和血肌酐浓度、检测肾损伤相关基因表达水平以及分析肾脏石蜡切片的病理变化,让学生了解某一具体疾病发生发展过程中在基因、生化和病理水平上的协同变化。

## 二、实验原理

利用顺铂诱导小鼠产生 AKI,并利用生化分析仪检测血尿素氮和血肌酐浓度以无创评估肾功能的损伤程度;利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real time quantitative PCR, RT-qPCR)技术来检测肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1, Kim-1)、炎症相关基因白介素-6(interleukin-6, IL-6)的转录水平;以及利用组织染色技术对 AKI 后的肾脏组织结构进行病理分析。

### (一) 顺铂诱导急性肾损伤的作用原理

作为临床高效广谱抗癌药物,顺铂中能不同的肾脏膜转运蛋白(如铜离子转运蛋白 1, copper transporter 1, Ctr1 和有机阳离子转运蛋白 2, organic cation transporter 2, Oct2)转运并积累于近端小管上皮细胞。顺铂的过量累积可导致细胞发生炎症、损伤和死亡,造成急性肾损伤<sup>[8]</sup>。

### (二) 血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)与血肌酐(serum creatinine, Scr)的检测原理

血尿素氮(BUN)是人体蛋白质代谢的主要末端产物。氨基酸脱氨基产生 $\alpha$ -酮酸和氨,而氨和二氧化碳在肝脏中合成尿素。每克蛋白代谢产生约 0.3 g 尿素,再通过肾小球滤过排出体外。BUN 是衡量肾功能主要指标之一,当肾小球滤过率下降或血容量严重减少时,其水平显著增高。

肌酐是由肌肉的肌酸通过不可逆的非酶促脱水反应缓慢形成并释放到血液,最终也是经过肾脏滤过而随尿排出体外。血肌酐(Scr)水平是临床早期判断 AKI 是否发生及其严重程度的重要生化指标之一,即使微弱升高也可能显著增加患者的死亡风险<sup>[9]</sup>。

### (三) 实时荧光定量聚合酶链式反应(real time quantitative PCR, RT-qPCR)原理

RT-qPCR 是在常规 PCR 基础上加入荧光染料或荧光探针,通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板的定量及定性分析。本次课程使用荧光染料法,SYBR Green I 是一种使用广泛的荧光标记染料,游离态几乎不发光,结合 DNA 后荧光强度大幅增强,根据反应时间和荧光信号的变化可以绘制荧光扩增曲线。荧光扩增曲线可分成三个阶段:荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段和平台期。仅当荧光信号指数扩增阶段,PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系,才可定量分析。本次实验中引入内参基因(18S RNA)对所有样品进行归一化处理,然后再对不同样品之间的目的基因表达量进行比较<sup>[11]</sup>。

肾脏受损后, Kim-1 在近端小管上皮细胞中表达显著增强,能迅速、灵敏、特异地反映各种肾脏疾病的损伤水平,是一种检测早期肾损伤的可靠生物学标记物<sup>[12]</sup>。IL-6 是机体创伤和修复过程中一种重要的急性期反应介质,机体创伤程度与 IL-6 水平呈正相关<sup>[13]</sup>。本实验利用 RT-qPCR 技术检测上述两个基因转录水平,从分子水平上反映肾脏损伤程度。

### (四) 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色原理

苏木精-伊红染色是病理分析中常用的染色法。碱性的苏木精染液使细胞核内染色质着紫蓝色;酸性伊红染料使细胞质和细胞外基质成分着红色。AKI 发生时,肾小管上皮细胞肿大,细胞核缺失,一些破碎的细胞碎片在肾小管管腔内形成管型(cast)堵塞肾小管,因此对石蜡切片进行 H&E 染色后,可清晰观察肾脏结构并分析病理变化。

## 三、实验设计与安排

### (一) 实验目的

掌握实验动物操作,了解小鼠急性肾损伤的诱导方法;掌握利用生化分析仪检测小鼠肾功能方法;学习并掌握 RT-qPCR 方法与原理;学习小鼠组织石蜡切片制备及观察方法。

### (二) 实验材料与设备

#### 1. 实验材料

10 周龄大 C57BL/6 小鼠(湖北省疾控中心);顺铂(Topscience 公司);RNAiso Plus(宝生物工程大连有限公司);氯仿、异丙醇、二甲苯和乙醇(上海沪试

实验室器材股份有限公司); DEPC 水(索莱宝科技有限公司); 逆转录试剂盒(Thermo scientific 公司); qPCR SYBR Mix(翊圣生物科技有限公司); 甲醛固定液(索莱宝科技有限公司); 石蜡(上海康朗生物科技有限公司); 苏木精和伊红(碧云天生物技术有限公司)血肌酐试剂片和血尿素氮试剂片(IDEXX 公司)

## 2. 实验仪器

离心机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司); qPCR 仪(Bio-Rad 公司); 生化检测仪(IDEXX 公司); 石蜡切片机(深圳市达科为生物技术股份有限公司); 普通光学显微镜(舜宇光学科技有限公司)

## (三) 实验步骤

### 1. 急性肾损伤模型构建

按 30 mg/Kg Body Weight(BW) 顺铂注射量对小鼠腹腔注射; 48h 后, 打开小鼠腹腔, 下腔静脉取血 600  $\mu$ l 后摘取两侧肾脏。一侧用于 RT-qPCR 实验, 另一侧用于制备石蜡切片。

### 2. 肾功能检测

静脉血室温静置 30min 后, 2000g 下 4  $^{\circ}$ C 离心 15min, 取上清, 即血清。按照生化检测仪使用手册, 取 100  $\mu$ l 血清至样品杯, 放入试剂片后放置生化检测仪检测。若测量结果超出试剂片检测范围, 血清可用生理盐水稀释后再行检测。

### 3. RT-qPCR

按照 RNAiso Plus 说明书提取小鼠肾脏 RNA 后, 检测 RNA 浓度; 按照逆转录试剂盒说明书, 向 PCR 管中加入 1  $\mu$ l Oligo(dT)18、1  $\mu$ l dNTP、3  $\mu$ g 总 RNA, 用双蒸水补齐至 12.5  $\mu$ l; 上述混合液在 65  $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后迅速置冰上冷却; 再加入 4  $\mu$ l 5 $\times$  First Buffer, 2  $\mu$ l DTT, 0.5  $\mu$ l M-MLV, 1  $\mu$ l RNase Inhibitor; 37  $^{\circ}$ C 逆转录 1 h 后 70  $^{\circ}$ C 孵育 15 min 以终止反应; 最后加入 180  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O 轻轻吹打混匀, 完成 cDNA 的制备。在 96 孔板上按照每孔 10  $\mu$ l 反应体系(2  $\mu$ l cDNA, 1  $\mu$ l 引物, 2  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O 和 5  $\mu$ l qPCR Mix)进行点样、离心机瞬时离心后, 放入 qPCR 仪, 设置 qPCR 程序进行实验: 预变性, 95  $^{\circ}$ C, 5min; 变性, 95  $^{\circ}$ C, 10s; 退火和延伸, 60  $^{\circ}$ C, 30s; 其中变性以及退火和延伸进行 40 次循环。

### 4. 石蜡切片制备

取小鼠肾脏于甲醛固定液中固定 18 h; 固定后的组织转移到 75% 乙醇处理 24h; 梯度乙醇脱水过缸到蜡缸; 2 h 后包埋; 调节切片机为 15  $\mu$ m 修片至组织暴露, 放入自来水中 4  $^{\circ}$ C 浸泡过夜; 调节切片机为 5  $\mu$ m 进行最终切片。

### 5. 石蜡切片的染色及观察

制作好的石蜡切片依次进行脱蜡和梯度乙醇复水, 然后进行苏木精染色 6 min, 自来水冲水 10 min, 伊红染色 30 s, 再进行脱水和透明处理, 最后用 50%

甘油进行封片<sup>[14]</sup>。置于光学显微镜下, 观察肾脏皮质细胞的形态。

## (四) 教学安排

### 1. 学时安排

课上 16 学时, 分四次进行, 每次 4 学时; 课前准备 1 学时, 由助教或学生利用课余时间进行。

### 2. 课前准备

顺铂溶液、组织固定液以及不同浓度的乙醇于课前新鲜配置。

### 3. 实验分组

根据实验动物数量和相关实验器材的具体条件进行分组, 2-3 人一组。根据协调分工、通力合作等方式完成包括小鼠解剖、采血、生化指标检测、切片制备、RNA 提取、染色和拍照等; 最后单独进行数据分析和实验报告撰写。

## (五) 实验结果示例

如图 1 所示, 对小鼠血肌酐及血尿素氮测定结果显示二者在顺铂诱导组(Cis)的含量均显著高于对照组(CT)(图 1A、B); 石蜡切片(横切)显示顺铂诱导组的肾小管出现细胞膨大及管腔内管型的形成(图中\*号)的现象, 而此现象在对照组的肾脏中未观察到(图 1C); RT-qPCR 结果显示与对照组相比, 肾损伤分子-1(Kim-1)基因和白细胞介素-6(IL-6)基因水平在顺铂诱导组的肾脏中分别显著上升 95 倍和 25 倍(图 1D、E); 同时, 在顺铂诱导组的小鼠肾脏石蜡切片中可观察到部分肾小管细胞细胞核消失(图中\*号)(图 1F)。

## 四、讨论

### (一) 实验内容开设的意义

小鼠是现代生物学、药学、病理生理学和医学等科学研究常用的实验动物材料, 提高本科生实验动物操作, 特别是小鼠相关操作十分必要。本实验模块中训练了学生小鼠实验的基础技能, 例如小鼠抓取、腹腔注射和解剖等, 帮助本科生更好适应未来有关课题研究。

相较于传统实验课程中的“一次课一实验”, 本实验内容设计为通过多次课完成一个大的综合性实验, 注重在实验过程中技术的培养及分析能力的锻炼。帮助学生了解小鼠肾损伤模型制备的全过程, 理解损伤过程中分子层面、组织形态层面以及血液代谢物浓度的多个角度的变化, 增进学生的学习兴趣以及培养学生的科研思维。

### (二) 实验模块开设的效果

该实验模块已在我校开设两年, 从学生问卷调查结果来看, 对该课程的满意度高。学生普遍反馈课程中的基础技能训练不但有助于克服动物实验时的一些心理障碍, 而且血液生化指标和肾脏基因表达



水平的检测有力提高了数据统计、处理以及作图能力,此外石蜡切片的制备过程趣味性较强,也提升

了学生的操作意识和动手能力。

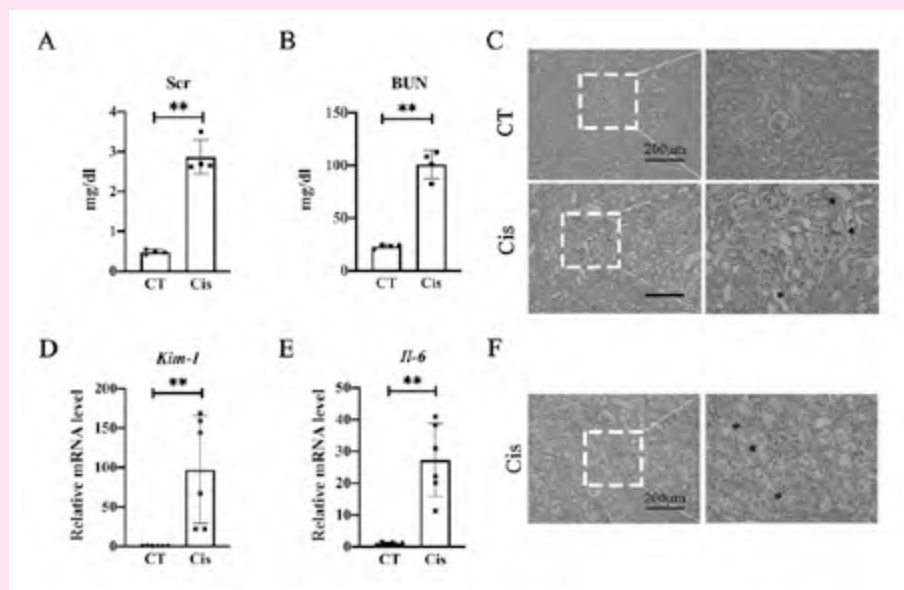


图1 建立顺铂诱导小鼠急性肾损伤模型

Fig.1 Set up of cisplatin induced acute kidney injury mouse model

(A, B) serum creatinine (A) and blood urea nitrogen (B) levels of mice in control group and cisplatin group; (C) H&E staining showed differences in renal tissue structure between the control group and the cisplatin group; (D, E) The transcription levels of Kim-1 (D) and Il-6 (E) in kidney of the control group and cisplatin group; (F) H&E staining showed that the nucleus of renal tubule epithelial cells disappeared in cisplatin group (n=4-6 in each experimental group, \*\*P < 0.01); a representative result by students.

(A、B) 对照组和顺铂组小鼠的血肌酐 Scr(A) 和尿素氮 BUN(B) 水平; (C) H&E 染色显示对照组与顺铂组小鼠肾脏组织结构差异; (D、E) 对照组与顺铂组小鼠肾脏中 Kim-1(D) 和 Il-6(E) 转录水平; (F) H&E 染色显示顺铂组小鼠肾脏中肾小管上皮细胞细胞核消失 (每个实验组 n=4-6, \*\*p < 0.01); 此结果为学生实验结果代表图。

### (三) 实验模块的推广与应用

随着专业学习的深入,许多本科生拟在三年级左右开始申请“大学生创新创业训练计划项目”或进入科研实验室从事业余科研项目。本实验内容教授的小鼠实验技术、疾病模型制备、生化指标检测、RT-qPCR 和组织切片染色以及病理观察等实验技术手段,为其在项目设计等方面提供基础。同时,该实验模块不仅能作为高年级本科生为提高自身动物实验技能而开展,也可以作为药学、生物医学等领域的低年级硕士研究生培养实验设计而开展,并可增加为治疗或缓解急性肾损伤药物筛选等方面实验内容。当前,作为本科生暑期素质教育提升的举措,许多高校已开设“第三学期”或“小学期”。“第三学期”中学生课程学习任务相对不重,可更好进行连续性实验课程安排,本实验内容能够很好地符合“第三学期”的教学特点。此外,本实验课设计的到的生化检测仪器和肾功能检测试剂片也可以用其它检测肾功能的产品代替,如南京建成试剂盒等,有效降低实验

费用,更有利于实验课程的推广。

### 参考文献:

- [1] KELLUM J A, ROMAGNANI P, ASHUNTANTANG G, et al. Acute kidney injury [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2021(1):52.
- [2] SAWHNEY S, MARKS A, FLUCK N, et al. Intermediate and Long-term Outcomes of Survivors of Acute Kidney Injury Episodes: A Large Population-Based Cohort Study [J]. Am J Kidney Dis, 2017(1):18-28.
- [3] SANCHEZ-PINTO L N, GOLDSTEIN S L, SCHNEIDER J B, et al. Association Between Progression and Improvement of Acute Kidney Injury and Mortality in Critically Ill Children [J]. Pediatric Critical Care Medicine, 2015(8):703-710.
- [4] LEWINGTON A J, CERDA J, MEHTA R L. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer [J]. Kidney Int, 2013(3):457-467.

- [5] 龙晓燕,温敏.转基因动物在人类疾病动物模型中的应用[J].云南中医中药杂志,2007(6):43-45.
- [6] 杨婷,林志健,姜卓希.急性肾损伤模型塑造研究进展[J].中国实验动物学报,2020(1):123-128.
- [7] Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X, Zhu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer[J]. Drug Des Devel Ther.2016(10):1885-1895.
- [8] MILLER R P, TADAGAVADI R K, RAMESH G, et al. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity [J]. Toxins (Basel), 2010(11):2490-2518.
- [9] SINGBARTL K, KELLUM J A. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes [J]. Kidney Int, 2012(9):819-825.
- [10] 安钢力.实时荧光定量PCR技术的原理及其应用[J].中国现代教育装备,2018(21):19-21.
- [11] 梁子英,刘芳.实时荧光定量PCR技术及其应用研究进展[J].现代农业科技,2020(6):1-3.
- [12] TANASE D M, GOSAV E M, RADU S, et al. The Predictive Role of the Biomarker Kidney Molecule-1 (KIM-1) in Acute Kidney Injury (AKI) Cisplatin-Induced Nephrotoxicity [J]. Int J Mol Sci, 2019(20):5238.
- [13] 乐海浪,罗国强.创伤后早期炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6的研究进展[J].现代诊断与治疗,2014(4):763-765.
- [14] 任成林,王爱华,苏杰.不同苏木精-伊红染色液在组织石蜡切片中的应用[J].畜牧兽医杂志,2006(6):29-30.
- [责任编辑:鞠守勇]

## Preliminary Exploration of Comprehensive Experimental Teaching Cases that Implement the Main Lines of “Disease” and “Kidney Cells”

FAN Yu, TANG Hao, LI Xiaoyan, ZHENG Ling

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

**Abstract:** Acute kidney injury (AKI) is a common and severe life-threatening clinical syndrome which refers to a sudden decline in renal function characterized by increased serum creatinine level and decreased urine output within seven days. AKI has a high mortality rate but lacks effective drugs. Cisplatin is one of the most widely used drugs for solid cancers such as lung cancer, cervical cancer and melanoma, but it causes many side effects including AKI. Based on the cisplatin-induced AKI mouse model, a comprehensive experimental course suitable for undergraduates was designed. Hand on construction of mouse cisplatin-induced AKI model, measurements of serum biochemical indexes, evaluation of renal gene expressions and pathological changes, have been taught in this course. This course helps undergraduates to master basic animal experimental techniques, deepen their thinking about data analysis, and increase their interests in scientific research thus initiatives their learning abilities.

**Key words:** acute kidney injury; cisplatin, mouse model; comprehensive experimental course