

黄文亭,曾子纯,王冬菊,等. 改良减少子宫血流灌注法建立子痫前期大鼠模型[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 776-780.

Huang WT, Zeng ZC, Wang DJ, et al. Establishment of a rat model of pre-eclampsia via the improved method of reduced-uterine perfusion pressure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 776-780.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.014

# 改良减少子宫血流灌注法建立子痫前期大鼠模型

黄文亭<sup>#</sup>, 曾子纯<sup>#</sup>, 王冬菊, 肖小敏<sup>\*</sup>

(暨南大学附属第一医院, 广州 510632)

**【摘要】** 目的 探讨子痫前期(PE)大鼠模型的建立方法。方法 SPF级妊娠Wistar大鼠39只,其中减少子宫血流灌注(RUPP)组16例、RUPP+灌水组10例、假手术组13例。分别孕14 d实施RUPP手术或假手术,孕18 d监测血压、尿蛋白及仔鼠状态。**结果** (1)RUPP手术对孕鼠的影响:与假手术组比较,RUPP组及RUPP+灌水组孕鼠收缩压、舒张压及平均动脉压均有不同程度上升,但单纯RUPP组血压上升不稳定,舒张压与假手术组差异无统计学意义;RUPP+灌水组血压稳定上升,且显著高于单纯RUPP组;RUPP组较假手术组孕18 d,24 h尿蛋白定量显著增高。(2)RUPP手术对仔鼠的影响:RUPP手术使孕20 d活产率及成仔率显著降低;RUPP手术使胎仔体重及胎盘湿重显著低于假手术组,其中RUPP+灌水组最明显。**结论** RUPP+灌水方法可诱发大鼠产生稳定的PE临床表现,推荐成为改良的RUPP造模方法。

**【关键词】** 先兆子痫;建模;动物模型;大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0776-05

## Establishment of a rat model of pre-eclampsia via the improved method of reduced-uterine perfusion pressure

HUANG Wenting<sup>#</sup>, ZENG Zichun<sup>#</sup>, WANG Dongju, XIAO Xiaomin<sup>\*</sup>

(Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Corresponding author: XIAO Xiaomin. E-mail: xiaoxiaomin55@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To establish a rat model of pre-eclampsia. **Methods** Thirty-nine specific pathogen-free pregnant Wistar rats were divided into 3 groups, with 16 in the reduced-uterine perfusion pressure (RUPP) group, 10 in the RUPP+H<sub>2</sub>O group and 13 in the sham-operation group. RUPP or sham surgery were performed on the 14th gestational day (G14). Blood pressure, urine protein and fetal status were measured on G18. **Results** (1) Compared with the sham-operation group, the systolic blood pressure, diastolic blood pressure and mean arterial pressure in the RUPP and RUPP+H<sub>2</sub>O groups were increased to different degrees in the pregnant rats, but the blood pressure in the RUPP group was unstable. The diastolic blood pressure did not significantly differ between the RUPP and sham-operation groups. The blood pressure of the RUPP+H<sub>2</sub>O group increased steadily and was significantly higher than that of the RUPP group. The 24-hour urine protein levels were significantly higher in the RUPP group than in the sham-operation group on G18. (2) RUPP surgery significantly reduced the live birth and formation rates on G20. The RUPP operation significantly reduced the fetal weight and placental wet weight compared with those of the sham-operation group, and these effects were the strongest in the

**【基金项目】** 广东省中医药管理局项目(34015011)。

Funded by Project of Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province of China (34015011).

**【作者简介】** 曾子纯(1995—),女,暨南大学附属第一医院研究生,研究方向:围产医学。Email:857392133@qq.com;

黄文亭(1990—),女,暨南大学附属第一医院研究生,研究方向:围产医学。Email:1415430421@qq.com。

<sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 肖小敏(1962—),女,教授,博士,博士研究生导师,研究方向:围产医学与高危妊娠。Email: xiaoxiaomin55@hotmail.com

RUPP+H<sub>2</sub>O group. **Conclusions** The RUPP+H<sub>2</sub>O method induces a stable clinical manifestation of pre-eclampsia in rats and is recommended as a modified method for modeling RUPP.

**【Keywords】** pre-eclampsia; modeling; animal model; rat

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

子痫前期(pre-eclampsia, PE)是妊娠期特有的多系统疾病,临床表现以由全身血管内皮系统广泛损伤为主要病理基础的高血压、蛋白尿为主,是导致围产期母婴死亡的主要产科并发症之一<sup>[1]</sup>。为了研究妊娠高血压疾病的发病机制及探索诊治方法,目前国内外有多种方法可建立妊娠期高血压模型。其中传统的减少子宫血流灌注(reduced-uterine perfusion pressure, RUPP)手术建立 PE 模型,由于能较针对性地引起由于胎盘缺血缺氧导致的妊娠高血压,接近临床上 PE 的发生机制,加上未使用药物建模,可减少建模药物对实验结果的影响,相比其他建模方式为多人选择<sup>[2]</sup>。本实验对 RUPP 手术建模方法进行改良,比较了 RUPP+灌水法与传统 RUPP 法建立子痫前期模型的效果差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 39 只,由广州中医药大学动物实验中心提供【SCXK(粤)2013-0034】,体重(250±20)g,饲养于暨南大学动物实验中心【SYXK(粤)2017-0174】。每晚将雌鼠与性成熟雄性大鼠按雌雄比 2:1~3:1 合笼过夜,次日取雌鼠阴道分泌物涂片后在显微镜下观察,见精子者定为孕 0 d,妊娠后常规喂养。该实验已通过暨南大学实验动物伦理委员会伦理审查(受理号 20150205001)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 孕 14 d

开腹手术,同时观察妊娠仔鼠数将已孕 14 d 的雌性大鼠随机分为三组:(1)RUPP 组 16 例:观察并记录孕仔数后实施 RUPP 手术,关腹后不给予任何干预。(2)RUPP+灌水组 10 例:实施 RUPP 手术后每日给予双蒸水 2 mL 灌胃。(3)假手术组 13 例:开腹暴露腹主动脉及双侧卵巢动脉,不钳夹血管。观察并记录孕仔数后即关腹,关腹后不给予任何干预。

RUPP 手术方法:孕 14 d 大鼠异氟烷诱导麻醉后,3%戊巴比妥钠按 4 mL/kg 腹腔注射麻醉,沿下腹正中线开腹,暴露腹主动脉下端、子宫及卵巢动脉,于腹主动脉下段近髂动脉分叉起始处置银夹 1

枚钳夹血管,左右两侧子宫动脉第一分叉前分别置银夹 1 枚,该法可使子宫血流灌注减少到 40%,胎盘处于缺血缺氧状态,常规关腹<sup>[2]</sup>。

#### 1.2.2 孕 18~20 d

观察血压、尿蛋白及妊娠结局(1)血压测量:于孕 19 d 当天 12:00 前完成有创颈动脉插管,晚间 20:00-21:00 及第二天 8:00-9:00 清醒状态下测量有创动脉血压 2 次取平均值。(2)尿蛋白:于孕 18 d 放 DXL-10 不锈钢标准大鼠代谢笼,留取 24 h 尿液,测量 24 h 尿蛋白定量。(3)仔鼠状态的判断:孕 20 d 测压结束后腹腔注射麻醉下行剖宫产,观察记录仔鼠死亡、畸形情况。成仔鼠为活产与死、畸胎仔总和。分别对活胎及死胎统一称重,再除以其胎数取平均值。分别对活胎胎盘及死胎胎盘称重,取其均数。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,对所有计量数据进行正态检验,正态计量数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,非正态则以中位数[M(P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]表示。正态数据使用 *t* 检验,非正态数据使用秩和检验或 Kruskal-Wallis H 检验, *P*<0.05 表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 孕鼠一般情况

实验过程中发生了孕鼠死亡及仔鼠全部吸收的情况,其中假手术组、RUPP 组、RUPP+灌水组纳入实验孕鼠总数分别为 13 例、16 例、10 例,死亡孕鼠分别为 0 例、2 例、0 例,胎仔全吸收孕鼠分别为 0 例、4 例、1 例。经  $\chi^2$  检验,三组间死亡率及吸收率差异均无显著性(*P*=0.785, *P*=0.110),因此将死亡孕鼠及胎仔全吸收鼠剔除实验,纳入后续研究孕鼠数量分别是:假手术组 13 例、RUPP 组 10 例及 RUPP+灌水组 9 例。

### 2.2 三组孕鼠建模效果比较

#### 2.2.1 三组孕鼠孕 19~20 d 血压比较

建模后孕鼠收缩压、舒张压及平均动脉压均有不同程度上升,差异有显著性(*P*<0.05);其中 RUPP+灌水组血压上升明显,三项指标较其余两组

差异均有显著性( $P < 0.05$ ); RUPP 组舒张压与假手术相比差异无显著性( $P = 0.122$ )。(表 1)

### 2.2.2 三组孕鼠孕 18 d, 24 h 尿蛋白比较

假手术组 18 d, 24 h 尿蛋白为(3.47±1.32) mg, RUPP 组为(4.96±0.85) mg, RUPP+灌水组为(4.14±1.05) mg, 三组差异有显著性( $P = 0.013$ ), 其中 RUPP 组与假手术组相比显著增高, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), RUPP+灌水组与 RUPP 组及假手术组组间比较差异均无显著性( $P = 0.103, P = 0.183$ )。

### 2.2.3 三组孕鼠孕 14 d 及孕 20 d 胎仔数比较

各组孕鼠其孕 20 d 活仔率、成仔(活仔与死畸胎数之和)率为非正态, 故使用中位数(M)进行检验, 多组检验方法为 Kruskal-Wallis H 检验, 组间两两比较使用 Mann-Whitney 检验。如表 2 所示, 造模前孕 14 d 时各组孕仔差异无显著性( $P > 0.05$ ), 手术后, 三组孕 20 d 活仔率及成仔率差异有显著性( $P = 0.000$ ); 组间比较, 假手术组孕 20 d 活仔率及成仔率明显高于 RUPP 组及 RUPP+灌水组, 差异有显著性(均  $P = 0.000$ ), RUPP 组与 RUPP+灌水组间比较差异无显著性( $P = 0.968, P = 0.549$ )。

表 1 三组孕鼠孕 20 d 血压比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of blood pressure of the pregnant rats on G20 day among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	例数 <i>n</i>	收缩压 Systolic blood pressure (mmHg)	舒张压 Diastolic blood pressure (mmHg)	平均动脉压 Mean arterial pressure (mmHg)
假手术组 Sham operation group	13	86.78±12.53	78.46±15.01	81.21±14.17
RUPP 组 RUPP group	10	103.01±7.19 <sup>a</sup>	90.01±21.38	94.34±16.39 <sup>a</sup>
RUPP+灌水组 RUPP+H <sub>2</sub> O group	9	125.97±10.37 <sup>ab</sup>	110.27±11.81 <sup>ab</sup>	115.50±11.07 <sup>ab</sup>
<i>P</i>		0.000	0.001	0.000

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。与与 RUPP 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the sham operation group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with the RUPP group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

表 2 三组孕鼠孕 14 d 孕仔数及孕 20 d 胎仔数比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the numbers of fetuses on G14 day and litters on G20 day among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	例数 <i>n</i>	孕 14 d 孕仔数 Fetuses on G14 day ( <i>n</i> )	孕 20 d 活仔数 Live birth rate on G20 day (%)	孕 20 d 成仔数 Formed fetus rate on G20 day (%)
假手术组 Sham operation group	13	11.62±3.93	91.67(70.38, 100.00)	93.75(86.97, 100.00)
RUPP 组 RUPP group	10	14.60±1.96	20.83(7.55, 41.36) <sup>a</sup>	25.83(7.55, 48.33) <sup>a</sup>
RUPP+灌水组 RUPP+H <sub>2</sub> O group	9	13.56±2.30	20.00(8.01, 33.33) <sup>a</sup>	20.00(8.01, 33.33) <sup>a</sup>
<i>P</i>		0.116	0.000	0.000

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the sham operation group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

### 2.2.4 三组胎仔体重及胎盘湿重比较

三组间孕 20 d 活仔体重及胎盘湿重差异有显著性, 其中假手术组活仔体重明显高于 RUPP 组及 RUPP+灌水组, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), 而 RUPP 组及 RUPP+灌水组间差异无显著性( $P = 0.746$ )。RUPP+灌水组胎盘湿重明显低于假手术组, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), RUPP 组与 RUPP+灌水组差异无显著性( $P = 0.080$ )。(表 3)

## 3 讨论

### 3.1 常见 PE 动物模型建立方法

目前, 子痫前期的发病机理尚不清楚, 比较公认是与子宫胎盘缺血缺氧有关, 另外也与水钠代谢遗传异常、神经功能紊乱、各种血清因子释放异常等相关。因此, 目前常见的子痫前期动物模型建立方法包括<sup>[3]</sup>: (1) 手术钳夹腹主动脉或子宫动脉, 减

表 3 三组胎仔体重及胎盘湿重比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Comparison of fetal weight and placental wet weight among the three groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	例数 <i>n</i>	胎仔体重 Fetal weight (g)	胎盘湿重 Placental wet weight (g)
假手术组 Sham operation group	13	4.82±1.44	0.53±0.18
RUPP 组 RUPP group	10	3.11±0.90 <sup>a</sup>	0.46±0.17
RUPP+灌水区 RUPP+H <sup>2</sup> O group	9	2.83±0.31 <sup>a</sup>	0.31±0.09 <sup>a</sup>
<i>P</i>		0.000	0.012

注:与假手术组相比,<sup>a</sup>*P*<0.05。

Note. Compared with the sham operation group, <sup>a</sup>*P*<0.05.

少子宫血流灌注,造成子宫胎盘缺血缺氧<sup>[4-5]</sup>。此法可快速建立模型,且缺血部位明确,也避免了药物对实验本身的干扰。但造模成功率不稳定,也无法体现滋养细胞侵袭不足、胎盘浅着床等特异性 PE 病理改变。(2)品系为 BPH/5 小鼠和 Dahl 盐敏感性大鼠的子代重复交配,可在自然培育的情况下产生高血压,具有一定遗传性<sup>[6]</sup>。此法无人工干预,发生机制与人类相同,但饲养条件高,育种周期长,遗传性不稳定、易变种,延长了实验周期。(3)应用一氧化氮合酶抑制剂(L-NAME)因子诱导模型<sup>[7]</sup>,或携带人重组缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )蛋白的腺病毒<sup>[8]</sup>,诱导孕鼠特异性产生 PE 样症状。但并未报道肾脏、胎盘等脏器的病变情况,且药物本身对胎鼠有毒性作用,可能干扰 PE 重要指标的准确性。(4)通过低氧、惊吓、生活环境拥挤等物理方法,持续刺激孕鼠,诱发 PE 症状<sup>[9-10]</sup>;但未报道胎盘滋养细胞的侵袭情况及肾脏小血管损伤程度。

### 3.2 RUPP 改良手术造模法

本次实验 PE 造模的目的是用于后续药物试验,实验初始设计对孕鼠进行单纯 RUPP 手术造模,因后续研究需要灌药干预,因此另外设置了 RUPP+灌水区作为空白对照,但实验的结果非常有趣,虽然单纯 RUPP 组与 RUPP+灌水区均能出现高血压、蛋白尿等 PE 临床表现,但单纯 RUPP 手术血压增高并不稳定,有时甚至不能出现高血压,而 RUPP+灌水区孕鼠则能稳定表现出高血压,且仔鼠 FGR 情况更明显。因此,我们认为这可以成为一种 RUPP 改良模型。分析其原因可能为:RUPP 手术后,在子宫胎盘缺血模型基础上,每天灌胃对孕鼠造成压力,使孕鼠持续处于紧张状态,激活交感神经系统,交感神经系统过度刺激,去甲肾上腺素分泌增多,抗血管收缩因子分泌减少,所以能诱导出更明显的妊娠高血压症状,与 Takiuti 等<sup>[9]</sup>及 Kanayama 等<sup>[11]</sup>

等研究相符合。

本研究另外一个发现是,虽然 RUPP+灌水区孕鼠血压更高,但其 24 h 尿蛋白量并未见明显增高,是否与灌水区增加了血容量从而改善肾脏血流量有关?尚需进一步研究。但本研究显示,虽然 RUPP+灌水区 24 h 尿蛋白量增加不明显,胎儿生长受限却更显著,而且胎盘湿重更低,说明灌水区并不能改善子宫胎盘血流,RUPP 手术机械性钳夹血管降低子宫灌注是非常有效的。

多年来,传统 RUPP 手术建立 PE 模型由于能较针对性地引起由于胎盘缺血缺氧导致的妊娠高血压,接近临床上 PE 的发生机制,加上未使用药物建模,可减少建模药物对实验结果的影响,相比其他建模方式人数较多选择,但其重复性受大鼠品系、遗传背景、实验室条件等影响因素较多<sup>[2,5,12-13]</sup>。本次实验的结果显示,RUPP+灌水区后能更稳定地构建 PE 模型,为子宫胎盘缺血妊娠高血压造模提供了新思路。

### 3.3 不足之处

RUPP 手术对孕鼠基本体质及实验室环境要求较高,且 RUPP 手术及颈动脉插管两次手术对孕鼠打击大,两次手术间隔时间短,孕鼠未完全恢复,令实验母鼠丢失率及胎仔吸收率较预期高。

临床公认的 PE 发病机制为:胎盘缺血缺氧,局部释放多种胎盘因子入血,引起全身小血管痉挛导致多脏器损伤。本实验只对孕鼠血压、蛋白尿及胎仔情况等临床表现进行了研究,并未关注孕鼠血液中的炎症介质含量及子宫以外其他脏器受损情况,能否模拟出临床公认的 PE 发病机制有待进一步研究。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Steegers EA, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, et al. Pre-eclampsia [J]. Lancet. 2010, 376(9741): 631-644.

- [ 2 ] Li J, LaMarca B, Reckelhoff JF. A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(1):H1-8.
- [ 3 ] 周盛萍. 子痫前期动物模型研究进展 [J]. *实用妇产科杂志* 2017, 33(10):744-747.  
Zhou CP. Progress in animal models of preeclampsia [J]. *J Practic Obstetr Gynecol*, 2017, 33(10):744-747.
- [ 4 ] Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia [J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 642-649.
- [ 5 ] Rogers JB, Klein R, Blumenthal HT, et al. Placental permeability in a toxemia-susceptible strain of guinea pigs [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1964, 88(4): 495-501.
- [ 6 ] Ganaway JR, Allen AM. Obesity predisposes to pregnancy toxemia (ketosis) of guinea pigs [J]. *Lab Anim Sci*, 1971, 21(1): 40-44.
- [ 7 ] Baijnath S, Soobryan N, Mackraj I, et al. The optimization of a chronic nitric oxide synthase (NOS) inhibition model of pre-eclampsia by evaluating physiological changes [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 182(1): 71-75.
- [ 8 ] Tal R, Shaish A, Barshack I, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  overexpression in pregnant mice: possible implications for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(6): 2950-2962.
- [ 9 ] Takiuti NH, Kahlale S, Zugaib M. Stress in pregnancy: A new Wistar rat model for human preeclampsia [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 186(3):544-550.
- [ 10 ] La Marca BB, Bennet WA, Alexander BT, et al. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor- $\alpha$  [J]. *Hypertension*, 2005, 46(4): 1022-1025.
- [ 11 ] Kanayama N, Tsujimura R, She L, et al. Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats [J]. *J Hypertens*, 1997, 15(4): 383-389.
- [ 12 ] 姚蓓蓓, 桂鸣, 徐秀秀, 等. 妊娠大鼠子宫胎盘缺血改良手术方法诱发妊娠高血压模型 [J]. *中华高血压杂志*, 2014, 22(1): 74-78.  
Yao BB, Gui M, Xu XX, et al. Gestational hypertension models induced by modified surgery for uteroplacental ischemia in pregnant rats [J]. *Chin J Hypertens*, 2014, 22(1):74-78.
- [ 13 ] 周燕, 朱剑文, 邹丽, 等. 改良法建立妊娠期高血压疾病大鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(1): 53-56+83.  
Zhou Y, Zhu JW, Zou L, et al. An improved method to establish animal model of hypertensive disorder complicating pregnancy [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2009, 17(1): 53-56+83.

[ 收稿日期 ] 2019-06-03