

# 子痫前期动物模型的制备及结果

## Preparations and Results of Animal Models of Preeclampsia

王甜<sup>1</sup> 朱丽红<sup>2</sup> 蔡晓晓<sup>1</sup> 袁宁霞<sup>2</sup> 杨小颀<sup>2</sup>

Tian Wang<sup>1</sup> Lihong Zhu<sup>2</sup> Xiaoxiao Cai<sup>1</sup> Ningxia Yuan<sup>2</sup> Xiaoqi Yang<sup>2</sup>

1.陕西中医药大学

中国·陕西 咸阳 712046;

2.陕西中医药大学第二附属医院

中国·陕西 咸阳 712046

1.Shaanxi University of Chinese Medicine,

Xianyang, Shaanxi, 712046, China;

2.The Second Affiliated Hospital of Shaanxi

University of Chinese Medicine,

Xianyang, Shaanxi, 712046, China

基金项目:1.生殖与代谢营养创新团队,团队负责人:朱丽红,项目编号:2019-QN08。

2.补肾活血方对子痫前期模型鼠血栓前状态的影响,项目编号:LCMS015(2017.09-2018.12)。3.补肾活血法对子痫前期模型鼠血栓前状态的影响,项目编号:2017k-02-106。

**【摘要】**目的:分析总结子痫前期动物模型的现有情况,对造模方法及检测结果进行概括比较。方法:对子痫前期相关学术期刊、会议论文等进行电子和人工检索。结果:判断模型情况主要通过观察动物行为学以及收集有关子痫定义指标,如血压、尿蛋白、镜下病理等。结论:中医指导下的方法目前无明确指标验证模型成功。遗传缺陷模型类似子痫前期症状,但是与子痫前期病因不一致。

**【Abstract】**Objective: To analyze and summarize the current situation of animal modeling in preeclampsia, and to compare and summarize the modeling methods and test results. Methods: Electronic and manual retrieval of preeclampsia related academic journals, conference papers, etc. Results: The model was judged mainly by observing animal behavior and collecting relevant indexes of eclampsia, such as blood pressure, urinary protein, and microscopic pathology. Conclusion: The method under the guidance of traditional Chinese medicine has no clear index to validate the model. The genetic defect model resembles preeclampsia symptoms but is inconsistent with the etiology of preeclampsia.

**【关键词】**中医证型;子痫前期;动物模型;鼠;妊娠肿胀

**【Keywords】**TCM syndromes; preeclampsia; animal model; rats; pregnancy swelling

**【DOI】**10.36012/pmr.v2i1.1314

## 1 引言

子痫前期(preeclampsia, PE)指妊娠 20 周后,出现血压升高和蛋白尿,并可能出现头痛、眼花、恶心、呕吐等症状。PE 相关疾病在临床属于产科急危病症,严重时发展为子痫,影响母婴安全。在中医方面,PE 疾病名为妊娠肿胀或妊娠眩晕,严重时为妊娠病证(妊娠病证属于子痫范畴)。妊娠眩晕常见的分类有脾虚、肾虚、气滞。妊娠肿胀常见的分类有肝肾阴虚、气郁

痰滞、气血虚弱。因 PE 与妊娠眩晕中的肝肾阴虚证表现重合度最高,所以只论述肝肾阴虚证造模法。由于子痫发病原因不明,因此对妇产科 PE 模型造模方法及进程进行归总,对研究 PE 有重要的意义。随着对现代疾病防治研究的深入,造模方法各有异同,中医药指导下的造模方法等逐渐走进大众视野。社会及相关医务人员对中医药治疗的确切认知要求越来越严格清晰,从中医理论的角度出发造模相关疾病将是研究中药的趋势,这对传统中医药来说是一个变革。现对 PE 动物模

型制备法及相关印证模型成功数据结果做出归纳概述,分为西医理论指导下的造模方法和中医理论指导下的造模方法,具体如下。

## 2 现代医学理论指导下的造模方法

### 2.1 药物诱导

#### 2.1.1 注射病毒型模型

方法:用表达人源 sFlt-1(阻挠血管生长)的慢病毒转染去透明带的囊胚后移植到假孕鼠子宫内。抗血管生成可溶性 FMS 样酪氨酸激酶-1(sFlt-1)是子痫前期进展的原因之一,通常与胎儿生长受限(FGR)有关。因此,产生了转基因的人 sFlt-1/逆转录四环素控制的转激活子(hsFlt1/rtTA)小鼠,其中 hsfl1 在雌鼠妊娠期间普遍过度表达。在 hsFlt1/rtTA 纯合子胎儿中观察到与 FGR 相关的最强效应,其中 hsFlt1 水平最高。只有胎儿 hsFlt1 表达导致胎盘形态受损,其特征是胎盘效率降低,母体窦扩大,胎儿毛细血管减少,迷路分化受损,与凋亡增加有关。模型鼠表现为胎盘重量下降、胎盘血管的改变。除了胎盘血管化受损外,还影响了一些转运系统的表达,如葡萄糖转运蛋白 1 和 3(GLUT-1;GLUT-3)等。此外,血管内皮生长因子途径也发生了改变,导致血管内皮生长因子、血管内皮生长因子 B 和血小板生长因子蛋白水平降低,Bad 和 Caspase9、mRNA 水平升高。作者认为,hsFlt1 通过减少血管内皮生长因子信号传导对胎盘血管形成有抑制作用,从而导致胎儿血管凋亡,损害胎盘分化和迷路的营养交换功能。当母体和胎儿都表达 hsFlt1 并最终导致 FGR 时,这些效应更为明显,与人类的先兆子痫表型相似<sup>[4]</sup>。近来,外文多篇证实 sFlt-1 与子痫前期的密切关系。

#### 2.1.2 重组鼠源 VEGF164 模型

实验人员开发了一种转基因方法,特别是在小鼠子宫内腔中发现,子宫内膜特异性 VEGF 表达诱导胎盘 sFlt-1 产生和升高的 sFlt-1 水平在母体血清中。这导致了妊娠损失、胎盘血管缺陷和子痫前期样症状,包括母亲的高血压、蛋白尿和肾小球内皮病。胎盘中可溶性 FMS 样酪氨酸激酶-1(sFlt-1)的过度产生是通过 sFlt-1 依赖的血管内皮生长因子拮抗影响子痫前期血管功能的主要原因。然而,胎盘 sFlt-1 上调的原因尚不清楚。Fan X 等人证明,在先兆子痫的妇女中,胎盘滋养层中的 sFlt-1 上调,而邻近的母体蜕膜细胞中的 VEGF 上调。在对血管内皮生长因子的反应中,在培养的小鼠滋养层干细胞中,sFlt-1 的表达增加,而不是全长的 Flt-1 的表达增加。胎盘 sFlt-1 与滋养层特异性转基因的敲除导致胎盘血管改变,这与过度的血管内皮生长因子活性一致。此外,在 VEGF 过度表达

的动物中,sFlt-1 的敲除增强了仅由 VEGF 过度表达引起的症状。此种方法仅有国外少量记载,具体实施及效果还需验证<sup>[5]</sup>。

#### 2.1.3 供氧失调模型

①减少子宫灌注压(RUPP)模型。采用减少子宫灌注压的方式建立 PE 大鼠模型,检测尾血压、24h 蛋白尿等和胎盘相关的基因表达。此方法于 1982 年由 Abitbol 等人发现,后改良为:合笼见栓后,于第 14 天腹主动脉分支子宫动脉处银夹<sup>[6]</sup>。通过手术前后孕鼠血压、尿蛋白和胎盘血流变化,分析胎盘、肾脏等镜下改变和 PE 相关因子的表达改变。得出 RUPP 组术前平均动脉压、尿微量白蛋白/肌酐比值差异均有统计学意义(P 均<0.05)。脐动脉血流增高,胎盘血管对比不足,迷路层血管孔径对比变小,肾小球内皮细胞增生显著异常。胎盘组织相关因子 sFlt-1、HIF-1、PLGF 表达均上升,而 VEGF 表达减弱。孟亚宁等人据此认为是比较好的 PE 模型。

②缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )表达模型。缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )被认为是 PE 患者普遍存在的缺氧状态的初步因素,它导致血管生成蛋白表达失衡。在合体滋养层中发现 HIF-1 $\alpha$  的显著核和细胞质表达,PE 患者合体滋养层细胞质中 PIGF 相关强度较低。此外,子痫前期妇女血清 HIF-1 $\alpha$  和下调的 PHIF 浓度显著升高,组织中 HIF-1 $\alpha$  与 PIGF 的直接关系可能是低氧化应激和内皮功能障碍的重要原因,从而导致 PE 的发病机制。在妊娠第 8 天,于鼠尾静脉注射表达 HIF-1 $\alpha$  的腺病毒,随后舒张压上升、蛋白尿出现及肾脏内皮细胞增生,sFlt-1 和 sEng 在循环中显著上升,还有相关如宫内发育迟缓(IUGR)和类 HELLP 表现。缺点:未发现滋养层细胞异常。而在 COMT 酶敲除模型中,HIF-1 $\alpha$  活性变强,模型鼠会有 IUGR、血压增高和蛋白尿等 PE 症状。并且,发现此模型中孕鼠子宫蜕膜有动脉小螺旋现象,但胎盘中迷路层与海绵层中的滋养层细胞和巨滋养层细胞中的标志分子都没发现显著变化。

#### 2.1.4 炎症反应及细胞因子诱导模型

大鼠于合笼见栓后第 14 天,于尾静脉缓慢注入 1.0g/kg 脂多糖溶液,建立 PE 大鼠模型。发现血压增高和蛋白尿,但没有血管形成相关因子和滋养层细胞浸润的数据。内毒素对于试验动物的处理看起来是矛盾的,内毒素改变既可以引起血压下降甚至休克,又可致血压上升。用小剂量内毒素注射第 12 天到第 18 天的妊娠大鼠,测鼠血压自给药第 2 天持续升高,且第 15 天、19 天,24 小时蛋白尿明显增加,同时白细胞粘附分子 CD49D 的表达率及血浆 TNF- $\alpha$  浓度较正常妊娠有明显升高,综合现象与 PE 临床表现一致,Zhou CC 等人认为建模成功。

### 2.1.5 血管紧张素 II 1 型(AT1)受体抗体注射模型

妊娠期间注射 AT1 受体抗体法通常利用主动免疫方法来造高血压鼠模型,利用 PE 与高血压情况的部分因素重合作为切入点。血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)自身抗体(AT1-AA)是先兆子痫的一个致病因素。AT1-AA 能持续诱导血管收缩,引起一系列不良反应,如血管损伤和胎盘灌注不良。然而,其基本机制仍不清楚。方法和结果:收集临床血清测定获得 AT1-AA,免疫法建立大鼠胸动脉内皮完整或内皮剥脱的长期血管收缩模型。作者认为,抑制  $\beta$ -抑制蛋白 1/2 募集引起的 AT1R 内化受限,对 AT1-AA 阳性 IgG 诱导的持续性血管收缩具有重要作用,这可能为避免 AT1R 过度激活对先兆子痫的治疗奠定了基础,也为 AT1 造模法提供了新的证据。此法会出现类似 PE 的症状,包括高血压、蛋白尿和血管功能受损等,但无肾损害证据。

### 2.1.6 慢性高血压和血管损伤模型

在此不对相关模型做论述。

### 2.1.7 T 细胞功能障碍模型

2009 年,美国学者 Mark Santillan 等发现了一种吡啶胺 2,3-二加氧酶(IDO)缺乏的先兆子痫小鼠模型的建立和表征。Santillan 等人发现妊娠的 IDO 敲除小鼠表现出特征性肾小球内皮细胞增生、蛋白尿、妊娠特异性血管内皮功能障碍及 IUGR。缺点:模型血压仅轻度升高。

### 2.1.8 一氧化氮合酶抑制模型

一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)是一种抑制 NOS 生产的精氨酸类似物,对血管系统有多重效果,包括抑制乙酰胆碱诱发的舒张,诱导增加动脉血液压力。

方法:自合笼见栓第 12 天开始,孕鼠皮下注射 L-NAME(剂量为 120mg/d/kg),共 7 天。部分模型鼠出现肝小叶局灶性变性坏死,发现尿蛋白、血压明显增高、肾功能损伤,这些与 PE 患者的特点类似。本实验研究结果与 Neerhof 等人的观点一致。同时,应用 L-NAME 后胎鼠胎盘血液灌注量减少所导致的胎盘体积较小、重量减轻,部分胎盘发白,螺旋小动脉等胎盘病理变化,也与人类 PE 胎盘的病理改变相符合。此外,仔鼠还表现为四肢短缩、畸形、无爪,形似海豹。然而,有研究认为,畸形是由于 L-NAME 的副作用导致的。但是,L-NAME 造模法目前也是国内常用的方法。

## 2.2 基因遗传缺陷模型

### 2.2.1 BPH/5 小鼠模型

BPH/5 小鼠是一种轻度高血压的鼠种,它本身就具有 PE 的相关症状,包括妊娠晚期血压增高、蛋白尿、内皮功能障碍、肾

小球硬化、胎盘发育畸形和子宫螺旋小动脉等。

### 2.2.2 p57Kip2 基因缺失小鼠模型

2002 年,Kanayama 等人发现,当 p57Kip2 缺失时,鼠孕后会出现类似 PE 的症状,包括血压增高、蛋白尿、肾脏受损、滋养层细胞浸润不足、血小板减少、抗凝血酶 III 活性降低和内皮素增多等,这些类似 PE 的症状是由 p57Kip2 缺失导致不成熟的中间型滋养层细胞过度增殖引起的。缺点:研究者缺乏阐明母体循环中 sFlt-1 或 sEng 及 IUGR 相关的情况。

### 2.2.3 RGS5 缺失小鼠模型

RGS5(regulator of G-protein signaling 5)既是癌症中血管重塑的关键调节器,也是心血管功能的临界调制器。2015 年,Holobotovskyy 等人在繁殖 RGS5 敲除小鼠时发现,RGS 缺失的模型鼠会出现血压增高、尿蛋白阳性、sFlt1 上升和仔鼠胎盘血管改变等 PC 症状,另外还出现了 IUGR。缺点:并没有发现肾脏损伤症状。

## 3 中医病机病理知指导肝肾阴虚造模模型

### 3.1 子痫前期中医病因病机

PE 在中医的概念中有妊娠肿胀(子肿)、妊娠眩晕(子晕),严重者则为妊娠痫症(子痫)等。《医宗金鉴 妇科心法要诀》中写道:“头面遍身浮肿,小水短少者,属水气为病,名约子肿。”此处与妊娠高血压水肿相符合。《陈素庵妇科补解》中写道:“妊娠头暈目眩,忽然视物不明……风火相搏,伤血动胎,热甚则头旋目晕视物不明。”与妊娠高血压疾病引起的眩晕相符合。综合病因病机总结为肝肾阴虚为 PE 主要表现证型。以下论述肝肾阴虚造模法。因无法检索到中药相关子痫前期造模法,因此概述中医证型肝肾阴虚造模法。

### 3.2 子痫前期相关中医药指导下的造模方式

#### 3.2.1 中医药物、饮食造模

肝肾阴虚模型按造模方式可分为中医病因模型和病症结合模型。

中医病因学建立的动物模型称为中医病因模型。利用温燥药造模法是根据中药学特点,以辛温燥烈之阳灼烧阴液,最终因“火灼津液,营阴暗耗”而造成肝肾阴虚模型。潘琳娜等人认为此法建立的肾阴虚模型在行为学表现、激素变化方面均与肾阴虚证相似,采用附片、吴茱萸、肉桂、细辛按 2:2:1:1 的比例称取药材,混合提取挥发油,按 15g/kg 生药量给动物灌胃 21 天后,成功制作肾阴虚动物模型。而陈晓阳等人发现,模型鼠表现为鼠毛潮湿且光泽差,活动较之前减少,便干、易怒等。

辨证相结合复制的动物模型称为病证结合模型。陈昌波、马静等人利用热性中药成功造模。热性中药取附子、吴茱萸、

肉桂、细辛按比例配置,混合后提取挥发油,水煎 2 次,每次 40min,过滤后合并,80~100℃水浴浓缩,兑入挥发油制成含生药 1.5g/mL 的水溶液,每天灌胃 10mL/kg,连续 7 天,结论显示无法复制模型。运用温燥药建模的研究不多,且此法建立的模型动物症状体征也不完全一致。此仅为肝肾阴虚造模,没有血压统计数据,没有 PE 相关现代数据支持。

### 3.2.2 中医理论指导下的西药造模

氢化可的松肾阴虚组:腹腔注射氢化可的松 50mg/(kg·d),连续 7 天。甲状腺素联合利血平组:灌胃给予甲状腺素 150mg/(kg·d)和利血平 1mg/(kg·d),连续 7 天。采集动物食量、饮水量、体质量、自主活动情况、呼吸耗氧量、体温、体能耐力、血清环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)与环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)及其比值等指标,观测鼠评价模型成功与否。结论显示,皮下注射氢化可的松、灌胃甲状腺素联合肌肉注射利血平混悬液可在短时间内建立肾阴虚证模型小鼠。证候往往由多因素导致,复合因素造模法稳定性,较符合中医理论和临床实际。复合造模法:施旭光等人采用肾上腺皮质激素联合激怒法致 cAMP、cGMP 升高。陈主初建立高血压肾阴虚模型,采用结扎实验动物一侧肾动脉的方式,通过条件反射造成神经性肾性高血压。此法与 PE 相关,与 PE 造模方法类似,造成高血压结果。采用去势法联合甲状腺素给药,建立大鼠围绝经期综合征肾阴虚证模型。病证结合模型由中医诊疗模式发展而来,将是中医类似模型研究的趋势。

## 4 结语

上述讨论的各类模型提供了 PE 模型的演变及现有成果。动物模型探索将继续加深研究者对于细胞层面下 PE 的病理认识。虽然这些模型或多或少有缺陷及漏洞,对 PE 疾病复杂的相互作用关系没有阐述清楚,但是目前国内外没有任何一

个模型能完美模拟 PE 表现,更何况模拟从开始发展到其危机出现的变化情况,即从 PE 的发展变化角度去完美模拟。而中医研究 PE 在某些层面上补充了部分生物行为学的不足。中医子痫前期相关疾病,如妊娠肿胀中肝肾阴虚证模型与子 PE 表现相类似,且较为适合。但中医理论指导下的造模方法很多,由于其病因病机繁多且复杂,并且现有检测手段验证中医证型模型成功与否说纷纭,在较短时间内不易达成非常理想的模型,这是难以忽略的缺陷。手术造模法虽快捷直观,但操作风险较大且无法较好地复制自然病理情况等。无论是现代医学还是中医理论指导下的造模法,都有其不足。基因敲除等方法属于科技和医学结合进步的产物,虽避免了人为干预造成的指标差异,但使模型在较“自然”的情况下制备成功,该发展将会越来越不可或缺,潜力巨大。虽然实验学发展对妇科子痫前期动物模型的制备有了改进和创新,以及现代医学对此病的研究不断深入,但现有的造模方法和模型指标在检测上仍存在争议,需更深层次地探索模型的制备方法,以及新的模型的创造。随着对胎盘及子宫因子等的继续研究,基因敲除技术的发展,以及对前人的实验总结和对未知的探索,我们将有更好的动物模型建立,将最终阐明子痫前期疾病,最终回到临床帮助患者。

### 参考文献

- [1]杨晓涛,韩顶立,Philip N.Baker,等.体外缺氧诱导子痫前期滋养细胞模型优化及代谢组学鉴定[J].重庆医科大学学报,2017,42(8):1045-1052.
- [2]孟亚宁,李来传,李清华,等.子痫前期大鼠模型的建立及相关指标监测[J].现代妇产科进展,2018,27(4):245-248+254.
- [3]王哲,陈媛媛,李花繁,等.血清 TGF- $\beta$  1、HIF-1 $\alpha$ 、sFlt-1 联合检测在子痫前期患者中的临床意义[J].检验医学与临床,2016,13(16):2283-2285.