



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111418710 A

(43)申请公布日 2020.07.17

(21)申请号 201910260528.5	A23K 10/22(2016.01)
(22)申请日 2019.04.01	A23K 10/24(2016.01)
(71)申请人 北京中医药大学	A23K 10/20(2016.01)
地址 100029 北京市朝阳区北三环东路11号	A23K 20/20(2016.01)
	A23K 20/174(2016.01)
	A23K 20/142(2016.01)
(72)发明人 张冰 林志健 王海鸽 褚梦真	A23K 20/121(2016.01)
王雨	A23K 20/28(2016.01)
(74)专利代理机构 北京市浩天知识产权代理事	A23K 50/75(2016.01)
务所(普通合伙) 11276	A01K 67/02(2006.01)
代理人 刘云贵 周华宁	
(51)Int.Cl.	
A23K 10/16(2016.01)	
A23K 10/26(2016.01)	
A23K 10/37(2016.01)	
A23K 10/30(2016.01)	

权利要求书2页 说明书22页

(54)发明名称

一种尿酸性肾病动物模型的建立方法

(57)摘要

本发明提供一种尿酸性肾病动物模型的建立方法,所述方法包括如下步骤:以禽类作为实验动物;给予实验动物含有一定比例钙和蛋白质的诱导剂;每只实验动物日饮水量为5~30mL。本发明模拟临床尿酸性肾病的发病机制,塑造了一种与临床该病发病特点相近的尿酸性肾病动物模型,同时也为临床尿酸性肾病机制的研究提供了实验基础。

1. 一种尿酸性肾病动物模型的建立方法,该方法包括如下步骤:

选取禽类为造模动物;

给予造模动物诱导剂作为饲料,所述诱导剂的原料由10%~90%酵母浸出粉、骨粉0%~90%、常规动物饲料0%~90%组成(按重量比计)。

2. 如权利要求1所述的方法,所述诱导剂的原料按重量比计由10%~80%酵母浸出粉、骨粉5%~80%、常规动物饲料10%~80%组成;优选由10%~70%酵母浸出粉、骨粉10%~70%、常规动物饲料20%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~60%酵母浸出粉、骨粉10%~60%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~50%酵母浸出粉、骨粉10%~50%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~40%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~30%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~70%组成。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述实验动物为鹌鹑;上述常规动物饲料优选适于鹌鹑饲养的常规饲料。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,该方法中包括给予每只造模动物日饮水量为5~30mL的步骤。

5. 一种用于建立鹌鹑的尿酸性肾病模型的诱导剂,所述诱导剂的原料由10%~90%酵母浸出粉、骨粉0%~90%、常规动物饲料0%~90%组成(按重量比计)。

6. 如权利要求5所述的诱导剂,所述诱导剂的原料按重量比计由10%~80%酵母浸出粉、骨粉5%~80%、常规动物饲料10%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~70%酵母浸出粉、骨粉10%~70%、常规动物饲料20%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~60%酵母浸出粉、骨粉10%~60%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~50%酵母浸出粉、骨粉10%~50%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~40%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~30%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~70%组成。

7. 如权利要求5或6所述的诱导剂,所述常规动物饲料优选适于鹌鹑饲养的常规饲料。

8. 一种用于建立鹌鹑的尿酸性肾病模型的产品,所述产品包括可载有诱导剂单元和盛水单元;所述盛水单元可控制鹌鹑日饮水量5~30mL/只;所述诱导剂单元可控制鹌鹑日食用量为10g~80g/只;诱导剂的原料由10%~90%酵母浸出粉、骨粉0%~90%、常规动物饲料0%~90%组成(按重量比计)。

9. 如权利要求8所述产品,所述诱导剂的原料按重量比计由10%~80%酵母浸出粉、骨粉5%~80%、常规动物饲料10%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~70%酵母浸出粉、骨粉10%~70%、常规动物饲料20%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~60%酵母浸出粉、骨粉10%~60%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~50%酵母浸出粉、骨粉10%~50%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~40%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30~80%组成;所述诱导剂的原料

按重量比计进一步优选由10%~30%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~70%组成。

10. 如权利要求8或9所述的产品,所述常规动物饲料为鹤鹑饲养的常规饲料。

一种尿酸性肾病动物模型的建立方法

技术领域

[0001] 本发明提供一种尿酸性肾病动物模型的建立方法,属于动物实验模型技术领域。

背景技术

[0002] 尿酸性肾病是由于机体内尿酸产生过多或排泄减少形成高尿酸血症所致的肾损害。近年来随着人们生活水平的提高,饮食结构的改变,高蛋白及高嘌呤食物摄入增加,我国尿酸性肾病的发病率不断升高,且呈年轻化趋势。尿酸性肾病的临床表现有尿酸结石、蛋白尿、水肿及肾小管功能损害等,如延误治疗或治疗不当,则病情可恶化并发展为终末期肾功能衰竭,其临床危害已成为严峻的问题。开展尿酸性肾病发病机制与治疗药物的研究成为日益关注的热点。然而,尿酸性肾病发病机制及治疗药物的筛选研究,很大程度上依赖于尿酸性肾病动物模型的建立与应用。

[0003] 现有的尿酸性肾病动物模型的塑造方法存在着局限性。如:①目前的尿酸性肾病动物模型多选用啮齿类动物(如大鼠、小鼠)作为造模对象,但由于这类动物体内含有尿酸酶,与人类尿酸代谢方式不同,因此模型塑造难度较大;②目前塑造尿酸性肾病模型的造模剂多使用腺嘌呤,但其发病机制与临床尿酸性肾病的发病机制差别较大。这些局限性极大程度上限制了尿酸性肾病的基础研究和临床治疗,故建立合适的动物模型是本领域亟待解决的关键问题。

[0004] 因此,模拟人类饮食结构和尿酸性肾病的发病机制,塑造一种与临床该病发病特点相近的尿酸性肾病动物模型是本领域亟待解决的问题。

发明内容

[0005] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种尿酸性肾病动物模型的建立方法;本发明的目的还在于提供一种用于建立尿酸性肾病动物模型的诱导剂。

[0006] 作为本发明的一个方面,本发明提供一种尿酸性肾病动物模型的建立方法,该方法包括如下步骤:

[0007] 选取禽类为造模动物;

[0008] 给予实验动物诱导剂,所述诱导剂的原料由10%~90%酵母浸出粉、骨粉0%~90%、常规动物饲料0%~90%组成(按重量比计)。

[0009] 在具体的实施方式中,控制给予每只造模动物日饮水量为5~30mL。

[0010] 在具体的实施方式中,所述诱导剂的原料按重量比计优选由10%~80%酵母浸出粉、骨粉5%~80%、常规动物饲料10%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~70%酵母浸出粉、骨粉10%~70%、常规动物饲料20%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~60%酵母浸出粉、骨粉10%~60%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~50%酵母浸出粉、骨粉10%~50%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~40%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂

的原料按重量比计进一步优选由10%~30%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~70%组成。

[0011] 本发明所述“酵母浸出粉”(中华人民共和国国家标准GB/T35536-2017);以面包酵母或啤酒酵母为原料,经自溶、酶解、浓缩、干燥等工艺制成的一种富含蛋白质、氨基酸等营养成分的生物培养基产品。酵母浸出粉也可由酵母浸膏及其他主要成分相近的不同形态的以面包酵母或啤酒酵母为原料的其他制成品,具体用量可根据酵母浸出粉国家标准记载的主要成分进行折算。

[0012] 所述骨粉以畜骨为原料制成的粉状产品,包括牛骨、鱼骨、猪骨、羊骨等中的任意一种或几种为原料。骨粉的制备方法可用常规方法,如用水煮,静置,去浮在水面的油脂,然后取出骨头干燥磨成骨粉。

[0013] 所述常规动物饲料是指维持造模所选取的禽类动物日常生长所需营养的饲料,由能量饲料、蛋白质饲料、矿物质饲料、维生素饲料制成。其中能量饲料包括谷实类饲料、糠麸类、糟渣类和淀粉质块根块茎类;蛋白质饲料包括动物性蛋白质饲料、植物性蛋白质饲料等,其中动物性蛋白质饲料主要包括鱼粉、肉骨粉、蚕蛹粉、血粉、鸡蛋、小鱼、小虾、蚯蚓、蜗牛等;植物性蛋白质饲料主要有大豆饼(粕)、花生饼、芝麻饼、菜籽饼、棉籽饼等。所述矿物质饲料主要包括石粉、骨粉、石灰石、磷酸氢钙、蛋壳粉、贝壳粉等;所述维生素饲料主要包括:工业合成或由原料提纯精制的各种单一维生素和复合多种维生素,以及富含维生素的自然饲料,如青贮料、青干草粉、树叶粉、苜蓿粉等。

[0014] 上述常规动物饲料可以根据禽类动物营养需要从上述能量饲料、蛋白质饲料、矿物质饲料、维生素饲料中进行选配;也包括从市售的该动物的基础饲料、预混料进行选配。所述预混料是添加剂预混合饲料的简称,它是将一种或多种微量组分(包括各种微量矿物质元素、各种维生素、合成氨基酸、某些药物等添加剂)与稀释剂或载体按要求配比,均匀混合后制成的中间型配合饲料产品。预混料可以选择市售或者根据禽类动物营养需要确定各种营养成分的组成及用量,如可以用如下成分的全部或选用其中的多种组合:维生素A、维生素B族、维生素D3、维生素E、维生素K3、蛋氨酸、硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸锰、碘酸钙、亚硒酸钠、食盐、乙氧基喹啉、二叔丁基羟基甲苯、鱼粉、糠粉、沸石粉。所述基础饲料包含禽类日常生长所必需的成分的饲料,主要由能量饲料、蛋白质饲料制成。作为一种实施方式,基础饲料根据禽类营养需要标准进行选配,可以选自以下成分中的任意一种或几种:玉米、豆粕、鱼粉、石粉。当常规动物饲料选自由市售的基础饲料及预混料组成时,预混料以重量百分比计为基础饲料0.5%~10%,上述常规动物饲料优选适于鹌鹑饲养的常规饲料。在具体的实施方式中,所述实验动物为鹌鹑。

[0015] 在具体的实施方式中,所述每只实验动物日饮水量为10~20mL;优选的,每只实验动物日饮水量为15mL。

[0016] 作为本发明的另一个方面,本发明提供一种用于建立鹌鹑的尿酸性肾病模型的诱导剂,所述诱导剂的原料由10%~90%酵母浸出粉、骨粉0%~90%、常规动物饲料0%~90%组成(按重量比计)。

[0017] 所述诱导剂的原料按重量比计优选由10%~80%酵母浸出粉、骨粉5%~80%、常规动物饲料10%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~70%酵母浸出粉、骨粉10%~70%、常规动物饲料20%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进

一步优选由10%~60%酵母浸出粉、骨粉10%~60%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~50%酵母浸出粉、骨粉10%~50%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~40%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~30%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~70%组成。

[0018] 本发明所述“酵母浸出粉”(中华人民共和国国家标准GB/T35536~2017);以面包酵母或啤酒酵母为原料,经自溶、酶解、浓缩、干燥等工艺制成的一种富含蛋白质、氨基酸等营养成分的生物培养基产品。酵母浸出粉也可由酵母浸膏及其他主要成分相近的不同形态的以面包酵母或啤酒酵母为原料的其他制成品,具体用量可根据酵母浸出粉国家标准记载的主要成分进行折算。

[0019] 所述骨粉以畜骨为原料制成的粉状产品,包括牛骨、鱼骨、猪骨、羊骨等中的任意一种或几种为原料。骨粉的制备方法可用常规方法,如用水煮,静置,去浮在水面的油脂,然后取出骨头干燥磨成骨粉。

[0020] 所述常规动物饲料是指维持造模所选取的禽类动物日常生长所需营养的饲料,由能量饲料、蛋白质饲料、矿物质饲料、维生素饲料制成。其中能量饲料包括谷实类饲料、糠麸类、糟渣类和淀粉质块根块茎类;蛋白质饲料包括动物性蛋白质饲料、植物性蛋白质饲料等,其中动物性蛋白质饲料主要包括鱼粉、肉骨粉、蚕蛹粉、血粉、鸡蛋、小鱼、小虾、蚯蚓、蜗牛等;植物性蛋白质饲料主要有大豆饼(粕)、花生饼、芝麻饼、菜籽饼、棉籽饼等。

[0021] 上述常规动物饲料可以根据禽类动物营养需要从上述能量饲料、蛋白质饲料、矿物质饲料、维生素饲料中进行选配;也包括从市售的该动物的基础饲料、预混料进行选配。所述预混料是添加剂预混合饲料的简称,它是将一种或多种微量组分(包括各种微量矿物质元素、各种维生素、合成氨基酸、某些药物等添加剂)与稀释剂或载体按要求配比,均匀混合后制成的中间型配合饲料产品。预混料可以选择市售或者根据禽类动物营养需要确定各种营养成分的组成及用量,如可以用如下成分的全部或选用其中的多种组合:维生素A、维生素B族、维生素D3、维生素E、维生素K3、蛋氨酸、硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸锰、碘酸钙、亚硒酸钠、食盐、乙氧基喹啉、二叔丁基羟基甲苯、鱼粉、糠粉、沸石粉。所述基础饲料包含禽类日常生长所必需的成分的饲料,主要由能量饲料、蛋白质饲料制成。作为一种实施方式,基础饲料根据禽类营养需要标准进行选配,可以选自以下成分中的任意一种或几种:玉米、豆粕、鱼粉、石粉。当常规动物饲料选自由市售的基础饲料及预混料组成时,预混料以重量百分比计为基础饲料0.5%~10%,上述常规动物饲料优选适于鹌鹑饲养的常规饲料。

[0022] 作为本发明的第三个方面,本发明还提供一种用于建立鹌鹑的尿酸性肾病模型的产品,所述产品包括可载有固体饲料单元和盛水单元;所述盛水单元可控制鹌鹑日饮水量5~30mL/只;所述固体饲料可控制鹌鹑日食用量为10g~80g/只;所述固体饲料为诱导剂,诱导剂的原料由10%~90%酵母浸出粉、骨粉0%~90%、常规动物饲料0%~90%组成(按重量比计)。优选的,所述固体饲料可控制鹌鹑日食用量为20g~70g/只;优选的,所述固体饲料可控制鹌鹑日食用量为30g~60g/只。

[0023] 所述诱导剂的原料按重量比计优选由10%~80%酵母浸出粉、骨粉5%~80%、常规动物饲料10%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~70%酵母浸出粉、骨粉10%~70%、常规动物饲料20~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一

步优选由10%~60%酵母浸出粉、骨粉10%~60%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~50%酵母浸出粉、骨粉10%~50%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~40%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~80%组成;所述诱导剂的原料按重量比计进一步优选由10%~30%酵母浸出粉、骨粉10%~40%、常规动物饲料30%~70%组成。

[0024] 本发明所述“酵母浸出粉”(中华人民共和国国家标准GB/T35536-2017);以面包酵母或啤酒酵母为原料,经自溶、酶解、浓缩、干燥等工艺制成的一种富含蛋白质、氨基酸等营养成分的生物培养基产品。酵母浸出粉也可由酵母浸膏及其他主要成分相近的不同形态的以面包酵母或啤酒酵母为原料的其他制成品,具体用量可根据酵母浸出粉国家标准记载的主要成分进行折算。

[0025] 所述骨粉以畜骨为原料制成的粉状产品,包括牛骨、鱼骨、猪骨、羊骨等中的任意一种或几种为原料。骨粉的制备方法可用常规方法,如用水煮,静置,去浮在水面的油脂,然后取出骨头干燥磨成骨粉。

[0026] 所述常规动物饲料是指维持造模所选取的禽类动物日常生长所需营养的饲料,由能量饲料、蛋白质饲料、矿物质饲料、维生素饲料制成。其中能量饲料包括谷实类饲料、糠麸类、糟渣类和淀粉质块根块茎类;蛋白质饲料包括动物性蛋白质饲料、植物性蛋白质饲料等,其中动物性蛋白质饲料主要包括鱼粉、肉骨粉、蚕蛹粉、血粉、鸡蛋、小鱼、小虾、蚯蚓、蜗牛等;植物性蛋白质饲料主要有大豆饼(粕)、花生饼、芝麻饼、菜籽饼、棉籽饼等。

[0027] 上述常规动物饲料可以根据禽类动物营养需要从上述能量饲料、蛋白质饲料、矿物质饲料、维生素饲料中进行选配;也包括从市售的该动物的基础饲料、预混料进行选配。所述预混料是添加剂预混合饲料的简称,它是将一种或多种微量组分(包括各种微量矿物元素、各种维生素、合成氨基酸、某些药物等添加剂)与稀释剂或载体按要求配比,均匀混合后制成的中间型配合饲料产品。预混料可以选择市售或者根据禽类动物营养需要确定各种营养成分的组成及用量,如可以用如下成分的全部或选用其中的多种组合:维生素A、维生素B族、维生素D3、维生素E、维生素K3、蛋氨酸、硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸锰、碘酸钙、亚硒酸钠、食盐、乙氧基喹啉、二叔丁基羟基甲苯、鱼粉、糠粉、沸石粉。所述基础饲料包含禽类日常生长所必需的成分的饲料,主要由能量饲料、蛋白质饲料制成。作为一种实施方式,基础饲料根据禽类营养需要标准进行选配,可以选自以下成分中的任意一种或几种:玉米、豆粕、鱼粉、石粉。当常规动物饲料选自由市售的基础饲料及预混料组成时,预混料以重量百分比计为基础饲料0.5%~10%,上述常规动物饲料优选适于鹌鹑饲养的常规饲料。

[0028] 本发明能够有效的塑造尿酸性肾病动物模型,为临床尿酸性肾病机制的研究提供了实验基础。

具体实施方式

[0029] 实施例1鹌鹑尿酸性肾病模型诱导剂种类的筛选研究

[0030] 1实验目的:

[0031] 本课题组前期研究表明,持续给鹌鹑饲喂拌入一定比例酵母浸出粉的饲料能导致鹌鹑血尿酸升高。禽类饲料中常用补钙剂种类有:蛋壳粉(主要含钙成分为 CaCO_3)、骨粉(主要含钙成分为羟磷灰石晶体 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$)、石粉(主要含钙成分为 CaCO_3)、磷酸氢钙粉

[CaH₂PO₄]和氯化钙(CaCl₂)。本实验将基础饲料混合酵母浸出粉后分别搭配蛋壳粉、骨粉、石粉、磷酸氢钙粉和氯化钙水作为诱导剂(具体配制方法见表1-1)。

[0032] 2实验方法:

[0033] 选取40日龄雄性迪法克鹌鹑84只,体质量(160±10)g,购自于北京市种禽公司德岭鹌鹑场,适应性饲养5d,按体质量随机分为7组,每组12只。根据表1-1配制各组饲料,给予正常组常规动物饲料50g/只/d,分别给予蛋白诱导组、A诱导剂组、B诱导剂组、C诱导剂组、D诱导剂组和E诱导剂组对应诱导剂50g/只/d,记录饮食量。各组均给予足量清水(其中给予E诱导剂组鹌鹑1.0%氯化钙水)。

[0034] 每10d称重并颈静脉取血1次,检测血清生化指标。实验周期为60d。实验第60d,鹌鹑颈静脉取血1.5ml后处死,取各组鹌鹑肾脏组织固定、制作石蜡切片。控制动物房室温20~25℃,湿度40%~60%。

[0035] 基础饲料由玉米、豆粕、鱼粉、石粉组成,成分含量见表1-1。

[0036] 每千克预混料原料组成为:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0037] 表1-1:实验各组饲料成分表(%)

[0038]

	正常组	蛋白诱导组	A 诱导剂组	B 诱导剂组	C 诱导剂组	D 诱导剂组	E 诱导剂组
玉米(粉)	55	43.4	31.8	31.8	31.8	31.8	43.4
豆粕(粉)	33	26	19.1	19.1	19.1	19.1	26
鱼粉	2	1.6	1.2	1.2	1.2	1.2	1.6

[0039]

酵母浸出粉		20	20	20	20	20	20
蛋壳粉			20				
骨粉				20			
石粉	5	4	2.9	2.9	22.9	2.9	4
磷酸氢钙粉						20	
预混料	5	5	5	5	5	5	5

[0040] 3数据分析

[0041] 实验数据采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析,各组数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05表示差异具有显著性,以P<0.01

表示具有极显著性差异。

[0042] 4试剂及药物

[0043] 酵母浸出粉,批号:1349145;500g,购自英国Oxoid公司;石粉,批号:20160801,1000g,购自济南鑫燕化工有限公司;骨粉,批号:20160911,500g,购自衡水爱宠商贸有限公司;蛋壳粉,批号:20160911,500g,购自衡水爱宠商贸有限公司;磷酸氢钙粉,批号:20160801,1000g,购自济南鑫燕化工有限公司;氯化钙,批号:20160405,500g,购自国药集团化学试剂有限公司;尿酸测定试剂盒,批号:161301,100T,购自中生北控生物科技股份有限公司;尿素氮测定试剂盒,批号:20160408,96T,肌酐测定试剂盒,批号:20160824,96T,均购自南京建成生物工程研究所;尿酸盐染色试剂盒,批号:20160604,4×50ml,购自北京索莱宝科技有限公司。

[0044] 5仪器及设备

[0045] SHZ88-1型台式水浴恒温振荡器,北京医疗设备厂;3K1S低温高速离心机,德国Sigma公司;sunrise酶标仪,瑞士TECAN公司;DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱,北京鸿达天矩试验设备有限公司;Reichert Histo STAT石蜡组织切片机,美国AO公司;Olympus BX53显微镜,日本奥林巴斯;AHIMADZU B1-220H电子天平,日本岛津公司;电子天平,德国赛多利斯公司。

[0046] 6结果

[0047] 表1-2各组鹌鹑体质量水平($\bar{g}, x \pm s, n=12$)

[0048]

	0d	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	164.43±13 .94	160.59±1 0.46	164.77±1 2.33	162.71±1 4.08	169.34±1 3.29	170.05±1 3.58	167.88±1 1.14
蛋白诱导组	165.55±13 .14	163.07±1 2.95	173.61±1 2.91	169.73±1 2.91	168.88±1 6.62	162.09±2 0.82	160.56±1 7.95
A 诱导剂组	165.29±10 .65	160.52±1 1.09	167.09±1 1.95	166.45±1 1.52	168.14±1 0.35	169.53±1 1.26	159.34±1 1.32
B 诱导剂组	164.74±13 .34	160.13±1 0.69	170.32±1 2.43	170.68±1 1.28	170.06±1 4.47	171.73±1 1.96	166.93±9 .72
C 诱导剂组	164.94±16 .47	165.15±1 2.27	168.89±1 1.89	168.58±1 0.67	164.84±1 1.17	161.65±9 .37	160.84±9 .11
D 诱导剂组	164.90±10 .31	156.59±1 1.80	153.98±1 2.51*	166.03±1 5.24	151.63±2 1.74*	159.12±1 7.8	156.08±6 .2
E 诱导剂组	165.27±12 .59	137.18±1 9.50**	152.54±2 5.68	165.70±1 6.85	149.45±2 0.22*	158.02±8 .03*	151.14±1 6.06

[0049] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0050] 表1-3各组鹌鹑摄食量水平(g/只/d, $\bar{x} \pm s, n=12$)

[0051]

	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	25.19 ± 3.45	25.31 ± 1.47	25.09 ± 1.18	23.40 ± 1.42	22.91 ± 3.14	22.50 ± 1.75
蛋白诱导组	26.33 ± 1.69	26.14 ± 1.38	23.55 ± 1.18	22.22 ± 1.99	25.26 ± 2.87	21.1 ± 4.18
A 诱导剂组	23.26 ± 3.12*	24.70 ± 1.57	26.77 ± 0.68**	27.44 ± 2.78**	26.87 ± 0.78	23.08 ± 3.67
B 诱导剂组	23.71 ± 3.30	24.80 ± 1.77	26.95 ± 0.70	25.23 ± 1.33	24.58 ± 1.15	23.76 ± 4.68
C 诱导剂组	24.59 ±	24.62 ±	29.12 ±	28.52 ±	28.28 ±	25.56 ±

[0052]

	1.64	1.91	1.93*	2.05**	0.80**	4.67
D 诱导剂组	22.39 ± 2.50**	23.95 ± 0.78	29.42 ± 2.73*	24.08 ± 1.90*	17.56 ± 2.42*	20.75 ± 3.04
E 诱导剂组	12.95 ± 2.79**	22.54 ± 1.62*	24.92 ± 3.11*	21.03 ± 3.12**	23.85 ± 6.59	19.84 ± 2.34*

[0053] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0054] 表1-4各组鹌鹑血清尿酸水平($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s, n=12$)

[0055]

	0d	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	278.20 ± 86.99	281.08 ± 43.45	280.03 ± 64.05	231.04 ± 83.41	277.64 ± 32.31	279.77 ± 74.64	277.123 ± 51.27
蛋白诱导组	279.21 ± 82.09	325.57 ± 48.07*	395.81 ± 72.16*	356.09 ± 127.25*	365.53 ± 94.05**	366.11 ± 78.35*	352.86 ± 95.55*
A 诱导剂组	280.73 ± 82.54	336.77 ± 86.71	362.66 ± 96.22*	318.69 ± 137.06	332.50 ± 82.92*	373.26 ± 106.65*	378.89 ± 76.68**
B 诱导剂组	278.2 ± 81.89	334.35 ± 85.02	411.72 ± 97.03**	409.58 ± 126.63**	439.13 ± 115.87**	369.01 ± 68.44**	427.70 ± 142.17**
C 诱导剂组	272.79 ± 77.97	332.16 ± 85.19	358.53 ± 770.26*	368.17 ± 87.94*	400.88 ± 115.35**	364.23 ± 91.38*	401.13 ± 148.66*
D 诱导剂组	276.17 ± 69.45	374.99 ± 63.80**	381.77 ± 83.59**	309.55 ± 87.98*	347.57 ± 103.7*	322.98 ± 83.77	394.08 ± 67.17*
E 诱导剂组	273.64 ± 48.75	330.18 ± 91.69	381.16 ± 116.86*	350.81 ± 113.88**	415.23 ± 83.17**	430.63 ± 84.69**	415.77 ± 88.92**

[0056] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0057] 表1-5各组鹌鹑血清尿素氮水平(mmol/L , $\bar{x} \pm s$, $n=12$)

[0058]

	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	1.43 ± 0.52	1.82 ± 0.52	1.23 ± 0.76	1.37 ± 0.52	1.26 ± 0.33	1.48 ± 0.65
蛋白诱导组	1.31 ± 0.54	1.53 ± 0.48	1.51 ± 0.75	1.23 ± 0.34	1.47 ± 0.67	1.13 ± 0.31

[0059]

A 诱导剂组	1.40 ± 0.57	1.63 ± 0.67	1.14 ± 0.51	1.31 ± 0.43	1.37 ± 0.48	1.06 ± 0.55
B 诱导剂组	1.08 ± 0.46	1.58 ± 0.43	0.97 ± 0.48	0.97 ± .31*	1.13 ± 0.30	1.15 ± 0.43
C 诱导剂组	1.41 ± 0.38	1.64 ± 0.57	0.90 ± 0.25	1.14 ± 0.30	1.00 ± 0.35	1.11 ± 0.48
D 诱导剂组	1.59 ± 1.40	1.69 ± 0.83	0.96 ± 0.36*	1.16 ± 0.37	1.28 ± 0.43	1.38 ± 0.45
E 诱导剂组	1.61 ± 0.81	2.04 ± 0.68	1.12 ± 0.54	2.17 ± 0.93*	1.83 ± 0.42**	1.57 ± 0.29

[0060] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0061] 表1-6各组鹌鹑血清肌酐水平($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, n=12)

[0062]

	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	123.23 ± 57.48	101.18 ± 13.58	116.67 ± 25.93	106.45 ± 22.91	103.62 ± 15.68	100.54 ± 16.62
蛋白诱导组	123.78 ± 59.21	94.67 ± 16.49	118.38 ± 24.61	109.68 ± 12.65	105.71 ± 16.66	106.75 ± 13.62
A 诱导剂组	106.05 ± 73.75	94.67 ± 18.15	116.18 ± 15.44	82.06 ± 23.93*	103.62 ± 17.91	99.19 ± 14.57
B 诱导剂组	108.23 ± 40.05	89.91 ± 16.83	116.67 ± 20.24	91.67 ± 17.14	101.36 ± 12.43	103.99 ± 14.64
C 诱导剂组	110.6 ± 23.65	106.69 ± 29.04	118.14 ± 16.82	93.15 ± 16.51	109.60 ± 20.68	102.02 ± 14.4
D 诱导剂组	93.86 ± 12.47	92.92 ± 21.16*	111.52 ± 32.72	85.22 ± 31.52*	88.67 ± 14.3*	104.15 ± 25.24
E 诱导剂组	118.29 ± 30.41	76.23 ± 17.44	99.47 ± 16.99	85.10 ± 31.98	96.98 ± 31.39	99.55 ± 26.69

[0063] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0064] 结果分析:由表1-2、1-3可知,正常组鹌鹑一般状态良好,摄食量、体质量平稳,毛

色鲜亮、有光泽。蛋白诱导组、A诱导剂组和B诱导剂组鹌鹑一般状态与正常组差异不显著。C诱导剂组鹌鹑摄食量和体质量与正常组相比无显著性差异,于实验40d后出现体质量降低趋势,毛色无光泽、不鲜亮。D诱导剂组鹌鹑一般状态不佳,实验第20d、40d鹌鹑体质量显著低于正常组,毛色无光泽、不鲜亮。E诱导剂组一般状态差,摄食量和体质量偏低,毛色发黑、发黏、无光泽、不鲜亮、羽毛变硬呈浸水状,懒动喜卧,鸣叫声沙哑,自实验第20d起陆续出现死亡,至实验60d共出现死亡6例。

[0065] 由表1-4可知,蛋白诱导组鹌鹑于实验第10d、20d、30d、50d、60d,血清尿酸水平显著高于正常组($P < 0.05$),实验第40d,血清尿酸水平极显著高于正常组($P < 0.01$)。A诱导剂组鹌鹑于实验第20d、40d、50d,血清尿酸水平显著高于正常组($P < 0.05$),实验第60d,血清尿酸水平极显著高于正常组($P < 0.01$)。B诱导剂组鹌鹑自实验第20d-60d,血清尿酸水平均极显著高于正常组($P < 0.01$)。C诱导剂组鹌鹑于实验第20d、30d、50d、60d,血清尿酸水平显著高于正常组($P < 0.05$),实验第40d,血清尿酸水平极显著高于正常组($P < 0.01$)。D诱导剂组鹌鹑于实验第30d、40d、60d,血清尿酸水平显著高于正常组($P < 0.05$),实验第10d、20d,血清尿酸水平极显著高于正常组($P < 0.01$)。E诱导剂组鹌鹑于实验第20d,血清尿酸水平显著高于正常组($P < 0.05$),实验第30d-60d,血清尿酸水平极显著高于正常组($P < 0.01$)。

[0066] 由表1-5可知,B诱导剂组鹌鹑于实验第40d血清尿素氮水平显著低于正常组($P < 0.05$)。D诱导剂组鹌鹑于实验第30d血清尿素氮水平显著低于正常组($P < 0.05$)。其余各组之间,血清尿素氮水平无显著差异($P > 0.05$)。E诱导剂组鹌鹑于实验第40d血清尿素氮水平显著高于正常组($P < 0.05$),实验第50d血清尿素氮水平极显著高于正常组($P < 0.01$),该组血清尿素氮水平升高可能与鹌鹑肾功能损伤相关,实验60d检测血清尿素氮水平恢复正常,因为3例尿素氮水平较高的鹌鹑于实验50d后死亡。由表1-6可知,实验期间,A诱导剂组鹌鹑于实验第40d血清肌酐水平显著低于正常组($P < 0.05$)。D诱导剂组水平于实验第20d、40d、50d血清肌酐水平显著低于正常组($P < 0.05$)。其余各组之间,血清肌酐水平无显著差异($P > 0.05$)。

[0067] 鹌鹑肾尿酸盐染色400倍光学显微镜下可见,正常组鹌鹑未见黑色尿酸盐结晶沉积。蛋白诱导组、A诱导剂组、D诱导剂组和E诱导剂组鹌鹑肾组织可见少量黑色的尿酸盐结晶沉积于肾小管。B诱导剂组、C诱导剂组鹌鹑肾组织可见大量黑色尿酸盐结晶沉积肾小管。

[0068] 综合考虑鹌鹑一般状态、各项血清生化指标和病理状态等因素,B诱导剂鹌鹑一般状态较好,血清尿酸水平升高、肾脏尿酸盐沉积效果最显著,因此下一步将针对B诱导剂的剂量进行深入探讨。

[0069] 实施例2鹌鹑尿酸性肾病模型诱导剂剂量的筛选研究

[0070] 1实验目的

[0071] 探讨不同剂量诱导剂对鹌鹑尿酸排泄及诱发尿酸性肾病的影响,进一步筛选诱导剂的剂量配比。

[0072] 2实验方法

[0073] 选取40日龄雄性迪法克鹌鹑60只,体质量(160 ± 10)g,购自于北京市种禽公司德岭鹌鹑场,适应性饲养5d,按体质量随机分为5组,每组各12只。根据表2-1配制各组饲料,给予正常组常规动物饲料50g/只/d,分别给予低剂量诱导剂组、中剂量诱导剂组、次高剂量诱导剂组、高剂量诱导剂组对应诱导剂50g/只/d,记录饮食量。各组均给予足量清水。

[0074] 每10d称重并颈静脉取血一次,检测血清生化指标。实验周期为60d。实验第60d,鹤鹑颈静脉取血1.5ml后处死,取各组鹤鹑肾脏组织固定、制作石蜡切片。控制动物房室温20~25℃,湿度40%~60%。预混料同实验例1。

[0075] 表2-1:实验各组饲料成分表(%)

[0076]

	正常组	低剂量诱导剂组	中剂量诱导剂组	次高剂量诱导剂组	高剂量诱导剂组
玉米(粉)	55	37.6	31.8	26	20.3
豆粕(粉)	33	22.6	19.1	15.6	12.2
鱼粉	2	1.4	1.2	1	0.7
石粉	5	3.4	2.9	2.4	1.8
酵母浸出粉		20	20	20	20
骨粉		10	20	30	40
预混料	5	5	5	5	5

[0077] 3数据分析

[0078] 实验数据采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析,各组数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性,以 $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

[0079] 4试剂及药物

[0080] 酵母浸出粉,批号:1349145,500g,购自英国Oxoid公司;骨粉,批号:20160911,500g,购自衡水爱宠商贸有限公司;尿酸测定试剂盒,批号:161301,100T,购自中生北控生物科技股份有限公司;尿素氮测定试剂盒,批号:20160408,96T,肌酐测定试剂盒,批号:20160824,96T,均购自南京建成生物工程研究所;尿酸盐染色试剂盒,批号:20160604,4×50ml,购自北京索莱宝科技有限公司。

[0081] 5仪器及设备

[0082] SHZ88-1型台式水浴恒温振荡器,北京医疗设备厂;3K1S低温高速离心机,德国Sigma公司;sunrise酶标仪,瑞士TECAN公司;DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱,北京鸿达天矩试验设备有限公司;ReichertHisto STAT石蜡组织切片机,美国A0公司;Olympus BX53显微镜,日本奥林巴斯;AHIMADZUB1-220H电子天平,日本岛津公司;电子天平,德国赛多利斯公司。

[0083] 6结果

[0084] 表2-2各组鹤鹑体质量水平($\bar{g}, \bar{x} \pm s, n=12$)

[0085]

	0d	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	161.33 ± 10.05	165.23 ± 11.22	166.68 ± 9.98	169.25 ± 10.53	170.95 ± 8.83	170.85 ± 8.61	170.65 ± 9.72
低剂量诱 导剂组	159.28 ± 15.77	162.93 ± 16.04	168.86 ± 14.84	169.04 ± 15.07	170.26 ± 15.1	171.41 ± 16.01	170.58 ± 15.47
中剂量诱 导剂组	160.125 ± 16.81	165.35 ± 18.32	170.44 ± 20.93	170.55 ± 17.19	173.18 ± 14.32	176.41 ± 16.39	174.62 ± 15.55
次高剂量 诱导剂组	162.59 ± 9.42	165.44 ± 12.86	168.83 ± 11.62	171.28 ± 10.24	173.07 ± 10.46	172.47 ± 12.23	172.49 ± 12.26

[0086]

高剂量诱 导剂组	158.09 ± 8.14	162.55 ± 9.61	167.85 ± 10.35	166.73 ± 12.77	167.38 ± 13.39	167.38 ± 11.05	167.34 ± 11.26
-------------	------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

[0087] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0088] 表2-3各组鹌鹑摄食量水平(g/只/d, $\bar{x} \pm s, n=12$)

[0089]

	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	21.74 ± 0.66	22.57 ± 0.49	23.86 ± 2.80	25.52 ± 1.55	25.64 ± 3.38	23.93 ± 2.72
低剂量诱 导剂组	25.78 ± 2.83**	26.36 ± 0.74**	27.72 ± 1.18*	27.27 ± 1.19*	23.96 ± 2.42	28.17 ± 2.07**
中剂量诱 导剂组	25.04 ± 2.42**	25.93 ± 1.21**	28.92 ± 1.47**	29.29 ± 2.08**	26.87 ± 0.78	25.84 ± 3.20
次高剂量 诱导剂组	23.39 ± 3.03	25.78 ± 2.12**	29.12 ± 1.08**	25.69 ± 0.53	26.96 ± 2.53	26.54 ± 2.80
高剂量诱 导剂组	25.72 ± 2.83**	25.27 ± 1.02**	30.55 ± 1.30**	28.99 ± 1.11**	28.28 ± 0.80	26.95 ± 3.55

[0090] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01

[0091] 表2-4各组鹌鹑血清尿酸水平($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s, n=12$)

[0092]

	0d	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	229.56 ± 63.3	248.74 ± 76.7	266.86 ± 62.05	243.90 ± 04.93	268.86 ± 03.90	354.68 ± 74.30	235.39 ± 87.69
低剂量诱 导剂组	230.51 ± 75.62	257.90 ± 96.07	282.74 ± 52.95	261.83 ± 34.94	273.04 ± 71.91	259.48 ± 71.01	268.91 ± 57.03

[0093]

中剂量诱导剂组	230.04 ± 58.17	279.59 ± 86.03	334.52 ± 99.32	339.77 ± 72.52*	366.45 ± 75.36**	341.88 ± 71.79*	327.62 ± 82.23*
次高剂量诱导剂组	230.51 ± 67.26	317.32 ± 72.00*	359.90 ± 86.54*	384.76 ± 98.88**	428.38 ± 75.36**	398.50 ± 59.12**	334.44 ± 124.41*
高剂量诱导剂组	229.56 ± 38.58	280.28 ± 96.90	285.73 ± 58.76	340.82 ± 98.88*	368.00 ± 110.92*	303.40 ± 40.97*	285.92 ± 73.00

[0094] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0095] 表2-5各组鹌鹑血清尿素氮水平变化(mmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=12)

[0096]

	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	1.31 ± 0.99	1.13 ± 0.91	0.74 ± 0.48	1.19 ± 0.96	1.30 ± 0.75	0.95 ± 0.56
低剂量诱导剂组	1.54 ± 1.06	1.39 ± 0.87	0.83 ± 0.30	1.76 ± 0.80	1.53 ± 0.77	1.02 ± 0.48
中剂量诱导剂组	0.57 ± 0.31*	0.69 ± 0.43	0.70 ± 0.30	1.03 ± 0.60	0.97 ± 0.56	0.70 ± 0.28
次高剂量诱导剂组	0.76 ± 0.43	0.59 ± 0.39	0.73 ± 0.34	0.92 ± 0.36	1.04 ± 0.87	0.76 ± 0.44
高剂量诱导剂组	1.18 ± 0.53	0.77 ± 0.46	0.70 ± 0.41	0.85 ± 0.39	0.88 ± 0.61	0.66 ± 0.43

[0097] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01。

[0098] 表2-6各组鹌鹑血清肌酐水平变化($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, n=12)

[0099]

	10d	20d	30d	40d	50d	60d
正常组	98.81 ± 19.74	117.40 ± 13.61	99.75 ± 18.08	120.10 ± 20.51	107.04 ± 20.80	100.74 ± 27.38

[0100]

低剂量诱导剂组	100.54 ± 35.99	127.84 ± 15.95	90.53 ± 16.48	123.12 ± 20.22	114.47 ± 24.96	103.69 ± 21.42
中剂量诱导剂组	82.80 ± 21.77	112.34 ± 17.49	88.93 ± 20.16	104.92 ± 37.26	100.65 ± 19.31	96.66 ± 12.64
次高剂量诱导剂组	81.56 ± 20.99	119.30 ± 20.44	98.74 ± 24.24	114.58 ± 29.00	110.32 ± 30.54	99.38 ± 38.06
高剂量诱导剂组	79.84 ± 24.95	119.30 ± 14.32	99.19 ± 23.22	106.94 ± 21.39	103.18 ± 21.58	101.42 ± 26.04

[0101] 注：与同期正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

[0102] 结果分析，由表2-2、2-3可知：实验期间各组鹌鹑均自由采食、饮水，各组鹌鹑均毛色鲜亮、有光泽，鸣叫声嘹亮，活泼好动，其精神状态、行为状态良好，且体重、摄食量水平平均平稳上涨，各组间无显著差异 ($P > 0.05$)。高剂量诱导剂组鹌鹑体质量水平较其他组偏低。

[0103] 由表2-4可知：实验期间，低剂量诱导剂组鹌鹑血清尿酸水平与正常组无显著差异 ($P > 0.05$)；中剂量诱导剂组鹌鹑于实验第30d、50d、60d血清尿酸水平显著高于正常组 ($P < 0.05$)，实验第40d，血清尿酸水平极显著高于正常组 ($P < 0.01$)；次高剂量诱导剂组鹌鹑于实验第10d、20d、60d血清尿酸水平显著高于正常组 ($P < 0.05$)，实验第30d-50d，血清尿酸水平极显著高于正常组 ($P < 0.01$)；高剂量诱导剂组鹌鹑于实验第30d-50d血清尿酸水平显著高于正常组 ($P < 0.05$)。次高诱导剂组鹌鹑血清尿酸升高最显著。

[0104] 由表2-5可知：实验期间，中剂量诱导剂组鹌鹑于实验第10d血清尿素氮水平显著低于正常组，其余各组鹌鹑血清尿素氮水平与正常组无显著差异 ($P > 0.05$)。

[0105] 由表2-6可知：实验期间各组鹌鹑血清肌酐水平与正常组无显著差异 ($P > 0.05$)。

[0106] 鹌鹑肾脏病理切片HE染色400倍光学显微镜下可见正常组鹌鹑肾组织结构清晰，细胞核蓝染，胞浆均匀红染，肾小球、肾小管结构正常。低剂量诱导剂组、中剂量诱导剂组、次高剂量诱导剂组和高剂量诱导剂组鹌鹑肾组织结构未见明显异常，组织结构清晰，肾小管上皮细胞形态正常。

[0107] 鹌鹑肾尿酸盐染色400倍光学显微镜下可见，正常组鹌鹑肾组织未见黑色尿酸盐结晶。低剂量诱导剂组鹌鹑肾组织可见少量黑色尿酸盐沉积于肾小管。中剂量诱导剂组和高剂量诱导剂组鹌鹑肾组织明显可见较多量黑色尿酸盐沉积于肾小管。次高剂量诱导剂组鹌鹑肾组织显著可见大量黑色尿酸盐沉积于肾小管。

[0108] 综上所述，次高剂量组鹌鹑一般状态良好，血清尿酸水平升高最显著，肾脏病理特殊染色表明该组肾脏尿酸盐沉积最显著。

[0109] 实施例3饮水量结合诱导剂塑造鹌鹑尿酸性肾病模型的研究

[0110] 1实验目的

[0111] 本实验考察限制饮水条件，旨在缩短造模时间，探索塑造鹌鹑尿酸性肾病模型的造模条件。

[0112] 2实验方法

[0113] 选取40日龄雄性迪法克鹌鹑50只,适应性饲养5d,按体质量随机分为5组,每组10只,分别为正常组、对照组、饮水大剂量组(日饮水量30mL/只/d)、饮水中剂量组(日饮水量15mL/只/d)、饮水小剂量组(日饮水量7.5mL/只/d)。实验期间各组鹌鹑均给予清水,正常组、对照组给予足量清水,其余各组按照所限制剂量饮水。根据表3-1配制各组饲料,正常组给予常规动物饲料50g/只/d,对照组和限水组给予诱导剂50g/只/d,记录饮食量。

[0114] 每10d称重并颈静脉取血一次,检测血清生化指标。实验周期为40d。实验第40d,鹌鹑颈静脉取血1.5ml后处死,取各组鹌鹑肾脏组织固定、制作石蜡切片。控制动物房室温20~25℃,湿度40%~60%。预混料同实验例1。

[0115] 表3-1各组饲料组成及营养水平(风干基础) %

[0116]

项目	正常组	对照组	限水组
日粮组成			
玉米(粉)	55	26	26
豆粕(粉)	33	15.6	15.6
鱼粉	2	1	1

[0117]

石粉	5	2.4	2.4
骨粉	-	30	30
酵母浸出粉	-	20	20
预混料	5	5	5
合剂	100	100	100
营养水平			
粗蛋白	21.7	29.5	29.5
钙	1	7.8	7.8
有效磷	0.5	3.73	3.73

[0118] 3数据分析

[0119] 实验数据采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析,各组数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性,以 $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

[0120] 4试剂及药物

[0121] 酵母浸出粉,批号:1424987,500g,购自英国Oxoid公司;骨粉,批号:20180715,500g,购自衡水爱宠商贸有限公司;尿酸测定试剂盒,批号:171314,100T,购自中生北控生物科技股份有限公司;尿素氮测定试剂盒,批号:20180908,96T、肌酐测定试剂盒,批号:

20180921,96T,均购自南京建成生物工程研究所;谷草转氨酶试剂盒,批号:20180506,100T,购自南京建成生物技术公司;谷丙转氨酶试剂盒,批号:20180507,100T,购自南京建成生物技术公司;黄嘌呤氧化酶,批号:201812016,50T,购自南京建成生物技术公司;腺苷脱氨酶,批号:20180911,100T,购自南京建成生物技术公司;尿酸盐染色试剂盒,批号:20180604;4×50ml,购自北京索莱宝科技有限公司。

[0122] 5仪器与设备

[0123] SHZ88-1型台式水浴恒温振荡器,北京医疗设备厂;3K1S低温高速离心机,德国Sigma公司;sunrise酶标仪,瑞士TECAN公司;DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱,北京鸿达天矩试验设备有限公司;Reichert Histo STAT石蜡组织切片机,美国A0公司;Olympus BX53显微镜,日本奥林巴斯;AHIMADZU B1-220H电子天平,日本岛津公司;电子天平,德国赛多利斯公司。

[0124] 6结果

[0125] 表3-2各组鹌鹑体质量水平($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

[0126]

	10d	20d	30d	40d
正常组	151.15±7.70	155.89±9.31	157.71±10.41	152.73±10.42
对照组	148.88±11.25	152.99±14.21	159.60±15.47	154.16±13.11
饮水大剂量	152.34±5.45	155.21±6.04	163.75±4.07	161.30±6.10
饮水中剂量	154.99±8.06	165.81±11.82	170.68±16.22	166.56±213.12
饮水小剂量	121.85±22.72**	149.84±13.29*	157.93±13.72	152.15±20.25

[0127] 注:与同期正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

[0128] 表3-3各组鹌鹑摄食量水平($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

[0129]

	10d	20d	30d	40d
正常组	23.91±2.64	28.96±2.01	27.11±2.31	32.09±1.57
对照组	23.36±3.83	31.74±1.96**	33.83±1.84**	34.34±2.07*
饮水大剂量	22.96±3.79	30.09±2.21	31.90±1.61**	33.84±2.17
饮水中剂量	22.23±6.17	31.12±1.41**	32.76±1.45**	32.39±3.26
饮水小剂量	19.22±9.77	24.45±3.09**	21.43±4.02**	24.46±1.01**

[0130] 注:与同期正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

[0131] 表3-4各组鹌鹑血清尿酸水平($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

[0132]

	10d	20d	30d	40d
正常组	164.32±69.57	196.52±56.99	188.37±81.90	254.79±98.55
对照组	308.80±86.34**	368.32±103.53**	389.55±114.50**	392.95±103.50*
饮水大剂量	358.77±85.67**	379.79±119.38**	365.05±56.29**	406.84±111.79*
饮水中剂量	365.27±101.12**	504.55±110.71**	277.30±58.36**	379.06±96.45*
饮水小剂量	815.50±440.90**	448.62±220.39**	385.42±178.44**	451.72±268.62

[0133] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01

[0134] 表3-5各组鹌鹑血清黄嘌呤氧化酶活性(U/L, $\bar{x} \pm s$, n=10)

[0135]

	10d	20d	30d	40d
正常组	3.44±0.35	3.79±1.09	3.40±0.65	3.62±1.20
对照组	3.47±1.08	2.75±0.53*	3.19±0.62	3.12±0.80
饮水大剂量	3.29±0.98	2.83±0.93	2.88±0.67	3.28±0.72
饮水中剂量	3.90±1.27	3.08±0.60	3.08±0.78	3.34±1.10
饮水小剂量	3.61±1.30	3.21±0.53	3.44±1.00	3.88±1.29

[0136] 注:与同期正常组比较,*P<0.05

[0137] 表3-6各组鹌鹑血清腺苷脱氨酶活性(U/mL, $\bar{x} \pm s$, n=10)

[0138]

	10d	20d	30d	40d
正常组	35.64±22.88	46.38±17.25	31.25±10.76	58.17±38.04
对照组	73.52±24.94**	54.25±11.55	47.32±8.48**	81.50±47.54
饮水大剂量	95.57±15.60**	40.36±14.37	39.29±7.64	64.83±29.78
饮水中剂量	98.71±32.35**	29.48±8.64*	46.07±14.13*	63.64±44.52
饮水小剂量	65.63±20.70*	47.17±24.96	33.33±1.84	57.33±45.54

[0139] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01

[0140] 表3-7各组鹌鹑血清肌酐水平($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, n=10)

[0141]

	10d	20d	30d	40d
正常组	40.50±11.70	73.22±17.19	55.52±10.25	54.83±9.79
对照组	45.21±6.04	76.59±7.59	67.38±10.54*	73.90±21.26*
饮水大剂量	52.20±10.30	79.64±14.69	72.11±11.75*	74.11±16.40*
饮水中剂量	47.09±7.26	88.76±14.44	82.76±24.77*	73.78±19.15*
饮水小剂量	53.28±13.31	74.99±15.12	75.17±16.84*	46.58±10.74*

[0142] 注:与同期正常组比较,*P<0.05

[0143] 表3-8各组鹌鹑血清尿素氮水平(mmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=10)

[0144]

	10d	20d	30d	40d
正常组	0.42±0.13	0.51±0.09	0.96±0.21	1.61±0.43
对照组	0.81±0.36*	0.78±0.30*	1.08±0.35	1.89±0.61
饮水大剂量	0.66±0.21*	0.63±0.12	0.96±0.18	1.55±0.25
饮水中剂量	0.58±0.16*	0.69±0.18*	1.10±0.37	1.55±0.45
饮水小剂量	1.00±0.26**	0.93±0.34**	0.91±0.28	1.82±0.93

[0145] 注:与同期正常组比较,*P<0.05,**P<0.01

[0146] 表3-9各组鹌鹑肾指数(%, $\bar{x} \pm s$, n=10)

[0147]

	肾指数
正常组	0.37±0.05
对照组	0.43±0.07*
饮水大剂量	0.40±0.04
饮水中剂量	0.44±0.07*
饮水小剂量	0.45±0.09*

[0148] 注:与同期正常组比较,*P<0.05

[0149] 结果分析:由表3-2、3-3可知,实验第10d、20d,与正常组相比,饮水小剂量组鹌鹑体质量出现显著降低(P<0.05),分析原因可能与摄食量有关。实验第20d、30d、40d,与正常组相比,饮水小剂量组鹌鹑摄食量出现显著降低(P<0.05),整体一般状态较差,毛色发黑、不鲜亮、无光泽、羽毛变硬、呈类浸水状,懒动喜卧。鸣叫声低沉、嘶哑,且在实验过程中鹌鹑死亡2例,死后剖检,与正常组相比,可见鹌鹑肾脏明显肿大,分析原因可能与饮水量、食量有关。由表3-2、表3-3共同得出结论:在塑造尿酸性肾病模型过程中鹌鹑饮水量过少不可行。

[0150] 由表3-4可知:实验第10d、20d、30d,与正常组相比,其余各组鹌鹑血尿酸水平极显著升高(P<0.01),实验第40d,与正常组相比,对照组、饮水大剂量和饮水小剂量组鹌鹑血尿酸水平显著升高(P<0.05),表明各限水组动物一直处于高尿酸状态下,其中饮水小剂量组由于整体一般状态较差,死亡例数多,而导致实验数据标准差偏大。

[0151] 由表3-5、3-6可知:与正常组相比,其余各组鹌鹑血清黄嘌呤氧化酶(XOD)活性未见明显变化;而在实验第10d,与正常组相比,对照组、饮水大剂量组和饮水中剂量组鹌鹑血清腺苷脱氨酶(ADA)活性极显著升高(P<0.01),饮水小剂量组鹌鹑血清腺苷脱氨酶(ADA)活性显著升高(P<0.05)。实验第30d,与正常组相比,对照组和饮水中剂量组鹌鹑血清腺苷脱氨酶(ADA)活性显著升高(P<0.05)。提示实验过程中动物血清尿酸水平升高可能与体内腺苷脱氨酶(ADA)的活性有关。

[0152] 由表3-7、3-8、3-9可知:与正常组相比,实验第30d、40d,其余各组鹌鹑血清肌酐(Cr)水平显著升高(P<0.05);实验第10d,与正常组相比,其余各组鹌鹑血清尿素氮(BUN)水平显著升高(P<0.05),实验第20d,与正常组相比,对照组和饮水中剂量组鹌鹑血清尿素氮(BUN)水平显著升高(P<0.05),饮水小剂量组鹌鹑血清尿素氮(BUN)水平极显著升高(P<0.01);实验第40d,与正常组相比,对照组、饮水中剂量组和饮水小剂量组鹌鹑肾指数显著升高(P<0.05),这些变化可能与鹌鹑肾脏功能损伤有关。

[0153] 鹌鹑肾脏病理切片HE染色400倍光学显微镜下可见正常组鹌鹑肾组织结构清晰,细胞核蓝染,胞浆均匀红染,肾小球、肾小管结构正常。对照组、饮水大剂量组、饮水中剂量组和饮水小剂量组肾组织结构未见明显异常,组织结构清晰,肾小管上皮细胞形态正常。

[0154] 鹌鹑肾尿酸盐染色400倍光学显微镜下可见,正常组鹌鹑肾组织中未见黑色尿酸盐结晶沉积,对照组、饮水大剂量组可见少量黑色的尿酸盐结晶沉积于肾小管;饮水中剂量组明显可见大量黑色的尿酸盐结晶沉积于肾小管;饮水小剂量组明显可见较大量黑色的尿酸盐结晶沉积于肾小管。随饮水量减少,肾脏尿酸盐沉积量增多。

[0155] 综合考虑鹌鹑一般状态、各项血清生化指标和病理状态等因素,最终确定最佳饮水剂量为中剂量,即鹌鹑饮水量为15mL/只/d。

[0156] 实施例4诱导剂

[0157] 原料由如下重量配比的成分组成:常规饲料:酵母浸出粉:骨粉=4.8:2.3:2.9;

[0158] 常规饲料由如下原料组成:玉米24.9重量份、豆粕15.8重量份、石粉2.3重量份、预混料5重量份:

[0159] 每千克预混料由如下原料组成:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0160] 上述原料按照常规制备方法混合均匀。

[0161] 实施例5诱导剂

[0162] 原料由如下重量配比的成分组成:常规饲料:酵母浸出粉:骨粉=5.2:2.1:2.7;

[0163] 常规饲料由如下原料组成:玉米27.2重量份、豆粕16.3重量份、鱼粉1.0重量份、石粉2.5重量份、预混料5重量份。

[0164] 每千克预混料由如下原料组成:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0165] 上述原料按照常规制备方法混合均匀。

[0166] 实施例6诱导剂

[0167] 原料由如下重量配比的成分组成:常规饲料:酵母浸出粉:骨粉=4.2:2.5:3.3;

[0168] 常规饲料由如下原料组成:玉米21.4重量份、豆粕12.9重量份、鱼粉0.8重量份、碳酸钙1.9重量份、预混料5重量份。

[0169] 每千克预混料由如下原料组成:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0170] 上述原料按照常规制备方法混合均匀。

[0171] 实施例7诱导剂

[0172] 原料由如下重量配比的成分组成:常规饲料:酵母浸出粉:骨粉=6.8:1.1:2.1;

[0173] 常规饲料由如下原料组成:小麦14重量份、高粱22.5重量份、豆粕21.9重量份、鱼粉1.3重量份、石灰石3.3重量份、预混料5重量份。

[0174] 每千克预混料由如下原料组成:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0175] 上述原料按照常规制备方法混合均匀。

[0176] 实施例8诱导剂

[0177] 原料由如下重量配比的成分组成:常规饲料:酵母浸出粉:骨粉=3.6:3.4:3.0;

[0178] 常规饲料由如下原料组成:玉米17.9重量份、豆粕10.8重量份、花生0.7重量份、贝壳1.6重量份、预混料5重量份。

[0179] 每千克预混料由如下原料组成:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0180] 上述原料按照常规制备方法混合均匀。

[0181] 实施例9诱导剂

[0182] 原料由如下重量配比的成分组成:常规饲料:酵母浸出粉:骨粉=6.0:1.5:2.5;

[0183] 常规饲料由如下原料组成:玉米25重量份、稻谷6.8重量份、豆粕19.1重量份、石粉2.9重量份、鱼粉1.2重量份、预混料5重量份。

[0184] 每千克预混料由如下原料组成:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0185] 上述原料按照常规制备方法混合均匀。

[0186] 实施例10诱导剂

[0187] 原料由如下重量配比的成分组成:常规饲料:酵母浸出粉:骨粉=3.2:3.8:3;

[0188] 常规饲料由如下原料组成:玉米15.6重量份、豆粕9.4重量份、磷酸氢钙0.6重量份、鱼粉1.4重量份、预混料5重量份。

[0189] 每千克预混料由如下原料组成:50mg维生素A、0.4g维生素B族、0.2g维生素D3、0.4g维生素E、50mg维生素K3、28g蛋氨酸、0.5g硫酸铜、5g硫酸亚铁、2.8g硫酸锌、4g硫酸锰、21.2g碘酸钙、0.2g亚硒酸钠、57g食盐、0.1g乙氧基喹啉、0.1g二叔丁基羟基甲苯、80g鱼粉、300g糠粉、500g沸石粉。

[0190] 上述原料按照常规制备方法混合均匀。

[0191] 实施例11药剂盒

[0192] 一种用于建立鹌鹑的尿酸性肾病模型的药剂盒,由两个单元构成;

[0193] 一个单元为载有50g诱导剂;另一个单元可载有水15mL;上述两个单元在存放过程中可封闭与空气隔离,使用状态时可以方便打开,用于给鹌鹑分别食用。

[0194] 诱导剂为实施例1-10。

[0195] 实施例12药剂盒

[0196] 一种用于建立鹌鹑的尿酸性肾病模型的药剂盒,由两个单元构成;

[0197] 一个单元为载有40g诱导剂;另一个单元可载有水15mL;上述两个单元在存放过程中可封闭与空气隔离,使用状态时可以方便打开,用于给鹌鹑分别食用。

[0198] 诱导剂为实施例1-10。

[0199] 实施例13药剂盒

[0200] 一种用于建立鹌鹑的尿酸性肾病模型的药剂盒,由两个单元构成;

[0201] 一个单元为载有60g诱导剂;另一个单元可载有水15mL;上述两个单元在存放过程

中可封闭与空气隔离,使用状态时可以方便打开,用于给鹤鹑分别食用。

[0202] 诱导剂为实施例1-10。