

• 实验研究 •

# 大鼠原位性肾小球肾炎模型的建立\*

黄小平 李成进 李士梅

(肾脏研究所)

**提 要** 应用阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)诱导 Wistar 大鼠产生膜性肾炎,结果表明:经静脉注射 C-BSA 2.5mg 第2周始出现严重蛋白尿,第3周进一步加重,第4周肾脏病理检查可见 GBM 增厚,钉突形成,上皮免疫沉积物及足突损伤。该模型发病率为100%,重复性好,具有人类膜性肾炎的病理类型特点和肾病综合征的临床表现,而无肾功能损害,是肾炎的发病机理和药物防治研究的理想动物模型。

**关键词** 大鼠 肾小球肾炎 阳离子化牛血清白蛋白

免疫复合物(IC)在肾小球中沉积是肾小球肾炎致病的重要环节。50~60年代提出血循环中形成IC沉积到肾脏导致肾炎的循环免疫复合物(CIC)学说。近10年来许多研究表明肾炎时IC在肾小球中的沉着还存在另一更重要的途径——原位(in situ)IC形成。该学说认为许多内源性和外源性抗原(或抗体)首先种植在肾小球组织中,随后与循环中相关的抗体(或抗原)在原位结合形成IC。抗原(或抗体)能种植在肾小球中,取决于其对肾小球的组织亲和力。其中电荷亲和力备受注目。众所周知,肾小球基膜(GBM),系膜基质以及内皮细胞和上皮细胞表面均存在负电荷层,形成负电荷生理屏障。血循环中带正电荷的抗原蛋白质通过电荷亲和力,非特异性地和肾小球的负电荷层结合,然后再与特异性抗体形成IC,导致肾炎。近年来用阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)建立的家兔原位性肾炎模型<sup>[1~3]</sup>是上述理论的有力证据。

家兔C-BSA原位性肾炎模型的建立无疑为肾炎的发病机理和药物防治研究提供了良好的实验基础,但家兔作为实验动物,有其不足之处:①血管活性胺的生成和释放不如大鼠接近人类患病时的表现;②家兔的饮食习惯不似人类,造成口服药物(如油剂)和饮食疗法等

研究困难;③家兔价钱较贵,而且所需抗原(C-BSA)和防治药物的用量较大。而用大鼠作为实验动物来研制C-BSA原位性肾炎模型将更有利于实验性肾炎的研究。我们对此进行了探索,成功地制成了大鼠C-BSA原位性肾炎模型。

## 材 料 和 方 法

### 抗原制备

1. 天然 BSA(N-BSA) (Sigma Chem Co. USA) 等电点(PI)4.5, 纯度99%。
2. 阳离子化 BSA(C-BSA) 按 Hoare 方法<sup>[4]</sup>对上述 N-BSA 进行化学处理, PI>8.7, 冷冻干燥, 分装备用。

### 实验动物与分组

1. 实验动物 Wistar 雄性健康大鼠, 体重100~150克。

首先分组探索到合适的 C-BSA 用量和注射时间间隔, 然后开始正式实验。

2. 分 组 抽签法随机分为 2 组:

C-BSA 组 13只(实验组),  
N-BSA 组 11只(对照组)。

### 肾炎模型的制作

1. 预免疫 取 C-BSA 1 mg, 加入 0.5ml PBS 中, 与等量的弗氏不完全佐剂混匀成乳白

\*国家教委博士点基金资助课题之一

色悬液，在大鼠双侧腋下，腹股沟作多点皮下注射。

2. 免疫 预免疫1周后，每只大鼠尾静脉注射 C-BSA 2.5mg，每周3次，共3周。

C-BSA 溶液用 pH 7.4 PBS 配制，浓度为 2.5mg/ml。免疫第4周末处死动物。N-BSA 组注射 N-BSA，方法与 C-BSA 组同。

### 观察指标

1. 24小时尿蛋白定量 分别在免疫后第1、2、3和4周末各测1次，共4次。

2. 血Cr 免疫第4周末断颈动脉取血1ml，分离血清检测。

3. 肾脏组织学检查 在免疫第2周末每组随机抽出2只，第4周末全部大鼠处死取肾组织分别作抗IgG、C<sub>3</sub>免疫荧光和光镜检查，并每组抽3例作电镜检查。

## 结 果

### 24小时尿蛋白定量 (图1)

两组在免疫前均小于10mg/24h。第2、3、4周末，C-BSA 组明显升高，其中第3周末达高峰，282.07 ± 130.03mg/24h。N-BSA 组也稍有增多，但第3周末最高仅为 19.7 ± 14.0mg/24h。两组间有非常显著性差异 (P < 0.01)。

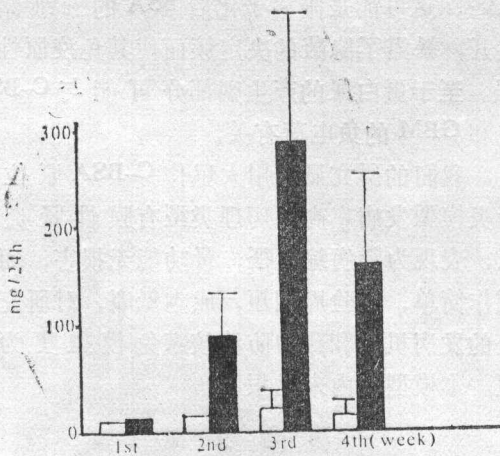


图1 24小时尿蛋白定量

■表示 C-BSA 组 □表示 N-BSA 组

血Cr 第4周末，C-BSA 组 0.53 ± 0.14mg/

dl; N-BSA 组 0.46 ± 0.09mg/dl，两组均在正常范围，无显著性差异。

### 肾组织学检查

1. 免疫荧光 C-BSA 组第2周末可见 IgG 和 C<sub>3</sub> 沿肾小球毛细血管壁颗粒状沉积，第4周末全部均见 IgG 和 C<sub>3</sub> 沿毛细血管壁呈弥漫性颗粒状沉积，系膜区可见散在颗粒状沉积。N-BSA 组第4周末仅见系膜区 IgG 和 C<sub>3</sub> 少量沉积。

2. 光镜检查 第2周末，C-BSA 组肾小球肿胀，囊腔变窄；N-BSA 组未见明显变化。第4周末，C-BSA 组肾小球增大，毛细血管腔狭窄，毛细血管壁轻度增厚，见少量钉突形成，系膜细胞轻度增生 (3个/肾小球)。N-BSA 组形态近似正常肾小球。两者有显著性差异 (表1、2)。两组肾小管大致正常。

3. 电镜检查 第4周末，C-BSA 组可见上皮下电子致密物沉积；GBM 节段性增厚；钉突形成，呈梳齿状排列；是突肿胀广泛融合；系膜细胞轻度增生 (3个/系膜区)；内皮细胞轻度肿胀，内皮窗排列完整 (图2)。N-BSA 组 GBM 完整光滑，无增厚，未见上皮下沉积物。

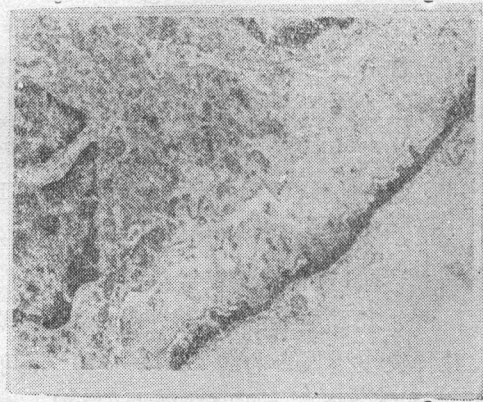


图2 肾小球基膜 (GBM) 钉突形成  
注射阳离子化 BSA 4周后的肾小球基膜  
钉突形成，梳齿状排列。EM × 1,000

## 讨 论

GBM 负电荷层的形成主要是疏松层含有

表1 肾小球内细胞计数和肾小球直径

	细胞/肾小球 $\bar{x} \pm s$	肾小球直径 ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{x} \pm s$
C-BSA (n=10)	56.7 ± 5.7	116.6 ± 7.6
N-BSA (n=9)	54.2 ± 6.1	96.8 ± 11.8
P	>0.05	<0.01

表2 光镜下肾小球病理变化

	GBM增厚				毛细血管 肿 胀				系膜细胞 增 生			
	-	±	++	+++	-	±	++	+++	-	±	++	+++
C-BSA (n=10)	0	3	7	1	2	1	8	0	2	0	9	0
N-BSA (n=9)	4	4	1	0	8	1	0	0	8	1	0	0
P	<0.01				<0.01				<0.01			

硫酸肝素多糖蛋白(heparan sulfate proteoglycans)。因为GBM的内皮细胞层是有间隙的,所以适当大小的正电荷抗原能通过电荷吸引作用植入GBM,或穿过GBM植入上皮下。抗原蛋白质的穿透取决于蛋白质的等电点(PI),即PI越高,穿透程度越深。例如PI>8的铁蛋白(ferritin)可以深入到GBM的外疏松层<sup>[6]</sup>。在家兔实验中已证实,C-BSA在静脉注入10分钟后已与肾小球毛细血管壁结合<sup>[3]</sup>。当然出现肾炎改变尚需要抗体的存在。事实上在没有抗体的情况下,C-BSA在循环中清除比N-BSA更为迅速<sup>[6]</sup>。C-BSA种植在GBM或上皮下,就会与循环中相应的抗体结合在原位形成IC和透发肾炎。本实验结果表明,实验大鼠百分之百发生了肾炎,这与家兔C-BSA原位性肾炎模型报告的结果相一致<sup>[3]</sup>,可见C-BSA诱导的肾炎,在电荷作用原理上家兔和大鼠没有动物种属的差异。

从病理分类而言,大鼠C-BSA原位性肾炎近似人类膜性肾炎。本模型可以观察到:①大量的IgG和C<sub>3</sub>沉积在GBM上;②足突损伤和上皮下沉积物;③GBM增厚,钉突形成。症状表现为大量的蛋白尿,血清甘油三酯和总

胆固醇升高(另文报告),这与人类“肾病综合征”相符;肾小球内细胞数没有增加。关于“系膜细胞轻度增生”的问题仍有待进一步的鉴定。纵使存在,仅此亦难以否定以上类似膜性肾炎的各种表现。

Border(1981)报告选用大鼠作实验,用内毒素作预免疫,然后给大鼠注射大量的C-BSA,结果仅出现<50mg/24h的蛋白尿和“系膜性肾炎”的变化<sup>[6]</sup>。Furness(1987)<sup>[7]</sup>和本实验均发现佐剂含有分枝杆菌成分(内毒素和卡介苗等)会减少大鼠肾炎发病,或完全不发病。这提示大鼠C-BSA原位性肾炎发病涉及更复杂的细胞免疫机理。为了能得到病理改变比前人更趋一致的模型,本实验中我们选用了最小有效剂量的C-BSA 2.5mg/次,结果系膜区沉积很少。而Furness用10mg/次,则在上皮下和系膜区见大量沉积物。在蛋白尿的严重程度上,本实验结果则与Furness所报告的不同,甚至更为严重,可见C-BSA每次用量和间隔要适当才能得到所希望的模型,并非注射C-BSA越多越好。

新近Muckerheide等的研究表明:在活体中,用C-BSA作为抗原所产生的IgG量要比用相同量的N-BSA高得多;另外刺激T细胞增殖所需要的C-BSA量也比N-BSA少500倍<sup>[8]</sup>,这可能是阳离子化后BSA的三维结构展开,暴露了隐蔽的决定簇而使其免疫原性增强。至于蛋白尿的产生则部分可能与C-BSA中和GBM的负电荷有关。

我们的研究显示用大鼠作C-BSA原位性肾炎模型发病率高,病理类型有膜性肾炎特点,表现为肾病综合征,肾功能无损害,而且制作简单,实验周期短,成本低廉,对研究肾炎的发病机理和药物防治较家兔模型更为理想。本模型国内未见报道。

### 参 考 文 献

1. Border W A, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. J Clin Invest 1982; 69(2):451

2. 章友康, 等. 用阳离子牛血清白蛋白制作原位免疫复合物型肾炎模型. 中华肾脏病杂志 1985; 1(1):7
3. 王一鸣, 等. 阳离子化牛血清白蛋白诱发家兔肾炎模型的研制. 中山医科大学学报 1986; 7(1):25
4. Hoare DG; et al. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in protein. J Bio Chem 1967; 242(10):2447
5. Rennke HG & Venkatachalam. Glomerular permeability: in vivo tracer studies with polyanionic and polycationic ferritins. Kidney Int 1977; 11:41
6. Border WA, et al. Antigen charge as a determinant of immune complex localization in the glomerular. Lab Invest 1981; 40(5):442
7. Furness PN & Turner DR. An assessment of the influence of antigen dose in two new models of chronic serum sickness glomerulonephritis in the rat. Br J Exp Pathol 1987; 68:527
8. Muckerheide A, et al. Cationization of protein antigens. V. Effect of the degree of cationization on patterns of immune responsiveness. Cell Immunol 1990; 127(1):67

## A NEW MODEL OF EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS IN RATS BY ADMINISTRATION OF CATIONIC BOVINE SERUM ALBUMIN

Huang Xiaoping    Li Chengjin    Li Shimei

(Kidney Research Institute)

The study developed a new model of experimental glomerulonephritis in rats by administration of cationic bovine serum albumin(C-BSA) as antigen. Twenty-four male wistar rats, weight 100~150g, were at random divided into two groups. One group( $n=11$ ) was as control; preimmunized by native bovine serum albumin(N-BSA) 1 mg and Freund's incomplete adjuvant(FIA) subcutaneously 7 days before starting injection. And another group ( $n=13$ ) was as experimental preimmunized by C-BSA 1 mg and FIA. Then the rats or both groups were respectively given intravenous injection of N-BSA or C-BSA 2.5mg thrice weekly for 3 weeks. At the end of 4th week, all rats were killed. All rats given C-BSA had been induced heavy proteinuria and nephrotic syndrome since 2nd week, but the rats given N-BSA showed slighter proteinuria only. Renal lesions produced by C-BSA were markedly different from that found in rats given N-BSA, and showed subepithelial deposits, extensive fusion of foot process, thickness and prominent spikes of GBM and mild mesangial proliferation, whereas rats receiving N-BSA seemed to be normal. This model showed several advantages, such as being reproducible, consistent, convenient and inexpensive, especially having heavy proteinuria and nephrotic syndrome without impairing renal function. These features make the model eminently suitable for further study.

**Key words:** Rat    Glomerulonephritis    Cationic bovine serum albumin