

实验性 IgA 肾病模型的改进

汤颖¹, 娄探奇¹, 成彩联¹, 彭晖¹, 关伟明²

(1. 中山大学附属第三医院肾内科, 广东 广州 510630; 2. 中山大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

摘要【目的】对以往实验性 IgA 肾病模型的制作方法加以改良, 建立一种更加可靠、稳定、成功率高的模型。【方法】清洁型雄性 SD 大鼠 12 只, 质量 220~260 g, 按随机数字表随机分为正常对照组、改良造模组。改良组造模方法: 口服免疫原牛血清白蛋白(BSA)剂量较常用剂量增加 1 倍, 为 400 mg/kg, 隔天 1 次灌胃, 四氯化碳(CCl₄)注射方式由既往的腹腔注射改为皮下注射, 用诱导肝纤维化剂量的 1/3 皮下注射蓖麻油 0.5 mL+CCl₄ 0.10 mL, 每周 1 次, 持续 9 周, 并联合运用脂多糖(LPS), 第 6, 8 周予以 0.05 mg 尾静脉注射。【结果】改良造模组的 6 只大鼠均出现蛋白尿, 其中 4 只出现肉眼血尿, 2 只出现镜下血尿, 免疫荧光显示肾组织 IgA 强度(2+~3+), 光镜高碘酸-希夫染色(PAS)染色显示有弥漫性的轻中度系膜区增生, 血清白蛋白(ALB)水平较正常对照组明显降低, 差异有统计学意义(P<0.05), 转氨酶较正常对照组没有升高。【结论】运用改良的造模方法 BSA+LPS+CCl₄ 建立 IgA 肾病模型效果良好, 病理、临床指标均与人类 IgA 肾病较为相似。

关键词: IgA 肾病; 动物模型; SD 大鼠

中图分类号: R 692

文献标识: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0184-04

Improvement of Experimental IgA Nephropathy Model

TANG Ying¹, LOU Tan-qi¹, CHENG Cai-lian¹, PENG Hui¹, GUAN Wei-ming²

(1. Department of Nephrology, The Third Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 To improve the method of early constructing IgA nephropathy model and seek more reliable and stable model. 【Methods】 Twelve clean SD rats (220~260 g) were randomly divided into control group and reforming group. Reforming method: the dose of oral immunogen bovine serum albumin (BSA) increased one times (400 mg/kg every other day), the method of injecting carbon tetrachloride CCl₄ was subcutaneous injection instead of intraperitoneal injection, which dose was one third of content to induce hepatic fibrosis (benne oil 0.5 mL/weekly and CCl₄ 0.10 mL/weekly, continue 9 weeks). Combined with lipopolysaccharide (0.05 mg/once everyday, the sixth and ninth week once). 【Results】 In reforming group, the six rats totally emerged albuminuria, 4 rats had gross hematuria, two had micro-hematuria. Immunofluorescence showed renal IgA density was (2+~3+), the sections stained with periodic acid-Schiff (PAS) examined by light microscopy showed diffuse mild-moderate mesangial proliferation, the level of serum albumin (ALB) obviously decreased compared with normal group, there was significantly different (P<0.05). Aminotransferase did not increase compared with normal group. 【Conclusion】 To apply with BSA, LPS, and CCl₄, IgA nephropathy model proves good effect, which pathology and clinical index resemble human IgA nephropathy.

Key words: IgA nephropathy; animal model; SD rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):184-187]

人们一直希望能够建立一种稳定、成功率高, 且病理、临床指标均很接近人类 IgA 肾病的动物模型, 通过它来研究 IgA 肾病的发病机制和治疗

方法。我们在参考了国内外大量文献后, 对原有的 IgA 肾病造模方法进行了改良, 取得了较为满意的结果, 报告如下。

收稿日期: 2005-11-15

基金项目: 广州市科技攻关基金资助项目(2004-2006, 2004Z3-E0461)

作者简介: 汤颖(1976-), 女, 江西临川人, 硕士; 娄探奇, 博士生导师, 通讯作者, E-mail: lou.tq@163.com

1 材料与方 法

1.1 试验分组

清洁型雄性SD正常大鼠12只,体质量220~260g,由中山大学实验动物中心提供。按随机数字表法选取6只作为改良造模组,余下6只作为正常对照组。

1.2 造模方法

在查阅了大量文献资料后^[1-5],我们对原有造模方法加以改进,运用脂多糖牛血清白蛋白(bovine serum albumin BSA)+脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)+四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)方法建立实验性IgAN模型,方案如下:口服免疫原BSA剂量较常用剂量增加1倍,剂量400mg/kg隔天灌胃,持续6周;CCl₄注射方式由既往的腹腔注射改为皮下注射,用诱导肝纤维化剂量的1/3(皮下注射蓖麻油0.5mL+CCl₄0.10mL,每周1次,持续9周),并联合运用LPS分别于第6,8周以LPS0.05mg尾静脉注射。正常对照组正常饮食和生活,不予干预。

1.3 临床指标检测

1.3.1 24h尿蛋白和尿常规测定 用代谢笼收集24h尿,分别取0.5mL和10mL(加防腐剂),留做尿常规及24h尿蛋白检测,每3周检测1次,直至10周末。在造模的10周内,每天观察有无肉眼血尿。

1.3.1 生化指标 分别于实验开始第1天、造模后10周末从改良造模组大鼠静脉取血,用全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、血清白蛋白(serum albumin, ALB)、血清总蛋白(total serum protein, TP)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)及血肌酐(serum creatinine, SCr),正常对照组在相同的时间点同时取血检测上述指标作为对照。

1.4 肾组织病理

实验结束时用乙醚麻醉大鼠,沿腹中线切开取肾脏,沿冠状线将肾脏分成两半,再沿冠状面将肾脏继续切分,取外围的肾皮质一部分做冰冻切片做免疫荧光IgA检测;另一部分做常规光镜检查,用100mL/L的中性甲醛固定,石蜡包埋切片,分别做苏木素-伊红染色(HE)、Masson染色,过碘

酸-希夫染色(PAS)及六胺银染色,观察系膜区有无增生和增宽。免疫荧光制作流程:新鲜肾组织OCT包埋,冰冻切片4μm,磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗3次,室温下或吹风机微干,滴加异硫氰酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的兔抗鼠IgA(1:100)4℃暗盒过夜,PBS洗3次,室温下晾干封片,荧光显微镜下观察对照、摄影。

1.5 肾组织形态学改变图象分析

取PAS染色的肾组织切片置于200倍光学显微镜下,每个标本随机计数15个肾小球,利用德国KONTRON IBAS 2.5全自动图像分析系统,用鼠标标出肾小球系膜区,计算面积,同时测出毛细血管丛面积,算出肾小球系膜区占整个毛细血管丛面积的百分比^[6]。

1.6 免疫荧光强度分级

半定量标准参照目前国内外通用的5级法(0~4+)分级:低倍镜下不能显示,高倍镜下似乎可见为+;低倍镜下似乎可见,高倍镜下可见为+;低倍镜下可见,高倍镜下清晰可见为++;低倍镜下清晰可见,高倍镜下耀眼为+++;高倍镜下刺眼为++++。

1.7 统计学处理

全部数据采用SPSS11.0医用统计软件进行处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用SNK-q检验法,等级资料采用非参数秩和检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫荧光

改良造模组6只大鼠均在肾脏有较强的IgA免疫荧光反应,而正常对照组在肾脏无IgA免疫荧光反应,见图1。

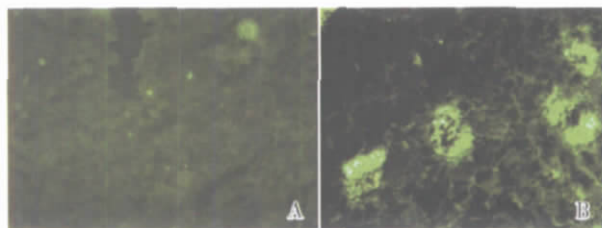


图1 正常对照组和改良造模组的IgA免疫荧光
Fig.1 The immunofluorescence of IgA in normal control group and reforming group

A: normal control group IgA (-); B: reforming group IgA (+++)

2.2 系膜区基质

改良造模组的系膜区基质表达量较正常对照组显著增加,其差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1 和图 2。

表 1 两组系膜区增生程度比较

Table 1 Level of mesangial area hyperplasy in the two groups

Group	Mesangial area (mm^2)	Glomerular area (mm^2)	Mesangium / glomerular
Normal control	415 \pm 126 ¹⁾	13 845 \pm 2867	0.03 \pm 0.01
reforming	1 118 \pm 387	11 804 \pm 4399	0.09 \pm 0.03 ²⁾

1) compared with reprovded group, $t = -4.24$, $P = 0.01$ 2) compared with normal control group, $t = 4.60$, $P = 0.01$

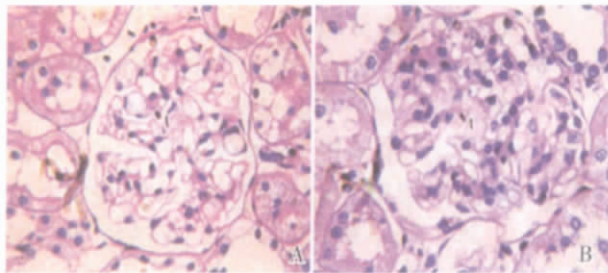


图 2 两组间肾组织病理

Fig.2 Histopathology of renal tissue between two groups (periodic acid- schiff staining, 400 \times)

A: normal control group; B: reforming group

2.3 临床指标

2.3.1 24 h 尿蛋白总量及血尿 改良造模组 24 h 尿蛋白量(13.23 g \pm 0.86 g),显著高于正常对照组(4.95 g \pm 1.76g),其差异有统计学意义($P < 0.01$),改良造模组中 4 只大鼠出现肉眼血尿,2 只出现镜下血尿,正常组无 1 例出现血尿。

2.3.2 肾功能 改良造模组 BUN,SCr 水平均显著高于正常对照组,具有统计学意义($P < 0.01$),表 4。

表 2 两组间血肌酐尿和素氮比较

Table 2 Comparison of SCr and BUN of the two groups ($\bar{x} \pm s$)

	Normal	Improved	t	P
SCr($\mu\text{mol/L}$)	32.5 \pm 9.0	62.3 \pm 6.1	- 12.73	0.00
BUN(mmol/L)	6.1 \pm 1.4	13.3 \pm 2.3	- 41.73	0.00

SCr: serum creatinine; BUN: urea nitrogen

2.3.3 肝功能 改良造模组 ALB、TP 水平明显降

低,与正常对照组相比有统计学差异($P < 0.01$); ALT、AST 水平在改良造模组与正常对照组间无统计学差异($P > 0.05$),见表 3。

表 3 各组间肝功能比较

Table 3 Comparison of liver function of the two groups($\bar{x} \pm s$)

	Normal	Reprovded	t	P
TP(g/L)	63.6 \pm 8.93	40.9 \pm 6.1	14.0	0.00
ALB(g/L)	30.1 \pm 2.6	20.8 \pm 3.0	19.50	0.00
ALT(U/L)	71.1 \pm 2.51	80.9 \pm 20.11	- 3.00	0.20
AST(U/L)	169.6 \pm 46.2	180.3 \pm 37.0	- 4.01	0.10

TP:total serum protein; ALB:serum- albumin; ALT:alanine aminotransferase; AST:aspartate aninotransferase

3 讨 论

目前国外所用的自发性 IgA 肾病模型是由具有血清高浓度 IgA 的 ddY 小鼠选择性交配而衍生的具有自发性 IgAN 倾向的 HIGA 鼠系。方法是选取 3-4 月龄的具有血清高浓度 IgA 的 ddY 小鼠进行交配,繁衍到第 12 代时,HIGA 鼠系在 10-60 周龄时具有异常高浓度 IgA^[7],但不足之处是尿的蛋白含量并不高(1~3 g/L),且从未有过血尿^[8]。国内研究者所用的 IgA 肾病动物模型主要是采用诱发的实验型 IgA 肾病,主要有以下几种方法:利用口服免疫原+肝脏切除+免疫佐剂,此实验术后死亡率明显增高^[9]。我们在预试验中也曾采用此方法,结果 6 只大鼠有 3 只死亡,死亡率高达 50%;葡萄球菌肠毒素+口服免疫原+免疫佐剂^[4],葡萄球菌肠毒素是外毒素,毒性大,易引起机体损害;腹腔注射 CCl₄ 引发的 IgA 肾病模型,此模型虽然有高强度的 IgA 沉积,但肝脏功能损害严重,常伴有肝细胞坏死变性和假小叶生成^[5]。我们对以往的造模方法加以改进:联合应用 LPS+BSA+CCl₄ 作为造模方法,LPS 是免疫佐剂,毒性较外毒素葡萄球菌肠毒素弱,不易对动物机体造成损害,引起动物死亡;将口服免疫原 BSA 的剂量比既往加大 1 倍,改为 400 mg/kg,隔日 1 次;CCl₄ 由以往的腹腔注射改为皮下注射,且剂量减少至诱导肝纤维化剂量的 1/3,尽可能减少对肝脏的损害,CCl₄ 常规诱导肝纤维化的剂量为 50%(体积比)^[9]。通过以上改良,模型组 IgA 在肾脏组织有较强沉积,操作起来更方便和安全,不易引起腹腔感染和动物死

亡,并且无明显肝脏损害。在整个实验过程中,改良造模组大鼠无 1 例死亡,除了临床检测指标(蛋白尿,血尿)取得比较满意的结果外,病理方面也较为理想,6 只大鼠肾脏系膜区都以较强的 IgA 沉积为主,说明用 LPS+BSA+CCL₄ 作为 IgA 肾病的模型改良方法是成功的。当然,这只是小样本的实验,要想得到更为肯定的结果,还需扩大样本量来证实。

参考文献:

- [1] 黄 胜,孙 林,叶任高.两种系膜增殖性肾炎大鼠模型的建立比较[J].中国实验动物学报,2002,10(4):236-238.
- [2] 李江涛,许 晨,李 素,等.雷公藤单体 T4 治疗 IgA 肾病的实验研究[J].上海医学,2003,26(suppl):19-22.
- [3] 王 丽,章友康,王海燕,等.肝脾和(或)胃肠黏膜免疫在肾小球系膜区 IgA 沉积中的作用 [J].中华内科杂志,1988,27(4):216-220.
- [4] 刘 震,周树录,谭建三,等.大鼠系膜增殖性肾小球肾炎模型的改进[J].华西医科大学学报,1996,27(2):182-184.
- [5] WOODROFFE A J, GORMLY A A, CLARKSON A R. Experimental cirrhosis and deposition of glomerular IgA immune complexes[J]. *Contrid Nephrol*, 1984, 40:51-54.
- [6] 郭啸华,刘志红,黎磊石.大黄酸对 2 型糖尿病肾病大鼠疗效观察[J].中华肾脏病杂志,2002,18(4):280-284.
- [7] MUSO E, YOSHIDA H, TAKEUCHI E, et al. Enhanced production of glomerular extracellular matrix in a new mouse strain of high serum IgA ddY mice [J]. *Kidney Int*, 1996, 50(6):1946-1957.
- [8] MIYAWAKI S, MUSO E, TAKEUCHI E, et al. Selective breeding for high serum IgA levels from noninbred ddY mice: isolation of a strain with an early onset of glomerular IgA deposition[J]. *Nephron*, 1997, 76(2):201-207.
- [9] 徐淑云. CCl₄ 诱发的肝纤维化动物模型[M]//徐淑云. 药理实验方法学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1350-1351.

(编辑 黄小延)

(上接第 183 页 from page 183)

表达分布在肺小血管壁及其周围,气管胃、肠粘膜上皮细胞浆及结缔组织,上述脏器均表现为病变越重的区域阳性强度越强。本实验还发现过敏性休克死亡豚鼠的肺、气管、胃组织 4 个时间点均呈阳性表达,并以 0、6 h 表达最强,各时间点的表达强度存在显著性差异;而肠组织 IL-4 阳性表达各时间点无显著性差异;对照组豚鼠所有脏器组织各时间点均无表达。这与 IgE 的表达情况基本一致。揭示 IL-4 促进 IgE 合成,并协同 IgE 参与过敏性休克反应。也可望作为法医学鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标。

本实验提示 IgE 和 IL-4 可望作为法医学鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标;它们在肺、气管、胃组织中不同时间点的表达强度差异和在脾、肠组织中表达的无差异性提示法医学鉴定过敏性休克死亡应根据尸检时间选择脏器和指标。

参考文献:

- [1] 左芷津.过敏性休克死亡动物肾脏免疫复合物型的实验研究[J].中国法医学杂志,1994,9(2):82-84.
- [2] 郭 薇,陈玉川,成建定等.豚鼠过敏性休克 IgE 和 C₃ 复合物分布及 C-kit 蛋白表达[J].中山医科大学学

报,2002,23(2):103-104.

- [3] 左止津,祝家镇.检测青霉素过敏性休克血中 IGE 类抗体[J].中国法医学杂志,1993,9(3):140-142.
- [4] 周亦武.药物过敏性休克的病理变化及其法医学鉴定[J].中国法医学杂志,1993,9(3):167-168.
- [5] 左止津,祝家镇.过敏性休克死亡体内白三烯变化的研究[J].中国法医学杂志,1992,7(3):141-142.
- [6] 赵 坡,辛 貌,王德文.用引物介导原位标记方法检测脑胶质瘤染色体畸变[J].中华病理学杂志,1996,25(2):291-293.
- [7] 巴德年.当代免疫学技术与应用[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:122-123.
- [8] BRUCE S, BOCHNER M D, LAWRENCE M, et al. Anaphylaxis [J]. *New Eng J Med*, 1991, 324 (25):1785-1787.
- [9] 杨 镇,地大鹏,施宝明,等.日本血吸虫病兔肝内血管壁免疫球蛋白和补体的免疫组织化学分析[J].同济医科大学学报,1998,27(1):49-51.
- [10] McGWIRE B S, CHANG K P, ENGMAN D M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic proto zoon *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp⁶³. *Infect Immunity* 2003, 71 (3): 1008-1010

(编辑 黄小延)