

阳离子化牛血清白蛋白诱发家兔肾炎模型的研制

王一鸣 黄文聪 何柏林 李士梅

(第一附属医院内科)

近20年来,在肾炎研究领域,对发病机理已取得了重大进展。近年来,较引人注目的发现是免疫复合物可在原位(in Situ)形成和抗原的电荷与致肾炎性(nephritogenicity)有关的问题。

在免疫复合物(IC)的形成部位方面,本世纪50~60年代,主要根据对血清病肾炎的研究,提出了肾炎发病机理的循环免疫复合物(CIC)理论^[1]。这一理论认为,抗原和相应抗体是在血循环中形成IC的,IC随血流经肾脏时,非特异性地在肾小球中沉积,从而引起肾炎。CIC理论提出后,得到了普遍接受,曾一度被认为是人类免疫复合物肾炎发生的主要途径。

但是,CIC理论并不能完满地解释人类免疫复合物肾炎的发病机理。如在人类膜性肾病中,尽管肾小球基膜(GBM)上有较多IC沉积,但仅在很少的病人血中能检出CI^[2]。那么,此型肾病GBM上的IC是在何处形成的呢?近年来,有的学者提出了IC形成的另一条途径,即原位性IC形成理论。这一理论认为,引起肾炎的IC不仅能在血循环中形成,而且还可以在肾小球局部形成,即原位形成。某些与肾小球基膜组织有特别亲和力的抗原,可首先嵌合在GBM上并刺激机体产生相应抗体,然后与肾小球中的抗原结合,在原位IC形成,引起肾炎^[3]。

在抗原的致肾炎性方面,1961年Dixon等^[1]在兔慢性血清病肾炎中观察到:牛血清白蛋白(BSA)比牛血清球蛋白、人血清白蛋白、人血清球蛋白更易诱发肾炎,即有更大的致肾

炎性。其它学者也注意到:抗原分子量的大小、抗原决定簇的数目和抗原的剂量与抗原的致肾炎性有关^[4]。近年来,人们已认识到肾小球毛细血管壁的电选择性,证实了肾小球多阴离子(Polyanion)的存在及其化学性质,一些学者还在实验中观察到肾小球多阴离子可非特异性地和多种带阳电荷的物质结合^[5],从而使人们认识到抗原的电荷可能和它的致肾炎性有关。

根据上述新进展,为了确定IC能在原位形成以及带阳电荷的抗原有更大的致肾炎性问题,我们按Border等^[6]、章友康、王叔咸等^[7]的方法用阳离子化BSA和天然BSA免疫两组家兔,对比两组的结果,评价了IC的形成部位及带不同电荷抗原的致肾炎性,并对有关问题进行了讨论。

材料和方法

抗原:天然BSA,采用Sigma产品,等电点4.5,阳离子化BSA系按Hoare所述方法^[8]处理天然BSA而成,等电点8.7。实验前用天然BSA或阳离子化BSA各10mg,分别从不同家兔的耳静脉中注入,于注射前及注射后10分钟取肾组织,滴加抗BSA荧光抗体,在荧光显微镜下观察。注射阳离子化BSA10分钟后取出的肾组织,抗BSA荧光抗体染色阳性(图1),证明其已和肾小球毛细血管壁结合。注射阳离子化BSA之前以及注射天然BSA前、后取出的兔肾组织则均无荧光可见。表明阳离子化BSA注射后能在10分钟内与兔肾组织结合,而天然BSA则否。

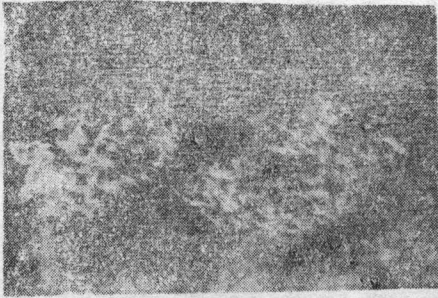


图1 注射阳离子化 BSA10分钟后取出的肾组织, 免疫荧光证实 BSA 已和肾小球毛细血管壁结合

实验动物的处理

选择健康杂系南京兔26只, 6只用于抗原鉴定, 其余20只按抽签法随机分入实验组和对照组。实验组12只, 注射阳离子化 BSA; 对照组8只, 注射天然 BSA。注射的剂量、次数两组相同。

免疫程序, 先做预免疫: 用阳离子化 BSA 和天然 BSA1mg 加大肠杆菌内毒素1ug, 分别给实验组和对照组兔注射。一周后, 实验组每日静脉注射阳离子化 BSA10mg, 每周6次; 对照组注射天然 BSA, 方法和剂量与实验组相同。从第7周开始至第7周末, 每日注射剂量加倍。注射期间于第2、5、7周末测血肌酐(Cr)、血尿素氮(BUN), 尿蛋白定量并做肾活检, 常规光镜检查, 并做抗 BSA, 抗兔 C₃, 抗兔 IgG 免疫荧光检查。

结 果

一、尿蛋白定量

阳离子化 BSA 注射组于注射后14天, 所有动物都检出了蛋白尿, 至第49天最为明显。天然 BSA 注射组8只兔中, 1只于第14天检出蛋白尿, 1只于第35天检出蛋白尿, 还有2只于第49天才检出蛋白尿。其余4只始终未检出蛋白尿。两组尿蛋白定量值有显著差异 ($P < 0.05$) (见图2)。

二、血 Cr

阳离子化 BSA 注射组头35天内血 Cr 无明显

升高 ($P > 0.05$), 第49天则显著升高 ($P < 0.01$) ($\bar{x} \pm SD: 1.63 \pm 0.53 \text{mg/dl}$)。天然 BSA 注射组血 Cr 在整个实验期间没有明显变化 ($P > 0.05$) (第49天 $\bar{x} \pm SD: 1.11 \pm 0.15 \text{mg/dl}$)。同一注射时间两组血 Cr 均数的比较在第14天, 35天没有显著差异 ($P > 0.2$), 第49天出现显著差异 ($P < 0.05$) (见图3)。

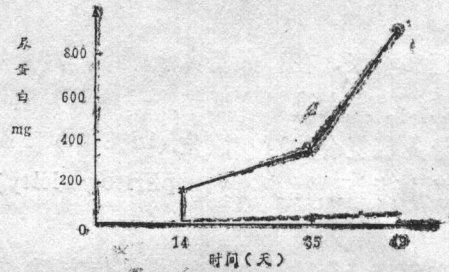


图2 尿蛋白定量结果
注: —表示阳离子化 BSA 注射组
...表示天然 BSA 注射组

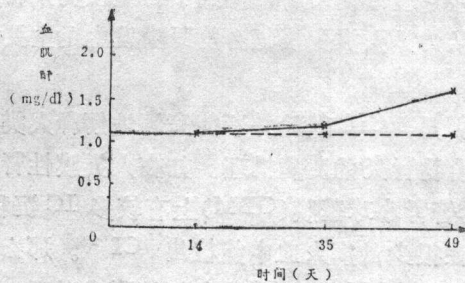


图3 血肌酐结果

三、BUN

BUN 改变与血肌酐的动态变化相似, 阳离子化 BSA 注射组头35天内 BUN 没有显著变化 ($P > 0.05$)。第49天 BUN 显著升高 ($P < 0.01$) ($\bar{x} \pm SD: 33.33 \pm 10.74 \text{mg/dl}$)。天然 BSA 注射组在整个实验期间 BUN 都没有显著变化 ($P > 0.05$) (第49天 $\bar{x} \pm SD: 21.80 \pm 1.85 \text{mg/dl}$)。同一注射时间两组 BUN 均数的比较, 在第35天以前没有显著差异 ($P > 0.05$), 第49天出现显著差异 ($P < 0.02$) (见图4)。

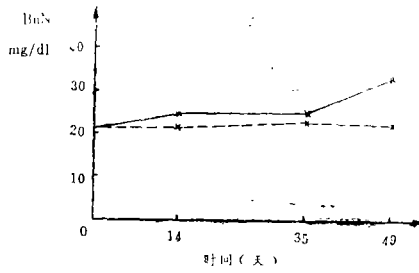


图4 BUN 结果

四、免疫荧光

阳离子化 BSA 注射组所有兔肾小球都于第14天出现了 IgG BSA 和 C₃沉积,表明有 IC 形成(见表1)。

天然 BSA 注射组 8 只兔中, 4 只兔肾小球的荧光染色始终阴性, 表明没有 IgG 和 BSA 沉积。其余 4 只在实验的不同时期出现了轻度(±~+)IgG 沉积, 其中 2 只出现轻度(±~+)BSA 沉积(见表2)。

表1 阳离子化 BSA 注射组肾活检组织免疫荧光结果

兔(编号)	14天			35天			49天		
	IgG	C ₃	BSA	IgG	C ₃	BSA	IgG	C ₃	BSA
3	++	+	+	++	++	+	+++	+++	+
4	++	+	+	++	++	+	+++	+++	+
16	+++	++	+	+++	++	+	+++	+++	+
17	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+
18	+++	++	+	+++	++	+	+++	+++	±~++
19	++	++	+	++~+++	++	+	(死亡)		
20	+++	++	±~+	+++	++	+	+++	+++	+
21	+++	++	+	+++	++	+	+++	+++	+
22	+++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+
23	+++	++	±~+++	+++	+++	+	+++	+++	+
24	+++	+	+	+++	+++	+	+++	+++	+
25	+++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+

注: +、++、+++表示抗 IgG 和抗 BSA 的荧光强度

表2 天然 BSA 注射组肾活检组织免疫荧光结果

兔(编号)	14天			35天			49天		
	IgG	C ₃	BSA	IgG	C ₃	BSA	IgG	C ₃	BSA
5	—	—	—	+	±	—	±	—	—
6	—	—	—	±	—	—	±~+	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	+	±	±	±	±	—	±	±	—
12	—	—	—	(死亡)			—	—	—
13	+	±	+	±	±	—	+	+	—
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	—	—

引人注意的是，阳离子化 BSA 注射组 IgG 和 BSA 都沉积于肾小球毛细血管壁，呈线条状或粒线状（图 5）。天然 BSA 注射组 IgG 和 BSA 都沉积于系膜区，量少呈弥漫性颗粒状（图 6）。

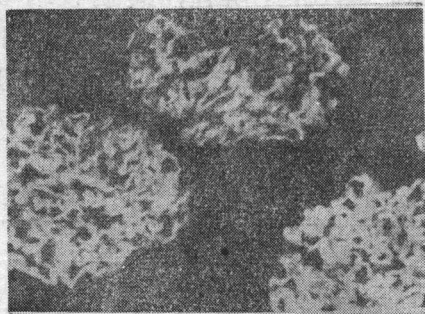


图5 阳离子化 BSA 注射组，肾小球中 IgG 呈线状沉积

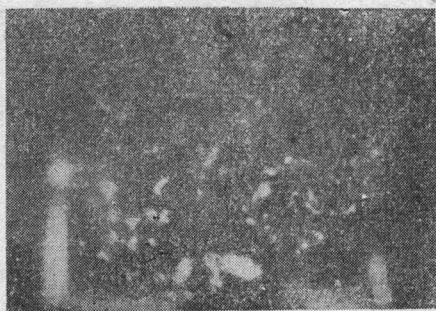


图6 天然 BSA 注射组，IgG 呈颗粒状沉积，量较少

五、光镜

阳离子化 BSA 注射组：

病变比较一致，突出的特点是 GBM 增厚。实验早期，本组 12 只兔全部出现了肾小球肿大，中性白细胞和单核细胞浸润，上皮细胞明显肿胀。其余 4 只有系膜细胞和基质轻度增多。PASM 染色下早期有轻度 GBM 增厚，随着注射时间的延长，GBM 增厚逐渐加重，至实验晚期全部出现了明显的 GBM 增厚（比对照组增厚 2~3 倍）。而系膜细胞和基质的增多则逐渐减轻。上皮细胞肿胀依然存在。此外还有不同程度的中性白细胞和单核细胞浸润。本组所有动物肾小球内未见血栓形成。

天然 BSA 注射组：

病变比阳离子化注射组轻，本组 8 只兔肾组织中，3 只未见明显病变，这 3 只在免疫荧光下也无 IgG 和 BSA 沉积，尿蛋白始终阴性。其余 5 只中有 2 只仅见轻度肾小球体积增大，另外 3 只出现轻度系膜细胞和基质增多，GBM 未见增厚。

讨 论

从上面的结果中可以看出：

一、带阳电荷的 BSA 注射后立即可与肾小球毛细血管壁直接结合，并能引发肾炎。

在反复进行的实验中，每一次都能用免疫荧光的方法证实：阳离子化 BSA 在注射后 10 分钟就能和肾小球毛细血管壁直接结合，但却没有观察到天然 BSA 和肾小球毛细血管壁有这种结合。

现已知道，GBM 上有多阴离子存在，故阳离子化 BSA 会通过静电引力和多阴离子结合。

由于抗原在注射后能立即和肾小球毛细血管壁结合，并持续存在，这些固定的抗原就可与相应的抗体在肾小球毛细血管壁上原位形成 IC。因此，本实验可以说明，用阳离子化 BSA 诱发的肾炎主要是在原位形成的 IC 引起的。

二、阳离子化 BSA 的致肾炎性较大。

阳离子化 BSA 注射组全部实验动物都出现了明显的 GBM 增厚等病变，蛋白尿显著高于天然 BSA 注射组 ($P < 0.05$)，血 Cr 和 BUN 于第七周末显著升高 ($P < 0.01$)。而天然 BSA 注射组 8 只兔中，3 只无明显病变，其余 5 只病变也较轻微，蛋白尿显著少于阳离子化 BSA 注射组，血 Cr 和 BUN 在整个实验期间无显著升高 ($P > 0.05$)。

上述结果表明，带阳电荷的抗原更大的致肾炎性。

三、在本实验中，两组实验动物在免疫荧光下 IgG 和 BSA、C₃ 的沉积部位不同。天然 BSA 注射组 IgG、BSA 和 C₃ 沉积于系膜区，光镜出现轻度系膜增生。阳离子化 BSA 注射

组 IgG、BSA 和 C₃ 沉积于肾小球毛细血管壁, 光镜下出现明显的 GBM 增厚和上皮细胞肥大, 虽然 GBM 增厚是符合膜性肾病改变的, 但因同时出现了白细胞浸润和系膜增生现象, 这在膜性肾病是比较少见的, 其原因有待进一步观察。这可能表示不同电荷的 BSA 所引起的组织学反应是有差别的。

在不同电荷抗原引起的 IC 沉积部位和肾小球组织学反应上, 各家报道结果是不尽相同的。我们的结果和章友康等报道的也不完全一样。在阳离子化 BSA 注射组, 我们见到 GBM 明显增厚, 他们未发现 GBM 增厚。我们未见到肾小球内有血栓形成, 他们在 30~40% 的肾小球中见到血栓形成。为什么各家报道的结果不尽相同? 这可能和实验动物的种系, 抗原所带电荷强弱, 抗原的种类(如 BSA 的纯度), 剂量和活检时间等因素有关, 有待进一步研究。

对 IC 可以在原位形成以及抗原的电荷和它的致肾炎性有关的认识, 将有助于进一步阐明人类肾炎的发病机理, 也有助于找寻治疗人类肾炎的有效途径。本实验证实了上述结论。阳离子化 BSA 肾炎模型提供了一种时间较短, 重复性较好, 成功率较高, 较便于做药物疗效研究的动物模型。

参 考 文 献

[1] Dixon F J, et al. Experimental glomerulo-

nephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J Exp Med* 1961; 113: 899.

[2] Hamburger J. Proceedings of the 8th international congress of nephrology, 1st edition, p56, university studio, Thessaloniki 1981.

[3] Wilson C B. Immune mechanisms in renal disease, 1st edition, p233, Flenum, New York 1983.

[4] Wilson C B and Dixon F J. The kidney, 2nd edition, p1237, Saunders Philadelphia 1981.

[5] Farquhar M G. Proceedings of the 8th international congress of nephrology, 1st edition, p116, university studio, Thessaloniki, 1981.

[6] Border W A. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. *J Clin Invest* 1982; 69(2):451.

[7] 章友康, 等. 用阳离子化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.

[8] Hoare D G, et al. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J Biol Chem* 1967; 242(10):2447.

Experimental Research of Glomerulonephritis in Rabbits by Administration of Cationic BSA

Wang Yiming Huang Wencong He Bailin Li Shimei

(Department of Internal Medicine, First Affiliated Hospital)

Abstract

Immune complex (IC) being formed in glomeruli in situ and relations between antigen (Ag) charge and its nephritogenicity are two noticeable problems in the recent study of pathogenesis of glomerulonephritis. To study these two problems, we immunized two groups of rabbits, one with cationic bovine serum albumin (BSA PI 8.7), the other with native BSA (PI 4.5). The amount of proteinuria, the level of blood Cr and BUN were measured in different stages of experiment. Renal biopsies were performed for light microscope and immunofluorescence examinations. Our studies shows that cationic BSA could fix onto glomerular capillary wall 10 minutes after injection, and could induce IC formation in situ as well as causing glomerulonephritis; Ag charge would have a relation with its nephritogenicity, and cationic Ag would have more nephritogenicity than anionic one.