

实验性肾炎的研究

I. 兔抗肾抗体肾炎模型的制备

第一附属医院儿科教研室 陆 毓 李世淑 彭宜君

抗肾抗体肾炎模型的制备, Lindamann 早于 1900 年首次实验成功。1934 年 Masugi 系统地报告了以兔抗肾血清在大鼠中造成实验性肾炎, 继之, 学者们相继用同样的方法对家兔^(1~5)、大鼠⁽⁴⁾等动物进行了实验和观察。Stener⁽⁶⁾ 则用直接注射荧光标记肾毒血清法, 证实了抗肾抗体在肾小球中的准确定位。在免疫、生化、组织学方面积累了不少资料。而国内尚缺少系统的报道。

为了开展中西医结合治疗肾小球肾炎的研究, 我组参考 Vassalli 方法, 进行了探索性实验和改进, 复制了兔抗肾抗体肾炎模型 45 例。本组复制模型的特点: (1) 较前人实验更接近于人体慢性肾小球肾炎; (2) 在发病及演变的过程中, 从免疫、生化、组织学及荧光抗体检查等方面进行了较仔细的观察和比较; (3) 对有关问题进行了探讨。

材料与方 法

一、实验措施:

(一) 羊抗兔肾免疫血清的制备: 正常兔肾反复灌洗后用 1% 胰酶消化, 制成匀浆。与完全佐剂混匀, 剂量按 5~10 毫克/公斤/次免疫山羊, 试血效价为 1:32 以上 (琼脂扩散法) 时取血, 分离血清; 低温冰箱存放。用前以等量正常兔红细胞吸附过夜, 取上清液灭活。

(二) 兔抗羊荧光抗体的制备: 正常羊全血清 0.2 毫升/公斤/次与完全佐剂混匀后免疫正常兔, 按上法测效价并分离血清。二步法提纯 IgG, 采用异硫氰酸荧光黄 (FITC), 按 Marshall

法标记 (F:A = 1:100), 经葡聚糖 50 纯化后低温冰箱保存备用。

同样方法, 以正常兔血清免疫正常羊, 制备羊抗兔荧光抗体。

(三) 实验性肾炎的制备: 白色健康家兔 45 例, 重 2 公斤左右, 精饲料喂养 (本校动物室配制), 尿常规阴性。

试验前, 用兔预试羊抗兔肾血清效价, 我组采用剂量为 1.5~2.5 毫升/公斤一次静脉注入。其中 30 例于尿蛋白消失前 (注射后 3~4 周) 行抗肾血清反复注射, 剂量为原注射量之半。

对照组: 同样规格和条件之家兔 5 例注入同量正常羊血清。进行同样观察作为对照。

二、观察方法:

尿蛋白: 注射抗肾血清前及注射后第一周每日一次, 以后隔日一次。尿蛋白 (煮沸法) 标准评定为: 极微量、微量、+、++、+++、++++。

生化: 非蛋白氮或尿素氮、肌酐、胆固醇。

免疫: 免疫球蛋白定量 (微量法)、E 玫瑰花结形成试验、四小时氟标淋转试验、白细胞移动抑制试验、血清补体总测定等, 均于注射抗肾血清前、尿蛋白高峰时及尿蛋白微量或消失时检查。

组织学及免疫荧光抗体检查: 于注射后 2 天、5~8 天、10 天、30 天、60 天、90 天行肾脏活检 (或杀检), 取同侧肾组织两块, 一块以中性甲醛溶液固定, 作苏木精伊红 (H.E) 染色、纤维蛋白染色及基底膜染色; 另一块作冰冻切片, 迅速吹干后用荧光标记的兔抗羊 IgG 或羊抗兔 IgG 染色, 取正常片对照, 国产荧光显微

镜观察。

结 果

一、尿及生化改变：见表1、表2。注射抗肾血清后3~5天均出现尿蛋白微量~“+”不等，第二周尿蛋白显著增加，同时肌酐、脲

氮日趋上升 ($P < 0.05$)。血清胆固醇升高者占70%。尿蛋白高峰持续一周后逐渐回降，大多于三周后降至微量，一个月左右消失。与此同时，血脲氮、肌酐继续下降，至一月左右大多数基本恢复正常。

表1 注射抗肾血清后蛋白尿的变化

兔 号	1	2	5	6	7	9	17	18	19	20	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
尿 蛋 白	出现时间	4	5	5	4	4	5	5	5	5	3	2	4	3	4	3	3	3	3	4
	初现时	极微	极微	极微	微	微	微	微	微	微	+	+	微	微	微	微	微	微	+	+
	7~14天	+	++	+	++	++	+	++	+++	++	+	++	+	++	+++	+	++	+++	+++	+++
	20天	+	+	微	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	+	微	+	++	++	++
30天	微	微	微	微	+	+	微	极微	微	微	微	微	+	+	+	微	微	微	+	

表2 注射抗肾血清后血生化的变化

	非蛋白氮 毫克%			肌 酐 毫克%			胆 固 醇 毫克%		
	注射前	7~14天	30天	注射前	7~14天	30天	注射前	7~14天	30天
均 值	26.19	38.13	23.4	1.75	2.55	1.72	104.82	128.35	122.12
S _x		5.34	8.21		0.63	0.33		20.46	22.41
P		<0.01	>0.05		<0.05	>0.05		>0.05	>0.05

行抗肾抗体追加注射者，首次追加注射后均立即出现竖毛、呼吸困难等血清病样反应，持续2~3分钟，最长达半小时。最初2~3天尿量减少并再次出现尿蛋白高峰达+++~++++。其中2例尿中出现较多红、白血球及管型。脲氮、肌酐显著上升 ($P < 0.01$)。高峰持续3~5天后逐渐回降，第二次再行追加时，反应较轻，虽有尿蛋白增加，脲氮、肌酐回升，但均无统

计学意义。

对照组注射正常羊血清者变化不大。

二、免疫球蛋白、细胞免疫与总补体的变化见表3。IgG、IgM均有上升趋势，两周时IgG升高显著，一个月后IgM上升显著，IgA变化不大。以上检查结果提示本组实验动物细胞免疫增强。

表3 注射抗肾血清后体液及细胞免疫的变化

	IgG 毫克/毫升			IgA 毫克/毫升			IgM 毫克/毫升			E 玫瑰花结%			³ H-淋转试验 单位/毫升		
	注射前	7-14天	30天	注射前	7-14天	30天	注射前	7-14天	30天	注射前	7-14天	30天	注射前	7-14天	30天
均值	0.12	1.09	0.54	0.15	0.18	0.16	0.21	0.48	0.94	10.2	22.7	27.5	2513	3110	2750
S _x		0.25	0.18		0.52	0.04		0.25	0.13		2.29	2.9		51.67	31.02
P		<0.05	<0.05		>0.2	>0.2		<0.05	<0.01		<0.01	<0.01		<0.01	>0.05

* 白细胞移动抑制试验5例，移动指数均<0.5

三、肾脏病理变化:

外观: 注射抗肾抗体后第3~5天, 肾脏外观及大小无明显改变。第10天, 肾体积增大(长平均4.19厘米, 最长达4.7厘米, 正常对照值为3~3.8厘米), 表面光滑, 包膜紧张, 略显苍白, 部份可见淤点及小出血点。一个月时, 肾体积回复, 但表面稍显粗糙, 包膜仍易撕离。二个月后, 体积稍缩小(2.8~3.5厘米), 表面可见散在针尖状白点或呈微粒状, 包膜仍易撕离。

镜检: 注射抗肾抗体后2~5天, 检查10例其中2例正常, 8例仅有极轻微变化。10天

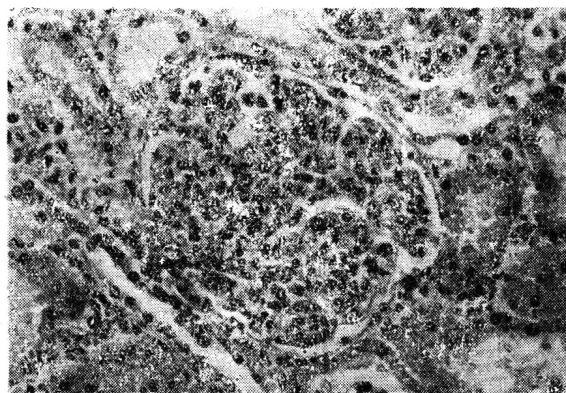


图1 注射抗肾抗体后10天 肾小球弥漫性肿胀内皮细胞增殖, 蛋白渗出及中性粒细胞浸润

时, 肾小球呈弥漫性肿胀, 内皮细胞增殖及渗出性改变, 大量中性粒细胞浸润。部份肾曲管上皮肿胀、变性、管腔内大量蛋白质堆积, 在收集管中形成管型(图1)。30天时, 多数表现为肾小球肿胀、间质细胞增生活跃, 间质基质积聚, 小叶结构清晰。少数为纤维素条索样物质增殖, 使毛细血管与球囊相互粘连。基底膜不规则增厚。仅一例为上皮细胞增生活跃伴大量新月体形成(图2)。此期肾曲管上皮均呈变性、脱落, 管腔内有较多蛋白管

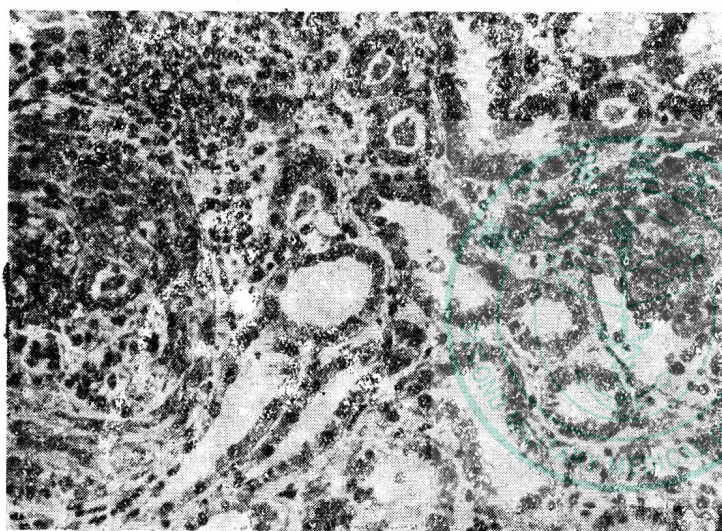


图2 注射抗肾血清30天 上皮细胞增生活跃伴大量新月体形成

型。60天时, 多数肾小球病变渐趋消退。而行抗肾抗体反复追加者, 基底膜增厚明显, 肾小球横切面呈“接种环”样改变(图3)。

四、免疫荧光抗体检查:

注射抗肾血清后2天、5天、10天的肾组织标本, 用荧光标记的兔抗羊IgG染色, 均见明亮、光滑而连续的线条状沉积物沿基底膜分布。第5天的标本亦呈现了线条状的沉积且伴有荧光抗体的聚集现象(图4), 一个月时, 明亮度稍低, 线条断续(图5)。对照片阴性。

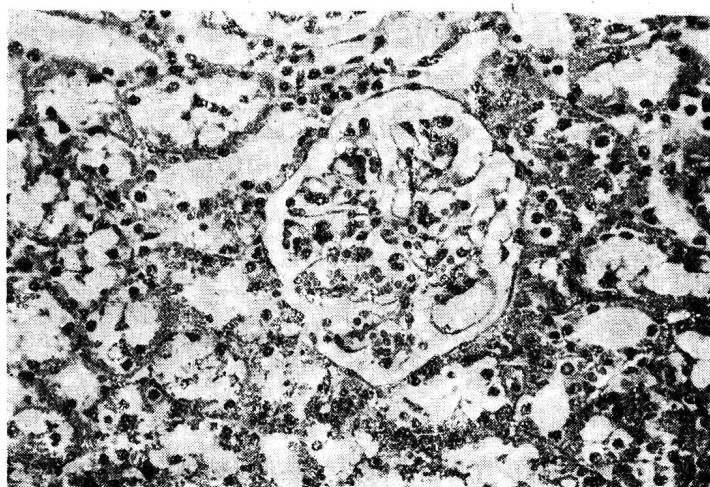


图3 小剂量抗肾血清反复注射者 肾小球基底膜肿胀明显肾小球膜切面呈“接种环”样改变

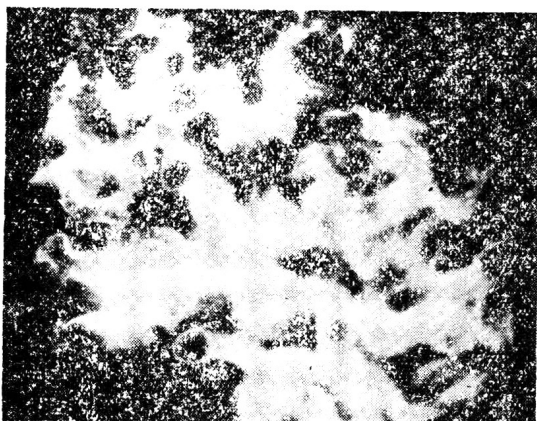


图4 注射抗肾血清后5天 荧光标记的兔抗羊染色IgG呈线条状分布伴有荧光抗体聚集现象

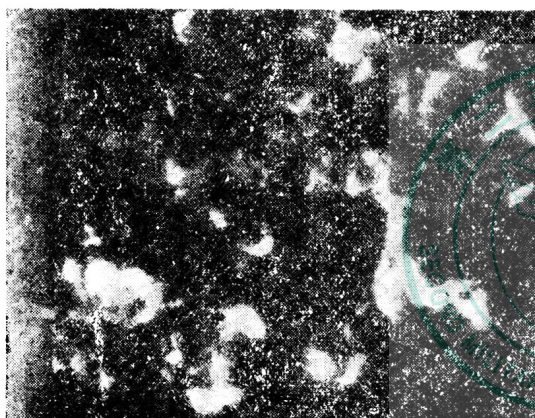


图5 注射抗肾血清后30天 荧光标记的羊抗兔IgG染色呈断续的线条状沉积

讨 论

采用抗肾抗体血清制成肾炎模型时，抗体剂量、血清效价等条件对肾炎的发生、症状及病理类型的影响等曾有过不同的报道⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁷⁾。我组实验所采用的方法和剂量，能使动物全数发病，潜伏期为3~5天，最早出现而且持续较久的症状为蛋白尿，且尿素、肌酐的改变与蛋白尿的程度一致。病理改变早期为内皮细胞增生及渗出性病变，以后则为间质细胞增殖，间质基质大量积聚，毛细血管基底膜不规则增厚及肾小管变性等，而小叶结构清晰，类似人类慢性分叶性肾小球肾炎。本组动物的组织学改变与 Vassalli 的结果不尽相同，后者主要是在

渗出性病变的基础上，球囊上皮细胞增生活跃伴大量新月体形成。Sell⁽⁹⁾最近指出，肾小球肾炎虽有三种免疫机制，但他们所引起的病变及临床表现则可能是相同的。急性期病变可能为坏死性、浸润性、渗出性或出血性；亚急性(或急性)病变可能为增生性或栓塞性，增生性病变可累及内皮细胞甚至阻塞毛细血管，还可累及上皮细胞形成新月体，或累及间质细胞使肾小球局部增生。慢性肾小球肾炎可表现为膜性即基底膜增厚，或表现为硬化性，即肾小球瘢痕形成。总之，病理变化的类型与免疫病理关系是相对的，而主要取决于肾小球受损的程度。

免疫学变化及荧光抗体检查验证了抗肾抗体肾炎发病的基本免疫机理为沉积物沿肾小球基底膜呈线条状沉积，这种沉积物包括抗肾抗体、宿主免疫球蛋白G及补体(β/C)。本组结果在10天左右线条状沉积最为清晰。5天内可能因抗肾抗体大量积聚，而出现一些荧光的堆积现象。一个月左右，线条出现断续、染色变浅，可能与基底膜断裂或沉积物部分被吸收有关；此外，由于异种抗体具有两重性⁽⁹⁾，它既是抗体，又具备抗原的条件，可刺激机体产生抗体(抗抗体)，又可能形成抗原稍多于抗体的条件，有利于免疫复合物形成，甚至影响了基底膜沉积物呈线条状的特点，其确切的机理或实验条件的影响尚须反复实验累积更多的资料。

抗肾抗体血清一次注入所引起的肾炎，病变均较轻，吸收好转较快，约一月后尿蛋白转阴，血液生化改变基本恢复正常。但两个月后肾脏仍呈慢性肾小球肾炎的变化，免疫荧光检查仍可见在肾小球基底膜有呈线条状沉积物，但可通过残存的肾单元取得足够的代偿，而趋向“全愈”。此时肾脏组织学尚未恢复。

小剂量抗肾血清反复注射对肾炎发病的影响已有不少学者进行了观察。有人认为，反复注射虽起作用，但不显著^(3,4)，其原因可能为第一次较大量抗肾血清的注入，使肾小球毛细血管基底膜抗原已大部份吸收饱和，因此再次注射时，作用不显⁽⁴⁾。我组实验中，所有家兔经抗

肾血清反复注射后,尿蛋白、肌酐、尿素氮均有相应增高(第一次追加上述指标均为 $P < 0.05$,以后再行追加则 $P > 0.05$),且伴有较重血清病样反应,同时病程显著延长。例如单次注射后蛋白尿维持 3~4 周,追加注射后明显延长,最短者 7 个月(存活兔)。病理改变与同期单次注射者相比,均显严重,并趋向慢性,无一例恢复正常。从肾炎的发病机理来看,小剂量异种抗肾血清反复注入动物体内,激发机体的再次应答(Secondary response)⁽⁹⁾ 迅猛地产生抗体,一方面与肾小球基底膜上的抗肾抗体反应,加速肾脏形态学的改变;另一方面,若抗原抗体比例适合(抗原稍多于抗体),势必也可形成可溶性免疫复合物,当循环经由肾脏时,不断向基底膜累加,导致基底膜的增厚及滤过能力的降低。可见反复注射抗肾抗体,可加重肾小球的病理改变,其损害不一定是引起形态学上明显的“复发性”改变,而至少是使病变趋于严重,并向慢性发展,更接近于人类慢性肾小球肾炎。应该指出,反复注射抗肾血清,如若剂量过大,次数过多,则有可能引起机体的免疫麻痹。

小 结

一、用抗肾血清复制兔抗肾抗体肾炎。对其发病及演变经过,从尿蛋白、血生化、免疫、组织学等方面进行了观察。

二、本组实验性肾炎,潜伏期为 3~5 天,蛋白尿为首发、且持续较久的症状,形态学改变类似于人类慢性肾小球肾炎。

三、小剂量抗肾血清反复注射,可使病变趋向慢性,更接近于人类慢性肾小球肾炎,对今后研究肾炎的治疗问题,具有一定价值。

参 考 文 献

1. Vassalli P, et al: The pathogenic role of the coagulation process in rabbit Masugi Nephritis. *Am J Pathol* 45: 653, 1964.
2. 北京医学院附属医院内科: 活血化瘀药物对慢性肾炎的临床及动物实验性肾炎的疗效的探讨。中华内科杂志 17: 87, 1978。
3. Fisher E, et al: Histochemical observations concerning some renal enzymes in nephrotoxic nephritis in the rat. *Arch Pathol* 64: 664, 1957.
4. 上海中医学院: 实验性肾小球肾炎。科研资料汇编, 第 9 页, 1966。
5. Warren KB, et al: Nephrotoxic nephritis in rabbits, The role of sympathetic nervous system. *Am J Pathol* 90: 689, 1978.
6. Nairn RC: Fluorescent protein tracing. 3rd ed. P 105. Livingstone, 1969.
7. 王伯云等: 甲状腺疾病中某些自身抗体的初步研究。中华内科杂志 18: 24, 1979。
8. Sell S: Glomerulonephritis. *Am J Pathol* 90: 234, 1978.
9. 叶天星: 免疫学理论与实际。第二军医大学, (内部资料) P 104, 1979。