

[文章编号] 1000 - 4718(2004)01 - 0054 - 06

抗胸腺细胞血清性肾炎模型大鼠肾小球中 C5b - 9 的沉积及 NO、TNF 含量分析*

王迎伟¹, 徐静华¹, 汤仁仙², 高丰光²

(¹南京医科大学免疫学教研室,江苏 南京 210029; ²徐州医学院免疫学教研室,江苏 徐州 221002)

[摘要] 目的:探讨抗胸腺细胞血清性肾炎(ATSN)大鼠肾小球内 C5b - 9 复合物的沉积与某些炎症介质和细胞因子如:一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子(TNF)的含量情况。方法:大鼠一次性静脉注射抗胸腺细胞抗血清(ATS)建立 ATSN 模型,定期对 ATSN 大鼠肾小球中的补体 C5b - 9 复合物进行免疫组化染色定位、显微图像扫描半定量分析;并对有 C5b - 9 包绕的肾小球系膜细胞(MC)进行计数。测定 ATSN 大鼠肾中诱生型 NO 合酶(iNOS) mRNA 的表达、尿液中 NO 的代谢产物(NO₂ / NO₃)及 TNF 的排泄量。结果:ATSN 模型大鼠肾小球 MC 先溶解坏死后继发增生,病变早期(溶解时相)补体 C5b - 9 复合物主要定位于肾小球系膜区及 MC 表面;随着病程的进展,被 C5b - 9 包绕的 MC 逐渐减少,病程初期 ATSN 大鼠肾小球 MC 有明显的 iNOS mRNA 表达,尿液中 NO₂ / NO₃ 和 TNF 的排泄量也明显增加。在 ATSN 病变的增生阶段(一般 7 d 后),上述指标的变化逐渐趋缓。结论:ATSN 模型大鼠肾小球中 MC 逐渐溶解与补体 C5b - 9 沉积及 NO 和 TNF 的合成与释放有一定关系。

[关键词] 肾炎;补体膜攻击复合物;一氧化氮;肿瘤坏死因子;大鼠

[中图分类号] R392.11; R692.3 [文献标识码] A

大鼠抗胸腺细胞血清性肾炎(anti - thymocyte serum nephritis, ATSN)是人类系膜增生性肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MPGN)动物模型之一,其肾组织的病变特征是肾小球系膜细胞(mesangial cells, MC)先溶解坏死后继发增生,晚期伴系膜区基质明显增多,最终可致肾小球硬化^[8]。过去认为,肾小球 MC 选择性的破坏乃是全溶量(lytic)补体 C5b - 9 复合物直接攻膜使靶细胞穿孔溶解所致。但近年来的研究提示,亚溶量(sublytic) C5b - 9 虽不直接引起细胞破坏,但可刺激释放某些炎症介质或细胞因子而致细胞损伤^[1-3]。文献报道,ATSN 大鼠肾小球 MC 的溶解损伤常伴一氧化氮(nitric oxide, NO)升高^[4,5]。一些细胞因子,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)也能促进 MC 损伤与增生^[6]。我们过去的研究表明,亚溶量 C5b - 9 体外能诱导培养的肾小球 MC 产生 NO 和 TNF, TNF 对 MC NO 的合成有促进效应^[7],体内应用抗 C5b - 9 抗血清和 NO 合成抑制剂处理也能减轻大鼠 ATSN 的肾脏病变^[8]。但有关 ATSN 大鼠肾小球内 C5b - 9 的沉积定位及某些炎症因子的合成情况并未完全阐明。本研究建立大鼠 ATSN 模型,在动态观察 ATSN 病变的同时,对肾小球内 C5b - 9 的沉积、NO 和

TNF 的合成情况进行了检查与分析。

材 料 和 方 法

1 主要试剂与材料

FITC - 羊抗兔 IgG、FITC - 羊抗大鼠 C3 和 ABC 免疫组化染色试剂盒购自上海华美生物工程公司。小鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单抗、小鼠抗 - 平滑肌肌动蛋白(- smooth muscle actin, - SMA)及小鼠抗 C5b - 9 单抗均购自 Dako 公司。限制性核酸内切酶(Bam HI)、蛋白酶 K、RNA 酶、地高辛(digoxinin, DIG) RNA (SP₆/T₇) 标记试剂盒和核苷酸检测试剂盒均来源于 B.M. 公司。OCT 包埋剂、去离子甲酰胺购自 Amresco 公司。Rat - ELISA TNF 试剂盒为 Endogen 公司产品。NO₂ / NO₃ 测定试剂盒来源于南京建成生物工程研究所。携带大鼠 iNOS cDNA 的重组质粒由瑞士 Novartis 公司薛春博士惠赠。SD 大鼠和新西兰家兔购自上海 BK 公司。

2 实验步骤与方法

2.1 兔抗鼠胸腺细胞抗血清(anti - thymocyte serum, ATS)的制备 方法参见文献^[9](本实验 ATS 效价 1:320)。

2.2 大鼠 ATSN 模型的复制

(1)动物分组 取雄性 SD 大鼠 24 只(180 - 220 g),随机分为 2 组。实验组即 ATSN 组(n = 18):给大

[收稿日期] 2002 - 09 - 18 [修回日期] 2002 - 12 - 24

*[基金项目] 江苏省“333 工程”专项基金资助项目(No. 20078);江苏省自然科学基金资助课题(No. BK97154)



鼠尾静脉一次性注射 ATS, 剂量为 0.5 mL/100 g BW。

对照组 ($n=6$): 给大鼠尾静脉一次性注射正常兔血清, 剂量同 ATS (注: 实验组注射 ATS 后随机再分成 3 个亚组, 每组 6 只, 便于在不同阶段采集样品, 故实验各期样品数均为 6)。

(2) 样品的采集与处理 采集下列样品 尿液: 收集各鼠 24 h 尿液并测其尿量, 收集时间为注射 ATS 后 24 h、48 h、96 h、7 d 和 14 d。 肾皮质: 首次取肾行左肾切除术, 再取右肾则处死动物。肾皮质样品作如下切块处理。一部分置于 4% 多聚甲醛中固定留作石蜡切片; 一部分用 OCT 包埋留作冰冻切片; 一部分固定于戊二醛中留作电镜切片。肾皮质取样时间为注射 ATS 后 2h、24 h、48 h、96 h、7 d 和 14 d (注: 对照组样品的采集时间仅为注射兔血清后 24 h)。

2.3 尿蛋白测定 采用双缩脲法测其尿蛋白含量, 结合各鼠 24 h 尿流量计算出 24 h 尿蛋白总量, 结果以 mg/24 h 表示。

2.4 病理组织学检查

(1) 光镜 石蜡切片 HE 染色, 除观察肾组织结构外, 还测定肾小球细胞总数, 即计算每张切片 20 个最大直径的肾小球内细胞数, 取均值表示结果。

(2) 免疫荧光 取冰冻切片分别用 1:100 FITC-羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 C3 染色 30 min, PBS 洗片后置荧光镜下观察兔 IgG 和鼠 C3 在肾小球中的沉积与分布。荧光强度参照 Yamamoto 等^[10] 分级标准以 - - 3 + 表示。

(3) 电镜 超薄切片观察肾小球超微结构的改变。

2.5 免疫组化染色

(1) PCNA 的表达 采用 ABC 法即: 冰冻切片分别采用 1:40 小鼠抗 PCNA 单抗染色, 37℃ 30 min, PBS 洗 3 次; 滴加 1:500 ABC 单抗, 37℃ 30 min, PBS 洗 3 次; 再用 ABC 试剂孵育 30 min, DAB 显色 5 min, 常规洗涤, 甘油盐水封片后镜检观察。PCNA 表达量采用阳性细胞核数表示, 即计数每张切片中 20 个最大直径的肾小球内 PCNA 阳性细胞核, 取均值比较结果。

(2) α -SMA 的表达 采用 1:25 小鼠抗 α -SMA 单抗为一抗, 其余 ABC 法染色步骤同 PCNA 检查。 α -SMA 表达的半定量用德国 MD 20 型 Leitz 显微图像分析仪扫描测定, 在每张切片上取 20 个最大直径的肾小球测定其平均积分吸光度 (A) 值后再行计算 (注: 对照组则取 20 个肾小球 DAB 显色背景的平均 A 值)。

2.6 C5b-9 的沉积

(1) 定位: 肾冰冻切片采用小鼠抗 C5b-9 单抗 (1:25) 为一抗, 行 ABC 法染色, 步骤同 PCNA 检查。

(2) 半定量: 采用显微图像分析仪扫描其平均 A 值。方法同 α -SMA 检查。

(3) 阳性细胞计数: 取注射 ATS 后 2h、24 h 及 48 h 染色的冰冻切片, 对有 C5b-9 沉积的细胞进行计数, 方法同前 PCNA 阳性细胞核检查。

2.7 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平的测定 各期大鼠尿液样品按试剂盒说明采用硝酸还原酶法测定, 结果以 nmol/24 h 尿液表示。

2.8 TNF 水平的测定 取注射 ATS 后 24 h 和 96 h 收集的大鼠尿液, 采用 ELISA TNF 试剂盒测定其 TNF 的含量。结合大鼠 24 h 尿量, 算出 TNF 排泄量, 结果以 ng/24 h 尿液表示。

2.9 诱生型 NO 合酶 (inducible NO synthase, iNOS) mRNA 的表达

(1) iNOS cRNA 探针的制备 方法详见参考文献^[11]。

(2) 原位杂交实验 肾脏灌注固定: 取 SD 大鼠 6 只 (体重 200 - 220 g)。其中 5 只行尾静脉一次性注射 ATS, 剂量为 0.5 mL/100 g BW, 另 1 只大鼠则注射与 ATS 相同剂量的正常兔血清。注射血清后 3 h 取大鼠行左心室插管先用 0.1 mol L^{-1} PBS (pH7.4) 灌注除血, 双肾转白后用 4% 多聚甲醛灌注固定 20 min。切片处理: 固定的肾皮质作石蜡切片, 经常规烤片、脱蜡及逐级乙醇脱水后, 分别用 0.2 mol L^{-1} HCl 和 0.2% Triton X-100 各处理 10 min, 蛋白酶 K (1 g L^{-1}) 37℃ 消化 10 min, 用含 0.2% 甘氨酸的 PBS 孵育 10 min, 再用含 5 mmol MgCl_2 的 PBS 洗 2 次。切片用 4% 多聚甲醛后固定 15 min, 再经梯度乙醇脱水, 晾干后置 4℃ 保存备用。原位杂交: 切片先浸入 2 \times SSC 中片刻, 再用 50% 去离子甲酰胺孵育 15 min, 加杂交液 42℃ 预杂交 3 h 后每片加含 DIG-antisense RNA (cRNA) 探针的杂交液 42℃ 杂交 16 h。取片依次经 2 \times SSC、0.1 \times SSC、buffer 1 洗涤各 15 min, buffer 2 作用 30 min。加 1:2500 的抗 DIG 抗体 37℃ 孵育 1 h。切片依次经 buffer 1 洗涤, buffer 3 平衡后加 NBT/BCIP 底物溶液显色 2 h, 用 buffer 4 中止反应。原位杂交的对照实验: (A) 切片用 DIG-sense RNA 探针杂交; (B) 切片杂交前用 RNA 酶处理; (C) 杂交液中不加探针 (注: 3 种对照结果均呈阴性)。

3 统计学处理

各组数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据比较采用单因素方差分析 q 检验, 方差不齐者采用非参数秩和检验, 统计学分析用计算机 PEMS 软件处理。

结 果

1 ATSN 模型的复制

1.1 尿蛋白变化 注射 ATS 后 24 h,大鼠尿蛋白总量已明显上升[(29.84 ±8.95) mg],以后各阶段持续升高,48 h 为 (45.25 ±12.57) mg,96 h 为 (67.32 ±15.97) mg,7 d 时达到高峰(69.89 ±15.80) mg,14 d 时已见回落(39.54 ±8.17) mg,各阶段与对照组 [(15.80 ±6.58) mg]比较,差异显著 (P < 0.05 或 P < 0.01)。

1.2 肾脏病变特征

兔 IgG 及鼠 C3 沉积 注射 ATS 后 2 h,24 h,大鼠肾小球有明显的兔 IgG 沉积,沿系膜区分布,荧光强度可达 3+,48 h 时兔 IgG 荧光减弱至 2+,96 h 为 1+ - 2+,7 d 为 - - 1+,14 d 时则为 -。此外,注射 ATS 后 2 h,24 h,鼠自身 C3 荧光抗体染色阳性,分布与兔 IgG 相同,强度为 1+ - 2+,48 h 为 1+,96 h 为

- - 1+,7 d 和 14 d 时则为 -,对照组兔 IgG、鼠 C3 检查结果均为阴性。

肾小球细胞总数的变化 结果归纳见附表。注射 ATS 后 2 h,大鼠肾小球明显充血,细胞数开始减少。24 h 和 48 h,肾小球体积增大,系膜区溶解明显,细胞数显著减少。96 h,系膜区细胞开始再生,7 d 时细胞增生明显,14 d 时,增生现象已趋向缓解。除 96 h 外,其余各阶段细胞总数的减少或增多与对照组相比,差异均较明显。大鼠肾小球细胞总数先减少后增多的现象符合 ATSN 的基本特征。

超微结构的改变 注射 ATS 后 2 h,系膜区电子密度下降,部分区域 MC 可见轻度破损。24 h 时,MC 大多溶解,48 h 时,系膜区消失(图 1A)。96 h,系膜区电子密度回升,部分区域 MC 再生,7 d 和 14 d 时,MC 明显增加,系膜区基质也显著增多(图 1B)。

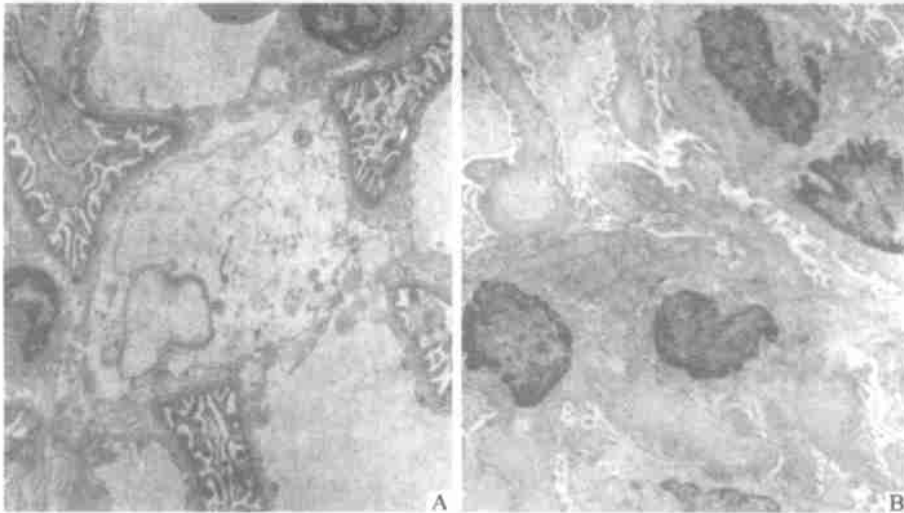


Fig 1 The result of electron microscope. A: Disappear of glomerular MC at 48 h after ATS injection (×6 000); B: Proliferation of glomerular MC and excessive mesangium matrix on day 7 after ATS injection(×4 000).

图 1 电镜检查结果

增殖抗原的表达 PCNA 属增殖细胞核抗原,对 PCNA 阳性细胞核计数显示,注射 ATS 后 2 h,肾小球内偶见 PCNA 阳性细胞核。24 h 和 48 h,PCNA 明显表达,96 h 最为显著,7 d 时开始减少。14 d 时,ATSN 组 PCNA 表达锐减,具体结果参见表 1。

- SMA 其表达是细胞增殖的又一标志。给大鼠注射 ATS 后 2 h,24 h 和 48 h,肾小球中未见 - SMA 表达。96 h 时,镜检可见少量 - SMA 阳性染色,呈条索状或分枝状,沿系膜区分布,7 d 时较为显著,14 d 时有所减少。显微图像扫描仪半定量结果与镜检观察基本一致(其平均 A 值详见表 1)。

2 肾小球中 C5b - 9 的沉积情况

注射 ATS 后 2 h,大鼠肾小球中可见补体 C5b - 9

的沉积,主要分布于肾小球系膜区及 MC 表面,被 C5b - 9 包裹的 MC 有的形态完好,提示有亚溶量 C5b - 9 的存在(图 2)。随着病程的进展,C5b - 9 染色强度逐渐减弱。显微图像分析仪扫描各期 C5b - 9 染色平均 A 值(数据见表 1)结果表明,注射 ATS 后 2 h 和 24 h,C5b - 9 A 值显著高于对照组。48 h 和 96 h 检查其 A 值逐渐下降,7 d 和 14 d 时,C5b - 9 的 A 值与对照组之间已无明显差异(注:对照组 C5b - 9 染色结果呈阴性,其 A 值为 DAB 显色背景灰度值)。此外,对有 C5b - 9 沉积的 MC 进行计数(单位:个/肾小球)结果发现,注射 ATS 后 24 h(10.68 ±2.99)和 48 h(9.38 ±2.33),MC 数显著少于 2 h(19.86 ±1.88),以 48 h 时最为明显。



Fig 2 The marked deposits of C5b - 9 complexes in glomerular mesangium and MC surface by immunohistochemical staining at 2 h after injecting ATS(×400) .

图 2 注射 ATS 后 2 h,免疫组化染色结果

3 尿液中 NO₂⁻ / NO₃⁻ 排泄量的变化

注射 ATS 24 h 和 48 h,大鼠尿中 NO₂⁻ / NO₃⁻ 排泄量分别为 1445.08 ±220.74 和 1535.61 ±274.33

(nmol/24 h),与对照组(213.64 ±100.65)相比,差异极为显著(P < 0.01)。96 h 时,NO₂⁻ / NO₃⁻ 排泄量虽大幅下降(500.38 ±89.86),但仍高于对照组(P < 0.05),而 7 d 和 14 d,NO₂⁻ / NO₃⁻ 排泄量分别为 288.26 ±92.24 和 239.40 ±81.50,与对照组之间,差异已不明显(P > 0.05)。

4 尿液中 TNF 排泄量的变化

注射 ATS 后 24 h 和 96 h,大鼠尿液中 TNF 排泄量显著升高,分别为(5.84 ±1.17) ng/24 h 和(7.92 ±2.47) ng/24 h,与对照组[(1.61 ±0.72) ng/24 h]之间差异均十分明显(P < 0.01)。

5 肾小球 iNOS mRNA 表达情况

iNOS mRNA 的表达可作为判断细胞受到刺激后合成 NO 的敏感指标。本实验给大鼠注射 ATS 后 3 h,肾皮质石蜡切片原位杂交结果显示,大鼠肾小球系膜区细胞可见明显的 iNOS mRNA 表达(图 3),而注射正常兔血清作为对照的大鼠,肾组织切片未见 iNOS mRNA 的表达。

表 1 ATSN 组和对照组大鼠几项检查结果的比较

Tab 1 Comparison of several detecting items in ATSN and control group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Detecting items			
	Cell numbers (counts/ glomerulum)	PCNA nuclear (counts/ glomerulum)	- SMA (A value)	C5b - 9 (A value)
ATSN				
2 h	54.26 ±4.23 *	0.33 ±0.28	0.2121 ±0.0140	0.3129 ±0.0089 **
24 h	43.17 ±3.50 **	5.23 ±2.58 **	0.2126 ±0.0115	0.2966 ±0.0106 **
48 h	39.03 ±3.61 **	7.36 ±2.90 **	0.2171 ±0.0091	0.2577 ±0.0186 **
96 h	61.62 ±3.14	15.11 ±4.04 **	0.2438 ±0.0131 **	0.2341 ±0.0101 **
7 d	86.53 ±6.28 **	7.58 ±2.61 **	0.3091 ±0.0097 **	0.1230 ±0.0118
14 d	70.85 ±5.99 **	0.43 ±0.30	0.2394 ±0.0152 **	0.2046 ±0.0072
Control	60.19 ±4.30	0.31 ±0.22	0.2172 ±0.0173	0.1983 ±0.0172

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group.

讨 论

大鼠肾小球 MC 表面表达丰富的 Thy1 抗原。该抗原属于胸腺细胞的分化抗原。大鼠外周血 T 细胞表面的 Thy1 抗原呈阴性,而小鼠则呈阳性^[10]。因此,利用大鼠胸腺细胞制备抗体给大鼠注射后,抗体能与肾 MC 表面的 Thy1 抗原结合形成免疫复合物(IC)并激活补体。本实验结果证实,注射 ATS 后 2 h,大鼠肾小球系膜区已有多量的兔 IgG 和鼠 C3 沉积,表明该部位有 IC 形成和补体系统的激活。与此同时,肾小球细胞数开始下降,MC 出现轻度溶溃现象,提示 MC 早期便遭破坏。这可能与全容量 C5b -

9 直接攻膜作用有关。随着病程进展至 24 h,MC 破坏明显加重,肾小球细胞数显著下降,48 h 最为明显。提示破坏作用具有持续性。目前有学者认为,这一现象可能与炎症介质释放引起的继发破坏有关^[2,12]。另本实验还观察到,病程 24 h 时,残存的 MC 已表达少量的增殖细胞核抗原(PCNA),表明部分细胞修复增生已经开始,96 h 时细胞增生全面启动。肾小球细胞数开始增加。病程 7 d 时,肾小球 MC 呈节段性增生,系膜基质合成也显著增多。此外,ATSN 的大鼠尿蛋白排泄量异常升高。综上所述表明,给大鼠一次性注射 ATS 能建立典型的系膜增生性肾炎实验模型,其临床病理表现与人类 MPGN

颇为相似。



Fig 3 The results of *in situ* hybridization (×400). The positive staining of glomerular MC iNOS mRNA at 3 h after ATN injection.

图3 原位杂交结果

在人类,有系膜增生的肾小球肾炎主要见于 IgA 肾病及膜性增生性肾炎等。免疫电镜证实,这类患者肾小球系膜区均可见到 C5b - 9 的沉积^[13]。但其确切的致病机制尚未澄清。Hinglais 发现^[14],IC 激活补体导致 C5b - 9 的形成若与 IC 分布同一部位,表明此种 C5b - 9 具有原始的致病作用。本实验发现,ATSN 大鼠早期 C5b - 9 的沉积正是位于肾小球系膜区且沿 MC 表面分布,与兔抗体 IgG 沉积的部位基本相同。已知 ATSN 病变具有补体依赖性^[3],故 C5b - 9 的出现可能与 ATSN 病变启动有关。

C5b - 9 对靶细胞的作用有全溶量和亚溶量之分。前者指 C5b - 9 能使靶细胞穿孔溶解,但此现象对有核细胞效率较低,而后者则是指 C5b - 9 可刺激靶细胞释放炎症因子,诱发细胞的多种反应^[3]。本实验给大鼠注射 ATN 后 2 h,其肾小球细胞数已有减少,这可能是全溶量的 C5b - 9 直接溶破的缘故,但对 C5b - 9 直接染色定位发现,此时仍有大部分被 C5b - 9 包绕的 MC 并未溶解。随着病程进展至 24 h,被 C5b - 9 包绕的 MC 数量明显下降,48 h 时更为显著(电镜检查结果相同)。鉴于全溶量 C5b - 9 溶破靶细胞的速度很快^[2],故 ATSN 大鼠 MC 的逐渐溶解可能是亚溶量 C5b - 9 的作用所致。

我们过去的研究揭示,用人膜结合型 C5b - 9 刺激培养的大鼠肾 MC 能诱生 NO 和 TNF^[7]。此次结果也证实,给大鼠注射 ATN 后 24 h 和 48 h,大鼠尿液

中 NO 代谢产物 - NO₂⁻ / NO₃⁻ 排泄量极度升高,肾 MC 3 h 时明显表达 iNOS mRNA。ATSN 大鼠尿液中的 TNF 排泄量也明显高于正常组。这些结果均提示,大鼠 ATSN 病变确与 NO 和 TNF 的升高存在联系。已知 ATSN 大鼠 MC 的损伤属于免疫介导的 NO 依赖的细胞毒作用所致^[4,15]。而 TNF 对 MC 既有细胞毒效应,又能促进其增生^[6]。由于 MC 合成与释放炎症介质有待刺激,而 C5b - 9 复合物正是 ATSN 病变初始 MC 最有效的刺激剂^[7]。因此,我们认为,ATSN 病变时,亚溶量 C5b - 9 的沉积与 MC 及炎症因子三者之间存在下列关系,C5b - 9 插入 MC 膜 诱导某些炎症介质或细胞因子合成与释放 加重 MC 病理损伤(溶解、凋亡和继发增生)。不过有关 C5b - 9 复合物还能诱导哪些炎症介质或细胞因子合成与释放及其介导 MC 病变的分子机制及信号转导通路仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Johnson RJ, Pritzl P, Iida H, et al. Platelet - complement interactions in mesangial proliferative nephritis in the rat [J]. Am J Pathol, 1991, 138(2) :313 - 321.

[2] Brandt J, Pippin J, Schulze M, et al. Role of the complement membrane attack complex (C5b - 9) in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis [J]. Kidney Int, 1996, 49(2) :335 - 343.

[3] Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerular nephritis [J]. Nephrol Dial Transplant, 1998, 13 (suppl 1) : 10 - 15.

[4] Narita I, Border WA, Kettelar M, et al. Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis [J]. Lab Invest, 1995, 72(1) :17 - 24.

[5] Cattell V. Nitric oxide and glomerulonephritis [J]. Kidney Int, 2002, 61(3) :816 - 821.

[6] Ivanov AA, Gladskikh OP, Bogomazova Slu, et al. Role of tumor necrosis factor alpha in the regulation of extracellular matrix and proliferation of mesangial cells in nephrotoxic nephritis [J]. Arkh Pathol, 1998, 60(1) : 27 - 30.

[7] 王迎伟,何球藻,秦慧莲,等. 补体 C5b - 9 复合物刺激大鼠肾小球系膜细胞 NO 合成的机制探讨 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(10) : 991 - 994.

[8] 王迎伟,何球藻,秦慧莲,等. 补体 C5b - 9 复合物抗血清对抗胸腺细胞血清性肾炎大鼠肾组织一氧化氮合成及病变的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(9) : 805 - 808.

[9] 陈广平,郭慕依,张月娥,等. 大鼠 Thy1 抗血清制备及系膜增生性肾炎模型的建立 [J]. 临床与实验病理学杂志, 1996, 12(3) :241 - 244.

[10] Yamamoto T, Wilson CB. Quantitative and qualitative studies

- of antibody induced mesangial cell damage in the rat[J]. *Kidney Int*, 1987, 32(4) :514 - 525.
- [11] 王迎伟, 高丰光, 何球藻, 等. 诱生性一氧化氮合酶(iNOS) cRNA 探针的制备及敏感性检测[J]. *徐州医学院学报*, 1999, 19(4) :265 - 267.
- [12] Shimizu A, Mascuda Y, Kitamura H, et al. Complement - mediated killing of mesangial cells in experimental glomerulonephritis: cell death by a combination of apoptosis and necrosis [J]. *Nephron*, 2000, 86(2) : 152 - 160.
- [13] Hinglais N, Kazatchkine MD, Bhakdi S, et al. Immunohistochemical study of the C5b - 9 complex of complement in human kidney [J]. *Kidney Int*, 1986, 30(3) : 399 - 410.
- [14] Brune B. Nitric oxide and apoptosis in mesangial cells[J]. *Kidney Int*, 2002, 61(3) :786 - 789.
- [15] Nauta AJ, Daha MR, Tijssma O, et al. The membrane attack complex of complement induced caspase activation and apoptosis[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(3) : 783 - 792.

Analysis of glomerular complement C5b - 9 deposits and synthesis of NO, TNF in the model of the rats with anti - thymocyte serum nephritis

WANG Ying - wei¹, XU Jing - hua¹, TANG Ren - xian², GAO Feng - guang²

(¹ *Department of Immunology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;*

² *Department of Immunology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)*

[**ABSTRACT**] **AIM** : To explore the localization and semi - quantification of the glomerular complement C5b - 9 complexes and synthesis of some inflammatory mediators or cytokines such as nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF) in the rats with anti - thymocyte serum nephritis(ATSN). **METHODS** : The animal model of rat ATSN was reproduced by a single intravenous injection of anti - thymocyte serum (ATS). Then, the deposits of glomerular C5b - 9 complexes were localized and quantified by immunohistochemical staining and microscopic image scanning separately. And the glomerular mesangial cells (MC) surrounded by C5b - 9 complexes were counted under microscope. In addition, the expression of glomerular MC inducible NO synthase (iNOS) mRNA and excretion of urinary NO metabolite ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) and TNF in the rats with ATSN were detected. **RESULTS** : The MC in the rats with ATSN emerged necrosis followed by a rapid proliferation. In the early time of MC injury, the C5b - 9 complexes were mainly seen in glomerular mesangium and MC surface. But with the progression of ATSN, the MC enclosed by C5b - 9 appeared gradual decrease. Moreover, the expression of MC iNOS mRNA in early stage of ATSN obviously increased and the excretion of urinary $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ and TNF also significantly increased. However, the changes of parameters mentioned above in ATSN proliferative stage (after 7 days) alleviated gradually. **CONCLUSION** : The secondary lysis of MC has relation to the deposition of C5b - 9 complexes and synthesis and release of NO and TNF in rats with ATSN.

[**KEY WORDS**] Nephritis; Complement membrane attack complex; Nitric oxide; Tumor necrosis factor; Rats