

[文章编号] 1000-4718(2003)12-1631-04

普乐可复防治大鼠抗肾小球基底膜肾炎的实验研究*

汤仁仙¹, 王迎伟², 黄瑞³, 高丰光¹, 刘晓梅¹

(¹徐州医学院微生物学与免疫学教研室,江苏徐州 221002; ²南京医科大学微生物学与免疫学教研室,江苏南京 210007; ³苏州大学基础医学院微生物学教研室,江苏苏州 215007)

[摘要] 目的:观察普乐可复(FK506)防治大鼠抗肾小球基底膜(CBM)肾炎的疗效。方法:复制大鼠抗CBM肾炎模型。实验分3组:肾炎+FK506组、肾炎对照组及正常对照组。大鼠一次性尾静脉注射抗CBM抗血清后6h内皮下注射FK506注射液(0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹),至第21d。对照组则给予等量的生理盐水。定期于第4d、第14d和第21d,检测大鼠尿蛋白、血清肌酐和尿素氮水平,观察肾组织病理学改变,以及检测T淋巴细胞转化功能。结果:肾炎对照组大鼠注射抗血清后于第4d即出现异常蛋白尿,血清肌酐和尿素氮亦持续上升;肾小球内可见细胞数增加和新月体形成,肾小管内大量蛋白管型,CBM呈不规则增厚,足突大片融合;T淋巴细胞转化功能异常。而肾炎+FK506组大鼠上述病变均明显较轻。结论:FK506能够明显改善大鼠抗CBM肾炎的肾功能。

[关键词] 普乐可复;抗肾小球基底膜肾炎;大鼠

[中图分类号] R692.3

[文献标识码] A

人类新月体性肾炎发病机制与机体免疫异常密切相关,临床上治疗该疾病时,一方面积极对症处理,另一方面使用一些免疫抑制剂,如环孢素A(cyclosporine, Cs-A)控制疾病的发展。免疫抑制剂能够使新月体趋于消散,从而缓解病情^[1]。但经长期大量临床资料证实,Cs-A等免疫抑制剂用于治疗肾小球肾炎等疾病时,疗效虽满意,但毒副作用(如肾毒性)亦较大^[2],因而其治疗应用亦受一定限制。

FK506是从土壤链霉菌中提取的代谢产物,属大环内酯类免疫抑制剂。Prisch等^[3]研究发现,其免疫抑制作用与Cs-A相似,均能抑制细胞增生、细胞因子的产生,而FK506的抑制效果是Cs-A的10-100倍,且毒副作用甚少。因此,在许多免疫性疾病(如移植排斥反应等)治疗方面,用FK506替代Cs-A,疗效甚好。

大鼠抗肾小球基底膜(anti-glomerular basement membrane, GBM)肾炎,是利用异种抗GBM抗体直接诱导后产生的具有典型的人类新月体性肾炎病理变化的动物模型。本实验在复制大鼠抗GBM肾炎模型的基础上,探讨FK506对该型肾炎病变的影响,旨在为治疗人类新月体性肾炎提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 药品

FK506,日本藤泽制药公司提供。

[收稿日期] 2003-01-03 [修回日期] 2003-03-24

*[基金项目] 江苏省科委及卫生厅自然科学基金资助项目(BK97154, H9723)

2 动物

正常健康SD大鼠,雌雄不限,重180-220g,徐州医学院动物实验中心提供。

3 大鼠GBM抗原及其抗体的制备

具体方法参见文献^[4]。

4 大鼠抗GBM肾炎模型的复制及动物分组处理^[4]

取正常健康SD大鼠24只,单笼饲养,喂以人工合成的颗粒饲料,饮用清洁水,保持垫料干糙,实验前测定各鼠24h尿蛋白总量,结果均无异常。按随机化原则分为3组,每组8只,即:(1)肾炎+FK506组:经尾静脉注入兔抗鼠GBM抗血清(0.5 mL/100g)后6h内皮下注射FK506注射液(0.5 mg/kg)^[5],每天1次,至第21d末。(2)肾炎对照组:经尾静脉注入兔抗鼠GBM抗血清(0.5 mL/100g)后6h内皮下注射无菌生理盐水(0.5 mL/100g),每天1次,至第21d末。(3)正常对照组,经尾静脉注入同剂量的非抗体性的正常兔血清代替兔抗鼠GBM抗血清后6h内皮下注射无菌生理盐水(0.5 mL/100g),每天1次,至第21d末。

5 主要观察指标

5.1 24h尿蛋白总量、血清肌酐及尿素氮含量的测定 于实验后第4d、第14d和第21d,将各组大鼠分别单置于代谢笼内收集大鼠24h全部尿液,采用3%磺基水杨酸浊度定量法进行尿蛋白定量测定。另于实验的第4d、第14d和第21d行各组鼠眼内眦静脉放血,分离血清,严格按照试剂盒说明书的方法操作,经全自动生化分析仪测定血清肌酐及血清尿素氮的含量(肌酐和尿素氮试剂购自上海长征康仁

医学科学有限公司)。

5.2 病理学检查 于实验后第 4 d、第 14 d 和第 21 d 经皮取各组大鼠肾皮质标本,分别行光镜、免疫荧光和电镜检查。光镜:肾切片行 HE 染色。免疫荧光:采用 FITC 标记的抗兔 IgG 和抗鼠 IgG 对肾冰冻切片行直接免疫荧光法染色。电镜:观察肾小球内电子致密物(即免疫复合物,immune complex,IC)沉积的部位、大小,GBM 厚度,及足突融合情况等。并重点对 GBM 的厚度作立体计量学定量分析,具体方法参见文献^[4]。

5.3 T 淋巴细胞转化功能和抗 GBM 自身抗体的检测 于实验后第 4 d、第 14 d 和第 21 d 行各组鼠眼内眦静脉放血,置肝素抗凝管,用淋巴细胞分离液分离并收集淋巴细胞,采用 MTT 法检测大鼠体内 T 淋巴细胞转化功能,具体方法参见文献^[6](淋巴细胞分离液、MTT 等试剂均购自上海华美生物工程有限公司)。并于实验的第 14 d 行各组鼠眼内眦静脉放血,分离血清,检测大鼠血清中抗 GBM 自身抗体,具体方法采用 HRP(辣根过氧化物酶,horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗鼠 IgG(由南京军区总医院提供)行 dot-ELISA 法^[7]。

6 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。方差不齐时,取几何均数再进行 *t* 检验。荧光强度以“-”、“++++”表示,半定量分析。

结 果

1 24 h 尿蛋白总量、血清肌酐及尿素氮的改变

第 4 d 肾炎对照组鼠 24h 尿蛋白总量已明显高于正常对照组,至第 14 d 血清肌酐及尿素氮亦明显高于正常对照组,之后,血清肌酐及尿素氮仍继续升高,而 24 h 尿蛋白于第 21 d 较第 14 d 下降;肾炎 + FK506 组在第 14 d 时就显示 24 h 尿蛋白量和血清尿素氮显著低于肾炎组,至第 21 d 时,血清肌酐亦显著低于肾炎组,血清尿素氮接近正常值,见表 1。

2 光镜检查

免疫后第 14 d,肾炎对照组大鼠肾小球体积增大,细胞数明显增多,新月体形成,肾小管内大量蛋白管型;而同期肾炎 + FK506 组大鼠肾组织病变则相对轻微。免疫后第 21 d 时,肾炎对照组大鼠肾小球内细胞数反而减少,并出现节段性或全部肾小球硬化,肾小球囊腔大部分亦闭塞;而肾炎 + FK506 组大鼠未见肾小球硬化,亦未见肾小球囊腔闭塞。

3 免疫荧光检查

肾炎对照组大鼠免疫后第 4d,可见肾小球内免

IgG 沿鼠 GBM 呈“线形”分布,荧光强度为 +++,至第 21 d 荧光强度为 ++;而鼠 IgG 荧光强度增强,第 14 d 时可见大鼠 IgG 亦呈“线形”沿 GBM 分布,荧光强度为 +,至第 21d 荧光强度为 ++(图 1a,见加页)。而肾炎 + FK506 组大鼠肾组织标本在第 21d 检测免 IgG 和鼠 IgG 表明,其荧光强度均弱于肾炎对照组大鼠,结果均为 +(图 1b,见加页)。正常对照组大鼠各时段不同荧光抗体检测结果均为阴性。

表 1 3 组大鼠尿蛋白总量、血清肌酐和尿素氮含量的变化
Tab 1 The content changes in urine protein and serum creatinine and serum urea nitrogen levels in three groups($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Time	Index	Nephritis + FK506 group	Nephritis control	Normal control
4 d	Urinary protein(mg/24h)	40.69 ±18.62 **	46.67 ±22.33 **	7.07 ±3.57
	Crea(μmol/L)	86.59 ±16.75	85.60 ±15.62	75.30 ±10.62
	Urea(mmol/L)	8.72 ±1.06	9.29 ±0.91	8.27 ±1.24
14 d	Urinary protein(mg/24h)	68.07 ±21.11 # **	115.43 ±55.48 **	7.10 ±3.81
	Crea(μmol/L)	95.74 ±22.11 *	133.19 ±17.42 *	73.79 ±12.43
	Urea(mmol/L)	10.53 ±3.12 ##	14.49 ±4.34 **	8.76 ±1.20
21 d	Urinary protein(mg/24h)	41.04 ±18.16 **	56.40 ±36.91 **	7.42 ±3.74
	Crea(μmol/L)	96.01 ±20.29 ## *	215.58 ±76.99 *	74.13 ±8.70
	Urea(mmol/L)	8.91 ±1.46 ##	17.81 ±3.88 **	8.30 ±0.95

Crea: serum creatinine; Urea: serum urea nitrogen; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs nephritis control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control.

4 电镜检查

肾炎对照组大鼠免疫后第 4 d,GBM 上电子密度大于正常对照组大鼠,厚度较宽,第 21 d,可见 GBM 厚度更宽,并见 GBM 上皮侧有不规则团块状电子致密物沉积,GBM 呈不规则增厚,沉积区足突融合明显(图 2a),部分区域可见内皮细胞脱落、坏死。而肾炎 + FK506 组大鼠 GBM 厚度显著低于肾炎组,足突融合及内皮细胞病变情况亦均较肾炎对照组大鼠为轻(图 2b)。GBM 定量分析结果,见表 2。

5 大鼠体内 T 淋巴细胞转化功能吸光度 A 值的变化

结果显示,第 14 d,肾炎对照组大鼠体内 T 淋巴细胞转化功能明显高于肾炎 + FK506 组,见表 3。

表 2 3 组大鼠 GBM 平均厚度的变化

Group	4 d	14 d	21 d
Nephritis + FK506	216.04 ±60.25 *	234.94 ±47.21 *	303.10 ±33.51 # *
Nephritis control	227.93 ±20.87 *	295.65 ±67.13 *	539.07 ±192.71 *
Normal control	122.72 ±20.27	120.60 ±15.62	129.42 ±22.32

$P < 0.01$ vs nephritis control; * $P < 0.01$ vs normal control.



Fig 2 a The thickening of GBM and loss of foot processes were seen in nephritis control (×20 000).

图 2a 肾炎对照组大鼠第 21 d,电镜示肾小球内 GBM 呈不规则增厚,足突融合



Fig 2b The changes of GBM were seen in nephritis + FK506 group (×10 000).

图 2b 肾炎 + FK506 组大鼠第 21 d,电镜示肾小球内 GBM 病变情况较肾炎对照组大鼠为轻

表 3 3 组大鼠 T 淋巴细胞功能转化试验的变化

Tab 3 The changes in T cell transforming function test in three groups(A. $\bar{x} \pm s$. n = 8)

Group	4 d	14 d	21 d
Nephritis + FK506	0.042 ± 0.004 *	0.034 ± 0.005 #	0.030 ± 0.005
Nephritis control	0.052 ± 0.015 **	0.045 ± 0.007 **	0.036 ± 0.009
Normal control	0.033 ± 0.007	0.031 ± 0.009	0.032 ± 0.009

P < 0.05 vs nephritis control ; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs normal control.

6 各组大鼠第 14d 血清中抗 GBM 自身抗体的检测

每组大鼠均为 8 例,肾炎对照组大鼠抗 GBM 自身抗体阳性例数为 6 例,肾炎 + FK506 组为 3 例,正

常对照组则为 0 例。

讨 论

人类新月体性肾炎是一种急进性肾小球肾炎,其发病机制与机体的免疫因素关系甚密;临床上发现该疾病病情重,进展快,易引起肾功能衰竭^[8],因而尽早防治此肾炎至关重要。本研究给大鼠一次性尾静脉注射兔抗鼠 GBM 抗血清后,经过一定潜伏期,便产生了肾炎。结果均表明,实验所建立的大鼠抗 GBM 肾炎模型与人类新月体性肾炎酷似。

FK506 是一种新型的强免疫抑制剂,20 世纪 90 年代进入临床,主要用于肝移植、肾移植后排斥反应等的治疗。其作用的主要机制是与细胞内特异性受体(FK506 结合蛋白)结合后,能抑制钙调神经磷酸酶的活性,干扰 T 细胞的激活和细胞因子转录,从而发挥免疫抑制作用^[9]。本研究利用 FK506 处理大鼠抗 GBM 肾炎发现,第 14 d,24 h 尿蛋白总量和血清尿素氮明显低于未予处理的肾炎对照组大鼠,随后第 21d 血清肌酐亦较肾炎对照组大鼠明显降低;肾小球内细胞增生和新月体形成的数量及肾小管内蛋白管型均明显减少,亦未见肾小球硬化、肾小球囊腔闭塞;并且发现 FK506 能够减轻 GBM 厚度的增加,足突细胞和内皮细胞病变情况亦得到明显的改善;同时亦发现实验的第 14 d,大鼠体内 T 淋巴细胞转化功能较肾炎对照组大鼠明显低下,血清中抗 GBM 自身抗体的阳性数少于肾炎对照组大鼠,且“线性”沉积在 GBM 上的兔 IgG 和鼠 IgG 的荧光强度在第 21d 较肾炎对照组大鼠为弱。上述结果均证实,FK506 确能抑制大鼠 T 细胞的激活,进而抑制大鼠产生抗 GBM 自身抗体,并阻止部分抗体在 GBM 的沉积,致使 GBM 不规则性增厚的程度明显减轻,并且能够抑制肾小球内细胞增生和新月体形成,从而减轻肾组织病变。

综上所述,FK506 可以减轻罹患抗 GBM 肾炎大鼠的肾脏病变,进而改善肾功能。因此,本实验将为 FK506 防治人类新月体性肾炎提供可靠的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Johnson JP, Moore J Jr, Austin HA, et al. Therapy of anti-glomerular basement membrane antibody disease: analysis of prognostic significance of clinical, pathologic and treatment factors[J]. J Med, 1985,64(4): 219 - 227.
- [2] 叶任高,李幼姬. 在自身免疫疾病中使用环孢素 A 的现状[J]. 国外医学: 内科分册, 1990,17(4): 162 - 164, 174.
- [3] Prisch JD, Miller J, Deierhoi MH, et al. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression

- after cadaveric renal transplantation FK506 kidney transplant study group[J]. *J Transplant*, 1997, 63(7) : 977 - 983.
- [4] 汤仁仙, 简洁, 王迎伟. 大鼠抗 GBM 肾炎模型的建立及不同病期的生化指标和肾组织病理学观察[J]. *徐州医学院学报*, 2003, 23(1) : 9 - 13.
- [5] Matsukawa W, Hara S, Yoshida F, et al. Effects of a new immunosuppressive agent, FK506, in rats with active Heymann nephritis[J]. *J Lab Clin Med*, 1992, 119(2) : 116 - 123.
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1) : 55 - 64.
- [7] 吴中兴, 杜文平, 荣漪雯. Dot - IGSS、Dot - EISA 和虫体切片检测肝吸虫病人血清中抗体的研究[J]. *中国寄生虫防治杂志*, 1989, 2(4) : 276 - 279.
- [8] Tam FW, Smith J, Morel D, et al. Development of scarring and renal failure in a rat model of crescentic glomerulonephritis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14(7) : 1658 - 1666.
- [9] 余传霜, 叶天星, 陆德源 主编. 现代医学免疫学 [M]. 第 1 版. 上海: 上海医科大学出版社, 1998. 1194 - 1194.

Effects of FK506 on anti - glomerular basement membrane nephritis in rats

TANG Ren - xian¹, WANG Ying - wei², HUANG Rui³, GAO Feng - guang¹, LIU Xiao - mei¹

¹ Department of Immunology and Microbiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China;

² Department of Immunology and Microbiology, Nanjing Medical College, Nanjing 210007, China;

³ Department of Microbiology, Suzhou University, Suzhou 215007, China)

[**ABSTRACT**] **AIM** : To investigate the effects of FK506 on anti - glomerular basement membrane (GBM) nephritis in rats. **METHODS** : Anti - GBM nephritis model was elaborated by rabbit anti - rat GBM antibody injection in SD rats in this study. The rats were divided into three groups: FK506 treated group (0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, sc), untreated nephritis control group and normal control group. FK506 was administered daily six hours after injection of anti - GBM IgG. All the rats were observed urinary protein at the 4th day, the 14th day and the 21st day. At the same time, the kidney specimens were collected, and T cell transforming function was also monitored. **RESULTS** : Rats injected with rabbit anti - GBM Ab developed heavy proteinuria by 4 days, and serum creatinine and serum urea appeared which kept on the rising. Glomerular hypercellularity, crescents, and protein casts were observed in nephritic rats. By electron microscopy, the thickening of GBM and loss of foot processes were seen. T cell transforming function was higher than normal. But, all pathological changes obviously turned for the better in FK506 treated group. **CONCLUSION** : FK506 could inhibit the progression of rat anti - GBM nephritis.

[**KEY WORDS**] FK506; Anti - GBM nephritis; Rats

《中华医学研究杂志》征稿

《中华医学研究杂志》具有 ISSN/ CN 标准刊号,是由中华临床医药学会主办的综合性、国际性医学期刊。也是《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、国家科技部西南信息中心《中文科技期刊数据库》收录期刊及《中文生物医学期刊文献数据库》收录期刊。主要反映医药科研成果、实验研究与临床实践和中西医的诊疗经验,传播医药新理论,交流医学新技术,帮助医学教研及医疗卫生技术人员更新知识,促进医学学术交流与研究。

本刊栏目有:论著、综述、讲座、临床医学、中西医结合、中医中药、药物与临床、检验与临床、医学影像、误诊分析、病例报告、预防医学、医学教育、临床护理、医学管理等。

来稿刊登周期短,免收审稿费,录用文稿颁发论文证书。欢迎投稿。

来稿请寄:山东省济南市北园大街 598 - 1 号《中华医学研究杂志》编辑部 收

邮编:250031 电话:0531 - 5933998 传真:0531 - 5822998

E - mail : zhyxyjzz @periodicals. net. cn http :// www. medical - journal. cn

突变型 β -连环蛋白基因对肝细胞增殖的影响

(正文见第1601页)

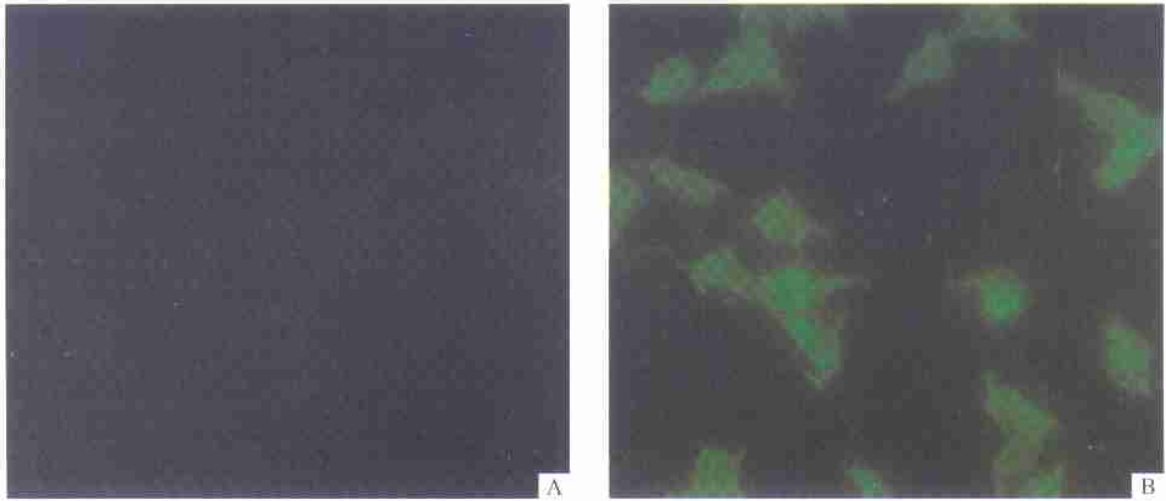


Fig 1 Immunofluorescence of AML12 cells and AML12S33Y cells (mouse anti-FLAG antibody, $\times 100$).

A: AML12; B: AML12S33Y.

图1 抗FLAG单克隆抗体免疫荧光染色

普乐可复防治大鼠抗肾小球基底膜肾炎的实验研究

(正文见第1631页)

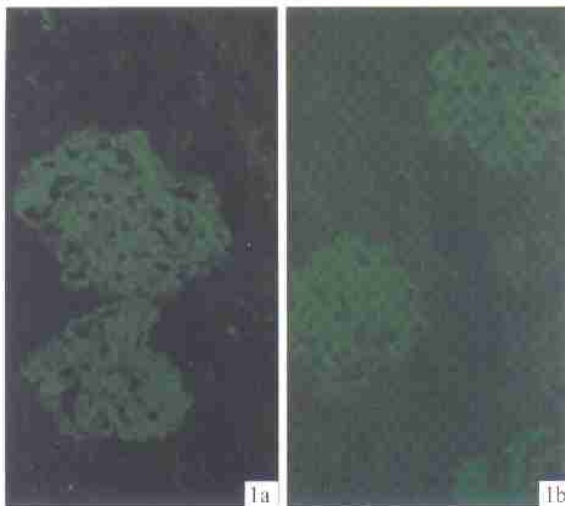


Fig 1a Rat IgG distributed around the glomerular capillary walls of rats with nephritis at the 21st day ($\times 400$).

图1a 肾炎组大鼠第21d, 抗鼠IgG荧光染色示鼠IgG沿GBM“线行”分布

Fig 1b Rat IgG distributed around the glomerular capillary walls of rats in nephritis+FK506 group at the 21st day ($\times 400$).

图1b 肾炎+FK506组大鼠第21d, 抗鼠IgG荧光染色示鼠IgG沿GBM“线行”分布

PI-3K在低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的表达

(正文见第1667页)



Fig 1 Weak expression of PI-3K p110 in plasma of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) in serum-free medium (SFM) group (IHC, $\times 200$).

图1 PI-3K p110在SFM组PASMC胞浆内表达呈弱阳性

Fig 2 Strong expression of PI-3K p110 in plasma of PASMC in 48 h hypoxia (H48h) group (IHC, $\times 200$).

图2 PI-3K p110在H48h组PASMC胞浆内表达呈强阳性