

慢性肾炎实验动物模型研究进展

尼日特 杨巧芳

摘 要 慢性肾小球肾炎是临床常见的难治性多发性疾病,是导致慢性肾衰竭的重要原因之一,几种常见的慢性肾炎也随着相关研究的深入总结形成了相应的实验用动物模型:微小病变型肾小球肾炎(MCD)和局灶节段性肾小球硬化(FSGS)常用阿霉素肾炎模型和嘌呤霉素氨基核苷肾炎模型;系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)常选用 BSA 肾炎模型和 Thy-1 抗血清肾炎模型;膜性肾病(MN)常用 Heymann 肾炎模型和 C-BSA 肾病模型等。根据实验需要造模动物常选用家兔、大鼠、小鼠等。

关键词 慢性肾炎 动物模型 综述

[中图分类号] R692

[文献标识码] A

慢性肾炎(chronic nephritic)是指以蛋白尿、血尿、水肿等为基本临床表现,可有不同程度的肾功能减退,起病方式各有不同,病情迁延,病变缓慢进展,最终将发展为慢性肾衰竭的一组肾小球疾病。常见的慢性肾小球肾炎可分为微小病变性肾病、局灶节段性肾小球硬化、膜性肾病、系膜增生性肾病等。本病病因和发病机制复杂,经过近百年的发展,随着人们对本病的研究的不断深入,学者们更多地认识到机体免疫系统在本病发病过程中的重要作用,研究发现免疫复合物(IC)在肾小球中沉积是肾小球肾炎致病的重要环节,肾小球基膜原位的免疫复合物形成,导致肾小球病变,导致肾病综合征。围绕对肾小球疾病的不断的研究发现,发展产生了不同的动物实验模型,本文旨在围绕慢性肾炎实验研究中几种常用的动物模型近年来的实验发展进行综述。

一、常见的慢性肾炎及其实验模型

1. 微小病变型肾炎和局灶性节段性肾小球硬化:

微小病变性肾病(minimal change disease, MCD)为常见的肾小球疾病。临床表现为单纯性的肾病综合征。以其病理形态学特征命名, MCD 光镜下可见轻度系膜增生,电镜下肾小球特征性表现为弥漫性足突融合。在 MCD 的实验研究中常用模型是嘌呤霉素肾炎模型。嘌呤霉素(puromycin)是一种蛋白质生物合成抑制剂。其衍生物氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PAN)被应用于微小病变性肾病模型建立。该

模型大致的制造方法是给予实验动物注射 PAN,多采用连续腹腔注射法,实验动物多选用大鼠,模型制成药 1~2 周。嘌呤霉素导致肾损害的机制目前尚不明确。因发现在注射嘌呤霉素期间给予模型自由基清除剂 SOD 可使嘌呤霉素所致的肾小球形态学改变及尿蛋白排泄减轻,故有学者认为嘌呤霉素造模机制可能是其促进自由基产生而对肾小球造成损害。近半个世纪的研究认为本模型是研究人类微小病变性肾病的可靠模型。刘丽华等^[1]经研究发现在 PAN 型肾病造模时选用雄性 Wistar 大鼠,一次性颈静脉注射适宜剂量 PAN 可建立典型急性期微小病变性肾病模型。

另一种研究微小病变性肾病的常用模型是阿霉素肾病模型。阿霉素在体内可变为药物自由基,产生活性氧表现。该模型制作方法大致如下:实验动物多用大鼠,小鼠、裸鼠等亦有报道。由于阿霉素的组织毒性,不选择皮下注射,采用静脉 1 次性注射造模。本模型原理是由于阿霉素进入体内,过量的活性氧作用于肾组织,使肾上皮细胞膜脂质形成过氧化物,使肾小球滤过膜的电荷排布和分子结构改变,最终导致滤过膜的通透性增加,产生相关症状。因考虑阿霉素组织毒性较强,1 次性给药剂量较大易引起实验动物死亡。杨维娜等^[2]选用雄性 SD 大鼠,采用首次以尾静脉注射 4mg/kg 较低剂量并于两周后进行等剂量二次给药。这样减少了单次较高剂量给药实验动物产生的较为剧烈的不良反应同时又较好的复制出了 MCD 模型。张伟等^[3]根据微小病变性肾病儿童多发的特点,选用 4~5 周龄 SD 雄性大鼠,给予 1 次性尾静脉注射阿霉素 6.5mg/kg 体重,复制阿霉素肾病模型。动态观察临床特征和病理变化,观察发现模型

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81102583);内蒙古医科大学博士启动基金资助项目(BQ2010YGF)

作者单位:010050 呼和浩特,内蒙古医科大学

通讯作者:杨巧芳,电子邮箱:yqiaofang2005@126.com

早期呈现微小病变型肾病综合征的表现,后期出现肾小球局灶节段性硬化,提示幼年大鼠阿霉素肾病模型复制成功。局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS), FSGS 表现为部分肾小球(局灶性)和(或)肾小球部分毛细血管节段发生硬化性改变, FSGS 对多种治疗反应性较差,呈缓慢进展性,最终出现慢性肾衰竭。通常在微小病变性肾病模型产生,病变后期便会出现此种改变。所以多采用微小病变性肾病造模方法,通过一次性给予实验动物较高剂量,或适当增加注射总次数来进行 FSGS 造模。比较阿霉素肾病模型和嘌呤霉素肾病模型,阿霉素肾病模型成本相对较低,造模所需时间较短。嘌呤霉素模型造模试剂较为昂贵,且模型动物病理变化显著,故在实际运用中阿霉素更适用于 MCD,嘌呤霉素适用于 FSGS。实验动物主要选用大鼠,研究重点多集中在 MCD 中足细胞内血管生成素样蛋白 4(angiotensin-like 4, ANGPTL4)的含量变化与其病理机制^[4]。

2. 膜性肾病(membranous nephropathy, MN): 膜性肾病以病理诊断特点命名的一种肾病,本病的特征性改变是肾小球毛细血管襻上皮侧可见大量免疫复合物沉积。Heymann 肾炎一直被认为是研究膜性肾病的经典模型。1959 年,Heymann 等首次运用同种或自体肾皮质制成匀浆加入完全弗氏佐剂注入实验 SD 大鼠体内诱导产生的一种自身免疫性肾病模型。相关研究指出,Heymann 肾炎的抗原 Fx1A 为一种高分子脂蛋白,其主要成分之一为 megalin,近年来研究表明 megalin 与其受体相关蛋白(receptor associated protein, RAP)复合体为 Heymann 肾炎的主要致病靶抗原, RAP 与 megalin 结合后形成 Heymann 肾炎抗原复合物(Heymann nephritis antigen complex, HNAC),进而与抗体结合在上皮下形成原位免疫复合物^[5]。同时围绕基膜、足细胞电荷分布对蛋白滤过作用影响相关研究也在进行^[6]。该模型的形态特征和病理特点酷似人类的膜性肾病,所以一直作为膜性肾病经典模型。该模型分为主动型和被动型两种。主动型 Heymann 肾炎制作原理是采用同种或异种实验动物肾皮质制成匀浆与弗氏佐剂混合乳化免疫实验动物^[7]。被动型则是采用抗肾皮质抗体免疫实验动物^[8]。目前选用被动型造模的实验研究占多数。被动型 Heymann 模型(PHN)其足细胞病变突出地表现为足突融合,裂孔隔膜消失,裂孔数减少。虽然 Heymann 肾炎动物模型的各项表现与人类膜性肾病相似,但由于在人类膜性肾病患者的肾小球中未检出

megalin 抗原成分,且在体内也未能发现 megalin 抗体,因此人类膜性肾病的发病机制和模型的准确建立仍需进一步深入研究^[5]。但由于 PHN 抗体制作较复杂,目前关于膜性肾病的实验研究模型逐渐被 C-BSA 肾病模型所取代。

阳离子化牛血清白蛋白(cationic bovine albumin, C-BSA)肾炎动物模型属原位免疫复合物性肾炎模型。该模型造型原理大致是注射 C-BSA,使实验动物的肾小球基膜原位直接形成免疫复合物。一般认为,此种实验模型可以较好的反映膜性肾病的临床特征和病理特点。区别于选用牛血清白蛋白(BSA)制作系膜增生性肾小球肾炎的模型,本模型选用 C-BSA 作为造模试剂。实验动物选用家兔、大鼠、小鼠等均有报道。1982 年, Border 等每日给予家兔耳缘静脉注射 C-BSA,约两周左右将肾病动物模型成功复制,具有与人类 MN 肾病相似的病理临床特点。本模型其机制是带正电的 C-BSA 与肾小球基膜上的带负电部位结合“种植”在肾小球基膜上,使机体产生相应抗体与抗原在原位形成 IC,有研究认为 Th2 细胞的免疫应答与膜细胞损伤关系密切^[9]。该模型重复性好,成功率高,已成为研究 MN 的又一经典模型^[10]。尹友生等^[11]选用 border 法,取 C-BSA 与 1mg 与弗氏不完全佐剂混匀融合,多点皮下注射免疫大鼠。预免疫 1 周后,按每只每次腹腔注射 C-BSA 2.5mg,每周 3 次,共 3 周进行正式免疫。实验动物的病理特征和临床表现与人类膜性肾病相似。魏日胞等^[12]采用家兔耳缘静脉注射 C-BSA 每只 10mg,每日 1 次,共 5 周,第 6 周剂量加倍制造家兔肾炎模型。黄春林等^[13]在给实验大鼠静脉注射 C-BSA 同时于第 3 周给予腺嘌呤,苦寒中药煎剂灌服两周以制造脾肾阳虚中医证型。梁静等^[14]选用雄性 SD 大鼠,采用 3 种 C-BSA 剂量进行造模并进行比较,发现不同剂量 C-BSA 造模引起模型病理变化程度不一,认为 16mg/kg 成模效果最佳,模型稳定、表现典型,可重复率较高。

比较主动型和被动型 Heymann 肾炎模型,在大量的实验研究中发现被动型因其操作性和成功率较主动型优秀,故较为常用。但同 C-BSA 模型相比, C-BSA 肾炎模型造模方法更为简便,成功率更高,制作周期较短,故研究膜性肾病中以 C-BSA 模型最为常见。近年从遗传方面研究 MN 的逐步开展,大鼠相比小鼠而言缺乏基因工程品系,故选用小鼠的造模亦将增多^[15]。

3. 系膜增生性肾小球肾炎:系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)在我国较为常见,多发于青少年。病理上以光镜下肾小球弥漫性系膜细胞增生、基质增多使系膜区增宽为特征表现。MsPGN 通常分为以 IgA 沉积为特征表现的 IgA 肾病和非 IgA 沉积的系膜增生性肾小球肾炎,本病由多种病因导致,临床演进呈多样性。MsPGN 常用的实验研究造型通常也称为血清病型肾炎(serum sickness nephritis),因其造型原理是由某种可溶性的抗原-抗体复合物沉积在肾小球血管壁而致病。通常慢性 SSN 造型是以持续较低剂量注射异种血清,实验动物在经过较长时间之后产生难修复的肾炎病变。Thy1.1 肾炎模型是 MsPGN 常用模型之一。20 世纪 80 年代初期, Ishizaki 首次报道应用大鼠胸腺细胞抗体诱发大鼠系膜增生性肾炎。此后许多研究者开始进行 Thy1.1 模型相关的系膜增生性肾炎研究。该模型的建立原理大致如下:由于大鼠系膜细胞表面存在 Thy1.1 抗原,故使用抗 Thy1.1 抗体可诱导大鼠建立系膜增生性肾小球肾炎模型。此种模型制造原理是因为 Thy1.1 抗原可与系膜表面相应 Thy1.1 分子结合,当 Thy1.1 抗体进入机体后和系膜表面相应抗原结合,迅速引发明显的系膜溶解、炎性细胞浸润、系膜细胞增生、细胞外基质沉积等系膜区病变,大鼠同时出现大量蛋白尿。模型制作方法基本是首先取动物 A(多选用大鼠)胸腺分离纯化获得单胸腺细胞,稀释混合佐剂后注射给动物 B(多选用家兔),之后择时提取分离动物 B 血清获得兔抗大鼠胸腺细胞免疫血清。后注射给动物 A 造模。通过单次注射造模所形成的肾脏病理学特征与人类系膜增生性肾炎早期改变较为相似,且具有病理生理学的可逆性。多次注射造成模型的不可逆改变,持续性蛋白尿。因此通过调节本模型制作时的给药计量可模拟人类初患此种肾炎并进展至终末期肾病的整个病理过程。张克非等^[16]在制备兔抗大鼠 Thy1 肾炎模型同时测定大鼠血清 IL-1、IL-6 及 TNF 含量发现与对照组对比明显升高,认为细胞因子可能在该模型致病机制中发挥重要作用。杨霓芝等采用抗 Thy-1 抗体制备大鼠系膜增生性肾炎(MsPGN)模型,向大鼠尾静脉注射适量 ATS,连续 4 周。并对实验大鼠行游泳疲劳试验,连续两周以复制气虚血瘀证型。

研究 MsPGN 另外一种肾炎模型是 BSA 致肾病模型,此模型制作原理是通过采用注射含 BSA 弗氏佐剂免疫动物。实验动物多选用大鼠,制成模型病理

临床特征与系膜增生性肾小球病变相似。模型制作周期缩短,经检查证实符合系膜增生性肾小球病变临床病理特征。少量多次逐级递增的造模给药方式相比短时单次给药更为系统,更适应动物自身的免疫生理周期,值得根据实验需要推广于多种模型造型。张红梅等制造慢性肾炎湿热证模型选用大鼠切除左侧肾脏,1 周后进行预免疫,后以每日腹腔注射 BSA,剂量从 0.5mg 开始,每日逐量增至 10mg 为止。另为建立中医湿热证型给予腹腔注射 LPS 进行致热免疫。系膜增生性肾小球肾炎的两种实验模型比较而言, Thy1.1 肾炎模型制作流程较为复杂,整体实验周期较长,制作成本较高。BSA 肾炎模型试剂易获得,方法较为简单,实验周期较短,较易成功。故近年来实验研究中采用 BSA 肾炎模型研究多见。

二、讨 论

以上介绍的近年来比较常用的慢性肾炎实验动物模型。总结起来,从实验动物选择方面,家兔、大鼠、小鼠均有采用,但因家兔较昂贵,实验药品消耗量较大,实验成本高。且其饮食习惯,某些生理生化指标方面不如实验鼠与人类相近。小鼠在造模时候由于其体积较小,在造模药量控制稍有偏差时可能造成实验鼠症状表现不明显或反应剧烈,实验相较大鼠而言不易操控。因此实验动物采用大鼠较多,实验动物性别选择没有明显区分,部分实验根据人类肾病的流行病学特点选择,比如膜性肾病多选用成年龄雄性大鼠等。

关于医学实验动物模型的复制,最重要的问题是模型复制其症状表现和病理特点是否典型,模型复制的成功率,其次是模型制作的成本,制作周期,操作难度。如何恰当的选择实验模型是实验研究中的关键问题。通过查阅近年来文献,发现围绕造模给药剂量,给药方式等开展研究以优化造模方案的相关报道开始出现,但仍不能较好的解决相关问题,相关研究有待进一步深入。

观察现有的实验造模方式,我们只能认为实验所造的模型与某种肾炎病理改变和某些临床特征相似,由于临床上关于某种肾病的发病机制并未完全明确,同种病理表现可能会由多种不同路径引发,在临床上相同的病理表现又会有不同的基于中医辩证的证候特点。所以不能完全肯定某一种模型造型可以准确地代表一种肾炎。如果从中医药方面研究本病,单一复制出某些症状和特定的病理改变显然不够,更应该基于中医理论对不同辨证分型进行探讨。有学者运用游泳疲劳法制造气虚血瘀模型,饲喂实验动物甲状

腺素以模拟阴虚证型,喂予蜂蜜、油脂以模拟脾虚湿盛证型,这些都是基于中医理论进行实验造模的重大进步。但是众所周知中医理论的整体观念和辨证求因思想告诉我们某种证型的出现是由某种因素主导多因素共同影响而形成的。所以我们或许可以尝试基于那些已经基本达成共识的中医理论中的关于某病的病因病机的定义,模拟某种证型的形成过程。从实验动物的整体喂养环境,饲养的饮食结构,定期给予机械或精神层面的主动或被动刺激等,并能够按某种时间规律(如参考中医的子午流注学说和现代的时间生物学理论)整合以上各个因素相互作用的时间周期这样的方式来建立与中医理论更为接近的,同时又有特定的病理形态学改变实验动物模型。如何能够总结一套临床病理特征典型,廉价高效的动物模型方案值得进一步实践探索。

参考文献

- 1 刘丽华,朱春芳,欧周罗. 单次静脉注射嘌呤霉素氨基核苷所致大鼠肾病模型的优化及评价[J]. 复旦学报:医学版,2005,32(4): 488-492
- 2 杨维娜,于琳华,郭尚温,等. 改良阿霉素肾病大鼠模型的建立[J]. 西安交通大学学报:医学版,2009,30(4):445-448-452
- 3 张伟,王莉,何轶,等. 幼年大鼠阿霉素肾病模型的复制[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2012,13(12):1068-1070-1140
- 4 Chugh SS, Clement LC, MACé C. New insights into human minimal change disease: lessons from animal models[J]. Am J Kidney Dis, 2012,59(2):284-292
- 5 达展云,范亚平,钱柯荪. Heymann 肾炎的发病机制及研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2007,8(8):491-492
- 6 Shimoi A, Hatakeyama H, Miyoshi S. Unchanged distribution density of anionic sites on the glomerular wall in rats with active heymann nephri-

- tis[J]. J Toxicol Pathol, 2013, 26(1):11-17
- 7 Wang Y, Wang Y, Wang Y, *et al.* DNA vaccine encoding CD40 targeted to dendritic cells in situ prevents the development of Heymann nephritis in rats[J]. International Society of Nephrology, 2013, 83(2): 223-232
- 8 Wang L, Hong Q, Lu Y, *et al.* Autophagy can repair endoplasmic reticulum stress damage of the passive Heymann nephritis model as revealed by proteomics analysis[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(3): 3866-3876
- 9 Tipping PG, Kitching AR. Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2005, 142(2): 207-215
- 10 朱立,赵玉庸,陈志强. 中医药治疗膜性肾病的实验研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2003,4(1):61-62
- 11 陈旭. 急性肾盂肾炎合并糖尿病肾病的用药分析和药学监护[J]. 中国医刊,2012,47(8):84-86
- 12 魏日胞,张五星,师锁柱,等. 肾乐胶囊对实验性肾炎兔及5/6肾切除肾功能衰竭大鼠的疗效[J]. 中国新药与临床杂志,2010,29(4):287-291
- 13 黄春林,杨霓芝,刘旭生,等. 加味阳和汤治疗实验性大鼠膜性肾病脾肾阳虚型的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志,2001,8(8): 33-34
- 14 梁静,孙兴旺,曹灵,等. 不同剂量阳离子化牛血清白蛋白对膜性肾病大鼠造模的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008, 12(37):7322-7325
- 15 Borza D, Zhang J, Beck LH. Mouse models of membranous nephropathy: the road less travelled by[J]. Am J Clin Exp Immunol, 2013, 2(2):135-145
- 16 张克非,张亮,吴雄飞,等. 大鼠抗 Thy1 系膜增生性肾小球肾炎模型发病机制探讨[J]. 四川大学学报:医学版,2004,35(2):188-190

(收稿日期:2013-07-05)

(修回日期:2013-08-26)

欢迎订阅 2014 年《医学研究杂志》

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》)于1972年创刊,是由国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医学学术刊物。中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。世界卫生组织太区医学索引(WPRIM)收录期刊。月刊。CN11-5453/R,ISSN1673-548X。

本杂志信息量大,装帧精美。每册定价10元,全年120元(含邮费)。国内外公开发行人。邮发代号:2-590。编辑部电话、传真:010-52328677,010-52328678,010-52328679;传真:010-65230946。E-mail:xyz85637883@126.com。投稿网址: <http://www.yxyjzz.cn>。编辑部地址:北京市朝阳区雅宝路3号(邮编:100020)

《医学研究杂志》编辑部