

BALB/c小鼠免疫复合物性肾损伤模型建立及肾损伤生物标志物初步探讨

郑少秋^{1, 2, 3#}, 张亚群^{2#}, 缪成贤², 李一昊², 王 娅², 刘 军², 王先浩^{1, 2, 3}, 王 明^{1, 2, 3}, 孙璐瑶^{2, 3}, 吕建军^{2*}, 汪溪洁^{4*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330103

2. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133

3. 长三角药物高等研究院, 长三角药物工程学院, 江苏 南通 226133

4. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203

摘要: 目的 构建BALB/c小鼠免疫复合物性肾损伤模型, 探讨观察此类肾损伤的早期、简便、灵敏检测方法和候选生物标志物, 为生物技术药物非临床安全性评价毒性试验中肾损伤检测提供参考。方法 BALB/c小鼠随机分为溶媒对照组和阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)低、中、高剂量造模组, 每组10只。诱导免疫时, 造模组动物给予2 mg·mL⁻¹ C-BSA和弗氏不完全佐剂1:1等体积混合乳剂(1 mg·mL⁻¹、5 mL·kg⁻¹), 而溶媒对照组动物给予磷酸盐(PBS)缓冲液与弗氏不完全佐剂1:1等体积混合乳剂, sc诱导免疫, 每周1次, 共2次; 加强免疫时, 各组动物均尾iv给予C-BSA, 溶媒对照组和C-BSA低、中、高剂量组剂量分别为0、2.5、5.0、10.0 mg·kg⁻¹, 每3天给予1次, 共5次。造模期末, 检测造模期末小鼠24 h尿蛋白含量; 检测凝血指标, 包括凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APPT)以及纤维蛋白原含量(Fbg); 检测血清尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)以及三酰甘油(TG)水平; 摘取主要脏器称质量并计算脏器比、脏脑比; HE染色和特殊染色[过碘酸-希夫(PAS)染色、Masson三色染色、过碘酸六胺银(PASM)染色]后, 光学显微镜下检查肾组织形态学改变; 免疫组化观察肾脏补体成分3(C3)、免疫球蛋白G(IgG)、结蛋白水平; 免疫荧光观察肾脏C3水平; 透射电子显微镜观察肾脏肾小球基底膜、足细胞足突的变化及毛细血管内皮细胞下有无电子致密物沉积。结果 C-BSA各剂量组动物在尾iv给予C-BSA后出现不同程度精神萎靡、活动减少、皮肤发红和呼吸急促等过敏反应症状, 溶媒对照组动物给药后无明显异常; 在加强免疫2周后, 与溶媒对照组比较, C-BSA低、中和高剂量组动物体重增长显著缓慢($P<0.05$); C-BSA低、中、高剂量组动物尿蛋白呈阳性。与溶媒对照组比较, C-BSA各组动物BUN、SCr、TG均未见规律改变, 仅高剂量组动物的BUN升高, TG降低; C-BSA中、高剂量组动物PT显著降低($P<0.05$), 低、中剂量组动物APPT显著降低($P<0.05$), 低、中、高剂量组动物Fbg含量显著降低($P<0.001$); C-BSA低、中、高剂量组动物肾脏的脏器比显著升高($P<0.01$), 且低、中和高剂量组的脾脏绝对质量和脏器比亦显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。肾脏组织病理学检查及特殊染色检查发现C-BSA中、高剂量组动物肾小球系膜基质增加、基底膜增厚; 免疫组化结果显示, 与溶媒对照组比较, C-BSA低、中、高剂量组动物的C3、IgG、结蛋白表达水平均显著升高($P<0.001$), 高剂量组IgG水平显著高于低、中剂量组($P<0.05$); 免疫荧光结果显示, 与溶媒对照组比较, C-BSA高剂量组C3水平显著升高($P<0.001$); 透射电镜结果显示C-BSA低、中、高剂量组动物肾脏肾小球基底膜增厚、足细胞足突部分融合, C-BSA中、高剂量组动物肾脏肾小球基底膜可见少量电子致密物沉积。结论 成功建立了免疫复合物性肾损伤模型和早期、简便、灵敏的检测方法, C3、IgG和结蛋白可作为生物技术药物非临床安全性评价毒性试验中肾损伤检测的候选生物标志物。

关键词: BALB/c小鼠; 免疫复合物; 肾损伤; 阳离子化牛血清白蛋白; 生物标志物; 补体成分3; 免疫球蛋白G; 结蛋白

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 05-0934-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.002

Establishment of a model of immune complex-induced renal injury in BALB/c mice and preliminary study of biomarkers of renal injury

ZHENG Shaoqiu^{1, 2, 3}, ZHANG Yaqun², MIAO Chengxian², LI Yihao², WANG Ya², LIU Jun², WANG Xianhao^{1, 2, 3}, WANG Ming^{1, 2, 3}, SUN Luyao^{2, 3}, LYU Jianjun², WANG Xijie⁴

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设(BM2021002)

#共同第一作者: 郑少秋, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学。E-mail: sqzheng.hm@simmm.ac.cn

张亚群, 助理研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: yqzhang@innostar.cn

*共同通信作者: 汪溪洁, 研究员, 研究方向为药物毒理学。E-mail: xjwang@innostar.cn

吕建军, 主任药师, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: jjlv@innostar.cn

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330103, China
2. Innostar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong 226133, China
3. Yangtze Delta Advanced Research Institute, Yangtze Delta Pharmaceutical College Nantong, Nantong 226133, China
4. Shanghai Innostar Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: Objective Construct an immune complex-induced renal injury model in BALB/c mice, explore early, simple, sensitive detection methods and candidate biomarkers for detecting such renal injury, and provide references for renal injury detection of biopharmaceuticals in toxicity studies during nonclinical safety evaluation. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into solvent control group and C-BSA low, medium, and high dose modeling groups, with 10 mice in each group. During induction immunization, the animals of model groups were administrated with an emulsion made of a mixture of $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ C-BSA and equal volume of Freund's incomplete adjuvant via subcutaneous injection, while the animals of vehicle control group were given an emulsion made of a mixture of PBS buffer and equal volume of Freund's incomplete adjuvant. Once a week, twice in total. During booster immunization, all animals in each group were administered with 0, 2.5, 5.0, and $10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ C-BSA via intravenous injection through tail vein for the vehicle control group and the low, medium, and high dose groups of C-BSA, respectively. Once every three days, five times in total. At the end of the modeling period, 24-hour urine protein content of mice were detected. Coagulation indicators were also detected, including prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APPT), and fibrinogen (Fbg). Blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), and triglyceride (TG) levels were detected. The main organs were weighed and calculated the mass, organ weight to body weight ratio and organ weight to brain weight ratio. Slides of kidneys prepared with HE staining and special staining [periodic acid Schiff (PAS) staining, Masson trichrome staining, and periodic acid silver methenamine (PASM) staining], the morphological changes of renal tissue were examined under an optical microscope. Immunohistochemical examination of renal complement component 3 (C3), immunoglobulin G (IgG), and desmin levels and immunofluorescence examination of renal C3 levels were carried out. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the changes in the glomerular basement membrane and foot process of podocytes of the kidneys, as well as the presence of electron dense deposits under capillary endothelial cells. **Results** The animals in each modeling group showed varying degrees of allergic reaction symptoms such as lethargy, decreased activity, skin redness, and short breath after administration of C-BSA via intravenous injection, whereas the animals in the solvent control group showed no significant abnormalities after the administration. After two weeks of booster immunization, compared with the vehicle control group, the animals in the low, medium, and high dose modeling group showed significant slow body mass growth ($P < 0.05$). The low, medium, and high dose modeling groups of C-BSA showed positive urine protein. Compared with the solvent control group, there were no regular changes in BUN, SCr, and TG in the animals of modeling groups. Only the animals of high dose modeling group showed an increase in BUN and a decrease in TG. PT of animals in the medium and high dose modeling groups was significantly reduced ($P < 0.05$), APPT of animals in the low and medium dose modeling groups was significantly reduced ($P < 0.05$), and the Fbg of animals in the low, medium, and high dose modeling groups was significantly reduced ($P < 0.001$). The organ weight to body weight ratio of the kidneys in the low, medium, and high dose modeling groups was significantly increased ($P < 0.01$), and the absolute mass and organ weight to body weight ratio of the spleen in the low, medium, and high dose modeling groups were also significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Histopathological examination of kidneys showed that the increased mesangial matrix and thickened basement membrane of animals in the middle and high dose modeling groups. The immunohistochemical examination results showed that compared with the vehicle control group, the expression levels of C3, IgG, and desmin in the low, medium, and high dose modeling groups were significantly increased ($P < 0.001$), while the IgG levels in the high dose modeling group were significantly higher than those in the low and medium dose modeling groups ($P < 0.05$). The immunofluorescence examination results showed that compared with the vehicle control group, the high dose modeling group had a significant increase in C3 levels ($P < 0.001$). The TEM results showed that animals in the low, medium, and high dose modeling groups had thickened glomerular basement membrane and partially fused foot processes of podocytes. A small amount of electron dense material was observed in the glomerular basement membrane of animals in the medium and high dose modeling groups. **Conclusion** An immune complex-induced renal injury model, as well as early, simple and sensitive detection methods were successfully established. C3, IgG and desmin might be candidate biomarkers for detecting immune complex-induced renal injury in the toxicity studies during nonclinical safety evaluation of biopharmaceuticals.

Key words: BALB/c mice; immune complex; renal injury; cationic bovine serum albumin; biomarker; complement component 3 (C3); immunoglobulin G (IgG); desmin

治疗性蛋白药物是一类由相对分子质量不同的多肽到大分子蛋白质为基本构成的生物技术药物,主要包括单克隆抗体、蛋白类和多肽类、抗体偶联药物(ADC)等大分子生物技术药物。由Pharmacodia数据库得知:2018—2022年,中国、美国、欧盟、日本等国家或地区批准上市新药中生物技术药物共342个,位居批准上市药物的第2名。生物技术药物免疫复合物(IC)性肾损伤是候选药物无法进入临床试验或临床试验终止的一个重要原因,IC仅通过肾脏的常规组织病理学检查很难发现,生物技术药物IC性肾损伤仍然是目前药物非临床安全性评价毒性试验毒性病理学评价的一个重点和难题。在药物非临床安全性评价中IC形成主要与受试物的免疫原性有关,免疫原性是指药物和(或)其代谢物诱发对自身或者相关的蛋白产生免疫应答的能力,包括2个方面,即细胞免疫介导细胞因子的释放和体液免疫介导的抗体的产生。其中非预期的抗药抗体的产生,具有中和药物的活性^[1]、导致过敏反应、影响药物疗效进而引起IC沉积导致肾功能损伤^[2]等潜在风险。1982年Border等^[3]首次采用iv阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)成功诱导家兔IC性肾损伤,随后Adler等^[4]证实了家兔的肾损伤是由于异源蛋白进入机体形成IC性肾损伤,与生物技术药物非临床安全性评价毒性试验中在实验动物体内形成的循环IC沉积于肾小球导致肾损伤机制类似^[5]。本研究采用C-BSA构建IC性肾损伤BALB/c小鼠模型,并进一步研究相关早期、灵敏、简便的检测方法和候选生物标志物,以期今后我国生物技术药物非临床药物安全性评价毒性试验中IC性肾损伤的检测和毒性病理学评价提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性BALB/c小鼠,5~6周龄,体质量20~30 g,共40只,购于浙江维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(浙)2019-0001。动物实验均获益诺思生物技术南通有限公司的实验动物伦理委员会批准(批准号IACUC-2022-m-465)。所有动物普通饲料饲养,自由饮水,在室温(22±1)℃、12 h光照周期的SPF环境中适应性饲养1周后开始实验。

1.2 药物及主要试剂

C-BSA:质量浓度2 mg·mL⁻¹,规格10 mL,购于美国Chondrex公司(批号220242);弗氏不完全佐剂

购于美国Sigma公司(批号1003405830);2.5%戊二醛电镜固定液、抗荧光衰减封片剂(批号20220804)购于北京索莱宝科技有限公司;抗体稀释液(批号22101202)、EDTA抗原修复液(货号22081703)、DAB显色试剂盒(批号22002114)、封闭山羊血清(批号228061020)、聚山梨酯20(批号212230414)购于北京中杉金桥生物技术有限公司;生物素检测封闭试剂盒(批号121520211011)、QuickBlock™免疫组化二抗稀释液(批号081222220921)、辣根过氧化物酶标记山羊IgG(H+L)(批号051022220824)购于碧云天生物技术有限公司;重组anti-补体成分3(C3)抗体(批号GR3396418-1)、Goat Anti-Mouse免疫球蛋白G(IgG) H&L(biotin)(批号GR3453037-1)、重组Anti-结蛋白抗体(批号GR3434806-9)、山羊抗兔IgG H&L(FITC)抗体(批号GR3416996-2)购于美国Abcam公司;过碘酸希夫染色(PAS)染色液(批号1014A22)、Masson三色染色液(亮绿法)(批号0524A22)、六胺银染色液(批号0310A23),购于北京雷根生物生物技术有限公司;磷酸盐(PBS)缓冲液(批号17H01A30),购于武汉博士德生物工程公司。

1.3 主要仪器

Sysmex CS-5100血凝仪、UC-3500型尿液分析仪(日本希森美康公司);Hitachi-7180型自动生化分析仪(日本日立公司);MD3000-正置荧光显微镜(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 动物分组和模型构建

构建IC性肾损伤小鼠模型方法参考Chen等^[6]推荐的方法。BALB/c小鼠检疫和适应1周后,对24 h尿蛋白进行半定量,然后按照随机分组原则分为溶媒对照组和C-BSA低、中、高剂量造模组,每组10只。诱导免疫时,造模组动物给予2 mg·mL⁻¹ C-BSA和弗氏不完全佐剂1:1等体积混合制成的乳剂,而溶媒对照组动物给予1×PBS缓冲液与弗氏不完全佐剂1:1等体积混合制成的乳剂,sc进行诱导免疫,每周1次,共2次,给药质量浓度为1 mg·mL⁻¹,给药体积为5 mL·kg⁻¹。加强免疫时,各组动物均通过尾iv给药,溶媒对照组和C-BSA低、中、高剂量造模组给C-BSA剂量分别为0、2.5、5.0、10.0 mg·kg⁻¹。每3天给药1次,共给药5次,给药体积为10 mL·kg⁻¹。

2.2 组织标本采集

给药前和给药期末使用代谢笼法收集24 h的尿液标本(禁食不禁水)。给药期末使用舒泰50和

赛拉嗪混合液ip麻醉小鼠,眼眶采血分别置于含柠檬酸钠的抗凝管及含促凝剂和分离胶的试管中,获得血浆和血清。采血后放血安乐死动物,摘取主要脏器称质量,放入10%中性福尔马林溶液中浸泡固定。右肾上极部位使用手术刀取4块1 mm³组织块,在预冷的洁净载玻片上进行,快速置于4℃预冷的2.5%戊二醛电镜固定液进行前固定。

2.3 病理学检测指标

采用UC-3500型尿液分析仪检测小鼠24 h尿蛋白含量。给药期末通过眼眶采血采集血液,置于含柠檬酸钠的抗凝管和分离胶促凝管,用Sysmex CS-5100血凝仪检测凝血指标,包括凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APPT)以及纤维蛋白原含量(Fbg)。Hitachi-7180型自动生化分析仪检测血清指标,包括血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)以及三酰甘油(TG)。

2.4 肾脏组织病理学检查

将固定后的肾组织修块、脱水、石蜡包埋,使用普通载玻片和黏附载玻片对包埋组织进行切片,分别用于HE染色和特殊染色[过碘酸-希夫(PAS)染色、Masson三色染色、过碘酸六胺银(PASM)染色],光学显微镜下检查肾组织形态学改变。

2.5 免疫组化检查

采用常规二步法和生物素标记一抗的二步法进行免疫组化检查。常规二步法试验步骤包括:肾组织切片梯度脱蜡水化;抗原修复15 min,取出放置室温冷却;充分洗涤;3% H₂O₂作用10 min;充分洗涤;正常羊血清工作液封闭20 min,倾去勿洗。滴加一抗湿盒4℃孵育过夜,第2天取出恢复室温20 min, PBS洗5 min,共3次;滴加二抗湿盒室温孵育20~30 min, PBS洗5 min,共3次;DAB溶液显色;苏木素染色,冲洗返蓝,盖玻片封固后进行镜检。结果判断标准:细胞无着色为阴性,浅黄色为弱阳性,棕黄色为中度阳性,棕褐色为强阳性。Image J软件分析平均吸光度(AOD)值。

生物素标记一抗的二步法试验步骤包括:肾组织切片梯度脱蜡水化;抗原修复15 min,取出放置室温冷却;充分洗涤;3% H₂O₂作用10 min;充分洗涤;正常羊血清工作液封闭20 min,放置37℃温箱孵育1 h;滴加Avidin封闭液孵育15 min, PBS洗5 min,共3次;滴加Biotin封闭液孵育15 min, PBS洗5 min,共3次。滴加一抗(100 μg·mL⁻¹生物素标记一抗),4℃冰箱孵育过夜;PBS洗5 min,共3次;滴加二抗(辣根酶标记链霉卵白素)室温孵

育20 min;PBS洗5 min,共3次;DAB溶液显色;苏木素染色,冲洗返蓝,盖玻片封固后进行镜检。结果判断标准:细胞无着色为阴性,浅黄色为弱阳性,棕黄色为中度阳性,棕褐色为强阳性。Image J软件分析平均AOD。

2.6 透射电子显微镜检查

2.5%戊二醛前固定后的肾组织用1%锇酸后固定,环氧树脂包埋,超薄切片,再使用1%醋酸铀和枸橼酸铝双染色,用透射电子显微镜观察肾脏肾小球基底膜、足细胞足突的变化及毛细血管内皮细胞下有电子致密物沉积等。

2.7 免疫荧光检查

免疫荧光二步法试验步骤包括:肾组织切片梯度脱蜡水化;抗原修复15 min,取出放置室温冷却;充分洗涤;正常羊血清工作液封闭20 min;滴加一抗,4℃冰箱孵育过夜;PBS洗5 min,共3次;滴加荧光二抗,室温孵育1 h, PBS洗5 min,共3次,荧光封片剂封片,荧光显微镜下观察拍照,以Image J软件分析平均荧光强度。

2.8 统计学方法

使用SPSS 27.0软件进行统计分析,以Levene's检验数据的方差齐性,当方差齐时,则进行单因素方差分析(ANOVA)。如果方差分析(ANOVA)结果有统计学差异,则Dunnett *T*检验进行组间比较检验;如果方差分析(ANOVA)结果无统计学差异,则统计结束。

3 结果

3.1 一般情况

C-BSA中剂量组1只动物给药中操作失误引起动物窒息而死亡,其余组未见动物死亡。C-BSA各剂量组动物在尾iv给予C-BSA后出现不同程度精神萎靡、活动减少、皮肤发红和呼吸急促等过敏症状。溶媒对照组动物给药后无明显异常。

3.2 体质量分析

如表1所示,在加强免疫2周后(即给药期末),与溶媒对照组比较,C-BSA低、中和高剂量组动物体质量增长显著变缓($P<0.05$)。

3.3 尿液分析

如表2所示,给药期末24 h尿蛋白半定量分析结果表明,C-BSA低、中、高剂量组动物尿蛋白呈阳性结果,提示造模组动物肾脏的肾小球滤过功能可能受损。

3.4 血清生化和凝血功能检查结果

给药期末,血清生化检查结果如表3所示,与溶

表1 体质量 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Body weight ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg· kg ⁻¹)	n/ 只	体质量/g		
			加强免疫 前	加强免疫1 周	加强免疫2 周
溶媒对照	—	10	23.4±1.17	24.4±1.11	27.5±1.11
C-BSA	2.5	10	23.6±0.69	24.8±0.87	26.2±1.25*
	5.0	9	23.4±1.17	24.7±1.38	26.2±1.16*
	10.0	10	23.1±1.91	24.7±0.95	26.4±1.21*

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs vehicle control group

表2 24 h尿蛋白的改变

Table 2 Change of 24 h urine protein

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n/只	加强免疫前	加强免疫2周
溶媒对照	—	10	—	—
C-BSA	2.5	10	—	+1
	5.0	9	—	+1
	10.0	10	—	+1

—代表0~300 mg·L⁻¹; +1代表尿蛋白水平为300~1 000 mg·L⁻¹- represents 0—300 mg·L⁻¹; +1 represents a urine protein level of 300—1 000 mg·L⁻¹

媒对照组比较, C-BSA各组动物BUN、SCr、TG均未见规律改变, 仅高剂量组动物的BUN升高, TG降低。凝血功能指标如表4所示, 与溶媒对照组比较, C-BSA中、高剂量组动物PT显著降低($P <$

0.05), 低、中剂量组动物APPT显著降低($P < 0.05$), 低、中、高剂量组动物Fbg含量显著降低($P < 0.001$)。

3.5 脏器质量结果

如表5~7所示, C-BSA低、中和高剂量组动物肾脏的绝对质量和肾脑比虽无统计学差异, 但存在升高趋势。同时发现, 与溶媒对照组比较, C-BSA低、中和高剂量组动物肾脏的脏体比显著升高($P < 0.01$), 且C-BSA低、中和高剂量组动物的脾脏绝对质量和脏体比亦显著升高($P < 0.05, 0.01$)。

3.6 肾脏组织病理学检查和特殊染色检查结果

溶媒对照组和C-BSA低剂量组动物肾脏HE染色结果见图1, 肾小球和肾小管结构未见异常; 而C-BSA中、高剂量组动物肾脏组织病理学检查可见肾小球毛细血管壁轻微增厚、系膜细胞和基质增多以及间质炎性细胞浸润。

PAS染色可将组织中的糖原染成粉红色, 如图2所示, 可显示肾小球内富含糖原的组织如肾小球系膜基质和基底膜。而Masson三色(亮绿法)染色肾小球基底膜呈绿色, 细胞核呈蓝黑色, 细胞质呈红色, 如图3所示。PAS染色和Masson三色染色结果发现, C-BSA中、高剂量组动物肾脏肾小球系膜基质和血管壁附近粉红色或浅绿色物质增多, 提示肾小球系膜基质增多和基底膜增厚。

PASM染色可将肾小球基底膜染成棕黑色, 如图4所示, 可用于肾小球基底膜增厚、断裂和双轨征

表3 血清生化指标 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 3 Clinical chemistry results ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	SCr/(μmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
溶媒对照	—	6.94±0.99	8.4±0.54	0.67±0.05
C-BSA	2.5	6.12±0.94	6.8±1.92	0.66±0.13
	5.0	5.92±0.82	5.8±0.83	0.81±0.26
	10.0	7.09±1.66	7.4±2.00	0.52±0.09

表4 凝血功能指标的改变 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 4 Change of coagulation parameters ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PT/s	APPT/s	Fbg/(g·L ⁻¹)
溶媒对照	—	7.06±0.37	26.9±1.31	2.56±0.40
C-BSA	2.5	6.88±0.08	23.9±1.78*	1.93±0.15***
	5.0	6.70±0.14*	23.9±1.46*	1.86±0.16***
	10.0	6.66±0.20*	25.6±2.05	1.89±0.27***

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs vehicle control group

表5 脏器绝对质量 ($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Absolute organ weights ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	脏器质量/g				
			肾脏	脑	心脏	脾脏	肝脏
溶媒对照	—	10	0.407±0.032	0.443±0.027	0.160±0.021	0.087±0.010	1.224±0.073
C-BSA	2.5	10	0.464±0.032	0.442±0.027	0.178±0.028	0.137±0.042*	1.249±0.129
	5.0	9	0.433±0.057	0.451±0.018	0.171±0.022	0.171±0.022**	1.189±0.096
	10.0	10	0.439±0.039	0.440±0.017	0.170±0.029	0.110±0.022*	1.166±0.128

与溶媒对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs vehicle control group表6 脏器比 ($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Organ weight/body weight ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	脏器比/(g·g ⁻¹)				
			肾脏	脑	心脏	脾脏	肝脏
溶媒对照	—	10	1.479±0.116	1.607±0.074	0.582±0.074	0.316±0.340	4.445±0.179
C-BSA	2.5	10	1.767±0.080**	1.687±0.155	0.625±0.142	0.523±0.179*	4.760±0.566
	5.0	9	1.648±0.198**	1.720±0.078	0.653±0.091	0.653±0.091**	4.530±0.271
	10.0	10	1.658±0.129**	1.665±0.061	0.642±0.106	0.416±0.078**	4.399±0.433

与溶媒对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs vehicle control group表7 脏器脑比 ($\bar{x}\pm s$)
Table 7 Organ weight/brain weight ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	脏器脑比/(g·g ⁻¹)			
			肾脏	心脏	脾脏	肝脏
溶媒对照	—	10	0.362±0.046	0.197±0.035	2.768±0.114	0.362±0.046
C-BSA	2.5	10	0.403±0.060	0.311±0.106	2.828±0.256	0.403±0.060
	5.0	9	0.380±0.045	0.380±0.045	2.637±0.181	0.380±0.045
	10.0	10	0.386±0.059	0.250±0.045	2.644±0.242	0.386±0.059

的检查等,本研究PASM染色结果发现C-BSA中、高剂量组动物肾脏肾小球基底膜增厚。

3.7 肾脏透射电子显微镜检查结果

肾脏透射电子显微镜检查结果如图5所示,溶媒对照组动物肾小球基底膜足突清晰、分布均匀、未出现融合。C-BSA低、中、高剂量组动物可见肾小球基底膜轻微增厚,足突变平或消失,部分融合;且C-BSA中、高剂量组动物可见肾小球基底膜少量电子致密物沉积。

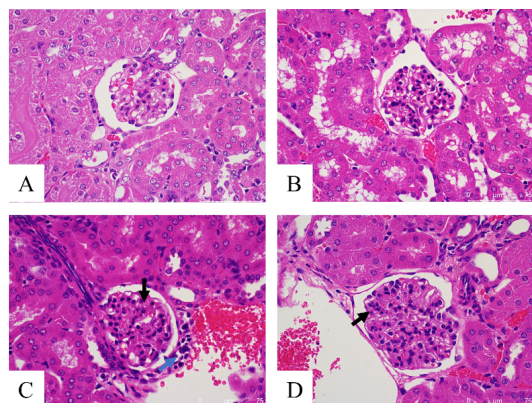
3.8 肾脏免疫组化和免疫荧光检查结果

如图6所示,C3免疫组化检查结果可见C-BSA低、中、高剂量组动物肾脏肾小球毛细血管壁可见C3呈中等强度阳性染色,在系膜基质内呈颗粒状物质沉积,溶媒对照组动物肾脏染色呈阴性。定量分析结果显示,与溶媒对照组比较,C-BSA低、中、高

剂量组动物的C3表达水平均显著升高($P<0.001$),C-BSA低、中、高剂量组动物之间无显著差异。

如图7所示,IgG免疫组化检查结果可见C-BSA低、中、高剂量组动物肾脏肾小球毛细血管壁IgG中等强度阳性染色,呈颗粒状物质沉积,而溶媒对照组动物肾脏染色呈阴性。定量分析结果显示,与溶媒对照组比较,C-BSA低、中、高剂量组动物的IgG表达水平显著升高($P<0.01$ 、 0.001);C-BSA高剂量组动物水平显著高于低、中剂量组动物($P<0.05$)。

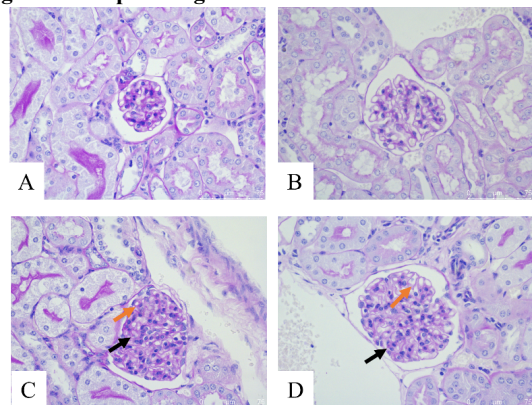
结蛋白的免疫组化检查结果如图8所示,C-BSA低、中、高剂量组动物肾脏肾小球系膜结蛋白呈弱阳性染色,溶媒对照组动物肾脏呈阴性。定量分析结果显示,与溶媒对照组比较,C-BSA低、中、高剂量组动物的结蛋白表达水平显著升高($P<$



A-溶媒对照; B、C、D-C-BSA低、中和高剂量; 黑色箭头-肾小球毛细血管壁轻微增厚、系膜细胞和基质增多; 蓝色箭头-间质炎性细胞浸润
A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; Black arrow-slight thickening of glomerular capillary wall, increase of mesangial cells and matrix; Blue arrow-Interstitial inflammatory cell infiltration

图1 肾脏组织病理学检查结果

Fig. 1 Histopathological examination results of kidneys



A-溶媒对照; B、C、D-C-BSA低、中和高剂量; 箭头-肾脏肾小球系膜基质和血管壁附近粉红色物质增多
A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; Arrow-increased pink material near renal glomerular mesangial matrix and vascular wall

图2 肾脏PAS染色结果

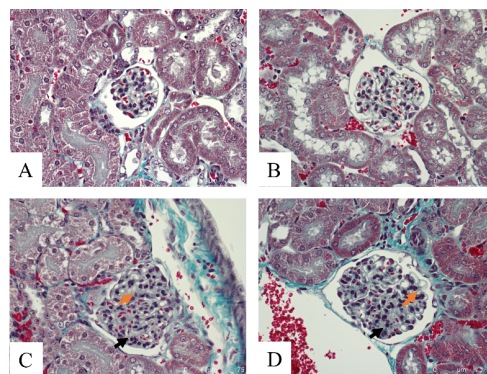
Fig. 2 PAS staining results of kidneys

0.01), 而C-BSA低、中和高组动物之间无显著差异。

C3免疫荧光检查结果如图9所示, C-BSA高剂量组动物肾脏肾小球毛细血管壁可见C3呈中等强度阳性颗粒状荧光, 溶媒对照组和C-BSA低、中剂量组动物肾脏C3呈阴性。平均荧光强度定量结果显示, 与溶媒对照组比较, C-BSA高剂量组C3水平显著升高($P < 0.001$)。

4 讨论

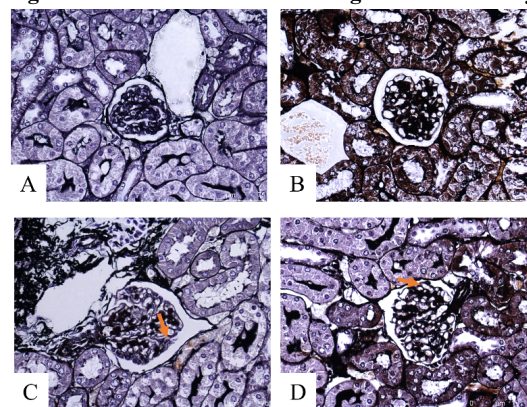
相比Sun等^[7]报道每只动物给予0.4 mg C-BSA, 每隔2天给药1次, 共给药5次; Wu等^[8]报道每只动物给予3 mg·kg⁻¹ C-BSA, 每隔2天给药1次, 共给药9次, 本研究C-BSA低、中、高剂量组分别采用给药质



A-溶媒对照; B、C、D-C-BSA低、中和高剂量; 箭头-肾脏肾小球系膜基质和血管壁附近浅绿色物质增多
A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; Arrow-increased light green material near renal glomerular mesangial matrix and vascular wall

图3 肾脏Masson三色染色结果

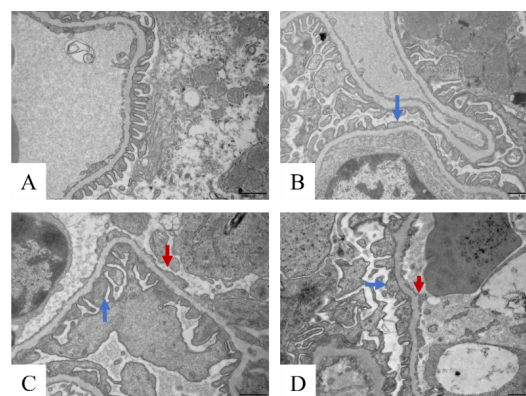
Fig. 3 Masson trichrome staining results of kidneys



A-溶媒对照; B、C、D-C-BSA低、中和高剂量; 箭头-肾脏肾小球基底膜增厚
A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; Arrow-renal glomerular basement membrane thickening

图4 肾脏PASM染色检查结果

Fig. 4 PASM staining results of kidneys

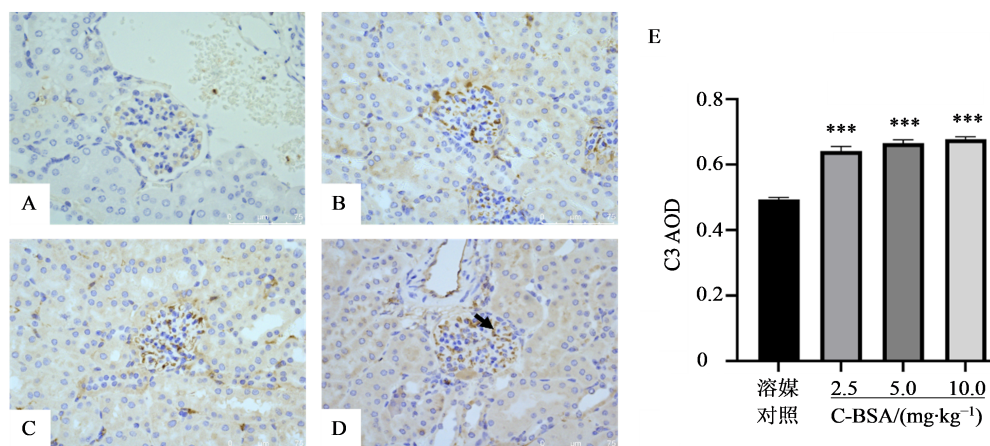


A-溶媒对照; B、C、D-C-BSA低、中和高剂量; 蓝色箭头-肾小球基底膜轻微增厚, 足突变平或消失, 部分融合; 红色箭头-肾小球基底膜少量电子致密物沉积

A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; Blue arrow-slight thickening of glomerular basement membrane, flat or absent foot mutation, partial fusion; Red arrow-deposition of small amounts of electron dense material in the glomerular basement membrane

图5 肾脏透射电子显微镜检查结果

Fig. 5 Transmission electron microscopy results of kidneys

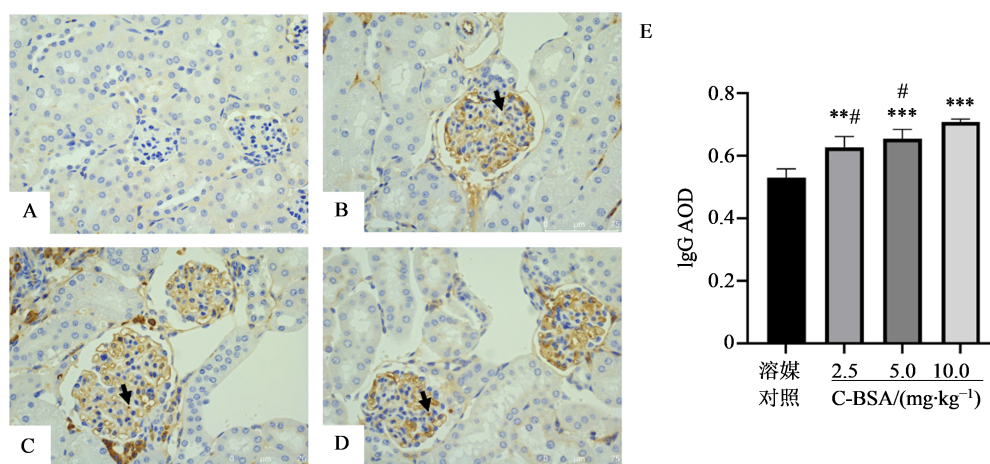


A-溶媒对照;B,C,D-C-BSA低、中和高剂量;E-定量分析;箭头-系膜基质内呈颗粒状物质沉积;与溶媒对照组比较:*** $P < 0.01$

A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; E- quantitative analysis; Arrow-Granular material deposition in mesangial matrix; *** $P < 0.01$ vs vehicle control group

图6 各组动物肾脏C3免疫组化结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Immunohistochemical results of C3 of kidney of animals of different groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-溶媒对照;B,C,D-C-BSA低、中和高剂量;E-定量分析;箭头-肾脏肾小球毛细血管壁IgG呈颗粒状物质沉积;与溶媒对照组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与C-BSA高剂量组比较:# $P < 0.05$

A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; E- quantitative analysis; Arrow-Granular deposition of IgG in capillary wall of renal glomeruli; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.01$ vs vehicle control group; # $P < 0.05$ vs C-BSA high-dose group

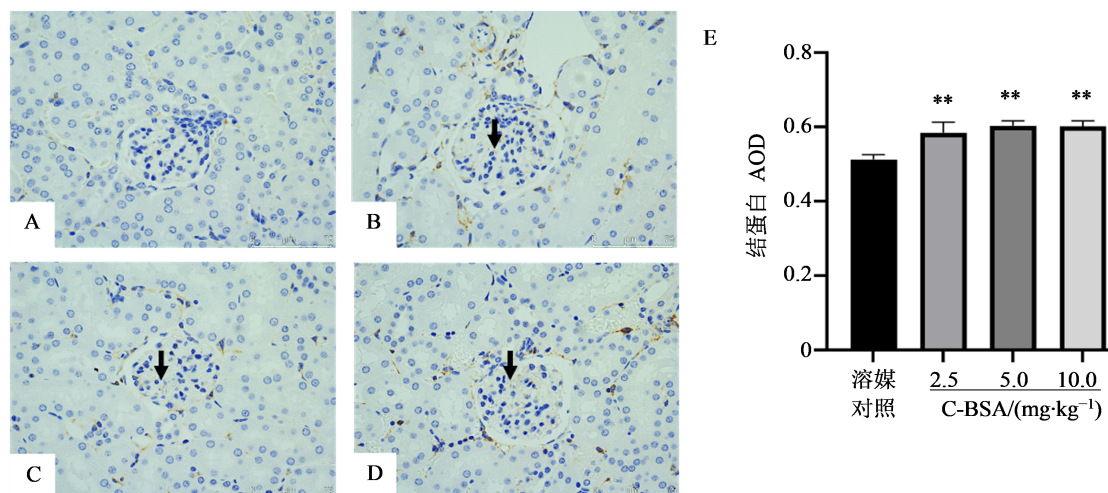
图7 各组动物肾脏IgG免疫组化结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Immunohistochemical results of IgG of kidney in animals of different groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

量浓度为0.25、0.50、1.00 mg·mL⁻¹,给药体积均为10 mL·kg⁻¹,C-BSA低、中、高剂量组动物给药剂量分别为2.5、5.0、10 mg·kg⁻¹,每3天给药1次,共给药5次。本研究根据动物体质量的改变进行调整和计算不同组动物C-BSA的给药量,有助于模型构建和随后分析肾脏病变的剂量效应关系。本研究发现C-BSA低、中、高剂量组动物在加强给药后出现精神萎靡、活动减少和呼吸急促等过敏反应症状^[9],但仅C-BSA中剂量组1只动物在给药过程中因操作失误引起动物窒息而死亡,其他组动物均未见死亡。结果表明本研究造模剂量的设计合理,动物可以良

好耐受过敏反应症状。与之前文献报道的模型构建方法相比,本研究增加了5、10 mg·kg⁻¹ C-BSA剂量组,共给药5次,可为今后快速构建小鼠IC性肾损伤模型提供参考和借鉴。

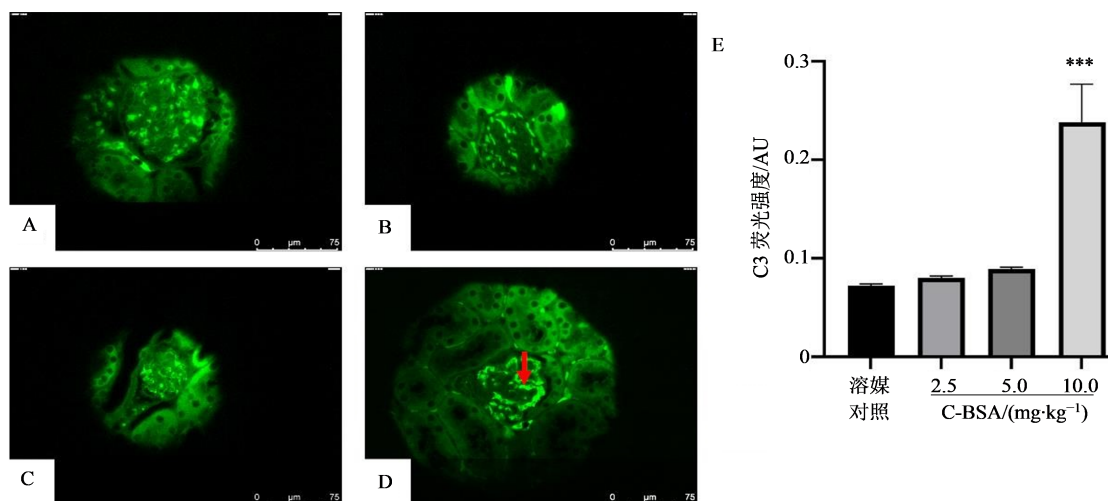
本研究C-BSA低、中和高剂量组动物在给药期末出现蛋白尿,并表现出体质量增长减缓情况。血清生化检查造模低、中和高剂量动物BUN、SCr、TG等指标均未见规律改变,仅高剂量组动物BUN升高。可能是由于肾脏的代偿和储备能力很强,只有当肾功能严重不全时,BUN和SCr才会显著升高^[10]。本研究构建的模型可能处于肾脏损伤的早



A-溶媒对照;B,C,D-C-BSA低、中和高剂量;E-定量分析;箭头-肾小球系膜结蛋白呈弱阳性染色;与溶媒对照组比较:** $P < 0.01$
A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; E- quantitative analysis; Arrow-kidney glomerular mesangial desmoprotein shows weak positive staining; ** $P < 0.01$ vs vehicle control group

图8 各组动物肾脏结蛋白免疫组化结果

Fig. 8 Immunohistochemical results of desmin of kidney of animals of different groups



A-溶媒对照;B,C,D-C-BSA低、中和高剂量;E-定量分析;箭头-C3呈中等强度阳性颗粒状荧光;与溶媒对照组比较:*** $P < 0.01$
A-vehicle control; B, C, D-C-BSA low, medium, and high doses; E-quantitative analysis; Arrow-C3 exhibits moderate intensity positive granular fluorescence; *** $P < 0.01$ vs vehicle control group

图9 各组动物肾脏C3免疫荧光检查结果

Fig. 9 Immunofluorescence examination results of C3 of kidney of animals of different groups

期阶段,因此,BUN和SCr未见显著升高,但高剂量组动物BUN升高提示可能有肾功能损伤。肾脏组织病理学检查结果显示,C-BSA中、高剂量组动物肾脏存在炎性细胞浸润,系膜细胞和基质增多;而且PAS、Masson三色和PASM 3种特殊染色结果显示C-BSA中、高剂量组动物肾脏的肾小球基底膜增厚、系膜基质增多,结果和文献报道一致^[8],提示本研究IC性肾损伤模型构建成功。同时,透射电子显微镜结果显示,C-BSA低、中和高剂量组动物可见肾小球基底膜轻微增厚,足突变平或消失,部分融合;C-BSA中、高剂量组动物可见肾小球基底膜少

量电子致密物沉积,进一步证实了本研究IC性肾损伤模型构建成功。本研究构建IC性肾损伤模型时发现,诱导免疫和加强免疫过程中免疫乳剂的浓度和持续时间都十分重要,浓度合理的免疫乳剂较长时间持续存在可缩短加强免疫的给药时间并可加重模型的肾损伤程度;加强免疫过程中动物体内维持较长时间且浓度稳定的C-BSA水平对IC性肾损伤模型成功构建影响亦很重要^[11]。

本研究进一步筛选了多种IC性肾损伤早期、简便、灵敏的检测方法和候选生物标志物。首先,免疫组化检查结果显示C3和IgG在C-BSA低、中、高

组动物肾脏均呈阳性结果,而且定量分析结果均较溶媒对照组动物显著升高,与Boysen等^[12]报道结果类似。其次,C3免疫荧光检查结果显示C-BSA高剂量组动物肾脏C3沿着毛细血管壁呈颗粒状分布,而且平均荧光强度较溶媒对照组动物显著升高。再次,本研究进一步探究了造模组动物肾脏结蛋白的变化,结蛋白是一种中间丝状体蛋白,正常情况肾小球中不表达,当足细胞损伤时,结蛋白表达可增加^[13]。本研究结蛋白免疫组化结果表明C-BSA低、中和高剂量组动物肾脏的结蛋白呈弱阳性,且定量分析结果均较溶媒对照组动物显著升高。上述免疫组化和免疫荧光检查结果表明补体C3、IgG和结蛋白可以较早期、简便、灵敏、快速地检查IC性肾损伤,并且可作为非临床药物安全性评价毒性研究中检测IC性肾损伤的候选生物标志物。

药物非临床安全性评价毒性试验中生物技术药物诱导的IC性肾损伤被广泛关注,并且仅通过肾脏的常规组织病理学检查很难发现,其发病机制尚未完全明确,早期、简便、灵敏的检测技术和生物标志物有待进一步建立和验证。本研究采用C-BSA成功构建了IC性肾损伤BALB/c小鼠模型,并进一步研究了检测这种类型肾损伤的早期、简便、灵敏检测方法和候选生物标志物,希望本研究能够为今后我国生物技术药物非临床安全性评价毒性试验中IC性肾损伤的检测和毒性病理学评价提供一些参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kroenke M A, Barger T E, Hu J, et al. Immune complex formation is associated with loss of tolerance and an antibody response to both drug and target [J]. Front Immunol, 2021, 12: 782788.
- [2] Rojko J L, Evans M G, Price S A, et al. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: Review and case studies [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(4): 725-764.
- [3] Border W A, Ward H J, Kamil E S, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen [J]. J Clin Invest, 1982, 69(2): 451-461.
- [4] Adler S G, Wang H, Ward H J, et al. Electrical charge. Its role in the pathogenesis and prevention of experimental membranous nephropathy in the rabbit [J]. J Clin Invest, 1983, 71(3): 487-399.
- [5] Borza D B, Zhang J J, Beck L H, Jr., et al. Mouse models of membranous nephropathy: The road less travelled by [J]. Am J Clin Exp Immunol, 2013, 2(2): 135-145.
- [6] Chen J S, Chen A, Chang L C, et al. Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine serum albumin: Antigen dose-response relations and strain differences [J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(11): 2721-2728.
- [7] Sun P C, Feng S J, Guan Q N, et al. Clusterin deficiency predisposes C57BL/6j mice to cationic bovine serum albumin-induced glomerular inflammation [J]. J Inflamm Res, 2020, 13: 969-983.
- [8] Wu H H, Chen C J, Lin P Y, et al. Involvement of prohibitin 1 and prohibitin 2 upregulation in cBSA-induced podocyte cytotoxicity [J]. J Food Drug Anal, 2020, 28(1): 183-194.
- [9] Akarsu A, Soyer O, Sekerel B E. Hypersensitivity reactions to biologicals: From bench to bedside [J]. Curr Treat Options Allergy, 2020, 7(1): 71-83.
- [10] 邸志权, 王晶晶, 滕晋莹, 等. 阳离子化牛血清白蛋白致大鼠慢性肾炎模型的研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(5): 484-490.
- [11] Di Z Q, Wang J J, Teng J Y, et al. Discussion on rat model of chronic nephritis induced by cationic bovine serum albumin [J]. Drug Eval Res, 2015, 38(5): 484-490.
- [12] Wu C C, Chen J S, Lin S H, et al. Experimental model of membranous nephropathy in mice: Sequence of histological and biochemical events [J]. Lab Anim, 2008, 42(3): 350-359.
- [13] Boysen L, Viuff B M, Landsy L H, et al. Formation and glomerular deposition of immune complexes in mice administered bovine serum albumin: Evaluation of dose, frequency, and biomarkers [J]. J Immunotoxicol, 2019, 16(1): 191-200.
- [13] Liu B H, Lu R R, Li H L, et al. Zhen-wu-Tang ameliorates membranous nephropathy rats through inhibiting NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome [J]. Phytomedicine, 2019, 59: 152913.

[责任编辑 兰新新]