

适合治疗给药的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型的建立与应用

石祖胶¹, 陈芙蓉^{2*}, 姜 溪², 只德广², 岳 南², 孙双勇²

1. 贵州省人口和计划生育科学研究技术指导所, 贵州 贵阳 550004

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300300

摘 要: **目的** 建立适合治疗给药的大鼠抗肾小球基底膜 (GBM) 肾炎模型。**方法** 采用家兔多点 sc 大鼠肾小球基底膜与弗氏佐剂乳化物的方法进行免疫, 两周 1 次, 共 5 次, 制备抗血清; 分次给大鼠 iv 抗血清, 检测血清循环免疫复合物 (CIC) 水平、肾小球基底膜免疫荧光强度、肾脏及肾小球基底膜病变, 确定适合治疗给药的抗血清效价、免疫剂量、方式及时间。以固肾 2 号为治疗药物, 验证模型的可行性。**结果** 使用效价为 1:4 的兔抗大鼠 GBM 血清 4 mL, 分 3 d 4 次 iv 免疫, 免疫第 6、8、10 天, 均能形成大鼠抗肾小球基底膜肾炎, 免疫第 6 天, 病变相对较轻, 免疫第 8 天及第 10 天, 病变基本稳定。验证实验结果显示, 连续给药 30 d, 固肾 2 号显著降低模型大鼠 24 h 尿蛋白排出, 减轻肾脏病变, 对大鼠抗肾小球基底膜肾炎有明显治疗作用。**结论** 使用效价为 1:4 的兔抗大鼠 GBM 血清 4 mL, 分 3 d 4 次 iv 免疫, 免疫后 8 d, 能形成适合治疗给药的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型。

关键词: 抗肾小球基底膜肾炎; 固肾 2 号; 尿蛋白; 免疫荧光; 抗血清效价

中图分类号: R285.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)17-3568-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.018

Methodology establishment and application of therapeutic treatment on rats with anti-glomerular basement membrane nephritis

SHI Zu-jiao¹, CHEN Fu-rong², JIANG Xi², ZHI De-guang², YUE Nan², SUN Shuang-yong²

1. Guizhou Provincial Institute of Population and Family Planning, Guiyang 550004, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd., Tianjin 300300, China

Abstract: **Objective** To establish a suitable model for therapeutic treatment on rats of anti-glomerular basement membrane nephritis. **Methods** Rabbit with rat glomerular basement membrane and Freund's adjuvant were immunized by multi-point subcutaneous injection biweekly, five times totally, and the antiserum was prepared. Experimental model for therapeutic treatment was established. Serum level of immune complex (CIC), intensity of immunofluorescence of glomerular basement membrane, lesion of kidney and glomerular basement membrane was measured by multiple intravenous injection of antiserum to rats to determine suitable experiment conditions including titer of antiserum, dose of antiserum, method and time of antiserum injection. The model was observed the efficacy using Gushen 2 as therapeutic drug. **Results** Rats with 4 mL antiserum (titer 1:4) by intravenous injection were immunized 4 times 3 d. Rat anti-glomerular basement membrane nephritis form on day 6, 8, and 10 since immunization; Pathogenic condition were relatively mild on day 6 since immunization and basically stable on day 8 and 10 since immunization. Verification tests showed that, Gushen 2 significantly reduced the 24 h urine protein excretion, relieved kidney lesion for 30 consecutive days, which had obvious therapeutic effect on rats with anti-glomerular basement membrane of nephritis. **Conclusion** Rats immunized with 4 mL antiserum (titer 1:4) by intravenous, immune points up to 4 times 3 d, rat anti-glomerular basement membrane nephritis model form which are suitable for therapeutic treatment of drug on day 8 since immunization.

Key words: anti-glomerular basement membrane nephritis; Gushen 2; urine protein; immunofluorescence; antiserum valency

抗肾小球基底膜肾炎是一种常见的, 具有特征性病因的慢性肾小球肾炎, 其病变特点是肾小球内

有大量新月体形成、免疫球蛋白 (IgG) 沿肾小球基底膜 (GBM) 线性沉积、血清抗 GBM 抗体增多^[1],

收稿日期: 2017-02-16

作者简介: 石祖胶 (1965—), 女, 从事药物临床前药理学研究。Tel: (1351)8515331 E-mail: 577246199@qq.com

*通信作者 陈芙蓉 (1982—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事临床前药效学研究工作。Tel: (022)84845240 E-mail: chenfr@tjipr.com

预后不良,易引起慢性肾衰竭。iv 兔抗大鼠 GBM 抗血清诱导的大鼠肾小球基底膜肾炎实验模型在慢性肾小球肾炎的发病机制和防治研究领域应用广泛。当前,开发治疗慢性肾小球肾炎的新药,要求观察对大鼠抗肾小球基底膜肾炎的治疗效果,以期为临床试验提供可靠的依据。但以往的研究中还存在明显不足,由于抗肾小球基底膜肾炎模型制备方法复杂,周期较长,实验研究多以预防给药为主,忽略了大鼠个体差异等问题,造成开始给药时分组不均衡,导致实验结果不可靠,不符合现行的新药审评要求。

慢性肾小球肾炎病症复杂,治疗时间较长,动物的病变程度尤为关键,如果病变较重会造成动物过早死亡,而病变较轻会过早恢复正常,限制了药物治疗的时间,尤其对于中药,一般作用较温和、治疗时间较长,就难以观察到治疗效果。因此,迫切需要建立稳定的适合治疗给药的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型。本实验主要依据抗血清效价、免疫方式、免疫剂量等,确定适合给药的时间,建立了较为稳定的适合治疗给药的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型。

固肾2号由黄芪、五味子、丹参等多味中药组成,具有补脾、活血、利湿等功效,临床用于治疗慢性肾小球肾炎。在前期的新药药效研究中,观察到固肾2号对家兔牛血清白蛋白(C-BSA)及大鼠 Heymann 肾炎均有明显的防治作用。本研究用固肾2号对建立的适合治疗给药的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型进行了实验验证。

1 材料

1.1 药物与试剂

固肾2号(棕色粉末,批号 20150713,每克粉末相当于 3.10 g 生药),由天津药物研究院中药现代研究室提供;肾炎康复片(天津同仁堂集团股份有限公司生产,批号 FP17059);完全弗氏佐剂(Sigma 公司,批号 F5881);不完全弗氏佐剂(Sigma 公司,批号 F5506);兔血清 IgG (Sigma 公司,批号 15006);兔抗 IgG (whole molecule) -FITC (Sigma-Aldrich 公司,批号 F9887);鼠抗 IgG (whole molecule) -FITC (Sigma-Aldrich 公司,批号 F1763);Regular Agaroseg-10 (Gene Company 公司,批号 111860);尿蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20150828、20160918);尿蛋白试纸(广州市珠江生化试剂有限公司,批

号 20140601)。

1.2 动物

日本大耳白家兔,普通级,体质量 2.0~2.5 kg,北京隆安实验动物养殖中心提供,许可证编号 SCXK(京)2014-0003;SD 大鼠,SPF 级,体质量 240~260 g,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号 SCXK(京)2012-0001。

1.3 仪器

TU-1810 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;7080 型全自动生化仪,日立公司;SCIENT2-IID 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;HERACELL 150i CO₂ 培养箱,Thermo 公司。OLYMPUS BX53 BX51 显微镜,日本奥林巴斯光学株式会社;VIP5J-F2 脱水机,日本樱花检验仪器株式会社;Leica EG-1150H+C 包埋机,德国 Leica 公司;樱花 IVS-410 切片机,日本大和光机工业株式会社;YD-335 切片机,金华市异迪医疗设备有限公司;DRS-2000J-D2 染色机,日本樱花检验仪器株式会社;Glas-J2 封片机,日本樱花检验仪器株式会社;TS100-F 倒置荧光显微镜,日本 Nikon 公司。

2 方法与结果

2.1 大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型的建立

2.1.1 大鼠 GBM 抗原制备 选用雄性 SD 大鼠,体质量 240~260 g,麻醉后分离双肾,剪碎肾皮质,过 50 目不锈钢筛网,取滤液置 200 目筛网滤过,取上层滤渣,显微镜观察为富含肾小球沉积物,将获得的肾小球用 0.1 mol/L PBS (pH 值 7.4) 洗 3 次 (3 000 r/min, 5 min),然后重新混悬,使用超声粉碎仪在冰水浴中分 3 次破碎肾小球(每次超声 3 min,每超声 2 s 后停顿 3 s),显微镜观察肾小球基本被击碎,4 ℃离心 (4 000 r/min, 15 min),调节质量浓度 10 g/L, -20 ℃分装保存,备用。

2.1.2 抗血清(兔抗鼠 GBM 血清)制备 选用雄性日本大耳白兔 20 只,除 2 只做正常对照外,其余均多点 sc 大鼠 GBM 与等量弗氏佐剂(首次用完全佐剂,其后采用不完全佐剂)乳化物进行免疫,免疫剂量每只兔 10 mg 抗原,每 2 周 1 次,共 5 次。末次免疫后 1 周,颈总动脉取血,分离血清 (3 000 r/min, 15 min),双向免疫扩散法测得抗体效价为 1:4。

2.1.3 大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型的建立 选用雄性 SD 大鼠 26 只,体质量 250 g 左右,除 6 只大鼠作对照组外,其余大鼠用于造模。首先,进行

预免疫, 将 1 mg 兔血清 IgG 溶解于 0.5 mL 生理盐水, 与等量完全弗氏佐剂充分乳化, 进行 ip (1 mL/只), 1 周后正式免疫, 模型组大鼠免疫第 1 天尾 iv (1 mL/只) 的兔抗大鼠 GBM 血清原液, 第 2 天 iv 2 mL (1 mL/次, 间隔 1 h); 第 3 天 iv 1 mL^[2-3]。免疫过程中, 每次 iv 抗血清后第 2 天用尿蛋白试纸监测尿蛋白, 尿蛋白显示在 (++)~(+++) 时即停止注射。并在免疫第 6、8、10 天分别麻醉对照组及模型组部分动物, 检测以下指标: (1) 血清循环免疫复合物 (CIC) 水平 (以吸光度值表示); (2) 肾小球基底膜免疫荧光强度 (荧光强度分为 5 级: 0 级无荧光; 1 级荧光弱; 2 级荧光弱但清晰; 3 级荧光明亮; 4 级荧光闪亮^[2,4]); (3) 肾脏病理; (4) 免疫第 8 天取部分动物肾脏, 做电镜检测。

2.1.4 各指标测定结果比较

(1) 血清 CIC 水平: 免疫第 6、8、10 天, 模型组大鼠血清 CIC 水平均较对照组增加, 免疫第 8、10 天, 2 组血清 CIC 水平趋于稳定, 见表 1。

表 1 免疫不同时间血清 CIC 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum level of immune complex in rat in different time ($\bar{x} \pm s$)

组别	CIC 值 (动物数)		
	免疫第 6 天	免疫第 8 天	免疫第 10 天
对照	5.3±1.2 (2)	4.4±1.0 (2)	4.6±2.8 (2)
模型	8.9±2.3 (5)	10.6±5.8 (6)	10.1±5.3 (6)

(2) 肾小球基底膜免疫荧光强度: 免疫第 6、8、10 天, 对照组大鼠肾小球基底膜未见 IgG 沉积, 模型组兔 IgG、大鼠 IgG 均沿肾小球基底膜呈不同程度的线性沉积, 这是肾小球基底膜肾炎的标志之一。免疫第 8、10 天, 荧光强度相当, 结果见图 1 和表 2。

(3) 肾脏病理: 光镜检查, 与对照组比较, 免疫第 6、8、10 天模型组大鼠可见不同程度的肾脏病变: 肾小管扩张、管型、上皮细胞肿胀、变性, 肾小球肿大, 球内有核细胞数增多, 见图 2。

(4) 肾脏电镜检查: 对照组大鼠肾小球结构正常, 毛细血管通畅, 血管内皮细胞无损伤和变性, 基底膜结构完整、平滑、无增厚; 系膜细胞和足细胞结构正常, 足突无增宽和融合; 肾小管无损伤。模型组大鼠免疫第 8 天, 与对照组比较, 肾小球毛细血管周围渗出明显, 基底膜增厚, 电子密度不均, 可见高密度沉积物和低密度渗出物, 部分区域内皮细胞与基底膜分离, 血管内皮细胞水肿; 足细胞突出变大、增宽和融合; 肾小管损伤明显, 管腔内有蛋白渗出物, 见图 3。

综上所述, 免疫第 6、8、10 天, 均能形成大鼠抗肾小球基底膜肾炎, 免疫第 6 天, 病变相对较轻, 免疫第 8、10 天, 病变基本稳定。

2.1.5 造模条件的确定 使用效价为 1:4 的兔抗大鼠 GBM 血清 4 mL, 分 3 d 4 次 iv 免疫, 免疫第 8 天, 病变基本稳定, 形成适合治疗给药的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型。

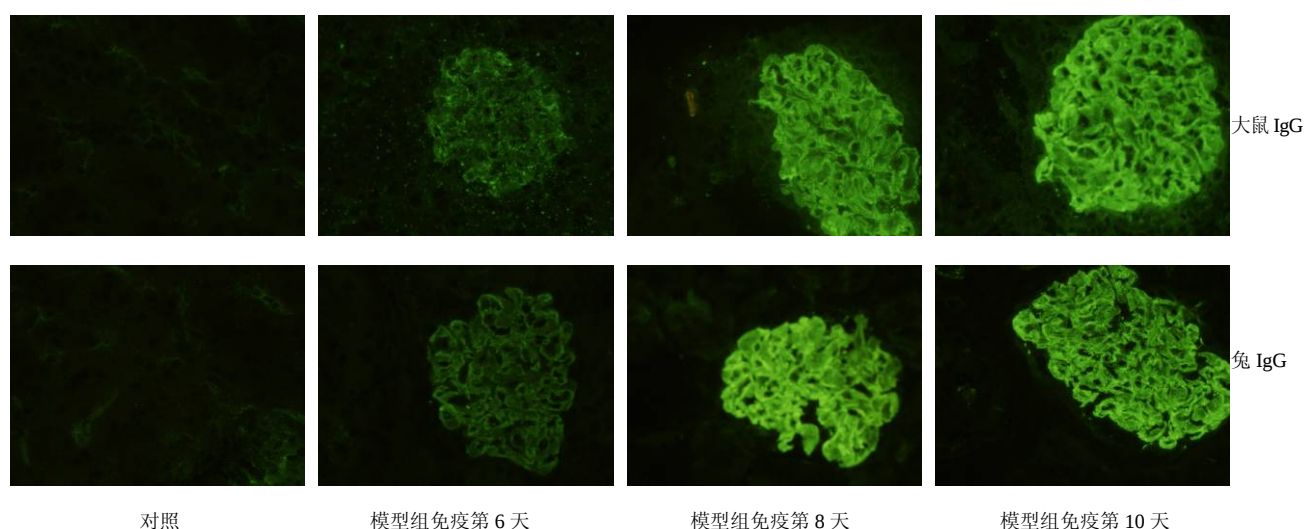


图 1 免疫不同时间肾小球基底膜免疫荧光检测结果 (×400)

Fig. 1 Rat IgG and rabbit IgG level of glomerular basement membrane in rat in different time (×400)

表 2 免疫不同时间肾小球基底膜大鼠 IgG 和兔 IgG 水平变化

Table 2 Rat IgG and rabbit IgG level of glomerular basement membrane in rat anti-glomerular basement membrane nephritis in different time

组别	免疫时间	大鼠 IgG 不同荧光强度的动物数					兔 IgG 不同荧光强度的动物数				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
对照	第 6 天	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
	第 8 天	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
	第 10 天	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
模型	第 6 天	0	4	1	0	0	0	3	1	1	0
	第 8 天	0	1	1	3	1	0	2	0	1	3
	第 10 天	0	0	2	3	1	0	1	1	2	2

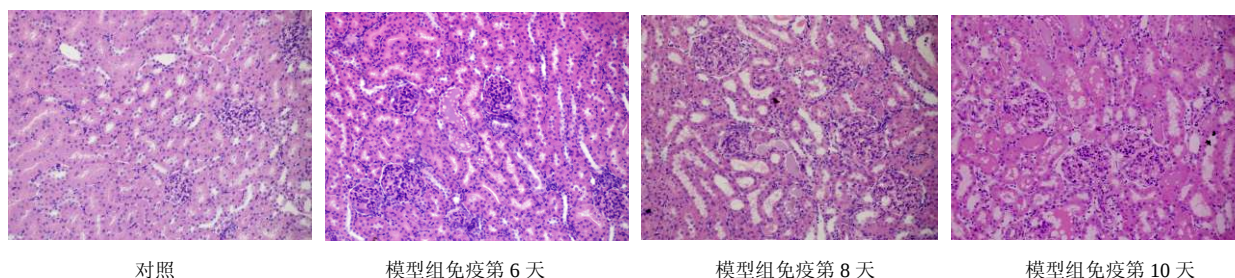


图 2 免疫不同时间肾脏病理的变化 (HE, ×200)

Fig. 2 Lesion of kidney in rat anti-glomerular basement membrane nephritis in different time (HE, × 200)

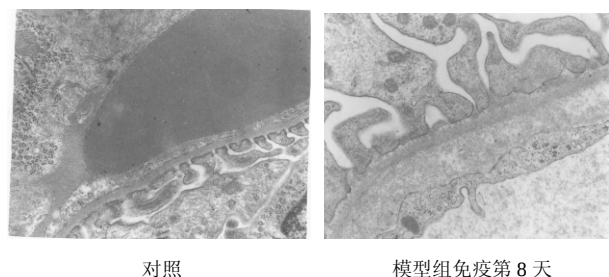


图 3 免疫第 8 天肾小球基底膜的变化 (电镜, ×20 000)

Fig. 3 Lesion of glomerular basement membrane in rat anti-glomerular basement membrane nephritis on day 8 since immunization (electron microscope, × 20 000)

2.2 治疗给药模型的验证

2.2.1 造模、分组、给药及指标测定 选用雄性 SD 大鼠 120 只, 体质量 180~200 g, 随机取 10 只为对照组, 其余大鼠用于造模。按照“2.1.5”项下确定的方法进行免疫, 免疫第 8 天, 将造模成功的大鼠 (随机取 55 只) 按 24 h 尿蛋白定量随机均衡 (采用 24 h 尿蛋白定量区组随机分组, 使组间尿蛋白及各生化指标无明显统计学差异) 分为模型组, 固肾 2 号低、中、高剂量 (生药 2、4、8 g/kg) 组, 肾炎康复片 (药粉, 1.3 g/kg 剂量, 临床等效量的 2

倍) 组, 每组 11 只。各组分别 ig 给药, 每天 1 次, 连续 30 d, 给药体积均为 10 mL/kg, 对照及模型组 ig 给予等容量 0.5% CMC-Na。实验过程中测定如下指标: (1) 给药第 5、10、20、30 天检测 24 h 尿蛋白定量; (2) 分别于给药前和给药后测定血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG) 水平 (均由全自动生化仪测定); (3) 检测血清 CIC 水平 (以吸光度值表示); (4) 每只动物取肾脏, 一个进行 HE 和 PAS 染色, 光镜检查大鼠肾组织病变; 另一个用生理盐水灌流后在 -80 °C 冰箱中冷冻保存, 用于免疫荧光检查, 观察大鼠 IgG、兔 IgG 在肾小球基底膜上的沉积; 荧光强度采用 Image J 软件计算, 采用配对 *t* 检验进行统计分析, 其他指标采用 Excel 2007 进行 *t* 检验。

2.2.2 对 24 h 尿蛋白定量的影响 与对照组比较, 模型组 24 h 尿蛋白均明显升高 ($P < 0.01$), 表明造模成功; 与模型组比较, 各给药组均无明显差异, 表明分组合理。给药第 20 天, 与模型组比较, 固肾 2 号高剂量能显著降低 24 h 尿蛋白定量 ($P < 0.05$); 给药第 30 天, 与模型组比较, 固肾 2 号高、

中剂量及阳性药肾炎康复片均能显著降低 24 h 尿蛋白定量 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明固肾 2 号能明显减少尿蛋白排出, 减轻肾炎症状, 结果见表 3。

2.2.3 对血清生化指标的影响 给药前, 与对照组比较, 模型组及各给药组的 BUN、TC、TG 水平明显升高 ($P<0.01$), TP、ALB、Cr 水平明显降低 ($P<0.01$), 显示已造成脂代谢紊乱, 肾功能损伤; 与模型组比较, 组间各项指标均无明显差异, 显示分组均衡合理。给药 30 d 后, 与模型组比较, 固肾 2 号高剂量明显升高 ALB 水平 ($P<0.05$), 高、中、低剂量及阳性药肾炎康复片均能显著降低 TC 水平 ($P<0.05$), 表明固肾 2 号能改善脂代谢, 减轻肾损伤, 结果见表 4 和 5。

2.2.4 对肾小球基底膜大鼠 IgG、兔 IgG 水平的影响 免疫荧光检查, 对照组大鼠肾小球基底膜未见大鼠 IgG、兔 IgG 沉积; 模型组大鼠肾小球基底膜大鼠 IgG、兔 IgG 显著增加; 与模型组比较, 固肾 2 号高剂量、阳性药肾炎康复片能显著降低大鼠 IgG、兔 IgG 在肾小球基底膜的沉积; 固肾 2 号中剂量显著降低兔 IgG 在肾小球基底膜的沉积。表明固肾 2 号能显著减轻大鼠肾小球基底膜病变, 结果

见表 6。

2.2.5 对血清 CIC 水平的影响 与正常对照组比较, 模型组血清 CIC 水平明显增加 ($P<0.01$); 给药 30 d, 与模型组比较, 固肾 2 号高、中剂量及阳性药肾炎康复片均能显著降低血清 CIC 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 结果见表 6。

2.2.6 对肾脏病变的影响 肾脏组织经修块, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 连续切片 2 张, 分别进行 HE 和 PAS 染色, 光镜下进行组织学检查。正常对照组肾脏皮髓质、肾小球、肾小管结构完整清晰, 间质未见明显异常。模型组肾脏可见中至重度病变: 肾小球肿大, 鲍曼囊扩张, 球内有核细胞数增多, 基底膜增厚; 肾小管再生、扩张、管型, 上皮细胞变性; 间质炎细胞浸润。固肾 2 号各剂量组及肾炎康复片组, 肾脏病变均有不同程度的改善。

固肾 2 号通过调节脂代谢、改善肾功能、降低血清 CIC 水平、抑制肾小球基底膜上大鼠 IgG 及兔 IgG 的沉积、减轻肾脏病变, 显示对大鼠抗肾小球基底膜肾炎有明显的治疗作用, 也表明建立的大鼠抗肾小球基底膜肾炎治疗给药实验模型成功合理。

表 3 固肾 2 号对抗肾小球基底膜肾炎大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Gushen 2 on 24 h urine protein quantitative in rat anti-glomerular basement membrane nephritis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	24 h 尿蛋白定量/mg (动物数)					
		给药前	给药 5 d	给药 10 d	给药 20 d	给药 30 d	
对照	—	12.1± 3.9 (10)	10.3± 3.3 (10)	14.9± 7.3 (10)	10.6± 4.5 (10)	14.8± 4.3 (10)	
模型	—	489.5±212.8 (11) ^{△△}	549.0±153.5 (11) ^{△△}	709.0±239.3 (11) ^{△△}	545.9±147.5 (11) ^{△△}	410.8± 60.0 (11) ^{△△}	
肾炎康复片	1.3	524.6±256.6 (11)	520.9±151.8 (11)	585.7±208.5 (10)	427.3±112.5 (10)	312.6± 97.8 (10)*	
固肾 2 号	8	541.3±253.8 (11)	525.1±168.0 (11)	583.5±194.3 (11)	413.6±107.8 (11)*	298.8± 85.3 (11)**	
	4	513.9±314.7 (11)	541.2±100.3 (11)	619.7±199.8 (11)	461.3±132.5 (11)	317.9±105.0 (11)*	
	2	509.8±246.3 (11)	548.3±77.6 (11)	681.9±216.1 (11)	486.1±273.6 (11)	354.8±158.2 (11)	

与对照组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下同

[△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, same as below

表 4 给药前各组大鼠的血清生化指标值 ($\bar{x} \pm s, n$)

Table 4 Biochemical index in anti-glomerular basement membrane nephritis before treatment ($\bar{x} \pm s, n$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Cr/(μmol·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	4.40±1.27 (10)	53.5±7.5 (10)	57.7±3.2 (10)	23.9±1.0 (10)	2.19±0.32 (10)	1.03±0.46 (10)
模型	—	8.23±2.90 (11) ^{△△}	40.3±4.0 (11) ^{△△}	39.7±4.9 (11) ^{△△}	12.2±2.7 (11) ^{△△}	7.03±1.96 (11) ^{△△}	3.85±2.77 (11) ^{△△}
肾炎康复片	1.3	7.92±2.77 (11)	39.9±4.6 (11)	41.7±3.8 (11)	13.2±2.5 (11)	6.73±3.57 (11)	3.64±3.05 (11)
固肾 2 号	8	7.60±2.38 (11)	38.2±2.6 (11)	41.0±3.4 (11)	12.9±1.9 (11)	6.51±2.17 (11)	3.25±1.50 (11)
	4	7.66±3.05 (11)	41.8±4.2 (11)	43.3±5.3 (11)	13.4±3.5 (11)	5.63±2.18 (11)	2.71±1.63 (11)
	2	6.29±1.14 (11)	40.5±3.8 (11)	43.5±4.6 (11)	15.0±3.1 (11)	5.33±2.61 (11)	3.58±5.43 (11)

表 5 给药 30 d 各组大鼠的血清生化指标值 ($\bar{x} \pm s, n$)

Table 5 Biochemical index in rat of anti-glomerular basement membrane nephritis after treatment ($\bar{x} \pm s, n$)							
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Cr/(μmol·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	4.71±0.42 (10)	52.8±3.5 (10)	61.6±2.5 (10)	23.9±1.4 (10)	1.54±0.17 (10)	0.49±0.13 (10)
模型	—	4.40±1.11 (11)	50.5±5.6 (11)	58.0±4.2 (11) [△]	20.5±1.9 (11) ^{△△}	8.56±1.97 (11) ^{△△}	3.15±1.34 (11) ^{△△}
肾炎康复片	1.3	5.15±0.86 (10)	50.0±4.6 (10)	57.8±3.8 (10)	21.6±1.4 (10)	6.27±1.77 (10) [*]	2.16±1.35 (10)
固肾 2 号	8	4.88±0.75 (11)	48.5±2.4 (11)	60.8±3.6 (11)	22.3±1.9 (11) [*]	6.40±2.43 (11) [*]	2.80±1.44 (11)
	4	5.22±0.92 (11)	48.6±3.3 (11)	57.2±5.1 (11)	20.8±2.2 (11)	6.49±2.53 (11) [*]	1.91±1.44 (11) [*]
	2	5.45±1.20 (11) [*]	49.5±4.5 (11)	57.8±3.5 (11)	21.8±2.0 (11)	6.25±1.86 (11) [*]	2.32±0.90 (11)

表 6 固肾 2 号对抗肾小球基底膜肾炎大鼠 GBM 大鼠 IgG、兔 IgG 荧光强度和血清 CIC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n$)

Table 6 Effect of Fushen 2 intensity of immunofluorescence of rat IgG and rabbit IgG of glomerular basement membrane in rat of anti-glomerular basement membrane nephritis ($\bar{x} \pm s, n$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	荧光强度		血清 CIC
		大鼠 IgG	兔 IgG	
对照	—	0.000±0.000 (10)	0.000±0.000 (10)	5.5± 0.7 (10)
模型	—	0.239±0.078 (11) ^{△△}	0.225±0.048 (11) ^{△△}	20.6±13.0 (11) ^{△△}
肾炎康复片	1.3	0.166±0.057 (10) [*]	0.184±0.036 (10) [*]	6.8± 3.5 (10) ^{**}
固肾 2 号	8	0.157±0.068 (11) [*]	0.166±0.046 (11) ^{**}	5.5± 2.3 (11) ^{**}
	4	0.208±0.081 (11)	0.172±0.058 (11) [*]	11.0± 6.8 (11) [*]
	2	0.228±0.064 (11)	0.184±0.064 (11)	14.9±11.4 (11)

3 讨论

本实验给大鼠 iv 效价为 1:4 的兔抗大鼠 GBM 血清, 血清注射量为 4 mL, 分 3 d 4 次注射, 免疫第 8 天获得稳定的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型。模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量显著升高, 免疫荧光检测大鼠肾小球基底膜有大鼠 IgG 及兔 IgG 线性沉积, 电镜检测到 GBM 显著增厚, 这些特点与临床上新月体性肾炎完全吻合, 表明造型成功^[5]。验证实验显示, 制备的大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型给药 30 d 仍保持稳定, 显示可以用于治疗给药实验, 尤其适合中药治疗效果的观察。大鼠抗肾小球基底膜肾炎治疗给药模型的成功建立, 主要在于抗血清的效价与免疫剂量的合理选择, 并在抗血清的注射过程中采取分次注射的方式, 过程中实时监测尿蛋白的量, 使模型轻重恰当, 避免了模型过轻容易恢复和模型过重造成大鼠过早死亡的问题。同时, 在制备抗血清的过程中, 减少对家兔免疫次数, 缩短了制备周期, 在降低效价的同时通过增加抗血清注射量以保证模型的成功。

固肾 2 号通过调节脂代谢、改善肾功能、降低血清 CIC 水平、抑制肾小球基底膜上大鼠 IgG 及兔

IgG 的沉积、减轻肾脏病变, 显示对大鼠抗肾小球基底膜肾炎有明显的治疗作用, 也表明建立的大鼠抗肾小球基底膜肾炎治疗给药实验模型成功合理。

抗肾小球基底膜肾炎是急进性肾小球肾炎的一种类型, 约占后者的 20%^[1], 如果不及早确诊和治疗, 易导致患者肾功能衰竭, 致死率高。目前, 普遍采用糖皮质激素、环磷酰胺进行治疗, 但是这些药物作用特异性差、副作用严重^[6], 因此, 寻找有效且副作用少的药物也是亟待解决的现实问题。近年来, 中医药用于治疗肾小球肾炎的研究取得了较大进展, 可避免应用化学药造成的副作用^[7]。但在以往的研究中, 中药对于慢性肾小球肾炎的作用及机制的研究主要采取预防给药的方式^[8-10], 存在一定的不足, 本实验建立了抗肾小球基底膜肾炎治疗给药的实验模型, 并进行了验证, 为今后慢性肾小球肾炎新药的开发提供了依据。

参考文献

- [1] Gupta A, Agrawal V, Kaul A, et al. Anti-glomerular basement membrane crescentic glomerulonephritis: A report from India and review of literature [J]. *Indian J Nephrol*, 2016, 26(5): 335-339.

- [2] 任国辉, 叶伍高, 李幼姬, 等. 大鼠加速型抗肾小球基底膜肾炎的研制 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1994, 3(6): 451-454.
- [3] Bhan A K, Schneeberger E E, Collins A B, *et al.* Evidence for a pathogenic role of a cell-mediated immune mechanism in experimental glomerulonephritis [J]. *J Exp Med*, 1978(148): 246-260.
- [4] 濮雪华, 邢昌赢, 朱璇, 等. 来氟米特对大鼠 Masugi 肾炎的治疗作用 [J]. 江苏医药, 2008, 34(5): 497-499.
- [5] 周春雷. 五肽化合物 PLNPK 对大鼠抗 GBM 肾炎的治疗作用及其作用机制的研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2008.
- [6] Ye T, Zhen J H, Du Y, *et al.* Green tea polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate restores Nrf2 activity and ameliorates crescentic glomerulonephritis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): 1-16.
- [7] 吕冬梅, 吕静. 中药治疗慢性肾小球肾炎临床对照研究文献分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 181-183.
- [8] 孙伟, 汤仁仙, 周峰, 等. 201B 中药合剂对大鼠抗肾小球基底膜肾炎病变的影响 [J]. 中国实用医药, 2008, 3(27): 17-18.
- [9] 汤仁仙, 简洁, 王迎伟, 等. 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.
- [10] 王亿平, 姜益, 胡顺金, 等. 参地颗粒对大鼠抗肾小球基底膜肾炎的干预作用 [J]. 新中医, 2013, 45(1): 136-139.