

刀豆蛋白A诱导小鼠肝纤维化动物模型的建立

谭友文¹, 吴建成² (1. 江苏省镇江市第三人民医院 肝炎科, 镇江 212000; 2. 苏州大学附属第一医院 感染科, 苏州 215006)

摘要: 目的 利用刀豆蛋白A建立昆明小鼠肝纤维化模型并探讨其机制。方法 昆明小鼠210只, 随机分为7组, 正常A组(注射等量生理盐水), 刀豆蛋白A 10 mg每周1~3次(分别为B、C、D组)、15 mg每周1~2次(分别为E、F组)、20 mg每周1次(G组), 采用尾静脉注射法攻击昆明小鼠, 分别在第1周、第5周、第12周和第20周处死3只小鼠, 留取肝组织标本行苏木精-伊红染色、纤维Masson染色, 并行Knodell HAI和Ishak肝纤维化半定量计分, 最后一次留取血清标本, 检测血清IL-18、TNF- α 和IFN- γ 。结果 15 mg每周1次, 10 mg每周2次组实验早期肝脏组织以坏死为主;实验中期(5~12周)坏死减轻, 细小纤维条索出现;实验晚期(20周)纤维间隔逐渐增宽。10 mg每周1次组实验晚期(20周)纤维条索形成, 纤维间隔有增宽趋势。10 mg每周3次组和20 mg每周1次组全部死亡前, 未发现有明显的肝纤维化形成。肝组织炎症活动度半定量计分显示刀豆蛋白A注射次数和注射剂量较大组评分较高($P < 0.05$)。肝纤维化半定量计分显示10 mg每周2次组较15 mg每周1次, 10 mg每周1次组高($P < 0.05$)。各组注射刀豆蛋白A后均出现了IL-18、TNF- α 和IFN- γ 的升高, 并且IL-18和TNF- α 表现出相关性($r = 0.889$, $P < 0.05$)。结论 利用刀豆蛋白A建立昆明小鼠的肝纤维化模型, 其形成机制与IL-18、TNF- α 和IFN- γ 的升高密切相关。

关键词: 刀豆蛋白A; 肝纤维化; 模型; IL-18

The immune hepatic fibrosis model induced by repeatedly injection of concanavalin A in Kunming mice

Tan You-wen¹, Wu Jian-cheng² (1. Department of hepatitis, the third Hospital of ZhenJiang, Zhenjiang 212000, China; 2. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

Abstract: Objective To create the immune hepatic fibrosis model induced by repeatedly injection of concanavalin A in Kunming mice and explore the mechanisms. **Methods** Kunming mice were divided into seven groups, control group mice (Ga) were injected weekly with normal saline, concanavalin A groups were divided into Gb, Gc, Gd, Ge, Gf and Gg. Gb mice were injected with concanavalin A (10 mg/kg) once a week; Gc mice were 10 mg/kg twice a week; Gd mice were 10 mg/kg three times a week; Ge mice were 15 mg/kg once a week; Gf mice were 15 mg/kg twice a week; Gg mice were 20 mg/kg once a week. Twenty-four hours after concanavalin A challenge at 1, 5, 12 and 20 weeks. Three mice were killed by cervical dislocation, respectively. The blood sera were stored at 4 °C for checking up IL-18, TNF- α and IFN- γ . The liver of different groups mice were excised and fixed in 10 % formalin for HE staining and Masson staining or frozen in liquid nitrogen for immunohistochemical staining for IL-18. **Results** At the beginning of experiment (1-5 weeks), hepatocellular necrosis had become widespread throughout the lobule. No evidence of hepatic fibrosis was observed at this period. However, at middle of experiment (6-12 weeks), the small fibrosis strip had been found in Gb, Gc, Gd, Ge, bridging fibrosis and large fibrosis strip in the parenchyma with hepatocellular necrosis was detectable in Gb, Gc, Ge at 20 weeks by HE staining and were higher than control group ($P < 0.05$). Moreover, there were relation between IL-18 and TNF- α ($r = 0.889$, $P < 0.05$). **Conclusions** The immune hepatic fibrosis model could be induced by repeatedly injection of concanavalin A in Kunming mice and the mechanisms related with IL-18, TNF- α and IFN- γ .

Key words: Concanavalin A; Liver fibrosis; Model; IL-18

基金项目: 江苏镇江市社会发展项目 (SH2006074)

通讯作者: 谭友文 Email: tyw915@sina.com

肝纤维化是慢性肝炎进一步发展的结果,尽管肝纤维化的解剖学已经清楚了,但造成这种纤维化的机理却仍不明朗,合适的模型对研究肝纤维化的机理有重要的意义。尽管肝纤维化动物模型可以由CCl₄、胆管结扎和注射动物血清等方法造成^[1-3],但这些模型并不适合用于人类肝纤维化的模型要求,这些模型的形成均未涉及到免疫病理损伤。近年来发现刀豆蛋白A(Con A)可以造成肝细胞损伤^[4],并且证明这种损伤由T细胞介导,与人病毒性肝炎的免疫病理机制非常相似。有学者已利用Con A成功建立了肝纤维化模型^[5-6],本研究用昆明小鼠成功建立了肝纤维化模型,以探讨建立模型的方法及肝纤维化发病机理,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明小鼠210只,6~8周龄,体重18~22 g,购自苏州大学实验动物中心。所有小鼠饲养于苏州大学动物房,22℃,55%相对湿度,12小时昼夜节律,自由进食、饮水。适应环境1周后开始实验。

1.2 主要试剂

刀豆蛋白A、小鼠IL-18、TNF- α 、IFN- γ ELISA检测试剂盒为Sigma公司产品。

1.3 主要方法

1.3.1 动物分组 昆明小鼠随机分为7组,每组各30只,即正常对照组A组;10 mg组又分B组(1次/周),C组(2次/周),D组(3次/周);15 mg组又分E组(1次/周),F组(2次/周);G组,(20 mg,1次/周)。采用尾静脉穿刺注射刀豆蛋白A,共20周。正常对照组注射等量生理盐水。每组分别于第1、5、12和20周末注射后24小时,每次随机选取3只小鼠,眼眶采血法留取血清并处死小鼠,取出肝脏组织,一部分用10%福尔马林固定,用于HE染色和Masson染色。

1.3.2 肝脏组织染色 苏木精-伊红染色、纤维Masson染色,按常规方法进行。

1.3.3 小鼠血清TNF- α 、IFN- γ 、IL-18 采用ELISA法检测,具体参考说明书进行。

1.4 统计学处理

数据表示为 $\bar{x} \pm s$,采用方差分析,所有资料

采用SPSS 12.0软件分析。

2 结果

2.1 各组动物一般情况及死亡数

正常组小鼠无死亡,发育良好,活泼好动;IL-18 10 mg每周1次组、IL-18 10 mg每周2次组、15 mg每周1次组病死率分别为7/18(38.9%)、14/18(77.8%)、11/18(61.1%);10 mg每周3次组小鼠实验中期全部死亡;15 mg每周2次和20 mg每周1次组在实验早期即全部死亡。刀豆蛋白A组动物精神差、活动少、发育迟缓、皮毛松弛、毛色黯淡、厌食、消瘦、体重明显减轻、后期出现大量腹水。各组死亡数比较有显著差异性($\chi^2 = 50.29, P < 0.05$)。

2.2 肝脏组织苏木精-伊红和Masson染色结果

10 mg每周1次、10 mg每周2次组、15 mg每周1次组实验早期(1~4周)肝脏组织病变以坏死为主;实验中期(5~12周)坏死减轻,细小纤维条索出现;实验晚期(20周)纤维间隔逐渐增宽。10 mg每周3次组,15 mg每周2次和20 mg每周1次组可见大量炎症细胞浸润,并有桥接样坏死和碎屑样坏死。10 mg每周3次实验中期可见纤维间隔形成(图1、2)。

2.3 各组小鼠评分

2.3.1 各组小鼠Knodell HAI计分参考文献^[7]进行,结果见表1。

2.3.2 各组小鼠Ishak肝纤维化评分参考文献^[8]进行,结果见表2。

2.4 各组小鼠血清IL-18、TNF- α 、IFN- γ 变化(表3、图3)

3 讨论

合适的模型对研究肝纤维化的机理有重要的意义。理想的肝纤维化动物模型应具有以下特点:①这种模型的发病机制是免疫性的;②肝纤维化由持续的炎症损伤所引起;③肝纤维化的诱导不应该是肝毒性药物。目前,国内外尚未成功建立如此理想的肝纤维化模型。

Con A诱导的肝损伤是T细胞诱导的^[9]。Con A是一种植物凝集素,在体外实验,可以促进T细胞的分裂。Imose等^[10]报道静脉注射BALB/c小鼠8

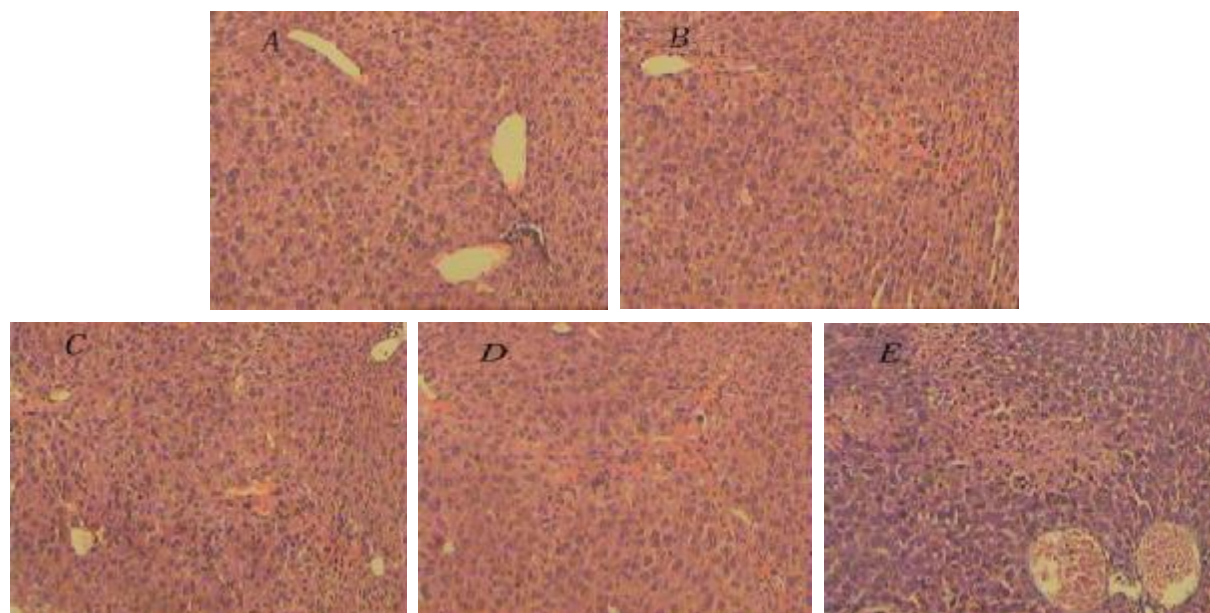


图1 各组肝脏组织HE染色结果

A: A组小鼠, 汇管区清晰, 肝细胞无坏死, 极少量炎症细胞浸润 (HE染色, 250×); B: E组第5周可见桥接样坏死、汇管区大量炎症细胞浸润、细小纤维条束形成 (HE染色, 250×); C: B组第12周纤维条束增宽、小叶间有融合趋势。(HE染色, 100×); D: E组每周1次组第12周纤维条束增宽清晰、肝小叶间纤维融合 (HE染色, 250×); E: E组每周1次组第20周纤维条束明显增宽 (HE染色, 250×)

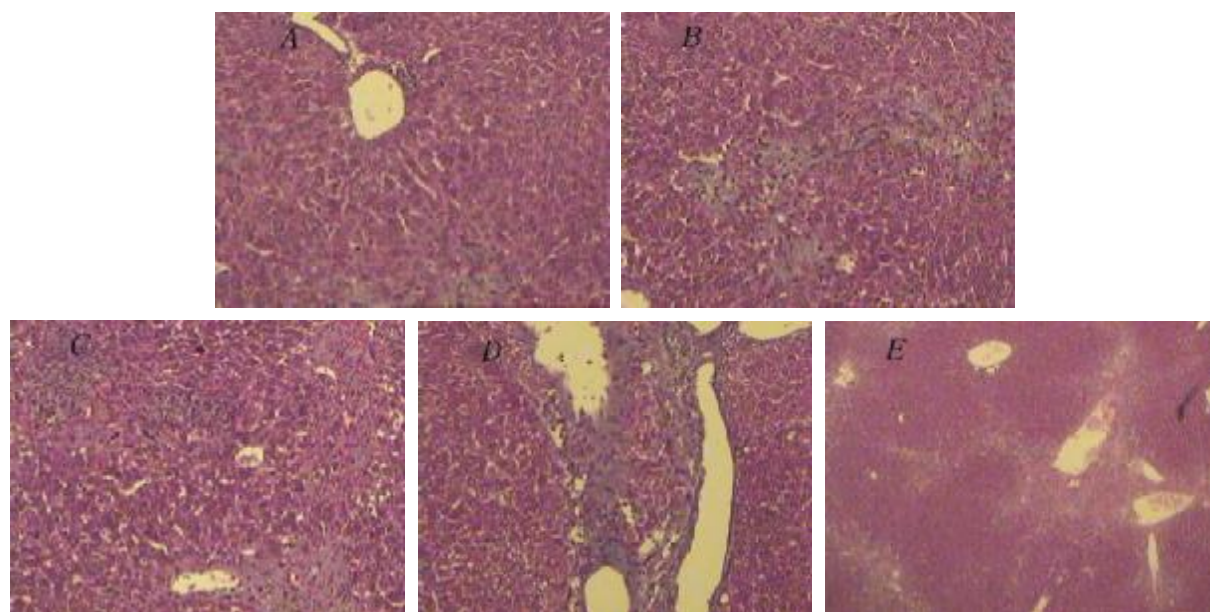


图2 各组小鼠肝脏组织Masson染色结果

A: A组小鼠, 汇管区清晰, 肝细胞无坏死, 极少量炎症细胞浸润 (Masson染色, 250×); B: E组第12周, 可见桥接样坏死, 汇管区大量炎症细胞浸润, 纤维条束形成 (Masson染色, 250×); C: B组第12周, 纤维条束增宽, 小叶间有融合趋势 (Masson染色, 100×); D: B组第20周, 血管周围形成明显纤维条束, 两血管间纤维融合 (Masson染色, 250×); E: E组第20周, 纤维条束明显增宽, 肝小叶间发生融合, 假小叶形成 (Masson染色, 100×)

表 1 各组小鼠KnodeIIHA 计分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1周	第5周	第12周	第20周
A组	0.31 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.01
B组	5.26 ± 1.24*	7.64 ± 1.71*	8.12 ± 1.05*	9.26 ± 1.21*
C组	6.65 ± 2.34*	8.36 ± 2.91*	11.38 ± 2.14*	12.21 ± 2.68*
D组	7.38 ± 2.64*	9.43 ± 2.01*	12.35 ± 2.45*	-
E组	6.64 ± 1.42*	7.38 ± 0.65*	9.56 ± 0.84*	7.82 ± 1.88*
F组	8.75 ± 2.81*	14.34 ± 3.35*	-	-
G组	8.26 ± 3.71*	14.76 ± 4.64*	-	-

注：*与正常组比较, $P < 0.05$

表 2 各组小鼠Ishak肝纤维化半定量计分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第1周	第5周	第12周	第20周
A组	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01
B组	0.21 ± 0.30	1.48 ± 0.45*	3.66 ± 1.22*	5.44 ± 1.76*
C组	0.31 ± 0.04	2.61 ± 0.75*	5.34 ± 1.97*	6.59 ± 2.15*
D组	0.24 ± 0.03	3.47 ± 1.02*	6.82 ± 2.34*	-
E组	0.26 ± 0.05	1.64 ± 0.51*	4.12 ± 1.56*	5.97 ± 2.13*
F组	0.31 ± 0.05	2.81 ± 0.88*	-	-
G组	0.35 ± 0.06	1.74 ± 0.79*	-	-

注：*与正常组比较, q 值12.87~138.28, $P < 0.05$

表 3 第20周各组小鼠IL-18,TNF- α 和IFN- γ 血清水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-18	TNF- α	IFN- γ
A组	15.2 ± 3.0	25.2 ± 4.4	32.2 ± 5.4
B组	1569.2 ± 369.8*	873.9 ± 183.3*	1325.9 ± 323.8*
C组	1968.1 ± 472.3*	1273.4 ± 283.3*	1647.2 ± 424.3*
E组	1854.3 ± 469.7*	1138.3 ± 235.2*	1438.3 ± 401.2*

注：*与正常组比较, $P < 0.05$

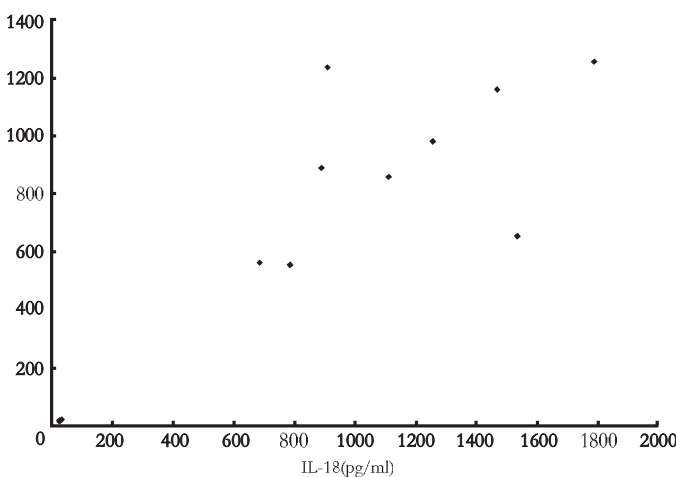


图 3 IL-18和TNF- α 相关性散点图

小时后可引起明显的急性肝损伤,这种损伤是肝特异性的,并且SCID小鼠和使用免疫抑制药物环孢霉素、FK506和皮质激素并没有引起肝损伤,可见,这种损伤机制为T细胞介导的,已经证明是由CD4⁺T介导的。因此,这些结果提示Con A诱导的肝损伤是免疫介导的,与人类的慢性肝炎发病机理非常相似,所以认为Con A诱导的动物模型是一种理想的动物模型。

目前Kimura等^[11]通过反复注射Con A,建立了一种肝纤维化模型。他们用BALB/c小鼠,采用15 mg/kg、每周1次尾静脉注射法,4次后就发现了肝纤维化的形成。Di Marco等^[12]也采用这种方法,可在第20周时才见到肝纤维化和肝硬化的形成。我们用昆明小鼠,采用10~20 mg尾静脉注射,并每周1~3次的不同注射方法,在1月左右,肝纤维化并不明显,10 mg每周3次组在第12周全部死亡时见到了肝纤维化的形成,15 mg每周2次和20 mg每周1次组5周全部死亡前,未发现有明显的肝纤维化形成。10 mg每周2次组和15 mg每周1次组在12周见到了肝纤维化,10 mg每周1次组在20周才有明显的肝纤维形成。

在Con A注射过程中出现了持续的肝损伤,并伴有TNF- α 和IFN- γ 的表达增加,而且利用抗体中和实验发现TNF- α 和IFN- γ 在这种模型的发病中发挥关键的作用,并且认为TNF- α 在这种模型起更为关键的作用^[13,14]。用TNF- α 可以完全阻断肝损伤,用IFN- γ 抗体仅有一定的保护作用,进一步研究发现,TNF- α 和IFN- γ 对肝组织的损伤作用与IL-18的水平密切相关,用IL-18抗体和TNF- α 抗体均可阻断肝损伤的形成。用IL-18抗体事先注射小鼠,TNF- α 和IFN- γ 的表达明显抑制,并以TNF- α 的减少更为明显。我们在实验中,也发现了IL-18和TNF- α 和IFN- γ 的升高,免疫组织化学也提示刀豆蛋白A组IL-18阳性表达明显增多,说明IL-18在纤维化的形成中发挥重要作用,并且IL-18与TNF- α 有相关性。

总之,我们成功利用ConA建立了昆明小鼠的肝纤维化模型,其形成机理验证了是由于TNF- α 和IFN- γ 的作用所致,同时也发现TNF- α 和IFN- γ 的升

高与IL-18的水平密切相关。这种肝纤维化模型的建立,由于其机制被证明是T细胞介导的免疫性肝损伤模型^[15],和人的肝纤维化机制有极大的相似性。为探讨肝纤维化的机理和实验性治疗有较大的帮助,但此模型的造模时间长、病死率较高,也为其使用带来了限制。

参考文献

- [1] Stephan K, Fred L, Weber JR, et al. Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rat with carbon tetrachloride-induced cirrhosis[J]. *Hepatology*,1991,14:1189-1195.
- [2] van de Bovenkamp M, Groothuis GM, Draaisma AL, et al. Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu[J]. *Toxicol Sci*,2005,85:632-638.
- [3] Bruck R, Schey R, Aeed H, et al. A protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate in a rat model of liver cirrhosis[J]. *Liver Int*,2004,24:169-176.
- [4] Fujino M, Kawasaki M, Funeshima N, et al. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A-induced hepatitis by inhibiting IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis[J]. *Gene Ther*,2003,10:1781-1790.
- [5] Kimura K, Ando K, Ohnishi H, et al. Immunopathogenesis of hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by repeatedly administered concanavalin A[J]. *Int Immunol*,1999,11:1491-1500.
- [6] Kobayashi S, Seki S, Kawada N, et al. Apoptosis of T cells in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells[J]. *Cell Tissue Res*,2003,311:353-364.
- [7] Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis[J]. *Hepatology*,1981,1:431-435.
- [8] Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update[J]. *Am J Clin pathol*,2000,113:40-55.
- [9] Kobayashi S, Seki S, Kawada N, et al. Apoptosis of T cells in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells[J]. *Cell Tissue Res*,2003,311:353-364.
- [10] Imose M, Nagaki M, Kimura K, et al. Leflunomide protects from T-cell-mediated liver injury in mice through inhibition of nuclear factor kappa B[J]. *Hepatology*,2004,40:1160-1169.
- [11] Kimura K, Ando K, Ohnishi H, et al. Immunopathogenesis of hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by repeatedly administered concanavalin A[J]. *Int Immunol*,1999,11:1491-1500.
- [12] Di Marco R, Xiang M, Zacccone P, et al. Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency[J]. *Autoimmunity*,1999,31:75-83.
- [13] Kobayashi S, Seki S, Kawada N, et al. Apoptosis of T cells

- in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells[J]. Cell Tissue Res, 2003, 311: 353-364.
- [14] Künstle G, Hentze H, Germann PG, et al. Concanavalin A hepatotoxicity in mice: tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation[J]. Hepatology, 1999, 30: 1241-1251.
- [15] Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 2367-2372.

收稿日期: 2007-06-19

• 消息 •

《现代肝炎病毒分子生物学》第二版即将出版

由北京地坛医院副院长、内科传染病学专业博士生导师、生物化学与分子生物学专业博士生导师成军教授主编、全国63位专家参与编写的《现代肝炎病毒分子生物学》第二版即将于2008年下半年出版, 科学出版社的编辑对本专著的内容有很高的评价。《现代肝炎病毒分子生物学》第二版全书约120万字, 是在1997年第一版的基础上重新修订, 增添了新的章节, 体现了近十年来国内外在肝炎病毒分子生物学研究领域的最新进展, 特别是成军教授课题组在过去十年间, 在肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学研究领域的最新研究成果和独到见解。《现代肝炎病毒分子生物学》第二版的出版, 必将进一步推动病毒性肝炎的研究和学术水平的进步。敬请予以关注。

地址: 北京市朝阳区京顺东街8号

网址: www.j-ditan.org.cn

Email: editor.ditan@gmail.com

电话: 010-84322058

传真: 010-84322059