

## 刀豆球蛋白 A 所致实验性肝损伤模型的构建

刘悦晖, 范学工, 李 宁, 刘洪波, 付春燕, 刘征波, 黄 燕

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

**[摘 要]** **目的** 建立刀豆球蛋白 A(Con A)诱导小鼠实验性肝损伤的模型。**方法** Balb/C 小鼠 40 只, 分别尾静脉注射 Con A, 根据注射剂量, 小鼠被随机分为 4 组(每组 10 只): A 组 10 mg/kg; B 组 20 mg/kg; C 组 30 mg/kg; 另设 D 组作为实验对照组, 尾静脉仅注射生理盐水。给药后 8 h 观察小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)活性、死亡率和肝组织的病理改变。选择最佳 Con A 剂量, 观察此剂量下不同时间点 ALT 活性、死亡率和肝组织的病理改变特点。**结果** 经 Con A 处理后 8 h, A 组与 D 组无小鼠死亡, B 组死亡 3 只, C 组小鼠全部死亡; 各组血清 ALT 值: A 组为(215.55 ± 70.19) IU/L, B 组为(2 516.14 ± 764.69) IU/L, 均显著高于对照组 D 组的(57.30 ± 12.21) IU/L (分别  $t = -8.466, t = -10.143$ , 均  $P = 0.000$ )。光镜下, A 组可见肝细胞变性; B 组和 C 组可见肝组织炎症细胞浸润和肝细胞变性、坏死, 以 C 组为甚。20 mg/kg Con A 尾静脉注射, 小鼠死亡率、ALT 活性、肝组织炎症细胞浸润和肝细胞变性、坏死在一定时间范围内(24 h)随时间增加而加剧。**结论** Con A 小鼠实验性肝损伤模型建立, Con A 剂量以 20 mg/kg、观察时间以 8 h 为宜。

**[关 键 词]** 刀豆球蛋白 A; 实验性肝损伤; 小鼠模型

**[中图分类号]** R575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2008)05-0297-05

## Development of the model about concanavalin A-induced experimental liver injury in mice

LIU Yue-hui, FAN Xue-gong, LI Ning, LIU Hong-bo, FU Chun-yan, LIU Zheng-bo, HUANG Yan (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish the model about concanavalin A-induced(Con A) experimental liver injury in mice. **Methods** Forty Balb/C mice were randomly divided into 4 groups(ten for each group), A, B, C and D. Con A 10mg/kg, 20mg/kg or 30mg/kg was intravenously (tail vein) injected into the mice in group A, B and C respectively while normal saline was used for the group D (control group). Activity of alanine transaminase(ALT), death rate and liver histopathological changes were observed after 8 hours of injection. The optimal Con A dose (20mg/kg) was selected, activity of ALT, death rate and liver histopathological changes were observed based on such dosage. **Results** After 8 hours of injection of Con A, no dead mouse was found in group A and D, but 3 and 10 mice were dead in group B and C respectively; the ALT level in group A and B was (215.55 ± 70.19) IU /L and (2 516.14 ± 764.69) IU / L respectively, both were significantly higher than (57.30 ± 12.21) IU /L in group D ( $t = -8.466, t = -10.143$ , respectively; both  $P = 0.000$ ). Liver histopathology showed only degeneration of liver cells was present in group A, while degeneration, necrosis and liver inflammatory cells infiltration in group B and C. Within 24 hours of injection of 20mg/kg of Con A, the death rate, activity of ALT, liver inflammatory cells infiltration, hepatocyte degeneration and necrosis exacerbated with the prolongation of time. **Conclusion** The optimal dosage to establish Con A-induced experimental liver injury in mice is 20mg/kg, with the optimal observation time at 8 hours after intravenous (tail vein) injected.

**[Key words]** concanavalin A; experimental liver injury; mice model

[Chin Infect Control, 2008, 7(5): 297-301]

[收稿日期] 2008-06-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30671845); 湖南省卫生厅科研基金(B2005030); 教育部高校博士点基金新教师资助项目(20070533009)

[作者简介] 刘悦晖(1975-), 男(苗族), 湖南省邵阳市人, 在读博士, 主要从事感染与免疫学研究。

[通讯作者] 范学工 E-mail: xgfan@hotmail.com

对各种肝脏疾病发病机制的探讨和治疗药物的筛选,很大程度依赖于和人类肝病病理机制相似的实验动物模型的建立与应用<sup>[1-2]</sup>。自身免疫性肝炎、病毒性肝炎等所致的肝损伤,均与 T 淋巴细胞活化密切相关<sup>[3-5]</sup>。多年来,所应用的实验性肝损伤模型,如细菌性脂多糖、D 氨基半乳糖和四氯化碳等所介导的肝损伤,均不能理想地反映这一病理特征<sup>[6]</sup>。1992 年, Tiegs 等成功应用刀豆球蛋白 A (Concanavalin A, Con A) 诱发了特异性肝损伤,就其致病特点来看,与目前所知的人类自身免疫性肝炎或病毒性肝炎的病理机制有许多相似之处<sup>[7-8]</sup>。这一模型的建立和应用为深入研究肝细胞损伤的免疫学机制及进行相应治疗药物的筛选提供了更为方便和理想的实验动物模型<sup>[8]</sup>。本研究旨在建立最佳 Con A 剂量及其作用时间的小鼠肝损伤模型。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 雌性 Balb/C 小鼠 (SPF 级), 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自中南大学实验动物中心。所有动物实验均得到中南大学实验动物中心实验动物管理与使用认证协会 (IACUC) 批准。

1.2 主要试剂与仪器 Con A 购自美国 Sigma 公司; HITACHI 717A2 全自动生化分析仪、IX70 倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品。

### 1.3 方法

1.3.1 实验药物剂量筛选 在使用前将 Con A 加适量无菌生理盐水调至总浓度为  $1.33 \times 10^6$  mg/L, 0.22  $\mu$ m 过滤除菌后 4  $^{\circ}$ C 保存备用。Balb/C 小鼠 40 只, 其中 30 只分别尾静脉注射 Con A, 根据注射剂量的大小, 小鼠被随机分为 3 组 (每组 10 只): A 组剂量为 10 mg/kg; B 组剂量为 20 mg/kg; C 组剂量为 30 mg/kg; 另设 D 组 10 只作为实验对照组, 尾静脉仅注射适量生理盐水 (剂量的多少与实验组所加量基本一致)。实验前 16 h 小鼠开始禁食, 但可以自由饮水。尾静脉注射 Con A 后开始观察小鼠活动情况及病死率, 并于处理 8 h 时采用摘眼球法取血, 分离血清检测丙氨酸转氨酶 (ALT) 活性, 同时摘取脑、肺、心、肝、肾组织观察其病理改变。根据以上不同剂量 Con A 处理所导致的小鼠存活率、血清 ALT 活性及各组织病理等实验结果的变化, 最终确定 Con A 的最佳剂量。

1.3.2 实验时间确定 Balb/C 小鼠 70 只, 根据

时间点随机分为 7 组 (每组 10 只), 即 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h 和生理盐水组。除生理盐水组外, 其余 6 组均尾静脉注射以上实验所获得的 Con A 最佳剂量, 即 20 mg/kg。经 Con A 处理后分别于 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h 时以摘眼球法处死尚存活小鼠 (生理盐水组在 36 h 时处死), 分离血清检测 ALT 活性, 并观察脑、肺、心、肝、肾组织的病理改变。

1.3.3 血清 ALT 检测 使用 HITACHI 7170A 全自动生化分析仪完成, 具体方法参照试剂盒说明书。

1.3.4 病理检查 用 10% 中性甲醛固定脑、肺、心、肝、肾组织标本, 石蜡包埋, 切片 5  $\mu$ m。热石蜡切片, 二甲苯作用 5 min, 无水乙醇 2 min, 95% 乙醇 2 min, 85% 乙醇 2 min, 自来水洗至透明, 双蒸水冲洗; 苏木素染色 8 min, 自来水冲净, 盐酸乙醇数秒, 自来水洗, 饱和碳酸锂返蓝 2 min, 自来水冲 30 min, 95% 乙醇中停留数秒, 伊红染色数秒, 80% 乙醇 2 min, 95% 乙醇 2 min, 无水乙醇 2 min, 吹干, 封片。镜下观察上述组织病理学改变。

1.4 统计学分析 结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, 存活率的比较采用  $\chi^2$  检验。以上统计处理用 SPSS 13.0 软件自动完成,  $P < 0.05$  视为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 不同剂量 Con A 处理后 8 h 小鼠死亡率及血清 ALT 水平 尾静脉注射 Con A 后小鼠开始出现进食、活动减少及毛发光泽降低, 并且随着 Con A 剂量的增加上述症状逐渐加重。最终, A 组小鼠的 8 h 死亡率为 0.00%; C 组 6.5 h 死亡 7 只小鼠, 到 8 h 时剩余 3 只也全部死亡, 其 8 h 死亡率为 100.00%; D 组注射生理盐水的 10 只小鼠 8 h 死亡率为 0.00%; C 组分别与 A 和 D 组死亡率相比, 差异均有显著性 (均  $\chi^2 = 20.00, P = 0.00$ )。B 组 6 h 时仅死亡 1 只小鼠, 8 h 时再死亡 2 只, 其 8 h 死亡率为 30.00%, 与 C 组相比, 差异亦有显著性 ( $\chi^2 = 10.77, P = 0.01$ )。经 Con A 处理后 8 h 各组血清 ALT 值: A 组为  $(215.55 \pm 70.19)$  IU/L, B 组为  $(2\ 516.14 \pm 764.69)$  IU/L, 均显著高于对照组 D 组的  $(57.30 \pm 12.21)$  IU/L (分别  $t = -8.466, t = -10.143$ , 均  $P = 0.000$ ); B 组 ALT 活性亦显著高于 A 组 ( $t = -9.326, P = 0.000$ )。C 组未检测血清 ALT 值。

2.2 相同 Con A 剂量不同时间点小鼠存活率及血清 ALT 水平 根据上述结果,我们选择 Con A 剂量为 20 mg/kg,观察 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h 时间点小鼠存活率及血清 ALT 活性,结果见表 1。2 h 组和 4 h 组在 Con A 分别处理后 2 h、4 h 小鼠均无死亡;8 h 组在处理 8 h 共死亡 3 只小鼠,存活率为 70.00%;12 h 组 6.5 h 时死亡小鼠 1 只,8.5 h 时死亡 2 只,小鼠存活率亦为 70.00%;24 h 组 6 h 时死亡小鼠 1 只,7.5 h 时死亡 2 只,16 h 时死亡 1 只,小鼠存活率为 60.00%;与 24 h 组结果类似,36 h 组小鼠在 6.5 h 时、8 h 时分别死亡 1 只和 2 只,并在 15 h 时再死亡 1 只,小鼠 36 h 前存活率为 60%。小鼠死亡率在 24 h 后未再增加,生理盐水组直到 36 h 亦无小鼠死亡。

表 1 与图 1 显示,血清 ALT 活性自 2 h 组到 24 h 组逐渐增加,各组间差异有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),但到 24 h 后血清 ALT 活性反而下降。作为对照,生理盐水组血清 ALT 活性显著低于其他各实验组(均  $P < 0.01$ )。

表 1 不同时间点相同剂量 Con A 对小鼠存活率及血清 ALT 活性的影响

Table 1 The effect of different Con A treated time points on ALT level and live rate of mice

组别	小鼠(只)	存活小鼠(n,%)	ALT(IU/L, $\bar{x} \pm s$ )
2h	10	10(100.00)	112.63 $\pm$ 39.89
4h	10	10(100.00)	232.09 $\pm$ 114.69
8h	10	7(70.00)	2 200.00 $\pm$ 678.35
12h	10	7(70.00)	3 398.34 $\pm$ 1 241.37
24h	10	6(60.00)	9 637.83 $\pm$ 1 737.84
36h	10	6(60.00)	6 864.50 $\pm$ 506.86
生理盐水	10	10(100.00)	55.73 $\pm$ 9.19

2.3 主要器官形态学及组织病理改变 不同剂量 Con A 尾静脉注射 Balb/C 小鼠后 8 h 肉眼观察小

鼠肝脏和脾脏,可见 B 组及 C 组肝脏明显淤血肿大,呈暗红色,有点状或小片状出血,同时脾脏也明显淤血,甚至呈黑色,尤以 C 组更为严重;而 A 组肝淤血程度明显轻于 B 组和 C 组,出血较少见;D 组未见肝大和淤血,颜色红润。光镜下 D 组肝组织活检未见明显异常;A 组可见肝细胞少量水样变性、气球样变;但 B、C 两组光镜下小鼠肝组织均出现明显病变,肝小叶内大多数肝细胞肿胀,细胞质疏松化,有的呈气球样变,明显的点状坏死和灶性坏死,坏死区可见炎症细胞浸润,汇管区淋巴细胞和单核细胞浸润明显,肝窦内可见红细胞堆集,但均以 C 组为甚(图 2)。剂量为 20 mg/kg Con A 处理小鼠后 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h,光镜观察肝组织病理变化,发现在 2~24 h,随着时间的延长肝组织坏死程度和炎症细胞浸润逐渐加重,而 24 h 和 36 h 组肝组织坏死程度和炎症细胞浸润则无明显差异(图 3)。剂量为 30 mg/kg Con A 处理小鼠后 8 h,光镜下可见肺轻度充血,肾小管上皮细胞出现轻度空泡变性,而脑、心未见明显异常(图 4)。

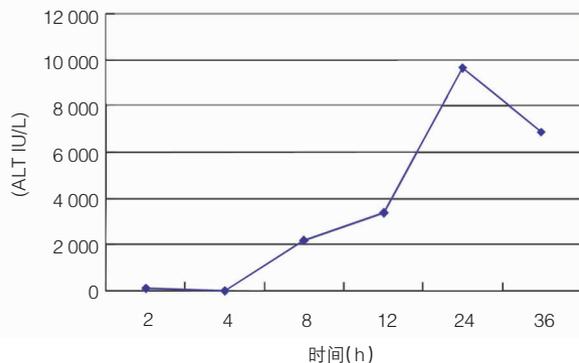
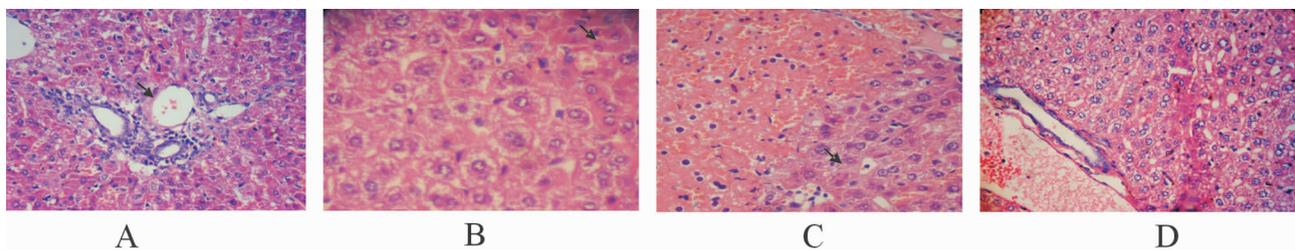


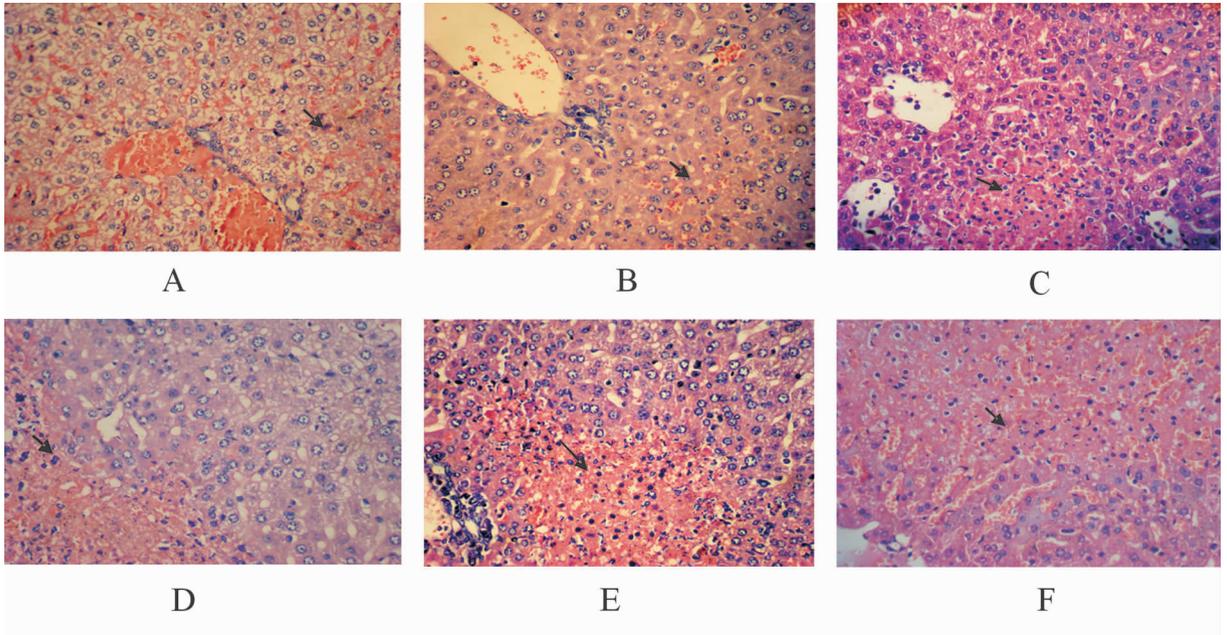
图 1 相同剂量 Con A 处理小鼠不同时间点 ALT 变化图  
Figure 1 The ALT levels in different time points after mice were treated with Con A



A: 10 mg/kg 组,光镜下可见少量水样变性、气球样变;B: 20 mg/kg 组,光镜下可见肝组织充血、出血,肝细胞变性、坏死,汇管区炎症细胞浸润;C: 30 mg/kg 组,光镜下可见肝组织充血、出血,肝细胞变性、坏死,汇管区炎症细胞浸润;D: 正常对照组,光镜下小鼠肝组织网架完好,未见明显的肝细胞变性、坏死,无出血

图 2 不同剂量 Con A 处理后 8 h 小鼠肝组织 HE 染色(400 $\times$ )

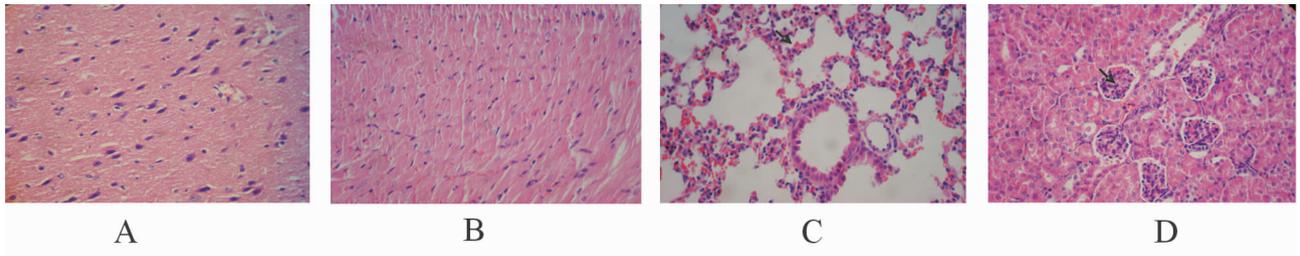
Figure 2 The histopathology of mice liver tissue( HE staining, 400 $\times$ ) in different Con A dose 8 hours after treatment



A: Con A 处理 2 h, 肝组织充血、出血, 肝细胞水样变性、坏死; B: Con A 处理 4 h, 肝组织充血、出血, 少量肝细胞变性、坏死, 汇管区炎症细胞浸润; C: Con A 处理 8 h, 肝组织充血、出血, 肝细胞变性、坏死, 汇管区炎症细胞浸润; D: Con A 处理 12 h, 肝组织充血、出血, 肝细胞变性、坏死, 汇管区炎症细胞浸润; E: Con A 处理 24 h, 肝组织充血、出血, 肝细胞变性、坏死明显, 汇管区大量炎症细胞浸润; F: Con A 处理 36 h, 肝组织充血、出血, 肝细胞变性、坏死明显, 汇管区大量炎症细胞浸润

图 3 20 mg/kg Con A 处理小鼠不同时间点肝组织 HE 染色(400×)

Figure 3 The histopathology of mice liver tissue( HE staining, 400×) in different time points with Con A(20mg/kg) treatment



A: 脑组织未见明显异常; B: 心组织未见明显异常; C: 肺组织可见充血; D: 肾小管上皮细胞出现轻度空泡变性

图 4 30 mg/kg Con A 处理后 8 h 小鼠脑、心、肺、肾组织 HE 染色(400×)

Figure 4 The histopathology of mice brain, heart, lung and kidney tissue( HE staining, 400×) with Con A(30 mg/kg) treatment for 8 hours

### 3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染是导致乙型肝炎慢性化、肝硬化和原发性肝癌的重要原因。目前认为 HBV 并不直接损害肝细胞, 而主要是通过宿主免疫应答引起肝细胞损伤, 针对 HBV 的特异性细胞毒 T 淋巴细胞反应和免疫细胞分泌的细胞因子干扰素(IFN)- $\gamma$  和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  等是导致肝细胞损伤的重要因素。Con A 是一种植物凝血素, 一类可与多种细胞表面糖分子残基结合的蛋

白分子。Con A 在体内和体外均可作为有丝分裂刺激原, 激活 T 淋巴细胞、巨噬细胞等释放细胞因子, 如 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等, 可损伤肝细胞, 并导致肝细胞坏死、凋亡、炎症加剧<sup>[9-10]</sup>。

本研究选用 Con A 10 mg/kg、20 mg/kg、30 mg/kg 三种剂量制造模型, 发现小鼠经 Con A 尾静脉注射后 8 h, 肝损伤程度随 Con A 剂量加大而加重, 死亡率随 Con A 剂量加大而提高。表现为血清 ALT 活性增高, 肝组织坏死程度和炎症加重。但光镜下仅发现肺轻度充血、肾小管上皮细胞轻度空泡变性, 心、脑未见异常。根据各器官的病理改变, 我

们认为脑、心、肺、肾病变不足以导致小鼠死亡,导致小鼠死亡的原因是肝脏严重受损。考虑到 Con A 10 mg/kg 组肝损伤太轻,无小鼠死亡,不便于观察和鉴别药物疗效;而 30 mg/kg 组从对动物施加处理到动物死亡的时间间隔太短,死亡率太高,没有足够的时间对其进行处理并评估疗效,故选用 Con A 20 mg/kg 制造模型是较为理想的剂量,因而我们选用 20 mg/kg Con A 用于后续的实验。这也与相关文献报道<sup>[9-10]</sup>类似。

对不同时间点的观察表明,小鼠经 Con A 20 mg/kg 尾静脉注射后 2 h 出现 ALT 活性轻度升高,肝细胞出现变性。随后,小鼠 ALT 活性、肝细胞坏死、炎症细胞浸润程度以及病死率随着时间延长而加剧,但到了 24 h 后不再增加。推测可能 Con A 所致的肝损伤作用到了 24 h 后不再发挥,也可能是损害作用达到峰值不再提高。因此,选用 Con A 肝损伤模型时,时间点的选择最好不要超过 24 h。

总之,Con A 诱发的小鼠肝损伤模型,制作简便、快速,肝损伤具有器官特异性、剂量依赖性和一定时间范围内的时间依赖性。其病理过程与我们目前所知的多种急、慢性肝病的病理过程相似,特别是其通过活化 T 淋巴细胞而诱发特异性肝损伤的病理特点<sup>[11]</sup>,能更好地模拟人类自身免疫性肝病、病毒性肝炎的致病过程。因此,Con A 性小鼠肝损伤模型的建立,为我们深入研究人类各种急、慢性肝病的发病机制和治疗药物的筛选提供了较为理想的实验动物模型。

#### [参 考 文 献]

[1] Wei H S, Lu H M, Li D G, *et al.* The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis; effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6(6): 824-828.

[2] Liu H L, Li X H, Wang D Y, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in fibrotic rat liver [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6(6): 881-884.

[3] Schirren C A, Jung M C, Gerlach J T, *et al.* Liver-derived hepatitis C virus(HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma [J]. *Hepatology*, 2000, 32(3): 597-603.

[4] Chen M, Sallberg M, Thung S N, *et al.* Nondeletional T-cell receptor transgenic mice; model for the CD4(+) T-cell repertoire in chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Virol*, 2000, 74(16): 7587-7599.

[5] Khakoo S I, Ling R, Scott I, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals [J]. *Gut*, 2000, 47(1): 137-143.

[6] Nagaki M, Muto Y, Ohnishi H, *et al.* Hepatic injury and lethal shock in galactosamine-sensitized mice induced by the superantigen staphylococcal enterotoxin B [J]. *Gastroenterology*, 1994, 106(2): 450-458.

[7] Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, *et al.* IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice [J]. *Hepatology*, 2007, 45(2): 475-485.

[8] Sakamoto T, Ezure T, Lunz J, *et al.* Concanavalin A simultaneously primes liver hepatopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice [J]. *Hepatology*, 2000, 32(2): 256-267.

[9] Schümann J, Wolf D, Pahl A, *et al.* Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(5): 1671-1683.

[10] Wetzel C C, Leonis M A, Dent A, *et al.* Short-form Ron receptor is required for normal IFN-gamma production in concanavalin A-induced acute liver injury [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(1): 253-261.

[11] 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(5): 1160-1169.

#### · 信 息 ·

根据《卫生部办公厅关于进一步加强抗菌药物临床应用管理的通知》,“特殊使用”药物为:(1)第四代头孢菌素:头孢吡肟、头孢匹罗、头孢噻利;(2)碳青霉烯类:亚胺培南/西司他丁、美罗培南、帕尼培南/倍他米隆、比阿培南、朵利培南;(3)甘酰胺类:替加环素;(4)糖肽类与噁唑酮类:万古霉素、去甲基万古霉素、替考拉宁、多粘菌素、利奈唑啉;(5)抗真菌药:卡泊芬净,米卡芬净,伊曲康唑(口服剂、注射剂),伏利康唑(口服剂、注射剂),两性霉素 B 含脂制剂。医疗机构在使用上述抗菌药物时应严格掌握临床应用指征,经抗感染或有关专家会诊同意,由具有高级专业技术职务任职资格的医师开具处方。