

· 免疫药理学 ·

迟发型变态反应机制致肝损伤的动物模型的建立^①徐 强 王 蓉 徐丽华^②(中国药科大学中药药理教研室,南京 210038)

〔摘 要〕 将 picryl chloride(PC)所致的迟发型变态反应(PC-DTH)导入肝脏诱发肝损伤,方法是将 PC 涂于昆明种小鼠腹部致敏,6 天后用 PC 在肝脏攻击,测量血清谷丙转氨酶(sGPT)的活性并进行肝组织病理学检查结果发现,sGPT 活性明显上升,肝细胞坏死、门管区粒细胞和淋巴细胞浸润等。在 PC 致敏前用环磷酰胺处理明显地增强了这种肝损伤。但给正常小鼠肝脏注射 PC 则不能诱发肝损伤。这些结果表明,该肝损伤模型是因在肝脏局部发生的 PC-DTH 所引起,其成立与 DTH 反应的强度有关,可适用于肝疾病中肝损伤机理及治疗药的研究。

〔关键词〕 迟发型变态反应 肝损伤 动物模型 picryl chloride

许多研究表明,肝内免疫反应是引起肝损伤的重要机制之一^{①-③},例如,在乙型肝炎的发病过程中,引起肝细胞损伤和破坏的直接因素是 T 细胞介导的细胞性免疫反应^④。机体的免疫应答一方面导致了肝细胞的损伤,另一方面免疫功能调节的失常又是肝炎慢性化的主要原因^⑤,可见调节免疫功能在肝炎治疗过程中的重要意义。但是,目前临床上常用的糖皮质激素类药物及免疫抑制剂等多具有严重的毒副作用,缺乏理想的动物模型是研究开发新型免疫调节剂的重要障碍之一,也给肝炎发病机制的阐明带来了困难。为此,我们用 picryl chloride(PC)诱发肝内的迟发型免疫反应,首次在小鼠上建立了致肝损伤的病理动物模型。

材料与方法

一、药品与试剂

picryl chloride(PC)(日本东京化成工业株式会社);环磷酰胺(cyclophosphamidum,Cy)(上海第十二制药厂);血清谷丙转氨酶(sGPT)测定试剂盒(上海生物制品研究所)。

二、动物

6~7 周龄(20~24 克体重)的昆明种雌性小鼠,由中国药科大学及中国医学科学院皮肤病研究所动物室提供。

三、PC 所致小鼠迟发型免疫反应(PC-DTH)

刮去小鼠腹毛,涂 1%PC 的乙醇溶液 100 μ l 致

敏,6 天后在小鼠右耳两面涂 1%PC 的橄榄油溶液 30 μ l 攻击,24 小时后用千分尺测量左、右两耳厚度,将其厚度差作为第一次 DTH 反应的强度。测量 3 天后于腹部再次致敏,再 6 天后右耳攻击,诱发第二次 DTH 反应。

四、PC-DTH 致小鼠肝损伤

用 PC 致敏,6 天后攻击时用各种浓度的 PC 橄榄油溶液 10 μ l 肝穿刺诱发 DTH 反应(下称第一次 DTH)。或在致敏的 5 天前在腹部预致敏一次(下称二次致敏),或在致敏的 6 天及 3 天前预致敏二次(下称三次致敏),或按 3 项下在耳诱发第一次 DTH,然后再次致敏,再 6 天后在肝脏诱发肝损伤(下称第二次 DTH)。除特别注明外,攻击 18 小时后采血,测定血清谷丙转氨酶的活性,同时,摘出肝脏,用 10%福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 染色作组织病理学检查。

五、统计

t 检验

结 果

一、PC-DTH 及 PC-DTH 致肝损伤的成立

取小鼠,在右耳诱发 PC-DTH,对照组小鼠涂等体积的橄榄油。结果如表 1 所示,以对照组的耳壳肿胀为零,第一次 DTH 反应小鼠耳壳出现了明显肿胀,第二次 DTH 反应时其肿胀较第一次更为强烈。

另取小鼠,诱发肝损伤,攻击用 PC 为 1%的浓度,对照组注射等体积的橄榄油。结果,与正常小鼠血清相比,在肝脏诱发第一次 DTH 的小鼠及第一和第二次 DTH 的对照组血清 GPT 水平均无变化,

①国家自然科学基金及国家教委资助优秀年轻教师基金项目。

②江苏省中药学校,镇江 212003

而诱发第二次 DTH 的小鼠肝脏肉眼可见明显的零星白色花斑,血清 GPT 水平显著升高(表 1)。但是,给正常小鼠一次性肝穿刺注入 0.2%、0.25%、0.5%和 1%PC 的橄榄油溶液或橄榄油 10 μ l,除 1%浓度时有轻微的升高趋势外,其余对 sGPT 水平均无影响(表 2)。故在以下实验中采用 0.5%的 PC 进行攻击。给正常小鼠肝穿刺注入 0.5%PC 的橄榄油溶液 10 μ l 后,每 2 天眼眶采血,连续 6 次未见 sGPT 活性的变化(表 3),第 12 天采血后同时摘出肝脏,组织病理学检查也未见异常。

表 1. PC-DTH 与 PC-DTH 机制所致的小鼠肝损伤

Tab. 1. picryl chloride (PC) - induced delayed type hypersensitivity (PC-DTH) and liver injury induced by the DTH mechanism in mice

Group	No. of mice	Ear swelling ($\times 10^{-3}$ mm, $\bar{X} \pm SD$)	sGPT (karmen unit, $\bar{X} \pm SD$)	
			No. of mice	$\bar{X} \pm SD$
Normal			8	185 \pm 42
1st DTH				
Control	8	0	8	189 \pm 43
DTH induced	8	103 \pm 31	8	187 \pm 35
2nd DTH				
Control	8	0	8	208 \pm 60
DTH induced	8	184 \pm 14	8	493 \pm 226 *

* , $p < 0.05$ vs Control

表 2. PC 注射于正常小鼠肝脏对 sGPT 水平的影响
Tab. 2. Effect of the injection of PC into the liver of normal mice on sGPT level

Conc. of PC (%)	No. of mice	sGPT (karmen unit, $\bar{X} \pm SD$)
Normal	7	191 \pm 40
olive oil	6	195 \pm 37
0.2	8	173 \pm 33
0.25	8	204 \pm 60
0.5	8	203 \pm 27
1	8	269 \pm 96

表 3. 一次性肝穿刺 PC 或橄榄油后小鼠 sGPT 活性的时程变化

Tab. 3. Time course of change of sGPT activity in mice received a single injection of PC or olive oil.

Days after inunction	sGPT (Karmen unit, $\bar{X} \pm SD$)		
	Normal	olive	0.5%PC
2	122 \pm 29	126 \pm 24	120 \pm 16
4	153 \pm 27	157 \pm 57	156 \pm 47
6	152 \pm 6	148 \pm 21	153 \pm 64
8	133 \pm 92	141 \pm 77	121 \pm 48
10	182 \pm 40	165 \pm 82	177 \pm 28
12	183 \pm 25	163 \pm 59	171 \pm 35

二、PC-DTH 致肝损伤小鼠 sGPT 水平的时程变化

取小鼠,进行二次致敏,攻击用 0.5%PC 的橄榄油溶液,12 小时后开始,每隔 6 小时测一组 sGPT 活性,结果如图 1 所示,在 PC 肝穿刺后 12 小时, sGPT 水平有所升高,18 小时达到高峰,24 小时后开始下降,此后恢复至正常水平。在此后的实验中均选用攻击 18 小时后采血。

三、免疫反应强度与肝损伤

取小鼠,按第一次 DTH、第二次 DTH、二次致敏及三次致敏法诱发肝损伤。结果如表 4 所示,除第一次 DTH 外,第二次 DTH、二次致敏及三次致敏动物 sGPT 活性均比对照组有明显升高,其中以二次致敏时较为显著,对于三次致敏小鼠,在首次致敏的 3 天前,一次用大剂量(150mg/kg)的 Cy 腹腔注射,显著地增强了肝损伤。

对上述二次致敏的 6 只小鼠进行肝组织病理学检查,发现有 5 例肝细胞明显坏死,并出现粒细胞和淋巴细胞浸润及脂肪性变性等。图 2 为组织显微像,其中 A 为门管区炎性细胞浸润,B 则显示肝细胞的凝固性坏死。而对照组(表 4 control C)小鼠肝脏无一例出现异常。

表 4 PC-DTH 致肝损伤小鼠 sGPT 活性的变化及 Cy 的影响。

Tab. 4. Change of serum GPT activity ou liver injury induced in various ways by PC-DTH mechanism in mice and effect of cyclophosphamide (Cy) on the injury.

Group	No. of mice	GPT (Karmen unit, $\bar{X} \pm SD$)
Normal	7	188 \pm 49
1st DTH		
Control A	6	180 \pm 53
DTH induced	6	190 \pm 39
2nd DTH		
Control B	6	214 \pm 70
DTH induced	7	313 \pm 156
duplicately sensitized		
Control C	6	197 \pm 25
DTH induced	6	344 \pm 159 *
triplicately sensitized		
Control D	6	187 \pm 34
DTH induced	7	294 \pm 70 * *
Cy-pretreated	6	446 \pm 166 * *

* , $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ vs respective control

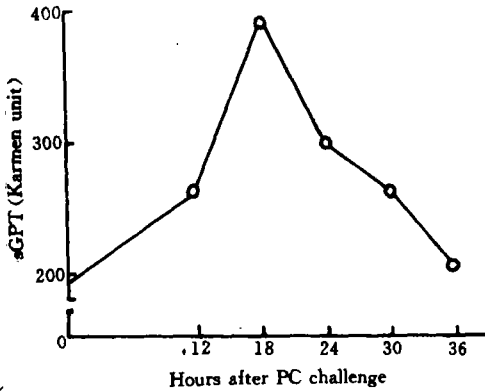


图 1. PC-DTH 致肝损伤小鼠 sGPT 水平的时程变化

Fig. 1. Time course of change of sGPT activity in liver injury mice induced by PC-DTH

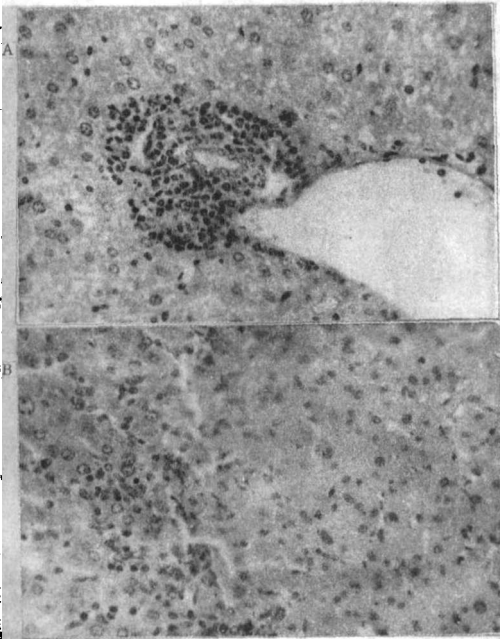


图 2. PC-DTH 致肝损伤小鼠肝组织病理像 HE 染色 ×400

Fig. 2. Histological picture of liver from the mouse with PC-DTH induced Liver injury. Hematoxylin and eosin. ×400

讨 论

对于肝损伤机理及保肝药的药理学及病理学研究,经典的动物模型有 CCl₄、半乳糖胺等化学因素所致的肝损伤,这些肝损伤在致病机理上与临床上多数肝炎有较大的距离,也不适用于影响免疫系统药物的药效评价。近年来建立的以免疫学机制诱发

的肝损伤模型,如 antibasic liver protein 抗体、anti-liver specific protein 抗体及短小棒状杆菌与内毒素脂多糖等⁽¹⁾,为肝损伤的研究开辟了新的途径。但是,对于与肝炎尤其是慢性肝炎的发病及进展直接相关的细胞性免疫反应,尚无特定的模型。为了在动物上以细胞性免疫机制诱发肝损伤,本研究以 DTH 为基本反应,激发肝脏的炎症性损伤,结果证明,以这种机制诱发肝损伤是可行的。

DTH 是由 T 细胞介导的免疫反应,其最终阶段是以巨噬细胞为中心的炎症反应。本研究在小鼠上用 PC 在腹部致敏一次后,在耳壳攻击可引起显著的肿胀,但在肝脏攻击则未能致肝组织损伤,对血清 GPT 活性也无影响。估计这种在肝脏局部发生的炎症反应不足以引起肝细胞的实质性损伤,使转氨酶等细胞内容物逸出。鉴于第二次 DTH 反应时小鼠耳壳肿胀大幅度增加的事实,我们将第一次 DTH 反应后的小鼠再次致敏,再在肝脏诱发第二次 DTH 反应,结果肉眼观察可见肝颗粒粗硬,甚至出现大片斑块,sGPT 也显著升高。同样,对小鼠用 PC 进行二次或三次致敏,sGPT 水平也明显上升,以二次致敏时较为显著。对二次致敏小鼠肝脏进行组织病理学检测,可见肝细胞明显坏死,炎细胞浸润等,证实了肝损伤的成立。此外,给三次致敏小鼠事先用 Cy 处理,后者在 PC 致敏前大剂量使用可增强 PC-DTH⁽²⁾,其机理是抑制了抑制性 T 细胞的前驱细胞⁽³⁾,结果,Cy 明显地增强了肝损伤。

本文还对 PC-DTH 致肝损伤的条件进行了一些探讨,发现 sGPT 活性的升高在诱发 DTH 后 18 小时最为显著。给正常小鼠肝穿刺 PC 及其溶媒橄榄油,连续观察 12 天,对 sGPT 水平均无影响,表明 PC 本身肝穿刺不会引起明显的肝损伤。此外,本研究中的各对照组是在 PC 免疫小鼠的肝脏注射橄榄油,其血清 GPT 活性也与正常小鼠无异。

基于上述事实,有理由认为,本研究诱发的肝损伤,是因在肝脏局部发生的 PC-DTH 所引起,其损伤的成立与 DTH 反应的强度有关。该模型可望适用于肝损伤机理及肝炎免疫调节剂的药理学研究。

参考文献

- (1) Almeida, J. D. and waterson, A. P. Immune complex in hepatitis Lancet, 1969, 2: 983.
- (2) Duddely, F. J., Fox, R. A. and Sherlock, S. Cellular immunity and hepatitis associated. Australian antigen liver disease. lancet, 1972, 1: 723.
- (3) Edgington, T. G. and Chisari, F. V. Immunological aspects

of hepatitis B virus infection. *Am. J. Med. Sci.*, 1975, 270, 213.

[4] Nagai, H., Yakuo, I., Yamada, H., et al. Liver injury model in mice for immunopharmacological study. *Japan. J. Pharmacol.*, 1988, 46: 247.

[5] 溝口靖雄. 药物性肝障害の免疫学机序. *临床免疫*, 1989, 21, 1974.

[6] 各务伸一. B 型肝炎の发症机序最新医学, 1990, 45: 2314.

[7] 孙宏训编. 肝脏病学. 南京: 江苏科学技术出版社,

1990, 422.

[8] 徐强, 等. 茯苓对迟发型变态反应的抑制作用. *中国药科大学学报*, 1991, 22(1): 12.

[9] Mitsuoka, A., Morikawa, S., Baba, M., et al. Cyclophosphamide eliminates suppressor T cells in age-associated central regulation of delayed hypersensitivity in mice. *J. Exp. Med.*, 1979, 149: 1018.

[1993 年 1 月收稿 6 月修回]

(编辑 赵中升)

Animal model of the liver injury induced by a mechanism of delayed type hypersensitivity

XU Qiang, WANG Rong and XU Li-hua^①. Dept. of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009. ^② The Provincial School of Traditional Chinese Pharmacy of Jiangsu, Zhenjiang 212003

Picryl chloride(PC)-induced delayed type hypersensitivity(PC-DTH) was applied to mice to cause an experimental liver injury. The model was produced by PC challenge in the liver of Kunming strain mice that had been previously immunized with PC on the abdomen 6 days before. The activity of glutamic pyruvic transaminase (GPT) in serum and histopathological changes in liver were evaluated. As the result, distinct elevation of sGPT, necrosis of hepatocytes and infiltration of granuocytes and lymphocytes into the portal tract and sinusoid were observed. The pretreatment of cyclophosphamide before PC immunization markedly augmented the injury. However, the PC injection into normal mice liver did not induce an injury. These evidences suggest that the liver injury is a result of the PC-DHT occurred in liver, related to the intensity of DTH reaction, and this model is suitable for investigating the mechanism of liver injury as well as remedy for liver diseases.

Key words: delayed type hypersensitivity(DTH) liver injury animal model picryl chloride

[*Chinese Journal of Immunology*, 1993, 9(5): 287]

• 消息 •

第二届生殖免疫国际论坛在德国召开

由德国生殖免疫学会主办的第二届生殖免疫国际论坛由 H. Donat 教授主持, 于 1993 年 6 月 14~18 日在 马德堡市举行, 有著名生殖免疫学家 shulman(美国)、Hijort(丹麦)、Isojima(日本)、voisin(法国)教授等来自世界各国近百人出席了大会。就 1. 精子与透明带抗体; 2. 配体的抗原性; 3. 自然流产的免疫学; 4. 生殖道局部的免疫学; 5. 免疫避孕等五个主题分别进行大会报告, 大字报展示、小组发言及自由讨论。总的来看, 生殖免疫的研究重点是精子免疫; 自然流产的治疗, 免疫避孕。另外, 细胞因子调节生殖过程的研究仍是重点, 不过未有突破性进展。值得一提的是, 在过去研究避孕疫苗的机制主要探讨的是体液免疫应答。这次大会有印度的一篇题为“细胞中介的免疫避孕: 生育控制的新战略”的论文引起人们的关注, 本文指出非特异性对女性生殖道进行免疫刺激可以激活细胞免疫机制而封闭了生殖。受大会资助, 本人参加了此次盛会并报告了“精浆对 NK 细胞的免疫抑制作用”的研究结果。

(郑振群供稿)