DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.023
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
300 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0300-04

CTLA-4Ig预防小鼠自身免疫性肝炎的实验研究

罗 洋[1],郝 飞[2],王宇明[1],钟白玉[2],唐书谦[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]全军感染病研究所;[2]皮肤科;重庆 400038)

提 要:目的 研究CTLA-4Ig在防治C57BL/6小鼠自身免疫性肝炎上的作用。方法 通过用C57BL/6近交系小鼠的肝特异性抗原与弗氏完全佐剂混合物免疫攻击小鼠,同时用CTLA-4Ig治疗,观察小鼠的肝脏组织学改变。结果 随着免疫次数的增多,治疗组结果与正常对照组相似;而病理模型组发现炎细胞的浸润,肝细胞的肿胀、灶性坏死甚至广泛坏死,这与正常对照组有明显差异。结论 CTLA-4Ig能有效地预防C57BL/6小鼠自身免疫性肝炎。

关键词:CTLA-4Ig;自身免疫性肝炎
中图法分类号:R392.11;R575.1;R593.2 文献标识码:A

Experimental study of cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4Ig for prevention of mice autoimmune hepatitis

LUO Yang, HAO Fei, WANG Yu-ming, ZHONG Bai-yu, TANG Shu-qian (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4Ig(CTLA-4Ig) in the prevention of C57BL/6 mice autoimmune hepatitis. Methods The C57BL/6 mice were intraperitoneally immunized with C57BL/6 mice liver-specific protein in complete Freund's adjuvant. At the same time CTLA-4Ig were given to observe the pathologic alteration of C57BL/6 mice liver. Results With the increase of time of immunization, the results in the treatment group were similar to those of the control group; but inflammatory cell infiltration, hepatic cell swelling, focal necrosis and severe hepatocyte damage were found in the pathologic model group. There was a significant difference between the pathologic model group and control one. Conclusion Autoimmune hepatitis of C57BL/6 mice can be effectively prevented by CTLA-4Ig.

Key words: CTLA-4Ig; autoimmune hepatitis

在T细胞激活过程中,除需要经过T细胞受体-抗原-主要组织相容性复合物(TCR-Ag-MHC)信号刺激外,还需要一些辅助信号即共刺激信号,方能使T细胞激活。在共刺激分子中,B7-CD28/CTLA-4起重要作用,CD28起正性作用,而CTLA-4起负性作用。CTLA-4与抗原递呈细胞(APC)表面B7分子有很高的亲和力,相互作用可以抑制T细胞的增殖、活化,起着负性共刺激分子的作用,以维持机体淋巴细胞动态平衡,防止自身反应性T细胞过度激活。CTLA-4Ig是一种通过基因重组方式用人CTLA-4的胞膜外部分和免疫球蛋白的C区融合而成的可溶性嵌合蛋白,其生物学功能与CTLA-4相似。我们通过肝特异性蛋白(Liver-specific protein, LSP)与弗氏完全佐剂一起免疫C57BL/6小鼠[1],同时用CTLA-4Ig治疗,观察小鼠的肝脏组织学改变。

1 材料与方法

1.1 研究对象

5周龄雄性C57BL/6小鼠90只,由重庆医科大学动物中心提供.小鼠健康状况良好,体重为17~19 g,生长环境为20~25 ℃,通风良好,无野鼠干扰。

1.2 主要试剂及来源

CTLA-4Ig由第三军医大学附属西南医院烧伤研究所提供。卡介苗由成都生物制品研究所提供。羊抗小鼠IgG荧光抗体由北京中山试剂公司提供。弗氏佐剂:无水羊毛脂与液体石蜡按3∶17比例混匀,高压消毒后分装,4 ℃保存。

1.3 实验步骤

1.3.1 LSP制备 取同系C57BL/6小鼠30只,脱颈致死,取出肝脏,将肝组织剪碎,等渗盐水反复冲洗除去血液,与等量等渗盐水进行匀浆,34 000 r/min,(100 000× g)离心60 min,取上清液即S-100。将S-100用琼脂糖凝胶6B分离,收集到的第1峰就是LSP[2]。将LSP用生理盐水稀释至25 mg/ml。

1.3.2 免疫剂制备 每次免疫时将25 g/L的LSP与弗氏佐剂按1∶1比例混匀,充分研磨至乳白色,滴加卡介苗(5 mg/ml)继续研磨。

1.3.3 免疫注射 将5周龄的C57BL/6小鼠随机分为3组:①正常对照组20只,不做任何处理,普通饲养。②病理模型组20只,每周用新制备的免疫剂腹腔注射1次,每只0.2 ml,共4次[4]。③CTLA-4Ig治疗组20只,每周腹腔注射免疫剂1次,每只0.2 ml,共4次。同时,在第1次免疫攻击时予以CTLA-4Ig治疗,100 μg腹腔注射,隔日1次,共3次。

1.4 研究内容及指标

①小鼠一般状况及体重。②血清白蛋白、总蛋白。③肝脏组织学检查:各组小鼠在免疫2、4次后分别取10只杀检,取肝组织进行石蜡切片,H-E染色。判断标准以文献[3]为依据。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39993430-2);国家自然科学基金面上项目(39970756);国家科技部重点项目(96-920-20-10)及全军医药重点项目;重庆市科委院士基金资助项目(969010518)

作者简介:罗 洋(1971—),男,四川省南充市人,硕士研究生,主治医师,主要从事自身免疫性疾病发病机制和防治方面的研究。电话:(023)68754000-73068

收稿日期:2000-10-13;修回日期:2001-02-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

－: 肝组织无变化; ＋: 肝组织轻度炎细胞浸润及灶性坏死; ＋＋: 肝组织中度炎细胞浸润及肝细胞坏死; ＋＋＋: 肝组织严重炎细胞浸润及广泛肝细胞坏死。④肝组织免疫荧光检查: 各组小鼠在免疫 2、4 次后分别取 10 只杀检, 取肝脏最大叶肝组织进行冰冻切片, 滴加羊抗小鼠 IgG 荧光抗体与 1/5 000 浓度的伊文氏蓝 1∶10 稀释液, 37 ℃保湿孵育 45 min, PBS 冲洗 3 次, 蒸馏水冲洗 1 次, 烘干后用缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察。

荧光强度判断标准: －: 底色均匀, 无特异性荧光; ＋: 有特异性点状、线状荧光; ＋＋: 特异性点状、线状荧光多, 有少量颗粒状荧光团; ＋＋＋: 有大量颗粒状荧光团, 底色明亮。

1.5　统计学处理

用 t 检验。

2　结果

2.1　一般情况

对照组与治疗组小鼠运动活跃, 精神进食好, 毛浓密光亮。模型组小鼠随着实验进行变得不活跃, 常显萎靡状, 进食欠佳, 毛稀疏干燥, 粗乱蓬松。

2.2　小鼠体重变化

小鼠 10 周龄时, 对照组小鼠体重平均增长(4.87±0.45) g; 治疗组小鼠体重平均增长(4.70±0.40) g, 与前组比较差异无显著性($P>0.01$); 模型组小鼠体重平均增长(2.82±0.25) g, 与前两组比较差异均有显著性($P<0.01$)。

2.3　小鼠血清蛋白含量变化见表 1

表 1　各组小鼠 10 周后血浆蛋白定量测定结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Results of plasma protein content in C57BL/6 mice after 10 weeks($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Total protein (ρ_B/g·L^{-1})	Albumin (ρ_B/g·L^{-1})	A/G
Control	10	64.44±0.08	31.07±0.07	0.93±0.01
Treatment	10	64.48±0.05	31.08±0.11	0.93±0.01
Pathologic model	10	69.49±0.44※	28.98±0.13※	0.72±0.02※

※: $P<0.01$ *vs* other groups

2.4　肝脏组织学检查

正常对照组小鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞间联系紧密; 肝细胞核大而圆, 核仁明显, 胞质丰富均匀; 汇管区无炎症浸润, 结构清晰可见。治疗组与正常对照组小鼠肝细胞无明显差别。病理模型组小鼠在免疫 2 次后即可见到肝细胞灶性坏死, 见图 1。免疫 4 次后中, 灶性坏死增多, 肝细胞肿胀、汇管区炎症细胞浸润明显, 见图 2。其结果见表 2。

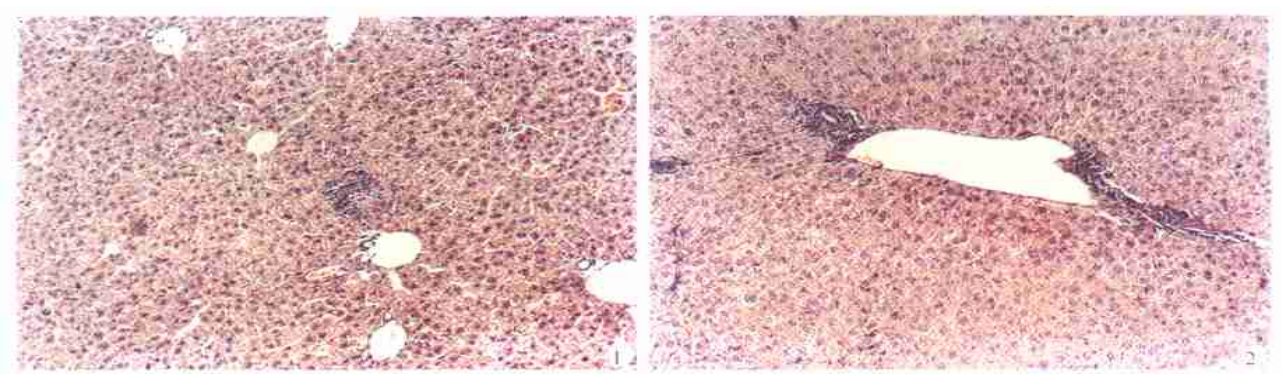


图 1　免疫 2 次后雄性 C57BL/6 小鼠肝脏组织即可见到肝细胞灶性坏死　(HE× 100)

Fig 1　Focal necrosis was found in hepatic tissues from male C57BL/6 mice after second immunization　(HE× 100)

图 2　免疫 4 次后雄性 C57BL/6 小鼠肝脏组织灶性坏死增多、肝细胞肿胀、汇管区炎症细胞浸润明显　(HE× 100)

Fig 2　Focal necrosis, hepatocyte swelling and inflammatory cell infiltration were increased in hepatic tissues in C57BL/6 mice after 4th immunization　(HE× 100)

表 2　C57BL/6 小鼠 10 周后肝损伤指数

Tab 2　Liver injury intensity of C57BL/6 mice after 10 weeks

Times of immunization	Control				Treatment				Pathologic model			
	－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋
2	10				10					6	4	
4	10				10					2	8	

2.5　肝组织免疫荧光检查

正常对照组小鼠肝组织底色均匀, 未见特异性性荧光。治疗组与正常对照组小鼠肝细胞无明显差别, 见图 3。病理模型组小鼠在免疫 2 次后即可见到呈点状、线状荧光特异性荧光, 见图 4。免疫 4 次后, 点状、线状荧光特异性荧光增多, 可见大量颗粒状荧光团, 底色明亮, 见图 5。其结果见表 3。

表 3　C57BL/6 小鼠 10 周后免疫荧光指数比较

Tab 3　Immunofluorescence intensity of C57BL/6 mice after 10 weeks

Times of immunization	Control				Treatment				Pathologic model			
	－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋
2	10				10					5	5	
4	10				10					6	4	

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net





图 3 治疗组与正常对照组小鼠肝细胞无明显差别 （荧光× 400）

Fig 3 No apparent differences in hepatocytes between treatment group and control group （Immunofluorescence× 400）

图 4 病理模型组小鼠在免疫 2 次后即可见到呈点状、线状荧光特异性荧光 （荧光× 400）

Fig 4 Dot, linear immunofluorescences were found in pathological model group （Immunofluorescence× 400）

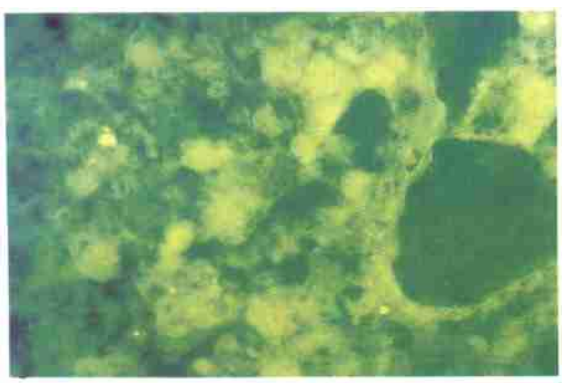


图 5 免疫 4 次后，点状、线状荧光特异性荧光增多，可见大量颗粒状荧光团，底色明亮 （荧光× 400）

Fig 5 Dot, linear immunofluorescences increased in hepatic tissues, and many granular immunofluorescences in pathological model group （Immunofluorescence× 400）

3 讨论

自身免疫性肝炎（Autoimmune hepatitis, AIH）是一种原因不明，伴循环自身抗体和高球蛋白血症的慢性炎症反应性肝病。目前，涉及 AIH 病因学的研究很多，化学物质、药物、毒素及感染（病毒、细菌）均可作为 AIH 的诱因，而绝大多数 AIH 的病因仍不清楚。本研究从 LSP 着手，建立 AIH 小鼠动物实验模型。LSP 是一种主要分布在肝细胞膜上的复合物，它包含有多种抗原，其中至少一种是具有器官特异而无种特异性的抗原，尽管用免疫化学和电子显微镜测试表明 LSP 来源于肝细胞膜[3]，但 LSP 的本质还不清楚，对 AIH 的治疗也不尽如人意。

我们用 LSP 加弗氏完全佐剂免疫攻击小鼠复制出 AIH 动物实验模型，在免疫攻击小鼠同时用 CTLA-4Ig 治疗，观察小鼠的肝脏组织学改变，未发现肝组织炎性病变，其结果与正常对照组相似；而病理模型组发现炎细胞的浸润，肝细胞的肿胀、灶性坏死甚至广泛坏死。通过羊抗小鼠 IgG 免疫荧光检查发现，在动物模型组免疫 2 次后就可见到肝组织有特异性荧光，汇管区最多，呈放射状分布；免疫 4 次后就可见到肝组织有大量颗粒状荧光团，底色明亮，表明肝细胞表面有大量 IgG 抗体沉着，这说明体液免疫参与了肝细胞的免疫损伤，这也同时为抗体依赖的细胞毒作用创造了条件，这也和病理切片中观察到的结果一致；而治疗组小鼠肝组织与正常对照组小鼠相同，肝组织底色均匀，无特异荧光出现，这说明 CTLA-4Ig 能有效地防治 C57BL/6 小鼠自身免疫性肝炎。我们同时也观察到小鼠 10 周龄时，对照组小鼠体重平均增长（4.87 ±0.45）g；治疗组小鼠体重平均增长（4.70 ±0.40）g，与前组比较差异无显著性（$P>0.01$），模型组小鼠体重平均增长（2.82 ±0.25）g，与前两组比较差异均有显著性（$P<0.01$），这也进一步证实了 CTLA-4Ig 的有效性。治疗组小鼠蛋白质与正常对照组小鼠差异不明显，这说明其肝脏合成蛋白质的能力强，这也间接地证实了 CTLA-4Ig 在保护肝脏免受自身免疫损害方面的重要作用。

用 LSP 与弗氏完全佐剂混匀后，腹腔注射免疫攻击 C57BL/6 小鼠。在初次免疫中，辅助细胞如巨噬细胞起关键作用，它呈递抗原给 T 细胞形成 MHC Ⅱ-Ag-TCR 复合物的第一信号，在 B7 与 CD28 第二信号的作用下，T 细胞通过自分泌或旁分泌 IL-2 使原初 T 细胞活化形成 Th1 细胞，介导细胞免疫；T 细胞通过分泌 IL-4 使原初 T 细胞活化形成 Th2 细胞，介导体液免疫，初次免疫应答主要分泌 IgM。当再次将 LSP 与弗氏完全佐剂混匀后免疫攻击 C57BL/6 小鼠时，由于 Ig 基因体细胞突变和 B 细胞抗原的选择性激活，产生的特异性抗体发生亲和力的成熟，使抗原与特异性 B 淋巴细胞上的膜 Ig 结合，通过 LSP 刺激细胞内的第二信使，导致休止期 B 细胞进入细胞周期，通过与抗原的相互

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作用有助于加强 B 细胞与 T 细胞的反应，这时 B 细胞就充当抗原提呈细胞的作用[6]，通过内吞、加工、呈递抗原给 Th2 细胞形成第一信号，在 B7 与 CD28 第二信号的作用下，Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子，这些细胞因子作用于 B 细胞，使其生长和分化为相应的浆细胞，分泌相应的抗体，再次免疫应答后重链类型发生转变主要分泌 IgG。抗 LSP-IgG 除与 LSP 抗原结合外，还与肝脏上的固定组织抗原 LSP 通过白细胞上的 CD16 介导结合，CD16 的出现激活 NK 细胞分泌细胞因子如 TNF 和 γ-IFN 以及释放颗粒，这些释放的细胞因子和颗粒蛋白可选择性杀伤已结合 IgG 的靶细胞，而不杀伤未结合 IgG 的细胞。杀伤的肝脏组织通过趋化因子招募炎细胞，使其从血管内向肝脏炎性部位定向游走，消除病变的组织和细胞。我们使用 CTLA-4Ig 的作用点为抗原提呈给 T 细胞时的第二信号，从而达到预防 AIH 的目的。

CTLA-4 能改善自身免疫性疾病病人的症状，因 CTLA-4 平时不表达，只有在 T 细胞活化后才表达和起作用，所以不会有诱发肿瘤、感染、出血性心脏疾病的危险。CTLA-4 在病人体内作用时间长，是一种很好的长效免疫抑制剂，CTLA-4Ig 与 CTLA-4 的生物学功能完全相同，运用 CTLA-4Ig 在防治自身免疫性疾病上应有广阔的前景，如果利用转基因的方法将 CTLA-4Ig 基因转导入患者体内，则可获得终身治疗的目的，且可遗传给后代。此外 CTLA-4Ig 还可以延长器官移植的存活时间[7]。

本课题仅为动物实验研究，其临床应用和自身免疫发生后的治疗作用还有待进一步研究。

（致谢：本实验得到烧伤研究所吴军研究员、罗高兴博士、易绍萱博士的大力支持与协作，在此表示衷心感谢。）

参考文献：

[1] Lohse A W, Manns M, Dienes H P, *et al*. Experimental autoimmune hepatitis: Disease induction, time course and T-cell reactivity[J]. Heapatology, 1990, 11(1): 24－30.

[2] Manns M, Meyer Zum Buschenfelde K H, Hutteroth T H, *et al*. Detection and characterization of liver membrane autoantibodies in chronic active hepatitis by a solid-phase radioimmunoassay[J]. Clin Exp Immunol, 1980, 42(2): 263－272.

[3] 病毒性肝炎防治方案(试行)[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(11): 788－791.

[4] Chattopadhyay D, Sen M R, Aryya N C, *et al*. Immunohistopathological reactions for liver-specific membrane lipo-protein in experimental autoimmune hepatitis[J]. Indian J Pathol Microbiol, 1999, 42(3): 291－297.

[5] McFarlane I G, McFarlane B M, Major G N, *et al*. Identification of the hepatic asialo-glycoprotein receptor as a component of liver specific membrane lipoprotein[J]. Clin Exp Immunol, 1984, 55(2): 347－354.

[6] 林学颜，张　玲. 现代细胞与分子免疫学[M]. 北京：科学出版社，1999. 181－198.

[7] 罗高兴，吴　军，易绍萱，等. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长小鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 37－39.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2001)03-0303-01

经验与短篇

颌下腺手术局麻方法的改进

Modification for local anaesthesia for submandibular gland operation

史文进[1]，时峰展[2]，杨　军[1]，孙　远[1]，杨彦春[1]　（[1] 第三军医大学附属西南医院口腔科，重庆 400038；[2] 南阳市镇平县五官科医院，南阳 474250）

1997 年 4 月以来，我们对颌下腺手术局麻方法作了改进，与传统方法进行了比较，麻醉效果满意，现报告如下。

1　临床资料

一般资料：将就诊的颌下腺包块病人随机分成 A、B 两组。A 组 15 例，其中颌下腺慢性炎 9 例，颌下腺混合瘤 4 例，颌下腺囊肿 2 例，男 6 例，女 9 例，平均年龄 48.4 岁。B 组 15 例，其中颌下腺慢性炎 10 例，颌下腺混合瘤 3 例，颌下腺囊肿 2 例，男 5 例，女 10 例，平均年龄 49.2 岁。两组病人一般情况类似，无显著差异。无麻醉手术禁忌症。

方法：按常规术前准备用药，禁食。术前 30 min 肌注鲁米那钠 2 mg/kg，阿托品 0.01 mg/kg。A 组病人于术中采用 1% 普鲁卡因局部浸润麻醉加 2% 利多卡因口腔内舌神经阻滞麻醉。B 组常规采用 1% 普鲁卡因局部浸润麻醉。除个别高血压患者外，两组麻药均加用 1∶40 万肾上腺素液。

麻醉效果评估标准：显效：术中患者无明显疼痛，配合手术好。有效：术中患者有轻微疼痛，尚能忍受，可配合手术。欠佳：术中患者疼痛明显，配合手术差，需加用其他镇痛剂。

2　结果

术中局麻效果为：A 组 9 例显效，4 例有效，2 例欠佳；B 组 2 例显效，3 例有效，10 例欠佳。两组病人麻醉有效率有显著性差别（$P<0.05$）。

作者简介：史文进(1966－)，男，陕西省安康市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事口腔颌面部缺损的修复与整形方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)68754406

收稿日期：2000-09-24；修回日期：2001-01-05

（下转 307 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net