

骨磷脂质体减少 Con A 介导的肝脏损伤

刘福青 (山东滨州职业学院医学系, 山东 滨州 256600)

摘要:目的 观察巨噬细胞在刀豆蛋白 A(Con A)诱导的免疫性肝脏损伤模型中的作用。方法 制备骨磷脂质体,通过尾静脉注射到小鼠体内诱导巨噬细胞凋亡,再用 Con A 诱导小鼠肝脏损伤,利用酶法检测小鼠血浆转氨酶水平、RT-PCR 法检测肝脏组织中 TNF- α mRNA 表达水平和 H-E 法分析肝脏组织病理学变化。结果 骨磷脂质体体外可以诱导巨噬细胞凋亡,体内注射可以降低 Con A 诱导小鼠血浆转氨酶升高、下调肝脏组织中 TNF- α mRNA 表达以及改善小鼠肝脏组织病理损伤程度。结论 巨噬细胞在 Con A 诱导的肝脏损伤中是重要效应细胞之一。

关键词:脂质体;骨磷脂质体;骨磷;凋亡;巨噬细胞;肝炎

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)08-0683-04

Apoptosis of Macrophages Induced by C₁₂ Mbp-Liposome Cut Down Hepatic Injury Mediated by Concanavalin A

LIU Fu-qing (Medical Department of Bin Zhou Vocational College, Bin Zhou 256600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the role of macrophages in the model of hepatic injury mediated by concanavalin A. **METHODS** C₁₂mbp-liposome is prepared by thin-film method; C₁₂mbp-liposome induce apoptosis of macrophages in mice by tail intravenous administration, and then concanavalin A induced hepatic injury in mice by tail intravenous administration. Blood density of ALT is examined by ferment method; TNF- α mRNA is examined by RT-PCR method; The pathological change of hepatic tissue is examined by H-E method. **RESULTS** C₁₂mbp-liposome induces the apoptosis of macrophages *in vitro*; Concanavalin A can improve the density of blood ALT and reduce the density of TNF- α mRNA, and restore the damage of hepatic tissue. **CONCLUSION** Macrophages play a important role in the hepatic injury induced by concanavalin A.

KEY WORDS: liposome; c₁₂mbp-liposome; c₁₂mbp; apoptosis; macrophage; hepatitis

肝炎是严重危害人们身体健康的重要疾病之一,阐明其发生机制对于预防和治疗该病不仅具有重要理论意义,而且具有实践意义。近年来采用刀豆蛋白 A(Con A)诱导的免疫性肝炎这一公认模型对其发生机制进行研究,认为 T 细胞和细胞因子 TNF- α 、IL-6 以及 IL-1 等是主要的效应细胞和效应分子^[1-4]。但关于巨噬细胞在 Con A 诱导的免疫性肝炎模型中的作用尚不清楚。本研究拟用骨磷脂质体体内诱导巨噬细胞凋亡来观察其在 Con A 诱导的免疫性肝脏损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Balb/c 小鼠由潍坊医学院实验动物中心提供。骨磷脂购于先灵(广州)药业有限公司分包装(德国 Schering GmbH und co. Produktions KG 生产)。Con A 购于 Sigma 公司; DNA 琼脂糖电泳所需 EDTA 蛋白酶 K、Rnase 平衡酚、氯仿、琼脂糖均有潍坊医学院免疫学教研室提供;血浆转氨酶测定试剂购于南京建成生物技术工程公司; β -actin 和 TNF- α 引物由

上海博亚生物技术有限公司合成。

β -actin 上游引物: 5'-ATGGATGACGATATCGCT-3'
 β -actin 下游引物: 5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3'
TNF- α 上游引物: 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3'
TNF- α 下游引物: 5'-TACAGGCTTGCTCACTCGAATT-3'

1.2 骨磷脂质体的制备

1.2.1 制备卵磷脂-氯仿液:称取 100 mg 卵磷脂溶于 1 mL 氯仿, -20℃ 保存。

1.2.2 制备胆固醇-氯仿液:称取 8 mg 胆固醇溶于 10 mL 氯仿,盛于 500 mL 细颈圆底瓶中。

1.2.3 吸取 0.86 mL 卵磷脂-氯仿液加入盛有胆固醇-氯仿液的细颈圆底瓶中,将圆底瓶颈口紧紧套在旋转蒸发仪的柄上,为了保证负压,瓶口处应用胶带密封。

1.2.4 在低真空下(从 200 mbar 逐渐降至 150 mbar)同时以 150 r·min⁻¹ 的速度旋转除去氯仿。待氯仿蒸发完毕之后,可看到在瓶内壁上形成一层薄薄的乳白色的脂质膜(氯仿蒸发速度不宜过快,否则形成的脂质膜不均匀并且在溶下

时容易形成块状。如果室温过低氯仿蒸发速度过慢,可适当提高瓶底部的温度,但不宜太高,可在瓶的底部加一盛水的大烧杯,调整烧杯中水的温度,一般温水浴的温度在 50℃左右即可)。

1.2.5 在室温下,将 10 mL 水溶液 A 或 B 加入细颈圆底瓶中,同时旋转 ($180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),分别溶下脂质膜,制成乳白色的混悬液。制备空脂质体:加入 A 液即 10 mL PBS 液旋转 10~20 min。于 -20℃ 保存。制备骨磷脂质体:加入 B 液即 10 mL $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 骨磷脂 (2.5 g 骨磷脂加 10 mL 蒸馏水) 旋转 5~10 min,于 -20℃ 保存。

1.2.6 将以上两种乳白色的混悬液分别无菌移入已编号消毒的青霉素瓶中,保存于室温 N_2 中 1~2 h (N_2 可阻止磷脂载体变性,这对于骨磷脂质体尤为重要。因为骨磷脂质体是悬浮于水溶液之上,空脂质体是在试管底部形成小球状。)

1.2.7 将盛青霉素瓶中的悬浮液轻轻摇荡,室温条件下,水浴超声 3 min 直至使乳白色不透明的液体变为透明澄清的液体。

1.2.8 将以上混悬液放置于室温 N_2 中 2 h (或 4℃ 过夜) 使脂质体膨胀。

1.2.9 将膨胀后的混悬液无菌移入 10 mL 消毒离心管中,离心 $5\,000\sim6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 15 min 离心去除空脂质体。通过离心骨磷脂质体形成乳白色的小棒状,浮于液面上呈膜状,膜下面的悬浮液较清澈。悬浮液不完全清澈时,获得骨磷脂质体就较少。

1.2.10 用 Pasteur pipette 管小心移走薄膜下面的液体, [仅有 10% 的骨磷脂被包裹,浓度为 ($3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)], 没有被包裹的骨磷脂通过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的过滤网过滤后可以再次使用,但最多不超过 5 次。

1.2.11 将剩在离心管中骨磷脂质体用消毒的 PBS 液洗涤 2~3 次 (每次皆离心 $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)。

1.2.12 最后将骨磷脂质体再次悬浮于 4 mL 消毒的 PBS 液中,使用于动物之前需要轻轻摇荡混匀,确保脂质体的均匀分配。骨磷脂质体保存于 N_2 中,可保存 2 周,如果将其保存于骨磷脂原液中可保存较长的时间,但是使用之前可以从第七步开始。

1.3 体外检测骨磷脂质体诱导巨噬细胞凋亡

1.3.1 腹腔巨噬细胞的制备 取 10 g 左右的小鼠雌雄皆可 5~6 只腹腔注射 2% 淀粉肉汤 2 mL 72 h 处死,浸入 70% 酒精中 1 min,置于超净工作台上,无菌暴露腹腔,用消毒的 Hanks 液充分清洗腹腔,将腹腔液取出移入冰浴消毒的试管中,离心 $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 3 min,弃上清液,用消毒的加小牛血清 1640 液调整巨噬细胞数至 1106 个。

1.3.2 巨噬细胞凋亡的诱导 取巨噬细胞混悬液 1 mL 四份,每份加 1640 液至 10 mL 移入培养瓶中,37℃ 5% CO_2 培养上述细胞,分三个时间段 0, 12, 24 h 分别加入骨磷脂质体 0.5 mL/10 mL,培养 24, 12, 3, 0 h 终止培养。加入胰酶将巨噬细胞从培养瓶壁上消化下来,离心 $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min,弃上清液, PBS 液 (pH 7.2) 洗涤 2 次。

1.3.3 DNA 琼脂糖电泳 加细胞核裂解液 0.5 mL 重悬细胞, 37℃ 水浴过夜,加等体积的平衡酚抽提,上下颠倒混匀,离心 $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 5~6 min,上清移至另一 Ep 管中,加等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 混匀抽提,离心 $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 5~6 min,上清移至另一 Ep 管中,加入 1/10 体积 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠和 2 倍体积无水冰冻乙醇上下颠倒混匀, -20℃ 放置 20 min,离心 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 10 min 沉淀 DNA,弃上清液, 70% 乙醇洗涤同上离心,弃上清液,风干残余液体,加适量的 TE 缓冲液溶解,加 5 μL Rnase, 37℃ 水浴 30 min,取样品 10 μL 加上样缓冲液 20 μL , 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 (电压 50 V 1~2 h) UV 观察,拍照。

1.4 骨磷脂质体体内对肝脏损伤的影响

实验组分为 2 组:骨磷脂质体注射组,在诱导经典的 Con A 肝炎模型前 24 h 静脉注射骨磷脂质体 ($3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); 对照组,在诱导经典的 Con A 肝炎模型前 24 h 静脉注射等体积不含骨磷脂的空脂质体。实验当天每只小鼠尾静脉注射 Con A $15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 诱导肝炎。12 h 后收集血浆及肝脏组织样品用于转氨酶 ALT 测定及 TNF- α mRNA 和病理组织学分析。

1.5 血浆转氨酶 ALT 测定

按照试剂盒说明操作。

1.6 肝脏组织 TNF- α mRNA 测定

应用 RT-PCR 检测肝脏组织中 TNF- α mRNA 表达水平。

1.7 肝脏组织病理学分析

取肝脏组织标本经 10% 福尔马林固定 4 h 后对样品进行脱水、透明和浸蜡处理,然后进行石蜡切片,常规 H-E 染色分析肝脏病变程度。

1.8 统计学分析

组间显著性差异分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 骨磷脂质体体外可以诱导巨噬细胞凋亡

DNA 琼脂糖电泳显示骨磷脂质体作用 0 h 和 3 h 没有出现梯状带,作用 12 h 出现较弱的梯状带,而作用 24 h 出现明显的梯状带。见图 1。

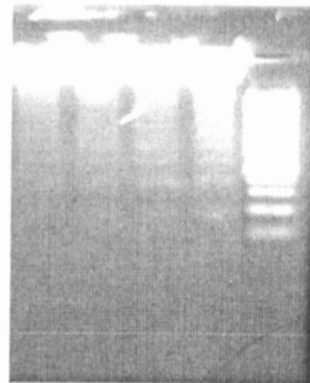


图 1 骨磷脂质体与巨噬细胞体外作用不同时间段 DNA 琼脂糖电泳条带

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of DNA was examined apoptosis of macrophages for 0, 3, 12, or 24 hours *in vitro*

2.2 骨磷脂质体体内注射可以减轻肝脏组织的损伤

2.2.1 血浆转氨酶 ALT水平改变 正常小鼠血浆 ALT为 $45 \pm 9 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,脂质体对照组小鼠血浆 ALT为 $376 \pm 29 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,骨磷脂脂质体处理组小鼠血浆 ALT为 $57 \pm 14 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,与脂质体对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.01$)。

2.2.2 肝脏组织 TNF- α mRNA表达水平变化 正常小鼠肝脏组织表达较低水平的 TNF- α mRNA;脂质体对照组小鼠肝脏组织 TNF- α mRNA表达水平明显升高;骨磷脂脂质体处理组小鼠肝脏组织 TNF- α mRNA表达水平较对照组明显降低,与脂质体对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.2.3 肝脏组织病理学检查 正常小鼠肝小叶结构正常、清楚,肝索排列整齐,中央静脉不充血,汇管区不扩大。对照组小鼠肝脏损伤严重,局部肝细胞坏死,出现炎症细胞向坏死区浸润,肝窦、肝索消失,胞核深染,细胞明显水肿,中央静脉中可见炎症细胞贴壁,明显脂肪变性,出现灶性坏死,肝窦、肝索消失,肝细胞明显水肿,出现明显的颗粒变性。骨磷脂脂质体组小鼠,肝脏组织损伤均明显减轻,与正常对照组表

图极为接近。见图 3。

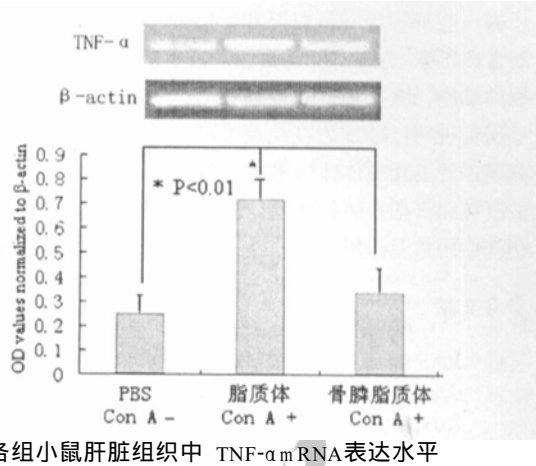


Fig 2 Different contents of TNF- α mRNA express in different groups of mice hepatic tissue

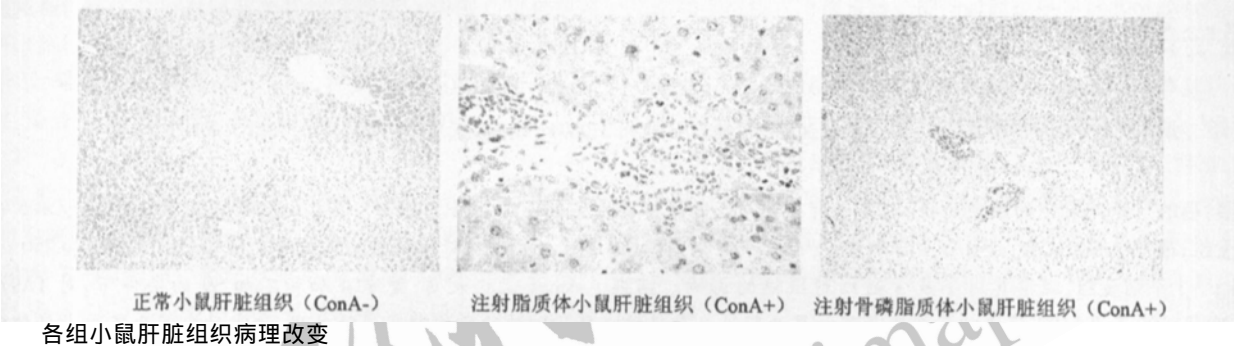


Fig 3 Pathological changes of mice hepatic tissue in different groups

3 讨论

刀豆蛋白 A (Con A) 诱发的小鼠特异性肝损伤被认为是 T 淋巴细胞介导的自身免疫性肝炎的一种实验模型,它的建立和应用为深入研究肝细胞损伤的细胞学与分子学机制以及进行治疗药物筛选提供了更为方便和理想的实验动物模型^[1]。文献表明,一次性小鼠尾静脉注射足剂量 Con A 后 3 h 即可见肝细胞损伤,12 h 左右肝损伤达峰值。肝损伤表现为血清 ALT, AST, LDH 增高,肝组织学炎症加重,同时肝组织内大量淋巴细胞、中性粒细胞浸润。Con A 诱导肝损伤的机制是通过与肝窦结合后,使循环 T 淋巴细胞汇入肝窦并在局部增殖,释放多种炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 等参与肝脏免疫损伤^[2-4]。

巨噬细胞是体内一种重要固有免疫细胞,除作为机体的“清道夫”外,还是机体的免疫调节和效应细胞,通过吞噬杀灭微生物、抗原递呈和分泌多种细胞因子等调控机体炎症反应和免疫应答。但该细胞在 Con A 诱导肝损伤中的机制尚不明了。本研究利用骨磷脂脂质体天然靶向性导入单核网状内皮系统,体外观察骨磷脂脂质体对巨噬细胞凋亡的影响,体内观察骨磷脂脂质体清除巨噬细胞后对 Con A 诱导肝损伤的影响。

本研究体外试验显示,骨磷脂脂质体与巨噬细胞作用一定时间后,巨噬细胞 DNA 琼脂糖电泳表现为不同的带型。作

用 0, 3 h 时巨噬细胞 DNA 没有梯状带出现。作用 12 h 时,琼脂糖电泳出现比较明显的梯状带——即特异性凋亡条带,24 h 时梯状带更加显著,说明随着骨磷脂脂质体与巨噬细胞作用时间的延长,降解的 DNA 也逐渐增多,小片段的 DNA 的增多,琼脂糖电泳的梯状带越明显 (如图 1)。说明骨磷脂脂质体可以体外诱导巨噬细胞凋亡。

本研究体内试验显示,通过尾静脉给小鼠注射 Con A 可以成功诱导肝损伤模型;若提前 24 h 注射骨磷脂脂质体后再进行尾静脉 Con A 注射,则肝脏损伤程度明显下降,表现为 ALT、TNF- α mRNA 水平明显降低,肝脏组织病理变化明显减轻。说明巨噬细胞也是 Con A 诱导的肝脏损伤模型中的重要效应细胞之一。

有研究报道^[5] ConA 可诱导小鼠腹腔 M Φ 高度表达 TNF- α 和 IL-1 β 。经 ConA 预处理可高度诱导 NF- κ B 活化,参与各种转录的调节,调节 TNF- α 、IL-1 β mRNA 的表达和 iNOS 的活性,产生 TNF- α 等炎性细胞因子、NO 等生物活性介质,增强 M Φ 的杀伤活性。最近有学者^[6]证明巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) 基因敲除小鼠不发生 Con A 诱导的肝炎,说明了 MIF 是 Con A 诱导肝炎模型的重要因子之一。研究表明, MIF 作为固有性免疫和炎症反应的调节因子发挥中枢性的作用,它可以直接或间接促进一组炎症前分子包括细胞因子 (TNF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) 巨噬细胞炎症蛋白 2

(MIP-2), NO, COX2和花生四烯酸途径产物的生成和表达, 还有一些基质金属蛋白酶和它们的抑制因子。还可以促进对含内毒素细菌的侦察,使位于宿主抗微生物防卫系统第一线的细胞,如巨噬细胞,能迅速对入侵的微生物起反应。这些研究说明巨噬细胞在免疫炎症反应中的重要作用。本研究利用骨髓脂质体体内清除巨噬细胞可以降低 Con A诱导的肝脏损伤损伤的程度,也表明了巨噬细胞在介导肝脏免疫损伤中的重要作用。

参考文献

- [1] JENS S , JENNIFER P , ALEXANDRA K K , *et al.* Silibinin protects mice from T cell dependent liver injury [J]. J Hepatol, 2003, 39(3) : 333-340.
- [2] TIEGS G, HENTSCHEL J, WENDEL A. A T cell dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A [J].

J Clin Invest, 1992, 90(1) : 196-203.

- [3] GANTNER F , LEIST M, LOHSE A W , *et al.* Concanavalin A-induced T cell mediated hepatic injury in mice : the role of tumor necrosis factor [J]. Hepatology, 1995, 21(1) : 190-198.
- [4] MIZUHARA H , O'NEILL E , SEKI N , *et al.* T cell activation associated hepatic injury : mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6 [J]. J Exp Med, 1994, 179(5) : 1529-1537.
- [5] 高立芬, 孙汶生, 刘君炎, 等. 刀豆蛋白 A活化小鼠巨噬细胞机理的初步探讨 [J]. 基础医学与临床, 2003, 123(6) : 661-665.
- [6] NAKAJIMA H, TAKAGI H, HORIGUCHI N , *et al.* Lack of macrophage migration inhibitory factor protects mice against concanavalin A-induced liver injury [J]. Liver International, 2006, 26(3) : 346-351.

收稿日期 : 2006-12-12