

• 基础实验研究论著 •

探讨不同浓度刀豆蛋白 A 对小鼠肝损伤的影响*

罗裕旋¹, 何小娟², 邱群芳¹, 朱飞¹, 杨建军¹

(广东省深圳市宝安区: 1. 龙华人民医院; 2. 龙华预防保健所 518109)

摘要:目的 探讨刀豆蛋白 A(ConA)诱导小鼠急性肝损伤,形成肝纤维化的最佳成模时间与剂量。方法 将 BALB/c 小鼠 60 只随机分为 6 组,即正常对照组和模型 A、B、C、D、E 组,每组 10 只。除正常对照组外,模型组分别经尾静脉注射 8、10、12、14、16 mg/kg ConA。每周 1 次检测各组小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆汁酸酶(TBA)、透明质酸酶(HA)水平,持续检测 8 周。8 周后检测肝组织匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)水平。结果 经不同剂量 ConA 诱导后随注射次数增多和持续时间延长,小鼠血清 ALT、TBA、HA 和肝组织匀浆中 MDA、NO、SOD 水平与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 小鼠经尾静脉注射剂量为 12 mg/kg ConA 第 5 周可获取理想的肝纤维化动物模型。

关键词:伴刀豆球蛋白 A; 丙氨酸转氨酶; 小鼠; 模型,动物; 肝硬化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1153-02

Influence of different concentrations of concanavalin A on mouse liver*

Luo Yuxuan¹, He Xiaomei², Qiu Qunfang¹, Zhu Fei¹, Yang Jiangjun¹

(1. Longhua Hospital; 2. Prevention & Health Care Center of Longhua, Baoan, Shenzhen, Guangdong 518109, China)

Abstract: Objective To explore optimal treat time and dosage of concanavalin A(ConA) to induce hepatic fibrosis in mouse model of acute liver damage. **Methods** 60 BALB/c mice were randomly divided into 6 groups, including normal control group and model group A, B, C, D and E, 10 mice for each group. Mice of model groups were injected through caudal vein with ConA for 8, 10, 12, 14 and 16 mg/kg of. Serum levels of alanine aminotransferase(ALT), total bile acid enzyme(TBA) and hyaluronidase(HA) were continuously detected in mice of every group for 8 weeks at frequency of once a week. Levels of malonaldehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD) and nitrogen monoxidum(NO) in hepatic tissue homogenate were detected after 8 weeks. **Results** After induced by different dosages of ConA, with the increasing of injection frequency and prolonging of duration, serum levels of ALT, TBA and HA, and MDA, NO and SOD levels in hepatic tissue homogenate in mice of model groups were significantly different with those in normal control group($P < 0.05$). **Conclusion** Continuous infection of ConA with dosage of 12 mg/kg through caudal vein for 5 weeks could construct ideal mouse model with hepatic fibrosis.

Key words: concanavalin A; alanine transaminase; mice; models, animal; liver cirrhosis

有研究显示,刀豆蛋白 A(ConA)剂量、注射次数和时间对肝纤维化模型成型影响较大^[1]。本实验采用不同剂量 ConA 诱导小鼠形成肝纤维化模型,以探讨形成肝纤维化的最佳成模时间与剂量。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 健康小鼠(BALB/c,体质量 20~40 g)60 只由广东医学院动物中心提供。

1.1.2 仪器与试剂 仪器为德国罗氏全自动生化分析仪(MODULARDP)、721B 型分光光度计(上海第三分析仪器厂生产)、Thermo 酶标仪、LXJ-II B 上海安亭离心机、GHP-9270 隔水式恒温箱等。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆汁酸酶(TBA)检测试剂及质控品由罗氏公司提供,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)试剂盒由南京建成生物研究所提供,小鼠透明质酸酶(HA)检测试剂由厦门慧嘉生物科技提供,ConA 购于美国 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的建立及处理 将 60 只小鼠随机分为 6 组,每组 10 只。A、B、C、D、E 组分别经尾静脉注射 8、10、12、14、16 mg/kg ConA 诱导急性肝损伤小鼠模型,正常对照组经尾静脉注射 250 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)溶液,每周 1 次,连续重复 8 周;所有动物每注射 24 h 后取尾静脉血,分离血清进行血清

酶检查。第 8 周后所有小鼠摘眼球采血,3 000 r/min(离心半径 19.5 cm)离心 10 min,取血清进行血清酶检测;脱颈椎处死小鼠取肝、脾脏称质量计算脏器系数(mg/10 g),去除血管内血液后取肝组织 1 000 mg,置烧杯中捣碎、磨浆加入 9 倍生理盐水混匀,取 5 mL 3 000 r/min(离心半径 19.5 cm)离心 10 min,用上清液严格按试剂盒说明书检测 MDA、SOD、NO。

1.2.2 实验动物的安全性 正常对照组与 A 组小鼠在实验过程中均未出现异常。B、C 组小鼠第 2、3 次注射后出现轻度皮肤、黏膜紫绀,呼吸加快,约 1 h 后自行缓解;D 组小鼠第 3 次注射后 2 只出现严重反应,经抢救无效死亡;E 组小鼠第 2 次注射后 2 只出现严重反应,经抢救无效死亡,第 3 次注射后又有 1 只出现严重反应,经抢救无效死亡。

1.3 统计学处理 检测结果采用 SPSS11.5 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠血清 ALT 检测 见表 1。

2.2 小鼠血清 TBA 检测 见表 2。

2.3 小鼠血清 HA 检测 见表 3。

2.4 实验对小鼠肝、脾指数和肝组织 MDA、SOD、NO 的影响 见表 4。

* 基金项目:深圳市宝安区科技计划社会公益项目(2010718)。

表 1 不同浓度 ConA 诱导急性肝损伤小鼠血清 ALT 检测结果 ($\bar{x} \pm s, U/L$)

时间	正常对照组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
第 1 周	28.1±6.2	897±168.6*	1 020±181.5*	1 127±233.6*	1 220±241.5*	1 289±248.9*
第 2 周	26.3±6.0	1 320±203.4**	1 682±242.7**	2 320±283.4**	2 873±392.7**	3 420±451.7**
第 3 周	27.9±6.7	1 129±186.7**	1 520±223.6**	1 829±233.7**	2 026±263.6**	2 820±383.6**
第 4 周	28.5±5.6	936±153.6**	1 120±181.5**	1 136±183.6**	1 820±241.5**	2 520±361.5**
第 5 周	29.4±6.2	727±123.2*	806±151.3*	820±153.2*	1 615±238.3*	2 205±292.3*
第 6 周	25.9±5.4	623±120.3*	639±138.8*	675±143.3*	1 429±235.8*	1 806±248.8*
第 7 周	27.7±6.9	589±117.8*	615±121.5*	620±133.8*	1 325±226.1*	1 535±221.5*
第 8 周	28.5±5.6	567±113.9*	571±116.2*	577±125.6*	1 237±217.5*	1 417±217.4*

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

表 2 不同浓度 ConA 诱导急性肝损伤小鼠血清 TBA 检测结果 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

时间	正常对照组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
第 1 周	6.5±3.2	127.0±33.3*	122.0±31.5*	155.0±39.6*	160.0±43.8*	177.0±46.6*
第 2 周	5.9±3.7	150.0±38.4*	175.0±52.7*	183.0±60.8*	205.0±88.6*	239.0±105.3*
第 3 周	6.1±3.6	229.0±93.7**	256.0±109.4**	295.0±126.6**	306.0±133.2**	327.0±156.1**
第 4 周	6.6±3.0	256.0±103.6**	278.0±137.5**	283.0±125.9**	275.0±120.6**	285.0±133.8**
第 5 周	5.5±2.8	220.0±93.2**	235.0±101.3**	278.0±129.8**	273.0±101.9**	276.0±113.7**
第 6 周	5.7±3.6	195.0±87.3**	216.0±89.8**	255.0±105.2**	258.0±85.1**	261.0±105.8**
第 7 周	7.2±3.8	182.0±63.8**	192.0±68.5**	236.0±95.9**	237.0±73.5**	248.0±83.2**
第 8 周	6.3±3.1	167.0±55.2*	173.0±46.2*	227.0±88.7*	215.0±88.4*	236.0±78.6*

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

表 3 不同浓度 ConA 诱导小鼠急性肝损伤血清 HA 检测结果 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

时间	正常对照组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
第 1 周	28.5±6.2	34.0±5.8*	35.0±6.2*	37.0±6.6**	42.0±7.2*	58.0±11.6*
第 2 周	25.9±6.7	47.0±7.4*	50.0±9.6*	58.0±15.3*	466.0±84.5**	573.0±96.1**
第 3 周	27.9±8.9	165.0±20.7**	197.0±26.1**	357.0±66.2**	763.0±156.1**	957.0±176.4**
第 4 周	28.5±5.6	276.0±46.2**	328.0±53.9**	447.0±83.8**	1 057.0±183.7**	1 257.0±201.2**
第 5 周	25.3±5.2	445.0±85.7**	543.0±105.4**	675.0±135.7**	1 346.0±215.4**	1 675.0±245.7**
第 6 周	27.9±4.9	687.0±114.3**	828.0±164.2**	1 287.0±164.3**	1 628.0±244.2**	1 928.0±284.5**
第 7 周	28.5±5.6	973.0±179.1**	1 193.0±200.8**	1 351.0±227.5**	1 863.0±267.1**	>2 000**
第 8 周	25.3±5.2	1 267.0±203.8**	1 535.0±231.5**	1 605.0±235.9**	>2 000**	>2 000**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

表 4 实验对小鼠肝、脾指数和肝组织 MDA、SOD、NO 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	肝指数(g/kg)	脾指数(g/kg)	SOD(kU/g)	MDA($\mu\text{mol/g}$)	NO($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	43.5±4.2	5.91±1.07	147.9±18.9	4.52±1.06	31.7±5.2
A 组	71.3±5.6**	8.19±1.14**	125.9±17.1*	6.93±1.86*	65.1±7.6**
B 组	76.8±4.7**	9.28±1.36**	96.8±16.7**	7.82±2.54**	78.8±10.3**
C 组	81.7±5.6**	12.73±1.54**	85.9±15.1**	8.93±2.86**	85.3±12.1**
D 组	88.9±7.3**	14.39±1.67**	76.1±13.9**	10.15±3.18**	96.7±14.8**
E 组	95.1±11.2**	16.22±1.78**	68.6±12.8**	12.60±3.36**	113.8±16.7**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

3 讨 论

3.1 用 ConA 诱导的小鼠急性肝损伤模型具有制作简便、快捷、有剂量依赖性和肝脏特异性等特点。该模型中小鼠肝损伤的病理变化特别更接近、更类似于人类肝病的病理特点,故被认为最适合研究人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等肝脏疾病的病理机制^[2]。

3.2 目前国内外常用的实验动物模型主要有四氯化碳法、二甲基亚硝胺法和注射异种蛋白引起肝损伤。ConA 是一种多克隆丝裂原,在体内有强嗜肝性,可以激活 T 细胞,引起 T 细胞介导的肝细胞损伤,其次,体内活化的 T 淋巴细胞与细胞因子 γ -干扰素(IFN-R)等随血流到肝脏,直接与肝细胞接触或进一步激活巨细胞、破坏血管内皮细胞导致肝(下转第 1156 页)

35 株细菌双圈耐药。

2.2 琼脂稀释法 8 株细菌对阿米卡星敏感;40 株细菌对阿米卡星耐药,其中 5 株细菌最低抑菌浓度(MIC)为 64~256 mg/L,另外 35 株细菌阿米卡星的 MIC 均大于 512 mg/L。K-B 法和琼脂稀释法测试结果一致。



A:敏感菌株;B:普通耐药菌株;C:双圈耐药菌株。

图 1 阿米卡星药敏试验结果

2.3 基因扩增 8 株对阿米卡星敏感的细菌均未检出相关耐药基因;5 株普通耐药细菌均未检出 armA、rmtB、rmtC 基因,80.0%(4/5)检出 aac(6') I 基因;35 株双圈耐药细菌均检出 armA 基因,未检出 rmtB、rmtC 基因,77.1%(27/35)检出 aac(6') I 基因。

3 讨论

氨基糖苷类抗生素通过与细菌 30S 核糖体亚单位的 16S rRNA 特异性位点不可逆结合,干扰蛋白质合成,从而阻止细菌生长。该类药物抗菌谱广、疗效卓越,在医学和畜牧兽医业得到广泛应用,但由于泛用和过度使用,氨基糖苷类药物耐药问题随之凸现。

本研究通过对基因扩增发现,敏感株均不携带耐药基因;普通耐药株均不携带 armA、rmtB、rmtC 基因,80.0%(4/5)携带 aac(6') I 基因;双圈耐药株均携带 armA 基因,不携带 rmtB、rmtC 基因,77.1%(27/35)携带 aac(6') I 基因。由此可以判断 armA 基因诱导型表达介导了双圈现象的产生。

细菌对氨基糖苷类药物的耐药机制:(1)细菌外膜蛋白的通透性改变或细胞内膜转运异常,使药物在菌体内的蓄积减

少而引起耐药;(2)产生氨基糖苷类修饰酶;(3)药物作用靶位改变^[3]。

armA 基因首先发现于分离自法国的 1 株肺炎克雷伯菌。Liou 等^[4] 研究发现,armA 基因编码的 armA 蛋白使 16S rRNA N7-G1405 位点发生甲基化,阻碍其与 4,6-脱氧链霉胺的 3'氨基之间的氢键形成,并造成 G1405 与庆大霉素环之间产生空间位阻。这一甲基化将使 G1405 发生改变,导致氨基糖苷与译码位点不能结合,使氨基糖苷类抗生素高水平耐药, MIC 往往高达 512~1 024 μg/mL。由 armA 16S rRNA 甲基化酶基因介导的高水平氨基糖苷类抗生素耐药已非常普遍,因此,必须合理使用氨基糖苷类抗生素,避免加速该耐药基因的传播。因 ABA 普遍存在于环境中,而且耐受肥皂,是医务人员手上最常分离到的革兰阴性菌,如医院内感染各项控制措施执行不到位,ABA 可以在医院内流行性传播,因此,必须加强各项医院内感染控制措施的执行力度,避免这种现象的发生。

参考文献:

- [1] Gombac F, Riccio ML, Rossolini GM, et al. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(11): 3665-3668.
- [2] 韩丽娟,邵海枫,王卫萍,等. 鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物的耐药机制研究[J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(10): 1038-1041.
- [3] 糜祖煌,钱小毛,秦玲. 鲍曼不动杆菌连续分离株耐药性与遗传学特征研究[J]. *现代实用医学*, 2007, 19(6): 427-431.
- [4] Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, et al. Aminoglycoside resistance by armA-mediated ribosomal 16Smethylation in human bacterial pathogens[J]. *J Mol Bio*, 2006, 359(2): 358-364.

(收稿日期:2011-10-08)

(上接第 1154 页)

损伤^[3]。而 ConA 致肝纤维化的启动因素是激活 T 细胞使肝细胞受损。本研究结果显示,ConA 剂量越大,转氨酶上升越快、越高,对小鼠肝损伤更急、更重,提示 ConA 引起小鼠急性肝损伤具有剂量依赖性,易于建立稳定肝纤维化模型^[4]。

3.3 肝纤维化为慢性肝病发展为肝硬化的共同病理过程,确诊肝纤维化的“金标准”是病理学检查。但其具有创伤性,且费用昂贵而难以被患者接受,血清酶检测是目前倍受关注的研究方法^[5]。肝脏是体内含酶最丰富器官,测定血清酶活性变化可以判断肝脏功能、了解肝细胞破坏程度、肝细胞膜通透性变化及胆道系统阻塞情况等^[6]。TBA 是唯一可以同时反映分泌、生成摄取、肝损伤 3 个方面的血清学指标^[7]。肝硬化过程中先发生纤维增生,肝脏体积和质量增加,然后纤维收缩,肝细胞减少,体积缩小。在肝纤维化阶段,肝脏是肿大的。一旦肝细胞有病变,很容易引起血清中 TBA 升高。肝脏对胆汁酸的摄取功能下降,同时由于门静脉旁路、胆汁酸不再限于肠肝循环中,导致血清中 TBA 水平升高^[8]。因此,血清 TBA 测定是肝纤维化、肝硬化的敏感指标之一,还能反映病情的发展和评估预后。HA 主要由肝脏星状细胞产生,肝窦内皮细胞通过膜受体摄取和降解。在肝纤维化时肝窦内皮细胞表型发生,血清 HA 不同程度升高,血清 HA 水平与肝纤维化程度的符合率高^[9]。本实验通过联合检测血清 ALT、HA、TBA,并结合病理检查,反复注射 ConA 可适时观察小鼠肝纤维化进程,可获取最佳小鼠肝纤维化模型。本研究建立了在病理、生理机制上更接近人

体肝炎的免疫性肝损伤动物模型,为进一步探讨中药复方护肝汤抗肝损伤的临床应用提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 李鸿立,田聆,魏于全. 刀豆蛋白 A 诱导小鼠肝纤维化动物模型的建立[J]. *免疫学杂志*, 2004, 20(5): 390-393.
- [2] 曲建慧,张修礼. 小鼠 ConA 性肝损伤模型[J]. *世界华人消化杂志*, 2001, 9(5): 571-574.
- [3] 张炜,陈明,傅涓涓. 不同剂量刀豆蛋白 A 诱导 B 小鼠肝纤维化的量效关系[J]. *徐州医学院学报*, 2007, 27(6): 375-378.
- [4] Cantner F, Leist M, Lohse AW, et al. Concanavalin A induced T-cell-mediated hepatic injury in mice; the role of tumormector[J]. *Hepatology*, 1995, 21(1): 190-198.
- [5] 李石好,叶晓光,徐建英. 病毒性肝炎患者血清中肝纤维化标志物的检测及分析[J]. *热带医学杂志*, 2008, 8(5): 469-470.
- [6] 刘金涛. 谷氨酸脱氢酶活力变化在肝损伤中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(2): 270-271.
- [7] 费德红,何凤琼,颜永乾. 血清总胆汁酸在新生儿溶血患者肝损害中的临床观察[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(1): 26-27.
- [8] 吕英,王国英. 血清总胆汁酸测定在肝硬化患者中的应用[J]. *中国热带医学*, 2006, 6(1): 85.
- [9] 蔡卫民,陶君,翁红雷. 血清纤维化指标的影响因素分析[J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(1): 23-25.

(收稿日期:2011-10-08)