

# 肝细胞膜特异性脂蛋白诱发的小鼠自身免疫性肝炎

朱芄芄、李晓玉 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 用兔肝细胞膜特异性脂蛋白(LSP)免疫C57 BL小鼠, 能引起机体产生高滴度抗LSP; 如同时辅入乙型肝炎疫苗刺激, 4 wk后能引起小鼠的肝损伤。另以2'-去氧鸟苷抑制小鼠T抑制细胞( $T_s$ )活化后, 再用同系小鼠(C57 BL或JCR)LSP免疫, 也可以引起小鼠肝损伤且病变形成速度加快。提示肝炎病毒感染和 $T_s$ 功能低下能促进自身免疫性肝炎。

**关键词** 肝细胞膜特异性脂蛋白; 自身免疫病; 肝炎; 疫苗; 去氧鸟苷; 抑制细胞; 酶连接免疫吸附试验

自身免疫性肝炎是机体免疫功能失调引起的一种慢性、进行性肝损伤, 病人血清中常能找到抗自身肝细胞膜特异性脂蛋白(LSP)的抗体, 其发病机理可能与 $T_s$ 功能低下有关。 $T_s$ 低下导致T辅助细胞( $T_H$ )活化, 使机体对自身LSP产生了免疫反应, 结果造成肝细胞的炎症和坏死<sup>(1)</sup>。LSP是一种重要的肝细胞膜抗原, 乙型病毒性肝炎患者血清中若抗LSP持续阳性, 提示病情向慢性化方向发展<sup>(2)</sup>。以往学者多用人LSP免疫兔制备动物模型, 周期长, 成功率低, 不适用于发病机理和药物治疗研究<sup>(3)</sup>。本文以同种及异种动物LSP免疫小鼠,

同时应用乙型肝炎病毒刺激和 $T_s$ 抑制剂, 提高了模型成功率, 缩短了实验周期, 发展了前人的工作。

## 材料与 方法

刀豆素A(Con A, Sigma), 2'-去氧鸟苷(2'-dG, Boehringer), 人乙型肝炎灭活疫苗(HHBV, 上海市卫生防疫站提供), 酶联葡萄糖菌A蛋白(HRP-Protein A, 上海生物制品研究所), 卡介苗(皮上划横用, 上海生物制品研究所)。

**LSP分离提取**<sup>(4)</sup> 将正常日本大耳兔或小鼠(C57 BL或JCR)放血处死, 取肝, 用pH 8.0的蔗糖溶液制成50%(wt/vol)的肝匀浆液。然后4℃下105 000×g离心1 h, 取上清液经Sephrose 6 B柱, 用LKB自动部分收集器及E<sub>280nm</sub>紫外检测仪收集第1峰, 浓缩、透析, 即得到肝细胞膜抗原。用酚试剂法定蛋白含量, 置-20℃保存备用。

**小鼠自身免疫性肝炎模型的病理检查标准** 实质细胞: (-)正常; (+)肝细胞轻度肿胀或个别肝细胞坏死; (+++)肝实质大片坏死; (++)介于后二者之间。胆管周围及汇管区炎

细胞浸润：(-)汇管区无炎细胞或偶见个别淋巴细胞散在浸润；(+)胆管周围有少量中性白细胞、嗜伊红细胞；(+++)胆管周围及整个汇管区有大量中性白细胞、嗜伊红细胞及少量单核细胞浸润，有些浸及肝实质，界板破坏；(++)介于后二者之间，有明显中性白细胞浸润。

**血清抗 LSP 测定** 采用 ELISA 方法<sup>(5)</sup>，用包被液(pH 9.6 碳酸缓冲液)将抗原 LSP 稀释为 5 µg/ml，加入 40 孔平底聚苯乙烯板，每孔 100 µl，置湿暗盒，37℃。2 h 后，倾去孔中液体，加满洗涤液(pH 7.2，20 mmol/L 的 Tris/HCl 缓冲液，含 0.05% Tween-20)，3 min 后倾去，反复 3 次。末次倒尽后，每孔加入稀稀过的被检血清(稀释液是含 0.05% Tween-20，pH 7.4 的磷酸缓冲液)100 µl，置湿暗盒中 37℃ 温浴。2 h 后同前洗涤 3 次。每孔加入用稀释液 1:20 稀释的 HRP-Protein A 100 µl，置湿暗盒中 37℃，1.5 h 后倾去，再同前洗涤 3 次。每孔加底物(邻苯二胺溶液:柠檬酸 25 mmol/L，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 50 mmol/L，邻苯二胺 0.4 mg/ml，0.15% 浓 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，临用前配制)100 µl，置湿暗盒 37℃ 水浴 30 min 后，立即加入终止液(12% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，最后用酶联免疫检测仪(华东电子管厂)记录 490 nm 读数。

## 结 果

**用兔 LSP 免疫小鼠制作自身免疫性肝炎模型** C 57 BL 小鼠，♂，30 d 龄，体重 11 ± 2 g。用兔 LSP 0.5 mg 蛋白/ml，加弗氏完全佐剂(FCA)，sc 0.1 ml/鼠，并在第 1 次免疫同时每鼠 sc 百日咳菌苗 4 × 10<sup>9</sup>/50 µl。以后每周用兔 LSP 加 FCA 免疫 1 次。10 wk 后血清中可测得抗 LSP 抗体，15 wk 后抗体滴度更高，肝脏组织病理学检查未见显著变化。

C 57 BL 小鼠，♀，体重 20.3 ± 1.0 g。用兔 LSP(0.5 mg 蛋白/ml)加等量弗氏不完全佐剂(FIA)和人乙型肝炎疫苗(0.25 µg/ml)，sc 0.1 ml，每周 1 次，于第 4 次免疫后 d 7 处死。

肝脏组织学检查有变化，主要表现为汇管区炎细胞浸润和胆管周围炎。病变分级经 ridit 分析，后者变化非常显著。见表 1，图 1 A、B，(见铜版图 3)。

**Tab 1. Number of mice with liver damages in C 57 BL mice immunized with rabbit liver specific lipoprotein (RLSP) and human hepatitis B vaccine (HHBV). \*p>0.05, \*\*p<0.05. The immunized mice were given sc 0.1 ml the mixture of RLSP (0.5 mg protein/ml) and HHBV (0.25 µg/ml) and Freund incomplete adjuvant (FIA), 4 times at weekly intervals.**

Mice		Control 11	Immunized 12
Infiltration in portal area	++	1	3*
	+	2	4*
	-	8	5*
Pericho- langitis	+	1	8**
	-	10	4**

同时模型组血清中可检测到抗兔 LSP 抗体，升高非常显著。在解剖前 24 h 每鼠左耳 sc LSP 12 ng/20 µl，右耳注射生理盐水，解剖时沿耳廓线剪下两耳，测左右耳片重量之差，显示模型组迟发性超敏反应值增高非常显著。见表 2。

**Tab 2. Serum anti-RLSP and delayed-type hypersensitivity (DTH) of C 57 BL mice after challenged with rabbit LSP. n = 9 mice,  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*\*p<0.01**

Groups	Serum anti-RLSP A ( $\lambda = 490\text{nm}$ )	DTH ear wt gain(mg)
None	1.24 ± 0.26	2.0 ± 6.2
RLSP + HHBV + FIA	3.19 ± 0.89***	17.0 ± 6.9***

用 LSP 与 FCA 制成的乳剂免疫 6 只裸鼠，每鼠每周 sc LSP 0.05 mg，连续 6 wk，血清中抗 LSP 阴性，肝脏亦无病变。

**改变小鼠免疫状况，再用同系小鼠 LSP 免疫制作肝炎模型** C 57 BL 小鼠，♀，60 d 龄，体重 21.3 ± 1.0 g 及 JCR 小鼠，体重 23.4 ± 1.4 g。于 d 0 尾静脉 iv Con A 0.2 mg/kg，

Tab 3. Number of mice with liver damages after immunized with syngeneic mice LSP. \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$  vs Con A + 2'-dG group.

Mice	Groups	Mice	Infiltration in portal area			Pericholangitis			Parenchyma necrosis		
			++	+	-	++	+	-	++	+	-
C 57 BL	2'-dG	5		2	3			5			5
	Con A	5		1	4			5			5
	ConA + 2'-dG	5		4	1			5			5
	ConA + 2'-dG + C57BL-LSP	5		3*	2*	1*	1*	3*	2**	2**	1**
JCR	None	3			3			3			3
	JCR-LSP	2		1	1			2			2
	ConA + 2'-dG	4		1	3		2	2	1	3	
	ConA + 2'-dG + JCR-LSP	3		3*		1*	2*	2*	1*		

d 0-2 ip 2'-dG 50 mg/kg, d 4 及 d 13 im 同系小鼠 LSP 0.2 mg/鼠, 于第 2 次免疫 1 wk 后处理. 组织学检查结果显示应用 Con A 加 2'-dG, 能够加强 LSP 免疫引起的肝脏病变. 见表 3. 这种病变表现为胆管周围中性白细胞浸润, 肝实质可见肝细胞肿胀及散在的小片状坏死灶. 见图 1 D、C. 因系同系小鼠 LSP 免疫, 血清抗 LSP 升高不明显, 血清 SGPT 有 1 鼠明显升高, 且出现黄疸.

用肝匀浆超离心上清液免疫小鼠 C57BL 小鼠, ♀, 60 d 龄, 体重  $18.4 \pm 1.9$  g. C57BL 小鼠肝匀浆超离心液(肝抗原 LAg)加 FCA 免疫, 1 mg 蛋白/(鼠·wk)  $\times 4$ , 末次免疫后 d 7 处死. 另取 JCR 小鼠, ♀, 60 d 龄, 体重 21.0

Tab 4. Number of mice liver damages in C 57 BL mice immunized with 105 000  $\times$  g liver homogenate supernatant (LAg) of C57BL mice of JCR mice. \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$  vs FCA group.

Groups	Mice	Infiltration in portal area			Parenchyma necrosis		
		++	+	-	++	+	-
None	5		1	4		1	4
FCA	5		2	3			5
FCA + C57BL-LAg	5		2*	3*		1*	4*
None	11		1	10			11
FCA	6		3	3		3	3
FCA + JCR-LAg	7		3*	2*	2*	1*	4*

$\pm 1.0$  g. 同样用 C 57 BL 小鼠肝抗原加 FCA 免疫, 血清抗 LSP 和抗肝抗原均无明显升高. 肝脏组织学检查结果显示异品系小鼠肝抗原免疫能造成较明显的肝脏病变, 而同系鼠则不能. 见表 4, 图 1 E、F.

## 讨 论

LSP 是一组大分子脂蛋白. 本实验结果表明, 用 LSP 反复免疫 C 57 BL 小鼠可以引起血清中抗 LSP 抗体产生, 异种动物的 LSP 抗原性强于同种. 但 LSP 是一种弱抗原, 不能诱发明显的肝脏病变. 在自身免疫性肝损伤中, 还存在着其它抗原物质. 本文证明用肝匀浆 105 000  $\times$  g 离心上清液免疫小鼠, 可增加肝损伤出现率, 显然在超离心上清液中还存在着其它抗原物质, 如文献(6)中报道的肝细胞膜抗原(LMAg)等.

机体的免疫系统对适应内外环境起着平衡和稳定作用, 若  $T_h/T_s$  的平衡失调, 就可能产生疾病. 本文结果证明, 用兔 LSP 免疫裸鼠不能产生抗 LSP, 因此 LSP 是 T 细胞依赖性抗原. 设想在正常小鼠先用 2'-dG 抑制  $T_s$  活化<sup>(7-9)</sup>, 再用 LSP 免疫小鼠, 即可加速病变的形成. 本实验在给小鼠 iv Con A 刺激淋巴细胞增殖的同时 ip 2'-dG 抑制 Con A 激活的  $T_s$ , 在此基础上, 用同种 LSP 免疫小鼠, 诱导出了肝脏病变, 此结果提示抑制  $T_s$  的激活, 加强了抗体反应, 同时 T 杀伤细胞也可能被激

活, 在抗体介导的细胞毒(ADCC)和T杀伤细胞对肝脏的共同作用下, 引起了肝脏病变, 有助于LSP诱发的自身免疫动物模型的建立。在HBsAg阴性的慢性活动性肝炎病人中, 尽管病毒已被消除, 但因T<sub>s</sub>细胞功能缺陷, 在T<sub>h</sub>细胞的作用下, 使自身的免疫性T细胞产生对LSP的持续应答, 最后抗LSP通过ADCC造成病人持续肝损伤<sup>(10)</sup>。临床检测支持这一假说<sup>(11,12)</sup>。本实验结果也表明, T<sub>s</sub>功能低下可能是自身免疫性肝炎产生的原因之一。

本文结果还表明, 同时应用HHBV作为不完全佐剂添加剂可使病变出现率增高。HHBV是从HBsAg阳性者血清中制备的肝炎疫苗, 主要是乙型肝炎病毒外壳成分, 具有免疫原性, 因此提示人类的乙型肝炎病毒感染可能参与自身免疫性肝损伤的机理。

**致谢** 上海医科大学病理教研室张月娥协助病理工作。

### 参 考 文 献

- 1 姚光弼. 肝病与免疫. 上海免疫学杂志 1983, 3 : 185
- 2 McIcconi R, Baraldini M, Stefanini GF, et al. Antibodies against human liver-specific protein (LSP) in acute and chronic viral hepatitis types A, B and non-A, non-B. *Clin Exp Immunol* 1981, 46 : 382
- 3 Uibo RM, Helin HJ, Krohn KJE. Immunological reactions to liver-specific membrane lipoprotein (LSP) in experimental autoimmune liver disease in rabbits. *Ibid* 1982, 48 : 505
- 4 McFarlane IG, Wojcicka BM, Zucker GM, Eddleston ALWF, Williams R. Purification and characterization of human liver-specific membrane lipoprotein (LSP). *Ibid* 1977, 27 : 381
- 5 许以平. 免疫酶技术. 见: 余 濯、谢少文、杨贵贞、许以平, 主编. 临床免疫技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1982 : 201-26
- 6 Meyer zum Büschenfelde K-H, Manns M, Hütteroth TH, Hopf U, Arnold W. Lm-Ag and LSP—two different target antigens involved in the immunopathogenesis of chronic active hepatitis? *Clin Exp Immunol* 1979, 37 : 205
- 7 Lelchuk R, Cooke A, Playfair JHL. Differential sensitivity to 2'-deoxyguanosine of antigen-specific and nonspecific suppressor T cells in delayed hypersensitivity. *Cell Immunol* 1982, 72 : 202
- 8 Dosch H-M, Mansour A, Cohen A, Shore A, Gelfand EW. Inhibition of suppressor T-cell development following deoxyguanosine administration. *Nature* 1980, 285 : 494
- 9 Gelfand EW, Lee JJ, Dosch H-M. Selective toxicity of purine deoxynucleotides for human lymphocyte growth and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76 : 1998
- 10 Eddleston ALWF, Williams R. Inadequate antibody response to HBAg or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis. *Lancet* 1974, 2 : 1543
- 11 Tremolada F, Fattovich G, Panebianco G, Ongaro G, Realdi G. Suppressor cell activity in viral and nonviral chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1980, 40 : 89
- 12 Nonomura A, Tanino M, Kurumaya H, Ohta G, Kato Y, Kobayashi K. Disordered immunoregulatory functions in patients with chronic active hepatitis. *Ibid* 1982, 47 : 595

**Liver specific lipoprotein-induced autoimmune hepatitis in mice**

ZHU Peng-Peng, LI Xiao-Yu

*(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)*

**ABSTRACT** Autoimmune hepatitis is a kind of chronic, progressive liver injury which is characterized by the presence of several kinds of circulating liver membrane autoantibodies such as anti-LSP (liver specific lipoprotein). In this study, mice autoimmune hepatitis was induced by repeated sc immunization with heterogenic and syngenic LSP which was prepared by ultracentrifugation and chromatography of liver homogenates. Serum high titer anti-LSP was detected by ELISA in C57BL mice immunized with rabbit LSP after 10-15 wk. Human hepatitis B vaccine 25 ng/mouse sc once a week was given with LSP to accelerate the formation of liver injuries for 4 wk. Liver histological changes revealed

mainly the mononuclear cell infiltration, pericholangitis and hepatocellular piecemeal necrosis which were mimic to human chronic active hepatitis. When using of Con A and 2'-deoxyguanosine as T<sub>h</sub> inhibitors challenged together with syngenic LSP in C57BL and JCR mice, the degree and number of mice with liver damages increased and was observed only after 3 wk. These results suggested that clinical hepatitis B virus infection and T<sub>h</sub> disfunction may potentiate liver autoimmune reactions.

**KEY WORDS** liver specific lipoproteins; autoimmune diseases; hepatitis; vaccines; deoxyguanosine; suppressor cells; enzyme-linked immunosorbent assay