

四氢大麻酚对 C57BL/6 小鼠自身免疫性肝炎的保护作用

池刚¹, 马沁雅², 裴晋红¹, 冯作化³

(1. 长治医学院 生化教研室, 长治 046000; 2. 长治市公安局 刑事技术支队, 长治 046000; 3. 华中科技大学同济医学院 基础医学院, 武汉 430030)

摘要:为研究大麻素成分[四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC)]对 C57BL/6 小鼠自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的影响, 尾静脉注射质粒 pCYP2D6 和 pcDNA3.1, 腹腔重复注射四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)和 THC, ELISA 检测自身免疫应答程度, 微板法检测血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)活性, HE 染色检测肝脏炎症反应程度, 天狼猩红染色检测肝脏纤维化程度。结果显示, THC 对由 CCl₄/CYP2D6 引起的 AIH 造成的肝损伤有显著改善, 而且对自身免疫应答有显著抑制作用, 自身抗体和抗 CYP2D6 抗体水平显著降低, 对于单独由 CYP2D6 引起的抗 CYP2D6 抗体能够完全抑制。THC 对 AIH 和肝纤维化也有显著的抑制作用, 且 THC 的抑制作用与其浓度有关。由此 THC 对由 CCl₄/CYP2D6 引起的 C57BL/6 小鼠的 AIH 有显著抑制作用, 并且呈剂量依赖性。由此大麻素类药物 THC 对 AIH 可能有保护作用。

关键词:四氢大麻酚; C57BL/6 小鼠; 自身免疫性肝炎; 保护作用

中图分类号:R392.5

文献标志码:A

文章编号:1001-2478(2019)04-0293-04

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是慢性肝炎, 以产生自身抗体和发生界面性肝炎为特征, 长期炎症最终可导致肝纤维化、肝硬化和肝癌^[1-2]。目前, AIH 通常采用免疫抑制剂治疗, 但会产生很大的副作用且有复发的可能^[3], 然而目前尚无有效的治疗药物。大麻素是植物大麻的主要活性成分, 根据来源可将其分为 3 类: 一是从植物中提取的活性成分, 其中最重要的是四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC); 二是内源性大麻素; 三是人工合成的大麻素。THC 具有显著的免疫抑制特性^[4-5], 拮抗 THC 及其受体可诱发各种炎症反应^[6-7]。研究显示, 肝脏炎症产生的炎症因子可能给自身反应性 T 细胞提供了活化微环境^[8], 同时, 模拟抗原可能加速了 AIH 的发展^[9]。研究表明, 四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)可以促进模拟抗原人 CYP2D6 诱导的 C57BL/6 小鼠发生 AIH^[10]。本研究旨在探索大麻素成分 THC 对 CCl₄/CYP2D6 诱导的 AIH 的治疗作用, 为今后更加深入研究有效的治疗靶点提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~9 周龄 C57BL/6 雌性小鼠, 购自湖北省医学实验动物中心。小鼠饲养于 SPF 级环境中, 自由饮食饮水, 相对湿度 45%~50%, 温度 22℃。小鼠随机分为 2 组, 对照组 18 只, 实验组 50 只。

1.1.2 实验试剂 腺病毒购于武汉维诺赛生物技术有限公司, 分装后保存于-80℃冰箱; pcDNA3.1 质粒购于 Invitrogen 公司; pCYP2D6 质粒由长治医学院生化教研室构建, -20℃冰箱保存; 人 CYP2D6 蛋白购于 Abcam 公司; 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。THC 购于 Sigma-Aldrich 公司。实验均获得长治医学院伦理委员会通过且符合用药标准和实验室操作规范, 并获得长治市公安局同意。

1.2 方法

1.2.1 动物接种 随机对 C57BL/6 小鼠分组, 分别为正常对照组(Naïve)、CCl₄组、pcDNA3.1 质粒组、pCYP2D6 质粒组、THC 组、CCl₄/pCYP2D6 质粒组以及 CCl₄/pCYP2D6/THC 组, 每组 6 只。尾静脉注射质粒 CYP2D6[50 μg/(次·只)], 具体方法为从第 0 天开始, 每 5 天注射 1 次, 注射至第 20 天为止。腹腔重复注射 CCl₄(1 mL/kg), 每 3 天

收稿日期: 2018-09-04

基金项目: 国家自然科学基金(81472704)

作者简介: 池刚(1983—), 男, 博士, 讲师, 主要从事炎症免疫相关研究

通信作者: 池刚(E-mail: chigang21@126.com)

1次,至第12天结束。第15天开始腹腔注射THC,每3天1次,至第30天结束。

1.2.2 血清酶活性测定 小鼠眼球采血,室温静置30 min后于4℃过夜,3 500 ×g离心10 min,收集上层血清。按照说明书用血清ALT试剂盒进行检测。

1.2.3 ELISA检测 提取小鼠血清和正常肝组织蛋白质,肝组织用匀浆器匀浆后,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法对肝组织蛋白质进行定量。步骤为将正常肝组织蛋白质或人CYP2D6蛋白包被于96孔ELISA板,4℃孵育过夜,洗板、封闭、抗体孵育、底物显色并用H₂SO₄终止反应,酶标仪读取数据并整理结果。

1.2.4 病理学检测 取小鼠肝组织,4%甲醛固定后石蜡包埋切片,进行常规HE染色和天狼猩红染色,镜检。

1.3 统计学处理 实验数据采用SPSS 12.0软件进行统计学处理。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本间比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THC对AIH肝损伤ALT酶活性的影响 血清ALT酶活性检测结果显示,在第8周时,CCl₄/pC-

YP2D6组ALT酶活性升高,造成明显的自身免疫性肝损伤。THC处理后,CCl₄/pCYP2D6/THC组血清ALT酶活性显著降低,并且THC的效应是剂量依赖的,即THC浓度越大,由CCl₄/CYP2D6造成的自身免疫性肝损伤程度越低。虽然在THC 50 mg/kg时,血清ALT酶活性显著下降,但是在80 mg/kg时,酶活性下降程度最明显(表1)。所以,选取THC浓度为80 mg/kg进行实验,此时不同时间点由CCl₄/CYP2D6造成的自身免疫性肝损伤均显著减轻(表2)。

表1 不同剂量THC对C57BL/6小鼠血清ALT酶活性的影响(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	第8周
Naïve组	7.34±1.48
CCl ₄ 组	7.32±1.52
pCYP2D6组	7.28±1.45
CCl ₄ /pCYP2D6组	112.73±22.56
CCl ₄ /pCYP2D6/THC 20组	97.14±20.56
CCl ₄ /pCYP2D6/THC 50组	64.26±13.16*
CCl ₄ /pCYP2D6/THC 80组	31.36±6.32**

注:与CCl₄/pCYP2D6组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表2 THC对C57BL/6小鼠不同时间点血清中ALT酶活性的影响(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	第5周	第8周	第11周
Naïve组	7.38±1.25	7.32±1.28	7.36±1.23
CCl ₄ /pCYP2D6组	118.12±23.67	109.15±13.23	98.42±19.68
CCl ₄ /pCYP2D6/THC组	33.27±6.67*	29.87±4.18*	28.64±6.43*

注:与CCl₄/pCYP2D6组相比,* $P < 0.01$

2.2 THC对AIH免疫应答的影响 ELISA检测结果显示,第5周时,CCl₄/CYP2D6引起了高滴度的抗CYP2D6抗体和抗自身肝蛋白抗体,产生了强烈的免疫应答。在THC(80 mg/kg)处理后,血

清抗体水平显著降低。虽然单独CYP2D6引起了低滴度的抗CYP2D6抗体,但在THC处理后,抗CYP2D6抗体的产生被完全抑制。(图1)

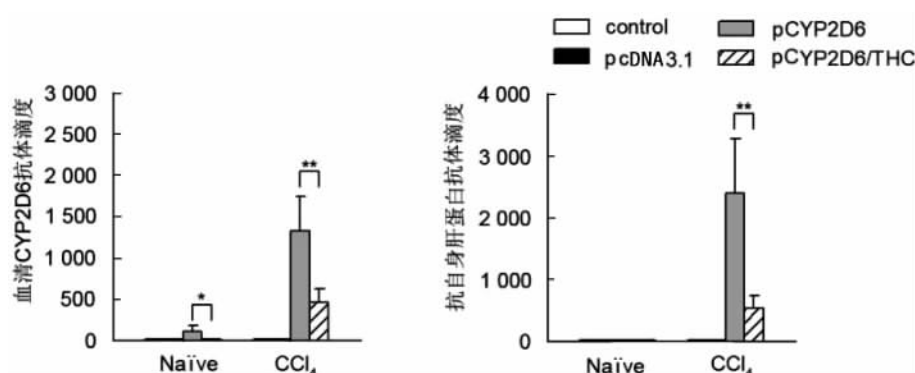


图1 THC对AIH免疫应答的影响

注:与pCYP2D6/THC组相比,* $P < 0.05$;与CCl₄/pCYP2D6/THC组相比,** $P < 0.01$

2.3 THC对AIH肝损伤的影响 HE染色结果显示,在THC(80 mg/kg)处理后,第8周时,由CCl₄/CYP2D6造成的肝脏大量淋巴细胞浸润显著减少。但是,THC单独处理却无法引起任何肝损伤和淋巴细胞浸润。(图2)

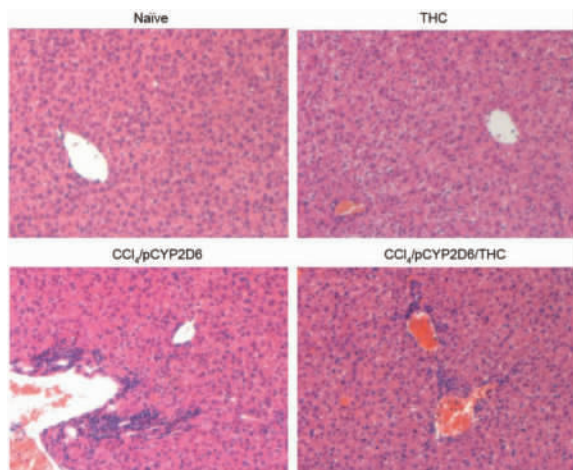


图2 THC对AIH肝损伤肝组织的影响(HE染色, ×200)

2.4 THC对AIH肝纤维化的影响 天狼猩红染色结果显示,在THC(80 mg/kg)处理后,第11周时,由CCl₄/CYP2D6造成的肝脏纤维化程度显著降低。但是,THC单独处理却无法引起任何肝纤维化。(图3)

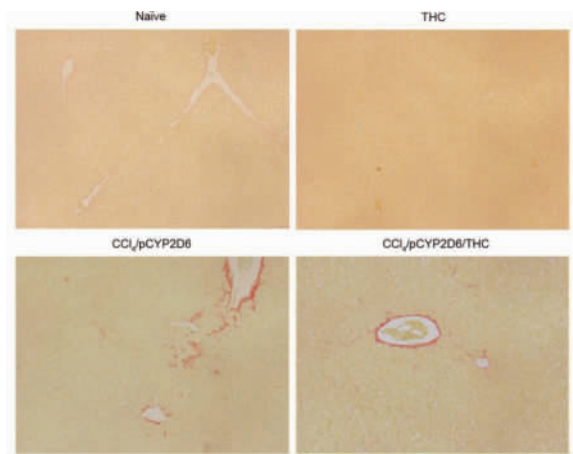


图3 THC对AIH肝纤维化的影响(天狼猩红染色, ×200)

3 讨论

AIH是严重的慢性免疫性肝损伤,长期炎症可导致肝纤维化、肝硬化和肝癌^[11]。目前,AIH的主要治疗方式是免疫抑制剂和激素。激素治疗可以减轻肝脏炎症,然而,强的松单一用药或者与低剂量咪唑硫嘌呤混合使用仅有13%的改善率,并且

有13%的患者治疗后出现了神经系统副作用,(50~86)%的患者在激素治疗后出现复发。激素治疗还会出现一些并发症,包括骨质疏松症和代谢综合征^[3]。

研究表明,大麻素成分THC能够抑制T细胞活化和相关细胞因子IL-2和IFN- γ 的表达,也抑制促炎细胞因子TNF- α 、IL-1和IL-6的表达,除了抑炎作用外,对各种自身免疫性疾病均有治疗作用^[4]。THC的治疗作用与其受体CB1和CB2的活化有关,然而也有研究表明,THC的抑炎作用并非由其受体CB1和CB2介导^[6],研究认为其与小鼠品系有关,其中THC治疗对C57BL/6小鼠EAE不敏感^[12]。然而,本研究发现80 mg/kg剂量的THC对治疗C57BL/6小鼠AIH有显著作用,而且在刀豆蛋白(concanavalin A, ConA)诱导产生的急性肝炎模型中,THC也有显著的抑炎效果^[13],这与本研究结果是一致的。另一方面,THC在治疗ConA诱导的急性肝炎模型中完全消除了肝脏炎症^[13],而本研究中其对AIH慢性炎症的作用是显著减弱而非消除炎症,同时也显著减弱了自身抗体和抗CYP2D6抗体的产生,但是单独由CYP2D6引起的抗CYP2D6抗体却被完全抑制了,这可能与THC的剂量有关,也可能THC对慢性肝炎和急性肝炎的抑炎机制不同,具体需要进一步研究。

综上所述,本研究在CCl₄/CYP2D6诱导的AIH动物模型的基础上,探索THC在其中的保护作用,不仅发现THC对自身免疫性肝损伤有显著保护作用,在降低自身免疫应答和肝纤维化中也有显著效果,而且多数研究结果也支持THC对炎症和免疫应答的抑制作用,所以本研究可为今后继续探索大麻素类药物对AIH作用的分子机制提供实验基础。

参考文献

- [1] Oo YH, Hubscher SG, Adams DH. Autoimmune hepatitis: New paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management[J]. *Hepatol Int*, 2010, 4(2): 475-493.
- [2] Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: Clinical challenges[J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(6): 1502-1517.
- [3] Sebode M, Hartl J, Vergani D, *et al.* Autoimmune hepatitis: From current knowledge and clinical practice to future research agenda[J]. *Liver Int*, 2018, 38(1): 15-22.
- [4] Li XG, Kaminski NE, Fischer LJ. Examination of the immunosuppressive effect of delta (9)-tetrahydrocannabinol in

- streptozotocin-induced autoimmune diabetes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1(4): 699-712.
- [5] Dalton GD, Howlett AC. Cannabinoid CB1 receptors trans-activate multiple receptor tyrosine kinases and regulate serine/threonine kinases to activate ERK in neuronal cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(8, SI): 2497-2511.
- [6] Ribeiro R, Yu F, Wen J, *et al.* Therapeutic potential of a novel cannabinoid agent CB52 in the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Neuroscience*, 2013, 254: 427-442.
- [7] Ismail M, Hasan H, El-Orfali Y, *et al.* Anti-inflammatory, antioxidative, and hepatoprotective effects of trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol/sesame oil on adjuvant-induced arthritis in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018; 9365464.
- [8] Manns MP, Lohse AW, Vergani D. Autoimmune hepatitis-Update 2015[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1): S100-S111.
- [9] Christen U. Animal models of autoimmune hepatitis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(5): 970-981.
- [10] Chi G, Feng XX, Ru YX, *et al.* TLR2/4 ligand-amplified liver inflammation promotes initiation of autoimmune hepatitis due to sustained IL-6/IL-12/IL-4/IL-25 expression[J]. *Mol Immunol*, 2018, 99: 171-181.
- [11] Harada K, Hiep NC, Ohira H. Challenges and difficulties in pathological diagnosis of autoimmune hepatitis[J]. *Hepatol Res*, 2017, 47(10): 963-971.
- [12] De Lago E, Moreno-Martet M, Cabranes A, *et al.* Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(7): 2299-2308.
- [13] Hegde VL, Hegde S, Cravatt BF, *et al.* Attenuation of experimental autoimmune hepatitis by exogenous and endogenous cannabinoids: Involvement of regulatory T cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(1): 20-33.

Protective effect of tetrahydrocannabinol on autoimmune hepatitis in C57BL/6 mice

CHI Gang¹, MA Qin-ya², PEI Jin-hong¹, FENG Zuo-hua³ (1. *Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China*; 2. *Criminal Technology Department, Changzhi Public Security Bureau, Changzhi 046000, China*; 3. *School of Basic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*)

Abstract: To investigate the effect of cannabinoids (tetrahydrocannabinol, THC) on autoimmune hepatitis in C57BL/6 mice, the plasmids pCYP2D6 and pcDNA3.1 were injected intravenously and the carbon tetrachloride (CCl₄) and THC were repeatedly injected intraperitoneally. The autoimmune response was detected *in vivo* by ELISA. The serum alanine aminotransferase (ALT) enzyme activity was measured. HE staining was used to detect liver inflammation. Liver fibrosis was detected by Sirius red staining. The results showed that THC had significant inhibitory effect on liver damage and autoimmune responses caused by CCl₄/CYP2D6. Autoantibodies and anti-CYP2D6 antibodies were significantly reduced by THC. Anti-CYP2D6 antibody caused by CYP2D6 alone was completely inhibited by THC. THC also had significant inhibitory effect on autoimmune hepatitis and liver fibrosis, and the inhibitory effect depended on its concentrations. Thus, THC has a significant dose-dependent inhibitory effect on autoimmune hepatitis caused by CCl₄/CYP2D6 in C57BL/6 mice, and could have a therapeutic effect on autoimmune hepatitis.

Key words: tetrahydrocannabinol; C57BL/6 mice; autoimmune hepatitis; protective effect