

PD-1抑制剂相关性肝炎小鼠模型的构建方法

徐俊玲*, 邱小梨, 张成伦, 韩亮, 邓向亮#

广东药科大学中医学院, 广东 广州

收稿日期: 2026年6月9日; 录用日期: 2026年7月21日; 发布日期: 2026年7月30日

摘要

目的: 免疫检查点抑制剂诱发的肝炎是肿瘤免疫治疗中常见的免疫相关不良反应。本研究旨在通过比较不同造模条件, 探讨利用PD-1单抗结合T细胞有丝分裂原ConA建立小鼠PD-1抑制剂相关性肝炎模型的方法。**方法:** 小鼠分为正常组、ConA组和ConA + PD-1单抗联用组。ConA组及联用组小鼠尾静脉注射ConA (20 mg/kg); 联用组于ConA注射后6小时或24小时腹腔注射PD-1抑制剂(250 µg/只), 正常组与ConA组同期注射等量生理盐水。分别于ConA注射后12、24、48、72 h结束实验。收集血清、肝脏。采用生化试剂盒检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平, 苏木精-伊红(H&E)染色观察肝组织病理学改变, 免疫组化法检测肝脏中T细胞浸润情况以及干扰素- γ (IFN- γ)的分泌水平。**结果:** ConA联合PD-1单抗在不同检测时间点均可不同程度地加重ConA诱导的炎症反应。其中, ConA注射6小时后给予PD-1单抗干预6小时(即ConA注射后12 h)所致的炎症反应最为显著: 与ConA组相比, 联用组小鼠血清ALT和AST水平显著升高。H&E染色结果显示, 联用组小鼠肝细胞坏死增多, 肝组织炎症浸润程度较ConA组加重。免疫组化结果显示, 联用组小鼠肝组织中CD3⁺ T细胞浸润显著增加, IFN- γ 的表达水平亦较ConA组明显升高。**结论:** 本研究通过PD-1单抗联合ConA成功建立了PD-1抑制剂相关性肝炎小鼠模型。在ConA注射后6小时再给予PD-1单抗干预6小时, 可显著加重ConA诱导的免疫性肝炎背景下的肝损伤, 其机制可能与促进肝脏T细胞(CD3⁺ T细胞)浸润及上调IFN- γ 表达有关。

关键词

PD-1抑制剂, 肝炎, PD-1单抗, T细胞, ConA, 小鼠

Establishment of a Mouse Model of PD-1 Inhibitor-Associated Hepatitis

Junling Xu*, Xiaoli Qiu, Chenglun Zhang, Liang Han, Xiangliang Deng#

School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

Received: June 9, 2026; accepted: July 21, 2026; published: July 30, 2026

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 徐俊玲, 邱小梨, 张成伦, 韩亮, 邓向亮. PD-1 抑制剂相关性肝炎小鼠模型的构建方法[J]. 生物医学, 2026, 16(4): 810-819. DOI: 10.12677/hjbm.2026.164083

Abstract

Objective: Immune checkpoint inhibitor-induced hepatitis is a common immune-related adverse event in cancer immunotherapy. This study aimed to establish a mouse model of PD-1 inhibitor-associated hepatitis by combining a PD-1 monoclonal antibody with the T-cell mitogen Concanavalin A (ConA) and comparing different modeling conditions. **Methods:** Mice were divided into a normal control group, a ConA group, and a ConA + anti-PD-1 combination group. Mice in the ConA and combination groups received an intravenous tail vein injection of ConA (20 mg/kg). The combination group received an intraperitoneal injection of anti-PD-1 antibody (250 µg/mouse) at either 6 hours or 24 hours post-ConA injection. The normal and ConA groups received an equivalent volume of saline at the same time points. Experiments were terminated at 12, 24, 48, and 72 hours after ConA injection. Serum and liver samples were collected. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured using commercial kits. Liver histopathology was evaluated by hematoxylin and eosin (H&E) staining. T-cell infiltration and the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) were assessed by immunohistochemistry. **Results:** The combination of ConA and anti-PD-1 exacerbated ConA-induced inflammation to varying degrees at all tested time points. The most pronounced inflammatory response was observed when the anti-PD-1 antibody was administered 6 hours after ConA injection, followed by assessment 6 hours later (*i.e.*, 12 hours post-ConA). In this group, serum ALT and AST levels were significantly elevated compared to the ConA-only group. H&E staining revealed increased hepatocyte necrosis and more severe inflammatory infiltration in the combination group. Immunohistochemistry showed a significant increase in CD3⁺ T-cell infiltration, as well as elevated expression of IFN- γ in the liver and spleen tissues of the combination group compared to the ConA group. **Conclusion:** This study successfully established a mouse model of PD-1 inhibitor-associated hepatitis by combining a PD-1 monoclonal antibody with ConA. Administering the anti-PD-1 antibody 6 hours after ConA injection for a 6-hour intervention period significantly exacerbated liver injury in the context of ConA-induced immune-mediated hepatitis. This mechanism may be related to the promotion of hepatic T-cell (CD3⁺ T cell) infiltration and the upregulation of IFN- γ expression.

Keywords

PD-1 Inhibitor, Hepatitis, Anti-PD-1 Antibody, T Cell, ConA, Mouse

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

PD-1 抑制剂在癌症治疗中作用重大,但常激活 T 细胞并攻击正常组织,引发免疫相关不良反应,其中肝毒性因与治疗依从性和预后密切相关而尤为关键[1]-[4]。然而,目前针对这些不良反应仍缺乏有效的防治策略,其主要原因之一在于缺乏能够可靠模拟临床病理改变的小鼠模型,阻碍了相关机制研究和药物筛选的开展。

临床实践中,免疫介导的肝损伤并非随机发生,患者基线免疫状态是决定性因素——在没有预设炎症刺激的健康个体中,PD-1 单抗几乎无法自行诱发明显的肝脏损伤[5]-[7]。正因如此,使用健康小鼠直接注射 PD-1 抑制剂无法构建理想的动物模型,必须引入“免疫预激活”策略。现有文献提示通过联合使用免疫刺激剂,可预先上调肝脏促炎因子、募集 T 细胞至肝脏,打破免疫耐受状态,为 PD-1 抑制剂发挥

作用提供必要条件[8]。

刀豆蛋白 A (ConA)是一种经典的 T 细胞有丝分裂原,经尾静脉注射可激活 T 细胞并诱导其向肝脏募集,建立急性免疫介导性肝炎模型[9] [10]。ConA 的作用机制与 PD-1 抑制剂临床不良反应中观察到的 T 细胞过度活化及“因子风暴”具有高度相似性。因此,我们推测将 PD-1 抑制剂与 ConA 联合使用,利用 ConA 预先激活的免疫状态作为背景,可能使 PD-1 抑制剂进一步打破免疫耐受,从而成功构建能够反映临床免疫性肝炎特征的小鼠模型。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

SPF 级雄性 BALB/C 小鼠(体重 18~20 g, 5 周龄)购自广州市言诚生物科技有限公司,动物生产许可证号:SYXK (粤) 2022-0125。实验期间,所有小鼠自由摄取食物和水,饲养于温度 22℃~24℃,空气相对湿度 50%~70%,12 h/12 h 昼夜循环的 SPF 级实验动物中心。所有动物经广东药科大学实验动物伦理委员会审理批准。小鼠适应性喂养 1 周后使用。

2.2. 实验试剂与仪器

ConA 购自美国 Sigma 公司;PD-1 单抗购自美国 Bioxcell 公司;天冬氨酸氨基转移酶测试盒、丙氨酸氨基转移酶测试盒购自南京建成生物工程研究所;组织切片机购自德国 Leica 公司;染色机购自日本 SAKURA 公司。

2.3. 动物分组与给药

将小鼠随机分为正常组、ConA 组、ConA + PD-1 单抗联用组,按 ConA 给药后不同采样时间(12、24、48、72 h)分为 4 批,每批次每组 6 只小鼠。所有 ConA 组及 ConA + PD-1 单抗联用组小鼠给予尾静脉注射 ConA (20 mg/kg),正常组注射等体积生理盐水。ConA + PD-1 单抗联用组于 ConA 注射后 6 h 或 24 h 腹腔注射 PD-1 抑制剂(250 µg/只),正常组和 ConA 组同期注射等量生理盐水。分别于 ConA 注射后 12、24、48、72 h 结束实验。示意图见图 1。

2.4. 样品采集

眼球取血,常规方法分离血清;将小鼠处死后取小鼠肝脏进行称重并置于 4%多聚甲醛中固定保存。计算肝脏器官指数:器官指数(%) = 器官质量/体质量 × 100%。

2.5. 肝功能生化指标检测

从小鼠眼眶取血置于 EP 管中,在室温下静置 1 h 后 4℃,3000 rpm 离心 15 min,取上清,根据天冬氨酸氨基转移酶(AST)测试盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)测试盒的说明书测定血清中 AST 和 ALT 的浓度。

2.6. 肝脏病理 HE 染色

将提前固定好的肝脏组织进行石蜡包埋,并制作常规切片(4 µm),经乙醇梯度脱蜡后,用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色法进行染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,采用光学显微镜观察肝组织的变化并采集图像。

2.7. T 细胞浸润情况和炎症因子的表达

取提前固定好的肝脏组织进行石蜡包埋、切片,用免疫组化进行染色,检测肝组织中 T 细胞的浸润

情况、炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 的表达。采用光学显微镜观察肝组织中抗体表达情况并采集图像,用 Image J 测量法进行量化分析。

2.8. 统计学方法

所有数据均使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行统计处理。检测结果用均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,组间对比采用非配对 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

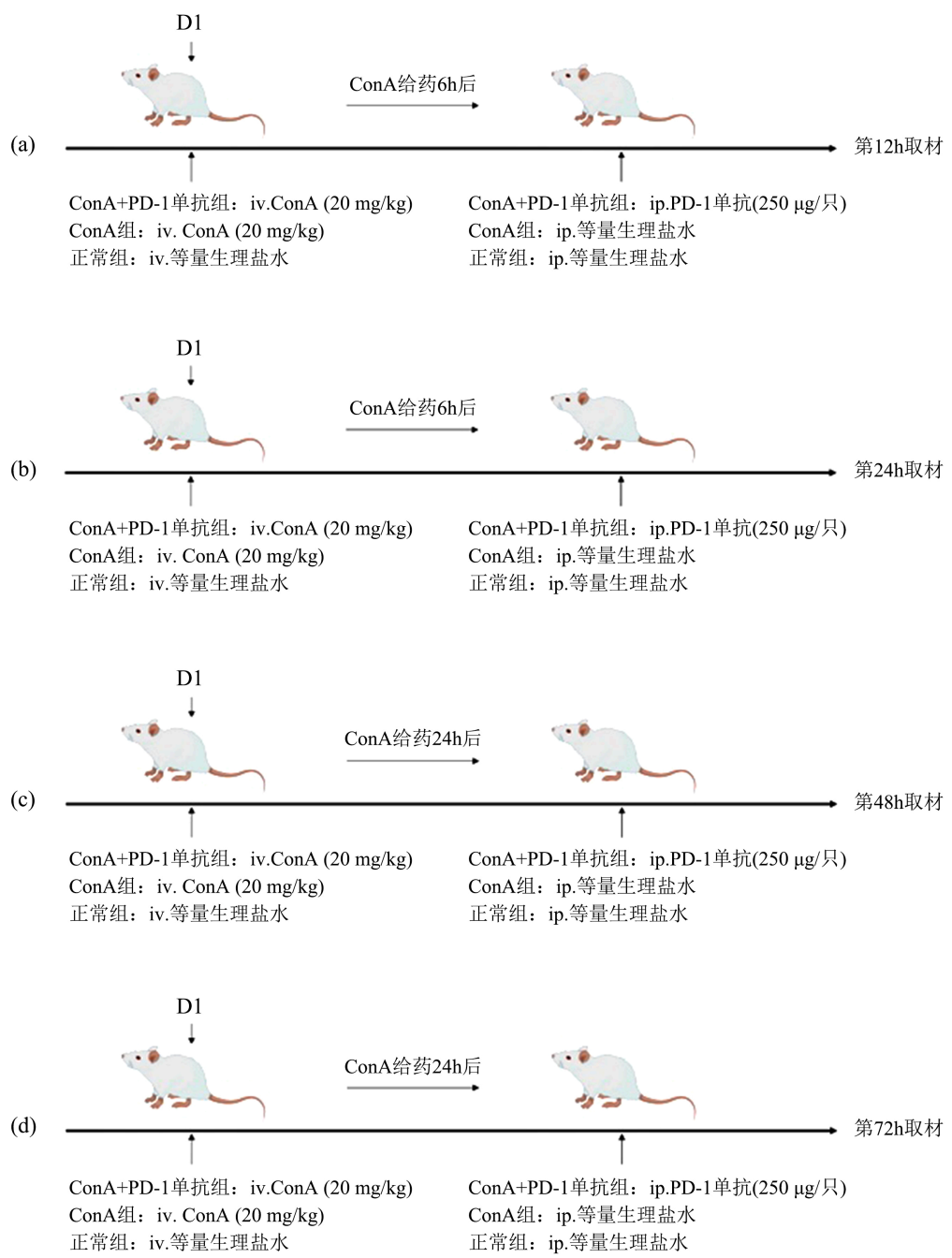
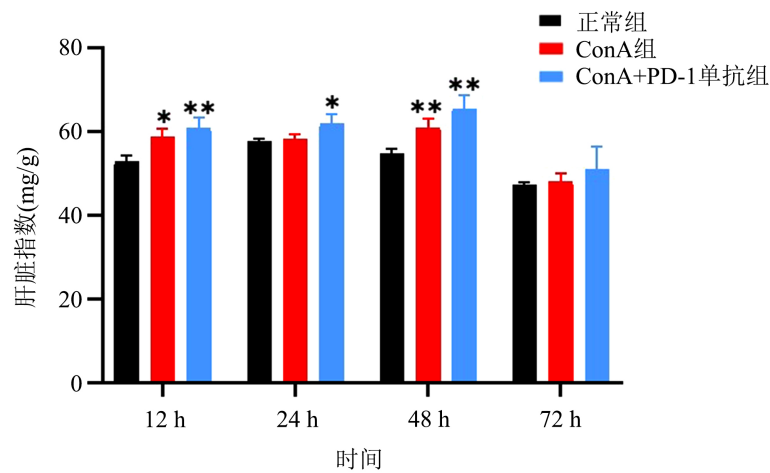


Figure 1. Schematic diagram of mouse model establishment
图 1. 小鼠造模示意图

3. 结果

3.1. 对小鼠肝脏指数和组织形态的影响



注：正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Figure 2. Liver index (Mean $\pm$ SD, n = 6)

图 2. 肝脏指数(Mean $\pm$ SD, n = 6)

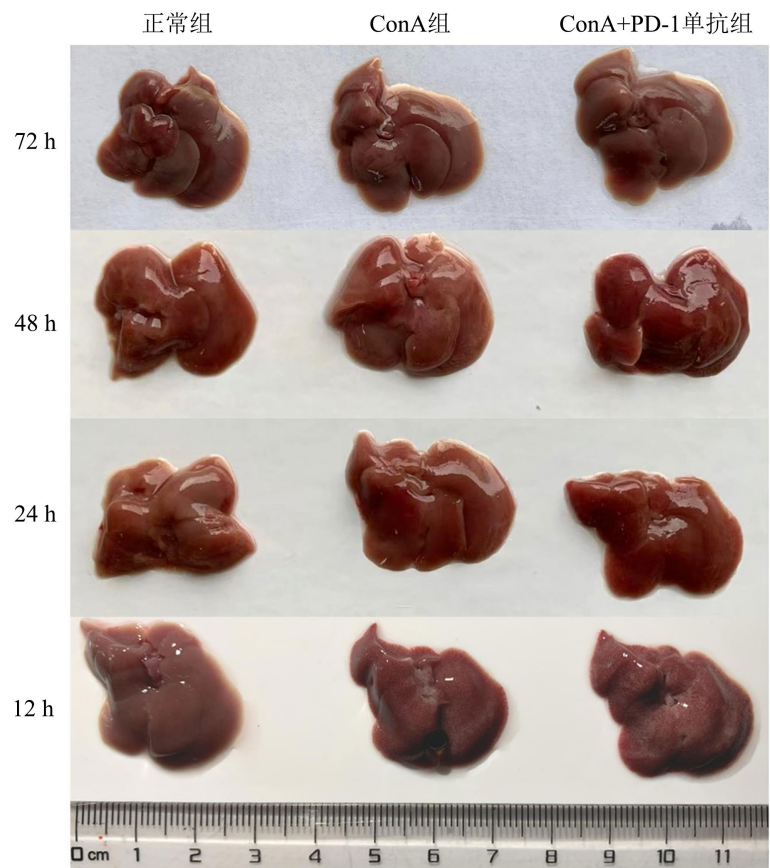


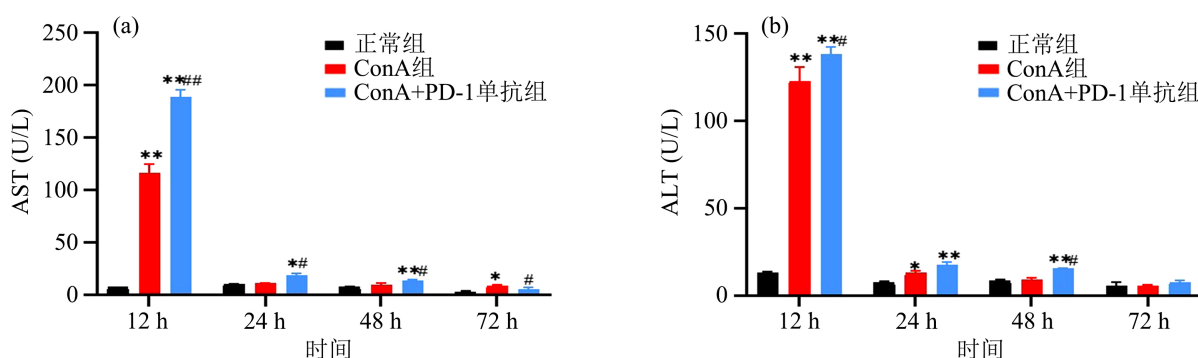
Figure 3. Morphology of liver tissue

图 3. 肝脏组织的形态

肝脏指数结果显示(图 2), ConA 组及 ConA + PD-1 单抗联用组在 ConA 注射后 12、24、48 及 72 h 的肝脏指数均高于正常组; 其中联用组略高于 ConA 组, 但组间差异无统计学意义。肝脏大体形态学观察显示(图 3): 正常组小鼠肝脏色泽红润、质地柔软、表面光滑; 在 ConA 注射后 12 h 后, ConA 组小鼠肝脏质地脆性增加, 表面可见散在灰白色点状坏死灶, 而 ConA + PD-1 单抗联用组小鼠肝脏质地脆性增加更明显, 表面散在多处灰白色点状坏死灶, 提示该组小鼠肝实质损伤较 ConA 组更为严重; 两组在其他时间段的肝脏大体形态学无明显改变。上述结果表明, ConA 联合 PD-1 单抗给药可加重对肝脏的损伤。

3.2. 对小鼠血清 AST、ALT 的影响

结果如图 4 所示, 与正常组比较, ConA 组及 ConA + PD-1 单抗联用组在不同时间点的 AST、ALT 水平均有不同程度升高, 其中在 ConA 注射 12 h 后 AST、ALT 水平升高最为显著, 而且 ConA + PD-1 单抗联用组都显著高于 ConA 组($P < 0.01$ 、 0.05)。



注: (a) 血清中的 AST 水平; (b) 血清中 ALT 水平。与正常组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ConA 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Figure 4. Serum AST and ALT levels in mice (Mean $\pm$ SD, $n = 6$)

图 4. 小鼠肝血清 AST、ALT 水平(Mean $\pm$ SD, $n = 6$)

3.3. 对小鼠肝脏组织病理变化的影响

肝脏组织 H&E 染色结果如图 5 所示。正常组小鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索排列整齐, 肝窦正常, 肝细胞形态及核结构完整。与正常组相比, ConA 注射后 12 小时, ConA 组及 ConA + PD-1 单抗联用组肝组织出现充血肿胀, 肝细胞索排列紊乱, 部分肝细胞形态不规则并出现点状坏死, 伴炎性细胞浸润; 其中, 联用组肝组织充血肿胀更为严重, 肝细胞索结构模糊, 可见大量红细胞及坏死肝细胞, 炎性细胞浸润亦更明显。ConA 注射后 24、48 及 72 小时, 两组肝组织的病理改变均不显著。

3.4. 对小鼠肝组织 T 细胞浸润的影响

结果如图 6 所示, 与正常组相比, ConA 组及 ConA + PD-1 单抗联用组肝脏组织中的 T 细胞浸润水平在不同时间点均呈不同程度升高。其中, 在 ConA 注射后 12、24、48 小时, 两组的 T 细胞浸润水平均显著高于正常组; 且与 ConA 组相比, 联用组 T 细胞浸润水平的升高更为显著。

3.5. 对小鼠肝脏 IFN- γ 表达的影响

如图 7 所示, 与正常组相比, ConA 组及 ConA + PD-1 单抗联用组肝脏组织中的 IFN- γ 分泌水平在不同时间点均呈不同程度升高, 差异均具有统计学意义。且与 ConA 组相比, 联用组 IFN- γ 分泌水平的升高更为显著, 两组间差异均有统计学差异。

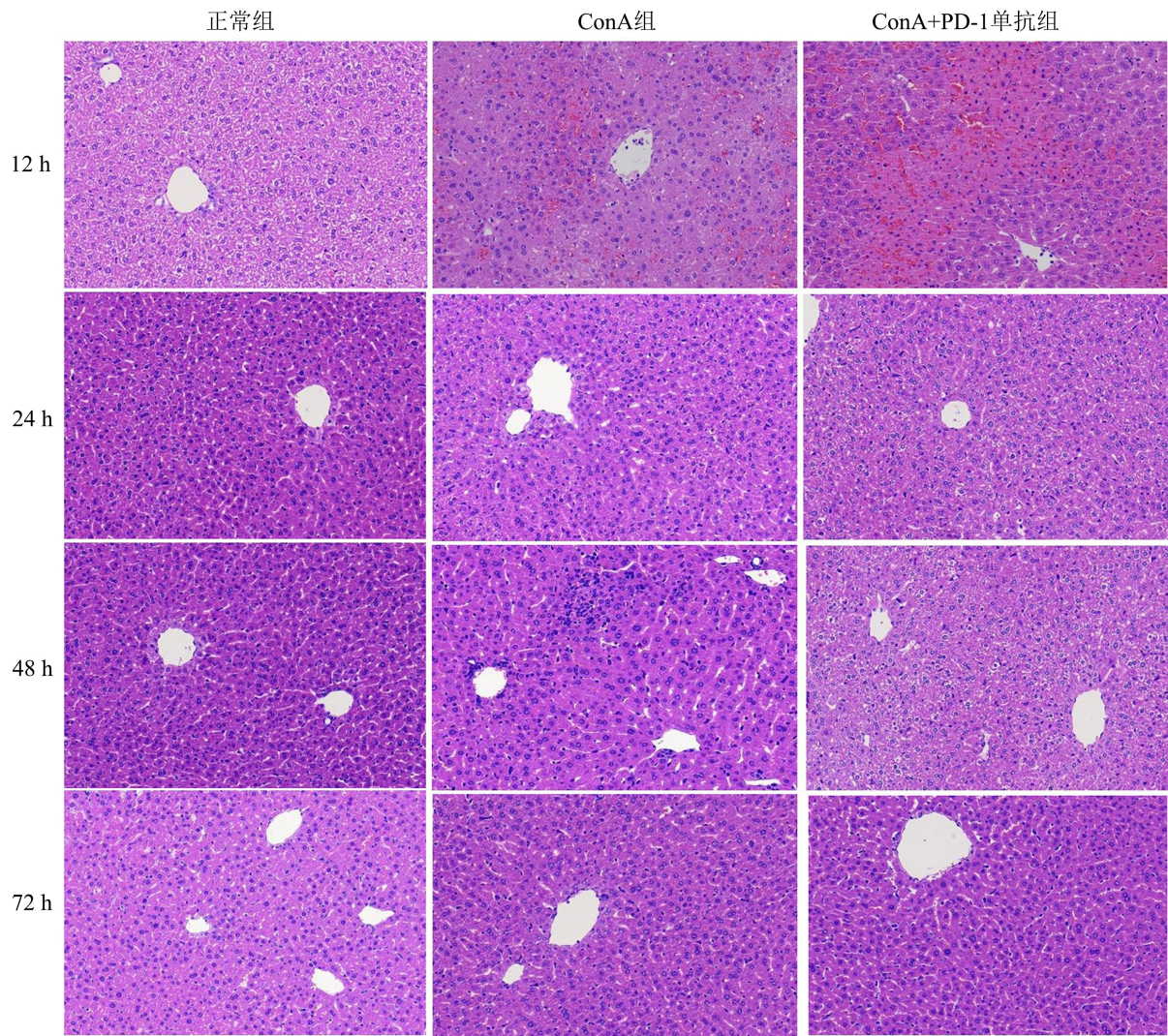
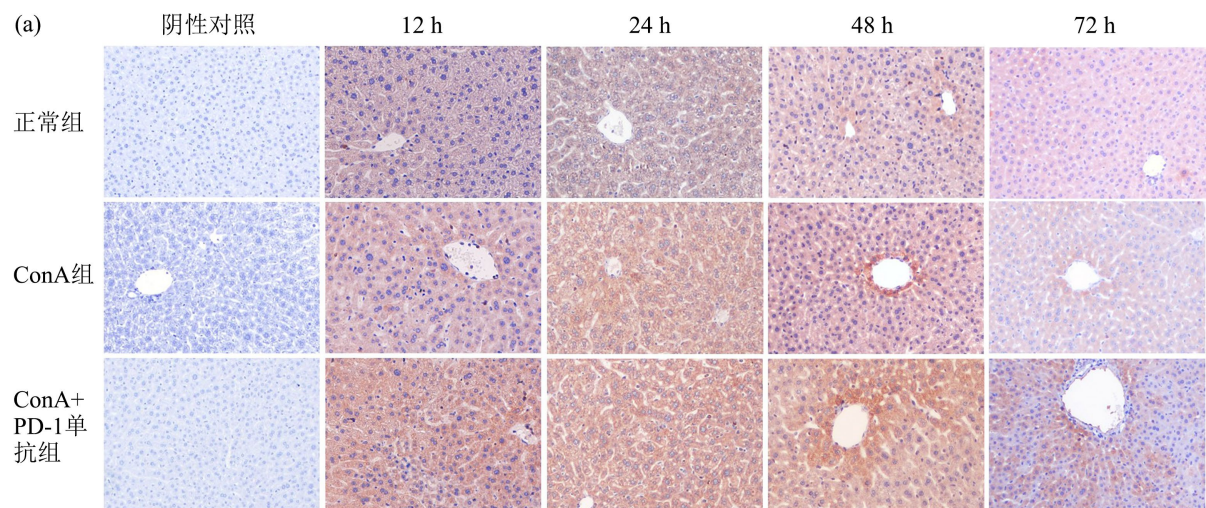
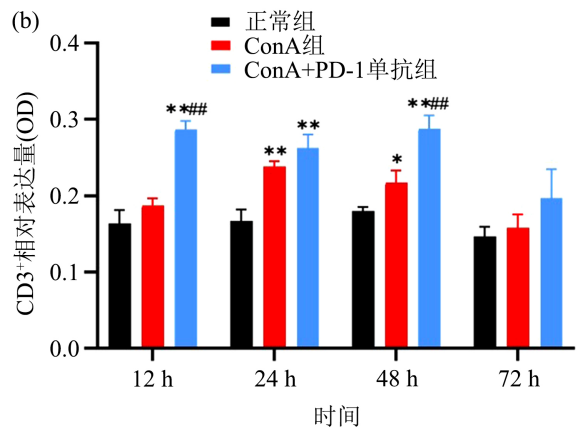


Figure 5. H&E staining results of liver tissues
图 5. 肝组织 H&E 染色结果(100×)

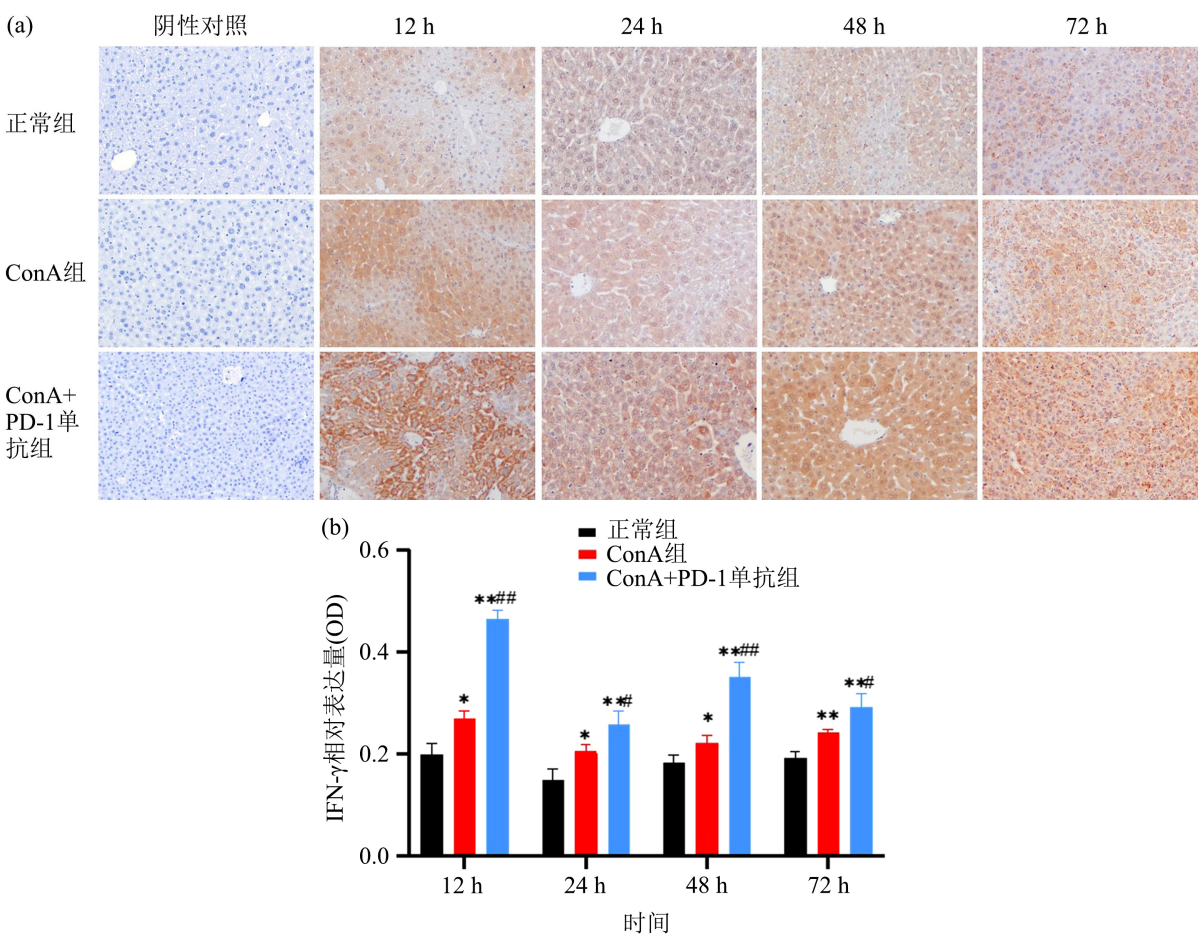




注: (a) 肝脏组织中 CD3⁺ T 细胞浸润免疫组化图; (b) CD3 相对表达量统计结果。与正常组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ConA 组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

Figure 6. Relative expression levels of CD3 in liver tissues (Mean $\pm$ SD, n = 6)

图 6. 肝脏中 CD3 的相对表达水平(Mean $\pm$ SD, n = 6)



注: (a) 肝脏组织中 IFN- γ 分泌免疫组化图; (b) IFN- γ 相对表达量统计结果。与正常组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ConA 组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

Figure 7. Expression levels of IFN- γ in liver tissues (Mean $\pm$ SD, n = 6)

图 7. 肝脏中 IFN- γ 表达水平(Mean $\pm$ SD, n = 6)

4. 讨论

近年来,以 PD-1 单抗为代表的免疫检查点抑制剂在肿瘤治疗中取得了突破性进展,但其诱发的免疫相关不良反应,包括免疫性肝炎,严重限制了临床应用。因此,建立一种能够模拟 PD-1 抑制剂相关免疫性肝炎临床病理特征的小鼠模型,对于开展免疫不良反应的防治研究具有重要意义。

目前研究发现,在健康个体中,PD-1 抑制剂无法诱发明显的免疫相关不良反应;只有当患者伴有肿瘤诱导的慢性炎症或既往的炎性疾病背景时,这种“预设”的炎症状态才会降低免疫耐受阈值,从而促使 PD-1 通路的阻断转化为病理性的免疫攻击[5]-[7][11][12]。这提示,预先制备炎症背景,再给予 PD-1 抑制剂干预,或可有效构建相关动物模型。已有研究在 DSS 诱导的化学性结肠炎基础上叠加双免疫检查点抑制剂,成功建立了免疫检查点抑制剂相关性结肠炎模型,进一步印证了这一思路的可行性[13]。基于此,本研究采用 PD-1 抑制剂与刀豆蛋白 A(ConA)联合使用,以 ConA 预先激活的免疫状态为背景,成功建立了具有 PD-1 抑制剂相关性肝炎特征的小鼠模型。

ConA 诱导的小鼠肝炎模型可选择性激活 T 细胞,诱发以 T 细胞及巨噬细胞介导的肝损伤[14][15],是研究免疫介导性肝损伤的适宜模型。本实验结果显示,小鼠接受 ConA 干预 12 小时后即可诱导肝脏炎症性病理损伤,并伴随 T 细胞浸润。而在此基础上给予 PD-1 单抗干预 6 小时,可进一步加重 ConA 诱导的 T 细胞浸润和肝脏病理损伤,伴随大量细胞因子 IFN- γ 的分泌,该特征与临床患者接受 PD-1 抑制剂治疗后早期出现全身性炎症因子大量分泌的表现相契合[13]。PD-1 单抗作为 T 细胞表面 PD-1 分子的阻断剂,在已存在 ConA 触发的 T 细胞激活及肝脏炎症背景下,其免疫强化效应可能导致 T 细胞过度活化,扰乱肝脏免疫平衡,促进 Th1 和 Th17 细胞浸润增加,释放 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-17 等炎性细胞因子,并招募和激活 CTL 及 NK 细胞,诱导颗粒酶 B 和颗粒酶 K 的表达,从而加剧肝细胞损伤[16][17]。

本研究采用 PD-1 单抗联合 ConA 构建急性免疫性肝炎小鼠模型,该模型可重现临床 PD-1 相关肝损伤中 T 细胞浸润、转氨酶升高等核心特征,但也存在一些局限性。如该模型依靠 ConA 非特异性激活免疫、无肿瘤背景,为短期自限性急性肝损伤,与人长期、亚急性起病且易合并多脏器 irAEs、伴慢性肝损伤纤维化的临床病程差异大;病理上模型以大片弥漫肝细胞坏死为主,而临床多为局灶点状坏死。但是二者在 T 细胞介导肝损伤的核心免疫机制上保持一致。

综上所述,本研究通过 PD-1 单抗联合 ConA 成功建立了 PD-1 抑制剂相关性肝炎小鼠模型,并发现 PD-1 单抗使用 6 小时即可显著加重 ConA 诱导的原有肝炎炎症反应。本研究结果为后续探索联合抗炎治疗以减轻免疫相关肝毒性提供了依据。

基金项目

广东省医学科研基金项目(A2023482; B2023225)。

参考文献

- [1] Tapiavala, S., Luo, C., Shenouda, M., Patel, V. and Davis, A.A. (2025) Reporting of Immune-Related Adverse Events in US Food and Drug Administration Approvals of Immune Checkpoint Inhibitors. *Frontiers in Oncology*, **15**, Article ID: 1606599. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1606599>
- [2] Giguelay, A.M., Maschmeyer, P., Müller-Jensen, L., Schinke, C., Maierhof, S.K., Nambiar, N., et al. (2025) Clonally Expanded Effector CD4⁺ Cytotoxic T Lymphocytes Are Associated with Severe Neurological Adverse Events after Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **13**, e012350. <https://doi.org/10.1136/jitc-2025-012350>
- [3] Zen, Y. and Yeh, M.M. (2018) Hepatotoxicity of Immune Checkpoint Inhibitors: A Histology Study of Seven Cases in Comparison with Autoimmune Hepatitis and Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Modern Pathology*, **31**, 965-973. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0013-y>
- [4] Chen, Y., Zeng, Y., Zhang, K., Lal, N., Zhao, Y., Qi, F., et al. (2025) Hepatobiliary Adverse Events Linked to Immune

- Checkpoint Inhibitors: A Real - World Pharmacovigilance Analysis Using FAERS Data. *Thoracic Cancer*, **16**, e70184. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.70184>
- [5] 李幼红, 吴凡, 颜志文, 等. PD-1 抑制剂致 NSCLC 患者肝损伤发生的影响因素分析及风险预测模型建立[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(13): 2304-2307.
- [6] 钟宇科, 刘文新, 谢聪. PD-1 抑制剂引起的严重肝损伤及肝损伤后再挑战的病例系列报道[J]. 肿瘤药学, 2024, 14(1): 126-132.
- [7] 王艳, 刘立伟, 赵梦鱼, 等. 胆管损伤对 PD-1 抑制剂相关肝损伤临床病理特征影响分析[J]. 肝脏, 2024, 29(8): 965-970.
- [8] 李华敏. 基于炎症反应激活和免疫耐受抑制机制构建 IDILI 药物预测模型的研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 中南大学, 2025.
- [9] 杨磊, 罗婧菱, 李浩辰. 刀豆蛋白 A 生物活性及应用的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2025, 61(1): 125-131.
- [10] 李潇潇. RAGE 在刀豆蛋白 A 诱导小鼠肝炎中的作用及机制研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中科技大学, 2021.
- [11] Triantafyllou, E., Gudd, C.L.C. and Possamai, L.A. (2025) Immune-Mediated Liver Injury from Checkpoint Inhibitors: Mechanisms, Clinical Characteristics and Management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **22**, 112-126. <https://doi.org/10.1038/s41575-024-01019-7>
- [12] Dias, Y., Silva, V., de Carvalho, M.F., Herchenhorn, R. and Herchenhorn, D. (2025) Safety and Effectiveness of Immune Checkpoint Inhibitors in Patients with Preexisting Autoimmune Diseases: A Systematic Review. *Frontiers in Immunology*, **16**, Article ID: 1712632. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1712632>
- [13] Perez-Ruiz, E., Minute, L., Otano, I., Alvarez, M., Ochoa, M.C., Belsue, V., *et al.* (2019) Prophylactic TNF Blockade Uncouples Efficacy and Toxicity in Dual CTLA-4 and PD-1 Immunotherapy. *Nature*, **569**, 428-432. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1162-y>
- [14] Zhang, X., Wei, H., Rui, S., Wei, H. and Tian, Z. (2010) Opposite Effects of High and Low Doses of Interleukin-2 on T Cell-Mediated Hepatitis in Mice (Interleukin-2 on Hepatitis). *Hepatology International*, **4**, 641-648. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9196-0>
- [15] Li, X., Zhang, Y., Wang, J., Li, Y., Wang, Y., Shi, F., *et al.* (2022) zVAD Alleviates Experimental Autoimmune Hepatitis in Mice by Increasing the Sensitivity of Macrophage to TNFR1-Dependent Necroptosis. *Journal of Autoimmunity*, **133**, Article ID: 102904. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102904>
- [16] Yang, H., Yao, Z., Zhou, X., Zhang, W., Zhang, X. and Zhang, F. (2020) Immune-Related Adverse Events of Checkpoint Inhibitors: Insights into Immunological Dysregulation. *Clinical Immunology*, **213**, Article ID: 108377. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108377>
- [17] Liu, Z., Zhu, Y., Xie, H. and Zou, Z. (2023) Immune-Mediated Hepatitis Induced by Immune Checkpoint Inhibitors: Current Updates and Future Perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article ID: 1077468. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1077468>