

小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003

齐慧慧, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 齐慧慧与宋佳对此文所作贡献均等; 此课题由齐慧慧与陈岳祥设计; 研究过程由齐慧慧与宋佳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈岳祥提供; 数据分析由齐慧慧完成; 本论文写作由齐慧慧完成。

通讯作者: 陈岳祥, 教授, 主任医师, 200003, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科。

chenyuex@sohu.com

电话: 021-81885343

收稿日期: 2011-11-27 修回日期: 2012-02-08

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Development of a mouse model of alcohol-induced acute liver injury

Hui-Hui Qi, Jia Song, Yue-Xiang Chen

Hui-Hui Qi, Jia Song, Yue-Xiang Chen, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China

Correspondence to: Yue-Xiang Chen, Professor, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China. chenyuex@sohu.com

Received: 2011-11-27 Revised: 2012-02-08

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To create a mouse model of alcohol-induced acute liver injury and to dynamically monitor the changes in histological structure, oxidative stress and inflammation in this model.

METHODS: Forty-eight ICR mice were randomly divided into two groups and were intragastrically given 50% ethanol (model group) or isocaloric/isovolumetric maltose-dextrin solution (control group). At 1.5, 3, 6 and 12 h after administration, all mice were sacrificed to take serum samples for biochemical measurements and liver samples for HE staining and Sultan III staining to grade the degree of fatty changes and inflammation.

RESULTS: The dose we used caused no mortality. Serum levels of ALT (U/L) and TG (mmol/L) gradually increased with time, reaching the

peak at 6 h and then slightly decreasing at 12 h. Hepatic GSH content reached the lowest level at 6 h. Hepatic SOD content decreased most significantly at 1.5 h (by about 24%), whereas hepatic MDA content increased most significantly at his time point (up to 2.2 times the normal group). Hepatic levels of IL-1 β and TNF- α gradually increased with time, reaching the peak at 12 h. At 12 h after administration, liver cell swelling, hydropic degeneration and other pathological changes were visible around the central vein and interlobular veins. With the prolongation of modeling time, the degree of liver steatosis was aggravated.

CONCLUSION: A mouse model of alcohol-induced acute liver injury has been successfully developed and can be used for studying the pathogenesis of acute liver injury. The method used for the development of this animal model is simple and has a short cycle and good stability.

Key Words: Alcohol; Alcohol-induced acute liver injury; Dynamic monitoring

Qi HH, Song J, Chen YX. Development of a mouse model of alcohol-induced acute liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 759-763

摘要

目的: 建立一次性暴饮小鼠急性酒精性肝损伤模型, 并动态研究肝脏病理形态学、氧化应激因子、炎症因子的变化。

方法: 将48只ICR小鼠随机分成2组, 空白对照组一次性给予等热量、等体积的糖水6 g/kg灌胃, 模型组一次性给予50%乙醇(6 g/kg)体质量灌胃, 分别于灌胃后1.5、3、6、12 h动态监测小鼠血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、甘油三酯(triglyceride, TG), 肝组织匀浆丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione hormone (GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 及肝组织白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达; 肝组织HE染色、苏丹Ⅲ染色观察肝组

■背景资料

在欧美国家的嗜酒人群中, 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的患病率高达84%, 其中20%-30%可进展为肝硬化。随着我国生活水平的提高、饮食结构的改变和酒精消费量的日益增长, ALD的发病率也呈现逐年升高的趋势。

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科

■ 研发前沿

目前除戒酒和支持性治疗外,尚无令人满意的治疗药物。而建立理想的动物模型是研究ALD发病机制和防治方法的前提;但目前国内外急性酒精性动物模型参差不齐,在一定程度上限制了实验研究。

织形态学、脂肪变性程度。

结果:成功复制了一次性暴饮50%乙醇(6 g/kg)的小鼠急性肝损伤模型,小鼠无死亡,出现翻正反射消失、嗜睡等醉酒状态。模型组小鼠血清ALT、TG水平随时间逐渐升高,6 h达峰值,12 h略下降;肝匀浆GSH含量6 h降至最低;造模后1.5 h肝脏SOD含量下降最为显著,下降约24%;1.5 h肝脏MDA含量上升最为显著,上升至正常组的2.2倍;肝脏IL-1 β 、TNF- α 水平升高,12 h达峰值;HE染色结果示,造模后12 h可见中央静脉及小叶间经脉周围出现肝细胞肿胀、水样变性等病理改变;苏丹Ⅲ染色结果显示随着造模时间延长肝脂肪变性程度加重。

结论:此模型造模周期短、易复制、稳定性好,是研究急性酒精性肝损伤发病机制和筛选药物的理想模型。

关键词:酒精;急性酒精性肝损伤;动态监测

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥. 小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 759-763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/759.asp>

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是欧美国家常见的肝脏疾病。随着我国生活水平的提高、饮食结构的改变和酒精消费量的日益增长,ALD的发病率也呈现逐年升高的趋势。ALD也日益引起了人们的重视。而建立理想的动物模型是研究酒精性肝损伤发病机制和防治方法的前提;但目前国内外急性酒精性动物模型参差不齐,在一定程度上限制了实验研究。一次性暴饮建立的急性酒精性肝损伤模型目前比较成熟,由于造模周期短,易复制,且与人类豪饮造成的肝损害一致,是研究急性酒精性肝损伤发病机制和筛选药物的理想模型;但目前尚缺少对造模过程中动物血清学及病理学改变的动态观察数据。本文旨在通过一次性暴饮建立急性酒精性肝损伤模型,并动态监测小鼠血清生化指标、氧化应激指标及肝组织病理的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 48只SPF级♂ICR小鼠,体质量20 g \pm 2 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司;实验动物饲养于中国人民解放军第二军医大学清洁级动物房,12 h光照和黑夜循环,温度22 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C,湿

度50%-60%,标准饲料,自由饮水;56 $^{\circ}$ C白酒购自北京红星酒业有限公司;ALT、TG检测试剂盒购于南京建成公司;SOD、MDA、GSH试剂盒购自南京建成公司;小鼠IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒购自eBioscience公司;油红O及HE染色相关试剂购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及处置:ICR小鼠适应性饲喂1 wk后随机分成2组:模型组和空白对照组。模型组给予50%乙醇(6 g/kg)灌胃,空白组给予等热量、等体积的糖水6 g/kg体质量灌胃,灌胃后2组均禁食。于灌胃后1.5、3、6、12 h分别将每组6只小鼠称重后麻醉、摘眼球取血;肝脏称重后部分液氮冻存,部分4%多聚甲醛固定,进行生化、病理形态学等测定。

1.2.2 血清ALT、TG含量:取血后静置30 min,离心3 000 r/min \times 10 min,常规分离血清,按试剂盒说明测定血清ALT、TG含量。

1.2.3 肝脏氧化应激因子、炎症因子:将冻存组织取出后匀浆,用TBA法检测肝组织匀浆中MDA和GSH的含量,用黄嘌呤氧化酶法检测肝组织匀浆中SOD含量,按试剂盒说明测定肝脏IL-1 β 、TNF- α 含量。

1.2.4 肝组织病理形态学:小鼠肝组织冰冻切片行苏丹Ⅲ染色;肝组织石蜡切片行常规HE染色。苏丹Ⅲ及HE切片使用Olympus摄像系统进行观察和摄片。

统计学处理 统计软件采用SPSS18.0统计软件包分析,统计结果用mean \pm SD表示。2组间比较先采用方差分析 F 检验进行方差齐性检验,方差齐的采用非配对 t 检验,不齐的采用非参方差分析。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 各组小鼠均无死亡,模型组小鼠出现翻正反射消失、嗜睡等醉酒状态,灌酒后6 h后小鼠逐渐苏醒。

2.2 血清ALT、TG 与空白组相比,模型组小鼠血清ALT、TG水平随着时间的推移逐渐上升,均于6 h达峰值,12 h略下降(表1);与空白对照组相比,模型组血清ALT、TG在1.5、3、6、12 h,两组间差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 肝脏IL-1 β 、TNF- α 含量 与空白组相比,模型组肝匀浆IL-1 β 、TNF- α 含量均上升(表2)。肝匀浆IL-1 β 含量灌酒后即上升,于造模12 h时达峰值。模型组肝脏TNF- α 水平随着时间的推移逐渐

表 1 两组不同时间点血清ALT、TG比较 (n = 6, U/L, mean ± SD)

造模时间	空白组		模型组	
	ALT	TG	ALT	TG
1.5 h	6.16 ± 0.75	1.57 ± 0.20	10.00 ± 0.89 ^b	2.58 ± 0.05 ^b
3 h	7.00 ± 0.89	1.55 ± 0.12	12.16 ± 1.17 ^b	3.67 ± 0.16 ^b
6 h	6.25 ± 1.26	1.26 ± 0.24	20.00 ± 1.14 ^b	5.62 ± 0.22 ^b
12 h	6.55 ± 1.02	0.97 ± 0.15	15.50 ± 1.04 ^b	4.25 ± 0.33 ^b

^bP<0.01 vs 空白组.

表 2 两组不同时间点肝脏IL-1β、TNF-α比较 (n = 6, pg/mg protein, mean ± SD)

造模时间	空白组		模型组	
	IL-1β	TNF-α	IL-1β	TNF-α
1.5 h	5.85 ± 0.19	70.10 ± 5.25	7.22 ± 0.57 ^b	85.82 ± 5.70 ^a
3 h	5.76 ± 0.43	74.62 ± 5.50	6.33 ± 0.46 ^a	86.02 ± 6.03 ^a
6 h	5.92 ± 0.34	68.82 ± 4.54	6.19 ± 0.42	92.53 ± 2.17 ^b
12 h	5.63 ± 0.25	72.32 ± 4.80	10.43 ± 0.59 ^b	130.33 ± 3.65 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 空白组.

表 3 两组不同时间点GSH比较 (n = 6, nmol/mg protein, mean ± SD)

造模时间	空白组GSH	模型组GSH
1.5 h	1.79 ± 0.11	1.53 ± 0.14
3 h	1.89 ± 0.22	1.25 ± 0.09 ^b
6 h	1.72 ± 0.21	0.76 ± 0.09 ^b
12 h	1.68 ± 0.16	1.12 ± 0.12 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 空白组.

上升, 于12 h达峰值. 其中12 h两组肝脏IL-1β、TNF-α含量比较均有显著统计学意义(P<0.01).

2.4 肝脏GSH含量 模型组小鼠于灌酒后肝脏GSH含量下降, 于6 h降至最低, 12 h时略上升(表3). 6 h两组肝脏GSH含量有显著统计学意义(P<0.01).

2.5 肝脏SOD、MDA含量 与空白对照组相比, 1.5 h肝脏SOD含量下降最为显著, 下降约24%(237.56 ± 4.12 vs 181.69 ± 13.01); 1.5 h肝脏MDA含量上升最为显著, 上升至正常组的2.2倍(2.63 ± 0.32 vs 5.76 ± 0.21). 1.5 h两组肝脏SOD含量有显著统计学意义(P<0.01).

2.6 肝组织病理形态学检测 HE染色结果显示: 空白组小鼠各检测点肝组织形态结构均正常; 模型组小鼠1.5、3、6 h HE染色切片未见明显变化, 12 h可见中央静脉及小叶间经脉周围出现肝细胞肿胀、水样变性等病理改变(图1).

■应用要点
本研究紧密联系临床, 通过一次性豪饮建立小鼠急性酒精性肝损伤模型, 并探讨急性酒精性肝损伤的表现及发病机制, 为动物实验研究和药物开发提供良好的实验平台.

苏丹III染色结果显示, 空白组小鼠各检测点肝组织未见红色脂滴; 模型组小鼠, 随着造模时间的延长, 肝组织红色脂滴数逐渐增多, 12 h见大量红色脂滴, 表现为脂滴弥漫浸润入肝细胞中, 肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数约为25%-35%(图2).

3 讨论

在西方国家, ALD及其并发症是导致死亡的重要病因之一^[1]. 在欧美国家的嗜酒人群中, ALD的患病率高达84%, 其中20%-30%可进展为肝硬化^[2]. ALD早期损伤多为可逆的, 如能及时有针对性地治疗可防止疾病向肝硬化、肝癌等不可逆病变发展^[3]. 目前除戒酒和支持性治疗外, 尚无令人满意的治疗药物. 因此需要通过大量的动物实验开展深入的研究, 而理想的动物模型则是实验的前提. 目前国内外关于急性酒精性肝损伤模型的造模方法主要有酒精灌胃和腹腔注射, 但腹腔注射死亡率高, 且不符合人类饮酒习惯. 而酒精灌胃法造模周期短、易复制、稳定性好, 无死亡, 且符合人类豪饮所致肝损伤的特点, 对研究酒精性肝损伤发病机制和筛选药物起关键作用, 但目前尚缺少急性酒精性肝损伤模型的动态监测数据.

ALD的发生、发展涉及遗传、营养和环境因素等多因素, 其早期发病机制与氧化应激、

■同行评价

本文结构较清晰, 结果、结论明确, 且文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国该领域研究的先进水平.

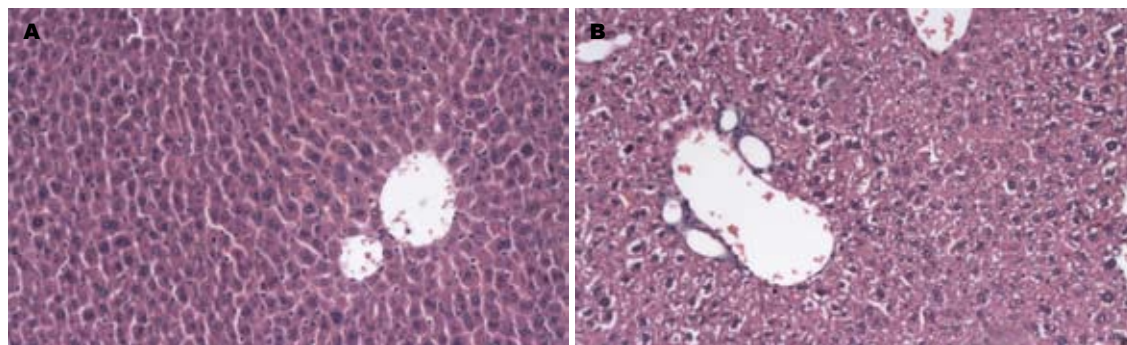


图 1 两组小鼠造模后12 h肝脏HE染色($\times 100$). A: 空白组; B: 模型组12 h.

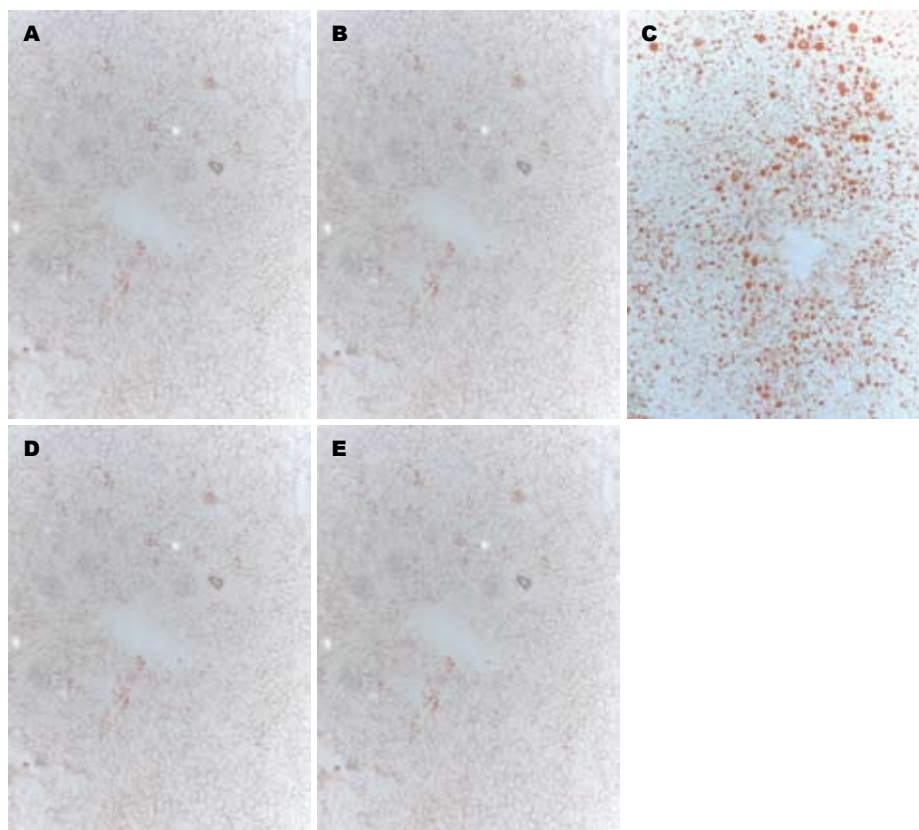


图 2 两组小鼠肝脏苏丹Ⅲ染色($\times 100$). A: 空白组; B-E: 模型组1.5、3、6、12 h.

内毒素介导的细胞因子释放、线粒体损伤、肝细胞凋亡等密切相关. 而氧化应激始终被认为是酒精性肝病的一个重要的致病因素. 乙醇进入体内后主要经肝细胞中的乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)代谢为乙醛, 再经乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)代谢为乙酸. 乙醇代谢过程中产生大量的还原型辅酶 I (dihydropyridine-adenine dinucleotide, NADH), 引起NADH/NAD⁺比例升高, 增加了呼吸链中传递的电子流, 导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度产生, 引起脂质、蛋白质和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)的降解^[4-7]. 除生成过量的ROS, 酒精还对多种抗氧化酶和非

抗氧化物造成损伤, 导致氧化应激, 促进ALD的发生、发展^[8]. 同时, 酒精可激活细胞色素P450, 尤其细胞色素酶P4502E1(CYP2E1), 使反应性氧中间产物和脂质过氧化终产物形成增多, 从而介导自由基脂质过氧化引起肝脏损伤. 急性期会发生肝细胞水肿, 肝脏体积和重量增大, 肝脏系数增大. 肝脏中蓄积的大量TG以极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的形式运出肝脏, 进入血液, 使血中TG含量也相应增加. 同时, 短时间内大剂量摄入酒精导致脂肪酸氧化障碍, TG以微泡形式在肝细胞中沉积, 苏木素特异性组织脂肪化学染色后, 镜下可见肝细胞呈泡沫状, 肝细胞内脂滴明显增加, 大小不等.

这种小泡状脂变在临床上往往标志着较严重的预后, 可导致肝功能衰竭或死亡。同时, 乙醇能使肠道通透性增加, 机体内毒素如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的水平上升, 从而导致内毒素血症。氧化应激和内毒素血症可激活核因子 κ B(nuclear factor NF-kappa-B, NF- κ B), NF- κ B的激活再进一步调控多种细胞因子, 如TNF- α , IL-1, IL-6等的释放, 引起肝细胞进一步坏死、凋亡、炎症加重^[9-15]。

本实验成功复制了一次性暴饮50%乙醇(6 g/kg)的小鼠急性肝损伤模型。实验结果显示: (1)模型组小鼠血清ALT、TG水平随着时间的推移逐渐上升, 均于6 h达峰值, 12 h略下降。有研究发现一次大剂量酒精冲击后ALT、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)会逐渐降至正常, 说明小鼠肝脏具有很强的自主修复和代偿能力。而苏丹III染色结果显示模型组小鼠肝脏见大量红色脂滴, 可见肝细胞脂肪变性程度与血中TG含量变化基本一致; (2)模型组小鼠肝脏炎症因子在造模后逐渐升高, 可能与损伤早期氧化应激和内毒素血症激活NF- κ B, NF- κ B的激活再进一步调控多种细胞因子有关, 如TNF- α , IL-1, IL-6等的释放, 引起肝细胞进一步坏死、凋亡、炎症加重^[16]。但由于监测时间短, 肝脏HE染色未见明显炎症细胞浸润; (3)在灌酒后小鼠氧化应激因子迅速发生了改变, 氧化应激在酒精性肝损伤早期重发挥着重要作用。氧化应激指机体在遭受各种有害刺激时, 体内活性高分子如ROS和活性氮自由基产生过多, 氧化系统和抗氧化系统失衡, 通过不同途径引起细胞凋亡或坏死、导致组织损伤^[17]。而肝细胞含有大量的SOD和过氧化氢酶, 因此当ROS过量产生和或抗氧化机能低下时, 就易发生肝细胞膜脂质过氧化、细胞器功能异常、炎症反应, 甚至核氧化。而肝库普弗细胞(Kupffer cell)、肝窦内皮细胞、肝星状细胞及Pit细胞(NK细胞)同样对肝细胞的氧化应激有影响。如Kupffer细胞在氧化应激时可被活化, 释放TNF- α 等炎症介质^[18,19]。因此损伤早期抗氧化应激具有积极的作用。

总之, 本研究系统监测了小鼠急性酒精性肝损伤肝脏病理及血清学的变化, 为更加深入研究发病机制和临床防治提供理想稳定的动物模型。

4 参考文献

- 1 Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 707-714
- 2 Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 24-34
- 3 Leung TM, Lu Y, Yan W, Morón-Concepción JA, Ward SC, Ge X, de la Rosa LC, Nieto N. Argininosuccinate synthase conditions the response to acute and chronic ethanol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2011 Dec 24. [Epub ahead of print]
- 4 Day CP. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2007; 13: S69-S75
- 5 Wilfred de Alwis NM, Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 44-54
- 6 Lieber CS, Abittan CS. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. *Clin Dermatol* 1999; 17: 365-379
- 7 Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-284
- 8 Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006; 43: S63-S74
- 9 Aram G, Potter JJ, Liu X, Wang L, Torbenson MS, Mezey E. Deficiency of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase enhances hepatocellular injury but attenuates fibrosis after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 2009; 49: 911-919
- 10 Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu GY, Maeda S, Hardiman G, Karin M. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 14: 156-165
- 11 Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-69
- 12 Kong L, Ren W, Li W, Zhao S, Mi H, Wang R, Zhang Y, Wu W, Nan Y, Yu J. Activation of peroxisome proliferator activated receptor alpha ameliorates ethanol induced steatohepatitis in mice. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 246
- 13 Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2011 Dec 13. [Epub ahead of print]
- 14 Ji C. Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochem Res Int* 2012; 2012: 216450. Epub 2011 Oct 26
- 15 Li D, Zhao H, Gelernter J. Strong protective effect of the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) 504lys (*2) allele against alcoholism and alcohol-induced medical diseases in Asians. *Hum Genet* 2011 Nov 20. [Epub ahead of print]
- 16 Veerman EC, Nazmi K, Van't Hof W, Bolscher JG, Den Hertog AL, Nieuw Amerongen AV. Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Biochem J* 2004; 381: 447-452
- 17 Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49: 3-8
- 18 Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 718-724
- 19 Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DY, Liu Y, Ji X, McClain C. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 407-413