

杜冯,梁李钺,邹坤,等. 两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型建立方法及比较 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 557-566.
Du F, Liang LC, Zou K, et al. Establishment and comparison of two alcoholic fatty liver models in C57BL/6J mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 557-566.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.001

两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型 建立方法及比较

杜冯¹, 梁李钺², 邹坤¹, 马明华³, 黄文峰^{4*}

(1. 天然产物研究与利用湖北省重点实验室 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002;
2. 三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002;
3. 宜昌市森林火灾预防中心, 湖北 宜昌 443000; 4. 湖北三峡职业技术学院 康养与护理学院, 湖北 宜昌 443000)

【摘要】 目的 短期内建立以酒精液体饲料和酒精加高脂饲料所诱导的两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型,并基于生物化学及组织病理学等方法进行比较,以筛选出较为高效的小鼠酒精性脂肪肝模型。**方法** 24 只健康 C57BL/6J 雄性小鼠,适应性饲养 2 周后,随机分为维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组共 4 个组($n = 6$)。各组记录每日饲料消耗量及体重变化情况。第 16 天处死后测定血清转氨酶活性及血清血脂、血糖含量。制备肝石蜡切片及冰冻切片,分别进行 HE 染色和油红 O 染色。**结果** 根据统计学分析,相比其他三组酒精液体饲料组小鼠体重呈明显的下降趋势且体重增长率为负增长。高脂饲料组饮食热量摄入明显低于其他三组。液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组三组肝质量与肝质量系数明显低于维持饲料组。生化结果显示,酒精液体饲料组 ALT、AST、TC 水平显著高于维持饲料组,血糖水平高于维持饲料组;酒精液体饲料组 ALT、AST、TC、血糖也高于液体饲料对照组。高脂饲料组血清 TC 显著高于维持饲料组,AST、血糖高于维持饲料组;高脂饲料组血糖显著高于液体饲料对照组。病理染色结果显示,酒精液体饲料组小鼠肝中有大量脂质沉积,高脂饲料组次之。**结论** 短期 Gao-Binge 模型与酒精加高脂饲料模型都能成功诱导 C57BL/6J 小鼠出现 AFL 的相应生化与病理特征,且 Gao-Binge 模型组的相应病理指标比后者更加显著,适合于急性 AFL 模型的建立。

【关键词】 酒精性肝病;酒精性脂肪肝;Gao-Binge 模型;酒精肝模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0557-10

Establishment and comparison of two alcoholic fatty liver models in C57BL/6J mice

DU Feng¹, LIANG Licheng², ZOU Kun¹, MA Minghua³, HUANG Wenfeng^{4*}

(1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Utilization, College of Basic Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, China. 2. State Administration of Traditional Chinese Medicine Third-Level Research Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, College of Basic Medicine, Three Gorges University, Yichang 443002. 3. Yichang Forest Fire Prevention Center, Yichang 443000. 4. College of Health Care and Nursing, Hubei Three Gorges Polytechnic, Yichang 443000)

Corresponding author: HUANG Wenfeng. E-mail: huangwenfeng@tgc.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish models of an alcoholic fatty liver induced by a alcohol liquid diet and alcohol combined with a high fat diet in C57BL/6J mice in a short time and assess a more efficient model of an alcoholic fatty liver in mice by biochemical and histopathological method. **Methods** Twenty-four healthy male C57BL/6J mice acclimated for 2

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82204237)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82204237).

【作者简介】 杜冯(1990—),男,硕士,研究方向:天然产物药理活性评价。Email: 348376607@qq.com

【通信作者】 黄文峰(1975—),男,医学博士,副教授,硕士导师,研究方向:中药的活性评价与应用。Email: huangwenfeng@tgc.edu.cn

weeks were randomly divided into four groups ($n = 6$): maintenance diet group, liquid diet control group, alcohol liquid feed group and high fat diet group. Daily feed consumption and body weight were recorded. On day 16, the animals were sacrificed and serum transaminase activity, serum lipids, and blood glucose were measured. Paraffin-embedded sections and frozen sections of the liver were prepared and stained with HE and oil red O, respectively. **Results** Compared with the other three groups, the body weight of mice in alcohol liquid feed group showed a significant downward trend and the growth rate was negative. The caloric intake of high fat diet group was significantly lower than that of the other three groups. The liver weight and liver weight index of the liquid diet control group, alcohol liquid diet group and high fat diet group were significantly lower than those of the maintenance diet group. The biochemical results showed that the levels of ALT, AST and TC in the alcohol liquid diet group were significantly higher than those in the maintenance diet group, and the blood glucose level was higher than that in the maintenance diet group. ALT, AST, TC and blood glucose in the alcohol liquid diet group were also higher than those in the liquid diet control group. Serum TC in the high fat diet group was significantly higher than that in the maintenance diet group, and AST and blood glucose were higher than those in the maintenance diet group. The blood glucose of high fat diet group was significantly higher than that of liquid diet control group. Pathological staining results showed that there was a large amount of lipid deposition in the liver of mice in the alcohol liquid diet group, followed by the high fat diet group. **Conclusions** The short-term Gao-Binge model and alcohol plus high fat diet model can successfully induce the corresponding biochemical and pathological characteristics of AFL in C57BL/6J mice, and the corresponding pathological indexes of Gao-Binge model group are more significant than the latter, which is suitable for the establishment of acute AFL model.

[Keywords] alcoholic liver disease; alcoholic fatty liver disease; Gao-Binge model; alcoholic liver model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是由于过量摄入酒精导致的肝病, 酒精性脂肪肝 (alcoholic fatty liver, AFL) 是酒精性肝病最早期的病理学改变, 早期脂肪肝通常没有明显的临床症状^[1]。AFL 可进一步发展为肝炎、肝纤维化及肝硬化甚至肝癌^[2]。早期的肝细胞脂肪变性对后续酒精性肝病的进一步发展及转归具有极重要的影响^[3]。AFL 可通过控制酒精摄入和药物干预而逆转, 因而是阻断 ALD 进展的最佳干预阶段。同时针对药理学研究, 早期 AFL 模型成功的建立, 能帮助早期 ALD 患者有效地筛选药物, 防止后续疾病的恶化。

目前建立动物 ALD 模型的方法多种多样^[4], 如急性酒精灌胃模型^[5]、Lieber-DeCarli 模型^[6-7]、Gao-Binge 模型^[8]等。在动物的选择方面, 目前 C57BL/6J 小鼠因其酒精偏好性较高及经济性较好成为 ALD 模型建立的首选^[9-11]。因此, 针对早期 ALD 动物模型的特点, 筛选出死亡率低、建模周期相对较短、有标准病理表现的建模方式非常必要。

在 Lieber-DeCarli 模型基础上改进建立的 Gao-Binge 模型, 是当前 ALD 模型中广泛应用的模型, 该模型具有造模时间短、病死率低、符合人类饮酒模式等特点^[12]。同时, 酒精加高脂饮食饲养模型由于致死率低、成本低、操作难度低且短期内能达到

ALD 早期 AFL 的标准, 也被广泛应用于 AFL 模型的建立^[13-15]。以上两种模型都是目前较为常用的能降低甚至消除酒精醇强制性摄入, 如灌胃、胃部置管等方式影响的脂肪肝模型建立手段。

但是, 酒精性肝病动物模型各有利弊, 并不能完全复制且体现 ALD 各阶段的病理学特点, 也无科学详尽的模型供建立与比较参考, 特别是相关 ALD 研究在前期模型的选择时困惑较大^[16], 同时存在建立周期较长、模型动物死亡率过高等问题^[17]。因此, 提供常见 ALD 模型的比较数据就显得极为必要, 本研究基于生物化学、组织学等相应指标, 对不同的模型进行比较, 为早期酒精性脂肪肝模型的应用及建立提供更多理论和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购自三峡大学实验动物中心【SCXK (鄂) 2022-0012】。正常饮食, 实验正式开展前适应性喂养 2 周, 使雄性小鼠体重尽量大于 20 g 以符合后期实验要求^[12]。饲养环境: 室温 25 ~ 27℃, 湿度 50% ~ 60%, 昼夜灯光控制周期为 12 h, 每周 2 次更换垫料, 饲养于三峡大学实验动物中心【SYXK (鄂)

2022-0061】。动物实验操作过程严格遵守三峡大学医学院实验动物伦理委员会伦理管理要求(2022B10A01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

丙氨转移酶(ALT)测定试剂盒(雷杜, S03030);谷草转移酶(AST)测定试剂盒(雷杜, S03040);甘油三酯测定试剂盒(雷杜, S03027);总胆固醇测定试剂盒(雷杜, S03042);葡萄糖测定试剂盒(雷杜, S03039);95%玉米食用酒精(河南鑫河阳酒精有限公司, 20211220)。全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技, Chemray 800);脱水机(Leica, 德国);病理组织切片机(Leica, 德国);多功能显微镜及图像分析系统(Leica, 德国);摊片烤片机(湖北宏业医用仪器有限公司)。

1.1.3 饲料选择及配方

大小鼠维持饲料:普通维持饲料。粗蛋白 $\geq 18\%$ 、粗脂肪 $\geq 4\%$ 、粗纤维 $\leq 5\%$ 、粗灰分 $\leq 8\%$ 。购自三峡大学实验动物中心。该饲料热量为 3.4 kcal/g。

TP 4030C:酒精肝模型饲料的液体对照饲料。脂肪 35%、蛋白质 18%、碳水化合物 47%,购自江苏特洛菲饲料科技有限公司。该液体饲料热量为 1 kcal/mL。

TP 4030D:酒精热量 28%(酒精含量:5% V/V, 100 U 体积的酒精溶液中含有 5 U 体积的酒精)脂肪 35%、蛋白质 18%、碳水化合物 19%、酒精 28%。用于小鼠酒精性脂肪肝造模的 Gao-Binge 法,购自江苏特洛菲饲料科技有限公司。该液体饲料热量为 1 kcal/mL。

60%高脂饲料(MD12033):蛋白质 20%、脂肪 60%、碳水化合物 20%,购自江苏美迪森生物医药有限公司。该饲料热量为 4.75 kcal/g。

1.2 方法

1.2.1 分组与动物模型建立

将 24 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组 4 个组($n = 6$)。维持饲料组为阴性对照组,普通大小鼠维持饲料饲养、自由进食进水。液体饲料对照组为液体饲料阴性对照,按 TP 4030C 液体对照饲料指导说明饲养、禁水;酒精液体饲料组按照 Gao-Binge 模型^[12]建立及 TP 4030D 酒精液体饲料指导说明饲养、禁水。第 16 天 7:00 ~ 9:00, 31.5% (V/V)酒精溶液灌胃,9 h 后动物标本取材。高脂

饲料组:60%高脂饲料饲养自由进食,20% (V/V)酒精溶液自由饮用,每日更换。第 16 天 7:00 ~ 9:00, 31.5% (V/V)酒精溶液灌胃,9 h 后动物标本取材。

1.2.2 动物体征及行为观察

每天观察小鼠的活动、进食、精神状态、毛发、排泄物及死亡情况。

1.2.3 动物体重及进食量变化

每天观察记录小鼠的进食量,酒精液体饲料及其对照饲料换算成热量单位记录。每 2 d 记录小鼠体重的变化情况。

1.2.4 肝质量及质量指数计算

小鼠取血完毕后,固定小鼠,开腹腔,取肝进行称量,计算其质量指数。

$$\text{肝质量指数} = \frac{\text{肝质量(g)}}{\text{体重(g)}} \times 100\%$$

1.2.5 血清生化指标含量测定

取血后,血浆 4℃ 静置 30 min, 3500 r/min 离心 15 min,得到分离血清,-80℃ 保存。按照试剂盒中说明书介绍的方法上机进行血清生化指标检测。

1.2.6 肝组织病理形态学分析

取血完毕后,取部分小鼠肝组织,并将其分为两部分:①用 4%多聚甲醛溶液固定,乙醇梯度脱水,常规石蜡包埋,连续 4 μm 切片,经 HE 染色后,在光镜下观察肝组织病理学变化;②用 4%多聚甲醛溶液固定后,依次用 20% 及 30% 蔗糖溶液脱水 24 h,脱水后经 OCT 包埋进行冰冻切片,切片时温度为 -18℃,厚度为 6 ~ 8 μm 。肝冰冻切片经油红染色后,显微镜进行观察脂质沉积情况。

1.3 统计学分析

计量资料用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均使用 GraphPad Prism 8 分析,对于符合正态性和方差齐性的计量资料,用单因素方差分析检验(LSD 进行两两比较),两组间差异比较,采用两独立样本的 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6J 小鼠体征及行动观察

如图 1 所示,维持饲料组、液体饲料对照组小鼠各状态良好,皮毛顺亮,行动灵敏且迅速,精神良好。酒精液体饲料组、高脂饲料组小鼠小鼠毛色暗淡,毛发凌乱显疏松,部分小鼠显消瘦,活动状态较维持饲料组和液体饲料对照组减弱,扎堆喜蜷卧。

实验后期,液体饲料对照组、酒精液体饲料组小鼠出现背部脱毛的现象。4 个组的 C57BL/6J 小鼠均未出现小鼠死亡情况。

2.2 C57BL/6J 小鼠体重及进食量变化情况

2.2.1 体重变化情况

每间隔 2 d 称重小鼠体重情况并记录,比较各组小鼠体重变化差异。如图 2A 所示,维持饲料组体重变化呈明显上升趋势;液体饲料对照组体重呈

上升趋势但较为平缓;酒精液体饲料组体重呈明显的下降趋势;高脂饲料组前期至第 7 天体重呈下降趋势,自第 7 天开始上升。

体重增长率如图 2B 所示,酒精液体饲料组、高脂饲料组相比维持饲料组体重增长率变化具有显著性差异($P < 0.01$),且酒精液体饲料组出现明显的负增长情况。酒精液体饲料组相比液体饲料对照组体重增长率变化也呈现显著性差异($P < 0.01$)。

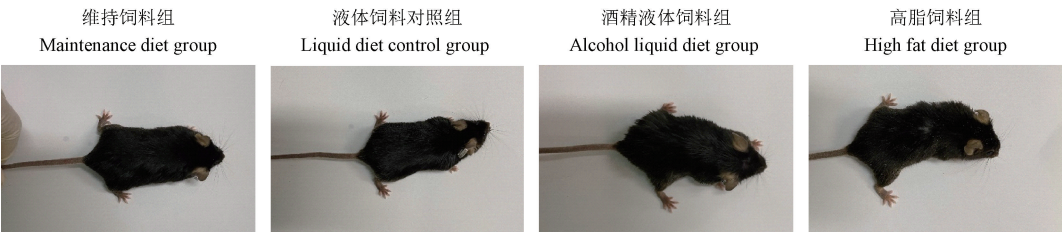
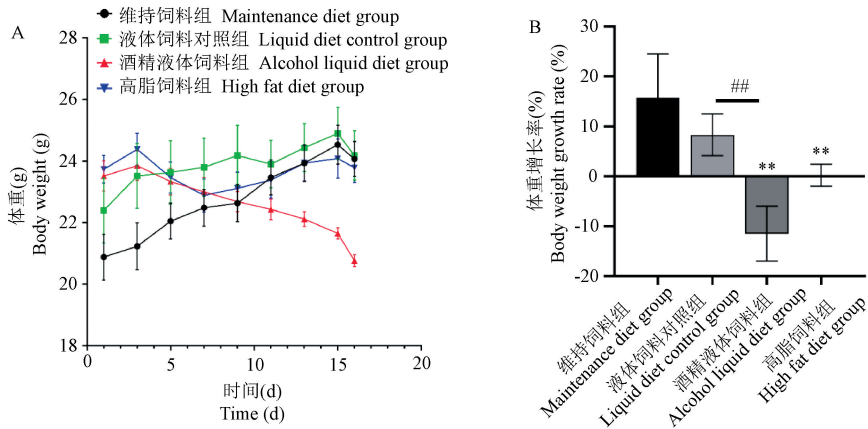


图 1 小鼠体征情况
Figure 1 Physical sign of mice



注:A:四组小鼠平均体重变化情况;B:四组小鼠体重分别相较初始体重变化情况;与维持饲料组相比,** $P < 0.01$;与液体饲料对照组相比,** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 2 小鼠体重变化及增长率

Note. A. Changes in average body weight of mice in the 4 groups. B. Changes in body weight of mice in the 4 groups compared with the initial body weight. Compared with maintenance diet group, ** $P < 0.01$. Compared with the liquid diet control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes and growth rate of body weight in mice

2.2.2 进食量

如图 3A ~ 3D 所示,依次为维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组小鼠平均进食量。各组在前期 1 ~ 5 d 基本呈现出进食量下降的现象,预计与其正处于适应期有关。5 d 后,逐渐趋于平稳。

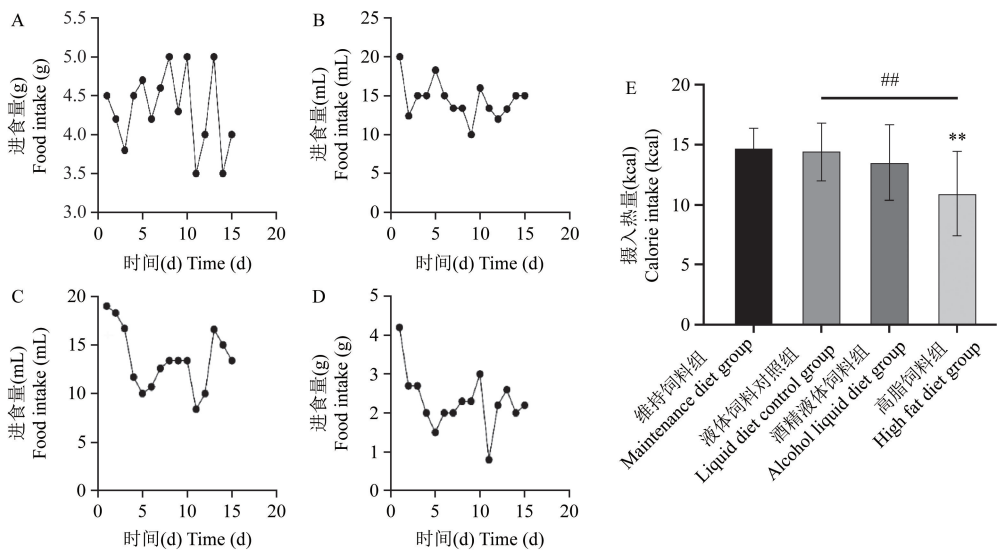
如图 3E 所示,维持饲料组与高脂饲料组平均热量摄入具有显著性差异($P < 0.01$),高脂饲料组

的平均热量摄入明显低于维持饲料组。液体饲料对照组与高脂饲料组平均热量摄入也具有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 C57BL/6J 小鼠肝质量及质量指数

2.3.1 肝质量

如图 4A 所示,与维持饲料组相比液体饲料对照组、酒精液体饲料组两组的小鼠肝质量存在显著性差异性($P < 0.01$),同时高脂饲料组与维持饲料



注:A ~ D:分别对应维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组小鼠平均每日进食量情况;E:四组小鼠平均每日饲料热量摄取情况。

图3 小鼠各组平均进食量及热量摄入情况

Note. A ~ D. Correspond to the average daily food intake of mice in the four groups of maintenance diet group, liquid diet control group, alcohol liquid diet group and high fat diet group, respectively. E. The average daily feed caloric intake of the four groups of mice.

Figure 3 Average food intake and caloric intake of mice in each group

组比较也存在差异($P < 0.05$)。酒精液体饲料组与高脂饲料组之间亦存在差异($P < 0.05$)。

2.3.2 肝质量指数

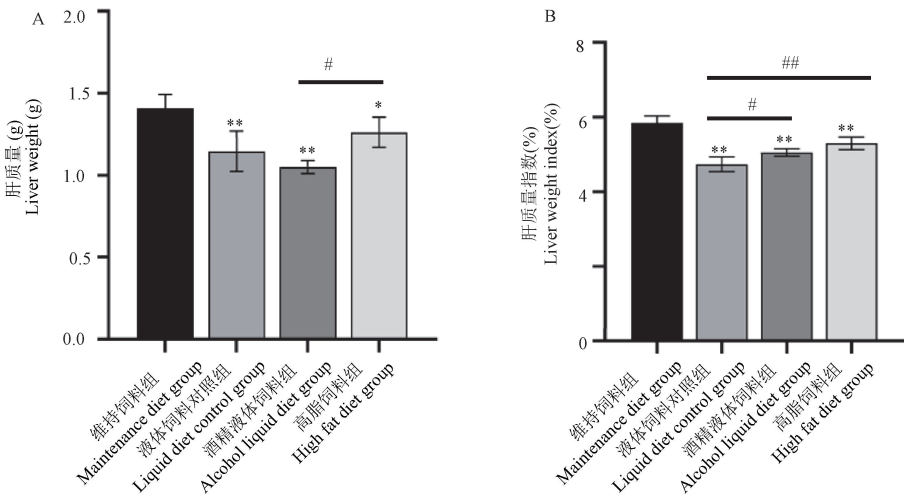
如图4B所示,除维持饲料组外其余三组肝质量指数明显降低,具有显著性差异($P < 0.01$)。同时酒精性脂肪肝模型组中酒精液体饲料组、高脂饲料组

料组与液体对照饲料组相比肝质量指数具有显著性差异性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.4 C57BL/6J 小鼠血清学指标

2.4.1 肝功能

如图5A所示,各组血清谷丙转氨酶(ALT)水平情况。与维持饲料组相比,酒精液体饲料组 ALT



注:与维持饲料组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与液体饲料对照组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)

图4 小鼠肝质量及质量指数

Note. Compared with the maintenance diet group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with liquid diet control group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Mouse liver weight and liver weight index of mice

值明显增高($P < 0.01$),酒精液体饲料组与液体饲料对照组相比,ALT 值也明显增高($P < 0.01$)。如图 5B 所示,各组血清 AST(谷草转氨酶)水平情况。与维持饲料组相比,其余三组明显增高($P < 0.05$)。酒精液体饲料组 AST 值也明显高于液体对照组饲料组($P < 0.05$)。

2.4.2 血脂

如图 6A 所示,各组血清甘油三酯(TG)水平情况。各组之间 TG 值未存在显著性差异。如图 6B 所示,各组血清总胆固醇(TC)水平情况:液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组三个组 TC 值明显高于维持饲料组且具有显著性差异($P < 0.01$)。酒精液体饲料组 TC 值明显高于液体饲料对照组($P < 0.01$)。

2.4.3 血糖

如图 7 所示,各组血糖葡萄糖(GLU)水平情况

酒精液体饲料组、高脂饲料组血糖水平明显高于维持饲料组且存在显著差异性($P < 0.05$)。同时,酒精液体饲料组、高脂饲料组两组血糖水平与液体饲料对照组相比也明显增高($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.5 C57BL/6J 小鼠肝病理学及组织学染色

2.5.1 肝外观

如图 8 所示,维持饲料组及液体饲料对照组小鼠肝均呈现鲜红色且脏器边缘锐利。酒精液体饲料组小鼠肝边缘圆润,肝表面发黄、有大量黄白色小点。高脂饲料组小鼠肝边缘圆润,表面轻微发黄,未见大量黄白色小点。

2.5.2 HE 染色

如图 9 所示,维持饲料组小鼠肝组织细胞形态正常,边界清晰,排列整齐,细胞胞质未见溶解和空泡;液体对照饲料组小鼠肝组织细胞形态正常,边界清晰,排列整齐,但细胞胞质见极少许小脂质空

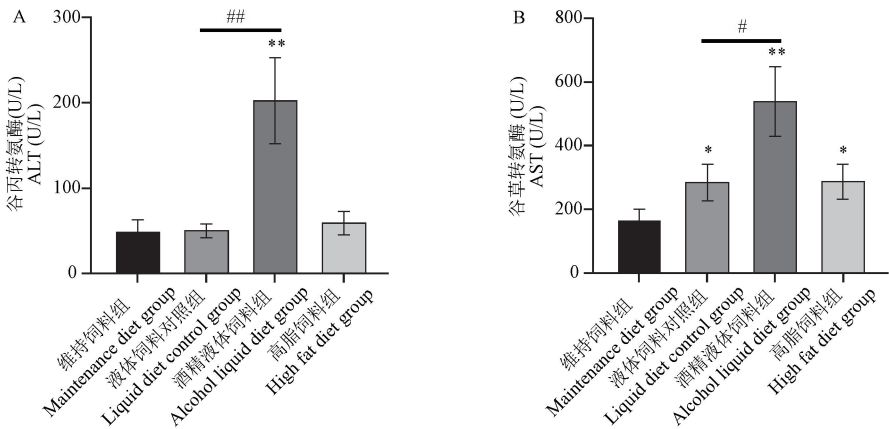


图 5 小鼠血清转氨酶
Figure 5 Mouse serum transaminase

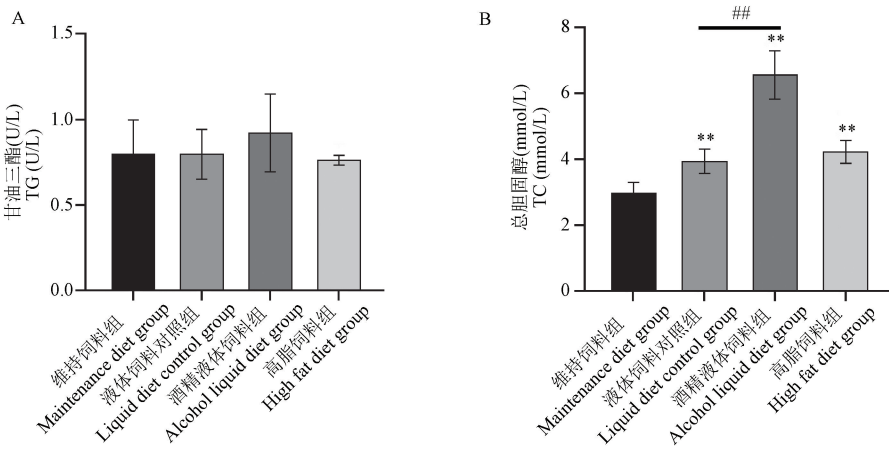


图 6 小鼠血脂
Figure 6 Blood lipid in mice

泡;酒精液体饲料组小鼠肝组织可见大量肝细胞弥漫性的脂质空泡,肝小叶有炎症发生且细胞肿胀,大量的脂肪滴积聚呈气球样变。高脂饲料组小鼠肝组织部分肝细胞含小脂质空泡,肝索排列较整齐,肝组织炎症浸润现象轻微。

2.5.3 油红 O 染色

小鼠肝组织经油红 O 染色后肝细胞中脂质着色呈红色,细胞核呈蓝色。如图 10 所示,维持饲料组肝细胞排列整齐,肝细胞核、质均匀,偶见极细微小脂肪颗粒,且无脂质沉积;液体饲料对照组肝细胞排列整齐,见部分小脂肪颗粒,有脂质沉积;酒精液体饲料组肝组织细胞质及其细胞间隙有密集红色脂肪滴聚集,有严重的脂质沉积,且大量脂质充满细胞质中;高脂饲料组肝组织细胞中,大量红色脂质液滴沉积于肝小叶中央静脉周围肝

细胞,远离肝小叶中央静脉的肝细胞脂质沉积相对较为轻微。

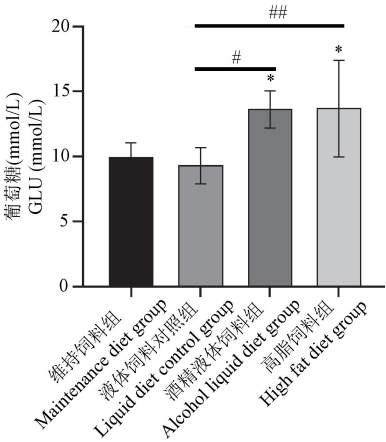


图 7 小鼠血糖
Figure 7 Mouse serum glucose

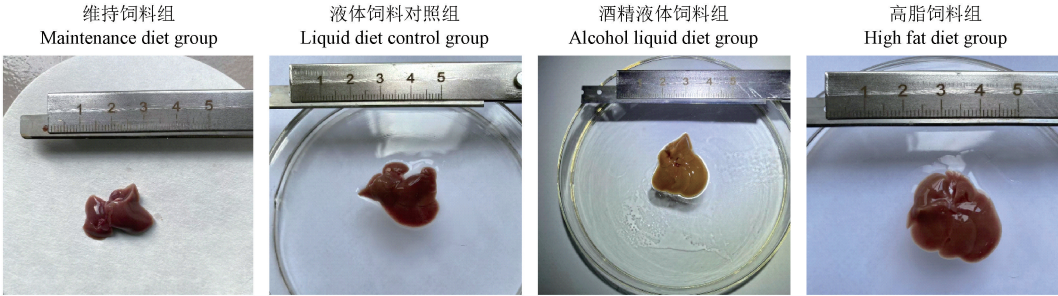


图 8 小鼠肝情况
Figure 8 Appearance of mouse liver

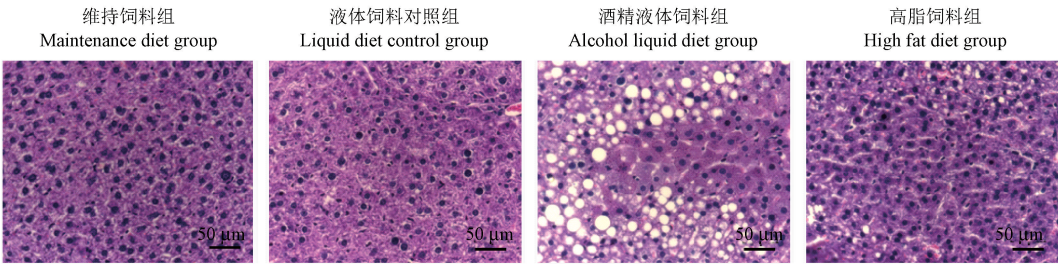


图 9 肝组织 HE 染色
Figure 9 HE staining of liver tissue

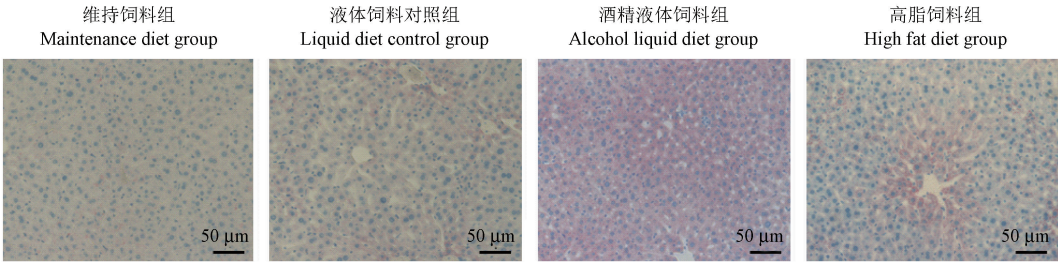


图 10 肝组织油红 O 染色
Figure 10 Oil red O staining of liver tissue

3 讨论

Gao-Binge 模型和酒精加高脂饮食模型作为非强制性酒精摄入的代表性模型,因能高度模仿与复制人类的饮酒模式与习惯而被广泛应用^[17-18]。

Gao-Binge 模型是通过将酒精加入完全流质的饮食中,让实验动物自由饮用的方式来建立 ALD 模型的方法,主要是为了降低或消除实验动物对酒精的厌恶性,从而维持血液中酒精浓度的相对恒定^[12]。为模仿人类短期酗酒的情景,于第 16 天进行 1 次高浓度酒精灌胃。作为让实验动物自主饮用含酒精的液体饲料,该模型养成率高、稳定性好,可复制酒精性脂肪肝和肝炎,并通过改变其喂养周期及高浓度酒精灌胃次数从而控制其表现出 ALD 不同阶段的病理学特征。其主要优点是能够主动控制热量的摄入,保持各组间的能量平衡,排除营养摄入因素对实验结果的影响^[19]。酒精加高脂饮食模型也是常用的非强制性酒精摄入的建模方式,是实验动物通过 2 ~ 7 周,以 20% 的乙醇溶液自由饮用和 60% 的高脂饲料自由食用而建立的 ALD 模型,该模型操作难度低且可达到 AFL 的相应病理标准^[15]。酒精加高脂饮食模型可以较好地模拟人类高脂饮食和慢性酒精饮用所造成的脂肪性肝损伤。但目前,在区分乙醇的摄入与外源性脂质摄入两者在 AFL 形成中所起的作用与影响仍然存在争议^[1,20]。

本研究中,为更加全面及科学地比较,设置了两组阴性对照组,即维持饲料组与液体饲料对照组。维持饲料组为正常饮食饲料与正常饮水,模拟正常饮食环境。而针对非正常饮食饲料,设立酒精液体饲料对照组,该组为酒精液体饲料组(Gao-Binge 模型组)的对照组,液体饲料对照组、酒精液体饲料组两组同为液体饲料且每单位提供的热量一致。两种饲料的区别在于,相比液体饲料对照组,酒精液体饲料组 28% 的热量由酒精提供,而液体饲料对照组由碳水化合物提供。两组阴性对照的设置是为了更好地与两组模型组互为比较。

本研究中,参照相关文献及饲料供应商提供方法,以 16 d 为周期建立并比较两种 C57BL/6J 小鼠 AFL 模型。实验结束时,酒精液体饲料组小鼠平均体重是唯一明显低于其初始平均小鼠体重且体重增长率为负的组别,表明含酒精的液体饲料会影响 C57BL/6J 小鼠的体重与生长,导致 C57BL/6J 小鼠

体重减轻。酒精液体饲料组与高脂饲料组的能量摄入情况也间接证实了这一点,短期持续性的酒精摄入会导致小鼠的进食量降低从而导致体重减轻^[21]。同时,维持饲料组与液体饲料对照组从能量摄入角度比较来看,说明液体饲料不会导致小鼠体重减轻。液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组三个组肝质量与肝质量系数明显低于空白组,表明液体饲料及 60% 的高脂饲料,这些病态的饲料短期喂养(16 d)会造成小鼠肝萎缩或退行性改变。有文献表明,酒精、营养不良等相关因素会导致肝细胞凋亡^[22-24]。肝细胞的凋亡会导致肝内细胞数量减少,肝萎缩而导致肝体积及相对质量减小^[25]。

ALT 主要分布于肝细胞浆内,当肝损伤时肝细胞内的 ALT 能进入血中引起血清 ALT 升高。AST 也存在于肝细胞浆内线粒体中。当肝细胞损伤时,线粒体内 AST 释放入血,使血清中 AST 升高。当肝细胞膜通透性增加时即使无肝细胞坏死,细胞内的转氨酶也可以顺浓度差而释放入血。所以,血清中转氨酶的含量是肝细胞损伤的敏感标志^[26-28]。酒精液体饲料组、高脂饲料组两组与维持饲料组、液体饲料对照组两个对照组相比较,酒精液体饲料组小鼠血清中转氨酶的活性较高脂饲料组显著高于维持饲料组、液体饲料对照组两对照组水平。

小鼠血清 TG、TC、GLU 含量升高,这些都是小鼠酒精性脂肪性肝损伤的变化特点之一^[28-31]。但维持饲料组、液体饲料对照组、酒料液体饲料组及高脂饲料组四组小鼠在血清 TG 水平上并无显著性差异;在 TC 的差异上,酒精液体饲料组小鼠较高脂饲料组显著高于两个对照组水平。血糖方面,酒精液体饲料组、高脂饲料组两组血糖水平明显高于维持饲料组、液体饲料对照组两个对照组且差异具有显著性,可能与脂质沉积导致肝胰胰岛素抵抗有关^[32]。

肝组织病理学检查是酒精性脂肪肝判别的黄金标准,由于脂质大量沉积于肝细胞内,故病理切片结果呈现出大量脂质空泡及肝组织气球样变情况^[31]。肝外观及肝病理学染色结果显示,酒精液体饲料组小鼠肝中有大量的脂质沉积,高脂饲料组也有一定的脂质沉积于肝小叶中央静脉周围肝细胞,但较酒精液体饲料组程度轻。液体饲料对照组虽然喂养中未给予酒精,但也出现少许的脂质沉积,呈现出非酒精性脂肪肝(NASH)早期的病理特

征^[33],但严重程度较酒精液体饲料组及高脂饲料组轻。液体饲料对照组与酒精液体饲料组在肝病理组织学的比较结果,较好地证明了同等热量摄入的情况下酒精能促进 AFL 的发生。

以上这些结果表明,在短期 16 d 的 ALD 建模周期内,酒精液体饲料组即 Gao-Binge 模型组和高脂饲料组都较为成功地诱导出 C57BL/6J 小鼠 AFL 的模型,但酒精液体饲料组即 Gao-Binge 模型组无论是从生化指标水平及肝病理组织学等各项参数上都显著优于酒精加高脂饲料模型。同时作为对照组之一的液体饲料对照组,经过短期 16 d 液体高脂饲料的喂养表现出非酒精性脂肪肝(NASH)早期的病理特征但程度较轻,若延长相应的建模时间,相信 NASH 的相应病理及生化特征更为明显。

综上所述,就酒精液体饲料组、高脂饲料组两组模型组而言,参照 Gao-Binge 模型的方法以酒精液体饲料喂养 C57BL/6J 小鼠相较酒精加高脂饲料的喂养方式,两者都能在短期(16 d)内成功诱导 C57BL/6J 小鼠出现 AFL 的相应病理特征,且 Gao-Binge 模型组的相应指标比后者更加显著。Gao-Binge 模型建立的方法,时间短、经济性好、效率高,作为急性模型能较好地复制 AFL 病理特征,但短期内会引起模型动物体重持续减轻,对实验动物的生理功能甚至存活是一个考验,适合成熟期实验动物短期建模应用。酒精加高脂饲料模型建立方法,虽在短期内 AFL 相应病理特征弱于 Gao-Binge 模型法,但体重未出现持续性减轻,相对而言较为温和,延长建模时间也能较好地复制 AFL 相应病理特征,因此更适合慢性 AFL 模型的建立。以上两组非强制性酒精摄入模型各有优劣,研究人员可以根据研究目的合理选取适当的模型。

参 考 文 献(References)

[1] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1572–1585.

[2] Yang L, Yang C, Thomes PG, et al. Lipophagy and alcohol-induced fatty liver [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 495.

[3] Cioarca-Nedelcu R, Atanasiu V, Stoian I. Alcoholic liver disease-from steatosis to cirrhosis-a biochemistry approach [J]. *J Med Life*, 2021, 14(5): 594–599.

[4] 吕超,石清兰,覃倩,等.小鼠实验性肝损伤模型的研究进展[J].*中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 107–113.

Lyu C, Shi QL, Qin Q, et al. A review of experimental liver injury models in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(1): 107–113.

[5] 林晓晖,黄玲,王一铮,等.小鼠急性酒精性肝损伤模型的制备及观察[J].*北方药学*, 2014, 11(6): 67–69.

Lin XH, Huang L, Wang YZ, et al. The establishment and observation of alcohol-induced acute liver injury model in mice [J]. *J North Pharm*, 2014, 11(6): 67–69.

[6] 方志红,崔剑巍,曹健美,等. Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤模型的复制[J].*中西医结合学报*, 2006, 4(6): 596–600.

Fang ZH, Cui JW, Cao JM, et al. Preparation of Lieber-DeCarli liquid diet induced alcoholic hepatic injury model in rats [J]. *J Chin Integr Med*, 2006, 4(6): 596–600.

[7] 蒋金金,张国富,董雅琪,等.急性 PM_{2.5}暴露对 C57BL/6J 小鼠和酒精性脂肪肝病模型小鼠肺组织炎症的影响[J].*中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 520–525.

Jiang JJ, Zhang GF, Dong YQ, et al. Effects of acute PM_{2.5} exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice and alcoholic fatty liver disease model mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 520–525.

[8] 周珂,王华. Gao-Binge 模型在酒精性肝病研究领域应用现状及未来前景[J].*临床肝胆病杂志*, 2019, 35(3): 485–488.

Zhou K, Wang H. Application status and future prospect of the Gao-Binge model in alcoholic liver disease [J]. *J Clin Hepatol*, 2019, 35(3): 485–488.

[9] Wei VL, Singh SM. Genetically determined response of hepatic aldehyde dehydrogenase activity to ethanol exposures may be associated with alcohol sensitivity in mouse genotypes [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1988, 12(1): 39–45.

[10] Belknap JK, Crabbe JC, Young ER. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1993, 112(4): 503–510.

[11] 杜宪. PDEs 在 C57BL/6J 和 DBA/2J 小鼠脑内表达的比较及其与饮酒行为的关联性分析[D]. 济南: 山东第一医科大学; 2019.

DU X. Comparison of PDEs expression in the brains of C57BL/6J and DBA/2J mice and its correlation with drinking behavior [D]. Jinan: Shandong First Medical University; 2019.

[12] 高斌,常彬霞,徐明江.慢性酒精喂养加急性酒精灌胃的酒精性肝病小鼠模型(NIAAA 模型或 Gao-Binge 模型)[J].*传染病信息*, 2013, 26(5): 307–311.

Gao B, Chang BX, Xu MJ. Mouse model of chronic plus binge ethanol feeding(NIAAA model or Gao-Binge model) [J]. *Infect Dis Inf*, 2013, 26(5): 307–311.

[13] Meadows GG, Blank SE, Duncan DD. Influence of ethanol consumption on natural killer cell activity in mice [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1989, 13(4): 476–479.

[14] Cook RT, Schlueter AJ, Coleman RA, et al. Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion-absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2007, 31(10): 1746–1758.

[15] Chang B, Xu MJ, Zhou Z, et al. Short-or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver

- injury in mice: an important role for CXCL1 [J]. *Hepatology*, 2015, 62(4): 1070–1085.
- [16] Mathews S, Xu M, Wang H, et al. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(10): G819–G823.
- [17] 其乐木格, 张娟, 段海婧, 等. 酒精性肝病动物模型建立方法的比较与评价 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 153–161.
- Qi LMG, Zhang J, Duan HJ, et al. Comparison and evaluation of methods for establishing animal models of alcoholic liver disease [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(5): 153–161.
- [18] Guo F, Zheng K, Benedé-Ubieto R, et al. The lieber-DeCarli diet-a flagship model for experimental alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2018, 42(10): 1828–1840.
- [19] 曾涛, 姜璐璐, 张翠丽, 等. 两种 Lieber-DeCarli 液体饲料诱导的小鼠酒精性肝损伤模型的建立 [J]. *毒理学杂志*, 2012, 26(4): 258–262.
- Zeng T, Jiang LL, Zhang CL, et al. Establishment of two kinds of Lieber-DeCarli liquid diet-induced alcoholic liver diseases in mice [J]. *J Toxicol*, 2012, 26(4): 258–262.
- [20] 王保伟, 李俊, 程文明, 等. 野菊花总黄酮对酒精性脂肪肝大鼠的防治作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(10): 1022–1025.
- Wang BW, Li J, Cheng WM, et al. The protective and therapeutic effects of total flavonoids of *Chrysanthemum indicu* on alcoholic steatohepatitis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2011, 46(10): 1022–1025.
- [21] Matsumoto A, Vasilou V, Kawamoto T, et al. Ethanol reduces lifespan, body weight, and serum alanine aminotransferase level of aldehyde dehydrogenase 2 knockout mouse [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38(7): 1883–1893.
- [22] Singhal PC, Reddy K, Ding G, et al. Ethanol-induced macrophage apoptosis: the role of TGF- β [J]. *J Immunol*, 1999, 162(5): 3031–3036.
- [23] Cohen JJ, Roychowdhury S, McMullen MR, et al. Complement and alcoholic liver disease: role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(2): 664–674, 674.
- [24] Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(3): 1165–1194.
- [25] 任成山, 钱桂生. 细胞凋亡和胀亡及其与多器官功能障碍综合征关系的研究进展 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(4): 247–250.
- Ren CS, Qian GS. Research progress of apoptosis, swelling and death and their relationship with multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2005, 17(4): 247–250.
- [26] Qin X, Zhang J, Lin Y, et al. Identification of miR-211-5p as a tumor suppressor by targeting ACSL4 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 326.
- [27] 赵稳兴, 杨举伦, 胡秀英. 小鼠酒精性肝损伤模型的建立及五味子提取物对其作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(5): 274–277, 254.
- Zhao WX, Yang JL, Hu XY. Model establishment of alcohol liver injury in mouse and effects of the extract from *Schisandra* on the injury [J]. *Chin J Comp Med*, 2006, 16(5): 274–277, 254.
- [28] Silva-Santana G, Bax JC, Fernandes DCS, et al. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 *Mus musculus* [J]. *Anim Model Exp Med*, 2020, 3(4): 304–315.
- [29] 肖娟, 张瑞芬, 黄菲, 等. 两种不同的酒精摄入方式诱导的小鼠酒精性肝损伤模型比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(6): 11–17.
- Xiao J, Zhang RF, Huang F, et al. Comparison of two mouse models of alcoholic liver disease induced by oral ethanol gavage or Lieber-De Carli ethanol liquid diet [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(6): 11–17.
- [30] Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease [J]. *Clin Liver Dis*, 2012, 16(4): 659–666.
- [31] Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 16.
- [32] Wiedemann MS, Wueest S, Item F, et al. Adipose tissue inflammation contributes to short-term high-fat diet-induced hepatic insulin resistance [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(3): E388–E395.
- [33] Yahaghi L, Ebrahim-Habibi A, Hayati-Roodbari N, et al. A simple method for inducing nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis [J]. *Anim Model Exp Med*, 2019, 2(4): 282–290.

[收稿日期] 2022-11-02