

程金来,周子玉,刘丽,等.小鼠急性酒精性肝损伤造模方法的比较[J].中国比较医学杂志,2023,33(7):26-33,40.
Cheng JL, Zhou ZY, Liu L, et al. Comparison and optimization of acute alcoholic liver injury model in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 26-33, 40.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.004

小鼠急性酒精性肝损伤造模方法的比较

程金来,周子玉,刘丽,宋丽霞,洪坤,谭余庆*,杨米一*

(中国中医科学院中药研究所,北京 100013)

【摘要】目的 模拟人类饮酒习惯,参考现有的利用酒精灌胃建立酒精性肝损伤模型报道,探究影响模型成功的关键因素并优化小鼠酒精性肝损伤模型的构建方法。**方法** 将150只SPF级ICR小鼠分为三个实验组讨论造模的周期和频率,造模剂的种类和用量及造模剂给予的时间间隔对实验动物的生化和生理指标所产生的影响差异。三组实验分别对小鼠进行不同剂量、不同频率、不同间隔时间的60%乙醇和53°白酒灌胃,最后计算各组小鼠的死亡率,检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)的活性及肝组织匀浆样本中丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、甘油三酯(TG)的含量,并进一步对小鼠肝进行HE染色及油红染色。**结果** 1d造模组死亡率为20%,两次不同剂量白酒造模组死亡率为40%,4h、6h、8h、12h白酒间隔造模组死亡率依次为40%、20%、10%、0%;对血清样本中ALT和AST的含量及肝组织匀浆中MDA、GSH、TG的含量、病理学检测指标等方面进行比较发现,缩短灌胃时间间隔及增加灌胃剂量会加剧小鼠肝受损情况。**结论** 在建立酒精性肝损伤的小鼠模型时,酒精灌胃的剂量、周期和频率会影响模型的成功率,比较而言,20 mL/kg和10 mL/kg的剂量,间隔6h灌胃53°白酒的方法更适合用于酒精性肝损伤动物模型的构建。

【关键词】 小鼠;酒精性肝损伤;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)07-0026-08

Comparison and optimization of acute alcoholic liver injury model in mice

CHENG Jinlai, ZHOU Ziyu, LIU Li, SONG Lixia, HONG Kun, TAN Yuqing*, YANG Miyi*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100013, China)

【Abstract】 Objective To investigate the factors affecting the establishment of a mouse model of alcoholic liver injury. **Methods** A total of 150 specific-pathogen-free male ICR mice were divided into three groups to study the possible influences of different experimental conditions, including modeling period, frequency, type, and dosage of modeling agent, and time interval between doses. Mice in the three groups received 60% ethanol and alcohol with 53% volume ratio by gavage at different doses, frequencies, and time intervals and the mortality rates were calculated. We also detected alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) serum levels and malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and triglyceride (TG) levels in liver tissue homogenate. Liver pathology was examined in tissue sections. **Results** The mortality rates in the 1-day modeling and double-dose liquor modeling groups were 20% and 40%, respectively, and the mortality rates in the 4, 6, 8, and 12 h interval dosing groups were 40%, 20%, 10%, and 0%, respectively. Pathological indicators, including ALT, AST, MDA, GSH, TG, and tissue pathology worsened in line with shortening of

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-056)。

【作者简介】 程金来(1993—),男,硕士,研究方向:肝癌。E-mail:479484528@qq.com

【通信作者】 杨米一(1989—),女,博士,助理研究员,研究方向:中药新药。E-mail:myyang@icmm.ac.cn

谭余庆(1960—),男,博士,研究员,研究方向:中药药理。E-mail:yqtan@icmm.ac.cn * 共同通信作者

the gavage interval and increased gavage dose. **Conclusions** The alcohol dose, length of the modeling period, and frequency of dosing affect the establishment of an alcoholic liver injury model in mice. We suggest that dosing mice with alcohol with 53% volume ratio twice a day at 20 mL/kg body weight or 10 mL/kg body weight at 6 h intervals can successfully cause liver damage.

【Keywords】 mice; alcoholic liver injury; animal model

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

酒精性肝病(alcohol liver disease, ALD)是指由于饮酒而导致的肝代谢损伤的疾病。随着现阶段生活水平的提高,酒精性肝病的发病率逐年提高^[1]。该种疾病早期表现为脂肪肝,如果不及时干预,进一步发展会成为肝炎、肝纤维化及肝硬化等严重疾病^[2]。2011 年的世界卫生组织的报告指出饮酒导致每年约有 260 万人死亡,死亡原因多与 ALD 有关^[3]。动物实验是探究疾病治疗的重要手段,而稳定、可靠、可重复的动物模型是开展实验工作的必然前提。目前报道的比较成熟的酒精性肝损伤的造模方法有酒精灌胃法和酒精腹腔注射法两种^[4]。较于酒精注射的造模方法,酒精灌胃法具有易复制、稳定性好、死亡率低的优点,且接近于人类由于饮酒所导致的肝损伤的行为习惯。急性酒精肝损伤的动物模型成模与否的判断标准为肝或血液中某些生化指标的相对改变或出现肝组织的病理性改变^[5]。但是,目前基于小鼠的急性肝损伤模型建立的方法还存在争议,不仅缺乏统一的造模方式且缺少不同造模方法间的横向比较。本研究拟从小鼠的存活情况、肝损伤的生化指标、病理学改变等相关参数来讨论不同条件下的酒精灌胃法所诱导的酒精性肝损伤小鼠模型的差异,为后续肝保护药物的开发奠定稳定、可信的动物模型基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 ICR 雄性小鼠 150 只(体重 14~16 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011、SCXK(京)2021-0006]。饲养于中国中医科学院中药研究所动物中心[SYXK(京)2019-0003],SPF 级屏障环境中(温度:22~24℃,湿度 50%~60%;饲料为钴 60 辐照实验鼠维持饲料;饮水为纯净水)。本研究获得中国中医科学院中药研究所动物实验伦理委员会批准(2021B120),实验符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

甘油三酯(triacylglycerol, TG)测定试剂盒(南京

建成生物工程研究所,批号:A110-1-1);丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A003-1);还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A006-2-1);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C009-2-1);谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C010-1-1);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝,批号:PC0020);无水乙醇(天津市津东天正精细化学试剂厂,批号:20210110);53°白酒(北京红星股份有限公司,批号:01-01-8);4%多聚甲醛(索莱宝,批号:P1110);0.9%生理盐水(石家庄四药有限公司,批号:1908013202)。恒温水浴锅(北京柏莱斯特科技发展有限公司, BW-2 T);酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司, Multiskan FC 型);高速低温离心机(湖南可成仪器设备有限公司, H1-16KR)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计

为了探究小鼠急性酒精性肝损伤成模的关键因素和条件,我们从造模的周期和频率、造模剂的种类和用量以及造模剂给予的时间间隔三个方面进行了讨论并开展了相关的实验(即本文所指的实验一、实验二及实验三),以探究不同造模条件下实验动物酒精性肝损伤相关指标表达的差异,从而寻找最佳的小鼠酒精性肝损伤的造模方法。

(1)造模周期和频率的比较研究(实验一)

适应性喂养 3 d 后,将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组每组 10 只,分为空白组、1 d 造模组、3 d 造模组、7 d 低剂量造模组、7 d 高剂量造模组。其中空白组连续 7 d 按照 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水;1 d 造模组前 6 d 以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水,第 7 天以 15 mL/kg 的剂量间隔 12 h 灌胃 60%的乙醇两次;3 d 造模组前 3 d 以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水,第 4 天后以 15 mL/kg 的剂量间隔 12 h 灌胃 60%的乙醇两次;7 d 低剂量造模组连续 7 d 按照

10 mL/kg 的剂量灌胃 60% 的乙醇;7 d 高剂量造模组连续 7 d 按照 15 mL/kg 的剂量灌胃 60% 的乙醇。

(2) 造模剂及造模剂量的比较研究(实验二)

适应性喂养 3 d 后,将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组每组 10 只,分为空白组、一次白酒造模组、两次不同剂量白酒造模组、两次不同剂量乙醇造模组、两次等剂量乙醇造模组。其中空白组造模当天以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水;一次白酒造模组以 10 mL/kg 的剂量灌胃 53°白酒;两次不同剂量白酒造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 53°白酒;两次不同剂量乙醇造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 60% 的乙醇;两次等剂量乙醇造模组以 20 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 60% 的乙醇两次。

(3) 造模剂给予方式的比较研究(实验三)

适应性喂养 3 d 后,将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组每组 10 只,分为空白组、4 h 间隔造模组、6 h 间隔造模组、8 h 间隔造模组、12 h 间隔造模组。其中空白组于造模当天以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水 1 次;4 h 间隔造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 53°白酒两次;6 h 间隔造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 6 h 灌胃 53°白酒两次;8 h 间隔造模组以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 8 小时灌胃 53°白酒两次;12 h 间隔造模组以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 12 h 灌胃 53°白酒两次。

1.3.2 样品采集

上述对应的实验操作结束后,实验动物禁食(自由饮水)12 h,称体重后进行眼球取血,静置 1 h 以上,随后 3000 r/min 离心 10 min 取上清。取血后迅速取其肝,置于预冷的生理盐水中漂洗数次,称定肝总质量,取肝左叶中部浸于 4% 多聚甲醛中,用于制备组织切片。另外,精密称取肝组织块 200 mg,精密量取 9 倍于质量的预冷生理盐水(约 1.8 mL),将组织块剪碎后与生理盐水同时放入匀浆器中,将匀浆器置于冰上反复研磨至充分破碎从而获得质量浓度为 100 mg/mL 的肝匀浆。将制备好的肝匀浆以 3500 r/min 于 4℃ 离心 15 min,取上清液,置于 1.5 mL 离心管中,样品于 -20℃ 冰箱中冷冻保存,以备后续使用。

1.3.3 指标检测

(1) 肝组织匀浆中蛋白含量的测定

根据 BCA 蛋白浓度说明书测定肝组织匀浆中的蛋白含量。

(2) 肝组织脂质代谢指标检测

根据 TG 试剂盒说明书检测各组小鼠 100 mg/mL 肝匀浆中甘油三酯的含量。

(3) 肝组织脂质过氧化指标检测

分别根据 MDA 和 GSH 试剂盒说明书检测各组小鼠 100 mg/mL 肝匀浆中 MDA 和 GSH 的含量。

(4) 小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量检测

分别根据 ALT 和 AST 试剂盒说明书检测各组小鼠血清中酶的活性。

(5) 肝组织病理检查

常规 HE 染色:肝经 4% 多聚甲醛固定后,采用石蜡包埋,然后切片、脱蜡,水化,使用苏木精-伊红染色,最后使用光学显微镜和成像系统观察肝组织的病理变化。

冰冻切片油红 O 染色:将经 4% 甲醛固定的小鼠肝组织于液氮环境中制冰冻切片,厚 10 μm ,将切片置于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,并放入 10% 的甲醛固定液中,固定 10 min;用蒸馏水稍洗,待切片干燥,将切片置于油红工作液中浸染 8~10 min;用 60% 乙醇分色;用蒸馏水稍洗;苏木素淡染细胞核 30 s;自来水泛蓝;用滤纸把周围水分吸干,甘油明胶封片;在光学显微镜下观察各组肝组织中脂滴含量的变化。运用 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析,并计算其 Per Area 值,Per Area 值=阳性区域面积(红色区域)/总面积,值越大表示阳性区域越大。

1.4 统计学方法

用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,最终数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以单因素方差分析进行组间差异比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物死亡情况

动物死亡率是评价建模方法的重要指标因素之一,理想的建模方法应具有成模率高,死亡率低的特点。经尸体解剖可排除本研究中由于灌胃不当而引起的死亡,从而推测动物的死亡的主要原因是其酒精的敏感性,三组实验所对应的死亡率如表 1 所示。实验一表明,短时间内大剂量灌胃乙醇的造模方式具有一定的可行性;实验二表明使用 53°白酒作为造模剂相对于体积分数 60% 的乙醇可以减少动物的死亡率,并且大剂量的造模剂的使用会增加实验动物的死亡率;实验三表明延长两次造模剂的灌胃时间间隔可以降低动物的死亡率,这一现

象可能是由于较长的时间间隔使酒精代谢分解相对充分,降低了酒精累积对脏器的损伤。

2.2 小鼠肝组织中 TG 的含量

实验一的结果显示单日内以 15 mL/kg 的剂量连续给予造模剂两次会提高肝组织中 TG 的浓度,但是以 15 mL/kg 或者 10 mL/kg 的剂量进行 7 d 造模时,实验动物肝组织中 TG 的浓度显著下降,这可能是由于长期大剂量灌胃酒精导致实验动物进食量减少、体重降低所致;实验二的结果显示短时间内以 53°白酒按照 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量依次进行灌胃造模时,肝组织中 TG 的含量相对于等剂量酒精刺激时显著增加,这可能是由于第一次大剂量的酒精刺激使得实验动物肝损伤明显,随后的第二次刺激又巩固了这一效果,从而导致更显著的

酒精刺激;实验三的结果显示间隔更短时间的造模剂刺激会加剧小鼠酒精性肝损伤的程度(图 1)。

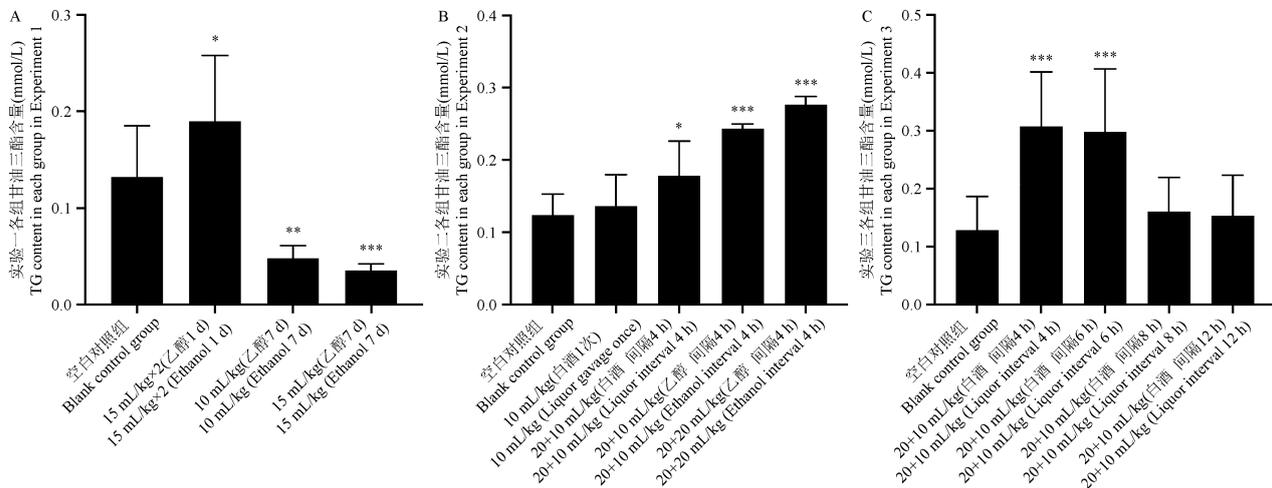
2.3 小鼠肝组织中 GSH 的含量

实验一的结果显示短时间内以 15 mL/kg 的剂量连续给予造模剂两次对肝组织中 GSH 的浓度影响不大,但是以 15 mL/kg 或者 10 mL/kg 的剂量连续 7 d 酒精灌胃造模时,实验动物肝组织中的 GSH 的浓度含量显著下降;实验二的结果提示 1 次灌胃剂量为 10 mL/kg 及 1 d 之内以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量灌胃 53°白酒两次时,实验动物肝组织的 GSH 相对于空白组均有明显下降,并且两次灌胃造模的方式小鼠肝组织中 GSH 的含量相对更低;此外,实验三的结果显示两次灌胃造模的时间间隔越短小鼠肝组织中 GSH 的含量越低(图 2)。

表 1 实验动物死亡率

Table 1 Mortality of experimental animals

实验一 Experiment 1		实验二 Experiment 2		实验三 Experiment 3	
组别 Groups	死亡率 (%) Mortality rate	组别 Groups	死亡率 (%) Mortality rate	组别 Groups	死亡率 (%) Mortality rate
空白对照组 Blank control group	0	空白对照组 Blank control group	0	空白对照组 Blank control group	0
1 d 造模组 Modeling group-1 day	20	一次白酒造模组 Modeling group-liquor gavage once	0	4 h 间隔造模组 Modeling group-4 h interval	40
3 d 造模组 Modeling group-3 day	100	两次不同剂量白酒造模组 Modeling group-double different doses of liquor	40	6 h 间隔造模组 Modeling group-6 h interval	20
7 d 低剂量造模组 Low dose modeling group-7 days	40	两次不同剂量乙醇造模组 Modeling group-double different doses of ethanol	60	8 h 间隔造模组 Modeling group-8 h interval	10
7 d 高剂量造模组 High dose modeling group-7 days	50	两次等剂量乙醇造模组 Modeling group-double equal doses of ethanol	60	12 h 间隔造模组 Modeling group-12 h interval	0



注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 小鼠肝组织中 TG 的含量

Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 1 Concentrations of TG in liver tissue of different experiments

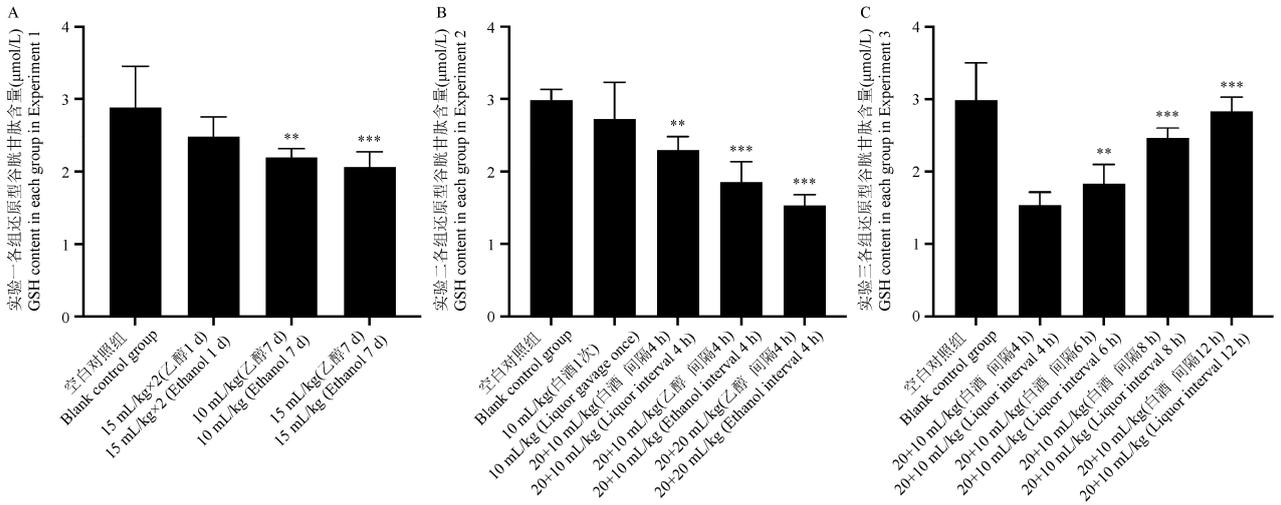
2.4 小鼠肝组织中 MDA 的含量

实验一的结果显示 1 d 内以 15 mL/kg 的剂量连续给予 60% 的乙醇两次及以 10 mL/kg 的剂量使用 60% 的乙醇造模 7 d 时,均会增加肝组织中 MDA 的含量,但与空白组相比无显著性差异;实验二的结果提示以 53° 白酒作为造模剂时,一次性灌胃剂量为 10 mL/kg 及 1 d 之内以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量灌胃两次时,实验动物肝组织中的 MDA 含量相对于空白组均有升高,数据具有统计学差异;此外,实验三的结果显示以 53° 白酒作为造模剂时,按照 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量依次灌胃造模

时,灌胃时间间隔为 4 h、6 h、8 h 时均会导致肝组织中 MDA 含量升高,且相比较于空白组具有统计学差异,但当两次造模时间间隔为 12 h 时,MDA 含量的升高不显著(图 3)。

2.5 小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性

实验一中,与空白对照组相比其他各实验组血清 ALT 和 AST 的活性均有明显升高($P < 0.05$),证明小鼠肝受到一定程度的损伤;实验二的结果显示,实验组相对于空白组的 ALT 和 AST 的活性也有明显增高($P < 0.05$),在相同灌胃剂量和灌胃间隔时间下,60% 乙醇相较于 53° 白酒对肝损伤更为明显;

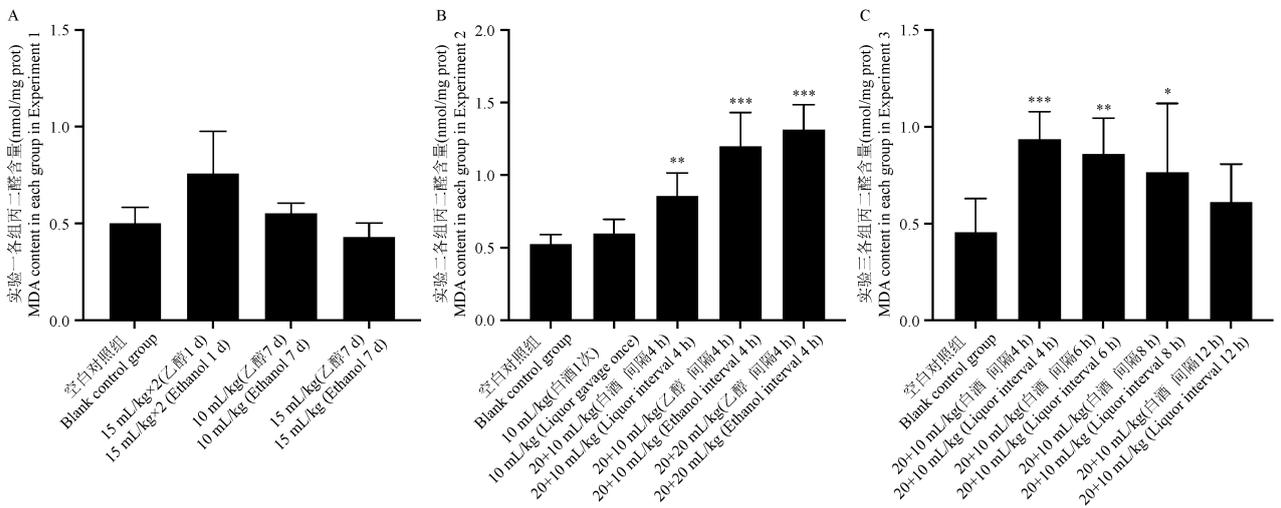


注:与空白对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 小鼠肝组织中 GSH 的含量

Note. Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Concentrations of GSH in liver tissue of different experiments



注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 小鼠肝组织中 MDA 的含量

Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

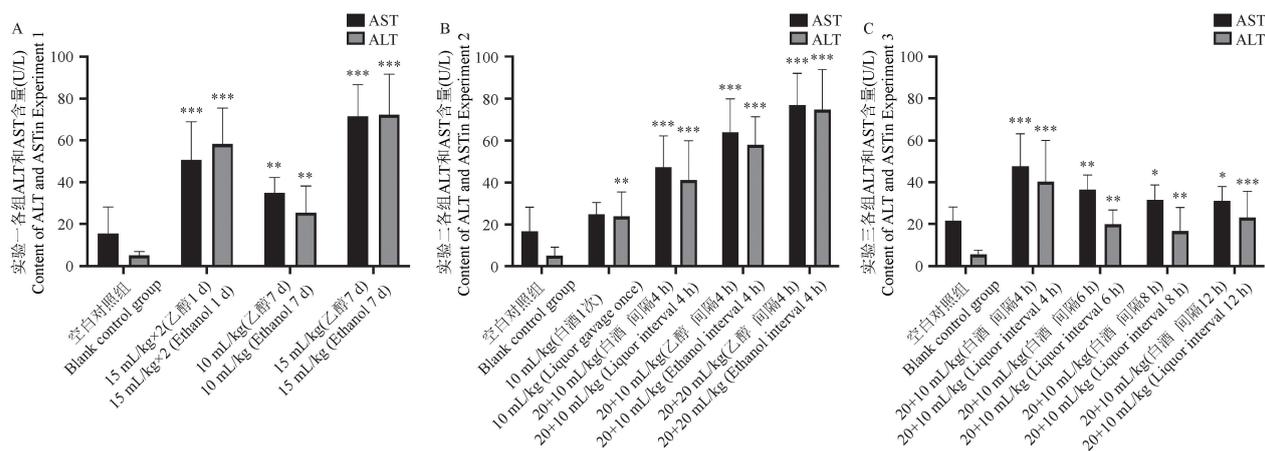
Figure 3 Concentrations of MDA in liver tissue of different experiments

实验三的结果显示,与空白对照组相比,其他各实验组 ALT 和 AST 的值均有明显增加 ($P < 0.05$),等量 53°白酒灌胃时,灌胃间隔时间越短 ALT 和 AST 的值越高,其对肝损伤也越大。对比肝功能特征指标血清 ALT、AST 活性的变化程度,可发现较大的白酒灌胃量和较短的灌胃间隔所诱导的肝损伤可能更严重,但也更易导致实验动物死亡(图 4)。

2.6 小鼠肝 HE 染色组织学观察

酒精性肝损伤动物模型具有血脂代谢紊乱、肝内脂肪蓄积的特点,病理组织学检查可见弥漫性的

肝细胞脂肪变性,细胞内可见大小不等的脂肪滴,图 5 所示的即为不同实验条件下 HE 染色的结果。对于实验一,1 d 造模组的病理变化变化最为明显,主要表现为含脂肪滴的肝细胞明显增多,超过总面积的 1/2。肝内隐约可见不规则的嗜酸性团块状物质沉积 (Mallory-Denk 小体, Mallory-Denk 小体是位于变形肝细胞浆内,核旁的均质嗜酸性包涵体,电镜下由缠绕在一起的细胞角蛋白中间丝构成,为酒精性肝炎的特征性病变之一)。7 d 造模组高剂量和低剂量肝细胞无脂肪滴的增多的现象。



注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量

Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 The content of ALT and AST in serum of mice

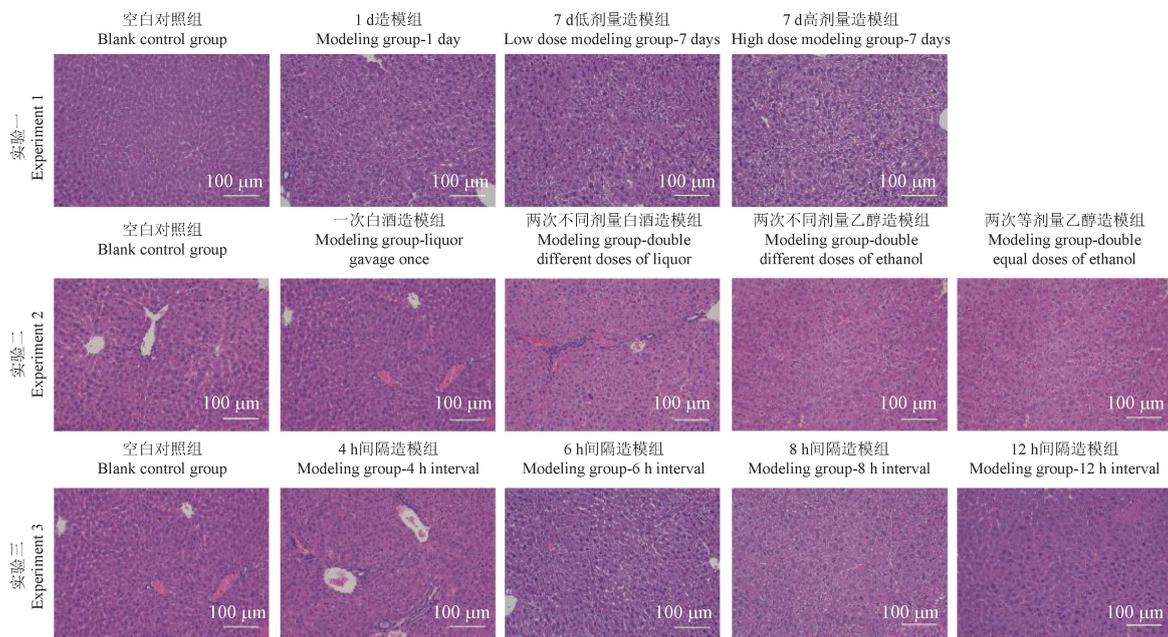


图 5 小鼠肝组织病理切片

Figure 5 Hepatocytes adipose degeneration

在实验二中,一次白酒造模组相比于空白组其 HE 染色无明显差异,两次不同剂量白酒造模组与正常组相比,其含脂肪滴的肝细胞明显增多,超过总面积的 1/2,且肝内隐约可见 Mallory-Denk 小体的沉积。

在实验三中,相较于空白组,12 h 间隔造模组的肝组织再病理学观察上无明显变化,4 h、6 h 及 8 h 间隔造模组可见含脂肪滴的肝细胞均增多,并伴有 Mallory-Denk 小体的沉积,在 200 倍视野下可

见其清楚的变化情况,各组中脂肪滴含量由多到少的排序依次为 4 h 间隔造模组、6 h 间隔造模组、8 h 间隔造模组。

2.7 小鼠肝油红染色组织学观察

油红染色可以特异性地将肝内的甘油三酯进行染色,肝脂肪堆积后可以观察到明显的红色(图 6)。在实验一中,相较于空白组,7 d 造模高剂量组和低剂量组均无明显变化,1 d 造模组阳性表达明显上升($P < 0.001$),统计差异见图 7A。实验二中,

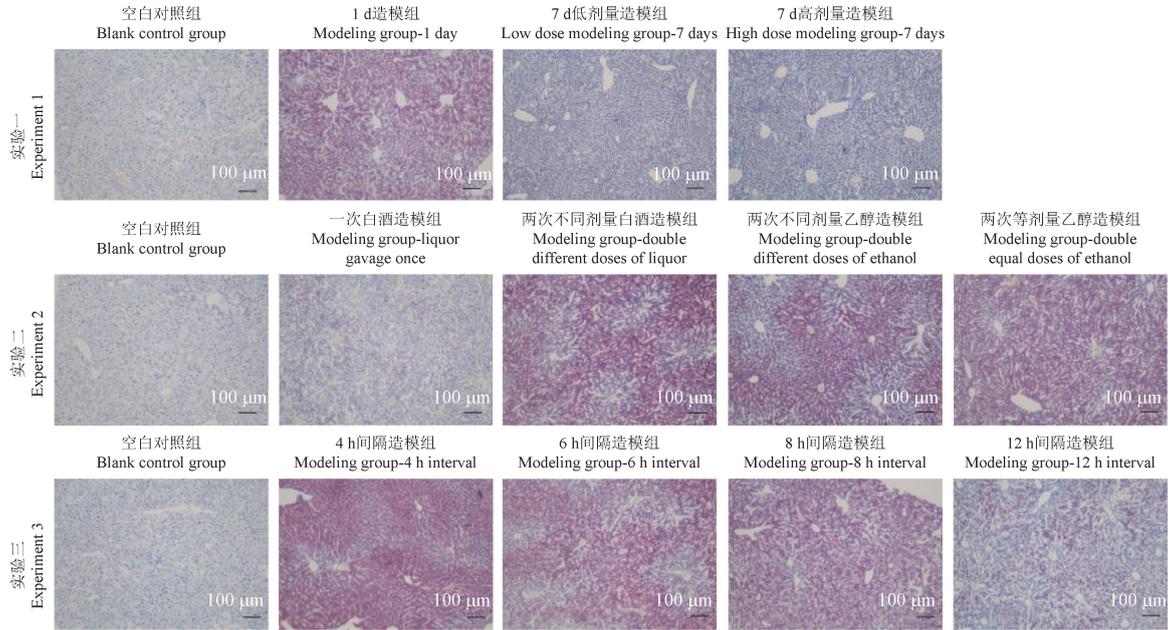
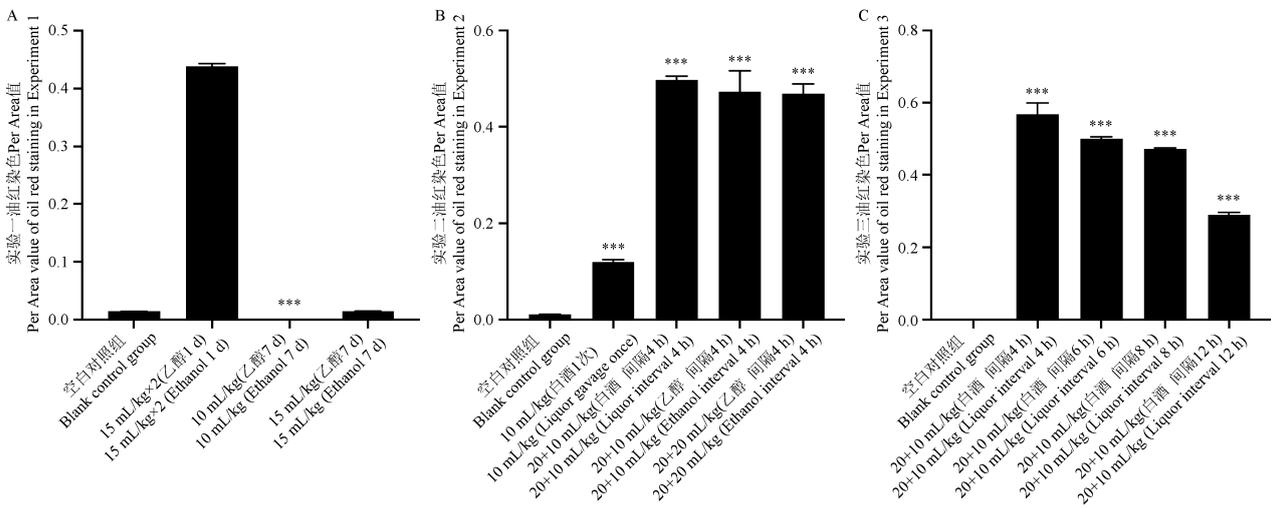


图 6 小鼠肝组织油红染色
Figure 6 Oil red staining of mice liver tissue



注:与空白对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 7 小鼠肝组织油红染色单位面积值
Figure 7 Per Area value of oil red staining of mice liver tissue

Note. Compared with the blank control group, *** $P < 0.001$.

Figure 7 Per Area value of oil red staining of mice liver tissue

相较于空白组,一次白酒造模组阳性表达有所上升,但低于两次不同剂量白酒造模组。两次不同剂量白酒造模组阳性表达明显上升($P<0.001$),趋势见图 7B。在实验三中,与空白组相比,其余各组阳性表达均有上升,且都有显著差异($P<0.001$),其表达趋势为 4 h 间隔造模组>6 h 间隔造模组>8 h 间隔造模组>12 h 间隔造模组(图 7C)。

3 讨论

酒精在体内代谢转化的主要场所是肝,其主要是通过微粒体乙醇氧化体系和乙醇脱氢酶乙醇氧化体系进行物质转换的。酒精过量摄入而导致 ALD 的机制较为复杂,目前尚不完全清楚,可能与酒精及其代谢产物对肝的毒性作用、氧化应激和脂质过氧化等作用有关。

酒精在肝内代谢时可产生大量自由基,过量的自由基可引起肝细胞膜脂质生成过氧化产物及其代谢产物 MDA,体内自由基和 MDA 的积累会造成 GSH 的耗竭。此外,乙醇的氧化会使肝细胞质中 NADH/NAD⁺ 的比值升高,使细胞内的三羧酸循环受到抑制,导致甘油三酯的分解减少,从而导致血清和肝中的甘油三酯的含量增加。甘油三酯在肝细胞内聚集,会进一步诱发细胞脂肪变性,从而导致肝受损引发 ALD^[6-9]。目前常用 ALT 和 AST 水平来评估肝损伤的情况,因其分布于肝细胞浆中,当肝细胞受损后会导致大量 ALT 和 AST 释放入血,使这两种酶在血液中的活性增加,可利用相关的试剂盒进行检测^[10-12]。

尽管国内外研究者已建立了多种酒精性肝病模型用于相关药物的研发,上述模型包括酒精灌胃模型、慢性酒精喂养模型和慢性酒精喂养模型+单次酒精灌胃模型,还有一些不常用的建模方法模型,如酒水饮料模型、酒精加辅剂模型和胃内喂养模型等^[13]。但是这些模型的成功率和肝损伤程度参差不齐,目前尚未建立一种标准的评价小鼠酒精性肝损伤模型的方法。笔者在查阅文献时发现国内研究者大多采用酒精灌胃的方式来建立酒精性肝损伤模型,这显然是有利于降低实验成本和方便实验的一种建模思路,因此本文对该种建模方式开展了进一步的研究,从而探究酒精灌胃法制备酒精性肝损伤动物模型的关键影响因素。

本研究从造模剂的种类、造模周期、造模剂用量及造模间隔时间等方面开展了考察和实验工作。

相关实验结果显示,较长时间造模周期下的酒精不耐受性的累积作用会导致实验动物体重减少不利于实验动物肝脂肪的堆积和模型的成功,而短时间内的连续造模操作不仅缩短了造模周期且更易引发实验动物肝病及相关生化指标改变的发生。基于实验一条件下小鼠的死亡率及相关生化指标的结果,笔者获得了以 60% 乙醇为造模剂,按照 15 mL/kg 的剂量,间隔 12 h 连续灌胃两次的初步造模方案,该方案可以实现快速造模的目的;为了降低实验动物的死亡率并获得更为显著的肝损伤效果的模型动物,笔者进一步开展了基于造模剂种类和造模剂用量的对比实验(实验二),发现灌胃大剂量的造模剂比低剂量的造模剂更易引起动物肝损伤的发生,且相较于使用 60% 乙醇灌胃的方式,使用同等剂量的 53° 白酒可以降低实验动物的死亡率;上述探究,使笔者对造模间隔时间与实验动物死亡率和肝损伤程度的关系产生了好奇,因而在实验三中设置了不同的灌胃时间间隔来优化造模方法,过短的造模间隔会导致死亡率升高,而当造模间隔时间大于 6 h 后,肝损伤程度会减弱,因此以 53° 白酒作为造模剂,分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量按照 6 h 的间隔进行灌胃,可以在较低死亡率的情况下获得具有明显肝损伤特征的小鼠。

综上,通过本研究的比较,我们获得了一种简便、稳定、可靠的小鼠酒精性肝损伤模型的制备方案,就是以 53° 的白酒作为造模剂,以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 6 h 依次对小鼠进行灌胃。使用上述方法造模后,生化指标的改变反映了造模剂对肝的明确损伤,证明了急性酒精性肝损伤小鼠模型的成功建立。本研究所涉及的造模方法操作简单,动物饲养成本低,造模时间短,可为后续研究酒精性肝病的发病机制和护肝药物的保护作用提供一种较理想的造模方案。

参考文献:

- [1] 张鸿,袁乐媛,王炳元. 酒精性肝病与代谢综合征[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(8): 826-829.
- [2] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 药品评价, 2007, 4(2): 74-76.
- [3] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 151-171.
- [4] 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.