刘梦佳,连奕琪,吕翼. 酒精性肝病动物模型的研究现状及展望 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 955-962.

Liu MJ, Lian YQ, Lyu Y. Research status and prospect of animal models of alcoholic liver disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 955-962.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.07.015

酒精性肝病动物模型的研究现状及展望

刘梦佳,连奕琪,吕翼*

(福建师范大学生命科学学院,福建省发育与神经生物重点实验室,福州 350117)

【摘要】 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由长期大量饮酒导致的一类广谱性疾病,包括酒精性脂肪肝、肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌等,严重损害人民身体健康并给社会带来巨大的经济负担。随着研究的不断深入,对ALD的发病机制具有一定了解,然而至今临床上治疗ALD的手段仍然十分有限。一个合适的ALD动物模型对于识别ALD发病机制、寻找有效的治疗靶点、评价相关药物的治疗效果等都具有重要的意义。本文梳理了目前ALD动物模型的研究和发展现状,对相关模型的建模思路、特点和局限性进行介绍,并探讨了相关新的建模思路,以为科研工作者建立合适的ALD动物模型提供参考。

【关键词】 酒精性肝病;动物模型;肝炎症

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)07-0955-08

Research status and prospect of animal models of alcoholic liver disease

LIU Mengjia, LIAN Yiqi, LYU Yi*

(School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fujian Key Laboratory of Developmental and Neurobiology, Fuzhou 350117, China)

Corresponding author: LYU Yi. E-mail: lvyi@fjnu.edu.cn

【Abstract】 Alcoholic liver disease (ALD) is a broad-spectrum disease caused by long-term heavy drinking, including alcoholic fatty liver, hepatitis, liver fibrosis, cirrhosis, and liver cancer. With the development of research, we have a certain understanding of the pathogenesis of ALD, but clinical treatment of ALD remains very limited. An appropriate ALD animal model is of great significance to elucidate ALD pathogenesis by seeking effective therapeutic targets and evaluating the therapeutic effects of related drugs. This review discusses the current research and development status of ALD animal models, introduces the modeling ideas, characteristics, and limitations of related models, and reviews the relevant new modeling ideas to provide a reference for researchers to establish appropriate ALD animal models.

【Keywords】 alcoholic liver disease; animal model; hepatitis

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

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是一类由于长期大量饮酒导致的肝代谢疾病,它严重危害人民的身体健康并给社会生活带来巨大的经济负担^[1-2]。随着人民生活水平的提高和生活方式的改变,我国嗜酒者的比率在逐年上升,酒精已成为

继病毒后导致肝损伤的第二大病因^[3]。ALD早期主要呈现的病理改变是肝细胞内发生脂肪变性,如不干预则进一步会发展成肝炎、肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌^[4-5],酒精已然成为威胁我国公共健康的重要因素之一。除此之外,饮酒导致的医疗消费也

【基金项目】 福建省基金青年创新项目(2021J05038),国家自然科学基金(81900535)。

Funded by the Youth Innovation Project of Fujian Province(2021J05038), National Natural Science Foundation of China(81900535)。

【作者简介】 刘梦佳(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:酒精性脂肪肝发病机制研究。Email:894201865@qq.com

【通信作者】 吕翼(1989—),男,副教授,研究方向:肝代谢相关疾病研究。Email: lvyi@fjnu.edu.cn

给患者家庭带来了巨大的经济负担。ALD 患者根据病情的严重程度每人每月所需的治疗费用为 500 ~ 10 000 元^[6]。虽然早期的 ALD 患者可以通过戒酒使病情得以改善甚至逆转,但对于中晚期患者目前临床上仍没有治疗的特效药物,而对于肝硬化晚期的患者,唯一行之有效的治疗手段则是肝移植,但是目前肝源的短缺及肝移植的昂贵费用严重制约着手术的开展^[7-8]。肝是一个“沉默”的器官,由于缺乏痛觉神经以及代偿功能强大,在 ALD 早期往往不会出现明显的疼痛感以及肝功能失常的症状。这就使得 ALD 在发现时就往往已经处于疾病的晚期阶段,从而引发一系列的并发症并造成高死亡率。2015 年我国约 16 万人死于酒精相关终末期肝病,其中约 3 万人死于酒精性肝硬化,约 13 万人死于酒精相关肝癌^[9-10]。另外根据世界卫生组织 2016 年的调查数据显示,每年由于饮酒导致的相关死亡人数为 300 多万,占全球所有死亡人数的 5.3%^[11]。由此可见酒精对人体的毒害作用不容小觑,开发早期诊断标志物来评估个体对 ALD 的易感性以及研究出新的、有效的 ALD 治疗药物或治疗措施是目前亟待解决的问题。

近些年随着现代分子生物学及基因组学的发展,对 ALD 发病机制也有了进一步的认识^[12]。然而到目前为止尚未开发出确切的早期诊断工具,也还未成功研发出预防和有效治疗 ALD 的特效药物,形成这一局面的部分原因是目前的动物模型还不够完善。一个行之有效的动物模型不仅可以用来研究 ALD 不同阶段的发病机制,还能提高发现新的治疗靶点的机率,也能加深对于酒精性肝损伤的认识。而目前已知的酒精肝模型,没有一个模型可以概括人类 ALD 的整个进程,这严重制约着对 ALD 的认识及研究进展^[13]。本文综述不同影响因素对 ALD 动物模型建模的影响和目前常见 ALD 模型的优缺点,并根据目前最新的研究进展提出相应的建模思路,以期能更好地完善和补充 ALD 动物模型的病程涵盖范围,为该领域的发展提供借鉴。

1 影响因素

早在 20 世纪 50 年代研究者就开始使用啮齿类动物和灵长类动物作为动物模型来研究 ALD^[14]。灵长类动物与人类的 ALD 的病理阶段非常相似,是公认的研究 ALD 最理想的模型。但是由于伦理问题以及目前对灵长类动物使用的严格管控和成本

等阻止了灵长类动物被广泛应用于 ALD 的研究。因此,目前研究 ALD 首选动物仍是啮齿类动物,但实际上有很多因素会影响到啮齿类模型的建成,如品种、性别、年龄等。接下来本文将从以下几个方面对建模的影响因素进行具体的综述。

1.1 品种

研究发现与西方国家的人相比,亚洲国家的人乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)的活性普遍较低,因此在同样的饮酒情况下,亚洲人的肝更容易受到酒精的毒害^[15]。同样,酒精对不同品系鼠的肝造成的损伤也具有显著性差异。转氨酶是肝细胞损伤的敏感标志^[16]。ICR 小鼠灌胃 1 次体积分数为 50% 的乙醇溶液(14 mL/kg),处死后发现血液中丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)及天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)含量与空白对照组相比提高了 1 倍^[17]。以同样的方式给予 129/Sv 小鼠体积分数为 30% 的乙醇溶液(6 g/kg)灌胃处理后,与空白对照组相比 ALT、AST 含量提高了 4 倍^[18]。而同样的处理只能引起 C57BL/6 小鼠血液中 ALT 和 AST 轻度升高^[19]。而在大鼠中,与对照组相比,使用 40% 的乙醇溶液(8 g/kg)灌胃的雄性 Wistar 大鼠和使用 52% 乙醇溶液(8 g/kg)灌胃的雄性 SD 大鼠处死后血液中升高的转氨酶的倍数几乎相同^[20-21]。说明不同品系的大、小鼠对酒精的耐受程度是不同的,有些品系的大、小鼠在较低浓度的酒精作用下就能产生的明显的肝损伤,而有些品系的大、小鼠则需要更高的酒精浓度。在建模前从品种、期望性状、实验结果出发对不同品系的小鼠进行筛选是必要之举。如 ICR 小鼠生长繁殖快,对环境的适应性和疾病的抵抗力强,可以用此品系的小鼠进行相关药物的开发。C57BL/6J 小鼠嗜酒精性高,对酒精耐受强,如果要建立长期模型适宜选用此品系的小鼠来建模。

1.2 年龄

随着年龄的增大,人类的肝结构、肝窦及功能发生改变,造成肝功能下降,导致了一系列与年龄有关的肝病的发展^[22]。越来越多的证据表明酗酒者患酒精性肝病的风险与其年龄大小有关^[23]。研究发现在啮齿动物中也存在相同的患病趋势。当分别以 C57BL/6 老年小鼠(> 16 个月)、中年小鼠(12 ~ 14 个月)、青年小鼠(8 ~ 12 周)为实验对象来探究年龄与酒精性肝损伤之间的关系时,发现在同样的喂养模式下,与青年小鼠相比,老年小鼠血

清中转氨酶的含量更高、脂肪变性更严重、并且观察到明显的肝中性粒细胞浸润以及纤维化^[24]。而当加大剂量和延长喂养周期时,老年小鼠的肝呈现典型的酒精性肝纤维化改变,而中年小鼠只是增加了纤维化反应有关的 mRNA 的表达,并没有肝纤维化发生^[25]。这些都说明在相同的喂养条件下老年小鼠的炎症程度更深,并且随着喂养周期的延长,老年小鼠的疾病进程更容易向纤维化发展。虽然老年小鼠很容易诱发肝炎症及肝纤维化,但是随着年龄的增大,小鼠自身的身体状况对建模也会有很大的影响,因此在建模时选择合适年龄的小鼠是一个十分重要的问题。

1.3 性别

随着女性社会地位的提升,女性的饮酒比例逐年上升,而对于同样的饮酒量,女性患酒精肝的风险却高于男性^[26]。在一些小鼠中实验也发现雄性小鼠似乎比雌性小鼠更能抵抗乙醇喂养引起的肝损伤。众所周知,慢性+狂饮的饮酒模式会导致显著的肝损伤,采用此种模式喂养的 C57BL/6 小鼠雌性小鼠血清中的 ALT 和 AST 水平明显高于雄性小鼠^[27]。对这种现象进行深入研究发现,与喂食相同酒精含量的雌性小鼠相比雄性在应激环境下表达了更多对蛋白质有保护作用的热休克蛋白 27/70,同时对肝细胞有保护作用的 IL-6 信号通路的激活更强,肝细胞增殖加快,这一系列因素减弱了酒精对雄性小鼠肝的损伤,弥补了由于酒精刺激导致的肝细胞的损失,使得雌性小鼠的肝损伤比雄性小鼠的更严重^[28]。另外有研究表明雌激素是 ALD 的辅助致病因子,因为与分泌正常激素水平的雄性小鼠相比,分泌高雌激素和低睾酮的雄性小鼠的肝损伤明显加重。而在日常中无论酒精摄入量如何,雄性小鼠的血清雌激素水平总是低于雌性小鼠,也就导致雌性鼠的肝损伤易感性更强^[29]。不同性别小鼠的生理情况不同,激素分泌水平也有所区别,而且小鼠的肝重量在性别之间也存在明显差异^[30]。尽管更明确的影响因素还不确定,但是就目前的研究发现而言,雌鼠对 ALD 的易感性更强,因此在选择小鼠来研究乙醇诱导的肝损伤时要注意考虑性别的影响。

1.4 酒精性饮料类型

随着生活水平的提高,人们日常生活中可获取的酒精饮品的类型也越来越丰富多样,常见的有白酒、葡萄酒、黄酒、啤酒等。饮用不同类型的酒精饮料对人体的伤害有着不同的差异,如在摄入相同酒

精的情况下,葡萄酒饮用者患肝硬化的风险低于白酒和啤酒饮用者^[31]。这是因为葡萄酒中的非酒精成分具有抗氧化的特性,从而降低酒精对肝的损伤^[32-33]。在小鼠中控制酒精的摄入量相同,分别喂食啤酒(酒精浓度 $\geq 5\%$ vol)、黄酒(酒精浓度 $\geq 10\%$ vol)、红葡萄酒(酒精浓度 $\geq 12.5\%$ vol)和白酒(酒精浓度 $\geq 56\%$ vol),发现白酒组小鼠肝脂肪样变和气球样变最为严重,啤酒组最轻,并且白酒组还出现了严重的肝细胞坏死^[34]。表明在饮用相同量的酒精的情况下高浓度的酒精饮料对肝的伤害更大。这可能是因为大量低浓度的酒精饮料在代谢过程中是水和酒精一起代谢的,当血容量扩增时,血液中的酒精浓度偏低,在产生相同乙醇脱氢酶和 ALDH 的情况下,酒精代谢得更彻底,所以对肝的危害更小。研究者在选择酒精饮料造模时要根据 ALD 不同阶段的情况和实验条件选择合适浓度的酒精饮料,以达到最佳的造模效果。

1.5 饮食

除了上述几种影响因素外,还有很多其他因素也会影响建模的效果,如饮食、饮酒方式等,饮酒方式会在下文详细探讨,对于饮食来说,饮食中微量元素的缺乏、高脂食物等会一定程度的影响酒精性肝病的发生进程。如锌的缺乏通过损害肠道屏障,使肝中内毒素含量升高,诱导一系列炎症因子的产生最终引发肝炎症^[35]。而微量元素镁缺乏也会加剧酒精诱导的肝损伤^[36]。高脂饮食会增加肥胖的机率,并且与非高脂饮食的酒精小鼠相比,高脂饮食的酒精小鼠血清 ALT 水平更高,增加了患脂肪性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的风险^[37-38]。另外胆碱具有促进脂肪代谢和降低血清中胆固醇的作用,喂食缺乏胆碱的饮食会使得大鼠出现一定程度的脂肪变性,若进一步反复暴饮酒精则会引发肝纤维化^[39]。所以,研究者在建模时要提供足量的营养支持,并且要平衡好各组动物的摄入热量,以防出现建模不理想的情况。

2 典型建模方式

研究表明,饮酒方式显著影响人类酒精性肝病的发病机制,酒精摄取的剂量以及持续时间会影响酒精性肝病的严重程度。目前应用广泛的喂养模型有急性酒精灌胃模型、慢性酒精喂养模型、慢性+暴饮模型、胃内灌注模型以及“二次打击”模型(见表 1)。

表 1 酒精性肝病动物模型

Table 1 Summary of experimental models of alcoholic liver disease

模型 Model	特点 Characteristic	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 Reference
急性酒精灌胃模型 Acute binge ethanol feeding model	高血液酒精浓度 High BCA level 血清转氨酶轻度升高 Mild elevation of serum ALT, AST 轻度脂肪变性 Mild steatosis	容易操作 Easy to perform 喂养周期短 Short term feeding 可以区分急性肝损伤和慢性肝损伤 Distinguish acute liver injury from chronic liver injury	只停留在 ALD 早期阶段 Stay only in the early stage of ALD	[18,40-41]
慢性酒精喂养模型 Chronic ethanol feeding model	ALT 水平显著提高 Marked elevation of ALT 轻度脂肪变性 Mild steatosis	容易操作 Easy to perform 低死亡率 Low mortality rate	无肝纤维化发生 No liver fibrosis	[19,35,42-43]
慢性 + 暴饮模型 Chronic-Plus-Binge model (NIAAA Model)	ALT 水平和脂肪变性显著增加 Marked elevation of ALT and steatosis 中等水平的肝炎和肝中性粒细胞浸润增加 Moderate liver inflammation Increase hepatic neutrophil infiltration	容易操作 Easy to perform 成本低 Cost efficient	长期喂养和多次灌胃会增加致死率 Long-term feeding plus multiple binges with a high mortality rate	[19,44-45]
胃内灌注模型 Intragastric infusion (IG) model (Tsukamoto-french model)	中等程度的肝纤维化 Moderate liver fibrosis ALT 水平和脂肪变性显著增加 Marked elevation of ALT and steatosis	可控性强 High controllability	操作难 Difficult to perform 需要严格的术后护理 Requirement for intensive medical care 成本高 High cost	[46-47]
“二次打击”模型 “Second hit” model	显著的肝炎 Marked liver inflammation 显著的肝纤维化 Marked liver fibrosis	容易操作 Easy to perform	存在非酒精因素 Exist role of nonalcoholic factors	[48-51]

2.1 急性酒精灌胃模型

为了克服小鼠天生对酒精的厌恶,研究者开发了一个酒精灌胃模型,直接给小鼠进行一定剂量的酒精灌胃。此方法可导致小鼠体内血液酒精浓度(blood alcohol concentration, BAC)水平逐渐升高^[40]。给小鼠进行一次 30% 的酒精(6 g/kg)灌胃,1.5 h 后发现与对照组相比,酒精组小鼠 BAC 增加了 4 倍多,内毒素水平增加了 6 倍,肝细胞轻度坏死^[18,41]。当给小鼠进行 3 次酒精灌胃时,小鼠肝出现明显的泡状脂滴聚集并伴随炎症灶的产生^[52]。急性酒精灌胃模型可以模拟没有饮酒史的人群一次暴饮后酒精对肝的损伤,以及辨别急性肝损伤与慢性肝损伤的区别。该模型因为造模时间短,操作简单,在研究酒精性肝损伤的相关药物方面有很大的应用空间。但是该模型的缺点也是显而易见的,只能引起血清中 AST、ALT 轻微升高以及轻度的脂肪变性,不能模拟更严重的肝损伤形式。

2.2 慢性酒精喂养模型

目前应用最多的慢性酒精喂养模型是由科学

家 Lieber 等^[53]创立的 Lieber-DeCarli 液体饮食模型。用加工成粉末的饲料加水勾兑成液体饲料,对于酒精组小鼠来说则是在液体饲料中添加一定浓度的酒精,让小鼠每天有一定量的酒精摄入。这个模型很好的模仿了人类慢性饮酒的模式。10 d 酒精饲料喂养,能引起小鼠血清 ALT 和 AST 轻度升高,但是差异不显著^[19]。而当慢性酒精喂养延长到 4 周时,小鼠肝出现了明显的脂肪聚集,还伴有微囊泡和大囊泡脂肪变性,血清中 ALT 和 AST 显著升高^[42-43]。有趣的是,当这种喂养延长到 16 周时,通过组织切片可以观察到酒精组小鼠肝内有大量脂滴聚集,肝中甘油三酯(triglyceride, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)的含量是对照组的 4 倍^[35]。该模型可以规避小鼠天生对酒精的厌恶情况,并且小鼠死亡率低、操作简单,同时可以发现随着酒精饲养时间的延长肝的损伤也越来越严重。但是可能因为小鼠的摄食时间长,该模型只是停留在 ALD 的早期,只会导致轻微的脂肪变性以及少量的炎症而更严重的纤维化则没有出现。

2.3 慢性 + 暴饮模型

前人的研究已经揭示慢性酒精摄入或急性重复狂饮只会导致肝轻微脂肪变性。但是大多数因肝病住院的患者都是近期有暴饮现象的酗酒者,这类饮酒模式是进一步增加肝损伤的诱因。高斌团队开发出的慢性 + 暴饮模型也即 Gao-binge 模型很巧妙的模拟的这类饮酒模式^[54]。笔者团队先前的研究发现,10 d 慢性饮酒 + 一次暴饮可以给小鼠肝造成典型的损伤如:显著升高的血清转氨酶水平、TG 水平、TC 水平等^[55],这与 Shukla 等^[44]的实验结果是一致的。另外在 4 周的慢性饮酒 + 2 周的酒精灌胃模型中,小鼠的肝小叶中心静脉周围出现明显的脂滴聚集和炎性细胞浸润^[56]。而肝内炎性细胞浸润是肝炎的一个显著临床特征,与酒精性肝炎的发生密切相关^[45,57]。当将慢性乙醇喂养期延长至 8 ~ 12 周,并也加上单剂量或者多剂量乙醇灌胃后发现该模型引起更严重的酒精性脂肪肝炎 (alcoholic steatohepatitis, ASH) 和轻度肝纤维化^[19]。该模型是结合 Lieber-DeCarli 液体饮食模型和口服灌胃模型来模拟大多数肝病患者的饮酒模式,它不仅操作简单,而且还能够诱导产生更高水平的脂肪变性、血清 ALT 和肝炎症反应,在 ALD 发病机制及新的治疗靶点的开发中得到广泛的应用。

2.4 胃内灌注模型

胃内灌注模型是 T-sukamoto-French 开发的一种通过手术在胃内插管直接输注的喂养模式,也称 TF 模型^[58]。这个模型需要在鼠的颈后部和腹中部各做一个皮肤切口,导管从颈后部的皮肤切口进入,插进前胃,通过导管来控制鼠的酒精摄入^[16]。该模型可以通过导管随意控制食物的种类和含量,以创建所需的肝损伤模型。研究表明在灌注 4 周时就能出现高水平的酒精中毒,表现为 BCA 的含量达到 350 mg/dL,有的甚至超过 400 mg/dL^[46]。如果加大酒精的摄入量并联合高脂饮食培养,大鼠在 4 周内就会开始出现肝纤维化,当培养到 16 周时所有的实验大鼠都能观察到肝纤维化^[47]。若在该情况下继续在食物中添加羰基铁,有少数大鼠则会发展为肝硬化^[59]。虽然 TF 模型可以通过导管使体内保持较高的酒精含量以及更改食物参数从而产生一系列肝损伤,如肝脂肪变性、肝硬化等,但是建立该模型需要很高的人力和物力成本,如高超的手术操作能力、严格的术后护理,以防止鼠在建模初期因感染致死,另外在造模过程中也要密切监测鼠的

健康状况以及生理体征。这些严苛的条件限制了该模型的广泛运用。

2.5 “二次打击”模型

大多数研究表明,单纯的酒精诱导只能诱发肝脂肪变性或者轻度的肝炎,而对于更严重的肝炎或是肝纤维化都不能用单纯的慢性酒精来诱导。因此有研究者开发了二次打击模型,即在酒精诱发肝产生一定损伤后,再次引入另外一种因素来达到加速肝损伤的目的^[60]。四氯化碳单独作用不能引发肝纤维化,但当它和酒精联合使用时可以引发明显的肝纤维化以及中度炎症,并且该模型与人的酒精性肝纤维化和炎症的关系模式基本相似^[48,50-51]。另外,小鼠以高脂 + 急性酒精暴食的方式喂养 3 d 就会导致肝损伤以及观察到中性粒细胞浸润,当这个喂养时长延长至 3 个月时则会引发严重的脂肪性肝炎^[49]。除了以上因素外还可以通过注射脂多糖、喂食缺乏胆碱的饮食等来获得更严重的肝损伤模型^[39,61-62]。概括来说,“二次打击”模型可以很容易的诱发肝炎和肝纤维化,但是其局限性也很明显,因为它存在非酒精性因素,所以所取得的结果可能与单纯酒精诱导的病变有所不同,对其病变机制的阐述也应更加谨慎。

3 新型建模方式

随着科学技术的发展,基因编辑已经成为建立人类疾病动物模型的重要手段,研究者可以通过向动物添加外源基因信息或者敲除某些内源基因以达到促进或抑制某些疾病相关基因表达的作用。过表达细胞色素 P450 酶 1 (cytochrome P450E1, CYP2E1) 基因的酒精小鼠体内与细胞结构和重组有关的基因表达增多(如角蛋白 8,细胞角蛋白 8 是 Mallory 小体中的主要角蛋白之一,它体现着酒精性肝病和酒精性肝炎的特征^[63])而与代谢相关的基因表达减少(如胆固醇代谢),并且还能观察到炎症灶^[64]。这说明过表达 CYP2E1 会加重肝损伤,如果要达到治疗 ALD 的目的或许可以从抑制该基因表达或者敲除其入手。另外对表观遗传调节因子去乙酰化酶 6 (sirtuin 6, SIRT6) 基因进行修饰,发现 SIRT6 敲除的酒精小鼠出现严重的肝损伤,尤其是氧化应激和炎症显著增加。同时与酒精性肝炎患者一样,EF-Sirt6 KO (ethanol-fed sirt6 knockout) 小鼠肝中金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 1 和 2 基因表达下调。当进一步在肝中过表达 Mt1 则发现可以显

著改善 Sirt6 KO 小鼠由于酒精导致的肝损伤。而在肝中过表达 SIRT6 也会出现与过表达 Mt1 同样的现象,这表明 Sirt6 及 Mt1 和 Mt2 的表达增强了肝防御系统对酒精毒性的抵抗力^[65]。在未来 SIRT6 很可能成为酒精肝的一个有效的治疗靶点。基因编辑模型运用基因编辑技术不仅可以针对实验动物全身进行基因编辑,也能特异性的针对某个组织、器官进行编辑,从而高效的对 ALD 进行研究,精准的掌握 ALD 的发病机制以及相关代谢通路,为寻找新的治疗靶点提供新途径。而它的缺点在于不能预见相关基因的敲除或过表达是否会对实验动物产生致命性伤害,如早死、胚胎致死等。

4 未来可能的建模方向

慢性 + 暴饮模型可以很好的建立 ASH 模型,引发严重的中性粒细胞浸润。而 ASH 患者的严重程度和死亡率与中性粒细胞浸润程度显著相关。在酒精处理的小鼠中,肝细胞和肝星状细胞会产生大量趋化因子配体 1 (chemokines 1, CXCL1)^[66]。CXCL1 是中性粒细胞募集趋化因子,它通过趋化因子受体 2 促进中性粒细胞渗入肝,增加肝中性粒细胞浸润,加剧肝损伤。Hwang 等^[67] 在高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 喂养的小鼠肝中过表达 CXCL1,发现过表达小鼠肝中性粒细胞浸润增加,并且促进了脂肪变性到非酒精性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 这一进程,而正常饲料喂养的 CXCL1 肝过表达小鼠可能因为缺乏脂肪变性和纤维化并没有产生 NASH 表型。另外在 HFD-CXCL1 肝过表达小鼠中还发现了与人类同源的 48 个炎症和纤维化基因表达的上调,这种建模方式完整的模拟了人类 NASH 的表达谱。未来也许可通过 EtOH-CXCL1 肝过表达来建立酒精性肝炎模型,从而完整模拟人类 ASH 的表达谱和寻找潜在的治疗靶点。

5 总结与展望

综上所述,小鼠的品种、年龄、性别、饮用酒精的类型对酒精性肝损伤有不同程度的影响,今后设计和解释酒精性肝病动物模型时应考虑这些因素以选择到合适的小鼠品种^[68]。小鼠以不同方式摄入酒精会对肝产生不同程度的损伤,每种模式都有其优点和局限性,根据实验的需求选择合适的喂养模型会给实验进程带来事半功倍的效果。需要注意的是啮齿类动物和人类在生理学和病理学方面

存在明显的物种差异,如啮齿类动物酒精分解速度是人类的 5 倍、啮齿类动物更能抵抗内毒素带来的炎症反应等,如果要达到与人类相同的肝损伤可能需要更大的酒精刺激,所以不能直接将小鼠的结果转换成人类的结果^[69]。

不同模型以其自身的特点应用于不同程度和不同阶段的 ALD 的研究,是 ALD 的发病机制、诊断、预后、标志物和治疗靶点的有力研究工具。目前已经建立的 ALD 动物模型还不能复制人类 ALD 全谱,而晚期 ALD 如纤维化和肝硬化也不能仅仅通过酒精来诱导,需要通过继发性的损伤才能实现,所以我们还需要改进和开发新的 ALD 模型,从而在更大相关程度上模拟人类的 ALD 谱^[70]。

参 考 文 献 (References)

- [1] Tan HK, Yates E, Lilly K, et al. Oxidative stress in alcohol-related liver disease [J]. World J Hepatol, 2020, 12(7): 332-349.
- [2] Ghosh Dastidar S, Warner JB, Warner DR, et al. Rodent models of alcoholic liver disease: role of binge ethanol administration [J]. Biomolecules, 2018, 8(1): 3.
- [3] 刘国涛, 朱玉翠, 张涛, 等. 酒精性肝病研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(15): 1382-1388.
Liu GT, Zhu YC, Zhang T, et al. Advances in research of alcoholic liver disease [J]. World Chin J Dig, 2017, 25(15): 1382-1388.
- [4] Ginès P, Krag A, Abraldes JG, et al. Liver cirrhosis [J]. Lancet, 2021, 398(10308): 1359-1376.
- [5] 易旭, 游绍伟, 龙毅, 等. 自拟葛花解酒汤脂汤对酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂肪沉积及 PXR 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 36-42.
Yi X, You SW, Long Y, et al. Effect of Gehua Jiejue Dizhi Decoction on the liver fatty deposition and expression of PXR in themousealcoholic fatty liver [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(3): 36-42.
- [6] Ndugga N, Lightbourne TG, Javaherian K, et al. Disparities between research attention and burden in liver diseases: implications on uneven advances in pharmacological therapies in Europe and the USA [J]. BMJ Open, 2017, 7(3): e013620.
- [7] Sousa Da Silva RX, Weber A, Dutkowski P, et al. Machine perfusion in liver transplantation [J]. Hepatology, 2022, 76(5): 1531-1549.
- [8] Duan Y, Llorente C, Lang S, et al. Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease [J]. Nature, 2019, 575(7783): 505-511.
- [9] Stein E, Cruz-Lemini M, Altamirano J, et al. Heavy daily alcohol intake at the population level predicts the weight of alcohol in cirrhosis burden worldwide [J]. J Hepatol, 2016, 65(5): 998-1005.
- [10] Sarin SK, Kumar M, Eslam M, et al. Liver diseases in the asia-pacific region: a lancet gastroenterology & hepatology commission

- [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(2): 167-228.
- [11] World Health Organization. (2018). Global status report on alcohol and health 2018; executive summary. In Global status report on alcohol and health 2018; Executive summary.
- [12] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1572-1585.
- [13] Xu MJ, Cai Y, Wang H, et al. Fat-specific protein 27/CIDEc promotes development of alcoholic steatohepatitis in mice and humans [J]. Gastroenterology, 2015, 149(4): 1030-1041.
- [14] Lamas-Paz A, Hao F, Nelson LJ, et al. Alcoholic liver disease; utility of animal models [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(45): 5063-5075.
- [15] Eng MY, Luczak SE, Wall TL. ALDH2, ADH1B, and ADH1C genotypes in Asians: a literature review [J]. Alcohol Res Health, 2007, 30(1): 22-27.
- [16] 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.
- [17] 杨柳, 王文地, 马允, 等. 急性酒精性肝损伤模型的考察及验证 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(3): 391-396.
- Yang L, Wang WD, Ma Y, et al. Investigation and verification of acute alcoholic liver injury model [J]. Northwest Pharm J, 2020, 35(3): 391-396.
- [18] Lambert JC, Zhou Z, Wang L, et al. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 305(3): 880-886.
- [19] Bertola A, Park O, Gao B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice; a critical role for E-selectin [J]. Hepatology, 2013, 58(5): 1814-1823.
- [20] 于泓洋, 刘孟奇, 曲仕钊, 等. 美他多辛对酒精性肝病的保护作用 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2022, 43(23): 2209-2212.
- Yu HY, Liu MQ, Qu SZ, et al. Protective effect of metadoxine on alcoholic liver disease [J]. J Qiqihar Med Univ, 2022, 43(23): 2209-2212.
- [21] 杨玲, 周素芳, 路月红, 等. 基于 LPS/TLR4 信号通路探讨酒精性肝病大鼠疾病进展的相关机制 [J]. 医学研究生学报, 2022, 35(1): 35-40.
- Yang L, Zhou SF, Lu YH, et al. The exploration of the mechanism of progression in ALD rats based on LPS/TLR4 signaling pathway [J]. J Med Postgrad, 2022, 35(1): 35-40.
- [22] Maeso-Díaz R, Gracia-Sancho J. Aging and chronic liver disease [J]. Semin Liver Dis, 2020, 40(4): 373-384.
- [23] Kim IH, Kisseleva T, Brenner DA. Aging and liver disease [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2015, 31(3): 184-191.
- [24] Ramirez T, Li YM, Yin S, et al. Aging aggravates alcoholic liver injury and fibrosis in mice by downregulating sirtuin 1 expression [J]. J Hepatol, 2017, 66(3): 601-609.
- [25] 周恒, 李俊, 王华. 酒精性肝病动物模型研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 468-472.
- Zhou H, Li J, Wang H. Animal models of alcohol liver diseases [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(4): 468-472.
- [26] Vatsalya V, Liaquat HB, Ghosh K, et al. A review on the sex differences in organ and system pathology with alcohol drinking [J]. Curr Drug Abuse Rev, 2016, 9(2): 87-92.
- [27] Ki SH, Park O, Zheng M, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3 [J]. Hepatology, 2010, 52(4): 1291-1300.
- [28] Li SQ, Wang P, Wang DM, et al. Molecular mechanism for the influence of gender dimorphism on alcoholic liver injury in mice [J]. Hum Exp Toxicol, 2019, 38(1): 65-81.
- [29] Eagon PK. Alcoholic liver injury: influence of gender and hormones [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(11): 1377-1384.
- [30] Abu-Toamih Atamni HJ, Botzman M, Mott R, et al. Mapping novel genetic loci associated with female liver weight variations using collaborative cross mice [J]. Anim Mod Exp Med, 2018, 1(3): 212-220.
- [31] Grønbaek M, Jensen MK, Johansen D, et al. Intake of beer, wine and spirits and risk of heavy drinking and alcoholic cirrhosis [J]. Biol Res, 2004, 37(2): 195-200.
- [32] Frankel EN, Kanner J, German JB, et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine [J]. Lancet, 1993, 341(8843): 454-457.
- [33] Zhang L, Meng B, Li L, et al. *Boletus aereus* protects against acute alcohol-induced liver damage in the C57BL/6 mouse via regulating the oxidative stress-mediated NF- κ B pathway [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 905-914.
- [34] 何志勇, 黄先菊. 不同种类酒精饮料与小鼠酒精性肝病的关系研究 [J]. 绿色科技, 2019, 14: 214-215, 220.
- He ZY, Huang XJ. Study on the relationship between different kinds of alcoholic beverages and alcoholic liver disease in mice [J]. J Green Sci Technol, 2019, 14: 214-215, 220.
- [35] Kang X, Zhong W, Liu J, et al. Zinc supplementation reverses alcohol-induced steatosis in mice through reactivating hepatocyte nuclear factor-4 α and peroxisome proliferator-activated receptor- α [J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1241-1250.
- [36] Nicoll R, Gerasimidis K, Forrest E. The role of micronutrients in the pathogenesis of alcohol-related liver disease [J]. Alcohol Alcohol, 2022, 57(3): 275-282.
- [37] Naveau S, Dobrin AS, Balian A, et al. Body fat distribution and risk factors for fibrosis in patients with alcoholic liver disease [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2013, 37(2): 332-338.
- [38] Wang Y, Fan Z, Yang M, et al. Protective effects of E Se tea extracts against alcoholic fatty liver disease induced by high fat/alcohol diet: *in vivo* biological evaluation and molecular docking study [J]. Phytomedicine, 2022, 101: 154113.
- [39] Nieto N, Rojkind M. Repeated whiskey binges promote liver injury in rats fed a choline-deficient diet [J]. J Hepatol, 2007, 46(2): 330-339.
- [40] Dille JE, Nicholson ER, Fischer SM, et al. Alcohol drinking

- and blood alcohol concentration revisited [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2018, 42(2): 260–269.
- [41] Wang C, Ma C, Gong L, et al. Macrophage polarization and its role in liver disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 803037.
- [42] Shen Z, Liang X, Rogers CQ, et al. Involvement of adiponectin-SIRT1-AMPK signaling in the protective action of rosiglitazone against alcoholic fatty liver in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298(3): G364-G374.
- [43] Ma Y, Chai H, Ding Q, et al. Hepatic SIRT3 upregulation in response to chronic alcohol consumption contributes to alcoholic liver disease in mice [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1042.
- [44] Shukla SD, Aroor AR, Restrepo R, et al. *In vivo* acute on chronic ethanol effects in liver: a mouse model exhibiting exacerbated injury, altered metabolic and epigenetic responses [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(4): 3280–3294.
- [45] Wang M, Ma LJ, Yang Y, et al. N-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: a critical review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(1): S116-S129.
- [46] Nanji AA, French SW. Animal models of alcoholic liver disease-focus on the intragastric feeding model [J]. *Alcohol Res Health*, 2003, 27(4): 325–330.
- [47] Tsukamoto H, Towner SJ, Ciofalo LM, et al. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet [J]. *Hepatology*, 1986, 6(5): 814–822.
- [48] Brol MJ, Rösch F, Schierwagen R, et al. Combination of CCL₄ with alcoholic and metabolic injuries mimics human liver fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317(2): G182-G194.
- [49] 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.
- [50] 王娟, 杨晶晶, 周仁鹏, 等. 肝纤维化小鼠模型研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(2): 105–110.
- Wang J, Yang JJ, Zhou RP, et al. Current status of research on mice models of liver fibrosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(2): 105–110.
- [51] Abbasnezhad A, Salami F, Mohebbati R. A review: systematic research approach on toxicity model of liver and kidney in laboratory animals [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(5): 436–444.
- [52] Abdelmegeed MA, Banerjee A, Jang S, et al. CYP2E1 potentiates binge alcohol-induced gut leakiness, steatohepatitis, and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 1238–1245.
- [53] Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration [J]. *Hepatology*, 1989, 10(4): 501–510.
- [54] Bertola A, Mathews S, Ki SH, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(3): 627–637.
- [55] Xie F, Zhong Y, Wang D, et al. Metformin protects against ethanol-induced liver triglyceride accumulation by the LKB1/AMPK/ACC pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(8): 7837–7848.
- [56] Gao H, Lv Y, Liu Y, et al. Wolfberry-derived Zeaxanthin dipalmitate attenuates ethanol-induced hepatic damage [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(11): e1801339.
- [57] Im GY. Acute alcoholic hepatitis [J]. *Clin Liver Dis*, 2019, 23(1): 81–98.
- [58] Ueno A, Lazaro R, Wang PY, et al. Mouse intragastric infusion (iG) model [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(4): 771–781.
- [59] Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(1): 620–630.
- [60] Tsukamoto H, Machida K, Dynnyk A, et al. "Second hit" models of alcoholic liver disease [J]. *Semin Liver Dis*, 2009, 29(2), 178–187.
- [61] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73–84.
- [62] Beier JI, Luyendyk JP, Guo L, et al. Fibrin accumulation plays a critical role in the sensitization to lipopolysaccharide-induced liver injury caused by ethanol in mice [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1545–1553.
- [63] Leung TM, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(2): 395–398.
- [64] Butura A, Nilsson K, Morgan K, et al. The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(3): 572–583.
- [65] Kim HG, Huang M, Xin Y, et al. The epigenetic regulator SIRT6 protects the liver from alcohol-induced tissue injury by reducing oxidative stress in mice [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(5): 960–969.
- [66] Roh YS, Zhang B, Loomba R, et al. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309(1): G30-G41.
- [67] Hwang S, He Y, Xiang X, et al. Interleukin-22 ameliorates neutrophil-driven nonalcoholic steatohepatitis through multiple targets [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 412–429.
- [68] Liu SX, Du YC, Zeng T. A mini-review of the rodent models for alcoholic liver disease: shortcomings, application, and future prospects [J]. *Toxicol Res*, 2021, 10(3): 523–530.
- [69] Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 558–577.
- [70] Teschke R. Alcoholic steatohepatitis (ASH) and alcoholic hepatitis (AH): cascade of events, clinical aspects, and pharmacotherapy options [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19(8): 779–793.