

## 三种小鼠酒精性肝病短期模型的评价

张译文, 李昱锦, 胡冰芳, 黄 民\*

(中山大学药学院, 临床药理研究所, 广东 广州 510006)

**摘要:** 酒精性肝病分为脂肪肝、脂肪型肝炎、肝纤维化和肝硬化; 严重情况下会发展成肝癌, 如今已经成为继病毒性肝炎之后我国第二大肝病。目前, 针对上述疾病的动物模型较为繁杂, 诱导指标单一, 且与临床指标有较大差异。其中, 有 3 种短期模型应用较为普遍, 分别为酒精灌胃诱导的急性肝损伤、短期液体饲料诱导的脂肪型肝炎 (Gao-binge 模型) 及酒精液体饲料联合四氯化碳注射诱导的肝纤维化模型。在本研究中, 充分讨论了上述 3 种短期模型的病理指标, 并根据参考文献和临床数据对其进行有效评价。结果发现, 所有模型的造模组肝重比均明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 病理切片证实造模组有空泡样病变和脂质沉积。然而, 对血清生化指标和炎症因子的诱导程度有较大差异。在急性肝损伤模型中, 肝脏 *IL-6* 和 *CCL2* 的 mRNA 水平大幅下调 ( $P < 0.05$ ), 与单次过量饮酒患者的全血基因表达结果相似, 而血清生化指标无变化趋势。Gao-binge 模型中, 造模组血清 ALT、AST 和 TG 水平显著上升 ( $P < 0.05$ ), 肝脏 TG 含量、*IL-6* 和 *CCL2* 的 mRNA 表达水平也明显上调 ( $P < 0.05$ ), 与临床脂肪型肝炎患者的病理指标一致。在肝纤维化模型中, 除造模组出现明显的汇管区纤维化和少量脂滴聚集外, 血清生化指标和炎症水平均无显著性变化。综上, 3 种动物模型代表了酒精性肝病的各个阶段。其中, Gao-binge 模型的建模方法相对简单, 得到的指标较为全面, 且与临床指标变化趋势相似, 有可能成为研究酒精性肝病的理想动物模型。此外, 本研究还发现 *CCL2* 在酒精性肝病的不同阶段基因表达水平不同, 能较好地区分各阶段酒精性肝病, 可作为潜在生物标记物。

**关键词:** 酒精性肝病; CC 族趋化因子 2; 白介素 6

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 02-0236-08

## Evaluation on three short-term animal models of alcoholic liver disease

ZHANG Yi-wen, LI Yu-jin, HU Bing-fang, HUANG Min\*

(Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Alcoholic liver disease (ALD) includes a spectrum of disorders ranging from asymptomatic steatosis, alcoholic steatohepatitis (ASH), fibrosis and cirrhosis. According to epidemical statistics, ALD has been ranked as the second major cause of liver diseases in China. Many animal models have been made in the study of potential therapies. However, in most of the models, the pathological changes are not always consistent with those in patients. There are three widely used short-term animal models of ALD: the acute alcoholic liver injury model, Gao-binge steatohepatitis model and  $\text{CCl}_4$ -alcohol diet induced liver fibrosis model. In this study, we evaluated the pathological responses of these models and compared the responses with the clinical parameters. The liver/body weight ratio was increased and liver histological lesions were induced in alcoholic groups in the three models, while the levels of biochemical parameters and inflammatory factors were affected by different type of treatments. In the acute alcoholic model, the mRNA levels of interleukin-6

收稿日期: 2017-09-07; 修回日期: 2017-11-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81320108027); 高等学校学科创新引智计划 (111 计划) 资助项目 (B16047).

\*通讯作者 Tel: 86-20-39943011, E-mail: huangmin@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0885

(*IL-6*) and C-C motif chemokine receptor-2 (*CCL2*) were surprisingly decreased, which was consistent with the transcriptome profile in patients ( $P < 0.05$ ), but the serum ALT and AST level, were not changed. In Gao-binge model, both AST/ALT and triglyceride levels were significantly induced by alcoholic consumption ( $P < 0.05$ ), along with the gene expression levels of hepatic *IL-6* and *CCL2* ( $P < 0.05$ ). These data were similar in tendency to the pathological indicators of hepatitis patients. In liver fibrosis model, although histological section indicated obvious fibrotic lesion and little lipid accumulations, other indexes were barely changed. In conclusion, the Gao-binge model induced similar pathological patterns to those of steatohepatitis patients. Gao-binge model might be ideal for study of ALD, especially alcoholic steatohepatitis. In addition, we also found that hepatic gene expression of *CCL2* was impacted differently at various stages of ALDs, which can be considered as a potential biomarker.

**Key words:** alcoholic liver disease; C-C motif chemokine receptor-2; interleukin-6

酒精性肝病 (alcohol liver disease, ALD) 是由过量酒精摄取导致的肝脏损伤, 包括酒精性脂肪肝 (alcoholic fatty liver, AFL)、酒精性肝炎 (alcohol hepatitis, AH) 和肝纤维化/硬化 (alcoholic hepatic fibrosis/cirrhosis, AHF/AC) 等<sup>[1]</sup>, 在临床中常合并存在。研究发现, 90% 以上酗酒者易患脂肪肝, 其中 10%~35% 将发展为酒精性肝炎, 约 8%~20% 的慢性嗜酒者会进一步发展为肝硬化, 严重情况下会演变为肝癌<sup>[1]</sup>。随着酒精生产工艺的简化和普及, 人类对酒精的摄取量不断增加, 由饮酒引发的健康问题也日益严峻。至 2009 年, 由饮酒导致的死亡人数占全球死亡人数总量的 3.8%<sup>[2]</sup>。2013 年, 中国成为仅次于英国的第二饮酒大国<sup>[3]</sup>。北京 302 医院统计, 在 2002~2013 年间, 医院接收的酒精性肝病患者 (7 422) 占有肝病总人数 (188 902) 的 3.93%, 酒精性肝病患者的住院率也由 1.68% (2002 年) 增至 4.59% (2013 年)。其中, 严重酒精性肝炎的患病率以 2.4 倍/年的速度不断攀升<sup>[4]</sup>, 其 90 天及 1 年内死亡率分别高达 29% 和 56%<sup>[5]</sup>。目前, 临床缺乏针对性的治疗药物及方法, 多采用戒酒、营养支持、抗炎保肝药物改善患者肝脏生化指标、糖皮质激素改善重症酒精性肝炎患者的生存率<sup>[5]</sup>、抗肝纤维化药物阻止细胞外基质沉积或促进其降解等措施<sup>[6-8]</sup>, 而这些被动治疗手段存在疗效较差及不良反应等较多问题。因此, 探讨 ALD 的发病机制并寻找有效治疗手段一直是该领域的研究热点。

迄今为止, 研究者们多集中于探讨酒精性肝病的发病机制; 虽然许多假说被提出, 但其系统性认知尚未完全构建。如何高效模拟人类酒精性肝病的动物模型具有十分重要的研究价值与临床意义。目前普遍使用的短期动物模型包括急性酒精灌胃模型、Gao-binge 模型和酒精液体饲料联合四氯化碳注射诱导的肝纤维化模型等。上述模型分别代表酒精性肝病

的不同发病阶段。综上, 本研究将结合临床诊断标准与芯片数据, 着重探讨各模型诱导指标与临床数据的切合度及相对优势。

*CCL2* (C-C motif chemokine receptor-2), 又称单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1), 是趋化因子家族的成员。单核细胞、巨噬细胞和肝星状细胞经多种生化因子刺激后, 均可分泌 *CCL2*<sup>[9, 10]</sup>。研究表明, *CCL2* 在酒精性肝病患者血浆中的 mRNA 和蛋白表达水平均显著增高<sup>[11]</sup>, 并在酒精诱导的肝脏炎症、脂质沉积中发挥重要的病理作用<sup>[12]</sup>。但是在酒精性肝病各阶段的动物模型中, *CCL2* 的变化趋势报道较少。*CCL2* 能否成为潜在的生物标记物仍然未有定论。

综上, 本研究结合临床诊断标准与芯片数据, 对 3 种较为普遍的酒精性肝病短期模型进行探讨, 筛选出建模方便、较为高效的动物模型并探索 *CCL2* 在各阶段酒精性肝病作为潜在生物标记物的可能性。

## 材料与方法

**药物与主要试剂** 四氯化碳, 由天津市科密欧化学试剂有限公司提供; 乙醇, 购于美国 Burdick & Jackson 公司; Lieber-DeCarli 液体饲料和糊精, 由南通特罗菲饲料科技有限公司提供; 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 试剂盒、甘油三脂 (triglyceride TG) 试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所; RT 试剂盒、SYBR Premix EX TaqTM, 购于日本 Takara 公司。

**动物** C57BL/6J 小鼠, 雄性, 8~10 周, 体重 24~26 g, 中山大学东校区实验动物中心 [SCXK (粤) 2011-0029] 提供, SPF 级。

**主要仪器** 5417-R 低温高速离心机、梯度 PCR 仪, 德国 Eppendderf 公司。Multiskan Go 多功能酶标

仪, 美国 Thermo Fisher 公司。METTLER AE260 电子天平, 美国 METTLER TOLEDO 公司。7500 Real Time PCR System, 美国 Applied Biosystems 公司。Mini-protein3 电泳系统、Mini Trans-Blot 转移系统, 美国 Bio-Rad 公司。ImageQuant LAS 4000 曝光成像仪, 美国 General Electric 公司。

**急性酒精性肝损伤模型<sup>[13]</sup>** 8~10 周 C57BL/6J 雄性小鼠, 随机分为对照组及造模组, 每组 5 只。造模组按照  $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量灌胃 40% 乙醇, 每 12 h 一次, 共 3 次。对照组给予等热量等体积的糊精。于最后一次给药 6 h 后, 乙醚麻醉, 处死并收取样本。实验期间, 自由饮水饮食。

**短期酒精性肝炎模型<sup>[14]</sup>** 根据 Gao-binge 模型, 选取 8~10 周 C57BL/6J 雄性小鼠称重, 按体重进行配对分组, 每组 6 只。首先, 均给予 Lieber-DeCarli 对照液体饲料 (脂肪热量 35%) 适应 5 天。于第 6 天, 造模组更换为 Lieber-DeCarli 5% (v/v) 酒精液体饲料; 共 10 天。第 11 天 7~9 点, 造模组灌胃给予  $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  乙醇, 对照组给予等热量等体积糊精。9 h 后, 处死并收取样本。实验期间, 自由饮用液体饲料。

**短期酒精性肝纤维化模型<sup>[15, 16]</sup>** 按体重将 8~10 周 C57BL/6J 雄性小鼠配对分组, 每组 4 只。对照组给予 Lieber-DeCarli 对照液体饲料。第 1~2 天, 造模组给予含有 1% 乙醇 (v/v) 的 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料, 第 3~4 天, 酒精含量翻倍。适应期后, 再用 2% Lieber-DeCarli 酒精液体饲料喂养 2 周。期间, 造模组腹腔注射四氯化碳 ( $1 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ , 以 1:3 的比例溶于橄榄油), 对照组注射橄榄油, 每周 2 次。最后一次给药后 72 h, 处死并收取样本。实验期间, 自由饮用液体饲料。

**血清中 ALT、AST 检测** 收取血液样本, 室温放置 1 h 后,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取血清; 按试剂盒说明书的相应操作步骤, 进行 ALT、AST 水平的测定。

**肝组织及血清中 TG 检测<sup>[17]</sup>** 按照 TG 定量试剂盒的使用说明进行肝组织及血清中 TG 定量, 并测定样品中的蛋白含量, 计算肝组织内的 TG 含量。

**肝组织病理形态学观察** 在肝脏右叶的同一部位, 取大小相同的肝组织, 放置于 10% 中性福尔马林中固定。经脱水, 包埋后, 制成石蜡切片, 厚度约  $5 \mu\text{m}$ , 再进行 HE 染色及 Masson Trichrome 染色。油红染色: 取相同位置大小的肝组织, 制成冰冻切片, 再进行油红染色。用光学显微镜观察肝组织病理学病变

的程度。

**肝组织中 IL-6 和 CCL2 mRNA 表达的测定** 取同一部位的肝组织 50 mg, 采用 Trizol 法提取总 RNA。IL-6 引物为 F: 5'-CCACGGCCTTCCTACTTC-3', R: 5'-TGGGAGTGGTATCCTCTGTGAA-3'; CCL2 的引物为 F: 5'-CTTCTGGGCCTGCTGTTCA-3', R: 5'-CCAGCCTACTCATTGGGATCA-3'。参照 SYBR Green Assay 试剂盒说明书进行逆转录反应, 再将逆转录得到的 cDNA 进行 real-time PCR 扩增, 扩增步骤:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  45 s,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  60 s。

**临床芯片数据的获取及处理** 利用 Gene Expression Omnibus 在线数据库, 搜索酒精性肝病的临床芯片数据, 获取人源化样本全血或肝脏中 IL-6 和 CCL2 的表达结果 [为实验组除以对照组的对数值 ( $\log_2 \text{ratio}$ )]。将结果数据进行  $2^n$  换算, 得到实验组除以对照组的倍数, 再进行统计。

**数据分析** 用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析, 实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 结果

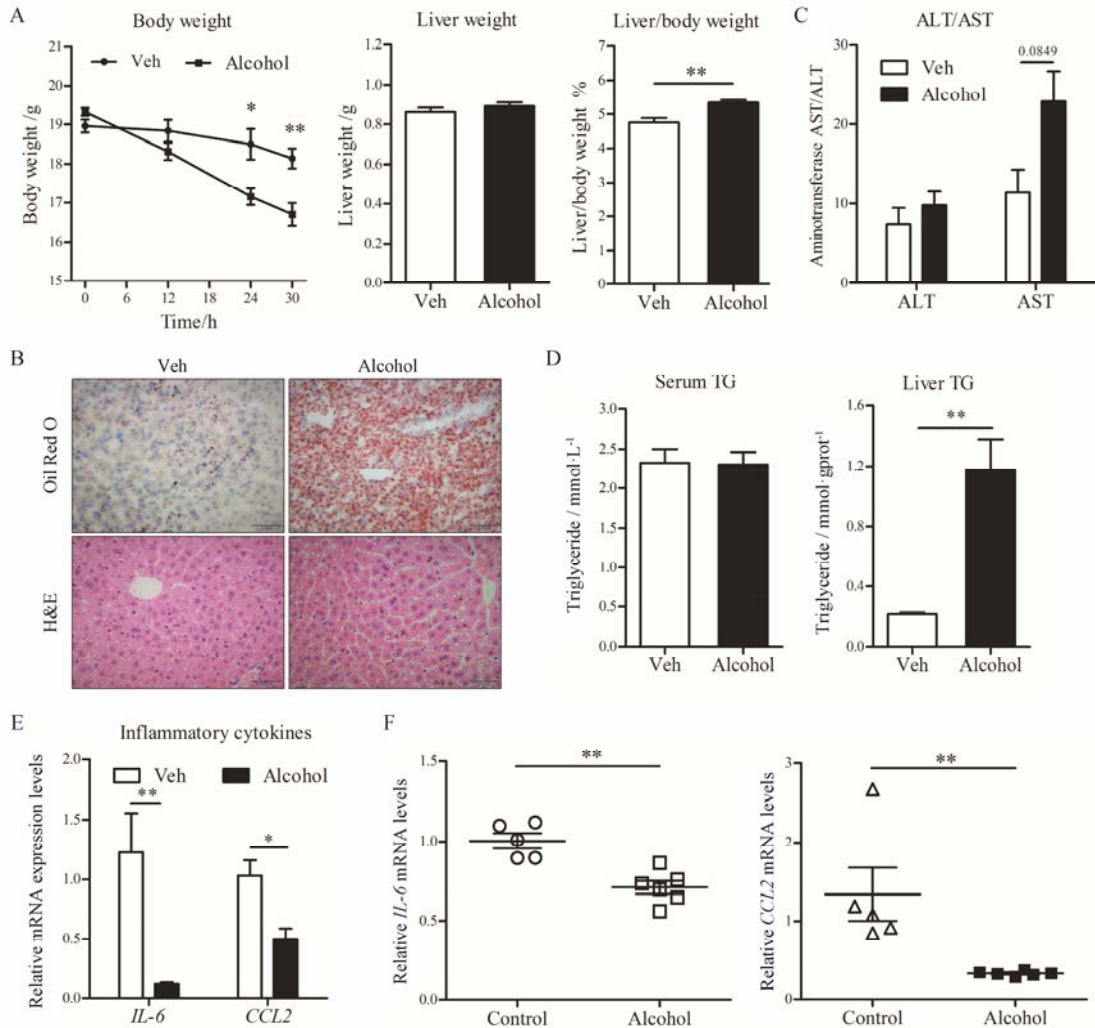
### 1 急性酒精性肝损伤病理指标变化

在体重和肝重方面 (图 1A), 对照组与造模组小鼠体重均呈下降趋势。但造模组体重下降更为明显, 两组具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。同时, 造模组小鼠肝脏重量有上升的趋势, 肝重比 ( $5.3 \pm 0.08$ ) % 显著增加 ( $P < 0.01$ ), 是对照组 ( $4.8 \pm 0.13$ ) % 的 1.12 倍。

在组织病理学方面 (图 1B), 造模组小鼠肝脏组织出现了明显的水样性病变, 肝小叶中央区的胞浆内可见大量空泡, 并有大量的脂质沉积。

在生化指标方面, 相比于对照组血清 ALT ( $7.3 \pm 2.1$ )  $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AST ( $11.4 \pm 2.9$ )  $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ , 造模组小鼠血清指标 ALT ( $9.8 \pm 1.8$ )  $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AST ( $22.9 \pm 3.9$ )  $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$  有上升的趋势, 但无显著差异 (图 1C)。造模组肝脏 TG 显著升高 ( $1.2 \pm 0.2$ )  $\text{mmol} \cdot \text{gprot}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ), 血清 TG 含量 ( $2.3 \pm 0.16$ )  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  却无明显变化 (图 1D)。

在细胞因子方面 (图 1E), 给予 3 次酒精灌胃后, 造模组细胞因子 IL-6 和 CCL2 mRNA 表达下降明显, 其中 IL-6 mRNA 表达下降了 90% ( $P < 0.01$ ), CCL2 下降了 51% ( $P < 0.05$ )。临床芯片数据结果显示 (图 1F), 急性饮酒过量患者大约在 2 h 左右, 全血中酒精浓度达到峰值, 而全血中 IL-6 和 CCL2 mRNA 表达水平有



**Figure 1** Under acute alcohol exposure, liver histological lesions was induced, along with the decreased gene expression levels of hepatic *IL-6* and *CCL2*. C57B/6 male mice (18-20 g) were challenged with acute exposure three times during 24 h. A: Growth curve, liver weight and liver/body weight ratio of mice; B: Histological analysis of liver samples; C: Serum ALT and AST levels; D: TG levels in serum and liver; E: The hepatic mRNA levels of *IL-6* and *CCL2*; F: The whole blood mRNA levels of *IL-6* and *CCL2* in trial subject exposed to single intake of orange juice and alcohol. The analysis was performed on the liver transcriptome data set GSE20489 from the Gene Expression Omnibus (GEO).  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

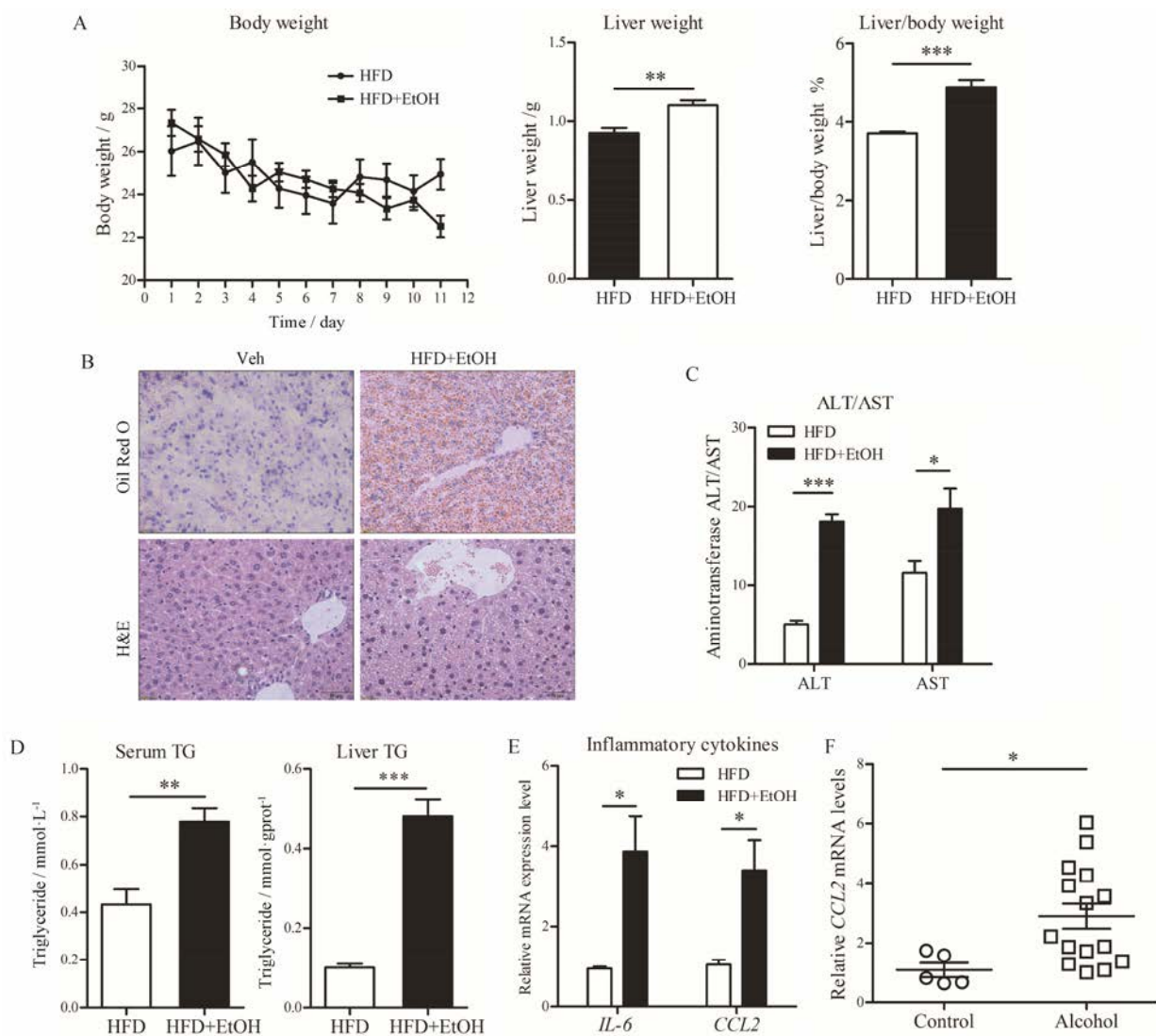
显著性下降, 其中在 169 min 时, *IL-6* 和 *CCL2* 的基因表达水平降至最低, 为对照组的 70% 与 30% 左右。结果表明, 小鼠急性酒精性肝损伤模型的炎症因子 *IL-6* 和 *CCL2* mRNA 表达与急性饮酒过量患者 (GEO 数据库: GSE20489) 全血中 *IL-6* 和 *CCL2* mRNA 表达变化的结果相一致。

## 2 短期酒精性肝炎模型的病理指标变化

在体重和肝重方面 (图 2A), 对照组与造模组小鼠体重变化趋势大致相同。至实验结束, 对照组、造模组小鼠体重分别为 (24.9 ± 0.7) g、(22.5 ± 0.5) g。造模组肝脏质量 [(1.1 ± 0.03) g,  $P < 0.01$ ] 与肝重比 [(4.9 ± 0.18)%,  $P < 0.001$ ] 明显高于对照组 [分别为 (0.9 ± 0.03) g、(3.7 ± 0.04)%]。

在组织病理学方面 (图 2B), 对照组肝小叶结构清晰, 肝索排列整齐, 汇管区存在轻微的水样性病变与脂质沉积; 模型组肝组织存在大面积的脂质沉积, 汇管区可见炎性细胞浸润和明显的水样性病变。除此之外, 造模组肝细胞还出现肿胀、胞浆内脂肪性小泡等病理现象。

在生化指标方面, 与对照组血清中 ALT (5.1 ± 0.5) U·L<sup>-1</sup> 和 AST (11.6 ± 1.6) U·L<sup>-1</sup> 相比, 造模组小鼠血清中 ALT (18.1 ± 0.9) U·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.001$ ) 和 AST (19.7 ± 2.5) U·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ) 明显升高, 且具有统计学意义 (图 2C)。同时, 造模组小鼠血清、肝脏匀浆中 TG 含量 (0.8 ± 0.06) mmol·L<sup>-1</sup>、(0.5 ± 0.04) mmol·gprot<sup>-1</sup>, 均明显高于对照组血清、肝脏匀浆中的 TG 含量 ( $P <$



**Figure 2** Chronic-plus-single-binge ethanol feeding induced liver injury, inflammation and fatty liver. Ethanol-fed group (24–28 g) was allowed free access to HFD+EtOH for 10 days, and control group was pair-fed with the control diet. At day 11, ethanol-fed and pair-fed mice were gavaged a single dose of ethanol (5 g·kg<sup>-1</sup>) or isocaloric maltose dextrin. A: Growth curve, liver weight and liver/body weight ratio of mice; B: Histological analysis of liver samples; C: Serum ALT and AST levels; D: TG levels in serum and liver; E: The hepatic mRNA levels of *IL-6* and *CCL2*; F: The hepatic gene expression levels of *CCL2* in patients with alcoholic hepatitis and normal livers. The analysis was performed on the liver transcriptome data set GSE28619 from the Gene Expression Omnibus (GEO). *n* = 6,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. HFD: Lieber-DeCarli diet containing high-saturated fat; HFD+EtOH: The ethanol Lieber-DeCarli diet containing high-saturated fat and 5% (v/v) ethanol

0.001, 图 2D)。上述实验结果与临床相关指标变化趋势相同 (表 1)<sup>[6, 18]</sup>。

在细胞因子方面 (图 2E), 造模组给予酒精液体饲料后, 肝脏细胞因子 *IL-6* 和 *CCL2* mRNA 表达水平显著性升高, 分别是对照组的 3.24 倍 (*P* < 0.05) 和 4 倍 (*P* < 0.05)。临床芯片数据显示 (图 2F), 酒精性肝炎患者 (GEO 数据库: GSE28619) 的肝脏 *CCL2* mRNA 表达水平是健康人的 3 倍 (*P* < 0.05), Gao-binge 模型小鼠肝脏中炎症因子 *CCL2* mRNA 表达情况与此结果相一致。

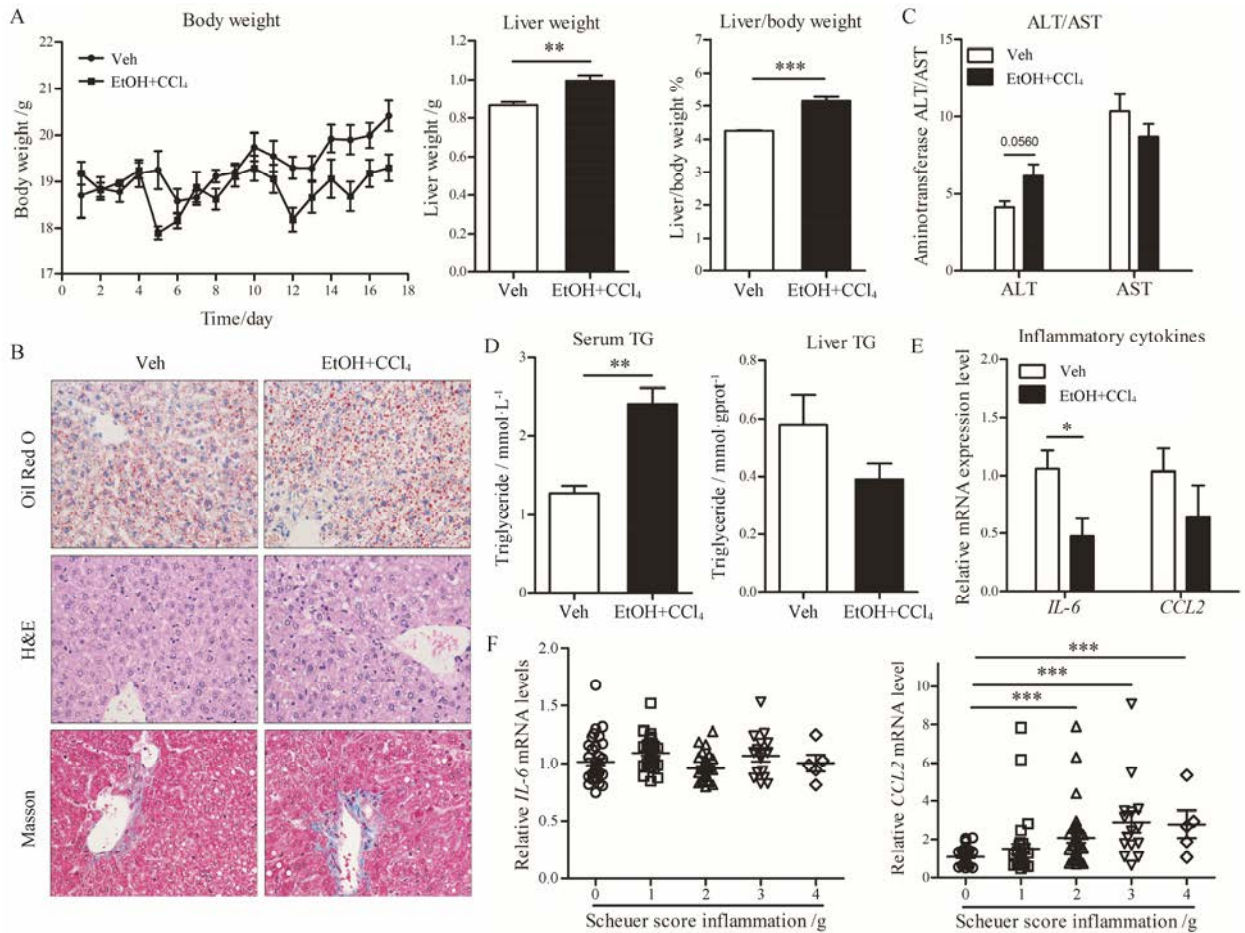
### 3 短期酒精性肝纤维化模型的病理指标变化

在体重和肝重方面 (图 3A), 造模组小鼠的体重的变化与对照组相似, 于第 10 天开始有逐步上升趋势。结束实验后, 对照组肝脏重量为 (0.9 ± 0.02) g, 而造模组小鼠的肝脏重量 (1.0 ± 0.03) g 明显增加 (*P* < 0.01), 其肝重比 (5.2 ± 0.13) % 也明显高于对照组 [(4.2 ± 0.02) %, *P* < 0.001]。

在组织病理学方面 (图 3B), 两组肝组织都呈现轻微的水样病变, 肝细胞水肿, 肝索排列紊乱, 部分肝细胞胞浆存在空泡, 并有明显脂质沉积, 但是, 造

**Table 1** Clinical diagnosis standard of alcoholic liver disease

	Acute liver injury	Alcoholic steatohepatitis	Alcoholic liver fibrosis
Drinking history <sup>[6]</sup>	More than 5 years, high daily alcohol intake (male $\geq 40 \text{ g} \cdot \text{day}^{-1}$ , female $\geq 20 \text{ g} \cdot \text{day}^{-1}$ ); or heavy drinking in two weeks (consumption of $> 80 \text{ g} \cdot \text{day}^{-1}$ )		
ALT/AST <sup>[6, 18]</sup>	Mild elevation	Moderate elevation $1.0 \leq \text{AST} / \text{ALT} \leq 2.0$	Significant elevation $\text{AST} / \text{ALT} \geq 2.0$ $\text{ALT} < 300 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$
Pathology <sup>[6]</sup>	Steatosis	Steatosis and moderate liver inflammation	Fibrotic lesion



**Figure 3** In CCl<sub>4</sub>-alcohol diet induced liver fibrosis model, although histological section indicated obvious fibrotic lesion, some pathological parameters were barely changed. C57BL/6 male mice (18–20 g) were fed with 2% alcoholic diet for up to 17 days. CCl<sub>4</sub> were given at day 4, 7, 11 and 14 for a total of 4 times. Liver and blood samples were then harvested 72 h after the last injection at day 14. A: Growth curve, liver weight and liver/body weight ratio of mice; B: Histological analysis of liver samples; C: Serum ALT and AST levels; D: TG levels in serum and liver; E: The hepatic levels of *IL-6* and *CCL2*; F: The hepatic mRNA levels of *CCL2* and *IL-6* in patients with different stage of liver fibrosis. The analysis was performed on the liver transcriptome data set GSE84044 from the Gene Expression Omnibus (GEO).  $n=4-5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

模组肝细胞胞浆存在空泡的现象更为显著, 数量更多, 肝小叶中央区存在明显的中性粒细胞浸润。组织经 Masson Trichrome 染色, 可标记生成的胶原蛋白 (蓝色区域)。由此可见, 对照组无纤维化生成迹象, 而造模组的肝组织切片小胆管以汇管区为中心轻度纤维组织增生。

在生化指标方面 (图 3C), 与对照组小鼠相比, 造模组小鼠血清中 ALT ( $6.2 \pm 0.7 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P=0.056$ ) 和

TG ( $2.4 \pm 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ) 水平显著上升, 而 AST ( $8.7 \pm 0.8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及肝脏中 TG 含量 ( $0.4 \pm 0.05 \text{ mmol} \cdot \text{gprot}^{-1}$ ) 却无明显差异, 或略有下降 (图 3D)。上述指标与临床数据相比不尽相同 (表 1)。

在细胞因子方面 (图 3E), 肝脏组织细胞因子 *IL-6* mRNA 表达水平, 与对照组相比, 下降了 55% ( $P < 0.05$ ), 并具有显著性差异; 而 *CCL2* mRNA 的表达虽受到影响, 有下降的趋势, 却无统计学意义。该

数据与临床肝纤维化患者 (GEO 数据库: GSE84044) 的样本测试结果有一定的差异 (图 3F)。

## 讨论

随着生活水平不断提高及中国“酒文化”影响, 我国酒精消耗量不断攀升, 由饮酒引发的健康问题日益严峻<sup>[1]</sup>。酒精性肝病已成为威胁人类健康的第二大肝脏疾病。因其机制复杂, 各种因素相互作用等原因, 其机制尚未完全阐述清楚。因此, 建立高效的动物模型, 为探索发病机制与寻找有效治疗药物提供实验基础, 具有极大的研究价值与临床意义。

结合前期工作, 本研究着重探讨了 3 种短期动物模型的可操作性, 及与各时期临床诊断标准 (表 1) 的相关程度。结果显示, 在急性酒精性肝损伤病理模型中, 肝组织出现明显的炎性浸润和脂肪变性; 细胞因子 *IL-6* 和 *CCL2* 的基因表达水平显著性降低, 该结果与临床芯片数据相似。上述结果表明, 该模型能模拟急性酒精摄取引发的肝损伤, 诱导部分相关指标, 但在肝重和血清生化指标方面的诱导作用并不显著。同样, 在短期酒精性肝纤维化模型中, 肝重增加, 肝组织出现炎性浸润、脂肪变性、汇管区纤维组织增生及 *IL-6* 的 mRNA 表达水平下调, 但血清中 AST 变化并不显著。参考表 1 及临床芯片数据, 此模型部分指标变化趋势与酒精性肝纤维化临床诊断指标有一定的差异。

另一方面, Gao-binge 模型的造模组小鼠体重、肝重和肝重比显著性增加, 血清生化指标 ALT、AST、TG 和肝脏中 TG 含量均大幅度升高, 肝组织炎性浸润和脂肪变性明显, 细胞因子 *IL-6* 和 *CCL2* 的 mRNA 水平显著升高。将实验结果与临床诊断指标及芯片数据相比较, 发现两者变化趋势相似。此对比结果表明, Gao-binge 模型能较好地模拟人类酒精性脂肪肝肺炎, 诱导作用显著, 得到的病理指标也较为全面。此外, Gao-binge 模型建立所需 16 天, 远少于传统 Lieber-DeCarli 模型 (4~8 周), 模型建立期间无需手术, 操作难度低, 更为方便。实验过程中, 给予小鼠 Lieber-DeCarli 5% (v/v) 酒精液体饲料, 酒精摄入量约每天每只 0.4 g, 等效于人类每日饮酒 120 g, 较好地模拟了人类 2 周内大量饮酒 (乙醇量 > 80 g·day<sup>-1</sup>) 从而导致酒精性肝病的行为。第 16 天灌胃高剂量酒精 (5 g·kg<sup>-1</sup>), 诱导肝脏炎症, 也进一步模拟了长期酗酒患者一次醉酒后导致的急性酒精性肝炎。综上, Gao-binge 模型的建模方法相对简单, 诱导的指标较为全

面, 且与临床指标变化趋势相似, 能够较好地模拟酒精性脂肪性肝炎, 是研究酒精性肝病与筛选有效治疗药物较为理想的模型。

随着研究深入, 还发现 *CCL2* 在酒精诱导的肝组织损伤中发挥着重要的作用<sup>[12]</sup>, 且在酒精性肝病患者血浆中显著升高<sup>[11]</sup>, 随着酒精性肝炎的加重而上调<sup>[19]</sup>。本实验结果显示, 肝组织 *CCL2* 的基因表达水平在急性酒精性肝损伤模型中下调, 在酒精性肝炎模型中大幅度上调, 且均与对应时期的临床芯片数据结果相一致。说明 *CCL2* 在酒精性肝病的不同阶段表达水平不同, 有可能成为酒精性肝病潜在的生物标记物, 对酒精肝病各阶段的动物模型选择及评价有一定的参考价值。

本研究表明, Gao-binge 模型能较好地模拟人类酒精性脂肪性肝炎, 诱导的病理指标较为全面。*CCL2* 不仅具有成为酒精性肝病生物标记物的可能, 其表达结果还对酒精肝病各阶段的动物模型选择及评价有一定的参考价值。今后, 本课题组的工作将集中于研究 *CCL2* 在酒精性肝病各阶段中发挥的作用, 进一步探索 *CCL2* 成为酒精性肝病生物标记物的可能性, 并拓展 *CCL2* 的临床应用范围, 为 *CCL2* 成为酒精性肝病潜在治疗靶点的假设提供更充分的研究依据。

## References

- [1] Qiu P, Li X, Kong DS, et al. Recent advances in alcoholic liver diseases [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2014, 30: 160–163.
- [2] Rehm J, Mathers C, Popova S, et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders [J]. Lancet, 2009, 373: 2223–2233.
- [3] Wang HX, Ma LX, Yin QL, et al. Prevalence of alcoholic liver disease and its association with socioeconomic status in north-eastern China [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2014, 38: 1035–1041.
- [4] Huang A, Chang BX, Sun Y, et al. Disease spectrum of alcoholic liver disease in Beijing 302 Hospital from 2002 to 2013: a large tertiary referral hospital experience from 7422 patients [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96: e6163.
- [5] Thursz MR, Richardson P, Allison M, et al. Prednisolone or pentoxifylline for alcoholic hepatitis [J]. N Engl J Med, 2015, 372: 1619–1628.
- [6] Chinese Society of Hepatology, CMA. Guidelines for the diagnosis and treatment of alcoholic liver diseases [J]. J Clin Hepatol (中华肝病杂志), 2010, 2: 49–53.

- [7] Zhao SS, Shao RG, He HW. Potential targets for anti-liver fibrosis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 1365–1371.
- [8] Hu QW, Liu GT. Advances in the research of anti-hepatic fibrosis drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 7–11.
- [9] Carr MW, Roth SJ, Luther E. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 3652–3656.
- [10] Xu LL, Warren MK, Rose WL, et al. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells *in vitro* [J]. *J Leukoc Biol*, 1996, 60: 365–371.
- [11] Degré D, Lemmers A, Gustot T, et al. Hepatic expression of CCL2 in alcoholic liver disease is associated with disease severity and neutrophil infiltrates [J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 169: 302–310.
- [12] Pranoti M, Aditya A, Arlene L, et al. An essential role for MCP-1 in alcoholic liver injury: regulation of pro-inflammatory cytokines and hepatic steatosis [J]. *Hepatology*, 2011, 54: 2185–2197.
- [13] Kirpich I, Ghare S, Zhang JW, et al. Binge alcohol-induced microvesicular liver steatosis and injury are associated with down-regulation of hepatic Hdac 1, 7, 9, 10, 11 and up-regulation of Hdac 3 [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2012, 36: 1578–1586.
- [14] Bertola A, Mathews S, Ki SH, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8: 627–637.
- [15] Karaca G, Xie GH, Moylan C, et al. Role of Fn14 in acute alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308: G325–G334.
- [16] Sanjoy R, Dian JC, Palash M, et al. Inhibition of apoptosis protects mice from ethanol-mediated acceleration of early markers of CCl<sub>4</sub>-induced fibrosis but not steatosis or inflammation [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2012, 36: 1139–1147.
- [17] Zhong LP, Li J, Wang FZ, et al. Protective effect and underlying mechanism of cordycepin on non-alcoholic fatty liver in *ob/ob* mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 106–112.
- [18] Nyblom H, Berggren U, Balldin J, et al. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking [J]. *Alcohol Alcohol*, 2004, 39: 336–339.
- [19] Fisher NC, Neil DA, Williams A, et al. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1alpha in alcoholic liver disease [J]. *Gut*, 1999, 45: 416–420.