

重症酒精性肝炎小鼠模型的建立与评价

朱学进^{1,2,4}, 郑淑文^{1,2,4}, 周光德³, 许燕瑜^{1,2,4}, 潘涛^{2,4}, 刘敏^{2,4*},
王伽伯^{1,2,4*}, 王英豪^{1*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069;
3. 首都医科大学附属北京佑安医院临床病理中心, 北京 100069;
4. 首都医科大学中医药防治传染性重症肝病研究与转化实验室, 北京 100069)

摘要: 重症酒精性肝炎 (severe alcoholic hepatitis, SAH) 是酒精性肝病中最严重的一种, 死亡率极高, 目前缺乏适合的动物模型进行相关研究。本研究旨在建立一种小鼠 SAH 模型为后续开展重症酒精性肝炎的相关研究提供临床前动物模型。本研究在 NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism) 模型的基础上采用联合给予细菌内毒素构建小鼠模型 [本实验所有动物实验均获得首都医科大学动物伦理委员会批准, 批准号: AEEI-2023-102]。在小鼠死亡率、肝脏组织损伤及炎症相关指标等方面模拟临床重症酒精性肝炎的病理过程。最终确立在 NIAAA 模型的基础上, 最后一次灌胃酒精浓度为 $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 联合腹腔注射脂多糖剂量 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 作用时间 12 h 作为 SAH 小鼠造模最优条件。该条件下, 小鼠模型能够较好地模拟临床上 SAH 的高死亡率、肝脏功能损害, 并且其病理染色结果与临床结果高度一致, 肝脏中也出现了大量中性粒细胞浸润等过度炎症反应的情况, 为 SAH 的临床前研究提供了理想的模型。

关键词: 重症酒精性肝炎; 肝损伤; 炎症反应; 动物模型; 模型评价

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)04-1029-12

Establishment and evaluation of a mouse model of severe alcoholic hepatitis

ZHU Xue-jin^{1,2,4}, ZHENG Shu-wen^{1,2,4}, ZHOU Guang-de³, XU Yan-yu^{1,2,4}, PAN Tao^{2,4}, LIU Min^{2,4*},
WANG Jia-bo^{1,2,4*}, WANG Ying-hao^{1*}

(1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. Clinical Pathology Center of Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 4. Research and Translational Laboratory for Traditional Chinese Medicine in the Prevention and Treatment of Infectious Severe Hepatitis, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Severe alcoholic hepatitis (SAH) represents the most extreme form of alcoholic liver disease (ALD), accompanied by an extremely high mortality rate. Currently, there is a dearth of appropriate animal models for related research. The objective of this study is to establish a mouse model of SAH, thereby providing a preclinical animal model for subsequent research on SAH. This study is based on the NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism) model and constructs a mouse model by combining bacterial endotoxins. This experiment was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Capital Medical University (approval

收稿日期: 2024-11-22; 修回日期: 2025-01-08.

基金项目: 国家自然科学基金联合基金重点支持项目 (U21A200211); “国家资助博士后研究人员计划”资助 (GZC20231759).

*通讯作者 E-mail: liumin624@ccmu.edu.cn; wyhtcm@163.com; jiabo_wang@ccmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1159

number: AEEI-2023-102). The model emulates the pathological processes of clinical SAH in terms of mouse mortality, liver tissue damage, and inflammatory markers, thereby establishing the model. Ultimately, it is ascertained that the optimal conditions for SAH mouse modeling based on the NIAAA model are the last intragastric administration of alcohol at a concentration of $7.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in combination with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide at a dose of $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for a period of 12 h. Under these conditions, the mouse model effectively simulates the high mortality and liver dysfunction seen in clinical SAH, with pathological staining results closely mirroring clinical findings. Additionally, it demonstrates a significant infiltration of neutrophils in the liver, indicative of an excessive inflammatory response. This model provides an ideal platform for preclinical research on SAH.

Key words: severe alcoholic hepatitis; liver injury; inflammatory response; animal model; model evaluation

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是由长期过量饮酒引起的一系列肝脏疾病^[1], 据 WHO 统计报告, 我国酒精性肝病患者已超 600 万, 占全球 1.5 亿酒精性肝病患者的 40%^[2,3]。我国酒精性肝病的疾病负担不容忽视。ALD 可分为轻症酒精性肝病、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎 (alcoholic hepatitis, AH)、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化 5 种临床分型^[4]。其中, 重症酒精性肝炎 (severe alcoholic hepatitis, SAH) 是在 AH 基础上出现肝功能衰竭表现的一种进展性疾病, 30 天自然病死率可高达 35%~50%, 90 天病死率可达 70%, 是酒精性肝病相关死亡的主要原因之一^[5,6]。

SAH 的临床病理特征主要是过度炎症反应, 肝脏中大量中性粒细胞浸润, 发生炎症因子风暴、全身性炎症等^[7]。SAH 炎症反应及诱因是系统性的免疫炎症紊乱, 酒精摄入后, 肝脏是主要的代谢器官, 其中酒精代谢毒物损伤肝细胞后产生的危险相关分子模式 (danger associated molecular patterns, DAMPs)^[8], 诱发强烈天然免疫和炎症反应; 并且酒精摄入还会导致肠道屏障功能障碍, 增加肠道细菌和内毒素作为病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs)^[9]的易位, 进而激活肝脏的免疫反应。此基础上的复杂免疫炎症反应级联放大过程和代谢紊乱^[10,11], 引起失控性炎症、细胞能量危机, 最终导致大量细胞死亡和脏器功能衰竭。

对于重症酒精性肝炎来说, 目前缺乏一种动物模型能较好复制临床症状。所以建立 SAH 动物模型, 特别是构建能模拟人类饮酒习惯和 SAH 发病过程的模型, 具有重要理论价值和现实意义。目前, 研究 ALD 大多采用美国国立卫生研究院酒精滥用与中毒研究所 (NIAAA) 建立的慢性乙醇喂养加急性乙醇灌胃模型 (NIAAA 模型)^[12], 可造成肝脏脂肪变性和酒精性肝炎早期少量炎性细胞浸润现象 (第一次打击)。而脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为革兰阴性细菌的细胞壁成分, 是内毒素的主要毒性成分, 可以介导炎症因子

破坏血管内皮的完整性, 导致肝细胞凋亡和坏死, 激活炎症反应, 加剧肝脏损伤^[13]。在酒精刺激的基础上, LPS 能够进一步介导炎症因子破坏血管内皮从而入血^[14], 并且改变肠道微生物结构^[15], 对肝脏进行“二次打击”, 加剧肝脏炎症和损伤, 更符合临床上高死亡率、大量炎症反应的特征。目前, 国内外尚无基于酒精联合 LPS 模拟“二次打击”的 SAH 动物模型报道。基于此, 本研究在 NIAAA 模型的基础上, 加大最后一天急性大剂量灌胃酒精的剂量并联合给予 LPS 刺激, 从而模拟临床上 SAH 患者由于大量饮酒和肠道菌内毒素诱发急性重症酒精性肝炎的特点。

材料与方法

动物 雄性 C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 体质量 20~25 g, 8~10 周龄, 购自维通利华 (北京) 生物技术有限公司。实验动物生产许可证号 SYXK (京) 2022-0049, 所有小鼠均饲养于温度 22~25 °C、相对湿度 40%~70% 的环境中, 自由进食饮水, 适应性饲养 7 天后进行动物实验。实验获首都医科大学伦理委员会批准 (批准号 AEEI-2023-102)。重症酒精性肝炎临床样本及对照样本切片由首都医科大学附属北京佑安医院临床病理中心提供。实验获北京佑安医院伦理委员会许可 (项目许可证号 LL-2023-018-Y)。

药品和试剂 42% vol 汾酒购自山西杏花村汾酒厂股份有限公司; LPS (货号: L2880) 购自美国 Sigma 公司; Lieber-DeCarli 对照饲料 (货号: F1259SP)、Lieber-DeCarli 酒精饲料 (货号: F1258SP) 购自美国 Bio-Serv 公司; 麦芽糊精 (货号: M8450) 购自北京索莱宝科技有限公司; 抗髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 抗体 (货号: AB208670) 购自英国 Abcam 公司; 淋巴细胞抗原 6G (lymphocyte antigen 6 complex, locus G, Ly6G) 抗体 (货号: 87048) 购自美国 CST 公司; 谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 测定试剂盒 (货号: C009-2-1)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate

transaminase, AST) 测定试剂盒 (货号: C010-2-1)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒 (A020-2-2)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL) 测定试剂盒 (货号: C019-2-1)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 测定试剂盒 (E003-2-1)、白蛋白 (albumin, ALB) 测定试剂盒 (货号: A028-2-1)、胆碱酯酶 (cholinesterase, CHE) 测定试剂盒 (货号: A023-2-1) 购自南京建成生物工程有限公司; 小鼠白介素 (interleukin, IL)-1 β ELISA 定量试剂盒 (货号: KTE7005)、小鼠白介素 (interleukin, IL)-6 ELISA 定量试剂盒 (货号: KTE7009)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) ELISA 定量试剂盒 (货号: HT7015)、小鼠 C-C 基序趋化因子配体 2 (C-C chemokine ligand 2, CCL2) ELISA 定量试剂盒 (货号: KTE7001) 购自武汉亚科因生物技术有限公司; 小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒 (货号: EK0433)、小鼠巨噬细胞炎性蛋白-2 (macrophage inflammatory protein-2, MIP-2) ELISA 试剂盒 (货号: EK0452)、小鼠 C-X-C 基序趋化因子配体 1 (C-X-C chemokine ligand 1, CXCL1) ELISA 试剂盒 (货号: EK0732)、小鼠 C-X-C 基序趋化因子配体 7 (C-X-C chemokine ligand 7, CXCL7) ELISA 试剂盒 (货号: EK0730) 购自武汉博士德生物工程有限公司。

主要仪器 FlexStation 3 多功能酶标仪 (美谷分子仪器有限公司)、Velocity 18R Pro 型高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备工程有限公司)、-20 °C 冰箱、4 °C 冰箱、-80 °C 超低温冰箱 (美菱公司)。

SAH 模型的构建 本研究将小鼠随机分为 6 组, 即对照组、NIAAA 组 (Gao-Binge 模型)、4 种改良的 NIAAA 模型组。其中, 4 种改良的 NIAAA 模型组考察了 NIAAA 模型最后一天大剂量酒精灌胃和 LPS 腹腔注射的不同剂量的组合, 分别是: 条件组合 ① (Comb. 1): 5 g·kg⁻¹ 酒精 ig+5 mg·kg⁻¹ LPS ip; 条件组合 ② (Comb. 2): 5 g·kg⁻¹ 酒精 ig+10 mg·kg⁻¹ LPS ip; 条件组合 ③ (Comb. 3): 7.5 g·kg⁻¹ 酒精 ig+5 mg·kg⁻¹ LPS ip; 条件组合 ④ (Comb. 4): 7.5 g·kg⁻¹ 酒精 ig+10 mg·kg⁻¹ LPS ip。

具体来说, 造模分为 4 个阶段: 第一阶段预适应 (preadaptation), 小鼠适应性饲养 1 周。第二阶段液体饲料适应 (liquid diet adaptation), 以 Lieber-DeCarli 液体饲料 (225 g 干燥混合对照饮食, 加入 860 mL 自来水中充分混匀) 喂养小鼠 5 天, 使小鼠适应液体饲料, 保证每只小鼠摄入 25 mL 的对照液体饲料。第三阶段慢性酒精液体饲料饲喂 (chronic alcohol liquid diet feeding), 从第 6 天开始给对照组小鼠饲喂对照液体饲料, 其他各组每天给予含 5% 酒精的液体饲料 (与对照组液体饲料具有相同的总卡路里), 保证其自由饮食, 给予每

只小鼠 25 mL, 且每 24 h 液体饲料的给予量始终保持与模型组相同, 连续饲养 10 天。第四阶段大剂量酒精灌胃和 LPS 注射 (Binge and LPS injection), 在第 16 天早上 7:00~9:00 进行灌胃, 其中对照组给予糊精溶液灌胃 (每 10 mL 糊精溶液含 4.5 g 糊精); 其他各组给予 31.5% 酒精溶液灌胃, 1 h 后对照组与 NIAAA 组腹腔注射生理盐水 (100 g·mL⁻¹), 其余各组腹腔注射相应剂量 LPS, 8 h 后处死小鼠 (图 1A), 收集血清和肝脏进行后续分析。

确定最佳酒精灌胃剂量以及 LPS 腹腔注射的剂量后, 本研究在此基础上增加了 LPS 在小鼠体内的作用时间, 分别设置了 10 和 12 h 后进行取材 (图 1B), 收集血清和肝脏进行后续分析, 直至确定 SAH 小鼠模型最优干预剂量与时间。

死亡率统计 在最后一天给予急性大剂量灌胃酒精并联合给予细菌内毒素刺激后, 直到取材前, 观察并记录各组小鼠的死亡情况。

肝组织病理检测 在肝右叶同一位置留取组织, 置入 4% 多聚甲醛缓冲液中固定, 48 h 后常规包埋, 切片, 烤片, H&E 染色, 在光学显微镜下观察肝脏组织的病理变化。

免疫组织化学法染色 取各组小鼠肝脏组织石蜡切片, 脱蜡, 水化, 抗原修复, 阻断内源性过氧化氢酶, 2% 山羊血清封闭, 分别加入 MPO、LY6G 抗体 (标记中性粒细胞) 4 °C 孵育过夜。磷酸盐缓冲液冲洗 5 min×3 次, 滴加相应二抗, 37 °C 孵育 1 h。PBS 冲洗 5 min×3 次, 3,3'-二氨基苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 蒸馏水冲洗后进行苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后封片, 扫描显微镜下扫描片观察结果。

Masson 染色 将肝组织用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 制成 4~6 μ m 的切片。脱蜡至水、染色 (Weigert 铁苏木素染色; Masson 蓝液返蓝; 丽春红酸性品红染色; 磷钼酸处理; 苯胺蓝染色)、脱水、透明和封片 (依次用 95% 乙醇、无水乙醇脱水, 每次 5 min 左右; 再用二甲苯透明, 每次 1~2 min; 最后用中性树胶封片)。

TUNEL 染色 取肝组织制成石蜡切片, 厚度约 4~6 μ m。脱蜡至水、抗原修复与处理、平衡与反应液孵育 (室温平衡: 切片稍甩干后, 圈内滴加 buffer 平衡液覆盖组织, 室温 10 min; 加反应液孵育: 按 TdT:FITC:buffer=1:5:50 比例混合 TUNEL 反应液, 加到圈内覆盖组织, 37 °C 恒温孵育 1 h, PBST 冲洗 5 min×3)、复染与封片 (染核: 用 DAPI 核染 2 min, PBST 冲洗 5 min×3 次; 封片: 切片稍甩干后, 用抗荧光淬灭剂封片)。在荧光显微镜下观察, 凋亡细胞的细胞核呈现绿色荧光, 正常细胞的细胞核呈现蓝色荧光。

小鼠血清生化指标检测 小鼠眼球取血后, 室温

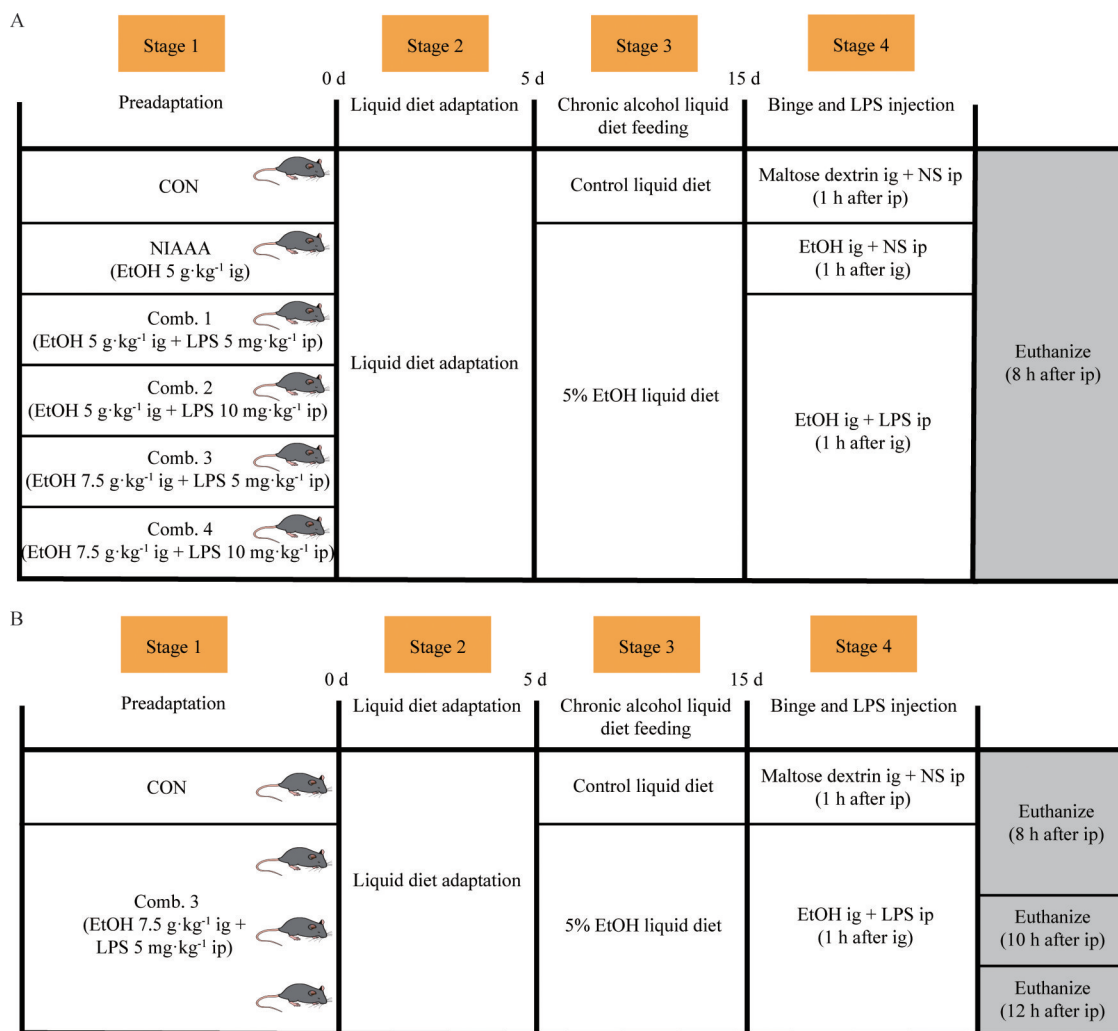


Figure 1 Experimental design process of severe alcoholic hepatitis (SAH) model. A: Modeling process of different groups; B: Modeling process of lipopolysaccharide (LPS) with different stimulation times

静置 2 h, 采用低温离心方法收集血清样本, 于 -80 °C 保存。试剂盒检测小鼠血清内 ALT、AST、LDH、DBIL、TBA、ALB、CHE 的水平。

小鼠血清炎症因子及趋化因子检测 小鼠眼球取血后, 室温静置 2 h, 采用低温离心方法收集血清样本, 于 -80 °C 保存。严格按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作, 测定小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 、MIP-2、CCL2、CXCL1、CXCL7 的水平。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析, 数据以均值 \pm 标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结果

1 各组小鼠死亡情况统计

临床上 SAH 的特点是肝脏炎症迅速恶化, 伴有高

短期死亡率, 30 天自然病死率可高达 35%~50%。本研究在给予最后一次急性大剂量酒精灌胃并联合 LPS 刺激, 直到取材前 (8 h 后), 结果显示, 对照组死亡率为 0; 在 5 g·kg⁻¹ 酒精灌胃剂量下, NIAAA、Comb. 1、Comb. 2 组的死亡率均低于 10%。然而, Comb. 3 组的死亡率达到 35%, 与 SAH 的临床死亡率相近。Comb. 4 组的死亡率异常高, 达到 80%, 这在动物实验研究中是不可取的。因此, 从模拟 SAH 临床死亡率的角度来看, 7.5 g·kg⁻¹ 酒精灌胃联合 5 mg·kg⁻¹ LPS 腹腔注射 (ip) 被认为是较为合适的造模条件。各组死亡率情况见图 2。

2 各组小鼠肝脏组织 H&E 染色和免疫组化染色的病理学变化

在本研究中, 通过 H&E 染色对小鼠肝脏组织病理变化进行了评估。对照组显示正常的肝小叶结构和肝细胞排列, 伴随少量脂肪空泡; NIAAA 组观察到肝细胞胞质疏松、肝小叶结构紊乱以及大量脂肪空泡;

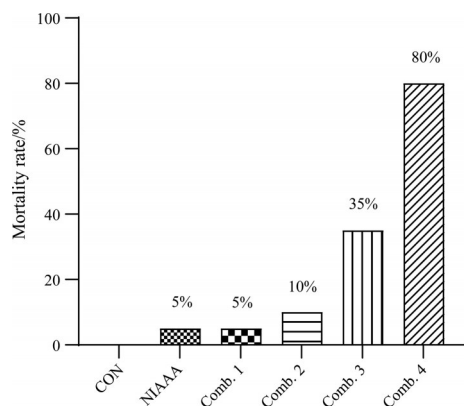


Figure 2 Death of mice in each group ($n = 20$)

Comb. 1 和 Comb. 2 组同样表现出肝细胞胞质疏松、肝小叶结构紊乱和大量脂肪空泡, 伴随中性粒细胞的浸润; Comb. 3 和 Comb. 4 组则显示出更为显著的肝细胞胞质疏松、肝细胞间隙增大、脂肪空泡明显, 以及中性粒细胞的大量聚集 (图 3A、B)。进一步通过免疫组化染色评估中性粒细胞浸润, 结果显示对照组和 NIAAA 组中性粒细胞浸润较少, 而 Comb. 1 和 Comb. 2 组中性粒细胞浸润较为明显; Comb. 3 和 Comb. 4 组则显示出极为明显的中性粒细胞浸润 (图 3A、C、D), 与 SAH 患者肝脏中观察到的过度炎症反应和大量中性粒细胞浸润相一致。

综合考虑小鼠死亡率和肝脏炎症反应 (中性粒细胞浸润) 的病理学变化, $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 酒精灌胃联合 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 腹腔注射的剂量组合在模拟 SAH 病理特征方面表现最佳。相比之下, $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 酒精灌胃联合 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 的剂量导致小鼠死亡率过高, 不利于后续实验研究。因此, 选择 $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 酒精灌胃联合 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 作为进一步模型研究的剂量。

3 LPS 不同作用时间对小鼠肝脏的影响

本研究评估了腹腔注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 后, 不同时间点对小鼠肝脏炎症和功能的影响。通过在 8、10 和 12 h 后对肝组织进行 H&E 和免疫组化染色, 观察到随着 LPS 作用时间的延长, 小鼠肝脏的病理变化包括肝细胞胞质疏松、细胞间隙增大、脂肪空泡增多及中性粒细胞浸润程度增强 (图 4A~C)。血清生化分析显示, 与对照组相比, 各时间点小鼠的 ALT 和 AST 水平均升高, 尤其在 10 和 12 h 后, 与对照组的差异具有统计学意义, 12 h 时的升高最为显著 (图 4D、E)。这些结果表明, 12 h 的 LPS 作用时间能够最大程度地模拟 SAH 模型中肝脏中性粒细胞的大量浸润和炎症因子风暴。因此, 本研究选择了 12 h 的 LPS 作用时间进行模型构建, 并通过临床样本病理染色进行对比分析、系统的血清肝功能指标、炎症因子和趋化因子的检测分析, 以及肝

组织中炎症相关蛋白的表达, 以深入对该 SAH 小鼠模型进行评价。

4 SAH 临床样本与小鼠样本病理染色的对比性评价

将临床上 SAH 患者和 SAH 小鼠肝组织进行病理学检测分析。临床样本 H&E 染色结果显示, 与对照组相比, SAH 患者肝组织中脂肪变性和炎性细胞浸润明显增多 ($P < 0.01$, 图 5A、B); Masson 染色结果显示, SAH 患者的胶原纤维面积百分比显著高于对照组 ($P < 0.01$, 图 5A、C); MPO 染色结果显示, SAH 患者的 MPO 阳性细胞面积百分比显著高于对照组 ($P < 0.01$, 图 5A、D), 说明其肝组织中中性粒细胞浸润明显。在 SAH 小鼠中, 其肝组织 H&E 染色结果也显示出 SAH 组的脂肪变性和炎症细胞浸润显著高于对照组 ($P < 0.001$, 图 5E、F); Masson 染色结果同样显示 SAH 组的胶原纤维面积百分比显著高于对照组 ($P < 0.01$, 图 5E、G); MPO 对小鼠肝组织中中性粒细胞进行染色, 与临床结果相似, SAH 组的 MPO 阳性细胞面积百分比显著高于对照组 ($P < 0.001$, 图 5E、H); TUNEL 检测细胞凋亡, SAH 组小鼠肝脏显示出更多的凋亡细胞, TUNEL 阳性细胞面积百分比显著高于对照组 ($P < 0.000 1$, 图 5E、I)。SAH 小鼠模型的肝脏病理特征与临床 SAH 患者高度一致, 包括脂肪变性、炎症细胞浸润、纤维化、中性粒细胞浸润和细胞凋亡。这些发现证实了 SAH 小鼠模型在模拟人类 SAH 病理变化方面的有效性。

5 SAH 小鼠肝脏指数及血清肝功能评价

小鼠肝重比和血清肝功能指标的变化可以反映肝脏的损伤程度、炎症反应、脂肪变性等病理状态, 为肝脏疾病的研究提供了重要的实验数据。将上述研究最终条件下模型小鼠 (SAH 组) 与对照组进行肝体比和血清肝功指标比较, 结果显示, 对照组与 SAH 组小鼠在整个饲养过程中, 体重变化无明显差异, 但 SAH 组体重略有减轻 (图 6A), 而肝脏指数, SAH 组与对照组相比明显升高 ($P < 0.01$, 图 6B)。肝脏功能指标中, SAH 组与对照组相比, ALT、AST、LDH、DBIL 的含量均显著性增高 ($P < 0.01$, 图 6C~F), TBA 水平增高最为明显 ($P < 0.000 1$, 图 6G), ALB 与 CHE 的水平均明显降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$, 图 6H、I)。SAH 小鼠模型显示出严重的肝脏功能损伤, 其血清肝功能指标的变化与临床 SAH 患者相一致。这些结果验证了 SAH 小鼠模型在模拟人类 SAH 肝脏病理变化方面的有效性, 为进一步研究 SAH 的病理机制和治疗策略提供了可靠的实验基础, 提示 SAH 小鼠模型较成功。

6 SAH 小鼠血清炎症因子和趋化因子改变情况

血清中的炎症因子和趋化因子是免疫系统的重要组成部分, 它们在炎症反应、免疫监视、组织再生等过

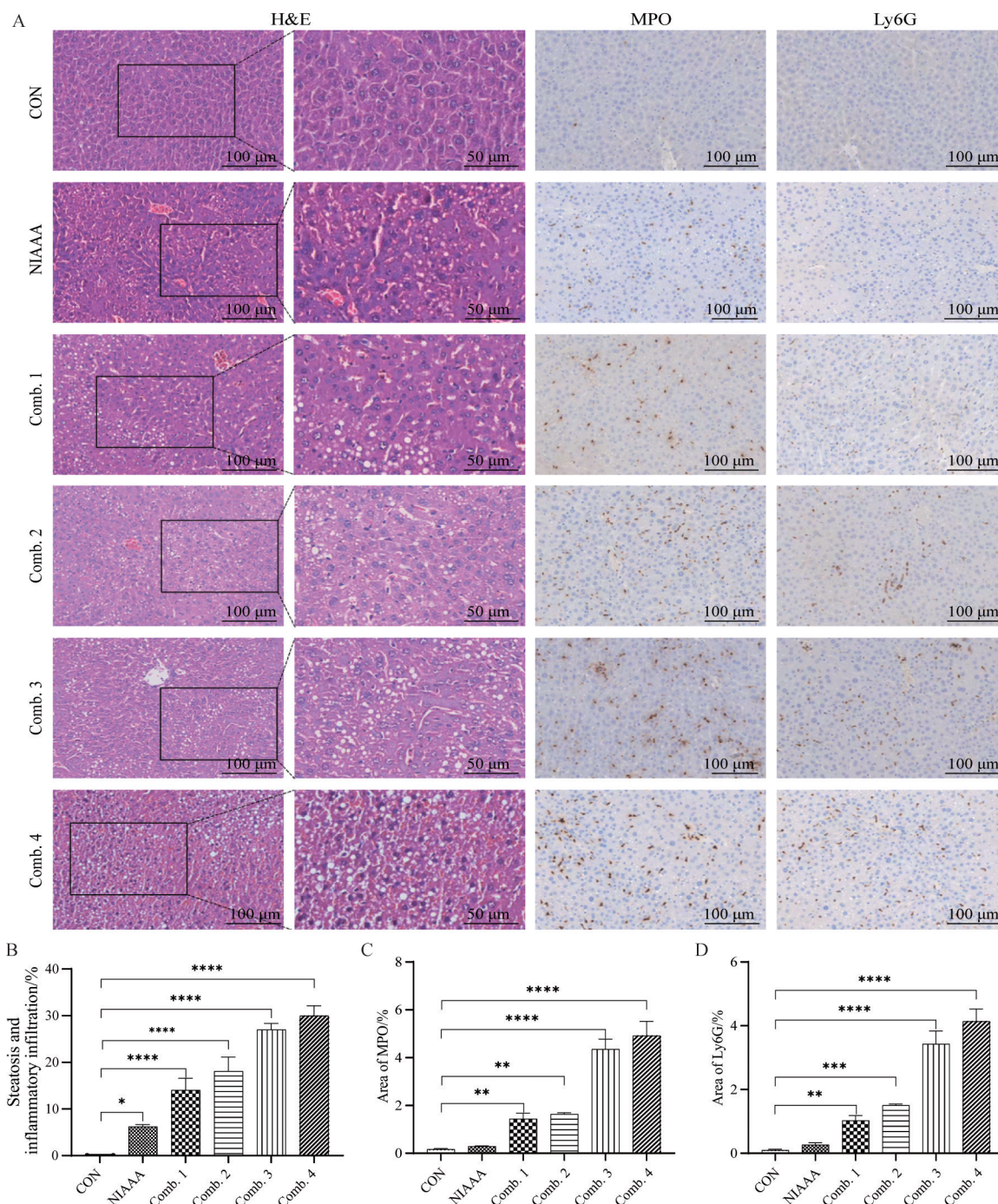


Figure 3 Liver tissue of mice in each group was stained by H&E and IHC staining with myeloperoxidase (MPO) and lymphocyte antigen 6 complex, locus G (Ly6G). A: H&E staining and IHC staining of mouse liver tissues in different groups; B: Quantitative analysis of steatosis and inflammatory infiltration; C: Quantitative analysis of MPO; D: Quantitative analysis of Ly6G. Magnification $\times 200$; scale bar = 100 μm . $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

程中发挥着关键作用。炎症因子在局部和循环性炎症反应中发挥重要作用,它们可以触发血管内皮细胞表达,增强白细胞黏附分子的表达,促进免疫细胞浸润到感染或受损部位^[16];趋化因子能够诱导细胞定向迁移,吸引免疫细胞沿着趋化因子浓度增加的方向迁移^[17]。研究检测对照组与 SAH 组小鼠血清炎症因子和趋化因

子,结果显示,与对照组相比,SAH 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-18、CCL2、CXCL1、CXCL7 的表达水平上调极其显著 ($P < 0.0001$, 图 7A~C、F~H), MIP-2 表达水平也显著上升 ($P < 0.01$, 图 7E),而 TNF- α 表达水平有所增高,但无明显差异 (图 7D)。SAH 小鼠模型中炎症因子和趋化因子的显著上调表明了模型中存在过度炎

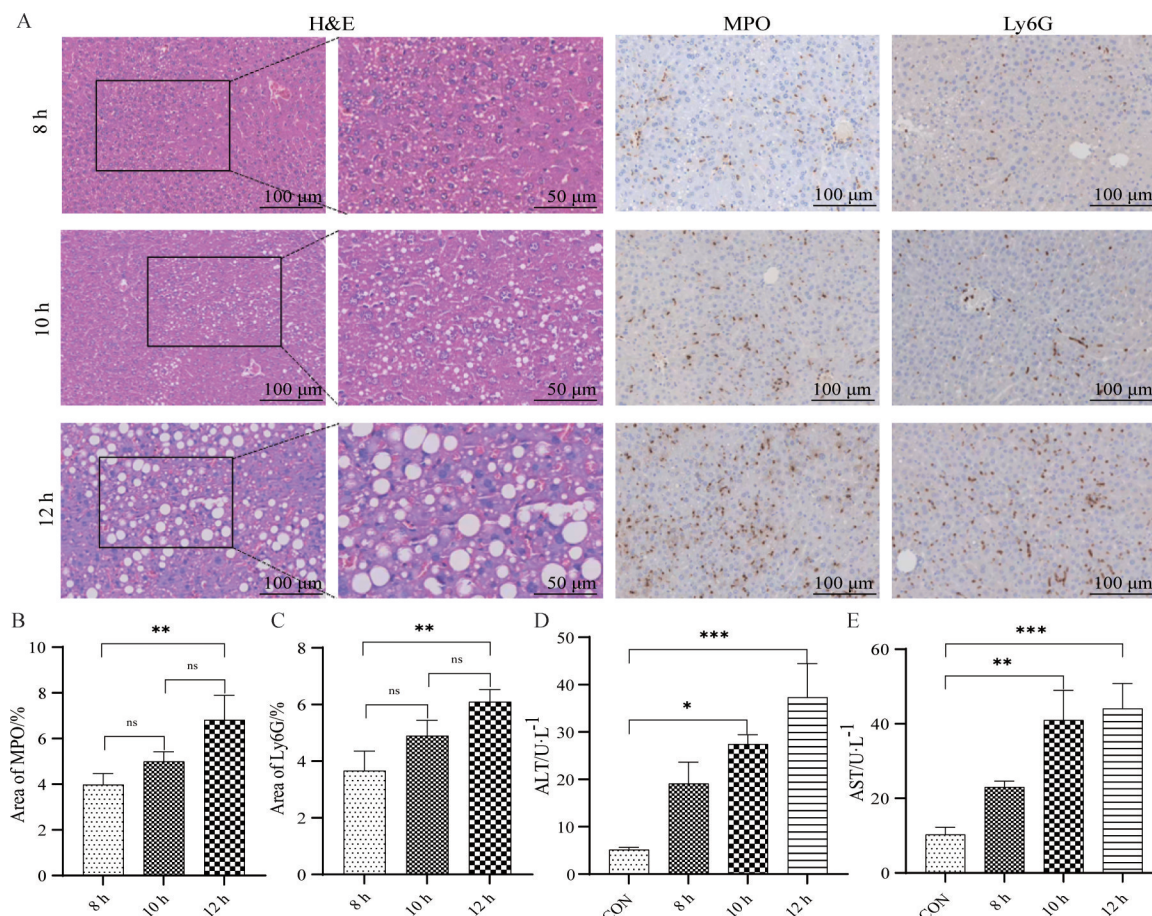


Figure 4 The effect of LPS stimulation time on mouse liver and the study final design. A: H&E staining and IHC staining of mouse liver tissues at different times; B: Quantitative analysis of MPO; C: Quantitative analysis of Ly6G; D: Serum alanine transaminase (ALT); E: Serum aspartate transaminase (AST). Magnification $\times 200$; scale bar = 100 μm . $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

症反应,这与肝脏中性粒细胞的大量浸润和炎症因子风暴的状态相一致。这些结果进一步证实了SAH小鼠模型在模拟人类SAH病理特征方面的有效性,SAH小鼠模型较成功。

7 SAH小鼠肝组织炎症蛋白改变情况

Western blot检测SAH小鼠肝组织炎症相关蛋白的表达水平。结果显示,与对照组相比,SAH小鼠肝组织中炎症相关蛋白IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NLRP3蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$,图8A~E),这可能与SAH引起的炎症反应有关,说明SAH小鼠肝脏中发生了明显炎症反应。

讨论

众所周知,ALD是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病,目前国际上已经探索并建立了多种ALD小鼠模型,其中以急性酒精灌胃模型^[18]、Lieber-DeCarli模型^[19]和NIAAA模型^[12]应用较多。急性酒精灌胃模型只是短时间内给予高剂量酒精,仅能模拟急性酒精中

毒对肝脏造成的一次性损伤,无法体现长期酗酒导致的肝脏渐进性病变过程,且小鼠酒精耐受性不高,给予浓度过高或多次后小鼠有极高死亡风险,并且急性酒精灌胃虽然会引发一定的炎症反应,但这种反应是短暂的、程度较轻;Lieber-DeCarli模型通过酒精液体饮食诱导肝损伤,实验周期较长,仅可以诱导出肝脏脂肪变性等早期肝脏损伤的表现,在炎症反应方面有明显局限;NIAAA模型是通过短期慢性酒精液体饮食联合较大剂量急性酒精灌胃来模拟酒精性肝病,较符合人类饮酒所导致的酒精性肝病发病模式,然而其在模拟复杂的炎症反应方面存在缺陷,并且不能较好体现肝细胞的坏死和紊乱,也仅仅只能诱导出肝脏脂肪变性和早期酒精性肝炎的表现。对于SAH来说,这些是远远不够的,重症酒精性肝炎有较高的死亡率,是酒精性肝病中致死的主要原因之一^[5,6],而单纯的ALD模型在死亡率方面与SAH严重不符。另一方面,SAH是复杂的病理生理机制,包括严重的肝细胞坏死、炎症因子大量释放、免疫反应的过度激活等多种因素共同造成

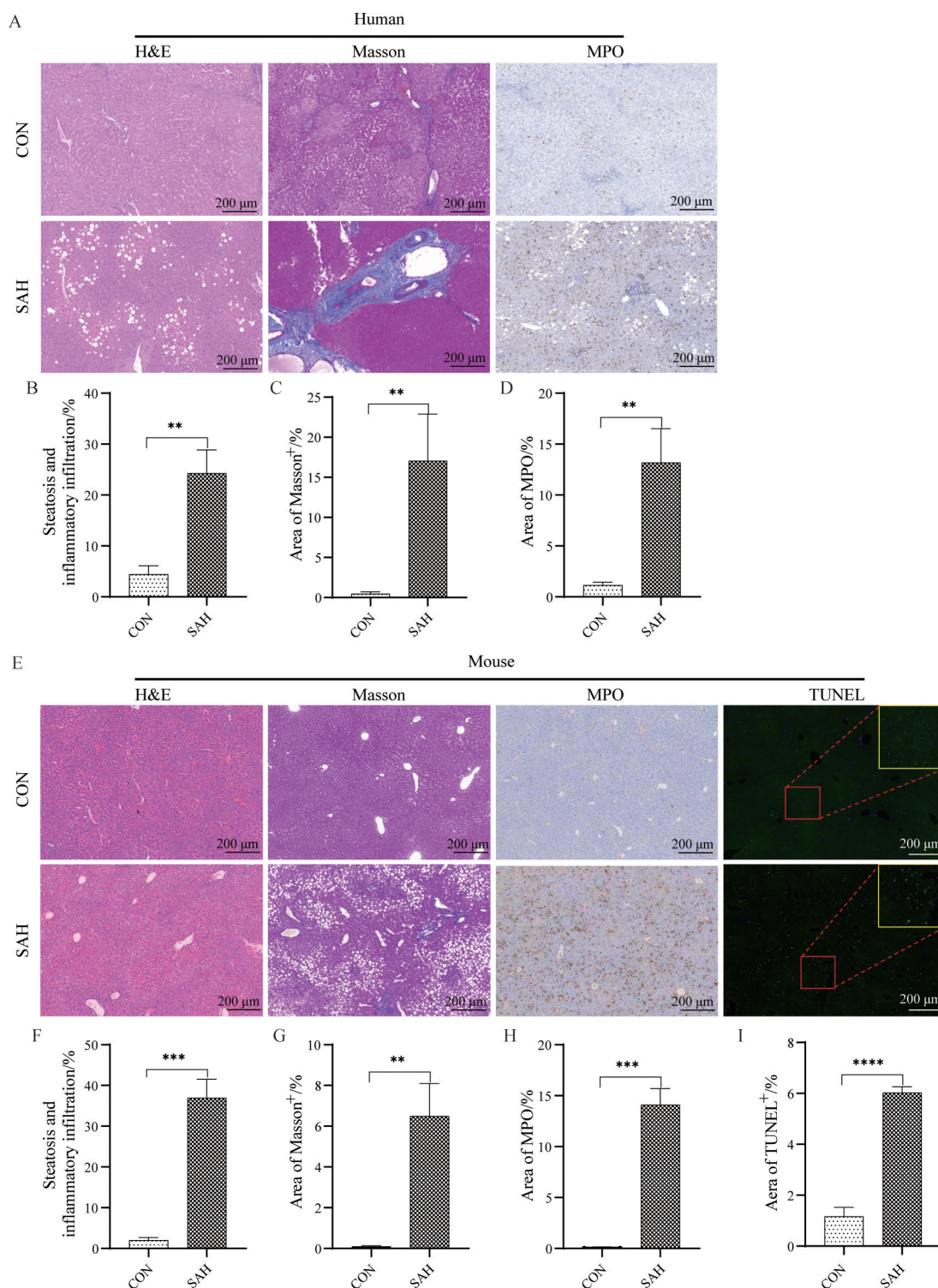


Figure 5 Pathological staining analysis of clinical and mouse SAH samples. A: H&E, Masson and MPO staining of SAH patients; B-D: Quantitative analysis of H&E, Masson and MPO staining; E: H&E, Masson, MPO and TUNEL staining of SAH mice; F-I: Quantitative analysis of H&E, Masson, MPO and TUNEL staining. Magnification $\times 100$; scale bar = 200 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

的^[20],而单纯的ALD模型对炎症反应程度的模拟与真实的人类SAH疾病中以中性粒细胞为主的炎症细胞浸润、炎症因子风暴等严重情况有差距。

目前只有临床上研究重症酒精性肝炎^[21-23],而在基础实验中并没有良好的动物模型来辅佐临床研究。

重症酒精性肝炎的临床和病理特征主要是过度炎症反应,肝脏中大量中性粒细胞浸润,发生炎症因子风暴、全身性炎症等,迫切需要一种良好的SAH动物模型来为治疗重症酒精性肝炎做铺垫。建立一种SAH模型,首先需要从发病机制考虑,慢性酒精液体饮食的应用,

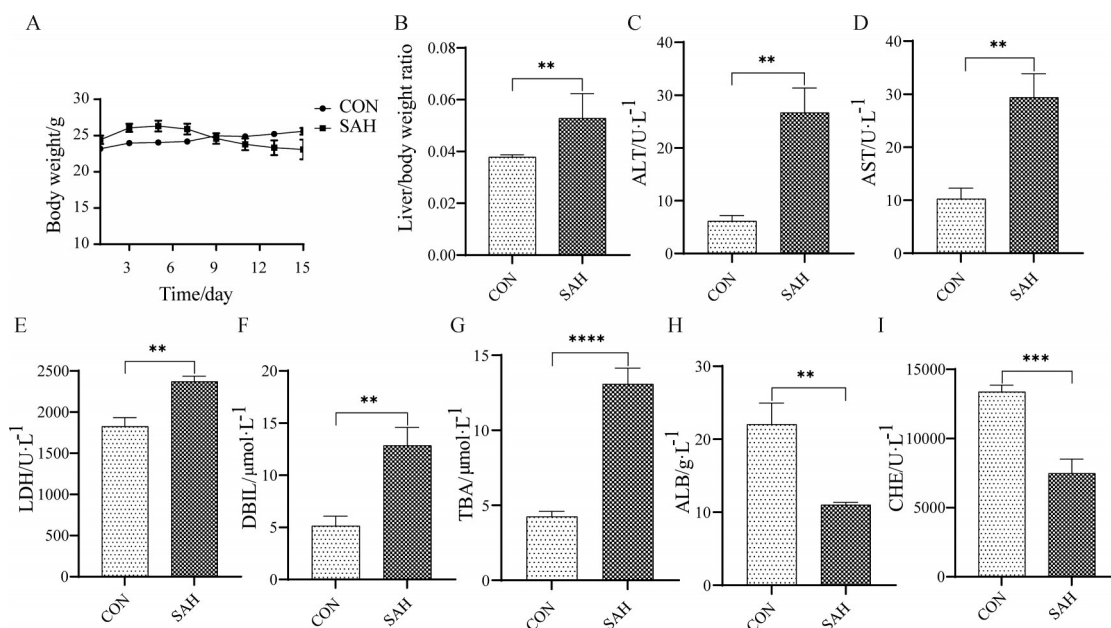


Figure 6 The liver function of SAH mice was significantly impaired. A: Weight change during modeling; B: Liver index; C: Serum ALT; D: Serum AST; E: Serum lactate dehydrogenase (LDH); F: Serum direct bilirubin (DBIL); G: Serum total bile acid (TBA); H: Serum albumin (ALB); I: Serum cholinesterase (CHE). $n = 6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

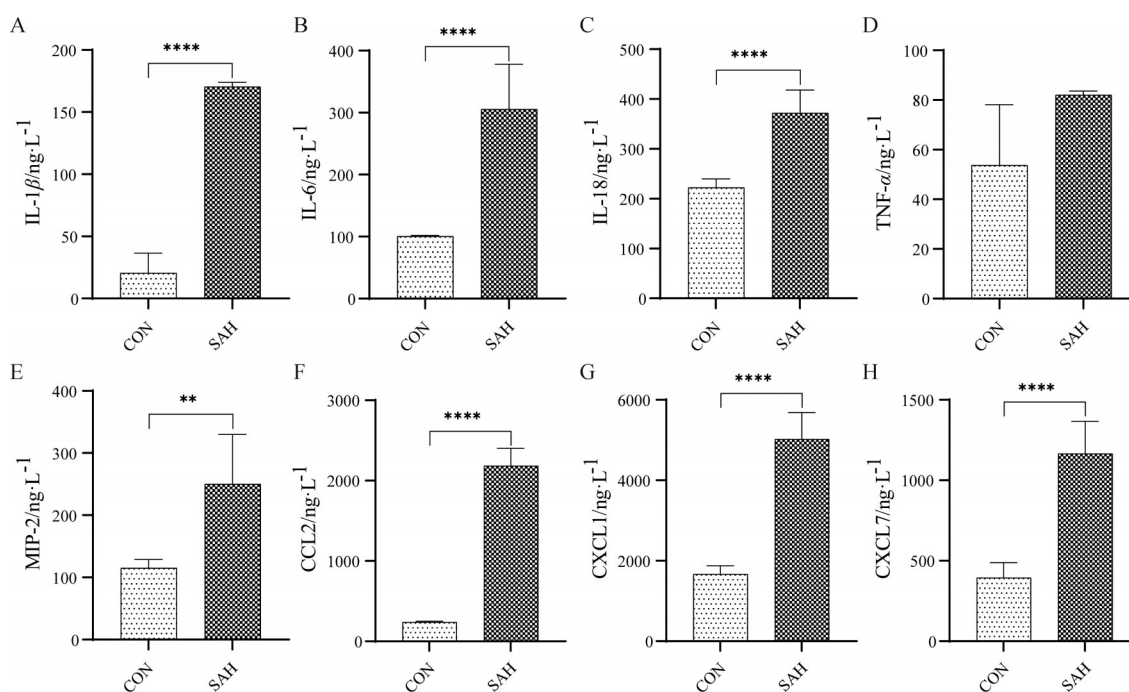


Figure 7 Serum levels of inflammatory factors and chemokines in SAH mice were significantly increased. A: Serum interleukin (IL)-1 β ; B: Serum IL-6; C: Serum IL-18; D: Serum tumor necrosis factor α (TNF- α); E: Serum macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2); F: Serum C-C chemokine ligand 2 (CCL2); G: Serum C-X-C chemokine ligand 1 (CXCL1); H: Serum C-X-C chemokine ligand 7 (CXCL7). $n = 6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

是模拟重症酒精性肝炎长期致病因素的关键。长期酗酒是人类患上重症酒精性肝炎的重要前提,而慢性酒精液体饮食能够精准地重现这一过程。持续摄入酒精会使肝脏持续处于异常代谢状态,引发肝脏细胞内一系列的生化改变。首先肝细胞内脂肪代谢紊乱,脂肪

开始在肝细胞内堆积,逐渐形成脂肪变性,随着时间的推移,这种慢性损伤不断累积,逐渐侵蚀肝脏的正常结构和功能,为重症化发展奠定了基础。在此基础上,大剂量酒精灌胃则是对已经受损的肝脏进行“致命一击”。这一步骤模拟了酗酒者短时间内大量饮酒的极

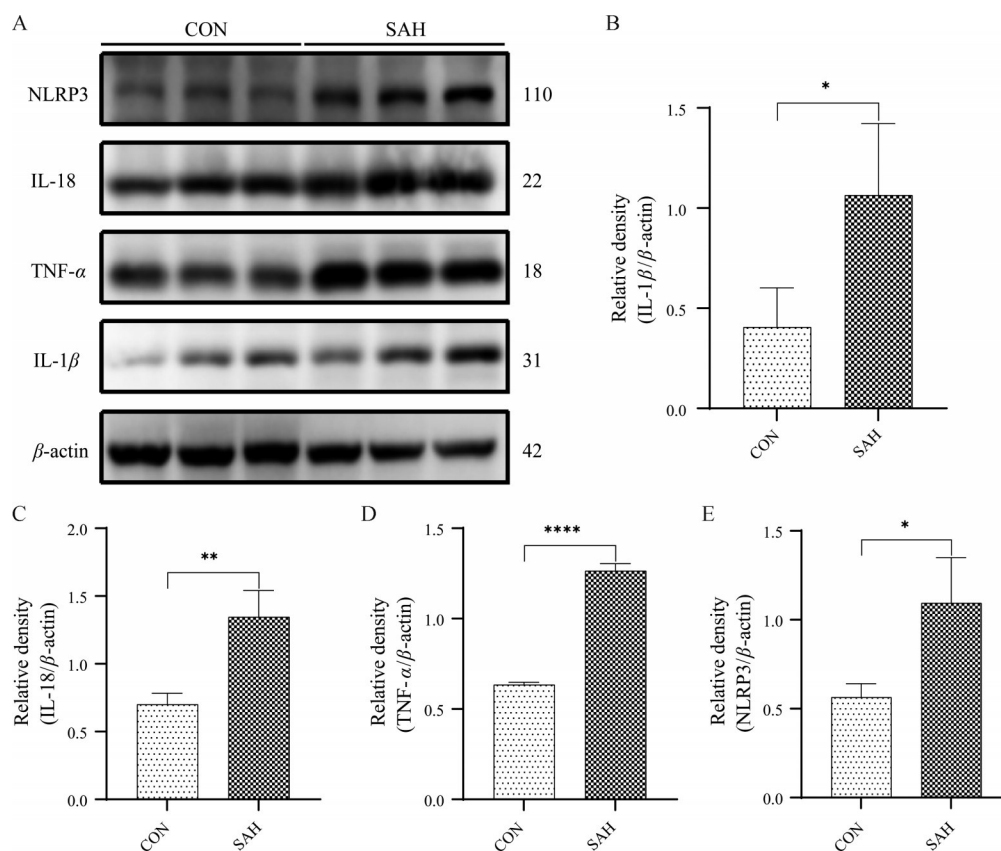


Figure 8 Expression of inflammation related proteins in liver tissue of SAH mice. A: The expressions of IL-1 β , TNF- α , IL-18 and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) were detected by Western blot; B-E: Quantitative analysis of IL-1 β , IL-18, TNF- α , NLRP3 protein. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

端行为。对于已经长期受到酒精慢性损害的肝脏,大剂量酒精灌胃带来的是更严重的破坏。大量酒精迅速进入肝脏,会直接损害肝细胞的细胞膜和细胞器,导致肝细胞内的代谢活动进一步紊乱。这种突然的强烈冲击会加剧肝细胞的损伤,引发急性炎症反应。而且这种炎症反应与慢性损伤相互叠加,使得肝脏的炎症程度急剧上升,更接近重症酒精性肝炎中严重的炎症状态。而LPS干预的加入,则是考虑到了重症酒精性肝炎中内毒素血症这一重要环节。在酒精长期作用下,肠道屏障功能遭到破坏,肠道内的LPS更容易进入血液循环,引发内毒素血症。通过人为给予LPS干预,能够真实地模拟这一病理过程^[24,25]。LPS进入血液后,会迅速激活肝脏内的免疫细胞,尤其是Kupffer细胞^[26]。这些被激活的免疫细胞会释放大量的炎症因子,如TNF- α 、IL-6等,进一步加剧肝细胞的坏死和炎症反应,对肝脏进行“二次打击”,使肝脏病变朝着重症酒精性肝炎的方向发展。而NIAAA模型较符合人类饮酒所导致的酒精性肝病发病模式,因此本研究采用改良的NIAAA模型,即在NIAAA Gao Bin教授建立的acute-on-chronic酒精性肝炎小鼠模型基础上,加大最

后一次急性大剂量灌胃酒精的剂量并联合给予细菌内毒素刺激,模拟临床上SAH患者由于大量饮酒和肠道内毒素诱发急性重症肝炎的特点。

本研究结合实验室前期研究基础,探索了最后一次酒精灌胃剂量以及细菌内毒素的剂量,研究发现7.5 g·kg⁻¹酒精灌胃剂量联合LPS 5 mg·kg⁻¹的剂量最佳,之后进一步探索了LPS刺激后不同作用时间对肝脏的影响,发现在作用12 h后取材,取材前的死亡率为35%,这与SAH的临床短期死亡率较为吻合。此条件下小鼠肝脏功能损伤最为严重,其中小鼠血清ALT的升高水平达到了对照组近5倍,血清AST和TBA的升高水平也为对照组的近3倍,以及病理检测结果与临床患者呈现高度相似性。血清的炎症因子和趋化因子水平均成倍明显升高。其中,肝脏中性粒细胞浸润最为明显。中性粒细胞在SAH中扮演极其重要角色,Wright等^[27]和Zhou等^[28]研究表明,肝脏中性粒细胞的异常浸润可触发炎症,其通过释放炎症介质和活性氧损伤肝细胞。而且,中性粒细胞与特定基因相互作用影响着疾病发展。Hu等^[29]和Kusumanchi等^[30]研究发现应激反应基因FK506结合蛋白5的变化也不容忽

视,它可通过激活相关信号通路和诱导趋化因子表达,导致中性粒细胞募集与炎症加重。此外,免疫反应异常影响显著,Sehrawat等^[31]研究表明酒精引发肠道菌群变化,增加肠道通透性,病原体相关分子模式进入循环激活炎症,同时肝脏免疫细胞如Kupffer细胞被激活,释放炎症因子损伤肝细胞。同时,炎症环境进一步扰乱肝脏的代谢和免疫平衡,让肝脏陷入恶性循环,最终促使重症酒精性肝炎的形成。因此,从肠道角度对肝脏的“二次打击”是造成SAH必不可少的环节。这些机制相互交织,共同构成了重症酒精性肝炎复杂的病理图景。最终,本研究确立在NIAAA模型的基础上,最后一天灌胃酒精 $7.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 联合腹腔注射LPS $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,且作用时间12 h作为SAH小鼠造模条件,可较好地模拟临床SAH的发病过程。

综上,本研究构建的重症酒精性肝炎模型通过病理学检测、血生化指标、肝功水平检测,以及各种血清炎症因子和趋化因子表达水平等方面综合判断,符合临床SAH发生发展的表现,具有出色的稳定性、可行性和易操作性。该模型的建立,可为下一步开展重症酒精性肝炎的致病机制相关研究提供较好的理想动物模型。

作者贡献:朱学进是本文的主要撰写者,搜集资料并分析,撰写草稿;郑淑文、许燕瑜、潘涛协助完成实验;周光德负责提供临床样本切片;刘敏负责指导实验研究;王伽伯、王英豪负责本文思路的提出、指导并修改论文。所有作者阅读并认可终稿。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Ratner JA, Blaney H, Rastegar DA. Management of alcohol withdrawal syndrome in patients with alcohol-associated liver disease [J]. *Hepatol Commun*, 2024, 8: e0372.
- [2] Singal AK, Bataller R, Ahn J, et al. ACG clinical guideline: alcoholic liver disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113: 175-194.
- [3] World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health 2018. Geneva: WHO, 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1>.
- [4] Dang K, Hirode G, Singal AK, et al. Alcoholic liver disease epidemiology in the United States: a retrospective analysis of 3 US databases [J]. *Am J Gastroenterol*, 2020, 115: 96-104.
- [5] Louvet A, Thursz MR, Kim DJ, et al. Corticosteroids reduce risk of death within 28 days for patients with severe alcoholic hepatitis, compared with pentoxifylline or placebo—a meta-analysis of individual data from controlled trials [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155: 458-468.e8.
- [6] Rudler M, Mouri S, Charlotte F, et al. Prognosis of treated severe alcoholic hepatitis in patients with gastrointestinal bleeding [J]. *J Hepatol*, 2015, 62: 816-821.
- [7] Ma J, Guillot A, Yang Z, et al. Distinct histopathological phenotypes of severe alcoholic hepatitis suggest different mechanisms driving liver injury and failure [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132: e157780.
- [8] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454: 428-435.
- [9] McDonald B, Pittman K, Menezes GB, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation [J]. *Science*, 2010, 330: 362-366.
- [10] Gao B, Ahmad MF, Nagy LE, et al. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2019, 70: 249-259.
- [11] Weichselbaum L, Azouz A, Smolen KK, et al. Epigenetic basis for monocyte dysfunction in patients with severe alcoholic hepatitis [J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 303-314.
- [12] Bertola A, Mathews S, Gao B, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8: 627-637.
- [13] Chen SN, Tan Y, Xiao XC, et al. Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42: 1610-1619.
- [14] Hou X, Yang S, Yin J. Blocking the REDD1/TXNIP axis ameliorates LPS-induced vascular endothelial cell injury through repressing oxidative stress and apoptosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316: C104-C110.
- [15] Li X, Gui R, Wang X, et al. Oligosaccharides isolated from *Rehmannia glutinosa* protect LPS-induced intestinal inflammation and barrier injury in mice [J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1139006.
- [16] Nagy LE. The role of innate immunity in alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Res*, 2015, 37: 237-250.
- [17] Cao S, Liu M, Sehrawat TS, et al. Regulation and functional roles of chemokines in liver diseases [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18: 630-647.
- [18] Park SH, Seo W, Xu MJ, et al. Ethanol and its nonoxidative metabolites promote acute liver injury by inducing ER stress, adipocyte death, and lipolysis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15: 281-306.
- [19] 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: 1828-1840.
- [20] Philips CA, Augustine P, Yerol PK, et al. Severe alcoholic hepatitis: current perspectives [J]. *Hepat Med*, 2019, 11: 97-108.
- [21] Louvet A, Labreuche J, Dao T, et al. Effect of prophylactic antibiotics on mortality in severe alcohol-related hepatitis: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2023, 329: 1558-1566.
- [22] Louvet A, Labreuche J, Moreno C, et al. Early liver transplantation for severe alcohol-related hepatitis not responding to medical treatment: a prospective controlled study [J]. *Lancet*

- Gastroenterol Hepatol, 2022, 7: 416-425.
- [23] Tornai D, Szabo G. Emerging medical therapies for severe alcoholic hepatitis [J]. Clin Mol Hepatol, 2020, 26: 686-696.
- [24] Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease [J]. Gastroenterology, 2015, 148: 30-36.
- [25] An L, Wirth U, Koch D, et al. The role of gut-derived lipopolysaccharides and the intestinal barrier in fatty liver diseases [J]. J Gastrointest Surg, 2022, 26: 671-683.
- [26] Hoo RL, Lee IP, Zhou M, et al. Pharmacological inhibition of adipocyte fatty acid binding protein alleviates both acute liver injury and non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. J Hepatol, 2013, 58: 358-364.
- [27] Wright HL, Lyon M, Chapman EA, et al. Rheumatoid arthritis synovial fluid neutrophils drive inflammation through production of chemokines, reactive oxygen species, and neutrophil extracellular traps [J]. Front Immunol, 2021, 11: 584116.
- [28] Zhou X, Yang L, Fan X, et al. Neutrophil chemotaxis and NETosis in murine chronic liver injury *via* cannabinoid receptor 1/*Gai*/*o*/ROS/p38 MAPK signaling pathway [J]. Cells, 2020, 9: 373.
- [29] Hu Y, Yang B, Xu Y, et al. FK506 suppresses hypoxia-induced inflammation and protects tight junction function *via* the CaN-NFATc1 signaling pathway in retinal microvascular epithelial cells [J]. Mol Med Rep, 2017, 16: 6974-6980.
- [30] Kusumanchi P, Liang T, Zhang T, et al. Stress-responsive gene FK506-binding protein 51 mediates alcohol-induced liver injury through the Hippo pathway and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 signaling [J]. Hepatology, 2021, 74: 1234-1250.
- [31] Sehrawat TS, Liu M, Shah VH. The knowns and unknowns of treatment for alcoholic hepatitis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5: 494-506.