维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0081-04

大鼠慢性酒精性脂肪肝模型的建立

古 赛[1],蒋小黎[2],何 琳[3],王丕龙[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016;2. 南岸区第一人民医院内科,重庆 4000061;
3. 重庆医科大学附属第一医院 B 超室,重庆 400016)

【摘 要】目的:复制大鼠慢性酒精性脂肪肝模型。方法:53 只大鼠分为对照组和模型组(分别为小、中、大剂量组)。模型各组给予 40%(v/v)乙醇[小剂量组 7 g/(kg·d)、中剂量组 8 g/(kg·d)、大剂量组 9g/(kg·d)]分 2 次灌胃至 4w 末,乙醇浓度增至 50%(v/v)[小剂量组 8 g/(kg·d)、中剂量组 9 g/(kg·d)、大剂量组 10g/(kg·d)]分 2 次灌胃至 8w 末,做肝脏 B 超,测血清 ALT、AST、γ-GT 及病理形态学观察。结果:模型组大鼠 8 周末除 ALT 与对照组无显著性差异外,AST、γ-GT、AST/ALT 均有显著性差异,但组间无差异。病理观察中和大剂量组出现肝脏脂肪变,小剂量组仅部分出现脂肪变。B 超与病理吻合率达 79.17%。结论:中剂量组乙醇灌胃 8w 末,即可造成稳定的慢性酒精性脂肪肝模型。

【关键词】慢性酒精性肝病;大鼠模型;病理学;超声学
【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-08-05

Establishment of experimental model of chronic alcoholic fatty liver in rats

GU Sai, et al

(*Department of Gastroenterology, the First Affilated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish an experimental animal model of chromic alcoholic fatty liver. *Methods*: Fifty three Wister rats were divided into four groups: control group and model groups (lower dose ethanol group, medium dose ethanol group and higher dose ethanol group). The rats in model groups were induced by ethanol intragastric infusion of 40% (v/v) ethanol orally [7g/(kg·d) for lower group, 8 g/(kg·d) for medium group and 9 g/(kg·d) for higher group], two times a day for the first 4 weeks. Ethanol intragastric infusion of 50% (v/v) ethanol orally [8 g/(kg·d) for lower group, 9 g/(kg·d) for medium group and 10 g/(kg·d) for higher group], two times a day for the second 4 weeks. Then, the liver was examined by Ultrasonography. The pathologic changes were observed and the amount of ALT, AST, γ-GT in serum were detected at the end of the eighth week. *Results*: At the end of eighth week, serum AST and γ-GT levels were increased significantly in model groups. The typical fatty liver pathologic changes of chronic alcoholism were observed in rats in medium and higher dose model groups. *Conclusions*: Experimental model of chronic alcoholic fatty liver can be established in rats with ethanol intragastric infusion.

【Key words】 Chronic alcoholic liver disease; Rat model; Pathology; Ultrasonography

我国酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的发病率逐渐增高,要探讨其发病的机制及病理过程,评判药物疗效,建立可重复、简单易行且稳定的动物模型十分重要。近来国内多采用乙醇灌胃法造模,由于乙醇浓度、剂量、灌胃次数、添加剂的不同,造成造模不稳定,动物死亡率或避而不报,或较高。为此,本实验意在探索一个标准的稳定的酒精性肝损伤大鼠模型。

作者介绍:古 赛(1967-),女,副教授,博士生,
主要研究方向:酒精性肝病。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 Wistar 清洁级大鼠 53 只,体重 180~230g,购于第三军医大学实验动物中心,动物合格证号为 SCXK(渝)2002002。

1.2 仪器与试剂

无水乙醇(国产分析纯),OLYMPUS AU5400 全自动化生化分析仪,ALT、AST 试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司,γ-GT 试剂盒购于日本第一化学株式会社。GEVoluson730 超声仪,探头频率 10MHz。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 方法

53 只大鼠在重庆医科大学实验动物中心适应性饲养 1w 后，随机分为四组，对照组 8 只，小剂量模型组，中剂量模型组和大剂量模型组各 15 只，分笼饲养，每笼 4~5 只，按昼夜时程，在室温及稳定湿度条件下，全价颗粒饲料喂养。模型组大鼠给予 40%（v/v）乙醇灌胃，小剂量组乙醇 7g/（kg·d），中剂量组乙醇 8g/（kg·d），大剂量组乙醇 9g/（kg·d），均分 2 次灌胃，2 次间隔 8~9h，灌胃至 4w 末，自 5w 开始，将乙醇浓度增至 50%（v/v），小剂量组乙醇 8 g/（kg·d），中剂量组乙醇 9g/（kg·d），大剂量组乙醇 10g/（kg·d），同前分 2 次灌胃，至 8w 末。对照组给等体积生理盐水，每日分 2 次灌胃至 8w 末。所有大鼠禁食禁饮 12h 后，B 超探测肝脏，再摘取眼球取血，制备血清，检测丙氨酸氨基转移酶（ALT），天冬氨酸氨基转移酶（AST），γ－谷氨酰转移酶（γ-GT）。剖腹取肝脏左叶同一部位组织，10%甲醛固定，石蜡包埋，切片，HE 染色，光学显微镜下行组织病理学观察。

1.4 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较用两样本均数 t 或 t' 检验。

2 结 果

2.1 一般情况

对照组大鼠皮毛光泽，行动灵活，进食量及大便正常。模型各组大鼠在乙醇灌胃后数十分钟出现困倦，动作迟缓，步态不稳，部分酣睡，约需 2～3h 方完全恢复常态，进食减少，大便稀溏，体重下降，精神不振，2w 后上述症状减轻，但皮毛渐粗糙，失去光泽，体重增长缓慢。8w 结束时，对照组大鼠无 1 只死亡，小剂量模型组死亡 2 只，均为灌胃时酒精误吸入气管，中剂量组死亡 2 只，1 只为酒精误吸入气管，1 只为肺部感染死亡，可能为吸入性肺炎所致，大剂量组死亡 8 只，2 只为酒精误吸入气管，2 只肺部感染死亡，4 只死因不明（解剖未发现脏器有明显病变，考虑为酒精中毒所至中枢神经抑制）。

2.2 肝功能结果见表 1

表 1 中可见，与对照组相比，模型组各组 ALT 无显著性差异，组间亦无差异；AST、γ-GT、AST/ALT 均较对照组有显著性差异，各模型组 AST、γ-GT、AST/ALT 均较对照组明显升高，但各组间无显著性差异。

2.3 肝脏大体标本观察

各模型组大鼠肝脏质地较对照组硬，色泽较暗淡，对照组大鼠肝脏被膜光滑，呈红褐色，质软。

2.4 肝脏组织病理学观察

光镜下，肝脏组织 HE 染色，对照组可见正常肝细胞以小叶中央静脉为中心呈放射状排列，肝小叶轮廓清晰，肝细胞呈多边形，细胞分界清，核圆，位于细胞中央，胞浆丰富，呈嗜碱性（图 1）；小剂量模型组仅有 5 例肝板排列稍显紊乱，肝细胞轻度浊肿，部分（少于肝细胞总数的 1/3）肝细胞胞质中可见大小不等圆形脂滴空泡，依脂变范围分级为轻度脂肪变[1]，其余 8 例未见肝细胞有明显空泡变性；中剂量组 13 例均出现轻到中度脂肪变，可见中央静脉周围肝细胞排列紊乱，肝细胞肿大，胞浆中大小不等的空泡明显增多，肝细胞有灶性坏死（图 2）；大剂量组则除 1 例无明显空泡变外，余 6 例均为中到重度空泡变性，严重者可见肝板排列十分紊乱，肝细胞胞体肿大呈球形，胞质明显减少，细胞核固缩，被脂肪滴挤压偏位，脂肪变性中均可见有散在和局灶性炎性细胞浸润（图 3）。中剂量组和大剂量组中有的肝组织切片可见肝细胞浆中有红色颗粒状 Mallory 小体（图 4）。

2.5 B 超

对照组肝包膜光滑，血管走行自然，显影清晰，小剂量组 3 例肝脏实质回声较对照组降低，提示有肝脂肪变，病理亦证实有脂肪变性；中剂量组 10 例和大剂量组 6 例肝脏实质回声降低，可见条状、线状中强回声，门脉管壁回声增强，提示有脂肪变，与病理吻合。

3 讨 论

表 1 酒精模型各组大鼠 8 周末肝功能检测结果

分组	n	ALT	AST	γ-GT	AST/ALT
对照组	8	45.50 ± 5.03	105.13 ± 15.74	1.25 ± 0.46	2.37 ± 0.50
小剂组	13	46.00 ± 4.98*	191.08 ± 50.52#	3.62 ± 1.89#	4.23 ± 1.30#
中剂组	13	47.55 ± 6.89*	233.18 ± 37.67#	4.82 ± 0.98#	4.30 ± 0.63#
大剂组	7	48.14 ± 5.27*	224.43 ± 33.89#	3.71 ± 0.76#	4.70 ± 0.85#

*P>0.05, #P<0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com

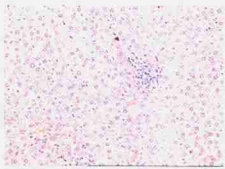


图 1 正常饲养 8w 大鼠肝组织病理切片(HE×100)



图 2 中剂量乙醇灌胃 8w 大鼠肝组织病理切片(HE×100)

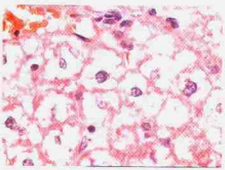


图 3 大剂量乙醇灌胃 8w 大鼠肝组织病理切片(HE×400)

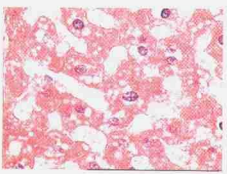


图 4 中剂量乙醇灌胃 8w 大鼠肝组织病理切片(HE×400)

制备标准、完善的动物模型，是研究一切疾病的基础。酗酒成为当今世界的严重问题，因而对 ALD 的研究成为热点。目前的 ALD 动物模型有在饮水中加入酒精的模型、Liber-Decarli 液体食料和液体食料加辅剂模型[2,3]、Tsukamato French 大鼠模型[4,5]以及国内常用的酒精灌胃模型[6,7]。

饮水中加入酒精是最早的造模方法，简单易行，但不能保证每只动物饮酒量的一致和血中有效的酒精浓度，造模成功率不高。Liber-Decarli 液体食料保证了大鼠长期摄入酒精和营养，成功率高，稳定性好，但液体食料配制后，由于酒精易挥发，使其贮存较困难，大鼠厌酒，故液体食料含酒精量低，且仍不能保证每只大鼠都能摄入等量酒精，因而造模时间较长，多需超过 16w 方有肝脏脂肪变性。Tsukamato French 大鼠模型既单笼饲养胃造瘘持续注入含乙醇的液体饲料，该法不但完全控制了酒精和营养物的摄入量，可研究酒精与营养因素的相互作用，还可同时中心静脉取血，监测血中乙醇浓度，且死亡率低，3 个月再现 ALD 的发展病程，但其不符合人类正常的酒精摄入途径，且操作复杂，价格昂贵，限制了在国内的推广应用。

目前国内酒精灌胃采用 2 种，一种为酒精体积分数为 0.56 的红星二锅头，由于市售白酒均含有复杂的添加剂，虽符合人类饮用习惯，但发生的病变不能完全视为乙醇的影响。另一种，也是本实验采用的无水乙醇，用蒸馏水稀释成不同浓度灌胃，但为造模成功，大多添加有高脂饲料[8,9]，如猪油、胆固醇、玉米油等，有的还加入肝毒性剂吡唑等乙醇脱氢酶抑制剂[10]，均不符合单纯性酒精性肝损伤的致病过程。本实验用普通饲料喂养（脂肪控制在 5%以内），酒精灌胃造模成功，表明酒精性脂肪肝及酒精性肝炎是基于酒精刺激下的脂肪合成增多，而非食物脂肪在肝脏的沉积增多，这一结果不支持 Liber 等人认为的食物脂肪是酒精性脂肪肝中蓄积的甘油三脂的重要来源[11]。

关于乙醇灌胃次数问题，有些学者采用每日 1 次灌胃法，但大鼠往往死于急性胃扩张或急性胃出血，死亡率增加（多为 1/3 左右）[12,13]；有的则分为 3 次灌胃，不仅对大鼠干扰大，且增加工作量，死亡率仍较高（接近 1/4）[14]。本实验采用 2 次灌胃法，死亡率减少（2/15）。

血清酶学方面，本实验模型组大鼠 8w 末时，除 ALT 各组与对照组相比无显著性差异外，其余

维普资讯 http://www.cqvip.com

AST、γ-GT、AST/ALT 均显著性升高，但各模型组间无统计学差异。这与各家报道乙醇可导致大鼠血清 ALT 升高不一致，本实验亦观察到各模型组 4w 末时 ALT 值较对照组升高，8w 末时测值有所下降，而 AST、γ-GT 则升高更为明显。考虑可能早期乙醇致肝脏损伤以破坏肝细胞膜，释放胞浆中 ALT 为主，稍后期则以损伤肝细胞线粒体，释放 AST 为主，并诱导微粒体生物转化系统使体内 γ-GT 增高。我们还观察到大剂量组 1 例虽血清 AST、γ-GT 明显升高，但病理形态未发现肝细胞明显空泡变，说明血清酶学改变可早于组织病理学改变，且个体间存在较大差异。进一步分析每只大鼠血清酶学升高程度与肝脏病理形态学改变程度不成正比，说明肝酶谱升高程度与病理学改变程度无明显正相关。

本实验模型组大鼠肝细胞脂滴空泡变与炎症浸润并存，这支持 ALD 各期病理改变可以并存的观点。Mallory 小体是 ALD 较为特征性的病理标志，它可能来源于中间丝蛋白合成与降解的异常，其出现率各家报道不一。本实验中部分大鼠病理切片中发现有 Mallory 小体，亦为肝脏脂肪变性的一个佐证。

B 超为本模型建立提供了一个值得探讨的观测指标，既简便又无创。本实验观察到病理改变与 B 超提示脂肪变的吻合率达到 79.17%（24 例病理有明显空泡变性大鼠中有 19 例 B 超呈阳性提示）。但本实验观察例数尚不够，B 超的经验亦不足，还需进一步扩大标本量加以研究。

本实验采用酒精分 2 次灌胃，配合普通饮食，8w 时小剂量组造模并不稳定，有部分大鼠肝脏病理未发现明显脂肪变，大剂量组则死亡率高，中剂量组死亡率低，造模较稳定，成功率高。这与许多文献报道的需 12w 形成中度脂肪肝模型相比，节约了时间，本方法造模时间缩短可能与乙醇起始浓度较大，并在 1 月后递增，每日两次灌胃，且间隔均为 10h 左右，保持了大鼠体内 24h 较稳定酒精浓度，又减少了死亡率，是一值得推广的造模方式。

参 考 文 献

[1] 欧 明. 汉英常用中医处方手册[M]. 广州：广东科学技术出版社, 1991；208.

[2] Lieber C S, DeCarli L M. The feeding of ethanol inliquid diets:1986 [J]. Alcohol Clin Exp Res,1986；10(5):550-553.

[3] Yokoyama H, Nagata S, Moriya S, et al. Hepatic fibrosis produced in guinea pigs by chronic tehanol administration and immunization with acetadehyde adducts[J]. Hepatology, 1995；21(5):1438-1442.

[4] Tsukamoto H, Reidelberger R D, French S W, et al. Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat[J]. Am J Physiol,1984；247(3Pt2):R595-R599.

[5] 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.

[6] 林 红，吕 森，张义侠，等. 酒精性肝病大鼠模型的建立[J]. 世界华人消化杂志，2001；9(1):24-28.

[7] 李东良，王玉玫. 大鼠酒精性肝损伤模型的建立与病理学观察[J]. 实用肝脏病杂志, 1998；3(4)：207-208.

[8] 范建高，曾民德，钟 岚，等.牛磺酸、金牡蛎对大鼠酒精性肝损伤的防治作用[J]. 肝脏, 1999；4(3)：154-156.

[9] 扈国杰，李佃贵，栗世方，等. 酒精性脂肪肝大鼠模型的建立及新清肝饮煎剂的防治作用[J]. 中西医结合学报, 2004；2(2)：123-137.

[10] Lindros KO, Stowell L, Vaanaoen H, et al. Uninterrupted prolonged ethanol oxidation as a main pathogenetic factor of alcoholic liver damage evidence from new liquid diet animal[J]. Liver, 1983；3(2):79-91.

[11] Rubin E, Lieber CS. Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates[J]. N Eng J Med, 1974；290(3):128-135.

[12] 李舒丹，历有名，虞朝辉，等.大鼠慢性酒精性肝损伤模型的建立[J].浙江医学，2002；24(9)：524-526.

[13] 张 宁，陈韶华，张幸国，等.茶多酚治疗慢性酒精性肝损伤的实验研究[J].中华肝脏病杂志，2005；13(2)：125-127.

[14] 林 红，吕 森，张义侠，等.酒精性肝病大鼠模型的建立[J].世界华人消化杂志，2001；9(1)：24-28.

（上接第 80 页）

gation of Stenotrophomonas maltophilia isolates exhibiting rapid emergence of ticarcillin-clavulanate resistance[J]. J Hosp Infect, 2000; 45(1):35-41.

[5] Sillber S, Pfaller MA, Hollis RJ, et al. Evalution of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli.Infect Control Hosp Epidemiol[J].2004;25(10):847-851.

[6] Avison MB, Higgins CS, von Heldrich CJ, et al. Plasmid location and molecular heterogenity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of Stenotrophomonas maltophilia[J]. Antimicrob Agents Chemother,2001; 45(2):413-419.