

FH/Wjd 大鼠酒精性肝损伤模型探讨

张彦芬, 秘尧, 何奇龙, 王宏涛

(河北以岭医药研究院, 石家庄 050035)

【摘要】 目的 对 FH/Wjd 大鼠酒精性肝损伤模型进行探讨。方法 FH/Wjd 大鼠按体重随机分为饮水组和饮酒组, 两组均自由饮食。16 周后取血, 检测血清 ALT、AST、TBIL、TG、CHO; 取肝脏, 匀浆后检测 TG、GSH; 流式细胞仪检测肝细胞凋亡率; Western blot 检测肝脏组织 PPAR α 蛋白表达; 肝脏 HE 染色观察组织病理学改变。结果 与饮水组比较, 饮酒组两种性别 FH/Wjd 大鼠血清 TBIL、TG 含量显著升高, 饮酒组雌性大鼠血清 ALT、CHO 显著降低; 饮酒组两种性别大鼠肝脏 TG 含量显著升高, GSH 含量呈现降低趋势; 饮酒组两种性别大鼠肝细胞凋亡率亦呈降低趋势; 饮酒组肝脏 PPAR α 蛋白表达明显上调; 饮酒组组织病理学改变以小泡性脂肪变性为主。结论 长期自主摄入酒精可以造成 FH/Wjd 大鼠肝脏损伤。

【关键词】 FH/Wjd 大鼠; 酒精; 肝脏损伤; PPAR α 蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0059-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.013

Exploration of a FH/Wjd rat model of alcoholic liver disease

ZHANG Yan-fen, MI Yao, HE Qi-long, WANG Hong-tao

(Hebei Yiling Pharmaceutical Research Institute, Shijiazhuang 050035, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the FH/Wjd rat model of alcoholic liver disease. **Methods** Thirty-six 16 - 18 week old SPF grade FH/Wjd rats (male:female = 1:1) were used in this study. The rats were divided into two groups randomly by body weight: water intake group and alcohol intake group. The rats took water or alcohol freely. 16 weeks later, ALT, AST, TBIL, TG, CHO in the serum and TG, GSH in the liver homogenate were detected. The expression of PPAR α protein in the liver tissue was detected by Western blot. The apoptosis rate of liver cells was assessed by flow cytometry. The pathological changes of liver tissue were examined using HE staining. **Results** Compared with the water intake group, the serum TBIL and TG were significantly increased in rats of both sexes of the alcohol intake group, moreover, ALT and CHO of the female rats in the alcohol intake group were significantly decreased. TG in the liver homogenate increased obviously, while GSH in the liver homogenate showed a decreasing tendency. Hepatocyte apoptosis in rats of both sexes in the alcohol intake group showed an increasing tendency. The PPAR α protein expression was up-regulated obviously, and the main pathological change in the liver tissue was microvesicular fatty degeneration. **Conclusion** Spontaneous long-term alcohol intake can induce liver injuries in FH/Wjd rats.

【Key words】 FH/Wjd rat; PPAR α ; Alcoholic liver disease

FH/Wjd 大鼠是纽约卫生中心 W. Jean Dodds 教授将远交系 Wistar 大鼠近亲繁殖了 19 代得到的, 这个品系的大鼠具有遗传性 5-HT 功能低下和大量自主饮酒的特点^[1]。北京大学中国药物依赖性研究所于 2007 年将 FH/Wjd 大鼠引入我国并成

功繁殖, 是我国第一个先天嗜酒的大鼠模型, 同时也是一个先天抑郁症的模型。目前主要用于精神依赖物质及其戒断的研究。我们根据其嗜酒特性, 观察了长期饮酒后 FH/Wjd 肝脏病变相关指标, 探讨其作为肝脏损伤动物模型的可行性。

【基金项目】 太行山道地、大宗药材综合利用技术及产业化开发项目(13042506Z)。

【作者简介】 张彦芬(1979 -), 女, 工程师, 研究方向: 中药药理学。

【通讯作者】 王宏涛, 高级工程师, E-mail: wanghongtao@yiling.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

SPF 级 FH/W jd 大鼠 36 只,雌雄各半,12~16 周龄。雄性体重 280~320 g,雌性体重 160~200 g。来源于北京大学医学部实验动物科学部[SCXK(京)2011-0012]。动物饲养于河北省中西医结合医药研究院新药评价中心[SYXK(冀)2009-0033],光照 12h/d,温度 20~25℃,相对湿度 40%~70%。

1.1.2 主要试剂

无水乙醇购自天津市大茂化学试剂厂。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHO)生化检测试剂盒购自北京九强。组织 TG 试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。组织谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。PPAR α 一抗购自 Abcam 美国公司。

1.2 方法

1.2.1 造模方法^[2]

将 36 只大鼠单笼饲养,按体重随即分为 2 组,即饮水组和饮酒组。饮水组每日自由摄取无菌水,饮酒组自由饮用 15% 乙醇溶液,持续 16 周。每周 2 次监测饮酒组大鼠乙醇摄入量,计算公式如下(M_E 为纯乙醇摄入量, m_E 为乙醇溶液摄入量, C_E 为乙醇浓度, ρ_E 为乙醇密度, ρ_W 为水密度,BW 为体重):

$$M_E = \frac{m_E \times \rho_E}{\left[\rho_E + \frac{(1 - C_E)}{C_E} \times \rho_W \right] \times BW}$$

表 1 酒精摄入对雄性 FH/Wjd 大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab.1 Influence of alcohol on the serum biochemical indicators in the male FH/Wjd rats

组别 Groups	ALT /IU/L	AST /IU/L	TBIL / μ mol/L	TG /mmol/L	CHO /mmol/L
饮水组 Water intake	76.4 \pm 40.9	96.6 \pm 35.2	0.73 \pm 0.29	0.47 \pm 0.07	2.04 \pm 0.28
饮酒组 Alcohol intake	64.6 \pm 10.9	85.3 \pm 7.2	1.07 \pm 0.32*	0.73 \pm 0.16**	1.98 \pm 0.33

注:与饮水组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the water intake group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 酒精摄入对雌性 FH/Wjd 大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab.2 Influence of alcohol intake on serum biochemical indicators in the female FH/Wjd rats

组别 Groups	ALT /IU/L	AST /IU/L	TBIL / μ mol/L	TG /mmol/L	CHO /mmol/L
饮水组 Water intake	55.6 \pm 12.6	88.1 \pm 11.6	1.01 \pm 0.18	0.46 \pm 0.05	1.69 \pm 0.33
饮酒组 Alcohol intake	44.7 \pm 7.5*	78.9 \pm 10.3	1.36 \pm 0.39*	0.63 \pm 0.15**	1.39 \pm 0.15*

注:与饮水组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the water intake group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

1.2.2 指标检测

10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,4℃、3000 r/min 转离心 10 min,分离血清,全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST、TBIL、TG、CHO。取肝脏组织约 100 mg,70% 乙醇固定,制成单细胞悬液,碘化丙啶染色,Epics XL 流式细胞仪检测,用 exp Analysis 软件分析细胞凋亡率。取肝脏组织 200 mg,制备组织匀浆,检测肝脏匀浆中 TG、GSH。取肝脏组织约 100 mg,Western 法检测肝脏组织过氧化物酶体增殖物激活受体 α ^[3,4] (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α) 蛋白表达。留取部分肝脏甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色,观察肝脏病理组织学改变。

1.2.3 统计方法

实验数据采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,统计方法为独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性,统计结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 血清生化

雄性大鼠饮酒组与饮水组相比,TBIL 与 TG 明显升高,且有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);转氨酶及 CHO 略有降低,但无统计学差异。雌性大鼠饮酒组与饮水组相比,除 TBIL 与 TG 明显升高外($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),ALT、CHO 降低更为明显,且有统计学差异($P < 0.05$)。见表 1、表 2。

2.2 肝组织生化

雌、雄大鼠饮酒组与饮水组相比,肝组织匀浆液中 TG 含量均明显升高,且有统计学差异 ($P < 0.01$);GSH 含量有降低趋势,但未见统计学差异。见表 3、表 4。

表 3 酒精摄入对雄性 FH/Wjd 大鼠肝组织生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab. 3 Influence of alcohol intake on the biochemical indicators of liver tissue of the male FH/Wjd rats

组别 Groups	TG / $\mu\text{mol/gprot}$	GSH / $\mu\text{g/mgprot}$
饮水组 Water intake	73.67 \pm 9.89	249.08 \pm 155.86
饮酒组 Alcohol intake	271.11 \pm 58.34 **	163.77 \pm 145.03

注:与饮水组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the water intake group, ** $P < 0.01$.

表 4 酒精摄入对雌性 FH/Wjd 大鼠肝组织生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab. 4 Influence of alcohol intake on biochemical indicators of liver tissue of the female FH/Wjd rats

组别 Groups	TG / $\mu\text{mol/gprot}$	GSH/ $\mu\text{g/mgprot}$
饮水组 Water intake	86.30 \pm 68.15	248.97 \pm 72.86
饮酒组 Alcohol intake	348.08 \pm 132.72 **	186.93 \pm 81.53

注:与饮水组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the water intake group, ** $P < 0.01$.

2.3 肝细胞凋亡

雌、雄大鼠饮酒组与饮水组相比,肝细胞凋亡率有升高趋势,但未见统计学差异。见表 5。

表 5 酒精摄入对 FH/Wjd 大鼠肝细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab. 5 Influence of alcohol intake on the apoptosis in hepatocytes of the FH/Wjd rats

组别 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate	
	雄性 Male	雌性 Female
饮水组 Water intake	24.13 \pm 9.41	25.85 \pm 11.81
饮酒组 Alcohol intake	35.78 \pm 12.11	44.17 \pm 17.27

2.4 肝 PPAR α 蛋白表达

饮酒组与饮水组相比,肝脏组织 PPAR α 蛋白表达明显降低,且有统计学差异 ($P < 0.05$)。见图 1、图 2。

2.5 组织病理学

饮水组肝组织结构正常,肝小叶结构完整,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞索、肝血窦排列规则,未见炎细胞浸润、肝细胞变性、坏死等病理变化。饮酒组可见肝细胞空泡变性(符合小泡性脂肪变的病理特点)、小灶性,多发,偶见坏死。见图 3(彩插 4)。

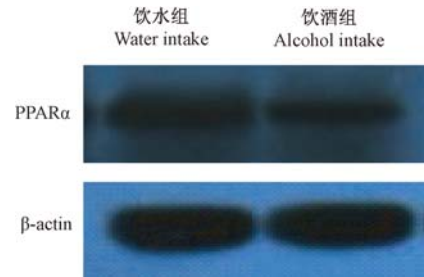
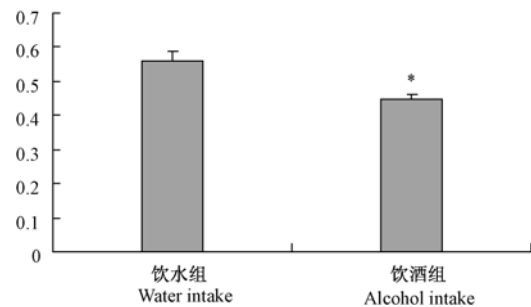


图 1 肝脏组织 PPAR α 的蛋白表达

Fig. 1 Expression of PPAR α protein in the rat liver tissues



注:与饮水组相比, * $P < 0.05$

图 2 肝脏组织 PPAR α 的蛋白表达

Note: compared with the water intake group, * $P < 0.05$.

Fig. 2 Expression of PPAR α protein in the rat liver tissue

3 讨论

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是由于长期大量饮酒导致的肝中毒性损害,包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和肝硬化^[5]。为了研究 ALD 的发病机制,筛选有效的治疗药物,建立相应的动物模型是非常有必要的。

关于酒精性肝损伤的动物模型主要有强制灌酒、自由摄入酒精食料 (Lieber-Decarli)^[6-8],前者乙醇溶液浓度过大或体积过大都会严重损伤消化道,长期灌胃酒精大鼠死亡率高,短期则造成乙醇摄入量低;后者由于大鼠厌酒,也会导致乙醇摄入量受限。为控制厌酒的大鼠的酒精摄入,以保证血液中长期维持高浓度的酒精,1984 年 Tsukamoto-French 等^[9]给 SD 大鼠手术植入胃管,持续注入含酒精的液体食料。但该模型中酒精是强制注入的,不符合正常摄入过程,并且制作此模型需要一些技术上的特别训练,不易复制。FH/Wjd 大鼠先天嗜酒特性使其在自然状态下可以自由饮用大量酒精,与人类饮酒行为非常相似,实验操作简便易行。

从本次实验数据可以看出, FH/Wjd 大鼠自由

饮酒 16 周后,血清 TG 和 TBIL 变化较大,从 GSH 可以推测肝脏可能出现了氧化损伤,而病理改变则以小泡性脂肪变性为主,这与肝脏 TG 含量升高吻合。与脂代谢密切相关的 PPAR α 的蛋白表达受到了明显影响,并且肝细胞凋亡率有升高趋势。饮酒组大鼠血清 CHO 有所降低,雌性动物降低程度尤为明显,可能是由于肝细胞受损,胆固醇酯生成减少,导致血清胆固醇总量降低。饮酒组大鼠血清 AST、ALT 均呈现降低趋势,同时血清 TBIL 水平升高,其中雌性大鼠 ALT 降低较为明显,与饮水组出现了显著统计学差异。临床上这种胆酶分离的现象是由于肝细胞大量坏死,对胆红素的处理能力进行性下降,同时转氨酶进行性耗竭造成的,所以我们推测 FH/Wjd 大鼠这种血清生化指标的改变与肝细胞受损或坏死有关。

本模型采用了两种性别的动物,从数据来看,雌雄动物各数据的变化趋势是一致的,但变化程度有一定差异,雌性动物变动幅度较雄性动物略大。在乙醇摄入量监测时发现,雌性动物乙醇摄入量高于雄性动物,故推测病变程度性别差异可能与此有关。本研究对 FH/Wjd 大鼠作为酒精性肝损伤动物模型的可行性进行了初步探讨,此模型仍然有待我们进一步深入研究。

(本文图 3 见彩插 4。)

参 考 文 献

- [1] 李雨玲, 梁建辉. FH/Wjd 大鼠的生物学特性及其在药理学研究中的应用 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(7):893 - 897.
- [2] 景丽, 张振华, 王卫平, 等. 先天性嗜酒大鼠的饮酒行为特性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2009, 23(1):65 - 69.
- [3] 尉明晓, 秦超, 陈威, 等. PPAR α 转基因小鼠在药物评价中的应用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(1):18 - 22.
- [4] 石巧娟, 刘月环, 楼琦, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠 PPAR α 基因表达及脂代谢和胰岛素水平的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(8):26 - 30.
- [5] 陈灏珠, 林果为, 廖履坦, 等. 实用内科学 [M]. 第 13 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009:2098.
- [6] 吴京燕, 潘玉英, 杨云峰, 等. 牛初乳冻干粉对酒精性肝损伤的预防作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(1):33 - 34.
- [7] 刘莉, 管小琴, 李芬, 等. 茶多酚对酒精性肝病大鼠核因子 κ B 及环氧化酶 2 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3):209 - 213.
- [8] Lieber CS, Jones DP, Dearli LM. Effects of prolonged alcohol intake: production of fatty liver despite adequate diets [J]. J Clin Invest, 1965, 44(10):1009.
- [9] Tsukamoto H, Reidelberger RD, French SW, et al. Long term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat [J]. Am J Physiol, 1984, 247(6):R595.

[收稿日期] 2014-06-08