

Fah^{-/-} 小鼠对 NTBC 的药物依赖性观察

彭雨婷^{1,2}, 武 昕^{1,2}, 孔祥平¹, 李绍林¹, 刘光泽¹

(1. 解放军第 458 医院全军肝病中心转基因工程室, 广州 510602;
2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

【摘要】 目的 观察 Fah^{-/-} 小鼠对 NTBC 的药物依赖性, 更详尽的掌握该模型的生物学特征, 使该模型得以更有效的利用。**方法** Fah^{-/-} 小鼠 NTBC 停药后, 观察小鼠体重变化、生存状态、生存时间, 定期取样记录血清学和肝脏病理学变化。**结果** NTBC 停药后, Fah^{-/-} 小鼠体重进行性下降, 活力降低, 5~7 周死亡, 期间伴随着 ALT、AST 等血清指标的升高及肝细胞严重变性大量坏死。**结论** Fah^{-/-} 小鼠需终身服用 NTBC, 依赖性强, 停药会出现严重肝损伤, 表明该模型是研究酪氨酸血症 I 型和其他肝损伤的理想模型。

【关键词】 Fah^{-/-} 小鼠; NTBC; 肝损伤; 酪氨酸血症 I 型

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.001

To observe the NTBC dependence of Fah-knockout mice

PENG Yu-ting^{1,2}, WU Xin^{1,2}, KONG Xiang-ping¹, LI Shao-lin, LIU Guang-ze¹

(1. Key Laboratory of Transgenic Engineering, Center of Infectious Diseases, 458th Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China;
2. Institute of Life Science and Bio-pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

【Abstract】 Objective To observe the NTBC dependence of Fah-knockout mice and study the biological characteristics in order to use the model more effectively. **Methods** Examine the progressive changes in body weight, survival time, liver pathology and serological markers after the NTBC withdrawal. **Results** After removing of NTBC, Fah-knockout mice lost their body weight gradually, and finally died in 5 to 7 weeks, along with increased serum ALT, AST levels and deformation of the hepatocytes. **Conclusions** Fah-knockout mice have a strong drug dependence of NTBC and could be the ideal model to hereditary tyrosinemia type I and other liver injury.

【Key words】 Fah-knockout mice; NTBC; Liver failure; Tyrosinemia type I

延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, Fah)基因敲除小鼠,简称 Fah^{-/-} 小鼠,是由 Grompe 等^[1]建立的酪氨酸血症 I (tyrosinemia type I, HT1)小鼠模型。该模型由于 Fah 的缺失,导致酪氨酸代谢受阻,毒性代谢产物蓄积,引起肝、肾的严重损伤^[2-3]。2-(2-硝基-4-三氟甲基苄基)-环己烷-1,3-二酮(NTBC)药物能够抑制酪氨酸降解通

路中 4-对羟基苯丙酮酸双氧化酶(4-HPPD)的活性,减少有毒代谢产物产生,临床上用于治疗高酪氨酸血症^[4]。Fah^{-/-} 小鼠存在广泛而持续的肝损伤,可用于细胞移植、肝脏持续损伤、肝再生及肝癌的研究中^[5-9]。本研究观察 Fah^{-/-} 小鼠对 NTBC 的药物依赖性,更详尽的掌握该模型的生物学特征,使该模型得以更有效的利用。

【基金项目】 国家 973 重点基础研究发展计划(2010CB945502)。

【作者简介】 彭雨婷(1990-),女,硕士生,研究方向:细胞治疗研究。

【通讯作者】 刘光泽(1962-),男,主任技师,研究方向:疾病基因工程动物模型的制备和应用研究 E-mail: lgze68@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 balb/c 品系 Fah^{-/-} 小鼠, 体重 23 ~ 25 g, 10 周龄公鼠 24 只, 10 周龄孕鼠 51 只, 受赠于厦门大学, 由解放军第四五八医院动物实验中心饲养繁殖, 饲养时饮水中添加 8 mg/L NTBC; SPF 级 balb/c 品系野生型小鼠 8 只, 体重 23 ~ 25 g, 10 周龄, 购自南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】, 由解放军第四五八医院动物实验中心提供及饲养【SYXK(军)2012-0059】。正常进食。

动物饲养条件为: 12h 光照/12h 黑暗节律, 所有动物都用标准饲料和饮水饲养。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂和仪器

2-(2-硝基-4-三氟甲基苄基)-环己烷-1,3-二酮(NTBC)购自上海瑞博化学有限公司(CAS:104206-65-7); 苏木素、伊红购自福州迈新生物科技有限公司; 中性树脂封片剂购自武汉博士德公司; 石蜡切片机购自德国 Leica 公司; 恒温烤箱购自北京医疗设备厂; 正置显微镜购自日本 Olympus 公司; 不锈钢高压锅购自福州迈新生物科技有限公司; 显微专业数码图像系统购自日本 Olympus 公司; 十万分之一天平购自日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 观察 NTBC 对 Fah^{-/-} 小鼠形态学和体重的影响

将 24 只 10 周龄 Fah^{-/-} 小鼠分为三组: a. 对照组(n=8), 服用 NTBC; b. 实验组 1(n=8), 间歇停药, 具体是停药 3 周后, 持续给药 2 周, 继续停药; c. 实验组 2(n=8), 停药不重复给药。记录小鼠生存状态, 形态学变化, 每周称重两次, 取各组体重均值, 绘制体重曲线。

1.2.2 血清学检测

Fah^{-/-} 小鼠停药组在第 1, 2, 3, 4, 5, 6 周眼眶采血, 离心分离获得血清, 检测血清中 ALB, AST, ALT, ALP 水平^[10]。

1.2.3 肝脏病理学检测

1.2.3.1 制备组织切片

分别取 Balb/c 野生小鼠和 NTBC 停药第 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 周的 Fah^{-/-} 小鼠小鼠的肝脏相同部位(0.8 cm × 0.8 cm × 0.3 cm), 生理盐水清洗, 4%

多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋、切片。

1.2.3.2 苏木素、伊红(HE)染色

60℃ 烤片 1 h, 常规脱蜡水化, 苏木素染色 5 ~ 10 min, 水中返蓝 5 ~ 10 min, 1% 盐酸酒精溶液分化 3 ~ 10 s, 水洗 2 min, 伊红复染 5 ~ 10 min, 水洗 2 min, 切片常规脱水透明干燥, 中性树脂封片, 显微镜下观察。

1.2.4 NTBC 对 Fah^{-/-} 小鼠繁殖情况影响

统计 2013 年 4 月至 2014 年 4 月一年内 Fah^{-/-} 小鼠每窝产仔数量, 与野生型窝产仔数进行统计学比较^[11]。

1.2.5 数据处理及统计分析

利用 spss19.0 统计分析软件对数据进行分析, 统计分析采用重复测量方差分析和单因素方差分析。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NTBC 对 Fah^{-/-} 小鼠形态学和体重的影响

对照组: Fah^{-/-} 小鼠饮水中一直给予 NTBC, 体重稳步增长, 健康存活。实验组 1: Fah^{-/-} 小鼠第一次停药, 体重进行性下降, 3 周后体重为初始体重的 70% ~ 80%, 有显著性差异($P < 0.05$), 第 3 周饮水中给与 NTBC, 第 5 周体重回升到初始体重后再次停药, 体重维持一周后再次呈进行性下降, 小鼠最终存活时间为 7 ~ 10 周。实验组 2: 从实验开始, Fah^{-/-} 小鼠停止给予 NTBC, 体重呈进行性下降, 小鼠最终存活时间 5 ~ 7 周。体重曲线见图 1。

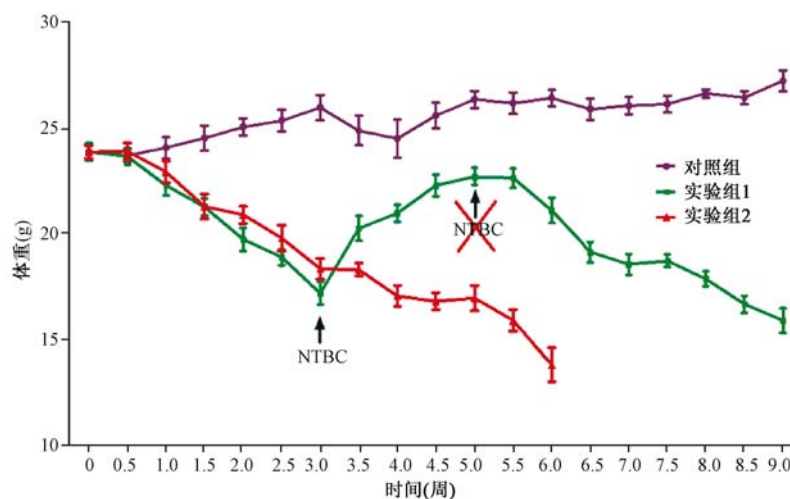
Fah^{-/-} 小鼠停药后活力逐渐降低, 3 周后出现弓背, 毛刺, 连续停药 5 周后肢体行动不协调, 易呈昏睡状, 且体重明显减轻($P < 0.05$); 如果再次给药, 其状态、体重可逐渐恢复, 生活状态也有所改善; 死亡时体重约为初始体重的 60% ~ 70%。

2.2 血清学指标检测

停药后, Fah^{-/-} 小鼠从第 2 周后 ALB 持续降低, ALT、AST、ALP 指标逐渐升高, 从第 3 周开始有明显的统计学差异($P < 0.01$) (见图 2)。

2.4 肝组织病理学观察

对照组 1: Balb/c 野生型小鼠肝脏, 肝组织结构完整, 肝小叶轮廓清晰, 细胞排列紧密有序, 细胞形态饱满, 胞浆充盈。对照组 2: 给药 NTBC, Fah^{-/-} 小鼠肝脏病理学形态与野生型相似, 无炎症病症。实验组: 随着停用 NTBC 的时间的增加, 肝脏正常组织



注:对照组:持续给药 NTBC;实验组 1:间歇停药 NTBC。实验组 2:持续停药 NTBC。

图 1 $Fah^{-/-}$ 小鼠体重曲线

Note: -○- : with NTBC; -■- : with NTBC episodically; -▲- : withdrawal of NTBC.

Fig. 1 Curves of Fah -knockout mice weight

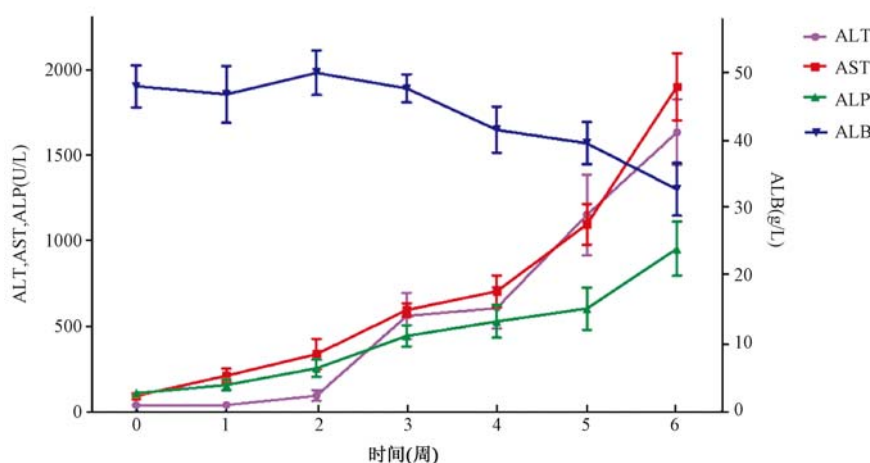


图 2 $Fah^{-/-}$ 小鼠去除 NTBC 后血清学指标随时间的变化曲线

Fig. 2 Curves of Fah -knockout mice serological markers changing with time after the NTBC withdrawal

结构消失,中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞逐步浸润,肝细胞由点状坏死向灶状、片状坏死发展,肝细胞索排列紊乱,细胞界限不清晰,体积增大,核收缩,胞浆疏松。4 周后胞质内可见大量的脂肪空泡和气球样变性,肝细胞大量坏死并伴有严重的炎症病症和细胞凋亡(见图 3,彩插 1)。

2.5 NTBC 对 $Fah^{-/-}$ 小鼠繁殖情况影响

2013 年 4 月到 2014 年 4 月,一年中繁殖 $Fah^{-/-}$ 小鼠 51 窝,平均窝产仔 7.29 只,Balb/c 野生鼠平均窝产仔 7.56 只。 $P > 0.05$, $Fah^{-/-}$ 小鼠窝产仔情况与 Balb/c 野生型无统计学差异。终身服药 NTBC 对 $Fah^{-/-}$ 小鼠繁殖能力无明显影响。

3 讨论

$Fah^{-/-}$ 小鼠肝损伤原理同酪氨酸血症 I 型的发病机制。酪氨酸血症 I 型是一种罕见的常染色体隐性遗传病,又称肝肾型酪氨酸血症,患病率约为 1/2000 至 1/10 000。其发病机制主要是由于肝、肾组织中延胡索酰乙酰乙酸水解酶(Fah)活性降低或缺失,导致酪氨酸代谢途径的终端代谢发生障碍,不能正常代谢延胡索酸和乙酰乙酸。延胡索酰乙酰乙酸积累,其上游代谢物酪氨酸、4-羟基苯丙酮酸升高,使中间代谢产物马来酰乙酰乙酸进一步积累,刺激产生旁代谢途径。马来酰乙酰乙酸和延胡

索酰乙酰乙酸经旁代谢生成琥珀酰乙酰乙酸,后又再生成琥珀酰丙酮(SA)。这两种旁代谢产物可以与蛋白质的巯基结合,二者含量增高造成严重的肝损伤及肾小管缺陷^[13-14],肝细胞和肾小管上皮细胞的细胞凋亡是这种疾病的主要特征。目前,临床上通过琥珀酰丙酮诊断酪氨酸血症 I 型。

2-硝基-4-三氟甲苯-1,3 环乙烷碘(NTBC),又称尼替西农,能够抑制酪氨酸降解通路第二步 4-对羟基苯丙酮酸双氧化酶(4-HPPD)的活性,从而减少下游旁代谢途径中的有毒代谢产物,起到治疗作用。同时,NTBC 抑制了酪氨酸向 4-羟基苯丙酮酸的代谢,血酪氨酸增高,需控制蛋白质的摄取。总的来说,NTBC 是替代肝肾移植治疗酪氨酸血症 I 型最直接有效的方法。1992 年,NTBC 应用于临床治疗,生存率 >90%。

Fah^{-/-}小鼠通过敲除 Fah 基因,模拟酪氨酸血症 I 型症状,肝损伤原理来自酪氨酸血症 I 型的发病机制。Fah^{-/-}小鼠在饲养过程中饮水中添加 8 mg/L 的 NTBC,不出现酪氨酸血症 I 型病症,健康存活,生物学特性同野生型,是能够稳定遗传、易繁殖的小鼠模型。当 NTBC 停供,小鼠体重进行性降低,可低至初始体重的 60%~70%,5~7 周死亡,损伤持续稳定并未见自然恢复。生命活力 3 周后明显降低,并伴有弓背、毛刺的现象;5 周后开始,精神不济,肢体不勤,弓背程度加重。肝损伤发生后重新喂药,损伤停止加剧,体重逐渐恢复。说明 Fah^{-/-}小鼠对 NTBC 有严重药物依赖性,不给与 NTBC, Fah^{-/-}小鼠不能存活, Fah^{-/-}小鼠出现酪氨酸血症 I 型症状。但有实验指出对 Fah^{-/-}小鼠进行多次的停药喂药实验,反复的肝脏损伤和再生还可以诱导肝癌的发生^[15-16]。

血清学指标检测结果反映出肝脏呈持续性损伤。ALT 与 AST 存在于肝细胞膜,能够反映出肝实质细胞膜通透性的变化。停药过程中,肝细胞逐渐坏死、凋亡,细胞膜破裂的同时释放 ALT 与 AST 到血液,使血清中二者水平升高。ALT、AST、ALP 水平与肝损伤程度呈正相关,ALP 水平变化不如 ALT、AST 显著;ALB 水平与肝损伤程度呈负相关^[12], ALB 降低呈现肝损伤加重。

停药后肝组织病理学和形态学特征变化具有阶段性,规律性,反映出不同阶段的细胞损伤情况,小鼠肝脏损伤的时间和程度可以通过 NTBC 药物的系统调节来进行控制。在连续给药的情况下,

Fah^{-/-}小鼠的各项生理指标、生物学特性和生殖情况与野生型小鼠基本一致。当对小鼠进行断药处理后,逐渐有炎性细胞浸润,发生炎症反应,肝细胞开始大规模坏死,胞质内形成大块脂肪空泡和气球样变性,停药后期肝细胞坏死伴随大量细胞凋亡,肝细胞发生细胞凋亡导致肝脏损伤。

Fah^{-/-}小鼠对 NTBC 有依赖性,需终身服用,NTBC 能通过抑制下游旁代谢途径中的有毒代谢产物产生来阻止 Fah^{-/-}小鼠肝损伤;Fah^{-/-}小鼠模型可以很好的模拟人类酪氨酸血症 I 型产生的各种症状,是研究该遗传病的理想模型;同时,该模型形成的持续性不可逆的肝损伤,也适用于研究外源细胞在小鼠体内的定植状况。因此,Fah^{-/-}小鼠模型被广泛应用于相关的肝病基础研究、肝病细胞治疗、肝脏持续损伤、肝再生及肝癌的研究领域。

参考文献:

- [1] Grompe M, Al-Dhalimy M, Finegold M, et al. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice[J]. *Genes & development*, 1993, 7(12a): 2298-2307.
- [2] Orejuela D, Jorquera R, Bergeron A, et al. Hepatic stress in hereditary tyrosinemia type 1 (HT1) activates the AKT survival pathway in the fah-knockout mice model [J]. *Journal of hepatology*, 2008, 48(2): 308-317.
- [3] Qi Z, Wang X, Wei H, et al. Infiltrating neutrophils aggravate metabolic liver failure in fah^{-/-} deficient mice [J]. *Liver International*, 2014, DOI: 10.1111/liv.12594.
- [4] Masurel-Paulet A, Poggi-Bach J, Rolland M O, et al. NTBC treatment in tyrosinaemia type I: long-term outcome in French patients[J]. *Journal of inherited metabolic disease*, 2008, 31(1): 81-87.
- [5] Su B L, Liu C C, Xiang D, et al. Xeno-repopulation of Fah^{-/-} Nod/Scid mice livers by human hepatocytes[J]. *Science China Life Sciences*, 2011, 54(3): 227-234.
- [6] Buitrago - Molina L E, Marhenke S, Longerich T, et al. The degree of liver injury determines the role of p21 in liver regeneration and hepatocarcinogenesis in mice[J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 1143-1152.
- [7] Alison M R, Lovell M J. Liver cancer: the role of stem cells[J]. *Cell proliferation*, 2005, 38(6): 407-421.
- [8] Kubo S, Sun M, Miyahara M, et al. Hepatocyte injury in tyrosinemia type 1 is induced by fumarylacetoacetate and is inhibited by caspase inhibitors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(16): 9552-9557.
- [9] 苏宝亮, 刘长城, 李帅, 等. Fah 基因剔除小鼠在肝细胞移植中的应用及其病理学变化[J]. *中国药科大学学报*, 2009, 30(6): 553-558.
- [10] Wilber A, Wangenstein K J, Chen Y, et al. Messenger RNA as

- a Source of Transposase for Sleeping Beauty Transposon - mediated Correction of Hereditary Tyrosinemia Type I [J]. *Molecular Therapy*, 2007, 15(7): 1280 - 1287.
- [11] 张洪, 鲍波. 浅谈国内 BALB/c 小鼠及 KM 小鼠的基本生物学特性[J]. *中国实用医药*, 2010 (3): 252 - 254.
- [12] 魏立, 张丽娟, 张跃新. 肝病患者血清学指标与肝纤维化程度的关系[J]. *标记免疫分析与临床*, 2009, 16 (4): 205 - 208.
- [13] Fernandes J, Saudubray J M, Van Den Berghe G, *et al.* Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment [M]. Springer, 2006; 233 - 243.
- [14] 杨楠, 韩连书, 叶军, 等. 尼替西农治疗 2 例酪氨酸血症 I 型的效果分析并文献复习[J]. *临床儿科杂志*, 2012, 29 (12): 1178 - 1181.
- [15] Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AL. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species [J]. *Hepatology*, 2002, 35 (1): 62 - 73.
- [16] Nieto N. Ethanol and fish oil induce NFkappaB transactivation of the collagen alpha2(1) promoter through lipid peroxidation-driven activation of the PKC-PI3K-Akt pathway [J]. *Hepatology*, 2007, 45 (6): 1433 - 1445.

〔修回日期〕2014-10-22