

酒精中毒大鼠动物模型的研究

王亚南 综述,刘儒林,程秀臻 审校

[关键词] 乙醇;大鼠;急性动物模型;慢性动物模型;综述

中图分类号:R595.6 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)04-0319-02

[本文著录格式] 王亚南,刘儒林,程秀臻.酒精中毒大鼠动物模型的研究[J].中国康复理论与实践,2006,12(4):319-320.

饮酒是一种风俗,有着悠久的历史。随着人们生活水平的提高,饮酒的人数不断增多,因饮酒而导致酒精中毒的人数也不断增多。在美国,酒精中毒是位列心血管疾病、肿瘤之后占第 3 位的公共卫生问题,美国一般人群的终生患病率高达 18%,欧洲国家男性慢性酒精中毒的终生患病率达到 3%~5%^[1]。酒精中毒可引起多器官系统的功能损害,研究酒精相关性疾病及酒精中毒已成为重要的社会问题,而建立相关的动物模型是一项重要的基础研究。

理想的动物模型应该是:①与人类患病特征相似;②病变有一定的发展过程;③成功率高,死亡率低,重复性好;④造模方法简便易行。为了模拟酒精对人体的影响,最好使用与人类物种相近似的动物,如灵长类动物。但现实情况和经济因素通常使人们不考虑使用这类动物。曾有研究人员使用过狒狒,在几年的研究中,持续让狒狒在每餐中都摄入酒精,最终有 1/3 的狒狒患肝硬化^[2]。虽然该研究取得了结论性的结果,但耗时长,且仅引起少数狒狒患病。也曾有研究人员使用过其他动物,其中大多数是哺乳动物,如大鼠、小鼠、仓鼠、豚鼠、家兔及狗等,另外,在果蝇和蛔虫中还进行过一些有关的行为学和基因的研究^[3]。

虽然应根据实验的性质选择实验动物的种类,但是大多数研究人员都采用了大鼠,因为大鼠价格低廉、易于操作、便于管理。笔者对国内外有关文献及本室多年来对酒精性大鼠动物模型制备的研究现状进行综述。

酒精中毒可以分为一次过量饮酒引起的急性酒精中毒或长期大量饮酒导致的慢性酒精中毒。典型的实验方法是通过急性(一次)或慢性(多次、长期)地给予动物酒精的方法研究酒精的作用,所以又分为急性动物模型和慢性动物模型。

1 急性酒精中毒大鼠模型

制备急性酒精中毒大鼠模型,需要将酒精注入大鼠体内,方法有几种:

1.1 腹腔注射 通过注射器直接将酒精注入大鼠腹腔。该方法的优点是方便、简单、容易操作;缺点是只适于低浓度,剂量有限,且吸收率无法估计。在实际操作中,注射酒精后大鼠腹部会因酒精的刺激出现硬块,且多次注射会造成腹腔炎症,致使脏器粘连、感染,形成腹水而导致死亡^[4]。

1.2 尾静脉注射 通过注射器直接将酒精注入大鼠的尾静脉。该方法的优点是血中酒精浓度可以计算;缺点是需要较高的注射技术,且其吸收方式不符合人体摄入酒精的方式。陈韶华等用无水乙醇 0.3 g/kg 和 0.7 g/kg 从大鼠尾静脉注入,注射时间持续 5 min,成功制备了急性酒精中毒大鼠模型^[5]。

1.3 灌胃 通过胃管直接将酒精灌入胃中。该方法的优点是符合人体摄入酒精的方式,剂量充足,可多次灌胃(大鼠无呕吐反射),可以保证酒精的吸收,且操作容易,同时避免了以上模

型的缺点;缺点是吸收率无法估计。该缺点可以通过测量血中酒精浓度加以弥补。在实际操作中,采用灌胃前 12 h 禁食不禁水的方法减少对酒精吸收的干扰^[6]。

本室综合以上模型的优缺点,选择灌胃的方法制备急性酒精中毒大鼠模型。具体为雄性 Spague-Dawley 大鼠(体重 180~200 g),用 60%白酒按 10 ml/kg 进行灌胃,灌胃前 12 h 禁食不禁水,在灌胃后 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h 等不同时间段断头取脑,采用高效液相色谱-紫外分光光度法观察到饮酒后不同时间段,不同脑区氨基酸类递质浓度有明显变化。

2 慢性酒精中毒大鼠模型

慢性动物模型的制备有一定的难度。

2.1 直接饮用 最简单的慢性给酒的方法是通过饮用^[7]。Solomon 等用随意饮酒的方式(乙醇浓度最大为 12%)让大鼠过度饮酒 40 周,动物出现骨质疏松,股骨头塌陷,部分区域骨髓坏死,骨小梁碎片中缺乏骨细胞,培养出酒精性股骨头坏死大鼠模型^[8]。Inagawa 等采用随意饮酒方式(乙醇浓度为 20%)让大鼠饮酒 24 周,用高效液相色谱-电化学分析法观测异丙酚对大鼠海马乙酰胆碱含量变化的影响^[9]。但大鼠对酒精易形成耐受,且由于厌恶酒精而导致液体摄入不足,引起脱水,营养失衡,以及由于低摄入导致血中酒精浓度低等,故难以保持较高的血酒精浓度,从而导致该方法不适合许多类型的研究。

2.2 经食物供给或吸入法 国际上经典的慢性酒精中毒动物模型是 Liber 和 Decarli 的给予液体食物的模型与 Tsukamoto 和 French 的胃内模型。

2.2.1 液体食物模型(Liber-DeCarli 模型) 通过研究在慢性动物模型中遇到的种种问题,DeCarli 和 Lieber 等于 1967 年提出含全营养素和酒精的液体食物^[10]。该液体食物作为惟一的食物和水供给大鼠^[11]。在这种食物中,酒精占总热量的 36%,而蛋白质、碳水化合物、脂肪则分别占总热量的 18%、11%、35%,此外还含有一些维生素和无机盐等。该方法的优点是即使大鼠不喜欢饮酒,但当给予一个要么吃含酒精的食物,要么饿肚子的选择时,动物通常选择前者,并且在 4~6 周内可以摄入酒精 14~18 g/kg·d。这种饮食可引起早期的肝脏损害(脂肪肝)和肝细胞损害,这些损害可以在电镜下观察到。该方法的缺点是,对人类,这种处理方式并不能导致更严重的肝损害,如肝组织坏死、炎症或纤维化等^[12]。但通过给狒狒食用修正过的 Lieber-DeCarli 液体食物,可使狒狒发生肝硬化^[13],所以该模型仍是有一定的效用,适用于研究酒精对心、脑和胰等器官中的作用。

2.2.2 胃内模型(Tsukamoto-French 模型) Tsukamoto 等在 1986 年建立了一种在大鼠中引起肝损害的胃内模型。该模型建立在“大鼠拥有比人类要高的酒精分解率,所以可能需要比人类更高的血酒精浓度来诱导肝损害”的假说基础上^[14]。在这个模型中,通过使用外科手术植入的胃管,持续将含酒精的液体食物直接灌入胃中(酒精占总热量的 47%)。该模型最大的优点是可任意设定酒精量,大鼠可摄入占总热量 36%以上的酒精(这是自由摄取达不到的量),从而能维持血酒精浓度在 50~

80 mmol/L (230 ~ 370 mg/dl), 超过了 Lieber-DeCarli 模型的 20 ~ 40 mmol/L (90 ~ 180 mg/dl)。采用这种方法处理的大鼠出现脂肪肝、局部坏死以及次级肝门纤维化^[15], 但未发生硬化或其他不可逆的改变。

Tsukamoto 等发现, 在连续灌胃的条件下, 大鼠血液酒精浓度呈周期性变化, 且不随灌胃浓度的变化而变化, 这种循环周期在 6 ~ 7 d, 变化范围在 10 ~ 100 mmol/L^[16]。但大鼠也存在着显著的个体差异, 从 35 ~ 60 mmol/L 不等。研究表明, 在人体, 血液酒精浓度也同样存在着周期性的变化。国内也有少数研究人员采用经胃造瘘管注入酒精。杨致富等用 40 % 的酒精(从 2 ml 逐渐加至 3 ml), 每日 3 次, 造模时间 12 周的方法成功造模^[17]。这种模型从根本上解决了营养供给、乙醇摄入的调控问题, 并可对血酒精浓度进行长期检测。

Enomoto 等报道了一种新的大鼠模型: 每 24 h 从胃内给予雌性 Wistar 大鼠酒精 5 g/kg, 4 周后导致大鼠肝脏脂肪堆积(脂肪变性)、炎症及坏死^[18]。

该模型适用于研究酒精对肝脏的作用。

2.2.3 吸入模型(Goldstein-Pal 模型) Goldstein 等采用酒精蒸汽的给药方式, 通常用于研究与酒精戒断有关的行为学改变^[19], 并未在诱导器官损害的实验中被广泛应用。Rimondini 等通过长期给 Wistar 大鼠吸入酒精蒸汽造成大鼠的酒精依赖或发现, 神经肽 γ 受体拮抗剂可以选则性地抑制饮酒的动机^[20]。这种吸入模型的缺点是实验组和对照组之间的营养失衡, 因为中毒的动物比对照组的动物摄食量减少, 还有就是不符合人体的酒精摄入方式。

2.2.4 程序诱导的大鼠酒精偏爱模型 张富强等使用限食大鼠通过自动的食物供应(程序为固定 60 s)诱导大鼠超量饮酒^[21]。该方法建立在“当限制大鼠食物供应, 使其体重维持在自由进食的 80 % 时, 如间隔给其提供食物, 大鼠会表现出大量饮水行为”的理论之上^[22]。该方法主要使用一个食物泵提供颗粒饲料和饮水/水, 通过自行编制的控制程序进行喂养, 成模时间为 3 周。该模型主要适用于研究酒精的强化效应、戒断症状、辨别刺激效应、个体对酒精的反应等共同影响酒精滥用的行为。

2.2.5 灌胃模型 灌胃的方法更符合人体的酒精摄入方式, 所以成功的模型很多, 且因为大鼠没有呕吐反射, 可以保证酒精的吸收。

吕晓辉等采用 6 周龄雄性 Wistar 大鼠, 体重(200 ± 10) g, 使用 40 % 乙醇 8 g/kg · d 分 3 次灌胃 4 周, 然后用 50 % 乙醇 9 g/kg · d 分 3 次灌胃 4 周, 再用 50 % 乙醇 10 g/kg · d 分 3 次灌胃 8 周, 成功地制备出酒精性肝病的大鼠模型^[23, 24]。

由于实验条件等原因的限制, 国内多采用根据周淑琴等的造模方法^[25]衍生出来的方法, 采用酒精浓度 50 % ~ 60 % 的白酒每日灌胃, 并加入玉米油、吡唑等^[26]诱发肝、胃及神经系统的损害。

综合以上方法的优缺点, 我室采用雄性 Spague-Dawley 大鼠, 体重 110 ~ 130 g, 用 60 % 白酒灌胃, 第 1 周每天给酒 5 ml/kg, 1 次灌胃, 同时给予 10 % 的乙醇随意饮用; 第 2 周每天给酒 10 ml/kg, 分 2 次灌胃, 同时给予 10 % 的乙醇随意饮用; 第 3 周每天给酒 10 ml/kg, 分 2 次灌胃, 同时给予 20 % 的乙醇随意饮用; 第 4 周每天给酒 15 ml/kg, 分 3 次灌胃, 同时给予 20 % 乙醇随意饮用, 至第 16 周, 成功制备出慢性酒精中毒外周神经损伤的动物模型。在制备过程中, 3 只大鼠因为灌胃不熟练, 误灌入气管导致死亡, 2 只大鼠死于胃扩张。成模后, 用 Keypoint 4 M/4C 标准型多功能肌电图仪对大鼠腓肠肌进行单纤维肌电图(SFEMG)检测, 第 16 周的 SFEMG 检测结果显示, 当体温 20 °C ~ 25 °C, 刺激电流 0.1 mA, 刺激频率 3 Hz 时, 乙醇组大

鼠的平均连续差值(MCD)和纤维密度(FD)值均增大($P < 0.05$), 并且出现电位对阻滞。

现有的大鼠模型可以应用于酒精对肝脏功能损害的机制的研究, 也可用于研究短期大量饮酒和长期饮酒对心脏功能的影响(酒精性心脏病)以及对神经系统的影响。此外, 动物模型也应用于孕妇在妊娠期间酗酒对胎儿影响的研究。

[参考文献]

- [1] 于爱红, 朴常福, 张在人. 酒精中毒研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(11): 690—691.
- [2] Rubin E, Lieber CS. Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates[J]. N Engl J Med, 1974, 290(3): 128—135.
- [3] Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohols effects on organs in animal models[J]. Alcohol Res Health, 2000, 24(2): 93—104.
- [4] 赵静波, 王泰龄, 张晶, 等. 大鼠急性酒精性肝损伤模型分析[J]. 中日友好医院学报, 1996, 10(1): 17—19, C2.
- [5] 陈韶华, 厉有名, 虞朝辉, 等. 急性乙醇中毒与内源性一氧化氮水平关系的实验研究[J]. 中国自然医学杂志, 2003, 5(1): 24—26.
- [6] 李芳芳, 张宇, 陈韶华, 等. 酒精灌胃大鼠全血乙醇浓度变化[J]. 浙江预防医学, 2004, 16(1): 13—14.
- [7] 田德安, 洪敏捷, 刘南植, 等. L-精氨酸对酒精性肝脂肪变大鼠肝组织 NOS 表达及氧应激的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(3): 702—705.
- [8] Solomon L, Schnitzler H, Seftel H, et al. Alcoholic osteonecrosis: a attempted experimental model in the adult rat[M]// Arlet J, Ficat RP, Hungerford DS. Bone Circulation. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984: 238.
- [9] Inagawa G, Sato K, Kikuchi T, et al. Chronic ethanol consumption does not affect action of propofol on rat hippocampal acetylcholine release in vivo[J]. Br J Anaesth, 2004, 93(5): 737—739.
- [10] DeCarli LM, Lieber CS. Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet[J]. J Nutr, 1967, 91(3): 331—336.
- [11] Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell, MF. Experimental methods of ethanol administration[J]. Hepatology, 1989, 10(4): 501—510.
- [12] Lieber CS, DeCarli LM. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptive properties in vivo[J]. J Biol Chem, 1970, 245(10): 2502—2512.
- [13] Rubin E, Lieber CS. Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates[J]. N Engl J Med, 1974, 290(3): 128—135.
- [14] Tsukamoto H, Townner SJ, Ciofalo LM, et al. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high-fat diet[J]. Hepatology, 1986, 6(5): 814—822.
- [15] Tsukamoto H, Gaal K, French SW. Insights into the pathogenesis of alcoholic liver necrosis and fibrosis: status report[J]. Hepatology, 1990, 12(3pt1): 599—608.
- [16] 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(3pt2): R595—R599.
- [17] 杨致富, 韩德恩, 张新宇, 等. 大鼠酒精肝模型的制备[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2000, 34(2): 111—112.
- [18] Enomoto N, Yamashina S, Kono H, et al. Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells[J]. Hepatology, 1999, 29(6): 1680—1689.
- [19] Goldstein DB, Pal N. Alcohol dependence produced in mice by inhalation of ethanol: grading the withdrawal reaction[J]. Science, 1971, 172(980): 288—290.
- [20] Rimondini R, Thorsell A, Heilig M. Suppression of ethanol self-administration by the neuropeptide γ (NPY) $\gamma 2$ receptor antagonist BIE0246: evidence for sensitization in rats with a history of dependence[J]. Neurosci Lett, 2005, 375(2): 129—133.
- [21] 张富强, 唐恩恩, 周文华, 等. 程序诱导的大鼠酒精偏爱模型[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2002, 5: 14—16.
- [22] Colotta VA. Adjuvant polydipsia as a model of alcoholism[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(3): 335—342.
- [23] 吕晓辉, 王炳元, 谢艳华, 等. 基质金属蛋白酶-2 和-9 在实验性酒精性肝病中的动态变化及表达[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(5): 268—270.
- [24] 吕晓辉, 谢艳华, 傅宝玉, 等. 基质金属蛋白酶抑制剂-1 在实验性酒精性肝病中的动态表达[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(1): 29—33.
- [25] 周淑琴, 贾从义, 高殿生, 等. 实验性慢性酒精中毒对肝脏损伤的病理形态学观察[J]. 中华病理学杂志, 1986, 15(2): 136—139.
- [26] Xu GF, Wang XY, Ge GL, et al. Dynamic changes of capillarization and perisinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2): 238—243.

(收稿日期: 2005-11-21)