

四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤模型的建立和优化

朱安妮¹, 李蕊^{2,3}, 刘三海¹, 乔艳雪¹, 冯时^{2,3}, 苑少欣^{2,3}, 张剑平^{2,3} (1.北京中医药大学基础医学院 硕士研究生, 北京 100029; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 3.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015)

摘要: 目的 通过单次腹腔注射不同剂量的四氯化碳(CCl_4)致小鼠急性肝损伤, 检测小鼠血浆转氨酶水平的变化, 建立适合本研究的小鼠模型。方法 采用6~8周龄雄性C57BL/6小鼠单次腹腔注射 CCl_4 诱导急性肝损伤。比较不同剂量的 CCl_4 诱导急性肝损伤小鼠的血浆转氨酶水平。将182只小鼠随机分出32只。32只小鼠随机分为3组 CCl_4 实验组(每组8只)和正常对照组(8只), 分别腹腔注射0.1%、0.2%、0.3%的 CCl_4 橄榄油溶液(10 ml/kg)或等体积橄榄油。注射12小时后取血, 检测血浆丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的水平。比较0.1%和0.2%剂量组小鼠不同时间点血浆转氨酶水平的变化。将剩余150只小鼠随机分为正常对照组(10只)、实验I组(0.1%剂量, 70只)、实验II组(0.2%剂量, 70只), 实验组小鼠在造模6、12、16、20、24、48、72小时后取血, 检测血浆ALT、AST的水平。结果 与正常对照组相比, 分别用0.1%、0.2%、0.3% CCl_4 处理后12小时小鼠血浆ALT、AST均明显升高($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性。与正常对照组相比, 0.1%和0.2%剂量组小鼠血浆ALT、AST的水平在早期均呈上升趋势, 并分别在16小时和20小时达到高峰, 随后逐渐下降, 在72小时接近至正常水平。结论 单次腹腔注射 CCl_4 诱导小鼠急性肝损伤呈剂量依赖性。0.1%剂量的 CCl_4 以及该剂量处理后16小时是建立C57BL/6小鼠急性轻度肝损伤的合适剂量与检测转氨酶水平的合适时间点。

关键词: 四氯化碳; 急性肝损伤; C57BL/6小鼠

Establishment of carbon tetrachloride-induced acute liver injury murine model

ZHU An-ni¹, LI Rui^{2,3}, LIU San-hai¹, QIAO Yan-xue¹, FENG Shi^{2,3}, YUAN Shao-xin^{2,3}, ZHANG Jian-ping^{2,3}
(1.School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
2.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China;
3.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To establish an appropriate murine model for this study, the mice were administrated by single intraperitoneal injection at different doses with carbon tetrachloride (CCl_4) to induce acute liver injury, and the changes of aminotransferase levels in plasma were measured. **Methods** Acute liver injury in C57BL/6 male mice (6-8 weeks) were administrated by single intraperitoneal injection with CCl_4 . Comparing the aminotransferase levels in plasma from different doses of CCl_4 -injected mice. The 32 mice were randomly separated from 182 mice. The 32 mice were randomly divided into normal control group (8 mice) and 0.1%, 0.2% and 0.3% CCl_4 groups (8 mice per group) which received 0.1%, 0.2% and 0.3% CCl_4 (10 ml/kg, dissolved in olive oil) respectively, while the normal control group received only olive oil as control. Twelve hours after challenge, the mice were sacrificed and plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured. Comparing the aminotransferase levels in plasma from 0.1% and

0.2% groups at different time points. The 150 mice were randomly divided into normal control group (8 mice), the experimental group I (0.1% dose, 70 mice) and the experimental group II (0.2% dose, 70 mice). Plasma levels of ALT and AST were measured at 6, 12, 16, 20, 24, 48 and 72 hours after challenge. **Results** Compared with normal control group, plasma ALT and AST were significantly increased ($P < 0.05$) in CCl_4 -treated mice at 12 hour, furthermore, the effect was dose-dependent in 0.1%, 0.2% and 0.3% groups. The levels of ALT and AST rised at the early phase in 0.1% and 0.2% groups, and reached the peak at 16 and 20 hours, respectively. Then the levels declined gradually and were close to the normal level at 72 hours. **Conclusions** The increase of ALT and AST levels was in a dose-dependent manner with CCl_4 by single intraperitoneal injection. To establish acute mild liver injury in C57BL/6 mice, 0.1% of CCl_4 was the appropriate dose, and 16 hours after challenge was the suitable time point for detection of aminotransferase levels.

Key words: Carbon tetrachloride; Acute liver injury; C57BL/6 mice

急性肝损伤是指病毒感染、肝毒性药物、有毒物质和肝缺血再灌注等因素^[1]导致的急性肝脏功能异常,是临床上多种急性肝病共同的病理基础,严重或持续的损伤最终可导致肝硬化甚至肝功能衰竭^[2,3]。四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的肝损伤模型广泛用于肝坏死及肝硬化的病因学、组织学和肝功能变化的研究以及对保肝药物、药用植物提取物的评价^[4,5]。目前国内多采用SD大鼠和封闭群小鼠进行 CCl_4 急性肝毒性实验,选取的染毒途径、剂量、时间点等因素也多有不同。近交系C57BL/6小鼠,因其有表现型的一致性、遗传的稳定性以及此背景下试剂和抗体的广泛性等特点,可以为今后进行免疫学相关的研究打下基础。本研究通过给予C57BL/6小鼠单次腹腔注射 CCl_4 造模并检测血浆转氨酶水平,摸索最适造模剂量,为下一步药理学、免疫学以及临床治疗等后续相关研究提供可靠的参照依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择野生型C57BL/6小鼠182只,雄性,6~8周龄,体重18~20 g,购于中国医学科学院动物所,饲养于中国医学科学院动物所SPF级动物室(许可证号:SCXK京2009-0007)。

1.2 主要试剂和设备 CCl_4 (分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号20120220);橄榄油(分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号20130513);低温多用途离心机(德国Thermo公司,型号Megafuge 1.0R);全自动生化分析仪(日本日立公司,型号7600-020)。

1.3 方法

1.3.1 CCl_4 橄榄油溶液的配制 用微量移液器分别取50、100、150 μl CCl_4 加入50 ml橄榄油,混合均匀,配置体积分数为0.1%、0.2%、0.3%的 CCl_4 橄榄油溶液,于通风橱操作,现用现配。

1.3.2 比较不同浓度 CCl_4 对小鼠血浆转氨酶水平的影响 将182只C57BL/6小鼠随机分出32只。将32只小鼠随机分为正常对照组和浓度为0.1%、0.2%、0.3%的 CCl_4 实验组,每组各8只。采用不同浓度的 CCl_4 橄榄油溶液,对实验组小鼠进行单次腹腔注射(10 ml/kg),正常对照组给予等体积的橄榄油作为对照。注射后12小时取外周血,置于EDTA- Na_2 抗凝管颠倒混匀,2000 r/min,离心20分钟,分离血浆,全自动生化分析仪测定小鼠血浆中ALT、AST的水平。

1.3.3 观察0.1%和0.2% CCl_4 组小鼠不同时间点血浆转氨酶水平的变化 将剩余的150只C57BL/6小鼠随机分为正常对照组(10只)、实验I组(70只)和实验II组(70只)。将实验I组小鼠随机分为7个亚组(各亚组每组10只),以0.1% CCl_4 橄榄油溶液,按照10 ml/kg剂量对各亚组小鼠进行单次腹腔注射,分别于注射后6、12、16、20、24、48、72小时取血,检测小鼠血浆中ALT、AST的水平,方法同1.3.2。实验II组小鼠以0.2% CCl_4 橄榄油溶液腹腔注射,亚组时间点的选取及操作同实验I组。正常对照组小鼠给予等体积的橄榄油溶液,单次腹腔注射,取血操作同前。

1.4 统计学处理 采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

采用 t 检验;非正态分布的计量以 $M(Q_R)$ 表示,采用Mann-Whitney U检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比较不同浓度 CCl_4 对小鼠血浆转氨酶水平的影响 根据不同的文献报道^[6-9],本实验选取体积分数是0.1%、0.2%、0.3% CCl_4 橄榄油溶液,以10 ml/kg为给药剂量,给予C57BL/6小鼠腹腔注射,建立急性肝损伤小鼠模型;按照参考文献中的时间点^[10,11],选取造模后12小时检测血浆转氨酶水平,比较3种浓度 CCl_4 致小鼠急性肝损伤的程度。结果显示造模后12小时,与正常对照组相比,0.1% CCl_4 浓度组小鼠血浆中ALT和AST的水平略有升高($P = 0.028$, $P = 0.010$),0.2% CCl_4 浓度组血浆中ALT和AST的水平升高显著($P < 0.001$, $P = 0.003$),0.3% CCl_4 浓度组血浆中ALT和AST的水平升高显著(P 均 < 0.001),见表1。

表1 不同浓度 CCl_4 处理后12小时小鼠血浆ALT和AST水平($\bar{x} \pm s$)

浓度(V/V)	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常对照组	33.838 ± 13.056	105.513 ± 24.093
0.1% CCl_4 浓度组	49.286 ± 10.828 ^a	162.357 ± 46.779 ^b
0.2% CCl_4 浓度组	179.643 ± 30.257 ^c	227.714 ± 70.279 ^d
0.3% CCl_4 浓度组	284.083 ± 58.578 ^e	256.667 ± 50.794 ^f

注:与正常对照组比较,^a $P = 0.028$,^b $P = 0.010$,^c $P < 0.001$,^d $P = 0.003$,^e $P < 0.001$,^f $P < 0.001$

2.2 观察0.1%和0.2% CCl_4 组小鼠不同时间点血浆转氨酶水平的变化

2.2.1 0.1% CCl_4 处理后6、12、16、20、24、48、72小时血浆转氨酶水平的变化 与正常对照组相比,血浆ALT水平12小时开始上升($P = 0.009$),16小时达到高峰($P < 0.001$),48小时恢复正常水平($P = 0.144$);血浆AST水平6小时明显升高($P = 0.001$),16小时达到高峰($P < 0.001$),72小时恢复正常水平($P = 0.634$)。不同时间点ALT与AST水平变化见表2。

2.2.2 0.2% CCl_4 处理后6、12、16、20、24、48、72小时血浆转氨酶水平的变化 与正常对照组相比,血浆ALT水平12小时显著上升($P < 0.001$),

20小时达到高峰($P < 0.001$),72小时下降至接近正常水平($P = 0.002$);血浆AST水平6小时明显升高($P < 0.001$),20小时达到高峰($P = 0.001$),72小时下降至接近正常水平($P = 0.029$)。不同时间点ALT与AST水平变化见表3。

3 讨论

CCl_4 是一种典型的肝脏毒性物质,作用机制复杂,研究表明与氧化应激和脂质过氧化反应有关。当 CCl_4 进入肝细胞后,经过细胞色素P450酶代谢激活,产生三氯甲基自由基($CCl_3\cdot$)和过氧化三氯甲基自由基($OOCCl_3\cdot$),这些自由基与肝细胞膜、内质网和线粒体上的磷脂分子发生共价结合,引发脂质过氧化反应损害膜的结构和功能^[12-14],并通过抑制细胞膜及线粒体膜上钙泵的活性,使得大量 Ca^{2+} 内流,导致肝细胞损伤^[13,15],从而影响细胞正常的物质能量代谢。脂质过氧化的副产物如反应性醛类还可以结合胞内正常的蛋白质和DNA,具有肝毒性和致癌作用。另外, CCl_4 代谢产物还可以刺激肝脏枯否细胞(Kupffer cells),释放促炎性细胞因子,进一步加重肝脏的损伤^[16]。肝细胞膜的结构与功能损伤后,胞内的转氨酶ALT、AST溢出,使血浆ALT、AST升高^[17],这在一定程度上反映了肝细胞的损伤程度,因此血浆ALT、AST升高被认为是判断急性肝损伤严重程度的重要指标^[3]。

CCl_4 的染毒剂量和持续接触的时间是影响其肝毒性的的重要因素。低剂量短时的肝毒性刺激,肝细胞发生脂质过氧化、钙离子失衡、细胞因子释放等病理过程,经历肝细胞凋亡和再生,逐渐恢复正常;高剂量或长期刺激会造成严重的损害,肝脏发生脂肪变性、纤维化甚至肝癌,当肝细胞坏死程度超过再生能力时即导致肝衰竭的发生^[12]。本实验采用单次腹腔注射0.1%、0.2%、0.3% CCl_4 橄榄油溶液,诱导C57BL/6小鼠急性肝损伤模型,检测其血浆转氨酶的方法,旨在选择一种低剂量短时的肝毒性刺激。实验结果显示,以0.1%、0.2% CCl_4 处理小鼠后,不同时间点小鼠血浆转氨酶经历了先升高后下降的过程,与文献^[18,19]报道相似,能够一定程度反映肝脏的损伤和修复过程。因此,笔者认为0.1%、

表 2 0.1% CCl₄处理后不同时间点小鼠血浆ALT和AST水平 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常对照组	36.869 ± 14.416	110.546 ± 26.758
6小时	44.050 ± 9.418	156.400 ± 31.427 ^a
12小时	52.250 ± 8.178 ^b	156.333 ± 48.179 ^c
16小时	601.500 ± 223.290 ^d	373.500 ± 131.748 ^c
20小时	100.00 (55.125 ~ 154.125) ^f	187.500 (158.125 ~ 211.625) ^g
24小时	87.833 ± 48.436 ^h	165.611 ± 44.754 ⁱ
48小时	45.850 ± 13.550 ^j	143.550 ± 33.881 ^k
72小时	34.000 ± 9.003	104.500 ± 33.299 ^l

注: 与正常对照组相比, ^a*P* = 0.001, ^b*P* = 0.009, ^c*P* = 0.015, ^d*P* < 0.001, ^e*P* < 0.001, ^f*P* = 0.001, ^g*P* < 0.001, ^h*P* = 0.014, ⁱ*P* = 0.002, ^j*P* = 0.144, ^k*P* = 0.016, ^l*P* = 0.634

表 3 0.2% CCl₄处理后不同时间点小鼠血浆ALT和AST水平 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常对照组	36.869 ± 14.416	110.546 ± 26.758
6小时	42.150 ± 8.216	154.750 ± 20.326 ^a
12小时	183.417 ± 31.288 ^b	206.917 ± 47.891 ^c
16小时	3410.700 ± 2233.818 ^d	2459.450 ± 1530.756 ^c
20小时	9397.500 ± 5367.452 ^f	4911.550 ± 3235.750 ^g
24小时	5621.563 ± 2676.230 ^h	2385.250 (1237.750 ~ 4081.625) ⁱ
48小时	484.950 ± 445.558 ^j	350.850 ± 235.727 ^k
72小时	82.050 ± 33.686 ^l	149.600 ± 51.890 ^m

注: 与正常对照组相比, ^a*P* < 0.001, ^b*P* < 0.001, ^c*P* < 0.001, ^d*P* = 0.001, ^e*P* = 0.001, ^f*P* < 0.001, ^g*P* = 0.001, ^h*P* = 0.001, ⁱ*P* < 0.001, ^j*P* = 0.011, ^k*P* = 0.010, ^l*P* = 0.002, ^m*P* = 0.029

0.2% CCl₄可以模拟低剂量短时的肝毒性刺激。

实验中, 0.1% CCl₄浓度组血浆转氨酶水平于12小时显著升高, 16小时达到峰值并迅速下降, 48小时恢复正常, 反映了16小时肝损伤程度比较适中、稳定, 易于反映出药物的保肝降酶作用, 然而12小时和20小时之间的转氨酶变化急剧, 因此, 针对大样本量16小时取材的实验, 操作时间则需要严格掌控, 以免造成实验结果在组间或组内有较大的差异, 导致实验数据无法进行质量控制。0.2% CCl₄浓度组转氨酶水平于20小时出现峰值, 16、20、24小时均维持高水平, 反映后者发生了较严重和持久的肝损伤, 尤其20、24小时损伤较重且数据离散度较大, 在此时间段开展药物治疗等实验可能会出现较大的组内差异; 而16小时处于肝损伤的进展阶段, 转氨酶水平升高显著, 此时间点进行肝损伤的相关实验研究结果比20小时平稳。由CCl₄造成的小鼠肝损伤的剂量依赖性推测, 在相同实验条件下, 应用0.3%或者更高剂量的CCl₄处理, 小鼠可能会出现更

严重的肝损伤甚至无法逆转, 更适合急性重度肝损伤的相关研究。根据后续实验要求, 笔者选择以0.1%浓度的CCl₄建立C57BL/6小鼠急性轻度肝损伤模型, 选择该剂量处理后16小时检测小鼠血浆转氨酶水平。

0.1%、0.2% CCl₄致小鼠肝损伤的血浆转氨酶峰值和峰值出现时间点与相关文献的报道均有差别^[18,19], 推测原因可能与模型动物品系、给药方式和应用剂量不同有关。本实验选择近交系C57BL/6小鼠进行造模, 为本课题组今后进行免疫学及药理学相关的后续研究打下基础, 同时也为CCl₄致急性肝损伤的相关研究提供模型选择的实验依据。

参考文献

- [1] Yu H, Zheng L, Yin L, et al. Protective effects of the total saponins from Dioscorea nipponica Makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation[J]. Int Immunopharmacol, 2014. [Epub ahead of print]
- [2] Kim TY, Kim DJ. Acute-on-chronic liver failure[J]. Clin Mol Hepatol, 2013, 19: 349-359.

- [3] Lee HS, Kim HH, Ku SK. Hepatoprotective effects of *Artemisia capillaris* herba and *Picrorrhiza rhizoma* combinations on carbon tetrachloride-induced subacute liver damage in rats[J]. *Nutr Res*, 2008, 28:270-277.
- [4] Lee CH, Park SW, Kim YS, et al. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30:1898-1904.
- [5] Ye JF, Zhu H, Zhou ZF, et al. Protective mechanism of andrographolide against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34:1666-1670.
- [6] 向维, 陈松华, 李朝品. 彩虹明樱蛤多糖对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用[J]. *中国生化药物杂志*, 2012, 33:43-45.
- [7] 许金鹏, 张慧慧, 李朝品, 等. 原卟啉钠对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17: 168-172.
- [8] 顾新, 董丽萍, 刘宇宸, 等. 异甘草酸镁对急性四氯化碳肝损伤小鼠保护作用的研究[J]. *中国药师*, 2009, 12: 37-39.
- [9] 娄猛猛, 李国玉, 王航宇, 等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型的研究[J]. *农垦医学*, 2010, 32: 196-198.
- [10] Zhu R, Zeng G, Chen Y, et al. Oroxylin A accelerates liver regeneration in CCl₄-induced acute liver injury mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e71612.
- [11] 孟繁龙, 李治建, 斯拉甫·艾白, 等. 一枝蒿有效部位对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *医药导报*, 2010, 29: 1266-1268.
- [12] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33:105-136.
- [13] Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, et al. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria[J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 90:381-387.
- [14] Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 37:118-133.
- [15] Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review[J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2007, 25:185-209.
- [16] Lin X, Huang R, Zhang S, et al. Methyl helicterate protects against CCl₄-induced liver injury in rats by inhibiting oxidative stress, NF-κB activation, Fas/FasL pathway and cytochrome P450E1 level[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50:3413-3420.
- [17] Dong D, Zhang S, Yin L, et al. Protective effects of the total saponins from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 62:120-130.
- [18] 周琼, 刘芳萍, 刘颖姝, 等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤动物模型建立方法的研究[J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43: 77-81.
- [19] 冯书营, 李三强, 刘小转, 等. 血管内皮生长因子在四氯化碳诱导的急性肝损伤小鼠肝组织中的表达[J]. *新乡医学院学报*, 2011, 28: 268-271.

收稿日期: 2014-01-09

· 消息 ·

出版物上数字的用法

使用汉字的情形

1. 必须使用: (1)定型的词、词组、成语、惯用语、缩略语或具有修饰色彩的词语。例: 一方面、一律; (2)相邻的两个数字并列连用表示概数, 连用的两个数字间不能用顿号隔开。例: 二、三米、三、五天、十三、四岁、七、八十种; (3)带有“几”字的数字表示约数。例: 一百几十次、十几天; (4)星期几一律用汉字; (5)并列的几个阿拉伯数字与其复指数相连时, 复指数用汉字, 如几组数据中都含有6、7、8三个数字; (6)形容词前面的数字要用汉字。例: 试验方法有四大优点; (7)名词前面的数字“一”必须用汉字。例: 这一性质十分奇特; (8)“一”与量词组成数量词组作定语表示泛指时, 用汉字表示。如: 一种全新的试验方法; (9)叙述和不定数字一律用汉字。例: 无一例死亡, 任何一个患者。

2. 要求使用: (1)各民族的非公历纪年。例: 正月十五、日本庆应三年(1867年); (2)含有月日简称表示事件、节日和其他意义的词组。例: “一·二九”运动(12月9日)、五四运动。

3. 可以使用

(1)非物理量、整数一至十, 如果不是出现在具有统计学意义的一组数字中, 可用汉字, 但要照顾到上下文。例: 四种产品、六条意见、读了十遍、截至1984年9月、我国高等院校有新闻系6个; (2)用“多、余、左右、上下、约”等表示的约数, 一般使用汉字, 如果文中出现一组具有统计学和比较意义的数字, 为保持局部体例上的一致, 其约数也可以使用阿拉伯数字。