

对乙酰氨基酚诱导的小鼠药物性肝损伤的模型研究

李大伟¹ 陆天飞¹ 华相伟¹ 张健健¹ 王维刚² 崔小兰¹ 戴绘娟¹ 张明¹ 夏强^{1*}

(¹上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科, 上海 200127; ²上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 改良对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)单独诱导小鼠急性肝损伤的模型和致死模型。随机将小鼠分为4组: 空白对照组、APAP 3 h组、APAP 6 h组和APAP 12 h组, 每组5只。饥饿15 h后用对乙酰氨基酚诱发小鼠肝损伤。测定各组血清ALT、AST及胆红素含量, HE染色观察各组肝组织损伤情况。观察生存率时, 小鼠随机分为对照组、禁食+APAP(500 mg/kg)组、禁食+APAP(300 mg/kg)组和不禁食+APAP(500 mg/kg)组, 四组同时给药, 然后记录各组小鼠的生存情况, 绘制四组小鼠的生存曲线。小鼠注射APAP后, 随着时间的延长, ALT、AST水平逐渐升高, 均明显高于空白对照组($P<0.05$)。小鼠肝脏HE染色可见, APAP中毒组小鼠肝细胞坏死及炎性细胞浸润。禁食+APAP(500 mg/kg)组小鼠自16 h开始出现死亡, 72 h时全部死亡, 死亡率明显高于不禁食组和禁食+APAP(300 mg/kg)组小鼠。该研究对APAP引起的C57/BL6小鼠药物性肝损伤模型进行改良, 使其更加稳定和便于研究, 为进一步探究APAP诱导肝毒性的机制及防治措施奠定了基础。

关键词 急性肝损伤; 对乙酰氨基酚; 动物模型

The Model of Acute Liver Injury Induced by Acetaminophen in Mice

Li Dawei¹, Lu Tianfei¹, Hua Xiangwei¹, Zhang Jianjian¹, Wang Weigang², Cui Xiaolan¹,
Dai Huijuan¹, Zhang Ming¹, Xia Qiang^{1*}

(¹Department of Liver Surgery, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China;

²Shanghai Research Center of Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract The aim of the study was to improve the acute liver injury model and lethal model of mice induced by acetaminophen (APAP) injection. 20 mice were divided into 4 groups randomly: normal control, APAP 3 h group, APAP 6 h group, and APAP 12 h group. Mice were fasted for 15 hours before APAP injection to induce liver injury. We assayed serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and examined liver pathologic changes after APAP injection by HE staining. 20 mice were divided into four groups: control group, fast+APAP (500 mg/kg) group, fast+APAP (300 mg/kg) group and non-fast+APAP (500 mg/kg) group. The four groups were administrated at the same time. We observed the survival status of mice before and after APAP administration and made survival curve. Serum ALT and AST levels increased by time after APAP administration and were significantly higher than that in control group ($P<0.05$). Liver specimens of APAP mice displayed characteristic centrilobular necrosis and inflammatory infiltration. All mice of fast+APAP (500 mg/kg) group died within 16 to 72 hours, and the mortality was significantly higher than those of the other 3 groups. Our study successfully improved acute liver injury model and lethal model of C57/BL6 mice induced by APAP, which laid the

收稿日期: 2013-12-29 接受日期: 2014-03-10

国家自然科学基金(批准号: 81270558)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-68383775, E-mail: xiaqiang@medmail.com.cn

Received: December 29, 2013 Accepted: March 10, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81270558)

*Corresponding author. Tel: +86-21-68383775, E-mail: xiaqiang@medmail.com.cn

网络出版时间: 2014-05-26 16:09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0435.html>

foundation for further exploration of mechanism and control measures of APAP-induced hepatotoxicity.

Key words acute liver injury; acetaminophen; mice model

对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是临床常用的解热镇痛药,治疗剂量内安全并且疗效可靠。但当使用过量时,APAP可以导致严重的急性肝脏及肾脏功能衰竭,严重者可导致患者死亡。APAP造成的急性肝衰竭已成为发达国家急性肝衰死亡的最常见因素,已引起了严重的公共健康安全[1-2]。对于保守治疗无效的患者,肝移植是唯一有效的治疗措施。

APAP诱导的肝脏毒性是一种毒性代谢损伤,肝细胞内经CYP450酶系代谢转化生成高活性的亲电子物N-乙酰-对苯醌亚胺(N-acetyl-p-benzo-quinone Imine, NAPQI),可通过坏死和凋亡的方式造成肝细胞的死亡,进而活化人体NK、NKT、中性粒细胞,使炎症因子过表达,从而激活人体固有免疫系统[3-4]。最新研究表明[5],人体炎症反应及免疫应答在APAP所致的肝脏毒性中也起重要作用。另外,文献报道认为[6],APAP的肝脏毒性与肝细胞线粒体功能障碍、自由基代谢产物增加及氧化应激等有密切关系。APAP诱导的相关动物肝毒性模型是研究临床上APAP肝损伤的重要手段。本文对APAP诱导的C57/BL6小鼠药物性肝损伤模型进行研究和改良,造模方法简单有效,有助于对APAP肝脏毒性的相关研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、试剂与仪器

实验试剂与仪器: APAP(Sigma公司)溶于PBS中,浓度为20 mg/mL, 55 °C水浴锅加热至完全溶解,现用现配; 10%中性福尔马林; 1 mL注射器。

实验动物: 9周龄健康雄性C57/BL6小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司。小鼠体重22~24 g。

1.2 APAP改良模型的制备

1.2.1 APAP损伤模型制备 C57/BL6小鼠20只,随机分为4组: 空白对照组、APAP 3 h组、APAP 6 h组、APAP 12 h组。所有小鼠均禁食不禁水15 h(晚18:00至第二天早9:00),空白对照组腹腔注射PBS,注射剂量同相同体重APAP组小鼠。APAP 3 h组、6 h组和12 h组小鼠均腹腔注射20 mg/mL的APAP溶液,注射

剂量为500 mg/kg。注射APAP后恢复正常食物供应。

1.2.2 APAP致死模型制备 C57/BL6小鼠20只,随机分为4组: 对照组、禁食+APAP(300 mg/kg)组、禁食+APAP(500 mg/kg)组和不禁食+APAP(500 mg/kg)组,根据组别分别给予腹腔注射PBS或APAP,处理方法同上。

1.3 模型评价

1.3.1 肝功能及肝组织病理损伤的检测 APAP 3 h组、APAP 6 h组和APAP 12 h组共3组小鼠分别于注射APAP后3, 6, 12 h,以3%戊巴比妥钠按0.01 mL/g麻醉,然后采集各组小鼠腹主动脉血。分离血清,测定血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的水平;取小鼠肝组织,用体积分数为10%的福尔马林固定,脱水,石蜡包埋,切片(厚5 μm),HE染色,于显微镜下观察肝组织病理改变。根据病理结果,评定各组标本的SUZUKI评分(主要包括三项指标:充血、空泡形成及坏死程度,每项指标根据严重程度分为0到4分,总分共12分),比较各组肝组织损伤程度。

1.3.2 生存率的测定 四组APAP致死模型:对照组、禁食+APAP(500 mg/kg)组、禁食+APAP(300 mg/kg)组和不禁食+APAP(500 mg/kg)组在处理时每2 h观察小鼠生存状态,连续观察72 h。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计处理。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

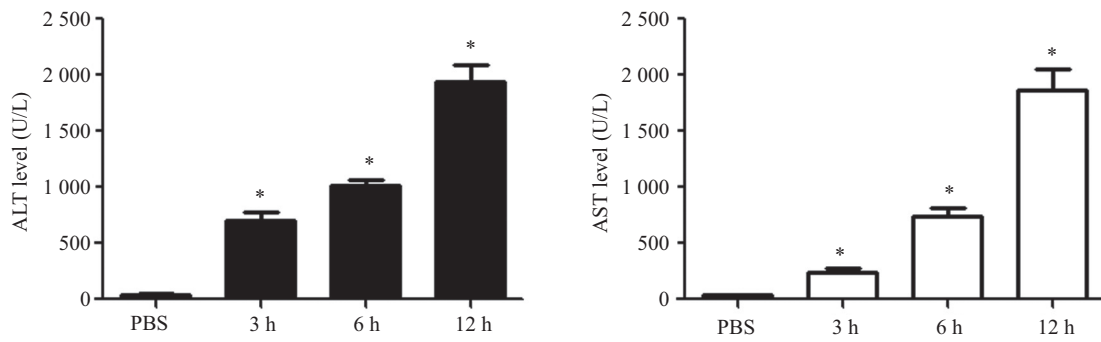
2.1 小鼠肝功能变化

由图1可知,APAP 3 h组、APAP 6 h组、APAP 12 h组与对照组比较,血清ALT、AST均明显高于空白对照组($P < 0.05$),且随时间延长而逐渐升高。

2.2 小鼠肝脏病理变化

肝脏坏死情况逐渐加重。SUZUKI评分亦逐渐增高,与肝脏病理HE染色坏死程度呈正相关(图2和图3)。

空白对照组:肝小叶结构完整,肝细胞绕中央静脉呈放射状排列,肝细胞未见变性、坏死。

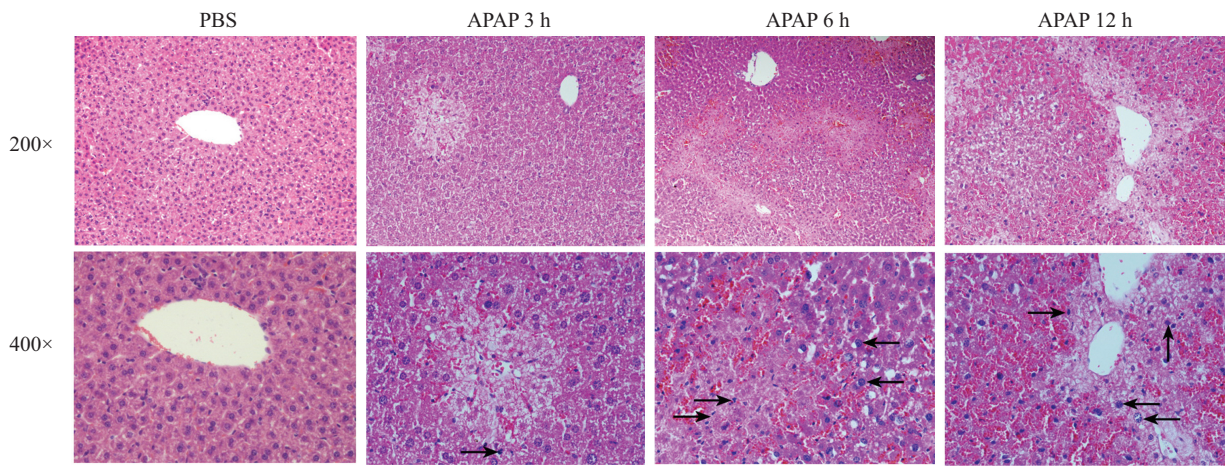


* $P < 0.05$, 与空白对照组(PBS组)相比。

* $P < 0.05$ compared with the control group (PBS group).

图1 APAP处理后ALT和AST随时间的变化

Fig.1 Serum ALT and AST levels increased over time after APAP administration

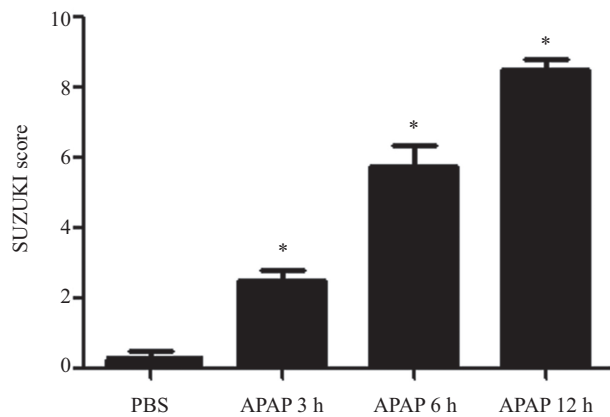


(→): 中性粒细胞; (←): 单核细胞; (↑): 淋巴细胞。

(→): neutrophils; (←): monocyte; (↑): lymphocyte.

图2 APAP处理后小鼠肝脏HE染色随时间的改变

Fig.2 Pathologic changes of HE staining of mice liver after APAP administration



* $P < 0.05$, 与空白对照组相比。

* $P < 0.05$ compared with the control group.

图3 各组SUZUKI评分比较

Fig.3 Comparison of SUZUKI score among different groups

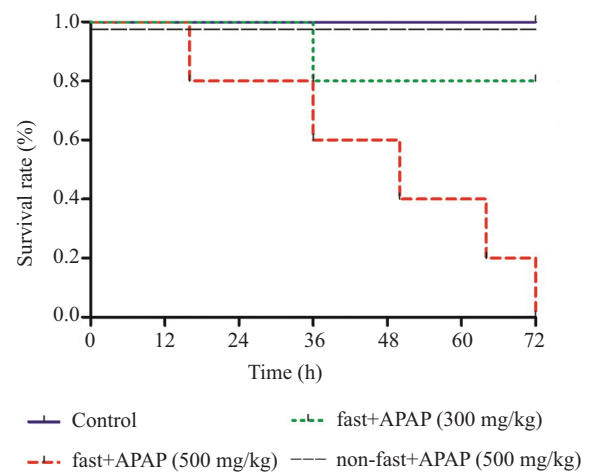


图4 不同处理组间生存率比较

Fig.4 Comparison of survival rates among different groups

APAP 3 h组: 肝小叶轮廓清楚, 部分肝细胞轻度水肿, 胞浆早期气球样变和嗜酸性变。

APAP 6 h组: 肝小叶结构尚可, 可见点状坏死灶及肝细胞水肿和炎症浸润等病变。

APAP 12 h组: 肝小叶结构模糊, 见大片状坏死灶, 门管区大量炎症细胞浸润, 炎症细胞主要以中性粒细胞为主, 其次还有淋巴细胞、单核细胞。

2.3 小鼠生存状态变化

实验观察显示, 禁食+APAP(500 mg/kg)组小鼠注射APAP后体温逐渐降低, 饮食饮水减少, 精神萎靡, 活动性下降。小鼠自16 h开始出现死亡, 72 h时全部死亡, 死亡率100%。禁食+APAP(300 mg/kg)组小鼠同样出现体温降低及萎靡不振, 但生存状况明显优于禁食+APAP(500 mg/kg)组, 72 h死亡率为20%。而不禁食+APAP(500 mg/kg)组出现轻度萎靡, 72 h内无死亡。PBS对照组小鼠无明显饮食、活动改变, 在观察时间内无死亡。生存曲线见图4。

3 讨论

对乙酰氨基酚是临床常用的解热镇痛药, 过量使用容易导致肝脏衰竭甚至死亡, 因此探究对乙酰氨基酚造成肝脏毒性的机制从而研究相应的预防及治疗措施是非常有必要的。建立一套可以在C57/BL6品系下实现APAP诱导小鼠肝脏毒性的模型方法, 对于研究APAP肝毒性的机制及防治措施具有重要的应用价值。

本实验结果显示, 小鼠禁食后给予对乙酰氨基酚(APAP)腹腔注射(500 mg/kg), 血清谷草转氨酶及谷丙转氨酶明显高于空白对照组, 同时肝脏HE染色也可见明显的病理损伤及炎细胞浸润, 并随时间的延长而加重。这些结果提示, 对乙酰氨基酚过量可引起肝脏的炎症反应、肝细胞破坏及造成小鼠肝功能降低。

通过对小鼠生存状态的观察发现, 禁食+APAP(500 mg/kg)组小鼠在注射APAP后, 饮食饮水明显减少, 精神萎靡, 活动性下降。小鼠自16 h开始出现死亡, 72 h时已全部死亡, 而不禁食组及禁食+APAP(300 mg/kg)组小鼠生存状态明显优于禁食+APAP(500 mg/kg)组。空白对照组小鼠生存状态正常, 无精神、饮食及活动方面的变化。这说明适当时间的禁食(15 h过夜)并且给予大量的APAP(500 mg/kg)是造模的关键。这也与临床实践中的发现相一致, APAP多

在空腹和过量服用的情况下导致病人发生急性药物性肝损伤。

对APAP肝细胞毒性的早期研究主要集中在代谢方面, 正常情况下, APAP主要通过CYP450代谢, 通过与葡糖醛酸结合而解毒, 但同时会产生一定量的高活性代谢产物NAPQI, NAPQI可造成细胞膜的脂质过氧化, 并能够影响内质网、线粒体等细胞器的功能, 从而导致肝细胞损伤及死亡。机体通过使NAPQI和谷胱甘肽(GSH)结合而解毒, 但当肝细胞内的GSH耗竭之后, 肝细胞坏死随即发生。及时使用GSH前体乙酰半胱氨酸或巯乙胺处理, 则可减轻对乙酰氨基酚对肝脏的损害。APAP还可以使线粒体的膜流动性降低, 改变线粒体的膜电位, 从而诱发线粒体功能障碍, 继而造成肝细胞坏死。线粒体膜稳定剂, 如环孢菌素A、三氟拉嗪等可明显降低APAP的肝细胞毒性^[7]。

越来越多的研究证实^[8], APAP首先通过毒性代谢产物直接造成肝细胞的坏死和凋亡, 继而激活人体固有免疫系统, 通过活化NK细胞、NKT细胞、中性粒细胞等造成炎症因子表达上调。肝细胞坏死产物激活固有免疫系统的分子机制与无菌炎症反应的过程有很多共同点, 是目前的研究热点。APAP诱导的肝细胞凋亡后产生的DNA可以激活Tlr9, Tlr9与Nalp3协同作用可促使pro-IL-1 β 、pro-IL-18转化成IL-1 β 和IL-18。IL-1 β 是一种重要的促炎因子, 在APAP诱导的肝毒性过程中明显升高。Tlr9拮抗物和阿司匹林可明显缓解APAP造成的小鼠肝功能损害并降低其死亡率。这种保护效果可能与阿司匹林下调促炎因子的表达有关, 应用APAP与阿司匹林的混合制剂可能会对APAP过量时产生的肝细胞毒性有保护作用。中性粒细胞也在APAP引起的炎症过程中起重要作用, 通过阻断中性粒细胞激活的通路, 可明显减轻APAP的肝细胞毒性^[9-11]。关于NKT细胞在APAP肝细胞毒性的发病过程中的作用尚存在争议, 有研究报道, NKT细胞在APAP诱导的肝损中起保护作用, 敲除NKT后损伤加重^[12]。而也有研究认为, NKT促进了APAP的肝毒性^[4]。所以, 固有免疫系统在APAP的发病过程中起的作用可能是多方面的, 明确的机制及其临床应用仍需要进一步的研究。

有文献报道在饥饿情况下, 肝内的谷胱甘肽耗竭, APAP的毒性代谢产物清除不及时更容易造成肝细胞损伤^[13-14]。本实验在饥饿条件下给予小鼠

APAP处理, APAP组小鼠ALT、AST均明显高于对照组, 同时病理组织学检查证实饥饿条件下给予小鼠APAP处理, 可引起肝细胞变性, 并随时间延长逐渐出现炎性细胞浸润, 最终导致肝小叶网架的塌陷及中央型坏死和灶性坏死, 实验组与对照组比较有显著性差异。通过比较生存率发现, 不禁食组小鼠无死亡, 而禁食组小鼠全部死亡, 进一步肯定了禁食对APAP肝毒性的作用。另外, 禁食时间的长短也是造模的关键因素, 过长时间的禁食会造成小鼠的体内代谢紊乱, 增加干扰因素; 而禁食时间太短又会造成小鼠体内剩余食物过多, 无法达到APAP迅速消耗GSH的效果。本研究的病理结果与文献报道的APAP的肝毒性的发展过程相符合, 即在第一阶段, APAP的毒性代谢产物NAPQI通过影响线粒体、内质网的功能及氧化应激等方式造成肝细胞的变性及少量的肝细胞坏死; 在第二阶段, 坏死的肝细胞释放的DNA可以激活人体固有免疫系统, 通过活化NK细胞、NKT细胞、中性粒细胞等造成炎症因子表达上调, 进而加速肝细胞的破坏, 造成肝小叶结构破坏和肝细胞大片状坏死。

APAP诱导的小鼠急性肝脏损伤已有大量的相关模型报道, 但是否禁食、禁食时间的长短及注射APAP的剂量各不相同, 从100 mg/kg到500 mg/kg不等, 这些模型都存在着造模不稳定、不同研究中心的实验数据及不同的实验批次之间差距很大的缺陷。小鼠个体差异明显影响造模成功率。本模型模拟临床病人发病情况, 造模前对小鼠预先禁食15 h, 消耗小鼠食物储备, 进而消除小鼠的饮食差异对造模的影响, 然后腹腔注射大剂量APAP(500 mg/kg)。小鼠72 h内死亡率为100%, 转氨酶随时间延长而升高, 模型稳定性明显优于低剂量300 mg/kg组及不禁食组。综上所述, 本文介绍了可以有效且稳定地诱导C57/BL6小鼠APAP肝中毒模型的方法, 同以往模型相比, 本方面造模简单, 稳定性高, 可供研究者对APAP引起的肝损伤同时进行肝功能及生存率的研究。该模型的应用对进一步研究APAP肝毒性的发

病机制及防治措施具有重要意义。

参考文献 (References)

- 1 Lee WM. Acetaminophen toxicity: Changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology* 2007; 46(4): 966-70.
- 2 Kaplowitz N. Acetaminophen hepatotoxicity: What do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* 2004; 40(1): 23-6.
- 3 Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 2006; 43: 1220-30.
- 4 Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004; 127(6): 1760-74.
- 5 Connolly MK, Ayo D, Malhotra A, Hackman M, Bedrosian AS, Ibrahim J, *et al.* Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 2011; 54(3): 959-68.
- 6 Saini SP, Zhang B, Niu Y, Jiang M, Gao J, Zhai Y, *et al.* Activation of liver X receptor increases acetaminophen clearance and prevents its toxicity in mice. *Hepatology* 2011; 54(6): 2208-17.
- 7 Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(2): 509-16.
- 8 Connolly MK, Ayo D, Malhotra A, Hackman M, Bedrosian AS, Ibrahim J, *et al.* Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 2011; 54(3): 959-68.
- 9 Marques PE, Amaral SS, Pires DA, Nogueira LL, Soriani FM, Lima BH, *et al.* Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* 2012; 56(5): 1971-82.
- 10 Jaeschke H, McGill MR, Williams CD. Pathophysiological relevance of neutrophils in acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 2013; 57(1): 419.
- 11 Jaeschke H, Liu J. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity: Another perspective. *Hepatology* 2007; 45(6): 1588-9; author reply 1589.
- 12 Martin-Murphy BV, Kominsky DJ, Orlicky DJ, Donohue TM Jr, Ju C. Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2013; 57(4): 1575-84.
- 13 James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(12): 1499-506.
- 14 Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: Apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 2002; 67(2): 322-8.